通过操控DNA的结构实时分析Cas9 的结合与剪切特性

基因编辑应用案例

2019

LUMICKS

本文为LUMICKS应用案例指南，欢迎大家免费引用。

内容目录

序言 3

研究难点和解决方案 4

研究难点 4
解决方案 4

实验设计 5

DNA拴系结构和操控 5
Cas9样品制备 5

实验 6

1. DNA气泡引起的脱靶结合 6
2. 脱靶结合信号的持续时间 7
3. 脱靶事件中的DNA链特性 8
4. 脱靶事件的序列特异性 8
5. Cas9催化活性的动力学研究 9

结论 11

附注 11
合作者 11
参考文献 11

通过操控DNA的结构实时分析Cas9 的结合与剪切特性

基因编辑简介

自从细菌CRISPR-Cas 体系引入到科学研究中，基因编辑领域的广泛性和应用性都得到了很大的提高，其中发展最为迅速的是Cas9系统，其成功的原因得益于其简单的特性，科研工作者通过将序列识别引导RNA (gRNA）与核酸内切酶Cas9结合实现无缝编辑DNA序列。该方法使科研工作者能够瞄准几乎所有类型的活细胞内的基因组位点，并且操纵基因序列、转录产物或者细胞功能。Cas系统已经广泛应用到临床前和临床应用当中，但我们仍然需要更好的更详细的理解其特性。特别的是，随着基因编辑工具的发展及其进入临床领域，对其靶标特异性及其脱靶特性的了解成为重中之重。

这篇应用报告为您介绍一种新型的动态单分子分析技术，使得您能够研究Cas相关复合物和其他基因编辑工具的结合与切割特性。我们展示了伦敦帝国理工学院David Rueda教授最新发表的科研成果，这些成果是在LUMICKS C-Trap光镊-共聚焦荧光集成系统上获得的。

本文亮点

这篇应用报告为您展示如何使用光镊-共聚焦荧光集成系统获得Cas9结合和切割机制的高分辨和基于单分子的动态数据。我们向您介绍在C-Trap系统上开展的五个实验，这些实验用于评估DNA结构变化时的Cas9结合和酶学特性。

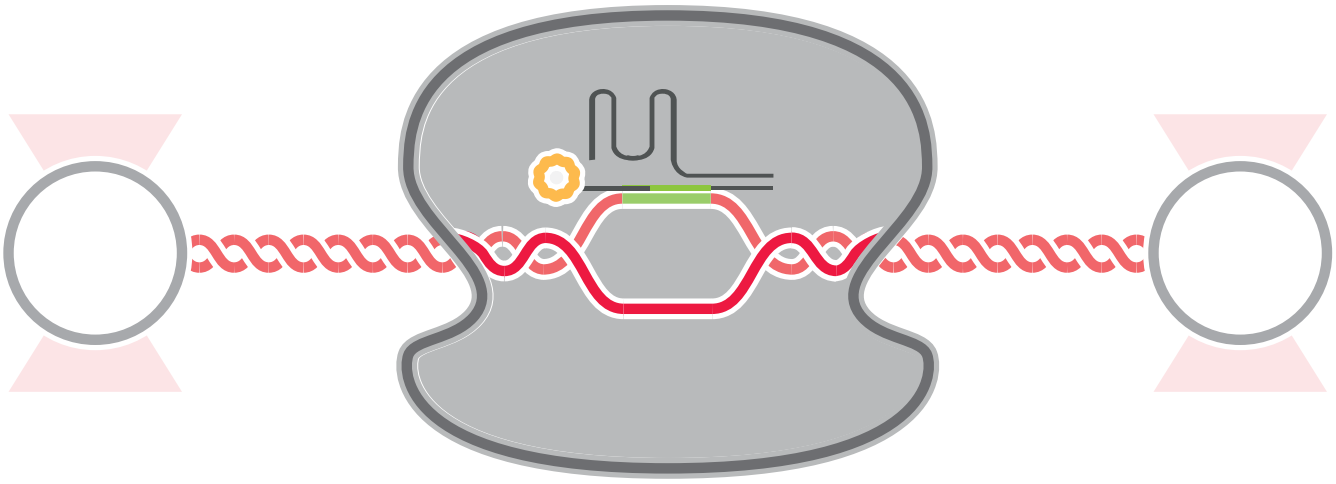
- 基因组结合特异性
- 脱靶持续时间
- 序列依赖的结合特性
- DNA结构依赖的结合特性切割动力学
- 研究难点和解决方案

样品和数据礼貌

感谢伦敦帝国学院的David Rueda教授提供数据和样品

参考文献

Newton et al. (2019) Nat Struct Mol Biol.



研究难点

研究难点

尽管Cas9已经是广泛应用的基因编辑系统，但旨在了解Cas9机制和特性的大部分研究仍然依靠批量研究和回顾性资料解析。此类实验包括报告基因实验，Sanger或者NGS，蛋白定量或者凝胶实验。

虽然对Cas9活性研究结果非常有价值，但是这些结果通常缺乏高时-空分辨或Cas9实时编辑动力学的数据。相反的是，大批量的细胞群的基因编辑评估结果通常依靠群体平均和回顾性基因型或者表型的变化。相反的是基因报告实验使得你能够实时追踪Cas9活性，但通常需要进行突变实验，并且不能提供真实Cas9编辑事件的详细读出结果。

此外，由于Cas9的特异性结合和切割对于可靠的基因编辑非常重要，尤其是因为它在临床研究上表现出的巨大潜力，因此更加广泛的研究旨在了解意外脱靶结合和切割相关的特征。目前，已经有多种在线工具使科研工作者通过对设计的gRNAs进行目标保真度打分来设计目标特异性的复合物。然而，最近的研究表明设计工具中遗漏了几个不能单独用序列解释的脱靶位点[2-4]，可能在Cas9结合和切割的过程中DNA的结构发生变化。我们这里展示一种高准确度和高时-空分辨的寻找脱靶位点的方法。

解决方案

基于C-Trap光镊-共聚焦荧光集成系统发展起来的动态单分子分析给予你实时研究Cas9相关的结合和切割等科学过程。该系统所具备的高时-空分辨率特性允许你在详细探测瞬态事件，同时使用pN尺寸的拉伸力操纵DNA的构象变化。因此，他能够补充和拓展您从传统批量实验中获得的实验结果。C-Trap集成了三种主要功能，使他成为在不同基因条件下评估基因编辑的力学工具：

1. 高性能光镊系统：内切酶靶向过程中，操控单根DNA分子的构象和特征变化；
2. 高分辨多色共聚焦荧光以及无标记成像系统追踪内切酶以及其他相关蛋白与DNA的结合事件
3. 高性能的微流控系统加速你的实验流程。

实验内容

实验设计

光镊系统使用激光束的辐射压力捕获微米尺度的颗粒，如微球。可以通过简单的控制光束的方向和力来控制捕获的微球的位置。您可以依靠这个原理来开展单分子的研究，例如DNA分子，通过将分子的末端链接到两个PS微球上，接下来，您可以使用低至皮牛顿的力来拉伸分子，以达到所谓的DNA轮廓长度，这是延伸能达到的最大长度，并且不会破坏DNA的碱基对（图1），要人为的创建DNA气泡（DNA气泡也是在DNA复制或者转录等细胞过程中形成的结构），您可以使用至少20pN的力拉伸DNA分子，这些气泡能够评估不同结构条件下的Cas9的结合和切割特性。

Cas9 制备及靶向

为了研究Cas9在DNA分子链上的位置，您可以将具备催化活性的或者没有催化活性的Cas9与荧光标记的crRNA（一种与目标DNA位点互补的20个核苷酸长度的序列）结合起来。标记后的复合物加载到微流控系统的中的特定通道中，最终让您实时追踪DNA上的核酸酶复合物。在这项研究中，研究工作者使用两个独立的crRNA靶向同一个DNA分子上的不同序列，以证实他们在不同靶向序列中的发现。他们使用具备催化活性的Cas9来评估靶向特异性和切割特性，并使用dCas9研究结合特异性。在此实验中，他们使用的Cy3或者Cy5来标记crRNAs.

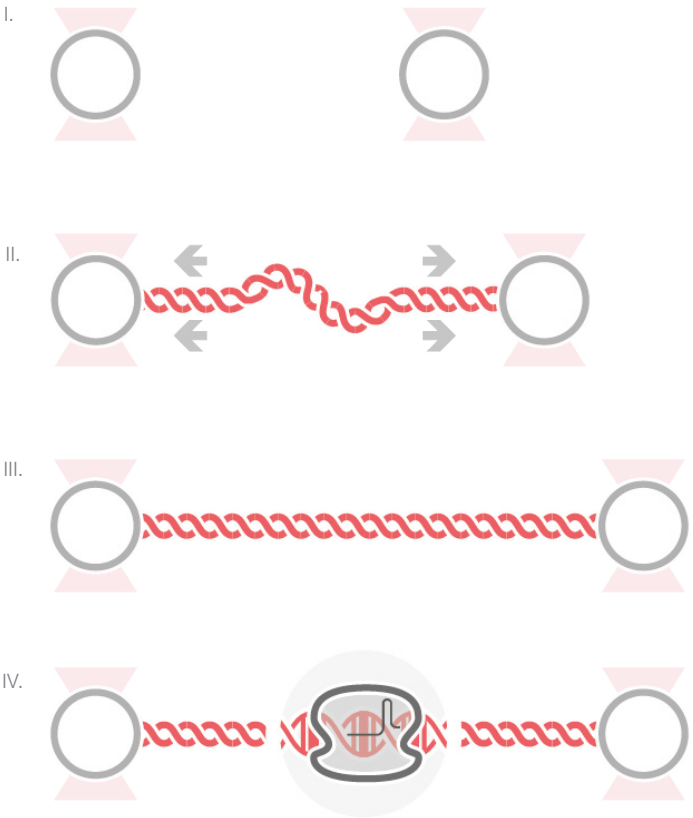


图**1a** 拉伸DNA至确保评估Cas9功能的整个工作流程示意图。样品在层流微流控通道中完成，I. 微球通道 II. DNA 通道 III. 缓冲液通道 IV. 成像（染料）通道

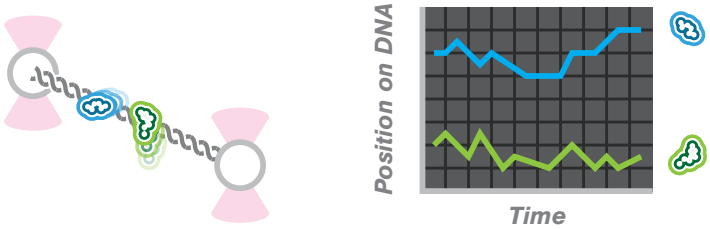


图**1b** Cy系列荧光标记的Cas9与DNA分子的结合示意图，数据格式为kymograph

数据输出

在这些实验中，科研工作者通过标定Cy系列荧光随时间的变化曲线定位荧光标记的Cas9蛋白与DNA分子的结合事件，数据格式为kymograph，其中横坐标为时间，纵坐标为蛋白在DNA上的位置。Kymograph数据形式展示了荧光标记的蛋白在DNA上的实时定位。

实验过程

1 DNA气泡产生的脱靶结合

借助于LUMICKS C-Trap光镊系统，研究人员通过施加不同的拉伸力操作DNA结构。C-Trap上集成的共聚焦荧光显微系统追踪荧光标记的dCas9复合物，保证研究人员识别DNA轮廓长度上的特异性靶向结合事件。此时，并没有非特异性的脱靶结合事件的产生。接下来，研究人员使用20pN的力拉伸DNA分子诱导DNA气泡的产生，此时，在共聚焦荧光图像上出现了多个dCas9复合物与DNA的脱靶结合位点。更有趣的是，将拉伸力降低到5pN，此时DNA恢复到轮廓长度，导致dCas9复合物与所有脱靶位点解离，仅仅维持单个特异性的靶向结合位点。

接下来，研究人员通过增加DNA分子上的拉伸力（20pN到50pN）定量研究力与脱靶结合位点的关系。施加20pN的拉伸力时观测到6个脱靶结合位点，更高的拉伸力产生的脱靶位点以力大小依赖的方式依次增加。更重要的是，许多脱靶位置是反复产生的，在拉伸力恢复到5pN时依然仅仅维持了特异性的靶向结合位点。

DNA构象的变化如何影响dCas9靶向结合和脱靶结合事件的数量?

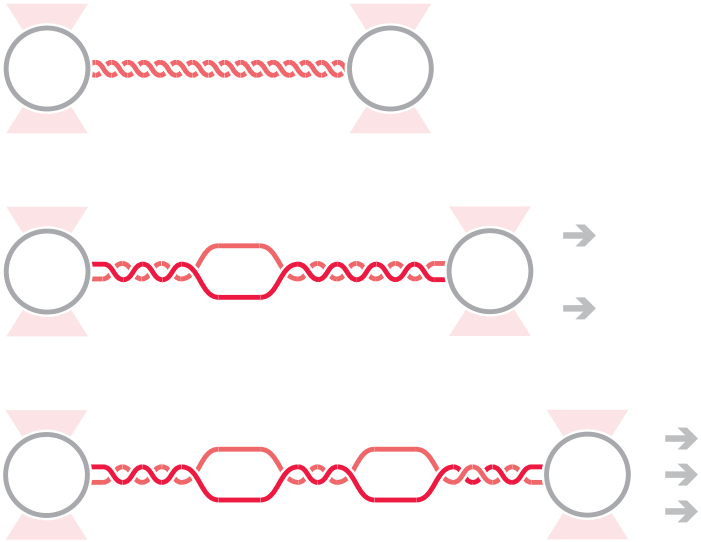


图3 拉伸DNA导致DNA气泡产生的整个过程的示意图。

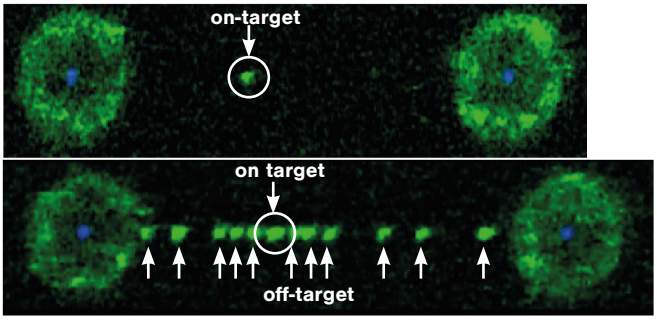


图2 荧光标记的dCas9复合物（绿点）特异性靶向固定在两个光镊捕捉的小球间的DNA分子（上）；施加20pN或者更高拉伸力时导致dCas9复合物与DNA分子产生更多的脱靶结合。

2 脱靶结合事件的持续时间

研究课题组同时评估了同一个dCas9复合物产生的几百个脱靶结合事件的持续时间。使用与实验1中相同的拉伸力（20pN到50pN），他们发现两个与脱靶结合模式相关的群体，快速（短期结合）和慢速（长期结合）群体。这两个种群各自的结合寿命几乎恒定（平均时间，快=9.0秒，慢=61秒）。值得注意的是，20pN的拉伸力仅建立快速的脱靶结合，但是更高的拉伸力（30,40或者50pN）通常同时导致快速和慢速的脱靶结合。

dCas9与其脱靶位点结合后多久才会解离?

Cas9 结合总结

从Cas9的切割属性中把Cas9与DNA的结合抽离出来，此结合的研究对于理解Cas9分子的不同应用包括转录控制和基因编辑都有非常重要的意义，我们这里展示如何使用C-Trap分析Cas9复合物的结合机制以及：

- 在不破坏DNA序列的情况下实时监测结合位点（靶向和脱靶）
- 比较Cas9与单链DNA和双链DNA的结合
- 研究DNA结构如何影响Cas9与DNA的结合

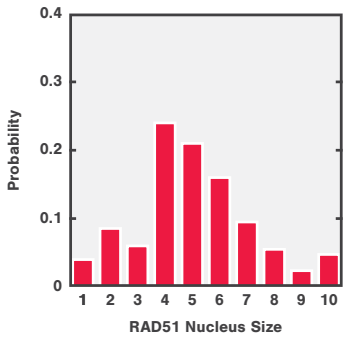


图**4** 两个不同的脱靶群体（快速和慢速）以及他们在脱靶位点上各自持续时间。

你可以使用C-Trap做什么?

- 研究DNA结合蛋白如何影响Cas9的结合
- 评估Cas9的结合事件是否会损害其他DNA结合蛋白与DNA的结合
- 研究表观基因态如何影响Cas9的结合
- 定量测量不同crRNA特异性Cas9复合物结合持续时间的差别

Experiments

3 脱靶事件中DNA链的特性

dCas9复合物与eGFP标记的人复制蛋白A (hRPA) 竞争实验可以检测dCas9对 DNA模板的结合选择性，其中hRPA是单链DNA特异性结合蛋白。研究人员使用C-Trap集成的多色共聚焦荧光成像系统分辨和定位DNA上的两种蛋白。5pN到65pN间的拉伸力导致单链DNA区域面积的增加。在施加较低的力时，hRPA少量结合双链DNA上缺口导致的单链DNA位点，而当施加到较高的拉伸力时（60-65pN），hRPA结合了更大的区域。重要的是，hRPA和dCas9从来没有发生共定位现象，这表明不管是缺口或者单链DNA都不能诱导dCas9的脱靶结合（图5）

Cas9复合物特异性结合单链DNA还是双链DNA?

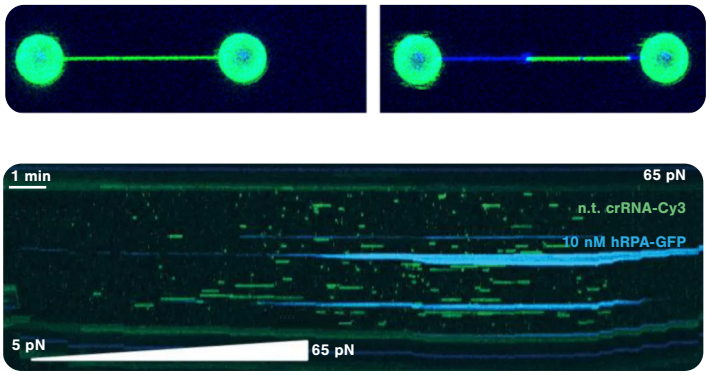


图**5**上图为双光镊捕捉的小球在较小拉伸力下拉伸Sytox标记（绿色）的双链DNA分子，在过度拉伸的情况下，hRPA（蓝色）结合区域的增加。下图的Kymograph数据形式展示了荧光标记的dCas9（绿色）和hRPA（蓝色）与DNA分子结合的竞争性实验结果，这两种蛋白是相互排斥的。

4 检测靶向结合事件的序列特异性

为了测量脱靶结合特征，研究人员在dCas9聚合物的体系中，使用40pN的力连续拉伸DNA三次。Kymograph数据表明，每次拉伸后结合位点总是反复出现；并且，降低拉伸力到5pN时，重新建立了DNA的轮廓长度，恢复了对应于各个crRNA的单个特异性的靶向结合。

值得注意的是，每次40pN的拉伸都会导致相同的特异性结合位点和脱靶结合位点的产生，这表明脱靶结合高度依赖于DNA的内在特征；有趣的是，观察到的结合位点与常见的脱靶预测工具预测的脱靶位点没有共定位，这表明目前的预测工具可以会错失多个脱靶位点。

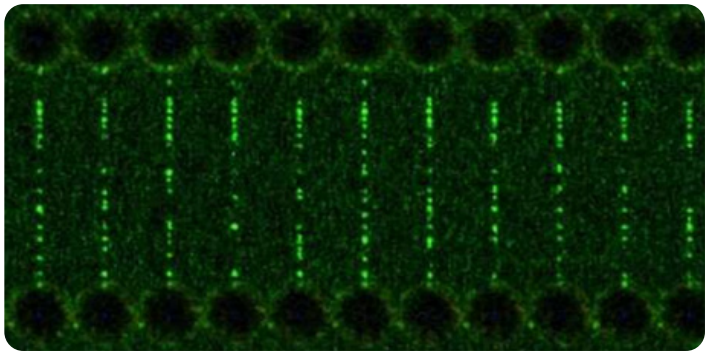


图**6** 拉伸DNA上的Cas结合事件

发生在DNA气泡出的脱靶结合具备序列特异性吗?

5. Kinetics of catalytically active Cas9

借助于高性能层流微流控系统，研究人员把DNA核酸酶复合物从包含EDTA的环境中转移到包含Mg2+的通道里，激活Cas9核酸酶活性。此时，他们测试了随着施加在DNA分子上的拉伸力增加（5pN到55pN）对Cas9诱导切割能力的影响。

较小的拉伸力（5pN）在十秒内都不会破坏DNA的结构，当力增加到40pN时，DNA分子在切割位点产生破坏（图7），有趣的是，Cas9在DNA断裂后仍然与DNA结合，这表明，实际的DNA切割发生在DNA与复合物结合的早期，而复合物的解离需要非常大的机械力。

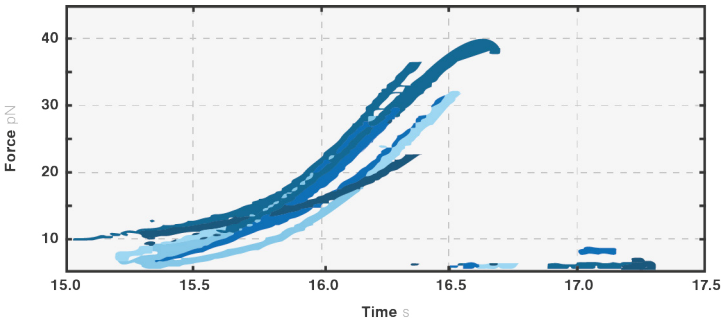


图7 此图为力-距离的曲线图，表明切割后施加在DNA上力及相应的DNA长度和断裂的关系

需要多大的力才能建立DNA断裂及切割后Cas9结合的关系?

C-Trap可以在下列研究中提供帮助:

- 测试核酸酶与DNA间的相互作用是否会损害DNA与其他蛋白的结合（如DDR蛋白）。
- 测试DNA结合蛋白是否会损害核酸酶的结合。
- 测量表观基因态如何影响核酸酶诱导的DNA切割 。
- 评估DNA构象（发卡结构，超螺旋，气泡）如何影响切割 。
- 复合物结合时核酸酶诱导的切割时间 。

Cas9 结合总结

大多数使用Cas9或者其他编辑工具的研究依靠各自核酸酶的催化活性，了解核酸酶的动力学有助于优化编辑工具。这里我们为您展示如何使用C-Trap提高对Cas9切割的理解以及:

- 测试您的核酸酶（Cas9）是否具备催化活性 。
- 测量DNA切割后核酸酶的持续时间 。
- 测量切割后破坏DNA或者解离核酸酶需要力的大小 。

结论

本篇报告中，我们为您介绍了使用LUMICKS C-Trap光镊-共聚焦荧光集成系统用于定位和量化在Cas9复合物与可力学操控的目标DNA结合的相关特征。请务必注意，基于C-Trap的相关测量可以应用于研究各种基因编辑工具，不管是CRISPR衍生系统（Cas9,Cpf1,Cas8等），或者其他不相关的系统（如TALENs或者锌指核酸酶）。

基因编辑是非常先进的技术，但是仍然有许多力学相关的研究可供探索。LUMICKS C-Trap光镊-高分辨荧光显微集成系统是一套非常强大的系统，有效补充和扩展传统批量检测以及其他传统检测分析实验获得的数据。

C-Trap系统将高动态范围和高灵敏的力学测试及操控系统与各种显微成像技术无缝集成，您可选择宽场，共聚焦和STED超分辨成像系统对基因编辑工具与目标分子（DNA或者RNA）的相互作用实时成像。更重要的是，这套完整的系统支持三通道的荧光激发，让您有机会识别更多的不同的蛋白与目标分子的共定位。

备注

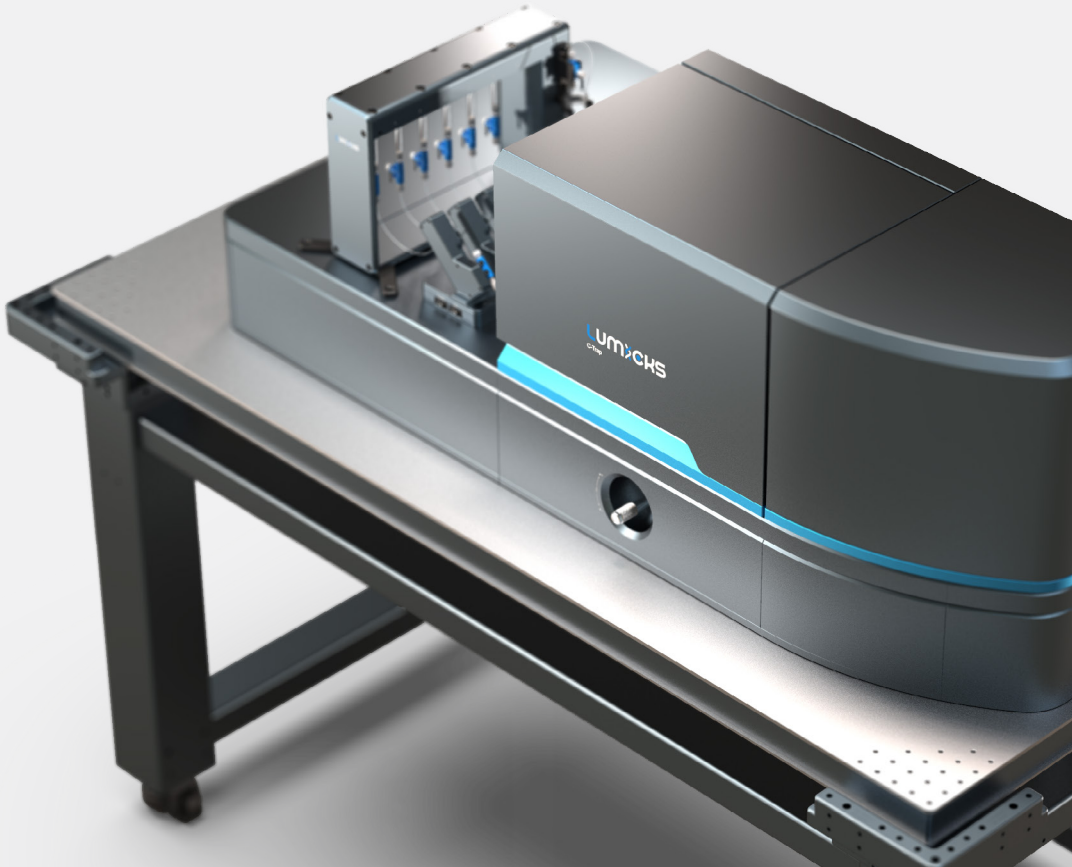
这篇应用报告中展示的所有实验可以在Newton et al与2019年发表在Nature Structure & molecular biology上的文章中找到。

合作者

伦敦帝国理工大学 Rueda Lab

相关文献

1. Newton MD, et al. DNA stretching induces Cas9 off-target activity. Nat Struct Mol Biol 26(3):185-92. 2019.
2. Kim D, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. Nat Methods 12(3):237-43, 1 p following 243. 2015
3. Tsai SQ, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat Biotechnol 33(2):187-97. 2015
4. Tsai SQ, et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. Nat Methods 14(6):607-14. 2017



info@lumicks.com
www.lumicks.com

Or find us on:

LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41

1059 CH Amsterdam, The Netherlands

+31 (0)20 220 0817

LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100

Waltham, MA 02453, USA

+1 781 366 0380

LUMICKS亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成中心A座 577房间

电话：+86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)'. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available “as is” and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.