



引用格式:林志贇,邹康文,万逸,等.中温性 Argonaute 核酸酶的体外切割活性研究及其在 MRSA 基因检测中的应用[J].海南大学学报(自然科学版中英文),DOI:10.65658/j.hndk.2025122401.

Citation:LIN Zhiyun, ZOU Kangwen, WAN Yi, et al. Characterization of a Mesophilic Argonaute Nuclease for in vitro Cleavage and Its Potential Application in MRSA Gene Detection[J]. Natural Science of Hainan University, DOI:10.65658/j.hndk.2025122401.

Open Access

中温性 Argonaute 核酸酶的体外切割活性研究及其在 MRSA 基因检测中的应用

林志贇^{1,2}, 邹康文^{1,2}, 万逸^{1,2}✉, 宋凤阁^{1,2}

(1. 海南大学海洋生物与水产学院, 海南 海口 570228;

2. 海南大学, 海洋科学学院, 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要: 随着水产品生产和加工的不断发展, 耐药微生物及其基因带来的安全风险逐渐引起关注。基于基因编辑系统的分子传感器, 特别是无需原间隔区邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)位点的 Argonaute 蛋白, 已成为核酸检测的重要发展方向。为获取中温性 Argonaute 核酸酶 CbAgo(*Clostridium butyricum* Argonaute)蛋白并验证其在人源耐药机会致病菌检测中的可行性, 本研究采用 pET-28a/Rosetta(DE3) 表达体系, 在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG、 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 下诱导表达 16 h, 成功获得了可溶性重组 CbAgo 蛋白。经镍柱纯化获得约分子量约为 87 kDa 的 CbAgo 蛋白。结果表明, CbAgo 蛋白能够在引导 DNA(Guide DNA, gDNA)引导下特异性识别并切割单链 DNA, 进一步优化反应体系后, 成功实现模拟人源耐药机会致病菌单链核酸片段的切割释放。因此, CbAgo 蛋白有望应用于后续海洋环境中人源耐药机会致病菌现场检测及基因编辑研究。

关键词: CbAgo; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 人源耐药机会致病菌; 海洋环境安全; 病原检测

中图分类号: X55 **文献标志码:** A

DOI: 10.65658/j.hndk.2025122401 CSTR: 32403.14.hndk.2025122401

Characterization of a Mesophilic Argonaute Nuclease for in vitro Cleavage and Its Potential Application in MRSA Gene Detection

LIN Zhiyun^{1,2}, ZOU Kangwen^{1,2}, WAN Yi^{1,2}✉, SONG Fengge^{1,2}

(1. School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in the South China Sea, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: With the continuous development of aquatic product production and processing, the safety risks posed by drug-resistant microorganisms and their genes have gradually attracted attention. Molecular sensors based on gene editing systems, especially Argonaute proteins that do not require protospacer adjacent motif (PAM) sites, have become an important direction in nucleic acid detection. To obtain the mesophilic Argonaute nuclease CbAgo (*Clostridium butyricum* Argonaute) and assess its feasibility in detecting human-derived drug-resistant opportunistic pathogens, the pET-28a/Rosetta(DE3) expression system was employed in this study.

Received: 2025-12-24; **Revised:** 2026-01-15; **Accepted:** 2026-01-22;

✉ **Corresponding author(s):** WAN Yi, E-mail: 993602@hainanu.edu.cn

Soluble recombinant CbAgo protein was successfully expressed by induction with $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG at $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 hours, followed by purification via nickel-affinity chromatography, yielding protein of approximately 87 kDa. The results showed that the CbAgo protein could specifically recognize and cleave single-stranded DNA under the guidance of guide DNA (gDNA). After further optimization of the reaction system, the cleavage and release of simulated single-stranded nucleic acid fragments of human-derived drug-resistant opportunistic pathogens were successfully achieved. Therefore, the CbAgo protein shows potential for application in subsequent detection of human-derived drug-resistant opportunistic pathogens in marine environments and gene editing research.

Keywords: CbAgo protein; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Human-derived drug-resistant opportunistic pathogens; Marine Environmental Safety; Pathogen detection

0 引言

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)虽然并不是典型水产病原菌,但作为人源耐药机会致病菌,其在海洋环境中的分布日益增多,可指示人类活动导致的耐药微生物输入风险。随着海洋牧场建设和现代渔业的持续发展,集约化养殖和规范化管理在提升水产品供给能力的同时,也对近海微生物组成与分布格局产生了一定影响^[1-3]。在养殖生产和水产品加工过程中,人员频繁参与使部分人源微生物进入海洋环境,带来潜在的公共卫生风险,其中耐药菌及其耐药基因的出现与累积逐渐受到关注^[4]。MRSA 作为典型的人源耐药机会致病菌,已被证实可随人类活动进入海洋环境,其生态学意义主要体现在对人源耐药菌输入海洋系统的指示作用^[5-9]。此外,MRSA 在水产品加工和流通过程中仍可能引发机会性感染,对水产品安全和从业人员健康构成潜在威胁^[10-13]。综上所述,建立针对 MRSA 等耐药相关基因的检测方法,对于识别人为耐药风险和加强海洋牧场与现代渔业的微生物安全管理具有重要意义。

基于基因编辑系统构建的分子传感器已成为核酸检测领域的重要发展方向,其中以成簇规律间隔短回文重复序列 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)介导的检测体系最为成熟。CRISPR 源于原核生物基因组中的成簇规律间隔短回文重复序列,是细菌为了抵御外来入侵基因所进化出的系统,具有特异性识别并切割目的基因的功能^[14-16]。基于这一特性,CRISPR 被用来开发出新型检测手段检测食源性病原菌、药物、各类小分子等^[17-19],但因该基因编辑工具介导的检测体系只在特定原间隔区邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)附近工作,限制了其可识别和可编辑的核酸位点范围。因此,探索不受 PAM 位点限制的新型核酸识别与切割工具,具有重要的研究意义和应用价值。

Argonaute 蛋白介导的核酸检测体系作为一种无 PAM 位点限制的体系,有望在特定场景下补充甚至突破 CRISPR 技术局限的新策略,近年来逐渐受到关注。该类体系具有靶标序列选择灵活、特异性高、反应温和等优势,正在分子诊断领域展现出重要的应用潜力^[20]。Argonaute 蛋白家族最初因其在真核生物(如植物、动物)的 RNA 干扰中起关键作用而被熟知^[21]。与 CRISPR 系统依赖 RNA 引导和 PAM 位点不同,Argonaute 系统可在引导 DNA(Guide DNA, gDNA)引导作用下,对互补 DNA 靶标精准识别,并在 5'端第 10-11 位碱基之间进行特异性切割^[20]。早期研究表明,来源于嗜热菌的 *Thermus thermophilus* Argonaute (TtAgo)蛋白在体外 $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下可以利用 DNA 引导链来切割 DNA 靶链^[22]。然而,其对高温反应条件的依赖限制了实际应用。随后研究发现, *Clostridium butyricum* Argonaute(CbAgo)蛋白同样能够介导 DNA 引导的 DNA 切割反应,并且可在常温条件下发挥活性^[23,24],从而显著拓展了 Argonaute 体系在分子诊断领域的应用潜力。

基于上述背景,本研究以中温性 Argonaute 核酸酶 CbAgo 蛋白为研究对象,对其表达与纯化过程进行了系统优化,并验证了其对于双链 DNA(dsDNA)的识别与切割能力。在此基础上,进一步优化了

CbAgo 蛋白介导的单链 DNA(ssDNA)识别反应体系,确定了适用于检测的反应条件。以 MRSA 基因组为模型靶标,模拟实际样本条件,验证了 CbAgo 蛋白在 MRSA 基因检测中的可行性。研究表明,相比于 CRISPR 检测体系需特定的 PAM 位点才可激活蛋白反式切割活性,CbAgo 蛋白可在不依赖 PAM 位点的常温情况下实现核酸特异性切割,为建立针对 MRSA 等耐药相关基因的现场检测提供了实验依据,有助于识别人为耐药风险并支撑海洋牧场与现代渔业的微生物安全管理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 表达质粒与菌株 pJH-MBP-CbAgo 购自于 Addgene(货号: 127 707; 抗性: 卡那霉素; 标签: N 端 MBP 标签)。pET-28a-TEV 购自于杭州宝赛生物科技有限公司(抗性: 氨苄青霉素; 标签: N 端 6×His)。Rosetta(DE3)感受态购自北京索莱宝科技有限公司(Solarbio)。

1.1.2 实验试剂 本实验所用试剂与耗材涵盖核酸和蛋白质分析等多个方面,在核酸实验中,琼脂糖(Thermo Fisher Scientific)用于制备电泳凝胶,配合 50×TAE Buffer(Sangon Biotech)或 10×TBE Buffer(Solarbio)稀释后作为电泳缓冲液;采用 GeneGreen 核酸染料(天根生物)进行凝胶染色,并以 50 bp DNA Ladder(Solarbio)作为分子量标准。在核酸提取实验中,采用 E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit D3350(OMEGA)提取细菌基因组 DNA,质粒提取试剂盒(OMEGA)提取质粒,上样时需添加 6×DNA loading buffer(索莱宝)。在蛋白分析实验中,30% Acr-Bis(Solarbio)与 TEMED(Solarbio)用于 SDS-PAGE 凝胶的配制,上样时添加 5× SDS-PAGE Protein Loading Buffer(碧云天),180 kDa Protein Mark(Solarbio)作为分子量标准。蛋白纯化实验中,Ni-NTA Agarose(真知生物)与 GE 肝素柱(天地人和)作为蛋白纯化的吸附柱,蛋白酶抑制剂(德国达姆施塔特默克)用于抑制纯化过程中蛋白酶对目的蛋白的影响。

1.1.3 仪器设备 超净工作台(上海博迅);高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);蛋白纯化仪 NGC(美国伯乐);纯水仪(德国达姆施塔特默克);精密天平(上海楚定分析仪器有限公司);恒温光照培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);pH 计(上海雷磁);振荡培养箱(浙江华盛仪器有限公司);电泳仪(广州道一科学技术有限公司);凝胶成像系统(美国 GE 医疗);PCR 仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司);冰箱(珠海格力电器股份有限公司);高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);超低温冰箱(中科美菱);恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 pJH-MBP-CbAgo 质粒提取 含 CbAgo 表达质粒的穿刺菌株(Addgene)接种于含卡那霉素的 LB 固体培养基上,于 37 °C 培养 12 h。挑取单个阳性菌落,在超净工作台内接种至含卡那霉素的 LB 液体培养基中,于 37 °C 振荡培养 12 h 以扩增菌体。取 2 mL 菌液,于室温条件下以 10,000 ×g 离心,弃上清,收集菌体沉淀。向沉淀中加入 250 μL Solution I/RNase A 混合液,充分涡旋振荡使菌体完全重悬;随后加入 250 μL Solution II,轻轻颠倒混匀,室温静置不超过 5 min,避免剧烈振荡。加入 350 μL Solution III,轻柔颠倒混匀,直至形成白色絮状沉淀后,以 10,000 ×g 离心。将上清液转移至硅胶吸附柱中,10,000×g 离心后弃去滤液。依次加入 500 μL HB Buffer 和 700 μL DNA Wash Buffer 洗涤,均以 10,000 ×g 离心弃去滤液,其中 DNA Wash Buffer 洗涤步骤重复一次。随后进行空柱离心以去除残余乙醇。将吸附柱置于 1.5 mL 离心管中,加入 30 ~ 50 μL Elution Buffer,室温静置 1 ~ 2 min 后,以 10,000 ×g 离心洗脱 DNA,获得 pJH-MBP-CbAgo 表达载体。所得质粒送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.2.2 pJH-MBP-CbAgo 质粒转化 将 3 μL pJH-MBP-CbAgo 表达载体(50 μg/mL)与 100 μL Rosetta(DE3)感受态细胞吹打混匀,冰浴 30 min。随后于 42 °C 热激 30 ~ 90 s,立即放回冰上继续冰浴 5 min。加入 500 μL LB 液体培养基,置于 37 °C 摇床振荡培养 2 h。离心收集菌体沉淀,弃上清,最后将菌液涂布于含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 固体培养基上,37 °C 倒置培养 12 h。

1.2.3 TEV 蛋白纯化 将 5 μL 转化后的 TEV 工程菌接种至含氨苄青霉素的 LB 培养基中,于 37 °C 振荡

培养 12 h 进行复苏。取复苏菌液转接至含氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基中,在相同条件下继续扩培 12 h。收集扩培后的菌液,经高速冷冻离心获取菌体沉淀,加入 TEV 裂解液重悬混匀。使用超声破碎仪裂解细胞,裂解后的菌液再次高速冷冻离心,保留上清并弃去沉淀。为纯化 TEV 蛋白酶,采用 Ni-NTA 重力柱进行亲和纯化,所得蛋白样品通过 SDS-PAGE 电泳验证。随后使用 10 kDa 超滤管进行脱盐及缓冲液置换,最终置换为 TEV 保存液。经 BCA 法测定,纯化后的 TEV 蛋白酶浓度为 1 mg/mL,分装后保存于-80 ℃。

1.2.4 pJH-MBP-CbAgo 蛋白纯化 将转化后的 pJH-MBP-CbAgo 单菌落接种至含卡那霉素的 LB 培养基中,于 37 ℃ 振荡培养 12 h。待菌液 OD 值达到约 0.8 时,加入 0.1~0.2 mM IPTG,于 16 ℃ 诱导表达 16 h。收集菌体,经冷冻高速离心后弃上清,重悬于 CbAgo 裂解缓冲液中,并进行超声破碎。经超声破碎的菌液再次离心,取上清经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液保存于 4 ℃ 备用。为纯化 pJH-MBP-CbAgo 蛋白,采用镍柱亲和和层析纯化,使用全自动蛋白纯化仪 NGC 进行操作,并通过 SDS-PAGE 凝胶进行电泳验证分析。纯化后的蛋白溶液经 10~30 kDa 超滤管进行脱盐及缓冲液置换。为去除 MBP 标签,加入 TEV 蛋白酶,于 4 ℃ 酶切过夜。酶切产物进一步经肝素柱层析(NGC 系统)纯化,获得 CbAgo 蛋白,并经 SDS-PAGE 验证。最终将蛋白置换至保存缓冲液中,分装保存于-80 ℃。

1.2.5 CbAgo 蛋白纯化的优化 将目的基因从 pJH-MBP-CbAgo 质粒中克隆,构建于 pET-28a 表达载体中,同时保留 C-端及 N-端的 6×His 标签(由生工生物工程(上海)股份有限公司制作)。之后对得到的 CbAgo 表达载体进行转化(同 1.2.2),并采用镍柱亲和层析进行蛋白纯化(同 1.2.4)。最后通过 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分析,并通过 BCA 法检测 CbAgo 蛋白的浓度。

1.2.6 引物设计与目标序列扩增 本实验根据实验室保存的 MRSA 菌株基因组测序结果中的 *nuc* 碱基序列,设计并合成扩增引物(F:5'-AAAAATGGTAGAAAATGC-3',R:5'-GCTTGTGCTTCACTTT-3')以 MRSA 的基因组 DNA 作为模板扩增 *nuc* 基因,在 95 ℃ 条件下预变性 5 min,95 ℃ 条件下变性 30 s,55 ℃ 条件下退火 20 s,72 ℃ 条件下延伸 10 s,进行 35 个循环;最后在 72 ℃ 条件下延伸 5 min,扩增结束后使用琼脂糖凝胶电泳检测 dsDNA 产物验证,保存于-20 ℃ 冰箱备用。其余性质验证探索所使用的 ssDNA 如表 1 所示:

表 1 CbAgo 蛋白性质摸索所使用 ssDNA 序列

名称	序列信息(5'-3')	对应图序
F-gDNA	GACTTCAATTTTCTTT	图3
R-gDNA	AAAGAAAATTGAAGTC	图3
F-59nt	TCGCGACTAATGCAATATCTATAGACGACTAATATCTCGCGCTGATCAGCTAGCATCAG	图4
gDNA	AGTCGTCTATAGATATT	图4
MRSA-F-50nt	CAAAGAAGTATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGG	图5
MRSA-gDNA	GCATAAATATACGCTA	图5
FQ-32nt	CCATCAGCATAAATATCCATCAACCGTCTGGC	图5
R-34	AGTACGAAGTCGTCGAGAGTACGAAGTCGTCGAG	图5

以上 ssDNA 由生工生物工程有限公司合成。

1.2.7 gDNA 制备 将 10 μM DNA 底物 25 μL、T4 PNK 酶 1.5 μL、10×T4 PNK Buffer 5 μL(700 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 7.6)、10 mM ATP 5 μL 和 ddH₂O 13.5 μL 加入 PCR 管中,总体积 50 μL。随后将反应体系置于 PCR 仪中,37 ℃ 孵育 1.5 h,随后 60 ℃ 处理 30 min 以失活 T4 PNK 酶。反应结束后,产物保存于 4 ℃ 备用。

1.2.8 CbAgo 蛋白切割 dsDNA 及辅助酶辅助切割效果 使用 ET SSB 及重组酶辅助 CbAgo 蛋白进行 dsDNA 切割,以观察在常温状态下 ET SSB 单链结合蛋白以及重组酶是否影响 CbAgo 蛋白的切割活性。反应结束后的溶液通过 PAGE 凝胶电泳进行分析。

1.2.9 CbAgo 蛋白切割 ssDNA 体系优化 为确定 CbAgo 蛋白的最佳反应体系,我们系统考察了温度、

离子种类与浓度、缓冲液成分、pH 值、gDNA 浓度等多个因素,并对各条件下的产物进行非变性 PAGE 凝胶电泳分析,以建立稳定可靠的反应体系,为后续实验提供依据。

1.2.10 CbAgo 蛋白检测模拟样本可行性验证 为验证检测系统的可行性,本研究设计了以下模拟实验:以 MRSA-F-50nt 单链 DNA 模拟人源耐药机会致病菌 MRSA 基因组中的靶标序列,并设置与之完全互补的 gDNA 引导 CbAgo 蛋白进行特异性切割,作为阳性对照;同时,以 R-34 序列模拟其他非目标耐药菌基因组,其无对应的互补 gDNA 引导切割,作为阴性对照;另使用 FQ-32 拟荧光探针 FQ,用于后续检测信号的读出。

2 结果

2.1 CbAgo 构建于 pET-His6-MBP-TEV-LIC 表达载体的蛋白纯化 使用 DNA 提取试剂盒获取纯化 pJH-MBP-CbAgo 质粒,并经琼脂糖凝胶电泳验证,经生工生物公司测序确认后,以 *E.coli* Rosetta (DE3)/pJH-MBP-CbAgo 表达系统进行 CbAgo 表达与纯化,获得带有 MBP 标签的重组 CbAgo 蛋白。SDS-PAGE 结果显示其蛋白条带位于 127 kDa 附近,与预测大小相符(图 1a)。同时,纯化所得 TEV 蛋白条带约为 28 kDa,亦符合预期(图 1b)。随后,利用 TEV 蛋白酶切除 MBP 标签,所得 CbAgo 蛋白条带约为 87 kDa,与理论分子量一致(图 1c)。然而,在后续使用过程中发现,该蛋白未能切割靶标核酸,且偶尔出现沉淀现象。放置一周后,经 SDS-PAGE 检测发现蛋白明显降解,表明在此条件下无法获得稳定可用的 CbAgo 蛋白(图 1d)。

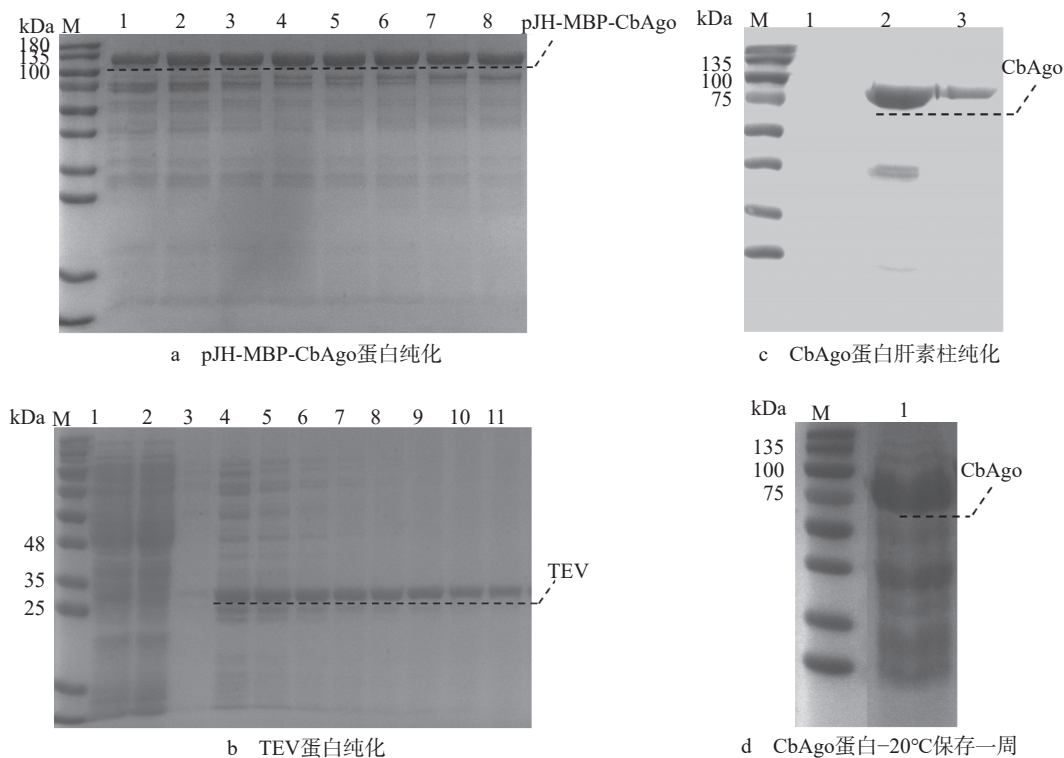


图 1 pET-His6-MBP-TEV-LIC 表达载体系统纯化 CbAgo 蛋白 SDS-PAGE 图

M: marker; a1-a8: 25 ~ 150 mM 咪唑浓度梯度洗脱的组分; b1: 裂解上清; b2: 流穿液; b3: 平衡液洗脱; b4-b11: 75 ~ 150 mM 咪唑浓度梯度洗脱的组分; c1-c3: 肝素柱纯化蛋白 0.6 ~ 1.2 M KCl 浓度梯度洗脱组分; d1: -20 °C 放置一周后 CbAgo 蛋白

2.2 CbAgo 构建于 pET-28a 表达载体的蛋白纯化 通过将 CbAgo 目的基因构建于 pET-28a 表达载体,本实验最终成功解决了 CbAgo 蛋白的纯化问题,能够稳定获得目标蛋白。相较于早期使用的 pET-His6-MBP-TEV-LIC 表达载体,采用 pET-28a 载体不仅简化了纯化步骤,降低了纯化成本,且显著提高了蛋白制备的稳定性与重复性(图 2)。

2.3 CbAgo 蛋白切割 dsDNA 性质验证 为验证 CbAgo 蛋白的体外活性,本研究首先通过 PCR 扩增获林志赞等. 中温性 Argonaute 核酸酶的体外切割活性研究及其在 MRSA 基因检测中的应用

得目的双链 DNA(dsDNA),并在不同温度下利用 CbAgo 蛋白对其进行特异性识别与切割。然而,实验结果发现,在 gDNA 存在时,电泳图中未出现预期的目的条带,CbAgo 蛋白未能有效切割目标 dsDNA(图 3a、图 3b)。鉴于 CbAgo 蛋白的识别与切割功能依赖于 gDNA 通过碱基互补配对定位至目标序列,我们推测 gDNA 与 dsDNA 的有效结合可能是反应的关键限制因素。为此,我们进一步尝试在反应体系中添加重组酶或 ET SSB 单链结合蛋白,以期辅助 gDNA 侵入并稳定结合 dsDNA,从而促进 CbAgo 蛋白的特异性切割。结果表明,即使加入这些辅助因子,反应仍未能产生预期大小的目的条带(图 3c、图 3d)。

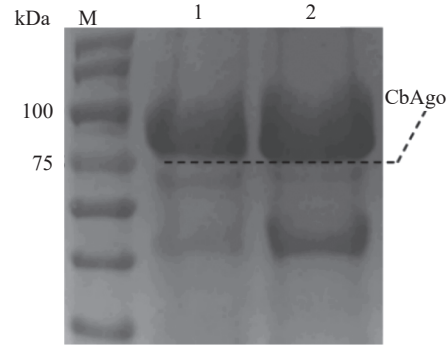


图2 质粒改造后的 CbAgo 蛋白纯化
M: marker; 1-2: 25 ~ 150 mM 咪唑浓度梯度洗脱的组分

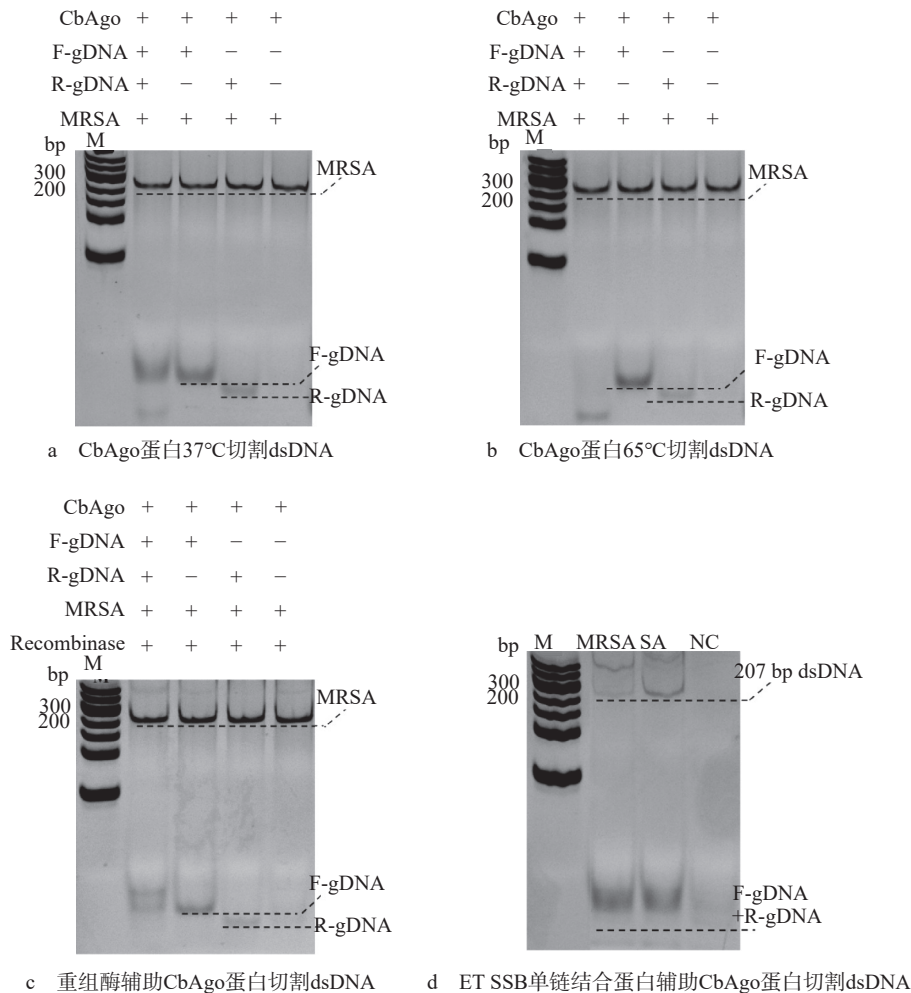


图3 CbAgo 蛋白不同条件下切割双链 DNA 效果

2.4 CbAgo 蛋白切割 ssDNA 性质验证 为确定 CbAgo 蛋白的最佳工作条件,本研究系统评价了温度(4 °C、20 °C、37 °C、45 °C、55 °C、65 °C、75 °C、85 °C、95 °C)、离子种类(Mg²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、K⁺、Ag⁺、Na⁺、Pb²⁺)、缓冲液(DEPC、Tris-HCl 7.5、PBS、NEB3.1、NEB2.1)、pH(5、6.8、7.5、8.3、10)、gDNA 浓度(500 nM、50 nM、5 nM、0.5 nM、0 nM)对其切割活性的影响,为实际检测应用提供优化方案。结果表明,CbAgo 蛋白在 4 °C ~ 95 °C 范围内均具有切割活性,其中 55 °C ~ 65 °C 时活性最高(图 4a)。当 Mg²⁺ 存在时,在不同离子条件下,发现其金属离子不到其危害细胞活性的浓度时 CbAgo 仍能保持较好

的切割效率(图 4b)。缓冲液测试结果显示, Tris-HCl(pH 7.5)是 CbAgo 的最适切割体系(图 4c)。pH 实验表明, 该蛋白在碱性条件下切割效果较强, 但产物条带呈现弥散现象; 在中性至酸性条件下其活性随 pH 下降而逐渐减弱(图 4d)。最后, 引导链 gDNA 浓度实验证实, 无 gDNA 时 CbAgo 无法切割靶标; 当 gDNA 浓度达到 5 nmol 及以上时, 可有效引导特异性切割(图 4e)。

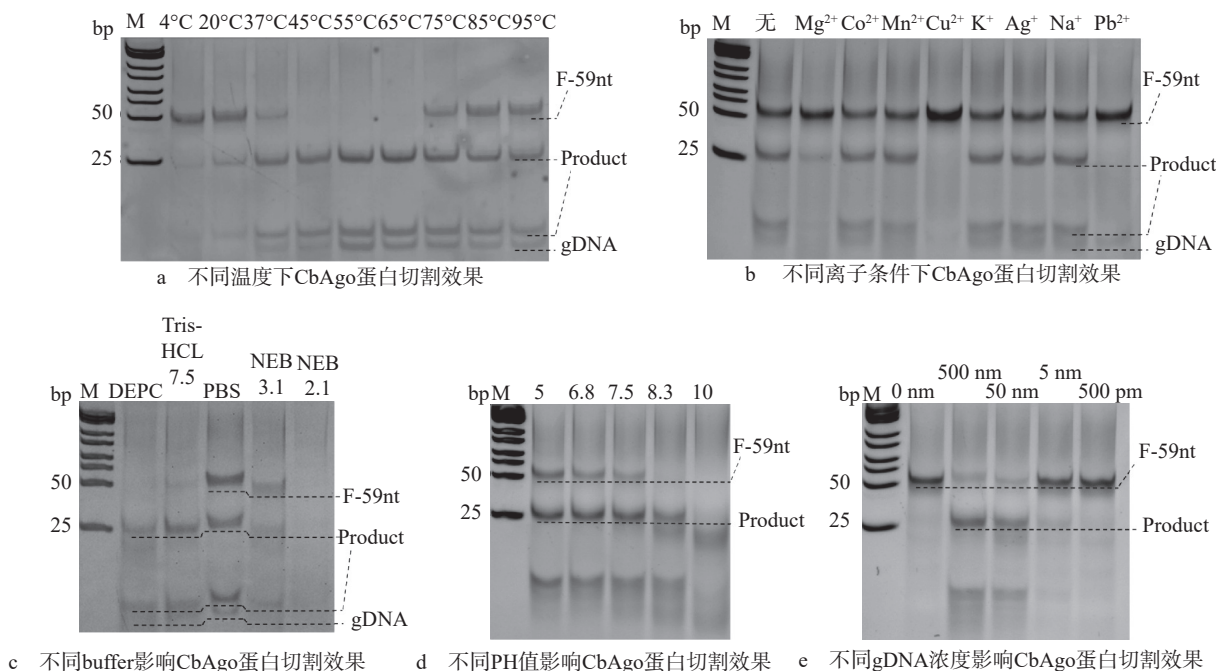


图 4 CbAgo 蛋白酶切反应体系优化

2.5 CbAgo 蛋白在 MRSA 基因检测中的应用 为验证 CbAgo 蛋白用于检测人源耐药机会致病菌的可行性, 本研究选取 MRSA 基因组序列作为模拟靶标进行切割验证。MRSA 靶标 ssDNA 的模拟与获取流程见图 5a。

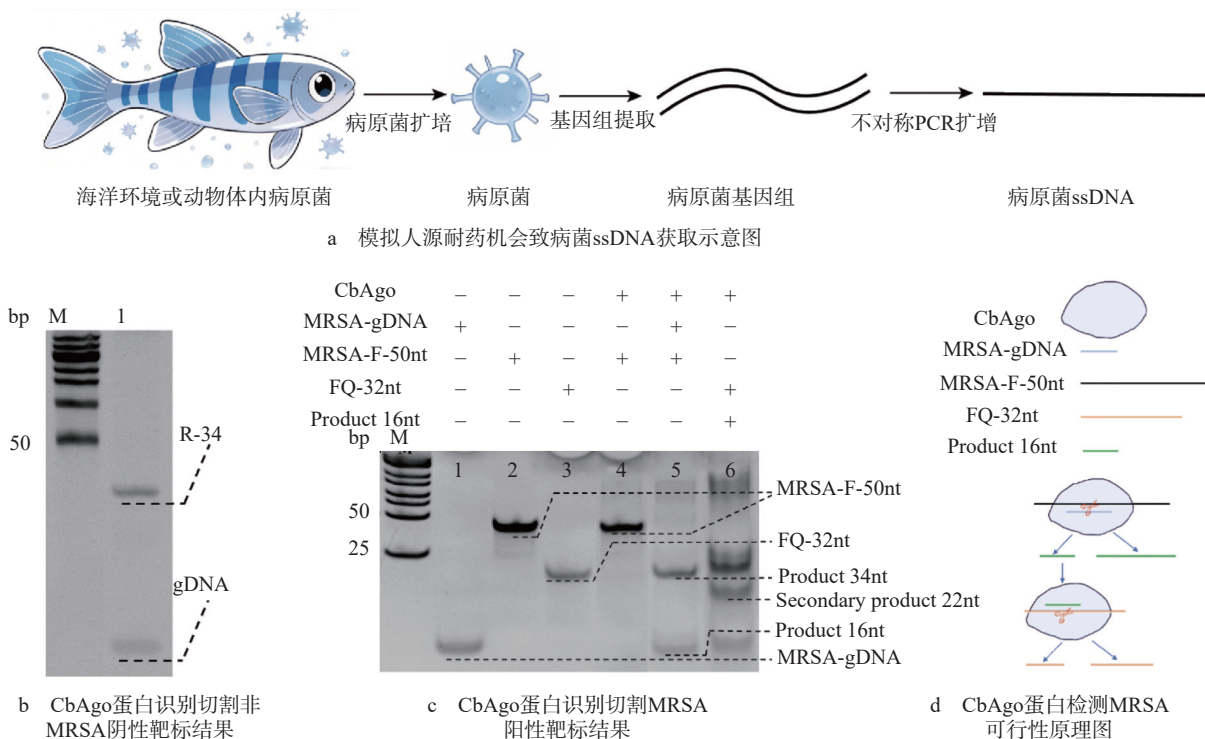


图 5 CbAgo 蛋白检测人源耐药机会致病菌可行性结果及原理图

在阴性对照中,以非互补序列 R-34 作为靶标,由于 gDNA 无法与之配对,CbAgo 蛋白未能切割靶标,结果与预期一致,仅可见完整靶标条带(图 5b)。在阳性对照实验中,以 MRSA-F-50nt 作为靶标序列,其与 MRSA-gDNA 完全互补。在缺失 CbAgo 蛋白或缺失 MRSA-gDNA 引导的条件下,靶链均未发生明显降解;而在 MRSA-gDNA 存在时,CbAgo 蛋白能够有效切割该靶标,生成预期大小的切割产物。进一步地,利用该切割产物中产生的 16 nt 片段作为二级 gDNA,引导 CbAgo 切割模拟荧光探针的 FQ-32 nt 序列,结果显示 FQ-32 nt 可被有效识别并切断为两条单链 DNA,与预期产物大小相符(图 5c)。基于上述结果的检测原理示意图可见图 5d:经 MRSA-gDNA 引导,CbAgo 蛋白成功引发了一个级联反应:通过切割 MRSA-50nt-F 产生次级 gDNA,并进一步切割释放 FQ-32nt。表明 CbAgo 蛋白能作为基因编辑工具设计检测方法进行人源耐药机会致病菌的检测。

3 讨论

相较于 CRISPR 系统依赖 PAM 位点识别的机制,Argonaute(Ago)系统在理论上不受 PAM 位点限制,同时其所使用的 DNA 导向分子(gDNA)相较于 CRISPR 系统中的 RNA 导向分子(gRNA)具有更高的化学稳定性与更低的合成成本。因此,Ago 系统在理论上仅需依据靶标基因组 DNA 序列设计特异性 gDNA,即可引导 Ago 蛋白实现精准切割^[24]。在多种已报道的 Ago 蛋白中,与 PfAgo、TtAgo 等高温型 Ago 蛋白相比,CbAgo 可在 37 °C 的中温条件下保持切割活性,这一特性显著拓展了其在常规实验条件乃至现场实地环境中的应用潜力,使其有望发展为适用于多种污染物检测的新型核酸识别与切割工具,为海洋污染物检测领域提供新的技术平台^[20]。

然而,当前关于 CbAgo 的研究仍存在一定技术差异。已有研究报道了两种主要的 CbAgo 蛋白纯化策略:一种是 John van der Oost 等人通过将 CbAgo 目的基因构建于 pET-His6-MBP-TEV-LIC 表达载体中,经多步纯化获得 CbAgo 蛋白;另一类是 Chen 等人将 CbAgo 目的基因构建于 pET-28a 表达载体中,在 N 端保留 6×His 标签,并通过 Ni-NTA 亲和层析实现蛋白纯化^[23,25]。本研究在充分参考并比较上述两种方法的基础上,发现将 CbAgo 目的基因构建于 pET-28a 表达载体中,同时保留 N 端与 C 端的 6×His 标签,可通过单步 Ni-NTA 亲和层析稳定获得较高质量的 CbAgo 蛋白,因在纯化方式上无 MBP 标签切除的需要,减少对 TEV 的纯化及肝素柱的纯化。重复性方面,使用 pET-28a 表达载体纯化 CbAgo,并不会随着时间的推移发生降解现象,且每次重复均能稳定获得 CbAgo,证实了使用 pET-28a 表达系统纯化 CbAgo,在操作简便性与重复性方面具有明显优势。

在核酸切割特性方面,已有研究尝试通过设计多条 gDNA 协同切割 dsDNA,以间接释放 ssDNA 作为下游反应底物^[26,27]。然而,本研究结果表明,CbAgo 对 dsDNA 的直接识别与切割能力仍然较弱。而实际检测应用中,ssDNA 的制备过程较为复杂,难以适应现场快速检测的需求。目前,CbAgo 的应用仍主要局限于实验室条件,但随着相关研究的不断深入,结合新型材料、信号放大策略及检测仪器的创新方法不断涌现,已在一定程度上显著提升了 CbAgo 在核酸检测中的应用性能^[28-30]。此外,已有研究通过引入辅助策略突破中温性 Argonaute 核酸酶对 dsDNA 识别效率受限的问题^[31],为 CbAgo 在复杂实际环境中的应用提供了重要的理论支撑。展望未来,随着蛋白工程与理性设计手段的进一步发展,通过对 CbAgo 进行结构与功能改造,有望进一步突破其 dsDNA 识别瓶颈,从而显著提升其在环境污染物检测等实际应用场景中的应用潜力。

4 结论

本研究成功纯化了 CbAgo 蛋白,并对其体外生化性质进行了探究,确定了最优反应体系。以人源耐药机会致病菌 MRSA 的基因组 DNA 为靶标,通过设计互补的 gDNA,成功实现了 CbAgo 蛋白的特异性切割,初步验证了在海洋领域该蛋白检测病原菌的可行性。为后续构建常温反应、无需 PAM 位点的现场快速检测方法奠定基础。

参考文献:

- [1] SHI R J, HAN T T, HUANG H H, et al. The extent and pattern of mariculture impacts on spatial and seasonal variations of sediment bacterial communities among three coastal waters[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 782456.
- [2] GUAN X Y, ZHAO Z L, JIANG J W, et al. Net cage aquaculture alters the co-occurrence network and functions of bacterial communities in offshore areas[J]. *Marine Environmental Research*, 2025, 204: 106872.
- [3] WANG J, LAI M Y, TONG M M, et al. Multi-omics insights into seasonal dynamics and interaction networks underpinning planktonic community stability in a subtropical mussel aquaculture system[J]. *Water Research*, 2025, 285: 124142.
- [4] 李昭宏, 谢秀琴, 原珂, 等. 中国边缘海沉积物中抗生素抗性基因和致病菌的组成特征 [J]. *环境化学*, 2023, 42(3): 805–812.
- LI Z H, XIE X Q, YUAN K, et al. Compositional characteristics of antibiotic resistance genes and putative pathogenic bacteria in sediments of Chinese marginal seas[J]. *Environmental Chemistry*, 2023, 42(3): 805–812.
- [5] 薛英伟, 乔璐. 食品常见食源性致病菌污染调查数据分析 [J]. *中外食品工业*, 2025(5): 17–19.
- XUE Y W, QIAO L. Analysis of survey data on common foodborne pathogenic bacteria contamination in food[J]. *Global Food Industry*, 2025(5): 17–19. (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认)
- [6] ESCOBAR L E, RYAN S J, STEWART-IBARRA A M, et al. A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions[J]. *Acta Tropica*, 2015, 149: 202–211.
- [7] LAKHUNDI S, ZHANG K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(4): e00020–18.
- [8] ONICIUC E A, NICOLAU A I, HERNÁNDEZ M, et al. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 61: 49–59.
- [9] HOWER S, PHILLIPS M C, BRODSKY M, et al. Clonally related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from short-finned pilot whales (*Globicephala macrorhynchus*), human volunteers, and a bayfront cetacean rehabilitation facility[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 65(4): 1024–1038.
- [10] MOHAMMED R, NADER S M, HAMZA D A, et al. Public health implications of multidrug-resistant and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail oysters[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 4496.
- [11] TURNER N A, SHARMA-KUINKEL B K, MASKARINEC S A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(4): 203–218.
- [12] BHATTA D R, KOIRALA S, BARAL A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination of frequently touched objects in intensive care units: potential threat of nosocomial infections[J]. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2022, 2022: 1023241.
- [13] ECKHARDT C, HALVOSA J S, RAY S M, et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the neonatal intensive care unit from a patient with community-acquired disease[J]. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2003, 24(6): 460–461.
- [14] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439–444.
- [15] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.
- [16] SWARTS D C, JINEK M. Mechanistic insights into the *cis*- and *trans*-acting DNase activities of Cas12a[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(3): 589–600. e4.
- [17] KOSTYUSHEVA A, BREZGIN S, BABIN Y, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases[J]. *Methods*, 2022, 203: 431–446.
- [18] WANG Y X, SHEN B, LUO N N, et al. Self-enhanced nanohydrogel electrochemiluminescence biosensor based on

- CRISPR/Cas12a and gold platinum nanoparticles modification for high-sensitivity detection of *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 486: 150279.
- [19] LU S H, LI F, CHEN Q B, et al. Rapid detection of African swine fever virus using Cas12a-based portable paper diagnostics[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6(1): 18.
- [20] LI Y R, ZHAO L, MA L, et al. Argonaute protein powered biosensing for pathogenic biosafety[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 305: 141321.
- [21] HEGGE J W, SWARTS D C, VAN DER OOST J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools?[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 5–11.
- [22] JANG H, SONG J, KIM S, et al. ANCA: artificial nucleic acid circuit with argonaute protein for one-step isothermal detection of antibiotic-resistant bacteria[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 8033.
- [23] HEGGE J W, SWARTS D C, CHANDRADOSS S D, et al. DNA-guided DNA cleavage at moderate temperatures by *Clostridium butyricum* Argonaute[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(11): 5809–5821.
- [24] HUANG S, WANG K H, MAYO S L. Genome manipulation by guide-directed Argonaute cleavage[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(8): 4078–4085.
- [25] WEN J P, HAN M J, FENG N, et al. A digital platform for One-Pot signal enhanced foodborne pathogen detection based on mesophilic argonaute-driven polydisperse microdroplet reactors and machine learning[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 482: 148845.
- [26] ZHAO J P, HAN M J, MA A M, et al. A machine vision-assisted Argonaute-mediated fluorescence biosensor for the detection of viable *Salmonella* in food without convoluted DNA extraction and amplification procedures[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 466: 133648.
- [27] KUZMENKO A, YUDIN D, RYAZANSKY S, et al. Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnithrix rosea*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(11): 5822–5836.
- [28] WANG Z P, CHENG X R, MA A M, et al. Multiplexed food-borne pathogen detection using an argonaute-mediated digital sensor based on a magnetic-bead-assisted imaging transcoding system[J]. *Nature Food*, 2025, 6(2): 170–181.
- [29] WANG Z P, MA A M, CHEN Y P. An amplification-free digital assay based on primer exchange reaction-mediated botryoidal-like fluorescent polystyrene dots to detect multiple pathogenic bacteria[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(45): 31174–31187.
- [30] LU Y Y, WEN J P, WANG C M, et al. Mesophilic Argonaute - based single polystyrene sphere aptamer fluorescence platform for the multiplexed and ultrasensitive detection of non - nucleic acid targets[J]. *Small*, 2024, 20(20): 2308424.
- [31] VAISKUNAITĖ R, VAINAUSKAS J, MORRIS J J L, et al. Programmable cleavage of linear double-stranded DNA by combined action of Argonaute CbAgo from *Clostridium butyricum* and nuclease deficient RecBC helicase from *E. coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(8): 4616–4629.

作者贡献声明

林志贇和邹康文负责进行实验、数据收集与分析以及论文撰写,万逸和宋凤阁负责实验方案设计、经费支持以及指导。

利益冲突声明

作者声明,其不存在已知的可能影响本论文所报告工作的竞争性经济利益或个人关系。

AI 使用说明

本文中文内容自己撰写,英文摘要采用 DeepSeek-V3.2 翻译,并进行部分修改。图片摘要中,鱼样本卡通图片及病

毒卡通图片采用腾讯元宝进行增强选取。

伦理声明

本研究动物实验遵循海南大学动物伦理委员会的指导原则,并经海南大学动物伦理委员会批准(伦理代码:HNUAUCC-2024-00139)。

数据可用性

支持论文结论所需的所有数据均已包含在稿件中。如需获取与本文相关的其他数据,可向通信作者提出申请。

致谢/Acknowledgements

本文得到国家自然科学基金面上项目(42 576 122)支持。

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (42 576 122).

作者简介

林志赞(2000—),男,海南临高人,海南大学海洋生物学专业 2023 级硕士研究生, E-mail: 1370004700@qq.com

邹康文(2002—),男,江西抚州人,海南大学渔业发展学专业 2025 级硕士研究生, E-mail: 1764593096@qq.com

万逸(1984—),男,湖南衡阳人,研究员,博士,研究方向:海洋微生物原位分析技术与仪器研究, E-mail: 993602@hainanu.edu.cn

宋凤阁(1992—),女,河南商丘人,副研究员,博士,研究方向:海洋微生物技术, E-mail: songfg@hainanu.edu.cn

(责任编辑:王玖琪)



This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

© The Author(s) 2026. Published by Journal Editorial Department of Hainan University.