



## 基因组编辑对酿酒酵母 DNA 的损伤作用及修复响应

张首<sup>1,2</sup>, 王震<sup>2</sup>, 蔺玉萍<sup>2\*</sup>, 戎倩倩<sup>2,3</sup>, 王丽贤<sup>2</sup>, 齐显尼<sup>2</sup>, 刘浩<sup>1</sup>, 王钦宏<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

<sup>2</sup>中国科学院天津工业生物技术研究所, 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

<sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】为了研究基因组编辑工具 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 所产生的 DNA 双链断裂(DNA double strand break, DSB)对酿酒酵母 DNA 的损伤作用及修复响应情况, 对比化学物质甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)对酿酒酵母基因组 DNA 的损伤和修复, 阐明编辑细胞在细胞水平和转录水平上的变化。【方法】起始细胞分为两种情况, 包括未进行细胞周期同步化和被  $\alpha$ -因子同步化细胞周期至 G0/G1 期。检测 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 处理后编辑细胞的生长情况。利用流式细胞术检测编辑细胞的细胞周期延滞的情况。利用荧光定量 PCR 检测编辑细胞和 MMS 处理细胞后 DNA 损伤响应关键基因转录表达水平的变化情况。【结果】起始细胞无论是未同步化还是同步化, 其生长均受到基因组编辑抑制, 细胞存活率降低, 细胞周期被滞留在 G2/M 期, 而 MMS 处理导致细胞周期 S 期的滞留。此外, 随编辑时间的延长, 突变率增加, 细胞存活率降低。CRISPR/Cpf1 编辑细胞的突变率和存活率均低于 CRISPR/Cas9, 由此可见, CRISPR/Cpf1 对细胞的损伤强度高于 CRISPR/Cas9。两种编辑均诱导酵母 DNA 损伤响应关键基因 *RNR3* 及 *HUG1* 转录水平显著上调, 并且 CRISPR/Cpf1 介导的上调幅度大于 CRISPR/Cas9, 但两者均低于 MMS 的处理。【结论】本研究解析了 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 介导的基因组编辑在细胞水平和转录水平上对 DNA 损伤作用及修复响应, 初步揭示了酿酒酵母应对不同类型的 DSB 损伤时响应程度的差异, 为提高基因组编辑工具的编辑能力和评估基因编辑安全性提供了重要依据。

**关键词:** 酿酒酵母, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, 甲基磺酸甲酯, 细胞周期, DNA 损伤响应

基金项目: 国家自然科学基金(31700077); 天津市自然科学基金(16JCYBJC43100)

\*通信作者。蔺玉萍, Tel: +86-22-24828705, Fax: +86-22-84861950, E-mail: [lin\\_yp@tib.cas.cn](mailto:lin_yp@tib.cas.cn); 王钦宏, Tel/Fax: +86-22-84861950, E-mail: [wang\\_qh@tib.cas.cn](mailto:wang_qh@tib.cas.cn)

收稿日期: 2019-09-18; 修回日期: 2019-12-03; 网络出版日期: 2020-01-21

基因组编辑技术是近年来取得突破性进展的颠覆性技术之一。成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)相关核酸酶介导的基因编辑技术, 主要由核酸酶和向导序列构成, 核酸酶包括来源于 *Streptococcus pyogenes* 核酸酶 SpCas9 及其靶向不同前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)的 Cas9 变体和 Cpf1 等新家族核酸酶。核酸酶 Cas9 有两个剪切域 HNH (His-Asn-His)和 RuvC (RuvC homology), HNH 活性位点剪切 crRNA 的互补 DNA 链, RuvC 活性位点剪切非互补链。野生型的 Cas9 剪切位点位于 crRNA 互补序列下游邻近的 PAM (protospacer adjacent motif)上游 3 个碱基处, 产生具有平齐末端或低频率的 5' 1-nt 的 DNA 双链断裂(DNA double strand break, DSB)<sup>[1-2]</sup>。核酸酶 Cpf1 仅具有 RuvC-like 核酸内切酶功能结构域, 并可以单独行使靶标基因的剪切功能, 产生的是 5' 2-4-nt 粘性末端的 DSB<sup>[3]</sup>。CRISPR 技术因具有简便高效、模块化、易于扩展等优点, 已被广泛应用于酿酒酵母, 如用于外源代谢合成途径在酿酒酵母中高效整合与优化、底盘细胞适配性的优化以及胁迫抗性育种等, 日益成为加快酿酒酵母细胞工厂的构建与优化的重要手段<sup>[4-7]</sup>。总之, 通过诱导和修复 DSB, CRISPR 编辑技术提供了一种强大的前所未有的改造基因组的工具。然而, 在酿酒酵母等部分细胞中非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)介导基因编辑效率很低, 当前研究热点集中于编辑工具的优化, 而解析细胞内源损伤响应和修复机制, 以此来提高基因组编辑能力的研究还很少<sup>[8-10]</sup>。此外, 在永生生化人视网膜色素上皮细胞和人多功能干细胞中的最新研究表

明<sup>[11-12]</sup>, CRISPR/Cas9 产生的 DSB 会通过激活抑癌蛋白 p53 而诱导 DNA 损伤应答, 造成细胞生长停滞, 使得 CRISPR/Cas9 基因编辑效率降低。虽然缺失或不能激活 p53 的细胞显示出更好的基因编辑效果, 但会导致细胞增殖失控和癌变。这些重要发现引发了人们对基于 CRISPR 的基因疗法的安全性的担忧。因此, 无论是从提高基因编辑能力还是从评估基因编辑安全性而言, 探究基因组编辑对细胞的损伤作用和修复响应都具有重要意义。

真核细胞的染色体 DNA 经常受到来自内源和外源多种因素导致的 DSB 损伤。内源性因素包括氧化、DNA 复制叉的停止、核酸酶裂解或各种 DNA 损伤的处理等; 外源因素包括电离辐射或致癌化学物质等<sup>[13]</sup>。未被修复的 DSB 会导致基因组不稳定和细胞死亡, 错误修复会导致基因组突变, 只有发生精确修复的细胞才能防止错误遗传信息的传递。为了应对 DSB 损伤, 生命体进化出一套复杂而精细的 DNA 损伤应答(DNA damage response, DDR)信号转导系统, 以确保快速检测和修复 DSB, 从而防止错误遗传信息的传递<sup>[14]</sup>。当 DNA 发生断裂, MRX 复合物(Mre11-Rad50-Xrs2)结合到 DSB 末端, 从而启动 DSB 修复信号的级联反应, 主要包括一些磷脂酰肌醇-3-激酶相关激酶(phosphoinositide3-kinase-related kinase, PIKKs)家族激酶作用的激活, 也就是它们的磷酸化过程, 例如酿酒酵母的 Tel1 和 Mec1。这些激酶的作用是调节大多数被检测基因的 DNA 损伤诱导转录。它们的磷酸化可能会改变它们作用于目标基因的亲合力, 从而激活转录过程<sup>[14]</sup>。此外, 这些激酶在损伤位置的积累, 使得 DNA 损伤信号的持续扩增和持续激活, DNA 复制减慢, 细胞周期被短暂地滞留, 从而为 DSB 修复留出足够的时间<sup>[14-15]</sup>。根

据 Zhou 等的报道<sup>[16]</sup>,在应对甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)等化学试剂所产生的 DSB 损伤过程中,被 Mec1、Rad53、Chk1 和 Dun1 等 DDR 激酶磷酸化的蛋白会影响 DNA 修复、细胞周期控制、DNA 复制、转录、染色质组装、mRNA 运输和加工以及翻译等过程,从而有效地修复 DSB 对细胞的伤害。但针对 CRISPR 核酸酶造成的 DSB 导致细胞周期滞留在哪个时期以及对 DNA 损伤响应情况尚不明确。

本研究从细胞水平和转录水平揭示了 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 介导的基因组编辑对酿酒酵母基因组 DNA 的损伤作用,并表征了酿酒酵母应对不同类型的 DSB 损伤时响应程度的差异,为优化细胞内源损伤修复响应机制提高基因组编辑能力和评估基因组编辑安全性提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

酵母转化试剂盒(Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit™)购自美国 Zymo Research 公司。酵母选择营养缺陷型培养基购自泛基诺科技有限公司。5-氟乳清酸(5-FOA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。酵母  $\alpha$ -因子交配信息素购自金斯瑞生物科技有限公司。PBS 缓冲液(NaCl 135 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mmol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2 mmol/L, pH=7.4, 115 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 保存)。蛋白酶 K 溶液(10 mg/mL)和 SYBR Green I 核酸染料(10000 $\times$ )购自北京索莱宝公司。RNase A 溶液(20 mg/mL)购自北京全式金生物技术有限公司。酵母 RNA 小量提取试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Green I, With ROX I)购自美国

BIOMIGA 公司。cDNA 反转录试剂盒购自美国 Thermo 公司。

流式细胞仪(美国 Beckman 公司, 型号 MoFlo XDP), 超声破碎仪(宁波新芝公司, 型号 SCIENTZ-II D), 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯公司), 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司), 恒温摇床(上海世平实验设备公司), 超净工作台(苏州净安泰公司), 电子天平(上海梅特勒公司), 移液器(德国 Eppendorf 公司), 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司, 型号 7500)。

### 1.2 酿酒酵母基因组编辑菌株的构建

本研究所使用的质粒和菌株见表 1。在本实验室的前期研究中<sup>[17]</sup>, 已经构建了靶向突变酿酒酵母 *URA3* 基因的 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑质粒, 分别为 pRS423-gRNA(*URA3-1*)-Cas9 和 pRS423-crRNA(*URA3*)-Cpf1; 其骨架质粒是多拷贝(2 $\mu$ -based)、携带 *HIS3* 营养缺陷型标记的 pRS423<sup>[18]</sup>; 核酸酶 Cas9 和 Cpf1 分别在 N 端融合 SV40 核酸定位信号, 并由半乳糖诱导型 *GAL1* 启动子和 *CYC1* 终止子控制其表达; 向导 RNA (gRNA) 表达盒由 *SNR52* 启动子和 *SNR52* 终止子控制<sup>[19]</sup>。我们采用前期构建的酿酒酵母菌株 BY4741a 为宿主菌<sup>[20]</sup>, 该菌株是在缺失 *URA3* 编码框的 BY4741 菌株(*MATa*; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *met15 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*, EUROSCARF, 法兰克福, 德国)的 *PDC1* 位点引入 *URA3* 基因表达盒, 从而重新获得具有功能的 *URA3* 基因。按照酵母转化试剂盒(Zymo Research)的使用说明, 将 200 ng 携带上述编辑质粒和空质粒 pRS423 分别转化宿主菌 BY4741a, 在 SD-His 营养缺陷型平板(SD-His-Ura-Trp-Leu 粉 8 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 根据需要添加亮氨酸 100 mg/L, 尿嘧啶 20 mg/L)上筛选阳性转化子。

表 1. 本研究使用的质粒和酿酒酵母菌株

Table 1. Plasmids and *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Plasmids and strains	Characteristics	Source
<b>Plasmids</b>		
pRS423	Empty plasmid	[18]
pRS423-gRNA(URA3-1)-Cas9	pRS423 containing Cas9 expressed by the inducible <i>GALI</i> promoter and the <i>URA3</i> specific gRNA (URA3-1) expression cassettes	[17]
pRS423-crRNA(URA3)-Cpf1	pRS423 containing Cpf1 expressed by the inducible <i>GALI</i> promoter and the <i>URA3</i> specific crRNA expression cassettes	[17]
<b><i>S. cerevisiae</i> strains</b>		
BY4741a	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; pdc1::URA3</i>	[17]
CK	BY4741a harboring the empty plasmid pRS423	This study
BY-Cas9	BY4741a harboring the CRISPR/Cas9 editing plasmid p423-gRNA(URA3-1)-Cas9	This study
BY-Cpf1	BY4741a harboring the CRISPR/Cpf1 editing plasmid p423-crRNA(URA3)-Cpf1	This study

### 1.3 编辑诱导和细胞同步化处理

本研究所使用的编辑质粒(表 1), 其核酸酶表达是由半乳糖诱导型 *GALI* 启动子控制, 因此可以通过在含有 20 g/L 半乳糖的 SD-His 培养基中培养来诱导核酸酶的表达, 从而诱导编辑。另外, 由于靶向 *URA3* 的编辑会导致该基因失活, 因此诱导培养基中不能缺省尿嘧啶。携带空质粒 pRS423 的菌株(CK)作为未被编辑的阴性对照。另外, 无论是携带编辑质粒还是空载体的菌株, 在含有 20 g/L 葡萄糖的 SD-His-Ura 培养基中培养时, 核酸酶不被诱导表达, 因此细胞均处于未被诱导编辑的状态。由于 DSB 损伤修复可能受到细胞周期的调控<sup>[21]</sup>, 为了避免不同菌株起始细胞周期状态的差异, 我们利用  $\alpha$ -因子对细胞进行同步化处理, 将菌体释放于含有 5  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -因子的含有 20 g/L 葡萄糖的 SD-His-Ura 培养基中培养 2 h, 使绝大多数细胞同步到 G0/G1 期<sup>[16,22]</sup>。

### 1.4 细胞培养以及生长曲线、存活率和突变率的检测

携带编辑质粒和空质粒的菌株(表 1)各挑取 2 个单菌落分别接种到 10 mL 含有 20 g/L 葡萄糖

的 SD-His-Ura 液体培养基中, 过夜培养。分成 2 份, 其中一份利用  $\alpha$ -因子进行细胞周期同步化处理。以初始  $OD_{600}=0.4$  转接到 20 mL 含有 20 g/L 葡萄糖的 SD-His-Ura 中, 摇瓶中加入 5  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -因子, 30 °C、250 r/min 诱导培养; 另一份不经过细胞周期的同步化。然后, 将经过细胞周期同步化的菌体和未经过细胞周期同步化的菌体各自以初始  $OD_{600}=0.4$  分别转接到下列 2 种培养基中: (1) 20 mL 含有 20 g/L 半乳糖的 SD-His 液体培养基, 诱导编辑; (2) 20 mL 含有 20 g/L 葡萄糖的 SD-His-Ura 液体培养基, 作为未诱导编辑的阴性对照。每个菌株每个培养基条件设置两组生物学平行。在 30 °C、250 r/min 条件下培养 36 h, 定期取样, 测定  $OD_{600}$ , 绘制生长曲线。为了计算编辑后的存活率和突变率, 按照上述同样的方法培养菌液, 定期取样, 10 倍梯度稀释, 分别涂布于含有 20 g/L 葡萄糖的 SD-His-Ura 平板和含有 20 g/L 葡萄糖以及 0.15% 5-FOA 的 SD-His 平板上, 30 °C 静止培养 36 h, 统计平板上的菌落数, 按照图 1 所示, 计算存活率和突变率, 即细胞存活率是用半乳糖诱导编辑的细胞在 SD-His 平板上生长的单菌落数目除以葡萄糖未诱导编辑的细胞在

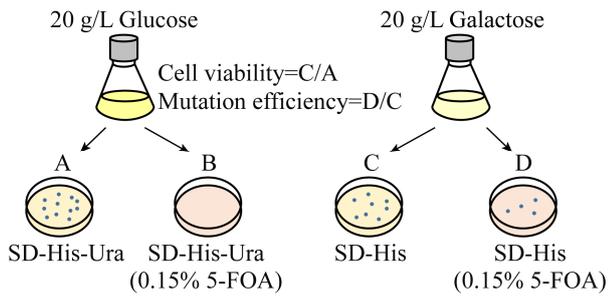


图 1. 编辑诱导以及细胞存活率和突变率的计算示意图

Figure 1. Schematic diagram of the induction of editing and calculations of cell viability and mutational efficiency.

SD-His-Ura 平板上生长的单菌落数目；突变率是半乳糖诱导编辑的细胞在含有 5-FOA 的 SD-His 平板上生长的单菌落数目除以在 SD-His 平板上生长的单菌落数目。

### 1.5 细胞周期检测

按照 1.4 部分的方法进行细胞编辑诱导培养, 定期取 1  $OD_{600}$  细胞(约  $1 \times 10^7$  个)测定细胞周期的变化。为了与甲基磺酸甲酯(MMS)所产生的 DNA 损伤对细胞周期的影响进行比较, 可将含有空质粒的对照菌(CK)分别在 20 mL 添加和不添加 0.02% MMS<sup>[23]</sup>的含有 20 g/L 葡萄糖的 SD-His-Ura 液体培养基(MMS 直接溶解于培养基中, 过滤除菌)中培养 2 h, 间隔 1 h 取样 1 次, 用于细胞周期检测。细胞周期的检测, 采用先前报道的基于核酸染料染色的流式细胞术检测方法<sup>[24]</sup>。具体步骤如下: 约  $1 \times 10^7$  个细胞,  $850 \times g$  离心 3 min 弃上清, 加入冰冷的蒸馏水洗涤 2 次, 离心弃上清, 用预冷的 70%乙醇于 4 °C 固定过夜(产生絮状物)。将固定的样品离心弃上清, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤, 洗涤后将菌体沉淀重悬在 100  $\mu$ L 预冷的 PBS 缓冲液中, 加入 12.5  $\mu$ L RNase

A 溶液(20 mg/mL), 50 °C 水浴 1 h; 离心弃上清, 加入 100  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液(10 mg/mL), 50 °C 水浴 1 h, 离心弃上清; 然后用 500  $\mu$ L 预冷的 PBS 缓冲液重悬菌体, 加入 0.5  $\mu$ L SYBR Green I (10000 $\times$ ), 4 °C 染色过夜, 染色完成后, 将上述样品置于超声破碎仪, 在 30 W 下用 3 个连续超声波脉冲超声处理 9–10 s, 每个脉冲之间间隔 9–10 s。利用 SYBR Green I 进行染色的样品激发波为 488 nm, 经激发后染色的 DNA 分子促发荧光, 由流式细胞仪检测荧光的强度, 每个样品收集细胞总数 10 万个。利用 Summit 5.2 软件进行数据分析。

### 1.6 实时荧光定量 PCR

按照 1.4 部分的方法进行细胞编辑诱导培养至 8 h, 以及 MMS 处理 2 h 的细胞, 离心收集菌体, 利用酵母 RNA 小量提取试剂盒提取总 RNA, 利用 cDNA 反转录试剂盒得到反转录的 cDNA, 用于实时荧光定量 PCR 检测不同编辑菌株中 DNA 损伤响应关键基因的表达水平差异, 具体方法流程参照 Livak 等的报道<sup>[25]</sup>。每组样品设置 2 个生物学重复。荧光定量 PCR 采用的仪器为 ABI 7500 Fast real-time PCR system。10  $\mu$ L 反应体系包含: 5  $\mu$ L 2 $\times$ SYBR Green Mix, 100 ng cDNA 模板, 以及 400 nmol/L 正向和反向引物(表 2)。荧光定量 PCR 引物设计的网站为 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>, 以 *S. cerevisiae* S288c (GenBank: GCF\_000146045.2\_R64)基因组序列为参考进行引物设计。熔解曲线显示扩增出单一的 PCR 产物。每个样品设置 3 个技术重复。反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个循环。表达差异分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法<sup>[25]</sup>。

表 2. 荧光定量 PCR 所需引物  
Table 2. Primers required for real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'→3')	Amplicon/bp	
<i>ACT1</i>	Forward primer	GGTACTCTTTCTCCACCACTG	150
	Reverse primer	TTGACCATCTGGAAGTTCGTAG	
<i>MEC1</i>	Forward primer	GATTCCAACGGGAACCTTGA	120
	Reverse primer	GCACCAGCTGCCTAATTTTC	
<i>DUN1</i>	Forward primer	GGCGCGAAAATCCAAGTCAA	159
	Reverse primer	GGACTTCGGGCGCTACATAA	
<i>RAD53</i>	Forward primer	TTGTGTGCAGGGTCATTTGT	127
	Reverse primer	CAGGCTGGGTTTCTACCAA	
<i>CHK1</i>	Forward primer	TGAGCCTGACGTTGGAGTTG	181
	Reverse primer	AAATTGAGAGGCGAGCCCAA	
<i>RPH1</i>	Forward primer	AACGCCACCCCTCAATCAAT	197
	Reverse primer	TGGGCTCGACAATGTTGGAA	
<i>GIS1</i>	Forward primer	CCCCGATTCAACAACAAGCC	195
	Reverse primer	CCTGCTGACTATCTACGCGG	
<i>HUG1</i>	Forward primer	CCCAAAGCAATTCTTCCTTG	124
	Reverse primer	GTTGGCAGAAGGAACGTGAT	
<i>RPN4</i>	Forward primer	GGGTCGTGCCAAGAGTTCTA	118
	Reverse primer	CTTCTCATGTCCCCGTTCAT	
<i>PDR3</i>	Forward primer	CATTTACCGCAGAAGGAGGA	118
	Reverse primer	TAATCGCAGTGTCAGATGC	
<i>PDS1</i>	Forward primer	CCGGCTCACTTGCTGAAAAG	130
	Reverse primer	ACACCTCCTTCCCTCCTTGT	
<i>PHR1</i>	Forward primer	AAAGTGTTGCGCTCTTCCAG	117
	Reverse primer	TCAATTTCATCCGCTATCC	
<i>RNR1</i>	Forward primer	CCGGTACTCCAAAACCTCAA	118
	Reverse primer	CCACCAGCAGTTTTGGAAAT	
<i>RNR3</i>	Forward primer	TTGCCCTACCAGCATTCGTT	143
	Reverse primer	AGCCTCGGGAAGTGGATAGT	
<i>MAG1</i>	Forward primer	TCAACAGATCAGTGGCCAAG	120
	Reverse primer	GCACATTTTGCTGGGTCTTT	
<i>DDI1</i>	Forward primer	GGCATTGGCTTGTGTGGAC	163
	Reverse primer	GTCTTGGTGGGTGTTAGGGG	

## 2 结果和分析

### 2.1 基因组编辑对细胞生长的抑制作用

CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 介导的基因组编辑, 其核酸酶 Cas9 和 Cpf1 会在基因组靶位点产生 DSB 损伤, 在没有外源 DNA 同源模板存在

的情况下, 细胞可以利用 NHEJ 途径完成 DSB 的精确或易错修复, 从而存活下来, 或者若不能完成 DSB 修复, 则细胞死亡。因此, 我们首先检测了基因组编辑对细胞生长的影响。编辑质粒中的 Cas9 和 Cpf1 均由半乳糖诱导型启动子 *GALI* 控制其表达。在半乳糖培养条件下, Cas9 和 Cpf1 的表

达被诱导,从而诱导编辑,与不携带编辑质粒的对照菌(CK)相比,携带编辑质粒的菌株(BY-Cas9和BY-Cpf1)生长明显受到延滞(图2-B),而且36h的终 $OD_{600}$ 略低于对照菌,分别为对照菌的0.82和0.91倍,表明基因编辑导致细胞增殖时间延长或细胞死亡。而在葡萄糖培养条件下,Cas9和Cpf1不表达,携带编辑质粒的菌株(BY-Cas9和BY-Cpf1)未被诱导编辑,因此,与对照菌(CK)相比,其生长与对照菌基本相似(图2-B)。另外,有文献报道,DSB损伤修复受细胞周期调控<sup>[21]</sup>。为了避免起始接种细胞所处细胞周期的不同可能造成DSB损伤响应和修复的差异,我们利用 $\alpha$ -因子对起始接种细胞进行G0/G1期同步化(图2-A),再测定生长曲线。类似地,在半乳糖培养条件下,编辑被诱导,与对照菌相比,携带编辑质粒的菌株(BY-Cas9和BY-Cpf1)的生长明显受到延滞,而且36h的终 $OD_{600}$ 分别只有对照菌的0.80倍和0.74倍(图2-C),此数值明显低于未经细胞周期同步化而直接诱导编辑36h的0.82倍和0.91倍,这说明 $\alpha$ -因子同步化细胞周期增加基因编辑对细胞增殖的抑制或细胞死亡。而在葡萄糖培养条件下,与对照菌(CK)相比,携带编辑质粒的菌株未诱导编辑,其生长与对照菌相似(图2-C)。此外,与对照菌(CK)相比,半乳糖诱导基因编辑使细胞比生长速率明显下降, $\alpha$ -因子同步化细胞周期至G0/G1期使细胞比生长速率进一步下降,细胞生长受到更强烈的抑制(图2-D)。以上结果表明,编辑产生DSB,而细胞需要时间来修复DSB,可能导致细胞周期受到延滞,进而表现为细胞生长受到延滞。此外,使用 $\alpha$ -因子同步化细胞周期至G0/G1期会进一步抑制基因编辑处理的细胞增殖或诱导细胞死亡。

## 2.2 基因组编辑对细胞存活率和突变率的影响

为了进一步研究基因组编辑在细胞水平上的

影响,我们对编辑细胞在生长过程中的存活率和突变率进行了检测。在起始细胞未进行细胞周期同步化的情况下,无论是CRISPR/Cas9还是CRISPR/Cpf1介导的编辑,随着编辑时间的延长,细胞存活率逐渐下降,分别从8h时间点的33.1%和20.5%逐渐下降到36h时间点的3.2%和1.2%,分别下降了10倍和17倍;而编辑突变率逐渐升高,即发生易错修复的细胞比例逐渐升高,分别从12h时间点的1.9%和0.1%升高到36h时间点的14.4%和1.7%,分别升高了8倍和17倍(图3-A)。而且CRISPR/Cpf1对细胞的损伤强度高于CRISPR/Cas9,因为在相同的编辑时间点,前者的细胞存活率和突变率均低于后者。在起始细胞被 $\alpha$ -因子同步化细胞周期至G0/G1期的情况下,随着编辑时间的延长,细胞存活率和编辑突变率的降低和升高的变化趋势与在起始细胞未进行细胞周期同步化的情况下类似(图3-B)。CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1介导的编辑,其细胞存活率分别从8h时间点的11.1%和9.9%逐渐下降到36h时间点的4.2%和0.8%,分别下降了3倍和12倍;而编辑突变率分别从12h时间点的0.74%和0.09%升高到36h时间点的13.4%和1.6%,均约升高了18倍(图3-B)。与CRISPR/Cas9编辑相比,CRISPR/Cpf1编辑的细胞存活率和突变率均较低,表明细胞对CRISPR/Cpf1编辑产生的5' 2-4-nt粘性末端DSB的易错修复能力可能低于对CRISPR/Cas9编辑产生的平末端或低频率的5' 1-nt DSB的易错修复。另外,对于同一种编辑工具编辑相同的时间而言,经 $\alpha$ -因子细胞周期同步化的细胞的存活率和突变率均低于未经同步化的细胞。NHEJ作为一种在细胞内自发进行的DSB修复途径,在整个细胞周期内都能发挥作用,且主要发生在G1期<sup>[26]</sup>,但是将细胞周期同步化至

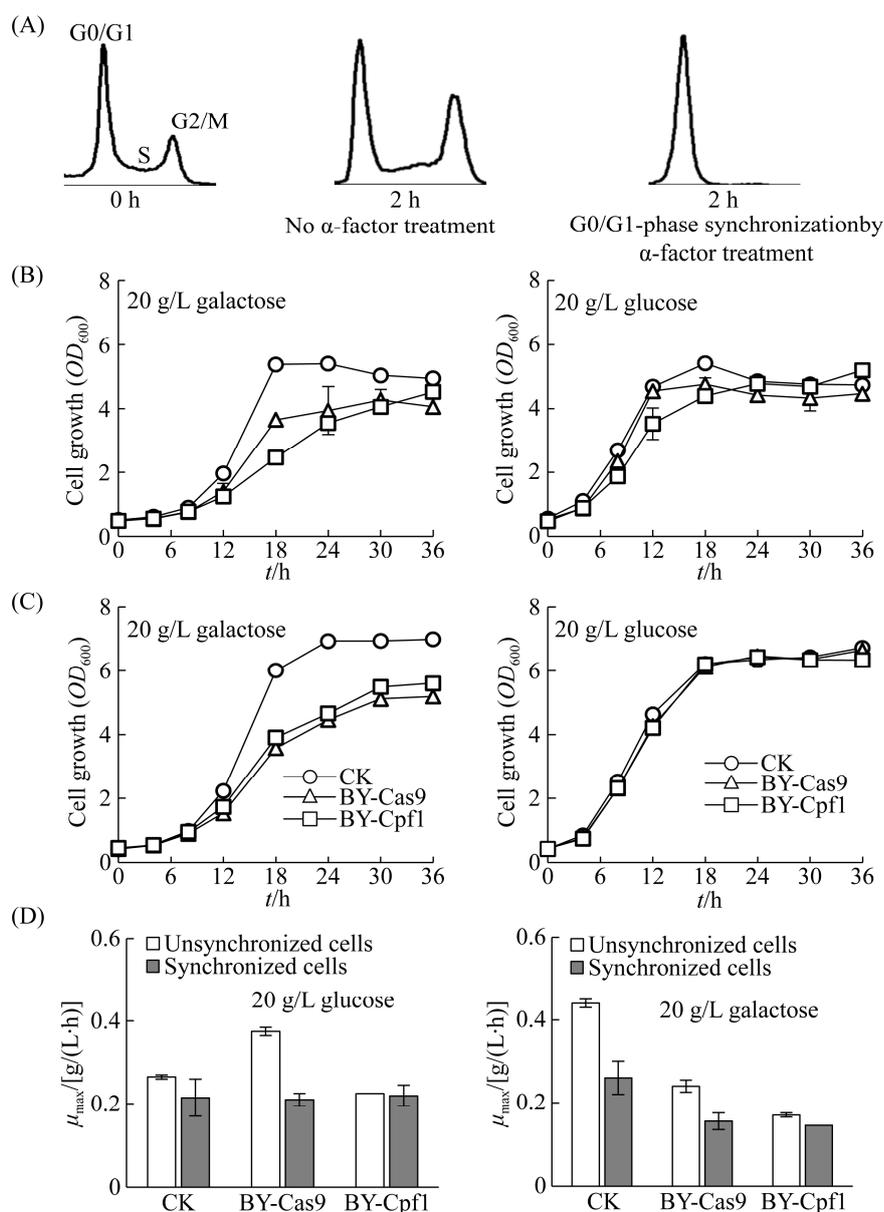


图 2. 在编辑和未编辑条件下未同步化和  $\alpha$ -因子同步化细胞的生长曲线

Figure 2. Growth profiles of unsynchronized and  $\alpha$ -factor-treated synchronized cells under editing or unediting conditions. A: Flow cytometry profiles of DNA content indicating cell cycles of starting cells (0 h), unsynchronized cells without  $\alpha$ -factor treatment and G0/G1-phase synchronized cells after 2 h  $\alpha$ -factor treatment. Cell cycle is divided into three periods including G0/G1, S and G2/M phases; B: Growth profiles of unsynchronized cells under editing condition induced by galactose (left panel) and unediting condition grown in glucose media (right panel); C: Growth profiles of synchronized cells under editing condition induced by galactose (left panel) and unediting condition grown in glucose media (right panel); D: The maximum cell growth rate ( $\mu_{max}$ ) of synchronized and unsynchronized cells. Cells were cultured with glucose (left panel, unediting) and galactose (right panel, editing). The parameter of  $\mu_{max}$  was calculated corresponding to the fermentation profiles using Originlab<sup>®</sup> Origin 8. The strains were listed in Table 1. Data represent the mean and standard error of duplicate cultures at each condition.

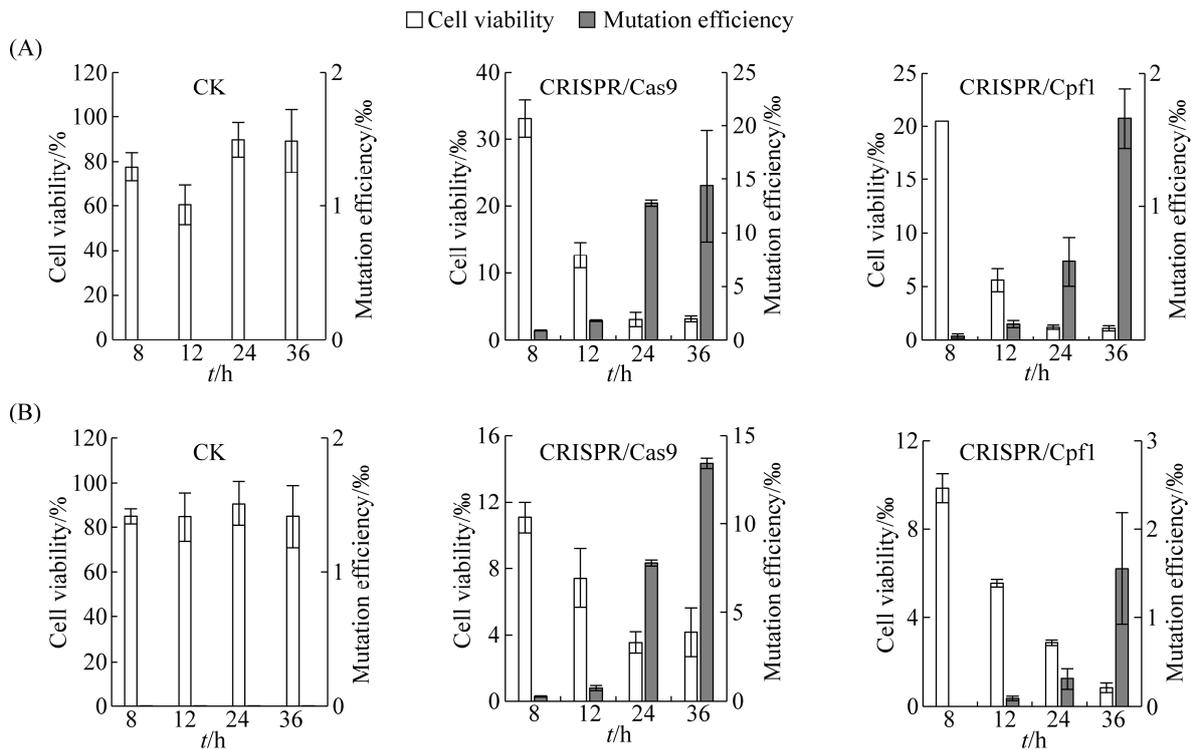


图 3. 未同步化和  $\alpha$ -因子同步化细胞的基因组编辑效果评价

Figure 3. Genome editing effects of unsynchronized and  $\alpha$ -factor-treated synchronized cells. A: Cell viability and mutation efficiency during cell growth of unsynchronized cells; B: Cell viability and mutation efficiency during cell growth of  $\alpha$ -factor-treated synchronized cells. Data represent the mean and standard error of duplicate cultures at each condition.

G0/G1 期并没有提高突变率和存活率, 这可能是由于 CRISPR 核酸酶介导的基因组编辑起作用的时间可能比细胞周期恢复的时间长, 或是产生 DSB 再进行修复的时间比细胞周期恢复的时间长。

### 2.3 基因组编辑对细胞周期的延滞作用

化学物质, 如 MMS 等, 所造成的 DSB 损伤具有位点随机、多发的特点。与之相比, 核酸酶编辑产生的 DSB 是定点的、单发的损伤。有文献报道, DSB 损伤会导致细胞周期的停滞<sup>[23,27]</sup>。通过流式细胞术检测细胞周期, 我们可以比较化学物质 MMS 和核酸酶产生的 DSB 对细胞周期的影响是否存在差异。未经过 MMS 处理的对照细胞的 G0/G1、S、G2/M 3 个时期的峰区分明显(图 4-A),

培养 2 h 后 G2/M 期的菌体量逐步增加, 说明此时菌体生长旺盛, 这符合正常的菌体生长规律。而经 MMS 处理 1 h 后, 细胞周期迅速开始紊乱, 3 个时期的峰区分不再明显, 大量细胞明显滞留在了 S 期(图 4-A), 这与之前的文献报道一致<sup>[23]</sup>。与 MMS 不同的是, 从细胞周期峰图上来看, 无论是未被编辑的对照菌株(CK)还是 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑菌株(BY-Cas9 和 BY-Cpf1)的细胞周期并没有发生明显的紊乱(图 4-B), 细胞群体所处各时期的比例依然随着培养时间的变化而呈现规律性变化, 即在生长的延滞期(8 h 之前)细胞群体主要处于 G0/G1 期, 在指数生长期(8 h 至 12 h) G2/M 期的细胞比例增加, 到指数生长期的末期

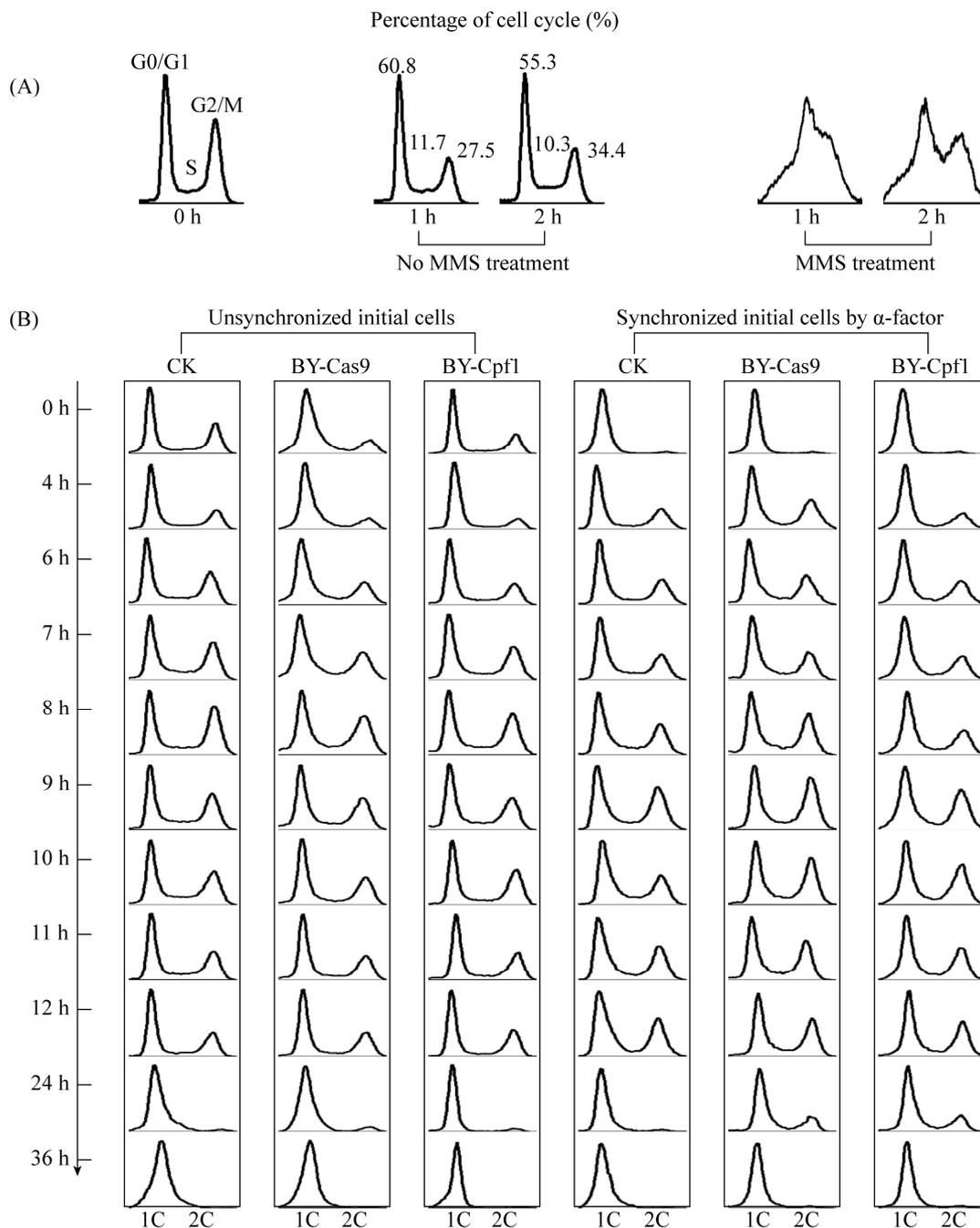


图 4. 基因组编辑和 MMS 处理对细胞周期的延滞作用

Figure 4. Arrested cell cycles by genome editing and MMS treatment. A: Flow cytometry profiles of DNA content from control strain (CK) in response to 0.02% MMS for 1 h and 2 h; B: Flow cytometry profiles of DNA content from indicated strains, whose initial cells were unsynchronized or synchronized by  $\alpha$ -factor. Cells were grown on galactose media to induce genome editing.

(24 h)和稳定期(36 h)又集中回到 G0/G1 期,这与以往的文献报道一致<sup>[28]</sup>。需要指出的是,在起始细胞未进行细胞周期同步化的情况下,在与对照菌株相比,当 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑菌株被编辑到 24 h 时,其在细胞周期峰图的 G2/M 期处有峰,说明依然有编辑细胞停留在 G2/M 期。这个现象在起始细胞被  $\alpha$ -因子同步化细胞周期至 G0/G1 期的情况下表现得更为明显(图 4-B)。

为了进一步定量细胞周期随时间的变化情况,我们统计并将各培养阶段处于不同时期的细胞比例以 0 h 作为参照进行归一化定量,结果如图 5 所示。在起始细胞未进行细胞周期同步化的情况下,对照菌株(CK)在培养过程中处于 S 期的细胞呈现明显的先增加后减少的变化(图 5-A),这符合正常的细胞增殖规律。对于 CRISPR/Cas9 编辑细胞而言,处于 G2/M 期细胞呈现明显的先增加后减少的变化,而且 8 h 时 G2/M 期细胞的百分比达到峰值(图 5-A)。与 0 h 相比,CRISPR/Cas9 编辑菌株 G2/M 期细胞的比例增加了 2.1 倍,而对照菌株只增加了 1.2 倍。而且在培养到 24 h 时,对照菌株 G2/M 期细胞的比例为 0 h 的 0.1 倍,而 CRISPR/Cas9 编辑菌株 G2/M 期细胞的比例为 0 h 的 0.8 倍,该结果与细胞周期峰图观察到的结果一致(图 4-B)。由此可以推断,CRISPR/Cas9 编辑造成的 DSB 损伤可能导致更多细胞停滞在 G2/M 期。同样在起始细胞未进行细胞周期同步化的情况下,与 CRISPR/Cas9 编辑相比,CRISPR/Cpf1 编辑细胞处于 G2/M 期细胞先增加后减少的变化趋势不明显,出现峰值的时间点是 10 h,此时与 0 h 相比增加了 1.4 倍,而对照菌株是增加了 1.1 倍,因此与对照菌株相比,CRISPR/Cpf1 编辑产生的 DSB 损伤可能也造成更多细胞停滞在 G2/M 期。

另一方面,在起始细胞被  $\alpha$ -因子同步化细胞周期至 G0/G1 期的情况下,对照菌株在培养过程中处于 S 期和 G2/M 期的细胞呈现明显的先增加后减少的变化(图 5-A),这也符合正常的细胞增殖规律。无论是 CRISPR/Cas9 还是 CRISPR/Cpf1 编辑细胞,与 0 h 相比,处于 G2/M 期细胞增加的比例的峰值(14.4 倍和 15.4 倍)均高于对照菌株(12.1 倍),特别是在 24 h 时,编辑菌株滞留在 G2/M 期的细胞增加的比例(6.1 倍和 9.0 倍)明显高于对照菌株(1.3 倍)。此结果再次表明,CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑会导致更多细胞滞留在 G2/M 期。另外,无论是起始细胞的细胞周期未同步还是同步的情况下,对照菌株所处 S 期细胞随培养时间增加的比例明显高于编辑菌株,这说明编辑细胞进入 S 期重启细胞周期的比例是低的,这可能是由于编辑产生的 DSB 没有及时被修复的缘故。有文献报道,HO 内切核酸酶诱导的单个 DSB 足以激活 DNA 损伤检查点,使酵母细胞停滞在 G2/M 长达 12–14 h。当细胞适应了 DSB 的存在后才恢复细胞周期进程<sup>[27]</sup>。以上这些结果表明,与 HO 内切核酸酶类似,基因组编辑中的核酸酶产生的定点的、单发的 DSB 损伤会造成细胞周期滞留在 G2/M 期。

#### 2.4 基因组编辑对 DNA 损伤响应基因转录表达的诱导作用

从细胞水平上来看,基因组编辑会抑制细胞生长,造成细胞存活率下降,表明基因组编辑诱导了 DNA 损伤响应,而 DNA 损伤响应会导致一些基因表达发生特定的变化<sup>[29]</sup>,进而造成细胞水平的变化。为了研究基因组编辑对 DNA 损伤响应过程中关键基因转录水平表达的影响,我们选择了信号转导(编码激酶的基因,包括 *MEC1*、*DUN1*、

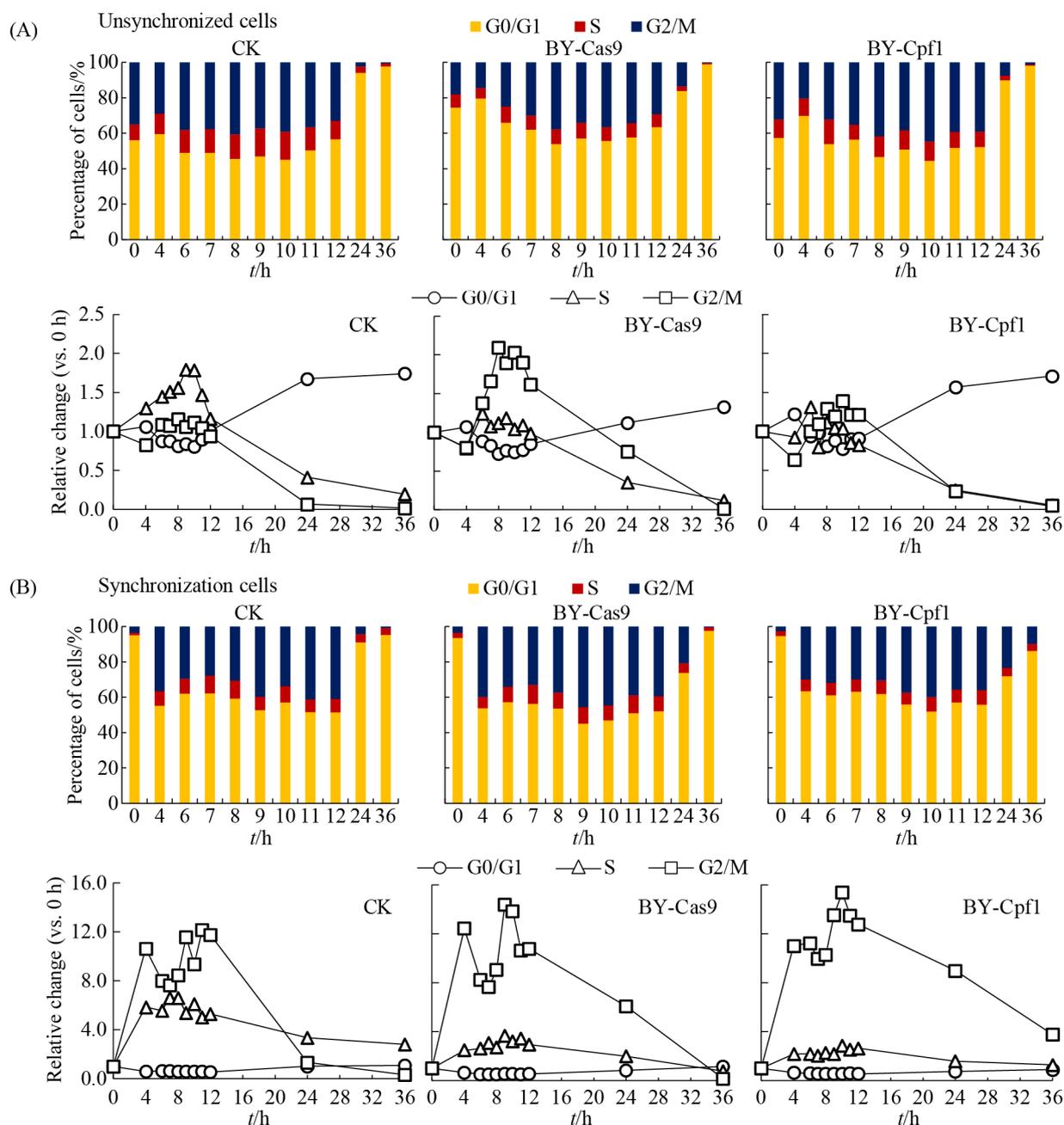


图 5. 菌株在不同 CRISPR 编辑条件下细胞周期各时期的相对定量

Figure 5. Relative quantitation of strains in different periods of cell cycle under different CRISPR editing conditions. A: Unsynchronized initial cells were used; B: Synchronization initial cells by  $\alpha$ -factor were used.

*RAD53* 和 *CHK1*)、响应因子(编码转录因子的基因, 包括 *RPH1*、*GIS1*、*RPNA4*、*HUG1*、*PDR3* 和 *PDS1*)和靶点基因(包括 *PHR1*、*RNR1*、*RNR3*、*MAG1* 和 *DDI1*) 3 个层面的关键基因进行荧光定

量 PCR 检测。一共检测了 3 类样品: 一是经 MMS 处理 2 h 的细胞, 根据 Chen 等<sup>[23]</sup>报道 MMS 处理 2 h 后, 细胞周期被严重扰乱, 随之细胞产生系列级联损伤修复响应; 二是在起始细胞未进行细胞周

期同步化的情况下, CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑 8 h 的细胞; 三是在起始细胞被  $\alpha$ -因子同步化细胞周期至 G0/G1 期的情况下, CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑 8 h 细胞。细胞生长和细胞周期检测结果表明, 与对照菌株(CK)相比, 无论是否经过  $\alpha$ -因子同步化细胞周期, 编辑细胞在半乳糖诱导培养 8 h 时产生 DSB 损伤, 细胞周期开始被停滞在 G2/M 期, 细胞对基因组损伤产生修复响应。提取样品的总 RNA, 通过核酸凝胶验证其具有良好的完整性(图 6), 即 28S/18S 大约在 1.8–2.0 范围内, 然后经过反转录成 cDNA 后, 作为模板进行荧光定量 PCR 检测。结果显示(图 7), 化学物质 MMS 以及 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 介导的基因组编辑均诱导 *RNR3* 及其上游转录因子 *HUG1* 转录水平的显著上调。*Rnr3* 和 *Hug1* 参与 *Mec1* 介导的 DNA 损伤检查点的响应, *Mec1* 检查点途径介导 DNA 损伤后的细胞周期停滞和基因表达诱导<sup>[30]</sup>。*RNR3* 是编码核糖核苷酸还原酶亚单位的基因<sup>[31]</sup>, 而核糖核苷酸还原酶是合成 DNA 所必需的, 因此 *RNR3* 的表达上调有助于细胞更快地合成 DNA, 从而达到修复 DSB 的目的。*HUG1* 编码 *Mec1* 介导的检测点对 DNA 损伤和复制阻滞反应的组成蛋白, 过量表达时, 细胞处于对 DNA 损伤敏感的应激状态, 更易启动 DSB 修复信号的级联<sup>[30]</sup>。Minard 等<sup>[32]</sup>指出 *HUG1* 和 *RNR3* 是细胞对复制应激或 DNA 损伤响应的标志性基因。Lee 等<sup>[33]</sup>研究酵母对 MMS 诱导的 DNA 损伤全局蛋白响应时, 发现在涉及细胞周期和 DNA 修复的相关蛋白中 *Hug1* 上调水平最为显著, *Rnr3* 蛋白表达水平也明显上调。基于上述研究, 此 2 个基因转录表达水平被诱导的程度可反映 DSB 损伤的强度。在起始细胞未进行细胞周期同步化的情况下, 在与对照菌株相比, CRISPR/Cas9 编辑 8 h 后,

*HUG1* 表达上调  $12.7 \pm 3.5$  倍, *RNR3* 上调  $4.6 \pm 1.5$  倍; CRISPR/Cpf1 编辑 8 h 后, *HUG1* 表达上调约  $26.4 \pm 3.3$  倍, *RNR3* 上调约  $12.9 \pm 1.7$  倍, 这说明核酸酶 Cpf1 切割产生的 DSB 较 Cas9 切割产生的 DSB 对细胞的破坏性更大或是更不易修复, 这也与 CRISPR/Cpf1 处理较 CRISPR/Cas9 编辑导致更低的细胞存活率的结果一致。与 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 编辑相比, MMS 处理导致细胞中 *RNR3* 和 *HUG1* 的表达上调幅度更大, 分别上调  $78.5 \pm 2.9$  倍和  $73.1 \pm 0.2$  倍, 这可能是由于 MMS 会导致多位点 DSB 产生的缘故。而且 MMS 处理还诱导 DSB 损伤响应信号转导基因 *DUN1* 和 *RAD53* 分别显著上调  $4.2 \pm 0.2$  倍和  $2.7 \pm 0.2$  倍, 表明 MMS 产生的 DSB 诱导更多的基因表达的级联反应。另外, 与起始细胞未同步化细胞周期的情况相比, 在起始细胞进行细胞周期同步化的情况下, 编辑细胞的 *HUG1* 和 *RNR3* 转录水平被诱导的程度要低, *HUG1* 分别被 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1

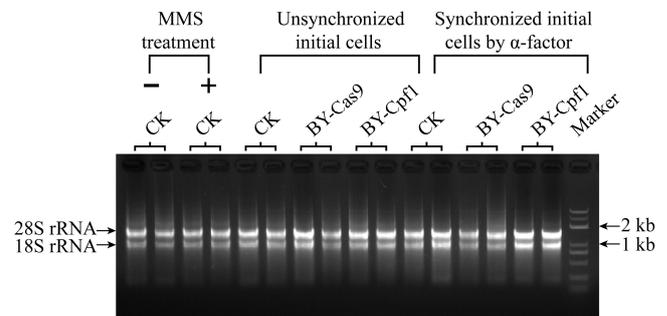


图 6. 提取样品总 RNA 的完整性

Figure 6. Integrity of total RNA extracted from samples. MMS treatment: cells of control strain (CK) were treated with 0.02% MMS for 2 hours. Unsynchronized initial cells: cells were grown on galactose media and edited by CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 for 8 hours. Synchronized initial cells by  $\alpha$ -factor: after synchronizing the cell cycle with  $\alpha$ -factor, cells were induced and edited by CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 for 8 hours. Total 1  $\mu$ g RNA were loaded.

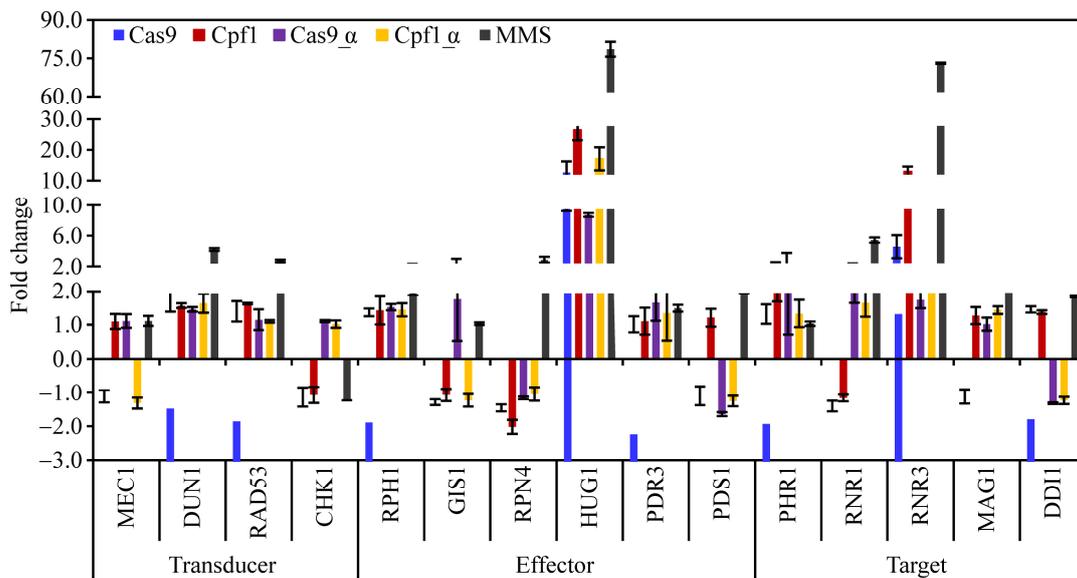


图 7. 基因组编辑和 MMS 处理导致的 DNA 损伤响应关键基因转录表达水平的变化

Figure 7. Expression change of key genes involved in DNA damage response induced by genome editing and MMS treatment. MMS: Changes of different gene expression levels in control strain (CK) in response to 0.02% MMS for 2 h; Cas9, Cpf1: Changes of different gene expression levels after inducing CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 editing for 8 h on galactose medium, respectively. Cas9\_α, Cpf1\_α: Cells were synchronized by α-factor and then subjected to CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 editing on galactose medium, respectively.

诱导上调  $8.7 \pm 0.2$  倍和  $17.1 \pm 3.8$  倍, 而 *RNR3* 被上调的水平均低于 2 倍, 说明其修复能力可能较低, 从而导致细胞存活率相对较低(图 3)。

### 3 讨论

基因编辑作为 21 世纪的颠覆性技术, 大大推动了生物制造产业和科学研究的进程, 也在精准医疗领域展现出无限潜力, 当前研究热点集中于编辑工具的开发和优化, 但是对于基因组编辑后的 DNA 损伤响应机制尚未被很好地阐明。本研究以酿酒酵母 BY4741a 为研究对象, 在细胞周期同步化与未同步化两种情况下, 探究了 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 对酵母基因组的损伤作用和修复响应。在细胞水平上基因组编辑抑制了细胞生长, 造成细胞存活率下降, 同时也会导致菌体细胞周期 G2/M 期的滞留。这与 HO 核酸酶产生的单点

DSB 导致的细胞滞留情况一致<sup>[27]</sup>。而 MMS 作为能诱发多位点 DSB 损伤的化学物质, 能够剧烈地破坏细胞周期, 同时导致细胞周期滞留在 S 期。这与 *EcoR I* 内切核酸酶产生的位点特异性、多发的 DSB 导致细胞周期滞留在 S 期情况一致<sup>[34]</sup>。此外, 本研究利用荧光定量 PCR 技术, 检测与 DNA 损伤响应相关的靶基因、激酶、转录因子基因在应对不同类型的 DSB 时表达水平的变化, 并通过 *RNR3* 和 *HUG1* 表达水平的变化, 初步阐明不同 DSB 损伤强度: 核酸酶产生的 DSB (α-因子同步化细胞周期后) < 核酸酶产生的 DSB (未经 α-因子同步化细胞周期) < MMS 产生的 DSB。与未同步化细胞周期相比, α-因子滞留细胞周期在 G0/G1 期有利于细胞通过 NHEJ 途径修复 DSB 损伤。此外, 细胞周期滞留减缓了细胞基因组复制的进程, 为基因组损伤修复提供了更多的时间。与基因组编

辑产生的单发 DSB 损伤相比, MMS 诱导多发的基因组损伤, 产生最强的损伤强度。对于核酸酶 Cas9 和 Cpf1 产生的 DSB, 两者作用位点与作用方式的不同, 导致了经核酸酶 Cpf1 产生的 DSB 较核酸酶 Cas9 产生 DSB 的细胞存活率和突变率不同, 前者低于后者, 而 *RNR3* 和 *HUG1* 的表达水平是前者高于后者, 说明在相同的细胞处理条件下(有无同步化细胞周期), 核酸酶 Cpf1 较核酸酶 Cas9 对于细胞的损伤性更大, 细胞更易修复 Cas9 核酸酶产生的平末端 DSB。

本研究表明基因编辑会导致细胞周期滞留于 G2/M 期, 这可能是由于细胞未及时准确地修复 DSB 损伤, 调整 DSB 检测和修复信号传导机制可能会在一定程度上减少细胞滞留在 G2/M 期。在哺乳动物中通过失活或抑制 p53 蛋白可以提高基因编辑的效率<sup>[11-12]</sup>, 本研究表明酿酒酵母通过 NHEJ 途径修复 DSB 过程中会显著上调 *HUG1* 和 *RNR3* 表达水平, 是否失活 *Hug1* 和 *Rnr3* 蛋白可以提高 NHEJ 介导基因组编辑引入随机突变的效率, 这些问题都是十分值得后续探究的。

本研究主要探究了基因编辑产生 DSB 损伤后, NHEJ 修复过程中细胞水平和转录水平的变化。NHEJ 修复 DSB 可发生在整个细胞周期, 但在 G1 期尤为活跃。因具有不需要合成外源重组模板可缩减成本和在一定程度上规避转基因困扰的优点, 通过 NHEJ 介导的基因编辑产生的多样性随机突变实现基因的表达调控和优良性状育种策略越来越受到青睐<sup>[4]</sup>。此外, 在哺乳动物细胞中 NHEJ 是主要的修复途径, 在酵母细胞中探究 NHEJ 介导的基因编辑损伤和响应对哺乳动物基因编辑具有一定的指导意义。当然, 在以后的研究中进一步探究同源重组(homologous recombination, HR)修复对细胞响应基因组编辑损伤的影响也是很有意义的工作。

## 参 考 文 献

- [1] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168(1/2): 20–36.
- [2] Lemos BR, Kaplan AC, Bae JE, Ferrazzoli AE, Kuo J, Anand RP, Waterman DP, Haber JE. CRISPR/Cas9 cleavages in budding yeast reveal templated insertions and strand-specific insertion/deletion profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(9): E2040–E2047.
- [3] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.
- [4] Jakociūnas T, Jensen MK, Keasling JD. CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metabolic Engineering*, 2016, 34: 44–59.
- [5] Stovicek V, Holkenbrink C, Borodina I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(5), doi: 10.1093/femsyr/fox030.
- [6] Giersch RM, Finnigan GC. Yeast still a beast: diverse applications of CRISPR/Cas editing technology in *S. cerevisiae*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2017, 90(4): 643–651.
- [7] Lian JZ, Hamedirad M, Zhao HM. Advancing metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* using the CRISPR/Cas system. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1700601.
- [8] Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root DE. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(2): 184–191.
- [9] Hubbard BP, Badran AH, Zuris JA, Guilinger JP, Davis KM, Chen LW, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK, Liu DR. Continuous directed evolution of DNA-binding proteins to improve TALEN specificity. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 939–942.
- [10] Xu S, Cao SS, Zou BJ, Yue YY, Gu C, Chen X, Wang P, Dong XH, Xiang Z, Li K, Zhu MS, Zhao QS, Zhou GH. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: the structure-guided nuclease. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 186.
- [11] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*, 2018, 24(7): 927–930.
- [12] Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, FriasE, HoD, Theriault K, Kommineni S, Chen J, Sondey M, Ye C, Randhawa R, Kulkarni

- T, Yang Z, McAllister G, Russ C, Reece-Hoyes J, Forrester W, Hoffman GR, Dolmetsch R, Kaykas A. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nature Medicine*, 2018, 24(7): 939–946.
- [13] McKinney JS, Sethi S, Tripp JD, Nguyen TN, Sanderson BA, Westmoreland JW, Resnick MA, Lewis LK. A multistep genomic screen identifies new genes required for repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 2013, 14: 251.
- [14] Finn K, Lowndes NF, Grenon M. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 69(9): 1447–1473.
- [15] Zhu CW, Shi J. Research of morphogenesis checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(5): 1177–1182. (in Chinese)  
祝嫦巍, 史钧. 酿酒酵母形态变化检验点的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(5): 1177–1182.
- [16] Zhou CS, Elia AEH, Naylor ML, Dephoure N, Ballif BA, Goel G, Xu QK, Ng A, Chou DM, Xavier RJ, Gygi SP, Elledge SJ. Profiling DNA damage-induced phosphorylation in budding yeast reveals diverse signaling networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(26): E3667–E3675.
- [17] 王震. 酿酒酵母基因组多样性突变工程及耐高温基因组变异研究. 中国科学院大学博士学位论文, 2019.
- [18] Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 1992, 110(1): 119–122.
- [19] Ryan OW, Skerker JM, Maurer MJ, Li X, Tsai JC, Poddar S, Lee ME, DeLoache W, Dueber JE, Arkin AP, Cate JHD. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife*, 2014, 3: e03703.
- [20] Zhang GQ, Lin YP, Qi XN, Li L, Wang QH, Ma YH. TALENs-assisted multiplex editing for accelerated genome evolution to improve yeast phenotypes. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(10): 1101–1111.
- [21] Frit P, Barboulet N, Yuan Y, Gomez D, Calsou P. Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair*, 2014, 17: 81–97.
- [22] Rosebrock AP. Synchronization and arrest of the budding yeast cell cycle using chemical and genetic methods. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, 2017(1), doi: 10.1101/pdb.prot088724.
- [23] Chen H, Donnianni RA, Handa N, Deng SK, Oh J, Timashev LA, Kowalczykowski SC, Symington LS. Sae2 promotes DNA damage resistance by removing the Mre11-Rad50-Xrs2 complex from DNA and attenuating Rad53 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(15): E1880–E1887.
- [24] Fortuna M, Sousa MJ, Côrte-Real M, Leão C, Salvador A, Sansonetty F. Cell cycle analysis of yeasts. *Current Protocols in Cytometry*, 2000, 13(1): 11.13.1–11.13.9.
- [25] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [26] Huertas P, Cortés-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature*, 2008, 455(7213): 689–692.
- [27] Dotiwala F, Haase J, Arbel-Eden A, Bloom K, Haber JE. The yeast DNA damage checkpoint proteins control a cytoplasmic response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(27): 11358–11363.
- [28] Delobel P, Tesnière C. A simple FCM method to avoid misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle assessment between G0 and sub-G1. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e84645.
- [29] Fu Y, Pastushok L, Xiao W. DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(6): 908–926.
- [30] Ainsworth WB, Hughes BT, Au WC, Sakelaris S, Kerscher O, Benton MG, Basrai MA. Cytoplasmic localization of Hug1p, a negative regulator of the MEC1 pathway, coincides with the compartmentalization of Rnr2p-Rnr4p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 439(4): 443–448.
- [31] Yagle K, McEntee K. The DNA damage-inducible gene *DIN1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a regulatory subunit of ribonucleotide reductase and is identical to *RNR3*. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10(10): 5553–5557.
- [32] Minard LV. Chromatin regulation by histone chaperone Asf1. Doctor Dissertation of University of Alberta, 2010.
- [33] Lee MW, Kim BJ, Choi HK, Ryu MJ, Kim SB, Kang KM, Cho EJ, Youn HD, Huh WK, Kim ST. Global protein expression profiling of budding yeast in response to DNA damage. *Yeast*, 2007, 24(3): 145–154.
- [34] Grenon M, Magill CP, Lowndes NF, Jackson SP. Double-strand breaks trigger MRX- and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint activation. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(5): 836–847.

# DNA lesions and repair response caused by genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*

Shou Zhang<sup>1,2</sup>, Zhen Wang<sup>2</sup>, Yuping Lin<sup>2\*</sup>, Qianqian Rong<sup>2,3</sup>, Lixian Wang<sup>2</sup>, Xianni Qi<sup>2</sup>, Hao Liu<sup>1</sup>, Qinhong Wang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

<sup>2</sup> CAS Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

<sup>3</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] To investigate DNA lesions and repair response caused by the DNA double strand break (DSB) generated by the genome editing tools including CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 in *Saccharomyces cerevisiae*, we used the damage and repair of *S. cerevisiae* genomic DNA caused by a chemical substance methyl methane sulfonate (MMS) as a comparison and elucidated the changes of edited cells at the cellular and transcriptional levels. [Methods] Initial cells were divided into two situations, including unsynchronized cell cycle and synchronized cell cycle to G0/G1 phase by  $\alpha$ -factor. We measured the growth profiles of CRISPR/Cas9- and CRISPR/Cpf1-mediated edited cells. We employed flow cytometry to detect the arrested cell cycle of edited cells. We used Real-time PCR to quantify the transcriptional expression changes of key genes involved in DNA damage response in edited cells and MMS-treated cells. [Results] Growth of initial cells, which were either unsynchronized or synchronized cell cycle by  $\alpha$ -factor, were inhibited by genome editing. Cell viabilities of edited cells decreased, and the cell cycles were arrested at the G2/M phase. Furthermore, along with the prolongation of editing time, mutation efficiency of edited cells increased while cell viabilities decreased. The mutation efficiency and viabilities of CRISPR/Cpf1 edited cells were lower than those of CRISPR/Cas9, and thus the damage induced by CRISPR/Cpf1 was stronger than that of CRISPR/Cas9. Both these two editing tools induced significantly up-regulated transcriptional expressions of *RNR3* and *HUG1*, which are key genes involved in DNA damage response in yeast. Additionally, the extent of CRISPR/Cpf1-mediated up-regulation was higher than that of CRISPR/Cas9, but both were lower than MMS treatment. [Conclusion] This study analyzed DNA lesions and repair response caused by CRISPR/Cas9- and CRISPR/Cpf1- mediated genome editing at the cellular and transcriptional levels, and preliminarily revealed the divergent extents of *S. cerevisiae* in response to different DSBs, thus providing an important guidance for improving the editing capacity and estimating the safety of genome editing.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, methyl methane sulfonate, cell cycle, DNA damage response

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31700077) and by the Natural Science Foundation of Tianjin, China (16JCYBJC43100)

\*Corresponding authors. Yuping Lin, Tel: +86-22-24828705, Fax: +86-22-84861950, E-mail: lin\_yp@tib.cas.cn; Qinhong Wang, Tel/Fax: +86-22-84861950, E-mail: wang\_qh@tib.cas.cn

Received: 18 September 2019; Revised: 3 December 2019; Published online: 21 January 2020