

• 生物技术与方法 •

一种新型的 CRISPR/Cas9-hLacI 双链 DNA 供体适配基因编辑系统

马宝霞, 崔婕妤, 钱泓润, 张潇筠, 杨森, 张骥镜, 韩艺帆, 张智英, 王建刚, 徐坤*

西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100

马宝霞, 崔婕妤, 钱泓润, 张潇筠, 杨森, 张骥镜, 韩艺帆, 张智英, 王建刚, 徐坤. 一种新型的 CRISPR/Cas9-hLacI 双链 DNA 供体适配基因编辑系统[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4204-4218.

MA Baoxia, CUI Jieyu, QIAN Hongrun, ZHANG Xiaojun, YANG Sen, ZHANG Qijing, HAN Yifan, ZHANG Zhiying, WANG Jiangang, XU Kun. A novel CRISPR/Cas9-hLacI donor adapting system for dsDNA-templated gene editing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4204-4218.

摘要: 在 CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑中, 借助于双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 供体模板的重组效应能够实现对目标基因组靶位点的精确编辑和基因敲入, 然而高等真核生物细胞中同源重组的低效性限制了该基因编辑策略的发展和运用。为提高 CRISPR/Cas9 系统介导 dsDNA 供体模板的同源重组效率, 本研究利用大肠杆菌(*Escherichia coli*) 乳糖操纵子阻遏蛋白 LacI 与操纵序列 LacO 特异性结合的特点, 通过重组 DNA 技术将密码子人源化优化的阻遏蛋白基因 *LacI* 分别与脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) 源的 *SpCas9* 和路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*) 源的 *SlugCas9-HF* 融合表达, 通过 PCR 将操纵序列 LacO 与 dsDNA 供体嵌合, 构建了新型的 CRISPR/Cas9-hLacI 供体适配系统(donor adapting system, DAS)。首先在报告载体水平上对 Cas9 核酸酶活性、DAS 介导的同源引导修复(homology-directed repair, HDR) 效率进行了验证和优化, 其次在基因组水平对其介导的基因精确编辑进行了检测, 并最终利用 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 在 HEK293T 细胞中实现了 *VEGFA* 位点的精确编辑, 效率高达 30.5%, 显著高于野生型。综上所述, 本研究开发了新型的 CRISPR/Cas9-hLacI 供体适配基因编辑系统, 丰富了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术种类, 为以后的基因编辑及分子设计育种研究提供了新的工具。

关键词: 基因编辑; CRISPR/Cas9; *LacI* 基因; LacO 序列; 供体适配

资助项目: 地方基金项目(NK2022010207); 内蒙古自治区“揭榜挂帅”项目(2022JBGS0025)

This work was supported by the Local Grant (NK2022010207) and the Inner Mongolia Autonomous Region Posted Leaders 584 (2022JBGS0025).

*Corresponding author. E-mail: xukunas@nwafu.edu.cn

Received: 2022-11-29; Accepted: 2023-04-24; Published online: 2023-05-08

A novel CRISPR/Cas9-hLacI donor adapting system for dsDNA-templated gene editing

MA Baoxia, CUI Jieyu, QIAN Hongrun, ZHANG Xiaojun, YANG Sen, ZHANG Qijing, HAN Yifan, ZHANG Zhiying, WANG Jiangang, XU Kun*

College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: During the gene editing process mediated by CRISPR/Cas9, precise genome editing and gene knock-in can be achieved by the homologous recombination of double-stranded DNA (dsDNA) donor template. However, the low-efficiency of homologous recombination in eukaryotic cells hampers the development and application of this gene editing strategy. Here, we developed a novel CRISPR/Cas9-hLacI donor adapting system (DAS) to enhance the dsDNA-templated gene editing, taking the advantage of the specific binding of the LacI repressor protein and the LacO operator sequence derived for the *Escherichia coli* lactose operon. The codon-humanized *LacI* gene was fused as an adaptor to the *Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9)* and *Staphylococcus lugdunensis Cas9 (SlugCas9-HF)* genes, and the LacO operator sequence was used as the aptamer and linked to the dsDNA donor template by PCR. The Cas9 nuclease activity after the fusion and the homology-directed repair (HDR) efficiency of the LacO-linked dsDNA template were firstly examined using surrogate reporter assays with the corresponding reporter vectors. The CRISPR/Cas9-hLacI DASs mediated genome precise editing were further checked, and we achieved a high efficiency up to 30.5% of precise editing at the *VEGFA* locus in HEK293T cells by using the CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS. In summary, we developed a novel CRISPR/Cas9-hLacI DAS for dsDNA-templated gene editing, which enriches the CRISPR/Cas9-derived gene editing techniques and provides a novel tool for animal molecular design breeding researches.

Keywords: gene editing; CRISPR/Cas9; *LacI* gene; LacO sequence; donor adapting

近年来, CRISPR 基因编辑技术因能实现动植物性状的快速改良越来越受到广大育种工作者的青睐,分子设计育种的理念已被广泛应用于动植物育种研究之中。在高等真核细胞中,由 CRISPR/Cas9 等技术引入的基因组 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源引导修复(homology-directed repair, HDR) 2 种机制进行修复^[1]。随着研究的深入, HDR 又逐渐被区分为以长同源臂 dsDNA 供体为模板的同源重组(homologous recombination, HR)、以微同源臂 dsDNA 供体为模板的微同源末端链接

(microhomology-mediated end joining, MMEJ)、以单链寡脱氧核苷酸(single-stranded oligodeoxynucleotides, ssODN)或单链 DNA(single strand DNA, ssDNA)为模板的单链 DNA 模板修复(single-stranded DNA templated repair, SSTR)以及分子内正向重复序列介导的单链退火(single-stranded annealing, SSA)^[2-5]。

HDR 能够借助于外源供体 DNA 模板的重组效应实现对目标基因组位点的精确编辑和基因敲入,但是其在高等真核生物细胞中的低效性严重制约了相关编辑策略的发展和应用。为了提高 HDR 效率,研究者们进行了一系列的努力,发现通过调控

DSB 修复通路、调节细胞周期、优化供体类型以及强化阳性细胞筛选等方法均可不同程度地提高 HDR 介导的基因编辑效率^[6-11]。

鉴于 HDR 是一种利用外源供体 DNA 模板进行 DSB 修复的重组过程,其效率依赖于供体 DNA 模板和目标 DSB 的空间和时间共定位。由于供体和靶序列在相对“巨大”细胞空间中共定位的机会有限,靶序列 DSB 募集供体 DNA 的效率可能是 HDR 的关键。研究表明,招募供体 DNA 到目标 DSB 附近能够有效提高 HDR 介导的基因编辑效率^[12]。将 Cas9 与亲和素/链霉亲和素或 SNAP 蛋白融合,可以将生物素标记或 O6-苄基鸟嘌呤(benzylguanine, BG)标记的 ssODN/dsDNA 供体募集到 DSB 位点,并在哺乳动物细胞和小鼠胚胎中实现高效的基因敲入^[12-14]。将 ssODN 序列共价连接的 HUH 内切酶与 Cas9 融合,也能实现供体 DNA 的 DSB 募集,介导高效的 HDR 基因编辑^[15-16]。基于上述报道,本课题组前期提出了供体适配系统(donor adapting system, DAS)的概念,并将酵母源的 Gal4 转录因子 DNA 结合域(binding domain, BD)与 Cas9 融合,开发了 CRISPR/SpCas9-Gal4BD 供体适配基因编辑系统^[17]。

大肠杆菌乳糖操纵子中的 *LacI* 基因编码的阻遏蛋白包含 3 个结构域: N-端结构域(1-62 aa)、核心结构域(63-340 aa)和 C-端结构域(341-357 aa)。其中 N-端结构域靠近氨基末端的区域称为头区,通过铰链区(46-62 aa)与核心区相连,并通过形成 α -螺旋与 LacO 序列特异结合。本研究利用 LacI 阻遏蛋白与 LacO 操纵元序列特异性结合的特点,以 LacI 蛋白作为适配器或适配接头(adaptor)与 Cas9 蛋白融合表达,以 LacO 序列作为适配子或适配序列(aptamer)和 dsDNA 供体序列进行嵌合,开发了一种新型的 CRISPR/Cas9-hLacI DAS,以期实现 CRISPR/Cas9 和 dsDNA 供体的 DSB 共定位,进

而提高其介导的 HDR 基因编辑效率。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293T 细胞源自课题组细胞库。pAAV2-SlugCas9-HF 质粒受赠于上海复旦大学王永明教授(特此致谢),pET28a(+),pJMB84-CMV-T2A-EGFP、pI3.7-U6-VEGFA.sgRNA-SpCas9-GGS5-yBD、pBlue-VEGFA(*Xba* I).donor、SSA-EGFP 报告载体、HDR-EGFP 报告载体和 HDR-USR 报告富集载体等均来自于课题组质粒库。引物合成和测序由西安热默尔生物科技有限公司或西安擎科生物公司完成。*Bsa* I、*Xba* I、*Bam*H I 和 *Eco*R I 等限制性核酸内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。*bLacI* 基因片段以 pET28a(+)载体为模板通过 PCR 扩增获得,密码子人源化优化的 *hLacI* 基因片段由西安擎科生物公司合成。

1.2 载体构建

将 *bLacI* 和 *hLacI* 基因片段分别连接到 pJMB84-CMV-T2A-EGFP 质粒骨架上,构建 *bLacI* 和 *hLacI* 基因表达载体。以 pI3.7 为载体骨架,分别用 U6 和 CMV 启动子起始 CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 和 Cas9 蛋白的表达,将 *bLacI* 和 *hLacI* 通过 5 个 GGS 的 linker 融合到 SpCas9 和 SlugCas9 蛋白的 C 端,获得 SpCas9/SlugCas9-*bLacI*/*hLacI* 融合蛋白表达载体。针对 *VEGFA* 位点,设计靶位点(5'-GCTCGGCCACCACAGGGAAGC-3'),将靶序列克隆到 SlugCas9-*hLacI* 中 U6 启动子下游,构建 sgVEGFA-SlugCas9-*hLacI* 表达载体。对于供体 DNA,以课题组质粒库中 pBlue-VEGFA(*Xba* I).donor 为模板,设计引物,分别在 5'端加入 LacO 序列(5'-GGAATTGTTATCGCTCACAAATTCC-3')或无关序列(irrelevant sequence, IS)序列(5'-GCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGT-3'),扩增出 5'端含有 LacO 序列或 IS 序列的 dsDNA 供体(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primer used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
VEGFA-donor-LacO-F	<u>GGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCGGGGGCAGCAGGAACAAGGG</u>	45
VEGFA-donor-IS-F	<u>GCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGGGGGCAGCAGGAACAAGGG</u>	45
VEGFA-donor-R	GCTCCGCCCGCCGGGACCC	20

The LacO sequence and the IS sequence are the underlined parts.

1.3 细胞培养和转染

采用 HEK293T 细胞系进行检测实验, 培养基含 90% DMEM 培养基、10% FBS 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素和链霉素, 在 5% CO_2 (体积分数)、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养。采用上海 YEASEN 公司的 Hieff Trans™ 脂质体核酸转染试剂根据说明书步骤进行转染实验, 转染前 24 h 将细胞接种于 12 孔板中, 在细胞密度达到 80%–90% 后进行转染, 每孔转染质粒总量为 2 μg , 每组最少设置 3 个平行转染孔。

1.4 SSA 报告实验检测 Cas9 活性

采用 SSA 报告系统对融合 hLacI 后 SpCas9 和 SlugCas9 蛋白的活性进行检测。pSSA-EGFP 报告载体中的 EGFP 报告基因中间由于插入重复序列和靶序列而不能正常表达, 当 Cas9 蛋白靶向 EGFP 基因时即可通过 SSA 修复机制进行修复, 进而 EGFP 正常表达(图 1A)^[18]。分别将 pCRISPR/SlugCas9-sgRNA、pCRISPR/SlugCas9-hLacI-sgRNA、pCRISPR/SpCas9-sgRNA、pCRISPR/SpCas9-hLacI-sgRNA 与 pSSA-EGFP 报告载体以摩尔比 1:1 共转染 HEK293T 细胞。转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察拍照并收集细胞, 使用 BD 公司 FACS Aria III 流式细胞仪对 EGFP 阳性 (EGFP+) 细胞进行计数。

1.5 HDR 报告实验验证 HDR 效率

通过 HDR 报告实验对不同 BS-dsDNA 供体介导的 HDR 效率进行评估。pHDR-EGFP 报告载体中 EGFP 报告基因被 CRISPR/Cas9 系统打靶后仅能通过供体 DNA 依赖的 HDR 机制实现修复(图 1B)^[9]。将 pCRISPR/SlugCas9-sgRNA 和

pCRISPR/SpCas9-sgRNA 与 pHDR-EGFP 报告载体和 3 种不同形式的供体以摩尔比为 1:1:1 转染 HEK293T 细胞, 初步结果表明 5' LacO-EGFP 组的 HDR 效率较高。为了进一步确定载体的最佳摩尔比, 分别设计 pCRISPR/SpCas9 表达载体:pHDR-EGFP 报告载体:EGFP 供体为 1:1:1 和 1:1:2 两种比例, 进行细胞转染。48 h 后, 收集细胞进行流式细胞分析, 绿色荧光细胞所占比例即可反映 HDR 效率。

1.6 HDR-USR 报告实验富集基因组编辑效率

使用优化后 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 对 HEK293T 细胞 VEGFA 位点进行点编辑。以课题组前期构建的质粒供体为模板, 通过 PCR 引入 5'-BS 获得相应的 BS-dsDNA 和 IS-dsDNA 供体, 供体左右同源臂长度均设计为 500 bp 左右, 且序列中 sgRNA 靶点前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 均突变为限制性内切酶 (restriction enzymes, RE) 位点, 通过限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析评估 HDR 编辑效率。采用课题组前期报道的 pHDR-USR 报告载体对基因编辑阳性细胞进行富集。pHDR-USR 报告载体上的 $\Delta Puro$ 基因被 Cas9 靶向后, 完整的 Puro 基因可作为供体使 $\Delta Puro$ 基因通过 HDR 修复并表达(图 1C)^[19]。转染后 24 h, 用含有嘌呤霉素的培养基筛选 3 d, 更换正常培养基继续培养 2 d, 收集各组细胞, 提取基因组 DNA, PCR 扩增目的基因片段并进行限制性内切酶消化实验及 RFLP 分析。

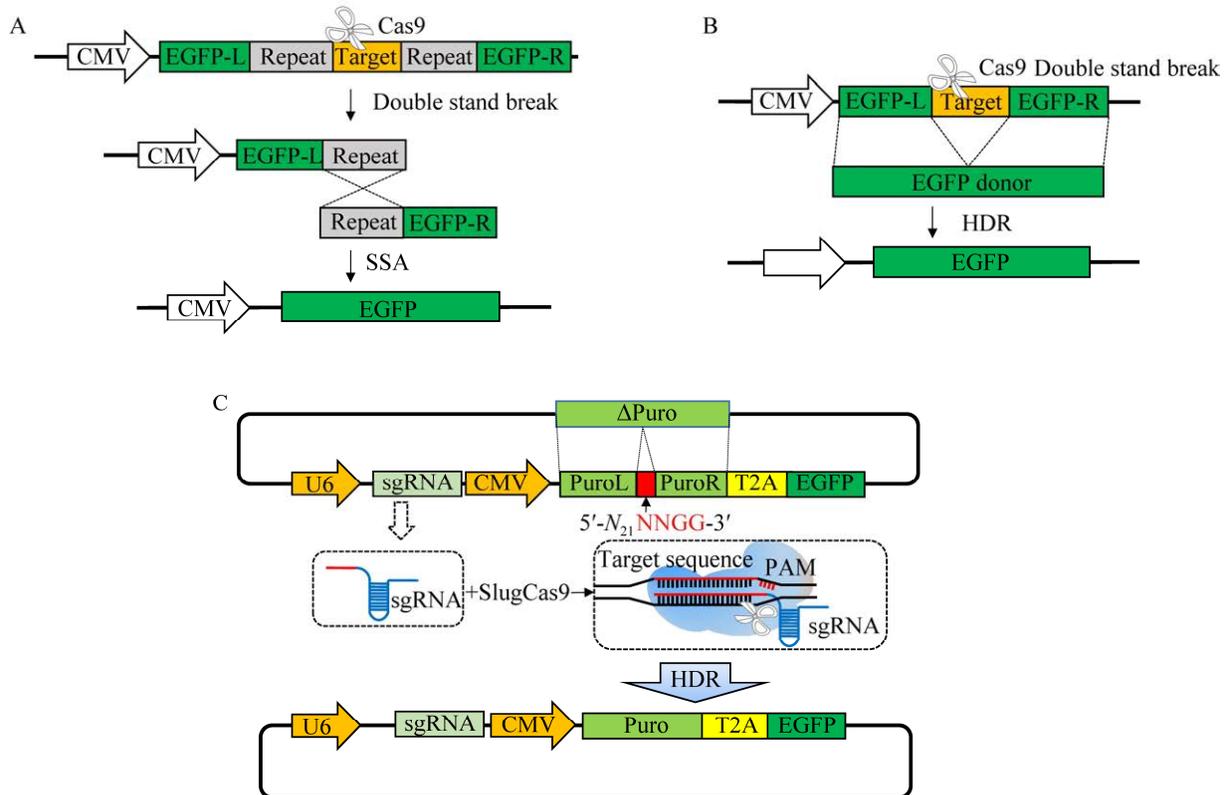


图1 不同报告系统原理示意图 A: SSA-EGFP 报告系统原理示意图^[18]. B: HDR-EGFP 报告系统原理示意图^[9]. C: HDR-USR 报告系统原理示意图^[19]

Figure 1 Schematic diagram of different report systems. A: Schematic diagram of the SSA-EGFP report system^[18]. B: Schematic diagram of the HDR-EGFP report system^[9]. C: Schematic diagram of the HDR-USR report system^[19].

1.7 流式细胞仪检测

转染 72 h 后, 去除培养基, 用 500 μ L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 2 次, 用胰酶消化, 900 r/min 离心 3 min, 弃上清, 用 500 μ L PBS 将细胞重悬, 过滤到流式管中, 使用 BD 公司 FACS Aria III 流式细胞仪对 EGFP 阳性(EGFP+) 细胞进行计数以评估 LacI 表达水平、Cas9 活性以及 DAS 介导的 HDR 效率等指标。

1.8 Western blotting 检测

在 6 孔板中转染, 72 h 后去除培养基, 用 PBS 清洗 2 遍, 加入 100 μ L 含有 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的放射免疫沉淀测定(radio immunoprecipitation

assay, RIPA) 细胞裂解液, 用细胞刮刀收集细胞至 1.5 mL 离心管中, 于冰上裂解 30 min, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集上清液。加入 5 \times SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 于 12% SDS-PAGE 胶中电泳, 采用半干转法将蛋白转移到聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜上, 室温封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗(抗 GFP 鼠单克隆抗体, 购自康为世纪生物科技有限公司)过夜, Tris 缓冲盐水吐温缓冲液(Tris buffered saline tween, TBST)洗膜 3 次, 室温孵育二抗 1 h (羊抗鼠 IgG-HRP, 购自康为世纪生物科技有限公司), TBST 洗膜 3 次, 采用超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)法在化学发光自显影仪检测蛋白条带并拍照。

1.9 数据统计和分析

通过 Image J 软件对 DNA 条带进行灰度对比分析,通过 GraphPad Prism 8 软件进行显著性检验。所有试验均至少设置 3 个平行重复或独立重复,数据以“均值 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ ”表示,使用 t 检验进行显著性检验。*: $P < 0.05$ 为差异显著,**: $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *LacI* 基因密码子优化结果

考虑到原核生物和真核高等动物密码子偏

好性差异较大,鉴于 *bLacI* 基因源于大肠杆菌,在哺乳动物细胞中不一定能有效表达。本研究首先对 *bLacI* 基因序列进行了密码子人源化优化,通过直接合成法获得了 *hLacI* 基因并测序确认。为了确认 *LacI* 基因密码子优化前后在哺乳动物细胞中的表达情况,本研究先后构建了相应的真核表达载体 pJMB84-CMV-*bLacI*-T2A-EGFP 和 pJMB84-CMV-*hLacI*-T2A-EGFP。分别将 *bLacI* 和 *hLacI* 基因的真核表达载体转染 HEK293T 细胞,48 h 后在荧光显微镜下观察(图 2A),并进行流式细胞仪计数分析,结果表明:*hLacI*-EGFP

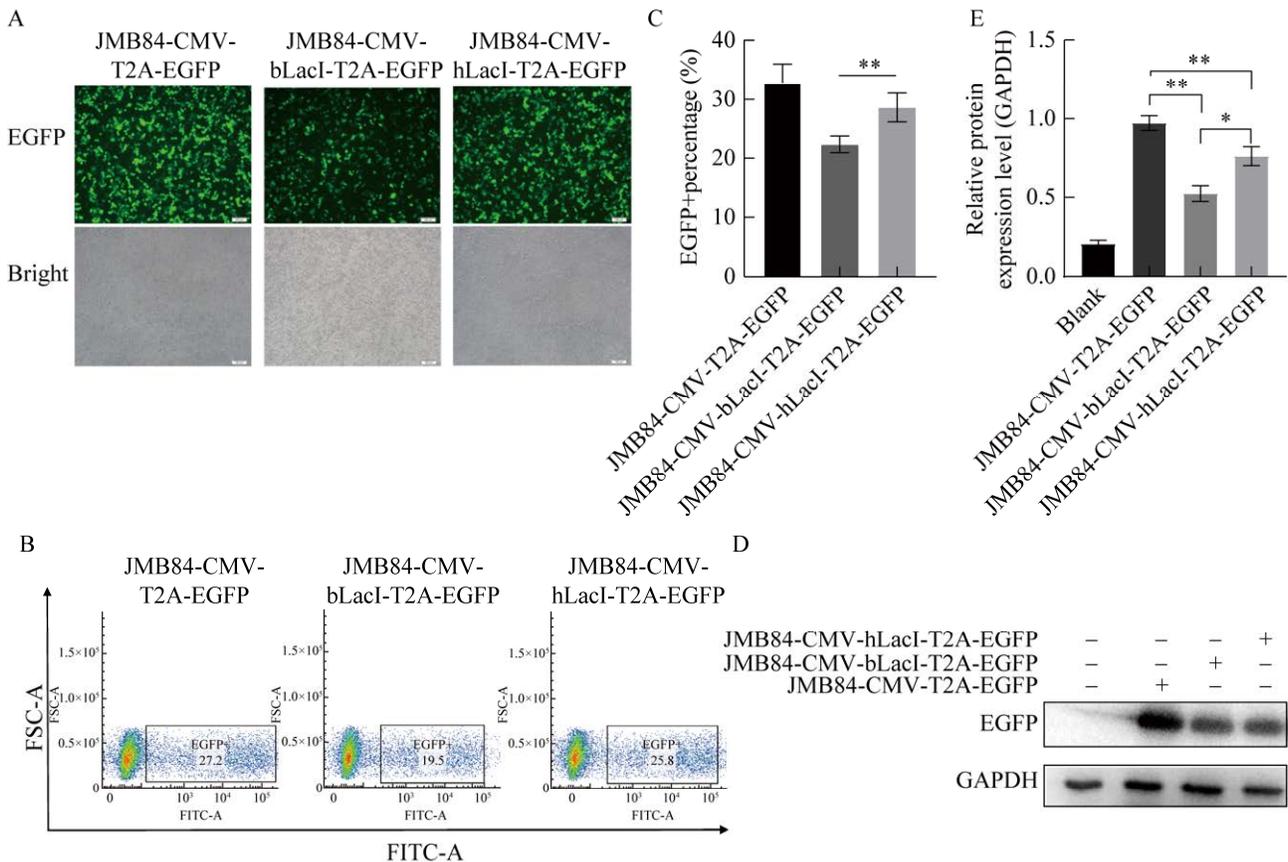


图 2 *LacI* 基因密码子优化前后表达水平检测结果 A–C: *bLacI* 和 *hLacI* 真核表达载体转染 48 h 后细胞荧光图(A)、流式计数分析图(B)和流式计数结果柱状图(C)。D–E: *bLacI* 和 *hLacI* 真核表达载体转染 48 h 后提取细胞总蛋白的 WB 检测结果(D)和灰度分析结果(E)。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。比例尺=100 μm 。Figure 2 Expression of the *LacI* genes before and after codon optimization. A–C: Fluorescent photographs (A), flow counting analysis (B) and bar graph of flow counting results (C) of the HEK293T cells transfected with the *bLacI* and *hLacI* eukaryotic expression vectors for 48 h. D–E: Western blotting result (D) and its gray analysis (E) of the protein expression of the HEK293T cells transfected with the *bLacI* and *hLacI* eukaryotic expression vectors. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. Scale bar=100 μm .

组的绿色荧光细胞比例显著高于 bLacI-EGFP 组 ($P < 0.01$, 图 2B、2C)。进一步的蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 检测结果表明, hLacI-EGFP 组和 bLacI-EGFP 组的细胞都表达 EGFP 蛋白, 且 hLacI-EGFP 组细胞中的表达量高于 bLacI-EGFP 组(图 2D、2E)。上述结果间接证明了与之串联的 *bLacI* 和 *hLacI* 基因均能有效表达, 且密码子优化后的 *hLacI* 基因表达效果显著优于优化前的 *bLacI*, 故本研究后续实验均采用

用了 *hLacI* 基因。

2.2 SSA 报告实验检测融合 hLacI 后的 Cas9 活性

将 sgRNA.SpCas9/SlugCas9-hLacI 表达载体和相应的 SSA-EGFP 报告载体共转染至 HEK293T 细胞中, 48 h 后进行流式细胞仪技术分析, 结果表明: SlugCas9-hLacI 组和 SlugCas9 组 EGFP 阳性细胞比例无显著差异(图 3A–3C), 但 SpCas9-hLacI 组与 SpCas9 组相比, EGFP 阳

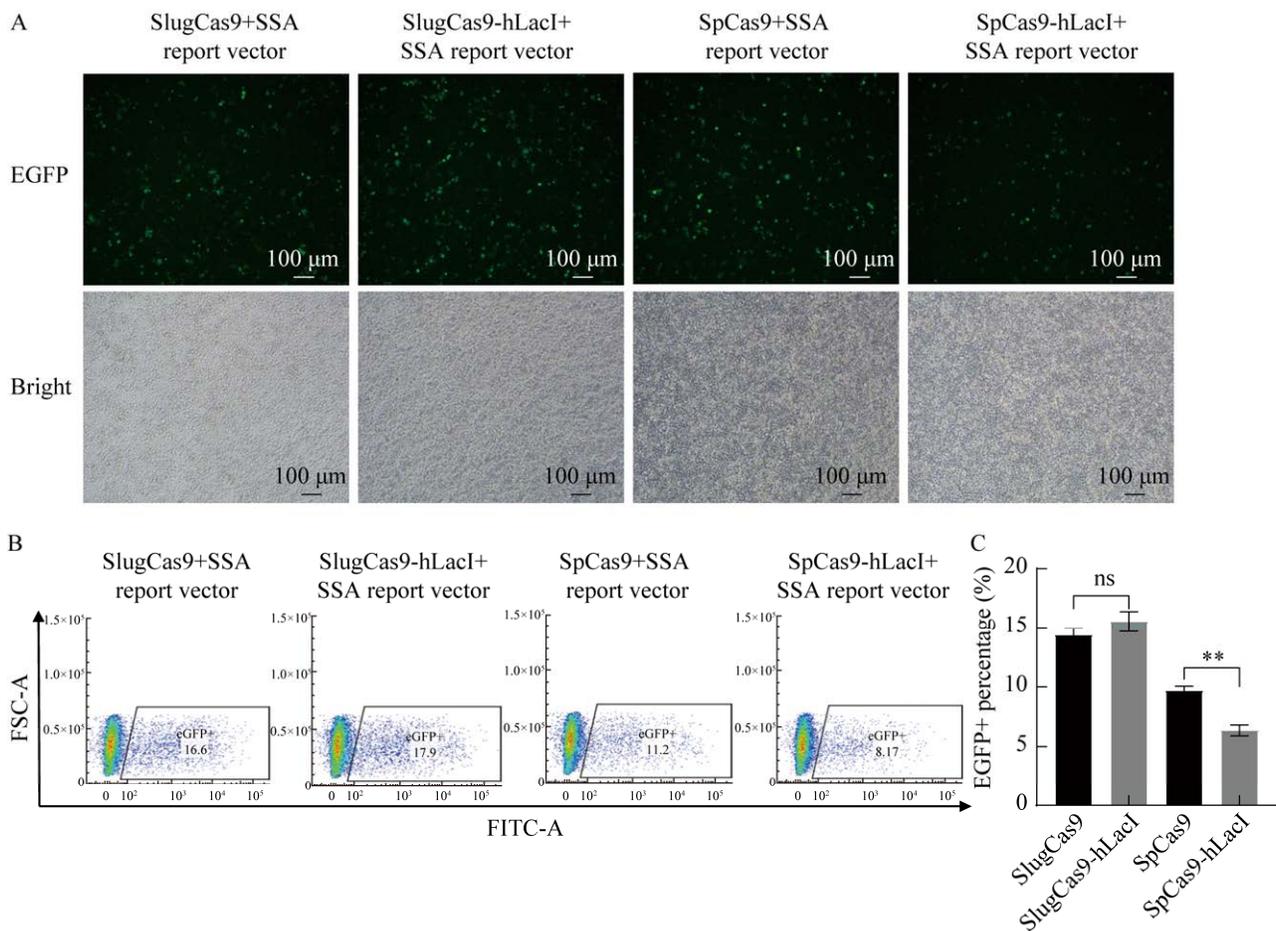


图 3 SSA 报告实验检测融合 hLacI 后 Cas9 活性的结果 A–C: sgRNA.SpCas9/SlugCas9-hLacI 表达载体和 SSA-EGFP 报告载体共转染后细胞荧光图(A), 流式计数分析图(B)和流式计数结果柱状图(C). **: $P < 0.01$; ns: 无显著性差异(比例尺=100 μm)

Figure 3 Results of SSA reporter assay for the activity of Cas9 fused with hLacI. A–C: Fluorescent photographs (A) (scale: 100 μm), flow counting analysis (B) and bar graph of flow counting results (C) of the HEK293T cells with co-transfection of sgRNA.SpCas9/SlugCas9-hLacI and SSA-EGFP vectors. **: $P < 0.01$, ns: No significance (scale bar=100 μm).

性细胞比例明显下降($P<0.01$) (图 3A–3C), 表明 hLacI 融合表达对 SpCas9 的打靶活性影响较大, 但对 SlugCas9 活性没有显著影响。因此, 本研究后续实验主要采用 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 进行相关检测。

2.3 HDR 报告实验检测 CRISPR/Cas9-hLacI DAS 介导的 HDR 效率

CRISPR/Cas9-hLacI DAS 包括 sgRNA.Cas9-hLacI 表达载体和 LacO-dsDNA 供体模板两部分。为了确定 LacO 序列与 dsDNA 供体的最佳嵌合方式, 共设计了 3 种不同的 LacO-dsDNA 供体(图 4A)。采用 HDR-EGFP 报告系统对 CRISPR/Cas9-hLacI DAS 介导的 HDR 效率进行评估。将 sgRNA.Cas9-hLacI 表达载体、LacO-EGFP 供体和 HDR-EGFP 报告载体共转染至 HEK293T 细胞(图 4B), 即可通过 EGFP 阳性细胞观察和流式细胞仪计数分析评估 CRISPR/Cas9-hLacI DAS 介导的 HDR 效率。结果表明: 对于 CRISPR/SpCas9-hLacI DAS, 5' LacO-EGFP 组的 EGFP 阳性细胞比例显著高于其他 3 组(图 4C–4D); 对于 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS, 5' LacO-EGFP 组的 EGFP 阳性细胞比例也有高于其他 3 组的趋势(图 4E、4F)。进一步对 sgRNA.Cas9-hLacI 表达载体、HDR-EGFP 报告载体和 LacO-EGFP 供体的转染比例进行优化, 结果表明比例为 1:1:2 时 HDR 效率较高(图 4G–4H)。综上所述, 本研究最终选择 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 和 5'-LacO-EGFP 供体进行后续的基因组编辑验证。

2.4 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 介导的基因组编辑

为了验证 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 介导的基因组编辑效果, 本研究初步选用了在 HEK293T 细胞中 sgRNA 活性较高的 VEGFA 位点, 构建了相应的 sgVEGFA.SlugCas9-hLacI 表达载体和 5' LacO-VEGFA 供体。在供体模板上

引入 *Xba* I 酶切位点, 若 VEGFA 位点发生 HDR, 靶位点 PAM 序列突变为引入的酶切位点, 可以通过 RFLP 分析检测 HDR 编辑效率, 并防止二次打靶。同时为控制单一变量, 在对照组 dsDNA 供体的 5'端结合了 25 bp 与 hLacI 蛋白无结合能力的非回文结构无关序列 IS。

采用通用型 HDR-USR 报告富集系统^[19]可以实现对 HDR 编辑阳性细胞的特异性富集(图 1C)。sgVEGFA.Cas9-hLacI 表达载体、HDR-USR 报告富集载体和 LacO-VEGFA 供体按 1:1:2 比例共转染 HEK293T 细胞, 转染 72 h 后进行嘌呤霉素筛选, 收集活细胞, 提取基因组 DNA, PCR 扩增打靶序列, 采用 *Xba* I 酶切实验检测 HDR 编辑效率(图 5A)。结果表明, CRISPR/SlugCas9-hLacI+5'LacO-VEGFA 组的 HDR 编辑效率为 30.5%, 显著高于 CRISPR/SlugCas9+5'LacO-VEGFA 组(25.8%)和 CRISPR/SlugCas9-hLacI+5'IS-VEGFA 组(24.6%) (图 5B、5C)。

3 讨论与结论

在 CRISPR/Cas9 介导基因编辑所依赖的细胞修复机制中, HDR 是相对于 NHEJ 的一类 DSB 修复方式, 根据供体 DNA 形式不同可以分为 HR、MMEJ 和 SSTR 等, 不同机制介导的 HDR 编辑形式和效率有所差异, 但总体上的低效率限制了该类基因编辑策略的广泛应用^[1]。系列研究表明, 通过调控 DSB 修复通路^[20]、调节细胞周期^[21]、修饰 DNA 供体^[22]、改造 Cas9 蛋白^[8]、提高供体浓度、开发基因编辑阳性细胞筛选系统^[19]以及协同使用小分子化学物质等能够有效提高 HDR 编辑效率^[17,23]。本研究以 Cas9 核酸酶和 dsDNA 供体的适配共定位为切入点, 利用大肠杆菌 LacI 蛋白与 LacO 操纵序列特异性结合的特点, 开发了一种新型供体适配基因编辑系统。该系统的核心内容为以 LacI 作为适配器与 Cas9 融合的 Cas9-hLacI

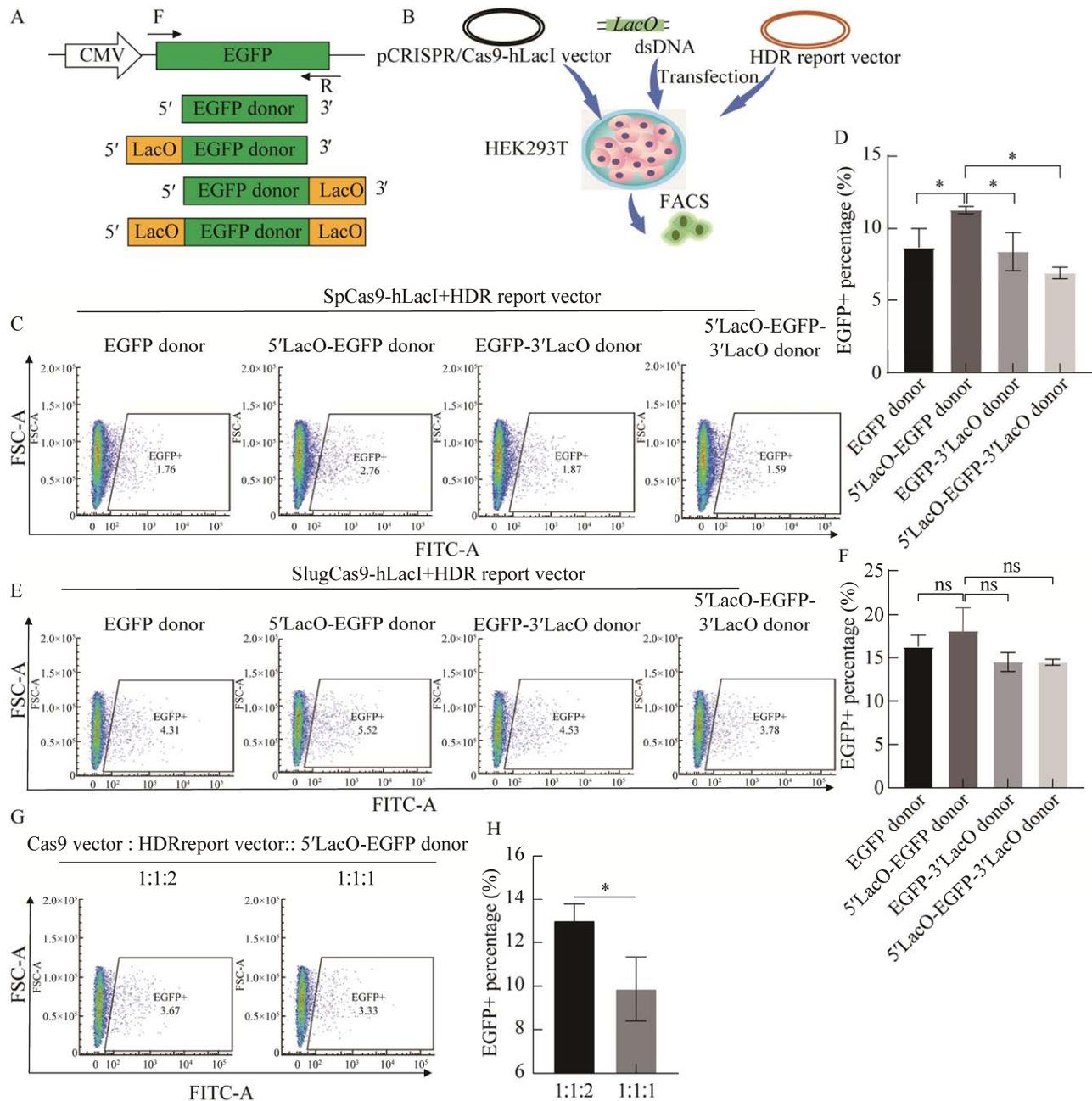


图 4 HDR 报告实验检测 CRISPR/Cas9-hLacI DAS 介导 HDR 效率的结果 A: 不同 LacO-EGFP 供体示意图. B: HDR-EGFP 报告系统检测流程示意图. C-D: 不同类型供体对 CRISPR/SpCas9-hLacI DAS 介导 HDR 效率的影响. E-F: 不同类型供体对 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 介导 HDR 效率的影响. G-H: sgRNA. Cas9-hLacI 表达载体、HDR-EGFP 报告载体和 LacO-EGFP 供体转染比例的优化结果. *: $P < 0.05$; ns: 无显著性差异

Figure 4 Results of HDR reporter assay for the HDR efficiency mediated by CRISPR/Cas9-hLacI DAS. A: Diagram of different LacO-EGFP donors. B: Flow chart of the detection process by HDR-EGFP report system. C-D: HDR efficiency mediated by CRISPR/SpCas9-hLacI DAS and different donors. E-F: HDR efficiency mediated by CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS and different donors. G-H: The results of the optimization of the transfection ratio of sgRNA. Cas9-hLacI expression vector, HDR-EGFP reporter and LacO-EGFP donor. *: $P < 0.05$; ns: No significance.

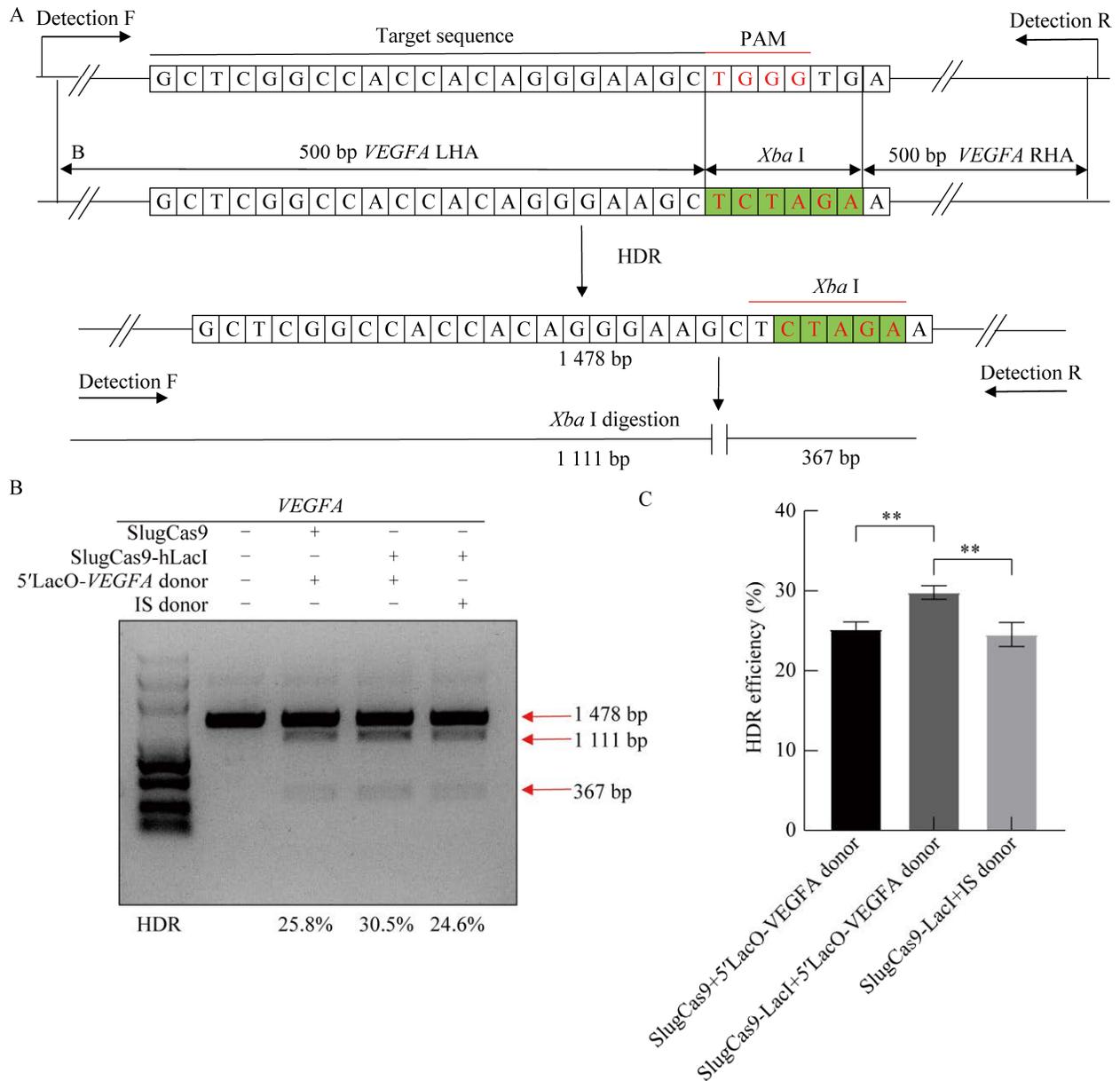


图 5 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 介导的 VEGFA 位点编辑结果 A: VEGFA 位点 HDR 编辑效率检测原理示意图。B–C: VEGFA 位点 HDR 编辑检测结果。**: $P < 0.01$

Figure 5 Genome editing of VEGFA locus by CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS. A: Schematic diagram for the detection of HDR editing efficiency at VEGFA locus. B–C: The detection results of the HDR editing efficiency at VEGFA locus. **: $P < 0.01$.

融合蛋白和以 LacO 序列作为适配子与 dsDNA 供体序列进行嵌合的 LacO-dsDNA 供体,理论上可以通过 sgRNA/Cas9-hLacI 和 LacO-dsDNA 供体的 DSB 共定位提高 HDR 基因编辑效率。本研究初步利用 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 在

VEGFA 位点提高了 HDR 编辑效率,为该系统的进一步优化及应用奠定了基础。CRISPR/Cas9-hLacI 系统首次采用了细菌源的 LacI/LacO 适配器/适配子组合,与目前已经报道的 CRISPR/Cas9 供体适配基因编辑系统的对比如表 2 所示。

表 2 不同 CRISPR/Cas9 供体适配基因编辑系统的比较

Table 2 Comparison of different CRISPR/Cas9-derived donor adapting systems

Cas9-adaptor fusion design			Adaptor type	Adaptor size (aa)	Source	Optimization method	Aptamer names	Donor type	HDR type	References
Cas9	X	SNAP	SNAP-tag	181	-	-	O ⁶ -BG	O ⁶ -BG-ssDNA	SSTR	[13]
Cas9	16 aa	Avidin	Avidin	152	-	-	Biotin	Biotin-ssDNA Biotin-dsDNA	SSTR HR	[9,12]
Cas9	sgRNA-Slm		Streptavidin	159	-	-	Biotin	Biotin-ssDNA	SSTR	[33]
Cas9	H4-2	PCV	ssDNA.BD	109	Virus	-	PCV.BS	BS-ssDNA	SSTR	[15]
Cas9	X	VirD2	ssDNA.BD	455	Agrobacterium	-	T-DNA.BS	BS-ssDNA	SSTR	[34]
Cas9	30 aa	N57	Sleeping beauty transposase BD	57	Transposase SB100X	-	N57.BS	BS-dsDNA	MMEJ	[28]
Cas9	16 aa	THAP11	Transcription factor BD	105	Human	-	THAP11.BS	BS-dsDNA	HR	[26]
Cas9	15 aa	GAL4BD	Transcription factor BD	146	Yeast	-	Gal4BD.BS	BS-dsDNA	HR	[17]
Cas9	15 aa	LacI	Repressor	361	<i>E. coli</i>	Codon humanized	LacO	LacO-dsDNA	HR	This study

X: The linker between the Cas9 protein and the adapter is unknown; SIm: RNA sequences, linked to sgRNA for the recruitment of streptavidin; DBD: DNA binding domain; BS: Binding sequences; HDR: Homology-directed repair, including homologous recombination (HR), single-stranded DNA templated repair (SSTR) and microhomology-mediated end joining (MMEJ). -: No detail.

本研究采用了目前应用最为广泛的 SpCas9 和一种新近报道的 SlugCas9-HF，二者活性相近，但后者具有高特异性和小型化的特点^[24]。将 SpCas9 和 SlugCas9 分别与 LacI 融合表达后，SpCas9 活性受到的影响较大，而 SlugCas9 活性没有受到明显影响，这可能与 Cas9 蛋白的大小以及特异性有关。本研究最终采用 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS，在 HEK293T 细胞中针对 VEGFA 位点实现了高效的 HDR 编辑。但遗憾的是，针对另一位点 EMX1 的基因组编辑实验并未检测到明显的 HDR 效率提升，猜测 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 可能具有一定的位点差异性，仍需在更多类型的细胞中针对更多基因组位点进行后续适用性验证。另外，采用 RFLP 法对 HDR 效率进行检测，虽然成本较低，但不能很好地反映 HDR 的效率^[17,25]。本研究过程中课题组也注意到，通过药物瞬时筛选富集 HDR 编辑

细胞和 RFLP 法检验 HDR 效率仍具有一定的局限性，受细胞筛选、基因组提取、PCR 及酶切等过程的影响，存在着一定的干扰因素。鉴于 dsDNA 供体主要优势在于基因大片段敲入，在后续的优化及应用研究中可以考虑采用荧光或抗性基因敲入的策略^[26]，改进筛选手段及下游检测方法，进而提高实验的可靠性和严谨性。

在类似的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 研究中，本课题组发现增加适配子(结合序列)重复数并不能提高 HDR 重组效率^[17]，图 4 中 5'/3'-端双 LacO 组的检测结果相对较低也说明了这一点，推测较长的 dsDNA 供体侧翼序列可能不利于重组。与 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 的研究结果一致，本研究中也发现将适配子序列添加在 dsDNA 5'-端的效果较好，推测 dsDNA 供体的 3'-游离端可能有助于同源重组，而 5'/3'-端双 LacO 的额外添加反而不利。不过上述推测尚待进一步研究论证。

另外, LacI 蛋白是一个呈 V 字形的四聚体, 利用 N-端结构域铰链区(46–62 aa)结合 DNA, 在后续优化研究中可以考虑精减 LacI 蛋白长度, 筛选关键结合域, 保留结合力的前提下尽量避免对 Cas9 活性的影响, 进而保证提高 HDR 效率的有效性。

DNA 结合蛋白(DNA-binding protein, DBP)与特异性 DNA 序列结合对于真核生物和原核生物的基因转录调节起着至关重要作用^[27], 利用

蛋白质与 DNA 相互作用这一原理, 将来自转座酶 SB100X 的 N57 DNA 结合域、人源化转录因子 THAP11 和 Gal4BD 等蛋白与 Cas9 蛋白融合, 也能够提高 HDR 基因编辑效率^[17,26,28]。表 3 中进一步列举了一些典型的源于高等动物、酵母和细菌源的 DNA 结合蛋白及相应的特异性结合序列, 或许可以作为适配器/适配子用于新型供体适配基因编辑系统的开发。

表 3 一些已经或可能作为 dsDNA 供体适配基因编辑系统的适配器蛋白及结构域

Table 3 Several proteins already or may available as adaptors for dsDNA donor adapting systems

Source	Protein type	Protein or domain name	Sequence of binding DNA (5'→3')	References
Artificial	Transcription factor BD	ZFP	Artificial combination	[35]
	Transcription factor BD	TAL	Artificial combination	[36]
Higher animal	Transcription factor BD	ATF3	GGTGACGTCATC	[26]
	Transcription factor BD	PDR1	TCCGCGGA	[26]
	Transcription factor BD	T-box	AATTCACACCTAGGTGTGAAATT	[37]
	Transcription factor BD	c-Myc	CACGTGGTTGCCACGTG	[38]
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i> Engrailed homeodomain	ENH	TAATNN	[39]
Yeast	Transcription factor BD	Gal4BD	TCCGGAGGACTGTCTCCGG	[17]
	Transcription factor BD	CBF1	RTCACRTG (R is purine)	[40]
Transposase	Sleeping beauty transposase BD	N57	N57.BS	[28]
Bacteria	Repressor	AraC	<i>araO1, araO2, araI</i>	[41]
	Repressor	LacI	GGAATTGTTATCCGCTCACAATTCC	[42]
	Repressor	TrpR	GAACTAGTAACTAGTACG	[43]
	Repressor	LexA	CTGTATATATATACAG	[44]

近年来, 基因编辑技术发展迅速, 单碱基编辑器(base editor, BE)与先导编辑(prime editor, PE)先后被报道, 能够分别用于单碱基替换与小片段的插入和缺失且被广泛应用^[29-30]。但是, BE 仅限于碱基之间的替换, PE 虽然能实现大片段的敲入和敲除, 但 pegRNA 设计复杂、效率偏低^[31-32]。基因敲入特别是大片段的敲入仍主要依赖于 CRISPR/Cas9 系统介导的 HDR 基因编辑策略。因此, HDR 效率的提升仍是一个亟待解决的科学问题, CRISPR/Cas9 供体适配基因编辑系统的开发仍然具有重要的科学意义和应用价值。

综上所述, 本研究开发了一种新型的 CRISPR/

Cas9-hLacI 双链 DNA 供体适配基因编辑系统, 并采用优化后的 CRISPR/SlugCas9-hLacI DAS 实现了对 *VEGFA* 位点的高效编辑, 丰富了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术种类, 为以后的基因编辑及分子设计育种研究提供了新的工具。

REFERENCES

- [1] YANG H, REN SL, YU SY, PAN HF, LI TD, GE SX, ZHANG J, XIA NS. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6461.

- [2] CHANG HHY, PANNUNZIO NR, ADACHI N, LIEBER MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(8): 495-506.
- [3] TIEN V, DUONG D, JIHAE K, WOO SY, MIL T, JONG SY, SWATI D, JAEYEAN K. CRISPR/Cas-based precision genome editing *via* microhomology-mediated end joining (MMEJ)[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 19(2): 230-239.
- [4] FU YW, DAI XY, WANG WT, YANG ZX, ZHAO JJ, ZHANG JP, WEN W, ZHANG F, OBERG KC, ZHANG L, CHENG T, ZHANG XB. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(2): 969-985.
- [5] ZHANG XY, LI T, OU JP, HUANG JJ, LIANG PP. Homology-based repair induced by CRISPR-Cas nucleases in mammalian embryo genome editing[J]. *Protein & Cell*, 2022, 13(5): 316-335.
- [6] RIESENBERG S, MARICIC T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1-9.
- [7] NAMBIAR TS, BILLON P, DIEDENHOFEN G, HAYWARD SB, TAGLIALATELA A, CAI KH, HUANG JW, LEUZZI G, CUELLA-MARTIN R, PALACIOS A, GUPTA A, EGLI D, CICCIA A. Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3395.
- [8] CHARPENTIER M, KHEDHER AHY, MENORET S, BRION A, LAMRIBET K, DARDILLAC E, BOIX C, PERROUAULT L, TESSON L, GENY S, de CIAN A, ITIER JM, ANEGON I, LOPEZ B, GIOVANNANGELI C, CONCORDET JP. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1133.
- [9] SHAO SM, REN CH, LIU ZT, BAI YC, CHEN ZL, WEI ZH, WANG X, ZHANG ZY, XU K. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, 92: 43-52.
- [10] PINDER J, SALSMAN J, DELLAIRE G. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(19): 9379-9392.
- [11] WIENERT B, NGUYEN DN, GUENTHER A, FENG SJ, LOCKE MN, WYMAN SK, SHIN J, KAZANE KR, GREGORY GL, CARTER MAM, WRIGHT F, CONKLIN BR, MARSON A, RICHARDSON CD, CORN JE. Timed inhibition of CDC7 increases CRISPR-Cas9 mediated templated repair[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2109.
- [12] MA M, ZHUANG FF, HU XB, WANG BL, WEN XZ, JI JF, XI JJ. Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxp alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system[J]. *Cell Research*, 2017, 27(4): 578-581.
- [13] SAVIC N, RINGNALDA FC, LINDSAY H, BERK C, BARGSTEN K, LI YZ, NERI D, ROBINSON MD, CIAUDO C, HALL J, JINEK M, SCHWANK G. Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair[J]. *eLife*, 2018, 7: 33761.
- [14] GU B, POSFAI E, ROSSANT J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(7): 632-637.
- [15] AIRD EJ, LOVENDAHL KN, ST MARTIN A, HARRIS RS, GORDON WR. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 54.
- [16] LEE K, MACKLEY VA, RAO A, CHONG AT, DEWITT MA, CORN JE, MURTHY N. Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering[J]. *eLife*, 2017, 6: 25312.
- [17] 张潇筠, 徐坤, 沈俊岑, 穆璐, 钱泓润, 崔婕妤, 马宝霞, 陈知龙, 张智英, 魏泽辉. 一种新型提高 HDR 效率的 CRISPR/Cas9-Gal4BD 供体适配基因编辑系统[J]. *遗传*, 2022, 44(8): 708-719.
- ZHANG XJ, XU K, SHEN JC, MU L, QIAN HR, CUI JY, MA BX, CHEN ZL, ZHANG ZY, WEI ZH. A CRISPR/Cas9-Gal4BD donor adapting system for enhancing homology-directed repair[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2022, 44(8): 708-719 (in Chinese).
- [18] XU K, REN CH, LIU ZT, ZHANG T, ZHANG TT, LI D, WANG L, YAN Q, GUO LJ, SHEN JC, ZHANG ZZ. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*[J]. *Cellular adhesion and migration*

- Molecular Life Sciences, 2015, 72(2): 383-99.
- [19] YAN NN, SUN YS, FANG YY, DENG JR, MU L, XU K, MYMRYK JS, ZHANG ZY. A universal surrogate reporter for efficient enrichment of CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2020, 19: 775-789.
- [20] TAKESHI M, DOUGAN STEPHANIE K, TRUTTMANN MATTHIAS C, BILATE ANGELINA M, INGRAM JESSICA R, PLOEGH HIDDE L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(5): 538-42.
- [21] ORTHWEIN A, NOORDERMEER SM, WILSON MD, LANDRY S, ENCHEV RI, SHERKER A, MUNRO M, PINDER J, SALSMAN J, DELLAIRE G, XIA B, PETER M, DUROCHER D. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells[J]. *Nature*, 2015, 528(7582): 422-426.
- [22] RICHARDSON CD, KAZANE KR, FENG SJ, ZELIN E, BRAY NL, SCHÄFER AJ, FLOOR SN, CORN JE. CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway[J]. *Nature Genetics*, 2018, 50(8): 1132-1139.
- [23] BANAN M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 308: 1-9.
- [24] HU ZY, ZHANG CD, WANG S, GAO SQ, WEI JJ, LI MM, HOU LH, MAO HL, WEI YY, QI T, LIU HM, LIU D, LAN F, LU DR, WANG HY, LI JX, WANG YM. Discovery and engineering of small SlugCas9 with broad targeting range and high specificity and activity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(7): 4008-4019.
- [25] REN CH, XU K, SEGAL DJ, ZHANG ZY. Strategies for the enrichment and selection of genetically modified cells[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(1): 56-71.
- [26] LI GL, WANG HQ, ZHANG XW, WU ZF, YANG HQ. A Cas9-transcription factor fusion protein enhances homology-directed repair efficiency[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100525.
- [27] TAK LEUNG RW, JIANG XS, CHU KH, QIN J. ENPD-a database of eukaryotic nucleic acid binding proteins: linking gene regulations to proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D322-D329.
- [28] MA SF, WANG XL, HU YF, LV J, LIU CF, LIAO KT, GUO XH, WANG D, LIN Y, RONG ZL. Enhancing site-specific DNA integration by a Cas9 nuclease fused with a DNA donor-binding domain[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(18): 10590-10601.
- [29] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [30] ANZALONE AV, RANDOLPH PB, DAVIS JR, SOUSA AA, KOBLAN LW, LEVY JM, CHEN PJ, WILSON C, NEWBY GA, RAGURAM A, LIU DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [31] JIANG TT, ZHANG XO, WENG ZP, XUE W. Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 227-234.
- [32] CHOI J, CHEN W, SUITER CC, LEE C, CHARDON FM, YANG W, LEITH A, DAZA RM, MARTIN B, SHENDURE J. Precise genomic deletions using paired prime editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 218-226.
- [33] CARLSON-STEVERMER J, ABDEEN AA, KOHLENBERG L, GOEDLAND M, MOLUGU K, LOU M, SAHA K. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1711.
- [34] ALI Z, SHAMI A, SEDEEK K, KAMEL R, ALHABSI A, TEHSEEN M, HASSAN N, BUTT H, KABABJI A, HAMDAN SM, MAHFOUZ MM. Fusion of the Cas9 endonuclease and the VirD2 relaxase facilitates homology-directed repair for precise genome engineering in rice[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 44.
- [35] NAKATA E, LIEW FF, UWATOKO C, KIYONAKA S, MORI YS, KATSUDA Y, ENDO M, SUGIYAMA H, MORII T. Zinc-finger proteins for site-specific protein positioning on DNA-origami structures[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(10): 2421-2424.
- [36] STEPHANOPOULOS N. Hybrid nanostructures from the self-assembly of proteins and DNA[J]. *Chem*, 2020, 6(2): 364-405.
- [37] SAMARASINGHE KTG, AN E, GENUTH MA, CHU L, HOLLEY SA, CREWS CM. OligoTRAFTACs: a

- generalizable method for transcription factor degradation[J]. *RSC Chemical Biology*, 2022, 3(9): 1144-1153.
- [38] ZELLER KI, ZHAO XD, LEE CWH, CHIU KP, YAO F, YUSTEIN JT, OOI HS, ORLOV YL, SHAHAB A, YONG HC, FU YT, WENG ZP, KUZNETSOV VA, SUNG WK, RUAN YJ, DANG CV, WEI CL. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(47): 17834-17839.
- [39] MOU Y, YU JY, WANNIER TM, GUO CL, MAYO SL. Computational design of co-assembling protein-DNA nanowires[J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 230-233.
- [40] KURAS L, CHEREST H, SURDIN-KERJAN Y, THOMAS D. A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(10): 2519-2529..
- [41] LIU Q, SONG LL, PENG QQ, ZHU QY, SHI XN, XU MQ, WANG QY, ZHANG YX, CAI MH. A programmable high-expression yeast platform responsive to user-defined signals[J]. *Science Advances*, 2022, 8(6): eab15166.
- [42] MARKLUND E, MAO GZ, YUAN JW, ZIKRIN S, ABDURAKHMANOV E, DEINDL S, ELF J. Sequence specificity in DNA binding is mainly governed by association[J]. *Science*, 2022, 375(6579): 442-445.
- [43] GONG XY, ZHANG RH, WANG J, YAN YJ. Engineering of a TrpR-based biosensor for altered dynamic range and ligand preference[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(6): 2175-2183.
- [44] MASO L, VASCON F, CHINELLATO M, GOORMAGHTIGH F, BELLIO P, CAMPAGNARO E, van MELDEREN L, RUZZENE M, PARDON E, ANGELINI A, CELENZA G, STEYAERT J, TONDI D, CENDRON L. Nanobodies targeting LexA autocleavage disclose a novel suppression strategy of SOS-response pathway[J]. *Structure*, 2022, 30(11): 1479-1493.e9.

(本文责编 郝丽芳)