

一种新型提高 HDR 效率的 CRISPR/Cas9-Gal4BD 供体适配基因编辑系统

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

西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

摘要: 近年来, CRISPR 基因编辑及衍生技术迅速发展, 在生命科学、生物医学研究以及动植物育种领域得到了广泛应用。基于 DNA 双链断裂(double-stranded break, DSB)同源指导修复(homology-directed repair, HDR)机制的基因敲入和点编辑是基因编辑的重要策略, 但效率偏低亟待提高。本文提出了驱动供体 DNA 富集至 DSB 处以提高 HDR 效率的新策略, 并设计了一套 CRISPR/Cas9-Gal4BD 供体适配基因编辑系统(donor adapting system, DAS)。该系统主要利用 Gal4 DNA 结合域(Gal4 binding domain, Gal4BD)作为配体蛋白与 Cas9 融合表达, 将 Gal4BD 结合序列(Gal4 binding sequence, Gal4BS)作为受体序列与双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 供体结合, 以期提高 HDR 效率。使用 HEK293T-HDR.GFP 报告细胞系的初步研究结果表明当 dsDNA 供体同源臂在一定长度(100~60 bp)时该系统能够提高 HDR 效率 2~4 倍。进一步的优化研究表明, 融合端口和融合使用连接子(linker)的选择会影响 Cas9 表达效果及活性, 而 GGS5 作为 Cas9-Gal4BD 融合的连接子则影响较小。同时, 本研究还发现 Gal4BS-dsDNA 供体的差异化设计也会影响 HDR 效率, 将 Gal4BS 添加到 dsDNA 供体 5'-端的效果最佳。综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 在 *AAVSI* 和 *EMXI* 位点上实现了 HDR 编辑效率的提高, 为进一步利用该系统进行动物分子设计育种研究提供了参考和借鉴。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 供体 DNA; 供体适配; 同源指导修复

A CRISPR/Cas9-Gal4BD donor adapting system for enhancing homology-directed repair

Xiaojun Zhang, Kun Xu, Juncen Shen, Lu Mu, Hongrun Qian, Jieyu Cui, Baoxia Ma, Zhilong Chen, Zhiying Zhang, Zehui Wei

College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 71200, China

Abstract: The fast-rising CRISPR-derived gene editing technologies has been widely used in the fields of life science and biomedicine, as well as plant and animal breeding. However, the efficiency of homology-directed repair (HDR), an

收稿日期: 2022-04-05; 修回日期: 2022-05-11; 网络发布日期: 2022-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 32172736), 陕西省重点研发计划项目(编号: 2021NY-027)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32172736), and the Shaanxi Key R&D Program (No. 2021NY-027)]

作者简介: 张潇筠, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物生物技术。E-mail: mshn15@163.com

通讯作者: 魏泽辉, 博士, 副教授, 研究方向: 动物分子设计育种, E-mail: weizehui7848@163.com

徐坤, 博士, 副教授, 研究方向: 动物基因编辑技术, E-mail: xukunas@nwafu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.22-118

important strategy for gene knock-in and base editing, remains to be improved. In this study, we came up with the term Donor Adapting System (DAS) to summarize those CRISPR/Cas9 systems modified with adaptor for driving aptamer-fused donor DNA. A set of CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS was designed in our study. In this system, Gal4 DNA binding domain (Gal4BD) is used as adaptor to fuse with Cas9 protein, and Gal4 binding sequence (Gal4BS) is used as aptamer to bind to the double-stranded DNA (dsDNA) donor, in order to improve the HDR efficiency. Preliminary results from the HEK293T-HDR.GFP reporter cell line show that the HDR editing efficiency could be improved up to 2–4 times when donor homologous arms under certain length (100–60 bp). Further optimization results showed that the choice of fusion port and fusion linker would affect the expression and activity of Cas9, while the Cas9-Gal4BD fusion with a GGS5 linker was the prior choice. In addition, the HDR efficiency was likely dependent on the aptamer-dsDNA donor design, and single Gal4BD binding sequence (BS) addition to the 5-end of intent dsDNA template was suggested. Finally, we achieved enhanced HDR editing on the endogenous *AAVS1* and *EMX1* sites by using the CRISPR/Gal4BD-Cas9 DAS, which we believe can be applied to facilitate animal molecular design breeding in the future.

Keywords: CRISPR/Cas9; gene editing; donor DNA; donor adapting; homology-directed repair

CRISPR/Cas9 基因编辑被称为能够“改变世界”的技术, 以其为基础的分子设计育种能够实现动植物性状的快速改良, 被广泛应用到了动植物育种研究中^[1-3]。CRISPR/Cas9 系统通过单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 在特定的靶位点诱导 DNA 双链断裂(double-stranded break, DSB), 进而利用细胞自身的 DSB 修复机制实现基因编辑^[4,5]。细胞主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)两种修复机制进行 DSB 的修复。其中, HR 包括在基因组编辑中广泛应用的同源指导修复(homology-directed repair, HDR)和相对小众的单链退火(single-stranded annealing, SSA)^[6]。

在哺乳动物细胞中, DSB 绝大部分通过 NHEJ 机制进行修复, 相关修复蛋白直接将 DNA 断裂末端拉近, 通过连接酶进行重新连接。在此过程中通常会导致断裂末端核苷酸的丢失或插入, 进而引起基因功能的丧失。HR 修复发生的概率相对较低, 当 DNA 双链断裂后, MRN 复合物(包括 MRE11、Rad50、Nbs1 三种蛋白质)结合到 DSBs, 引起核酸内切酶(CtIP)对 DSBs 末端进行切除, 导致长 3'单链 DNA 片段被复制蛋白 A (replication protein A, RPA)包裹。随后, Rad51 取代了 RPA 与 ssDNA 结合, 形成核蛋白突触前丝, 促进寻找同源供体。待同源双链 DNA 结构形成后, Rad51 分解, 同时伴随着 DNA 合成和

最后的连接步骤。

在使用 CRISPR/Cas9 进行相关研究时, 基于 NHEJ 修复的基因编辑通常被用于目标基因的移码敲除, 而 HDR 机制常被用于基因精确编辑(精确的点突变、小片段的插入或缺失等)、置换和敲入等。但是, HDR 机制依赖于供体 DNA 的重组效应, 普遍存在着效率低下的缺点^[7]。近年来, 研究者们开发了一系列的提高 HDR 效率的策略, 包括抑制 NHEJ 通路、增强 HDR 机制、优化供体形式和控制打靶时效等(表 1)。

Ruff 等^[8]首次提出了将供体 DNA 靶向募集到 DSB 附近以提高 HDR 效率的策略。该研究直接将 I-Sce I 核酸酶作为配体蛋白, 筛选出具有强结合活性的受体 DNA 元件(I-Sce I 适配子)。通过在单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)短供体(小于 100 nt)一端引入适配子序列, 成功在酵母和人类细胞中将 HDR 效率提高了 32 倍和 16 倍。受此策略的启发, 多个类似的 CRISPR/Cas9 基因编辑衍生系统相继被开发^[9-16]。为了便于描述, 本文提出了供体适配基因编辑系统(donor adapting system, DAS)的概念, 特指驱动供体 DNA 富集至 DSB 处以提高 HDR 效率的 CRISPR/Cas9 基因编辑衍生系统。

Gal4 转录因子是半乳糖诱导基因表达的正调节因子, 由 DNA 结合域(binding domain, BD)和激活域(activating domain, AD)两个功能域组成。两个结构

表 1 不同 HDR 效率提高策略的比较

Table 1 Comparison of different strategies to improve HDR efficiency

分类	具体策略	检测所用细胞类型	不同类型供体提升效果		代表性参考文献
			dsDNA	ssDNA	
抑制 NHEJ 通路	抑制 DNA 连接酶 4	HEK293/K562/MEF/DC2.4/MelJuSo/HCT-116	2.4~19 倍	~3 倍	[5,17,18]
	抑制蛋白激酶催化亚基	HEK293/iPSC	2~5 倍	1.6~3.3 倍	[5,19,20]
	抑制 Ku 蛋白	HEK293/PFF	2~3 倍	~2.4 倍	[21,22]
	抑制 53BP1	HEK293/Hela/K562/U2OS/LCL B/iPSC	1.4~3 倍	1.3~3.3 倍	[23,24]
增强 HDR 通路	共表达 CtIP 转录因子	HEK293/iPSC	1.5~14.9 倍	—	[25]
	共表达外切核酸酶 1	K562/A549/H1299	2~2.5 倍	—	[26]
	共表达 Rad51、Rad52	HEK293/PK15/iPSC	2~6 倍	1.4~2.4 倍	[24,27]
优化供体形式	ssDNA 供体优化	HEK293/U2OS/T cells	—	~3 倍	[28,29]
	环状 dsDNA 供体优化	HEK293/HeLa/MCF10A/Embryo	1.1~18 倍	—	[30,31]
	线性 dsDNA 供体优化	HEK293/iPSC	2~10 倍	1.4~10 倍	[32,33]
	供体与 DBS 共定位	HEK293	3~6 倍	1.6~18 倍	[11,12,34]
控制打靶时效	调节细胞周期	HEK293/iPSC/T cells	1.7~6 倍	—	[35-37]
	Cas9 定时生效	HEK293/Two-cell embryo	1.87~10 倍	1~5 倍	[38,39]
其他机制	小分子化合物	HEK293/PFF/iPSC	2~3 倍	2~10 倍	[40]
	染色质状态	PFF/hES/iPSC/Embryo	~2 倍	2-3 倍	[41,42]

域可以独立表达并行使功能,已被成功应用于商业化的酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system, Y2H)。Gal4BD 位于 Gal4 N-末端,是一个属于 Zn(2)-C6 家族的锌指结构,能够特异性识别 Gal1 启动子中的上游激活序列(upstream activation sequence, UAS)^[43]。野生型 UAS 由几个具有高度同源性的结合序列(binding sequence, BS)组成。研究人员发现单个结合序列是约为 20 bp 的保守序列,两端均有保守的 GC 碱基^[44]。

本研究基于课题组在 CRISPR/Cas9 和 Y2H 方面的研究基础提出了一种新型的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 基因编辑系统,通过将 Cas9 蛋白与酵母源的 Gal4 BD^[45]融合表达以提高 HDR 效率。

1 材料与方法

1.1 载体构建

采用 pLL3.7 作为载体骨架,分别用 U6 和 CMV 启动子起始 CRISPR/Cas9 系统 sgRNA 和 Cas9 的表达。通过 PCR,从 Y2H 载体 pBKT7 (美国 Clontech 公司)上扩增获得 Gal4BD 及 C-端 28 aa 链接的 DNA

表达序列,克隆至 pLL3.7-U6/sgRNA-CMV-Cas9 中 Cas9 基因的上游(N-端),构建获得 N-ter Gal4BD Cas9 融合蛋白表达载体;将课题组研究常用的针对 VEGF 基因相关靶位点(CTCGGCCACCACAGGG-AAGCTGG_{PAM})的 sgRNA 克隆至该载体中 U6 启动子下游,构建 sgVEGF/N-ter Gal4BD Cas9 表达载体,初步建立 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS (图 1A)。

为了进一步优化该系统,采用两类不同的柔性 linker,即不同长度的 GGSn (n=1/3/5/7,为 GGS 氨基酸串联重复的个数)和全长及截短的 XTEN (XTEN1-SGSETPGTSESATPES 和 XTEN2-SESATPES),将 Gal4BD 基因克隆至 Cas9 基因的下游(C-端),进而构建获得相应的 C-ter Gal4BD Cas9 融合蛋白表达载体,同样采用 sgVEGF 作为后续功能验证实验的 sgRNA 构建相应的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 表达载体。

本研究中所使用的 pSSA.GFP.VEGF 和 pHDR.GFP.VEGF 荧光报告载体分别为课题组前期研究所构建^[27,46]。两个报告载体中的 GFP 报告基因均被插入的 VEGF 靶序列打断,经过 CRISPR/Cas9 系统打靶造成 DSB 后,分别通过 SSA 和 HDR 机制进行修复,进而可以通过荧光细胞流式计数评估

Cas9 活性和 HDR 效率。

1.2 细胞培养和转染

采用 HEK293T 细胞进行相关细胞实验检测。细胞培养条件均为: 90% DMEM 培养基, 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素, 5% CO_2 (均为体积分数), 温度 37°C 。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 1 天将细胞接种于 12 孔板中, 在细胞密度达到 80%~90% 后进行转染, 每孔转染 2 μg 的质粒, 每组最少设置 3 个平行转染孔。

1.3 报告细胞系的构建及检测

课题组前期通过 *Piggybac* 转座系统将 HDR.GFP 报告基因表达盒随机整合至 HEK293T 基因组中构建了相应的 HEK293T-HDR.GFP 报告细胞系^[46]。本研究利用该报告细胞系初步验证 CRISPR/Gal4BD-Cas9 DAS 的可行性, 通过 PCR 在不同长度的 GFP dsDNA 供体 5'-端添加长度为 20 bp 的 Gal4BD 结合序列(binding sequence, BS; 5'-TCCGAGGACTG-TCCTCCGG-3') (图 1B)。对照组供体添加同样长度的无关序列(irrelevant sequence, IS; 5'-TTCAGAC-GAGATAGTCTGAG-3')。将上述构建的 sgVEGF/N-ter Gal4BD Cas9 表达载体与经 5'-端改造的 GFP dsDNA 供体以质量比 1:1 转染 HEK293T-HDR.GFP 报告细胞系, 转染 48 h 后使用 BD FACS Aria III 流式细胞仪对 GFP 阳性(GFP⁺)细胞进行计数以评估 HDR 效率。

1.4 SSA 报告实验检测 Cas9 活性

采用 SSA 报告实验比较不同 Cas9-Gal4BD 融合表达方案对 Cas9 活性的影响。其中, pSSA.GFP.VEGF 报告载体中的 GFP 报告基因被 CRISPR/Cas9 系统打靶后无需供体 DNA 即可通过 SSA 机制直接修复(图 2A)。以 1:1 的质量比或摩尔比, 将 sgVEGF/Cas9 表达载体与 pSSA.GFP.VEGF 报告载体共转染 HEK293T 细胞进行预实验, 初步结果表明 1:1 的质量比效果最佳。进而以质量比 1:1 将不同融合表达方案(图 2, B 和 D)的 sgVEGF/Cas9-Gal4BD 表达载体与 pSSA.GFP.VEGF 报告载体共转染 HEK293T 细胞, 转染 48 h 后, 使用美国 BD 公司 FACS Aria III

流式细胞仪对 GFP 阳性(GFP⁺)细胞进行计数以评估 Cas9 活性。同时收集每个转染组的细胞提取总蛋白, 使用抗-Gal4BD (美国 Abbkine 公司, ABP57232)和抗-Cas9 (英国 Abcam 公司, ab191468)抗体分别进行免疫印迹(Western blot, WB)实验检测不同 Cas9-Gal4BD 融合蛋白的表达情况。

1.5 HDR 报告实验验证 HDR 效率

为了获得最佳的 BS-dsDNA 供体设计, 使用 HDR 报告实验对不同 BS-dsDNA 供体介导的 HDR 效率进行评估。其中, pHDR.GFP.VEGF 报告载体中 GFP 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 3A)。以 1:1:1 的质量比或摩尔比, 将 sgVEGF/Cas9 表达载体、pHDR.GFP.VEGF 报告载体和长度为 700 bp 的 GFP dsDNA 供体共转染 HEK293T 细胞进行预实验, 初步结果表明 1:1:1 的质量比效果最佳。根据相关报道, Gal4BD 结合序列的一般结构是 5'-CGG-N11-CCG-3'^[44,47,48], 进一步选择长度为 17 bp 的短 BS 序列^[49]进行 BS-dsDNA 供体的设计(图 3, B 和 D)。以质量比 1:1:1 将 sgVEGF/Cas9-GGS5-Gal4BD 载体、pHDR.GFP.VEGF 报告载体和通过 PCR 扩增获得的不同 BS-dsDNA 供体共转染 HEK293T 细胞。转染 48 h 后, 使用美国 BD 公司 FACS Aria III 流式细胞仪对 GFP 阳性(GFP⁺)细胞进行计数以评估 HDR 效率。

1.6 基因组编辑

使用优化后 Cas9-Gal4BD 和 BS-dsDNA 组成的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 对 HEK293T 细胞三个基因组位点(AAVS1、EMX1、NUDT5)进行点编辑。将 sgVEGF/Cas9-GGS5-Gal4BD 载体中的 sgVEGF 替换为 sgAAVS1、sgEMX1 和 sgNUDT5, 构建相应的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 载体。以课题组前期构建的质粒供体^[50]为模板, 通过 PCR 引入 5'-BS 获得相应的 BS-dsDNA 供体。供体左右同源臂长度均设计为 1000 bp 左右, 且序列中 sgRNA 靶点 PAM 均突变为限制性内切酶(RE)位点(图 4A), 以便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。

以质量比 1:1:1 将 CRISPR/Cas9-Gal4BD

DAS 载体、相应的 BS-dsDNA 供体和 HDR 通用型报告筛选载体(HDR-universal surrogate reporter, HDR-USR)共转染 HEK293T 细胞。HDR-USR 为课题组前期开发的 HDR 编辑阳性细胞辅助筛选报告载体^[50]。转染后 24 h, 用含有嘌呤霉素的培养基筛选 3 天, 更换正常培养基继续培养 2 天, 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。其中, 一条 PCR 检测引物设计在 dsDNA 供体模版之外, PCR 产物及酶切后片段大小(bp)为: *AAVS1*, 1274=1087+187; *EMX1*, 2147=1087+1060; *NUDT5*, 2186=1105+1081。通过 ImageJ 软件对消化和未消化的 DNA 条带进行灰度对比分析, 进而评估目标基因位点的 HDR 编辑效率。

1.7 数据统计与分析

所有实验均至少设置三个平行重复或独立重复, 数据以“平均值±SD”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 报告细胞系初步验证 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 功能

本研究最初将 Gal4BD 与 Cas9 N-端进行融合, 初步建立了 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 基因编辑系统(图 1A), 并尝试利用课题组前期研究构建的 HEK293T-HDR.GFP 报告细胞系进行功能验证。该报告细胞系中整合的 *GFP* 报告基因修复原理如图 1B 所示。其中, Gal4BD 结合序列 BS 可以通过 PCR 技术直接添加到 dsDNA 供体的 5'-端, IS 为无关对照序列。本实验采用了长度分别为 215 bp、100 bp 和 60 bp 的 GFP dsDNA 供体, 初步检测结果表明, 当供体 DNA 在一定长度内时, HDR 编辑效率可提

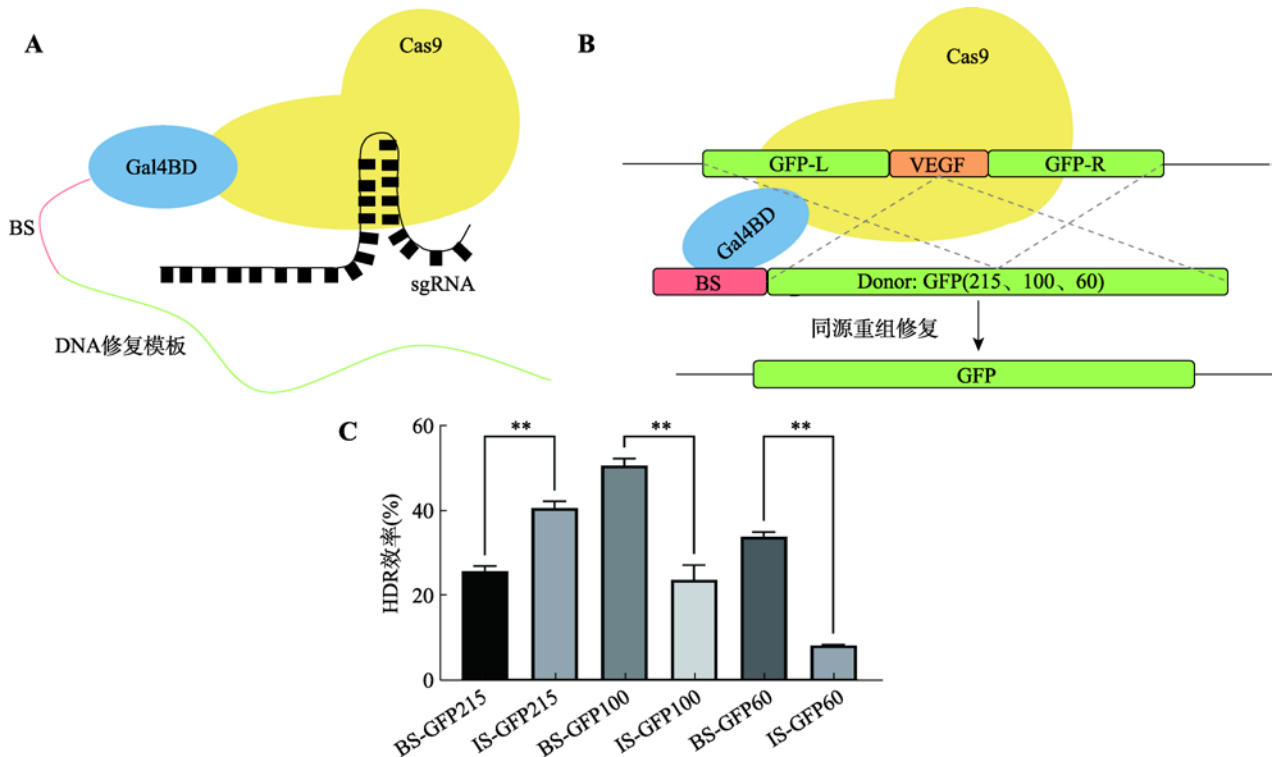


图 1 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 及 HEK293T-HDR.GFP 报告细胞系验证结果

Fig. 1 Schematic of the CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS and the result of HEK293T-HDR.GFP reporter cell assay
A: Cas9-Gal4BD 融合蛋白驱动 BS-dsDNA 供体示意图; B: CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 介导报告细胞系 *GFP* 基因 HDR 示意图; C: CRISPR/Cas9-Gal4BD-Cas9 DAS 介导的不同 GFP dsDNA 供体 HDR 效率比较。BS/IS-GFP215/100/60 分别代表 5'-端连接 BS 或 IS、长度为 215/100/60 bp 的 GFP dsDNA 供体; BS 为 Gal4BD 结合序列, IS 为无关对照序列。数据以平均值±SD 表示, $n=3$, **: $P < 0.01$ 。

高 2~4 倍(图 1C)。但 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 能否有效提高长 dsDNA 供体的 HDR 效率尚有待商榷。

2.2 SSA 报告实验优化 Cas9-Gal4BD 融合方式

鉴于 Gal4BD 与 Cas9 N-端融合(N-ter Gal4BD)可能会严重影响 Cas9 的活性,进一步将 Gal4BD 与 Cas9 C-端进行融合(C-ter Gal4BD),并采用了多个不同的 linker,构建了优化的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS。利用课题组前期开发的 SSA 报告系统(图 2A)进行 Cas9 活性的验证,结果表明 C-ter Gal4BD 保留了与野生型(WT)Cas9 相近的活性,而 N-ter Gal4BD 活性显著降低(图 2, B 和 C);不同 linker 连接的 C-ter Gal4BD 对 Cas9 活性造成了不同程度的影响(图 2, D 和 E)。进一步采用抗-Gal4BD 和抗-Cas9 抗体对 Cas9-Gal4BD 融合蛋白的表达情况进行 WB 检测,结果表明除了 GGS5 和 XTEN1,其余 linker 连接的 C-ter Gal4BD 均对 Cas9 表达造成了显著影响(图 2, F 和 G)。结合 SSA 报告实验结果及 Cas9、Gal4BD

蛋白表达检测情况,推测采用 GGS5 (5 个 GGS 重复) linker 的 C-ter Gal4BD 融合表达策略是相对较优的选择。

2.3 HDR 报告实验优化 BS-dsDNA 供体设计

作为 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 重要组成部分,BS-dsDNA 供体的设计也是提高 HDR 效率的关键。为了探讨最佳的 BS-dsDNA 供体设计,采用课题组前期开发的 HDR 报告系统(图 3A)进行不同 BS-dsDNA 供体的 HDR 效率验证。鉴于 Gal4 BS 的一般结构为 5'-CGG-N11-CCG-3',改用长度为 17 bp 的短 BS 序列,并采用不含启动子的全长 GFP 序列(约 700bp)作为供体模板。首先,将不同数量的 BS 添加到 dsDNA 供体的 5'-端, HDR 报告实验结果表明增加 BS 并不能提高 HDR 效率,反而单个 BS (1×BS)可能是最好的选择(图 3, B 和 C)。其次,将 BS 序列添加到供体模板的 5'-或/和 3'-端(图 3D),结果表明将 BS 添加到供体 DNA 5'-端的效果较好(图 3E)。

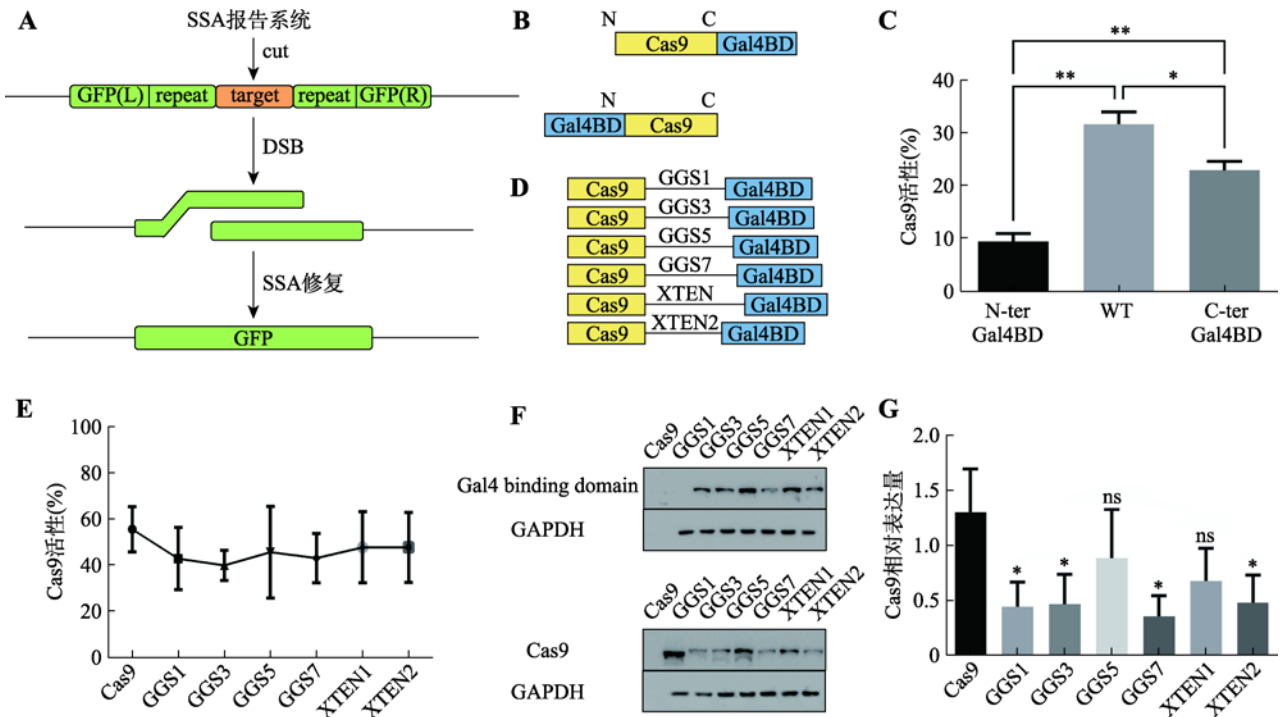


图 2 SSA 报告实验验证不同 Cas9-Gal4BD 融合蛋白活性的结果

Fig. 2 The results of SSA surrogate reporter assay for the activity of different Cas9-Gal4BD fusions

A: pSSA.GFP 报告载体修复原理示意图; B, D: Cas9 N-端和 C-端融合 Gal4BD (N-ter Gal4BD, C-ter Gal4BD)及 linker 示意图; C: N-ter Gal4BD 和 C-ter Gal4BD 对 Cas9 活性影响的检测结果; E: 不同 linker 链接的 C-ter Gal4BD 对 Cas9 活性影响的检测结果; F: 使用抗-Gal4BD (上)和抗-Cas9 (下)抗体的 WB 检测结果; G: Cas9 蛋白表达水平 WB 检测结果的灰度分析。数据以平均值±SD 表示, n=3~5, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

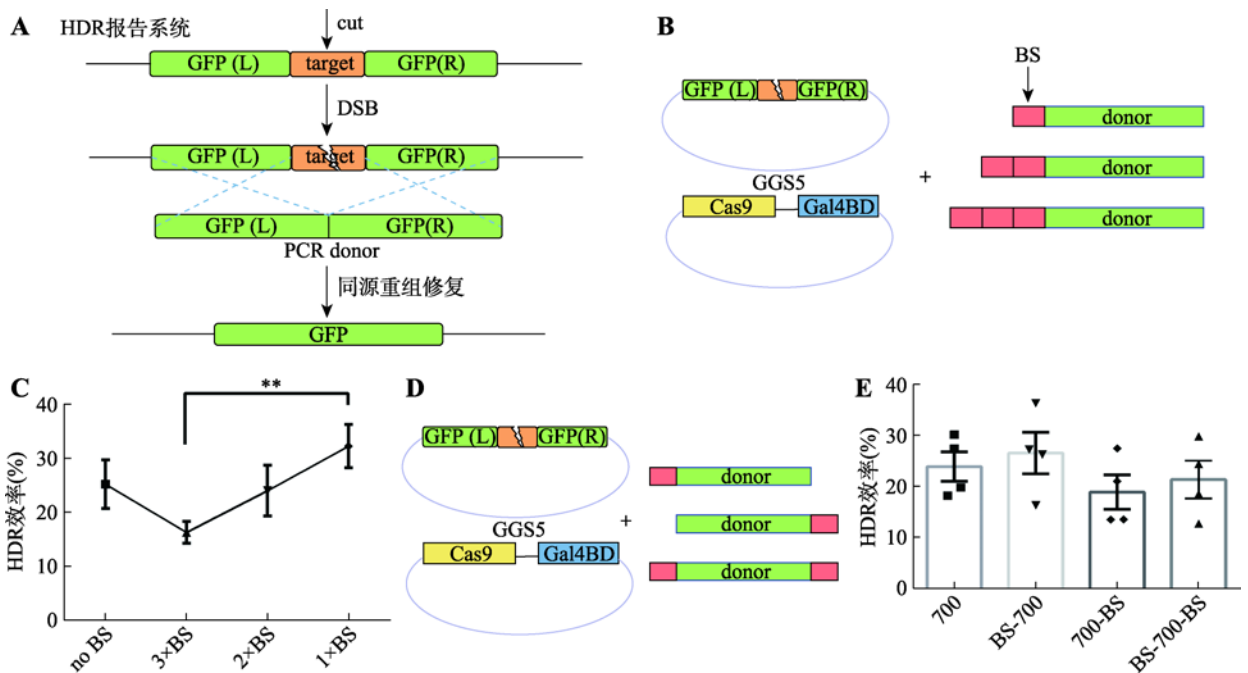


图 3 HDR 报告实验验证不同 BS-dsDNA 供体 HDR 效率的结果

Fig. 3 HDR surrogate reporter assay for the HDR efficiency of different BS-dsDNA donors

A: pHDR.GFP 报告载体修复原理示意图; B: 5'-端添加不同数目 BS 的 dsDNA 供体及 HDR 报告实验设计示意图; C: 5'-端添加不同数目 BS 的 dsDNA 供体 HDR 效率检测结果; D: 5'-端或/和 3'-端添加 BS 的 dsDNA 供体及 HDR 报告实验设计示意图; E: 5'-端或/和 3'-端添加 BS 的 dsDNA 供体 HDR 效率检测结果。数据以平均值 \pm SD 表示, $n=3\sim 5$, **: $P<0.01$ 。

2.4 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 介导的基因组编辑

使用优化后 Cas9-Gal4BD 和 BS-dsDNA 组成的 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 对 HEK293T 细胞的三个基因组位点(AAVS1、EMX1、NUDT5)进行点编辑。将 BS-dsDNA 供体中 sgRNA 靶序列的 PAMs 突变为 RE 位点防止供体 DNA 被打靶, 同时方便后续通过 RFLP 实验进行 HDR 效率检测(图 4A)。结果表明 AAVS1 和 EMX1 位点的 HDR 编辑效率显著提高了约 20%, 但是 NUDT5 基因位点则与对照组相比无显著差异(图 4, B 和 C)。据此推测, HDR 编辑效率的提高具有位点依赖性, 可能与基因的结构和活跃情况有关。

3 讨论

为了提高供体 DNA 的 HDR 效率, 本研究开发了新型的 CRISPR/Cas9-Gal4BD 供体适配基因编辑系统。优化结果表明 Cas9-Gal4BD C-端融合效果较

好, 这可能是因为 RuvC-1 位于 Cas9 N-端且 N-端的完整性对 Cas9 的核酸酶活性至关重要^[11]。为了降低 Gal4BD 融合对 Cas9 活性的影响, 本研究采用了两类不同的柔性 linker, 即不同长度的 GGS_n 和全长及截短的 XTEN。虽然最终确认了相对较优的 GGS5 和 XTEN1, 但不同 linker 链接的 Cas9-Gal4BD 融合均对 Cas9 的表达及活性均造成了一定程度的影响。这可能与 Cas9 蛋白较大、空间结构折叠容易受到影响有关。在后续相关研究中可以尝试比较更多类型及不同长度的 linker 以降低融合蛋白对 Cas9 活性的影响。在 BS-dsDNA 供体的优化过程中, 本研究发现单个 BS 序列添加在 dsDNA 5'-端的效果较好, 推测 dsDNA 供体的 3'-游离端有助于同源重组, 非同源 BS 的额外添加反而不利于重组, 但该假设仍有待进一步探讨。

此外, 课题组也注意到了预实验中 HKE293T-HDR.GFP 报告细胞系的验证结果与后续优化过程中的 HDR 报告载体实验及基因组编辑结果并不呼应, 这可能与报告细胞系的质量、供体长度改变、融合 linker 优化以及后续检测手段不同等因素有关。

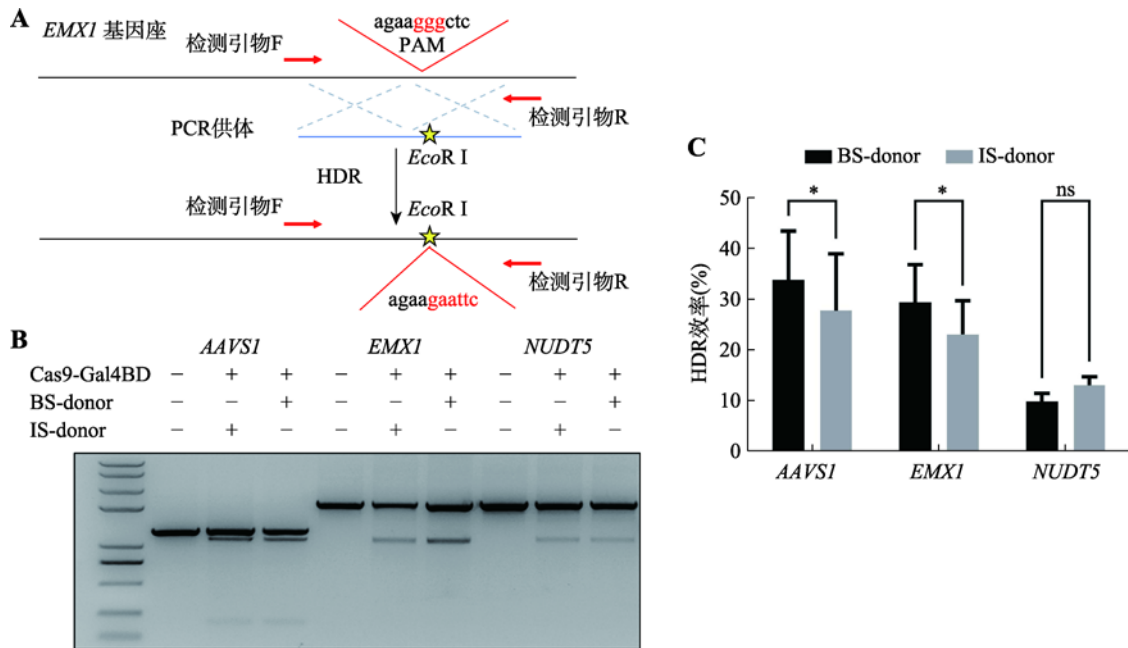


图 4 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 介导的基因精确编辑

Fig. 4 Endogenous gene editing assay using the CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS

A: 以 *EMX1* 基因座为例的基因编辑设计及检测示意图, 其中一条 PCR 检测引物设计在 dsDNA 供体模板之外; B: RFLP 实验检测 HDR 编辑效率的琼脂糖凝胶电泳结果, PCR 产物及酶切后片段大小(bp)为: *AAVS1*, 1274=1087+187; *EMX1*, 2147=1087+1060; *NUDT5*, 2186=1105+1081; C: 基于 RFLP 实验 DNA 条带灰度分析的 HDR 编辑效率检测结果。数据以平均值±SD 表示, $n=3$, *: $P<0.05$ 。

在报告细胞系验证实验中, dsDNA 供体长度为 100 bp 和 60 bp 时的 HDR 效率有所提高。推测修复模板较短时, 可能存在效率较 HDR 高的微同源末端链接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)修复, 故提升效果明显。但 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 能否有效提高长 dsDNA 供体的 HDR 效率尚有待商榷。由于 HKE293T-HDR.GFP 报告细胞系是一个转基因细胞混池, 基因型背景不清晰, 存在着一定的不确定因素, 课题组后续放弃了使用该细胞系进行优化研究。另鉴于较短的 dsDNA 供体不能介导基因敲入, 其应用前景有限, 且与 ssDNA 供体相比 HDR 效率相对较低, 后续优化研究及内源基因编辑均采用了长 dsDNA 供体, 以期应用于基因大片段敲入研究。在进一步的内源基因编辑实验中, 尽管利用 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 在 *AAVS1* 和 *EMX1* 位点实现了编辑效率的提高, 但仍需在更多类型的细胞中针对更多基因组位点进行适用性验证。另外, 通过药物瞬时筛选富集基因点编辑细胞后进行 RFLP 分析的检验方法具有一定的局限性, 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 CRISPR/Cas9-Gal4BD DAS 所采用的 dsDNA 供体主要优势在于基因大片段敲入, 后续研究可采用荧光或抗性基因敲入的策略并优化下游检测手段, 更严谨地论证该系统的可行性。

在本研究开展前后, 多种以相似设计理念改进的 CRISPR/Cas9 DAS 被相继报道(表 2)。其中, Cas9-SNAP/O6-BG-ssDNA 系统以 SNAP-Tag 作为适配配体, 以 O6-苄基鸟嘌呤(BG)作为“受体”修饰 ssDNA 供体^[9]。Cas9-Avidin/Biotin-dsDNA 系统^[10]将与 Cas9 蛋白融合的亲合素作为适配配体, 同时将生物素作为适配“受体”与 PCR 获得的 dsDNA 供体进行化学偶联。Cas9-Avidin/Biotin-ssDNA 系统^[11]与 Cas9-Avidin/Biotin-dsDNA 系统类似, 但采用了长 ssDNA 供体(~1000 nt)。另一个 sgRNA-S1m.Avidin/Biotin-ssDNA 系统^[12]采用了新颖的 sgRNA 导向策略, 该系统将亲和素特异性结合序列(S1mRNA)与 sgRNA 融合, 作为驱动链亲和素/生物素-ssDNA 供体的接头部分。该系统增加了供体和 sgRNA 设计的复杂程度, 且 ssDNA 供体需要与生物素-链霉亲和素偶联, 理论上并不实用。ssDNA 供体与 dsDNA

表 2 目前已报道的 CRISPR/Cas9 DAS 系统

Table 2 Several CRISPR/Cas9-derived donor adapting systems

系统简称	融合端	Linker	适配配体	配体大小	适配受体	受体大小	供体形式	参考文献
Cas9-SNAP/ ssDNA	Cas9 C-terminus	Undeclared	SNAP-tag	181 aa	O6-BG	~241 (MW)	ssDNA	[9]
Cas9-Avidin/ dsDNA	Cas9	SGSETPGTSESATPES (16 aa)	Monomeric Streptavidin	114 aa	Biotin	~244 (MW)	dsDNA	[10]
Cas9-Avidin/ ssDNA	Cas9 C-terminus	SGSETPGTSESATPES (16 aa)	Avidin	152 aa	Biotin	~244 (MW)	ssDNA	[11]
sgRNA-S1m/ ssDNA	sgRNA	S1m*	Recombinant Streptavidin	159 aa	Biotin	~244 (MW)	ssDNA	[12]
Cas9-PVC/ ssDNA	Cas9 C-terminus	H4-2	Porcine Circovirus 2 (PCV) Rep	109 aa	PCV.BS	13 nt	ssDNA	[13]
Cas9-VirD2/ ssDNA (Plant editing)	Cas9	Undeclared	VirD2	455 aa	T-DNA.BS	25 nt	ssDNA	[14]
Cas9-THAP11/ dsDNA	Cas9 C-terminus	SGSETPGTSESATPES (16 aa)	THAP11	105 aa	THAP11.BS	19 bp	dsDNA	[15]
Cas9-N57/ dsDNA	Cas9 C-terminus	GGGGSGGGGSGGGGS (30 aa)	N57	57 aa	N57.BS	292 bp	dsDNA	[16]
Cas9-Gal4BD/ dsDNA	Cas9 C-terminus	5×GGG (15 aa)	Gal4BD	146 aa	Gal4BD.BS	17 bp	dsDNA	This study

Linker, 一段短肽链用于连接 Cas9 蛋白和适配器。S1m*, 一段与 sgRNA 连接的用于连接链霉素亲和素的 RNA 序列。MW, 分子量。

供体介导的 DNA 修复机制有所不同,前者具有重组效率高、操作简单方便等优点,但是长 ssDNA 供体制备相对困难、价格昂贵、不稳定且容易降解。因此,基因编辑研究中多使用长度小于 120 nt 的短 ssDNA 供体进行点编辑,而大片段基因敲入研究仍受限于相对偏低的 dsDNA 供体重组效率。

与本研究思路类似,在最新的报道中不同的 dsDNA 结合蛋白也被用于开发新型 CRISPR/Cas9 DAS。对于这些 DAS,通常可以通过 PCR 便捷地获得 BS-dsDNA 供体,并且可以通过重组 DNA 技术以质粒的形式组装大型供体进而介导复杂的基因编辑。在 Cas9-THAP11/THAP11.BS-dsDNA 系统中,将灭活的转录因子 THAP11 与 Cas9 C-端融合^[15],可以提高 HDR 敲入效率 2 倍。Cas9-N57/N57.BS-dsDNA 系统^[16]采用了来自睡美人转座子 SB100X 的 N57 DNA 结合域,该系统具有上述相似的供体适配特征,但使用了非同源依赖靶向整合(homology-in-dependent targeted integration, HITI)供体^[51],可以在分裂和非分裂细胞中提高靶向敲入效率。

最后,值得注意的是灭活的转录因子 THAP11、转座酶 SB100X 的 N57 DNA 结合域和本研究使用的

酵母源 Gal4BD 长度分别为 105 aa、57 aa 和 146 aa,均远小于 Cas9 蛋白(1368 aa)。此外,Cas9-N57 系统采用了 HITI 供体进行非同源依赖靶向基因敲入,表明 CRISPR/Cas9 DASs 能够同时适用于 HDR 和 HITI 介导的基因编辑。在 BS-dsDNA 供体方面,Cas9-Gal4BD 系统和 Cas9-THAP11 系统具有更短 BS (17 bp 和 19 bp)的相对优势。

综上所述,本研究开发了一种新型提高 HDR 效率的 CRISPR/Cas9-Gal4BD 供体适配基因编辑系统,并在 Cas9-Gal4BD 融合表达和 BS-dsDNA 供体设计方面进行了优化。最终利用优化后的 CRISPR/Gal4BD-Cas9 DAS 实现了对 *AAVS1* 和 *EMX1* 位点的 HDR 增强编辑,为进一步利用该系统进行动物分子设计育种研究提供了参考和借鉴。

参考文献(References):

- [1] Zhou SW, Yu HH, Zhao XE, Cai B, Ding Q, Huang Y, Li YX, Li Y, Niu YY, Lei AM, Kou QF, Huang XX, Petersen B, Ma BH, Chen YL, Wang XL. Generation of gene-edited sheep with a defined Booroola fecundity gene (*FecB^B*)

- mutation in bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPRI1B) via clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(12): 1616–1621. [DOI]
- [2] Niu YY, Zhao XE, Zhou JK, Li Y, Huang Y, Cai B, Liu YT, Ding Q, Zhou SW, Zhao J, Zhou GX, Ma BH, Huang XX, Wang XL, Chen YL. Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(2): 307–312. [DOI]
- [3] Park KE, Kaucher AV, Powell A, Waqas MS, Sandmaier SES, Oatley MJ, Park CH, Tibary A, Donovan DM, Blomberg LA, Lillico SG, Whitelaw CBA, Mileham A, Telugu BP, Oatley JM. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Sci Rep*, 2017, 7: 40176. [DOI]
- [4] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [5] Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548. [DOI]
- [6] Decottignies A. Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. *Front Genet*, 2013, 4: 48. [DOI]
- [7] Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8403–10. [DOI]
- [8] Ruff P, Koh KD, Keskin H, Pai RB, Storic F. Aptamer-guided gene targeting in yeast and human cells. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(7): e61. [DOI]
- [9] 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. *eLife*, 2018, 7: e33761. [DOI]
- [10] Gu B, Posfai E, Rossant J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(7): 632–637. [DOI]
- [11] Ma M, Zhuang FF, Hu XB, Wang BL, Wen XZ, Ji JF, Xi JZJ. Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxed alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. *Cell Res*, 2017, 27(4): 578–581. [DOI]
- [12] 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. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1711. [DOI]
- [13] Aird EJ, Lovendahl KN, Martin AS, Harris RS, Gordon WR. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol*, 2018, 1: 54. [DOI]
- [14] 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. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 44. [DOI]
- [15] Li GL, Wang HQ, Zhang XW, Wu ZF, Yang HQ. A Cas9-transcription factor fusion protein enhances homology-directed repair efficiency. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100525. [DOI]
- [16] 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. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(18): 10590–10601. [DOI]
- [17] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542. [DOI]
- [18] Hu Z, Shi Z, Guo X, Jiang B, Wang G, Luo D, Chen Y, Zhu YS. Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells. *Cell Biosci*. 2018 19(8): 12. [DOI]
- [19] Riesenberger S, Maricic T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2164. [DOI]
- [20] Riesenberger S, Chintalapati M, Macak D, Kanis P, Maricic T, Pääbo S. Simultaneous precise editing of multiple genes in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2019 47(19): e116. [DOI]
- [21] Robert F, Barbeau M, Éthier S, Dostie J, Pelletier J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med*, 2015, 7(1): 93. [DOI]
- [22] Li G, Liu D, Zhang X, Quan R, Zhong C, Mo J, Huang Y, Wang H, Ruan X, Xu Z, Zheng E, Gu T, Hong L, Li Z, Wu Z, Yang H. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts.

- Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 99: 154–160. [DOI]
- [23] Nambiar TS, Billon P, Diedenhofen G, Hayward SB, Tagliatela 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. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3395. [DOI]
- [24] Paulsen BS, Mandal PK, Frock RL, Boyraz B, Yadav R, Upadhyayula S, Gutierrez-Martinez P, Ebina W, Fasth A, Kirchhausen T, Talkowski ME, Agarwal S, Alt FW, Rossi DJ. Ectopic expression of RAD52 and dn53BP1 improves homology-directed repair during CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1(11): 878–888. [DOI]
- [25] Tran NT, Bashir S, Li X, Rossius J, Chu VT, Rajewsky K, Kühn R. Enhancement of precise gene editing by the association of Cas9 with homologous recombination factors. *Front Genet*, 2019, 10: 365. [DOI]
- [26] Hackley CR. A novel set of Cas9 fusion proteins to stimulate homologous recombination: Cas9-HRs. *CRISPR J*, 2021, 4(2): 253–263. [DOI]
- [27] 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. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 92: 43–52. [DOI]
- [28] Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 339–344. [DOI]
- [29] Shy BR, Vykunta V, Ha A, Roth TL, Talbot A, Nguyen DN, Chen YY, Blaeschke F, Vedova S, Mamedov MR, Chung JY, Li H, Wolf J, Martin TG, Ye LM, Eyquem J, Esensten JH, Marson A. Hybrid ssDNA repair templates enable high yield genome engineering in primary cells for disease modeling and cell therapy manufacturing. *bioRxiv*, 2021, doi:10.1101/2021.09.02.458799. [DOI]
- [30] Cruz-Becerra G, Kadonaga JT. Enhancement of homology-directed repair with chromatin donor templates in cells. *eLife*, 2020, 9: e55780. [DOI]
- [31] Hirotsune S, Kiyonari H, Jin MY, Kumamoto K, Yoshida K, Shinohara M, Watanabe H, Wynshaw-Boris A, Matsuzaki F. Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2518. [DOI]
- [32] Liang X, Potter J, Kumar S, Ravinder N, Chesnut JD. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J Biotechnol*, 2017, 241: 136–146. [DOI]
- [33] Nguyen DN, Roth TL, Li PJ, Chen PA, Apathy R, Mamedov MR, Vo LT, Tobin VR, Goodman D, Shifrut E, Bluestone JA, Puck JM, Szoka FC, Marson A. Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(1): 44–49. [DOI]
- [34] Ling X, Xie B, Gao X, Chang L, Zheng W, Chen H, Huang Y, Tan L, Li M, Liu T. Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates. *Sci Adv*, 2020, 6(15): eaaz0051. [DOI]
- [35] Lomova A, Clark DN, Campo-Fernandez B, Flores-Björström C, Kaufman ML, Fitz-Gibbon S, Wang XY, Miyahira EY, Brown D, DeWitt MA, Corn JE, Hollis RP, Romero Z, Kohn DB. Improving gene editing outcomes in human hematopoietic stem and progenitor cells by temporal control of DNA repair. *Stem Cells*, 2019, 37(2): 284–294. [DOI]
- [36] 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. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2109. [DOI]
- [37] Zhang JP, Li XL, Li GH, Chen W, Arakaki C, Botimer GD, Baylink D, Zhang L, Wen W, Fu YW, Xu J, Chun N, Yuan W, Cheng T, Zhang XB. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 35. [DOI]
- [38] Gutschner T, Haemmerle M, Genovese G, Draetta GF, Chin L. Post-translational regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair. *Cell Rep*, 2016, 14(6): 1555–1566. [DOI]
- [39] Matsumoto D, Tamamura H, Nomura W. A cell cycle-dependent CRISPR-Cas9 activation system based on an anti-CRISPR protein shows improved genome editing accuracy. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 601–601. [DOI]
- [40] Li G, Zhang X, Zhong C, Mo J, Quan R, Yang J, Liu D, Li Z, Yang H, Wu Z. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8943. [DOI]
- [41] Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN

- system. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9): 5198–5207. [DOI]
- [42] Li GL, Zhang XW, Wang HQ, Liu DW, Li ZC, Wu ZF, Yang HQ. Increasing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed DNA repair by histone deacetylase inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 125: 105790. [DOI]
- [43] Keegan L, Gill G, Ptashne M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, 1986, 231(4739): 699–704. [DOI]
- [44] Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature*, 1992, 356(6368): 408–414. [DOI]
- [45] Lohr D, Venkov P, Zlatanova J. Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J*, 1995, 9(9): 777–787. [DOI]
- [46] Xu K, Ren CH, Liu ZT, Zhang T, Zhang TT, Li D, Wang L, Yan Q, Guo LJ, Shen JC, Zhang ZY. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(2): 383–399. [DOI]
- [47] Liang SD, Marmorstein R, Harrison SC, Ptashne M. DNA sequence preferences of GAL4 and PPR1: how a subset of Zn2 Cys6 binuclear cluster proteins recognizes DNA. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(7): 3773–3780. [DOI]
- [48] Bram RJ, Lue NF, Kornberg RD. A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. *EMBO J*, 1986, 5(3): 603–608. [DOI]
- [49] Selleck SB, Majors JE. In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(9): 3260–3267. [DOI]
- [50] 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. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 775–789. [DOI]
- [51] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, Hatanaka F, Yamamoto M, Araoka T, Li Z, Kurita M, Hishida T, Li M, Aizawa E, Guo SC, Chen S, Goebel A, Soligalla RD, Qu J, Jiang TS, Fu X, Jafari M, Esteban CR, Berggren WT, Lajara J, Nuñez-Delicado E, Guillen P, Campistol JM, Matsuzaki F, Liu GH, Magistretti P, Zhang K, Callaway EM, Zhang K, Belmonte JCI. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540(7631): 144–149. [DOI]

(责任编辑: 谷峰)