



# CRISPR/Cas13a 系统在大肠杆菌 RNA 编辑过程中的逃逸现象

张悦<sup>1,2,3</sup>, 许杰<sup>2,3</sup>, 王珩瑜<sup>2,3</sup>, 盛勇<sup>2,3</sup>, 欧一新<sup>2,3</sup>, 王斌<sup>1</sup>, 张蓓<sup>1</sup>, 康前进<sup>2,3\*</sup>, 张丽<sup>1\*</sup>

- 1 青岛大学青岛医学院基础医学院, 山东 青岛 266071
- 2 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240
- 3 上海交通大学代谢与发育国际联合合作实验室, 上海 200240

张悦, 许杰, 王珩瑜, 盛勇, 欧一新, 王斌, 张蓓, 康前进, 张丽. CRISPR/Cas13a 系统在大肠杆菌 RNA 编辑过程中的逃逸现象[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2998-3013.

ZHANG Yue, XU Jie, WANG Hengyu, SHENG Yong, OU Yixin, WANG Bin, ZHANG Bei, KANG Qianjin, ZHANG Li. Escape phenomenon of CRISPR/Cas13a system during RNA editing in *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2998-3013.

**摘要:** 【目的】在大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655- $\Delta$ recA 和 *Escherichia coli* DH10B 中构建 CRISPR/LshCas13a 质粒干扰系统, 通过靶向非必需基因 *lacZ* 和必需基因 *polA*, 分别分析 RNA 编辑实验中的逃逸现象。【方法】选取来自沙氏纤毛菌(*Leptotrichia shahii*)中的 Cas13a 蛋白编码基因 *LshCas13a*, 构建可诱导的 CRISPR/LshCas13a 的 RNA 编辑系统相关质粒, 选取 MG1655- $\Delta$ recA 和 DH10B 为研究对象。通过 Crisporo 算法, 设计靶向 *lacZ* 和 *polA* 的 CRISPR RNA (crRNA) 序列, 考察利用 LshCas13a 质粒干扰实验靶向 *lacZ* 和 *polA* 的逃逸现象。再通过对逃逸菌落的数量和序列分析评估 LshCas13a 系统的逃逸现象, 结合 PCR 和 Sanger 测序技术探究 LshCas13a 系统的逃逸事件。选取通过插入序列(insertion sequence, IS)转座破坏 LshCas13a 系统的 *LshCas13a* 基因的逃逸菌落, 通过监测  $OD_{600}$  进一步考察菌株的生长情况。【结果】利用 LshCas13a 系统靶向 MG1655- $\Delta$ recA 和 DH10B 中的 *lacZ* 和 *polA*, 发现靶向 *lacZ* 时, MG1655- $\Delta$ recA 通过 *LshCas13a* 基因点突变和 IS 转座突变方式逃逸; 靶向 *polA* 时, MG1655- $\Delta$ recA 和 DH10B 通过点突变 *LshCas13a*

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100600); 上海市农业科技创新项目(202302080012F04596); 合成生物学海河实验室重大攻关类项目(22HHSWSS00001)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100600), the Agricultural Science and Technology Innovation Program of Shanghai (202302080012F04596), and the “Major Project” of Haihe Laboratory of Synthetic Biology (22HHSWSS00001).

\*Corresponding authors. E-mail: KANG Qianjin, qjkang@sjtu.edu.cn; ZHANG Li, zhangli\_qddx@126.com

Received: 2024-01-31; Accepted: 2024-04-02; Published online: 2024-04-08

基因、IS 转座和突变 crRNA 的直接重复(direct repeat, DR)序列等方式逃逸。*LshCas13a* 编码基因的突变促进了菌株生长的恢复。【结论】本研究利用 *LshCas13a* 质粒干扰系统研究了 *E. coli* 宿主 RNA 编辑中的多样化逃逸现象, 包括了染色体编码的 IS 介导的 *LshCas13a* 转座突变、*LshCas13a* 点突变、crRNA 的 DR 序列突变或重组等情况。本研究为进一步优化 CRISPR/*LshCas13a* 基因编辑系统奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌; CRISPR/*LshCas13a*; 质粒干扰系统; 逃逸现象; 插入序列

## Escape phenomenon of CRISPR/Cas13a system during RNA editing in *Escherichia coli*

ZHANG Yue<sup>1,2,3</sup>, XU Jie<sup>2,3</sup>, WANG Hengyu<sup>2,3</sup>, SHENG Yong<sup>2,3</sup>, OU Yixin<sup>2,3</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, ZHANG Bei<sup>1</sup>, KANG Qianjin<sup>2,3\*</sup>, ZHANG Li<sup>1\*</sup>

1 School of Basic Medicine, Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

3 Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Objective] The plasmid interference system of CRISPR/*LshCas13a* was constructed in *Escherichia coli* MG1655- $\Delta$ *recA* and *Escherichia coli* DH10B to analyze the escape phenomenon in RNA editing experiments by targeting the non-essential gene *lacZ* and the essential gene *polA*. [Methods] An inducible CRISPR/*LshCas13a* RNA editing system-associated plasmid was designed with *LshCas13a* from *Leptotrichia shahii*. MG1655- $\Delta$ *recA* and DH10B were selected as the research objects. The Crisporo algorithm was employed to design the CRISPR RNA (crRNA) sequences targeting *lacZ* and *polA*, and the *LshCas13a* plasmid interference experiment was carried out to study the escape phenomena targeting *lacZ* and *polA*. The escape phenomenon of the *LshCas13a* system was evaluated based on the number and sequences of escaped colonies. PCR and Sanger sequencing were conducted to explore the escape events of the *LshCas13a* system. The escaped colonies carrying the *LshCas13a* system disrupted by the insertion sequence (IS) were selected, and  $OD_{600}$  was measured to evaluate the growth recovery of the strains. [Results] The *LshCas13a* system was used to target *lacZ* and *polA* in MG1655- $\Delta$ *recA* and DH10B. MG1655- $\Delta$ *recA* escaped through point mutation of *LshCas13a* and IS-mediated transposition when *lacZ* was targeted. When *polA* was targeted, MG1655- $\Delta$ *recA* and DH10B escaped by point mutation of *LshCas13a*, IS-mediated transposition, and mutation of the direct repeat (DR) sequence of crRNA. The mutation of *LshCas13a* promoted the recovery of strain growth. [Conclusion] The *LshCas13a* plasmid interference system successfully revealed the diversified escape phenomena during the RNA editing of *E. coli*, including IS-mediated the transposition of *LshCas13a*, point mutation of *LshCas13a*, and DR sequence mutation or recombination of

crRNA. The results laid a foundation for optimization of the CRISPR/LshCas13a gene editing system.

**Keywords:** *Escherichia coli*; CRISPR/LshCas13a; plasmid interference system; escape phenomenon; insertion sequence

CRISPR/Cas13a 系统属于 2 类 VI 型 CRISPR/Cas 适应性免疫系统<sup>[1]</sup>, 保护原核生物免受外来核酸物质(如病毒和质粒)的侵袭, 该系统介导的适应性免疫过程包括了 3 个阶段, 即适应、表达和干扰。(1) 在适应阶段, 外源核酸片段被加工成新的间隔区, 整合到 CRISPR 基因簇中<sup>[2]</sup>; (2) 表达阶段包括转录 CRISPR 阵列, 将前体转录物加工为成熟的 CRISPR RNA (crRNA), 然后与 Cas13a 蛋白组装成 CRISPR 核糖核蛋白复合物<sup>[3]</sup>; (3) 在干扰阶段, Cas13a 在 crRNA 的引导下识别和切割目标 RNA, 从而使外源的 RNA 降解<sup>[4]</sup>。当外来核酸物质入侵宿主时, Cas13a 切割 crRNA 前体产生成熟的 crRNA, 并与其结合产生 CRISPR-crRNA 监测复合物, 在 crRNA 的引导下, 使得 Cas13a 发挥降解外源 RNA 的功能<sup>[5]</sup>。

Cas13a 蛋白是由识别瓣叶(recognition lobe, REC)和核酸酶瓣叶(nuclease lobe, NUC)组成的两瓣叶结构, REC 瓣叶包括 N 端结构域(N-terminal domain, NTD)和 Helical-1 结构域, NUC 瓣叶包括 2 个保守的负责 crRNA 成熟的高等真核生物和原核生物核苷酸结合(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain, HEPN)结构域、连接 2 个 HEPN 结构域的连接结构域和 1 个 Helical-2 结构域<sup>[6]</sup>。CRISPR/Cas13a 系统依赖于 crRNA, 作为一种导航系统, 通过识别入侵的外源核酸和结合 Cas13a 蛋白来特异性切割和破坏外源核酸。目标 RNA 与 crRNA 结合后诱导 Cas13a 构象发生改变, 形成 crRNA-靶 RNA 双结合通道<sup>[7]</sup>, crRNA 的直接重复(direct repeat,

DR)序列与 Cas13a 也形成了新的相互作用, 目标 RNA 和 Cas13a 之间的相互作用对于 crRNA 指导的 RNA 切割是必不可少的<sup>[8]</sup>。实际上, 目标 RNA 是一个激活剂, 通过与 crRNA 的引导区形成双链并将催化残基靠近在一起来激活 HEPN 结构域内的 2 个催化位点, 活化的 HEPN 催化该位点的单链核糖核酸(single-stranded ribonucleic acid, ssRNA)裂解。

CRISPR/Cas13a 系统的特征是不仅可以切割底物 RNA, 还具有反式 RNA 切割活性来切割游离的单链 RNA, 这一发现使研究者对开发核酸检测的新型生物传感技术产生了更大兴趣<sup>[5]</sup>, 并有望在 CRISPR 诊断方面取得重大进展<sup>[9]</sup>。目前, CRISPR/Cas13a 系统已经被成功开发用于检测多种病原体, 如细菌<sup>[10]</sup>、病毒<sup>[11]</sup>和癌细胞<sup>[12]</sup>, 还可用于噬菌体基因组编辑<sup>[13]</sup>, 表现出了高灵敏度和高特异性的优越特征<sup>[14]</sup>。在植物<sup>[15]</sup>和真菌<sup>[16]</sup>中使用 CRISPR/Cas13a 技术也大大加快了农业研究的步伐和进程。此外, CRISPR/Cas13a 基因检测技术还可用于癌症的早期检测和肿瘤相关标志物的快速检测, 以及肿瘤治疗和基因治疗<sup>[17]</sup>, 展现了较好的应用潜力。

LshCas13a 蛋白属于 CRISPR/Cas13a 家族, 在基因组编辑和 RNA 干扰中发挥关键作用。与其他 Cas13a 蛋白相比, LshCas13a 蛋白具有更高的特异性、稳定性<sup>[18]</sup>和广泛的应用前景。此外, LshCas13a 蛋白可以高效调控靶标 RNA 的水平, 有效地沉默靶标基因的表达<sup>[19]</sup>, 从而为研究人员提供了一个强大的工具来研究基因功能和疾病机制<sup>[20]</sup>。总的来说, LshCas13a 蛋白

相较于其他 Cas13a 蛋白具有更高的特异性、精准性和广泛的研究基础,使其在基因组编辑和 RNA 干扰领域具有重要的应用意义。然而,CRISPR/LshCas13a 系统对被编辑的宿主造成了一定的生理负担<sup>[5]</sup>,该系统介导的基因编辑过程也存在着逃逸的问题<sup>[21]</sup>。LshCas13a 系统靶向 RNA 分子时会引发非特异性 RNA 分子的剪切和降解,从而干扰基因表达和细胞代谢过程,可能会对细胞或生物体产生毒性作用。逃逸效应可能会导致意外的副作用,甚至引起不必要的细胞死亡或损伤,影响了基因编辑的效果。

本研究以 LshCas13a 系统为研究对象,选择大肠杆菌(*Escherichia coli*)中 *recA* 基因的敲除突变株 MG1655- $\Delta recA$  和重组缺陷 *recA* 的 DH10B 作为研究的宿主菌,构建 LshCas13a 质粒干扰系统,通过靶向大肠杆菌的非必需基因 *lacZ* 和必需基因 *polA* 研究 LshCas13a 系统的多样化逃逸现象,旨在为开发高效能的 CRISPR/LshCas13a 基因编辑技术提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器

胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、甘油、异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇、乙二胺四乙酸、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基磺酸钠、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷和冰醋酸均购自国药集团化学试剂股份有限公司;琼脂购自青岛华东玻仪器有限公司;卡那霉素、氯霉素、氨苄青霉素、四环素和大观霉素均购自西格玛奥德里奇(无锡)生化科技有限公司;Gibson 重组试剂盒购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;质粒小提试剂盒、质粒中提试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Omega

Engineering 公司;DNA 连接酶和高保真 DNA 聚合酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;琼脂糖和限制性核酸内切酶均购自 ThermoFisher Scientific 公司。

恒温振荡摇床和电子精密天平均购自上海知楚仪器有限公司;生化培养箱购自韶关市泰宏医疗器械有限公司;电转仪购自 Eppendorf 公司;微波炉购自广东美的微波炉制造有限公司;双向磁力搅拌器购自常州荣华仪器制造有限公司;4 °C 冰箱购自青岛澳柯玛控股集团有限公司;NanoDrop、PCR 仪、离心机、-30 °C 冰箱、-80 °C 冰箱均购自 ThermoFisher Scientific 公司;制冰机购自宁波新芝生物科技股份有限公司;电泳仪购自上海天能科技有限公司;生物安全柜购自江苏埃德伯格电气有限公司;凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;电热恒温鼓风干燥箱和水浴锅均购自上海一恒科学仪器有限公司;高压灭菌锅购自上海实维实验仪器技术有限公司。

#### 1.1.2 培养基

大肠杆菌培养基采用 LB 液体培养基(g/L)<sup>[22]</sup>:胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,氯化钠 10.0,用 5 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2,加水定容至 1 000 mL,120 °C 灭菌 15 min,4 °C 保存。

LB 固体培养基需要将 LB 液体培养基分装到锥形瓶中,每瓶分装 250 mL LB 液体培养基和 3.75 g 琼脂,120 °C 灭菌 15 min。将液体倒入平皿中,每个平皿倒入 20 mL,4 °C 保存,2 周内使用。

#### 1.1.3 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株见表 1,所用质粒见表 2,所用引物见表 3(所用引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成)。

表 1 大肠杆菌菌株信息

Table 1 Strains information of *Escherichia coli*

Strains	Descriptions	Sources
DH10B	str. K-12 F <sup>-</sup> , <i>lacZ</i>	Lab preservation
MG1655- $\Delta$ <i>recA</i>	MG1655 strain with <i>recA</i> disrupted	[23]
ZY01	MG1655- $\Delta$ <i>recA</i> containing plasmid pLshCas13a-zy	This study
ZY02	DH10B containing plasmid pLshCas13a-zy	This study
ZY03	In MG1655- $\Delta$ <i>recA</i> , IS1A is inserted into the LshCas13a system	This study
ZY04	In DH10B, IS10R is inserted into the LshCas13a system	This study

表 2 质粒及其特征和来源

Table 2 Plasmids and their properties and sources

Plasmids	Descriptions	Sources
pC003-LshC2C2 locus into pACYC184 for spacer cloning	The template plasmid for amplifying the <i>LshCas13a</i> gene	[5]
pCasY-3- $\Delta$ <i>SIM</i> -kan	Template plasmid used to amplify vectors	[23]
pLshCas13a-zy	Plasmid associated with the LshCas13a interference system	This study
p15A-cm	<i>Ori</i> (p15A), <i>chl</i>	[23]
p15A-control	The crRNA cassette without any spacer sequence cloned into plasmid p15A-cm	This study
p15A-cm-Lsh-1-crRNA:: <i>lacZ</i>	The expression cassette targeting one region of the <i>lacZ</i> gene (200–400 bp) was cloned into p15A-cm plasmid	This study
p15A-cm-Lsh-1-crRNA:: <i>polA</i>	The expression cassette targeting one region of the <i>polA</i> gene (400–600 bp) was cloned into p15A-cm plasmid	This study
p15A-cm-Lsh-2-crRNA:: <i>polA</i>	The expression cassette targeting two regions of the <i>polA</i> gene (400–600 bp and 1 000–1 200 bp) was cloned into p15A-cm plasmid	This study
p15A-cm-Lsh-2-crRNA:: <i>lacZ</i>	The expression cassette targeting two regions of the <i>lacZ</i> gene (200–400 bp and 600–800 bp) was cloned into p15A-cm plasmid	This study
pBluescript SK(+)	<i>ColE</i> , <i>lacZ</i> , <i>bla</i> , <i>oriF1</i>	This study

## 1.2 构建 CRISPR/LshCas13a 干扰系统相关质粒

### 1.2.1 PCR 扩增 *LshCas13a* 基因片段

在本研究中以质粒 pC003-LshC2C2 (武汉森灵生物科技有限公司)作为模板,该质粒含有完整的 *LshCas13a* 基因,使用引物对 LshCas-F/LshCas-R 进行 PCR 扩增,经胶回收纯化后获得 PCR 扩增产物。将 4.5  $\mu$ L 的回收产物与 0.5  $\mu$ L pBluescript SK(+)载体和 5  $\mu$ L 连接酶加入反应体系中,在 16  $^{\circ}$ C 条件下反应 2 h 后,将总体积为 10  $\mu$ L 的反应产物通过化学转化法转入感受态细胞 *E. coli* DH10B 中。挑取验证成功的菌株进

行测序,选择序列正确的菌液进行质粒的提取。使用 *Sma* I 消化质粒,经胶回收获得线性化含有同源臂的 *LshCas13a* 基因片段(图 1B)。

### 1.2.2 PCR 扩增载体片段

以 pCasY-3- $\Delta$ *SIM*-kan 质粒作为模板,使用引物对 5500-F/5500-R 进行 PCR 扩增,取 50  $\mu$ L 的 PCR 产物在 130 V 的条件下电泳 30 min,胶回收纯化后获得带有同源臂的载体片段(图 1B)。

### 1.2.3 Gibson 重组

将 *LshCas13a* 基因片段和载体片段以摩尔比 1:1 加入到离心管中进行重组反应,在 50  $^{\circ}$ C 的条件下反应 10 min,取 20  $\mu$ L 的反应产物化

表 3 引物及其序列

Table 3 PCR primers and their sequences

Primers	Sequences (5'→3')
LshCas-F	<u>ACCCGGGATAACAATTCACACCCTAGGCCGCAAAGAGGAGAAAGGATCTATGGGAAATTTATTT</u> GGAC ( <i>Sma</i> I)
LshCas-R	<u>ACCCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAA</u> TCTTATAACGTATCAT TCG ( <i>Sma</i> I)
Lsh-sk-F	TTCCCAGTCACGACGTTGT
Lsh-sk-R	CTATCTCTATTTCTTCTTC
Lsh-SK-WF1	TAAGAATAATAGAAAATG
Lsh-SK-WF2	GGAAATTGTGATACAG
Lsh-SK-WF3	TACAAGGAACGCAAGA
Lsh-SK-WF4	GCAACATCAGTTTGTT
Lsh-SK-WF5	AAATACATAATATGCTCTAAC
5500-F	<u>CGCTTCCTTTAGCAGCCCTTGCGCCCTGAGTGCTTG</u>
5500-R	<u>TGCGGCCTAGGGTGTGAA</u> ATTGTTATCCGCTCACAATT
spe-Lsh-F	GGCCTCGCGCGCAGATCAGT
spe-Lsh-R	ATACAACCTTCTTCTGTTTCC
tet-Lsh-F	AAGAAATCCGTTTGCTGA
tet-Lsh-R	GCAAGGCTATGTGCCATC
Lsh-IS-R	CGGAACACGTAGAAAGCCAG
Lsh-IS-F	GGCCGCAAAGAGGAGAAAGG
Lsh-1-R	CCATAAAATTAGTCAAATA
Lsh-2-F	CGCTAAAGAGGAATTGGATT
Lsh-3-F	GAAAAAAGTAATAGAATGTT
Lsh-4-F	GGCTGATGCAAAATTTTAT
Lsh-5-F	GCAGAACAAATTGATAGAGT
P15A-F	CAAGGCGACAAGGTGCTGAT
P15A-R	GGTAGCTCAGAGAACCTTCGA

Uppercase plus underscores indicate homology arms, restriction endonuclease have been noted in parentheses and its recognition site is indicated in capital italics.

学转化到感受态细胞 *E. coli* DH10B 中(图 1A)。转化结束后加入四环素和大观霉素涂布于 LB 平板, 在 30 °C 条件下孵育 12 h, 然后在 LB 平板上挑取单克隆菌落于 3 mL 含四环素和大观霉素 LB 液体培养基, 30 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。用引物对 spe-Lsh-F/R 和 tet-Lsh-F/R 进行 PCR 验证, 挑选出正确的克隆。接着, 再提取正确克隆的质粒, 利用 *Nco* I 和 *Bam*H I 进行酶切验证, 获得正确的目标质粒, 命名为 pLshCas13a-zy (图 1C)。

### 1.3 crRNA 的设计

考虑到 LshCas13a-crRNA 复合物与目标 RNA 结合时, crRNA 识别 3'原型间隔区侧翼位点 (protospacer-flanking site, PFS) 偏好于碱基 C<sup>[24]</sup>, 以及 LshCas13a 蛋白的裂解位点主要定位于 ssRNA 的富尿嘧啶区域或 ssRNA-dsRNA 连接处<sup>[5]</sup>, 并且 LshCas13a 系统的靶向区域偏好 AT 含量高的区域, 因此选择靶向 *lacZ* 基因的 200–400 bp 和 600–800 bp 2 个区域, 靶向 *polA* 基因的 400–600 bp 和 1 000–1 200 bp 2 个区域

进行 crRNA 的选择。利用 Crisporo 算法 (<http://bioinfolab.miamioh.edu/ct-finder>) 分别设计靶向 *lacZ* 基因和 *polA* 基因的 crRNA 序列, 靶向位点和 PFS 等信息见表 4。crRNA 序列全部由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 并克隆到载体 p15-cm 载体中。

#### 1.4 电转化 CRISPR/LshCas13a 干扰系统相关质粒

将质粒 pLshCas13a-zy 分别电转化到 MG1655- $\Delta recA$  和 DH10B 中。分别挑取 MG1655- $\Delta recA$  和 DH10B 单个菌落于 3 mL 的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。然后, 利用低温冷冻离心机, 4 °C、12 000 r/min 将 MG1655- $\Delta recA$  和 DH10B 离心 5 min, 再用

预冷的无菌水洗涤细胞 2 次, 制备电感受态细胞。最后, 加入 40  $\mu$ L 无菌水和 1–3  $\mu$ L 浓度为 50–100 ng/ $\mu$ L 的 pLshCas13a-zy 质粒与电感受态细胞轻轻混合后, 迅速加入至预冷的 1 mm 电转杯中; 电转仪参数设置为 25  $\mu$ F、200  $\Omega$  和 1.8 kV 同时电击 5 ms, 电击结束后迅速向电转杯中加入 1 mL 预冷的 LB 液体培养基重悬细胞, 30 °C、220 r/min 振荡培养 1 h; 然后加入四环素和大观霉素后均匀涂布于 LB 固体培养基上, 倒置放置在 30 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 筛选正确的菌株分别命名为 ZY01 和 ZY02。

#### 1.5 CRISPR/LshCas13a 质粒干扰实验

在 LshCas13a 系统中, LshCas13a 蛋白的表达由 IPTG 诱导的启动子 P<sub>Trc</sub> 驱动, 首先将质

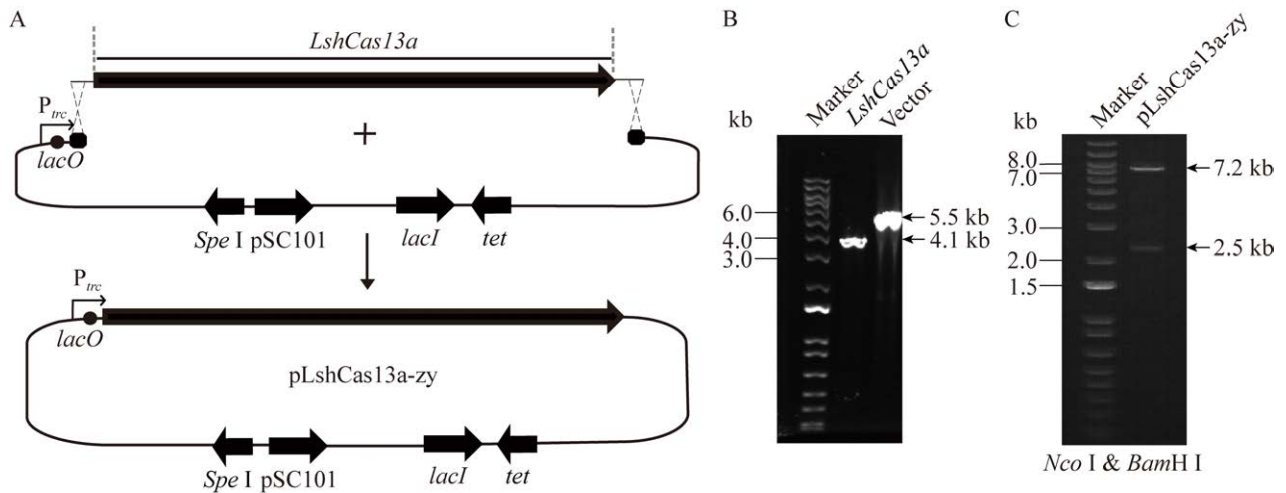


图 1 pLshCas13a-zy 质粒的构建和验证

Figure 1 Construction and validation of pLshCas13a-zy. A: Cloning of pLshCas13a-zy using Gibson assembly. B: The *LshCas13a* fragment was digested with *Sma* I and PCR recovery of 5.5 kb gene fragment. C: Enzymatic verification of pLshCas13a-zy by the digestion of *Nco* I and *Bam*H I.

表 4 靶向位点信息

Table 4 Targeting sites information

CRISPR spacer name	Targeted regions in crRNA (5'→3')	PFS
<i>lacZ</i> (200–400 bp)	CCTCAGGAAGATCGCACTCCAGCCAGCT	C
<i>lacZ</i> (600–800 bp)	AAATCATCATTAAAGCGAGTGGCAACAT	C
<i>polA</i> (400–600 bp)	TCATGGTATTGATAAGCGTAATATTTGG	C
<i>polA</i> (1 000–12 00 bp)	ACCAGGTTAGCAGAGATGTTATCAAGGC	C

粒 pLshCas13a-zy 电转化到菌株中, 然后再电转入 crRNA 的质粒后进行表达。在抗生素选择压力下孵育后, IPTG 诱导 LshCas13a 蛋白表达, LshCas13a 系统作用于目标 RNA 后降低基因表达并非特异性降解 RNA。

将 ZY01 和 ZY02 制成电感受态细胞, 分别将质粒 p15A-cm-Lsh-1-crRNA::*lacZ*、p15A-cm-Lsh-2-crRNA::*lacZ*、p15A-cm-Lsh-1-crRNA::*polA*、p15A-cm-Lsh-2-crRNA::*polA* 电转化到电感受态细胞中。电转化完毕后, 30 °C、220 r/min 振荡培养 1 h, 然后涂布于含有氯霉素、四环素、大观霉素和 IPTG 的 LB 平板上, 将平板放置在 30 °C 培养箱中培养 16 h。

## 1.6 菌株活化及生长曲线的测定

将 ZY01 和 ZY02 在含有四环素和大观霉素的 3 mL 的 LB 液体培养基中在 30 °C、220 r/min 条件下振荡培养 14 h 后, 将菌液浓度统一调整至  $OD_{600}$  为 0.05, 然后接种于含有四环素和大观霉素的 5 mL 的 LB 液体培养基中, 分别在 IPTG 和无 IPTG 的条件下, 30 °C、220 r/min 振荡培养, 每 2 h 取样检测一次, 连续监测 14 h。每个实验均进行 3 次生物学重复, 将测得的结

果进行线性化处理。

## 1.7 数据处理

实验数据均为 3 组平行, 采用平均值±标准差表示。用 GraphPad Prism 9.4.1 对数据进行整理, 用 SPSS 26.0 软件进行显著性分析( $P < 0.01$ ), 通过 Adobe Illustrator 2020 软件进行作图分析及图片的整理。

# 2 结果与分析

## 2.1 诱导表达 LshCas13a 蛋白对细菌生存影响的分析

为了考察 LshCas13a 系统对大肠杆菌的生理状况的影响, 在缺乏 crRNA 引导的情况下, 分别在含有质粒 pLshCas13a-zy 的 MG1655- $\Delta recA$  (菌株 ZY01) 和 DH10B (菌株 ZY02) 中诱导表达 LshCas13a 蛋白, 通过分别测量 IPTG 诱导组(+) 和无 IPTG 组(-) 细菌的生长曲线来判断诱导表达 LshCas13a 蛋白是否对 ZY01 和 ZY02 的生长产生影响(图 2)。

结果显示, 与不添加诱导剂的条件相比, 在添加诱导剂的生长条件下, ZY01 和 ZY02 的生长速度均有不同程度的减慢。如图 2A 所示,

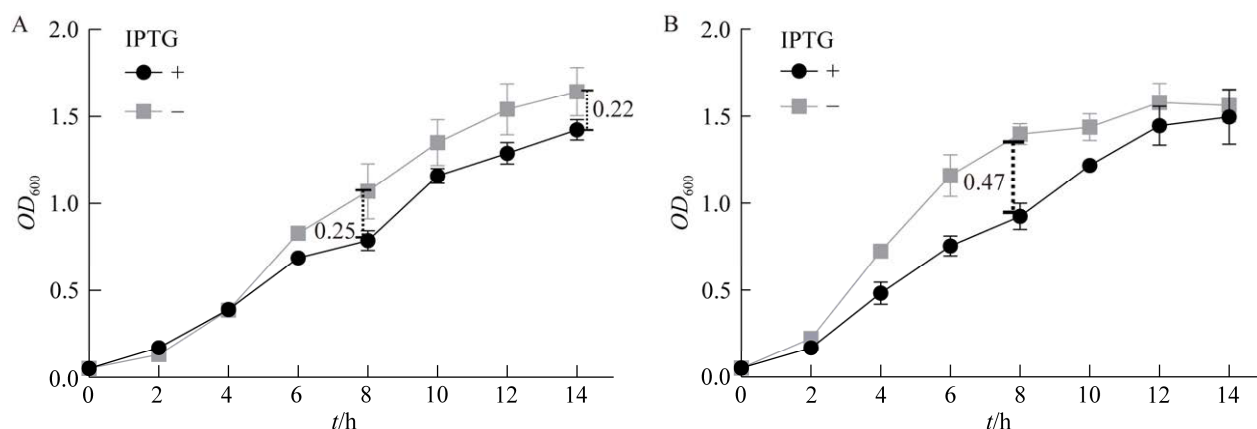


图 2 不同诱导条件下菌株的生长曲线

Figure 2 Growth curves of strains under different induction conditions. A: ZY01 (LshCas13a system in MG1655- $\Delta recA$ ). B: ZY02 (LshCas13a system in DH10B). The standard deviation represents the difference in  $OD_{600}$  of the strains under different induction conditions at the same time.



ZY01 在培养 4 h 后, 不添加诱导剂时菌株的  $OD_{600}$  始终大于添加诱导剂的情况。当培养 8 h 时, 在不同诱导条件下的  $OD_{600}$  差距最大, 差距为 0.25。培养 14 h 后, ZY01 在不同诱导条件下的  $OD_{600}$  的差异仍然存在, 差距为 0.22。如图 2B 所示, ZY02 在不添加诱导剂的条件下菌株的  $OD_{600}$  始终大于添加诱导剂的情况。在培养 8 h 时, 在不同诱导条件下的  $OD_{600}$  差距最大, 差距为 0.47。尽管随着培养时间的不断延长, 不同诱导条件下的  $OD_{600}$  差异逐渐减小, 在培养 14 h 结束时, ZY02 的生长状态相对较弱。该研究结果表明, LshCas13a 蛋白的表达对菌株产生了一定的生理负担。

## 2.2 考察 CRISPR/LshCas13a 质粒干扰系统靶向非必需基因 *lacZ* 的情况

将 LshCas13a 干扰系统相关质粒 pLshCas13a-zy 电转化到菌株中, 再将目标为 *lacZ* 的 crRNA 的质粒继续电转化到该菌株中。在转化后的 MG1655- $\Delta recA$  中, LshCas13a 复合物通过与目标 *lacZ* 的序列互补结合, 引发 LshCas13a 蛋白的活性, 从而靶向 *lacZ*, 以实现对其功能控制或沉默, 产生白色菌落(图 3A)。

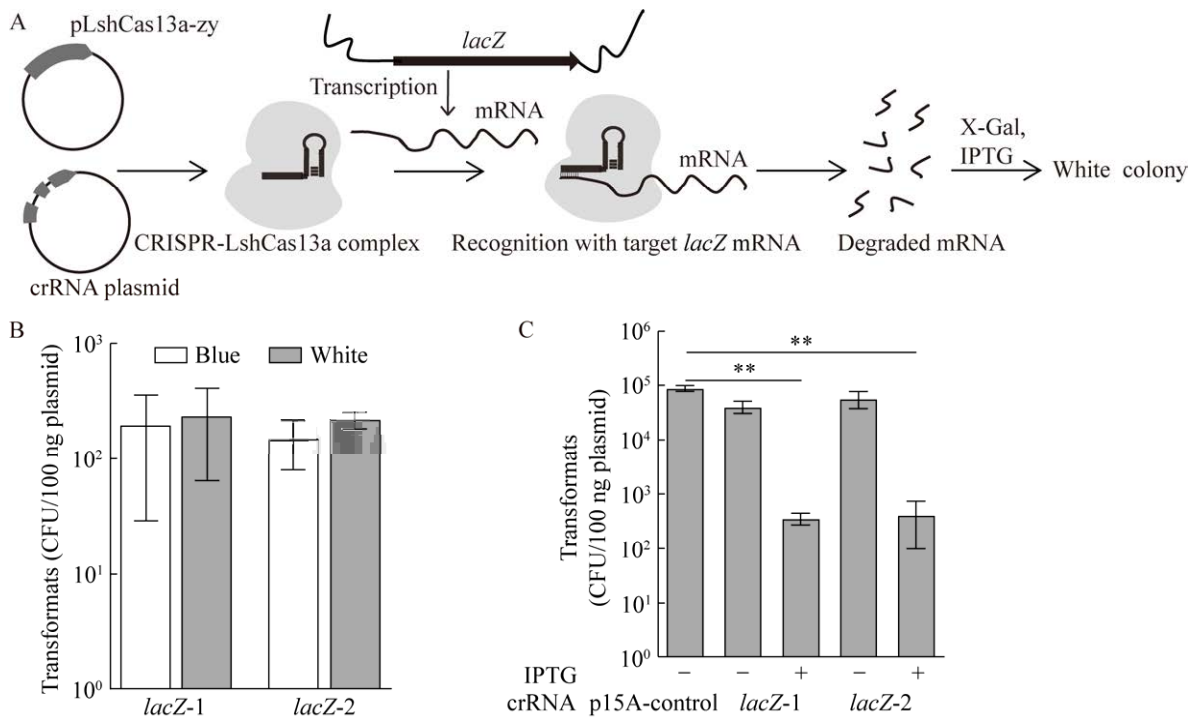
当 LshCas13a 系统在 MG1655- $\Delta recA$  中靶向 *lacZ* 后, 在添加 IPTG 和 X-Gal 的培养条件下, 出现了白色菌落, 说明成功构建 LshCas13a 干扰系统靶向 *lacZ*。在添加诱导剂的条件下, 比较靶向 *lacZ* 的 1 个区域和 2 个区域时蓝色菌落与白色菌落的数量, 通过统计菌落数发现数量比例均在 0.4–0.5 波动(图 3B)。与转化质粒 p15A-control 转化效率相比, 在添加诱导剂的条件下, 靶向 *lacZ* 的 1 个区域和 2 个区域时转化效率均下降了 50%左右, 而在不添加诱导剂的条件下, 转化效率基本没有变化(图 3C)。表明 LshCas13a 系统操纵子的诱导表达可能对宿主

产生了遗传毒性胁迫。

## 2.3 CRISPR/LshCas13a 质粒干扰系统靶向必需基因 *polA* 的逃逸情况

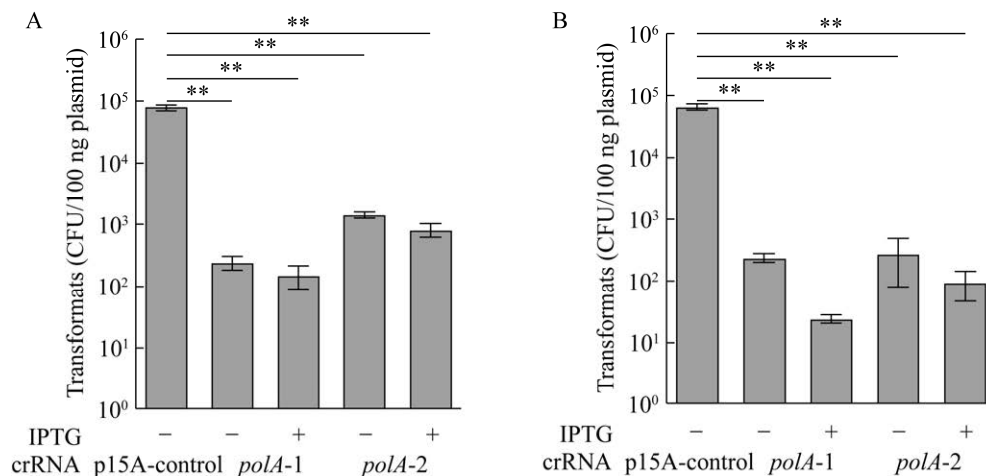
在 *E. coli* 的染色体中, *polA* 基因是一个重要基因, 编码 DNA 聚合酶 I<sup>[25]</sup>, 参与细胞中的核酸代谢, 包括 DNA 合成、DNA 修复和 RNA 加工, 对于维持基因组的稳定性和功能起着至关重要的作用。*E. coli* 中的 *polA* 基因以单拷贝的形式存在, 如果缺少 *polA* 基因, 将无法产生 DNA 聚合酶 I, 从而导致 DNA 复制和修复过程受到严重影响, 甚至会导致细胞死亡<sup>[26]</sup>。为了进一步增加 LshCas13a 系统对宿主的生存压力, 选择靶向必需基因 *polA*, 进而考察大肠杆菌对该基因编辑系统的逃逸能力和多样性分析。

通过对质粒干扰实验中存活的菌落数量分析, 发现在 MG1655- $\Delta recA$  和 DH10B 中利用 LshCas13a 系统靶向 *polA*, 在不同的诱导条件下, 与对照质粒 p15A 的转化效率相比, 都显著降低( $P < 0.01$ ) (图 4A、4B)。在 LshCas13a 系统靶向 *polA* 的实验中, 即使在不添加诱导剂的培养条件下, 转化效率依然明显小于靶向 *lacZ* 的转化效率, 这表明即使 LshCas13a 系统的启动子有较少的渗漏表达, 依然对菌株产生了生存压力。同时, 以 MG1655- $\Delta recA$  为研究对象, 与转化质粒 p15A-control 转化效率相比, 在添加诱导剂的条件下, 靶向 *polA* 的 1 个区域和 2 个区域时转化效率均下降了 70%左右。以 DH10B 为研究对象, 靶向 *polA* 时, 与转化质粒 p15A-control 转化效率相比, 在添加诱导剂的条件下, 靶向 1 个区域和 2 个区域时转化效率均下降了 75%左右。这表明 LshCas13a 系统靶向 *polA* 对宿主产生了更大的生存压力时, 仍然有较多存活的菌落。因此, 进一步探讨了 LshCas13a 系统逃逸情况产生的可能原因。



**图 3 LshCas13a 质粒干扰系统靶向非必需基因 *lacZ***

Figure 3 The LshCas13a plasmid interference system targets the non-essential gene *lacZ*. A: Schematic representation of the work of the LshCas13a plasmid interference system by targeting *lacZ*. B: Ratio of blue and white colonies after targeting the *lacZ* gene by LshCas13a plasmid interference system in MG1655- $\Delta recA$ . C: Analysis of the CFU after the curation of LshCas13a plasmid interference system by targeting *lacZ* in MG1655- $\Delta recA$ . \*\*:  $P < 0.01$ .



**图 4 LshCas13a 质粒干扰系统靶向必需基因 *polA***

Figure 4 The LshCas13a plasmid interference system targets the essential gene *polA*. A: Analysis of the CFU after curation of LshCas13a plasmid interference system by targeting *polA* in MG1655- $\Delta recA$ . B: Analysis of the CFU after treatment of LshCas13a plasmid interference system by targeting *polA* in DH10B. \*\*:  $P < 0.01$ .

## 2.4 逃逸事件的捕捉

当 LshCas13a 系统靶向 *lacZ* 和 *polA* 时,均出现了大量能够逃避 LshCas13a 系统的逃逸菌落,针对这些菌株探索了其逃逸发生的可能情况。

### 2.4.1 靶向 *lacZ* 基因的逃逸情况分析

在 MG1655- $\Delta recA$  中,当 LshCas13a 系统靶向 *lacZ* 基因的 1 个区域时,随机选取 50 个存活的菌落,对 LshCas13a 系统的作用元件进行分析,结果显示在添加诱导剂的情况下 *LshCas13a* 区域突变发生了 22 次,在不添加诱导剂的条件下 *LshCas13a* 区域突变发生了 21 次。当 LshCas13a 系统靶向 *lacZ* 基因的 2 个区域时,随机选取 50 个存活的菌落,结果显示在添加诱导剂的情况下 *LshCas13a* 区域突变发生了 5 次,在不添加诱导剂的条件下 *LshCas13a* 区域突变发生了 17 次。

然而,在添加诱导剂的条件下,通过 PCR 扩增 *LshCas13a* 区域,意外地发现 *LshCas13a* 区域相较于原始 *LshCas13a* 区域变大,测序结果显示是由于菌株基因组中具有转座功能的插入序列(insertion sequence, IS)元件转移到了 *LshCas13a* 编码区域,破坏了 LshCas13a 系统,致使宿主逃脱 LshCas13a 系统的切割反应。在添加诱导剂的条件下,当 LshCas13a 系统靶向 *lacZ* 基因 1 个区域时 IS 转座发生了 2 次,靶向 *lacZ* 基因 2 个区域时 IS 转座发生了 6 次(图 5D)。

### 2.4.2 靶向 *polA* 基因的逃逸情况分析

研究显示当 LshCas13a 系统靶向 *polA* 时,仍然有许多 *E. coli* 存活。为了探讨 LshCas13a 系统的逃逸情况,随机选取大量幸存的菌落,对 LshCas13a 系统的作用元件进行分析,PCR 扩增 *LshCas13a* 区域,通过琼脂糖凝胶电泳发现

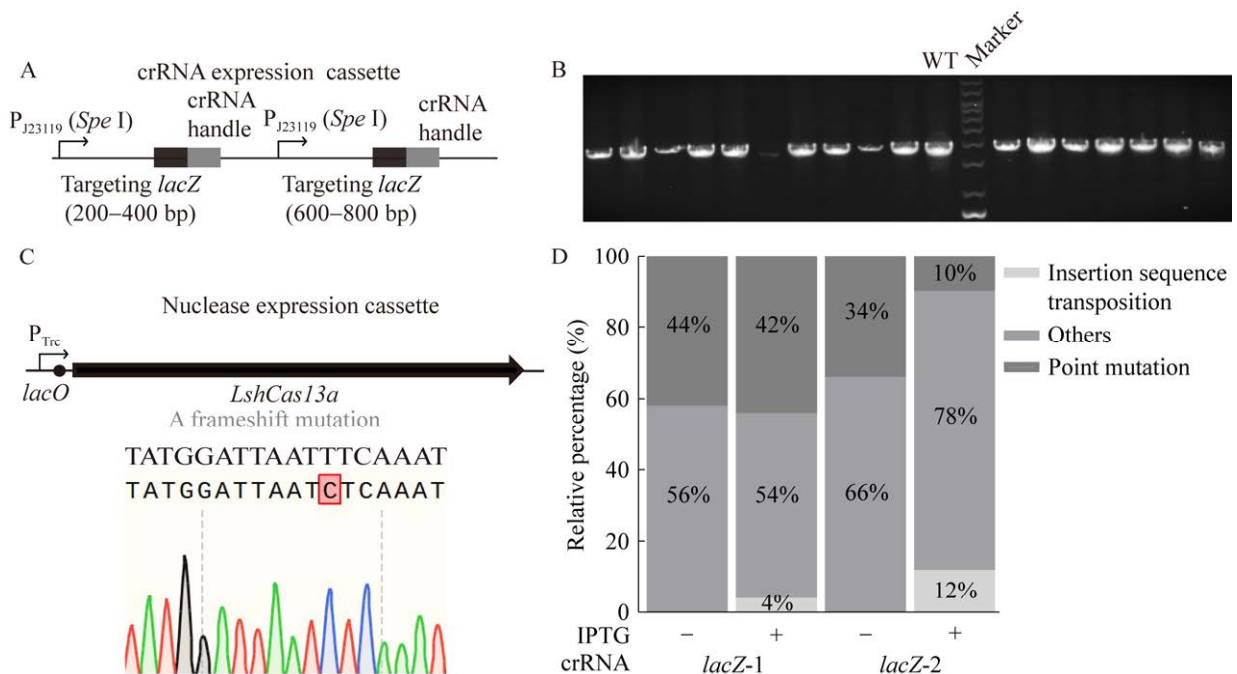


图 5 LshCas13a 系统靶向 *lacZ* 基因的逃逸现象分析

Figure 5 Analysis of the escape phenomenon of the LshCas13a system by targeting *lacZ*. A: Schematic representation of crRNA targeting the *lacZ* gene. B: PCR screening for IS insertions into *LshCas13a* gene expression cassettes. C: Schematic representation of mutations occurring in the *LshCas13a* gene. D: Statistics of the escape phenomena of 50 randomly selected surviving colonies in MG1655- $\Delta recA$ .

其中大部分的 *LshCas13a* 的 PCR 产物比预期条带变大(图 6C)。测序结果显示, 这些条带变大的 *LshCas13a* 区域是因为 IS 元件的插入, 从而破坏了 *LshCas13a* 系统, 致使菌株可以存活。

在 MG1655- $\Delta recA$  和 DH10B 中, 当 *LshCas13a* 系统靶向 *polA* 基因的 2 个区域时(图 6A), 通过 PCR 随机检测 50 个存活的菌落, 结果均显示在添加诱导剂的情况下 IS 转座发生了 50 次(图 6D、

6E)。不添加诱导剂的情况下, 当 *LshCas13a* 系统靶向 *polA* 基因的 2 个区域时, IS 转座发生的次数分别为 6 次和 16 次, 测序结果显示 IS 插入的类型主要是 IS1 和 IS10。从 IS 插入数目来看, 不同的诱导情况, IS 转座事件发生的数量也不同, 添加诱导剂相较于不加诱导剂 IS 转座事件发生得更多, 表明 IS 转座可能是作为靶向必需基因时菌落的主要逃逸机制。

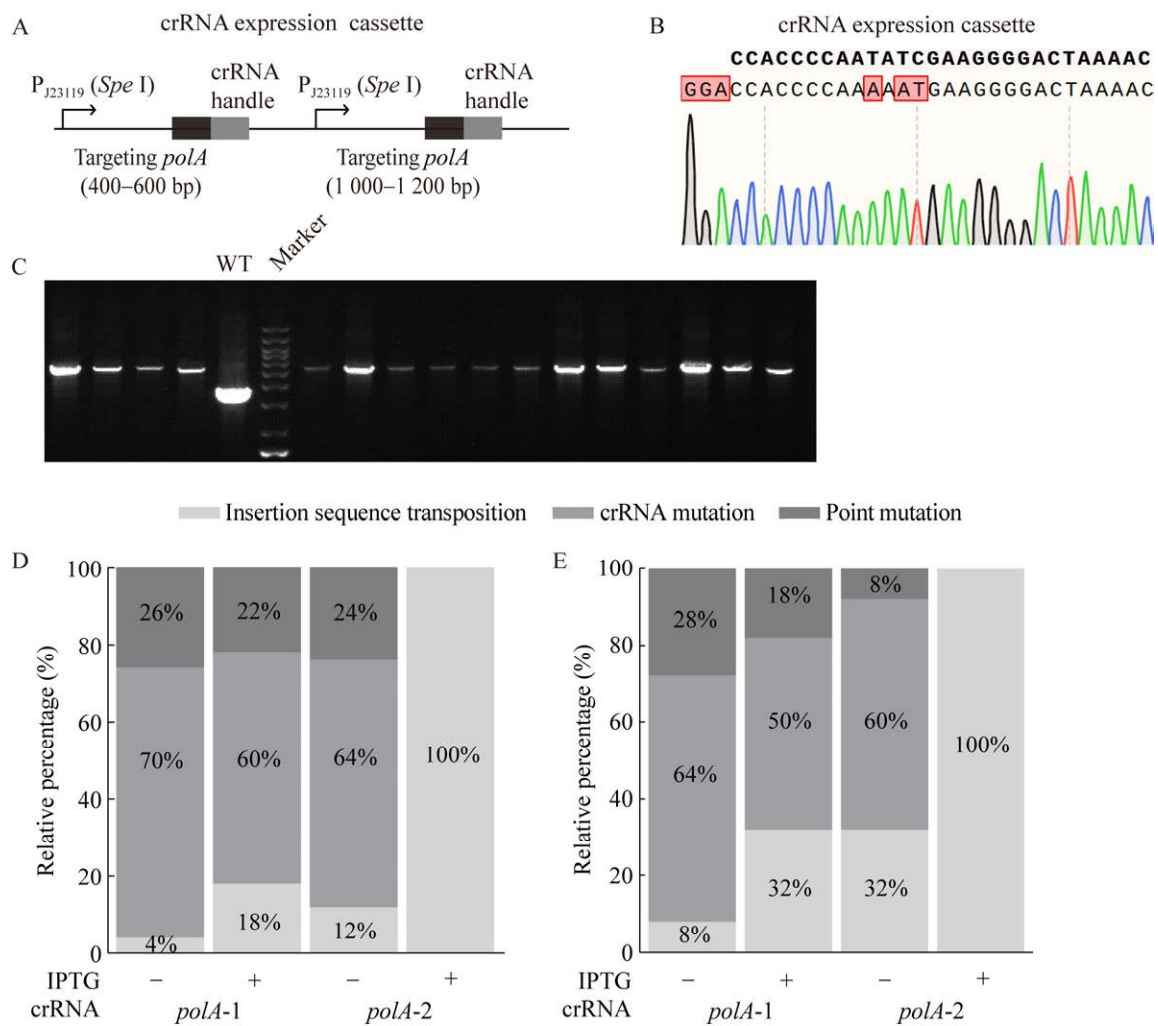


图 6 *LshCas13a* 系统靶向 *polA* 基因的逃逸现象分析

Figure 6 Analysis of the escape phenomenon of the *LshCas13a* system targeting the *polA* gene. A: Schematic representation of the crRNA targeting the *polA* gene. B: Schematic representation of mutations occurring in the DR of crRNA. C: PCR screening for IS insertions into *LshCas13a* gene expression cassettes. D: Statistics of the escape phenomena of 50 randomly selected surviving colonies in MG1655- $\Delta recA$ . E: Statistics of the escape phenomena of 50 randomly selected surviving colonies in DH10B.

此外, 针对 PCR 检测存在 *LshCas13a* 区域没有变大的幸存菌落, 通过测序分析 *LshCas13a* 编码区域发现发生了点突变, 或者在 crRNA 的 DR 区域的 3 个碱基发生突变并插入 3 个碱基 (图 6B), 这些突变均导致了 LshCas13a 基因编辑系统的功能丧失。

## 2.5 IS 插入 CRISPR/LshCas13a 系统后菌株的生长情况

通过对大肠杆菌逃逸菌株的系统分析, 发现了 *LshCas13a* 编码区域存在大量的 IS 元件插入热点 (图 7A)。为了进一步探讨 IS 对逃逸菌株生长的影响, 选取 LshCas13a 系统作用后 *LshCas13a* 区域含 IS 插入后的菌落, 通过测量细菌生长曲线来验证菌株生长情况的恢复。

通过对菌株 MG1655- $\Delta recA$  中 IS1A 插入 *LshCas13a* (ZY03) 和在 DH10B 中 IS10R 插入 *LshCas13a* 区域 (ZY04) 的生长情况的分析, 分别检测了 IPTG 诱导组 (+) 和无 IPTG 组 (-) 的  $OD_{600}$  值, 绘制了相关菌株的生长曲线。在不同

诱导条件下, IPTG 和无 IPTG 组的生长曲线无明显差异。这表明当 IS 元件转座到 *LshCas13a* 区域后, ZY03 和 ZY04 恢复了生长, 在不同诱导条件下, 生长状况几乎一致 (图 7B、7C)。说明破坏 LshCas13a 系统后 MG1655- $\Delta recA$  和 DH10B 生长良好, 宿主可以与靶向染色体的质粒共存, 有效地消除 LshCas13a 系统诱导的遗传毒性。

## 3 讨论与结论

CRISPR/LshCas13a 是一种 RNA 介导的靶向 RNA 的基因编辑技术, 但该系统不仅可以切割靶 RNA, 还可以非特异性地切割其他的 RNA<sup>[27]</sup>。然而这种混乱的 RNA 切割活性引起了细胞生理的压力, 甚至导致生长受限<sup>[28]</sup>。细菌为了躲避基因编辑系统带来的生理胁迫, 对基因编辑系统进行了不同程度的遗传修饰<sup>[29]</sup>, 导致基因编辑过程中出现多样化的逃逸问题<sup>[30]</sup>。

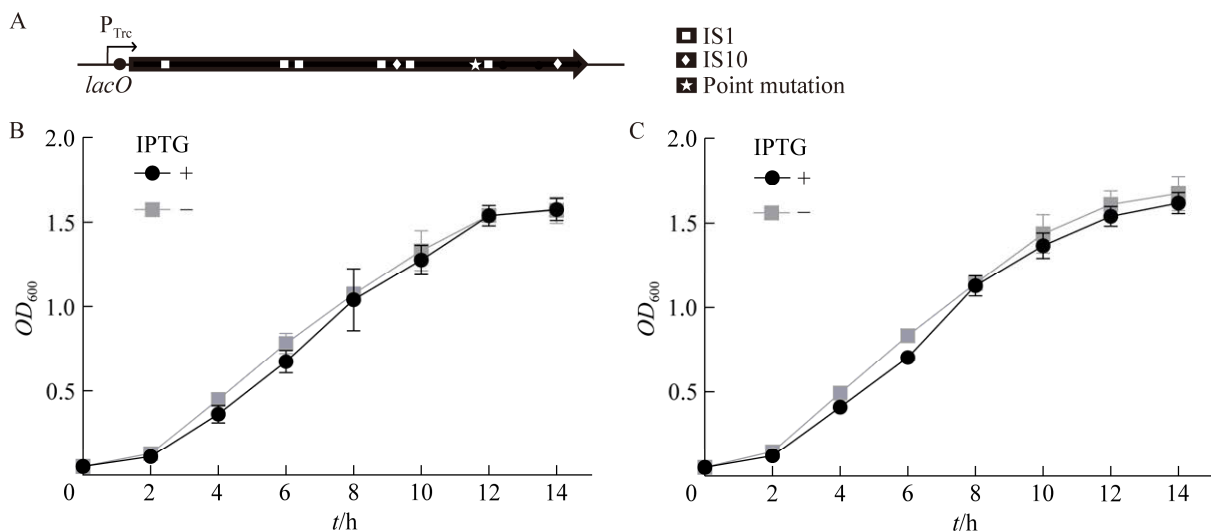


图 7 不同诱导条件下 IS 插入后菌株的生长情况

Figure 7 Growth recovery of strains after IS insertion. A: Some of the numbered insertion hotspots of IS1 and IS10 in the *LshCas13a* region. B: LshCas13a system targets the *polA* gene in MG1655- $\Delta recA$  and growth curves of strains after IS1A insertion into the *LshCas13a* region. C: LshCas13a system targets the *polA* gene in DH10B and growth curves of strains after IS10R insertion into the *LshCas13a* region.

基于此, 本研究在 *E. coli* 构建了 CRISPR/LshCas13a 的质粒干扰系统, 展开对 LshCas13a 系统逃逸现象的系统分析。为了避免 *recA* 介导的远端同源序列之间或微同源序列之间的重组来修复基因组损伤, 以及降低细胞通过 *recA* 介导的 SOS 反应逃避 LshCas13a 系统诱导的细胞死亡<sup>[31]</sup>, 选择了 *recA* 基因的敲除突变株 MG1655- $\Delta recA$  和重组缺陷 *recA* 的 DH10B 作为实验菌株, 比较分析了 LshCas13a 系统在大肠杆菌中靶向非必需基因 *lacZ* 和必需基因 *polA* 时的逃逸现象。通过分析逃逸菌落的数量、*LshCas13a* 基因编码序列以及 crRNA 的突变情况, 发现了 IS 转座、*LshCas13a* 基因突变和 crRNA 序列改变等逃逸现象。显示当 LshCas13a 系统靶向 *polA* 时, IS 转座逃逸事件的发生频率较高。通过筛选了 IS 转座事件, 其中, IS1 和 IS10 几乎占据了主要转座事件的发生。通过转座发生后的菌株生长曲线的比较分析, 转座破坏后的 LshCas13a 系统消除了对细胞的遗传毒性。

IS 转座元件是可移动的一个基因盒, 具有简单的遗传构造, 通常只编码与基因转移有关的功能结构, 能够插入到目标分子的多个位点<sup>[32]</sup>。转座事件的发生率在正常情况下为  $10^{-8}$ , 但当基因组重排的高活性和伴随的诱变效应对宿主细胞是有害时, 转位通常保持较高的发生率<sup>[33]</sup>。IS 在不同生物中的普遍存在表明, IS 的转位能力对宿主的环境适应性和生物遗传的多样性是不可或缺的, IS 转座对于驱动宿主与各种免疫障碍之间的相互适应, 具有广泛的生理学意义。系统探索 IS 在生物进化中的作用, 不仅有助于理解 IS 对原核生物环境适应的驱动作用, 而且有助于菌株遗传工作改造和基因组编辑等应用技术的深度开发。为了更好地研究 IS 的转座插入特征, 需要构建高效的 LshCas13a 捕获系统来进一步细致研究 IS 元件插入转座的热点序列特

征, 相关工作也是我们下一步研究的重点工作。

此外, 为了进一步优化 LshCas13a 系统的编辑效率, 可以通过在不破坏 LshCas13a 蛋白功能的基础上, 利用密码子的简并性特征, 通过改变 *LshCas13a* 基因上 IS 转座热点区域等方法进一步降低 LshCas13a 系统的逃逸事件的发生概率, 提高 LshCas13a 编辑系统的编辑效率。

综上所述, 本研究针对 LshCas13a 系统在 *E. coli* 的逃逸现象的多样性进行了分析, 结果显示 LshCas13a 系统在 RNA 编辑过程中不仅要考虑脱靶效应, 还要考虑宿主染色体中编码的内源性 IS 元件特征、Cas13a 编码基因突变和 crRNA 基因组靶点改变对 LshCas13a 系统功能的潜在干扰效应。针对不同的特征, 对基因编辑技术开展有针对性的优化, 加快 LshCas13a 系统的高效应用。总之, 本研究利用了质粒干扰实验, 在 *E. coli* 中分析了 LshCas13a 系统的逃逸事件, 为 CRISPR/Cas13a 技术的应用和 RNA 编辑等技术应用提供了借鉴作用。

## 参考文献

- [1] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL MR, KNIGHT SC, BURSTEIN D, CATE JHD, TJIAN R, DOUDNA JA. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection[J]. *Nature*, 2016, 538: 270-273.
- [2] MOHANRAJU P, MAKAROVA KS, ZETSCHKE B, ZHANG F, KOONIN EV, van der OOST J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aad5147.
- [3] ZHOU J, YIN LJ, DONG YN, PENG L, LIU GZ, MAN SL, MA L. CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform: sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 225-233.
- [4] TAKEUCHI N, WOLF YI, MAKAROVA KS, KOONIN EV. Nature and intensity of selection pressure on CRISPR-associated genes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(5): 1216-1225.



- [5] ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, KONERMANN S, JOUNG J, SLAYMAKER IM, COX DBT, SHMAKOV S, MAKAROVA KS, SEMENOVA E, MINAKHIN L, SEVERINOV K, REGEV A, LANDER ES, KOONIN EV, ZHANG F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [6] LIU L, LI XY, WANG JY, WANG M, CHEN P, YIN ML, LI JZ, SHENG G, WANG YL. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 121-134.e12.
- [7] WANG BB, ZHANG TL, YIN J, YU Y, XU WH, DING JP, PATEL DJ, YANG H. Structural basis for self-cleavage prevention by tag: anti-tag pairing complementarity in type VI Cas13 CRISPR systems[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(5): 1100-1115.e5.
- [8] BOT JF, van der OOST J, GEIJSSEN N. The double life of CRISPR-Cas13[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 78: 102789.
- [9] ZHAO L, QIU M, LI X, YANG J, LI J. CRISPR-Cas13a system: a novel tool for molecular diagnostics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1060947.
- [10] KIGA K, TAN XE, IBARRA-CHÁVEZ R, WATANABE S, AIBA Y, SATO O Y, LI FY, SASAHARA T, CUI BT, KAWAUCHI M, BOONSIRI T, THITIANANPAKORN K, TAKI Y, AZAM AH, SUZUKI M, PENADÉS JR, CUI LZ. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2934.
- [11] MYHRVOLD C, FREJE CA, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, METSKY HC, DURBIN AF, KELLNER MJ, TAN AL, PAUL LM, PARHAM LA, GARCIA KF, BARNES KG, CHAK B, MONDINI A, NOGUEIRA ML, ISERN S, MICHAEL SF, LORENZANA I, YOZWIAK NL, MacINNIS BL, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [12] HONG JS, SON T, CASTRO CM, IM H. CRISPR/Cas13a-based microRNA detection in tumor-derived extracellular vesicles[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(24): e2301766.
- [13] ADLER BA, HESSLER T, CRESS BF, LAHIRI A, MUTALIK VK, BARRANGOU R, BANFIELD J, DOUDNA JA. Broad-spectrum CRISPR-Cas13a enables efficient phage genome editing[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7: 1967-1979.
- [14] WESSELS HH, MÉNDEZ-MANCILLA A, GUO XY, LEGUT M, DANILOSKI Z, SANJANA NE. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide RNA design[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 722-727.
- [15] AMAN R, ALI Z, BUTT H, MAHAS A, ALJEDAANI F, KHAN MZ, DING SW, MAHFOUZ M. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 1.
- [16] LEWIS KM, KE AL. Building the class 2 CRISPR-Cas arsenal[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(3): 377-379.
- [17] ALI Z, MAHAS A, MAHFOUZ M. CRISPR/Cas13 as a tool for RNA interference[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(5): 374-378.
- [18] ZHAO X, LIU L, LANG JY, CHENG KM, WANG YW, LI XY, SHI J, WANG YL, NIE GJ. A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant KRAS for pancreatic cancer treatment[J]. *Cancer Letters*, 2018, 431: 171-181.
- [19] JIAO BL, HAO XY, LIU ZM, LIU MB, WANG JY, LIU L, LIU N, SONG R, ZHANG JX, FANG YL, XU Y. Engineering CRISPR immune systems conferring GLRaV-3 resistance in grapevine[J]. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhab023.
- [20] ZHANG N, BEWICK B, XIA GB, FURLING D, ASHIZAWA T. A CRISPR-Cas13a based strategy that tracks and degrades toxic RNA in myotonic dystrophy type 1[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 594576.
- [21] TAMBE A, EAST-SELETSKY A, KNOTT GJ, DOUDNA JA, O'CONNELL MR. RNA binding and HEPN-nuclease activation are decoupled in CRISPR-Cas13a[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(4): 1025-1036.
- [22] 韩舒婷, 马婧贤, 盛勇, 王珩瑜, 邢利, 罗晓霞, 白林泉, 邓子新, 康前进. *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> 中新结构套索肽 noncaromin 生物合成基因簇的克隆及异源表达[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 4927-4942.  
HAN ST, MA JX, SHENG Y, WANG HY, XING L, LUO XX, BAI LQ, DENG ZX, KANG QJ. Cloning and heterologous expression of the new biosynthetic gene cluster of noncaromin from *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup>[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4927-4942 (in Chinese).
- [23] SHENG Y, WANG HY, OU YX, WU YY, DING W, TAO MF, LIN SJ, DENG ZX, BAI LQ, KANG QJ. Insertion sequence transposition inactivates

- CRISPR-Cas immunity[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 4366.
- [24] KNOTT GJ, EAST-SELETSKY A, COFSKY JC, HOLTON JM, CHARLES E, O'CONNELL MR, DOUDNA JA. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24: 825-833.
- [25] OLIVERA BM, BONHOEFFER F. Replication of *Escherichia coli* requires DNA polymerase I[J]. *Nature*, 1974, 250: 513-514.
- [26] LEHMAN IR, UYEMURA DG. DNA polymerase I: essential replication enzyme[J]. *Science*, 1976, 193(4257): 963-969.
- [27] WIEDENHEFT B, ZHOU KH, JINEK M, COYLE SM, MA W, DOUDNA JA. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense[J]. *Structure*, 2009, 17(6): 904-912.
- [28] BIKARD D, EULER CW, JIANG WY, NUSSENZWEIG PM, GOLDBERG GW, DUPORTET X, FISCHETTI VA, MARRAFFINI LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 1146-1150.
- [29] ZHOU JS, LI BH, PENG CJ, WANG FF, FU ZQ, ZHOU CY, HONG D, YE F, LÜ WG, XIE X. Inhibition of cervical cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by lentiviral-vector mediated shRNA targeting the common promoter of HPV16 E6 and E7 oncogenes[J]. *Antiviral Research*, 2013, 98(2): 305-313.
- [30] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782.
- [31] MOREB EA, HOOVER B, YASEEN A, VALYASEVIN, ROECKER Z, MENACHO-MELGAR R, LYNCH MD. Managing the SOS response for enhanced CRISPR-Cas-based recombineering in *E. coli* through transient inhibition of host RecA activity[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(12): 2209-2218.
- [32] SIGUIER P, FILÉE J, CHANDLER M. Insertion sequences in prokaryotic genomes[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(5): 526-531.
- [33] FEHÉR T, CSEH B, UMENHOFFER K, KARCAGI I, PÓSFAL G. Characterization of *cycA* mutants of *Escherichia coli*. An assay for measuring *in vivo* mutation rates[J]. *Mutation Research*, 2006, 595(1/2): 184-190.