

## 研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-023

## 遗传开关的活细胞定向进化平台的建立及应用

周玉洁<sup>1,2</sup>, 易啸<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院深圳先进技术研究院, 定量合成生物学全国重点实验室, 深圳合成生物学创新研究院, 广东 深圳 518055; <sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 在合成生物学中, 转录因子作为遗传开关, 可通过模块化组合策略构建复杂的调控网络。现有工程化的基因元件种类有限, 因此建立高效的遗传开关定向进化平台对于基因线路设计和代谢通路优化具有重要价值。本研究整合 TADR 活细胞定向进化系统和基于半乳糖磷酸激酶 GalK 及绿色荧光蛋白 GFP 的双重正负筛选系统, 构建了优化遗传开关的实验平台。通过转录因子 TetR 的进化实验验证了该平台的有效性, 并成功将转录因子 AcuR 从阻遏模式反转为激活模式 (AcuR-OFF)。AcuR-OFF 蛋白的开关性能与野生型类似。相较于常用的易错 PCR 技术, TADR 构建突变文库成本更为低廉, 突变规模多样性更高。双重正负筛选系统极大降低了假阳性率, 在目标种群丰度低的极端情况下仍然具有高效筛选能力。该实验平台有望成为遗传开关开发与优化的有力工具。

**关键词:** 活细胞定向进化; 正负筛选; 遗传开关; 转录因子; 大肠杆菌

中图分类号: Q819 文献标志码: A

## Engineering an *in vivo* directed evolution system for developing genetic switches

ZHOU Yujie<sup>1,2</sup>, YI Xiao<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Quantitative Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China; <sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

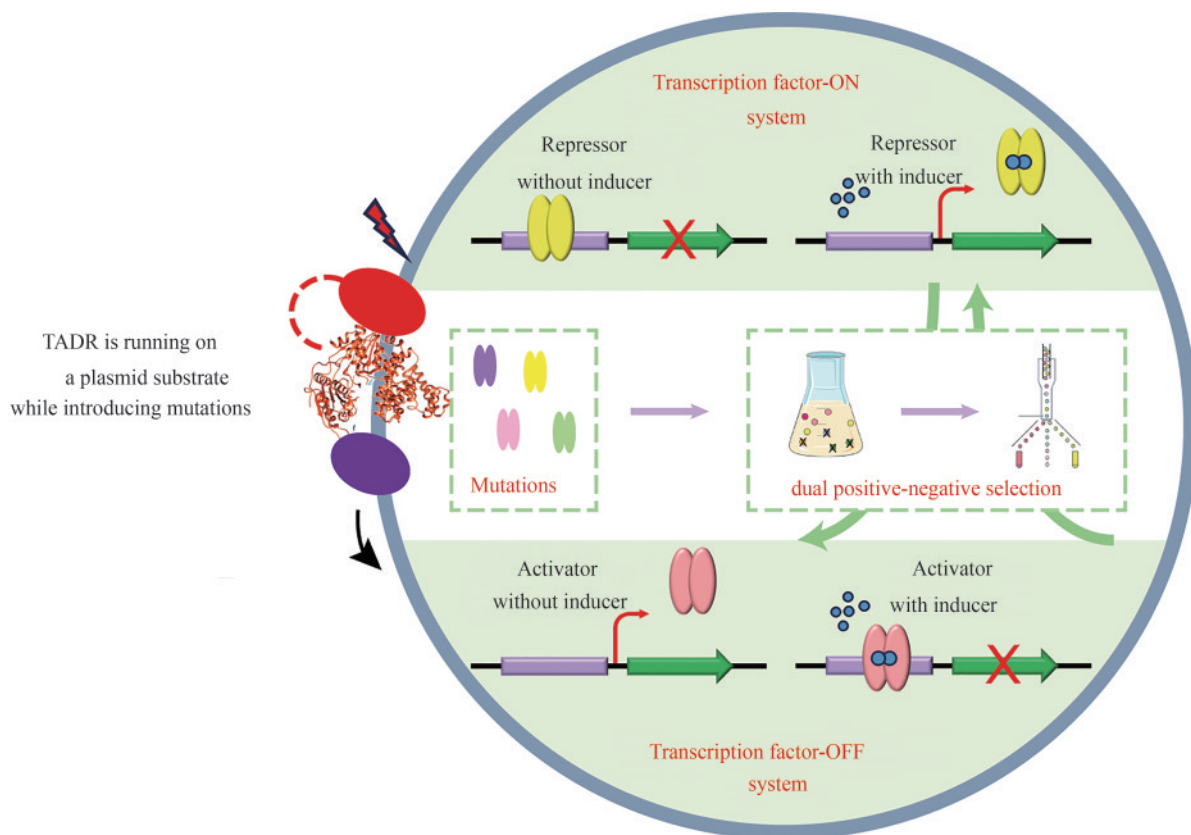
**Abstract:** Transcription factors, as genetic switches, are used in synthetic biology to construct complex regulatory networks through modular combinations. Transcription factors are classified by two groups, repressors and activators. Repressors bind DNA and repress the expression level of downstream genes without inducers but will dissociate from DNA in the presence of inducers. The regulation type of repressor is called ON system, whereas activators bind DNA only after induced. The regulation type of activator is called OFF system. The goals to optimize transcription factors include identifying new substrates, enhancing sensitivity, adjusting dynamic range, and modifying regulation types.

收稿日期: 2025-03-24 修回日期: 2025-04-23

引用本文: 周玉洁, 易啸. 遗传开关的活细胞定向进化平台的建立及应用[J]. 合成生物学, 2025, 6(6): 1421-1434

Citation: ZHOU Yujie, YI Xiao. Engineering an *in vivo* directed evolution system for developing genetic switches[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(6): 1421-1434

However, current types of engineered genetic elements are limited. Consequently, establishing an efficient platform of directed evolution for developing genetic switches is important for the design of genetic circuits and the optimization of metabolic pathways. In this study, we integrated *in vivo* directed evolution system of TADR (Targeted Artificial DNA Replisome) with a dual positive-negative selection system based on galactose kinase (GalK) and green fluorescent protein (GFP) to develop an experimental platform for optimizing genetic switches. The effectiveness of this platform was validated through experiments with transcription factor TetR. We successfully converted TetR from a repressor to an activator. In addition, we also converted transcription factor AcuR from a repressor to an activator (AcuR-OFF) which has not been reported before. The response of AcuR-OFF mutants to inducer is opposite to that of the wild type, but with similar dynamic range. Compared with the commonly used error-prone PCR technique, TADR is more affordable for construction of mutants library with higher genetic diversity. The dual positive-negative selection system greatly reduces the rate of false positives, and is able to screen in extreme cases where abundance of the target mutants within the population is low. This experimental platform is expected to be a powerful tool for the development and optimization of genetic switches, thereby advancing the research in synthetic biology.



**Keywords:** *in vivo* directed evolution; positive-negative selection; genetic switches; transcription factors; *Escherichia coli*

转录因子在调控基因功能模块和优化代谢网络拓扑结构中发挥关键作用，因此成为遗传开关这一合成生物学核心元件的主要来源。使用定向

进化技术开发遗传开关，可系统扩展遗传开关元件库的多样性与可编程性，以提升细胞选择与执行复杂行为的能力<sup>[1]</sup>。要实现转录因子的定向

进化, 需要实现两个高效步骤: 第一步需要构建大规模高质量的突变文库; 第二步需要开发适配的筛选策略以实现高通量筛选。

目前已经开发了许多突变工具, 针对不同的宿主, 采用不同的机制进行靶蛋白的突变<sup>[2-15]</sup>。根据建库方式可以分为体外建库和体内建库两类。易错PCR突变是实验室内常用的体外建库突变工具, 利用易出错的DNA聚合酶, 使得错误碱基以一定的频率随机掺入到扩增的基因中, 得到具有丰富遗传多样性的突变体文库<sup>[16-17]</sup>。TADR突变系统(target artificial DNA replisome)是一种活细胞体内建库的定向进化技术, 它由三个部分组成: CisA切口酶、Rep解旋酶和T5易错DNA聚合酶[图1(a)]<sup>[15]</sup>。CisA切口酶识别起始序列(30 bp)后, 切断DNA单链, 而后招募Rep解旋酶-T5易错DNA聚合酶形成复合物, 并以完整的DNA单链为模板进行新链的合成, 在合成过程中随机引入突变。当复合物遇到终止序列(30 bp)时, 聚合反应终止, 复合物从DNA上解离[图1(b)]。相较于传统的定向进化, TADR系统转化至宿主后, 即可伴随着宿主的细胞分裂自动进行多轮突变积累, 通过指数增长的复制周期(20~30 min/代)实现了突变库的几何级数扩展。即TADR系统可随着细菌的生长迭代不断累积突变, 进一步扩大突变库的规模。

转录因子的筛选系统需要正向筛选(诱导剂出现时有基因表达)和负向筛选(诱导剂缺失时无基因表达)交替的筛选策略。满足上述要求的标记系统可分为两种类型: 一类是单分子正负筛选标记体系<sup>[18-23]</sup>(即单个蛋白兼具筛选“开”“关”两种状态的能力); 一类为双分子正负筛选标记体系<sup>[24]</sup>(即两个蛋白协作, 一个作为正向筛选标记, 一个作为负向筛选标记)。在筛选实验中, 负向筛选往往容易产生大量假阳性, 选择两个单分子正负筛选系统联用(双重正负筛选), 能够更有效地控制假阳性对实验的干扰。单分子正负筛选标记体系的典型代表是荧光蛋白家族, 将荧光蛋白与调控序列偶联, 通过荧光强度的强弱变化来反映调控的开关状态。Umeno团队<sup>[18, 25]</sup>开发的BetI阻遏蛋白定向进化平台(Bet-ON/Bet-OFF系统), 通过GFP荧光强度变化实时监测大肠杆菌中BetI的

DNA结合状态。另一种经典的正负筛选标记是TetA蛋白。*tetA*基因编码了四环素外排泵, 可以使细菌获得四环素抗性(正向筛选), 同时也会使细胞更容易受到氯化镍毒性的影响致死(负向筛选)<sup>[20-22]</sup>。GalK也是一种常用的正负筛选标记[图1(c)], 其原理是通过GalK催化半乳糖(galactose, Gal)和脱氧半乳糖(2-deoxy-galactose, DOG)使其磷酸化, 在半乳糖为唯一碳源的培养基中, 只有*galK*基因表达, 细菌才能利用半乳糖生存(正向筛选), 反之则不能。而培养基中添加脱氧半乳糖时, 若*galK*基因表达, GalK将脱氧半乳糖磷酸化, 生成有毒物质, 导致细胞死亡(负向筛选); 相反若*galK*基因不表达, 脱氧半乳糖本身对细菌没有毒性, 则细菌可以生存。因此, 可以通过控制培养基物质成分来达到GalK正负筛选的目的<sup>[23, 26]</sup>。

转录因子的优化目标包括识别新底物、提升灵敏度、调整动态范围和改变调控模式。依据转录因子的类别, 可以将调控模式分为ON模式和OFF模式两类。ON模式是指无诱导剂时阻遏蛋白结合在DNA上, 阻遏下游基因的表达; 而添加诱导剂时, 阻遏蛋白与诱导剂结合, 解除对下游基因的抑制。OFF模式是指无诱导剂时激活蛋白不与DNA结合, 下游基因表达; 当添加诱导剂时, 激活蛋白与诱导剂结合, 阻遏下游基因的表达。不同应用场景对遗传开关的调控模式有不同需求, 当靶标基因需要长时间严格关闭、偶尔表达时, 更适合阻遏蛋白进行调控, 如在代谢物生物传感器中, 只有在代谢物存在时才启动报告基因表达, 无代谢物时, 报告基因不表达<sup>[27-28]</sup>。当靶标基因需要长时间表达、偶尔关闭时, 更适合激活蛋白进行调控, 如在微生物发酵中, 细胞生长与产物合成阶段需要动态调控代谢流, 在诱导后关闭生长相关基因, 将资源转向产物合成<sup>[29]</sup>。将TetR(阻遏蛋白)开发为TetR-ON和TetR-OFF系统, BetI(阻遏蛋白)开发为Bet-ON和Bet-OFF系统, 以实现对不同基因的精准调控<sup>[18, 25, 30-31]</sup>。

目前具备两种调控模式的遗传开关数量有限, 无法满足对复杂调控网络设计的需求。因此, 本研究选择TADR活细胞体内定向进化技术进行建库, 利用GFP-GalK双重标记进行筛选, 构建大肠

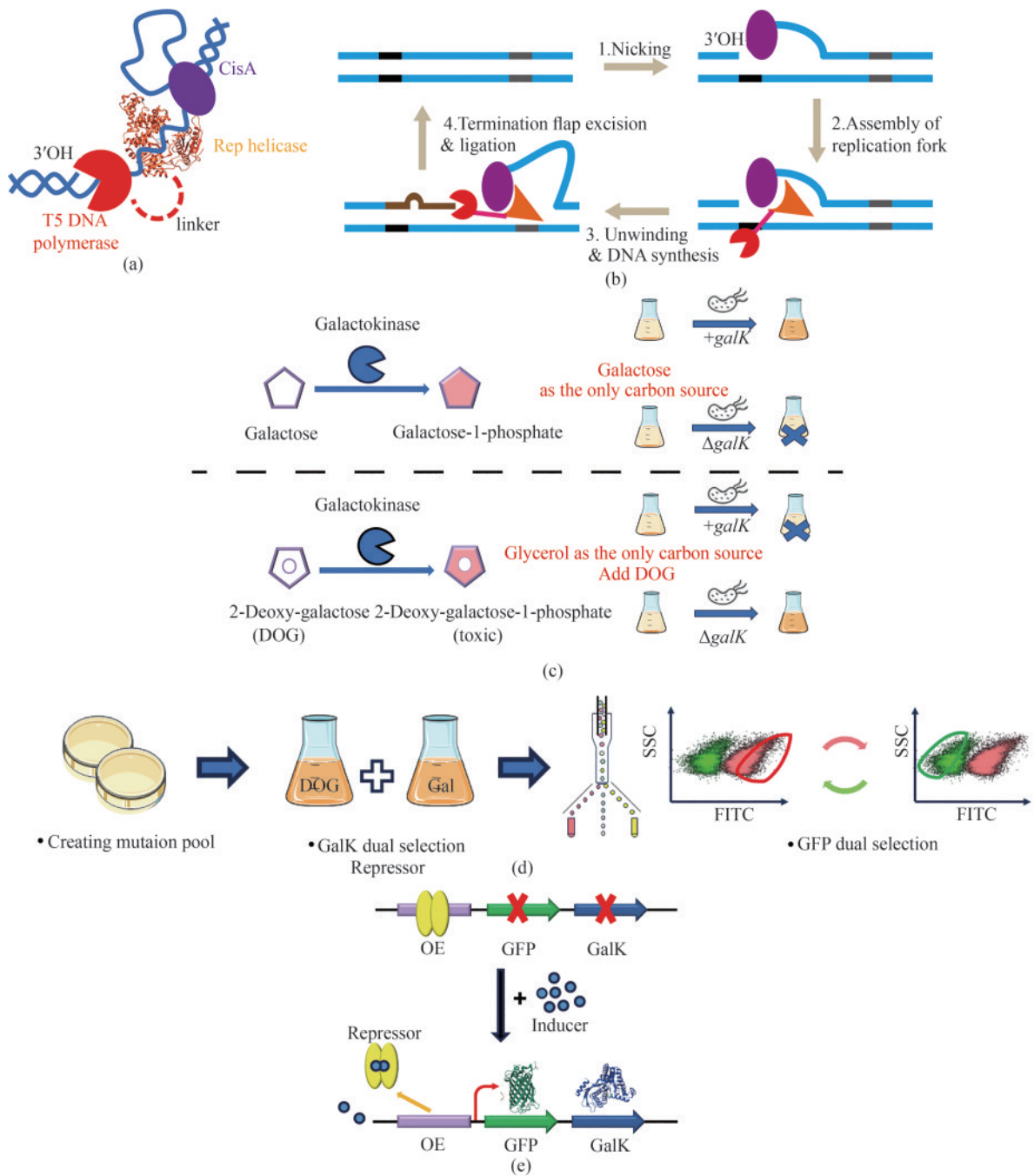


图1 搭建定向进化实验平台

(a) TADR系统的组成元件；(b) TADR系统引入突变的过程，黑色和灰色片段分别为起始和终止序列；(c) GalK正负筛选标记的工作原理；(d) TADR-GalK-GFP实验平台的工作流程；(e) 以阻遏蛋白为例，筛选系统GFP-GalK的表达受阻遏蛋白调控，通过改变诱导条件实现正向和负向筛选

Fig.1 Construction of the directed evolution experimental platform

(a) Components of the TADR system; (b) The process of introducing mutations by the TADR system, the black and gray segments represent the initiation and termination; (c) The working principle of the positive and negative screening markers of GalK; (d) The working process of the TADR-GalK-GFP experimental platform; (e) Taking the repressor protein as an example, in the screening system, the expression of GFP-GalK is regulated by the repressor protein, and positive and negative screening are achieved by changing the induction conditions

杆菌活细胞内的遗传开关定向进化平台，为拓展合成生物学元件库提供新的工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料与设备

实验所用 MG1655 $\Delta$ rep 菌株、TADR 质粒、pETcoco 质粒均从实验室获得。Trans1-T1 克隆感受态细胞从全式金公司购买，所用片段由迪赢公司合成，引物由擎科公司合成。其他实验材料：LB 和 MOPS 培养基（细菌培养）；天根质粒小提试剂盒（提取质粒）；Omega 胶回收试剂盒（回收 DNA 片段）；全式金 Gibson Assembly 试剂盒（构建质粒）；诺唯赞 PCR 试剂盒（PCR 扩增）；安捷伦随机突变试剂盒（易错 PCR 化学建库）。实验主要使用的设备有贝克曼 CytoFlex SRT 流式细胞仪及安捷伦 Biotek Synergy H1 酶标仪等。

实验中主要使用了 LB 培养基和 MOPS 培养基两种。LB 液体培养基配制方法为：取 LB 肉汤 21 g（或者 LB 肉汤不含糖 20 g），加入去离子水 1 L，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装三角瓶，121 °C 灭菌 15 min。LB 固体培养基配制方法为：取 LB 琼脂 36 g（或者 LB 琼脂不含糖 35 g），加入去离子水 1 L，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装三角瓶，121 °C 灭菌 5 min。本研究使用了 Rich MOPS 和 Minimal MOPS 两种培养基，并对其成分进行调整。选择了 10 种氨基酸作为添加物，包括亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸和苏氨酸。分别称取各类氨基酸 2 g，共计 20 g，溶于 100 mL 蒸馏水中，使用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌。使用时按照 1:100 的比例加入。配制 Rich MOPS 培养基时，按照 1:100 加入 10 $\times$  MOPS 母液、1:1000 加入 0.132 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液、1:100 加入碳源（20% 葡萄糖或 50% 甘油）、1:100 加入氨基酸混合液，补加无菌水至所需体积。Minimal MOPS 培养基中不添加氨基酸，其余与 Rich MOPS 成分相同。

此外，实验中涉及的所有核糖体结合序列（ribosome binding site, RBS）序列见表 1。使用 RBS Calculator 预测启动子和 RBS 序列的表达强

度，RBS Calculator 的网址为：[https://www.denovodna.com/software/predict\\_rbs\\_calculator](https://www.denovodna.com/software/predict_rbs_calculator)。

表 1 实验使用的 RBS 序列

Table 1 The RBS sequence used in the experiment

RBS 名称 RBS name	RBS 序列 RBS sequence
RBS1	TCGAGGT
RBS2	TCCTGGT
RBS4	AGGAGGT
RBS5	GAGGAGG
RBS28	CTCGTGA
RBS166	TCCTGGA
RBS1036	TCCAGGA

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 同源重组

制备 MG1655 $\Delta$ rep 电转感受态，电转 pKD46 质粒，制备含有 pKD46 质粒的感受态。准备不少于 500 ng 的融合片段，电转进含有 pKD46 的感受态细胞中，在 30 °C 下孵育 2 h（也可适当延伸至 3 h 左右），获得含有目标片段的底盘细胞。本实验中需要完成两次同源重组，一次将卡那抗性片段取代基因组中的 *galK* 基因，完成后，再同源重组含有调控序列和筛选标记的片段，获得实验底盘细胞。将底盘细胞传代去除 PKD46 质粒后，挑取单克隆至 1 mL 培养基中摇菌。37 °C 培养 12 h 后，取 500  $\mu$ L 菌液与等体积的 50% 甘油混合，放置于 -80 °C 下进行保菌，其余菌液用于制备感受态，便于后续实验。

#### 1.2.2 质粒构建

目的片段可以从已有的基因片段中扩增片段，或直接送由公司合成，质粒骨架可从实验室中已有的质粒骨架上扩增，在设计引物时应注意片段与骨架之间的接口处有 30 bp 左右的重叠片段，以进行正确组装。片段长度在 25 bp 以上，能够确保重叠片段的退火温度在 50 °C 左右。将扩增好的片段及质粒骨架回收后，进行定量操作。依据 Gibson Assembly 说明书，在 PCR 仪下 50 °C 反应 15 min（若需要提高效率，可延长反应时间），化转构建质粒。测序验证成功后，扩培菌液进行质粒的提取，用于后续实验。

### 1.2.3 TADR 突变建库

由 TADR 的作用机理可知, 将目标基因构建在含有起始 30 bp 序列后, TADR 系统便可以实现对目标序列的随机突变。本实验所用的 TADR 版本为质粒版本, 其表达受阿拉伯糖操纵子调控, 因此可以通过控制阿拉伯糖 (arabinose, Ara) 的添加与否来调控 TADR 表达。将含有调控系统的细胞制备感受态后, 电转入 TADR 质粒, 涂布在 LB/Ara 的抗性平板上, 即可突变建库。细菌在平板上生长至肉眼可见大小, 约传代 20 次。洗板稀释后, 重新涂布在 LB/Ara 平板中, 即可实现细菌的迭代突变。共进行 3 次平板传递, 细菌突变传代约 60 次, 获得规模较大的突变库。在后续筛选实验中, 需添加葡萄糖作为碳源, 抑制 TADR 蛋白的表达, 减少突变对筛选结果的干扰。

### 1.2.4 筛选表征方法

取不同实验组, 在酶标仪下培养至平台期, 检测吸光度和荧光强度。利用生长曲线计算各组的生长速度检验系统响应 GalK 筛选情况, 计算荧光值与吸光度值的比值, 即群体平均荧光强度 (记为  $M$ ), 检验系统表达 GFP 情况。计算诱导前后种群平均荧光强度的差值 ( $\Delta M$ ), 差值最大的点则表明此时诱导效果最好, 可借助该点确定细菌的最佳诱导状态。将细菌培养至目标状态后, 取 10  $\mu\text{L}$  菌液混入 200  $\mu\text{L}$  PBS 溶液中, 用流式细胞仪测定 FITC 值, 查看诱导效果, 通过以上步骤优化调控系统。

建库后, 将平板上的菌液洗下, 培养细菌至对数期 (由  $\Delta M$  确定最佳  $\text{OD}_{600}$  区间), 先进行 GalK 筛选 (DOG 负筛与 Gal 正筛), 通过液体筛选富集目标表型, 再进行荧光筛选 (GFP 表达与不表达)。

## 2 结果

TADR-GalK-GFP 活细胞定向进化平台由两部分组成, TADR 活细胞体内定向进化技术用于大规模建库, GFP-GalK 双重标记系统用于高通量筛选 [图 1(d)]。TADR 的工作机制由 3 个步骤组成: 靶向识别、解链延伸和易错修复。因此, 在质粒上将目标片段 (转录因子基因) 整合在识别序列的

下游, 可在活细胞内实现靶向区域的持续突变, 随着细菌的生长迭代建立突变库。在染色体上 GFP-GalK 双重标记筛选系统由转录因子对应的诱导型启动子表达 [图 1(e)]。这种设计使 GFP、GalK 的表达与转录因子的调控相关联, 从而通过诱导条件的变化实现对目标突变子的高通量筛选。

为确保该平台的有效运行和高效筛选, 搭建进化平台时, 需对各组分 (转录因子、GFP、GalK) 的表达水平及调控系统的诱导条件 (诱导剂浓度、培养条件) 进行优化。

### 2.1 以 TetR 为例进行平台可行性验证

TetR 为阻遏蛋白, 受四环素及类似物诱导, 调控 *tetA* 的表达。实验室常使用去水四环素 (anhydrotetracycline, aTc) 作为 TetR 的诱导剂。无诱导剂时, TetR 结合在两个 OE 序列上, 抑制 *tetA* 与 *tetR* 的过量表达<sup>[31-34]</sup>。当环境中添加诱导剂时, TetR 可识别该配体, 结合配体后的 TetR 对 DNA 的亲和力降低, 从 DNA 上解离下来, 解除对 *tetA* 基因表达的抑制。*tetA* 基因编码外排泵蛋白, 负责在细胞膜上逆向转运金属离子和四环素, 将四环素及其类似物排出胞外。TetR 是一个非常严谨的开关, 响应快且泄露表达低, 已被工程化为 “Tet-ON” “Tet-OFF” 系统用于调控基因表达, 在细菌、酵母、哺乳动物细胞等多宿主中广泛应用<sup>[35-38]</sup>。

因此, 本实验平台以 TetR 为例, 进行调控模式逆转进化实验, 验证平台的可行性。

#### 2.1.1 搭建 TetR 的 TADR-GalK-GFP 进化平台

将 TetR 阻遏蛋白构建在 pETcoco 单拷贝质粒上, 以实现表型与基因型的对应。将 *tetO* 序列与筛选标记 GalK-GFP 同源重组至底盘细胞中, 用于调控蛋白的筛选。其中, TetR 阻遏蛋白的表达量、诱导剂的使用浓度以及筛选标记系统的表达水平都会影响最终的筛选效果。设置不同表达水平的 TetR 阻遏蛋白, 见表 2, 并使用 0 ng/ $\mu\text{L}$ 、20 ng/ $\mu\text{L}$ 、50 ng/ $\mu\text{L}$ 、100 ng/ $\mu\text{L}$  aTc 诱导 TetR 解离, 通过比较各组的荧光强度和分布, 判断最优表达强度。

以 50 ng/ $\mu\text{L}$  aTc 为预实验诱导条件, 设置底盘细胞 *PL-tetO-GFP* 的核糖体表达强度为 RBS4, 检

表2 多个启动子及RBS序列预测强度

Table 2 Prediction strength of multiple promoter and RBS sequences

启动子-RBS组合 Promoter-RBS groups	启动子预测强度 Promoter strength	RBS 预测强度 RBS strength
<i>Pbla</i> -RBS1	2000	3000
<i>Pbla</i> -RBS2	2000	500
<i>Ptac</i> -RBS1	16000	3000
<i>Ptac</i> -RBS2	16000	500

测各组生长曲线及荧光强度曲线。计算诱导前后种群平均荧光强度  $M$  及差值比 [图2(a)]。纵轴表示细菌在相同时刻下诱导前后的荧光差异，曲线最高点表明此时荧光差异最大，蛋白开关效果最好，依据该点确定种群诱导最佳状态 ( $OD_{600}$  为 0.4~0.6)。分别测定 MG1655 (不含 GFP) 和底盘细胞 *PL-tetO*-GFP (记为 TetO) 的荧光强度，将前者作为负对照，以后者 TetO 为正对照。若 TetR 转化后，不添加诱导剂时荧光强度更趋近于负对照，则表明 TetR 阻遏效果更好；添加诱导剂后荧光强度更趋近于正对照，则表明诱导 TetR 解离效果更好。选择 *Ptac*-TetR 两组进行诱导浓度优化预实验，分别在 0 ng/ $\mu$ L、20 ng/ $\mu$ L、50 ng/ $\mu$ L、100 ng/ $\mu$ L aTc 诱导浓度下培养，待  $OD_{600}$  为 0.4~0.6 时，使用流式细胞仪分析，绘得响应曲线 [图2(b)]。随着诱导浓度的提升，荧光强度逐渐升高。在 50 ng/ $\mu$ L aTc 诱导浓度下，细菌荧光强度较高，与不诱导组 (0 ng/ $\mu$ L aTc) 相比，两个荧光种群分布分离明显 [图2(c)]，因此可使用 50 ng/ $\mu$ L aTc 用于筛选开关两种表型。

经预实验后，可知最佳诱导状态为  $OD_{600}$  处于 0.4~0.6 区间，诱导条件为 50 ng/ $\mu$ L aTc，对各实验组 TetR 进行荧光强度表征，并与 MG1655 (负对照)、TetO (正对照) 比较。若未诱导时荧光强度更接近 MG1655，诱导时荧光强度更接近 TetO，则表明该组蛋白开关调控效果更好。开关调控效果最好的 TetR 为 *Pbla*-RBS1 一组 [图2(d)]。

使用卡那抗性基因敲除大肠杆菌中的 *galK* 基因，使用 *PL-tetO* 启动子控制 GFP 及 GalK 的表达。使用 RBS Calculator 预测表达强度，设置不同的 RBS 以优化表征水平 (GalK 设置为 RBS28、RBS166、RBS1036，表达强度依次增高)。

将上述3组实验组分别培养在 MOPS/Gal 培养

基和 MOPS/Gly/DOG 培养基中，测定生长曲线。使用 MG1655 (含 *galK* 基因) 与 MG1655 $\Delta$ *galK* (敲除 *galK* 基因) 两组菌株验证 GalK 筛选标记的有效性。MG1655 (含 *galK* 基因) 只在半乳糖条件下生长，在 DOG 添加后几乎不生长，MG1655 $\Delta$ *galK* (敲除 *galK* 基因) 生长情况与 MG1655 相反，这表明 GalK 筛选标记具有良好的正负筛选效果 [图2(e)]。使用 *Pbla*-RBS1\_TetR 调控优化 GalK 表达强度，GalK 的表达强度为 RBS1036 时，可以实现较好的筛选响应 [图2(f)]。

综上所述，调控序列 *PL-tetO* 下游整合 RBS4\_GFP 和 RBS1036\_GalK，使用终浓度为 50 ng/ $\mu$ L aTc，培养细菌至  $OD_{600}$  处于 0.4~0.6 时，*Pbla*-RBS1\_TetR 响应开关效果最好，可用于定向进化实验。

### 2.1.2 以 TetR(B) 为起点进化 TetR-OFF 系统

#### (1) 突变文库构建

依次将 *Pbla*-RBS1\_TetR (B) 质粒、TADR 质粒转化进 *PL-tetO*-GFP-GalK 底盘细胞，涂在含 0.01% Ara 的平板上。待生长至肉眼可见单克隆后，洗板稀释菌液，涂在含 0.01% Ara 的平板中继续传代，重复一次后，获得最终用于筛选的突变库。

同期使用易错 PCR 对 TetR (B) 随机建库，以检验 TADR 建库的效果。将构建好的突变文库质粒转化进 *PL-tetO*-GFP-GalK 底盘细胞中，用于后续筛选。

#### (2) 高通量筛选

TetR (B) 与 TetR-OFF 系统的调控方向相反。野生型 TetR (B) 在添加诱导剂后解除对下游基因的阻遏，表现为“ON”，而 TetR-OFF 为反转表型 (Rev)，添加诱导剂后阻遏下游基因的表达，表现为“OFF” [图3(a)]。利用 TetR-OFF 系统对诱导

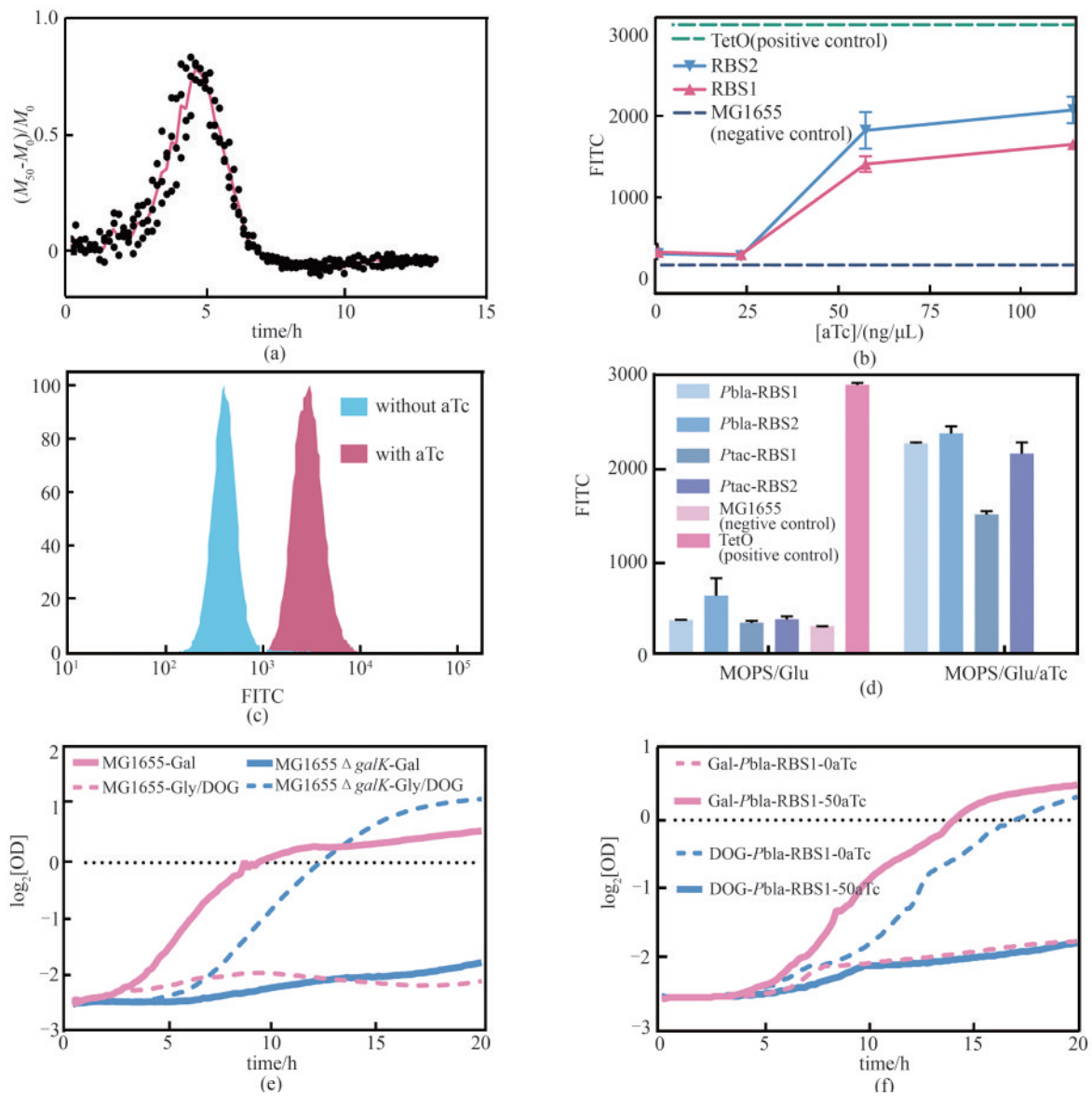


图2 TetR 进化实验平台搭建

(a) 酶标仪测定的荧光强度与吸光度值计算可得群体平均荧光强度，记为  $M$ ，比较诱导前后  $M$  的差值以反映阻遏蛋白的调控状态；(b) TetR 对 aTc 诱导剂的响应曲线，诱导剂浓度分别为 0 ng/ $\mu$ L、20 ng/ $\mu$ L、50 ng/ $\mu$ L、100 ng/ $\mu$ L，虚线表示两组对照，TetO 组为 *PL-tetO*-GFP 底盘细胞（GFP 为组成型表达），MG1655 组不含 GFP，两组分别代表了该系统中荧光表达强度的上限及下限；(c) 诱导浓度为 50 ng/ $\mu$ L 时，诱导前后的群体荧光分布；(d) 不同表达强度的 TetR 蛋白诱导前后的荧光强度变化，以及与对照组荧光强度的比较；(e) 使用 MG1655（含 *galK*）与 MG1655 $\Delta galK$  两种菌株验证 GalK 的正负筛选性能；(f) *Pbla*-RBS1-TetR 对 GalK 正负筛选的响应

Fig. 2 Construction of the TetR evolution experimental platform

(a) The average fluorescence intensity of the population, denoted as  $M$ , can be calculated from the fluorescence intensity and absorbance value measured by the microplate reader. Compare the difference of  $M$  before and after induction to reflect the regulatory state of the repressor protein; (b) The response curve of TetR to the aTc inducer, with the inducer concentrations being 0 ng/ $\mu$ L, 20 ng/ $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L, and 100 ng/ $\mu$ L respectively. The dashed lines represent the two control groups. The TetO group consists of *PL-tetO*-GFP chassis cells, in which GFP is expressed constitutively. The MG1655 group, by contrast, lacks GFP. These two groups represent the upper and lower limits of fluorescence expression intensity within this system, respectively; (c) When the induction concentration is 50 ng/ $\mu$ L, the population fluorescence distribution before and after induction; (d) The variations in fluorescence intensity before and after the induction of TetR proteins with different expression levels, as well as the comparison of these fluorescence intensities with those of the control groups; (e) Strains, MG1655 (containing *galK*) and MG1655 $\Delta galK$  were used to verify the positive and negative screening performance of GalK; (f) The response of *Pbla*-RBS1-TetR to the positive and negative screening of GalK

剂的响应情况，确定筛选表型与诱导剂添加之间的关系。

①GalK-GFP筛选 将细菌在MOPS/Gly/aTc培养基中培养至OD<sub>600</sub>处于0.4~0.6，按1:100转接至MOPS/Gly/aTc/DOG的培养基中进行负筛。培养至平台期后，1:100接种至MOPS/Gly中（培养基中不添加诱导剂），培养至OD<sub>600</sub>处于0.4~0.6，1:100转接至MOPS/Gal进行正筛。培养至平台期

后，1:100转接至MOPS/Glu中进行培养，而后使用流式分选仪进行荧光筛选。第1轮不添加诱导剂，则逆转表型为亮（正筛）。分选10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>个细菌后，添加诱导剂培养，第2轮筛选逆转表型为不亮（负筛），分选细菌后用于第3轮正筛。GalK标记正负筛选1轮，荧光正负筛选2轮后，富集逆转表型 [图3(b)]。

②GFP筛选 将细菌在MOPS/Glu培养至

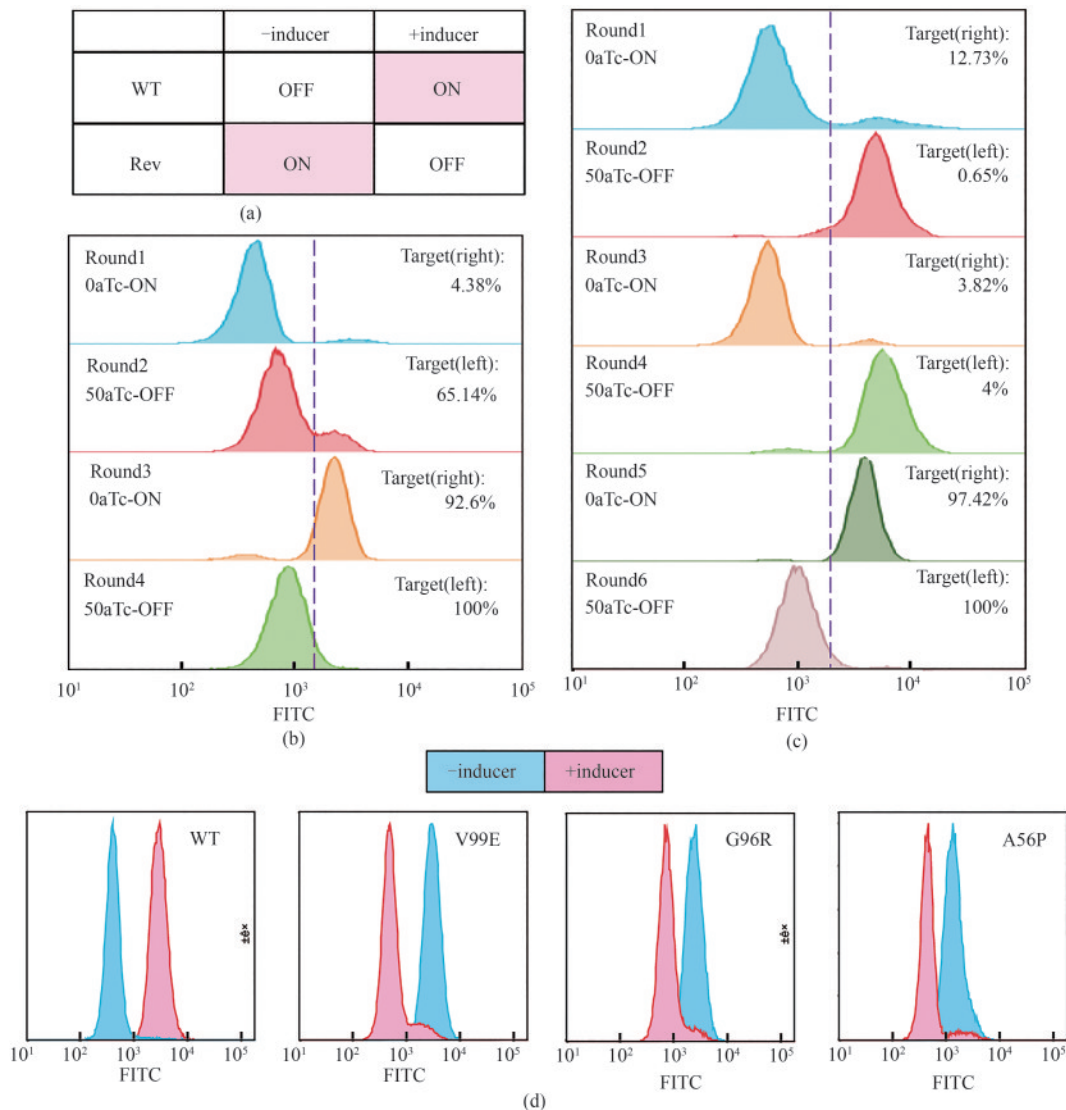


图3 筛选 TetR-OFF 系统

(a) TetR 野生型与反转表型对诱导剂的响应；(b) 使用 GalK-GFP 双正负筛的筛选过程；(c) 仅使用 GFP 作为筛选标记的筛选过程；(d) 对野生型及 TetR-OFF 突变子的调控性能表征，蓝色为没有诱导剂时的群体荧光分布，红色为 50 ng/μL aTc 诱导后的群体荧光分布

Fig.3 Screening of the TetR-OFF system

(a) The response of the wild-type TetR and the reversed phenotype to the inducer; (b) The screening process using the GalK-GFP dual positive and negative screening; (c) The screening process using only GFP as the screening marker;(d) Characterization of the regulatory performance of the wild-type and TetR-OFF mutants. The blue represents the population fluorescence distribution without the inducer, and the red represents the population fluorescence distribution after induction with 50 ng/μL aTc.

OD<sub>600</sub>处于0.4~0.6, 直接进行荧光筛选, 培养基中不加诱导剂, 则逆转表型应为亮(正筛)。分选10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>个细胞后, 添加诱导剂诱导培养筛选逆转表型为不亮的种群(负筛), 继续分选细胞, 用于下一轮正筛。正负筛选交替6轮后成功富集逆转表型[图3(c)]。

提取突变子质粒, 重新转化入新的底盘细胞, 对其功能进行验证, 实验结果表明突变子仍为逆转表型。在GalK-GFP联用筛选系统中, 使用TADR组获得了2个单点突变(V99E、G96R), 易错PCR组获得了3个单点突变(A56P、V99E、G96R)[图3(d)]。而在单一GFP筛选系统中, 两组突变仅获得了V99E突变子。该实验验证了TADR-GalK-GFP平台进化遗传开关的可行性, 同时表明GalK-GFP联用筛选系统能有效提高筛选效率。相较于单一GFP筛选, GalK-GFP联用筛选方式荧光筛选轮数更少, 最终获取的突变子数量更多。

### 2.1.3 以revTetR(BD)为起点进化TetR-ON系统

revTetR(BD)由TetR(BD)突变而来, 表型与野生型相反, 没有诱导剂时不与DNA结合, 当环境中添加诱导剂时才与DNA结合阻遏<sup>[39]</sup>。因此, TetR(BD)表现为ON调控模式, revTetR(BD)则表现为OFF调控模式。本研究将revTetR(BD)改造为ON模式以验证实验平台的可行性。由于TetR(B)与revTetR(BD)极为相似, 因此可基于已优化的实验参数进行实验。从前人报道的revTetR(BD)中选择了多点突变子(N18Y、V20D、I22T、L60S)为进化起点, 使用TADR和易错PCR两种方式对revTetR(BD)进行建库, 成功富集了目标表型, 筛选结果见表3。

起点revTetR(BD)中含有4个点突变使表型从ON模式进化为OFF模式, 而从OFF模式进化为ON模式实验中, 测序结果显示仅有少数位点对调

控模式反转起到关键作用。相较于易错PCR, TADR系统不仅能获得多点突变的组合, 还揭示了22位点具有单点突变逆转表型的能力。这表明, TADR系统在细胞迭代建库的过程中, 积累了更多的突变类型, 能更精确地捕捉突变与表型变化的因果关系。

## 2.2 基于AcuR阻遏蛋白开发AcuR-OFF新元件

AcuR阻遏蛋白属于TetR家族, 在*Rhodobacter sphaeroides*菌中调控下游两个基因的表达: 一个是*acul*基因, 该基因属于锌依赖性氧化还原酶; 另一个是*dddL*基因, 是一种二甲基磺酰基丙酸酯(DMSP)的裂解酶, 可以将DMSP分解代谢为丙烯酸酯。而丙烯酸酯可以诱导AcuR与DNA解离, 从而调节DMSP的分解代谢<sup>[40]</sup>。AcuR与大肠杆菌中的AcrR具有很高的相似性, 该蛋白在大肠杆菌中负责多耐药外排泵AcrABC的表达<sup>[41-42]</sup>。

AcuR转录因子在大肠杆菌底盘中的异源表达体系已被成功实现并成功功能验证, 其野生型蛋白作为核心元件构建了AcuR-ON诱导型调控系统<sup>[43-45]</sup>。本研究拟基于搭建的实验平台, 逆向开发AcuR-OFF系统, 填补了AcuR调控元件在抑制型工具领域的空白, 为构建多维度可编程的基因线路提供全新范式。

### 2.2.1 搭建AcuR的TADR-GalK/GFP进化平台

使用RBS Calculator对*PL-acuO*启动子的表达强度进行预测, 分别设置两组不同强度的RBS: RBS4(AGGAGGT)和RBS5(GAGGAGG)。以TetO组作为正对照, MG1655组作为负对照, 荧光信号越强表明AcuR诱导后的荧光强度更高, 相较于未诱导组的荧光强度差距更大, 更有利于区分AcuR的开关效果。测定荧光表达强度如图4(a)所示, AcuO-

表3 revTetR进化为TetR-ON的突变位点

Table 3 The mutation sites where revTetR evolved into TetR-ON

突变工具 Mutation tool	组别 Groups		位点突变 Mutation sites				
	WT		N18Y	V20D	I22T	L60 S	Others
易错 PCR	1		18N	20V	22I	60 L	R28H, T202A
	2		18N	20V	22I		
TADR	3		18N	20V	22I		Y93C, D95E
	4				22I		

RBS4组荧光信号较低，AcuO-RBS5组荧光信号更强，因此选择RBS5序列的实验组用于后续实验。

将AcuR构建至pETcoco质粒上，设置不同表达强度的AcuR质粒（*Pbla*-RBS1、*Ptac*-RBS1），设置丙烯酸钠盐（sodium acrylate, Acr）浓度为0 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L，待生长至 $OD_{600}$ 处于0.4~0.6时，测定FITC值 [图4(b)]。比较各组诱导前后荧光强度及分布，确定使用3 mmol/L丙烯酸酯钠诱导*Ptac*-RBS1\_AcuR用于后续进化实验。

### 2.2.2 AcuR突变进化实验

依次将*Ptac*\_RBS1\_AcuR质粒、TADR质粒转化进*PL-acuO*-GFP-GalK底盘细胞，涂在含0.01%

Ara的平板上。待生长至肉眼可见单克隆后，洗板稀释菌液，涂在含0.01% Ara的平板中继续传代，重复一次后，获得最终用于筛选的突变库。将细菌在MOPS/Glu培养至 $OD_{600}$ 处于0.4~0.6，使用流式细胞仪分析荧光表型分布，发现目标表型在种群中占比较低，仅占0.14%。

将突变库进行GalK生长筛选2轮后，使用流式细胞仪分析荧光表型分布，发现目标表型比例增加至10%，大大降低了荧光筛选的难度 [图4(c)]。最终成功获得了AcuR-OFF突变子V127I-G128D。提取该突变子质粒后，重新转化入新的底盘细胞，对其功能进行验证。结果表明该突变子仍为逆转表型，且诱导前后的荧光分布几乎没有

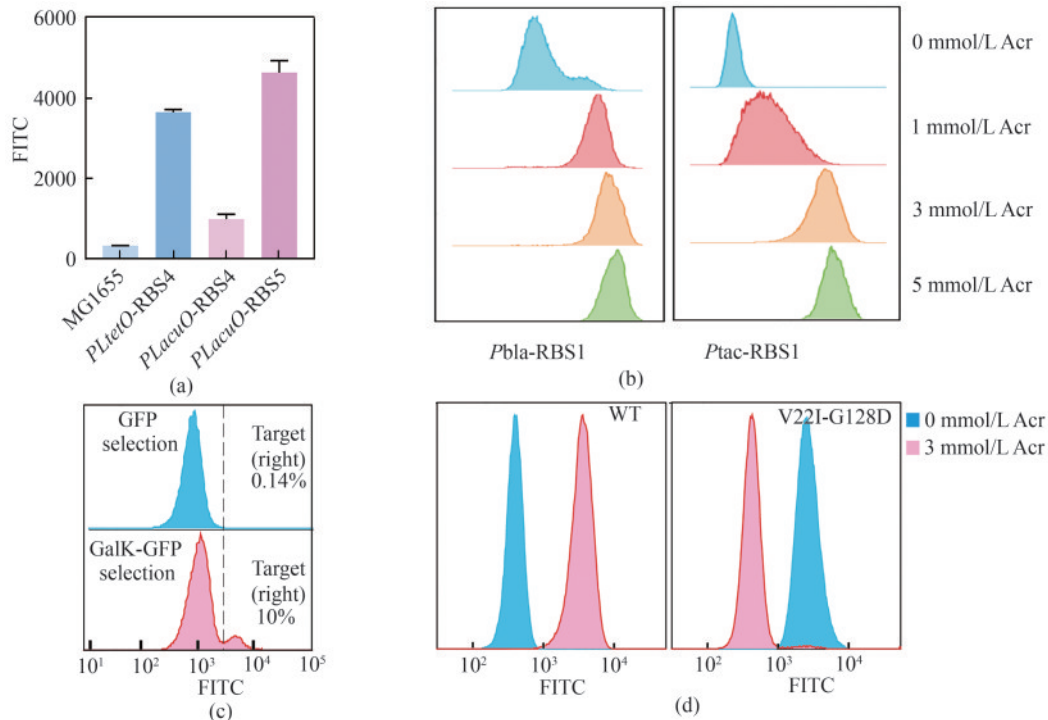


图4 搭建实验平台开发AcuR-OFF

(a) 以MG1655为荧光负对照，TetO组为荧光正对照，优化AcuO调控系统；(b) 分别对两组不同表达强度的TetR测定诱导浓度梯度下的荧光群体分布，以选择最佳诱导条件；(c) GalK筛选前后，没有诱导剂时目标种群比例的变化，蓝色表示GalK筛选前群体荧光分布，红色表示GalK筛选后群体荧光分布；(d) 对野生型及AcuR-OFF突变子的调控性能表征，蓝色为没有诱导剂时的群体荧光分布，红色为3 mmol/L Acr诱导后的群体荧光分布

Fig.4 Construction of the experimental platform for the development of AcuR-OFF

(a) Using MG1655 as the fluorescence negative control and the TetO group as the fluorescence positive control, the AcuO regulatory system was optimized. (b) The fluorescence population distributions of two groups of TetR with different expression intensities were measured under the induction concentration gradients respectively to select the optimal induction conditions. (c) The changes in the proportion of the target population in the absence of the inducer before and after GalK screening. The blue color represents the population fluorescence distribution before GalK screening, and the red color represents the population fluorescence distribution after GalK screening. (d) Characterization of the regulatory performance of the wild type and the AcuR-OFF mutant. The blue color represents the population fluorescence distribution in the absence of the inducer, and the red color represents the population fluorescence distribution after induction with 3 mmol/L Acr

重叠,能很好地阻遏和激活下游调控基因的表达[图4(d)]。该实验结果表明,GalK-GFP联用筛选系统相较于单一GFP筛选系统,在富集低丰度目标群体以及进行高通量筛选方面更具优势。

### 3 总结与讨论

以转录因子为研究对象,开发了活细胞定向进化实验平台。该平台以TADR活细胞定向进化技术为突变工具,偶联GalK-GFP的双重正负筛选系统,成功开发了一种新的遗传开关——AcuR-OFF。AcuR-OFF对诱导剂的响应模式与野生型相反,当存在诱导剂时严格抑制下游基因的表达,当不存在诱导剂时解除抑制,动态范围较宽,是可用的遗传开关。本实验不仅为基因线路设计提供了“OFF”响应的新元件,也展示了TADR-GalK-GFP活细胞定向进化实验平台的有效性。

TADR突变系统实验成本较低,操作简便,并且能够生成更具多样性的突变文库,因此该实验平台有望成为丰富合成生物学基因调控元件库的有力工具。相较于易错PCR,TADR仅通过质粒的转化与诱导表达,随着细胞的生长迭代完成突变库的构建。除此之外,易错PCR在进行建库实验时,一个反应只能构建一个突变规模的库(低、中、高三种规模),而TADR在一次建库实验中可以包含多种突变规模,突变规模可对着细胞的生长迭代累加。而GalK-GFP联用筛选系统在筛选低丰度目标群体的试验下具有显著优势。如在AcuR突变探索实验中,目标种群占比约为整体的0.14%,直接筛选难度较大,而经过GalK筛选富集后,初次荧光筛选时目标种群比例提升至10%,使荧光筛选的难度大大降低。

该系统不仅可以实现对调控元件调控模式的定向进化,除此之外,也可以用于调控元件灵敏性、底物识别特异性等基因开关特性的定向进化,甚至可以设置不同的筛选条件,同时进行调控元件的优化。

### 参 考 文 献

[1] 丁明珠,李炳志,王颖,等.合成生物学重要研究方向进展

[J].合成生物学,2020,1(1):7-28.

DING M Z, LI B Z, WANG Y, et al. Significant research progress in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 7-28.

[2] CAMPS M, NAUKKARINEN J, JOHNSON B P, et al. Targeted gene evolution in *Escherichia coli* using a highly error-prone DNA polymerase I[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(17): 9727-9732.

[3] CROOK N, ABATEMARCO J, SUN J, et al. *In vivo* continuous evolution of genes and pathways in yeast[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13051.

[4] ENGLISH J G, OLSEN R H J, LANSU K, et al. VEGAS as a platform for facile directed evolution in mammalian cells[J]. Cell, 2019, 178(3): 748-761.e17.

[5] ESVELT K M, CARLSON J C, LIU D R. A system for the continuous directed evolution of biomolecules[J]. Nature, 2011, 472(7344): 499-503.

[6] FAURE G, SAITO M, WILKINSON M E, et al. TIGR-Tas: a family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses[J]. Science, 2025, 388(6746): eadv9789.

[7] HALPERIN S O, TOU C J, WONG E B, et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window[J]. Nature, 2018, 560(7717): 248-252.

[8] HESS G T, FRÉSARD L, HAN K, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells[J]. Nature Methods, 2016, 13(12): 1036-1042.

[9] MOORE C L, PAPA L J, SHOULDERS M D. A processive protein *Chimera* introduces mutations across defined DNA regions *in vivo*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(37): 11560-11564.

[10] NYERGES Á, CSÖRGŐ B, DRASKOVITS G, et al. Directed evolution of multiple genomic loci allows the prediction of antibiotic resistance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(25): E5726-E5735.

[11] RAVIKUMAR A, ARZUMANYAN G A, OBADI M K A, et al. Scalable, continuous evolution of genes at mutation rates above genomic error thresholds[J]. Cell, 2018, 175(7): 1946-1957.e13.

[12] SIMON A J, MORROW B R, ELLINGTON A D. Retroelement-based genome editing and evolution[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(11): 2600-2611.

[13] TIAN R Z, ZHAO R Z, GUO H Y, et al. Engineered bacterial orthogonal DNA replication system for continuous evolution

- [J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(12): 1504-1512.
- [14] YI X, KAZLAUSKAS R, TRAVISANO M. Evolutionary innovation using EDGE, a system for localized elevated mutagenesis[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0232330.
- [15] YI X, KHEY J, KAZLAUSKAS R J, et al. Plasmid hypermutation using a targeted artificial DNA replisome[J]. *Science Advances*, 2021, 7(29): eabg8712.
- [16] WILSON D S, KEEFE A D. Random mutagenesis by PCR[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001, 8(1): Unit8. 3.
- [17] MCCULLUM E O, WILLIAMS B A R, ZHANG J L, et al. Random mutagenesis by error-prone PCR[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 634: 103-109.
- [18] IKE K, ARASAWA Y, KOIZUMI S, et al. Evolutionary design of choline-inducible and-repressible T7-based induction systems[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(12): 1352-1360.
- [19] RKENES T P, LAMARK T, STRØM A R. DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(6): 1663-1670.
- [20] LI X T, THOMASON L C, SAWITZKE J A, et al. Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(22): e204.
- [21] RYU Y S, CHANDRAN S P, KIM K, et al. Oligo- and dsDNA-mediated genome editing using a *tetA* dual selection system in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181501.
- [22] STAVROPOULOS T A, STRATHDEE C A. Synergy between *tetA* and *rpsL* provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors[J]. *Genomics*, 2001, 72(1): 99-104.
- [23] BISWAS K, STAUFFER S, SHARAN S K. Using recombineering to generate point mutations: *galk*-based positive-negative selection method[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 852: 121-131.
- [24] POELWIJK F J, DE VOS M G J, TANS S J. Tradeoffs and optimality in the evolution of gene regulation[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 462-470.
- [25] SAEKI K, TOMINAGA M, KAWAI-NOMA S, et al. Rapid diversification of BetI-based transcriptional switches for the control of biosynthetic pathways and genetic circuits[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1201-1210.
- [26] WARMING S, COSTANTINO N, COURT D L, et al. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galk* selection [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(4): e36.
- [27] DABIRIAN Y, GONÇALVES TEIXEIRA P, NIELSEN J, et al. FadR-based biosensor-assisted screening for genes enhancing fatty acyl-CoA pools in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(8): 1788-1800.
- [28] XIAO Y, BOWEN C H, LIU D, et al. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(5): 339-344.
- [29] XU X H, LI X L, LIU Y F, et al. Pyruvate-responsive genetic circuits for dynamic control of central metabolism[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(11): 1261-1268.
- [30] DAS A T, TENENBAUM L, BERKHOUT B. Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression[J]. *Current Gene Therapy*, 2016, 16(3): 156-167.
- [31] GOSSSEN M, BUJARD H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5547-5551.
- [32] RAMOS J L, MARTÍNEZ-BUENO M, MOLINA-HENARES A J, et al. The TetR family of transcriptional repressors[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(2): 326-356.
- [33] CUTHBERTSON L, NODWELL J R. The TetR family of regulators[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(3): 440-475.
- [34] BHUKYA H, ANAND R. TetR regulators: a structural and functional perspective[J]. *Journal of the Indian Institute of Science*, 2017, 97(2): 245-259.
- [35] BERENS C, HILLEN W. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(15): 3109-3121.
- [36] BERTRAM R, HILLEN W. The application of Tet repressor in prokaryotic gene regulation and expression[J]. *Microbial Biotechnology*, 2008, 1(1): 2-16.
- [37] MOL A A, GROHER F, SCHREIBER B, et al. Robust gene expression control in human cells with a novel universal TetR aptamer splicing module[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(20): e132.
- [38] HE S F, ZHANG Z W, LU W Y. Natural promoters and promoter engineering strategies for metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2023, 50(1): kuac029.
- [39] SCHOLZ O, HENßLER E M, BAIL J, et al. Activity reversal of Tet repressor caused by single amino acid exchanges[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(3): 777-789.
- [40] SULLIVAN M J, CURSON A R J, SHEARER N, et al. Unusual regulation of a leaderless operon involved in the

- catabolism of dimethylsulfoniopropionate in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15972.
- [41] HARMON D E, RUIZ C. The multidrug efflux regulator AcrR of *Escherichia coli* responds to exogenous and endogenous ligands to regulate efflux and detoxification[J]. mSphere, 2022, 7(6): e00474-22.
- [42] GRKOVIC S, BROWN M H, SKURRAY R A. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2001, 12(3): 225-237.
- [43] ROGERS J K, GUZMAN C D, TAYLOR N D, et al. Synthetic biosensors for precise gene control and real-time monitoring of metabolites[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(15): 7648-7660.
- [44] JONES K A, SNODGRASS H M, BELSARE K, et al. Phage-assisted continuous evolution and selection of enzymes for chemical synthesis[J]. ACS Central Science, 2021, 7(9): 1581-1590.
- [45] ROGERS J K, CHURCH G M. Genetically encoded sensors enable real-time observation of metabolite production[J].

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(9): 2388-2393.



**通讯作者:** 易啸(1986—),男,博士,研究员,博士生导师。研究方向为合成生物学,定向进化。

E-mail: xiao.yi@siat.ac.cn



**第一作者:** 周玉洁(2000—),女,硕士研究生。研究方向为合成生物学。

E-mail: yj.zhou@siat.ac.cn