



刘陈立博士, 研究员, 博士生导师, 现任中国科学院定量工程生物学重点实验室主任、中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所所长、深圳合成生物学创新研究院院长。任中国生物工程学会合成生物学专业委员会副主任兼秘书长。为中组部“青年千人计划”获得者、中国科学院“百人计划”获得者、国务院特殊津贴专家获得者、科技部重点研发计划首席科学家。曾获“中源协和生命医学奖创新突破奖”、“香港青年科学家奖”、“李嘉诚奖”、“深圳十大好青年”等奖项。成果发表在*Science*、*PNAS*、*Microbiome*、*ACS Synth Biol*、*Biomaterials*、*Nucl Acids Res*等国际专业期刊上。担任*ACS Synthetic Biology*和*Quantitative Biology*杂志编委。主要方向是利用合成基因线路和空间进化等技术方法, 开发恶性肿瘤合成细菌疗法和研究生物体系有序性形成原理。

<http://isynbio.siat.ac.cn/liulab/>

合成生物学中的高通量筛选与测量技术

崔金明 刘陈立*

(中国科学院深圳先进技术研究院, 合成生物学研究所, 深圳 518055)

摘要 在合成生物学的“设计-合成-测试-学习”闭环中, 高通量筛选与测量技术日益受到重视。该文以酶元件的新活性检测、基因线路的活性检测、天然产物的活性筛选、研究大肠杆菌基因型与线虫宿主寿命表型之间的关系等为案例, 介绍高通量筛选的共性器具与步骤、实验设计与分析方法, 比较系统地整理了相关技术, 以期为未来高通量筛选技术的进步提供参考与理论依据。

关键词 高通量筛选; 微孔板; 活性检测

High-Throughput Screening and Measurement Techniques in Synthetic Biology

CUI Jinming, LIU Chenli*

(Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract High-throughput screening and measurement techniques are receiving increasing attention in the “design-build-test-learn” closed loop of synthetic biology. In this paper, using the new activity detection of enzyme elements, the activity measurement of genetic circuits, the activity screening of natural products, and the study of

科技部国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0902700)、深圳市科技创新委员会项目(批准号: JCYJ20180507182241844、JCYJ20170818164139781、KQTD2015033117210153)、中国科学院重点部署项目(批准号: KFZD-SW-216)、中国科学院青年创新促进会(批准号: 2016325)和中国科学院定量工程生物学重点实验室、人工诊疗微生物自动化合成工程实验室项目(批准号: 深发改(2016)1194号)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-86585245, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFA0902700), the Program of Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (Grant No.JCYJ20180507182241844, JCYJ20170818164139781, KQTD2015033117210153), the Key Deployment Project of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.KFZD-SW-216), the Youth Innovation Association of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.2016325) and CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology and the Engineering Laboratory for Automated Manufacturing of Therapeutic Synthetic Microbes (Grant No.Shenzhen Institutes and reform commission (2016) 1194)

*Corresponding author. Tel: +86-755-86585245, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn

网络出版时间: 2019-12-11 10:18:31

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1018.006.html>

the relationship between *E. coli* genotype and nematode host lifespan phenotype as examples, we introduced the common instruments and steps of high-throughput screening, as well as experimental design and analysis methods, to systematically sort out the relevant technology, and to provide reference and theoretical basis for the future progress of high-throughput screening technology.

Keywords high-throughput screening; microtiter plate; activity assay

在合成生物学研究中, 为了实现对生命体的工程化设计和改造, 研究者通过调控相关基因通路对细胞进行“编程”, 让它们像微型工厂或机器一样, 生产特定产品或完成特殊功能。然而, 与其他工程领域不同, 本领域的研究对象——生命体系往往是高度动态、灵活调控、非线性、难以预测的。想要成功制造一个工程细胞, 一般需要经过成百上千次的实验试错, 逐渐逼近正确答案。因此, 人造生命体的高度复杂性决定了其需要大量的工程化试错实验, 即需要快速、低成本、多循环地完成“设计-合成-测试-学习”这一闭环。

闭环中的“测试”环节以高通量筛选与测量技术为代表。通过运用机器人、自动化液体处理设备、数据处理与控制软件、灵敏检测方法, 高通量筛选使研究人员能够快速进行上万次的化学、遗传学或药理学测试, 从而快速识别最优的候选细胞。这些实验结果还为新一轮的“设计-合成-测试-学习”闭环提供了起点。本文对近年来运用于合成生物学研究中的若干高通量筛选与测量案例进行综述, 以期比较系统地整理相关技术, 并为未来高通量筛选技术的进步提供参考与理论依据。

1 高通量筛选的共性器具与步骤

高通量筛选的共性实验器具或检测容器主要是微孔板: 通常是由塑料制成的一种小型容器, 其上带有网格状排列的、单面开口的小孔, 一般有6、12、24、48、96、192、384、1 536、3 456、6 144、9 600孔等规格。微孔板自2003年起被美国国家标准协会(American National Standards Institute, ANSI)及实验室自动化和筛选协会(SLAS)提出标准化, 96孔是最初被最广泛使用的设计, 即带有8×12个间隔孔, 间距为9 mm。各个孔内盛有待测试样品或对照组样品, 可以是某种类型的细胞、酶或化合物, 具体取决于实验的性质。依据孔的尺寸, 可盛放的液体样品体积为数十纳升至数毫升^[1-3]。微孔板最常见的材质是聚苯乙烯, 用于大多数光学检测微孔板。它

可以通过添加二氧化钛做成白色, 进行光吸收或化学发光检测; 也可以添加碳做成黑色, 用于荧光检测。聚丙烯材质则具有优良的耐低温与热循环性能, 适于样品的长期储存。聚碳酸酯材质价格便宜, 适用于PCR反应的一次性使用。环烯烃材质可用于透过紫外线, 也有微孔板由固体玻璃和石英组成, 用于特殊应用。

微孔板能执行样品与试剂添加、混合、培养孵育、检测等功能。微孔板可被机器人在多种实验设备之间自动化或半自动化传递, 包括低温冰箱、培养箱、离心机、PCR仪、封膜机、撕膜机、挑克隆系统等; 孔内的样品可由液体处理设备自动化添加或人手添加; 孔内发生的生物、化学、物理变化事件则可由多功能酶标仪、流式细胞仪、液相色谱仪、质谱仪等检测仪器连续自动化读取, 或通过显微镜人工或自动化观测。实验结果一般体现为一组网格化的数值, 各个数值对应于单一孔内的样品。例如, 一些高配置的酶标仪能在数分钟内读取数十块微孔板, 从而迅速获取上千个实验数据点; 自动化挑克隆系统能连续挑取上千个克隆用于遗传筛选。研究人员可从中挑取最高值或大于某阈值孔内的样品, 重复实验确认并优化实验结果, 或开始新一轮测试。

除了微孔板, DNA微阵列(DNA芯片)将大量显微尺度的DNA斑点附着于固体表面(可以是玻璃、塑料或硅材质), 可同时测量大量基因的表达水平, 或确定基因组多个区域的基因型^[4]。每个DNA斑点含有皮摩尔量级(10^{-12} mol)的特定DNA序列, 被称为探针或寡核苷酸。探针与目标DNA分子的杂交配对通常通过检测荧光基团、银或化学发光标记的靶点来测量, 以确定样品中目标DNA序列的相对丰度。DNA微阵列的另一种形式是以编码的小珠子(聚苯乙烯等材质)携带探针来组成阵列。蛋白质微阵列(蛋白质芯片)则用于跟踪蛋白质的相互作用和活性, 并大规模地确定蛋白质功能^[5], 其材质可以是载玻片、硝化纤维素膜、小珠子或微孔板, 其探针通常用荧光染料标记, 通过抗原抗体结合或蛋白间

相互作用来检测目标。此外还有一些特殊的筛选方式, 例如基于油包水乳状液滴的区室化合作复制 (compartmentalized partnered replication, CPR), 文库中的个体分别处于各个液滴之中, 待进化筛选的目标基因的转录、翻译、调控或其他代谢功能必须与热稳定DNA聚合酶的产量相耦合, 从而影响其子代基因的拷贝数, 经过多轮重复筛选富集^[6]。基于脂质体展示, 结合体外蛋白质合成, α 溶血素能够介导膜穿孔及色素分子进入脂质体, 从而结合流式细胞仪展开筛选^[7]。由于篇幅所限, 本文主要介绍最常见的基于微孔板的高通量筛选案例。

2 高通量筛选的实验设计与分析方法

高通量筛选实验的成功, 依赖于采用恰当的实验设计、分析方法、质量控制方法来获取可靠的测量值并选择合适的阈值, 从而“命中”目标样品^[8]。

在实验设计方面, 很多时候目标基因的活性难以直接高通量测量, 因此常将特定的报告基因与目标基因或调控序列的活性偶联, 以衡量样品中的目标基因的活性。一类报告基因是易于识别测量的 (以光信号为主), 如化学发光蛋白 (荧光素酶) Lux-ABCDE系统^[9]、荧光蛋白GFP及其增强突变体^[10]、催化X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β 吡喃半乳糖苷) 蓝白显色反应的 β 半乳糖苷酶LacZ^[11], 等等。另一类报告基因是选择性标记, 如抗生素抗性基因*cat*^[12]或营养缺陷补足基因*galK*^[13]等, 可影响细胞生长从而反映为光吸收值差异。此外, 液相色谱、质谱、显微观察等方式则不依赖于报告基因, 而是直接测量目标代谢物产量或其他特性; 也有根据目标酶活性特殊设计的测量方法。

在数据分析与阈值选取方面, 筛选实验的结果一般包括光吸收值、化学发光值、荧光值、液相色谱峰值、质谱峰值、显微观察统计等信号类型, 最容易比较的指标包括平均倍数变化、平均差、抑制百分比、活性百分比等, 研究人员可根据需要选择合适的阈值并分析。需要注意的是, 不带重复的筛选 (通常为主筛选) 与带重复的筛选 (通常为重复确认筛选) 分别适用于不同的分析方法, 例如Z因子法适用于前者, 而t统计法则适用于后者^[8]。

在质量控制方面, 须注意三点: (1) 进行良好的微孔板位置设计, 避免造成与孔所在位置相关的系统误差; (2) 选取有效的正负对照; (3) 制定有效的质

量控制衡量指标, 包括信号背景比、信噪比、信号窗口、波动比例、Z因子、严格标准均值差等, 来评估数据质量并识别质量不佳的数据点^[14-17]。

3 高通量筛选的若干案例

3.1 基于报告基因光信号的高通量筛选案例

在2019年发表于*Nature Chemical Biology*的一项研究中, Schmidl等^[18]将DNA结合结构域模块化互换, 实现了对细菌双组分系统的重构。双组分系统是介导多步信号传导通路的最大家族, 是合成生物学领域中重要的传感器元件来源。但由于许多双组分系统的启动子未知, 或交叉调控, 或沉默表达, 导致大部分双组分系统仍未被解析, 难以应用。该研究证明: OmpR/PhoB与NarL/FixJ这两个最大家族的应答调控蛋白的DNA结合结构域可以灵活互换, 从而用于重构基因线路并激活对方的启动子。DNA结合结构域互换后, 传感器元件的核心输入输出仍保持, 但定量指标如信号输出强度、希尔系数、输入灵敏度均发生了一定变化。

在研究中, 采用了超快折叠绿色荧光蛋白 (superfolder green fluorescent protein, sfGFP) 作为报告基因输出, 来检测研究对象双组分系统的信号输入。借助DNA结合结构域互换这一手段, 研究组在大肠杆菌中大规模筛选了希瓦氏菌 (*Shewanella oneidensis*) MR-1的双组分系统。首先根据KEGG与BLAST结果, 选取了希瓦氏菌MR-1菌株的OmpR/PhoB家族的7个未知双组分系统, 扩增其基因并异源表达于大肠杆菌, 同时将其应答调控蛋白的激酶受体 (REC) 结构域 (N-端) 与大肠杆菌的PsdR的DNA结合结构域 (C-端) 在第137氨基酸位点处融合。核糖体结合位点采用合成序列, 预测强度约为1 000单位。研究组设计了117种化学信号输入, 包括希瓦氏菌的电子受体、生理代谢物等, 并开展高通量筛选。大肠杆菌TorS-TorR菌株对于氧化三甲胺的响应则作为阳性对照。若融合蛋白及重构的基因线路能够响应某化学信号, 则将激活大肠杆菌中sfGFP的表达从而输出荧光信号。

大肠杆菌先被过夜培养好后, 15~50 μ L的种子液被加入到3 mL的携带抗生素的M9培养基, 于37 $^{\circ}$ C、250 r/min培养2 h。培养液在新鲜M9中被稀释至 $D_{600}=10^{-4}$, 以200 μ L体积被转入96孔微孔板的各个孔内, 各孔内已添加有4 μ L的50 mmol/L待测化合物溶

液。除半胱氨酸、硫酸铜、亚硒酸钠、硒酸钠、硫化钠(100 $\mu\text{mol/L}$)、高碘酸钠(25 $\mu\text{mol/L}$)、盐酸羟胺、亚砷酸钠(10 $\mu\text{mol/L}$)，其他化合物的测试浓度都为1 mmol/L。微孔板由铝箔纸封闭，置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、900 r/min培养5 h。微孔板最后置于冰上并由流式细胞仪读取荧光信号，记录有化合物相比没有化合物时的sfGFP荧光倍数变化。以sfGFP表达量增强1.5倍以上为阈值筛选，初筛命中了16个目标(图1)。经过复筛与更多实验验证，证明希瓦氏菌中

的SO_4387-SO_4388是一对新发现的酸性pH传感器元件，半最大响应值为pH6.22。该高通量筛选工作依赖于荧光蛋白报告基因，加速了对双组分系统的基础研究，并促进了这一传感器元件大家族的广泛应用。

3.2 基于生长抑制的高通量筛选案例

Sikora等^[19]以霍乱弧菌为模式生物，建立了从天然产物库中筛选新抗生素的方法。许多革兰氏阴性致病菌的存活与毒力依赖于将毒素、蛋白酶、脂

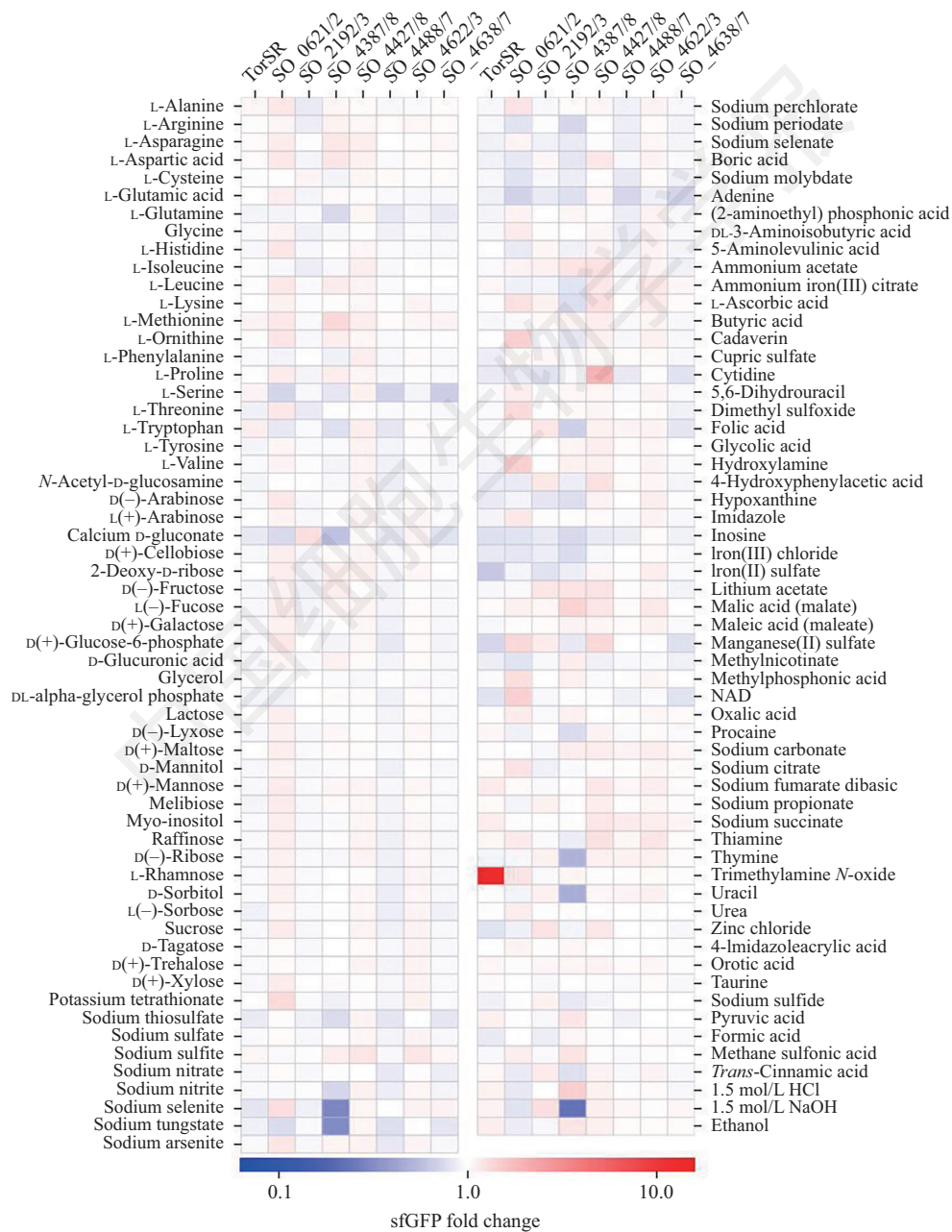


图1 七个重构双组分系统以及TorS-TorR对照菌株的化学筛选结果(sfGFP倍数变化值)(根据参考文献[18]修改)

Fig.1 Results of the chemical screen for TorS-TorR and the seven rewired TCSs (sfGFP fold-change values) (modified from reference [18])

肪酶、几丁质酶、神经氨酸酶等分泌至胞外,且分泌过程依赖于高度保守的II型分泌系统。因此,II型分泌系统是理想的抗生素靶点^[20-21]。

该筛选既基于生长抑制,也基于对II型分泌依赖型蛋白酶的活性检测。首先,准备从海洋及陆地蓝细菌、陆地真菌、深海热泉生物等不同来源的天然产物,其分离提取物组分分装入微孔板,然后以所需浓度添加到样品384孔板中。霍乱弧菌接种于LB琼脂板上,取单菌落接种LB培养基,在标准条件下培养16 h。随后被稀释1:100到新鲜的LB培养基中,直到 $D_{600}=4.5$,培养液再次稀释至 $D_{600}=0.05$,分装20 μL 于微孔板的各个孔中(图2)。微孔板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养16 h。采用酶标仪读取 D_{600} ,比较生长抑制情况。

Boc-QAR-AMC(*N-tert-butoxycarbonyl-Gln-Ala-Arg-7-amino-4-methylcoumarin*)是可被外泌的VesB蛋白酶分解并产生荧光的底物,在测量 D_{600} 比较生长抑制情况后,在各孔中加入10 μL 的0.25 mmol/L Boc-QAR-AMC(溶于25 mmol/L Hepes pH7.5)以检测外泌蛋白酶活性。振荡30 s,等待10 min后以380 nm的激发波长,测量450 nm的荧光值,从而反映VesB所依赖的II型分泌系统是否受到天然产物抑制。亮肽素

(leupeptin)则作为抑制II型分泌系统的阳性对照。之后,命中的活性天然产物组分可通过LC-MS/MS手段,进一步评估活性成分,或识别已知结构化合物。

3.3 基于特定酶活性的高通量筛选案例

Frances Arnold研究组^[22]2016年通过定向进化细胞色素c,成功地使其在生理条件下催化了碳硅键的生成(催化效能比最好的化学催化剂还提高了15倍),从而验证了硅基生命体的一种存在形式。在对一系列来源于不同物种的血红素、细胞色素c、P450、肌球蛋白进行纯化初筛后发现,海洋嗜热盐菌(*Rhodothermus marinus*)的细胞色素c的对映体过量值达到97%,且转化数接近40,因此选择其作为定向进化的起点。对其结合血红素的“疑似”活性位点附近的M100、V75、M103依次做22密码子的饱和突变^[23],并展开高通量筛选。

携带不同点突变的大肠杆菌文库在96孔微孔板中培养并表达蛋白,细胞经过离心并重悬于M9-N最简培养基(pH7.4)。该培养基被用作全细胞、细胞裂解液及纯化蛋白的缓冲液系统,含有47.7 mmol/L Na_2HPO_4 、22.0 mmol/L KH_2PO_4 、8.6 mmol/L NaCl 、2.0 mmol/L MgSO_4 、0.1 mmol/L CaCl_2 。细胞在75 $^{\circ}\text{C}$ 处理10 min裂解,然后以4 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min以除去细胞残

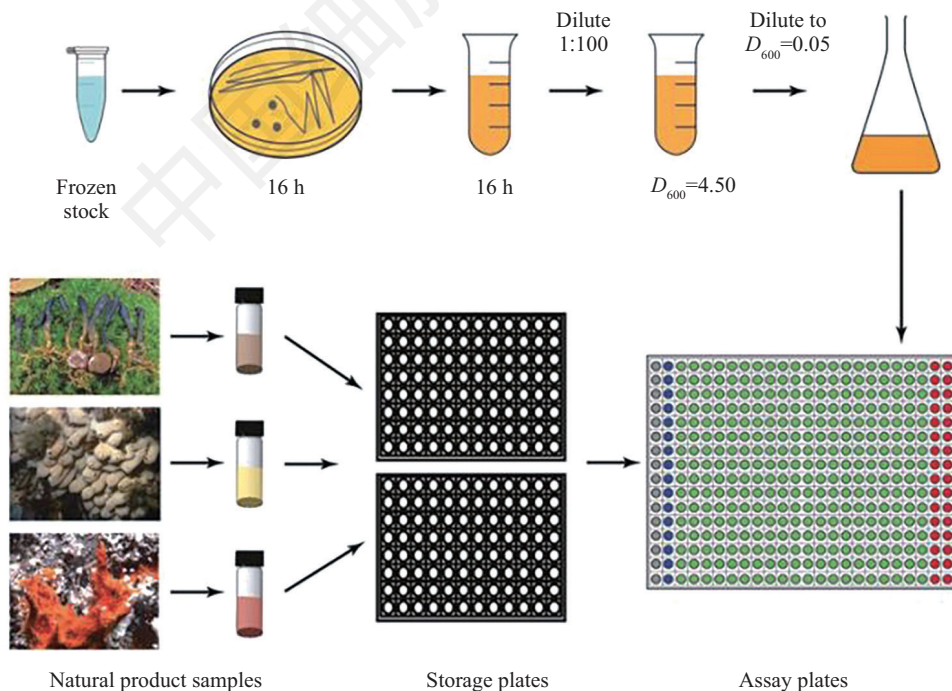


图2 采用霍乱弧菌作为模式生物的高通量筛选实验准备步骤(根据参考文献[19]修改)

Fig.2 Experimental outline of preparation for HTS campaign utilizing *V. cholerae* as a model organism (modified from reference [19])

渣。每份340 μL 细胞裂解液添加10 mmol/L二甲基苯基硅烷、10 mmol/L 2-重氮乙基丙酸酯作为反应物, 10 mmol/L连二亚硫酸钠作为还原剂, 在室温无氧条件下反应, 置于400 r/min摇床1.5 h。通过向每孔加入1 mL环己烷终止反应, 并加入20 μL 20 mmol/L的甲基-2-苯甲酸酯作为内标并混匀。经过4 000 $\times g$ 、5 min离心, 每孔中的有机相(约400 μL)被转移到浅孔的96孔微孔板, 通过超临界流体色谱法进行分析测量(仪器为JACSO 2000系列, 采用异丙醇与超临界 CO_2 为流动相, 观测波长210 nm, 手性层析柱为Daicel Chiralpak IC, Chiralpak AD-H, Chiralcel OD-H)。

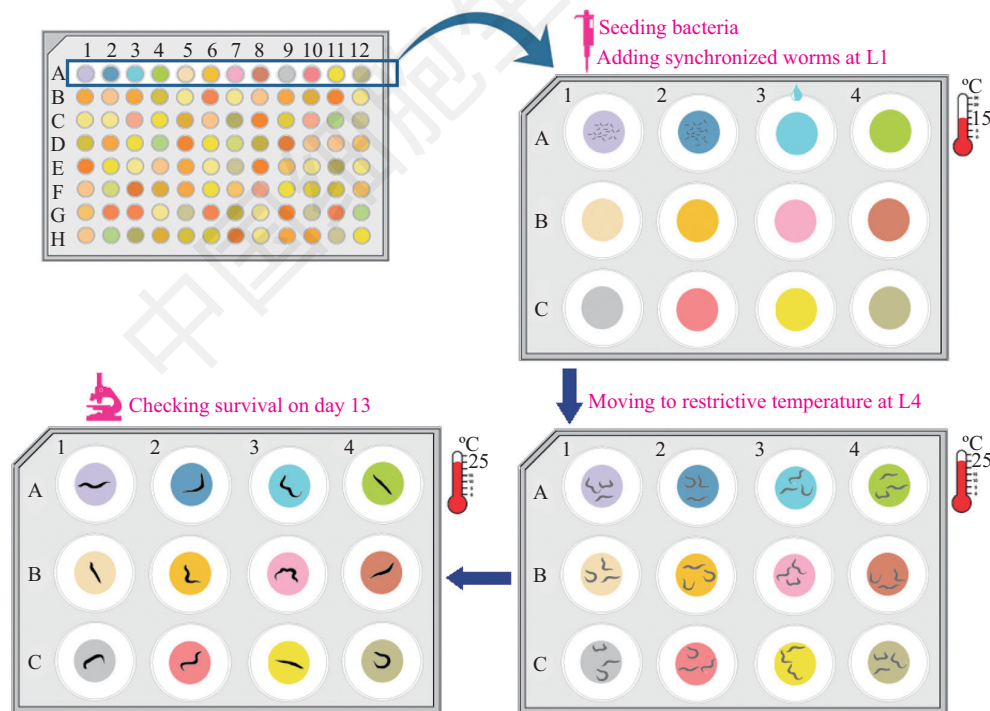
经过三轮定向进化与高通量筛选, 最终获得了携带三个点突变的V75T/M100D/M103E突变体, 其对映体过量值达到99%, 且转化数大于1 500, 转化频率达46次/min。对一系列含硅和重氮化合物测试发现, 该突变体能够催化20种含硅产物的生成, 底物范围较广。这些体外和体内实验采用酶和地球富含的硅, 形成了碳硅键, 证明了自然界蛋白质库是高度可进化的: 只需要几个突变, 现有蛋白就可以催化生命

体中尚未存在的化学键, 从而探索生命体尚未探索的化学空间^[22]。

3.4 基于显微观察的高通量筛选案例

在2017年发表于*Cell*的一项研究中, Han等^[24]将3 983个大肠杆菌的单基因敲除株分别用于喂养秀丽隐杆线虫, 发现其中的29个单基因敲除株能够延长宿主寿命, 且某些株保护了宿主免除肿瘤生长或 β 淀粉体积聚。具体的主筛选方法见下图3: 单基因敲除的大肠杆菌文库来自于保藏的96孔微孔板^[25], 分别用于喂养12孔微孔板中的线虫(线虫已同步化于L1幼虫期); 线虫发育至L4繁殖期时, 置于25 $^{\circ}\text{C}$ 以利用线虫*sqt-3(e2117)^{ts}*株的特性, 令新生胚胎致死从而仅观察母代线虫, 这样既避免了繁重的线虫传代工作, 又未影响正常产卵; 在第13天, 显微镜下观察测量线虫的存活率与运动能力。通过简单计算可知, 单轮主筛选需要约40块96孔微孔板及其中大肠杆菌单基因敲除文库, 约320块12孔微孔板用于线虫培养与观测, 一轮实验流程约需13天。

经过多轮筛选及复筛验证, Han等^[24]命中了29



该株线虫生长繁殖正常, 但胚胎在25 $^{\circ}\text{C}$ 致死。不同颜色代表不同的大肠杆菌单基因敲除菌株。

Schematic diagram of the procedures for the primary screen using the *sqt-3(e2117)^{ts}* collagen mutants, which are embryonic lethal at 25 $^{\circ}\text{C}$ non-permissive temperature. Various colors represent different bacterial mutants from the single-gene knockout *E. coli* library.

图3 采用秀丽隐杆线虫*sqt-3(e2117)^{ts}*株的主筛选方法示意图(根据参考文献[24]修改)

Fig.3 Schematic diagram of the procedures for the primary screen using the *sqt-3(e2117)^{ts}* collagen mutants (modified from reference [24])

个单基因突变, 所选取阈值为延长线虫寿命 $>10\%$, $P<0.001$ 。其中的21个单基因突变株仅在成虫期饲喂仍能延长寿命, 23个突变株换作大肠杆菌MG1655野生株为背景仍能延长宿主寿命。这些突变体分属转录翻译、代谢、膜及转运、蛋白酶及伴侣等功能类别。研究发现, 大肠杆菌对一些特定代谢物如荚膜异多糖酸(colanic acid)的过量生产能够显著延长线虫宿主寿命, 且进一步证实荚膜异多糖酸对线粒体的动态调节在多个物种中是高度保守的^[24]。巧妙设计的高通量筛选实验帮助取得了这些重要成果。

4 结语和展望

高通量筛选及测量技术, 在合成生物学领域仍处于快速发展阶段。针对具体研究方向, 研究人员可以选取微孔板、微阵列、小磁珠、油包水乳状液滴、脂质体等各种形式, 灵活建立文库。通过运用机器人、自动化液体处理设备、数据处理与控制软件、灵敏检测方法, 高通量筛选可帮助研究人员快速获取海量的测量值, 从而快速识别最优的候选细胞, “命中”目标样品。

在上文的几个案例中, 高通量筛选已用于酶元件的新活性检测^[22]、基因线路的活性检测^[18]、天然产物的活性筛选^[19]、研究大肠杆菌基因型与线虫宿主寿命表型之间的关系^[24], 等等。可以预见, 高通量筛选在元件工程、线路工程、基因组工程、基因编辑、微生物组工程等合成生物学研究的多个层面将拓宽研究思路, 不仅具有重要的理论意义, 还将推动“建物致知”与“建物致用”的更好开展。

参考文献 (References)

- Weibull E, Antypas H, Kjäll P, Brauner A, Andersson-Svahn H, Richter-Dahlfors A. Bacterial nanoscale cultures for phenotypic multiplexed antibiotic susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2014; 52(9): 3310-7.
- Antypas H, Veses-Garcia M, Weibull E, Andersson-Svahn H, Richter-Dahlfors A. A universal platform for selection and high-resolution phenotypic screening of bacterial mutants using the nanowell slide. *Lab Chip* 2018; 18: 1767-77.
- Inglis RC, Stevens MJA, Meile L, Lacroix C, Meile L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J Microbiol Methods* 2015; 114: 26-9.
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996; 6(7): 639-45.
- Melton L. Protein arrays: proteomics in multiplex. *Nature* 2004; 429(6987): 101-7.
- Abil Z, Ellefson JW, Gollihar JD, Watkins E, Ellington AD. Compartmentalized partnered replication for the directed evolution of genetic parts and circuits. *Nat Protoc* 2017; 12(12): 2493-12.
- Fujii S, Matsuura T, Sunami T, Kazuta Y, Yomo T. *In vitro* evolution of α -hemolysin using a liposome display. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(42): 16796-801.
- Zhang XHD. Optimal high-throughput screening: practical experimental design and data analysis for genome-scale RNAi research. Cambridge University Press: New York, 2011.
- Radeck J, Kraft K, Bartels J, Cikovic T, Dürr F, Emenegger J, *et al.* The *Bacillus* biobrick box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *J Biol Eng* 2013; 7: 29.
- Phillips GJ. Green fluorescent protein: a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Letters* 2001; 204(1): 9-18.
- Joung J, Ramm E, Pabo C. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7382-7.
- Shaw WV, Packman LC, Burleigh BD, Dell A, Morris HR, Hartley BS. Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature* 1979; 282(5741): 870-2.
- 周建光. 双报道基因系统的构建以及在N蛋白生物功能研究中的应用. *中国生物化学与分子生物学学报*(Zhou Jianguang. The construction of lacZ and galK double reporter system and its use in the study of lambda phage N gene regulation. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 1999; 15(4): 568.
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4(2): 67-73.
- Zhang, XHD. A pair of new statistical parameters for quality control in RNA interference high-throughput screening assays. *Genomics* 2007; 89(4): 552-61.
- Zhang XHD. Novel analytic criteria and effective plate designs for quality control in genome-scale RNAi screens. *J Biomol Screen* 2008; 13(5): 363-77.
- Zhang XH, Espeseth AS, Johnson EN, Chin J, Gates A, Mitnaul LJ, *et al.* Integrating experimental and analytic approaches to improve data quality in genome-scale RNAi screens. *J Biomol Screen* 2008; 13(5): 378-89.
- Schmidl SR, Ekness F, Sofjan K, Daeffler KN, Brink KR, Landry BP, *et al.* Rewiring bacterial two-component systems by modular DNA-binding domain swapping. *Nat Chem Biol* 2019; 15(7): 690-8.
- Sikora AE, Tehan R, McPhail K. Utilization of vibrio cholerae as a model organism to screen natural product libraries for identification of new antibiotics. *Methods Mol Biol* 2018; 1839: 135-46.
- Tran N, Zielke RA, Vining OB, Azevedo MD, Armstrong DJ, Banowetz GM, *et al.* Development of a quantitative assay amenable for high-throughput screening to target the type II secretion system for new treatments against plant-pathogenic bacteria. *J Biomol Screen* 2013; 18(8): 921-9.
- Waack U, Johnson TL, Chedid K, Xi C, Simmons LA, Mobley HLT, *et al.* Targeting the Type II secretion system: development, optimization, and validation of a high-throughput screen for the

- identification of small molecule inhibitors. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 380.
- 22 Kan SBJ, Lewis RD, Chen K, Arnold FH. Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: bringing silicon to life. *Science* 2016; 354: 1048-51.
- 23 Kille S, Acevedo-Rocha CG, Parra LP, Zhang ZG, Opperman DJ, Reetz MT, *et al.* Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth Biol* 2013; 2: 83-92.
- 24 Han B, Sivaramakrishnan P, Lin CJ, Neve IAA, He J, Tay LWR, *et al.* Microbial genetic composition tunes host longevity. *Cell* 2017; 169: 1249-62.
- 25 Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 inframe, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006; 2: 2006.0008.

中国细胞生物学学报