



# 圆红冬孢酵母自主复制序列分离和利用游离型质粒进行基因敲除

郭霄, 史硕博\*

北京化工大学生命科学与技术学院 软物质科学与工程高精尖创新中心, 北京 100029

郭霄, 史硕博. 圆红冬孢酵母自主复制序列分离和利用游离型质粒进行基因敲除[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 882-892.  
GUO Xiao, SHI Shuobo. Isolation of autonomously replicating sequence and gene knockout using an episomal plasmid in *Rhodosporidium toruloides*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 882-892.

**摘要:**【目的】与整合型表达载体相比, 游离型表达载体通常具有更高的拷贝数以实现目标基因的高强度表达, 并且对于 DNA 操作应用更加方便和灵活。然而, 目前的研究尚未确定适用于圆红冬孢酵母的游离型质粒, 该酵母外源基因的表达或者基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑都需要通过整合方式来完成, 这也是对其遗传改造进展缓慢的一个重要原因。本研究目的是构建圆红冬孢酵母的游离型质粒, 使得其外源基因的表达和基因组编辑更方便省时。【方法】首先对圆红冬孢酵母苯丙氨酸氨裂解酶基因(phenylalanine ammonia-lyase gene, *PAL*)中可能存在的自主复制序列(autonomously replicating sequences, ARSs)进行挖掘和表征, 将该基因及其上下游序列进行分段扩增, 构建到带有  $\beta$ -异丙基苹果酸脱氢酶基因( $\beta$ -isopropyl malate dehydrogenase gene, *LEU2*)的质粒中, 通过电转化的方法导入 *LEU2* 基因缺陷的圆红冬孢酵母中, 根据转化效率高低鉴定了该酵母的一个 ARS。其次, 以编码香叶基香叶基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS)的 *BTS1* 基因为敲除靶点, 将其 gRNA 构建到基于 ARS 的游离型质粒中, 通过转化子直观的颜色变化来验证该游离型质粒是否成功应用于圆红冬孢酵母的 CRISPR/Cas9 体系。【结果】本工作鉴定了圆红冬孢酵母的 ARS, 构建了基于 ARS 元件的游离型质粒, 并将该质粒应用于圆红冬孢酵母 CRISPR/Cas9 体系, 成功实现了基于游离型质粒的基因敲除。【结论】本研究丰富了圆红冬孢酵母现有的工具库, 为圆红冬孢酵母的合成生物学应用提供了良好的研究基础和技术支持。

**关键词:** 圆红冬孢酵母; 自主复制序列; 游离型质粒

资助项目: 国家自然科学基金(21878013, 22011530113)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21878013, 22011530113).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64438262, E-mail: shishuobo@mail.buct.edu.cn

Received: 2023-09-10; Accepted: 2023-11-22; Published online: 2023-11-30

# Isolation of autonomously replicating sequence and gene knockout using an episomal plasmid in *Rhodospiridium toruloides*

GUO Xiao, SHI Shuobo\*

Beijing Advanced Innovation Center for Soft Matter Science and Engineering, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

**Abstract:** [Objective] Episomal expression vectors typically have higher copy number to achieve strong gene expression than chromosomal expression vectors. Moreover, they are more convenient and flexible for DNA manipulation. However, the episomal plasmids suitable for the application in *Rhodospiridium toruloides* remain to be determined, and the expression of heterologous genes or CRISPR/Cas9-based genome editing needs to be achieved by integration, which is a key reason for the slow progress in its genetic modification. Thus, this work aims to construct an episomal plasmid of *R. toruloides*, which facilitates the expression of heterologous genes and promotes the gene editing in a time-saving manner. [Methods] First, the possible autonomously replicating sequences (ARSs) in the phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL*) of *R. toruloides* were mined. Specifically, *PAL* and its upstream and downstream sequences were amplified in segments and constructed into a plasmid containing the  $\beta$ -isopropyl malate dehydrogenase gene (*LEU2*). The recombinant plasmids were then introduced into *LEU2*-deficient *R. toruloides* by the electroporation method. An ARS was then identified according to transformation efficiency. Then, the *BTS1* gene encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase was selected as the knockout target, and its gRNA was constructed into the episomal plasmid based on the identified ARS. The color change of the transformant was observed to verify whether the episomal plasmid was successfully applied to the CRISPR/Cas9 system of *R. toruloides*. [Results] In this work, an ARS was identified, based on which an episomal plasmid was constructed and applied to CRISPR/Cas9 editing in *R. toruloides*. Finally, the episomal plasmid-based gene knockout of *R. toruloides* was successfully achieved. [Conclusion] This work enriched the existing tool library and provided a research basis and technical support for the application of *R. toruloides* in synthetic biology.

**Keywords:** *Rhodospiridium toruloides*; autonomously replicating sequence; episomal plasmid

为了改变或实现特定基因的表达, 往往需要将基因通过载体引入到相应宿主细胞中。目前常见的载体有两种: 整合型表达载体和游离型表达载体。整合表达是通过将相应核酸片段插入到宿主细胞染色体中进行复制, 具有遗传和表达稳定的优点。游离表达往往依赖游离型

载体实现(例如游离型质粒), 能够在细胞内独立于宿主细胞本身的复制周期而实现扩增, 具有拷贝数高、易于操纵的优点, 同时这种表达方式对菌体的基因组影响很小。游离型质粒是一种重要的合成生物学元件, 在诸多微生物中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。

圆红冬孢酵母是一株可高产油脂的非模式酵母,能够累积超过自身细胞干重 70%的油脂,可引入不同的修饰酶或代谢途径合成各类脂肪酸类燃料与化学品。同时,该酵母可利用的碳源和氮源较广,且对木质纤维素水解液中的诸如乙酸等毒性物质具有天然抗性,被认为是一株具有广泛工业应用前景的产油菌株<sup>[2-3]</sup>。目前,外源基因导入圆红冬孢酵母主要依靠整合表达,通过同源重组将相应核酸片段插入到酵母基因组上,该方法因遗传稳定性好而被广泛应用<sup>[4-5]</sup>,但该方法也存在大量随机整合、假阳性率高、后期筛选烦琐等缺点<sup>[6]</sup>。

自主复制序列 (autonomously replicating sequence, ARS) 是常见的游离型质粒的一个核心功能元件,它可以启动核酸的复制,是 DNA 的复制起点,类似于细菌中的复制起点,指导基因组 DNA 和游离型质粒的复制<sup>[7]</sup>。圆红冬孢酵母中游离型质粒的构建可以追溯到 1985 年<sup>[8]</sup>,该工作将圆红冬孢酵母苯丙氨酸氨裂解酶基因 (phenylalanine ammonia-lyase gene, *PAL*) 构建到质粒中,可以提高该酵母的转化效率,猜测 *PAL* 基因中可能存在 ARS,该质粒可能作为不稳定游离型质粒在酵母中复制,从而提高了转化效率。除此之外,到目前为止,还没有关于圆红冬孢酵母游离型质粒及其应用的相关报道。

本研究通过挖掘圆红冬孢酵母 ARS 元件,构建了圆红冬孢酵母的游离型质粒,并进一步将该游离型质粒应用于圆红冬孢酵母的 CRISPR/Cas9 系统,成功实现了编码香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS) 的 *BTS1* 基因的敲除。本研究结果为圆红冬孢酵母构建稳定的游离型质粒表达系统提供了良好的支撑,为该酵母运用 CRISPR/Cas9 系统进行多基因编辑提供了更合适的表达载体。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

本文中用到的圆红冬孢酵母 NP11、NCYC 1585 和 NP11-SpCas9 菌株分别由赵宗保、纪良辉和赵惠民教授提供<sup>[9-11]</sup>,菌株的具体特征见表 1。

#### 1.1.2 培养基及试剂

酵母提取物蛋白胍葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胍 20, 葡萄糖 20; LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, 胰蛋白胍 10, 氯化钠 10。TE 溶液 (g/L): 三羟甲基氨基甲烷 1.21, 乙二胺四乙酸 0.29, pH 调节至 7.5; 酵母基因组提取溶液: 2% 曲拉通 X-100, 1% 十二烷基磺酸钠, 100 mmol/L 氯化钠, pH 值为 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 值为 8.0 的 1 mmol/L 乙二胺四乙酸溶液。

#### 1.1.3 主要仪器

电转仪、PCR 仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop One 型超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; 化学发光成像系统, Azure Biosystems 公司。

### 1.2 克隆反应系统和程序

Golden Gate 克隆反应体系: 按照等摩尔比例加入纯化的载体和片段, *Bsa* I 限制性内切酶 1.6  $\mu$ L, T4 DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L, T4 缓冲溶液 0.2  $\mu$ L, 加无菌水至 20  $\mu$ L 混匀。反应过程: 37  $^{\circ}$ C 30 min; 37  $^{\circ}$ C 10 min, 16  $^{\circ}$ C 5 min, 反应 15 个循环; 16  $^{\circ}$ C 连接 30 min, 80  $^{\circ}$ C 灭活 10 min。

NEBuilder 克隆反应体系: 按照等摩尔比例加入纯化的载体和片段, 2 $\times$ NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液 5  $\mu$ L, 加无菌水至 10  $\mu$ L 混匀, 于 50  $^{\circ}$ C 反应 1 h。

反应完的体系转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并涂布在含有相应抗生素的 LB 琼脂平板上, 选取单克隆用于下一步研究。

表 1 本实验所用的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Descriptions	References
P0	<i>AmpR-Ori</i>	Lab storage
P1	<i>AmpR-Ori-LEU2</i>	This work
P2	<i>AmpR-Ori-LEU2-F1</i>	This work
P3	<i>AmpR-Ori-LEU2-F2</i>	This work
P4	<i>AmpR-Ori-LEU2-F3</i>	This work
P5	<i>AmpR-Ori-LEU2-F4</i>	This work
P6	<i>AmpR-Ori-LEU2-F5</i>	This work
P7	<i>AmpR-Ori-LEU2-F6</i>	This work
P8	<i>AmpR-Ori-LEU2-F7</i>	This work
P9	<i>AmpR-Ori-LEU2-F8</i>	This work
P10	<i>AmpR-Ori-LEU2-F2-1</i>	This work
P11	<i>AmpR-Ori-LEU2-F2-2</i>	This work
P12	<i>AmpR-Ori-LEU2-F2-3</i>	This work
NM810	Rt 5S-(tRNA-Gly)-gRNA scaffold-(tRNA-Arg)-T <sub>35S</sub>	Lab storage
NM810-gRNA1	Rt 5S-(tRNA-Gly)-gRNA1-gRNA scaffold-(tRNA-Arg)-T <sub>35S</sub>	This work
P13	<i>AmpR-Ori-LEU2-F2-2-gRNA1</i>	This work
pZPK-pPGK-BLE-Tnos	pPGK1- <i>BLE</i> -Tnos	[4]
P14	<i>AmpR-Ori-LEU2-F2-2-gRNA1-BLE</i>	This work
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Lab storage
<i>R. toruloides</i> NCYC 1585	<i>MAT-A2 leu2-ino</i>	[9]
<i>R. toruloides</i> NP11	<i>MAT A1</i> , haploid strain	[10]
<i>R. toruloides</i> NP11-SpCas9	<i>MAT A1</i> , haploid strain, NP11-pPGK1-SpCas9-NLS3-Tnos	[11]
Strain A1	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P1	This work
Strain A2	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P2	This work
Strain A3	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P3	This work
Strain A4	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P4	This work
Strain A5	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P5	This work
Strain A6	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P6	This work
Strain A7	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P7	This work
Strain A8	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P8	This work
Strain A9	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P9	This work
Strain A10	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P10	This work
Strain A11	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P11	This work
Strain A12	<i>R. toruloides</i> NCYC 1585 with plasmid P12	This work
Strain A14	<i>R. toruloides</i> NP11-SpCas9 with plasmid P14	This work

### 1.3 酵母基因组 DNA 提取

圆红冬孢酵母基因组 DNA 的提取方法在标准苯酚/氯仿提取法<sup>[12]</sup>的基础上进行了部分改进,增加了用玻璃珠破碎酵母细胞这一操作。

具体如下:圆红冬孢酵母依次经过 PBS 缓冲液处理、玻璃珠破碎、苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, 体积比)抽提、100%乙醇沉淀、70%乙醇洗涤、核糖核酸酶 A 和蛋白酶 K 处理等步骤后,溶解

于 50  $\mu$ L 水溶液, 并保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

#### 1.4 质粒的构建

质粒 P1 的构建。首先, 以圆红冬孢酵母基因组 DNA 为模板, 针对包含  $\beta$ -异丙基苹果酸脱氢酶基因 ( $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase gene, *LEU2*, 1 573 bp)、基因编码区上游 500 bp 的序列(作为启动子)和基因编码区下游 200 bp 序列(作为终止子)的一段核酸序列, 设计引物分两段进行扩增。即分别以 *LEU2*-1F、*LEU2*-1R 和 *LEU2*-2F、*LEU2*-2R 为引物, 扩增片段 *LEU2*-1 和 *LEU2*-2。然后, 与带 *Bsa* I 酶切位点的工具质粒 P0 (含有元件 *Ori-AmpR*) 用 Golden Gate 的方法构建质粒 P1 (含有元件 *AmpR-Ori-LEU2*)。

质粒 P2-P12 的构建。通过在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 上比对序列, 找到了一段 20 kb 的圆红冬孢酵母 *PAL* 及其上下游序列, 将该序列分为 8 段, 每段有 500 bp 的重复序列, 分别命名为 F1-F8。以圆红冬孢酵母基因组 DNA 为模板, 通过设计合适的引物, 成功扩增出这 8 个片段。最后分别将其插入用 *Bgl* II 酶切的质粒 P1 中, 用 NEBuilder 组装方法构建质粒 P2-P9。进而将 F2 片段拆分为 3 个小片段 F2-1、F2-2、F2-3, 用同样的方法构建到质粒 P1 中, 得到质粒 P10-P12。

质粒 P13、P14 的构建。首先, 设计引物 gRNA1F 和 gRNA1R, 互为质粒和模板, 扩增得到 gRNA1 序列, 用 Golden Gate 的方法将其构建到 NM810 质粒上, 得到 NM810-gRNA1 质粒。再以该质粒为模板, 设计引物 gRNAF 和 gRNAR, 扩增得到 gRNA 表达基因盒 (5S rRNA-tRNA-gRNA1-T<sub>35S</sub>), 再用 NEBuilder 组装法将该 gRNA 表达盒插入到质粒 P11 的 *Bgl* II 酶切位点处, 得到质粒 P13 (*AmpR-Ori-LEU2-F2-2-5S rRNA-tRNA-gRNA1-T<sub>35S</sub>*)。

以质粒 pZPK-pPGK-BLE-Tnos<sup>[4]</sup> (表 1) 为模板, 设计引物 BLEF 和 BLER, 扩增得到博来霉素基因表达盒 P<sub>pgk-BLE-Tnos</sub>, 然后将该片段用 NEBuilder 组装法构建到质粒 P13 的 *Bgl* II 酶切位点处, 得到包含 gRNA 和 BLE 表达盒的质粒 P14 (*AmpR-Ori-LEU2-F2-2-5S rRNA-tRNA-gRNA1-T<sub>35S</sub>-pPGK1-BLE-Tnos*)。实验流程图如图 1 所示。

本实验涉及到的质粒和菌株见表 1, 所用的引物序列详见表 S1, 质粒序列见表 S2, 片段 F1-F12 序列见表 S3, gRNA 序列见表 S4。表 S1-S4 数据存储在国家微生物科学数据中心 (National Microbiology Data Center, NMDC), 编号为 NMDCX0000241。

#### 1.5 圆红冬孢酵母电击转化

根据文献[13]报道的方法制备圆红冬孢酵母电转感受态细胞, 然后向 100  $\mu$ L 感受态细胞中加入 2  $\mu$ g DNA, 设置电击电压为 1 400 V, 电阻为 400  $\Omega$ , 电容为 25  $\mu$ F。电击后立即加入 1 mL YPD 培养基, 并在  $30^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 温育 2 h, 使其复苏。最后离心收集菌体, 调整体积后涂布于相应的抗生素抗性平板或营养缺陷型平板上, 于  $30^{\circ}\text{C}$  温箱中培养 2-5 d 至转化子出现。

## 2 结果与讨论

### 2.1 圆红冬孢酵母潜在 ARS 的挖掘

首先通过文献[8]给出的对 *PAL* 片段包括酶切位点在内的描述, 找到了约 20 kb 的核酸片段, 该片段包括 *PAL* 基因及其上下游序列。通过设计相应的引物, 以圆红冬孢酵母野生型菌株 NP11 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 分 8 段扩增了这段序列, 每个片段的长度为 3 000 bp, 并设计了相邻 DNA 片段之间的 500 bp 重叠, 片段分别命名为 F1-F8 (图 2A)。

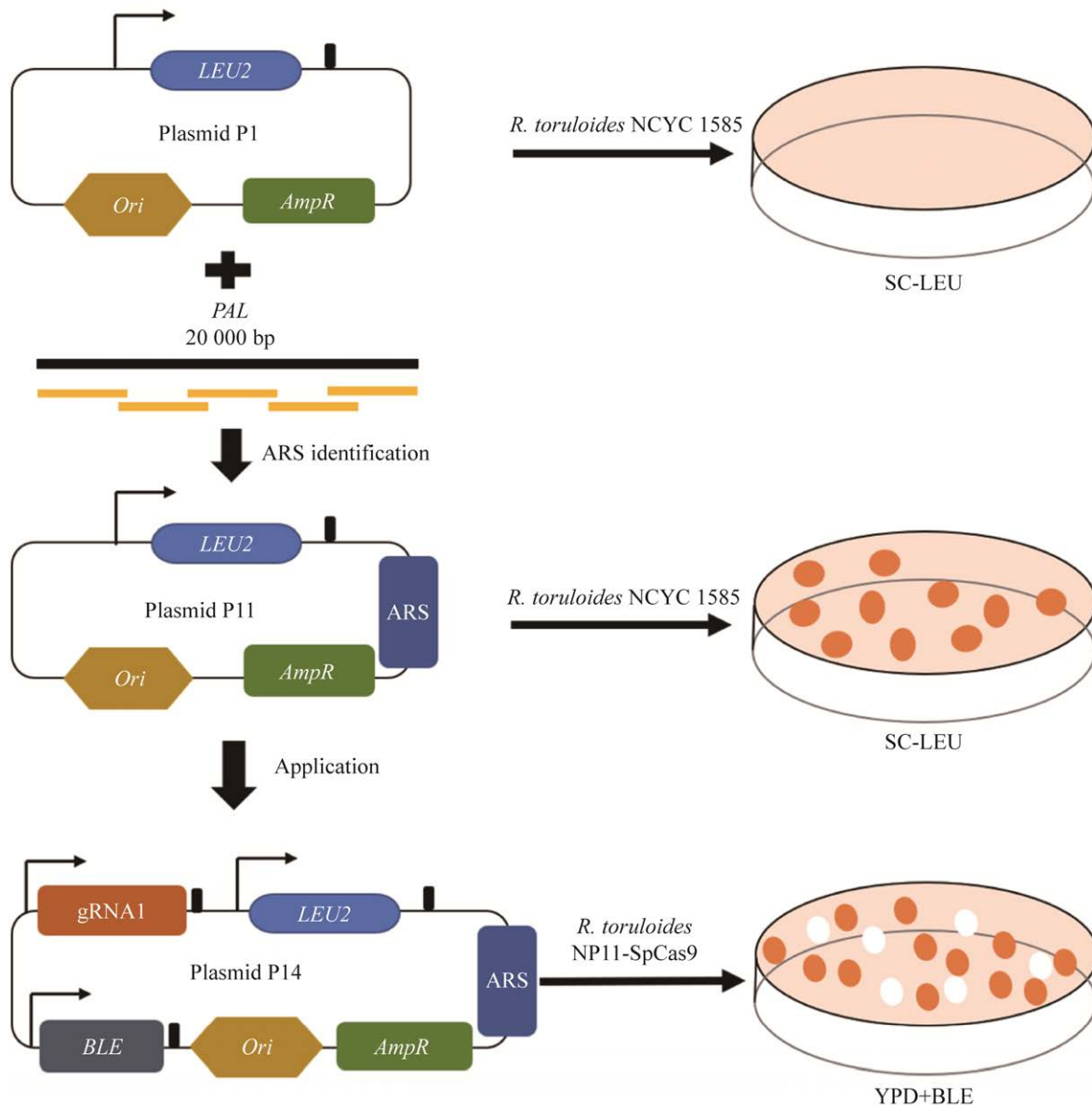


图 1 研究流程示意图

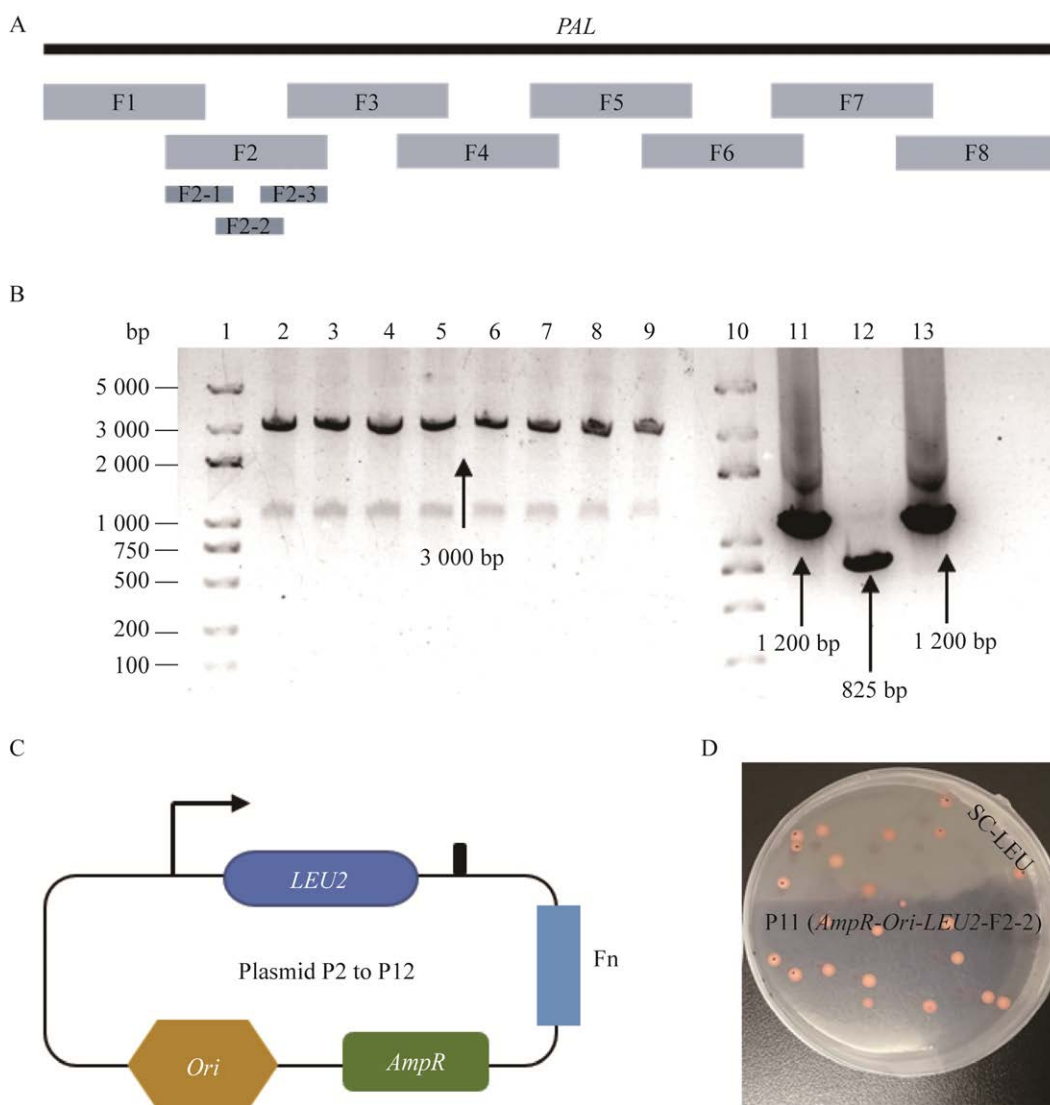
Figure 1 Workflow diagram of the research. *Ori*: Replication origin of *E. coli*; *LEU2*: The gene encoding  $\beta$ -isopropyl malate dehydrogenase; *AmpR*: Ampicillin resistance gene; *PAL*: Phenylalanine ammonia-lyase gene; *ARS*: Autonomously replicating sequence; *BLE*: Bleomycin resistance gene.

其次, 本研究构建了一个工具质粒 P1, 它包含 *Ori* 序列、*LEU2* 基因表达盒、*AmpR* 抗生素基因和两个 *Bsa* I 酶切位点, 方便后续片段的组装, 该质粒构建过程见图 3。

然后, 将上述扩增得到的 8 个 DNA 片段 (F1–F8, 凝胶电泳图见图 2B) 分别组装到质粒

P1 中。至此, 一个可能携带 *ARS* 的环状质粒文库 (P2–P9) 构建成功 (图 2C)。

在圆红冬孢酵母中, 应用最广泛、效率最高的转化方法为农杆菌转化法, 该方法是将位于两段 T-DNA 中间的片段整合到酵母基因组上, 不能完成游离型质粒的转化。然而电转化



**图 2 ARS 的鉴定**

Figure 2 Identification of ARS. A: Divide the 20 kb *PAL* fragment into eight fragments from F1 to F8 of about 3 000 bp. F2 fragment was further divided into three smaller fragments-F2-1, F2-2, F2-3. B: Agarose gel electrophoresis of amplified *Fn* fragments, n=1, 2, 3...8, 2-1, 2-2, 2-3. Lane 1, Lane 10: DNA marker; Lane 2-9: Amplified fragment from F1 to F8, 3 000 bp; Lane 11: Amplified fragment F2-1, 1 200 bp; Lane 12: Amplified fragment F2-2, 825 bp; Lane 13: Amplified fragment F2-3, 1 200 bp. C: Schematic diagram of plasmids P2 to P12. *AmpR*: Ampicillin resistance gene; *Ori*: Replication origin of *E. coli*; *LEU2*: The gene encoding  $\beta$ -isopropyl malate dehydrogenase. D: Transformants on SC-LEU medium after the plasmid P11 was transformed into *LEU2* gene-deficient *Rhodospiridium toruloides* NCYC 1585 by electroporation.

技术能够将外源基因片段或者质粒随机整合到宿主中，所以本文采用电转化的方法将这些质粒(P2-P9)导入到圆红冬孢酵母 NCYC 1585 菌株中，涂布在 SC-LEU 的营养缺陷型固体培养

基上。由于 NCYC 1585 菌株是 *LEU2* 基因缺陷型菌株，所以只有成功将质粒导入的菌株会在上述缺陷型培养基上生长，并可根据长出的单克隆数量来计算转化效率。



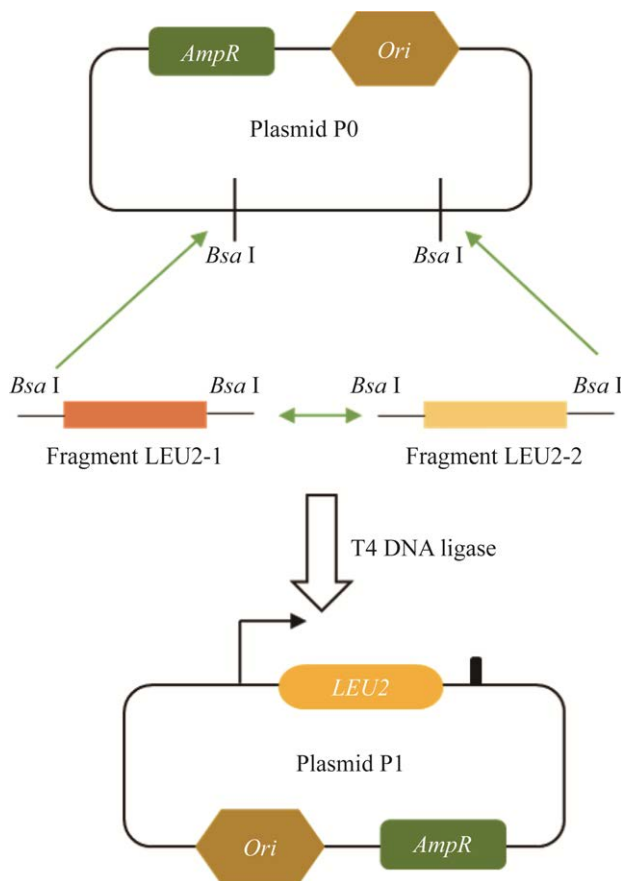


图 3 质粒 P1 的构建过程

Figure 3 The construction process of plasmid P1. *AmpR*: Ampicillin resistance gene; *Ori*: Replication origin of *Escherichia coli*; *LEU2*: The gene encoding  $\beta$ -isopropyl malate dehydrogenase.

结果显示, 在质粒 P2–P9 中, 只有将质粒 P3 (包括 F2 片段) 导入圆红冬孢酵母后, 在 SC-LEU 固体培养基上有 13 个单克隆长出, 因此推断 F2 片段中可能包含圆红冬孢酵母的 ARS 序列。为了进一步缩短 ARS 的长度, 将 3 000 bp 的 F2 片段继续分成 3 个 DNA 片段 F2-1、F2-2、F2-3, 每个片段之间有 200 bp 的重复序列, 并将它们插入到 P1 质粒的 *Bgl* II 酶切位点处, 得到了质粒 P10–P12。结果表明, 只有将质粒 P11 (包含 F2-2 片段) 导入圆红冬孢酵母后, 在 SC-LEU 固体培养基上有 22 个单克隆长出(图 2D)。转化

效率比 P3 略有提高, 可能是由于缩短了 ARS DNA 序列的长度, 从而减小了质粒大小。因此, 经过几轮筛选, 获得了一个包含复制起始活性的 825 bp 的 F2-2 片段。包括白色念珠菌和酿酒酵母在内的一部分酵母的 ARS 中存在 14 bp 的核心序列, 其中包含一个富含 AT 的高度保守序列 A(T)TTTATT(G)TTA(T)<sup>[14-15]</sup>。而另一部分酵母, 如粟酒裂殖酵母, 其 ARS 却没有这样的核心保守序列<sup>[16]</sup>。可能由于圆红冬孢酵母的 G+C 含量较高, 平均为 62%<sup>[17]</sup>, 所以没有在该 ARS 中找到富含 AT 的核心保守序列。酿酒酵母 ARS 功能的最小大小为 100–150 bp, 而粟酒裂殖酵母 ARS 功能的最小大小约为 500–1 500 bp<sup>[16]</sup>, 鉴定的该圆红冬孢的 ARS 为 825 bp, 经过比对分析, 并没有发现该序列和其他菌株已有的 ARS 有相同或相似序列。

其次, 有必要验证 P11 质粒在圆红冬孢酵母内是否以环状形式存在。因此, 本研究设计了一个涉及两组直接相邻的反向引物对的 PCR 检测(图 4A)。一对引物与质粒的 *Ori* 区域结合, 另一对引物与 *LEU2* 基因的启动子区域结合。提取圆红冬孢酵母菌株 A11 的基因组并以其作为 PCR 模板, PCR 检测结果显示酵母细胞中存在完整的环状质粒(图 4B), 表明本研究鉴定的序列 F2-2 包含 ARS 位点, 可以介导圆红冬孢酵母中环状质粒的复制和维持。

## 2.2 圆红冬孢酵母游离型质粒的应用

CRISPR/Cas9 作为一种新型的基因组编辑工具, 因其方便、高效, 近几年来也被成功地应用在圆红冬孢酵母中<sup>[18-19]</sup>。由于圆红冬孢酵母目前仍没有稳定遗传的游离型质粒, 所以 Cas9 和 sgRNA 表达盒都是通过农杆菌转化或化学转化随机整合到基因组中, 这可能导致位于整合位点的基因失活, 产生一些未知的影响。然而农杆菌介导的转化耗时多, 每完成一次转化需



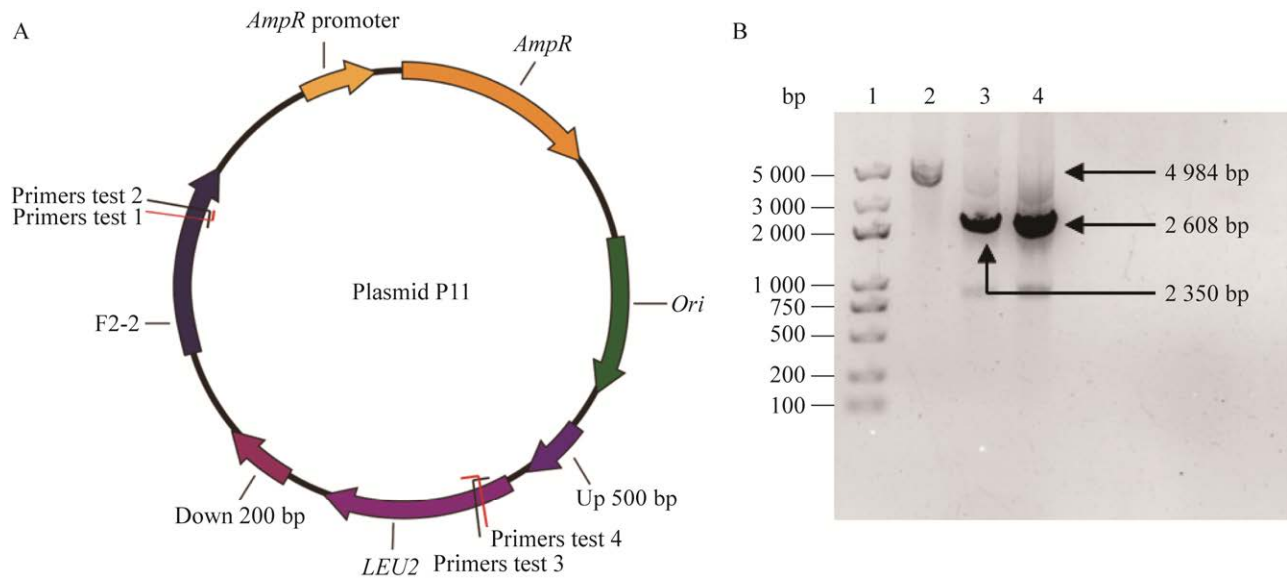


图 4 圆红冬孢酵母菌株 A11 中游离型质粒 P11 的表征

Figure 4 Characterization of the episomal plasmid P11 in *Rhodosporidium toruloides* strain A11. A: The map of 4.9 kb plasmid P11 and the primer pairs for PCR detection. B: PCR detection results for the circular plasmid of P11. Lane 1: DNA marker; Lane 2: Primers test 1 and test 2, 4 984 bp; Lane 3: Primers test 2 and test 4, 2 350 bp; Lane 4: Primers test 1 and test 3, 2 608 bp.

要两周的时间；化学转化法效率很低，不适合圆红冬孢酵母 CRISPR/Cas9 系统的操作，所以本研究将上述构建的游离型质粒应用于圆红冬孢酵母的 CRISPR/Cas9 系统中，验证其是否能顺利表达 sgRNA，从而实现基因编辑的目的。

圆红冬孢酵母可天然合成  $\beta$ -胡萝卜素，这也是该酵母为红色的原因。在本研究中，选取的敲除靶点为  $\beta$ -胡萝卜素合成途径中编码香叶基香叶基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS)的基因 *BTS1*，缺失 *BTS1* 基因的圆红冬孢酵母会由红色变为白色。在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 上获得该基因序列。在其基因外显子区域设计了一个 gRNA，即 gRNA1。用电转化方法将包含 gRNA1 和博来霉素抗生素表达盒的质粒 P14 (*AmpR*-*Ori*-*LEU2*-*F2-2*-5S rRNA-tRNA-gRNA1-*T*<sub>35S</sub>-pPGK1-*BLE*-*T*<sub>nos</sub>)，图 5)用电转化法转化圆红冬孢酵母 NP11-SpCas9 菌株中，并涂布在带有博来霉素抗性的 YPD 筛

选平板上，得到菌株 A14，共有 89 个单克隆，其中有 6 个为白色，敲除效率为 6.7%。同时将质粒 P14 通过农杆菌转化的方法导入圆红冬孢酵母 NP11-SpCas9 菌株中，涂布在带有博来霉素抗性的 YPD 筛选平板上，共得到 59 个单克隆，其中有 36 个为白色，其敲除效率为 61.0%。结果表明，构建的游离型质粒可以成功地应用于圆红冬孢酵母的 CRISPR/Cas9 系统中，但是其基因编辑效率较低。可能因为转化方法的不同导致转化效率不同，进而影响最终的编辑效率；此外，目前含 ARS 的质粒表达不稳定也可能是造成其编辑效率低的原因之一。下一步可以通过优化转化方法和提升质粒稳定性来提高游离型质粒的编辑效率。相对于目前基于整合表达 gRNA 的农杆菌转化方法来说，本研究基于游离型质粒表达的电转化方法更具有灵活性和便利性，可节省大约 9 d 时间，缩短了研究周期。

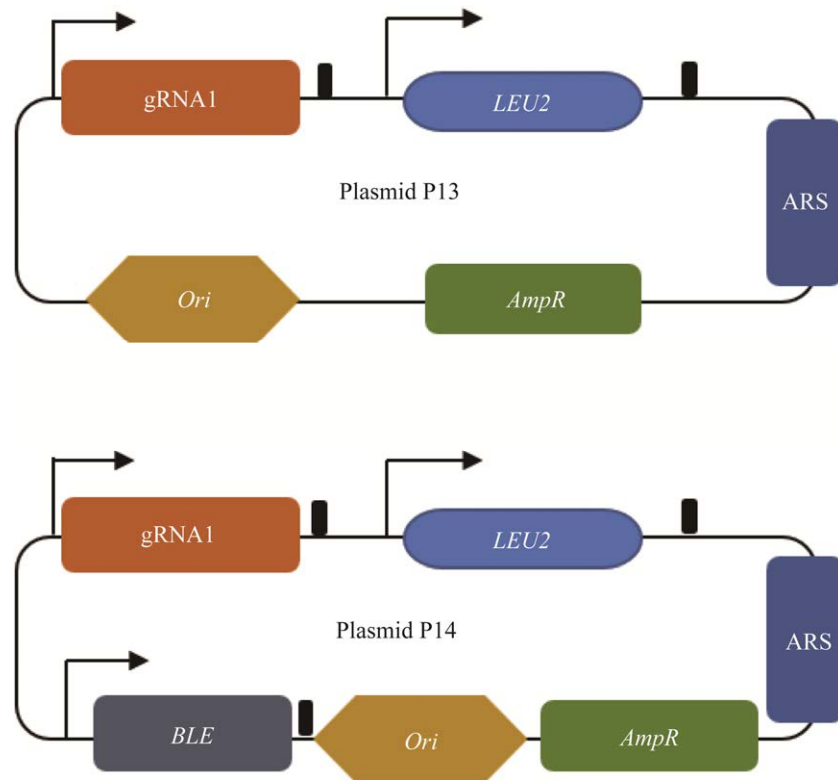


图 5 用于敲除圆红冬孢酵母菌株 *BTS1* 基因的质粒 P13 和 P14 示意图

Figure 5 Schematic illustration of plasmids P13 and P14 used to knock out the *BTS1* gene in *Rhodospiridium toruloides*.

### 3 结论

(1) 前人研究圆红冬孢酵母 *PAL* (苯丙氨酸氨裂解酶) 基因时发现了一种不稳定的圆红冬孢酵母质粒, 猜测该基因或邻近序列中可能包含圆红冬孢酵母的一个自主复制序列。在此研究的基础上, 本工作通过对 *PAL* 基因及其上下游序列的进一步分析, 得到了该酵母的一个自主复制序列 F2-2。

(2) 构建了圆红冬孢酵母基于自主复制序列的游离型质粒, 并将该质粒应用于圆红冬孢酵母的 CRISPR/Cas9 系统。本研究丰富了圆红冬孢酵母现有的工具库, 为圆红冬孢酵母运用 CRISPR/Cas9 系统进行多重基因编辑提供了良好的研究基础, 对其代谢工程应用和合成生物

学研究有着重要意义。

总之, 通过挖掘圆红冬孢酵母自主复制序列元件, 构建了该酵母的游离型质粒, 进一步应用于 CRISPR/Cas9 系统中。以上方法有望成为圆红冬孢酵母遗传工具的有力补充, 并进一步促进圆红冬孢酵母作为生物制造平台的发展。

### 参考文献

- [1] OLIVEIRA PH, MAIRHOFER J. Marker-free plasmids for biotechnological applications-implications and perspectives[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(9): 539-547.
- [2] PARK YK, NICAUD JM, LEDESMA-AMARO R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(3): 304-317.

- [3] WEN ZQ, ZHANG SF, ODOH CK, JIN MJ, ZHAO ZK. *Rhodospiridium toruloides*-a potential red yeast chassis for lipids and beyond[J]. *FEMS Yeast Research*, 2020, 20(5): foaa038.
- [4] LIN XP, WANG YN, ZHANG SF, ZHU ZW, ZHOU YJ, YANG F, SUN WY, WANG XY, ZHAO ZK. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(4): 547-555.
- [5] ZHANG Y, PENG J, ZHAO HM, SHI SB. Engineering oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* for overproduction of fatty acid ethyl esters[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 115.
- [6] SCHWARZHANS JP, WIBBERG D, WINKLER A, LUTTERMANN T, KALINOWSKI J, FRIEHS K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 1-15.
- [7] TAN XY, WU XL, HAN MZ, WANG L, XU L, LI BZ, YUAN YJ. Yeast autonomously replicating sequence (ARS): identification, function, and modification[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2021, 21(7): 464-474.
- [8] TULLY M, GILBERT HJ. Transformation of *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Gene*, 1985, 36(3): 235-240.
- [9] WANG YN, ZHANG SF, PÖTTER M, SUN WY, LI L, YANG XB, JIAO X, ZHAO ZK. Overexpression of  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 180(8): 1497-1507.
- [10] JOHNS AMB, LOVE J, AVES SJ. Four inducible promoters for controlled gene expression in the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1654-1666.
- [11] SCHULTZ JC, CAO MF, ZHAO HM. Development of a CRISPR/Cas9 system for high efficiency multiplexed gene deletion in *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(8): 2103-2109.
- [12] NEUMANN B, POSPIECH A, SCHAIRER HU. Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria[J]. *Trends in Genetics*, 1992, 8(10): 332-333.
- [13] LIU HD, JIAO X, WANG YN, YANG XB, SUN WY, WANG JH, ZHANG SF, ZHAO ZK. Fast and efficient genetic transformation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* by using electroporation[J]. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(2): fox017.
- [14] CANNON RD, JENKINSON HF, SHEPHERD MG. Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (ARS) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and General Genetics*, 1990, 221(2): 210-218.
- [15] SINGH VK, KRISHNAMACHARI A. Context based computational analysis and characterization of ARS consensus sequences (ACS) of *Saccharomyces cerevisiae* genome[J]. *Genomics Data*, 2016, 9: 130-136.
- [16] DUBEY DD, KIM SM, TODOROV IT, HUBERMAN JA. Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin[J]. *Current Biology*, 1996, 6(4): 467-473.
- [17] ZHOU RH, ZHU ZW, ZHANG SF, ZHAO ZK. The complete mitochondrial genome of the lipid-producing yeast *Rhodotorula toruloides*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2020, 20(6): foaa048.
- [18] OTOUPAL PB, ITO M, ARKIN AP, MAGNUSON JK, GLADDEN JM, SKERKER JM. Multiplexed CRISPR-Cas9-based genome editing of *Rhodospiridium toruloides*[J]. *mSphere*, 2019, 4(2): e00099-19.
- [19] JIAO X, ZHANG Y, LIU XJ, ZHANG Q, ZHANG SF, ZHAO ZK. Developing a CRISPR/Cas9 system for genome editing in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(7): e1900036.