



CRISPR-Cas9 系统与 *mazF* 介导的大片段删减法在酿酒酵母染色体大片段删减中的比较

吴玉珍¹, 徐海津¹, 白艳玲¹, 张秀明¹, 乔明强^{1,2*}

¹南开大学生命科学学院, 天津 300071

²南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要:【目的】比较 CRISPR-Cas9 系统与 *mazF* 法这两种酿酒酵母染色体大片段删减方法。【方法】分别用上述两种方法删减了酿酒酵母长度为 26.5 kb 的染色体大片段 YKL072W-YKL061W, 并比较了两种方法的转化效率、敲除成功率。【结果】利用 CRISPR-Cas9 系统平均得到 5 个转化子, 但正确率为 100%; *mazF* 法得到约 100 个转化子, 正确率略低于前者, 为 93%。【结论】两种方法均能高效删减酿酒酵母染色体大片段, CRISPR-Cas9 系统正确率较高, 操作简便省时; *mazF* 法相对稳定, 对目的基因无 PAM 位点要求。

关键词: 酿酒酵母, 大片段删减, CRISPR-Cas9, *mazF*, 方法比较

酿酒酵母作为真核模式生物, 由于具有繁殖快、无致病性、遗传背景清晰等优势, 多年来被广泛应用于工业生产及生物学研究^[1]。基于合成生物学中底盘细胞的概念, 在酿酒酵母基因组精简的过程中^[2], 染色体大片段删减成为一种必要的手段。在酿酒酵母中删减染色体大片段, 染色体裂分技术^[3]、Cre-*loxP* 系统^[4]以及 Latour 法^[5]都是比较成熟的常用手段。然而这几种方法在打靶效率、同源区残留问题以及操作简便性等方面都有待提高。近年来, 利用 CRISPR-Cas 系统进行基因编辑

已成为研究热点, 在大肠杆菌^[6]、酿酒酵母^[7-9]、大米^[10]、小鼠^[11]等生物中均有报道。

CRISPR-Cas 系统是细菌和古生菌利用 RNA 引导的核酸酶来抵御病毒、质粒等外源入侵核酸的免疫系统, CRISPR 全名为成簇的规律间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats), Cas 为 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated proteins)。CRISPR-Cas 系统分为 3 个主要类型及 11 个亚型^[12]。其中 II 型 CRISPR-Cas 系统中以 Cas9 为标志蛋白。CRISPR-Cas

基金项目: 国家自然科学基金(31470004); 国家“973 计划”(2011CBA00802)

*通信作者。Tel: +86-22-23503340; E-mail: qiaomq@nankai.edu.cn

收稿日期: 2016-11-15; 修回日期: 2017-02-22; 网络出版日期: 2017-02-27

系统发挥作用靠 RNA 复合物的引导作用以及 Cas9 核酸酶的剪切作用。其中 RNA 复合物由 CRISPR RNA (crRNA)和反式激活 CRISPR RNA (tracrRNA)组成, crRNA 包含了 20–30 bp 的靶序列以及能与 tracrRNA 结合的序列,二者结合成能够被 Cas9 核酸酶识别的 RNA 二聚体复合物,进而引导 Cas9 核酸酶切割邻近 PAMs 的靶序列。目前广泛应用的是简化的 II 型 CRISPR-Cas 系统,该系统中的 gRNA 由 crRNA 以及确定的 tracrRNA 融合而成,应用时只需更换 gRNA 5'端 20 bp 的靶序列即可^[13]。需要注意的是,选择的靶序列一定要紧挨着 PAM 序列(一般为 NGG 形式)的 5'端。

Cas9 核酸酶介导的 DNA 双链断裂可以通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组方式(homology-directed repair, HDR)两种手段进行修复。NHEJ 方式可能会导致双链断裂位置不同长度的插入或缺失突变;HDR 方式则可以通过基因组 DNA 与 DNA 修复模板的同源重组进行精确的点突变或外源基因插入。

mazF 基因是来源于大肠杆菌中编码核酸内切酶的毒力基因, MazF 能够特异性切割游离 mRNA 的 ACA 位点,因此 MazF 蛋白的表达能够导致原核及真核细胞的程序性死亡^[14]。本实验中即利用 *mazF* 该特点,将其作为负筛标记进行大片段删减及筛选标记回收。

本文通过利用 CRISPR-Cas 系统以及 *mazF* 介导的大片段删减方法同时对酿酒酵母中的染色体大片段进行删减,将两种方法的转化效率、删除成功率以及操作简便性等方面进行了比较,为以后在酿酒酵母中进行大片段删减的方法选择提供了依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和引物: 本研究中用到的菌株和质粒如表 1 所示,本研究中用到的引物由金唯智生物科技(北京)有限公司合成,信息如表 2 所示。

1.1.2 培养基和生长条件: YPD 培养基(g/L): 20 g 葡萄糖, 20 g 蛋白胨, 10 g 酵母粉, 1 L ddH₂O。合成培养基 SC (g/L): 20.0 g 葡萄糖, 5.0 g 硫酸铵, 1.7 g 无氨基酵母氮源, 1.3 g 氨基酸混合物, 1 L ddH₂O。碳源更换为同等比例半乳糖的合成培养基作为 *mazF* 负筛培养基。营养缺陷培养基则为添加了相应氨基酸缺陷的氨基酸混合物的合成培养基。LB 培养基(g/L): 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g 氯化钠, 1 L ddH₂O。氨苄青霉素的使用浓度为 100 μg/mL。固体培养基加入 20 g/L 琼脂粉。BY4741 的培养条件为 30 °C, 200 r/min; 大肠杆菌培养条件为 37 °C, 200 r/min。

表 1. 本研究中所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source
BY4741	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i>	EUROSCARF
IMX581	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52 can1_::cas9-natNT2</i> ; <i>TRP1</i> ; <i>LEU2</i> ; <i>HIS3</i>	EUROSCARF
41-cas9	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>met15Δ0 can1_::cas9-LEU2</i>	This study
pUG73	Template for <i>LEU2</i>	EUROSCARF
pROS10	2 μm amp ^R <i>URA3</i> gRNA- <i>CAN1.Y</i> gRNA- <i>ADE2.Y</i>	EUROSCARF
pROS10-11L	2 μm amp ^R <i>URA3</i> gRNA- <i>STB6</i> gRNA- <i>BLI1</i>	This study
pGREG506- <i>mazF</i>	Template for <i>mazF</i>	This study

表 2. 本研究中使用的引物
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Target genes
HRA-F	ATGCTTCTACTCCGTCTGCT	Upstream region of CAN1
HRA-R	ATTTTGAAGCTATGAGCTCCAGCTTCGGCCACATTTATGACGATC	Upstream region of CAN1
Cas9-F	ATAATGATCGTCATAAATGTGGCCGAACTGGAGCTCATAGCTTC	<i>Cas9</i>
Cas9-R	CCTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGCCGCAAATTAAGCCCTTCGAG	<i>Cas9</i>
Leu2-F	GACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	<i>LEU2</i>
Leu2-R	AGAAGAGTGGTTGCGAACAGAGTAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	<i>LEU2</i>
HRB-F	TATCAGATCCACTAGTGGCCTATGCTTACTCTGTTCGCAACCACT	Downstream region of CAN1
HRB-R	CTTGTCCCTTATTAGCCTTG	Downstream region of CAN1
6005	GATCATTATCTTTACTGCGGAGAAG	Backbone of pROS10
YKL072W-F	TGCGCATGTTTCGGCGTTCGAACTTCTCCGCAGTGAAAGATAAATGATCTCAA ATTCAAATTTATCACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG TCCGTTATCAAC	2 μm fragment
YKL061W-F	TGCGCATGTTTCGGCGTTCGAACTTCTCCGCAGTGAAAGATAAATGATCTGAC ATGAAGTTAAATATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG TCCGTTATCAAC	2 μm fragment
11L-det-F	GACAAGACCACCGAGTCGAAT	Detection of deletant strain
11L-det-R	TTTGTACGCTGGTGACATCG	Detection of deletant strain
11L repair-F1	GTGGATATACGTAATGCACATT	Donor DNA
11L repair-R1	TCGATCTATCGTTTTTGTAGCTTTTTCCCCCAGCAAATATATT	Donor DNA
11L repair-F2	AATATATTTGCTGGGGGAAAAAGCTATCAA AAACGATAGATCGA	Donor DNA
11L repair-R2	AGTTTTTTAATGAGTATTGAATCTG	Donor DNA
B29-F	CACCGAGTCGAATCCAAGTT	HR1
B29-R	TAATCGATCTATCGTTTTTGTAGCTTTTTCCCCCAGCAAATATAT	HR1
B30-F	AATAATATATTTGCTGGGGGAAAAAGCTATCAAAAACGATAGATCGAT	HR3
B30-R	GCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTCCAGAAATCTTGGCTGAACAC	HR3
mazF-F	TTTGGTGTTCAGCCAAGATTTCTGGAACCCTACTAAAGGGAACA	<i>mazF</i>
mazF-R	CCTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGTGCTGGTTCGCTATACTGCT	<i>mazF</i>
B31-F	ATCGACAGCAGTATAGCGACCAGCACAGCTGAAGCTTCGTACGC	<i>LEU2</i>
B31-R	TCTGATGAGTGGCTTCCAGTTGCATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	<i>LEU2</i>
B32-F	TATCAGATCCACTAGTGGCCTATGCATGCAACTGGAAGCCACTC	HR2
B32-R	GTTGGAAATCCGACGTTATT	HR2

1.1.3 主要试剂: SORB: 0.1 mol/L 醋酸锂, 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8, 用 1 mol/L 储液稀释), 0.001 mol/L EDTA/NaOH (pH 8, 用 0.5 mol/L 储液稀释), 1 mol/L 山梨醇, 调节 pH=8, 灭菌后室温保存。40% PEG: 0.1 mol/L 醋酸锂, 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8, 用 1 mol/L 储液稀释), 0.001 mol/L EDTA/NaOH (pH 8, 用 0.5 mol/L 储液稀释), 40% PEG3350, 过滤除菌, 4 °C 保存。实验所用氨基

酸、抗生素购于鼎国科技生物有限公司; 质粒快速小提试剂盒购于天根生物科技公司; PCR 试剂, DNA marker 购于宝生物工程有限公司; 大肠杆菌感受态 DH5α 购于康为世纪生物技术有限公司。

1.2 利用 CRISPR-Cas9 系统进行基因组大片段删减

CRISPR-Cas9 系统主要通过介导染色体双链断裂(DSB), 进而以修复片段为模板进行 DNA 修

复, 从而达到大片段删减的目的, 工作原理简图如图 1 所示。为了提高大片段删减的成功率, 本文在目的片段的两端选取了 2 个靶点, 如图 1 中箭头所指。修复片段如图所示由目的基因上下游片段融合而成, 通过共转化带有 2 个靶序列的 gRNA 表达质粒与修复片段发生染色体双链断裂与定向修复。最终通过菌落 PCR 与测序确认目的大片段的删除。

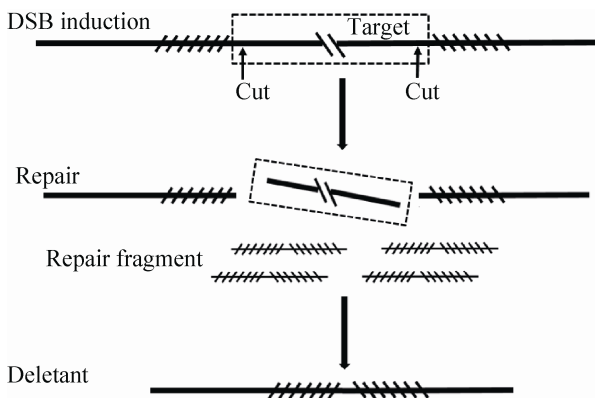


图 1. CRISPR-Cas9 系统删减方法示意图
Figure 1. Schematic representation of the CRISPR-Cas9 system deletion method.

1.2.1 Cas9 蛋白表达菌株的构建: 通过酵母基因组数据库(Saccharomyces Genome Database, SGD) 查询基因 *can1* 序列, 设计引物 HRA-F/R、HRB-F/R, 以酿酒酵母基因组为模板分别扩增 *can1* 基因的上

下游片段作为同源重组的同源臂。以质粒 pUG73 为模板扩增 *LEU2* 标记, 以菌株 IMX581 基因组为模板扩增 *cas9* 基因。将含有搭叠序列的片段共转化导入细胞, 利用酿酒酵母的同源重组系统获得 *cas9* 与 *LEU2* 整合到酿酒酵母染色体上 *can1* 基因位置的 Cas9 蛋白表达菌株。

1.2.2 gRNA 表达质粒的构建^[8]: 以质粒 pROS10 作为 gRNA 表达质粒, 可搭载 2 个靶序列 gRNA。首先 PCR 扩增得到 pROS10 质粒骨架以及带有 2 个靶点 gRNA 序列的 2 μm 片段, 将纯化回收的 2 个片段转化至酿酒酵母 BY4741, 利用质粒 pROS10 所带的 *URA3* 筛选标记进行筛选。挑选单菌落接种至液体培养基, 提取质粒回转至大肠杆菌 DH5α 扩增质粒, 进行测序比对后, 选取带有两个正确 gRNA 靶序列的质粒, 并保存菌种。

1.3 *mazF* 作为负筛标记的大片段删减方法^[14-15]

利用 *mazF* 作为负筛标记的大片段删减方法主要有两步, 如图 2 所示, 首先利用同源重组将同源臂、*LEU2* 标记以及 *mazF* 表达盒整合到目的大片段的上游, 得到中间态菌株。第二步, 通过诱导表达毒力基因 *mazF* 发生第 2 次同源重组, 将目的大片段以及筛选标记弹出, 得到大片段无痕删减的最终缺失态菌株。

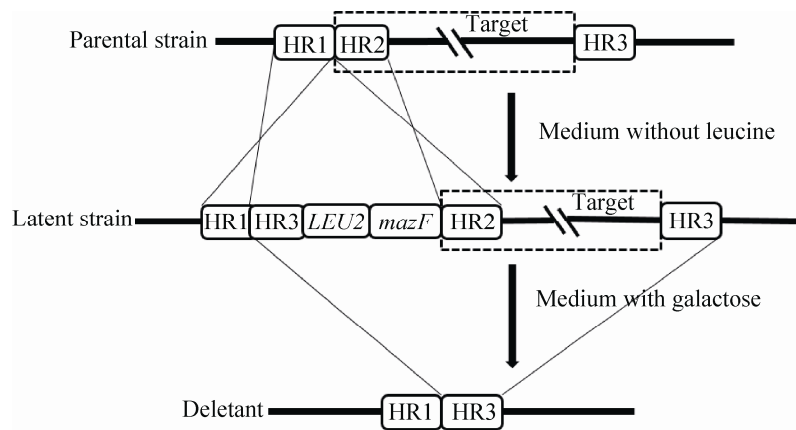


图 2. *mazF* 介导的删减方法示意图
Figure 2. Schematic representation of the *mazF*-mediated deletion method.

1.4 酿酒酵母感受态的制备及转化^[16]

制备酿酒酵母感受态细胞：1.5 mL 离心管室温收集酵母菌体，加入 1 mL 无菌水漂洗，再加入 1 mL SORB 进行漂洗。最后用 50 μ L SORB 悬浮，加入 4 μ L 鲑精 DNA 后用于转化或 -80°C 保存。

酿酒酵母转化是基于 LiOAc 法。取 80 μ L 酵母感受态细胞，加入 1/5 体积质粒 DNA 或 PCR 片段产物充分混匀。加入 6 倍体积 40% PEG，混匀后室温放置 30 min。加入 1/9 体积 DMSO 混匀后 42 $^{\circ}\text{C}$ 热击 15 min。离心去上清后加入 100 μ L 无菌水涂布平板。

1.5 基因组大片段删减菌株的表型检测

为了检测大片段缺失菌株的生长表型，本文测定了出发菌株及大片段删减菌株的生长曲线以及在不同压力条件下菌株的生长情况。菌株起始 OD 调为 0.1，接菌至含 20 mL YPD 培养基摇瓶中，间隔 8 h 利用分光光度计测定 OD_{600} 吸光值。为了检测大片段缺失菌株的抗逆性有无变化，将 10 倍梯度稀释的菌液点至 YPD 平板以及分别添加了 8%乙醇、1.5 mol/L NaCl、1 mol/L 山梨醇的平板上。为了检测菌株的耐热性，将菌液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后稀释点板。通过添加 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液配置 pH 8.5 的碱性平板，检测耐碱性。

2 结果和分析

2.1 Cas9 蛋白表达菌株的构建

为了避免每次删减时都转化 *cas9* 基因表达质粒，本实验首先将 *cas9* 基因整合到酿酒酵母 BY4741 染色体上 *can1* 基因座，构建了 1 株 Cas9 蛋白表达菌株，命名为 41-cas9 菌株。PCR 扩增 *cas9* 基因、同源臂 HRA、HRB 以及 *LEU2* 筛选标记。共转化 4 个片段，通过菌落 PCR^[17]初步检测

整合成功的转化子。转接初步验证正确的转化子，转化靶点为 *ade2* 基因的质粒 pROS10，将转化所得转化子点接到 YPD 平板，如图 3 所示，可以观察到有变红的菌落出现，证明 *cas9* 基因正确整合到染色体并表达出具有生物活性的 Cas9 蛋白，在 *ade2* 基因位置进行切割导致其失活。

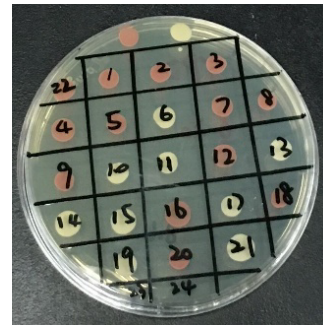


图 3. *ade2* 基因突变菌落表型

Figure 3. Phenotype of colonies with *ade2* gene mutated.

2.2 构建 gRNA 表达质粒进行酿酒酵母大片段删减

本文选取质粒 pROS10 作为 gRNA 表达质粒，可搭载 2 个靶序列 gRNA。以大片段 YKL072W-YKL061W 作为删减对象，该片段共包括 14 个 ORF，全长约为 26.5 kb，如表 3 所示。分别选取大片段两端基因 *STB6* 和 *BLI1* 作为 Cas9 切割位点。PCR 克隆 pROS10 质粒骨架和两侧分别带有含 *STB6* 和 *BLI1* 靶序列 gRNA 的 2 μ m 片段后转化至酿酒酵母进行组装，提取质粒回大肠杆菌扩增，经测序正确的质粒命名为 pROS10-11L。供体 DNA 由删减片段上下游片段融合而成，大小为 500 bp 左右。将质粒 pROS10-11L 与修复片段一起转化至菌株 41-cas9，涂布 SC-ura-leu 平板。通过 6 次平行实验，转化子个数平均为 5 个(表 4)，以引物对 11L-det-F/R 进行菌落 PCR 检测，条带大小为 1200 bp，符合预期，如图 4 所示。测序验证正确敲

表 3. 删减大片段所包含 ORFs 信息

Table 3. The information of ORFs included in the deletion region

Systematic name	Standard name	Length/ bp
YKL061W	<i>BLI1</i>	342
YKL062W	<i>MSN4</i>	1893
YKL063C		504
YKL064W	<i>MNR2</i>	2910
YKL065C	<i>YET1</i>	621
YKL065C-A		222
YKL066W		444
YKL067W	<i>YNK1</i>	462
YKL068W	<i>NUP100</i>	2880
YKL068W-A		237
YKL069W		543
YKL070W		510
YKL071W		771
YKL072W	<i>STB6</i>	2301

表 4. CRISPR-Cas9 系统与 *mazF* 法的比较

Table 4. Comparison of CRISPR-Cas9 system and *mazF*-mediated method

Methods	Clone No. ^a	Clones with expected deletion/%
CRISPR-Cas9	5	100 (30/30)
<i>mazF</i>	100	93 (28/30)

^a Values represent results of six independent operations.

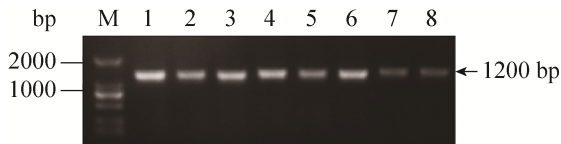


图 4. 大片段删除 PCR 检测电泳图

Figure 4. Identify of large deletion. M: DL2000 marker; lane 1-8: PCR amplification with 11L-det-F/R.

除大片段。验证正确的 YKL072W-YKL061W 片段缺失菌命名为 W4。未加修复片段的对照平板平均得到 2 个转化子，均为假阳性。转化子的数目偏少可能是由于同时进行 2 个位点的双链断裂而对菌体有损伤。

2.3 *mazF* 作为负筛标记的大片段删减

该方法在 Latour 法的基础上将负筛标记 *URA3* 更换为 *mazF* 标记。通过半乳糖诱导 *mazF* 表达进行第 2 次同源重组，得到 100 个转化子(表 4)。随机选取 30 个转化子同样进行菌落 PCR，正确率达

93%。检测结果如图 5。

2.4 大片段删减菌株的表型检测

出发菌株及大片段 YKL072W-YKL061W 缺失菌 W4 生长曲线如图 6 所示。可见缺失菌株 W4 生长并未受到影响，与出发菌株几乎没有区别。抗逆性点板实验结果如图 7 所示，在 YPD、8%乙醇、1.5 mol/L NaCl、1.0 mol/L 山梨醇、pH 8.5 平板以及热处理后，W4 菌株生长均未受影响，说明大片段 YKL072W-YKL061W 的删减对菌株耐热性、耐碱性、乙醇耐受性以及高盐、高渗透压条件下的生长无明显影响。

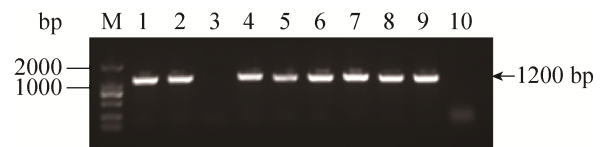


图 5. 大片段删除 PCR 检测电泳图

Figure 5. Identify of large deletion. M: DL2000 marker; lane 1-9: PCR amplification with 11L-det-F/R; lane 10: wild type BY4741.

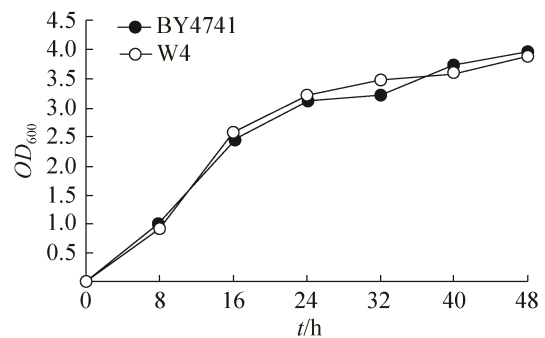


图 6. 基因组大片段缺失菌株生长曲线

Figure 6. Growth curve of the strain with large deletion.

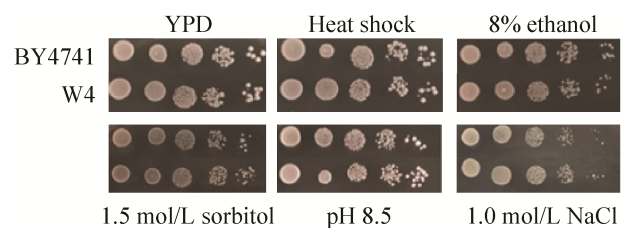


图 7. 大片段缺失菌株的表性检测

Figure 7. Phenotypes of the deletion mutants.

3 讨论

CRISPR-Cas 系统是一项新的用于定向基因编辑的重要技术,通过带有特异性靶序列 gRNA 引导 Cas9 核酸酶,在目的序列进行切割产生双链断裂,通过供体 DNA 与基因组 DNA 的同源重组进而实现对基因组的定向改造。本实验选取了 26.5 kb 的染色体大片段 YKL072W-YKL061W,在大片段区域的上下游端部基因位置选取了 2 个靶序列,构建双 gRNA 表达质粒,与修复 DNA 一起转化至已构建好的 Cas9 蛋白表达菌株 41-cas9。平均得到 5 个转化子,经检测全部为正确删减了大片段的缺失菌株,正确率 100%。

mazF 介导的大片段删减方法首先转化 3 个同源臂及正负筛选标记构建中间态菌株,然后利用诱导表达 *mazF* 毒力基因进行大片段的删减以及筛选标记的回收,得到无碱基残留的大片段缺失菌株。本文中在大片段 YKL072W-YKL061W 的删减中得到约 100 个转化子,正确率高达 93%。

本文也对大片段 YKL072W-YKL061W 删减菌株 W4 进行了初步的表型检测,生长曲线表明缺失菌株的生长状态未受到影响;在 8%乙醇、1.5 mol/L NaCl、1.0 mol/L 山梨醇、pH 8.5 平板以及热处理条件下 W4 生长状况也与野生菌株 BY4741 无异。

CRISPR-Cas 系统以其操作的简便性在大片段删减应用中的优势明显,尤其体现在大规模基因删减中,仅需改变 20 bp 的 gRNA 序列即可,在实验设计及操作上都极为简便。且在添加了修复模板 DNA 同源重组修复后正确率几乎为 100%,为合成生物学中最小基因组细胞的构建创造了可能。*mazF* 介导的大片段删减方法需要克隆多个片段,且需要诱导表达 *mazF*,在更换目的片段后需要重新设计大批引物,相比之下操作相对

繁复。但是根据文献报道,CRISPR-Cas 系统存在脱靶现象,导致得到非预期的突变。也就是说,CRISPR-Cas 系统在针对不同的删除目标时作用效果并不稳定。而 *mazF* 法的优势在于不需要 PAM 序列,相对稳定,具有普适性。

总之,本文中两种方法均可以高效删减酿酒酵母染色体大片段。CRISPR-Cas 系统适用于大批量删减基因,操作简便省时;*mazF* 介导的大片段删减法适用于无合适 gRNA 序列等基因。

参考文献

- [1] Runguphan W, Keasling JD. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metabolic Engineering*, 2014, 21: 103–113.
- [2] Fujio T. Minimum genome factory: innovation in bioprocesses through genome science. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2007, 46(3): 145–146.
- [3] Sugiyama M, Nakazawa T, Murakami K, Sumiya T, Nakamura A, Kaneko Y, Nishizawa M, Harashima S. PCR-mediated one-step deletion of targeted chromosomal regions in haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(3): 545–553.
- [4] Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(6): e23.
- [5] Hirashima K, Iwaki T, Takegawa K, Giga-Hama Y, Tohda H. A simple and effective chromosome modification method for large-scale deletion of genome sequences and identification of essential genes in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(2): e11.
- [6] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233–239.
- [7] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [8] Mans R, van Rossum HM, Wijsman M, Backx A, Kuijpers NGA, van den Broek M, Daran-Lapujade P, Pronk JT, van Maris AJ, Daran JMG. Crispr/Cas9: a molecular swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(2): fov004.
- [9] Hao HH, Wang XF, Jia HY, Yu M, Zhang XY, Tang H, Zhang LP. Large fragment deletion using a CRISPR/Cas9 system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry*, 2016, 509: 118–123.
- [10] Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17): 10903–10914.
- [11] Zhang LQ, Jia RR, Palange NJ, Satheka AC, Togo J, An Y,

- Humphrey M, Ban LY, Ji Y, Jin HH, Feng XC, Zheng YW. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One*, 2015, 10(3): e120396.
- [12] Fu Q, Sun JH, Yan YX. The functional aspects of bacterial CRISPR-Cas systems and interactions between phages and its bacterial hosts—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 251–257. (in Chinese)
傅强, 孙建和, 严亚贤. 细菌 CRISPR-Cas 系统功能及其与噬菌体相互作用. *微生物学报*, 2015, 55(3): 251–257.
- [13] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 347–355.
- [14] Liu QL, Liu HJ, Yang YY, Zhang XM, Bai YL, Qiao MQ, Xu HJ. Scarless gene deletion using *mazF* as a new counter-selection marker and an improved deletion cassette assembly method in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2014, 60(2): 89–93.
- [15] Liu QL, Wu YZ, Yang P, Zhang XM, Bai YL, Xu HJ, Qiao MQ. *MazF*-mediated deletion system for large-scale genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Research in Microbiology*, 2014, 165(10): 836–840.
- [16] Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 1999, 15(10B): 963–972.
- [17] Wang H, Kohalmi SE, Cutler AJ. An improved method for polymerase chain reaction using whole yeast cells. *Analytical Biochemistry*, 1996, 237(1): 145–146.

Comparison of CRISPR-Cas9 system and *mazF*-mediated method for large deletions in *Saccharomyces cerevisiae*

Yuzhen Wu¹, Haijin Xu¹, Yanling Bai¹, Xiuming Zhang¹, Mingqiang Qiao^{1,2*}

¹ College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

² Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [Objective] The objective of this research was to compare CRISPR-Cas9 system and *mazF*-mediated method for large deletions in *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] We made a 26.5 kb deletion from YKL072W to YKL061W using the foresaid two methods. The two methods were analyzed from the perspective of transformation rate and accuracy of deletion. [Results] There were five colonies appeared on the plate in average using CRISPR-Cas9 system and all of these were correct. And 100 colonies were observed using the *mazF*-mediated method and the accuracy was 93%, a little bit lower than CRISPR-Cas9 system. [Conclusion] Both methods are good to make large deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. The CRISPR-Cas9 system has a high accuracy and easy to use, the *mazF*-mediated method is stable and does not need the PAM sequence.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, large deletion, CRISPR-Cas9, *mazF*, comparison

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470004) and by the National Basic Research Program of China (2011CBA00802)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23503340; E-mail: qiaomq@nankai.edu.cn

Received: 15 November 2016; Revised: 22 February 2017; Published online: 27 February 2017

乔明强, 南开大学生命科学学院教授, 博导。芬兰赫尔辛基大学博士。中关村高端领军人才; 教育部新世纪优秀人才资助计划获得者; 天津市政府优秀留学人员; 中国生物化学与分子生物学会常务理事, 中国微生物学会会员。天津市生物化学及分子生物学会理事长。曾任南开大学国际学术交流处处长, 南开大学生命科学学院副院长。主要研究方向: (1) 铜绿假单胞菌致病机理和抗药机理的研究; (2) 生物源性抗菌多肽的抑菌机理和基因调控及产业化; (3) 生物活性纳米材料真菌疏水蛋白的分离纯化、性质、结构与应用研究; (4) 酵母菌和乳酸乳球菌合成生物学之底盘生物的构建与重要功能元件的适配; (5) 食品安全之食物链中抗药基因水平转移的监控和减灭。



<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>