

## 研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-051

## 基因增变器驱动的酿酒酵母基因组连续进化

潘颖佳<sup>1,2</sup>, 夏思杨<sup>1</sup>, 董昌<sup>2</sup>, 蔡谨<sup>1</sup>, 连佳长<sup>1,2</sup>( <sup>1</sup> 浙江大学化学工程与生物工程学院, 浙江 杭州 310027; <sup>2</sup> 浙江大学杭州国际科创中心, 浙江 杭州 310000)

**摘要:** 酿酒酵母是工业生物技术最常用的底盘细胞之一, 被广泛应用于生物基化学品和高附加值产品的大规模生产。鉴于生物体系代谢和调控网络的复杂性, 由多基因协同控制的复杂生理性状的改造通常需要采取全基因组进化来实现。为实现酿酒酵母基因组的快速进化, 本研究采用CRISPR干扰技术(CRISPRi)调控与染色体复制和稳定性相关基因(*MSH2*、*TSA1*、*RAD27*和*CLB5*, 即增变基因)的表达水平, 构建了能够调控酿酒酵母基因组突变率和突变类型的基因增变器。利用基因增变器提高酿酒酵母的β-胡萝卜素合成水平、木糖利用效率和异丁醇耐受性。此外, 构建了混合基因增变器和多重基因增变器, 进一步探究了不同表型基因组进化所需的最佳突变类型以及不同突变类型之间的协同进化机制。本研究不仅可用于创建高性能酿酒酵母细胞工厂, 还有可能发展一个具有普遍适用性的基因组连续进化策略。

**关键词:** 基因增变器; 酿酒酵母; 基因组连续进化; CRISPR干扰; 增变基因

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Mutator-driven continuous genome evolution of *Saccharomyces cerevisiae*PAN Yingjia<sup>1,2</sup>, XIA Siyang<sup>1</sup>, DONG Chang<sup>2</sup>, CAI Jin<sup>1</sup>, LIAN Jiazhang<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China; <sup>2</sup>ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Zhejiang University, Hangzhou 310000, Zhejiang, China)

**Abstract:** *Saccharomyces cerevisiae*, one of the most commonly used cell factories for industrial biotechnology, is widely employed for mass production of bio-based chemicals and value-added compounds. Due to complicated cellular metabolism and regulatory network of biological systems, genome evolution is generally required for engineering with complicated phenotypes, which are coordinated and regulated by multiple genes. To achieve rapid evolution of *S. cerevisiae* genome, this study employed Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Interference (CRISPRi) to regulate the expression of genes closely related to chromosome replication and maintenance, such as *MSH2*, *TSA1*, *RAD27*, and *CLB5*, known as mutator genes. By designing guide RNAs (gRNAs) with differential repression efficiency, four mutators: *MSH2* mutator mainly for point mutations and small InDels (MM), *TSA1* mutator

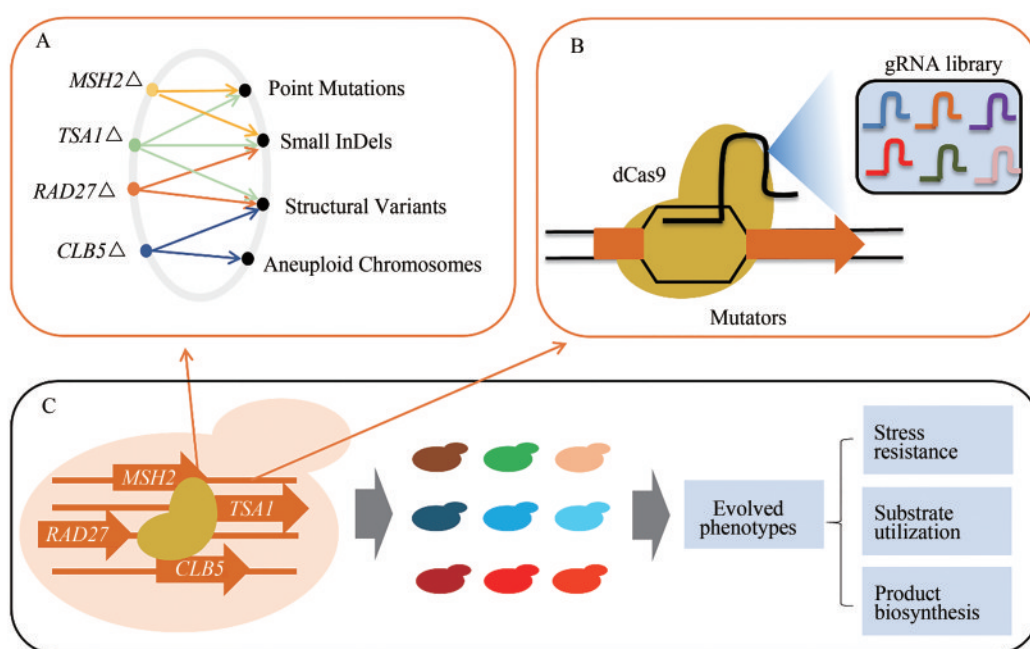
收稿日期: 2022-09-21 修回日期: 2022-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(21808199); 国家重点研发计划(2018YFA0901800 & 2021YFC2103200); 浙江省杰出青年基金(LR20B060003); 中央高校基本科研业务费专项资金(226-2022-00214)

引用本文: 潘颖佳, 夏思杨, 董昌, 蔡谨, 连佳长. 基因增变器驱动的酿酒酵母基因组连续进化[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 225-240

Citation: PAN Yingjia, XIA Siyang, DONG Chang, CAI Jin, LIAN Jiazhang. Mutator-driven continuous genome evolution of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 225-240

mainly for point mutations, small InDels, and structural variants (TM), *RAD27* mutator mainly for small InDels and structural variants (RM), and *CLB5* mutator mainly for structural variants and aneuploidy chromosomes (CM) were constructed to control genome mutation rates and types (e.g. point mutation, small InDels, structural variants, and aneuploid chromosomes). These mutators were used for continuous evolution of a series of industrially relevant phenotypes, such as isobutanol tolerance, xylose utilization, and  $\beta$ -carotene biosynthesis. Interestingly, TM was more efficient for evolving isobutanol tolerance, but TM and CM were preferred for evolving  $\beta$ -carotene overproduction, and all mutators were verified to have comparable performance for evolving xylose utilization with yeast strains. We also discovered that the effectiveness of mutators was dependent on the phenotype to be evolved. To address challenges in the evolution of phenotypes without pre-determined knowledge on mutation rates and types, a mixed mutator (MTRC) was constructed to rapidly evaluate the mutator-phenotype relationship. Finally, a combinatorial mutator (MTRC\*2) were constructed to explore synergistic interactions among various mutators for the continuous genome evolution of *S. cerevisiae*. The established mutators can not only be used for constructing robust yeast cell factories, but also be further developed as a generally applicable genome evolution tool.



**Keywords:** mutators; *Saccharomyces cerevisiae*; continuous genome evolution; CRISPR Interference; mutator genes

基因组进化是模拟自然进化过程，通过人为产生基因多样性和功能筛选的迭代循环，快速获得具有目标性状的工程菌株<sup>[1-2]</sup>。传统的诱变育种、全局转录因子工程以及实验室适应性进化等基因组进化工程虽然已被广泛应用于创建高性能的酿酒酵母细胞工厂<sup>[3]</sup>，但是这些方法均采用“先突变后筛选”的工程策略，需要进行多轮迭代的诱变选择和频繁的人工干预，导致菌株改良过程不

连续且低效<sup>[4]</sup>。相比之下，连续进化可在最小的人工干预下，将翻译、选择、复制和突变（达尔文进化的四个过程）集成一个不间断的循环<sup>[5-6]</sup>。基因组连续进化解了现有进化工程方法的不连续性，提高工程效率，遵循“边突变边筛选”原则，大大简化了菌株选育过程，是获得满足工业生产所需高性能酿酒酵母细胞工厂的主要手段之一<sup>[7-8]</sup>。

突变的遗传基础是存在许多基因和途径，能够在基因的复制、修复、重组等过程中防止发生诱变，确保基因序列和染色体数目的准确性<sup>[9]</sup>。然而，当这些基因存在缺陷时，与野生型菌株相比能够提高突变率，这种与突变的发生和抑制相关的基因称为增变基因（mutator genes）<sup>[10]</sup>，也就是说，增变基因可通过提高基因组突变率而加速细胞的进化。之前有报道指出，降低基因组复制过程的保真性能够提高突变率，可有效实现基因组连续进化<sup>[4, 11]</sup>。敲除酿酒酵母基因组复制过程中稳定性相关的基因会显著提高基因组突变率<sup>[12-13]</sup>，同时不同的增变基因能够引发不同的突变类型<sup>[13]</sup>，如 *MSH2*Δ（点突变和小片段增删）、*TSA1*Δ（点突变和小片段增删）、*RAD27*Δ（小中中长片段增删）、*CLB5*Δ（长片段增删和染色体畸变）、*MEC1*Δ*TEL1*Δ（染色体畸变）等<sup>[13-19]</sup>。前期研究表明，在构建工程菌株过程中，不同进化表型往往需要相应的基因组突变率或突变类型，如较低

的突变率有利于进化乙酸耐受性<sup>[20]</sup>，进化丁醇耐受性则需要较高的突变率<sup>[4]</sup>，而染色体畸变是提高酿酒酵母耐热性的主要分子机制<sup>[21]</sup>。

基因敲除的手段会导致不可恢复的高频突变，无法直接适用于构建工业生产所需的稳定菌株。而基于 CRISPR 干扰技术（CRISPRi）的质粒可以在酿酒酵母细胞中稳定表达，突变菌株在压力筛选条件下成功进化后可将质粒从酿酒酵母细胞内剔除，因此可以在基因增变表型和稳定表型之间灵活互换<sup>[22]</sup>。此外，CRISPRi 效率主要受 gRNA 序列与靶标序列的结合能力和结合位置的影响，也就是说增变基因的表达水平（基因组突变率）可通过设计和构建 gRNA 文库进行精确调控，以满足不同基因组进化的需求<sup>[23]</sup>。如图 1 所示，本研究利用 CRISPRi 体系调控一个或者多个增变基因的表达水平，不仅能够酿酒酵母基因组中诱导产生不同类型的突变，还能够调控基因组的突变率，实现突变率和突变类型协同控制的基因组连续进化。

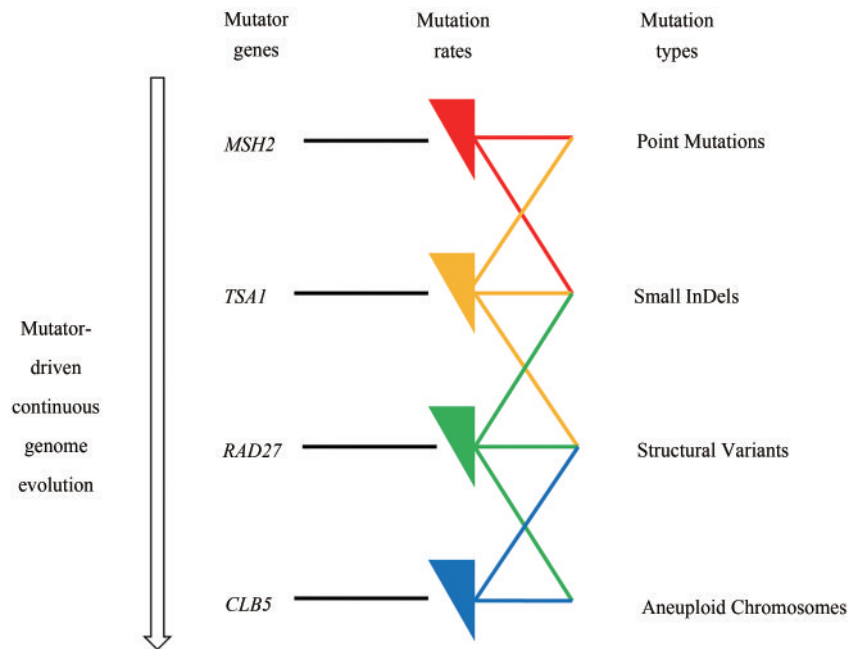


图1 基于增变基因的酿酒酵母基因组连续进化

[酿酒酵母中存在一些维持遗传稳定性的基因，其敲除或抑制会引发不同的突变类型，提高基因组突变率，即增变基因（mutator genes）。利用 CRISPRi 系统抑制增变基因的表达水平，构建 4 个基因增变器（mutators），可诱导酿酒酵母基因组发生不同类型的突变]

Fig. 1 Continuous genome evolution of *S. cerevisiae* through mutator genes

(There are mutator genes in *S. cerevisiae* to maintain its genetic stability, and their knockdown or suppression can increase the genome mutation rate, and also result in different types of mutations. Using the CRISPRi system to inhibit the expression of mutator genes, four mutators were constructed to induce different types of mutations in the genome of *S. cerevisiae*.)

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和仪器

PCR产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒以及大肠杆菌质粒提取试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific; 酵母基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Q5高保真DNA聚合酶和T4 DNA连接酶购自NEB; 酵母质粒提取试剂盒购自 Zymo Research; 遗传霉素、氨苄青霉素以及刀豆氨酸硫酸盐购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 醋酸锂、PEG3350以及ssDNA购自Sigma; 酵母细胞裂解液购自Takara; 氯化钠、异丁醇、硫酸铵、葡萄糖等其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

振荡培养箱 ZQZY-88AH; 生化培养箱 DNP-9162; PCR仪 Longene A200; 离心机 Eppendorf Centrifuge 5424R; 多功能酶标仪 TECAN INFINITE Pro200; 高效液相色谱仪岛津 LC-20A; 凝胶成像系统 Tanon1600; 生物传感分析仪 SBA-40D; 流式细胞仪 BD Calibur 等。

### 1.2 质粒与菌株的构建

本文相关的酿酒酵母菌株如表1所示, 质粒、序列信息等见附表1和附表2。 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞购自擎科生物(杭州)。酿酒酵母出发菌株 BY4741-iAID6由实验室前期构建, 含有 dSpCas9 以及转录抑制结构域 RD1152<sup>[24]</sup>, 用 YPD 培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胨以及2%葡萄糖)培养; 含有基因增变器的重组酵母菌株

表1 本研究相关的酿酒酵母菌株  
Table 1 *S. cerevisiae* strains used in this study

Strains	Description	Source
BY4741-iAID6	BY4741 with CRISPRi machinery (dSpCas9-RD1152) integrated	Our lab <sup>[24]</sup>
y426	BY4741-iAID6/p426	This study
yMM	BY4741-iAID6/MM	This study
yTM	BY4741-iAID6/TM	This study
yRM	BY4741-iAID6/RM	This study
yCM	BY4741-iAID6/CM	This study
BY4741-iAID6-CrtIEYB	BY4741-iAID6-CrtE-CrtYB-CrtI	Our lab <sup>[24]</sup>
yCar426	BY4741-iAID6-CrtE-CrtYB-CrtI/p426	This study
yCarMM	BY4741-iAID6-CrtE-CrtYB-CrtI/MM	This study
yCarTM	BY4741-iAID6-CrtE-CrtYB-CrtI/TM	This study
yCarRM	BY4741-iAID6-CrtE-CrtYB-CrtI/RM	This study
yCarCM	BY4741-iAID6-CrtE-CrtYB-CrtI/CM	This study
BY4741-iAID6-psXP	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS	This study
yX426	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/p426	This study
yXMM	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/MM	This study
yXRM	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/RM	This study
yXTM	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/TM	This study
yXCM	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/CM	This study
yXMTRC	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/MTRC	This study
yXMTRC*2	BY4741-iAID6-XR-XDH-XKS/MTRC-MTRC	This study
CT	CEN-PK2-1C; <i>TEF1p-mVenus-PGK1t</i> ; <i>URA3</i>	Our lab <sup>[24]</sup>
MSH2p-mVenus	BY4741-iAID6/p415- <i>MSH2p-mVenus</i>	This study
TSA1p-mVenus	BY4741-iAID6/p415- <i>TSA1p-mVenus</i>	This study
RAD27p-mVenus	BY4741-iAID6/p415- <i>RAD27p-mVenus</i>	This study
CLB5p-mVenus	BY4741-iAID6/p415- <i>CLB5p-mVenus</i>	This study

用 SED-URA/G418 培养基 (0.17% 酵母无机氮源 YNB、0.067% CSM-URA、0.11% 谷氨酸钠、2% 葡萄糖以及 0.1% 遗传霉素) 培养, 其中固体培养基额外加入 2% 琼脂粉。采用 LiAc-ssDNA-PEG 热激转化法<sup>[25]</sup> 将外源基因转入酿酒酵母, 构建重组工程菌株。利用在线工具 (<https://benchling.com>) 设计靶向不同基因的 gRNA 序列, 包括 *MSH2* (Gene ID: 854063)、*TSA1* (Gene ID: 854980)、*RAD27* (Gene ID: 853747) 和 *CLB5* (Gene ID: 856237) 的 -200 bp 到 +50 bp 区域附近, 每个靶向基因含有多个不同效率的 gRNA 质粒, 其中 PAM 位点选择 NGG, 且 Specificity Score 和 Efficiency Score 分数均较高。

### 1.3 基因增变器的构建与表征

以 *mVenus* (编码黄色荧光蛋白) 为报告基因检测不同 gRNA 抑制增变基因表达水平的效率: ①以酿酒酵母 BY4741 基因组为模板, 分别扩增 *MSH2*、*TSA1*、*RAD27* 和 *CLB5* 基因的启动子区域以及编码区的前 50 bp 序列 *MSH2p*、*TSA1p*、*RAD27p* 和 *CLB5p*; ②分别将各启动子序列和 *mVenus* 表达框克隆到 *XhoI/SacI* 线性化的 pRS415 质粒骨架, 构建报告质粒 p415-*MSH2p-mVenus*、p415-*TSA1p-mVenus*、p415-*RAD27p-mVenus* 以及 p415-*CLB5p-mVenus*; ③将报告质粒与其对应的 gRNA 质粒共转化到 BY4741-iAID6 酵母菌株中; ④通过酶标仪 (激发波长为 498 nm, 发射波长为 533 nm) 或者流式细胞仪 (488 nm 通道, 酵母细胞用 PBS 缓冲液稀释至  $10^5/\text{mL}$ ) 检测酿酒酵母中 *mVenus* 的荧光强度, 获得对增变基因不同抑制程度的 gRNA 质粒, 将抑制同一增变基因的 gRNA 质粒混合, 即得 4 个不同的基因增变器: MM (*MSH2* Mutator)、TM (*TSA1* Mutator)、RM (*RAD27* Mutator) 以及 CM (*CLB5* Mutator)。每个基因增变器均含有不同 CRISPRi 效率的 gRNA 质粒, 可实现不同的基因组突变率, 能够满足不同性状的突变率需求, 在酿酒酵母中, 经常使用 *URA3* 和 *CAN1* 基因来测试突变率<sup>[26]</sup>, 因为其缺失突变会产生便于表征的性状: *URA3* 功能的丧失可

使细胞对 5-氟乳清酸 (5-FOA) 产生抗性<sup>[27]</sup>, *CAN1* 功能的丧失可使细胞对有毒精氨酸类似物刀豆氨酸 (Can) 产生抗性<sup>[28]</sup>。本研究利用 *CAN1* 突变报告系统测定 4 个基因增变器介导的酿酒酵母基因组突变率和突变类型。具体步骤如下: ①将基因增变器质粒转化 BY4741-iAID6 酵母细胞, 分别获得 yMM、yTM、yRM 以及 yCM 酿酒酵母增变菌株; ②将增变菌株在 5 mL SED-URA/G418 液体培养基中传代培养 2 次 (本菌种培养 48 h 时转接 1% 菌液至新的液体培养基中, 下同); ③取 1 mL 生长饱和的菌液, 将其中 10  $\mu\text{L}$  稀释 100 倍后在非选择培养基 SED-URA/G418 上涂 5  $\mu\text{L}$ , 培养 2 d 后计数单克隆, 换算得到 990  $\mu\text{L}$  饱和菌液中的总细胞数  $r_0$ ; ④剩下的 990  $\mu\text{L}$  菌液离心后重悬于 100  $\mu\text{L}$  无菌水中, 全部涂布于含有 0.1% 刀豆氨酸 (Can) 的选择性培养基 SED-URA-ARG/G418+Can 上, 5~6 d 后计数单克隆记为  $r_1$ ; ⑤计算各增变菌株的突变率  $r_1/r_0$ , 以野生型菌株 WT 的突变率为 1, 计算各增变菌株的相对突变率; ⑥挑取选择性培养基上的单菌落, 扩增其基因组上的 *CAN1* 基因, 通过序列比对后, 统计各增变菌株的突变类型, 包括点突变 (1 bp)、小片段增删 (-11 至 +3 bp) 和其他突变类型 (包括中长片段增删和染色体畸变等)。

### 1.4 基因增变器在酿酒酵母基因组进化中的应用

以异丁醇耐受性为测试表型, 验证基因增变器的有效性。增变菌株在 SED-URA/G418 传代培养 2 次后, 接种至含不同异丁醇浓度的液体培养基中 (24 深孔板, 起始  $\text{OD}_{660}$  值为 0.03), 异丁醇浓度设置为 0%、4%、4.5%, 每 24 h 测定菌液的细胞密度 ( $\text{OD}_{660}$  值)。

基于基因增变器对  $\beta$ -胡萝卜素生产菌株 (BY4741-iAID6-CrtIEYB) 进化的影响。将基因增变器质粒转化至 BY4741-iAID6-CrtIEYB, 构建 yCarMM、yCarTM、yCarRM 以及 yCarCM 增变菌株, 在 SED-URA/G418 液体培养基中传代培养 2 次, 稀释后涂布于 SED-URA/G418 固体培养基上, 在 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 2~3 d 后, 比较各组菌落的颜色。挑取颜色最深的菌落, 接种于 24 深

孔板中培养, 在 30 °C、800 r/min 恒温摇床中培养 2 d, 取 1 mL 菌液并稀释至相同细胞密度, 丙酮萃取后用 HPLC 测定各菌株中  $\beta$ -胡萝卜素的产量<sup>[29]</sup>。

以木糖发酵菌株 (BY4741-iAID6-psXP) 为研究对象, 测试基因增变器在改造底物利用效率方面的应用<sup>[30]</sup>。将基因增变器质粒转化至 BY4741-iAID6-psXP, 构建 yXMM、yXTM、yXRM 以及 yXCM 增变菌株, 在 SED-URA/G418 液体培养基中传代培养 2 次后, 接种至以木糖为唯一碳源的液体培养基 (SEX-URA/G418, 24 深孔板) 中, 每 12 h 通过酶标仪测定菌液的 OD<sub>660</sub> 值, 并通过生物传感分析仪测培养基中木糖的残留量, 比较增变菌株与 WT 木糖利用率的差异。

### 1.5 利用混合基因增变器探究进化性状的最佳突变类型

将靶向 4 个增变基因的质粒文库等比例混合, 即混合基因增变器 MTRC, 根据 MTRC 质粒文库在基因组进化前后的富集程度, 可以探究进化性状的最佳突变类型。将 MTRC 转化至酿酒酵母 BY4741-iAID6-psXP, 构建 yXMTRC 增变菌株, 在以木糖为碳源的液体培养基中连续传代培养 4 次后, 提取进化菌株中的质粒进行二代测序, 并统计靶向不同增变基因 gRNA 的丰度, 丰度高的 gRNA 所对应的基因增变器更适合用于进化木糖利用工程酵母菌株。

### 1.6 多重基因增变器及其基因组连续进化应用

为进一步探索不同突变类型在基因组连续进化中的协同促进作用, 设计了能够同时靶向 2 个增变基因 (如 *MSH2-RAD27*、*RAD27-CLB5* 等) 的多重基因增变器 (串联 gRNA 质粒文库)。以质粒 p426-SpSgH 为模板扩增两端带有 *BsaI* 酶切位点的质粒骨架, 以混合 gRNA 质粒文库 (MTRC) 为模板, 扩增两端带有 *BsaI* 酶切位点的 gRNA 表达框 1 和表达框 2。利用 Golden-Gate Assembly 连接质粒骨架和两个 gRNA 表达框, 获得多重基因增变器 MTRC\*2。将 MTRC\*2 转化至酿酒酵母 BY4741-

iAID6-psXP, 构建 yXMTRC\*2 多重增变菌株, 在 SED-URA/G418 液体培养基中传代培养 2 次后, 接种至 SEX-URA/G418 中 (24 深孔板), 测定进化菌株在以木糖为唯一碳源培养基的生长速率。

## 2 实验结果

### 2.1 基因增变器 gRNA 质粒文库的构建与表征

靶向 4 个增变基因 *MSH2*、*TSAI*、*RAD27* 和 *CLB5* 分别设计了 CRISPRi 的 gRNA 文库, 以 *mVenus* 为报告基因测试其抑制效率。由于 *MSH2* 启动子强度太弱, 利用酶标仪检测无法确定其 gRNA 是否有抑制功能 (附图 1), 所以通过流式细胞仪在单细胞水平分析 *mVenus* 表达水平, 结果表明 p426-SpSg11/12/15/17 对 *MSH2* 基因有不同程度的抑制效果 [图 2(a)]。其余 3 个增变基因的抑制结果如图 2 所示, 其中 p426-SpSg21/22/24/26 对 *TSAI* 基因有不同程度的抑制效果 [图 2(b)]; p426-SpSg32/33/34/36 对 *RAD27* 基因有较高等程度的抑制效果 [图 2(c)]; p426-SpSg41/42/44/45 对 *CLB5* 基因有不同程度的抑制效果 [图 2(d)]。将各增变基因对应的功能 gRNA 质粒均匀混合, 构建了 4 个不同的 gRNA 质粒文库 (表 2), 即基因增变器: MM (靶向 *MSH2* 基因的功能 gRNA 质粒以及 p426-SpSgH)、TM (靶向 *TSAI* 基因的功能 gRNA 质粒以及 p426-SpSgH)、RM (靶向 *RAD27* 基因的功能 gRNA 质粒以及 p426-SpSgH) 以及 CM (靶向 *CLB5* 基因的功能 gRNA 质粒以及 p426-SpSgH)。

采用刀豆氨酸体系来测定 4 个基因增变器对酿酒酵母基因组的突变率与突变类型的影响。如图 3(a) 所示, 不同基因增变器能够诱导酿酒酵母基因组产生不同大小的突变率, 其中诱导产生突变率最高的增变器是 TM, 其次是 RM, 相对较低的是 MM 和 CM。随后利用基因测序技术测定各基因增变器诱导酿酒酵母 *CANI* 基因的突变类型。如图 3(b) 和附表 3 所示, 4 个基因增变器均诱导酿酒酵母基因组产生了点突变, 其中 TM 和 RM 诱导产生短片段缺失和插入, RM 和 CM 还诱导产生了中长片段插入缺失等其他突变类型。

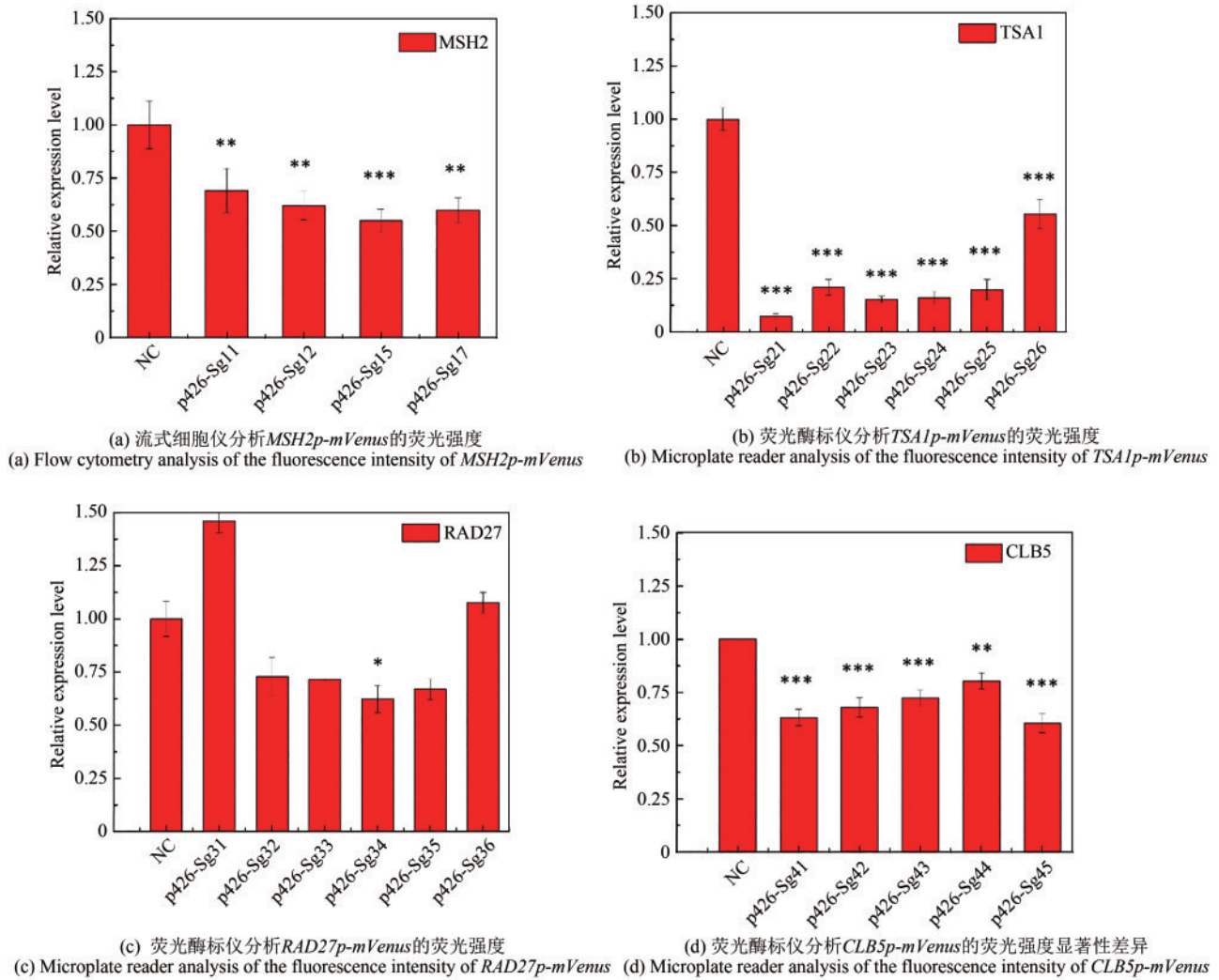


图2 以 *mVenus* 为报告基因检测不同 gRNA 对增变基因表达的抑制效果

(显著性差异: \*表示  $p < 0.05$ ; \*\*表示  $p < 0.01$ ; \*\*\*表示  $p < 0.001$ )

Fig. 2 Inhibition efficiency of different gRNAs on the expression of mutator genes with *mVenus* as a reporter

(\*, \*\* and \*\*\* for the significance  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively)

表2 不同基因增变器对应的 gRNA 质粒文库

Table 2 gRNA plasmid libraries for mutators

Mutators	gRNA plasmids
MM	p426-Sg11 p426-Sg12 p426-Sg15 p426-Sg17 p426-SpSgH
TM	p426-Sg21 p426-Sg22 p426-Sg24 p426-Sg26 p426-SpSgH
RM	p426-Sg32 p426-Sg33 p426-Sg34 p426-Sg36 p426-SpSgH
CM	p426-Sg41 p426-Sg42 p426-Sg44 p426-Sg45 p426-SpSgH

## 2.2 基因增变器提高酿酒酵母的异丁醇耐受性

通过基因增变器提高酿酒酵母 BY4741-*iAID6* 的突变率, 比较各基因增变器对提高酿酒酵母异丁醇耐受性的影响。4 类增变酵母在不同浓度的

异丁醇胁迫环境中的生长曲线如图 4 所示, 当培养基中不含有异丁醇时, 增变菌株和对照菌株的生长趋势无显著差异, 当培养基中异丁醇浓度达到 4% 时, *yTM* 的生长速率显著高于其他菌株; 当异丁醇浓度达到 4.5% 时, 各增变菌株均表现出显著的生长优势, 其中提升效果最显著的是增变菌株 *yTM*。上述结果表明较高的突变率以及点突变、小片段增删对进化异丁醇耐受性最为有利。将异丁醇最适进化菌株 *yTM* 在平板上划线培养后, 随机挑选了 12 个单菌落进行测序, 其中有 7 个菌落含有 p426-SpSg21, 5 个菌落含有 p426-SpSg22。

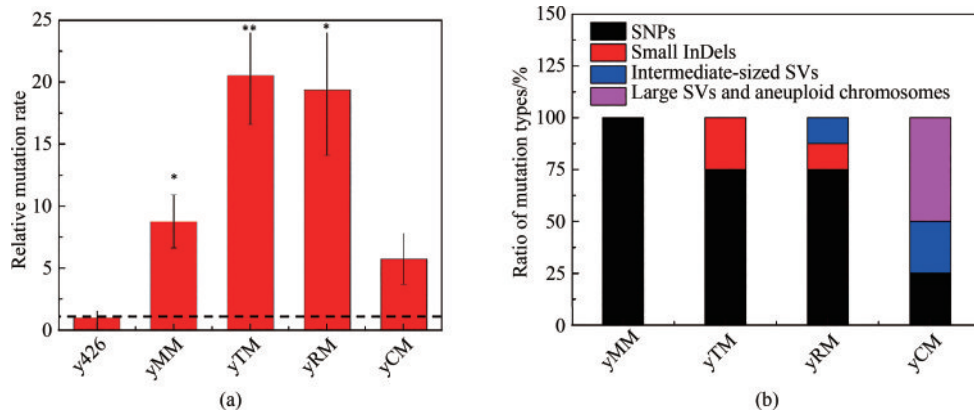


图3 基因增变器诱导酿酒酵母基因组产生的突变率和突变类型

(a) 基因增变器诱导酿酒酵母基因组产生不同的相对突变率；(b) 基因增变器均诱导酿酒酵母基因组产生不同的突变类型，4个基因增变器均产生了点突变，其中TM和RM诱导产生短片段缺失和插入，RM和CM还诱导产生了中长片段插入缺失等其他突变类型（显著性差异： $*$ 表示 $p < 0.05$ ； $**$ 表示 $p < 0.01$ ）

Fig. 3 Mutation rates and types in the genome of *S. cerevisiae* induced by mutators

(a) Relative mutation rates of the genome of *S. cerevisiae* induced by mutators ( $*$  for significance  $p < 0.05$ ); (b) Mutation type of the genome of *S. cerevisiae* induced by mutators. All 4 mutators induced SNPs, TM and RM induced small Indels, and RM and CM also induced other mutation types.  $*$  and  $**$  for significance  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

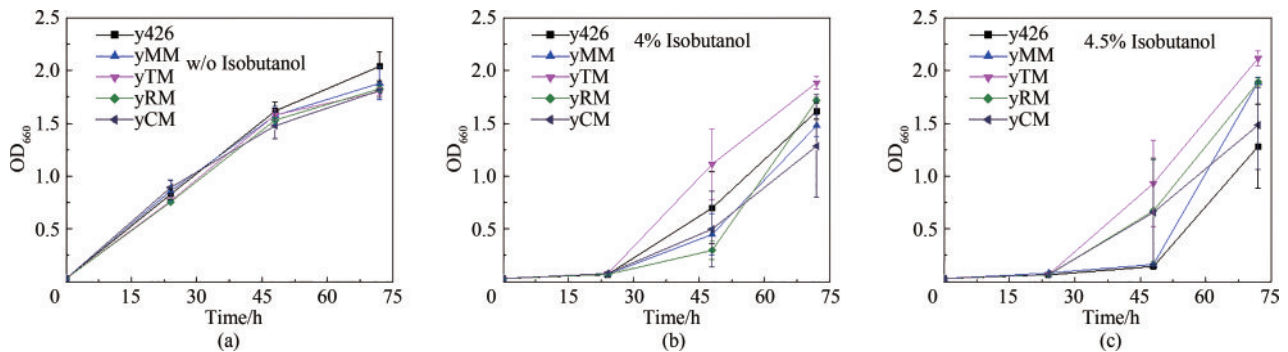


图4 基因增变器提高酿酒酵母异丁醇耐受性

(a) 当培养基中不存在异丁醇时，进化组和对照组之间的生长趋势无显著差异；(b) 当培养基中异丁醇浓度达到4%时，yTM的生长速率显著高于其他菌株；(c) 当异丁醇浓度达到4.5%时，相对对照y426菌株，各进化组都具有显著的生长优势，其中提升效果最好的增变器为yTM

Fig. 4 Evaluation of the mutators for improved isobutanol tolerance

(a) No significant difference in the growth profiles of the mutated and control strains when isobutanol was not present in the medium; (b) When the concentration of isobutanol in the medium reached 4%, the growth rate of yTM was significantly higher than that of other strains; (c) When isobutanol concentration reached 4.5%, all mutated strains showed significant growth advantages over the control, with yTM as the best strain.

### 2.3 基因增变器提高 $\beta$ -胡萝卜素产量

通过基因增变器提高酿酒酵母BY4741-iAID6-CrtIEYB的突变率，比较各基因增变器对提高酿酒酵母 $\beta$ -胡萝卜素产量的影响。如图5(a)~(e)所示，酿酒酵母增变菌株yTM和yCM产生了具有显著颜色差异的单克隆；挑取颜色最深的菌落，并以yCar426为对照，通过HPLC测定增变菌株的 $\beta$ -胡萝卜素含量。如图5(f)所示，增变菌株yCarTM

和yCarCM的 $\beta$ -胡萝卜素产量均提高了2倍以上，DAN测序结果表明其含有的gRNA分别为p426-SpSg25和p426-SpSg41，表明TM和CM是最适用于提高酿酒酵母 $\beta$ -胡萝卜素产量的基因增变器，也就是说中长片段增删或者染色体畸变对促进 $\beta$ -胡萝卜素的生物合成最为有利。随后对去除基因增变器质粒的进化菌株进行传代培养并涂布到非选择性平板上，胡萝卜素的色保持高度均一，证明了进化菌株的遗传稳定性（附图2）。

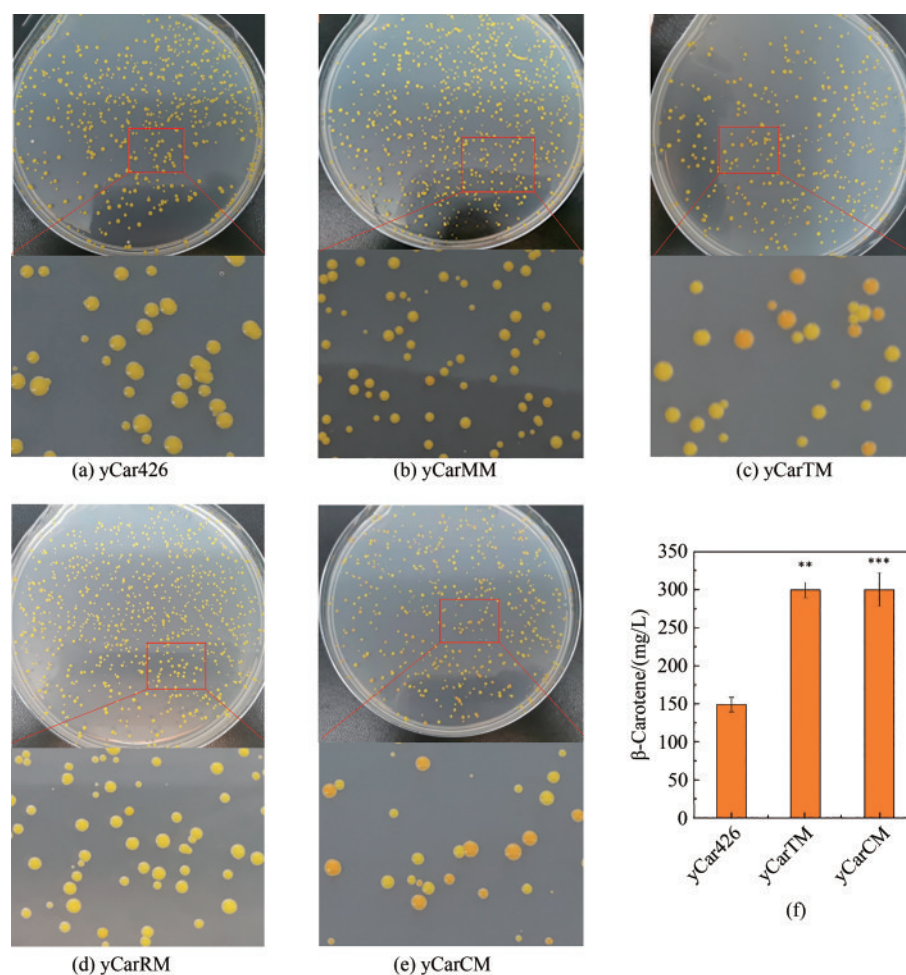


图5 基因增变器提高酿酒酵母 $\beta$ -胡萝卜素产量

(a)~(e)基因增变器诱导酿酒酵母产生颜色深浅不一的菌落；(f)通过HPLC测定进化菌株的 $\beta$ -胡萝卜素产量  
(显著性差异：\*\*表示 $p < 0.01$ ；\*\*\*表示 $p < 0.001$ )

Fig. 5 Evaluation of the mutators in increasing  $\beta$ -carotene biosynthesis

(a)~(e) Mutation resulted in the formation of colonies with different color densities; (f) Production of  $\beta$ -carotene in the mutated and control strains determined by HPLC. \*\* and \*\*\* for significance  $p < 0.01$  and  $0.001$ , respectively.

## 2.4 基因增变器提高木糖利用率

通过基因增变器提高酿酒酵母的木糖利用率，以构建能够高效利用木糖的酿酒酵母进化菌株。增变菌株在以木糖为唯一碳源培养基中的生长曲线和木糖消耗曲线如图6(a)~(b)所示，其生长速率均高于对照组，各基因增变器之间的差异不显著，表明所构建的基因增变器均可提高酿酒酵母对木糖的底物利用速率。

## 2.5 基于混合基因增变器的最佳突变类型研究

由上述研究结果可知，不同进化性状的最佳

突变类型往往存在较大差异，需要进行大量进化测试才能获悉进化性状的最佳突变类型，费时费力。为快速确定基因组进化的最优参数，将4个基因增变器质粒文库等比例混合，构建混合基因增变器MTRC。对基因组连续进化富集得到的菌体进行高通量测序，gRNA富集程度越高，说明所对应的基因增变器越有利于基因组连续进化，也就是说根据gRNA富集程度，可更加快速、准确和全面地确定该表型基因组连续进化的最优突变类型。以木糖利用菌株的基因组进化为研究对象，含有混合基因增变器的酵母菌株(yXMTRC)在以木糖为唯一碳源的培养基中生长速率显著高于对照

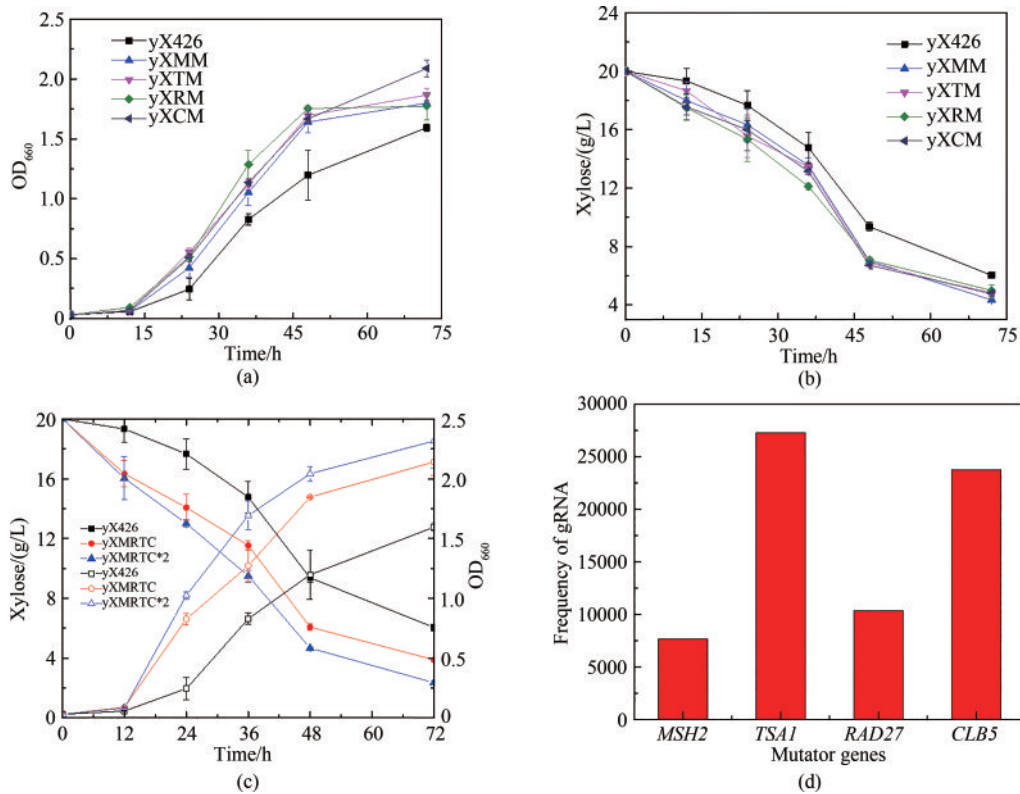


图6 通过基因增变器提高酿酒酵母对木糖的利用率

[不同基因增变器诱导的酿酒酵母在以木糖为唯一碳源的液体培养基中的生长曲线 (a) 和木糖消耗曲线 (b); (c) 混合增变器MTRC和多重增变器MTRC\*2诱导的酿酒酵母的生长曲线 (空心图例) 和木糖消耗曲线 (实心图例); (d) 混合增变器MTRC诱导酿酒酵母在以木糖为唯一碳源的液体培养基中连续传代培养后菌液中的gRNA丰度分布]

Fig. 6 Evaluation of the mutators in improving xylose utilization

[Profiles for growth (a) and xylose consumption (b) of the mutated and control strains with xylose as the sole carbon source. (c) Profiles for growth (hollow symbols) and xylose consumption (solid symbol) of the single (MTRC) and double (MTRC\*2) mutated strains. (d) Distribution of gRNA abundance when the MTRC mutated strain was continuously subcultured in the liquid medium containing xylose.]

菌株, 如图6(c), 连续传代培养后, 抽提进化菌株的gRNA质粒文库并进行二代测序, 通过生物信息学分析gRNA丰度。如图6(d)所示, 靶向*TSA1*和*CLB5*的gRNA得到了最高程度的富集, 表明TM和CM是最适合进化木糖利用速率的基因增变器, 与增变菌株yXCM和yXTM在木糖生长速率最快的结果一致。

## 2.6 基于多重基因增变器的酿酒酵母基因组协同进化

考虑到不同突变类型在基因组连续进化中可能存在协同效应, 通过串联靶向不同增变基因的gRNA序列, 设计构建了能够同时靶向2个增变基因的多重基因增变器 (MTRC\*2)。同样以木糖利用速率为表型, 多重增变菌株yXMTRC\*2在以木

糖为唯一碳源的液体培养基中的生长曲线如图6(c)所示, 其生长速率显著高于yXMTRC和yX426, 表明多重基因增变器对木糖利用酵母菌株的连续进化具有协同促进作用。

## 3 讨论

基因组连续进化是获得满足工业生产所需鲁棒性和适配性细胞工厂的主要手段之一<sup>[31]</sup>。基因增变器可促进酿酒酵母基因组进化以提高产物产量、环境耐受性和底物利用率等多种性状, 并且基因增变器系统易于调控, 可通过简单操作来控制基因增变作用的开和关, 适用于工业生产中筛选和保存优良的菌种。基于DNA复制的保守性, 基因增变器在理论上可适用于其他工业菌种, 但

有待进一步实验验证。另一方面, 基于基因增变器的酿酒酵母性状改良是非理性进化, 其分子机制仍需要从基因组序列变化等做进一步分析。

事实上, 基因增变器不仅能够提高酿酒酵母基因组的突变率, 还能诱导不同的突变类型, 包括点突变、短片段缺失和插入、中长片段插入缺失和染色体畸变。突变率高低和突变类型的差异丰富了基因组突变类型, 为基于基因组进化的菌种改造提供了更多的选择。虽然基因增变器均能促进酿酒酵母基因组进化, 以改善 $\beta$ -胡萝卜素产量、异丁醇耐受性和木糖利用率等性状, 但不同基因增变器所能改善性状的程度不同, 说明不同进化性状所对应的最佳基因增变器往往不同。在提高酿酒酵母 $\beta$ -胡萝卜素产量和木糖利用率时, 虽然各基因增变器对性状的进化效果有所差异, 但是能够产生包括点突变、片段插入缺失和染色体畸变等多种突变类型的CM效果均最好, 推测多种突变类型协同更适用于酿酒酵母的基因组进化。另一方面, 能够同时靶向2个增变基因的多重基因增变器, 即同时产生更多的基因突变类型, 更快进化出高效利用木糖的工程菌株, 进一步说明了多种突变类型协同更适用于酿酒酵母的基因组进化。

总之, 本研究采用CRISPRi技术调控与染色体复制和稳定性相关基因(增变基因)的表达水平, 以控制基因组的突变率和突变类型, 成功建立了一种基因增变器的基因组连续进化新方法, 实验证明其可用于底盘细胞鲁棒性、底物利用速率以及高附加值化合物合成效率等重要工业性状的连续进化。基因增变器作用的分子机制, 包括目的性状的最适基因增变器、通过二代测序技术和基因组学探索基因增变器所诱导产生的有益突变和突变类型, 不同基因增变器组合的功能探索, 以及在其他微生物基因组进化中的作用有待于做进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 李祎, 林振泉, 刘子鹤. 酿酒酵母适应性实验室进化工具的最新进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(2): 287-301.  
LI Y, LIN Z Q, LIU Z H. Advances in yeast based adaptive laboratory evolution[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 287-301.
- [2] 夏思杨, 江丽红, 蔡谨, 等. 酿酒酵母基因组进化的研究进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(5): 556-569.  
XIA S Y, JIANG L H, CAI J, et al. Advances in genome evolution of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(5): 556-569.
- [3] SI T, XIAO H, ZHAO H M. Rapid prototyping of microbial cell factories via genome-scale engineering[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(7): 1420-1432.
- [4] LUAN G D, CAI Z, LI Y, et al. Genome replication engineering assisted continuous evolution (GREACE) to improve microbial tolerance for biofuels production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 137.
- [5] BADRAN A H, LIU D R. *In vivo* continuous directed evolution[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2015, 24: 1-10.
- [6] ARNOLD F H, VOLKOV A A. Directed evolution of biocatalysts[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 1999, 3(1): 54-59.
- [7] WANG Y J, XUE P, CAO M F, et al. Directed evolution: methodologies and applications[J]. Chemical Reviews, 2021, 121(20): 12384-12444.
- [8] 祁延萍, 朱晋, 张凯, 等. 定向进化在蛋白质工程中的应用研究进展 [J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1-29.  
QI Y P, ZHU J, ZHANG K, et al. Recent development of directed evolution in protein engineering [J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1-29.
- [9] SCHELLER J, SCHÜRER A, RUDOLPH C, et al. *MPHI*, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage[J]. Genetics, 2000, 155(3): 1069-1081.
- [10] SPEYER J F. Mutagenic DNA polymerase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1965, 21(1): 6-8.
- [11] CHOU H H, KEASLING J D. Programming adaptive control to evolve increased metabolite production[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2595.
- [12] DROTSCHMANN K, CLARK A B, TRAN H T, et al. Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the *MSH2* gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(6): 2970-2975.
- [13] SERERO A, JUBIN C, LOEILLET S, et al. Mutational landscape of yeast mutator strains[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(5): 1897-1902.
- [14] REENAN R A, KOLODNER R D. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *MSH1* and *MSH2* genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions[J]. Genetics, 1992, 132(4): 975-985.
- [15] KATJU V, KONRAD A, DEISS T C, et al. Mutation rate and spectrum in obligately outcrossing *Caenorhabditis elegans* mu-

- tation accumulation lines subjected to RNAi-induced knock-down of the mismatch repair gene *msh-2*[J]. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2021, 12(1): jkab364.
- [16] GOTO M, SASAKI M, KOBAYASHI T. The S-phase cyclin *Clb5* promotes rRNA gene (rDNA) stability by maintaining replication initiation efficiency in rDNA[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2021, 41(5): e00324-e00320.
- [17] TISHKOFF D X, FILOSI N, GAIDA G M, et al. A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* *RAD27* is distinct from DNA mismatch repair[J]. *Cell*, 1997, 88(2): 253-263.
- [18] MCCULLEY J L, PETES T D. Chromosome rearrangements and aneuploidy in yeast strains lacking both *Tel1p* and *Mec1p* reflect deficiencies in two different mechanisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(25): 11465-11470.
- [19] PENNANEACH V, KOLODNER R D. Recombination and the *Tel1* and *Mec1* checkpoints differentially effect genome rearrangements driven by telomere dysfunction in yeast[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(6): 612-617.
- [20] PARK H, KIM S. Gene-specific mutagenesis enables rapid continuous evolution of enzymes *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(6): e32.
- [21] YONA A H, MANOR Y S, HERBST R H, et al. Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(51): 21010-21015.
- [22] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [23] YAO Z, WANG Q H, DAI Z J. Recent advances in directed yeast genome evolution[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(6): 635.
- [24] LIAN J Z, HAMEDIRAD M, HU S M, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1688.
- [25] GIETZ R D, SCHIESTL R H. High-efficiency yeast transformation using the *LiAc/SS* carrier DNA/PEG method[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 31-34.
- [26] PATTERSON M N, MAXWELL P H. Combining magnetic sorting of mother cells and fluctuation tests to analyze genome instability during mitotic cell aging in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2014(92): e51850.
- [27] BOEKE J D, LACROUTE F, FINK G R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance[J]. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1984, 197(2): 345-346.
- [28] WHELAN W L, GOCKE E, MANNEY T R. The *CAN1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates[J]. *Genetics*, 1979, 91(1): 35-51.
- [29] QI M M, ZHANG B, JIANG L H, et al. PCR & Go: a pre-installed expression chassis for facile integration of multi-gene biosynthetic pathways[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 8: 613771.
- [30] TSAI C S, KONG I I, LESMANA A, et al. Rapid and marker-free refactoring of xylose-fermenting yeast strains with Cas9/CRISPR[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(11): 2406-2411.
- [31] 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.



**通讯作者:** 蔡谨(1960—), 男, 博士, 副教授。研究方向为工业微生物学。  
E-mail: caij@zju.edu.cn



**通讯作者:** 连佳长(1984—), 男, 博士, 研究员。研究方向为合成生物学。  
E-mail: jzlian@zju.edu.cn

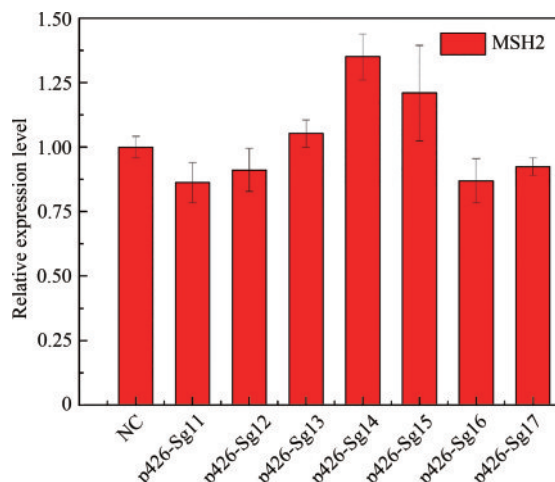


**第一作者:** 潘颖佳(1992—), 女, 博士研究生。研究方向为合成生物学。  
E-mail: 12228048@zju.edu.cn



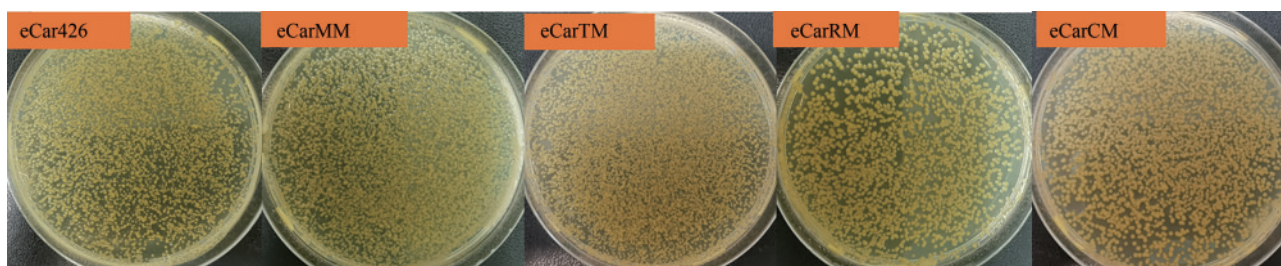
**第一作者:** 夏思杨(1996—), 女, 硕士研究生。研究方向为基因组进化。  
E-mail: 21828174@zju.edu.cn

## 附录



附图1 荧光酶标仪分析 *MSH2p-mVenus* 的 CRISPRi 结果

Supplementary Fig. S1 Repression of *MSH2p-mVenus* by CRISPRi analyzed by a microplate reader



附图2 产β-胡萝卜素的酿酒酵母进化菌株的遗传稳定性

Supplementary Fig. S2 Genetic stability of the evolved β-carotene producing strains

(eCarTM 菌株丢质粒前所携带的质粒为 p426-Sg25, eCarCM 菌株丢质粒前所携带的质粒为 p426-Sg41, 为验证菌株获得目的性状后能够保持遗传性状的稳定性, 将获得目的性状的进化菌株去除其 gRNA 质粒, 然后再对其性状的稳定性进行测试。以产 β-胡萝卜素的进化菌株为例, 具体方法如下: ①在增殖菌株 yCarMM、yCarTM、yCarRM、yCarCM 和对照菌株 yCar426 生长的 SED-URA/G418 固体培养基上挑取颜色最深的菌落, 每类菌种各挑 3 个单菌落, 接种于 SED 完全液体培养基中, 连续传代培养 2 次, 同时通过测序确认所挑取的单菌落的 gRNA 种类; ②取 5 μL 菌液在 SED 完全固体培养基上划线培养, 培养 2~3 天后, 从划线的固体培养基上随机挑取 16 个单菌落, 每个菌落都同时在 SED-URA/G418 和 SED 完全固体培养基上接种, 筛选出只能够在 SED 完全固体培养基上生长的菌落, 即丢弃质粒的进化菌株; ③将去除质粒的进化菌株继续在 SED 完全液体培养基中连续传代培养 3~5 次后, 取菌液涂布至 SED 完全固体培养基, 通过其菌落颜色的均一性判断性状遗传的稳定性。TM 和 CM 的进化菌株经过传代后, 其菌落颜色保持均一, 证明其遗传稳定性。)

附表1 本研究所用的质粒

Supplementary Table S1 Plasmids used in this study

Plasmid	Genotype	Source
pRS415	CEN/ARS; Amp; <i>LEU2</i>	Our lab
pRS406-RV500	Amp; <i>URA3</i> ; <i>mVenus</i> ; <i>mCherry</i>	Our lab
p415-MSH2p-mVenus	CEN/ARS; Amp; <i>URA3</i> ; <i>mVenus</i>	This study
p415-TSA1p-mVenus	CEN/ARS; Amp; <i>URA3</i> ; <i>mVenus</i>	This study
p415-RAD27p-mVenus	CEN/ARS; Amp; <i>URA3</i> ; <i>mVenus</i>	This study
p415-CLB5p-mVenus	CEN/ARS; Amp; <i>URA3</i> ; <i>mVenus</i>	This study
p426-SpSgH	2 μ; Amp; <i>URA3</i>	Our lab
p426-Sg11	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg12	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study

续表

p426-Sg13	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg14	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg15	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg16	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg17	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg18	p426-SpSgH target on <i>MSH2</i>	This study
p426-Sg21	p426-SpSgH target on <i>TSA1</i>	This study
p426-Sg22	p426-SpSgH target on <i>TSA1</i>	This study
p426-Sg23	p426-SpSgH target on <i>TSA1</i>	This study
p426-Sg24	p426-SpSgH target on <i>TSA1</i>	This study
p426-Sg25	p426-SpSgH target on <i>TSA1</i>	This study
p426-Sg26	p426-SpSgH target on <i>TSA1</i>	This study
p426-Sg31	p426-SpSgH target on <i>TRAD27</i>	This study
p426-Sg32	p426-SpSgH target on <i>TRAD27</i>	This study
p426-Sg33	p426-SpSgH target on <i>TRAD27</i>	This study
p426-Sg34	p426-SpSgH target on <i>TRAD27</i>	This study
p426-Sg35	p426-SpSgH target on <i>TRAD27</i>	This study
p426-Sg36	p426-SpSgH target on <i>TRAD27</i>	This study
p426-Sg41	p426-SpSgH target on <i>CLB5</i>	This study
p426-Sg42	p426-SpSgH target on <i>CLB5</i>	This study
p426-Sg43	p426-SpSgH target on <i>CLB5</i>	This study
p426-Sg44	p426-SpSgH target on <i>CLB5</i>	This study
p426-Sg45	p426-SpSgH target on <i>CLB5</i>	This study

附表2 本研究所用的引物

Supplementary Table S2 Primers used in this study

Oligo	Sequences(5'→3')	Applications	
SpSg11-for	gatcaatatactgaaaataaaaaag	To construct gRNA plasmids targeting <i>MSH2</i>	
SpSg11-rev	aaacctttttatttcagtatt		
SpSg12-for	gatcgaattttagctctgacctag		
SpSg12-rev	aaacctaggccagagctaaaattc		
SpSg13-for	gatgcctttatccactaatctaa		
SpSg13-rev	aaacttagattagtgataaaaggc		
SpSg14-for	gatcggaaagtcttggccgttaca		
SpSg14-rev	aaactgtaacggcaagaacttcc		
SpSg15-for	gatctatgtatatagaaatatta		
SpSg15-rev	aaactaatattctatatatacata		
SpSg16-for	gatcttaaaagtatgctctccact		
SpSg16-rev	aaacagtggaggacatactttaa		
SpSg17-for	gatcaaaaattctctgatgatcag		
SpSg17-rev	aaacctgatacatcagagaatttt		
SpSg18-for	gatcacttctataagaagtataca		
SpSg18-rev	aaactgtataacttctatagaagt		
SpSg21-for	gatcaagtcgctgcaacaacc		To construct gRNA plasmids targeting <i>TSA1</i>
SpSg21-rev	aaacggtttgtgccagccgactt		
SpSg22-for	gatcaccaggacatataataaggg		

续表

Oligo	Sequences (5'→3')	Applications
SpSg22-rev	aaaccctttatatatgtcctggt	
SpSg23-for	gatcaaggcccgttgagaacggtt	
SpSg23-rev	aaacaaccgttctcaacgggcctt	
SpSg24-for	gatcaggggaagcccgttgagaa	
SpSg24-rev	aaacttctcaacgggccttccct	
SpSg25-for	gatcgggtgtgagcaattgaacga	
SpSg25-rev	aaactcgttcaattgctcacaacc	
SpSg26-for	gatcacatacacatacacaciaa	
SpSg26-rev	aaactgtgtatgtatgtatgt	
SpSg31-for	gatcaaaagctttaaaccgcttagg	To construct gRNA plasmids targeting <i>RAD27</i>
SpSg31-rev	aaaccctaaccgctttaaagcttt	
SpSg32-for	gatcgcgtaacatcgcgcaaatga	
SpSg32-rev	aaactcatttgcgcgatgttacgc	
SpSg33-for	gatcaaagcgttgacagcatacat	
SpSg33-rev	aaacatgtatgctgtcaacgcttt	
SpSg34-for	gatcaagaaataggaaacggacac	
SpSg34-rev	aaacgtgtccgtttcctatttctt	
SpSg35-for	gatcgacaccggaagaaaaatat	
SpSg35-rev	aaacatatttttctccgggtgc	
SpSg36-for	gatcaggttgaatgcaattatat	
SpSg36-rev	aaacataaattgcattcaaacct	
SpSg41-for	gatcaattggccgtgaaaagcttt	To construct gRNA plasmids targeting <i>CLB5</i>
SpSg41-rev	aaacaaaagctttcacggccaatt	
SpSg42-for	gatccttgtgtgagacaactaat	
SpSg42-rev	aaacattagttgtctcacacaaag	
SpSg43-for	gatcgttcagcggcctttaaataca	
SpSg43-rev	aaactgtattaaagccgctgaac	
SpSg44-for	gatctgaacaccttactgaacaa	
SpSg44-rev	aaactgttcagtaaaaggtttca	
SpSg45-for	gatctaatactctgctcatggtcg	
SpSg45-rev	aaaccgaccatgagcagagtatta	
MSH2p-for	NNNNNctcgagattagaattaaaatgtgtag	Used to amplify <i>MSH2p</i>
MSH2p-rev	NNNNNggatcctctctcctctgatacatcag	
mVenus-for	NNNNNggatccggcggcagcggcggcagcatggaattcgtgagcaagg	Used to amplify <i>mVenus</i>
mVenus-rev	NNNNNgagctccaggaagaatacac	
TSA1p-for	NNNNNctcgagacagcaggaaaacgaagatg	Used to amplify <i>TSA1p</i>
TSA1p-rev	NNNNNggatccgacggcagttttctttaaag	
RAD27p-for	NNNNNctcgagaaacaaaagaacagggaag	Used to amplify <i>RAD27p</i>
RAD27p-rev	NNNNNggatccagcagaggggaacatgttccg	
CLB5p-for	NNNNNctcgagtgaagacgcgcccttgatgg	Used to amplify <i>CLB5p</i>
CLB5p-rev	NNNNNggatccaatcatagaattttttaaatac	
SpSg-GJ-for	cttctgggtctcagtcacctcagcacagggaataact	To construct gRNA plasmid library MTRC*2
SpSg-GJ-rev	tatcttaggtctcagtgaggctccctcagggcatg	
2gRNA-F1	NNNNNgggtccggactctttgaaaagataatgtatg	

续表

Oligo	Sequences (5'→3')	Applications
2gRNA-R1	NNNNNgggtctcccggacttgcattgctgcaggagctc	
2gRNA-F2	NNNNNgggtctcctcctctttgaaaagataatgtatg	
2gRNA-R2	NNNNNgggtctcccaaccttgcattgctgcaggagctc	

附表3 基因增变器诱导酿酒酵母基因组产生的突变类型

Supplementary Table S3 Mutation types of the *S. cerevisiae* genome induced by mutators

Strains	SNPs	Small InDels	Other mutation types
yMM	16	0	0
yTM	12	4	0
yRM	12	2	2
yCM	4	0	12

注：采用刀豆氨酸体系来测定4个基因增变器对酿酒酵母基因组的突变类型的影响，每种突变类型的具体数量如表中数据所示。

广告索引：北京华元山水生物科技有限公司(后彩一)/九天基因科技(天津)有限公司(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)