

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-045

担子菌门圆红酵母游离型质粒的构建及应用

陈琼琼^{1,2}, 吕力婷³, 赵宗保^{1,3}

(¹ 中国科学院大连化学物理研究所生物技术部, 辽宁 大连 116023; ² 中国科学院大学, 北京 100049; ³ 大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 含自主复制序列 (ARSs) 的附加体质粒可脱离染色体独立复制, 转化效率高、操作简便, 已广泛应用于子囊菌酵母遗传改造。然而担子菌酵母普遍缺乏成熟附加体编辑体系, 产油菌种圆红酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 亦缺少相关工具。本研究利用 *R. toruloides* 内源 ARS 构建游离型质粒系统, 并证实该质粒可在无筛选压力下丢失。从酵母细胞中回收完整质粒, 进一步验证了其游离型复制特性, 表明该系统适用于无痕迭代遗传改造。将该质粒与 CRISPR/Cas9 编辑系统结合, 本研究不仅实现了 *CAR2*、*CRT1* 和 *NAT* 等靶基因的随机突变, 还通过同源重组途径分别完成了内源基因敲除与增强型绿色荧光蛋白编码基因 (*eGFP*) 表达盒的染色体定点整合。依托质粒可自主丢失特性实现筛选标记无痕回收, 大幅简化菌株迭代改造操作。综上, 该游离型质粒系统是一套灵活且可循环使用的编辑工具, 能够有力支撑 *R. toruloides* 基因功能解析、多基因表达及代谢通路重构等合成生物学研究。

关键词: 圆红酵母; 基因敲除; 同源重组; 游离型质粒; CRISPR/Cas9

中图分类号: Q782 **文献标志码:** A

Construction and application of episomal plasmid in the basidiomycetous yeast *Rhodotorula toruloides*CHEN Qiongqiong^{1,2}, LYU Liting³, ZHAO Zongbao^{1,3}

(¹Laboratory of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning Province, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning Province, China)

Abstract: Episomal plasmids containing autonomously replicating sequences (ARSs) can replicate independently of the host chromosome, exhibiting high transformation efficiency, simple operation and excellent flexibility, and have been widely applied for the genetic modification of ascomycetous yeasts. However, mature episomal editing platforms remain scarce in basidiomycetous yeasts. The oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* lacks recyclable genetic tools, which hinders gene functional research and targeted metabolic engineering. In this study, a new episomal plasmid

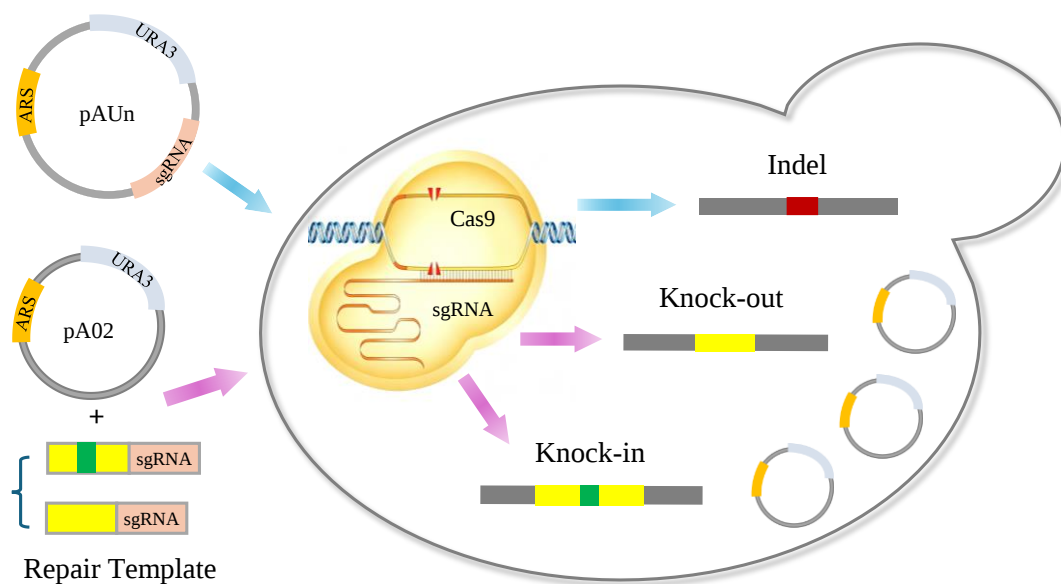
收稿日期: 2026-05-19 修回日期: 2026-08-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目—生物质转化制油脂的化工基础研究 (22238010); 广西壮族自治区科技重大专项 (AA24206050)

引用本文: 陈琼琼, 吕力婷, 赵宗保. 担子菌门圆红酵母游离型质粒的构建及应用[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-045

Citation: CHEN Qiongqiong, LYU Liting, ZHAO Zongbao. Construction and application of episomal plasmid in the basidiomycetous yeast *Rhodotorula toruloides* [J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-045

system specifically adapted to *R. toruloides* was constructed using an endogenous ARS element. A series of functional validation experiments with long-term continuous passage culture confirmed that the episomal plasmid could be spontaneously eliminated under non-selective culture conditions. Repeated plasmid recovery assays and sequencing identification of intact plasmids from transformed *R. toruloides* cells further verified its stable episomal replication feature, laying a solid foundation for marker-free iterative genetic engineering. To further improve its editing performance, this system was combined with the classical CRISPR/Cas9 system and established a multifunctional genome editing platform in *R. toruloides*. Genetic amplification and sequencing verification confirmed that random indel mutations were generated at several functional loci, including *CAR2*, *CRTI*, and *NAT*. In addition, endogenous homologous recombination was induced by co-transformation with homologous donor templates achieving accurate target gene knockout and site-specific chromosomal integration of the enhanced green fluorescent protein (*eGFP*) expression cassette. Fluorescence observation and molecular detection further confirmed the successful integration and exogenous gene expression. Benefiting from the self-eliminating property of this episomal plasmid system, selection markers can be seamlessly recycled after each round of genome editing, which significantly simplifies the cumbersome screening and purification procedures required for iterative strain reconstruction. In conclusion, the flexible and recyclable episomal plasmid system constructed in this work offers a stable and multifunctional editing toolkit for *R. toruloides*. It provides reliable technical support for subsequent synthetic biology research, including gene function verification, multi-gene coordinated expression, and precise reconstruction and optimization of complex metabolic pathways.



Keywords: *Rhodotorula toruloides*; episomal plasmid; gene knock-out; homologous recombination; CRISPR/Cas9

子囊菌门与担子菌门并列为真菌界两大门类，二者同属双核亚界。两者约于十亿年前分化，由此形成了显著的生物学差异^[1]。在有性生殖结构上，子囊菌在子囊内部形成子囊孢子，并依赖钩状体完成细胞核配对；担子菌则在担子外部产生

担孢子，其菌丝通过锁状联合维持双核细胞^[2]。基因组层面同样存在门类差异。子囊菌门酵母内部遗传背景分化明显，但整体基因组复杂度更低；担子菌门酵母的基因组一般具有更高GC含量和内含子密度、更多编码基因数目，以及更复杂的转

录后调控网络^[3-6]。

圆红酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 为担子菌门酵母, 底物谱广, 抗逆性强, 可利用廉价生物质原料, 已成为合成油脂、脂肪酸和萜类等高度依赖乙酰辅酶A供给代谢产物的重要底盘, 工业应用潜力巨大^[7-9]。目前, 圆红酵母已建立了多种基因编辑工具。其中, CRISPR技术已成功应用于随机突变敲除、同源重组介导的定向整合以及碱基编辑等^[10-14]; 同时, 基于Cre重组酶识别靶点 (Cre-loxP) 的诱导型标记回收系统也已建立, 实现了迭代基因组编辑^[15]。

然而, 上述对圆红酵母的遗传改造主要依赖染色体整合策略^[15, 16]。尽管该方法能够实现外源基因的稳定遗传, 但普遍存在筛选标记难以重复利用、多轮基因工程改造周期长、以及潜在的随机整合风险等问题, 制约了其基础研究与应用开发效率^[17, 18]。例如, 传统标记回收方法 (如Cre-loxP系统) 虽能实现标记去除, 但会在染色体上留下重复序列, 这些残留序列可能引发非预期重组或染色体重排^[19]。

游离型质粒因其独立复制、对基因组影响小、便于标记回收和多基因迭代转化等特性, 是突破上述瓶颈的理想工具^[20, 21]。游离型质粒在宿主细胞中稳定维持通常需要两类关键元件: 自主复制序列 (ARS) 和着丝粒, ARS负责DNA复制, 决定质粒能否自主复制, 例如酿酒酵母的2 μ 复制原点; 而着丝粒可提升有丝分裂稳定性^[22, 23]。虽然多数酵母缺乏天然2 μ 高拷贝质粒, 但研究者依旧通过寻找不同来源的ARS元件构建游离型质粒。例如, 在毕赤酵母中, 利用不同来源的ARS已成功构建游离型质粒, 并开发出高效的CRISPR/Cas9基因编辑系统^[24]。类似地, 在甘油假丝酵母中, 通过筛选获得panARS, 并采用基于panARS与PPARS2的双ARS组合策略, 显著提高了游离型质粒的转化效率、拷贝数及表达量^[18]。

圆红酵母作为非常规酵母, 其游离型质粒构建长期受限于缺乏有效ARS和着丝粒信息。尽管早在1985年便有研究指出, 圆红酵母中的苯丙氨酸氨裂解酶基因 (PAL) 片段可能具备ARS活性, 但此后始终未能鉴定出明确、高效的ARS元件^[25]。2021年, Schultz等采用CUT&RUN技术对

该酵母的着丝粒区域进行全基因组鉴定, 发现了15个长度在8-19 kb之间的推定着丝粒序列, 但对其中4个包含着丝粒序列的基因组片段进行测试, 均未检测到ARS活性^[26]。近期, 通过对PAL基因及其上下游序列进行分段扩增和转化效率评估, 已成功从圆红酵母中鉴定出一段功能性ARS序列, 首次为该酵母游离型质粒系统的建立提供了核心元件^[27]。尽管游离型质粒系统已初步建立, 但其在圆红酵母中的应用范围仍局限于随机突变敲除, 同源重组介导的基因敲除和整合仍未见系统研究。

本研究基于上述鉴定的ARS序列, 构建了适用于圆红酵母的游离型质粒表达系统, 并结合CRISPR/Cas9技术, 在多种遗传操作场景中验证了其适用性。通过将该ARS序列与筛选标记及CRISPR/Cas9元件组装, 构建基于游离型质粒的基因编辑体系, 实现以下三方面应用: 通过游离型质粒携带sgRNA表达盒, 成功随机突变敲除类胡萝卜素合成通路基因 (CAR2和CRTI) 和抗性基因 (NAT); 通过游离型质粒和携带单链引导RNA (single-guide RNA, 简称sgRNA) 表达盒的靶基因线性供体DNA片段共转化, 实现基于同源重组的基因敲除; 将基因表达盒上下游链接靶位点同源序列, 所得线性供体DNA片段和游离型质粒共转化, 实现染色体特定位点表达盒整合。通过上述研究, 建立了一套高效便捷的游离型质粒辅助遗传操作体系, 为后续代谢工程改造和合成生物学研究提供使能工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基

LB (Luria-Bertani) 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母抽提物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 配制固体培养基时添加 20 g/L 的琼脂粉。LB培养基中添加抗生素至终浓度分别为: 卡那霉素 (Kan) 50 μ g/mL、氨苄青霉素 (Amp) 100 μ g/mL。

YPD (yeast extract peptone dextrose) 培养基: 酵母抽提物 10 g/L, 胰蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 配制固体培养基时添加 20 g/L 的琼脂粉。YPD培

培养基中添加抗生素至终浓度分别为：潮霉素 (Hygromycin B, HYG) 50 $\mu\text{g/mL}$ 、诺尔丝菌素 (Nourseothricin, NAT) 50 $\mu\text{g/mL}$ 。YPD平板为添加50 $\mu\text{g/mL}$ 诺尔丝菌素的YPD固体平板。

SD-Ura培养基：葡萄糖20 g/L，无氨基酸酵母氮源6.7 g/L，配制固体培养基时添加20 g/L的琼脂粉。

5-FOA培养基：葡萄糖20 g/L，无氨基酸酵母氮源6.7 g/L，5-氟乳清酸 (5-FOA) 1.0 g/L，尿嘧啶0.1 g/L，配制固体培养基时添加20 g/L的琼脂粉。

1.1.2 实验设备

实验使用的主要设备：紫外/可见分光光度计，JASCO V-530；高速冷冻离心机，Hitachi GM-21M；超微量分光光度计，Thermo Fisher Scientific ND-1000 NanoDrop；凝胶成像系统，Syngene InGenius LHR；PCR仪，Takara TP600；电转化仪，Eppendorf Eporator；冷冻研磨仪，Servicebio KZ-5F-3D；细胞成像系统，Thermo Fisher Scientific EVOS M5000。

1.2 质粒构建

质粒均通过RF克隆 (restriction-free cloning) 的方法构建^[28]。

构建游离表达载体。以圆红酵母NP11基因组DNA为模板，用引物ARS1000-F/ARS1000-R扩增内源ARS片段 (DNA序列见表S1)，克隆至pUC57骨架，获得pA0。以pH01为模板，用引物PGKpart-F/T_{NOS}-R扩增潮霉素表达盒P_{PGK}-HYG-T_{NOS}，克隆至pA0，获得pA01。以NP11基因组为模板，分别用引物URA3P-F/URA3T-R和LEU2P-F/LEU2T-R扩增URA3 (编码乳清苷5-磷酸脱羧酶) 和LEU2基因 (编码 β -异丙基苹果酸脱氢酶) 片段，各自替换pA01中的HYG基因，获得pA02和pA03。以pZPK-eGFP为模板，用引物eGFP-RF-F/eGFP-RF-R扩增eGFP基因，分别插入pA01和pA02，获得pA04和pA05。

构建用于CRISPR基因敲除的系列载体pAU_n (pAU01、pAU02与pAU03)。在目标基因的外显子区域中，筛选具有5'-N20-NNGRRT-3'序列特征的靶点^[11]。驱动表达sgRNA的5S-tRNA融合启

动子来源于圆红酵母内源5S rRNA与tRNA串联构建，兼具5S rRNA的高转录活性与tRNA的自剪切特性^[12]。以pCar2.1质粒为模板，分别使用3对引物 (T_{NOS}-5s-F/sgRNA-R、T_{NOS}-5s-F/nat.1-sgRNA-R、T_{NOS}-5s-F/crti.2-sgRNA-R) 扩增不同的sgRNA表达盒，并将其分别克隆至pA02质粒上，得到相应的敲除载体pAU01、pAU02与pAU03。

构建用于染色体定点同源重组整合的载体。从NP11基因组中扩增URA3基因上游和下游各1000 bp的DNA片段，作为敲除URA3基因的左同源臂和右同源臂，分别克隆至pH01质粒中P_{PGK}-HYG-T_{NOS}表达盒的两侧，得到质粒pURA3H。此外，以质粒pCAR2Hsg为模板，用引物pZPK166-F/CAR2-RF-R进行扩增，以去除其内部的P_{PGK}-HYG-T_{NOS}表达盒，获得质粒pCAR2LRsg。最后，以质粒pZPK-eGFP为模板，用引物eGFP-RF-F/eGFP-RF-R扩增eGFP基因，分别替换pCAR2Hsg、pCAR2Hs2、pCAR2Hs3及pCAR2Hs4质粒上的HYG基因，对应获得pCAR2eGs1、pCAR2eGs2、pCAR2eGs3、pCAR2eGs4重组质粒。

所有RF克隆产物转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞后，经生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序验证正确后，再进行质粒提取，用于后续实验。本研究所涉及质粒见表1，所用引物序列见表S2。

1.3 菌株构建

本研究所用圆红酵母 (*Rhodotorula toruloides*，早期命名为圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides*)^[29]，单倍体菌株NP11、NP11-SaCas9-1、NS03、NCYC1585、IFO0880均由本实验室保存。

R. toruloides SDU6菌株的构建流程如下：以起始菌株 *R. toruloides* NS03为宿主，通过醋酸锂转化法制备感受态细胞。以pURA3H质粒为模板，用引物PZPK166-F和RB-R进行PCR扩增，获得线性供体DNA片段 (序列结构为URA3L-P_{PGK}-HYG-T_{NOS}-URA3R)。将该线性供体DNA转化至NS03感受态细胞中，转化产物涂布于含潮霉素的YPD平板进行初步筛选。挑取转化子，分别划线于5-FOA平板和SD-Ura平板。由于URA3基因被破坏

后细胞获得 5-FOA 抗性且失去尿嘧啶自养能力，因此筛选能够在 5-FOA 平板上生长、同时在 SD-Ura 平板上不生长的转化子。提取上述转化子的基因组 DNA，通过 PCR 扩增 URA3 位点上下游边界进行基因型鉴定（引物见表 2），并将 PCR 产物送测序验证。将鉴定正确的菌株命名为 SDU6。

1.4 酵母基因组 DNA 提取

取过夜培养的圆红酵母菌液，离心收集菌体。加入玻璃珠与 TES 缓冲液，使用细胞研磨破碎仪破碎细胞。随后，采用苯酚-氯仿-异戊醇（25：24：1）抽提裂解液，离心后吸取上清。加入醋酸钠和无水乙醇沉淀 DNA，经 75% 乙醇洗涤、干燥后，将基因组 DNA 溶解于 TE 缓冲液中，使用超微量分光光度计测定浓度，于 -20 °C 保存备用。

1.5 圆红酵母醋酸锂转化法

圆红酵母的醋酸锂转化方法在文献 [30] 的基础上进行部分改进，具体如下：将过夜培养的圆红酵母转接至新鲜 YPD，调整初始 OD₆₀₀ 至 0.2，30 °C 振荡培养至 OD₆₀₀=0.6~1.0。收集菌体后，依次用 50 mL、25 mL 无菌水和 10 mL 100 mM 醋酸锂各洗涤一次，最后加入 100 mM 醋酸锂重悬菌体。取适量感受态细胞，于 8000 g 离心 30 s 弃上清。依次加入 240 μL PEG3350、36 μL 1 M 醋酸锂、100 μg 热变性鲑鱼精 DNA、1-2 μg 质粒或线性化 DNA 片段，补加无菌水至 360 μL。混匀后于 30 °C 振荡孵育 30 min，并于 37 °C 水浴孵育 60 min（NCYC1585 和 IFO0880 菌株在转入 37 °C 前需额外加入 36 μL DMSO）。离心去上清，用 YPD 重悬并洗涤一次后，将细胞重悬于 1 mL YPD 中过夜培养。最终收集细胞涂布于相应抗性的 YPD 平板，30 °C 培养 3-5 天至菌落长出。

转化效率计算：转化效率（cfu/μg DNA）=（平板菌落数×稀释倍数）/转化 DNA 量（μg）。

1.6 游离质粒的丢失与筛选

1.6.1 基于潮霉素抗性标记的质粒丢失

将 pA01 与 pU01 质粒通过醋酸锂转化法转入宿

主菌株 NS03 中，转化产物涂布于含潮霉素的 YPD 平板，于 30 °C 培养 2-3 天直至转化子生成。随机挑选 3 株转化子至 YPD 液体培养基中连续培养（不添加任何抗性），以 1：100 比例每天转接至新鲜 YPD，连续培养 5 天。每间隔 24 h 取样，分别涂布于含潮霉素的 YPD 平板（YPDH）和不含抗性的 YPD 平板，观察菌落生长情况。

质粒保留率计算：质粒保留率（%）=（YPDH 平板菌落×稀释倍数）/（YPD 平板菌落数×稀释倍数）×100%。每个时间点设置 3 个生物学平行，结果以平均值±标准差表示。

1.6.2 基于 URA3 标记的质粒丢失

将质粒 pA02 与 pU02 通过醋酸锂转化法转入宿主菌株 SDU6 中，转化产物涂布于 SD-Ura 平板，于 30 °C 培养 2-3 天直至转化子生成。随机挑选 3 株转化子至 YPD 液体培养基中连续培养（不添加任何抗性），以 1：100 比例每天转接至新鲜 YPD，连续培养 5 天。每间隔 24 h 取样，分别涂布于 SD-Ura 平板和不含抗性的 YPD 平板，观察菌落生长情况。

5-FOA 液体培养基筛选：取一个携带质粒 pA02 的单菌落于 YPD 液体培养基培养 24 h 后，按 1：100 比例转移至 5-FOA 液体培养基中培养，每间隔 24 h 取样，分别涂布于 SD-Ura 平板和不含抗性的 YPD 平板，观察菌落生长情况。

质粒保留率的测定及计算方法同 1.6.1，且将 YPDH 平板替换为 SD-Ura 平板。

敲除效率检测：成功敲除 *CAR2* 和 *CRT1* 基因的转化子因类胡萝卜素合成受阻而呈白色菌落（野生型通常呈红色）；成功敲除 *NAT* 基因的转化子在含 NAT 的 YPD 平板上不生长。为分析菌落的突变类型，对靶位点的 PCR 产物进行 Sanger 测序。

本研究中，CRISPR/Cas9 系统介导的编辑事件分为两类：一类为随机突变（由 NHEJ 修复导致基因失活），通过白色/NAT 敏感表型进行筛选；另一类为同源重组（HR）（含基因敲除与靶向整合），通过颜色表型筛选结合测序进行鉴定。各指标均来源于各自独立的转化实验，转化子分别挑取、分别计数。具体计算公式如下：

随机突变效率（Random mutagenesis efficiency, %）=（发生表型突变的转化子数 / 初

筛存活总转化子数)×100%;

针对白色显色实验(*CAR2*与*CRTI*基因),“发生表型突变的转化子”指菌落呈白色的转化子;针对NAT抗性标记实验,“发生表型突变的转化子”指在YPD平板上能够生长、但在含NAT平板上不能生长的转化子;

CRISPR介导的编辑效率(CRISPR-editing efficiency, %)=白色转化子数/总转化子数×100%;(白色转化子即代表本实验条件下CRISPR系统介导的全部*CAR2*基因失活事件,涵盖随机突变与HR介导的基因敲除);

质粒丢失率(Episomal plasmid loss frequency, %)=在SD-Ura平板上不生长的转化子数/总检测转化子数×100%;

同源重组阳性克隆率(即本实验条件下的HR效率)均采用以下公式进行计算:

HR效率(HR efficiency, %)=(经测序验证正确的特异性转化子数/经抗性筛选存活的总转化子数)×100%;

其中,针对基因*CAR2*的HR介导的基因敲除实验,“特异性转化子”指测序验证发生666 bp基因敲除的转化子;针对基因*CAR2*的靶向整合*eGFP*的实验,“特异性转化子”指PCR及测序验证发生外源片段靶向整合的转化子。

1.7 质粒回收

将携带质粒pA02的酵母转化子接种于SD-Ura液体培养基中,30℃、200 rpm振荡过夜培养。离心收集菌体,加入玻璃珠和TES缓冲液,使用细胞研磨破碎仪破壁后,采用酵母质粒提取试剂盒(索莱宝)提取质粒DNA。将所得质粒转化至*E. coli* DH5α感受态细胞中,筛选阳性转化子,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.8 荧光显微镜观察

取酵母菌液滴于载玻片上,盖上盖玻片后置于荧光显微镜下观察。使用FITC滤光块(激发波长488 nm,发射波长507 nm)检测绿色荧光信号。

2 结果与讨论

2.1 圆红酵母游离型质粒构建与功能验证

ARS是维持环状质粒在酵母细胞中自主复制的核心元件^[32]。为构建圆红酵母游离型质粒表达系统,本研究从NP11基因组中扩增获得一段已报道的约1000 bp的ARS功能片段[27],并将其插入pUC57载体骨架,构建得到质粒pA0。在此基础上,分别插入潮霉素表达盒(P_{PGK} -*HYG*- T_{NOS})和*URA3*表达盒(P_{PGK} -*URA3*- T_{NOS}),得到游离型质粒pA01和pA02[图1(a)]。此外,本研究通过将线性供体DNA转入菌株NS03中,借助同源重组技术敲除其*URA3*基因,成功构建尿嘧啶营养缺陷型圆红酵母菌株SDU6[图1(b)]。

为验证内源ARS元件功能,本研究进一步构建缺失ARS序列的整合型对照质粒pU01与pU02[图1(c)]。将游离型质粒pA01、pA02与随机整合的整合型质粒pU01、pU02分别转化对应宿主菌株,对比分析各组质粒的转化效率。结果显示,质粒pA01和pU01的转化效率无显著差异;而pA02的转化效率为492 cfu/μg DNA,显著高于pU02的245 cfu/μg DNA[图1(d)]。这与以尿嘧啶为筛选标记时游离型质粒转化效率通常高于整合型质粒的报道一致^[33, 34],表明该ARS序列可有效支持质粒在圆红酵母中自主复制。

为探索本研究构建的游离型质粒在无筛选压力下的自发丢失情况,将携带质粒pA01或pA02的转化子在YPD液体培养基中连续传代培养5天,每24 h取样涂布于含或不含筛选压力的平板上,并以转入质粒pU01或pU02的转化子作为对照。培养5天后,pA01的保留率降至约5.7%,pA02的保留率降至约61.2%。对保留筛选标记的传代菌株进行PCR鉴定结果表明,61.2%的pA02保留菌株中77.8%可同时扩增出质粒骨架与表达盒,证明质粒以游离形式稳定存在且未发生基因组整合,另有22.2%的菌株丢失完整质粒骨架但残留部分表达盒,疑似发生质粒相关序列整合的潜在比例为13.6%。此外,仅存的5.7%携带pA01的阳性菌株继续传代2次后,标记保留率进一步降至2.1%,说明游离质粒可随传代持续丢失,对照组整合型

表1 本研究所使用的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant description	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> -λ - <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+)</i>	Our lab
NP11	Haploid, <i>MAT A</i>	Our lab
NP11-SaCas9-1	NP11, P _{GPD} -SaCas9-T _{HSP}	[11]
NS03	NP11-SaCas9-1, P _{PGK} - <i>NAT</i> -T _{NOS} -P _{ADH2} - <i>ScRAD52</i> -T _{HSP}	[31]
SDU6	NS03, <i>URA3::</i> P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS}	This study
IFO0880	Haploid, <i>MAT a, ku70Δ</i>	Our lab
NCYC1585	Haploid, <i>MAT a, leu2Δ</i>	Our lab
Plasmids		
pH01	pZPK-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} , Kan ^R	Our lab
pZPK-eGFP	pZPK-URA3L-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -T _{NOS} -URA3R-P _{5S-rRNA} - <i>ura3.2</i> -sgRNA, Kan ^R	Our lab
pCar2.1	pZPK-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} -P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	Our lab
pCAR2Hsg	pZPK-CAR2L (1000)-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} -CAR2R (1000)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	Our lab
pCAR2Hs2	pZPK-CAR2L (500)-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} -CAR2R (500)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	Our lab
pCAR2Hs3	pZPK-CAR2L (200)-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} -CAR2R (200)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	Our lab
pCAR2Hs4	pZPK-CAR2L (50)-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} -CAR2R (50)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	Our lab
pURA3H	pZPK-URA3L-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} -URA3R, Kan ^R	This study
pUC57	pUC57, Amp ^R	Our lab
pA0	pUC57-ARS, Amp ^R	This study
pU01	pUC57-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
pU02	pUC57-P _{PGK} - <i>URA3</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
pA01	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>HYG</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
pA02	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>URA3</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
PA03	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>RtLEU2</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
pA04	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -P2A- <i>URA3</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
pA05	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -P2A- <i>HYG</i> -T _{NOS} , Amp ^R	This study
pAU01	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>URA3</i> -T _{NOS} -P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Amp ^R	This study
pAU02	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>URA3</i> -T _{NOS} -P _{5S-rRNA} - <i>crti.2</i> -sgRNA, Amp ^R	This study
pAU03	pUC57-ARS-P _{PGK} - <i>URA3</i> -T _{NOS} -P _{5S-rRNA} - <i>nat.1</i> -sgRNA, Amp ^R	This study
pCAR2LRsg	pZPK-CAR2L (1000)-CAR2R (1000)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	This study
pCAR2eGs1	pZPK-CAR2L (1000)-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -T _{NOS} -CAR2R (1000)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	This study
pCAR2eGs2	pZPK-CAR2L (500)-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -T _{NOS} -CAR2R (500)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	This study
pCAR2eGs3	pZPK-CAR2L (200)-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -T _{NOS} -CAR2R (200)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	This study
pCAR2eGs4	pZPK-CAR2L (50)-P _{PGK} - <i>eGFP</i> -T _{NOS} -CAR2R (50)-P _{5S-rRNA} - <i>car2.1</i> -sgRNA, Kan ^R	This study

质粒pU01或pU02的转化子在连续培养后，稳定表达抗性基因的转化子比例仍维持在100%左右[图1(e)]。上述结果表明本研究构建的游离型质粒具备可自发丢失、动态可控的核心特征。

基于5-FOA对*URA3*阳性酵母细胞的特异性致死效应，将携带pA02的转化子置于含5-FOA的液体培养基中培养，每24 h取样，分别涂布于SD-

Ura平板和YPD平板进行菌落计数。结果显示，含质粒的细胞占比随培养时间延长持续降低，培养4天后仅为6.4% [图1(f)]，表明5-FOA反向筛选可高效富集质粒丢失的酵母菌株。实验中仍存在少量带质粒细胞耐受5-FOA筛选的现象，推测原因一是游离质粒拷贝数偏低，胞内乳清苷-5'-磷酸脱羧酶表达不足，毒性代谢产物5-氟尿嘧啶无法

达到致死浓度；二是5-FOA筛选压力下，质粒上*URA3*基因可能发生自发失活突变，使细胞产生抗性^[10, 35]。

鉴于*URA3*基因兼具正负双向筛选功能，后续实验均采用*URA3*基因作为筛选标记。其中正向筛选通过SD-Ura平板特异性富集携带质粒的转化子；反向筛选利用5-FOA对*URA3*阳性细胞的致死作用，在液体培养中持续清除含质粒细胞，特异性扩增发生质粒丢失的转化子。该筛选体系可有效提升筛选通量与菌株富集效率、缩短试验周期并避免残留质粒对后续基因功能验证、代谢改造实验的干扰[图1(g)]。

为验证游离型质粒pA02在圆红酵母体内的游离存在特性与序列完整性，随机选取10株pA02阳性转化子，提取酵母基因组DNA为模板，采用两对特

异性引物进行PCR扩增鉴定[图2(a)]。PCR结果显示，所有转化子均扩增出与预期大小一致的目的条带，阴性对照无特异性条带扩增，证实pA02可在圆红酵母中以完整游离质粒的形式稳定存在[图2(b)]。为进一步验证质粒序列无突变、结构完整，提取酵母胞内质粒并转化至大肠杆菌进行扩增回收，测序结果显示，回收质粒序列与pA02原始参考序列完全匹配，无任何碱基突变、缺失或插入。

综上所述，本研究利用圆红酵母内源ARS序列成功构建了可自主复制、可自发丢失的游离型质粒。该质粒可在圆红酵母中稳定完成自主复制，且在无筛选压力下可自发丢失，同时可通过5-FOA反向筛选快速获得质粒丢失菌株，可为后续圆红酵母基因编辑、代谢通路改造等研究提供高效的质粒工具。

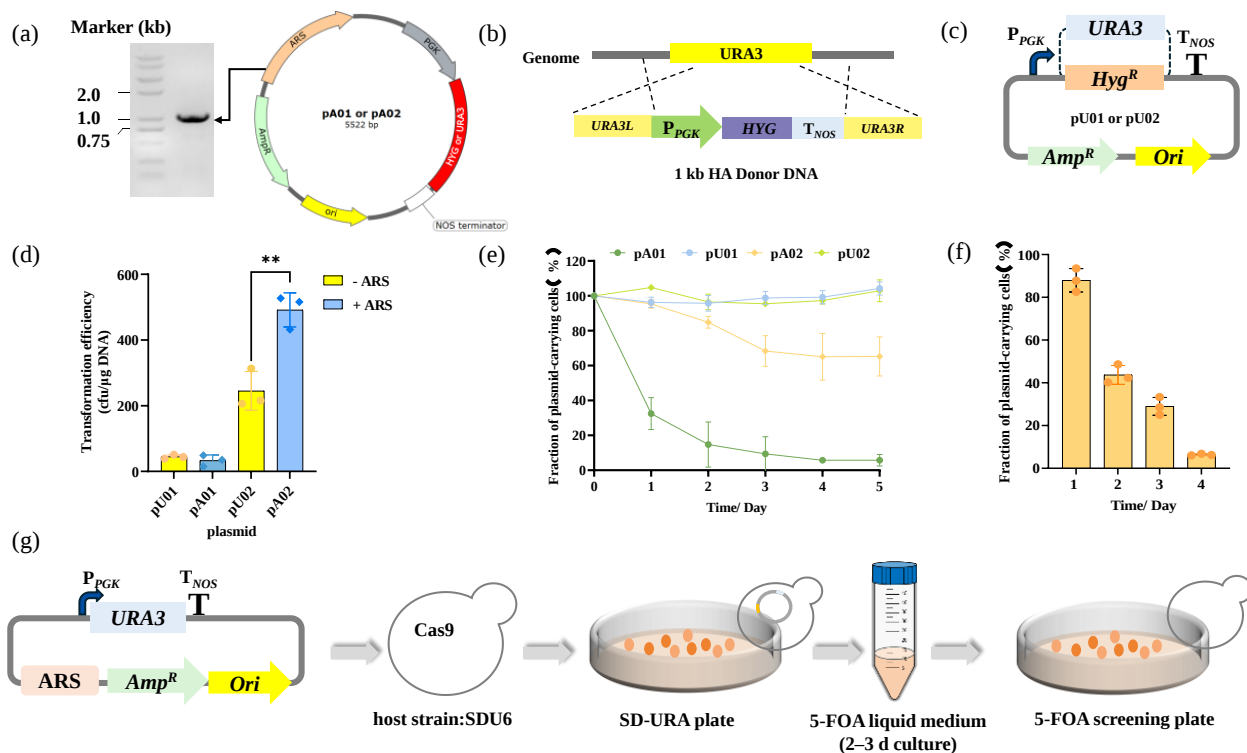


图1 游离型质粒的构建与功能验证

(a) ARS片段凝胶电泳图(左)及游离型质粒结构(右);(b)敲除*URA3*位点的同源重组表达盒;(c)整合型质粒结构示意图;(d)质粒转化效率(-ARS表示质粒不含ARS序列,+ARS表示质粒含有ARS序列);(e)质粒保留率曲线;(f)5-FOA液体培养基中pA02质粒保留率;(g)游离型质粒转化流程图。数据经t-检验分析,显著性标记“*”表示 $P < 0.05$,”*”表示 $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Construction and functional validation of the episomal plasmid

(a) ARS fragment gel electrophoresis (left) and schematic diagram of the episomal plasmid structure (right); (b) Homologous recombination cassette for *URA3* knockout; (c) Schematic diagram of the integrative plasmid structure; (d) Plasmid transformation efficiency (-ARS, without ARS; +ARS, with ARS); (e) Curve of plasmid maintenance rate; (f) pA02 plasmid retention rate in 5-FOA liquid medium; (g) Schematic workflow for episomal plasmid transformation. The data were analyzed using t-test, and the significant results were marked with “*” indicating that $P < 0.05$,”*” indicating that $P < 0.01$.

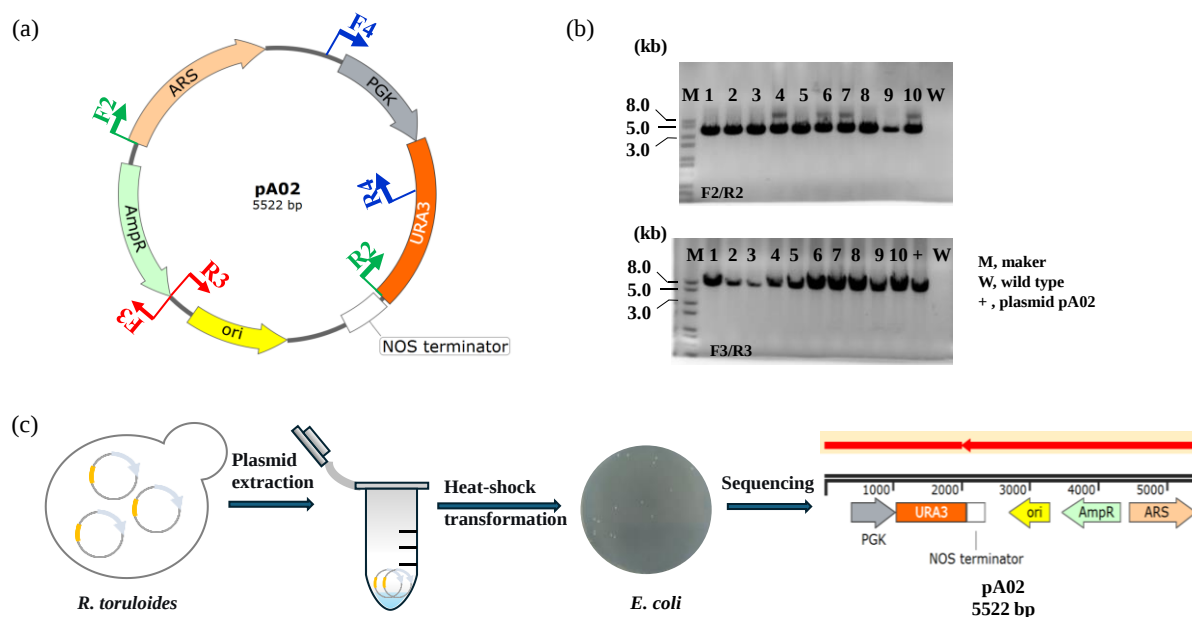


图2 pA02 游离型质粒的PCR验证及回收鉴定

(a) pA02质粒图谱及PCR验证引物位置示意图；(b) pA02质粒环状形式的PCR检测结果。上图，引物对F2/R2扩增结果；下图，引物对F3/R3扩增结果；(c) 质粒回收实验流程及测序验证结果。

Fig. 2 PCR verification and recovery identification of the episomal plasmid pA02

(a) Map of pA02 plasmid and schematic diagram of primers for PCR verification; (b) PCR detection results for the circular form of pA02 plasmid. Upper panel, primer pair F2/R2; lower panel, primer pair F3/R3; (c) Workflow of plasmid recovery assay and sequencing verification of the recovered plasmid.

2.2 游离型质粒介导的CRISPR随机突变

在圆红酵母中，CRISPR/Cas9编辑体系多通过sgRNA表达盒整合至宿主染色体，依托非同源末端连接机制（NHEJ）修复机制诱导靶基因产生随机突变^[11-12]。然而，该染色体整合型编辑策略存在随机整合、脱靶风险较高、易干扰宿主内源基因及回补实验体系等缺陷^[36]。因此，开发游离型质粒辅助的CRISPR敲除系统，对实现酵母无痕、可回收的基因编辑具有重要意义。

为验证该系统的可行性，选取圆红酵母 β -类胡萝卜素合成通路关键基因CITI（GenBank ID: RHOT_04602，编码八氢番茄红素脱氢酶）与CAR2（GenBank ID: RHOT_04605，编码具有八氢番茄红素合成酶和胡萝卜素环化酶活性的双功能蛋白）作为敲除靶点^[14, 37]，上述两个基因的功能缺失均可使酵母菌落由野生型红色突变为白色。此外，选择NAT抗性基因（编码诺尔丝菌素乙酰转移酶）作为另一个靶点，该基因敲除可使菌株恢复对诺尔丝菌素的药物敏感性，实现筛选标记

的循环复用。本研究采用游离型质粒递送sgRNA表达盒，分别构建靶向上述3个基因的CRISPR敲除载体pAU_n [图3(a)]，并将其转化至稳定表达Cas9蛋白的菌株SDU6中开展编辑验证。

转化结果显示，分别将游离质粒pAU01（靶向CAR2）与pAU02（靶向CITI）转入SDU6菌株，两组转化均观察到部分菌落由野生型红色转变为白色 [图3(b)]。随机挑取白色菌落进行PCR扩增和Sanger测序鉴定，结果显示各靶位点处均发生了不同长度的碱基缺失突变 [图3(d)]。统计分析显示，CITI位点的阳性敲除克隆数分别为5/50、7/42和8/54，平均随机突变效率为 $13.8 \pm 3.4\%$ 。CAR2位点阳性敲除克隆数分别为2/24、3/24和4/24，随机突变效率为 $12.5 \pm 4.2\%$ [图3(e)]。将靶向NAT的游离质粒pAU03转化SDU6菌株，约26.7%的转化子无法在含诺尔丝菌素的抗性平板与SD-Ura平板上生长，提示该部分菌株已成功敲除NAT基因且丢失游离编辑质粒 [图3(c)]。PCR产物经进一步测序确认NAT基因已被破坏 [图3(d)]。将各靶点获得的转化子划线接种于5-FOA筛选平

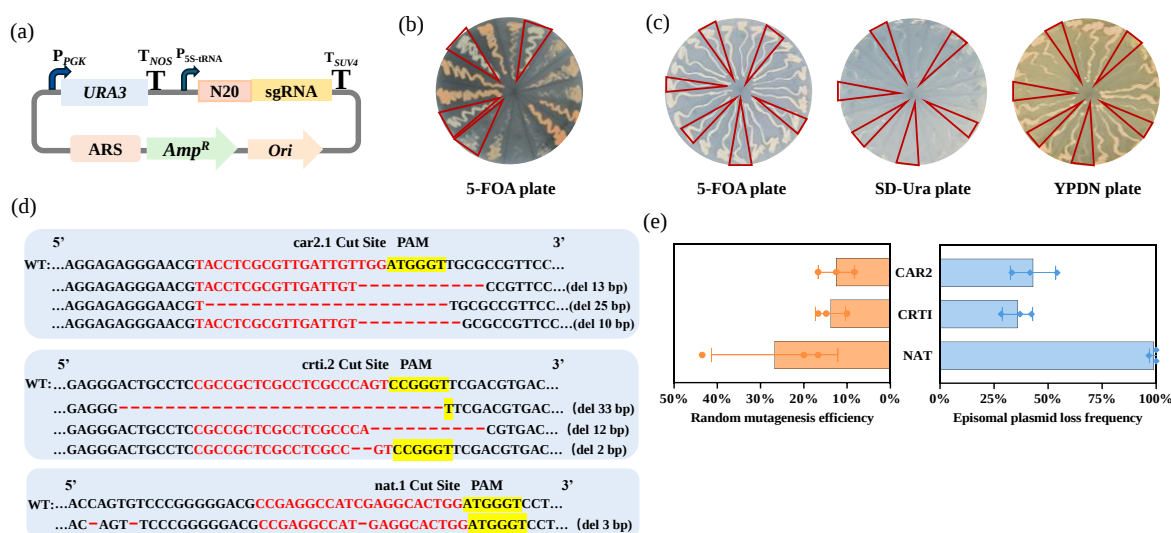


图3 游离型质粒pAUn辅助CRISPR-Cas9介导的随机突变

(a) sgRNA表达游离载体pAUn示意图；(b) *CRT1*基因随机突变的菌落颜色表型验证。红色三角标示阳性转化子；(c) NAT抗性及其质粒丢失的表型验证。红色三角形标示阳性转化子；(d) 靶位点随机突变测序验证。N20序列以红色字体标注，PAM序列以黄色高亮标注；(e) 随机突变效率（左）及质粒丢失频率（右）统计，数据以mean ± SD表示（n = 3）。

Fig. 3 CRISPR-Cas9-mediated random mutagenesis assisted by the episomal plasmid pAUn

(a) Schematic of sgRNA-expression episomal plasmid pAUn; (b) Colony color phenotype validation of *CRT1* gene random mutagenesis. Red triangles: positive transformants; (c) Phenotypic validation of NAT resistance and plasmid loss. Red triangles: positive transformants; (d) Sequencing validation of random mutagenesis at the target site. The N20 sequence is shown in red, and the PAM sequence is highlighted in yellow; (e) Statistics of random mutagenesis efficiency (left) and episomal plasmid loss frequency (right). Data are presented as mean ± SD (n = 3).

板，结果显示不同靶点的质粒丢失效率介于30%~100% [图3(e)]。质粒丢失效率显著高于基因敲除效率，表明部分转化子仅发生游离型质粒丢失，未完成靶基因位点的编辑修饰。

2.3 游离型质粒介导的CRISPR-HR基因敲除

游离型质粒辅助的CRISPR/Cas9系统虽可实现靶基因随机突变，但其依赖NHEJ，无法实现精准基因修饰或原位替换，例如点突变、启动子优化或基因缺失^[38]。为弥补随机编辑的局限实现圆红酵母精准基因改造，本研究引入同源重组（HR）机制，构建游离型CRISPR-HR精准编辑体系。环状质粒可作为双链同源修复供体介导CRISPR精准编辑却易出现不对称同源定向修复问题，即DNA双链断裂一端通过HR整合目标序列，另一端借助NHEJ或微同源末端连接（MMEJ）连接载体骨架，会造成质粒冗余序列随机插入基因组^[39]。前期研究系统对比了同源修复模板的递送方式，将sgRNA表达盒与同源修复模板全部组装至同一组成型质粒进行醋酸锂转化，结果显示菌株整体转

化效率出现明显下降^[31]，因此本研究选择不含冗余骨架的线性DNA片段充当供体模板，提升编辑精准度与细胞存活效率。将携带*CAR2*基因上下游同源臂及sgRNA表达盒的线性供体DNA与游离型质粒pA02共转化至菌株SDU6，利用CRISPR/Cas9系统诱导靶基因DNA双链断裂，同时提供同源修复模板，通过HR通路介导敲除靶基因 [图4(a)]。

共转化实验结果显示，3个SD-Ura平板上共获得58株转化子，其中白色转化子共12株，各平板阳性菌株的比例分别为4/15、3/16和5/27。对这12株白色转化子开展PCR鉴定，结果显示10株转化子的PCR产物长度显著短于野生型菌株，其余2株扩增大小与野生型相近 [图4(b)]。测序鉴定结果表面，10株阳性转化子在*CAR2*靶位点发生了666 bp特异性片段的精准敲除，剩余2株转化子仅发生NHEJ介导的随机碱基缺失突变 [图4(c)]。

菌株统计结果显示，HR介导的基因敲除效率为17.2%（10/58），NHEJ介导的突变效率约为3.4%（2/58）。上述结果表明，在提供同源修复模板的条件下，该游离型CRISPR编辑体系对*CAR2*

基因的编辑以HR精准修复途径为主要方式，同时伴随少量NHEJ随机修复事件[图4(d)]。这可能是由于NHEJ与HR通路存在竞争关系，NHEJ修复速度更快且不依赖模板，可在线性供体DNA发挥作用前完成断裂修复；另一方面，线性供体DNA具有游离末端，进入细胞后易被核酸酶降解或发生末端重组，可能导致同源臂失效，而sgRNA表达盒仍能正常表达^[39, 40]。

为进一步提升基因敲除效率、验证sgRNA表达量对编辑效果的影响，将游离型质粒pAU01与线性供体DNA共转化SDU6菌株。pAU01由pA02质粒引入sgRNA表达盒构建获得，因此该策略是在线性供体DNA自带sgRNA表达盒的基础上，通过pAU01质粒额外增加sgRNA表达拷贝。结果显示，HR介导的基因敲除效率显著提升至32.5%，且未检测到NHEJ介导的随机突变事件[图4(d)]。该结果表明，初始体系编辑效率偏低是由于sgRNA表达剂量不足，靶位点切割效率有限；而通过游离型质粒增加sgRNA表达，可提升CRISPR

切割效率，有效抑制NHEJ随机修复，提高游离型CRISPR-HR体系的精准编辑能力。

2.4 游离型质粒介导的CRISPR-HR基因整合

在实现靶基因精准敲除的基础上，进一步探究该体系介导外源基因定点同源整合的能力。为此，本研究构建以增强型绿色荧光蛋白(eGFP)为报告基因、靶向*CAR2*基因位点的线性供体DNA，将其与游离型质粒pA02共转化至菌株SDU6中[图5(a)]。

随机挑取12株白色表型转化子进行PCR边界鉴定，分别检测整合位点的上游边界(CAR2L-F/eGFP-R，预期3527 bp)与下游边界(eGFP-F/CAR2R-R，预期2522 bp)。PCR鉴定结果显示，12株转化子在上下游边界均可扩增出预期大小一致的单一特异性条带[图5(b)]，表明线性供体DNA已精准定点整合至*CAR2*基因靶位点。进一步对PCR阳性菌株开展荧光显微镜观察，在488 nm

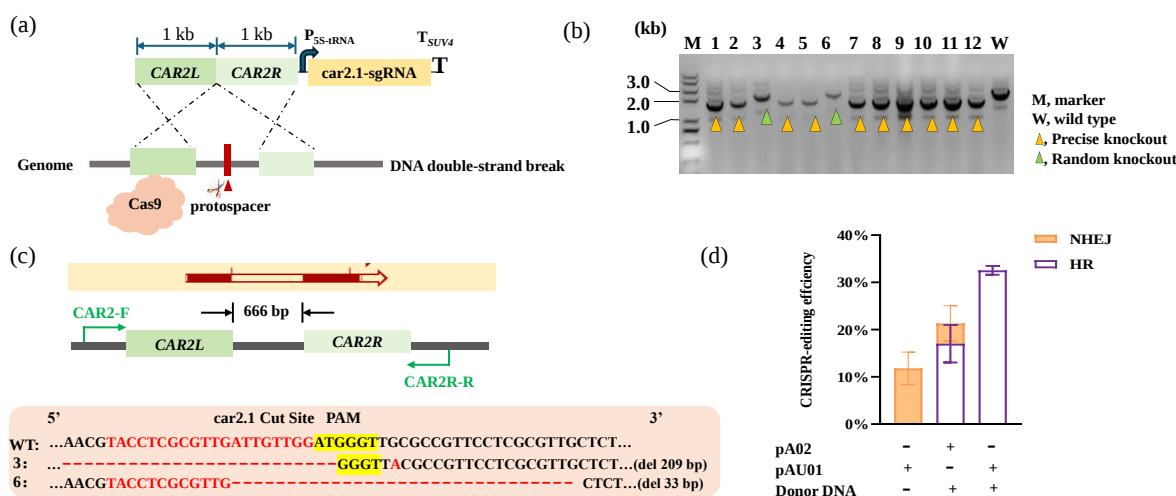


图4 游离型质粒辅助同源重组介导的基因敲除

(a) 线性供体DNA片段结构示意图；(b) 白色转化子的基因型PCR验证结果；(c) 靶位点测序验证结果。同源重组介导的基因敲除表现为*CAR2*基因座定向缺失666 bp（对应图4b泳道1-2、4-5、7-12）；随机突变敲除表现为靶位点不同长度的随机缺失（对应图4b泳道3、6）。上图：测序比对示意图，红色箭头指示测序方向；下图：随机突变敲除靶位点的具体碱基序列变化；(d) pA02、pAU01及线性供体DNA不同组合处理时NHEJ与HR介导的CRISPR编辑效率对比。数据以均值 $\pm$ 标准差表示（n = 3）。

Fig. 4 HR-mediated gene knockout assisted by the episomal plasmid

(a) Schematic diagram of the donor DNA fragment; (b) Genotypic PCR validation of white transformants; (c) Sequencing validation of target sites. HR-mediated gene knockout resulted in a targeted 666 bp deletion at the *CAR2* locus (corresponding to lanes 1-2, 4-5, and 7-12 in panel, while random mutagenesis caused variable random deletions at the target site (lanes 3 and 6 in panel). Upper panel: schematic diagram of sequencing alignment, with red arrows indicating the sequencing direction; Lower panel: detailed base sequence variations at randomly mutated target sites; (d) Comparison of CRISPR editing efficiencies mediated by NHEJ and HR under different treatment combinations of pA02/pAU01 and donor DNA. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

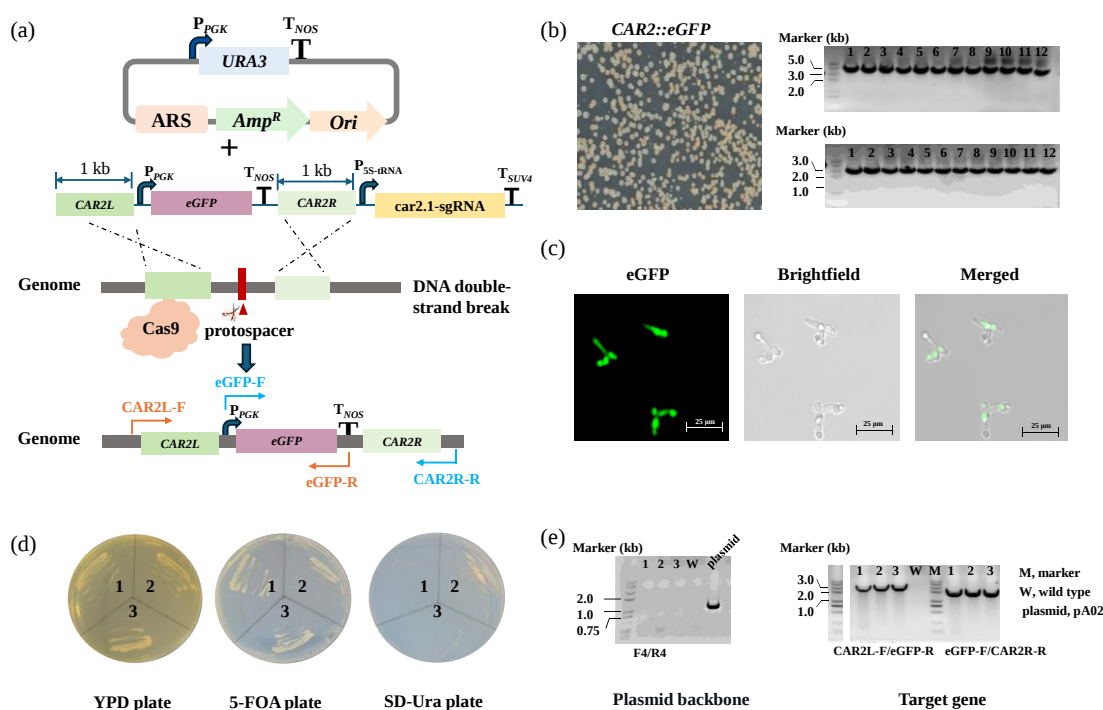


图5 游离型质粒辅助*eGFP*基因通过同源重组整合至*CAR2*位点

(a) 整合策略示意图，橙色箭头和蓝色箭头表示上下游边界验证引物对；(b) 整合转化子平板照片及PCR验证。上图：上游边界验证；下图：下游边界验证；(c) *eGFP*整合菌株的荧光显微镜观察，左图：荧光场；中间：明场；右图：合并图。比例尺为25 μ m；(d) 质粒丢失验证平板照片，菌株仅可在5-FOA、YPD平板生长，SD-Ura平板无菌落长出；(e) 3株5-FOA抗性转化子的PCR验证结果。泳道1-3，5-FOA抗性转化子。左图，质粒骨架片段扩增；右图，插入基因*eGFP*片段扩增。

Fig. 5 Episomal plasmid-mediated HR integration of the *eGFP* gene into the *CAR2* locus

(a) Schematic diagram of the integration strategy. Orange and blue arrows indicate the upstream and downstream boundary validation primer pairs, respectively; (b) Photographs of transformant plates after integration and corresponding PCR validation. Upper panel: upstream boundary validation; Lower panel: downstream boundary validation; (c) Fluorescence microscopy observation of *eGFP*-integrated strains, with left panel showing fluorescence field, middle panel showing bright field, and right panel showing merged image. Scale bar: 25 μ m; (d) Plate photographs for plasmid loss verification. Strains grew normally on 5-FOA and YPD plates, while no colonies were observed on SD-Ura plates; (e) PCR verification results of three 5-FOA-resistant transformants. Lanes 1-3, 5-FOA-resistant transformants. Left panel, amplification of plasmid backbone fragment; right panel, amplification of inserted *eGFP* fragment.

激发光下检测到明显的绿色荧光信号 [图5(c)], 证实定点整合的*eGFP*外源基因可在圆红酵母中正常表达, 说明本体系可有效实现外源功能基因的定点整合。

为验证整合菌株的遗传稳定性, 将上述阳性整合转化子在SD-Ura平板上连续传代7代, 随后转接至含5-FOA的液体培养基中进行反向筛选, 涂布获得5-FOA抗性菌落。随机挑选3株抗性转化子进行表型验证, 结果显示菌株可在YPD普通平板正常生长, 但无法在SD-Ura筛选平板存活 [图5(d)], 初步提示菌株已丢失游离型质粒。为进一步验证基因组整合与质粒清除效果, 分别采用靶向质粒骨架及抗性表达盒的特异性引物开展

PCR鉴定, 结果显示3株待测菌株均未扩增出质粒骨架片段, 但可稳定扩增出*eGFP*外源基因片段 [图5(e)]。以上结果证明, 游离型辅助质粒可通过5-FOA反向筛选清除, 且外源目的基因可稳定保留在酵母基因组中, 实现无痕、稳定的外源基因定点整合。

上述结果表明, 本研究构建的游离型质粒辅助CRISPR-HR系统可高效介导外源基因在靶位点同源重组。为系统探究同源臂长度对同源重组效率的影响, 构建了不同线性供体DNA, 分别携带50 bp、200 bp、500 bp和1000 bp同源臂 [图6(a)], 与质粒pA02共转化至圆红酵母SDU6感受态细胞。结果表明, 同源重组效率随同源臂长度

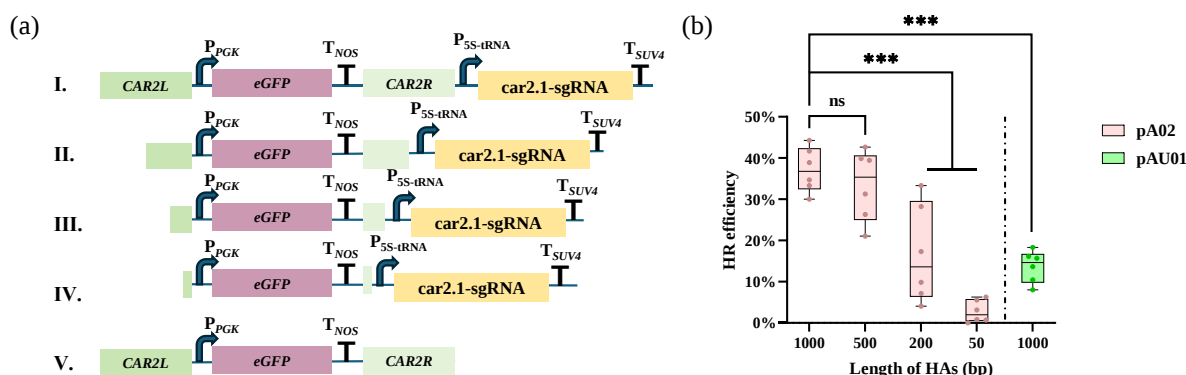


图6 同源臂长度对游离质粒辅助同源重组效率的影响

(a) 带有不同长度同源臂的供体DNA结构示意图。编号I至IV的供体片段会与pA02载体共转化，对应CAR2左右同源臂长度分别为1000 bp、500 bp、200 bp、50 bp；编号V的供体片段和pAU01载体共转化，同源臂长度为1000 bp。CAR2L为CAR2基因左侧同源臂，CAR2R为CAR2基因右侧同源臂；(b) 同源重组效率箱线图统计。pA02组为pA02质粒与携带sgRNA、不同同源臂长度的线性供体DNA共转化；pAU01组为pAU01质粒与1000 bp同源臂长度的线性供体DNA共转化。数据为均值±标准差 (n = 6)，采用单因素方差分析；*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Effects of homologous arm (HA) length on the efficiency of episomal plasmid-mediated HR

(a) Schematic diagram of donor DNA structures with homology arms of varying lengths. Donor fragments numbered I – IV are co-transformed with plasmid pA02, with the left and right CAR2 homology arms designed at lengths of 1000 bp, 500 bp, 200 bp, and 50 bp respectively; the donor fragment numbered V is co-transformed with plasmid pAU01, featuring a 1000 bp homology arm. CAR2L denotes the left homology arm of the CAR2 gene, and CAR2R denotes the right homology arm of the CAR2 gene; (b) Box plot analysis of HR efficiency. Group pA02 represents co-transformation of plasmid pA02 with donor DNAs carrying sgRNA and HAs of different lengths (50, 200, 500, 1000 bp); group pAU01 represents co-transformation of plasmid pAU01 with donor DNA containing 1000 bp HAs. Data are presented as mean ± standard deviation (n = 6). One-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

的延长显著升高，1000 bp、500 bp、200 bp和50 bp同源臂对应的同源重组效率分别为37.1%、33.4%、16.7%和2.7% [图6(b)]。

与此同时，本研究进一步探究sgRNA搭载方式对同源重组编辑效率的影响。对比实验结果显示，sgRNA表达盒位于游离型质粒上（线性供体不含sgRNA表达盒）时的HR编辑效率仅为13.7% [图6]。该结果表明，sgRNA的载体搭载方式是影响CRISPR介导同源重组编辑效率的关键因素。

2.5 游离型质粒在不同圆红酵母菌株中的通用性

为评估本研究构建的游离型质粒系统在不同遗传背景菌株中的适用性，选取NCYC1585和IFO0880两株圆红酵母开展转化验证，并以SDU6作为对照。将质粒pA03、pA05分别转化至NCYC1585，质粒pA05转化至IFO0880，质粒pA04转化至菌株SDU6 [图7(a)]。在无选择压力下对各组工程菌株连续传代培养5天，结果显示所有菌株的质粒保留率均随传代时间延长逐步下降。

不同菌株的质粒流失速率与最终质粒保留率存在显著差异，但均可实现质粒自主丢失 [图7(b)]。综上，该游离质粒系统适用于多株不同遗传背景的圆红酵母，转化效率与胞内游离维持性能良好。

3 讨论

本研究构建了圆红酵母自主复制游离型质粒，并建立了基于游离型质粒与CRISPR/Cas9的基因编辑体系。利用该体系完成靶基因随机突变、同源重组介导的基因敲除与外源基因定点整合，开展同源臂长度编辑效率梯度优化和多菌株通用性验证，证实该编辑工具性能稳定可靠，突破了传统基因组整合编辑模式不可逆、载体无法回收的局限，为圆红酵母遗传改造、代谢工程与合成生物学研究提供了灵活可控的新型编辑工具。

质粒稳定性实验结果表明，骨架结构、复制元件完全一致的pA01与pA02质粒在无筛选压力下

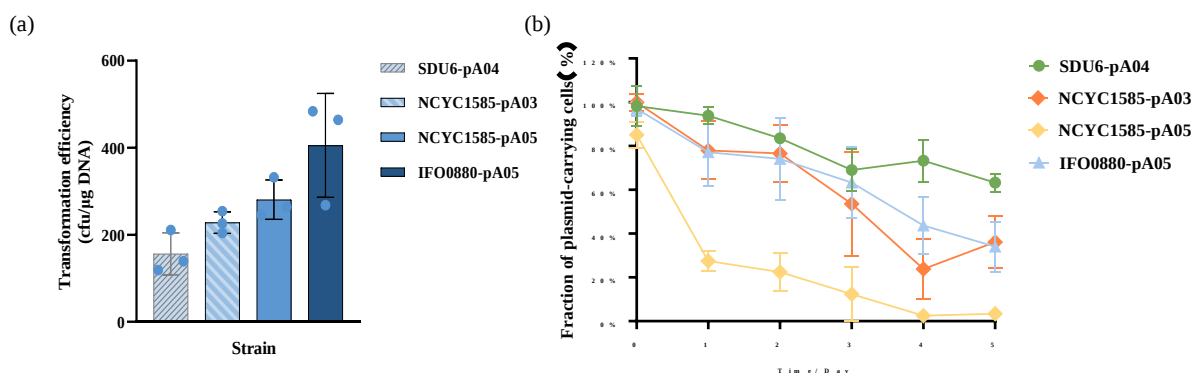


图7 游离型质粒在不同 *R. toruloides* 菌株中的转化效率及质粒保留曲线

(a) 不同菌株搭配对应质粒后的转化效率对比；(b) 菌株在无选择压力条件下传代培养的质粒保留率曲线。图例标注：SDU6-pA04、NCYC1585-pA03、NCYC1585-pA05、IFO0880-pA05 分别代表4组菌株与质粒的组合；数据为均值±标准差 (n = 3)。

Fig. 7 Transformation efficiency and plasmid maintenance curves of episomal plasmids in different *R. toruloides* strains

(a) Transformation efficiency of each strain-plasmid combination; (b) Curves of plasmid maintenance rate during serial subculture under non-selective conditions. Legend notes: SDU6-pA04, NCYC1585-pA03, NCYC1585-pA05 and IFO0880-pA05 represent four strain-plasmid combinations. Data are shown as mean ± SD (n = 3).

的质粒保留率差异明显 [图1(e)]。携带异源 *HYG* 的 pA01 质粒丢失速率显著高于携带内源 *URA3* 筛选标记的 pA02 质粒，该趋势在 NCYC1585 菌株中保持一致，仅 IFO0880 菌株中 *HYG* 质粒丢失速率相对平缓 [图7(b)]。上述差异可能源于两类筛选标记对宿主代谢负荷的不同影响。内源营养标记与宿主代谢通路高度适配，可有效降低质粒维持的代谢负荷，质粒可稳定传代^[41]，而异源 *HYG* 抗性基因持续表达会产生额外的代谢负荷，引发转录与复制冲突，降低质粒稳定性，最终加速质粒丢失^[42]。

编辑效率对比试验显示，在 *CAR2* 位点，*eGFP* 大片段定点整合效率显著高于基因敲除效率与 NHEJ 随机突变效率。一方面，将 sgRNA 表达盒与同源修复模板串联耦合，可同步激活 CRISPR 切割与同源修复过程，提升靶位点切割效率，为精准修复提供充足底物，有效减少 NHEJ 随机修复干扰；另一方面，依据 Nimonkar 等^[43] 建立的体外生化模型，延长 D-loop 置换单链的互补区能够形成互补稳定 D 环稳定重组中间体，解除复制蛋白 A (RPA) 对单链退火的抑制，提升 Rad52 介导的第二端捕获效率；第二端捕获是同源重组通路分支的核心节点，完成捕获后修复中间体将走向双霍利迪交叉通路，产生更多交叉互换产物。据此推测，在本实验体系下，载体中 *eGFP* 长插入片段可通过延长 D-loop 置换单链强化上述效应，进

一步提高交叉互换型重组比例，该推测仍有待更多基因组位点的实验进一步验证。

相较于前期游离型质粒的研究^[27]，本研究完善了质粒验证体系，弥补了单一 PCR 检测准确性不足的缺陷。已有整合型 CRISPR 体系虽突变效率较高，但以 NHEJ 随机编辑为主，且载体不可逆整合，难以实现无痕编辑，应用场景受限^[12]。本研究构建的游离型系统可通过可控质粒丢失、同源重组实现精准无痕编辑，大幅拓展了圆红酵母基因编辑技术的应用场景。

本编辑体系仍存在一定局限性。游离质粒仅含 ARS 自主复制元件、无着丝粒结构，有丝分裂过程中易丢失，限制了 sgRNA 持续表达与编辑效率^[44]；同时，不稳定质粒的随机片段残留会轻微增加筛选背景。后续研究可通过引入着丝粒元件提升质粒稳定性、优化筛选体系降低假阳性、改造 sgRNA 表达模块强化切割与修复耦合效率，进一步提升该编辑体系的稳定性与编辑效率。

致谢：感谢梁世玉在实验过程中提供菌落划线等技术操作支持。

作者贡献声明：陈琼琼：实验设计、实验操作、分析数据、撰写文章、文章修改吕力婷：实验设计、文章修改赵宗保：实验设计、基金支持、文章修改

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

数据可用性声明:本研究产生的数据集未上传至公共数据库,相关原始数据由第一作者归档保存,如有合理学术需求,可联系通讯作者获取实验数据。

利益冲突:赵宗保是本刊编委,在同行评议过程中未进行影响公平性的行为。其他作者没有利益冲突。

参 考 文 献

- [1] JAMES T Y, ROKAS A. Use their names: there are no basal, lower, or early diverging fungi[J]. *Mycologia*, 2025, 117: 246-254.
- [2] HIBBETT D S, BLACKWELL M, JAMES T Y, et al. Phylogenetic taxon definitions for *Fungi*, *Dikarya*, *Ascomycota* and *Basidiomycota*[J]. *IMA Fungus*, 2018, 9: 291-298.
- [3] LIM C S, WEINSTEIN B N, ROY S W, et al. Analysis of Fungal Genomes Reveals Commonalities of Intron Gain or Loss and Functions in Intron-Poor Species[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(10): 4166-4186.
- [4] SHEN X X, STEENWYK J L, LABELLA A L, et al. A. Genome-scale phylogeny and contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota[J]. *Science Advances*, 2020, 6(45): eabd0079.
- [5] TODD R B, ZHOU M M, OHM R A, et al. Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 214.
- [6] MOHANTA T K, BAE H. The diversity of fungal genome[J]. *Biological Procedures Online*, 2015, 17: 8.
- [7] YU Y, SHI S B. Development and perspective of *Rhodotorula toruloides* as an efficient cell factory[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(4): 1802-1819.
- [8] LI J S, HA L, LIN M, et al. Adaptive laboratory evolution and scale-up of *Rhodospiridium toruloides* for commercial lipid production. [J]. *Industrial Biotechnology*, 2025, 21(5): 344-352.
- [9] ZHENG X C, LEDESMA-AMARO R, ZHAO Z K, et al. *Rhodotorula* yeasts as potential chassis for sustainable food biotechnology[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73: 19157-19173.
- [10] OTUPAL P B, ITO M, ARKIN A P, et al. Multiplexed CRISPR-Cas9-based genome editing of *Rhodospiridium toruloides*[J]. *mSphere*. 2019;4(2): e00099-19.
- [11] JIAO X, ZHANG Y, LIU X J, et al. Developing a CRISPR/Cas9 system for genome editing in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology Journal*, 2019;14 (7): e1900036.
- [12] 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: 2103-2109.
- [13] YU Y, YUAN Q, LIU Z H, et al. Enhancement of free fatty acids production in *Rhodotorula toruloides* using the CRISPR/Cas9-based base editor[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14: 3578-3588.
- [14] SUN W Y, YANG X B, WANG X Y, et al. Homologous gene targeting of a carotenoid biosynthetic gene in *Rhodospiridium toruloides* by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39: 1001-1007.
- [15] HWANG H J, ADAMCZYK P A, GLADDEN J M, et al. Inducible flippase-mediated metabolic engineering of *Rhodospiridium toruloides* for enhanced 3-hydroxypropionic acid production from corn stover hydrolysate[J]. *Bioresource Technology*, 2026, 439: 133368.
- [16] LIN X P, WANG Y N, ZHANG S F, et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14: 547-555.
- [17] JENSEN N B, STRUCKO T, KILDEGAARD K R, et al. Easyclone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14: 238-248.
- [18] DONG D, WANG X, ZONG H, et al. Construction of a novel plasmid for an industrial yeast *Candida glycerinogenes* by dual-autonomously replicating sequence strategy[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2023, 13: 10-16.
- [19] AKADA R, KITAGAWA T, KANEKO S, et al. PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2006, 23: 399-405.
- [20] MAYLE R, O'DONNELL M. Expression of recombinant multi-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*[M]. *Methods in Enzymology*, 2021: 3-20.
- [21] TAN X Y, WU X L, HAN M Z, et al. Yeast autonomously replicating sequence (ARS): identification, function, and modification[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2021, 21: 464-474.
- [22] MECHALI M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11: 728-738.
- [23] CLARKE L, CARBON J. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes[J]. *Nature*, 1980, 287: 504-509.
- [24] GU Y, GAO J, CAO M, et al. Construction of a series of episomal plasmids and their application in the development of an efficient CRISPR/Cas9 system in *Pichia pastoris*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35: 79.

- [25] TULLY M, GILBERT H J. Transformation of *Rhodospiridium toruloides*[J]. Gene, 1985, 36: 235-240.
- [26] SCHULTZ J C, CAO M, MEJIA A, et al. CUT&RUN identifies centromeric DNA regions of *Rhodotorula toruloides* IFO0880[J]. FEMS Yeast Research, 2021, 21(8): foab066.
- [27] 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 X, SHI S B. Isolation of autonomously replicating sequence and gene knockout using an episomal plasmid in *Rhodospiridium toruloides*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 882-892.
- [28] VAN DEN ENT F, LÖWE J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2006, 67: 67-74.
- [29] WANG Q M, YURKOV A M, GÖKER M, et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina* [J]. Stud Mycol, 2015, 81: 149-189.
- [30] TSAI Y Y, OHASHI T, KANAZAWA T, et al. Development of a sufficient and effective procedure for transformation of an oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16 [J]. Current Genetics, 2017, 63: 359-371.
- [31] CHEN Q Q, LYU L T, WANG S, et al. Systematic evaluation of the DNA repair machinery facilitated the development of efficient genome editing tools for the red yeast *Rhodotorula toruloides*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2027, 17: 96-105.
- [32] STROPE P K, KOZMIN S G, SKELLY D A, et al. 2 μ plasmid in *Saccharomyces* species and in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 15(8): fov090.
- [33] CAO M, FATMA Z, SONG X, et al. A genetic toolbox for metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 87-97.
- [34] YANG V W, MARKS J A, DAVIS B P, et al. High-efficiency transformation of *Pichia stipitis* based on its *URA3* gene and a homologous autonomously replicating sequence, ARS2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 60: 4245-4254.
- [35] 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, 1984, 197(2): 345-346.
- [36] SATO G, KURODA K. Overcoming the limitations of CRISPR-Cas9 systems in *Saccharomyces cerevisiae*: off-target effects, epigenome, and mitochondrial editing[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 1040.
- [37] KOH C M J, LIU Y B, MOEHNINSI, et al. Molecular characterization of *KU70* and *KU80* homologues and exploitation of a *KU70*-deficient mutant for improving gene deletion frequency in *Rhodospiridium toruloides*[J]. BMC Microbiology, 2014, 14: 50.
- [38] JIA N, ZHOU Y J, GAO J Q. Engineering recombination machinery facilitates the construction of yeast cell factories[J]. FEMS Yeast Research, 2025, 25: foaf066.
- [39] XUE C Y, GREENE E C. DNA Repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing[J]. Trends in Genetics, 2021, 37: 639-656.
- [40] DERMIC E, ZAHRAKKA D, VUJAKLIJA D, et al. 3'-Terminated overhangs regulate DNA double-strand break processing in *Escherichia coli*[J]. G3 Genes Genomes Genetics, 2017, 7: 3091-3102.
- [41] UGOLINI S, TOSATO V, BRUSCHI C V. Selective fitness of four episomal shuttle-vectors carrying *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, and *URA3* selectable markers in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Plasmid, 2002, 47(2): 94-107.
- [42] WEIN T, WANG Y, HÜLTER N F, et al. Antibiotics interfere with the evolution of plasmid stability[J]. Current Biology, 2020, 30(19): 3841-3847.
- [43] NIMONKAR A V, SICA R A, KOWALCZYKOWSKI S C, et al. Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3077-3082.
- [44] IWANAGA S, KATO T, KANEKO I, et al. Centromere plasmid: a new genetic tool for the study of *Plasmodium falciparum*[J]. PLOS One, 2012, 7(3): e33326.



通讯作者: 赵宗保(1968—),男,教授,博士生导师。研究方向为能源生物技术、合成生物学和化学生物学。
E-mail: zhaozb@dlut.edu.cn



第一作者: 陈琼琼(1997—),女,博士研究生。研究方向为圆红酵母的基因编辑系统及代谢工程研究。
E-mail: chenqiongqiong@dicp.ac.cn

附录

附表1 本研究使用的ARS序列

Supplementary Table S1 The ARS sequence used in this study

Gene	Sequence (5'-3')
ARS	TAACCTTGTATCGTCCTGCAGCTACTCCGAGTTTGTTCGGGGCGAAGTGCGGGTGGCCTGCCTTCGGGCGAGGCGAGCGACG AAGTCGGCGGGCGGGCAAGCTTGATGTAGAGTGTACGCTGAGAGGGTGGGCCACCCATTATGCACCCGAATTCGCACCTCCAGA CCACCTCCTCGTCGTCTCGCTGCCCCGCGGGGATACGAGATTGCGGTGCCACAAGGCCGCTCGCTTGCCTGGGATGCTCT CCGATTGTGTAGGAAGCTAGTGAGTCTGTCTGCGACCTCCAGCGAGCCGTCGTCGGGCACTTGCCACCATCCCGTTCCCTCGA CCCATTCTCGCGCTCTGAAGTCAACCACTCGCTGTGACTCTCGCTCGAGGGGCGAGACAAGCCCGCACTGCTGCTCTCGGGCTTA CTTTGAAGCTATCTACCCGGCTCGAAGCCACGCCAGACGCCGTCCTCCCTCCCGAGTCTTCATCTCGCCGCGATCAGCTCAACA GCGCACGCTCACGCCTATCGACGCCTATCCGCCAGCTAGAGCCTCGCTGACCGCCTGCCAGACCCCGTCGAGGGATGTCCAAG TCGCCAAGGCCCTCCTCCCTCGAGCCTGACCTTCTCGACCATCTCGCGCGCTCTCCCAACCTCGGCCGCGACGGGCAAGTACT CGGTGCGGACGGTCGCGCTCGCGTTGGCAGCAAGGCCGCGGAAAGGGACAGGCTCCTGGCGGCTTCATCGTCGTAGGCAG CGGCCGGCGTCGCGGTTTCGAGGGGAGTCTCGTCGTCCGCGAGGAGCGCGGTGCAGGTCAGGCAGGCGGGTCAGGACAGG CGGGCCCGTCTCGCCAGGCTTCCGGCTCTCGAGGACAGGTCAATGCCGTGCGCACGTGCGGTGGACTGCTCAGGACAGGCGGG GGCGTCAGCACCTCGGCCTCGTCTTCGAGCGGCAGCAGGGCCTTGCGGGGCTACTTTGGCGAGTCGGCGCGGCCGC

表S2 本研究所使用的引物

Supplementary Table S2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
ARS1000-F	TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGATAACCCTTGTATCGTCCTGC
ARS1000-R	GTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGGCGGCCGCGCCGACTCGCCAAAGTA
PGKpart-F	GCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGCGCATCCGGATCCTC
T _{Nos} -R	AATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATATGAGGCCCGATCTAG
URA3P-F	ACTCTGCAGGTTACAGCAACTCACCCGTCCAACTCCACCCCTCCCCGTGCAGCCCACCATGCCGTCCATCACGACC
URA3T-R	CAATCTTAAGAACTTTATTGCCAAATGTTGAACGATCCTAGTGATGGTGATGGTGGTGCTACTGCCTCAGCCTGTC
T _{Nos} -5s-F	TATAGCGCGAAACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTATCTATGTTACTAGATCATCTGCGGCCATAACCGCAT
sgRNA-R	CACCTATTAGGCACCCAGGCTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATATGAGGCCCGACAATCTGATAGACAT
nat.1-sgRNA-R	CCTTGTTTTAGTAGATTCTGTTTCCAGAGTACTAAAACCCAGTGCCTCATGGCCTCGGCGACGGTGAAGGGGATCGAAC
crti.2-sgRNA-R	CCTTGTTTTAGTAGATTCTGTTTCCAGAGTACTAAAACACTGGGCGAGGCGAGCGGCGCGACGGTGAAGGGGATCGAAC
CAR2-RF-R	GGAGGAAGTCGCGCAAGGGTGGGAAGACGGACGAGGTGCGGGTGTGCGATATGAGGCCCCCATGGGGTATGACCAGA
URA3L-F	GTACTGAATTAACGCCGAATTGAATTCGAGCTCGGTACCCGCATTTCGAGTTCTCGCACTC
URA3L-R	CGCGAGCGATTGAGGGTTCTCAAGGTCCGTCTGGCCATGGCTCGACGGATGGAGCGGGAG
UR3R-F	GATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGCCTCATATGCGCAAGTTTGCCGACATCGGTGCGTC
UR3R-R	GCTGCCAAGCTTGCATGCTGCAGGTCGACGATTGTGACGGCGACTCTAGAGGAGGCGCCACACGACCGCTCTCCGCC
CARLP-F	CTTCCTACCCTCGAAAGCGCCGACTAACGCTTGCACCGGACAGATCTGGTCATACCCCATGGTGCATCCGGATCCTC
LEU2P-F	CTGCAGGTTACAGCAACTCACCCGTCCAACTCCACCCCTCCCCGTGCAGCCCACCATGCCCTACTCTATCACCTGC
LEU2T-R	TAAGAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCCTAGTGATGGTGATGGTGGTGCTACTTCTGGTAAGCAATCCCGTA
GFP-P2A-R	AGGGCCAGGGTTCTCTTCGACGTCGCCAGCCTGCTTGAGGAGCGAGAAAGTTGGTAGCGCCCGAGCCCTGTAGAGCT CGTCCATGC
P2A-U-R	CGACCGGGACGGGGTGCTTGGCAGCCCGTTCGGCGTAGGTGCGGGTCTGATGGACGGCATAGGGCCAGGGTTCTCTTC
P2A-H-R	AGACCGAGTCGAACTTTTCGATGAGGAACCTTCGACCGACGTCGCCGTGAGCTCCGGCATAGGGCCAGGGTTCTCTTC
PZPK166-F	CCGACTGATGGGCTGCCTGTATC
RB-R	CTTTACCCGCCAATATATCTGTG
URA3L-VF	CATCAGATCCTCGTCGTG
URA3R-VR	GCAAAGGCGCGAATGAC
HYG20-F	CGGTCGAGAAGTTCCTCATC
HYG147-R	GTTGACGCGGAGGACGTATC
CAR2-F	TGCTAGTGAAGTCTAGAC
CAR2R-R	GAGGAACCGAGGACCG
CAR2L-F	CGCAGAATGTAAGCTCGTTG
eGFP-RF-F	GTTACAGCAACTCACCCGTCCAACTCCACCCCTCCCCGTGCAGCCCACCATGGTCTCGAAGGGCGAG
eGFP-RF-R	AACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCCTAGTGATGGTGATGGTGGTGCTTGTAGAGCTCGTCCATGC

续表

Primers	Sequences (5'→3')
eGFP-F	TTCCCTGGCGAGTCCAAG
eGFP-R	GCAAGACCGGCAACAGGATTC
CAR2-top-F	GCACGGGGAGGTAGTTGC
CAR2-1000-R	TGCGGCAACTTCTCTATCGC
F2	CCTTGATCGTCCTGCAGCT
R2	TCACTGCCTCAGCCTGTC
F3	ACCAATGCTTAATCAGTGAGG
R3	GCCTCACTGATTAAGCATTGG
F4	GCCATTCGCCATTCAGG
R4	GGTCCTCGGATTACTTCAGC
F5	TTGCGCATCCGGATCCTC