

基于靶向多拷贝基因 sgRNA 表达盒替换的一种通用反选择技术

蔡倩茹, 王曼曼, 朱进妹, 吴杰群*

浙江工业大学 长三角绿色制药协同创新中心, 浙江 杭州 310014

蔡倩茹, 王曼曼, 朱进妹, 吴杰群. 基于靶向多拷贝基因 sgRNA 表达盒替换的一种通用反选择技术[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1649-1657.

CAI Qianru, WANG Manman, ZHU Jinmei, WU Jiequn. A universal counter-selection strategy based on replacement of sgRNA expression cassettes targeting multi-copy genes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1649-1657.

摘要: 筛选标记作为基因编辑中的重要工具, 其应用范围常因宿主遗传背景及代谢兼容性差异而呈现种属特异性限制。为了解决这一问题, 本研究利用 CRISPR/Cas9 系统开发了一种通用性更强的反选择工具, 设计引入 sgRNA 表达盒作为反选择标记, 引导 Cas9 蛋白靶向切割基因组 DNA, 对 sgRNA 表达盒替换的菌株进行筛选。该系统经过优化将 sgRNA 靶向多拷贝位点, 增强了细胞致死率, 从而将反选择效率提高到 85.00% 以上。这一反选择工具不受菌种的限制, 应用范围更广, 适用于多拷贝的质粒组装以及质粒编辑等各种场景。

关键词: sgRNA 反选择; 质粒编辑组装; Cas9 靶向切割; 无痕编辑

A universal counter-selection strategy based on replacement of sgRNA expression cassettes targeting multi-copy genes

CAI Qianru, WANG Manman, ZHU Jinmei, WU Jiequn*

Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Selection markers are essential tools in gene editing, the utility of such systems is inherently constrained by species-specific limitations, governed by divergent host genetic backgrounds and metabolic compatibility. To address this limitation, we leveraged the CRISPR/Cas9 system to develop a universal counter-selection tool. We designed and introduced an

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2101000); 国家自然科学基金(22078295)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101000) and the National Natural Science Foundation of China (22078295).

*Corresponding author. E-mail: jiequnwu@zjut.edu.cn

Received: 2024-06-19; Accepted: 2024-08-08; Published online: 2024-08-09

sgRNA expression cassettes as counter-selection markers, which directs the Cas9 protein to target and cleave genomic DNA, allowing for the selection of the strains where the sgRNA expression cassette has been replaced. Optimized to target multiple copy sites with sgRNA, this system significantly enhances cell lethality, boosting counter-selection efficiency to over 85.00%. This counter-selection tool is not limited to single strains and is suitable for various scenarios, including multi-copy plasmid assembly and plasmid editing, demonstrating broad application potential.

Keywords: sgRNA counter-selection; plasmid editing and assembly; Cas9-targeted cleavage; scar-free editing

筛选标记是遗传操作中的必要工具,传统基因编辑的筛选方法是在编辑载体中引入抗生素的抗性基因,利用抗性基因的正向选择得到突变菌株^[1-2];或者使用菌株自身编码生长因子的基因作为筛选标记,通过特定营养缺陷型培养基进行筛选^[3-4]。然而,利用抗性基因进行筛选的方法会产生抗生素耐药性的问题^[5-6],增加基因编辑的假阳性率,并引入额外的抗性基因标记;而在营养缺陷型筛选方法中,通过突变产生的缺陷型菌株在传代生长过程中存在基因型不稳定等问题。除此之外,正向选择的方法无法实现无痕编辑,会引入额外的筛选标记。因此这2种方式在连续基因编辑应用中有一定的局限性。

为了能够实现连续的无痕编辑,有研究者开发了基于特定标记的反选择方法。常用的反选择标记有 *sacB*^[7-8]、*ccdB*^[9]、*pyrF*^[10]和 *codA*^[11-12]等,其作用原理都是将特定底物代谢为对菌株有毒害作用的产物,使含有相应基因的菌株无法正常生长甚至死亡。在筛选过程中,反选择标记基因被清除,菌株恢复正常生长。因此可以反复使用同一标记基因对下一个靶基因进行分子遗传操作,从而实现多个靶基因的连续敲除^[7]。这种方法避免了抗生素的使用,解决了抗性标记无法重复使用的问题。然而,目前使用的反选择标记一般基于物种本身所含有的特定基因,对于不同类型的菌株缺乏通用性,

这一缺陷限制了其在广泛的微生物种群中的应用。

为了解决现有反选择系统在不同菌株中通用性差的问题,本研究尝试开发了一种基于 Cas9 切割,以 sgRNA 为反选择标记的筛选方法。同时,利用基于荧光标记的方法来高效评估该反选择系统的效率,检测荧光强度的同时筛选更多的菌株,更好地测定反选择的效率。该反选择方法具有更小的反选择标记、筛选流程更简便、无需外源添加选择试剂等优势。此外,该反选择系统区别于传统的反筛选标记,更适用于在多拷贝质粒的编辑上进行反选择,为体内质粒 DNA 组装提供一种全新的反选择方法,避免利用抗性选择标记的同时无需对组装载体进行线性化,且选择标记长度较小,具有良好的应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用酿酒酵母菌株为 CEN.PK2-1C,购自 Euroscarf 保藏中心,体外质粒构建转化所用大肠杆菌 DH5 α 菌株为商品化感受态细胞,购自北京擎科新业生物技术有限公司。p-Cas9 (#64329)、p-gRNA (#64329)质粒从 Addgene 网站购买。通过在 pUC57 载体的 *EcoR* I 和 *Hind* III 之间分别插入 TDH3p-GFP-ADH1t 和 TDH3p-NrsR-ADH1t 表达盒构建 pUC57-GFP、pUC57-

NrsR 质粒, 具体序列已提交国家微生物科学数据中心(编号为 NMDCX0000434)。

1.2 方法

1.2.1 载体质粒构建和目的片段扩增

以购买的 p-gRNA 质粒为模板, 在引物两端添加靶向相应位点的 20 bp 的序列作为同源臂, 进行全质粒 PCR, 回收产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) 抗性平板, 培养过夜, 使用通用引物 M13-47 和 M13-48 进行测序验证。

为了获得对 sgRNA 进行替换的 donor DNA 片段, 使用引物 GFP-LR150-S (5'-GCAGTGAGCGCAACGCAA-3')和 GFP-LR150-A (5'-ATTCA GGCTGCGCAACTGTT-3'), 分别以 pUC57-GFP 和 pUC57-NrsR 质粒为模板扩增获得含有 150 bp 同源臂的目的片段, 纯化产物用于后续转化。

1.2.2 载体质粒和目的片段的共转化

将线性目的片段与环状 p-gRNA-LR 载体质粒混合, 用电穿孔法共转化酿酒酵母 S0 菌株感受态细胞, 涂布在同时含有潮霉素(hygromycin, HyB, 300 μ g/mL)和诺尔斯菌素(nourseothricin, NTC, 10 μ g/mL)的 YPD 固体培养基上, 培养 72 h, 获得转化子用于后续验证。

1.2.3 荧光强度检测

挑取平板上的酵母转化子至 600 μ L 含有相应抗生素的 YPD 培养基的 96 深孔板中培养 48 h, 取 50 μ L 菌液加入 150 μ L YPD 液体培养基进行稀释, 使用 Agilent BioTek Synergy LX 多功能微孔板检测仪进行绿色荧光和 OD_{600} 检测。以荧光强度(relative fluorescence units, RFU) 和 OD_{600} 的比值衡量菌株荧光强度。

1.2.4 酿酒酵母转化子 PCR 验证

将平板上的转化子挑取至 5 mL 含有相应抗生素的 YPD 液体培养基中, 培养 48 h 后取 1 mL 菌液离心收集菌体, 加入 100 μ L 破胞缓

冲液及 3 颗玻璃珠, 充分涡旋研磨, 加入 50 μ L 苯酚涡旋混匀, 再加入 50 μ L 氯仿涡旋萃取苯酚, 将混悬液转移到新的 1.5 mL 尖底离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 0.5 μ L 上清液作为模板进行 PCR 验证。

2 结果与分析

2.1 sgRNA 反选择系统的构建

酿酒酵母具有强大的同源重组系统, 能够介导体内质粒 DNA 的组装。Cas9 蛋白通过与 sgRNA 形成复合物, 在 sgRNA 的引导下靶向切割目的基因, 造成双链断裂, 断裂的 DNA 可通过外源导入的同源片段进行同源重组修复或在自身的非同源末端修复作用下进行随机修复, 若断裂的双链 DNA 没有及时修复, 则会造成菌株死亡。设计将 sgRNA 质粒和含有 sgRNA 表达盒两侧同源臂的同源片段同时导入含有 Cas9 表达质粒的酿酒酵母模式菌中。当 sgRNA 表达盒被替换后, 质粒无法转录产生 sgRNA 与 Cas9 形成复合物, 就不会对基因组 DNA 产生切割作用, 菌株能够存活。因此利用切割基因组位点的 sgRNA 表达盒作为反选择标记, 在酿酒酵母体内通过质粒上 sgRNA 表达盒的替换消除 sgRNA 的产生, 达到反选择的目的(图 1)。

2.2 反选择系统的验证和高效筛选方法的建立

先前的研究证明酿酒酵母基因组上的 308a 位点的 Cas9 靶向切割效率良好^[13], 因此选择该位点作为 sgRNA 的靶向位点。反选择系统的效率可以通过 sgRNA 表达盒的替换效率来评估。当 sgRNA 表达盒被含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的同源片段替换时, 菌株转录翻译产生的绿色荧光能够通过酶标仪被快速检测。将 p-g308a-LR 载体质粒和 donor-GFP 片段导入酿酒酵母后, 挑取平板上的转化子利

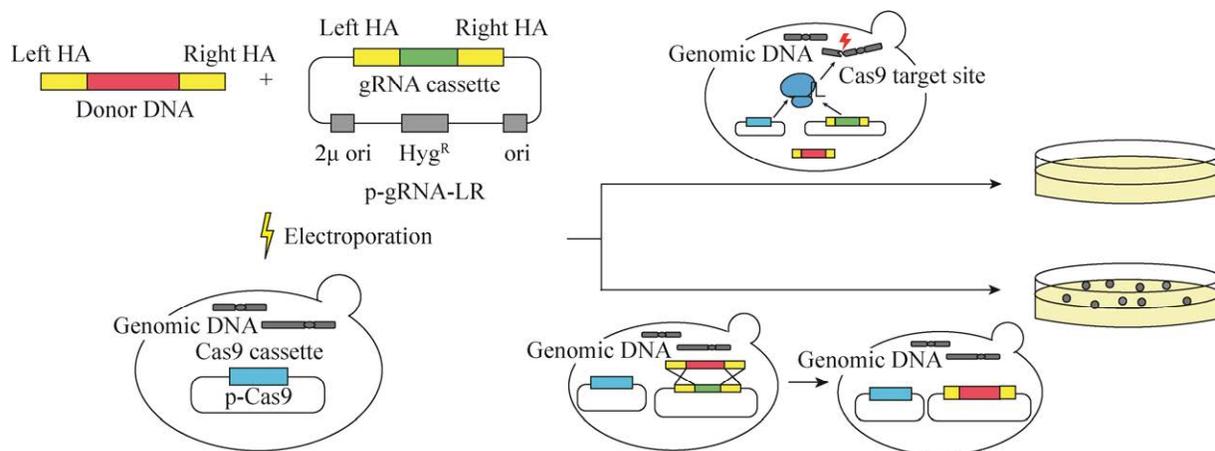


图1 sgRNA反选择系统原理示意图 载体质粒和 donor-DNA 片段通过电击转化导入含有 Cas9 表达质粒的酿酒酵母菌株中，涂布抗性平板进行筛选。

Figure 1 Schematic diagram of the sgRNA counter-selection system. The vector plasmid and donor DNA fragment are introduced into a *Saccharomyces cerevisiae* strain containing a Cas9 expression plasmid via electroporation. The transformed cells are then plated on selective media for screening.

用酶标仪检测酿酒酵母转化子的荧光强度。荧光检测结果显示，7、13、15号转化子的荧光强度明显高于野生型菌株，表明这3个转化子可能发生了sgRNA表达盒替换(图2B)。

为了进一步确认sgRNA表达盒已经被成功替换，对转化子进行了PCR验证。设计引物对转化子进行扩增，若sgRNA表达盒被成功替换，则菌株PCR扩增目的条带大小为1668bp；若没有发生替换，菌株的扩增目的条带为564bp。如图2C所示，7、13、15号转化子的扩增条带明显高于对照质粒，说明sgRNA表达盒被donor-GFP片段取代，该结果与荧光检测结果相符。证明成功构建了以sgRNA表达盒作为反选择标记的系统，筛选效率约为18.75%。

PCR基因型验证表明荧光检测的方法可以准确区别菌株内的sgRNA表达盒是否发生替换。而且与PCR验证的方法相比，荧光检测的方法无需经过总DNA抽提处理以及扩增片段验证等繁琐的步骤，直接通过荧光强度检测即可判断是否发生sgRNA表达盒的替换，可同时

检测通过96孔板培养的大量转化子的荧光强度来计算反选择系统效率。综上，荧光检测的方法具有操作简单、耗时短等优势，适用于该反选择系统效率的检测。

2.3 更换Cas9靶点进一步提高反选效率

308a位点为sgRNA的靶点时，尽管通过sgRNA表达盒的替换能够实现反选择，但筛选的效率仍然低于现有筛选方法。为了探究反选择系统效率低下的原因，随机选取5个未发生表达盒替换的转化子，对其308a位点进行测序。测序结果显示，这些未发生替换但仍然能够在平板上存活的菌株发生了非同源末端连接修复(non-homologous end-joining, NHEJ)。其中有4个转化子在切割位点发生了单碱基的插入，1个转化子在切割位点插入了一段载体质粒复制子的序列。这种由非同源末端修复导致的碱基插入使308a靶向位点的20个核苷酸序列发生突变，从而使其逃脱了Cas9的切割，导致Cas9的致死率降低。推测这种非同源末端修复引起的Cas9逃逸是导致反选择效率较低的主要原因。

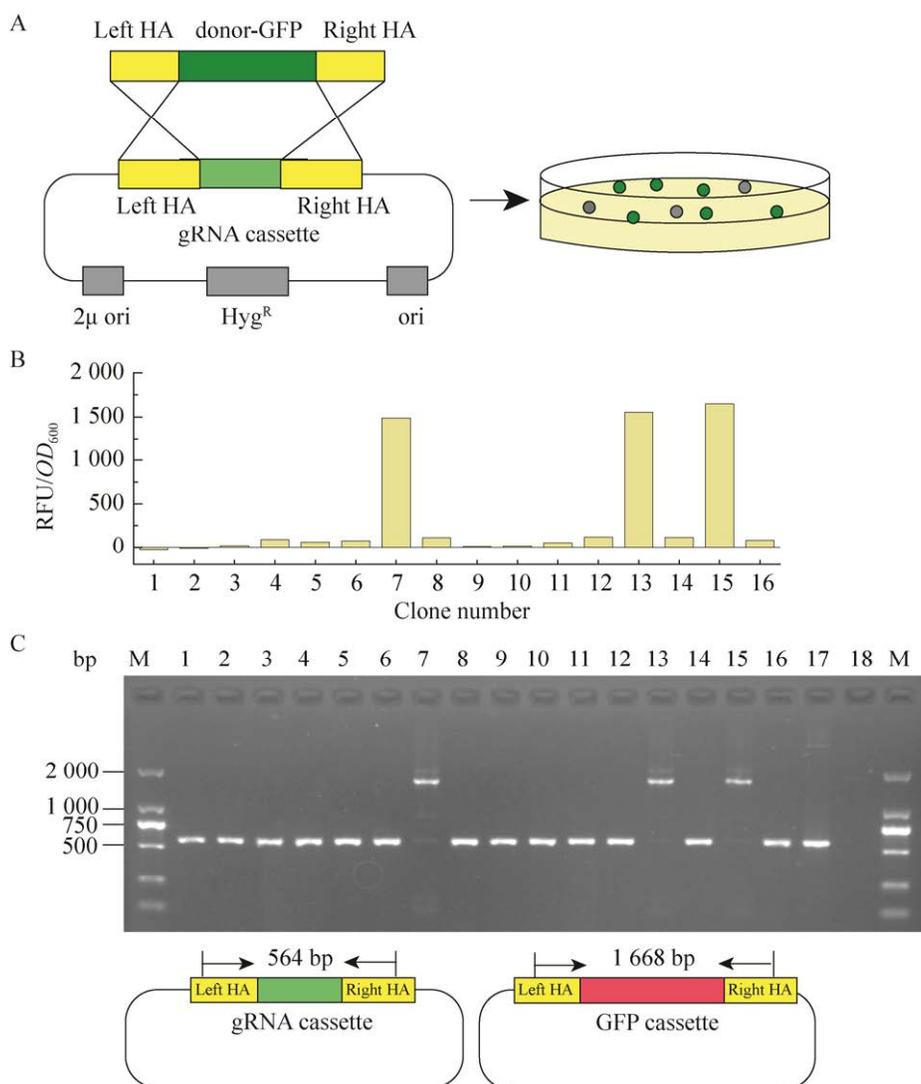


图 2 sgRNA 反选择系统构建与结果 A: sgRNA 表达盒替换示意图。B: 酿酒酵母转化子荧光强度检测。C: 酿酒酵母转化子 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图。泳道 M: DL2000 DNA marker; 泳道 1–16: 以转化子为模板进行 PCR 扩增; 泳道 17: 以 p-g308a-LR 载体质粒为模板进行 PCR 扩增; 泳道 18: 阴性对照(以水为模板)。

Figure 2 Construction and results of the sgRNA counter-selection system. A: Schematic representation of the sgRNA expression cassette replacement. B: Fluorescence intensity measurement of *Saccharomyces cerevisiae* transformants. C: Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified transformants from *Saccharomyces cerevisiae*. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1–16: Amplification using transformant genomic DNA as templates; Lane 17: Amplification using p-g308a-LR plasmid DNA as the template; Lane 18: Negative control (using water as the template).

Sigma (σ)和 delta (δ)位点是酿酒酵母 *Ty3* 和 *Ty1* 转座子的长末端重复序列,在酿酒酵母内分别有 39 个和 185 个拷贝,并且其碱基序列高度

重复^[14-15]。为了提高 Cas9 的切割致死率,选择酿酒酵母的多拷贝位点—— δ 和 σ 位点作为反选择系统的切割位点。由于该位点在酿酒酵母

基因组中有多个拷贝, Cas9 能够同时切割多个基因组的位点, 从而提高致死率。如表 1 所示, 靶向 σ 和 δ 位点的致死率接近 100%, 显著高于靶向 308a 位点的致死率, 所以选择 σ 和 δ 位点作为反选择系统的切割位点能够有效减少反选择过程中产生的假阳性菌株。选择 σ 和 δ 位点作为反选择系统的切割位点, 荧光定量结果显示, 反选择效率比 308a 位点提高了 3 倍左右, 分别为 91.10% 和 88.90%。 σ 和 δ 位点的反选择效率与 NrsR 抗性筛选方法在酿酒酵母中的效率相当(图 3)。

表 1 sgRNA 靶向切割不同基因的菌株存活率
Table 1 Survival rate of strains with sgRNA-targeted cleavage of different genes

Cut sites	Total number of strains	Number of survival strains
308a	10^7	84
δ	10^7	2
σ	10^7	5

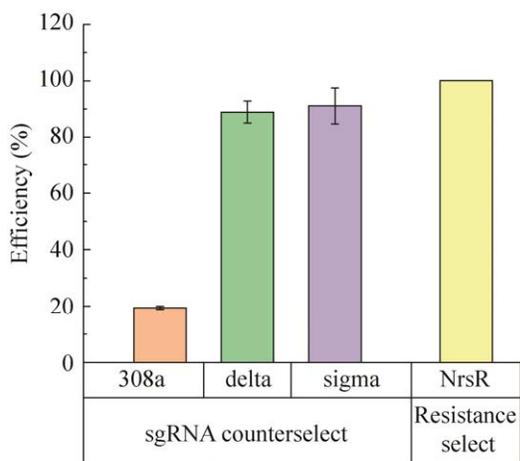


图 3 sgRNA 反选择系统与抗性标记选择法效率比较

Figure 3 Efficiency comparison of the sgRNA counter-selection system and antibiotic resistance marker selection method.

综上所述, 以酿酒酵母的多拷贝位点作为 Cas9 靶向位点, 通过替换 sgRNA 表达盒可以

实现高效的反选择。这一策略不仅提高了反选择系统的致死率, 还显著降低了假阳性菌株的产生, 进一步优化了 sgRNA 反选择工具包的效率。

2.4 sgRNA 反选择系统与抗性标记选择法的比较

在目前所使用的筛选方法中, 抗性基因介导的正向选择是效率最高并且使用最广泛的, 因此将 sgRNA 反选择系统与传统的抗性基因正向筛选方法进行了比较。为了避免实验中采用不同的同源臂序列对同源重组效率产生影响, 本研究沿用了 sgRNA 反选择时所用的同源臂。

在利用抗性基因筛选时, 选择了酿酒酵母中的诺尔斯菌素抗性基因表达盒作为 donor DNA, 与 p-g308a-LR 质粒载体一同转入野生型酿酒酵母菌株中, 涂布在含有诺尔斯菌素的 YPD 固体平板上, 挑选转化子进行筛选效率的验证(图 4A)。由于抗性基因无法通过荧光检测方法进行检测, 挑取转化子进行 PCR 验证。PCR 结果显示, 几乎所有的菌株都发生了 donor DNA 和质粒载体的重组。然而, 使用这一方法筛选得到的部分菌株中, 原始载体质粒和 sgRNA 表达盒替换成功的质粒在一个菌株中同时存在(图 4B)。这可能是由于载体质粒在菌株内是多拷贝的, 当部分载体质粒发生替换并携带抗性基因表达盒时, 菌株就能在含有相应抗性的平板上生长。尽管质粒具有相似不相容性, 但是在传代生长的早期, 依然能检测到 2 个质粒的共存。

相比之下, 靶向多拷贝位点的 sgRNA 标记反选择方法不存在 2 种质粒共存的现象。对靶向单拷贝位点的反选择转化子进行 PCR 验证时, 扩增到了一个未替换 sgRNA 的微弱条带(图 2C、4C), 但利用靶向 σ 和 δ 多拷贝位点的 sgRNA 进行反选择时, 经过 PCR 验证, 不存在未替换质粒的扩增条带(图 4C), 说明不存在 2 种质粒共存的现象。当使用 sgRNA 作为反选择

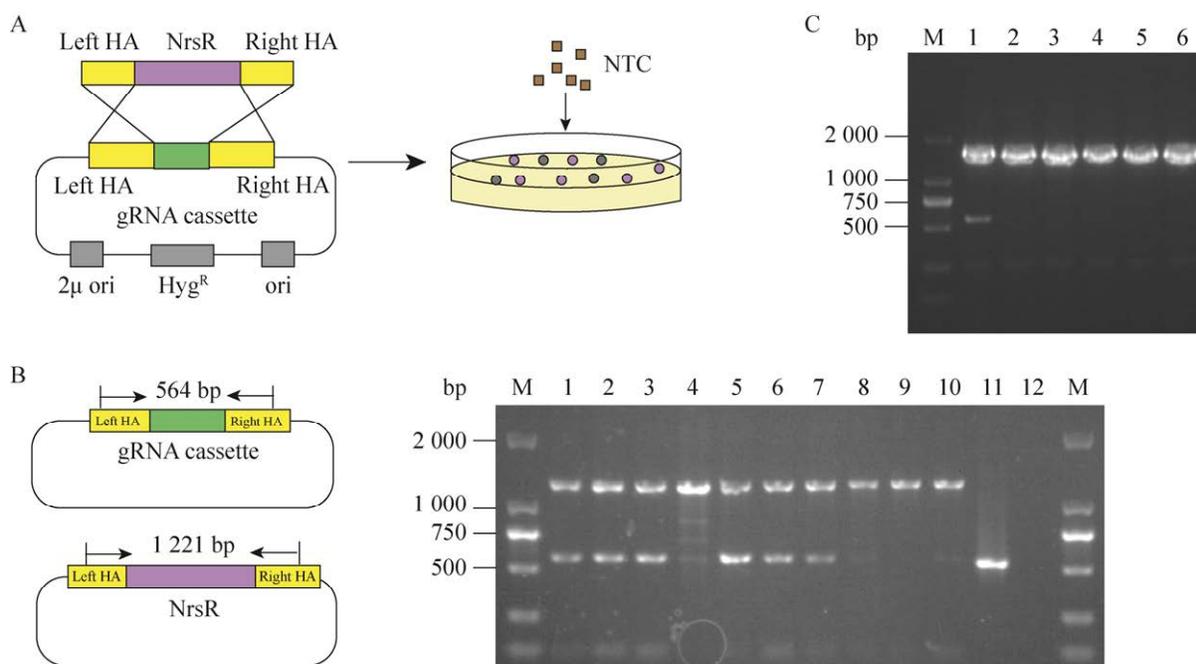


图 4 抗性标记选择法原理和 PCR 验证结果 A: 以 NrsR 抗性基因进行正向筛选的示意图。B: 酿酒酵母转化子 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图。泳道 M: DL2000 DNA marker; 泳道 1-10: 抗性筛选转化子; 泳道 11: p-g308a-LR 质粒为模板; 泳道 12: 空白对照(以水为模板)。C: 酿酒酵母转化子 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图。泳道 M: DL2000 DNA marker; 泳道 1: 以 308a 为靶点 sgRNA 反选择转化子; 泳道 2-6: 以 δ 位点为靶点 sgRNA 反选择转化子。

Figure 4 Principle of the antibiotic resistance marker selection method and PCR validation results. A: Schematic diagram of positive selection using the NrsR resistance gene. B: Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified transformants from *Saccharomyces cerevisiae*. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1-10: Resistant screening transformants; Lane 11: Amplification using p-g308a-LR plasmid DNA as the template; Lane 12: Blank control (using water as the template). C: Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified transformants from *Saccharomyces cerevisiae*. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: The sgRNA antiselective transformants target site 308a; Lane 2-6: The sgRNA antiselective transformants target site δ .

标记时, 载体质粒作为一个多拷贝元件, 所有质粒上的 sgRNA 表达盒被全部替换后, 菌株稳定存活。

通过改变 Cas9 靶向切割的位点, 成功提高了 sgRNA 标记反选择的效率, 虽然与抗性选择相比, 筛选效率尚未达到 100%, 但是 sgRNA 标记反选择方法在 DNA 组装筛选过程中具有明显优势。该方法筛选获得的质粒是单一的, 不存在 2 种质粒共存的现象, 这对于 DNA 组装过程中质粒的分离具有显著优势。

3 讨论与结论

酿酒酵母因具有良好的同源重组系统, 被广泛应用于多种基因克隆的场景。本研究基于 CRISPR-Cas9 的靶向切割作用, 以 sgRNA 表达盒为反选择标记, 构建了一个能够进行多拷贝质粒编辑且通用性更强的反选择系统。

传统的反筛选标记通常只应用于基因组的编辑筛选^[8,16-17], 而基于 sgRNA 表达盒替换的反选择方法除了能够应用于基因组的无痕编

辑,还能够用于多拷贝质粒的组筛筛选。相比于基因组上的单拷贝基因编辑,多拷贝质粒的编辑具有更大的筛选难度。质粒作为一个多拷贝元件,编辑过程中会不断地复制,增加筛选的难度。利用抗性基因介导的正向选择来进行多拷贝质粒组筛筛选时,会出现筛选不完全的情况,即会同时存在编辑成功质粒和未编辑质粒,不利于后续质粒的分离,而本研究构建的 sgRNA 反选择系统则不存在这种情况,因此该系统在多拷贝质粒编辑的筛选上具有更大的优势。

此外,与体外无缝克隆构建质粒的方法相比,本研究开发的 sgRNA 反选择方法有助在宿主菌株体内直接构建表达质粒,无需经过体外的重组过程,节省了遗传操作步骤的时间。同时,大片段 DNA 的组筛在体外操作时极易断裂,因此越来越多的大片段组筛都通过在细胞内完成,能够很好地保持片段的完整性^[18]。本研究开发的反选择系统可以结合现有的酵母体内大片段以及多片段组筛技术,对大片段的组筛进行反选择^[19-20],并且无需对载体质粒进行线性化,有利于载体的导入。

最后,随着 CRISPR-Cas9 系统在放线菌、谷氨酸棒杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、构巢曲霉等越来越多的物种中得到广泛应用,只要 Cas9 在目标宿主中能够发挥切割作用,反选择系统就可以通过替换 sgRNA 靶向的 20 bp 序列进行反选择,因此该反选择系统能够推广到更多的菌株当中。同时,针对部分菌株同源重组效果较差的缺陷,也可以通过引入 red/ET 等同源重组系统来提升同源重组效率,进一步适配反选择系统。相比于传统的抗性筛选和反选择标记,本研究中的 sgRNA 反选择系统不仅具有更好的通用性,而且在效率方面也得到显著提升,简化了质粒基因编辑筛选的流程,降低了操作难度,为基础研究及工业应用中的遗传

操作提供了更为高效和可靠的筛选方法。

作者贡献声明

蔡倩茹:方案设计、实验操作、初稿写作;王曼曼:实验操作、数据管理;朱进妹:监督指导、稿件润色修改;吴杰群:方案设计、监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] TOKASHIKI J, TOYAMA H, MIZUTANI O. Development of an itraconazole resistance gene as a dominant selectable marker for transformation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus luchuensis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85(3): 722-727.
- [2] TODOKORO T, BANDO H, KOTAKA A, TSUTSUMI H, HATA Y, ISHIDA H. Identification of a novel pyrithiamine resistance marker gene *thiI* for genome co-editing in *Aspergillus oryzae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(3): 227-232.
- [3] FREUDENBERG RA, WITTEMEIER L, EINHAUS A, BAIER T, KRUSE O. The spermidine synthase gene *SPDI*: a novel auxotrophic marker for *Chlamydomonas reinhardtii* designed by enhanced CRISPR/Cas9 gene editing[J]. *Cells*, 2022, 11(5): 837.
- [4] KAPLAN K, LEVKOVICH SA, DeROWE Y, GAZIT E, BAR-YOSEF DL. Mind your marker: the effect of common auxotrophic markers on complex traits in yeast[J]. *The FEBS Journal*, 2024, 291(10): 2209-2220.
- [5] LI LG, ZHANG T. Plasmid-mediated antibiotic resistance gene transfer under environmental stresses: Insights from laboratory-based studies[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 887: 163870.
- [6] BHARDWAJ S, MEHRA P, DHANJAL DS, SHARMA P, SHARMA V, SINGH R, NEPOVIMOVA E, CHOPRA C, KUČA K. Antibiotics and antibiotic resistance-flipsides of the same coin[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2022, 28(28): 2312-2329.
- [7] QIN ZJ, YU SQ, LIU L, WANG LL, CHEN J, ZHOU JW. A SacB-based system for diverse and multiple genome editing in *Gluconobacter oxydans*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 338: 31-39.
- [8] WANG X, LIU JQ, ZHENG WT, ZHANG YM, BIAN

- XY. Recombineering-mediated genome editing in burkholderiales strains[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2479: 21-36.
- [9] MENESTREAU M, RACHEDI R, RISOU V, FOGLINO M, LATIFI A. The CcdB toxin is an efficient selective marker for CRISPR-plasmids developed for genome editing in cyanobacteria[J/OL]. *MicroPublication Biology*, 2022.10.17912/micropub.biology.000512.
- [10] YANG YY, SUN QQ, LIU Y, YIN HZ, YANG WP, WANG Y, LIU Y, LI YX, PANG S, LIU WX, ZHANG Q, YUAN F, QIU SW, LI J, WANG XF, FAN KQ, WANG WS, LI ZL, YIN SL. Development of a *pyrF*-based counterselectable system for targeted gene deletion in *Streptomyces rimosus*[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2021, 22(5): 383-396.
- [11] LÜ J, LONG QS, ZHAO ZL, CHEN L, HE WJ, HONG JL, LIU K, WANG YM, PANG XH, DENG ZX, TAO MF. Engineering the erythromycin-producing strain *Saccharopolyspora erythraea* HOE107 for the heterologous production of polyketide antibiotics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 593217.
- [12] JACKSON HO, TAUNT HN, MORDAKA PM, KUMARI S, SMITH AG, PURTON S. CpPosNeg: a positive-negative selection strategy allowing multiple cycles of marker-free engineering of the *Chlamydomonas* plastome[J]. *Biotechnology Journal*, 2022, 17(10): 2200088.
- [13] REIDER APEL A, D'ESPAUX L, WEHRS M, SACHS D, LI RA, TONG GJ, GARBER M, NNADI O, ZHUANG W, HILLSON NJ, KEASLING JD, MUKHOPADHYAY A. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(1): 496-508.
- [14] LESAGE P, TODESCHINI AL. Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 110(1/2/3/4): 70-90.
- [15] MAXWELL PH, CURCIO MJ. Host factors that control long terminal repeat retrotransposons in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for regulation of mammalian retroviruses[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(7): 1069-1080.
- [16] YANG J, ZHANG Q, ZHANG GY, SHANG GD. Recombineering-mediated *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 gene deletion[J]. *Current Microbiology*, 2023, 80(2): 76.
- [17] PANG AP, WANG Y, ZHANG T, GAO F, SHEN JD, HUANG LG, ZHOU JP, ZHANG B, LIU ZQ, ZHENG YG. Highly efficient production of rhamnolipid in *P. putida* using a novel *sacB*-based system and mixed carbon source[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 394: 130220.
- [18] JUHAS M, AJIOKA JW. High molecular weight DNA assembly *in vivo* for synthetic biology applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(3): 277-286.
- [19] ZHOU JT, WU RH, XUE XL, QIN ZJ. CasHRA (Cas9-facilitated Homologous Recombination Assembly) method of constructing megabase-sized DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(14): e124.
- [20] LIN QH, JIA B, MITCHELL LA, LUO JC, YANG K, ZELLER KI, ZHANG WQ, XU ZW, STRACQUADANIO G, BADER JS, BOEKE JD, YUAN YJ. RADOM, an efficient *in vivo* method for assembling designed DNA fragments up to 10 kb long in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(3): 213-220.