

酿酒酵母CRISPR/Cas9基因编辑在本科实验中的 教学实践

王文洁 杨玲琦 李余动*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310018)

摘要 CRISPR/Cas9系统作为一项开创性的基因编辑技术,已被广泛地应用于各种生物体的基因研究,并将彻底改变生物医学研究以及疾病治疗。理解与掌握CRISPR技术的基本原理和操作方法,能够帮助生物相关专业学生紧跟时代前沿技术,培养创新科研思维。该研究设计了基于模式真菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的CRISPR/Cas9基因编辑教学实验,并融合了GFP荧光标记技术增强实验教学的可视化。实验模块包括gRNA设计、pCAS/gRNA共表达质粒构建、同源修复DNA表达盒构建、PCR产物纯化、醋酸锂酵母转化和荧光显微镜观察GFP表达等。教学实践表明学生能完成酿酒酵母CRISPR基因编辑操作模块,得到预期结果。该团队在实验教学过程中充分利用超星学习通平台进行多元智能评价,教学评价显示学生更加了解CRISPR基因编辑技术在生物研究中的重要性,并显著提高了本科生从事科学研究的兴趣。在新工科教育背景下,将此前沿技术引入本科生实验教学,有助于提高教学质量。

关键词 CRISPR/Cas9; 酿酒酵母; GFP; 基因编辑; 实验教学设计

The Teaching Practice of an Undergraduate Experiment in CRISPR/Cas9 Genome Editing of *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Wenjie, YANG Lingqi, LI Yudong*

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract As an emerging gene editing technology, the CRISPR/Cas9 system is widely used in the research of various organisms and is bound to revolutionize biomedical research and disease treatment. Understanding and mastering CRISPR technology will provide a strong foundation for undergraduates majoring in biology and related fields to follow the advanced technology, and cultivate innovative thinking. This study developed an innovative teaching experiment to apply CRISPR/Cas9 technology in *Saccharomyces cerevisiae* and incorporate GFP fluorescent labeling technique into this gene editing experiment to improve the visualization. The experimental modules include the design of gRNA, the construction of pCAS/gRNA co-expression plasmids, the construction of DNA cassette for homologous repairing, PCR product purification, lithium acetate-mediated yeast transformation and fluorescence microscope observation of GFP expression. Teaching practice indicates that students could complete the laboratory modules and achieve the expected

收稿日期: 2025-04-02

接受日期: 2025-05-30

浙江省教育厅一般科研项目(批准号: Y202250153)和浙江省“十四五”研究生教育改革项目(批准号: SYJG202201006)资助的课题

*通信作者。Tel: 13735883914, E-mail: lyd@zjhu.edu.cn

Received: April 2, 2025

Accepted: May 30, 2025

This work was supported by the General Scientific Research Projects of Zhejiang Provincial Department of Education (Grant No.Y202250153), and the 14th Five Postgraduate Education Reform Project of Zhejiang Province (Grant No.SYJG202201006)

*Corresponding author. Tel: +86-13735883914, E-mail: lyd@zjhu.edu.cn

outcomes. Multiple assessments were performed using intelligent evaluation platform throughout the entire laboratory process. Post-class assessment indicates that this team's experimental teaching course allows undergraduates to deepen their understanding of CRISPR/Cas9 technology and increase their interest in scientific research. Under the background of emerging engineering education, it is of great significance to introduce this cutting-edge scientific technique into the undergraduate classroom to improve the teaching quality.

Keywords CRISPR/Cas9; *Saccharomyces cerevisiae*; GFP; genome editing; experimental teaching design

成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)是一种在细菌和古菌中普遍存在的基因组免疫系统,由一系列重复的DNA序列(回文重复序列)和间隔的非重复序列组成,原核生物通过这些序列识别和抵御病毒和其他外源性DNA的入侵^[1]。该系统主要包括crRNA(CRISPR RNA)、tracrRNA(trans-activating crRNA)与Cas蛋白(CRISPR-associated proteins)三部分组成。研究人员已经发现了许多不同的CRISPR/Cas系统,其中来源于化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的CRISPR/Cas9系统被广泛应用于基因组编辑中^[2]。CRISPR/Cas9系统的作用机理是crRNA与tracrRNA退火形成向导RNA(guide RNA, gRNA)复合物,此复合物能特异性识别与其互补的基因组序列,引导Cas9核酸内切酶在靶标位点产生双链DNA断裂(double strand break, DSB)。然后DSB通过两种途径修复:非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的易错DNA修复或同源定向修复(homology directed repair, HDR)的高保真DNA修复^[3]。这一革命性技术的出现改变了基因编辑的可行性和效率,其通过对靶向DNA的精准编辑成为基因功能研究的新途径。目前,CRISPR技术被广泛应用于生物医学研究、农业品种改良和疾病基因治疗等领域^[4]。

基因编辑技术已成为生命科学研究的常用技术之一,生物相关专业学生需要掌握CRISPR/Cas9基因编辑技术的实验原理与方法;在模式生物中进行基因编辑尤为基础和重要,如果蝇、拟南芥、哺乳动物细胞等已被用于教学实验^[5-6]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是研究真核生物遗传特性和基因表达调控的理想模式生物。酿酒酵母具有生长迅速、易于遗传操作、转化高效和同源重组率高等特点,在常规实验条件下能快速繁殖,其较短的生长周期有利于学生在短时间内完成实验和观察结果^[7]。另外,酿酒酵母是第一个完成基因组测序的

单细胞真核生物,其遗传背景和生物学特性等已经被广泛解析,学生可以通过酿酒酵母基因组数据库(saccharomyces genome database, SGD)获取到酵母基因研究的相关文献和数据,方便深入研究某一基因相关的功能^[8-9]。

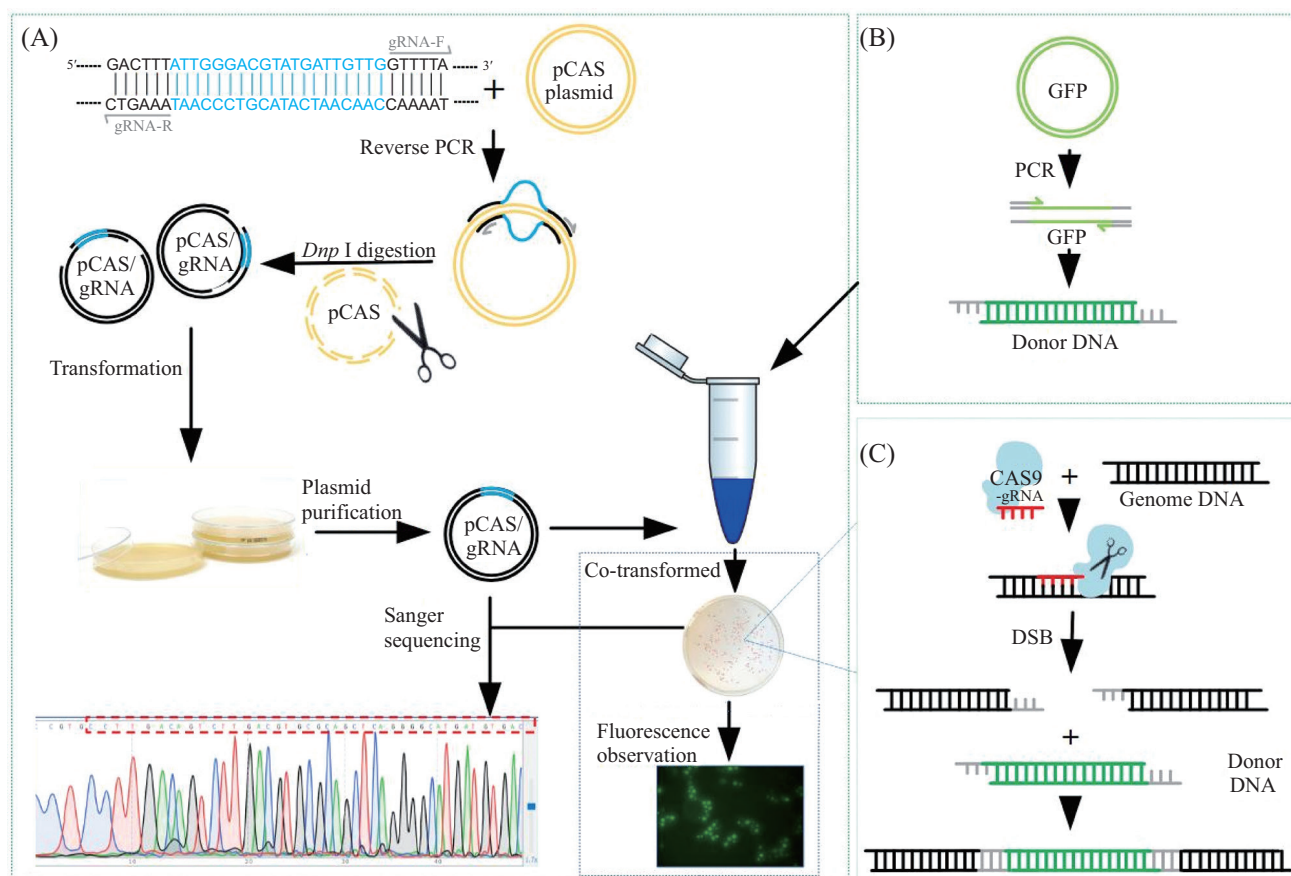
本教学实验旨在培养学生对基因编辑技术的实验设计和操作技能。通过完成实验的操作,学生将掌握CRISPR/Cas9技术的原理、实验设计和结果解读,为他们未来从事生物医学科学研究奠定坚实的基础^[10]。这种基于课程的本科生科研体验(course-based undergraduate research experiences, CUREs)的教学模式为所有学生提供了参与真实科研项目的机会,而且实验所需的仪器、耗材均为微生物学或分子生物学实验室常用的设备和物品,无需额外采购。

1 实验教学设计

本实验采用酿酒酵母模式菌株BY4741作为实验对象,实验设计选择酿酒酵母的ADE2基因位点进行基因编辑操作。ADE2基因编码磷酸化核糖氨基咪唑羧化酶,催化嘌呤核苷酸的从头合成^[11]。利用CRISPR/Cas9技术突变该基因后,酵母细胞内将积累磷酸化核糖氨基咪唑(P-ribosylamino imidazole, AIR),从而使菌落呈现粉红色或者红色,可通过肉眼快速筛选转化结果。

利用CRISPR基因编辑技术在酿酒酵母ADE2基因位点以同源重组修复机制精确插入绿色荧光蛋白(GFP)片段表达盒,并通过荧光实验观察其表达情况。GFP作为一种荧光标记蛋白,能够直观地显示基因表达的位置和强度^[12]。通过观察和定量测量荧光信号,学生可以评估基因编辑的效果,并可进一步研究基因的功能和调控机制等。

整个实验内容主要包括如下3个部分:(1)设计靶向ADE2的gRNA,构建CRISPR-Cas9/gRNA共表达质粒,测序验证质粒是否构建成功(图1A);(2)构



A: 大肠杆菌内pCAS/gRNA的构建; B: 含GFP的Donor DNA构建; C: pCAS/gRNA与Donor DNA转化酿酒酵母, 并对 $ADE2$ 基因进行编辑操作。
A: construction of pCAS/gRNA in *E. coli*; B: construction of Donor DNA containing GFP; C: co-transformation of pCAS/gRNA and Donor DNA into *S. cerevisiae* and gene editing of *ADE2* gene.

图1 酿酒酵母 $ADE2$ 基因编辑的CRISPR/Cas9体系构建及转化流程图

Fig.1 Schematic for CRISPR/Cas9-mediated *ADE2* disruption in *Saccharomyces cerevisiae*

建并纯化同源修复片段 -GFP, 即供体DNA(Donor DNA)(图1B); (3) 将CRISPR-Cas9/gRNA质粒与 Donor DNA转入酿酒酵母BY4741, 观察转化子菌落颜色(白色或粉色)以及荧光显微镜观察荧光结果(绿色荧光)判断靶基因编辑情况(图1C)。整体实验流程如图1所示。

2 教学进度安排

CRISPR/Cas9基因编辑教学实验开设于微生物育种实验课程, 是主要面向高年级本科生的开放性或创新性实验内容。实验教学安排12学时, 连续4周, 由选课同学自主在课外或暑假短学期完成实验。每组2~4位同学, 组内成员分工合作, 各小组独立完成实验并进行汇报。本课程基于超星泛雅慕课平台(<https://mooc1.chaoxing.com/course/220802079.html>), 实验教学过程中充分利用超星学习通平台进行个性

化学习, 旨在培养本科生的创造力与动手能力, 包括前期学情诊断分析、“云端”实验学习活动、多元智能评价和总结交流等环节。

2.1 CRISPR/Cas9技术原理讲解与CRISPR-Cas9/gRNA共表达质粒的构建(第1周)

课前准备: 教师需购买pCAS质粒和限制性内切酶Dpn I, 合成 $ADE2$ 基因靶向编辑的gRNA序列相应引物, 准备好PCR相关试剂及仪器设备、大肠杆菌转化实验所需的试剂与设备; 教师利用学习通平台发布课前任务及学情诊断调查问卷; 学生需完成学情诊断调查问卷及课前任务, 包括查阅文献了解CRISPR/Cas9技术的基本原理和方法, 掌握无菌操作技术, 如无菌工作台的使用、消毒步骤和培养基制备等。

课堂教学: 首先, 教师讲解CRISPR/Cas9技术原理和实验流程、 $ADE2$ 基因的相关知识, 帮助学

生了解引物的选择标准,如目标序列的选择和特异性要求(1 h);然后,教授学生使用在线引物设计工具CRISPRdirect(<https://crispr.dbcls.jp/>),根据*ADE2*基因序列进行引物设计,教师从引物特性对其结果给予评分建议,包括碱基组成、 T_m 值和二聚体形成等(0.5 h);最后,将已合成的gRNA序列相应引物和pCAS质粒提供给学生,学生通过反向PCR构建pCAS/gRNA重组质粒(1 h)。同时,学生在超星学习通上完成测验练习(0.5 h)。

课后任务:学生将PCR产物用限制性内切酶*Dpn* I处理后,转入大肠杆菌(1天),隔夜培养后在筛选平板上挑取单菌落接入液体培养基进行培养(1天),菌液部分用于甘油管保存,其他提取质粒后寄样测序(3~4天),分析测序结果以判断重组质粒是否构建成功。

2.2 同源修复片段DNA表达盒的构建(第2周)

课前准备:教师需购买PCR产物纯化试剂盒,合成含gRNA左右同源臂的GFP引物GFP-F/GFP-R,准备PCR扩增、电泳的相关试剂及仪器设备;学生需掌握琼脂糖凝胶电泳技术、凝胶成像系统、Nano-drop核酸检测仪的操作方法。

课堂教学:首先,教师讲解DNA损伤修复机制的原理、GFP绿色荧光蛋白的相关知识,帮助学生明确同源修复片段的设计思路,即gRNA左同源臂-GFP-gRNA右同源臂(1 h);然后,指导学生使用SanpGene软件设计包含gRNA左右同源臂的GFP引物,即选取gRNA左侧40 bp序列作为Donor DNA的左同源臂(HA-L),取gRNA右侧40 bp序列作为右同源臂(HA-R)(1 h);最后,将GFP片段提供给学生作为模板,同时将已合成的引物GFP-F/GFP-R提供给学生,PCR扩增以获得Donor DNA表达盒(0.5 h)。同时,学生在超星学习通上完成对应测验(0.5 h)。

课后任务:学生通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物条带,教师根据其条带大小是否正确、条带是否清晰、浓度是否足够高对PCR结果进行评价和指导(1天)。然后,学生利用PCR产物纯化试剂盒将合格的PCR产物进行纯化,获得Donor DNA片段,并通过Nanodrop测量浓度和纯度评估DNA样品的质量(1天)。

2.3 酵母感受态细胞的制备以及CRISPR-Cas9/gRNA和同源修复模板的共转化(第3周)

课前准备:教师需提前两天活化酿酒酵母菌株

BY4741,并在上课当天将活化的酵母接入液体培养基中进行培养,每2 h检查一次 D_{600} 值,直至 D_{600} 值在0.4~0.6之间;教师需准备酵母醋酸锂转化的相关试剂和仪器设备。

课堂教学:首先,教师讲解酵母感受态细胞的制作原理以及常用的酵母细胞转化技术——酵母醋酸锂转化法(1 h);然后,学生在教师的指导下将酵母在室温下,以4 200 r/min的速度离心5 min→收集→清洗→TE/LiAc溶液重悬,制备酵母感受态细胞(1 h);最后,学生通过醋酸锂介导的化学转化法将CRISPR-Cas9/gRNA重组质粒和同源修复模板Donor DNA转入酵母感受态细胞(1 h)。

课后任务:转化2天后学生开始观察筛选平板上转化子的形态和生长情况,记录菌落的大小、形状和颜色等特征。通过对转化子菌落的观察,学生可以初步评估CRISPR基因编辑是否成功。

2.4 酿酒酵母ADE2基因编辑转化子的结果观察与总结汇报(第4周)

课前准备:学生需对转化后的筛选平板进行拍照,对粉色或红色菌落进行标记;教师需收集学生在实验过程中遇到的难点问题,整理归纳并解答;学生需制作好总结汇报PPT。

课堂教学:首先,教师介绍荧光显微镜的操作步骤和参数设置,并指导学生使用荧光显微镜观察转化后酵母细胞中的GFP荧光表达,观察并记录荧光强度和分布情况,采集荧光显微镜图像并对实验结果进行定性和定量分析(1.5 h);教师组织学生对整体实验结果进行PPT汇报和总结交流,教师给出评分并与学生就实验过程中的问题进行交流、答疑(1.5 h)。

课后任务:学生将整个实验内容、实验结果和分析讨论撰写成实验报告,教师给予评分并计入本实验总成绩;学生完成本实验调查问卷。

3 实验结果

3.1 CRISPR-Cas9/gRNA共表达质粒的构建

将酿酒酵母*ADE2*基因的DNA序列复制到在线设计平台CRISPRdirect进行gRNA序列设计,在结果中选择gRNA序列:5'-ATT GGG ACG TAT GAT TGT TG-3'。之后根据pCAS质粒(Addgene, #60847)连接末端序列设计引物(表1和图2A),通过反向PCR构建pCAS/gRNA重组质粒。用限制性内切酶

Dpn I(New England Biolabs, #R0176S)去除作为模板的原始质粒后,转入大肠杆菌保存pCAS/gRNA质粒。再通过Sanger测序验证共表达质粒是否构建成功。测序结果显示,蓝色框内的基因序列与设计gRNA序列完全一致(图2B),这说明gRNA已成功插入pCAS质粒,pCAS/gRNA共表达质粒构建成功。

3.2 同源修复片段DNA表达盒的构建

Cas9蛋白对目标位点靶基因序列进行结合并切割后,细胞对该DNA损伤会立刻启动修复机制。在此过程中若存在Donor DNA,靶基因双链断裂处会与Donor DNA上的同源臂序列结合从而启动同源修复。如图3所示,利用该同源重组修复机制,在BY4741酵母细胞内选取gRNA左侧40 bp序列作为

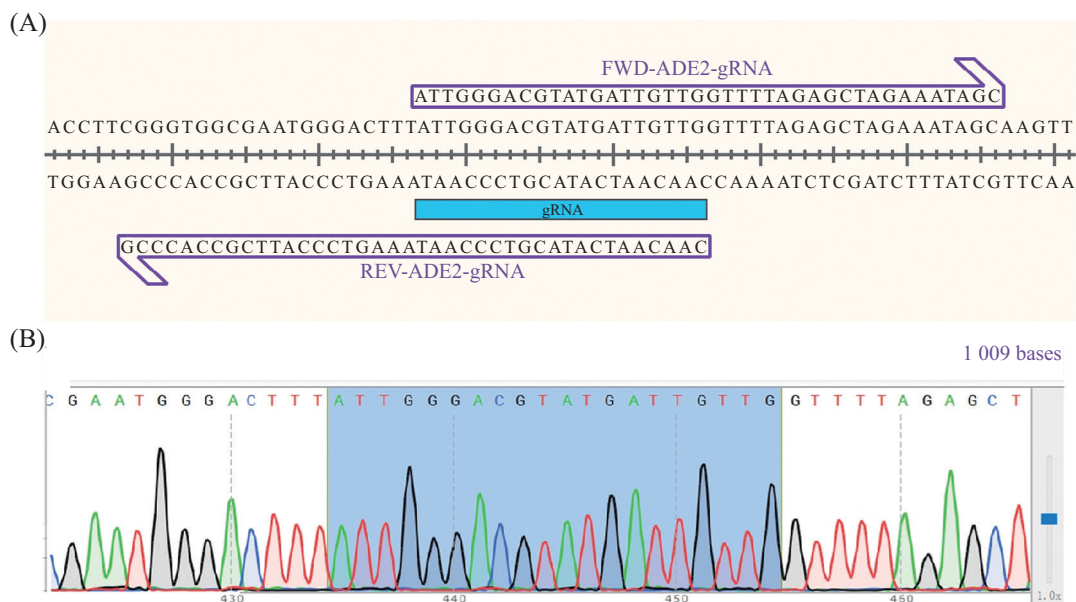
Donor DNA的左同源臂(HA-L),取gRNA右侧40 bp序列作为右同源臂(HA-R),使用SanpGene软件设计引物GFP-F和GFP-R(表1)扩增GFP片段以获得Donor DNA表达盒,即一段带有切割位点左右同源臂的GFP同源修复片段。利用PCR产物纯化试剂盒(TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit, #9761)对组装好的HDR Donor DNA片段进行纯化,并用ThermoScientific Nanodrop One测量其浓度,合格的浓度范围为0.1~0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,之后将其置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

3.3 CRISPR-Cas9/gRNA和同源修复模板共转化酿酒酵母

将酿酒酵母菌株BY4741接种于YPD培养基上进行活化并制备成感受态细胞,方法参照文献[13]。

表1 本实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	目标 Aim
FWD-ADE2-gRNA	ATT GGG ACG TAT GAT TGT TGG TTT TAG AGC TAG AAA TAG C	Construction of pCAS/gRNA
REV-ADE2-gRNA	CAA CAA TCA TAC GTC CCA ATA AAG TCC CAT TCG CCA CCC G	
GFP-F	GTT GGT ATA TTA GGA GGG GGA CAA TTG GGA CGT ATG ATT GAG TAA AGG AGA AGA ACT TTT	Construction of Donor DNA
GFP-R	TGG ATG AAC TAT ACA AAT AGT TGA GGC AGC AAA CAG GCT CAA CAT TAA GAC GGT AAT ACT	



A: gRNA双向引物示意图(紫色箭头所示); B: pCAS/gRNA共表达质粒构建测序验证。

A: gRNA bidirectional primers (as shown in purple arrow); B: sequencing verified the construction of pCAS/gRNA plasmid.

图2 gRNA设计与测序验证

Fig.2 gRNA design and sequencing result

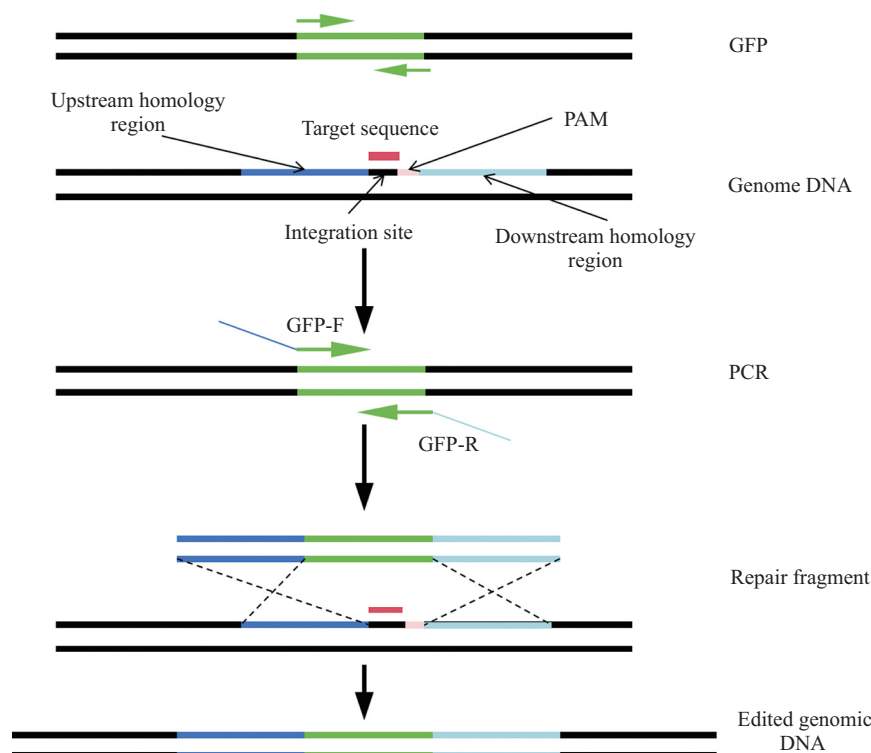


图3 同源修复片段DNA表达盒的构建

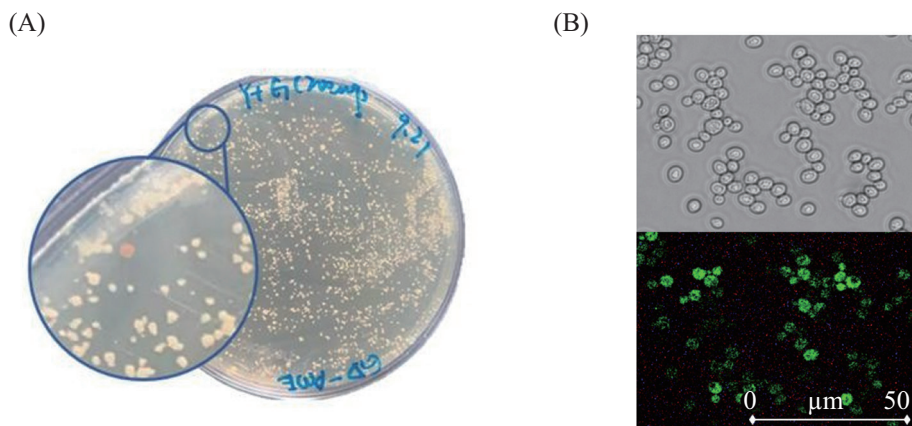
Fig.3 Construction of the homologous repair fragment DNA cassette

依次向酿酒酵母感受态细胞中加入900 μL 40% PEG、10 μL 鲑鱼精DNA(10 mg/mL)以及pCAS/gRNA质粒: 同源修复片段DNA表达盒=1:2添加量, 用涡旋振荡仪使其彻底混合均匀。同时设立阴性对照组, 阴性对照中用pCAS空质粒代替pCAS/gRNA质粒。30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育30 min后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 热击20 min, 促进pCAS/gRNA质粒和同源修复片段转入酵母细胞内。之后13 000 $\times g$ 离心30 s移去上清, 并加入250 μL YPD液体培养基混匀, 将菌液涂布于G418抗性平板上进行筛选。30 $^{\circ}\text{C}$ 培养2天后, 观察G418抗性平板上的菌落情况。按照实验设计, 同源修复片段中GFP定点敲入*ADE2*基因位点的酵母菌不再正确表达ADE2蛋白, 应显示粉红色菌落; 同时GFP蛋白表达应有绿色荧光。结果显示, G418抗性平板上长出粉红色菌落, 如图4A所示, 这表明pCAS/gRNA质粒成功转入并靶向*ADE2*基因位点进行切断失活。用牙签挑取粉红色单菌落与生理盐水混合均匀后涂布于载玻片上, 波长488 nm下进行显微镜观察。结果如图4B所示, 明显观察到酵母细胞内部发出绿色荧光, 说明GFP成功插入并表达。综上, 可初步判断基因编辑有效果, 后续仍需进行Sanger测序验证, 确定基因组靶位点上发生的序列变化。

4 教学效果评价

本实验采用多元化教学评价方式, 包括PPT汇报、实验报告、学习通平台上的单元测试和课后调查问卷等, 以精准把握学生的学习情况, 诊断实验教学情况, 激发学生学习动力, 并据此调整与优化教学流程。此外, 借助超星泛雅慕课平台, 我们在实验中的各个阶段持续追踪并动态评估学生的学习进展, 实现了伴随性的学习诊断与评价。另外我们通过线上单元测试对实验原理与方法等理论知识进行学习效果的摸底巩固。当每组学生在进行各个阶段的现场实验内容时, 助教还会对学生的实验操作表现进行评估。最后每组学生整理实验结果并按组进行PPT汇报, 每位学生独立撰写并提交一份实验报告。

实验结束后学生再次完成线上教学评价问卷, 从图5可以看出, 在课程教学期间学生对本基因编辑技术实验的整体满意度较高, 能有效利用线上线下资源进行学习或实验操作, 而且对利用基因编辑技术进行科学研究的兴趣也大大加强。教师在课堂教学中注重结合微生物学的科研实践, 鼓励学生直接将所学知识应用于毕业论文或科技创新竞赛等科研



A: 突变体筛选平板图; B: 酿酒酵母突变体荧光显微镜图。

A: selective plate of transformants; B: fluorescence microscope picture of *S. cerevisiae* mutants.

图4 酿酒酵母转化结果图

Fig.4 Transformation results of *Saccharomyces cerevisiae* mutants

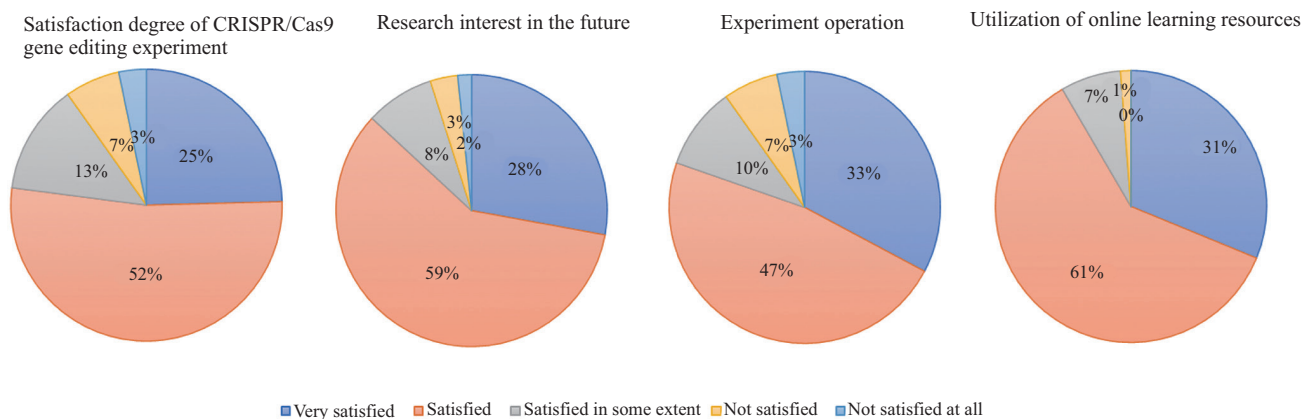


图5 调查问卷部分数据统计结果

Fig.5 Part statistic results of the questionnaire

工作,选课学生中多位同学在全国大学生生命科学竞赛中获奖或发表研究论文。

5 结语

教育部在《全国普通高校本科教育教学质量报告(2018年度)》中指出,部分高校课程存在学习难度、挑战度不高,考核方式单一、重结果轻过程的问题。本实验教学通过引入CRISPR基因编辑技术这一与生命科学前沿科研接轨的高阶性实验,有助于学生亲身参与到现代生物科学研究的艰难探索中,加深对分子生物学和遗传学原理的理解,并增加他们对生物科学的兴趣。

利用真核模式生物酿酒酵母的成熟遗传操作体系,本实验设计了一套简明扼要、易于操作的酵母CRISPR实验教学方案,并保持CRISPR实验的

“高阶性、创新性与挑战度”。该实验教学项目既有PCR引物与gRNA设计、DNA测序分析等生物信息学“干实验”,又涉及分子克隆、PCR扩增和微生物培养等“湿实验”。尽管各项实验相互独立,实验原理各不相同,但环环相扣,有效促进学生熟悉CRISPR实验的原理与操作方法,并掌握真实生物科研的实验设计与实施过程。另外,教师可鼓励学生大胆选择他们自己感兴趣的目标基因进行实验,可增加学生实验的探索性和挑战性。

本实验通过融合智慧课堂教学设计,充分、合理利用教学云平台(超星泛雅慕课平台)、智能学习终端(超星学习通)以及数字化教学资源等,使学生在学过程中不仅有明确的目标,而且在实践基因编辑技术的同时扩展了他们的实验技能和科学知识。在教学实践中,本实验作为本校生物工程专

业的微生物育种实验的一个基于项目教学(project-based learning, PBL)的扩展模块开设^[14],也可以作为教学模块嵌入到其他课程中,例如细胞生物学和基因工程实验等课程。通过实验的设计和实施,学生深入了解了CRISPR技术在生命科学中的应用,同时这也锻炼了他们关键的实验操作技术操作能力与科研思维能力。这将为今后学生的学习和科研工作奠定坚实的基础,且有利于学生自主学习与提高学生的兴趣,从而进一步提高新工科背景下的本科实验教学质量。

参考文献 (References)

- [1] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [2] TONSAGER A J, STARGELL L A. An undergraduate research experience in CRISPR-Cas9 mediated eukaryotic genome editing to teach fundamental biochemistry techniques [J]. *Biochem Mol Biol Edu*, 2025, 53(1): 33-45.
- [3] SCULLY R, PANDAY A, ELANGO R, et al. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(11): 698-714.
- [4] JACINTO F V, LINK W, FERREIRA B I. CRISPR/Cas9-mediated genome editing: from basic research to translational medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7): 3766-78.
- [5] THURTTLE-SCHMIDT D M, LO T W. Molecular biology at the cutting edge: a review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates [J]. *Biochem Mol Biol Edu*, 2018, 46(2): 195-205.
- [6] 张敏, 宋亚坤, 吕沫, 等. 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术的本科教学实验体系的创建与实践[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(ZHANG M, SONG Y K, LYU M, et al. Construction and practice of experimental system for undergraduate teaching based on CRISPR/Cas9 gene editing technology [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2021, 37(1): 135-43.
- [7] SEHGAL N, SYLVES M E, SAHOO A, et al. CRISPR gene editing in yeast: an experimental protocol for an upper-division undergraduate laboratory course [J]. *Biochem Mol Biol Edu*, 2018, 46(6): 592-601.
- [8] WONG E D, MIYASATO S R, ALEKSANDER S, et al. *Saccharomyces* genome database update: server architecture, pan-genome nomenclature, and external resources [J]. *Genetics*, 2023, 224(1): iyac191.
- [9] BAEK S, UTOMO J C, LEE J Y, et al. The yeast platform engineered for synthetic gRNA-landing pads enables multiple gene integrations by a single gRNA/Cas9 system [J]. *Metab Eng*, 2021, 64: 111-21.
- [10] 郭滨, 莫翱澈, 蔡亮, 等. 遗传学实验的教学改革——经典实验与新技术的融合(二)[J]. 高校生物学教学研究: 电子版(GUO B, MO A W, CAI L, et al. An exploration of teaching in the genetic experiments developing a type with classic experiments and new technology fused (2) [J]. *Biology Teaching in University, electronic edition*), 2018, 8(1): 56-60.
- [11] SIROIS A R, PILOTTE N, WILLIAMS S A, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing of the *Saccharomyces cerevisiae* ADE2 gene with restriction-free cloning and a rapid BamHI digest readout [J]. *Curr Protoc Essent Lab Tech*, 2020, 21(1): e45.
- [12] CORMACK B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1(4): 406-10.
- [13] GIETZ R, SCHIESTL R. Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1-4.
- [14] 严婷婷, 张蕾, 李余动, 等. 基于微信的“微生物遗传育种实验”混合式教学模式探究[J]. *遗传*(YAN T T, ZHANG L, LI Y D, et al. Research on the blended learning mode of “Microbial Breeding Experiments” based on WeChat [J]. *Hereditas*), 2018, 40(7): 601-6.