

## 一种温敏复制缺陷 T 载体的构建及在鸡白痢沙门氏菌基因敲除中的应用

郭春, 林蕾, 任妮妮, 姜轲冉, 袁海霞, 余旭平

浙江大学动物科学学院 农业部动物病毒学重点实验室, 浙江 杭州 310058

郭春, 林蕾, 任妮妮, 等. 一种温敏复制缺陷 T 载体的构建及在鸡白痢沙门氏菌基因敲除中的应用. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1118–1129.

Guo C, Lin L, Ren NN, et al. Construction of a temperature-sensitive and replication-defective T-vector and its application for gene knockout in *Salmonella pullorum*. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1118–1129.

**摘 要:** 基因敲除是基因功能研究的重要手段, 载体是基因敲除的工具和核心。为获得有效的基因敲除载体以快速构建基因突变株及鉴定相应基因的必需性, 在已有温敏复制缺陷 pIDM1 质粒的基础上, 于 *EcoR* I 和 *Pst* I 位点间插入串联的 *Xcm* I 酶切位点接头, 构建了 pIDM-T 质粒; 该质粒经 *Xcm* I 酶切可获得末端突出 T 的线性化 pIDM-T 载体。在验证了 pIDM-T 质粒复制的温敏特性基础上, 应用构建的 T 载体克隆鸡白痢沙门氏菌 CVCC527 菌株的 *eno* 和 *ybdR* 两个基因, 鉴定获得 pIDM-T\_eno 和 pIDM-T\_ybdR 两个重组质粒; 将重组质粒转化 527 菌株, 经 IPC (Integration rate per cell) 值计算, 鉴定 *eno* 为必需基因, *ybdR* 为非必需基因。挑取非必需 *ybdR* 基因 527 菌株重组菌(SalΔybdR), 经 PCR 和测序, 确认突变菌株重组位点的正确性。pIDM-T 载体可快速克隆 PCR 产物, 用于沙门氏菌的基因敲除及必需性鉴定, 为沙门氏菌基因功能研究提供了一种有效快速的手段。

**关键词:** 载体, pIDM-T, 基因必需性, 基因敲除

## Construction of a temperature-sensitive and replication-defective T-vector and its application for gene knockout in *Salmonella pullorum*

Chun Guo, Lei Lin, Nini Ren, Keran Jiang, Haixia Yuan, and Xuping Yu

Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

**Abstract:** Knockout is an important method for gene function study, while vector is the core of gene knockout. In order

**Received:** March 1, 2012; **Accepted:** June 7, 2012

**Corresponding author:** Xuping Yu. Tel/Fax: +86-571-88982096; E-mail: xpyu@zju.edu.cn

to obtain an effective vector for rapid construction of mutant and essentiality identification of the corresponding gene, we constructed a recombinant plasmid named pIDM-T based on the temperature-sensitive and replication- defective plasmid pIDM1 by inserting an *Xcm* I adapter into the *Eco*R I and *Pst* I sites of pIDM1. Digesting with *Xcm* I, pIDM-T can be prepared as a linear T-vector for PCR products cloning and be used to knockout the corresponding gene in the genome with insertion duplication mutagenesis. After the verification of temperature sensitivity of the replication of the plasmid, we cloned two *Salmonella pullorum* genes *eno* and *ybd*r into the constructed pIDM-T, and two recombinant plasmids pIDM-T\_ *eno* and pIDM-T\_ *ybd*r were identified. The recombinant plasmids were then transformed into *S. pullorum* strain CVCC527 and the IPC (Integration rate per cell) values were calculated. As a result, we identified the *eno* gene as an essential gene and the *ybd*r as a non-essential gene in CVCC527. We verified the correctness of recombination site in *ybd*r recombinant 527 clones (SalΔ*ybd*r) by PCR and sequencing. The pIDM-T vector can be used for gene knockout in *S. pullorum*, as well as the identification of essentiality of the corresponding genes, which offers an effective and rapid tool for gene function study in *Salmonella*.

**Keywords:** vector, pIDM-T, gene essentiality, gene knockout

基因敲除是后基因组时代基因功能研究的最有效手段之一,而载体是基因敲除工作的工具和核心<sup>[1]</sup>。2010 年李军华等<sup>[2]</sup>以 pBS246 质粒为骨架,在该质粒的两个 LoxP 序列之间插入正筛选标记基因,并在两个 LoxP 序列外侧分别插入两组携带“8 碱基”酶切位点的多克隆位点序列(MCS-1 和 MCS-2)和负筛选标记基因,成功构建了通用型基因打靶载体 pGT-V1,该载体的构建为有效开展基因打靶提供了新的平台。同年姜娜等<sup>[3]</sup>通过构建打靶载体 pHY-Kan-*ssaV*,成功敲除了伤寒沙门氏菌 *S.ty*2 的 *ssaV* 基因,获得伤寒沙门氏菌 *ssaV* 基因缺失株。基因缺失株的构建是研究病原微生物致病机理的重要手段<sup>[4]</sup>,通过构建致病菌的基因缺失株并分析其表型<sup>[5]</sup>,有助于快速了解致病基因功能和致病机制。2007 年乔凤等<sup>[6]</sup>在 pUC19 质粒的基础上,在其多克隆位点处插入卡那霉素抗性基因,并在该基因两侧添加多个酶切位点,成功构建了 pUC19K 质粒。作者进一步利用该自杀质粒构建了布鲁氏菌外膜蛋白 *Omp25* 基因突变株,为细菌基因功能研究奠

定基础。2011 年胡勇等<sup>[7]</sup>以 pMD18-T 为载体,利用交错 PCR 技术构建了伤寒沙门氏菌 *bcd*D 基因敲除突变株,为进一步研究 *bcd*D 的基因功能提供有效的技术手段。

基因敲除方法很多,插入复制突变法(Insertion duplication mutation, IDM)是其中一种简单高效的基因敲除和基因功能研究方法<sup>[8-9]</sup>。IDM 是利用克隆于载体中的 DNA 片段与基因组中的相应基因同源重组,插入另一拷贝 DNA 片段和质粒骨架,导致重组菌中相应基因被截断而敲除。IDM 可以用于基因功能的鉴定,包括细菌基因的必需性鉴定。2004 年 Knuth 等<sup>[8]</sup>采用 IDM 方法鉴定出鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 的 257 个必需基因,该方法构建了一个带温度敏感复制子的 pIDM1 质粒,它在 37 °C 时不能复制;利用该载体的 *Kpn* I 位点,Knuth 等<sup>[8]</sup>克隆了基因组随机 PCR (rPCR) 产物,构建了鼠伤寒沙门氏菌本菌株基因组文库。通过细菌培养温度的改变,筛选出发生了同源重组并插入 pIDM1 骨架(含 *tet* 基因)的重组菌。由于必需基因 IDM 敲除

菌株不能存活,理论上不能通过培养温度转换而筛选到重组菌(实际上因非同源重组、突变等原因,仍可能筛到极少量的四环素耐药菌株),而非必需基因的敲除不影响细菌的生存,因此能筛选到大量的重组菌,计算重组率(Integration rate per cell, IPC)可以了解基因的必需性<sup>[9]</sup>。2007年, Klumpp 等<sup>[10]</sup>还进一步测定经 pIDM1 质粒突变的菌株在巨噬细胞中的存活情况,筛选获得与巨噬细胞内复制相关的致病基因。

pIDM1 是一个有效的基因敲除载体,但 pIDM1 质粒需要经 *Kpn* I 等单酶切,并需进一步脱磷处理以避免自身环化,操作较繁琐,成功率低;另一方面,PCR 产物也需首先经过酶切,而不能进行直接克隆。为此,本实验拟在 pIDM1 的基础上,在 *Eco*R I 和 *Pst* I 位点间插入 *Xcm* I 接头,构建可以直接克隆 PCR 产物的 T 载体,进一步应用构建的 T 载体进行鸡白痢沙门氏菌 2 个基因的敲除和必需性检测,验证该载体的有效性。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

基因工程宿主菌 *E. coli* TG1 由本实验室保存;质粒 pIDM1 (温度敏感、*tet* 抗性)由德国博士 Fuchs TM (Zentralinstitut für Ernährungs-und Lebensmittelforschung (ZIEL), Abteilung Mikrobiologie, Technische Universität München) 馈赠;鸡白痢沙门氏菌 CVCC527 菌株购自中国兽医药品监察所。

### 1.2 试剂和工具酶

*Eco*R I、*Pst* I 等限制性内切酶和 *rTaq* DNA 聚合酶、dNTPs Mix 购自 TaKaRa 公司;T4 DNA

连接酶和 *Xcm* I 内切酶购自 New England Biolabs;DNA marker (DL5000、DL2000) 购自东盛公司;AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、PCR 清洁试剂盒均购自 Axygen 公司;血液/细胞/基因组 DNA 提取试剂盒购自北京博大泰克生物有限公司;基因片段引物及接头引物的合成在南京金思瑞生物有限公司完成,测序由华大基因科技股份有限公司完成。

### 1.3 引物

本实验所用引物名称及序列见表 1。

### 1.4 pIDM-T 质粒的构建

#### 1.4.1 *Xcm* I 接头引物的设计与合成

参照文献[11]设计一对接头引物 *Xcm* I-up 和 *Xcm* I-dn,并在上下游引物的两端分别增加 *Eco*R I 位点和 *Pst* I 位点(表 1),以便克隆入质粒 pIDM1 的 *Eco*R I 位点和 *Pst* I 位点间,引物由南京金思特有限公司合成。

#### 1.4.2 接头的退火、酶切与纯化

取 *Xcm* I-up、*Xcm* I-dn (10 μmol/L) 各 10 μL 混合,100 °C 下煮沸 5 min,缓慢冷却至室温,得到双链接头。对接头进行 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切并纯化回收。

#### 1.4.3 pIDM1 质粒的双酶切

用 *Eco*R I 和 *Pst* I 对 pIDM1 质粒进行双酶切并回收。

#### 1.4.4 连接

将上述回收的接头酶切产物与 pIDM1/*Eco*R I/*Pst* I 酶切产物于 16 °C 连接,转化 *E. coli* TG1 并筛选得到重组质粒 pIDM-T。用限制性内切酶 *Xcm* I 对重组质粒进行酶切验证和测序分析,测序由华大基因科技股份有限公司完成,测序引物为 M13F。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers

Name of the primers	Primer sequences(5'-3')	Position	Length (bp)
<i>Xcm</i> I-up <sup>1</sup>	CTGAATTC <u>CCAGGTCTAAGCTGGCCACCGGAAGACTGG</u> CTGCAGTTTT	—	48
<i>Xcm</i> I-dn <sup>1</sup>	AAAACTGCA <u>GCCAGTCTTCCGGTGGCCAGCTTAGACCTGG</u> GAATTCAG	—	
<i>eno</i> -up	CCGTGGTAACCCGACTGTTGAA	2971454 <sup>2</sup>	429
<i>eno</i> -dn	TCGCCGCCGTTGATGATGTT	2971041 <sup>2</sup>	
<i>ybdr</i> -up	TTTATGGGCGAGGTGGTGGAA	668527 <sup>2</sup>	436
<i>ybdr</i> -dn	CGCACAGGCGATAGTCAGTAAT	668940 <sup>2</sup>	
<i>eno</i> -I-up	TTAAAGCCGCCAACGAGCATCA	2971621 <sup>2</sup>	763 <sup>4</sup>
<i>ybdr</i> -I-up	ACGTATCACGGTCCACATCAC	668356 <sup>2</sup>	772 <sup>4</sup>
m13F-47up	CAGGGTTTTCCAGTCACGA	131 <sup>3</sup>	305 <sup>5</sup>
m13R-Mdn	GAGCGGATAACAATTTCACACAG	144 <sup>3</sup>	
M13F	TGTAACACGACGGCCAGT	108 <sup>3</sup>	—

1: the *Eco*R I and the *Pst* I sites are underlined and the two *Xcm* I sites are boxed in the *Xcm* I adapter; 2: the position of the *eno* and *ybdr* primers corresponding to the genome sequence of *Salmonella gallinarum* str. 287/91 (GenBank Accession No. NC\_011274.1); 3: the position of universal primers on the constructed pIDM-T vector referred to the *Xcm* I cassette (for m13F-47up and M13F: upstream of the *Xcm* I cassette, for m13R-Mdn: downstream of the *Xcm* I cassette); 4: the theoretically calculated length of DNA fragments amplified together with m13R-Mdn, respectively; 5: the length of DNA amplified from the pIDM-T vector with no insertion.

## 1.5 选定基因 pIDM-T 敲除质粒的构建

### 1.5.1 目的基因的选取

根据 DEG 必需基因库 (Database of essential genes) 已有信息和文献报道<sup>[8,10,12-13]</sup>, 选取 2 个鸡白痢沙门氏菌基因 *eno* 和 *ybdr* 作为目标敲除基因。*eno* 在 DEG 库的多种细菌中均为必需基因, *ybdr* 在 PEC (Profiling of *E. coli* Chromosome) 数据库上公布为大肠杆菌的非必需基因, 且在本实验室前期鸡白痢沙门氏菌必需基因片段筛选工作中验证为非必需基因。

### 1.5.2 引物设计与合成

从 NCBI 上公布的鸡伤寒沙门氏菌基因组序

列中, 获得选定基因的序列, 并应用 Primer 5.0 设计引物: *eno*-up 和 *eno*-dn, *ybdr*-up 和 *ybdr*-dn, 引物序列见表 1, 引物由南京金思瑞生物有限公司合成。

### 1.5.3 目的基因片段的扩增与克隆

以 *S. Pullorum* 基因组 DNA 为模板, 用上述设计的引物扩增出目的基因片段, 将纯化后的基因片段与经纯化的 pIDM-T/*Xcm* I 载体进行 16 ℃ 连接 12~14 h, 将连接产物转化大肠杆菌 TG1。

### 1.5.4 阳性克隆筛选

在 pIDM-T 质粒中具有 M13 通用引物结合位点, 因此选择合成 m13F\_47up 与 m13R\_M-dn

引物 (表 1), 用于转化克隆的菌落 PCR 鉴定。取大肠杆菌转化子稀释液为模板, 用上述通用引物进行菌落 PCR 检测, 筛选阳性克隆 (空载体 PCR 产物长度为 305 bp), 进一步抽提阳性克隆质粒, 进行酶切鉴定和测序验证。

### 1.6 pIDM-T 质粒复制温敏特性的测定

pIDM-T 质粒是在 pIDM1 基础上插入 *Xcm* I 位点构建而成的, 理论上它与 pIDM1 质粒一样, 在 30 °C 培养时正常复制, 在 37 °C 培养时质粒因不能复制而逐步在子代细胞中丢失, 新的细胞将因 *tet* 抗性基因丢失而无法在 *tet* 平板上存活, 只有重组菌因基因组中整合了一拷贝的质粒 (含 *tet* 抗性基因) 而能在 37 °C 平板上生长。为验证上述推论, 以排除因质粒未完全丢失而对 IPC 值测定的影响, 我们开展了如下实验: 将 pIDM-T 空质粒转化鸡白痢沙门氏菌 527 菌株, 挑选阳性转化克隆, 30 °C 过夜培养, 将过夜培养物稀释后涂布四环素抗性平板, 37 °C 培养 24~48 h, 同时以克隆有非必需 *ybdr* 基因片段的 pIDM-T<sub>*ybdr*</sub> 重组质粒转化菌为阳性对照, 观察细菌 (重组菌落) 的生长情况。

### 1.7 IPC 值计算及基因的必需性鉴定

将抽提的阳性质粒, 电转化至 527 菌株感受态细胞, 涂布含四环素的 LB 平板, 30 °C 培养 24~48 h。挑取单个阳性克隆接种于含四环素的 SOC 液体培养基中, 30 °C 温和振荡培养 20~24 h。

为使计数更加精确和方便, 对稀释方法进行了摸索。对 30 °C 培养条件下的细菌总数计数, 尝试了  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  等多个稀释梯度; 对 37 °C 条件下的重组菌计数, 我们进行过 2 倍、3 倍、4 倍稀释, 比较各个梯度菌液在平板上的

生长情况, 确定最佳稀释倍数。据前期的摸索用 96 孔板将菌液稀释为 30 倍和 120 倍, 并将稀释菌液 50  $\mu$ L 涂布于含四环素的 LB 平板, 每个稀释度做 3 次重复, 将平板置于 37 °C 培养 24~48 h, 计数重组菌的数量。同样再用 96 孔板将菌液稀释为  $10^5$  和  $10^6$  倍, 将稀释菌液 50  $\mu$ L 涂布于含四环素的 LB 平板, 每个稀释度做 3 次重复, 并将平板置于 30 °C 培养 24~48 h, 计数菌液中的细菌总数。

根据公式 ( $IPC = \text{重组子个数} / \text{细菌总个数}$ , 即  $37\text{ }^\circ\text{C}$  平板菌落总数 /  $30\text{ }^\circ\text{C}$  平板菌落总数) 计算出 IPC 值。据文献报道<sup>[8,10]</sup>,  $IPC \leq 1.0 \times 10^{-6}$  时判定目的基因为必需基因;  $1.0 \times 10^{-4} \leq IPC \leq 1.0 \times 10^{-2}$  时判定目的基因为非必需基因。

### 1.8 鸡白痢沙门氏菌突变株重组插入位点的鉴定

参照鸡伤寒沙门氏菌基因组全序列, 分别在目的基因片段的上游 200 bp 左右设计突变株鉴定引物 *eno*-I-up, *ybdr*-I-up (表 1), 将上述鉴定引物与位于 pIDM-T 载体上的下游引物 m13R-Mdn (或上游引物 m13F\_47up, 因 T 载体克隆片段时可以正反向二种方式插入) 组合, 对 37 °C 条件下生长的 2 个菌落进行 PCR 鉴定。依据能否扩增出特异的基因片段及片段的测序结果鉴定突变株 IDM 插入位点的正确性。

## 2 结果

### 2.1 pIDM-T 质粒的构建和鉴定

将 *Xcm* I 接头插入 pIDM1 的 *Eco*R I 和 *Pst* I 后获得 pIDM-T 重组质粒, 为验证接头已正确插入, 用 *Xcm* I 酶切重组质粒, 获得 1 条约 3.9 kb 的片段; 而未插入接头的 pIDM1 原始质粒不能

被 *Xcm* I 酶所消化 (图 1)。用引物 M13-F 对已构建的 pIDM-T 质粒进行测序, 结果与预期一致。

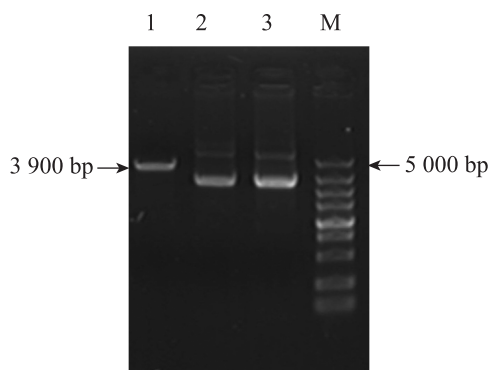


图 1 pIDM-T 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Gel electrophoresis of the recombinant vector pIDM-T identified by enzyme digestion. M: marker (DL5000); 1: pIDM-T digested with *Xcm* I; 2: pIDM1 digested with *Xcm* I; 3: pIDM-T plasmid.

## 2.2 选定基因 pIDM-T 敲除质粒的构建

*eno* 和 *ybdr* 基因扩增片段的预期大小分别为: 429 bp 和 436 bp, 电泳结果显示与预期相符 (图 2)。用通用引物 m13F\_47up 与 m13R\_Mdn 对 pIDM-T 载体克隆的转化子进行菌落 PCR 检测, 理论上阳性克隆片段条带大小为目的基因克隆片段加 300 bp (空载体扩增出的条带大小为 305 bp), 对应地 *eno*、*ybdr* 阳性克隆的扩增长度分别约为 730 bp 和 740 bp, 电泳检测结果与预期一致 (图略)。提取初步鉴定为阳性克隆的质粒, 用 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切再次验证, 电泳结果可见两条带, 小片段与插入片段大小一致 (图 3)。

## 2.3 pIDM-T 质粒复制温敏特性的测定

据文献报道<sup>[14]</sup>, pIDM1 在沙门氏菌细胞中的质粒拷贝数约为 300 个, 尽管细菌在 37 °C 培养时 pIDM1 质粒不复制, 但它可以继续随细胞

分裂而分配, 因此, pIDM1 质粒可最多分配到 200 多个子代细胞中。如果细菌基因组上没有重组的质粒拷贝, 新的细菌细胞中将因质粒丢失而无法在四环素平板上存活。pIDM-T 质粒是在

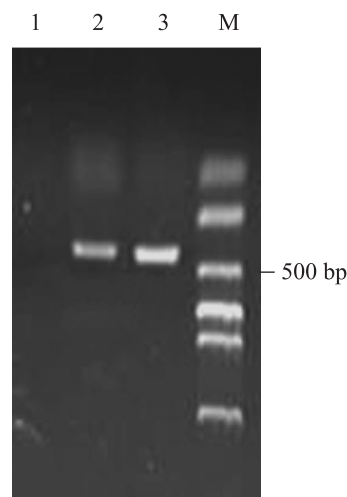


图 2 目的片段扩增

Fig. 2 The amplification of the target genes. M: marker (DL2000); 1: amplification without template; 2: *eno* fragment; 3: *ybdr* fragment.

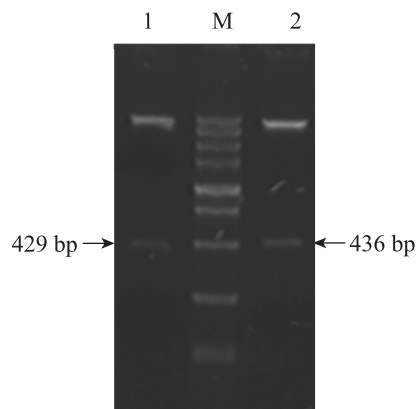


图 3 阳性质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 The double digestion of the target plasmid. M: marker (DL5000); 1: *Eco*R I /*Pst* I double digestion of pIDM-T\_eno; 2: *Eco*R I /*Pst* I double digestion of pIDM-T\_ybdr.

pIDM1 质粒的基础上插入 *Xcm* I 酶切位点构建而成的,理论上它与 pIDM1 质粒的温敏特性是一样的,因此,如果 pIDM-T 或其衍生质粒不与基因组发生有效的重组,*tet* 基因传递给子代细胞的数量是有限的。

为验证上述推论,在实验时我们将 pIDM-T 空质粒转化鸡白痢沙门氏菌 527 菌株,阳性转化菌 30 °C 过夜培养后稀释涂布于四环素抗性平板,37 °C 培养约 36 h 后,观察细菌(重组菌落)的生长情况,发现在 pIDM-T 空质粒转化菌涂布的平板上仅见到较淡的菌苔背景,无单个的重组菌落(图 4A);而平行开展的 pIDM-T<sub>ybdr</sub> 重组质粒转化菌则在较淡的菌苔背景上见到明显的重组菌落(图 4B,黑色箭头标示)。

由此可见,pIDM-T 质粒在 37 °C 培养时会逐步丢失,不会影响 IPC 值的测定。

## 2.4 IPC 值计算及选定基因的必需性鉴定

将 2 个阳性重组质粒分别电转化 527 菌株,将转化菌株接种 LB 液体 30 °C 增菌,菌液稀释涂板后分别置于 30 °C 和 37 °C 培养。30 °C 培养用于

计数菌落总数,而 37 °C 培养用于计数重组子数。根据公式  $IPC = \text{重组子数} / \text{细菌总数} = 37\text{ °C 平板菌落总数} / 30\text{ °C 平板菌落总数}$ ,计算得 *eno* 和 *ybdr* 的 IPC 值分别为  $1.92 \times 10^{-7}$  和  $1.64 \times 10^{-4}$  (表 2)。从测定数值看出, *eno* 基因片段的重组率低于  $1.0 \times 10^{-6}$ ,鉴定为必需基因,而 *ybdr* 基因片段重组率较高,鉴定为非必需基因,与预期结果一致。

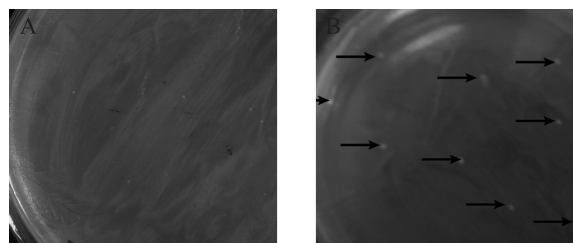


图 4 pIDM-T 及其衍生质粒转化菌的 37 °C 平板培养结果

Fig. 4 Growth of the transformants of pIDM-T and its derivative plasmid in 37 °C. (A) The growth of the 527 strain with pIDM-T plasmid on *tet* plate after incubated in 37 °C for 36 hours. (B) The growth of the 527 strain with pIDM-T<sub>ybdr</sub> plasmid on *tet* plate after incubated in 37 °C for 36 hours. Black arrows point to recombinant colonies grown on the plate.

表 2 菌落计数及 IPC 值测定

Table 2 The colony number and IPC value

Temperature	Dilution	<i>eno</i>		<i>ybdr</i>	
		Colony number	$\bar{x} \pm s$	Colony number	$\bar{x} \pm s$
30 °C	$10^5$	278; 276; 283	$279.00 \pm 1.70$	630; 626; 619	$625.00 \pm 2.16$
	$10^6$	25; 27; 24	$25.33 \pm 0.71$	110; 110; 116	$112.00 \pm 1.63$
37 °C	30	1; 0; 0	$0.33 \pm 0.27$	23; 26; 20	$23.00 \pm 2.44$
	120	0; 0; 0	0	7; 9; 11	$9.00 \pm 1.63$
IPC value		$1.92 \times 10^{-7}$		$1.64 \times 10^{-4}$	

Note: the colony numbers grown on *tet* plates from 50  $\mu$ L bacteria culture are separated by semicolon. *s*: standard deviation.

## 2.5 鸡白痢沙门氏菌突变菌株重组插入位点的鉴定

携带非必需的 *ybdR* 基因片段的 pIDM-T<sub>*ybdR*</sub> 质粒电转化至 527 菌株后,目的基因片段可与细菌基因组 DNA 同源片段发生重组, pIDM-T 质粒骨架插入到对应基因中,使目的基因被敲除,同时使细菌基因组中携带 1 拷贝的 *tet* 抗性基因 (原理图见图 5)。尽管 37 °C 条件下 pIDM-T<sub>*ybdR*</sub> 质粒不能复制,逐渐丢失,由质粒表达的 *tet* 抗性也随之消失,但发生了同源重组的细菌基因组上仍含有 1 拷贝的 *tet* 基因,因此重组菌可以在四环素平板上存活。然而,携带 *eno* 基因片段的 pIDM-T<sub>*eno*</sub> 质粒电转化至 527

菌株后,因 *eno* 基因的必需性,发生特异性同源重组的菌株因 *eno* 基因的敲除而死亡,因此理论上不可能出现 *eno* 基因中插入质粒骨架和 *tet* 基因的菌株。

为验证上述分析的正确性,我们从 37 °C 培养的 pIDM-T<sub>*ybdR*</sub> 质粒转化平板中,随机挑选了 2 个菌落,用 *ybdR*-I-up 上游引物分别与 m13R-Mdn 和 m13F-47up 引物组合进行 PCR 扩增,结果用 *ybdR*-I-up 与 m13R-Mdn 引物组合时扩增出约 750 bp 的片段,*ybdR*-I-up 与 m13F-47up 引物组合扩增无产物 (图 6)。对扩增出的约 750 bp 的片段进行测序,结果显示该片段含有一段 *ybdR* 基因序列和小段载体序列 (144 bp),与预

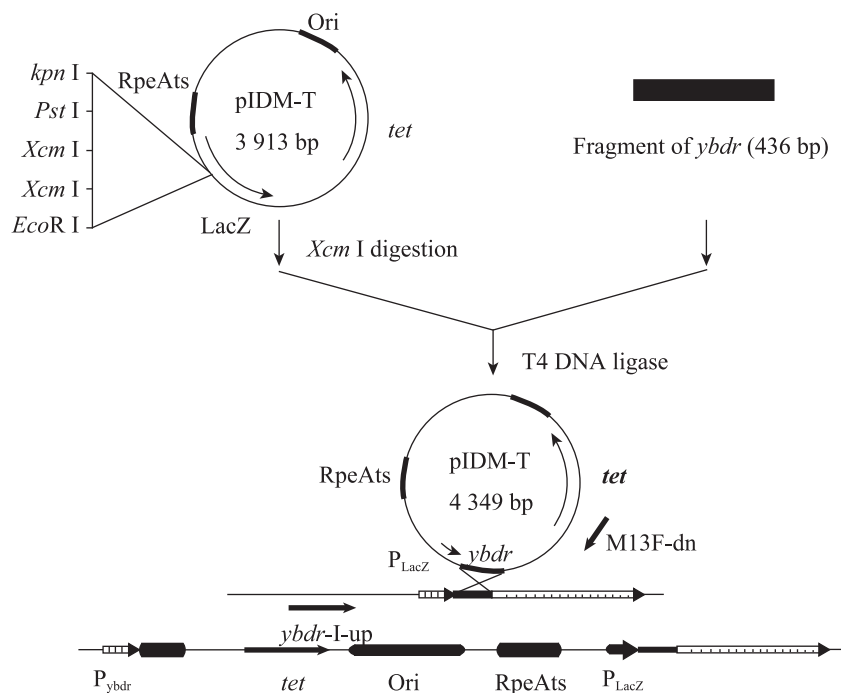


图5 *SalΔybdR* 突变株构建原理图

Fig. 5 Construction of the *SalΔybdR* mutant strain by homologous recombination. A 436 bp fragment of *ybdR* gene was cloned into pIDM-T, and the resulting IDM mutant *SalΔybdR* carries a truncated gene followed by linearized plasmid pIDM-T and rest part of the gene.



期一致,说明构建的 *Sal* $\Delta$ *ybdr* 527 突变株是由于 pIDM-T 载体克隆的 *ybdr* 基因片段经 IDM 方式特异性地同源重组的结果。检索 GenBank 中的基因功能注释, *ybdr* 基因编码一个脱氢酶。可能由于鸡白痢沙门氏菌 527 菌株具有多种该脱氢酶的同工酶的缘故,在 LB 液体和 LB 平板培养 *Sal* $\Delta$ *ybdr* 527 突变株和原始野生株时,未发现二者具有明显的生长特性差异。突变株的其他表型鉴定有待进一步开展。

对 *eno* 基因敲除平板筛选到的 1 个 *tet* 抗性菌落,我们用引物 *eno*-I-up 分别与 m13R-Mdn 和 m13F-47up 引物组合对其进行 PCR 扩增鉴定,结果无任何条带(图 6),对野生菌株菌液的对照 PCR 扩增也无任何产物,因此可初步确定质粒没有特异性地插入 *eno* 基因中。进一步以该菌培养物的稀释液为模板,以 *eno*-up 和 *eno*-dn 为引

物扩增 *eno* 基因片段,电泳检测获得与预期一致的 DNA 条带(约 430 bp,图略),测序结果进一步显示 *eno* 基因为野生型,说明 *eno* 基因没有被插入突变。将该菌抽提质粒,电泳结果未检测到与 pIDM-T 质粒大小相近的小质粒(约 3.9 kb,图略)。由此推测,该克隆可能是质粒随机重组至细菌基因组的结果,具体重组位置有待进一步测定。

### 3 讨论

*Taq* DNA 聚合酶具有末端转移酶活性,在扩增 DNA 的 3'末端非模板依赖地加上一个腺苷酸。为解决 PCR 产物的克隆,需要在线性化载体的 3'末端多加一个的脱氧胸腺嘧啶核苷(T),这就是 TA 克隆,相应的载体通常被称为 T-载体<sup>[15-16]</sup>。商品 T 载体多数是在平末端上加 T 而成,而 *Xcm* I 识别 CCA(N5/N4)TGG 序列,切割后产生单个核苷酸突出的 3'末端,且切割位点附近的碱基可以简并<sup>[16]</sup>。将识别序列的第 8 位设为 T,重组质粒在两个反向 *Xcm* I 序列接头处经 *Xcm* I 切割,便可获得线性化的 T 载体。

Knuth 等<sup>[8]</sup>用 pIDM1 质粒构建了鼠伤寒沙门氏菌的基因文库,通过 IDM 的方法鉴定了鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 的必需基因,我们采用类似的方法构建了鸡白痢沙门氏菌 527 菌株文库,并筛选了 527 菌株的必需基因(结果待发表)。pIDM1 可用于克隆随机片段,构建文库,并有效地应用于必需基因的大规模筛选和鉴定,但在实际应用时该质粒需首先经 *Kpn* I 酶切线性化,然后用热敏磷酸酶(Antarctic phosphatase)脱磷处理,防止自身环化<sup>[17]</sup>,操作繁琐,成功率低;另一方面它不能直接克隆 PCR 产物,因此

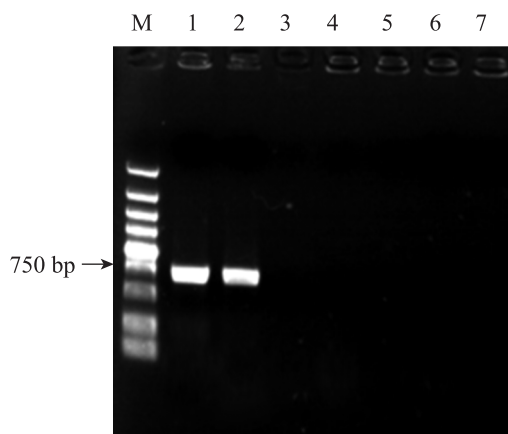


图 6 突变菌株的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR verification of the mutant strains. M: marker (DL5000); 1,2: *Sal* $\Delta$ *ybdr* mutant strain amplified by *ybdr*-I-up and m13R-Mdn; 3: *Sal* $\Delta$ *eno* mutant strain amplified by *eno*-I-up and m13R-Mdn; 4: *Sal* $\Delta$ *eno* mutant amplification by *eno*-I-up and m13F-47up; 5: *Sal* $\Delta$ *ybdr* mutant amplification by *ybdr*-I-up and m13F-47up; 6,7: wild type control.

PCR 产物克隆前同样需要酶切。为方便地克隆 PCR 产物,提高效率,以用于特定基因的敲除,我们在 pIDM1 载体的多克隆位点插入了两个串联 *Xcm* I 接头,对 pIDM1 质粒进行了 T 载体改造,经检测正确。构建的 pIDM-T 质粒经 *Xcm* I 酶切后即可成为 T 载体,能直接快速有效地克隆未经处理的单个目标 PCR 产物。由于 T 载体采用内切酶法制备,保证了质量的稳定,且成本低廉,适合普通实验室使用。

理论上, pIDM-T 与 pIDM1 质粒一样,在 37 °C 培养时不复制,存在于细菌中的原始质粒拷贝将随细菌的分裂而分配给有限的子代细胞,若质粒不与基因组发生有效的重组,经一定代数后, pIDM-T 质粒将从新增殖的细胞中丢失而使细菌无法在四环素平板上存活。为验证上述推论,我们将 pIDM-T 空质粒和 pIDM-T<sub>ybdr</sub> 重组质粒同时转化鸡白痢沙门氏菌 527 菌株,通过观察两种质粒转化菌在 37 °C *tet* 平板上的生长情况,我们发现: pIDM-T 空质粒的转化菌在平板上仅形成淡淡的菌苔背景,未见单个重组菌落;而 pIDM-T<sub>ybdr</sub> 重组质粒转化菌则在较淡的菌苔背景上生长有明显的重组菌落。由此可见, pIDM-T 质粒在 37 °C 培养时会逐渐丢失,转化菌在四环素平板上才出现了有限增殖,因此,它不影响 IPC 值的测定。

为使细菌总数和重组菌计数更加精确和方便,以获得准确的 IPC 值,我们对稀释方法进行了摸索。对 30 °C 培养条件下的细菌总数计数,我们曾尝试  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  等多个 10 倍梯度稀释,结果发现在设定的 96 孔板培养条件下 50  $\mu$ L 菌液中的细菌总数在  $2.5 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^8$

之间,  $10^5$  和  $10^6$  倍两个稀释梯度较为合适;对 37 °C 条件下的重组菌计数,我们曾尝试 10、20、40、80 和 160 倍(经 10 倍稀释后再倍比稀释), 10、30、90 和 270 倍(10 倍稀释后再 3 倍稀释)及 30、120 和 480 倍(30 倍稀释后再 4 倍稀释)等多个稀释梯度,结果发现稀释倍数偏低会因为形成菌苔而掩盖了重组菌落的识别,稀释过高则平板上无菌落生长,而 30 和 120 倍二个梯度较为适合。

与 pIDM1 质粒一样, pIDM-T 可应用于特定基因的敲除及必需性的鉴定。为验证 pIDM-T 的有效性,我们选取 *eno* 和 *ybdr* 两个基因,运用插入复制突变法在鸡白痢沙门氏菌 527 菌株中进行了必需性鉴定和敲除。将 *eno* 和 *ybdr* 扩增片段克隆于线性化的 pIDM-T 载体,转化大肠杆菌 TG1,经鉴定获得带有目的片段的重组质粒。将携带有目的片段的重组质粒电转化至 527 菌株,将转化子增菌后稀释涂板,并分别置于 30 °C 和 37 °C 培养,计数重组子和菌落总数,根据公式计算得出 *eno* 的 IPC 值为  $1.92 \times 10^{-7}$ ,鉴定为必需基因; *ybdr* 的 IPC 值为  $1.64 \times 10^{-4}$ ,鉴定为非必需基因。实验结果与 DEG 必需基因库(Database of essential genes)、大肠杆菌 PEC(Profiling of *E. coli* Chromosome)数据库的已有信息,以及文献报道<sup>[12-13]</sup>和本实验室前期实验结果相符。

为确认 IDM 敲除非必需的 *ybdr* 基因的插入位点的正确性,以及 IDM 无法敲除必需基因 *eno*,我们从 *ybdr* 基因敲除的筛选平板上随机挑取了 2 个克隆,PCR 扩增质粒插入 *ybdr* 基因的交界处片段,并经测序证实 pIDM-T 质粒骨架已插入在 *ybdr* 基因所在的细菌基因组特定位点,由此说

明, *ybdr* 基因已通过 IDM 重组被特异性地敲除。*ybdr* 基因是一个脱氢酶编码基因<sup>[18-19]</sup>, 可能由于鸡白痢沙门氏菌 527 菌株具有多种该脱氢酶的同工酶的缘故, 我们未发现 *Sal*Δ*ybdr* 527 突变株和原始野生株在 LB 液体和 LB 平板生长特性的差异。

我们对 *eno* 基因敲除筛选平板上生长的唯一 1 个抗性菌落同样进行了 PCR 扩增, 结果无任何条带; 进一步对该菌落的 *eno* 基因片段进行扩增, 扩增产物的电泳检测和测序结果均显示 *eno* 基因为野生型, 由此说明 *eno* 基因未被 pIDM-T 质粒骨架插入而破坏。对该抗性菌培养并抽提质粒, 结果也未检测到与 pIDM-T 质粒大小相近的质粒, 因此我们推测该菌落可能是质粒随机重组至细菌基因组的结果。据报道, Knuth 等<sup>[8]</sup>应用 pIDM1 质粒鉴定鼠伤寒沙门氏菌 257 个必需基因时, 超过 1/3 的克隆有非特异性重组现象 (即 IPC 值大于零), 我们在开展鸡白痢沙门氏菌必需基因克隆鉴定时也有类似的现象 (结果待发表), 可见这种随机重组现象是较普遍的, 它可能受基因片段长度等多种因素影响<sup>[20]</sup>, 但因 IPC 值的数量级不同, 它不影响基因必需性的鉴定。

由此可见, 本实验构建的 pIDM-T 质粒是一个有效快速的基因敲除载体, 它可以快速克隆 PCR 产物, 并应用 IDM 方法快速有效地鉴定特定基因的必需性, 构建非必需基因的突变株, 为鸡白痢沙门氏菌基因功能研究提供了一种有效的手段。

## REFERENCES

- [1] Tenno T, Goda N, Tateishi Y, et al. High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17(4): 305-314.
- [2] Li JH, Han CQ, Deng J, et al. Construction and functional analysis of a common gene targeting vector with double-selection markers. *Chin J Biotech*, 2010, 26(12): 1696-1703.  
李军华, 韩翠芹, 邓捷, 等. 双筛选标记打靶载体的构建及其功能鉴定. *生物工程学报*, 2010, 26(12): 1696-1703.
- [3] Jiang N, Wang YC, Ma ZH, et al. A novel temperature sensitive plasmid-based method for deletion of chromosomal genes. *China Biotechnol*, 2010, 30(3): 85-89.  
姜娜, 王艳春, 马志宏, 等. 一种基于温敏质粒的新型基因敲除方法. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(3): 85-89.
- [4] Blaby IK, Phillips G, Blaby-Haas CE, et al. Towards a systems approach in the genetic analysis of *Achaea*: accelerating mutant construction and phenotypic analysis in *Haloferax volcanii*. [EB/OL]. [2012-2-25]. <http://www.hindawi.com/journals/arch/2010/426239/>.
- [5] Baek SH, Rajashekara G, Splitter GA, et al. Denitrification genes regulate *Brucella* virulence in mice. *J Bacteriol*, 2004, 186(18): 6025-6031.
- [6] Qiao F, Chen ZL, Wang YF, et al. Construction of plasmid pUC19K and its application in *Brucella* mutant construction. *China Biotechnol*, 2007, 27(12): 1-5.  
乔凤, 陈泽良, 王玉飞, 等. pUC19K 质粒的构建及其在布鲁氏菌突变株构建中的应用. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(12): 1-5.
- [7] Hu Y, Cong YG, Qiu RR, et al. Construction of a *bcd* gene knock-out mutant of *Salmonella enterica* serovar typhi. *Biotechnology*, 2011, 21(3): 10-13.  
胡勇, 丛延广, 邱荣蓉, 等. 伤寒沙门菌 *bcd* 基因敲除突变株的构建. *生物技术*, 2011, 21(3): 10-13.
- [8] Knuth K, Niesalla H, Hueck C J, et al. Large-scale identification of essential *Salmonella* genes by trapping lethal insertions. *Mol Microbiol*, 2004,

- 51(6): 1729–1744.
- [9] Biswas I, Vanger V, Eerlich SD. Efficiency of homologous intermolecular recombination at different locations on the *Bacillus subtilis* chromosome. *J Bacteriol*, 1992, 174(17): 5593–5596.
- [10] Klumpp J, Fuchs TM. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology*, 2007, 153(4): 1207–1220.
- [11] Park HK, Zeng CY. Construction of an *Xcm* I-generated T vector bearing green fluorescent protein marker for direct cloning of PCR products. *Anal Biochem*, 2007, 360(1): 144–145.
- [12] Cohen R, Yokoi T, Holland JP, et al. Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene ENO1 is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(8): 2753–2761.
- [13] Burnett ME, Liu J, Conway T. Molecular characterization of the *Zymomonas mobilis* enolase (eno) gene. *J Bacteriol*, 1992, 174(20): 6548–6553.
- [14] Fuchs TM, Klumpp J, Przybilla K. Insertion-duplication mutagenesis of *Salmonella enterica* and related species using a novel thermosensitive vector. *Plasmid*, 2006, 55(1): 39–49.
- [15] Zhou MY, Clark SE, Gomez-Sanchez CE. Universal cloning method by TA strategy. *Biotechniques*, 1995, 19(1): 34–35.
- [16] Jo C, Jo SA. A simple method to construct T-vectors using *Xcm* I cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid*, 2001, 45(1): 37–40.
- [17] Sun CL, Li YW, Wang Y, et al. Construction of a pUC19-T Vector based on *Xcm* I. *J Anhui Agric Sci*, 2011, 39(17): 10182–10184.  
孙程龙, 李业伟, 王颖, 等. 基于 *Xcm* I 酶切的 pUC19-T 载体的构建. *安徽农业科学*, 2011, 39(17): 10182–10184.
- [18] Riley M, Abe T, Arnaud MB, et al. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(1): 1–9.
- [19] Erickson KD, Detweiler CS. The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Mol Microbiol*, 2006, 62(3): 883–894.
- [20] Zhou JG, Hong X, Huang CF. Recombineering and its application. *Acta Gen Sin*, 2003, 30(10): 983–988.  
周建光, 洪鑫, 黄翠芬. 重组工程及其应用. *遗传学报*, 2003, 30(10): 983–988.