

· 生物技术与方法 ·

大肠杆菌 *hfq* 和 *rne-710* 基因的双质粒无痕敲除技术

王净^{1,2}, 吕瑞辰², 韩延平², 杨瑞馥²

1 河北北方学院 动物科技学院, 河北 张家口 075131

2 军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

王净, 吕瑞辰, 韩延平, 等. 大肠杆菌 *hfq* 和 *rne-710* 基因的双质粒无痕敲除技术. 生物工程学报, 2018, 34(4): 602–612.

Wang J, Lv RC, Han YP, et al. Two-plasmid scarless genetic modification in *Escherichia coli hfq* and *rne-710*. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 602–612.

摘 要: 基因敲除技术是了解基因功能的重要手段。以大肠杆菌 K-12 MG1655 基因组 *hfq* (309 bp) 和 *rne-710* (1056 bp) 基因为模型, 首先构建 $\Delta hfq::Spe$ 和 $\Delta rne-710::Spe$ 菌株, 通过融合 PCR 方法分别构建缺失 *hfq* (309 bp) 和 *rne-710* (1056 bp) 的融合片段并连接至辅助质粒, 缺失 *hfq* 和 *rne-710* 的片段经重组分别替换壮观霉素抗性盒, 得到无痕敲除株 Δhfq 和 $\Delta rne-710$ 。双质粒无痕敲除和融合 PCR 方法相结合为大片段基因缺失开辟了新的途径。

关键词: 大肠杆菌, *hfq*, *rne-710*, 双质粒无痕敲除, 融合 PCR, I-*Sce* I 内切酶

Two-plasmid scarless genetic modification in *Escherichia coli hfq* and *rne-710*

Jing Wang^{1,2}, Ruichen Lv², Yanping Han², and Ruifu Yang²

1 College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, Hebei, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Gene modification is an important technique to understand gene function. We firstly constructed $\Delta hfq::Spe$ and $\Delta rne-710::Spe$ mutant strains of *Escherichia coli* MG1655. The fragment lacking of *hfq* and *rne-710* was ligated to the auxiliary plasmid and separately replace the spectinomycin box by homologous recombinase system to obtain the Δhfq and $\Delta rne-710$ mutant strains. The combination of two-plasmid scarless genetic modification and fusion PCR led to a new way for the long DNA fragment gene deletions.

Keywords: *Escherichia coli*, *hfq*, *rne-710*, two-plasmid scarless genetic modification, fusion PCR, endonuclease I-*Sce* I

Received: October 8, 2017; **Accepted:** December 26, 2017

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2014CB744405), Science and Technology Program of Hebei Province, China (No. 16236605D-1(2017)).

Corresponding author: Yanping Han. Tel: +86-10-66948562; E-mail: hypiota@hotmail.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2014CB744405), 河北省科技计划项目 (No. 16236605D-1(2017))资助。

基因敲除技术是 20 世纪 80 年代末发展起来的新型分子生物学技术,常用的 Red 系统重组方法是通过外源 DNA 与染色体 DNA 之间的同源重组^[1-4],即用设计的同源片段替代靶基因片段,使机体特定的基因缺失,从而达到基因敲除的目的^[5-6],这种方法具有专一性强、染色体 DNA 与目的片段共同稳定遗传等特点^[7-8]。通过抗性筛选完成的基因敲除,基因组留存一定的抗性基因片段,影响了后续研究工作。抗性基因两侧含有 2 个同向的 FRT 位点,研究者通常利用 FLP/FRT 位点特异性重组系统删除抗性基因,该系统的 FLP 重组酶 (Flippase recombination enzyme) 可以介导 FRT 位点 (FLP recombination target) 之间的基因发生删除重组。即使这样,在重组分子上仍残留 2 个 48 bp 的 FRT 序列,达不到无痕敲除的目的^[9]。

目前,无痕敲除技术主要有单质粒敲除法^[10]、两步同源重组正负筛选法^[11]、Tn5 靶向的 Cre/loxP 切除系统法^[12]等,这些方法操作复杂、转化效率低、实验周期长。双质粒无痕敲除法将 λ -Red 系统与 I-Sce I 核酸内切酶相结合^[13-14],通过两步 Red 基因重组即可实现^[15],首先进行第一次同源重组,将两端带有 I-Sce I 核酸内切酶的抗性基因片段替换目的基因^[16],然后在辅助质粒的参与下,通过诱导激活 I-Sce I 内切酶,暴露替换基因,具有同源的基因片段发生第二次重组,从而删除抗性基因^[17],辅助质粒被 I-Sce I 内切酶切成片段而失活,最后经抗性筛选得到重组菌株^[18-19]。第一步重组技术非常成熟,已经广泛应用于各领域^[20-24],第二步操作简单易行,转化效率高达 90%。双质粒无痕敲除法是无痕敲除方法中的最优选择,以其快速的优点将无痕敲除技术推到了更高的层次。

双质粒无痕敲除法多用于基因定点插入、点突变的研究,对于长片段的基因敲除未见报道。本研究采用双质粒无痕敲除法,以大肠杆菌 K-12

MG1655 基因组 *hfq* (309 bp) 和 *rne-710* (1 056 bp) 基因为模型,通过融合 PCR 方法分别构建缺失 *hfq* (309 bp) 和 *rne-710* (1 056 bp) 的融合片段并连接至辅助质粒,通过同源重组完成高效无痕敲除技术,为大片段的无痕敲除技术提供理论依据和方法借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

pREDTKI、pKSI-1、pMDISI 三种质粒 (图 1) 由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室杨晟研究员赠送,大肠杆菌 *Escherichia coli* K-12 MG1655 为军事医学科学院生物工程研究所王恒樑老师赠送。

1.2 引物设计

结合双质粒无痕敲除法 (图 2) 和融合 PCR 方法,根据构建无痕敲除基因的原理,设计 *hfq* 和 *rne-710* 基因扩增引物和鉴定引物 (表 1)。

1.3 质粒提取

按照 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) 操作步骤提取 pREDTKI、pKSI-1 和 pMDISI 质粒。

1.4 pREDTKI 质粒电转至 *E. coli* K-12 MG1655 感受态细胞

取过夜活化的 *E. coli* K-12 MG1655 菌液转接 LB 培养基中,培养至 OD_{600} 为 1.0 左右离心收集菌体;预冷的 10% 甘油洗涤菌体并以 100 μ L 重悬,加入 1 μ L pREDTKI 进行质粒电击,菌液 30 $^{\circ}$ C 摇床复苏 1 h,取 50 μ L 涂布含有卡那霉素的 LB 固体平板培养,12-16 h 后挑取单个菌落扩大培养并保种,用 TKI-Kan-F/TKI-Kan-R 引物鉴定 pREDTKI 质粒。

1.5 λ -Red 重组

1.5.1 PCR 扩增壮观霉素抗性盒

NanoDrop 2000 测定提取的 pMDISI 质粒浓

度,再用去离子水稀释成 5 ng/ μ L 作为模板。50 μ L PCR 体系: 10 \times Ex Taq 缓冲液 5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, Forward primer (10 μ mol/L) 1 μ L, Reverse primer (10 μ mol/L) 1 μ L, Ex Taq 聚合酶 0.4 μ L, Pfu 聚合酶 0.1 μ L, pMDISI 质粒 (5 ng/ μ L) 8 μ L, 灭菌双蒸水 30.5 μ L, 共扩增 10 个体系。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化回收 PCR 产物。

1.5.2 Dpn I 酶消化甲基化的模板质粒

100 μ L 酶切体系: PCR 产物 30 μ L, Dpn I Enzyme 5 μ L, 10 \times NE 缓冲液 10 μ L, 灭菌双蒸

水 55 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h。酶切产物使用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) 胶回收壮观霉素抗性盒。

1.5.3 感受态细胞的制备及电转化

取活化菌 K12 MG1655/pREDTKI 扩大培养至 OD_{600} 为 0.8 左右, 培养时加入 L-阿拉伯糖至终浓度 10 mmol/L、卡那霉素至终浓度 50 μ g/mL, 离心收集菌体并用冰冷的 10% 甘油洗涤, 100 μ L 10% 甘油重悬后加入 10 μ L 高浓度的壮观霉素抗性盒, 预冷 20 min 后进行电击, 加入液体培养基复苏, 取离心后重悬菌体 200 μ L 涂含卡那霉素、壮观霉素的 LB 固体平板, 挑取单个菌落扩大培养并保种, 将壮观抗性盒敲入的菌株记为

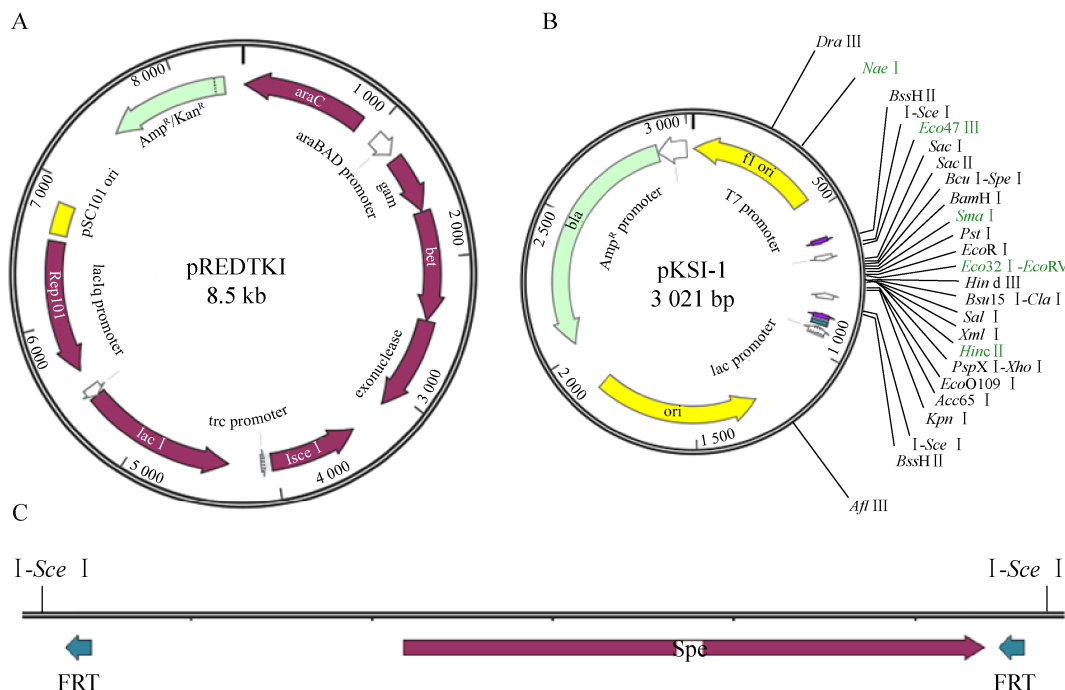


图 1 质粒图谱^[18] (A: pREDTKI 质粒具有 *araB* promoter, 当加入 L-阿拉伯糖时可诱导 λ -Red 重组功能, pREDTKI 质粒同时具有 *trc* promoter, 当加入 IPTG 时可诱导 I-Sce I 酶表达; B: pKSI-1 载体具有一个多克隆位点, 含有两个 I-Sce I 识别位点; C: pMDISI 质粒具有壮观抗性基因, 两侧有 FRT 和 I-Sce I 识别位点)
Fig. 1 Plasmids profiles^[18]. (A) pREDTKI with arabinose-inducible (*araB* promoter) λ -Red recombinase functions and IPTG-inducible (*trc* promoter) I-Sce I expression. (B) pKSI-1 vector with an MCS and two I-Sce I recognition sites. (C) Part of plasmid pMDISI with the spectinomycin resistance gene flanked by FRT sites and I-Sce I recognition sites.

$\Delta hfq::Spe$ (壮观霉素 Spectinomycin) 和 $\Delta rne::Spe$; 分别用 Hfq-I-F/Hfq-Spe-I-R、Hfq-Spe-I-F/Hfq-I-R、Hfq-F/Hfq-R、Hfq-I-F/Hfq-I-R 引物和 Rne-I-F/Rne-Spe-I-R、Rne-Spe-I-F/Rne-I-R、Rne-F/Rne-R、Rne-I-F/Rne-I-R 引物鉴定重组菌。

1.6 融合 PCR

在 *hfq* 上下游和 *rne-710* 上下游 600 bp 左右设计引物对, 待融合片段上下游引入 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切位点。分别以 Hfq-F-1/Hfq-R-1、Hfq-F-2/Hfq-R-2、Rne-F-1/Rne-R-1、Rne-F-2/Rne-R-2 共 4 对引物, k-12 MG1655 菌株基因组为模板进行 PCR 扩增, 再以上述 PCR 产物为模板, 分别用引物对 Hfq-F-1/Hfq-R-2 和 Rne-F-1/Rne-R-2

进行扩增, 得到缺失 *hfq* 和 *rne-710* 基因的上下游融合片段。PCR 体系和扩增条件同 1.5.1, 将 *Ex Taq* 替换为高保真 LA *Taq* 聚合酶, 胶回收目的片段。按照常规操作分别酶切融合片段和 pKSI-1 质粒, PCR 回收试剂盒纯化酶切产物, 再将回收的片段与载体分别连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 引物对 Hfq-F-1/Hfq-R-2 和 Rne-F-1/Rne-R-2 进行 PCR 鉴定, 将鉴定正确的细菌培养 12 h 后提取质粒。pKSI-1- Δhfq 和 pKSI-1- $\Delta rne-710$ 质粒分别电转至 $\Delta hfq::Spe$ 和 $\Delta rne-710::Spe$, 方法同上, 引物对 Hfq-F-1/Hfq-R-2 和 Rne-F-1/Rne-R-2 进行菌落 PCR 鉴定。

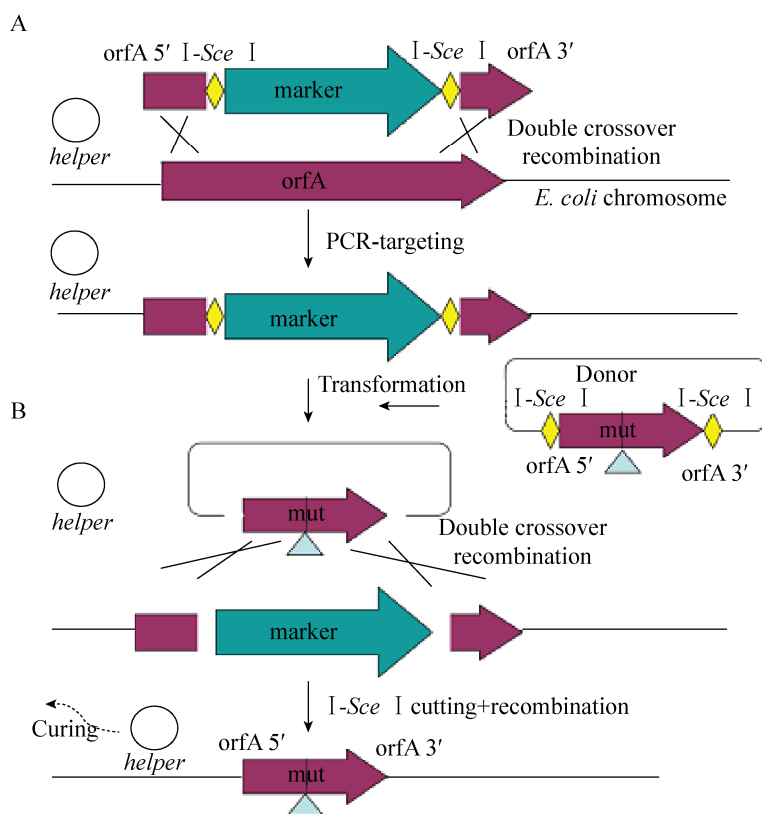


图 2 双质粒无痕敲除法原理图^[18]

Fig. 2 Diagram of the two-plasmid scarless genetic modification method^[18].

表 1 本研究中使用的寡核苷酸引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
mdHfq-F	<u>GCAATTTTTTCAGAATCGAAAGGTTCAAAGTACAAATAAGCATATAAGGAAAAGAGA</u> <u>G</u> ACCCTTCCCGGCGATCCTCTGG
mdHfq-R	<u>AATAGATCAGCGGGGAACGCAGGATCGCTGGCTCCCCGTGTAAAAAACAGCCCGA</u> <u>A</u> ACCCCGCATGACGGCAAGTGGACG
Hfq-I-F	CGGACTTGCCTTCCATTC
Hfq-Spe-I-R	GCAGGATAGGTGAAGTAGG
Hfq-Spe-I-F	CTCCAGCCTACACATTACC
Hfq-I-R	CGGAAGAGACCAGAGATTC
Hfq-F	TTACAAGATCCGTTCTCTGAAC
Hfq-R	GATGGTAGTTACTGCTGGTAC
Hfq-F-1 (<i>Sac</i> I)	TCCGAGCTCAGGTAGATCCGGTTGCGGCAGCAAGGATTCATC
Hfq-R-1	CCCGAAACCTCTCTCTTTTCCTTATATGCTTATTTGTACTTTG
Hfq-F-2	AAAGAGAGAGGTTTCGGGCTGTTTTTTTACACGGGGAGCCAG
Hfq-R-2 (<i>Hind</i> III)	ACTAAGCTTCCAGGCGCGACTGTATCTGCACGATGCGATTACG
Hfq-QC-F	GCCGAACGCTGAAGAGTTAC
Hfq-QC-R	CCGACATCTGCAACGTCAATAC
mdRne-F	<u>CAACAAGAAGCGAAGGCGCTGAATGTTGAAGAGCAATCTGTTTCAGGAAACCGAACA</u> <u>GGA</u> ACCCTTCCCGGCGATCCTCTGG
mdRne-R	<u>TCAAAGATGAAATAAAAAAGCCCTGGCAGTTACCAGGGCTTGATTACTTTGAGCTAA</u> <u>TT</u> ACCCGCATGACGGCAAGTGGACG
Rne-I-F	AGTGAACGTAAGGCGAGCGATAATCGCG
Rne-Spe-I-R	TAGACTTTCCTTGGTGTATCCAACGGCGTCAG
Rne-Spe-I-F	ATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCC
Rne-I-R	ATGCAACTATTTTCATCTTACATCATGCAGC
Rne-F	GCCAGTTGTTGAAGAAGTG
Rne-R	ATGATGTGTTGCCGTATGAC
Rne-F-1 (<i>Sac</i> I)	TCTGAGCTCCGTCTGAAGAAGAGTTCGCTGAACGTAAGC
Rne-R-1	ACTTTGAGCTAATTATTCCTGTTTCGGTTTCCTGAACAGATTGCTC
Rne-F-2	TAATTAGCTCAAAGTAATCAAGCCCTGGTAACTGC
Rne-R-2 (<i>Hind</i> III)	GCGAAGCTTCTGAAACCAATCTTTTTGCCATGCTGGATAGTGCC
Rne-QC-F	CTGTGCCAATCGCTTCTTACC
Rne-QC-R	CGGAACCAGACGGTAGCG
TKI-Kan-F	TGGGTATAAATGGGCTCG
TKI-Kan-R	ATCCTGGTATCGGTCTGC

Homologous arms sequences are underlined. Enzyme restriction sites are in italic font.

1.7 诱导重组

过夜培养 K-12 MG1655/pKSI-1- Δhfq /pREDTKI 和 K-12 MG1655/pKSI-1- Δrne /pREDTKI 两种菌液, 添加卡那霉素、氨苄青霉素和壮观霉素至常规浓度, 5%葡萄糖至终浓度 0.5%。接种 50 μ L 上述菌液至 5 mL LB 液体培养基, 加入卡那霉素、L-阿拉伯糖和 5%葡萄糖, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 6 h 至 OD_{600} 达到 0.5 左右, 加入终浓度为 20 mmol/L 的 IPTG 培养过夜; 取过夜菌转接至新鲜培养基, 同时加入卡那霉素、L-阿拉伯糖、5%葡萄糖和 IPTG, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 6 h 至菌液 OD_{600} 为 0.5 左右。

取 50 μ L 菌液用 PBS 进行 10 倍梯度稀释, 取 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 稀释液各 100 μ L 分别涂平板 A (Kan^r 、10 mmol/L 阿拉伯糖、20 mmol/L IPTG) 和平板 B (Kan^r 、10 mmol/L 阿拉伯糖、20 mmol/L IPTG、 Spe^r), 培养后挑取平板 A 单个菌落分别涂平板 A 和平板 B, 选择平板 A 生长而平板 B 不生长的菌落, 引物对 Hfq-QC-F/Hfq-QC-R、Hfq-I-F/Hfq-I-R、Hfq-F/Hfq-R 和 Rne-QC-F/Rne-QC-R、Rne-I-F/Rne-I-R、Rne-F/Rne-R 分别进行 PCR 鉴定。

1.8 pREDTKI 质粒的消除

将鉴定正确的菌液转接入 LB 液体培养基, 42 $^{\circ}$ C、80 r/min 培养 2 h; 取少量菌液 10 倍梯度稀释后分别涂 LB 板 (Kan^r) 和无抗性 LB 板, 37 $^{\circ}$ C 温箱过夜培养; 选择阴性板生长而抗性板不生长的单克隆, 分纯三代并进行 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 构建 $\Delta hfq::Spe$ 敲除株

pREDTKI 质粒电转至 *E. coli* K-12 MG1655 感受态细胞, 然后使用设计的引物扩增壮观霉素抗性盒, PCR 产物纯化回收后经 *Dpn* I 酶消化质粒模板, 再通过胶回收得到壮观霉素抗性盒, 使用 L-阿拉伯糖诱导 Red 重组酶, 制备 *E. coli* K-12 MG1655/pREDTKI 感受态细胞, 将纯化的壮观霉

素抗性盒电转化至具有 Red 重组系统的感受态细胞中, 染色体上的 *hfq* 基因经同源重组被壮观霉素抗性盒替代, 从而实现 λ -Red 重组。通过 *hfq* 内引物、外引物以及外引物同壮观霉素抗性盒鉴定引物交叉配对共 4 对引物鉴定敲除株的正确性。结果可见, 内部引物野生株有 235 bp 大小的条带, 敲除株没有条带; 外部引物敲除株有 2 002 bp 大小的条带; 第一对交叉引物敲除株有 242 bp 大小的条带; 第二对交叉引物敲除株有 537 bp 大小的条带, 以上结果均与预期一致 (图 3)。内部引物鉴定说明敲除株基因组已经不含有 *hfq* 基因, 外部引物显示分子量较大的条带表明基因组已经含有壮观霉素抗性盒, 交叉引物的鉴定说明敲除株同源替换部位准确。以上结果表明 $\Delta hfq::Spe$ 敲除株构建成功。

2.2 构建 $\Delta rne-710::Spe$ 敲除株

经过 λ -Red 重组, 壮观霉素抗性盒取代 *rne-710* 基因。生长的单克隆中大部分为杂菌, 只有少量是敲除株, 需要使用引物进行 PCR 鉴定, 使用外引物同壮观霉素抗性盒引物交叉配对、内引物、外引物全面鉴定敲除株。第一对交叉引物

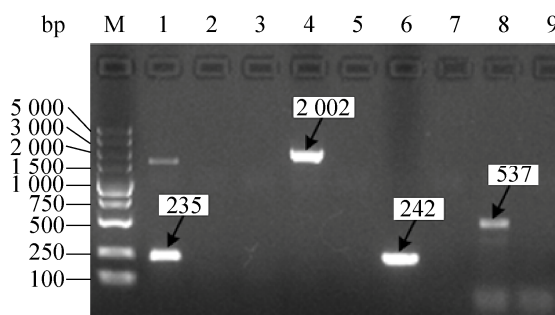


图 3 $\Delta hfq::Spe$ 敲除株的鉴定

Fig. 3 Identification of $\Delta hfq::Spe$. M: DL 5000 DNA marker. 1-3: Hfq-F/Hfq-R. 1: WT; 2: Δhfq ; 3: negative control. 4,5: Hfq-I-F/Hfq-I-R. 4: Δhfq ; 5: negative control. 6,7: Hfq-Spe-I-F/Hfq-I-R. 6: Δhfq ; 7: negative control. 8,9: Hfq-I-F/Hfq-Spe-I-R. 8: Δhfq ; 9: negative control.

敲除株有 510 bp 大小的条带, 第二对交叉引物敲除株有 620 bp 大小的条带, 交叉引物的鉴定说明壮观霉素抗性盒有小部分存在基因组中, 敲除株同源替换部位准确; 外部引物敲除株有 2 054 bp 大小的条带, 比 *rne-710* 分子量大, 包含了壮观霉素抗性盒的全部碱基; 内部引物敲除株没有条带, 野生株有 490 bp 大小的条带, 表明敲除株基因组不含 *rne-710* 基因。所有条带的大小与预期结果一致 (图 4), 表明 $\Delta rne-710::Spe$ 敲除株构建成功。

2.3 辅助质粒 pKSI-1- Δhfq 的构建

通过融合 PCR 的方法缺失目的基因片段, 设计引物时保证上游的下游引物和下游的上游引物有 15–20 个重复碱基。首先 PCR 扩增分体片段 594 bp 和 619 bp, 再用上游的上游引物和下游的下游引物扩增融合片段, 胶回收后同载体分别双酶切并进行连接转化构建 pKSI-1- Δhfq , PCR 鉴定可见与预期一致的 1 195 bp 大小的条带 (图 5)。

2.4 辅助质粒 pKSI-1- $\Delta rne-710$ 的构建

首先采用融合 PCR 的方法扩增缺失 *rne-710* 片段, 再与 pKSI-1 连接。在缺失 *rne-710* 片段的

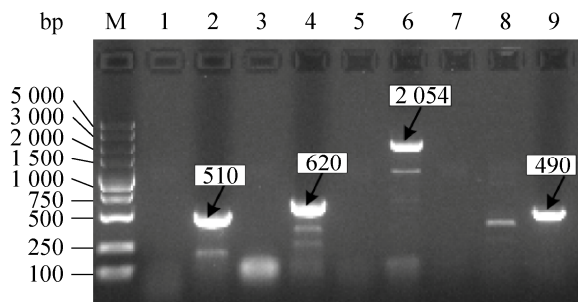


图 4 $\Delta rne::Spe$ 敲除株的鉴定

Fig. 4 Identification of $\Delta rne-710::Spe$. M: DL 5 000 DNA marker. 1,2: Rne-I-F/Rne-spe-I-R. 1: negative control; 2: $\Delta rne-710$. 3,4: Rne-spe-I-F/Rne-I-R. 3: negative control; 4: $\Delta rne-710$. 5,6: Rne-I-F/Rne-I-R. 5: negative control; 6: $\Delta rne-710$. 7–9: Rne-F/Rne-R. 7: negative control; 8: $\Delta rne-710$; 9: WT.

上下游设计引物扩增 593 bp 和 563 bp 大小的片段, 再进行第二轮扩增融合片段, 胶回收纯化 PCR 产物, 同载体分别双酶切, 连接并转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 条带的大小为 1 156 bp (图 6), 表明 pKSI-1- $\Delta rne-710$ 构建成功。

2.5 无痕敲除 Δhfq 的构建

$\Delta hfq::Spe$ 菌株含有 pKSI-1- Δhfq 和 pREDTKI 质粒。加入 IPTG 进行诱导, 使 pREDTKI 分泌

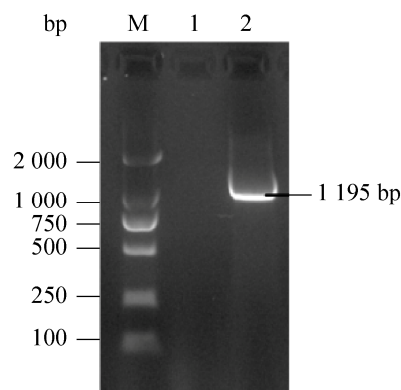


图 5 pKSI-1- Δhfq 的鉴定

Fig. 5 Identification of pKSI-1- Δhfq . M: DL 2000 DNA marker; 1: negative control; 2: pKSI-1- Δhfq .

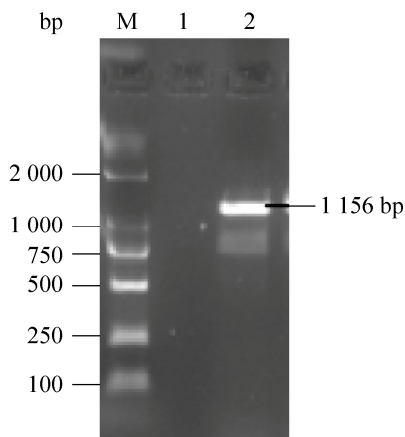


图 6 pKSI-1- $\Delta rne-710$ 的鉴定

Fig. 6 Identification of pKSI-1- $\Delta rne-710$. M: DL 2000 DNA marker; 1: negative control; 2: pKSI-1- $\Delta rne-710$.

I-Sce I 酶,将含有 I-Sce I 酶切位点的壮观霉素和 pKSI-1 载体酶切, L-阿拉伯糖诱导条件下, pREDTKI 质粒发挥 λ -Red 重组功能,使得酶切后的线性融合片段替代壮观霉素抗性盒,再通过卡那霉素抗性筛选,得到含有 pREDTKI 质粒的无痕敲除菌株 Δhfq 。通过鉴定引物进行验证敲除株,外部引物敲除株有 499 bp 大小的条带,野生株有 808 bp 大小的条带,敲除株条带小于野生株,证明基因有缺失;内部引物敲除株没有条带,野生株有 235 bp 大小的条带,说明该片段在敲除株中已经不存在;在融合基因外部设计全长引物进行鉴定,敲除株有 1 678 bp 大小的条带,野生株有 1 987 bp 大小的条带,敲除株与野生株大小不同。以上结果与预期的大小一致 (图 7),表明无痕敲除 Δhfq 构建成功。

2.6 无痕敲除 $\Delta rne-710$ 的构建

$\Delta rne-710::Spe$ 菌株在保证足够糖供给的情况下,经 L-阿拉伯糖和 IPTG 诱导发生重组。pREDTKI 分泌 I-Sce I 内切酶,将连接到载体的融合片段酶切成线性游离状态;pREDTKI 分泌 Red 重组酶,促进融合片段与壮观霉素抗性盒发生同源重组,从而得到敲除株 $\Delta rne-710$ 。为了准确验证敲除株是否正确,需要 3 对引物进行 PCR

扩增鉴定。全长引物敲除株有 1 384 bp 大小的条带,野生株有 2 440 bp 大小的条带,敲除株比野生株片段小;外部引物敲除株有 551 bp 大小的条带,野生株有 1 607 bp 大小的条带,敲除株条带明显小于野生株,证明基因缺失了大片段;内部引物敲除株没有条带,野生株有 490 bp 大小的条带,对比野生株说明敲除株 *rne-710* 基因缺失。图示结果与预期条带大小一致 (图 8),表明无痕敲除 $\Delta rne-710$ 构建成功。

2.7 Δhfq 敲除株 pREDTKI 质粒消除鉴定

无痕敲除的 Δhfq 菌株含有 pREDTKI 质粒, pREDTKI 是温敏型质粒,通过高温培养即可将其消除。此质粒存在的适合温度是 30 $^{\circ}\text{C}$,本实验将温度提高到 42 $^{\circ}\text{C}$,低速培养 2 h,菌液微浑浊即进行稀释涂板,选择在阴性板生长而在卡那霉素抗性板不生长的菌株,再用无痕敲除鉴定引物以及卡那盒鉴定引物进行 PCR 鉴定。结果可见, Δhfq 内引物、外引物和全长引物均扩增出目的条带, pREDTKI 质粒鉴定引物扩增的敲除株没有条带,野生株有 613 bp 大小的条带,与预期结果一致 (图 9),表明敲除株 pREDTKI 质粒消除成功。

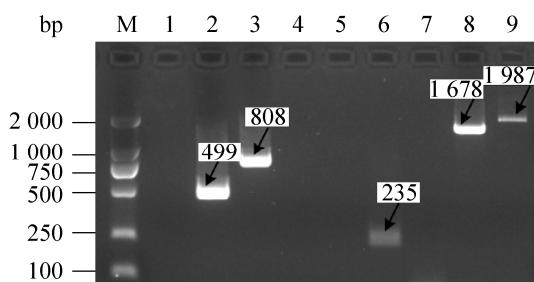


图 7 Δhfq 敲除株的鉴定

Fig. 7 Identification of Δhfq . M: DL 2000 DNA marker. 1-3: Hfq-I-F/Hfq-I-R. 1: negative control; 2: Δhfq ; 3: WT. 4-6: Hfq-F/Hfq-R. 4: negative control; 5: Δhfq ; 6: WT. 7-9: Hfq-QC-F/Hfq-QC-R. 7: negative control; 8: Δhfq ; 9: WT.

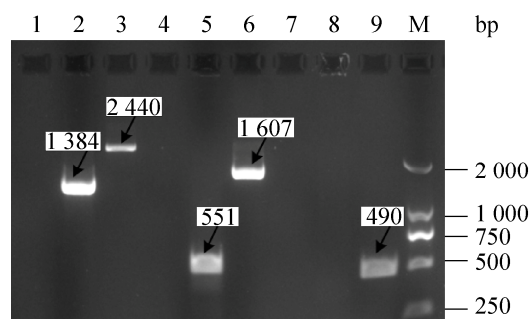


图 8 $\Delta rne-710$ 敲除株的鉴定

Fig. 8 Identification of $\Delta rne-710$. M: DL 2000 DNA marker. 1-3: Rne-QC-F/Rne-QC-R. 1: negative control; 2: $\Delta rne-710$; 3: WT. 4-6: Rne-I-F/Rne-I-R. 4: negative control; 5: $\Delta rne-710$; 6: WT. 7-9: Rne-F/Rne-R. 7: negative control; 8: $\Delta rne-710$; 9: WT.

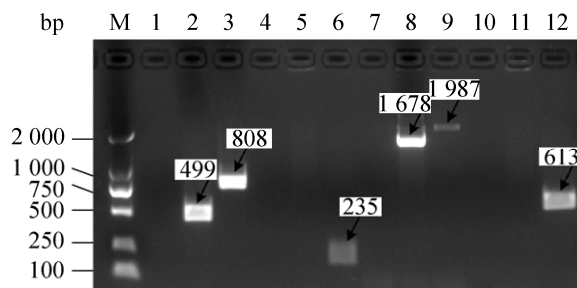


图9 Δhfq 敲除株 pREDTKI 质粒消除鉴定

Fig. 9 Identification of Δhfq pREDTKI-cured. M: DL 2000 DNA marker. 1–3: Hfq-I-F/Hfq-I-R. 1: negative control; 2: Δhfq ; 3: WT. 4–6: Hfq-F/Hfq-R. 4: negative control; 5: Δhfq ; 6: WT. 7–9: Hfq-QC-F/Hfq-QC-R. 7: negative control; 8: Δhfq ; 9: WT. 10–12: TKI-Kan-F/TKI-Kan-R. 10: negative control; 11: Δhfq ; 12: WT (pREDTKI).

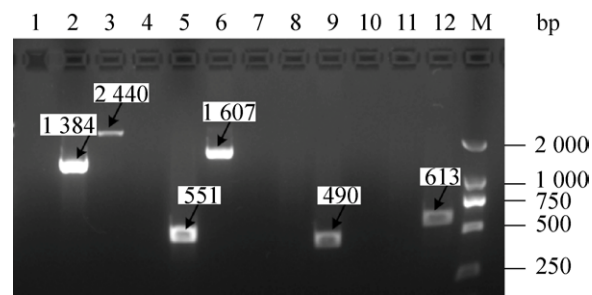


图10 $\Delta rne-710$ 敲除株 pREDTKI 质粒消除鉴定

Fig. 10 Identification of $\Delta rne-710$ pREDTKI-cured. M: DL 2000 DNA marker. 1–3: Rne-QC-F/Rne-QC-R. 1: negative control; 2: $\Delta rne-710$; 3: WT. 4–6: Rne-I-F/Rne-I-R. 4: negative control; 5: $\Delta rne-710$; 6: WT. 7–9: Rne-F/Rne-R. 7: negative control; 8: $\Delta rne-710$; 9: WT. 10–12: TKI-Kan-F/TKI-Kan-R. 10: negative control; 11: $\Delta rne-710$; 12: WT (pREDTKI).

2.8 $\Delta rne-710$ 敲除株 pREDTKI 质粒消除鉴定

无痕敲除的 $\Delta rne-710$ 菌株含有 pREDTKI 质粒, 该质粒的存在可能影响对菌株的后续操作。由于 pREDTKI 是温敏型质粒, 提高培养温度至 42 °C 即可将其消除, 培养后的菌液稀释涂板, 通过无抗性筛选即可得到消除菌株。经 PCR 扩增鉴定, $\Delta rne-710$ 内引物、外引物和全长引物均扩增出目的条带, 使用 pREDTKI 质粒含有的卡那盒鉴定引物扩增的敲除株没有条带, 野生株有 613 bp 大小的条带, 与预期结果一致 (图 10), 表明敲除株 pREDTKI 质粒消除成功。

3 讨论

大肠杆菌 RNase E 由 Rne 基因编码, 全长 1 061 aa, 分为 N 端催化区 (1–529 aa) 和支架区 (430–1 061 aa)。Hfq 与 Rne 结合位点在 711–750 aa。751–1 061 aa 对介导 sRNA 与靶 mRNA 降解是必需的。因此, 本研究在不改变 RNase E 活性的情况下, 保留 N 端催化区, 在支架区从 710 aa 开始敲除 rne 基因构建 $\Delta rne-710$ 。

常见的基因敲除方法一般选择 30–50 bp 同源

臂, 对于一些特殊的基因, 这种短同源臂利用一步法很难敲除, 必须采用二步法才可实现, 同源臂加长到 500 bp 左右, 采取融合 PCR 方法构建含有同源臂与抗性基因的片段, 再同源重组并筛选菌株达到敲除的目的。

本研究无痕敲除过程中, 第一步的 Red 重组将同源臂设计为 60 bp, 按照常规一步法操作难以实现壮观霉素抗性盒替换目的基因, 后来改进了试验方案。由于电转时高强度的电击会损伤菌的活性, 因此, 在制备感受态细胞时菌液量由 5 mL 增加到 20 mL, 菌液的 OD_{600} 由 0.8 增加到 1.0 以上, 足够多的菌量接受电击, 目的是保证转化的活菌量。加入 L-阿拉伯糖的时间由培养终止前 1–2 h 提前到接菌时同时加入 L-阿拉伯糖, 增加诱导时间。转化时电击后复苏时间一般为 1 h, 本研究适当延长时间为 1–2 h, 更容易获得重组菌。

辅助质粒的参与使得无痕敲除变得简单易行, pKSI-1 载体多克隆位点上下游分别含有 I-Sce I 酶切位点, 两个 I-Sce I 位点范围内可以插入靶基因。本研究通过融合 PCR 构建目的基因敲除片段作为靶基因, 第一步分体 PCR 扩增后不需要纯化

回收, 直接用产物 40 倍稀释作模板进行第二轮 PCR 扩增即可得到融合片段。为了获得较高的扩增产量, 对比 LA *taq* 酶+*pfu* 酶和 EX *taq* 酶+*pfu* 酶扩增效果, 发现使用 LA *taq* 酶+*pfu* 酶扩增得到的条带更亮, 扩增效率更高。用于融合片段的长度在 600 bp 左右即可, 太长不利于融合, 并且连接载体的效率也会降低。融合片段连接至 pKSI-1 载体后需要鉴定, PCR 扩增鉴定由于特异性较差, 还需要测序相结合, 关于测序鉴定需要注意的是: 1) 测序时不能使用 PCR 产物, 否则测序结果发生的碱基突变, 分不清是基因突变还是扩增过程造成的; 2) 在 pKSI-1 载体上接近融合片段的两端设计引物, 使用特异引物进行测序才能得到正确的结果。

得到的 $\Delta hfq::Spe$ 和 $\Delta rne-710::Spe$ 菌株分别含有 pKSI-1- Δhfq 和 pKSI-1- $\Delta rne-710$ 质粒, 同时含有 pREDTKI 质粒, 抗性为卡那霉素、氨苄青霉素和壮观霉素。如果想获得无痕敲除的菌株, 必须使 pKSI-1 载体上的缺失 *hfq* 和 *rne-710* 片段代替壮观霉素盒, 分别重组到 Δhfq 和 $\Delta rne-710$ 敲除株中。在 IPTG 诱导条件下, pREDTKI 分泌 I-Sce I 酶, 一方面, 将 pKSI-1 载体的 I-Sce I 酶切位点部位进行酶切, 此区域包含的融合片段即成线性, 为进一步的基因重组作好了准备, 在 L-阿拉伯糖诱导条件下, pREDTKI 质粒发挥 λ -Red 重组功能, 可以帮助实现替换过程; 另一方面, 含有 I-Sce I 酶切位点的壮观霉素和 pKSI-1 载体在 I-Sce I 酶切作用下失活。通过卡那霉素抗性筛选, 可以得到含有 pREDTKI 质粒的无痕敲除菌株, pREDTKI 为 pKD46 改造的质粒, 温敏型的特点经 42 °C 培养即可将其消除。

本研究通过融合 PCR 方法构建目的基因缺失片段, 采用双质粒无痕敲除法, 利用 λ -Red 系统与 I-Sce I 核酸内切酶相结合的技术, 构建了敲除株 Δhfq 和 $\Delta rne-710$, 为进一步研究其功能奠定

了基础。

REFERENCES

- [1] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [2] Muylers JPP, Zhang YM, Testa G, et al. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(6): 1555–1557.
- [3] Muylers JPP, Zhang YM, Stewart AF. ET-cloning: think recombination first. *Genet Eng*, 2000, 22: 77–98.
- [4] Muylers JPP, Zhang YM, Stewart AF. Techniques: recombinogenic engineering—new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(5): 325–331.
- [5] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002, 36: 361–388.
- [6] Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, 2000, 246(1/2): 321–330.
- [7] Takahashi N, Kobayashi I. Evidence for the double-strand break repair model of bacteriophage lambda recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(7): 2790–2794.
- [8] Ellis HM, Yu DG, DiTizio T, et al. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6742–6746.
- [9] Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, et al. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 2006, 40(2): 191–197.
- [10] Yu BJ, Kang KH, Lee JH, et al. Rapid and efficient construction of markerless deletions in the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(14): e84.
- [11] Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, et al. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol*, 2005, 55(1): 137–149.
- [12] Yu BJ, Sung BH, Koob MD, et al. Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/LoxP

- excision system. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(10): 1018–1023.
- [13] Kolisnychenko V, Plunkett III G, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res*, 2002, 12(4): 640–647.
- [14] Pósfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, et al. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(22): 4409–4415.
- [15] Doublet B, Douard G, Targant H, et al. Antibiotic marker modifications of λ red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(2): 359–361.
- [16] Friedman DI, Court DL. Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4(2): 201–207.
- [17] Murphy KC. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998, 180(8): 2063–2071.
- [18] Yang JJ, Sun BB, Huang H, et al. High-efficiency scarless genetic modification in *Escherichia coli* by using lambda red recombination and I-Sce I cleavage. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(13): 3826–3834.
- [19] Murphy KC, Campellone KG. Lambda red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC Mol Biol*, 2003, 4: 11.
- [20] Poteete AR. What makes the bacteriophage λ red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 201(1): 9–14.
- [21] Dabert P, Smith GR. Gene replacement with linear DNA fragments in wild-type *Escherichia coli*: enhancement by Chi sites. *Genetics*, 1997, 145(4): 877–889.
- [22] El Karoui M, Amundsen SK, Dabert P, et al. Gene replacement with linear DNA in electroporated wild-type *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(5): 1296–1299.
- [23] Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, et al. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol*, 2001, 39(2): 260–272.
- [24] Russell CB, Thaler DS, Dahlquist FW. Chromosomal transformation of *Escherichia coli recD* strains with linearized plasmids. *J Bacteriol*, 1989, 171(5): 2609–2613.

(本文责编 郝丽芳)