

铜绿假单胞菌中快速基因操作工具的开发和应用

李飞旋¹, 倪磊², 金帆^{2*}

1 中国科学技术大学 合肥微尺度物质科学国家研究中心, 安徽 合肥 230026

2 中国科学院深圳先进技术研究院 合成生物学研究所, 广东 深圳 518055

李飞旋, 倪磊, 金帆. 铜绿假单胞菌中快速基因操作工具的开发和应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1789-1803.

LI Feixuan, NI Lei, JIN Fan. Development and application of a rapid gene manipulating toolbox for *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1789-1803.

摘要: 针对基因的操作, 包括缺失和插入基因、替换基因元件(如启动子)、融合荧光蛋白基因、构建原位的基因报告系统, 是大多数生物技术实验室的必备技术。目前广泛使用的基于2次同源重组的基因操作方法, 在构建质粒、转化和筛选方面较为繁琐。另外使用该方法进行长片段敲除的效率较低。为了简化基因操作的流程, 本研究构建了一个最小化的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)整合型质粒 pln2, 只需将目标基因内部一段序列克隆到 pln2 质粒并导入细菌, 由于质粒不能在细菌内自我复制而只能通过单次等位基因交换整合到基因组上, 从而使目的基因断裂为两部分而失去活性。在 pln2 的基础上开发了一整套工具质粒适用于基因组的不同操作, 包括融合荧光蛋白基因、替换基因元件(如启动子)、构建原位的转录型荧光报告系统。此外, 本研究借助该系统成功实现超长片段基因簇的敲除, 单次可以敲除长达 270 kb 的片段。

关键词: 基因操作; 单交换同源重组; 铜绿假单胞菌; 长片段敲除; 新技术与新方法

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0906900, 2018YFA0902700); 中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20200033)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0906900, 2018YFA0902700) and the Scientific Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (YJKYYQ20200033).

*Corresponding author. Tel: +86-755-26409621, E-mail: fan.jin@siat.ac.cn

Received: 2022-07-25; Accepted: 2022-09-26; Published online: 2022-09-30

Development and application of a rapid gene manipulating toolbox for *Pseudomonas aeruginosa*

LI Feixuan¹, NI Lei², JIN Fan^{2*}

1 Hefei National Research Center for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

2 Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: Manipulation of genes, including knock-out or knock-in, replacement of gene elements (such as promoters), fusion with a fluorescent protein gene, and construction of *in situ* gene reporter, is required in most of the biotechnological laboratories. The widely used gene manipulating methods based on two-step allelic exchange are cumbersome in terms of constructing plasmids, transforming and screening. In addition, the efficiency of using this method for long fragment knockout is low. To simplify the process of gene manipulation, we constructed a minimized integrative vector pln2. When a gene needs to be inactivated, an internal fragment of the target gene (non-frameshift) is cloned into the pln2 plasmid. Once the single-crossover recombination between genome and the constructed plasmid occurs, the endogenous gene is segmented by the plasmid backbone and thus inactivated. We developed a toolbox based on pln2 that can be used for different genomic operation mentioned above. With the help of this toolbox, we successfully knocked out large fragments of 20–270 kb.

Keywords: gene manipulation; single-crossover recombination; *Pseudomonas aeruginosa*; long fragments knockout; new technologies and methods

几乎每个生物技术实验室都需要进行基因相关的操作,例如基因的敲除、插入、融合等。其中最常用的是敲除,其他操作可以视为基因敲除的延伸。广义上的基因敲除是指使用一定的手段使基因组上特定的基因失活或缺失,从而丧失功能。而通常来说则是利用DNA同源重组的原理,从基因组上替换或删除目的基因。在研究基因功能和调控网络、构建生物模型或者底盘生物时,或为了在实验中避免某个基因对实验的干扰,都需要用到基因敲除。伴随着现代生物技术大规模、高通量的发展趋势,近些年快速涌现出一批基因操作(其中包括敲除)的新方法,例如规律成簇的间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic

repeats, CRISPR)及其衍生技术,并应用于高通量的功能调节与筛选^[1-3]。这些工作同时也都需要文库构建和高通量测序手段。

然而落实到具体验证阶段的很多工作中,仍然需要逐个构建不同基因的缺失突变株或进行基因插入、融合等操作。经典的基因敲除方法是利用2次同源重组双交换将靶标基因替换为两侧带有FRT位点的抗性基因,之后再利用FLP/FRT系统将抗性基因从基因组删除。这一方法虽然经典但也较为繁琐。例如大肠杆菌中常用的λRed系统敲除方案^[4-5],通常包括如下步骤:(1)设计和构建敲除片段,该片段组成为上游同源臂+抗性基因+下游同源臂;(2)细菌导入λRed系统并诱导表达;(3)细菌导入敲除

片段；(4) 使用含抗生素的培养基筛选敲除菌株；(5) 验证菌株并消除 λ Red 系统。如果想要得到无抗性敲除株还需额外的操作。Baba 等利用这种方法构建了大肠杆菌 K-12 BW25113 菌株的单基因敲除文库，成功获得了 3 985 个单基因敲除菌株^[6-8]。这些突变体文库不仅为系统分析未知基因功能和基因调控网络提供了基础资源，为在大肠杆菌 K-12 BW25113 这一常见菌株背景下的全基因组突变效应测试提供了实验资源，也为系统生物学研究提供了实验数据来源^[8]。

另外一种模式微生物铜绿假单胞菌也是利用同源重组的原理来敲除基因。不同于敲除大肠杆菌基因时导入的同源片段为 PCR 扩增产物，铜绿假单胞菌基因敲除通常是将包含上下游同源序列和抗性基因的片段构建到包含 *sacB* 基因的自杀质粒上^[9-10]。之后的操作则和大肠杆菌基因敲除类似。Hmelo 等在上述方法的基础上进行改进，直接将靶标基因的上下游片段连接并克隆到敲除质粒，导入菌株后利用质粒本身携带的抗性基因和 *sacB* 基因进行 2 次筛选，进而可以得到纯净无痕的敲除结果^[11]。这是一种力求精确纯净的基因敲除技术。

本研究则开发了一种“半精确”的基因敲除(还包括替换、插入等)方法，快速实现一系列基因操作但损失部分精确性，在操作简易性和敲除准确干净之间做个平衡。一般来说，在生物体内单交换同源重组(homologous recombination)发生的概率要远高于双交换同源重组(double-crossover recombination)^[12-15]，因此比较容易通过单交换同源重组将片段插入目标基因位置。其次，单交换同源重组对所用骨架质粒的要求也很简单，只需包含复制起始子(不能在敲除菌株中复制)和用以后续筛选的抗性基因即可，因此质粒很小，如本研究使用的质

粒 *pln2* 大小为 1 800 bp，是一般敲除所用质粒大小的 1/3。将目的基因内部部分片段(不移码)克隆到该质粒上，导入细菌后通过一次单交换同源重组，质粒被线性化整合到目的基因内部使其遭到破坏，这样就完成了目的基因的失活。在 *pln2* 的基础上我们开发了一套质粒工具用于构建融合荧光蛋白、替换基因元件(如启动子)、构建原位的转录型荧光报告系统和大片段敲除(>200 kb)等。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

构建质粒所用感受态大肠杆菌为商业化 Top10 菌株。基因操作实验中所用的菌种为铜绿假单胞菌 PAO1 (ATCC 15692)，来源于美国圣母大学 Joshua D. Shrout 实验室。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L)：胰蛋白胨 10，酵母提取物 5，氯化钠 10；固体培养基加琼脂粉 20。

FAB 限制性培养基：硫酸铵 2 g/L，十二水合磷酸氢二钠 12 g/L，磷酸二氢钾 3 g/L，氯化钠 3 g/L，氯化镁 93 mg/L，二水合氯化钙 14 mg/L，二水合硫酸钙 200 μ g/L，七水合硫酸亚铁 200 μ g/L，一水合硫酸锰 20 μ g/L，五水合硫酸铜 20 μ g/L，七水合硫酸锌 20 μ g/L，七水合硫酸钴 10 μ g/L，钼酸钠 10 μ g/L，硼酸 5 μ g/L。根据不同实验需要，碳源分别设置为醋酸钠 30 mmol/L 或谷氨酸钠 30 mmol/L。必要时向培养基中加入抗生素，庆大霉素(gentamicin, Gen)终浓度分别为 30 mg/mL (铜绿假单胞菌)和 15 mg/mL (大肠杆菌)，四环素(tetracycline, Tc)终浓度为 100 mg/mL (铜绿假单胞菌)和 10 mg/mL (大肠杆菌)，羧苄青霉素(carbenicillin, Carb)终浓度为 300 mg/mL (铜绿假单胞菌)和 100 mg/mL (大肠杆菌)。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建和提取

本文所有质粒均使用无缝克隆方法构建。首先分别 PCR 扩增片段和载体,使两者具有 25 bp 的互补同源末端序列,将两者按摩尔比 3:1 比例混合,加入等体积的 2×Gibson Assembly[®] Master Mix, 50 °C 反应 30 min。将反应液转化到 Top10 感受态细菌中,经抗生素琼脂板筛选后得到转化质粒,再经 PCR 鉴定和测序正确后保存使用。质粒提取使用商业试剂盒,按说明书操作。

1.2.2 铜绿假单胞菌电转质粒和筛选

质粒使用电击转化法导入 PAO1 菌株。具体步骤:从新划线的 LB 平板上挑一个单菌落接种于 15 mL 新鲜 LB 液体培养基, 37 °C 过夜培养。第 2 天在室温下收集细菌,每支离心管收集 3 mL 菌液,离心后弃上清。用 10%蔗糖溶液重悬清洗 2 次并离心弃上清,加入 100 μL 的 10%蔗糖溶液重悬,得到电转感受态细菌。加入 5 μL 质粒孵育 5 min 后,将感受态细菌转入 2 mm 电转杯,使用 2.5 kV、5 ms 参数进行电击。电击程序结束后,迅速加入 0.5 mL 的 LB 培养基重悬细菌,并转移到离心管中,在 37 °C 摇床复苏 2 h。取 100 μL 菌液涂布到含相应抗生素的 LB 平板上,放置于 37 °C 恒温培养箱培养过夜。抗性板上长出的单菌落,证明质粒已经插入细菌基因组中。挑取 4 个单菌落溶于 30 μL ddH₂O, 95 °C 裂解,离心后取上清液作模板进行 PCR 验证。长度正确的 PCR 产物进行测序,进一步验证菌株正确性。将验证正确的菌株保存于甘油中,置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2.3 抗性基因消除

大片段敲除实验的最后步骤,是消除插入基因组的抗性基因。在使用 pln2 和 pln2Tc 将 2 个同方向 FRT 位点和质粒插入目标片段两侧

后,需要使用 FLP 位点重组酶删除 FRT 位点之间的片段和抗性基因。具体方案如下:(1)电转 pFLP2 质粒,得到的双抗性细菌培养过夜,按照 1.2.2 所述方法,把 pFLP2 质粒电转到细菌中,培养 2 h 后取 100 μL 菌液涂布到 Carb 抗性板上。pFLP2 质粒可持续表达 FLP2 位点重组酶,同时含有蔗糖致死基因。(2)消除 pFLP2 质粒,挑选上一步长出的单菌落划线到含 5%蔗糖的 LB 固体培养基上,培养过夜。(3)抗性验证,挑选上一步蔗糖板上长出的单菌落若干,溶于 30 μL ddH₂O,然后分别取 1 μL 点到 LB 平板、LB+Tc 100 mg/mL 平板、LB+Gen 30 mg/mL 平板和 LB+Carb 300 mg/mL 平板上,37 °C 恒温箱培养过夜。只在 LB 平板上长出的菌落成功消除抗性基因和 pFLP2 质粒,也即成功删除了目标片段。抗性验证正确的菌株,通过测序进一步检验目标片段是否成功敲除。

1.2.4 细菌培养

从 -80 °C 冰箱取出实验所需的菌株,划线到新鲜的 LB 固体培养基上,置于 37 °C 恒温培养箱孵育 18 h。(1)细菌游动(swimming)观察实验,直接挑一个单菌落接种于 3 mL 新鲜 LB, 37 °C、220 r/min 摇床培养约 6 h,然后取菌液稀释观察。(2)吩嗪表达比较实验,挑一个单菌落接种于 1 mL 新鲜 LB, 37 °C、220 r/min 摇床培养约 10 h,测定菌液 OD₆₀₀ 值。将不同启动子的菌液都统一稀释到 OD₆₀₀=1.0,再分别取 150 μL 菌液转接到 3 mL 新鲜 LB 培养基中,放回摇床继续培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.8 (后对数期)。(3) PiIT 荧光标记,挑一个单菌落接种于 1 mL 新鲜 FAB+30 mmol/L 谷氨酸钠培养基, 37 °C、220 r/min 摇床过夜培养。(4) aceA 启动子对不同碳源的响应实验,挑一个单菌落接种于 1 mL 新鲜 FAB+30 mmol/L 谷氨酸钠培养基, 37 °C、220 r/min 摇床培养过夜。测定菌液 OD₆₀₀

值,将菌液稀释到 $OD_{600}=1.0$,然后分别取 50 μL 菌液添加到 1 mL 新鲜 FAB+30 mmol/L 谷氨酸钠培养基和 1 mL 新鲜 FAB+30 mmol/L 醋酸钠培养基中,放回摇床继续培养 6 h,之后用荧光显微镜观察并记录不同细菌的荧光强度。

1.2.5 细菌显微图像采集

细菌显微图像的采集使用本实验室的激光转盘共聚焦显微镜。采集荧光数据时,首先将菌液稀释到 OD_{600} 值约为 0.05,取 5 μL 菌液滴到约 2 mm 厚的 1.5%琼脂糖片上,待菌液快干时将琼脂糖片倒扣于透明载玻片上。将载玻片放于倒置显微镜物镜载物台上然后使用商业化的 Andor 软件控制物镜寻找焦面,锁焦后使用集成的 Andor sCMOS 相机进行细菌的观察和拍摄。SfGFP 绿色荧光使用 488 nm 波段激光激发,荧光信号使用 520/20 nm 单通滤波片接收。拍摄细菌的明场图片时,则使用白光作为激发光源。

1.2.6 细菌游动(swimming)的视频采集

将要观察的菌液稀释后取 30 μL 滴加到底部为玻片的单格共聚焦培养皿,并盖上盖子防止溶液蒸发。将培养皿放于倒置显微镜物镜上,使用商业化的 Andor 软件控制物镜寻找焦面并锁定,同样使用集成的 Andor sCMOS 相机进行图像采集,帧率设置为 20 ms/帧。

2 结果与分析

2.1 快速基因操作工具箱的开发

本文的快速基因操作工具箱包含的质粒及其用途如表 1 所示。pln2 质粒由 Messing 等开发的 pUC18 质粒衍生而来^[16-17],包含 *lacZa* (及 *lac operator*)、pMB1 复制起始位点、*ampR* 抗性基因、多克隆位点等,总大小为 2 686 bp。pUC18 可以在大肠杆菌中自我复制,但无法在铜绿假单胞菌中复制。我们通过 PCR 反应和 Gibson Assembly 连接的方法,直接将 pUC18 质粒上包含 *lacZa* 和 *ampR* 抗性基因的整个片段替换为 *aacC1* (包含启动子)抗性基因,得到质粒 pln1。为了适用于之后的大片段敲除实验,我们继续在 *aacC1* 基因上游插入 2 个同方向的 FRT 位点,2 个 FRT 位点间隔为 42 bp,这样就得到了 pln2 质粒。同样使用 PCR 反应和 Gibson Assembly 连接,将 *aacC1* 基因替换为四环素抗性 *tetR* 抗性基因,得到质粒 pln2Tc (图 1)。

(1) 对某个基因融合 *sfGFP*,我们在 pln2 质粒两个 FRT 位点之间插入了不带启动子的 *sfGFP* 基因,称为 pln2-*sfGFP*_F 质粒。(2) 在基因组上直接将某个基因的启动子替换为标准化的常启动子,我们将一系列人工合成启动子连同 rbs 组合插入到 pln2 两个 FRT 位点之间,

表 1 快速基因操作质粒工具箱

Table 1 Plasmid toolbox for rapid gene manipulation

Plasmid	Components	Resistance	Purposes
pln2	<i>ori, aacC1, FRT</i>	Gen	Gene disruption, large fragment deletion
pln2Tc	<i>ori, tetR, FRT</i>	Tc	Gene disruption, large fragment deletion
J23102-pln2	J23102, B0034 rbs	Gen	Promoter and rbs replacement
J23105-pln2	J23105, B0034 rbs	Gen	Promoter and rbs replacement
pln2- <i>sfGFP</i> _F	<i>sfGFP</i>	Gen	<i>sfGFP</i> fusion
pln2- <i>sfGFP</i> _T	RNAse III processing site, B0034 rbs, <i>sfGFP</i> , <i>TOT1</i>	Gen	Construction of <i>in situ</i> gene reporter

Rbs: Ribosome binding site; Gen: Gentamicin resistance; Tc: Tetracycline resistance.

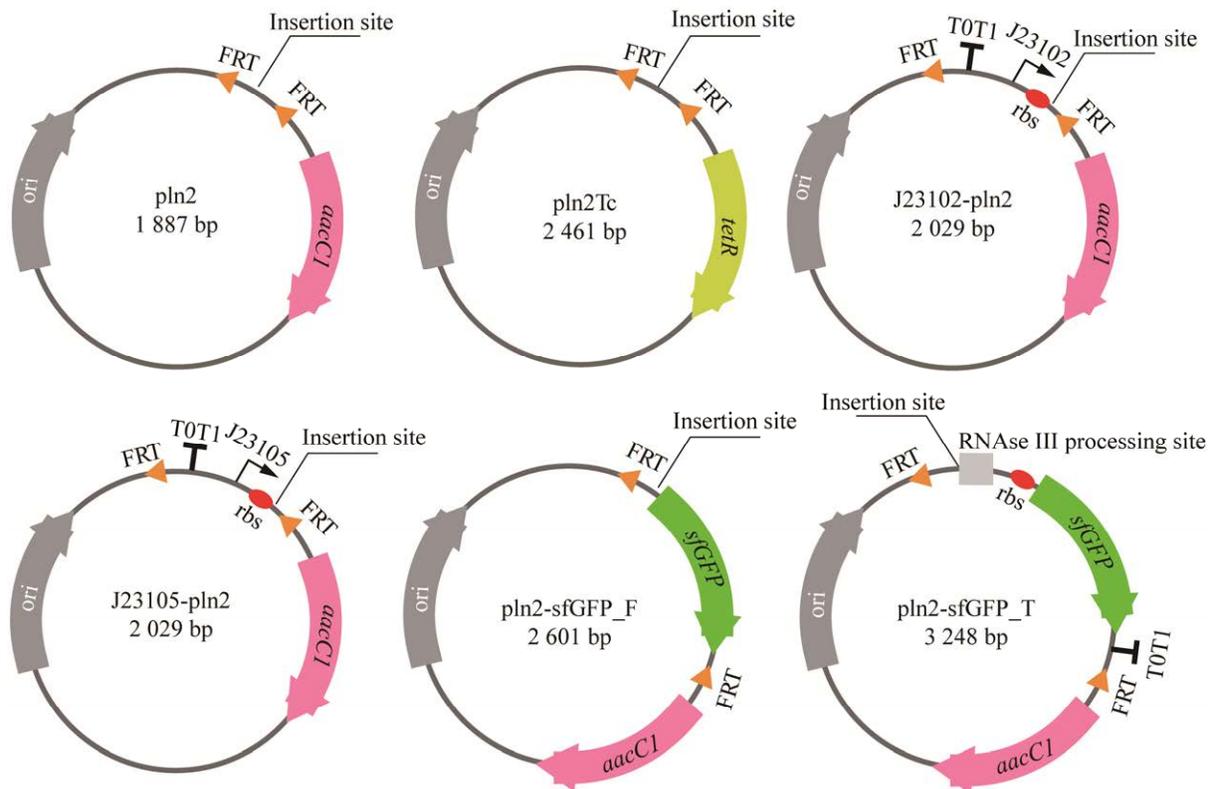


图 1 快速基因操作工具质粒的图谱

Figure 1 Schematic diagram of the plasmids using for rapid gene manipulation. *aacCI*: Gene for gentamicin resistance. *tetR*: Gene for tetracycline resistance. FRT: Flippase recognition target. T0T1: Terminator. J23102/J23105: Synthetic promoter.

得到了一系列包含不同启动子序列的质粒, 如 J23102-pln2、J23105-pln2 等, 这些启动子为人工合成, 相对强度已经被精确标定, 可根据需要选择。(3) 构建用于基因组启动子原位转录型报告系统的质粒, 我们在 pln2 质粒 2 个 FRT 位点之间插入了一段包含 RNAse III 处理位点 (RNAse III processing site)、人工合成的核糖体结合位点 (ribosome binding site, rbs)、*sfGFP* 基因以及 T0T1 终止子的序列, 这样得到了 pln2-*sfGFP_T* 质粒 (图 1)。加入 RNAse III 处理位点是为了在转录形成 pre-mRNA 后立即在此处切断, 只保留转录子上人工合成的 rbs 位点及以后的部分, 这样可以避免内源转录后和翻译层面的调节, 只反映转录的量或强度^[18-19]。

(4) 长片段基因簇敲除需要借助 pln2 和 plnTc 两个质粒将 FRT 位点插入到待敲除区域两侧, 且保证 FRT 位点的方向相同。这就是 pln2 和 plnTc 质粒都包含 2 个 FRT 位点的原因。图 1 的图谱标注了质粒使用时, 目标片段 (也就是同源臂) 插入的位置 (insertion site)。

2.2 快速基因操作质粒工具箱的应用

2.2.1 基因敲除 (失活)

基因失活的原理如图 2A 所示。将靶标基因内部部分片段克隆到 pln2 中得到敲除质粒, 电转后通过一次单交换同源重组, 质粒被线性化整合到靶标基因内部从而导致基因被分割成两段, 前面一段编码区不完整, 后面一段也缺失 5' 端部分编码区且上游无启动子, 这样基因

就失去了活性。为了验证 *pln2* 系统及单次等位基因交换可用于失活基因，我们选择铜绿假单胞菌基因组上的 *fliC* (*PAI092*) 基因为靶标进行实验。铜绿假单胞菌中 *fliC* 负责编码鞭毛蛋白 (flagellin)，缺失 *fliC* 基因的 PAO1 菌株将丧失特定的运动能力，如游动 (swimming)、涌动 (swarming) 等^[20-21]。我们直接从铜绿假单胞菌 PAO1 基因组上扩增出 *fliC* 基因内部一段 200 bp 长的片段并将其插入到 *pln2* 质粒，得到插入质粒 *fliC'*-*pln2*。后面构建其他插入质粒，也使用 200 bp 这个长度。将插入质粒电转到菌株 PAO1 中，相应抗性板上筛选鉴定后得到 PAO1*fliC'*-*pln2* 菌株，即为 *fliC* 基因被破坏的菌株。显微镜下观察发现，野生型菌株则可以在溶液中自由游动，因此在视野中变化很大。PAO1*fliC'*-*pln2* 菌株已失去游动能力，被束缚在溶液中不能上下左右自由游动，而只能在原处转动 (图 2B)。这表明我们的方法可以用于基因的失活或者敲除。

2.2.2 启动子和 rbs 替换

对基因的表达水平和表达时序进行调控，最常用和有效的手段就是替换启动子和 rbs。基因的表达是随生长周期的变化而发生改变，甚至剧烈波动。例如，铜绿假单胞菌中调节吩嗪 (phenazine) 合成的 *phz1* 操纵子 (图 3B)，只有在细菌生长的中后期受到喹诺酮信号 (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, PQS) 诱导时才会开启表达^[22-23]。如果我们希望该合成途径一直处于激活状态，就需要把 *phz1* 操纵子原来的启动子替换为持续表达的结构性启动子。替换原理如图 3A 所示，将目标基因的前半段 (包括起始密码子) 克隆到 J23102-*pln2* 质粒中得到插入质粒，根据不同需求可以选择其他强度的启动子和 rbs 组合。将得到的质粒电转入菌株 PAO1 后，通过单次交换同源重组就可以将基因原本的启动子替换。我们用这种方法将 *phzA1* 的启动子和 rbs 分别替换为 J23102、J23105 启动子和 B0034 rbs。水溶液中吩嗪呈绿色，因此菌液颜色深浅

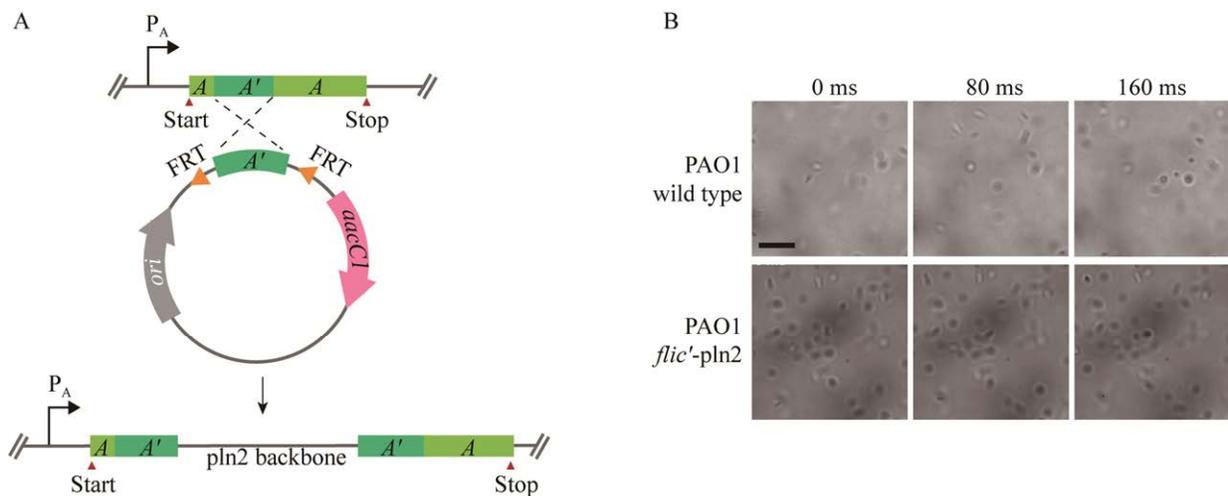


图 2 *pln2* 工具质粒用于基因失活 A: 基因失活的原理. B: 野生型 PAO1 和 *fliC* 破坏型 PAO1 游动能力的比较. 图中标尺为 5 μm

Figure 2 Gene disruption by *pln2* plasmid. A: Schematic diagram of gene inactivation. B: Comparison of the swimming ability of wild type PAO1 and *fliC*-disrupted PAO1. The scale bar is 5 μm .

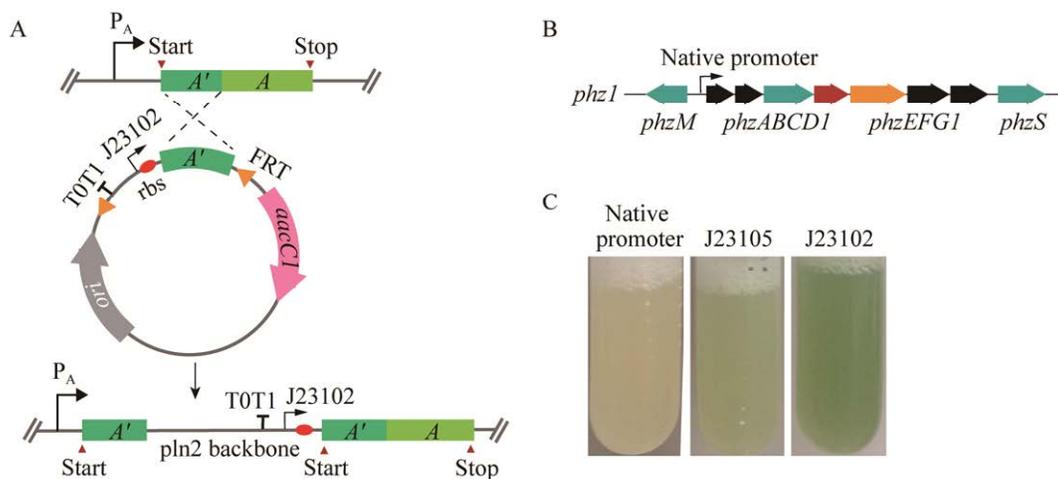


图3 *pln2* 工具质粒用于启动子和 *rbs* 替换 A: 基因元件替换的原理. B: 吩嗪合成基因簇 *phz1* 组成. C: *phzA1* 启动子替换成不同启动子后的吩嗪生产差异

Figure 3 Promoter and rbs replacement by *pln2* plasmid. A: Schematic diagram of gene replacement. B: Gene cluster *phz1* for phenazine biosynthesis. C: Differences in phenazine production after replacing the *phzA1* promoter with different promoters.

可以反映吩嗪的产量,从而反映 *phz1* 操纵子表达强度。图 3C 表现了在相同培养条件下 ($OD_{600}=0.8$)使用不同启动子表达 *phz1* 时菌液的颜色。通过颜色可以看出在原有启动子下,对数期时几乎没有吩嗪产生,因为此时细菌群体密度较低,群体感知系统尚未开启。而替换为常启动子 J23102 和 J23105 后,吩嗪在对数期时就已经产生,并且启动子强度越强吩嗪产量就越高,因为结构性启动子不再受到上游群体感知信号的调控,可以独立地表达 *phz1* 基因。该结果表明我们的方法可以用于基因调控元件的替换,从而对基因表达水平和时序进行调控。

2.2.3 原位荧光蛋白基因的融合

标记和示踪某个蛋白的位置分布,需要在对应的蛋白基因上融合荧光蛋白基因。融合表达既可以构建在质粒上,也可以构建后插入在基因组上。将融合表达的基因插入铜绿假单胞菌基因组可以借助 mini-Tn7 或者 CTX2 系统,但是这 2 套系统只能将所载片段插入基因组的

固定位置^[24-25]。利用 *pln2* 系统实现原位 *sfGFP* 基因融合的原理如图 4A 所示,根据不同的需求可以将 *sfGFP* 基因融合到不同的位置。融合成功的菌株能够观察到绿色荧光,因此鉴定非常方便。

我们以 PiIT 蛋白的荧光标记来做案例展示。PiIT 是铜绿假单胞菌四型菌毛系统的马达蛋白,由 *pilT* 基因编码。研究表明, PiIT 蛋白在细菌表面呈极性分布,这和铜绿假单胞菌四型菌毛的极性分布一致^[26]。我们使用 *pln2* 系统在 *pilT* 基因后直接融合了 *sfGFP* 基因,培养菌株表达后观察荧光蛋白的分布,其分布则代表了 PiIT 蛋白的分布。从图 4B 可以看出, PiIT 蛋白分布在细菌的一极或两极,在母代细菌分裂的 2 个子代细菌未完全分离时,在分割点上仍有 PiIT 蛋白分布,这和之前文献报道的结果相符^[26]。这表明我们的方法可以用于在基因组上直接对目标基因原位融合 *sfGFP* 基因,进而观察相应蛋白的位置和分布。

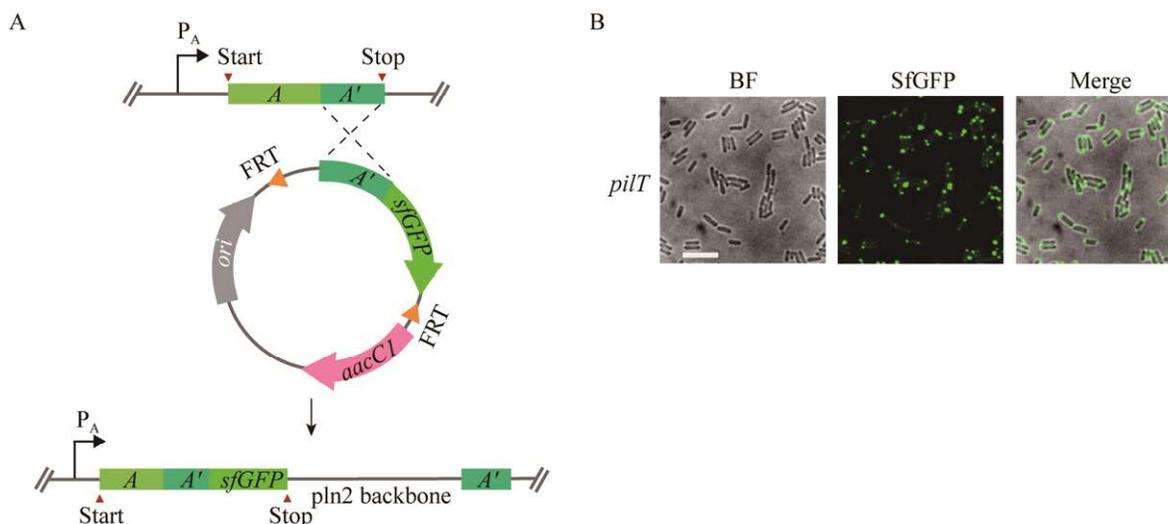


图 4 *pln2* 工具质粒用于目标基因原位融合 *sfGFP* 基因 A: 目标基因原位融合 *sfGFP* 的原理示意图.

B: 使用 SfGFP 荧光蛋白标记 PilT 蛋白的分布. 图中标尺为 5 μm

Figure 4 *In-situ* fusion of *sfGFP* gene to a targeted gene. A: Schematic diagram of *in-situ* fusion *sfGFP* gene to a gene of interest. B: Labelling the distribution of the PilT protein by fused SfGFP fluorescent protein. The scale bar is 5 μm .

2.2.4 启动子的转录报告系统构建

图 5A 是在基因组上原位构建某个启动子的转录报告系统示意图。由于 RNase III 处理位点和人工合成 rbs 的存在，新转录的 mRNA 会立即从 RNase III 处理位点处切开，荧光蛋白的翻译只能从人工合成的 rbs 位点开始，这样就避免了内源的转录后调节和翻译调节对荧光强度的影响，使荧光强度只反映启动子的转录水平。

我们构建了 *aceA* 启动子原位转录型荧光报告系统。*aceA* 基因编码异柠檬酸裂合酶，是乙醛酸循环中的关键性基因^[27]。当以醋酸盐 (acetate) 为单一碳源时，铜绿假单胞菌中 *aceA* 基因的转录水平显著提高，而当一些葡萄糖 (glucose) 和谷氨酸盐 (glutamate) 存在时，*aceA* 基因的转录水平则明显受到抑制^[28]。我们分别使用醋酸盐和谷氨酸盐为单一碳源诱导 *aceA* 启动子的转录，荧光数据 (图 5B、5C) 显示在醋酸盐刺激下 *aceA* 启动子转录水平相比谷氨

酸盐刺激下提高了约 10 倍，和文献报道数据吻合。这表明我们的方法可以用于在基因组上原位构建启动子的转录报告系统，进而观察其转录强度。

2.2.5 大片段敲除

大片段敲除需要通过 *pln2* 和 *pln2Tc* 质粒分 2 次将 FRT 位点插入目标片段两侧，同时需要注意保证 2 个 FRT 位点方向相同。然后诱导表达 FLP 重组酶将 2 个 FRT 位点之间的大片段包括插入的质粒骨架一并删除 (图 6A)。我们选取了铜绿假单胞菌基因组上的类 Pf 原噬菌体 (Pfl-like prophage) 基因簇 *PA0616-PA0641* (共 25 个基因, 长度约 15 kb) 和三型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 基因簇 *PA1690 (pscU)-PA1724 (pscL)* (共 35 个基因, 长度约 24 kb) 作为敲除的目标 (图 6C)。这 2 个基因簇起源外源噬菌体和病毒^[29-30]，都不是铜绿假单胞菌的必需基因，因此被选来验证我们方法的可行性。

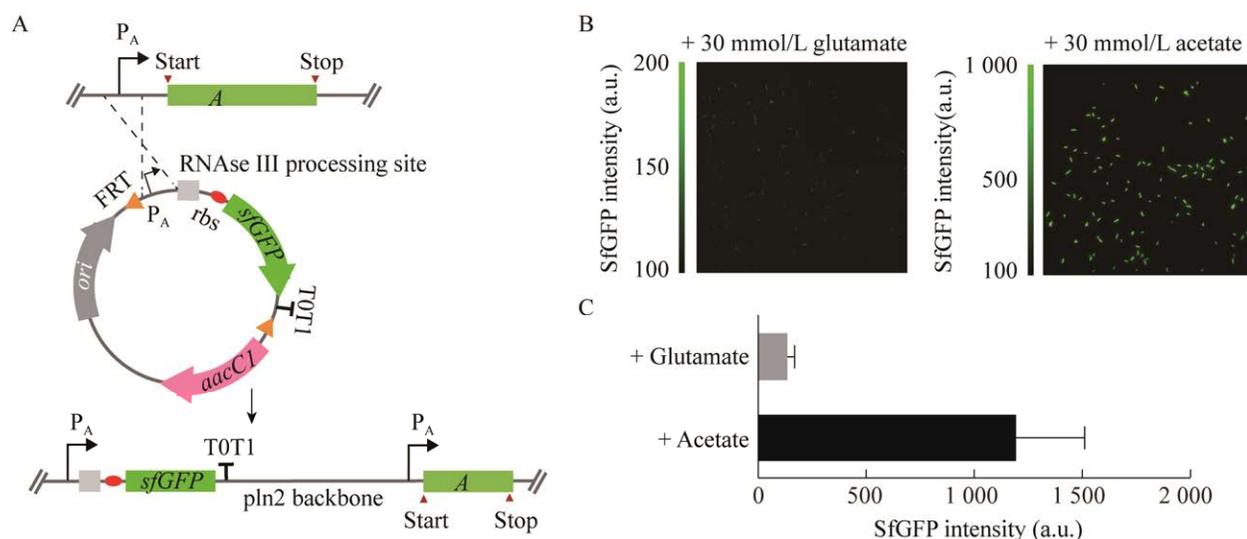


图5 *pln2* 工具质粒用于构建启动子的原位转录报告子 A: 构建启动子的原位转录报告子的原理示意图. B: *aceA* 启动子转录报告系统在不同碳源诱导下的荧光图像. C: *aceA* 启动子在不同碳源诱导下的相对转录强度

Figure 5 Constructing *in-situ* transcription reporter by *pln2* plasmid. A: Schematic diagram of constructing *in-situ* transcription reporter of a promoter. B: Fluorescence image of *aceA* promoter transcription reporter under different carbon sources. C: Transcriptional intensity of *aceA* promoter under different carbon sources.

在获得了靶片段两侧插入 2 个同向 FRT 位点的菌株(具有四环素和庆大霉素双抗性),再经 FLP 酶消除 FRT 位点和蔗糖筛选消除 pFLP2 质粒后,我们各挑取 16 个单菌落进行抗性验证。这个结果反映了大片段敲除的效率,在 Tc 和 Gen 抗性板上都无法生长的菌落即为敲除菌株。图 6B 显示,对于 *PA1690 (pscU)–PA1724 (pscL)* 基因簇,挑选的 16 个单菌落中,有 8 个敲除成功;对于 *PA0616–PA0641* 基因簇,挑选的 16 个单菌斑中,有 9 个敲除成功。这表明使用这种策略可以较为高效地敲除大片段基因簇。对敲除区域进行 PCR 测序,之后将测序结果用 SnapGene 软件与参考序列比对(图 6C),测序结果表明目标区域内的基因簇确实被删除了。

我们进一步在铜绿假单胞菌中敲除更长的片段,以验证这种方法的潜力。Turner 等使用

Tn-Seq 高通量测序数据结合蒙特卡洛模拟方法,鉴别了铜绿假单胞菌 PAO1 在不同人工培养基以及囊性纤维病患者痰液中的必需基因^[31],这为我们提供了参考。我们尝试敲除 *PA1184–PA1373* 和 *PA2246–PA2452* 这 2 大段基因,其中 *PA1184–PA1374* 这一段长度为 200 kb(包含 190 个基因),*PA2246–PA2452* 这一段长度为 270 kb(包含 206 个基因)。经过相同的方法和步骤,最终这两个大片段都被成功敲除,测序结果见图 7A、7B。我们在已敲除 *PA1184–PA1373* 这个大片段菌株的基础上继续敲除 *PA2246–PA2452*、*PA0616–PA0641*、*PA1690–PA1725* 这 3 簇基因,累计共从 PAO1 基因组上删除掉约 520 kb 碱基,约占铜绿假单胞菌基因组大小的 8.3%。我们还简单测试了敲除 *PA1184–PA1373* 这个大片段后,菌株在不同培养基下的生长情况。在限制

性培养基 FAB 中, $\Delta PA1184-1373$ 不能生长。在富营养的 LB 培养基中, $\Delta PA1184-1373$ 生长正常, 菌液和菌株 PAO1 相比也没有明显区别 (图 7C)。我们将 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存的 $\Delta PA1184-1373$ 菌

株和 PAO1 菌株分别划线到固体 LB 平板上, PAO1 的菌斑看起来较为湿润, 菌斑呈淡绿色, $\Delta PA1184-1373$ 的菌斑看起来较为干燥而且肉眼可见的红褐色代谢产物产生 (图 7D)。

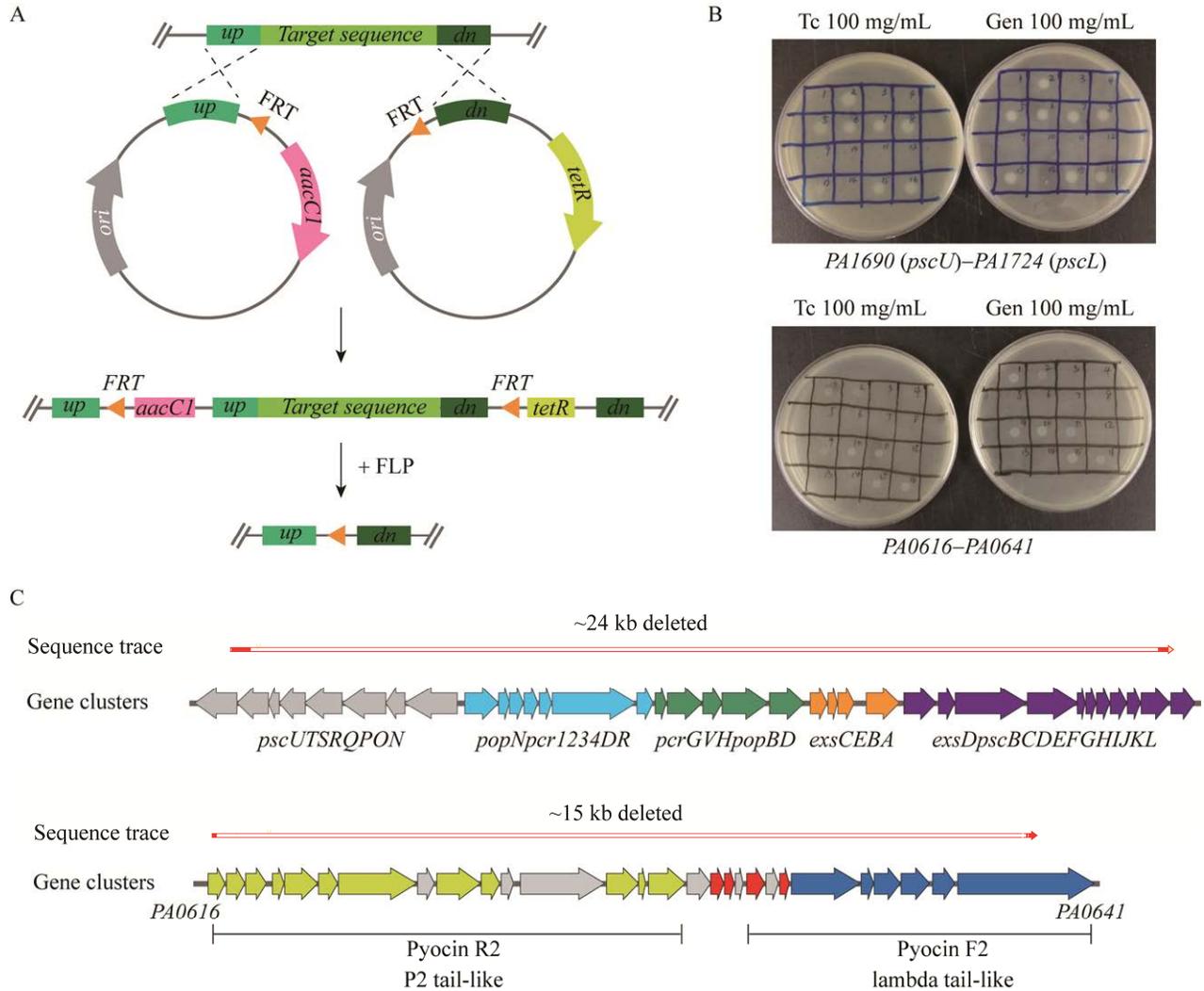


图 6 *pln2* 工具质粒用于大片段敲除

A: 大片段敲除的原理示意图. B: 大于 15 kb 片段敲除的效率. C: 三型分泌系统基因簇(上)和原噬菌体基因簇组成和敲除测序结果, 基因簇上方的红色箭头是测序文件比对到片段上生成的, 比对软件为 SnapGene, 中间空白表示这一部分没有被检测到, 也即被删除

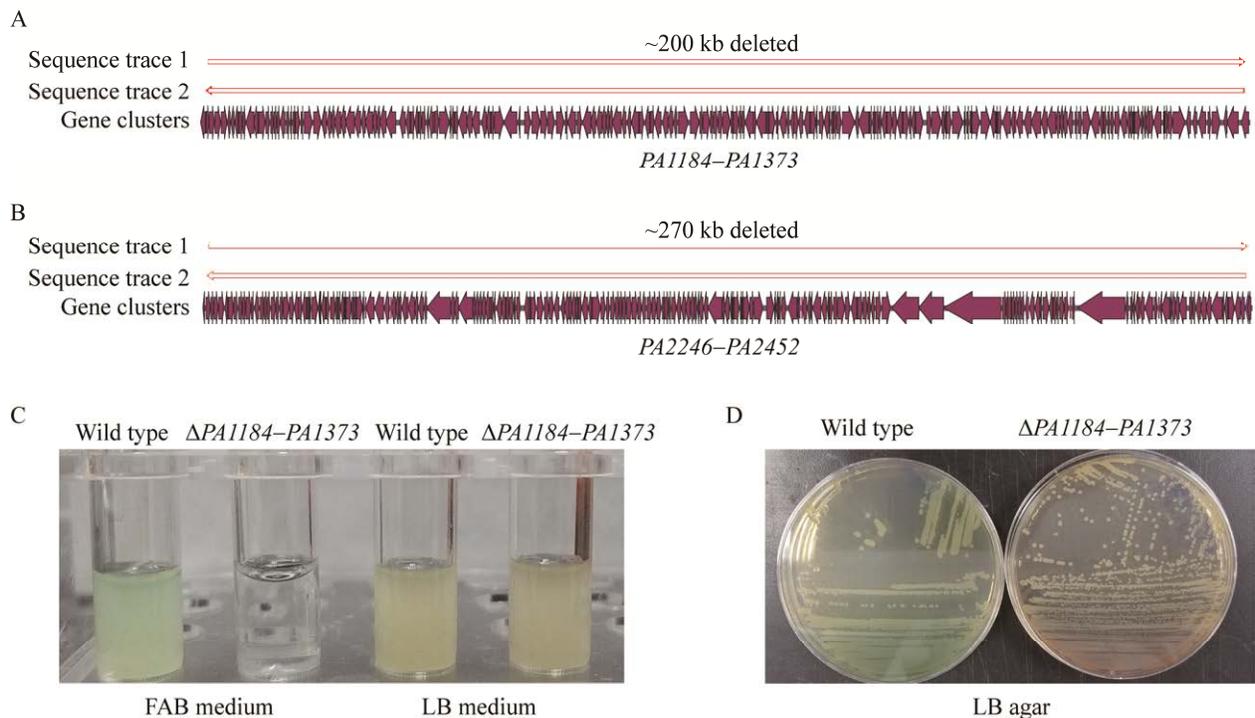


图7 200 kb 以上片段的敲除 A: *PA1184-PA1373* 的敲除. B: *PA2246-PA2452* 的敲除. C: *PA1184-PA1373* 敲除变种在不同液体培养基中的生长状态. D: *PA1184-PA1373* 敲除变种和 PAO1 野生菌在 LB 平板上的生长差异

Figure 7 Knockout of fragments greater than 200 kb. A: Knockout of *PA1184-PA1373*. B: Knockout of *PA2246-PA2452*. C: Growth status of *PA1184-PA1373* knockout variants in different liquid media. D: Differences of *PA1184-PA1373* knockout variant and strain PAO1 on LB plate.

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌是研究致病和生物被膜的重要模式菌株。实验室中经常需要对铜绿假单胞菌基因组 DNA 进行大量的分子操作。一般的 DNA 操作手段基于双交换同源重组，偏重于精确和纯净地敲除基因(或相应的其他操作)。本文旨在开发一种“即插即用”的轻量化基因敲除(还包括替换、插入等)方法，在操作效率和结果纯净性之间获得平衡。利用单交换同源重组将携带同源片段的质粒线性化插入靶标基因的原理，开发了一项可快速用于铜绿假单胞菌基因的失活、融合，基因元件的替换，构建基因组

原位转录型荧光报告子，长片段基因簇的删除等操作的方法。本研究提供了一套完整的解决方案即整合型的 *pln2* 质粒系统，这套质粒系统包含 *pln2*、*pln2Tc*、*J23102-pln2* (还有 *J23105*、*J23100* 等)、*pln2-sfgfp F*、*pln2-sfgfp T* 等基础质粒，在使用时只需简单的一步 PCR 反应获得同源臂片段，之后再使用 Gibson Assembly 连接将同源臂插入基础质粒就可获得用于相应操作的质粒。质粒电转到细菌之后只需要单次抗性筛选即可获得正确的菌株。由于单次交换重组的效率远高于双交换重组，因此同源臂片段不需要很长，我们实验中使用的同源臂片段为 200 bp。本方法和其他已发表方法的比较见表 2。

表 2 本文和其他基因操作方法的比较

Table 2 Comparison between this study and other gene manipulation methods

Method	Recombination type	Efficiency	Positive rate of candidate clones	The complexity of plasmid(s) construction	Time to obtain the desired mutant	Advantages
pIn2 (this study)	Single crossover once	$\sim 10^{-7}$	2/4–4/4	One plasmid with one fragment inserted	3–5 d	Easy, rapid, large fragment knockout (270 kb)
Two-step allelic exchange method ^[11]	Single crossover twice	First crossover $\sim 10^{-7}$, second crossover $\sim 10^{-5}$	46% on average	One plasmid with two fragments inserted	Two weeks	Seamless
CRISPR/Cas9 based method ^[32]	Cas9 cleavage mediated double crossover once	More than 10^3 colonies for a single transformation	5/12–12/12	Three plasmids with multiple fragments inserted	More than two weeks	Can be used for high throughput

我们使用实例展示了该方法的可行性, 实现了基因的失活、基因元件的替换、原位转录报告系统构建、大片段敲除等。这些操作对于研究基因功能和活性、调控网络、代谢途径, 蛋白的功能和定位, 基因组的结构等具有重要作用。尤其值得一提的是, 我们借助这套系统单次可以敲除铜绿假单胞菌基因组上 270 kb 的片段, 并且重复 2 次就可删除菌株 PAO1 基因组上 8.3% 的序列, 相信继续操作可以删除铜绿假单胞菌更多的基因。这对于制备和研究铜绿假单胞菌最小化基因组具有现实的意义。

该方法对于其他微生物的基因操作也有一定的借鉴意义。该方法基于同源重组, 即发生在 2 条包含相同序列的 DNA 链之间遗传物质交换, 这一原理在细菌里是普遍存在的, 同源重组所依赖的酶系统也是内生的, 不需要外源导入。因此理论上, 该方法可以推广到其他非同源重组缺陷的菌种里使用。推广到其他菌种时, 需要找到在该菌种中不可复制的骨架质粒, 或将我们质粒系统的复制起始位点替换为这种菌种不兼容的复制起始位点, 就可以将我们的系统移植到这种菌种里使用。

操作时需要注意的问题是, 单次同源重组发生之后整个质粒被线性化插入细菌基因组, 因此在插入位置会存在 2 段间隔的重复片段。在没有外界抗生素压力时, 插入基因组的线性化质粒会逐渐丢失, 细菌重新恢复为野生型。因此在筛选正确的变种后, 保存和使用时需要一直用相应抗生素, 维持插入片段不丢失。

REFERENCES

- [1] QI LS, LARSON MH, GILBERT LA, DOUDNA JA, WEISSMAN JS, ARKIN AP, LIM WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2021, 184(3): 844.
- [2] LIU SJ, HORLBECK MA, CHO SW, BIRK HS, MALATESTA M, HE D, ATTENELLO FJ, VILLALTA JE, CHO MY, CHEN YW, MANDEGAR MA, OLVERA MP, GILBERT LA, CONKLIN BR, CHANG HY, WEISSMAN JS, LIM DA. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells[J]. *Science*, 2017, 355(6320): aah7111.
- [3] TIAN JZ, YANG GH, GU Y, SUN XQ, LU YH, JIANG WH. Developing an endogenous quorum-sensing based CRISPRi circuit for autonomous and tunable dynamic regulation of multiple targets in *Streptomyces*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(14):

- 8188-8202.
- [4] DATSENKO KA, WANNER BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [5] YU D, ELLIS HM, LEE EC, JENKINS NA, COPELAND NG, COURT DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(11): 5978-5983.
- [6] BABA T, ARA T, HASEGAWA M, TAKAI Y, OKUMURA Y, BABA M, DATSENKO KA, TOMITA M, WANNER BL, MORI H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2: 2006.0008.
- [7] BABA T, MORI H. The construction of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection in *Escherichia coli* K-12[A]//Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2008: 171-181.
- [8] BABA T, HUAN HC, DATSENKO K, WANNER BL, MORI H. The applications of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection of *Escherichia coli* K-12[A]//Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2008: 183-194.
- [9] HOANG TT, KARKHOFF-SCHWEIZER RR, KUTCHMA AJ, SCHWEIZER HP. A broad-host-range F₁p-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants[J]. Gene, 1998, 212(1): 77-86.
- [10] QUÉNÉE L, LAMOTTE D, POLACK B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. BioTechniques, 2005, 38(1): 63-67.
- [11] HMELO LR, BORLEE BR, ALMBLAD H, LOVE ME, RANDALL TE, TSENG BS, LIN CY, IRIE Y, STOREK KM, YANG JJ, SIEHNEL RJ, HOWELL PL, SINGH PK, TOLKER-NIELSEN T, PARSEK MR, SCHWEIZER HP, HARRISON JJ. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange[J]. Nature Protocols, 2015, 10(11): 1820-1841.
- [12] IWAI M, KATOH H, KATAYAMA M, IKEUCHI M. Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1[J]. Plant & Cell Physiology, 2004, 45(2): 171-175.
- [13] PUCHTA H, HOHN B. The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells[J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1991, 230(1/2): 1-7.
- [14] BISWAS I, GRUSS A, EHRLICH SD, MAGUIN E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(11): 3628-3635.
- [15] SAITO TT, COLAIÁCOVO MP. Regulation of crossover frequency and distribution during meiotic recombination[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2017, 82: 223-234.
- [16] NORRANDER J, KEMPE T, MESSING J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis[J]. Gene, 1983, 26(1): 101-106.
- [17] YANISCH-PERRON C, VIEIRA J, MESSING J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors[J]. Gene, 1985, 33(1): 103-119.
- [18] PANAYOTATOS N, TRUONG K. Cleavage within an RNase III site can control mRNA stability and protein synthesis *in vivo*[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(7): 2227-2240.
- [19] ALTUVIA Y, BAR A, REISS N, KARAVANI E, ARGAMAN L, MARGALIT H. *In vivo* cleavage rules and target repertoire of RNase III in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(19): 10530-10531.
- [20] KÖHLER T, CURTY LK, BARJA F, VAN DELDEN C, PECHÈRE JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(21): 5990-5996.
- [21] HARSHEY RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 249-273.
- [22] WHITELEY M, GREENBERG EP. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5529-5534.
- [23] RECINOS DA, SEKEDAT MD, HERNANDEZ A, COHEN TS, SAKHTAH H, PRINCE AS,

- PRICE-WHELAN A, DIETRICH LEP. Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(47): 19420-19425.
- [24] CHOI KH, SCHWEIZER HP. Mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 153-161.
- [25] HOANG TT, KUTCHMA AJ, BECHER A, SCHWEIZER HP. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains[J]. Plasmid, 2000, 43(1): 59-72.
- [26] CHIANG P, HABASH M, BURROWS LL. Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus ATPases involved in twitching motility[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(3): 829-839.
- [27] GALÁN-VÁSQUEZ E, LUNA B, MARTÍNEZ-ANTONIO A. The regulatory network of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Informatics and Experimentation, 2011, 1(1): 3.
- [28] CROUSILLES A, DOLAN SK, BREAR P, CHIRGADZE DY, WELCH M. Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(37): 14260-14269.
- [29] NAKAYAMA K, TAKASHIMA K, ISHIHARA H, SHINOMIYA T, KAGEYAMA M, KANAYA S, OHNISHI M, MURATA T, MORI H, HAYASHI T. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage[J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(2): 213-231.
- [30] HAUSER AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(9): 654-665.
- [31] TURNER KH, WESSEL AK, PALMER GC, MURRAY JL, WHITELEY M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(13): 4110-4115.
- [32] CHEN WZ, ZHANG Y, ZHANG YF, PI YS, GU TN, SONG LQ, WANG Y, JI QJ. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species[J]. iScience, 2018, 6: 222-231.

(本文责编 陈宏宇)