

研究报告

整合型碱性蛋白酶基因工程菌中抗性基因的敲除*

唐雪明 邵蔚蓝 王正祥 方慧英 诸葛健**

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 利用大肠杆菌载体 pET-28a 和穿梭载体 pHY300PL 构建了敲除载体 pHK, 通过 DNA 变性技术和同源重组技术成功地敲除了整合型碱性蛋白酶基因工程菌 BP071 中的卡那霉素抗性基因 (Kan^r), 得到 11 株敲除卡那霉素抗性基因的阳性克隆, 并使产酶水平保持稳定。该方法的建立为基因敲除技术在工业微生物研究中应用提供了经验, 并为微生物来源的转基因产品安全性的研究提供了模型。

关键词: 碱性蛋白酶, 基因工程菌 BP071, 抗性基因, 基因敲除

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0001-05

STUDY ON RESISTANCE GENE KNOCK OUT FROM INTEGRATED ALKALINE PROTEASE GENE ENGINEERING STRAIN

TANG Xue-Ming SHAO Wei-Lan WANG Zheng-Xiang FANG Hui-Ying ZHUCE Jian

(The key laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education,

School of Biotechnology Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The knock out vector pHK was constructed with *E. coli* vector pET-28a and shuttle vector pHY300PL, by using denatured DNA and homologous recombination technique, the kanamycin resistance gene (Kan^r) from integrated alkaline protease gene engineering strain BP071 was knocked out successfully, and the 11 positive clones were obtained. The yield of the best positive clone BP0715 was stable as same as BP071. The methods provided the good experience for the industrial microbiology research, and it was foundation for studying on the safety of genetically modified organisms.

Key words: Alkaline protease, Gene engineering strain BP071, Resistance gene, Knock out

基因敲除 (gene knock-out) 是指外源 DNA 与受体细胞基因组中顺序相同或相似的基因间发生同源重组, 整合至受体细胞基因组中并得以表达的一种外源 DNA 导入技术。在微生物代谢工程研究中, 基因敲除与基因克隆技术同等重要, 广泛应用于构建具有特定突变的工程菌, 改变生物代谢途径, 阻断副反应的进行, 防止副产物或有毒产物形成, 促进目的产物积累等方面。随着重组 DNA 技术的发展, 研究者多采用将克隆的目的基因进行定点突变, 然后导入宿主细胞, 利用某些机制筛选得到目的基因敲除突变株。目前国内在关于基因敲除在微生物应用研究方面的工作还很少^[1-3]。

在整合型碱性蛋白酶工程菌的构建过程中, 我们通过不断提高抗生素的浓度插入了多个拷贝的碱性蛋白酶基因, 同时也插入了的多拷贝的卡那霉素抗性基因, 随着染色体的复制而复制。然而, 在工业化大规模生产中, 这种含有抗性基因的菌种的表达

* 教育部高等学校骨干教师项目资助 (No.2000-65)

** 联系人

收稿日期: 2002-06-25, 修回日期: 2002-09-28

可能对生态环境造成新的污染,即所谓的转基因污染,而这种新的污染源又是很难消除的。转基因产物的安全性问题已经日益引起人们的关注,而碱性蛋白酶又是应用非常广泛的酶制剂,所以为尽可能的避免所谓的转基因污染,我们利用基因敲除技术,对此前的工作所得到的整合型碱性蛋白酶工程菌 BPO71 中的卡那霉素抗性基因进行了敲除研究。

1 材料与方法

1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Escherichia coli* 菌株: JM109, 整合型工程菌 BPO71 (在摇瓶条件下, 比出发菌株产酶水平提高了 85%); 质粒 pET-28a (NOVAGEN 公司); pYH300PLK 穿梭载体 (含大肠杆菌和枯草芽孢杆菌复制起点) 为日本福井大学 TAKAGI 教授惠赠。

1.1.2 工具酶和试剂: Taq DNA 聚合酶购自 NEW ENGLAND BIOLABS 公司; 限制性内切酶 *Sma*I、*Pvu*I、*Bam*HI、*Eco*RI 购自 TAKARA 公司; Klenow 片段、T4DNA 连接酶购自华美生物工程公司 (上海); Gel Extraction Min Kit, PCR Purification Min Kit 购自华舜公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: LB 液体培养基按常规方法配制, 在液体培养基中添加 1.5% 的琼脂即为 LB 固体培养基, LB 固体和液体培养基在需要时加入卡那霉素至 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 或加入氨苄青霉素至 $50\mu\text{g}/\text{mL}$; 芽孢杆菌基本培养基 (100mL): 20 mL 5 倍的微量盐溶液, 0.5 g 葡萄糖, 0.2 g 酪氨酸; 芽孢杆菌饥饿培养基 (诱导芽孢生成培养基) (100 mL): 20 mL 5 倍的微量盐溶液; 0.5 g 葡萄糖; BY 液体培养基 (1000 mL): 牛肉膏 5 g, 酵母膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 葡萄糖 5g, pH7.2 ~ 7.4。5 倍的微量盐溶液 (1000 mL): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g, K_2HPO_4 74 g, KH_2PO_4 27 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.5 g, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作技术按常规方法^[4]及试剂盒操作说明书进行。

1.2.2 引物的合成与 PCR 扩增: 根据报道的卡那霉素抗性基因及其两段序列, 设计 PCR 反应的引物:

A: 5' 端引物 5' -CGCGGATCTCCATATTCTAACCGGAA -3' 引入 *Bam*HI 酶切位点;

B: 3' 端引物 5' -GCCITTAAGCTCTATCTGAGCATCTAAACG-3' 引入 *Eco*RI 酶切位点;

引物由中国科学院上海生物工程中心合成。在 0.5mL Eppendorf 管中按以下顺序分别加入各试剂:

10 × PCR 缓冲液 10 μL 、25mol/L MgCl_2 5 μL 、2.5mmol/L dNTPs 10 μL 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物 A 和引物 B 各 2 μL 、模板 1 μL 或 2 μL 、加双蒸水至 100 μL 、95 $^\circ\text{C}$ 变性 10min, 加入 Taq DNA 聚合酶, 稍离心沉降, 加石蜡油 1~2 滴进行 PCR 扩增 (94 $^\circ\text{C}$ 50 s, 54 $^\circ\text{C}$ 1min30s, 72 $^\circ\text{C}$ 3min), 经 35 个循环后, 在 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10min。PCR 产物用 Promega 公司 PCR 回收纯化试剂盒进行纯化, 纯化产物进行酶切和连接。

1.2.3 变性双链 DNA 的制备: 采用碱变性法: 9 μL 双链 DNA 溶液中加入 2 μL 1 mol/L NaOH 37 $^\circ\text{C}$ 温育 10min, 然后迅速置于冰上冷却, 再加入 2 μL 1 mol/L HCl 中和, 即可直接用于转化。

1.2.4 电转化: 转化前细胞处理见文献^[5]。将新鲜制备的转化前细胞 0.5mL 在 4 $^\circ\text{C}$ 下

10,000 g 10 min 离心, 弃上清, 加入 0.5 mL 冰水溶解, 如此反复洗涤细胞 3 次, 轻柔操作, 冰浴 10 min, 分别加入浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碱变性处理的敲除载体 DNA, 混匀, 将溶液转移到预冷的无菌电转化池中, 吸干池表面的水分, 将电转化池放入电转仪的样品槽中, 在 1,750 V 下, 25 μF 下电击转化。迅速取出电转化池, 加入 1 mL BY 液体培养基稀释细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床培养 3 h, 取 200 μL 涂布于 LB 固四环素抗性平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

1.2.5 基因敲除菌的筛选方法: 将转化后的菌液涂布 LB Tet 抗性平板, 培养 16 h 后将阳性转化子用灭菌牙签分别点到 Tet、Kan 平板上, 一一对应进行标记。筛选出在 Tet 平板上可以生长, 在 Kan 平板上不能生长的菌株。再将这些转化子在无 Tet 压力的培养基中培养 48 h, 取 100 μL 菌液涂布 LB 平板, 培养 16 h, 再用灭菌牙签分别点到含 Tet 和无抗生素的 LB 平板上, 一一对应进行标记。那些能在 LB 平板上生长而在 Tet 平板上不能生长的菌株, 即为丢失了载体 pHK 的菌株, 这些菌株内已经不含有抗性基因, 是筛选所有需的目的菌株。

1.2.6 酶活测定方法: 按部颁行业标准 QB/1803^[6] 进行酶活定义: 1 mL 液体酶, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 pH 10.5 的条件下, 1 min 水解 1 μg 酪素产生 1 μg 酪氨酸为 1 个活力单位, 以 u/mL 表示。

2 结果与讨论

2.1 卡那霉素抗性基因敲除载体的构建

构建敲除载体的原则是基于利用基因同源重组的方法将体外失活的卡那霉素抗性基因替换基因组上正常的抗性基因。通过同源重组进行基因敲除构建时, 由于同源重组是一个低频率事件, 所以要求目的基因两端的同源片段的长度对重组效率有很大的影响, 为了保证同源重组的高效发生, 需要一定长度的同源序列。根据卡那霉素抗性基因两端的序列设计引物, 用以扩增失活后的基因片段。并将该片段连接到穿梭载体 pHY300PL 上, 作为敲除载体。

基因敲除载体的构建路线如图 1 所示。pET-28a 中含有的卡那霉素抗性基因全长 807 bp, 经过 DNAMAN 软件分析, 发现该基因的 300 bp 和 426 bp 处分别为 *Sma*I、*Pvu*I 酶切位点, 在 pET-28a 中 *Sma*I、*Pvu*I 均为单酶切位点。用 *Sma*I、*Pvu*I 对 pET-28a 进行双酶切, 凝胶回收酶切产物, 用 Klenow 片段进行补平, 灭酶后用 T4 DNA 连接酶进行连接。取连接产物进行 PCR, 得到 681 bp 的片段, 回收 PCR 产物, 并用 *Bam*HI、*Eco*RI 进行双酶切。同时用 *Bam*HI、*Eco*RI 将 pHY300PLK 进行双酶切。用 T4DNA 连接酶将上述双酶切后 PCR 产物和线性化 pHY300PLK 进行连接, 得到用于进行基因敲除的载体命名为 pHK。该质粒包含了失活的卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因和四环素抗性基因。图 2 为用 *Bam*HI、*Eco*RI 进行双酶切 pHK, 得到与预期一致的 681 bp 左右的片段, 确证得到所需要的敲除载体。

2.2 基因敲除菌的筛选

pHY300PLK 质粒在地衣芽孢杆菌中分配不稳定, 在细胞分裂过程中易于出现质粒丢失的细胞, 在无抗性压力条件下培养 10~50 代就会出现很多质粒丢失的细胞^[7]。因此将突变基因构建在此类质粒上, 再让发生重组后的质粒丢失即可。构建时将插入卡那霉素抗性基因失活片段的敲除载体转化入 C600 大肠杆菌, 得到在 LB Amp 抗性平板上能够生

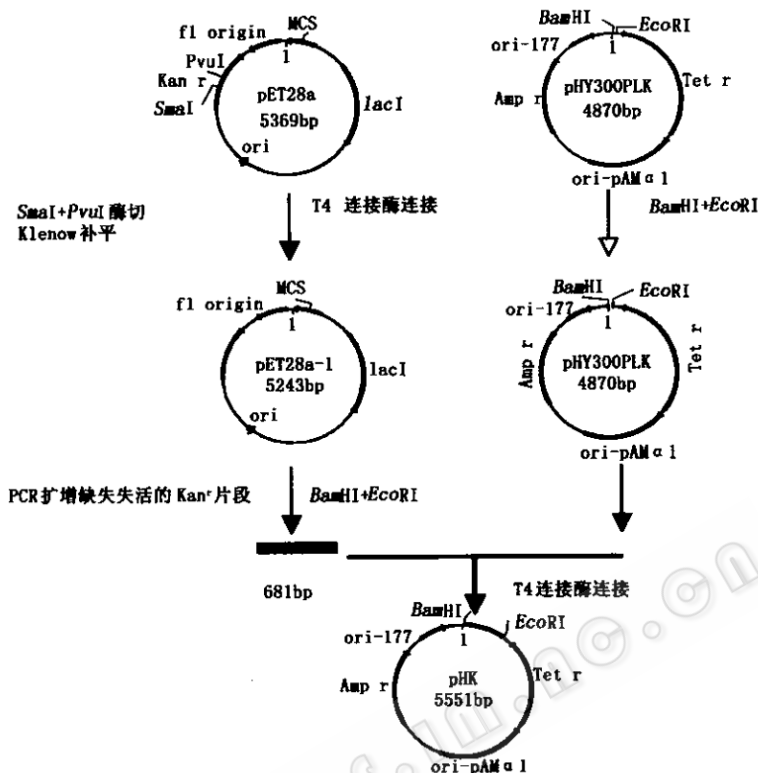


图1 基因敲除载体 pHK 的构建路线

长的转化子,大量抽提 pHK 质粒,经过碱变性方式处理后,以 BP071 为宿主,进行电转化。按照所设计的筛选方法,筛选只能在 LB 平板上生长,而在 Kan、Tet 平板上均不能生长的转化子。实验中共筛选得到 11 株。

2.3 阳性转化子的产酶比较

分别将得到 11 株转化子及用于作对照的 BP071 接种于 BY 液体培养基

表 1 抗性基因敲除后阳性转化子的产酶比较

菌株	酶活 (u/mL)
BP071	8520
BP0711	7779
BP0712	7932
BP0713	7688
BP0714	8027
BP0715	8534
BP0716	8075
BP0717	8117
BP0718	7969
BP0719	8072
BP0720	8093
BP0721	7948

中, 37℃, 220 r/min 培养 48h, 每株菌做了 3 摇瓶, 取平均值。结果如表 1 所示, 各菌株产酶水平比较

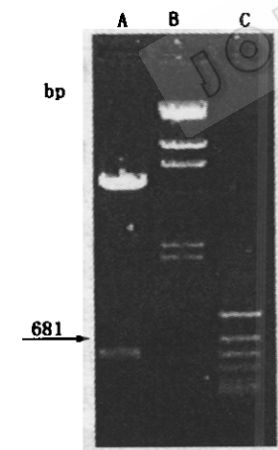


图 2 pHK 双酶切凝胶电泳鉴定

接近,其中以 BP0715 产酶水平最高。与 BP071 产酶水平基本一致。

在微生物代谢工程研究中基因敲除技术可以用于终止某一基因表达或引入新的外源基因,还可以用于定点突变^[8]。Rorader D L 等

人在敲除欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi* 中果胶酶基因 *pelC* 时,采用无抗生素压力及低磷诱导使敲除载体 pBR322 衍生质粒的丢失,结果非常理想^[9]。陈芳等亦通过此中方式通过培养诱导 pBR322 衍生质粒的丢失也获得成功^[10]。作者在前期中工作中通过构建整合载体 pAPR1 实现了碱性蛋白酶基因在染色体区域上拷贝数的扩增^[11],扩增是经过逐步提高培养液中卡那霉素的水平筛选而得到的。整合扩增方式如图 3 所示,整合质粒 pAPR1 的碱性蛋白酶基因与宿主地衣芽孢杆菌蛋白酶基因高度同源,在整合子的培养过程中,染色体进行复制,通过不断提高卡那霉素的浓度,实现新生代染色体中同源序列不等位交换,使整合子对卡那霉素的抗性在一定范围内增加,以致碱性蛋白酶基因在宿主染色体上实现扩增。本实验中,为了终止抗性基因在工程菌中的表达,我们从 pBR322 衍生质粒和 pMA 衍生质粒构成的 pHY300PLK 载体入手,构建了敲除载体 pHK,通过碱变性的方法使双链环状 DNA 部分氢键断裂,造成部分单链区使其成为同源重组的最佳底物,经电转化导入此前构建的整合型碱性蛋白酶工程菌中,经过反复筛选得到了 11 株不含抗性基因的整合型碱性蛋白酶工程菌。为转基因产品安全性的研究提供了成功的经验。

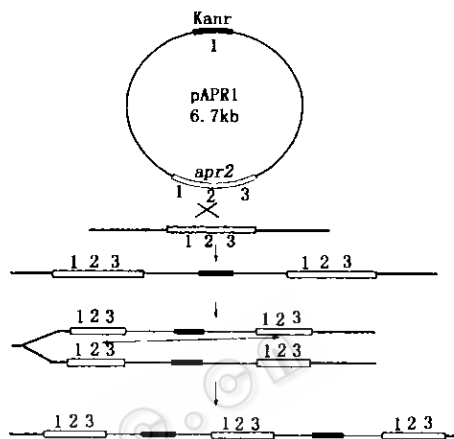


图 3 碱性蛋白酶基因在染色体上的扩增模式

在宿主染色体上实现扩增。本实验中,为了终止抗性基因在工程菌中的表达,我们从 pBR322 衍生质粒和 pMA 衍生质粒构成的 pHY300PLK 载体入手,构建了敲除载体 pHK,通过碱变性的方法使双链环状 DNA 部分氢键断裂,造成部分单链区使其成为同源重组的最佳底物,经电转化导入此前构建的整合型碱性蛋白酶工程菌中,经过反复筛选得到了 11 株不含抗性基因的整合型碱性蛋白酶工程菌。为转基因产品安全性的研究提供了成功的经验。

参考文献

- [1] John T. Science, 1992, 256:1392.
- [2] Msaor S T. Nature, 1988, 336: 348 ~ 350.
- [3] 刘德培, 方福德, 梁植权. 生理科学进展, 1995, 26: 909 ~ 913.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 曼尼阿蒂斯 T. (金冬雁等译). 分子克隆指南(第二版), 北京: 科学出版社, 1995.
- [5] 唐雪明, 邵蔚蓝, 沈微, 等. 生物技术, 2002, 12(4): 13 ~ 15.
- [6] 中华人民共和国轻工业部部颁标准: 洗涤剂用碱性蛋白酶制剂标准. QB1806-93, 1994.
- [7] Ishima H, Tsuchida N. Gene, 1984, 32: 129 ~ 134.
- [8] 廖军, 徐冲, 杨永辉, 等. 遗传学报, 2000, 27: 449 ~ 454.
- [9] Rorader D L, Collmer A. J Bacteriology, 1985, 164: 51 ~ 52.
- [10] 陈芳, 陈策实, 李越, 等. 微生物学报, 2000, 40: 475 ~ 480.
- [11] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 等. 第三届全国发酵工程学术讨论会论文集. 北京: 中国轻工出版社, 2002. 11.