

技术与方法

一种快速、精确构建大肠杆菌组氨酸营养缺陷型的方法*

王 芃 袁盛凌 郑继平 李淑琴 段海清 张兆山**

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要: 将表达 Red 体内重组蛋白的质粒 pKD46 转化大肠杆菌 DH5 α , 用 5' 端与组氨酸基因同源, 3' 端与卡那霉素抗性基因同源的引物获得具有卡那霉素抗性基因的 PCR 产物, 然后电击转化 DH5 α , 在 λ Red 重组系统的帮助下, 通过卡那霉素抗性基因两侧的组氨酸基因序列在体内与大肠杆菌染色体上的组氨酸基因发生同源重组, 置换了 DH5 α 组氨酸操纵元中的 *hisDCB* 基因, 最后利用卡那霉素抗性基因两端的 FRT 位点, 通过 FLP 位点专一性重组将卡那霉素抗性基因去除, 最终获得了不具抗性的大肠杆菌组氨酸营养缺陷型菌株。为在大肠杆菌及其他菌株中快速、精确的构建营养缺陷型菌株提供了有益的参考。

关键词: 大肠杆菌, 营养缺陷型, 体内同源重组

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 02-0095-05

A QUICK AND PRECISION METHOD TO CONSTRUCT *ESCHERICHIA COLI* HISTIDINE AUXOTROPH

WANG Peng YUAN Sheng-Ling ZHENG Ji-Ping LI Shu-Qin DUAN Hai-Qing ZHANG Zhao-Shan

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract: λ Red in vivo recombination is a new kind of genetic engineering technique based on homologous recombination. In this work, plasmid pKD46 which expresses Red recombination proteins is transferred into *Escherichia coli* strain DH5 α . The kanamycin resistant gene is generated by PCR by using primers with homology to *hisDCB* gene of *E. coli* chromosome. Thus, the *hisDCB* gene was replaced with kanamycin resistant gene by the plasmid recombination system, then the resistant gene was eliminated by a helper plasmid encoding the FLP recombinase. At last, a *E. coli* histidine auxotroph which is sensitive to kanamycin was got. The results indicate that Red in vivo recombination is a convenient method to construct auxotrophs.

Key words: *Escherichia coli*, Auxotroph, In vivo homologous recombination

营养缺陷型菌株在工业微生物的设计育种、遗传学及医学等领域都有着重要作用。我们常常需要获得某种特定营养缺陷型的突变株, 以使用于不同的研究和实际应用。众所周知, 筛选出特定营养缺陷型菌株是十分困难的, 或者经过复杂的体外构建, 或者经过多次突变筛选^[1,2]。本研究利用 λ Red 体内重组系统, 对大肠杆菌染色体上的组氨酸基因 *hisDCB* 进行体内敲除, 得到了组氨酸营养缺陷型菌株。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2001AA215211)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA215211)

** 联系人 Tel: 010-66948834, E-mail: zhangs@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-08-05, 修回日期 2003-10-17

λ Red 体内重组技术的建立要归功于对 λ 噬菌体重组功能的充分认识^[3,4]。 λ 噬菌体 Red 重组蛋白由 *gam*、*bet* 和 *exo* 3 个基因编码的 Gam、Bet 和 Exo 蛋白组成。大肠杆菌本身的 RecBCD 蛋白具有外切核酸酶 V 的功能, 它会将侵入的外源 DNA 降解, λ 重组系统中的 Gam 蛋白可以抑制这种外切酶功能; Exo 蛋白可以将外源双链 DNA 两端按 5'→3' 的方向降解, 产生 3' 单链尾端, Bet 蛋白能结合其上, 从而启动互补链间的退火反应, 使具有同源区域的 DNA 发生重组。这种重组系统的优点在于其所需的同源序列只需 30~50bp, 而如此短的核酸序列完全可以由人工合成, 通过 PCR 方法产生的两端带有上述同源臂的 DNA 片段即可用于在 Red 系统指导下的快速基因敲除^[5-7]。

质粒 pKD46 的构建是将 Red 基因 (*gam*、*bet* 和 *exo*) 克隆到一个低拷贝质粒中, 并在阿拉伯糖诱导的 *ParaB* 启动子的启动下表达 Red 重组蛋白, 此质粒具有温度敏感型复制元, 在温度高于 37℃ 时可以自动去除。模板质粒 pKD4 具有带 FRT (FLP 重组酶识别位点) 的卡那霉素抗性基因^[5]。进行体内基因敲除的外源 DNA 片段是两端具有与 *E. coli* 的 3.5kb 组氨酸基因 *hisDCB* 侧翼同源的卡那霉素抗性基因, 它是以质粒 pKD4 为模板经 PCR 扩增而来。将质粒 pKD46 转化 *E. coli* 的 DH5 α 株中, 通过阿拉伯糖诱导表达 Red 体内重组蛋白, 电击转化外源 DNA 使之在 DH5 α 染色体上进行体内同源重组, 产生 *his⁺kan⁺* 重组体。质粒 pCP20 表达 FLP 重组酶, 可以通过 FRT 位点将 *his⁺kan⁺* 重组体的卡那霉素抗性基因去除, 由于 pCP20 也受控于温度敏感型复制子, 因此也可以通过调节温度去除。最终, 本研究通过体内重组方法得到了大肠杆菌组氨酸营养缺陷株。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ *M15*) *hsdR17* *recA* *endA* *gyr96* *thi-re* *relA1*] 由本室保存。质粒 pKD46 [*ori*101 *repA*101 (*ts*) *araBp-gam-bet-exo*], pKD4 (含有两边带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因, *Kan^r*), pCP20 [*ts-repC* I 857 (*lambda*) (*ts*)] 均由 B.L. Wanner 博士^[5]馈赠。

1.2 引物

用于基因敲除的外源 DNA 的 PCR 扩增引物 KH1 (5'GGTCCTGCGGATTGAGAAGATGATGCGATGATCGCCGTGTAGGCTCGACCTGCTTC3'), KH2 (5' CACCACGTTTCAT TACAGCACTCCTTTCGACGAGGGCATGGGAATTAGCCATGCTCC3'), 它们分别由 5' 端 36nt 的组氨酸基因同源区和 3' 端 20nt 的模板质粒 pKD4 的卡那霉素抗性基因同源区组成; 用于检测卡那霉素抗性基因的 PCR 扩增引物 K1 (5'CGGTGCCCTGAATGAACTG C3') 和 K2 (5'CGGC-CACAGTCGATGAATCC3'), 用于检测敲除掉的组氨酸基因的 PCR 扩增引物 H1 (5'ATC-GACAAACTCCTGACCCG3') 和 H2 (5'ATATGTGGCAGTGGCAGA CC3') 均由北京三博远志生物技术公司合成。

1.3 PCR 产物的处理

PCR 产物中存在的质粒模板会造成重组产物的假阳性化, 为此选用 *Dpn* I 酶作用于 PCR 产物, 它可以将甲基化的模板质粒分解, 对于没有甲基化的 PCR 产物则没有作用^[8]。将 *Dpn* I 作用后的 PCR 产物用乙醇沉淀法进行回收。

1.4 Red 基因的诱导表达和感受态细胞的制备

将编码 Red 重组系统的质粒 pKD46 用 *CaCl₂* 法转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 将宿主菌

在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中 30℃ 过夜振荡培养, 接种 1mL 菌液于 50mL 的含有 Amp 的 LB 中, 30℃ 振荡培养 3 ~ 4h, 至 $OD_{600} \approx 0.6$ 。在培养终止前 1h 加入 L-阿拉伯糖, 使之终浓度为 1mmol/L。离心收集菌体, 用 10% 甘油洗 3 ~ 4 次, 最后将菌体重悬于 500 μ L 冷的无菌 10% 甘油中, 取 50 μ L 用于电击转化。

1.5 电击转化

取 2 μ L PCR 产物与 48 μ L 的感受态菌混合, 将混合物吸入 0.1cm 的 Bio-Rad 电转杯进行电击, 设置电压 1.8kV, 脉冲 25 μ F, 控制器 200 Ω 。电击后快速加入 1mL 冰冷的 LB 培养基。37℃ 振荡培养 1h, 然后取 100 μ L 菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上, 37℃ 过夜培养, 挑选重组子。

1.6 卡那霉素抗性基因的去除

质粒 pCP20 表达 FLP 重组酶, 作用在重组体染色体上两个 FRT 之间的靶位点上, 使卡那霉素抗性基因丢失。将具有氨苄青霉素抗性的质粒 pCP20 利用 $CaCl_2$ 方法转化进入 *his⁺kan^r* 阳性菌株中, 于 30℃ 培养条件下在含有 Amp 和 Kan 的平板上获得阳性转化子。然后转接到没有抗生素的 LB 培养基中, 42℃ 培养 5h, 37℃ 平板划线培养。对所得到的单菌落进行 Amp 和 kan 敏感检测, 最后的 Amp^rkan^s 表型菌株就是去除掉 Kan 基因的重组菌。

1.7 质粒 pKD46 Red 体内重组系统进行基因敲除的操作步骤

用质粒 pKD46 系统进行染色体上的基因敲除一般包括 4 个步骤: (1) 合成一对分别带有两部分同源序列的引物 H1-P1 和 H2-P2 (5' 端的 H1 和 H2 与需敲除的靶基因边缘序列同源, 3' 端的 P1 和 P2 与抗性基因两端序列同源), 以合适的靶基因 DNA 作模板扩增相应的抗性基因。(2) 将 PCR 产物转化至含有质粒 pKD46 的宿主菌中, 由于 PCR 产物两端的短序列与靶序列两端同源, 通过同源重组的作用, 抗性基因置换了靶基因。(3) 筛选出带有该抗性基因的重组菌株, 对表型和基因型作进一步的鉴定。(4) 将编码位点专一性重组酶——FLP 重组酶的质粒 (pCP20) 转化至上述重组菌株中, FLP 重组酶识别抗性基因两端的 FRT 位点并促使重组发生, 从而使抗性基因丢失。

2 结果

2.1 *hisDCB* 基因缺失重组体的构建

大肠杆菌组氨酸操纵元由 *hisL*、*hisG*、*hisD*、*hisC*、*hisB*、*hisH*、*hisA*、*hisF* 和 *hisIE* 9 个基因组成^[9,10] 他们负责合成大肠杆菌组氨酸合成所需要的酶。组氨酸操纵元中的 *hisDCB* 基因负责组氨酸合成的最后 3 步: 转氨基, 去磷酸和脱氢作用, 它们是组氨酸合成必不可少的成分^[11], 它们的缺失会造成组氨酸的营养缺陷型, 使菌株的生长对组氨酸有依赖性。用于 PCR 产物扩增的 5' 端引物 KH1 包括与宿主 DH5 α 染色体的组氨酸基因 *hisG* 末端同源的 36bp 碱基和 pKD46 质粒序列 31 ~ 50 共 20bp 碱基; 3' 端引物 KH2 包括与 *hisB* 末端同源的 36bp 碱基和 pKD46 质粒序列 1,507 ~ 1,526 共 20bp 碱基, 这样, 以 pKD46 为模板进行 PCR 扩增, 得到的大小为 1.5kb 左右, 两端具有与 *his* 基因同源的短序列并携带

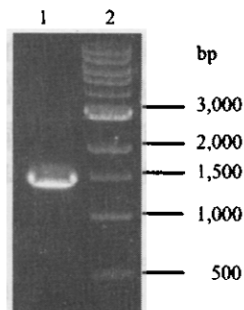


图 1 外源 DNA 的 PCR 产物
1 PCR 扩增产物, 2 1kb 标志物

有 FRT 位点的 *kan* 抗性基因片段 (图 1)。为了避免 PCR 产物中的质粒模板也被转化从而产生假阳性结果, 将 PCR 产物用 *Dpn* I 酶酶切, 甲基化的模板就被分解掉了。将 PCR 产物电击转化至已含有质粒 pKD46 的 DH5 α 的电击感受态细胞中。在含有卡那霉素的 LB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 筛选阳性克隆。由于 pKD46 为温度敏感型质粒, 因此升高温度到 42 $^{\circ}$ C 对阳性克隆进行筛选, 不具有氨苄青霉素抗性的菌株就是证明已经丢失了质粒 pKD46 的重组子。

用与卡那霉素抗性基因同源的 K1 和 K2 作为引物, 以 37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养的菌液为模板对它进行 PCR 鉴定, 得到了大小约为 0.5kb 的产物 (图 2), 证明卡那霉素抗性基因已经存在于染色体上; 再用与组氨酸基因同源的引物 H1 和 H2 进行 PCR 鉴定, 得到了约 2kb 的产物 (图 3, 第 3 泳道), 证明 3.5kb 的 *hisDCB* 基因已被敲除而代之以 1.5kb 的卡那抗性基因, 鉴定结果与预期一致。表型实验也证明, 阳性菌株只在含有组氨酸 (40 μ g/mL) 的基本培养基 M9 中生长, 在不含组氨酸的 M9 培养基中则完全不生长。PCR 鉴定和表型鉴定已经证明大肠杆菌 DH5 α 的 *hisDCB* 基因已经被含有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因替换掉了。

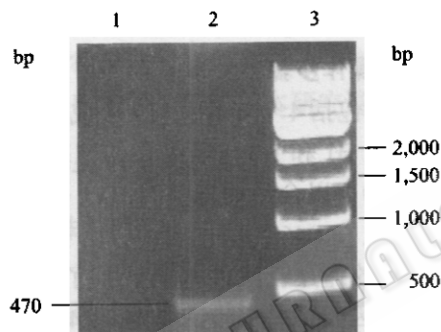


图 2 *his⁺kan⁺* 重组体 *kan* 抗性基因的 PCR 鉴定

1 DH5 α (阴性对照), 2 *his⁺kan⁺* 重组体,
3 1kb 标志物

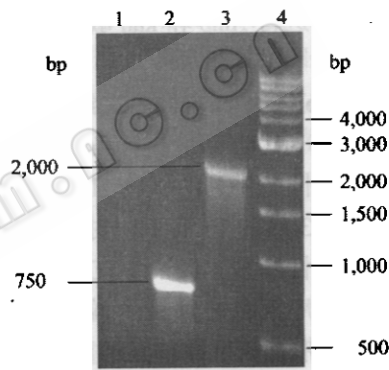


图 3 *his⁺kan⁺* 重组体和 *his⁺kan⁺* 重组体组氨酸基因的 PCR 鉴定

1 DH5 α (阴性对照), 2 *his⁺kan⁺* 突变体,
3 *his⁺kan⁺* 突变体, 4 1kb 标志物

2.2 *his⁺kan⁺* 重组体卡那霉素抗性基因的去除

FLP 位点特异性重组酶的 34bp 的识别位点 FRT 是典型的位点特异性重组靶点区 (SSRT)。重组产物受到 FLP 位点特异性重组酶的作用后将抗性基因去除掉, 仅在作用位点处留下了重组靶点区 FRT。质粒 pCP20 表达 FLP 重组酶, 作用在重组体染色体上两个 FRT 之间的靶位点上, 使卡那霉素抗性基因丢失。将质粒 pCP20 转化进入 *his⁺kan⁺* 阳性菌株中, 经过筛选后最后得到的 *Amp^rkan^r* 表型菌株就是去除掉 *Kan* 基因的重组菌。将 *his⁺kan⁺* 阳性菌株 37 $^{\circ}$ C LB 过夜振荡培养, 取 5 μ L 菌液煮沸作为模板, 以组氨酸基因的引物 H1 和 H2 作为模板, 扩增出 700bp 左右的 DNA 产物 (图 3, 第 2 泳道), 这与预期结果相符合。将 *his⁺kan⁺* 菌株 PCR 鉴定扩增出 700bp 左右的 DNA 产物以组氨酸基因的引物 H1 和 H2 作为测序引物进行序列测定, 序列分析显示, 运用 pKD46 体内重组系统成功的将大肠杆菌染色体上的 *hisDCB* 基因从组氨酸操纵元 *hisLGDCBHAFIE* 上敲除掉了, 并留下了一个 FRT 位点。这与我们的预期结果相一致。

3 讨论

pKD46 质粒体内重组系统将 Red 重组基因——*gam*、*bet* 和 *exo* 构建于温度敏感型的载体上, 并使它受阿拉伯糖诱导的 *ParaB* 启动了控制。这种方法的优点在于由于质粒的灵活性, 可以将它应用于大肠杆菌的不同菌株甚至不同菌种之间; 并且由于质粒可以通过调节温度轻易去除, 使改造后的受体菌可以保持遗传稳定性和背景的单纯性。

本研究运用质粒 pKD46 系统成功地将大肠杆菌 DH5 α 染色体上组氨酸操纵元的 *his-DCB* 基因置换以卡那霉素抗性基因, 又通过 FTP 重组系统将此基因剔除。通过对重组菌株的抗性基因和组氨酸操纵元进行 PCR 鉴定、DNA 序列分析和表型分析可以确证已经运用 Red 体内重组系统成功地构建了大肠杆菌 DH5 α 组氨酸缺陷株。

实验发现质粒 pKD46 体内重组系统可以在大肠杆菌染色体上实现精确位置的基因敲除, 并可以利用模板质粒 pKD4 实现卡那霉素抗性基因的替换以利于重组菌株的筛选, 完全抛弃了以往依赖于酶切与连接的传统基因工程操作手段, 因此不必在乎是否有合适的酶切位点、DNA 长度和碱基组成, 真正实现了在染色体上的“随意”操作; 而且由于引入 pCP20 质粒使抗性基因的去除变得轻而易举, 因此整个染色体基因敲除株的构建过程条理清楚, 周期短, 一般一周左右的时间就可以筛选到阳性重组株。在实验中我们注意到当将质粒 pKD46 转化到不同的宿主菌时 Red 重组蛋白的表达会有变化。因此摸索出不同宿主菌中最佳阿拉伯糖浓度和诱导时间是提高重组效率的关键。

营养缺陷型菌株在分子生物学中有着较高的应用价值, 传统方法制备营养缺陷株步骤繁琐, 耗时长。本研究的思路和技术方法为其便捷、高效的制备提供了有益的参考, 国内已有报道运用此方法在大肠杆菌和痢疾杆菌中实现了染色体上的基因敲除^[7]; 而国外也有报道将这种方法与细菌人工染色体 (BAC) 文库技术相结合, 在真核生物体内实现了基因敲除^[12]。

参考文献

- [1] 潘军华, 张星元. 武汉工业学院学报, 2002, (2): 8~10, 15.
- [2] 金 明, 韩照中, 苏国富. 生物工程进展, 2000, 20 (2): 49~51.
- [3] Poteete A R. FEMS Microbiol Lett, 2001, 201 (1): 9~14.
- [4] Murphy K C. J Bacteriol, 1998, 180 (8): 2063~2071.
- [5] Datsenko K A, Wanner B L. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97 (12): 6640~6645.
- [6] Muylers J P, Zhang Y, Stewart A F. Genet Eng (NY), 2000, 22: 77~98.
- [7] 王恒樑, 冯尔玲, 史兆兴, 等. 军事医学科学院院刊, 2002, 26 (3): 161~164.
- [8] Yu D, Ellis H M, Lee E, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 5978~5983.
- [9] Goldschmidt E P, Cater M S. Genetics, 1970, 66 (2): 219~229.
- [10] Chiariotti L, Nappo A G, Carionagno M S, et al. Mol Gen Genet, 1986, 202: 42~47.
- [11] Blasi F, Bruni C B. Curr Top Cell Regul, 19: 1~45.
- [12] Liu P, Jenkins N A, Copeland N G. Genome Res, 2003, 13: 476~484.