

利用 λ -Red 重组系统和平衡致死系统改造抗药性致腹泻工程疫苗

袁盛凌 王 芃** 刘向昕 王艳春 展德文 张兆山*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要: 质粒 pMM085 是含有猪毒素源性大肠杆菌 (ETEC) 的黏附素 K88 与无毒肠毒素 LTA⁻B⁺ 基因的重组质粒, 含氯霉素抗性基因, 由此构建的菌苗株带有抗药性。利用平衡致死系统改建此疫苗株, 即将质粒上的氯霉素抗性基因 *cat* 替换成 *asd* 基因, 并把新构建的质粒转移到缺失 *asd* 基因的大肠杆菌 X6097 中。但由于质粒 pMM085 是一个 23kD 的大质粒, 传统的基因工程操作不易进行, 利用 λ -Red 重组系统, 将表达 Red 重组蛋白的质粒 pKD46 转化含 pMM085 的大肠杆菌 X6097, 并用两端各带有 39nt *cat* 基因同源区、含全长 *asd* 基因的 PCR 产物电击转化此感受态细胞, 在 λ -Red 重组系统的帮助下, 成功实现了 *asd* 基因对 *cat* 基因的置换。

关键词: λ -Red 重组系统, 抗药性基因, 平衡致死系统

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0010-06

Utilization of λ -Red Recombination System and Balanced Lethal System to Reconstruct the Plasmid with Antibiotic Resistant Gene Using in Live Vaccine

YUAN Sheng-Ling WANG Peng** LIU Xiang-Xin WANG Yan-Chun ZHAN De-Wen
ZHANG Zhao-Shan*

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract: Recombination plasmid pMM085 possessed both immunogens heat-labile enterotoxin (LT) and fimbriae antigen K88 of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Although vaccine strain MM-3 carrying pMM085 had good effect to protect piglets against diarrhea due to ETEC infections, it was not ideal live vaccine for pMM085 bringing chloramphenicol resistance gene (*cat*). To solve the problem, the host-plasmid balanced lethal system was introduced which including the replacement of *cat* gene by *asd* gene and transformation the new plasmid to the strain X6097 which *asd* gene was knocked out in its chromosome. Considering pMM085 was a big plasmid (23kb) and traditional genetic manipulations was not easy to carry on, λ -Red recombination system was adopt in this work to realize the replacement of *cat* gene by *asd* gene. The results indicated that λ -Red recombination system was convenient and efficient to reconstruct big plasmid.

Key words: λ -Red recombination system, Host-plasmid balanced lethal system, Antibiotic resistant gene

毒素性大肠杆菌 (ETEC) 引起新生仔猪腹泻, 是导致仔猪死亡的主要原因之一。ETEC 的主要致病因子为黏附素 (定居因子) 与肠毒素, 前者是菌毛抗原, 病原菌借助它黏附于细胞表面而大量繁殖, 产生肠毒素; 不耐热肠毒素 (LT) 是引起仔猪腹泻的直接原因^[1]。质粒 pMM085 由陈添弥等构建^[2], 是含有 ETEC 黏附素主要型别 K88ac 与无毒肠毒素 LTA⁻B⁺ 基因, 并用氯霉素抗性作为筛选标记的重组质粒。尽管 pMM085

* 通讯作者 Tel: 010-66948834, E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

** 并列第一作者

收稿日期: 2005-05-08, 修回日期: 2005-06-20

转化大肠杆菌 C600, 构建成的菌苗株 MM-3 在动物实验中的免疫效果非常显著, 但由于菌苗株 MM-3 需要大量增殖与使用, *cat* 基因的存在, 有增加环境中抗药性基因, 造成生物公害的可能性, 因此, 有必要对其进行改造。

1988 年 Curtiss 实验组首次在鼠伤寒沙门氏菌中建立了一套宿主-载体平衡致死系统, 为发展基因工程多价疫苗开辟了一条新途径^[3]。对质粒 pMM085 的改造也采取同样的思路, 希望将质粒上的 *cat* 基因缺失或灭活, 用 *asd* 基因替代, 由此构建的质粒转入缺失 *asd* 基因的宿主菌中, 获得无抗药性基因, 又能稳定表达 K88 与 LT 的菌苗株。

以 λ -Red 重组系统为基础的重组工程是一种新型高效的基于体内同源重组的遗传工程技术, 特点是使用长度仅为 <50 个碱基的同源臂高效率地催化体内同源重组反应。质粒 pKD46 是一个工具质粒, 它的构建是将 Red 基因 (*gam*、*bet* 和 *exo*) 克隆到一个低拷贝的质粒中, 并在阿拉伯糖的诱导下表达 Red 重组蛋白, 此质粒具有温度敏感型复制元, 在温度高于 37℃ 时可以自动除去^[4,5]。利用 λ -Red 重组系统对指定基因进行敲除和替换在细菌染色体和细菌人工染色体上的成功例子虽然不少, 但单独针对质粒上基因的操作还鲜有详细的报道。我们的工作表明, λ -Red 重组系统对普通大质粒上指定基因的敲除和替换更为方便和快捷。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

见表 1。

表 1 实验中用到的细菌和质粒

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strain		
MM-3	<i>E. coli</i> C600, contain the plasmid of pMM085	From Chen ^[2]
X6097	<i>E. coli asd</i> ⁻	Dr. Roy Curtiss III
Plasmid		
pLZL1	<i>asd</i> ⁺ , <i>amp</i> ^R	This lab
pMM085	K88ac ⁺ , LTA ⁺ B ⁺ , cm ^R	From Chen ^[2]
pKD46	<i>araBp-gam-bet-exo</i>	Dr. B L Wanner ^[4]

1.2 引物

用于氯霉素基因敲除的外源 DNA 的 PCR 扩增引物为: Forcatasd (5' GAG-GCATTTTC AGTCAGTTCC TCAATGTACC TATAACCAGa AGCCGTTAGC TCCTTCGGT 3'), Revcatasd (5' CCGACATGGA AGCCATCACA AACGGCATGA TGAACCTGAC CAACT-TACTT CTGACAACG 3'), 它们均由 5' 端 39nt 的 *cat* 基因同源区和 3' 端 20nt 的 *asd* 基因同源区组成, 负责在指定位置将 *cat* 基因序列敲除, 并置换成 *asd* 基因。用于检测基因置换是否成功的引物为上游引物 Forcat (5' ATATCCCAATGGCATCGTAA 3') (20nt) 和下游引物 Revcat (5' TGGAAGCCATCACAAACG 3') (18nt), 它们分别与 *cat* 基因上不被敲除的 5' 端一段编码序列和 3' 端一段编码序列序列一致。上述引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.3 融合 PCR 产物的获得和纯化

扩增融合 PCR 产物使用天为时代 pfu DNA 聚合酶, 模板为含完整 *asd* 基因的质粒 pLZL1, 反应体系的配置参照 pfu DNA 聚合酶使用说明书。采用降落 PCR 来获得高特

异性的 PCR 产物: 94℃ 热变性 5min 后, 以 94℃ 热变性 40s, 58℃ 退火 40s 72℃ 延伸 2min, 下一个循环其它条件不变, 退火温度减低 0.5℃, 如此进行 16 个循环, 直至退火温度降到 50℃。然后按照常规 PCR, 以 94℃ 热变性 40s, 50℃ 退火 40s 72℃ 延伸 2min 进行 20 个循环。PCR 产物以 1:200 的比例加入到新的反应体系中, 进行第 2 次 PCR, 以消除模板质粒的影响。第 2 次 PCR 条件同第 1 次 PCR, 产物用胶回收的办法进行纯化, 溶于 50μL 的洗脱液中, 测定 DNA 浓度为 7.8μg/mL。

1.4 感受态细胞的制备

将质粒 pMM085 从宿主菌大肠杆菌 C600 中提取出来, 用 CaCl_2 法转移到大肠杆菌 X6097 中, 筛选依赖二氨基庚二酸 (DAP) 生长, 且含氯霉素抗性的转化子。用同样的办法将此转化子制备成 CaCl_2 法的感受态细胞, 将编码 Red 重组系统的质粒 pKD46 转化至菌体中, 30℃ 培养 24h, 在添加 DAP、氯霉素、氨苄青霉素的 LB 平板上筛选克隆, 作为下一步转化的宿主菌。此宿主菌在 5mL 液体培养基中过夜培养后, 以 1:100 的接种量转接于 50 mL 同样的培养基, 30℃ 震荡培养 2.5h 左右, 至 OD_{600} 大约为 0.2 左右, 加入终浓度为 2mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 Red 重组蛋白的表达。继续培养 1h 左右, 待其 OD_{600} 大约为 0.5 左右时收获菌体, 用 10% 的甘油洗涤 3 次, 最后将菌体悬浮于 400μL 预冷的 10% 的甘油中, 取 25μL 用于电击转化。

1.5 电击转化

取 3μL 左右的 PCR 产物 (23ng DNA), 与 25μL 感受态细胞混合, 将混合物加入到 0.1cm 的 Bio-Rad 电极杯中, 在电压 1.8kV, 脉冲 25μF, 电阻 200Ω 的参数下进行电击; 采用 0.2cm 的电极杯时, 电压调高到 2.5kV, 其余参数不变。电击后迅速加入预冷 1mL LB 液体, 37℃ 孵育 1h 左右, 取 200μL 涂布于 LB 平板上, 37℃ 倒置培养并观察转化子的生长状况。

1.6 全菌 PCR 鉴定含重组质粒的转化子

随机挑取数个克隆, 在 5 mL LB 液体培养基中培养过夜, 取菌液 7μL 加入 PCR 小管中, 在 PCR 仪上以 99℃ 热变性菌体 5min, 降温至 10℃ 1min, 此程序重复一次, 目的是使菌体变性更为充分。然后在各管中加入 35μL 除模板之外的 PCR 反应体系, 采用引物为 Forcat 和 Revcat, Taq DNA 聚合酶为天为时代公司产品。PCR 反应条件: 94℃ 热变性 40s, 52℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 2min 进行 30 个循环。

2 结果

将 *cat* 基因置换成 *asd* 基因, 必须保证 *asd* 基因是包含转录起始元件和转录终止元件的一个完整的基因。通过对质粒 pLZL1 的测序, 发现此质粒上所携带的 *asd* 基因与 GenBank V00262 纪录上的“大肠杆菌天门冬氨酸半醛脱氢酶”序列是一致的, 通过文献 [6] 确认其中包含 *asd* 基因的转录起始元件和转录终止元件。设计一对融合引物, Forcat_{asd} (5' GAGGCATTC AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGa AGCGGTTAGC TCCTTCGGT 3'), 和 Revcat_{asd} (5' CCGACATGGA AGCCATCACA AACGGCATGA TGAACCTGAC CAACTTACTT CTGACAACG 3') 其中 Forcat_{asd} 由 5' 端 39nt 的 *cat* 基因同源区 (从 *cat* 基因编码序列的第 67 位到第 105 位) 和 3' 端 20nt 的 *asd* 基因外同源区 (GenBank V00262 纪录的 *asd* 基因第一个碱基之前的 -28 位至 -9 位) 组成; Revcat_{asd} 由 5' 端 39nt 的 *cat* 基因同源区 (从 *cat* 基因编码序列的第 605 位到第 567 位) 和 3' 端 20nt 的 *asd* 基因外同源区 (GenBank V00262 纪录的 *asd* 基因的最后一个碱基

之后,第 22 位至第 3 位)组成,负责从质粒 pLZL1 上扩增出完整的 1.7kb 的 *asd* 基因,并确定 *cat* 基因编码序列的第 105 位到第 567 位之间的序列置换成 *asd* 基因序列。引物设计好之后,由于两条引物在的 20nt 的 *asd* 基因序列上的 *T_m* 值相差 10℃,采用降落 PCR 的方法扩增 *asd* 基因,取得了很好的结果(图 1)。

通过 PCR 扩增出 *asd* 基因后,为了防止模板质粒 pLZL1 转入宿主菌,造成假阳性结果,第 1 次 PCR 产物以 1:200 的比例加入到新的反应体系中,作为模板进行第 2 次 PCR。第 2 次 PCR 条件同第 1 次 PCR,产物进一步用胶回收进行纯化。

用 CaCl₂ 法制备 X6097 的感受态,先后将质粒 pMM085 和质粒 pKD46 转化至菌体中,再将含两种质粒的宿主菌进行短暂的阿拉伯糖诱导后,制备成电击感受态细胞,与 PCR 产物混合,进行电击。为防止转化子被漏检,把 1mL 孵育的 LB 菌液全部涂板,37℃ 倒置培养并观察转化子的生长状况。

DNA 加入量与质粒的重组效率相对稳定的(表 2)。

表 2 DNA 加量与转化效率之间的关系

感受态细胞体积 (μL)	DNA 加量 (ng)	电极杯大小 (cm)	平板总菌数	转化效率
				(×10 ² 个/μg DNA)
25	23	0.1	5	2.2
25	39	0.1	4	1.0
25	78	0.1	0	0
50	39	0.2	4	1.0
50	78	0.2	11	1.4
80	78	0.2	9	1.2

从表 2 可以看出,在实验条件略微不同的情况下,质粒的重组效率相对稳定,波动在 1.0~2.2×10² 个转化子/μg DNA 之间。唯一没有长菌的平板是感受态细胞体积 25μL、DNA 加量 78ng 这一组,估计是因为外源 DNA 加入的体积占到了感受态细胞体积的近 1/3,破坏了细胞的稳定状态。

挑取平板上分隔良好的单菌落 21 个,液体培养以后做全菌 PCR 鉴定,鉴定结果如图 2 所示。

在从 1 号到 21 号重组克隆中,除了第 20 号是假阳性之外,其余克隆都得到了 1.8kb 的 *asd* 基因特异性扩增带,说明平板上长出的克隆阳性率非常高(本实验为 95% 左右)。值得注意的是,每一个重组克隆都还扩增出了 0.5kb 的代表 *cat* 基因的特异性条带,说明质粒 pMM085 在宿主菌中是以多拷贝形式存在的,λ-Red 重组系统对质粒上指定基因的敲除和替换可能只涉及了 1 个到 2 个拷贝,所以重组子虽然能在选择培养基上生长,但其所含质粒是原始质粒和重组质粒的混合体。用含 75μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基对 1 号到 10 号重组克隆进行培养,表明生长状况良好,表明了宿主菌中质粒 pMM085 的存在。另外,用含 100μg/mL 的氨苄青霉素 LB 液体培养基对 1 号到 10 号重组克隆进行培养,表明生长状况均良好,说明作为重组工具的质粒 pKD46 也存在于

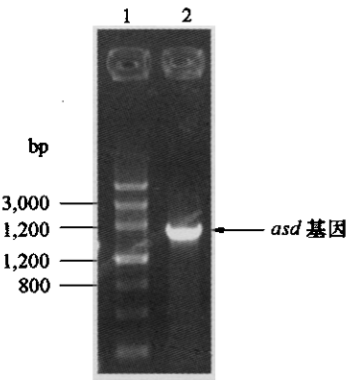


图 1 PCR 扩增 *asd* 基因
1 DNA marker, 2 PCR 扩增产物

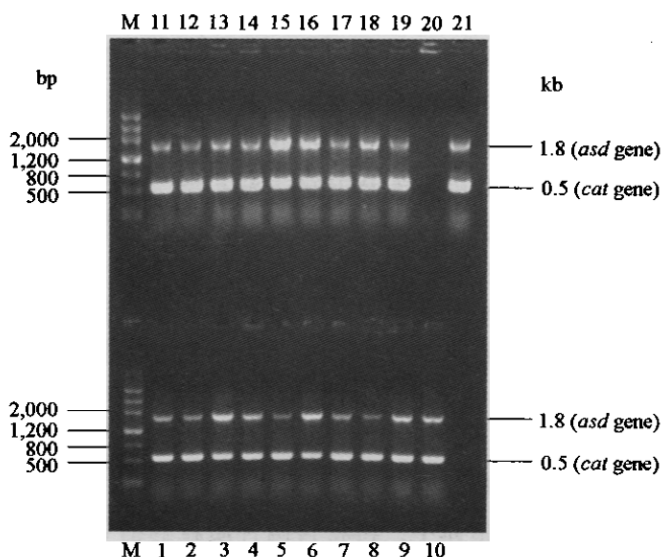


图2 重组子的全菌 PCR 鉴定

M DNA marker, 11~21 各重组子的顺序编号

宿主菌中, 在 37℃ 下传代 1 至 2 代不能消除此质粒。

为了得到只含有置换上 *asd* 基因的重组质粒, 任意挑选一个含有 1.8 kb 的 *asd* 基因特异性扩增带的克隆, 经过培养, 提取质粒后, 将质粒的混合物重新转化到大肠杆菌

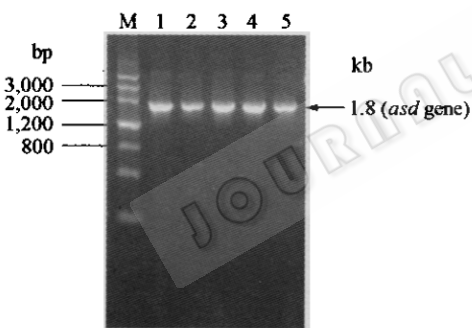


图3 质粒重转化后重组子的全菌 PCR 鉴定

M DNA marker, 1~5 各重组克隆的顺序编号

X6097 中, 用 LB 平板进行筛选。在平板上任意挑选了 5 个克隆, 进行全菌 PCR 鉴定。鉴定结果表明, 1.8 kb 的 *asd* 基因特异性扩增带仍然存在, 而代表 *cat* 基因的 0.5 kb 的特异性条带消失了 (如图 3 所示), 说明宿主菌中已不含原始质粒 pMM085。另外, 任挑 10 个克隆, 对它们进行了氯霉素和氨苄青霉素抗性验证, 表明在给定的抗生素浓度下, 37℃ 摇床培养 36h 以后仍不见有菌体的生长, 进一步说明宿主菌中已不含质粒 pMM085 和 pKD46, 证明提取质粒并重新转化宿主菌, 对重组质粒的纯化

起到了很好的效果。将重组质粒命名为 pMM085-*asd*。

根据文献 [2], 对质粒 pMM085 进行酶切鉴定时, 此质粒有如下特征: (1) *Xho*I 可以将它切成大小为 23 kb 的单一一条带; (2) *Bam*HI 可以将它切成分子量相近, 电泳分不开的两条带。对重组质粒 pMM085-*asd* 进行限制性酶切图谱分析时, 发现插入的 *asd* 基因及其相关序列没有 *Xho*I 酶切位点, 因此 *Xho*I 可以将 pMM085-*asd* 切成大小为 24 kb 的单一一条带; *asd* 基因序列两头各带一个 *Bam*HI 酶切位点, 因此用 *Bam*HI 可以从质粒 pMM085-*asd* 上切出与 *asd* 基因相对应的条带 (如图 4 所示)。质粒 pMM085 和 pMM085-*asd* 酶切鉴定如图 5, 与我们的分析结果相一致。

对 pMM085-*asd* 的 *cat*-*asd*-*cat* 相关部分进行序列测定, 测序结果表明, *asd* 基因的确是从预先设计的指定位点对 *cat* 基因进行了替换。

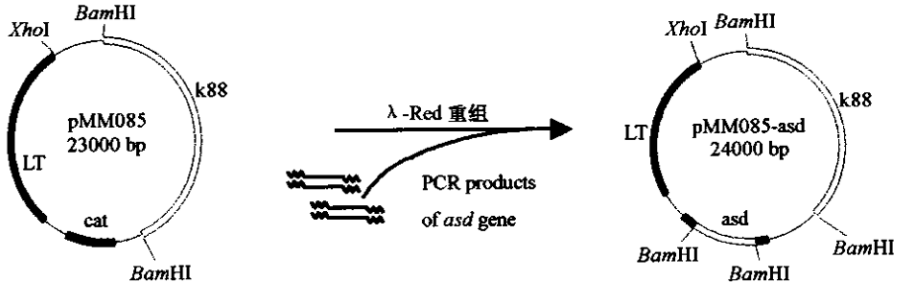


图 4 重组质粒 pMM085 - *asd* 的构建

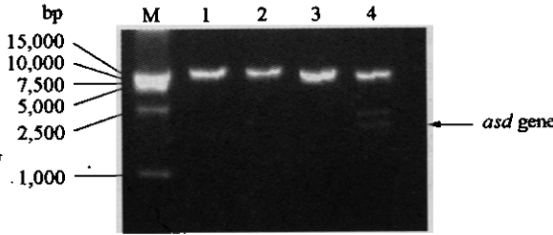


图 5 质粒 pMM085 和 pMM085 - *asd* 的酶切鉴定

M DNA marker, 1 质粒 pMM085/*Xho*I, 2 质粒 pMM085-*asd*/*Xho*I,
3 质粒 pMM085/*Bam*HI, 4 质粒 pMM085-*asd*/*Bam*HI

3 讨论

本课题的目的,是将原始质粒 pMM085 上携带的氯霉素抗性基因 *cat* 置换成 *asd* 基因,并和染色体上敲除了 *asd* 基因的新的宿主菌 X6097 构成平衡致死系统,消除以前疫苗株所携带的抗生素基因对环境的潜在污染。因此,实际操作中不需要分析质粒 pMM085 上的抗原基因以及其它序列,只需要了解氯霉素乙酰转移酶基因 *cat* 和模板质粒 pLZL1 上的 *asd* 基因就足够了。

利用 λ-Red 重组系统在普通质粒上对指定基因进行敲除和替换,的确比较方便快捷,特别是需要操作的质粒构建年代比较久远,详细的限制性酶切图谱不清楚,进行酶切连接操作没有合适方案的前提下,对指定基因或位点进行的操作时非常适合。而且,与在染色体上的基因进行操作相比,质粒在宿主菌中通常是以多拷贝形式存在,目标基因的拷贝数比染色体上基因的拷贝数(通常只是单拷贝)多,从而接触外源 DNA,实现重组的几率更大。本实验表明,在消除了模板质粒带来的假阳性结果后,此重组过程阳性率非常高(95%)。

重组过程带来的原始质粒和新重组质粒的混合存在也是事实,但通过一次提取质粒并重新转化宿主菌就可以轻松解决。

本课题后续工作的开展,主要是验证在更换宿主菌以后,对两个抗原基因的表达会不会造成一定的影响。关于这方面的工作还在进行中。

参考文献

- [1] Levine M M, Kaper J B, Black R E, et al. Microbiol Rev, 1983, 47 (4): 510 ~ 550.
- [2] 陈添弥, 李丰生, 黄培堂, 等. 中国科学 (B 辑), 1989, 12: 1281 ~ 1287.
- [3] Nakayama K, Kelly S M, Curtiss III R. Bio/Technology, 1988, 6: 693 ~ 697.
- [4] Datsenko K A, Wanner B L. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97 (12): 6640 ~ 6645.
- [5] 王 芃, 袁盛凌, 郑继平, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 95 ~ 99.
- [6] Haziza C, Stragier P, Patte J C. EMBO J, 1982, 1 (3): 379 ~ 384.