

基于大肠杆菌受体菌 DH5 α Δasd 缺失株的构建及作为基因转化、表达操作系统的评估

原志伟^{1,2} 朱晓芳³ 朱春红¹ 朱军¹ 王建业¹ 朱国强^{1*}

(1. 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009)

(2. 中华人民共和国荣成出入境检验检疫局 山东 荣成 264300)

(3. 扬州大学临床医学院 江苏 扬州 225001)

摘要: 基于大肠杆菌(*E. coli*)染色体上 *asd* 基因的已知序列, 利用 λ 噬菌体的 Red 同源重组系统一步法构建 *E. coli* DH5 α 的 *asd* 基因缺失突变株 DH5 α $\Delta asd::cat$, 在二次重组中利用携带能够表达 FLP 位点特异性重组酶的质粒 pCP20 介导二次同源重组, 以去除上述缺失突变株中氯霉素抗性筛选基因。结合 PCR 扩增和测序结果, 证明 DH5 α Δasd 缺失突变株的正确构建。该缺失突变株失去了在普通 LB 培养基上生长的能力, 只有添加 DAP 或导入表达 *asd* 基因的质粒(*asd* 基因互补试验)才能在 LB 培养基上生长, 与原型 DH5 α 比较, 其生长速度和生长对数期、接受不同拷贝数质粒的转化效率几乎相一致。基于该缺失突变株构建出以 *asd* 营养基因为标志的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统。体外培养连续传代 50 代次, pnrBMisL-fedF-*asd* 质粒不丢失, 并功能性表达 F18 大肠杆菌黏附素 FedF。

关键词: 大肠杆菌 DH5 α , 受体菌, Red 重组系统, *asd* 基因, 突变株

The Construction of *E. coli* DH5 α Δasd Deletion Mutant and the Evaluation on Its Potential on Gene Transformation-expression System

YUAN Zhi-Wei^{1,2} ZHU Xiao-Fang³ ZHU Chun-Hong¹ ZHU Jun¹
WANG Jian-Ye¹ ZHU Guo-Qiang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(2. Rongcheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of China, Rongcheng, Shandong 264300, China)

(3. Northern People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

Abstract: *E. coli* DH5 α Δasd deletion mutant was constructed by using Red recombination system. First, the chloramphenicol resistance(*cat*)gene flanked by homology extensions of *asd* gene was amplified by PCR. The PCR products were electro-transformed into *E. coli* DH5 α strain, with the help of Red recombinant system, the most part of *asd* gene was *in vivo* replaced by homology extensions connected

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30571374, 30771603); 江苏省属高校自然科学重大基础研究项目(No. 08KJA230002)

* 通讯作者: Tel: 86-514-87972590; Fax: 86-514-87972218; 信箱: yzgzqzhu@hotmail.com; yzgzqzhu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2009-06-21; 接受日期: 2009-09-21

with *cat* gene. *E. coli* DH5α ($\Delta asd::cat$)deletion mutant with *cat* gene was selected by LB plate with DAP and chloramphenicol. The *cat* gene was then eliminated by using a helper plasmid, pCP20, encoding the FLP recombinase; the mutant for the recombinant *E. coli* was named *E. coli* DH5α Δasd which lost the capability of growth on LB plate. The deletion mutant recovered the capability of growth on LB plate when added with DAP component. The function of the *asd* deletion mutant also could be compensated by the plasmid expressing *asd* gene. There were no significant difference in the key characters of growth speed, growth log phase, accepting different origin plasmids with high efficiency between *E. coli* DH5α and *E. coli* DH5α Δasd mutant. Based on the DH5α Δasd mutant, the chromosome-plasmid balanced-lethal system was set up successfully, which was stable for 50 generations of passage culture *in vitro* and expressed the FedF adhesin without antibiotic resistance gene.

Keywords: *E. coli* DH5α, Host strain, Red recombination system, *Asd* gene, Mutant

鉴于临床多种耐药性菌株不断产生和迅速水平传播扩散，FDA 已禁止在重组菌生产中使用抗生素和含抗药性基因作为筛选标志的载体质粒^[1-8]。染色体-质粒平衡致死系统是近年来发展起来的一类以非抗生素作为筛选标记的载体表达系统，它的宿主菌通常是一类染色体管家基因的突变体，该缺陷型菌株不能在基本培养基上生长，当导入带有其完整基因的互补质粒后，质粒与缺陷型菌株即以遗传互补的方式构成染色体-质粒平衡致死系统，此时互补质粒对其宿主菌的生长起到功能性互补的作用，一旦质粒丢失，细菌则由于不能合成必需物质而死亡^[2,4-5,9]。

Red 同源重组技术是一种新型的基因打靶技术，其原理是将一段携带与靶基因两翼同源序列的 PCR 片段导入宿主菌，利用 λ 噬菌体 Red 重组酶(Exo、Beta、Gam 3 种蛋白)，使线性 DNA 片段与染色体上特定的靶序列发生同源重组，靶基因被标记基因置换下来。这种重组技术可直接对染色体进行修饰，

是基因功能研究和重组菌构建的有力工具^[6-8,10-13]。本研究采用 Red 同源重组技术敲除基因工程菌 DH5α 染色体上的 *asd* 基因，获得二氨基庚二酸(DAP)营养缺陷型大肠杆菌 DH5α Δasd 缺失突变株，基于其保留原型优良功能特性，并进一步构建出以 *asd* 营养基因为标志 *E. coli* 染色体-质粒平衡致死系统。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒：本实验用菌株和质粒见表 1。质粒 pKD46 为同源重组的辅助质粒，含温度敏感型复制子，高于 37℃ 该质粒会丢失，阿拉伯糖诱导后能够表达 Gam、Beta 和 Exo 3 个 λ 噬菌体重组酶；pKD3(*oriRγ*, *cat*, *bla*)为 PCR 扩增提供氯霉素抗性基因的模板，氯霉素抗性基因两侧有 FRT 位点(FLP 重组酶识别位点)，为重组转化子提供筛选标志；pCP20 是具有氨苄青霉素(Amp)抗性和氯霉素(Cm) 抗性

表 1 实验中使用的菌株和质粒 Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study		
菌株和质粒 Strain or plasmid	相关基因型和特性 Relevant genotype or characteristics	来源 Source or reference
<i>E. coli</i> DH5α	supE44 $\Delta lacU(\psi 80lacZ \Delta M15)$	[15]
DH5α Δasd	supE44 $\Delta lacU(\psi 80lacZ \Delta M15 \Delta asd)$	[14], [16]
pYA3341	Amp, pUC origin, pTRC promoter	Curtiss R III
pYA3342	Amp, pBR origin, pTRC promoter	Curtiss R III
pYA3332	Amp, p15A origin, pTRC promoter	Curtiss R III
pKD46	Amp, R101ts origin, paraB promoter	[17]
pKD3	Cm, <i>Rγ</i> origin, FLP recombinase site	[17]
pCP20	Amp/Cm, R101ts origin, FLP recombinase	[17]
pnirBMisL-fedF- <i>asd</i>	Amp, ColE1 origin, pnirB promoter	[14], [16]

的质粒, 含有温度敏感型复制子, 能够表达 FLP 重组酶, 42°C 诱导下 FLP 重组酶得到表达, 质粒也逐渐丢失, 该质粒用于消除 FRT 位点间的 *cat* 基因; pYA3341、pYA3342 和 pYA3332 分别为高、中和低拷贝数且都能表达链球菌 *asd* 基因的系列质粒^[7]; pMisL-fedF-*asd* 为同时表达 *E. coli asd* 基因和 F18 黏附素 FedF 的载体质粒, 由本室研究和保存^[14,16]。

1.1.2 试剂和溶液: Taq DNA 聚合酶, DNA 凝胶回收试剂盒, DL2000 DNA Marker, 抗性筛选用 Amp 和 Cm 均购自 TaKaRa 公司; Expand Long Template PCR System 购自 Roche 公司; 质粒提取试剂盒,

pGEM-T Easy vector, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计: 用于同源重组的引物 P1-C1、P2-C2 分别由两部分组成, 5'端加下划线的序列与 *asd* 基因两翼序列同源, 3'端未加下划线的序列与质粒 pKD3 上 *cat* 基因两侧序列互补。在 *E. coli asd* 基因同源重组区域外侧, 设计引物 P3、P4 用于鉴定 *asd* 基因缺失突变菌株; 引物 P5 位于氯霉素抗性基因下游, 与引物 P3 配对用于鉴定第一次同源重组菌, 如表 2 和图 1 所示。

表 2 实验中使用的引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	大小 Size (bp)
P1-C1	<u>CGGTAGGTCGGCTCCGTCTCATGCAACGCATGGTTGAAGAGCGCGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	69
P2-C2	<u>CGACGCAGCGGCTCCGCGGCCCCCACAGCAGCTGGTCGCCCACGGTACATATGAATATCCTCCTTAG</u>	68
P3	ATGAAAAATGTTGGTTTTATC	21
P4	TTACGCCAGTTGACGAAGCATC	22
P5	ATATGAATATCCTCCTTAG	19

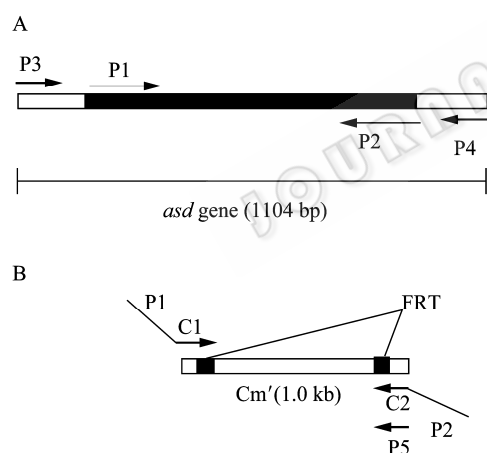


图1 各引物所在大肠杆菌DH5α染色体的相对位置示意图
Fig. 1 The different primers and corresponding position located in *E. coli* DH5α chromosome

注: A: 大肠杆菌 DH5α 染色体; B: 质粒 pKD3.

Note: A: The *E. coli* DH5α chromosome; B: The plasmid pKD3.

1.2.2 含 FRT 位点和 *cat* 基因融合 PCR 产物的制备和纯化: 以质粒 pKD3 为模板, P1-C1、P2-C2 为引物, 进行 PCR 扩增。以第 1 次 PCR 产物稀释溶液作为模板进行二次 PCR, 以消除模板质粒的影响。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测、DNA 回收试剂盒纯化和 DNA 浓度测定。

1.2.3 表达 Red 重组酶菌株的诱导和第 1 次同源重组: 用 CaCl_2 法将 pKD46 质粒转化到 DH5α 中, 用含有氨苄青霉素的 LB 培养基筛选单个菌落并鉴定后, 经 30°C 振荡培养和 30 mmol/L L-阿拉伯糖诱导 Exo、Bet 和 Gam 蛋白充分表达后, 制备含 10% 甘油电转化用感受态细胞。在 MicroPulser 电转化仪 (Bio-Rad 公司) 上, 电压 1.8 kV, 脉冲 25 μF , 电阻 200 Ω 的参数下, 将上述纯化融合 PCR 产物电转化到含 pKD46 的 DH5α 感受态细胞, 在含有 DAP 和 Cm 的 LB 平板上筛选单个菌落, 并进一步在 42°C 培养下, 对每个单菌落分别进行 Amp 和 Cm 的抗性检测, 挑选对 DAP 依赖、Amp 敏感而 Cm 抗性的克隆, 该克隆为去除 pKD46 质粒的重组菌, 命名为 DH5α($\Delta asd::cat$)。

1.2.4 重组菌 DH5α($\Delta asd::cat$)的 PCR 鉴定: 将重组菌接种含氯霉素和 DAP 的 LB 液体中培养, 取细菌培养物经离心、沉淀和水浴煮沸法制备重组菌染色体 DNA 模板, 以 P3、P5 对引物 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物和大小。

1.2.5 FLP 位点专一性重组和重组菌 DH5α Δasd 鉴定: 将编码 FLP 点特异性重组酶的 pCP20 质粒

DNA 转化到重组菌 DH5 α ($\Delta asd::cat$), 30°C 培养在含氨苄青霉素和 DAP 的 LB 培养基上, 筛选单个菌落, 然后转接在 42°C 培养数小时, 在 37°C 条件下划线培养分离单菌落进行 Amp 和 Cm 抗性检测, 获得对上述两种抗生素均敏感而 DAP 依赖的阳性克隆, 命名为 DH5 α Δasd 。进一步制备该重组菌基因组 DNA 模板, 以 P3、P4 引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物经纯化回收, 与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化 DH5 α , 涂布 AIX LB 平板(含 Amp、IPTG、X-gal), 白斑筛选阳性克隆, 将阳性克隆酶切鉴定后送上海申能博采公司测序。

1.2.6 重组菌 DH5 α Δasd 与表达 *asd* 基因的质粒的功能性互补: 将表达 *asd* 基因的质粒 pYA3341 转化重组菌 DH5 α Δasd , 涂布不含 DAP 的 LB 平板, 观察菌落生长情况。

1.2.7 重组菌 DH5 α Δasd 与表达 *asd* 基因的质粒的功能性互补: 将重组菌株 DH5 α Δasd 单个菌落接种在含 DAP 的 LB 液体培养基, 37°C、250 r/min 振荡培养不同时间, 定时测定细菌密度, 为确保试验结果的可靠性, 每一结果重复 2 次, 计算其平均值, 绘制生长曲线。DH5 α 菌株作同步对照菌。

1.2.8 重组菌 DH5 α Δasd 转化效率及不同的载体转化效率的比较: 用 CaCl₂ 和电转化两种方法将都能表达链球菌 *asd* 基因, 且分别为高、中和低拷贝数的系列质粒(pYA3341、3342 和 3332)DNA 转化到 DH5 α Δasd 重组菌中, 涂布不含 DAP 的 LB 平板, 观察菌落生长情况并比较上述不同载体的转化效率。

1.2.9 DH5 α Δasd 重组菌介导的染色体-质粒平衡致死系统的稳定性表达: 将表达 *E. coli asd* 基因和 F18 黏附素 FedF 的质粒 pMisL-fedF-*asd* DNA 转化到 DH5 α Δasd 重组菌中, 在 LB 培养基上生长并分别传代至 50 代次, 选择第 1、10、20、30、40 和 50 代次重组菌, 通过诱导表达 pMisL-fedF-*asd* DNA 重组菌, 分别与兔抗 F18ab FedF 亚单位单因子血清凝集试验, 与易感仔猪小肠上皮细胞黏附和黏附抑制试验结果验证重组菌 DH5 α Δasd 染色体-质粒平衡致死系统的构建和功能性表达 F18 大肠杆菌黏附素 FedF。

2 结果

2.1 含 FRT 位点和氯霉素抗性基因的融合 PCR 产物制备

以质粒 pKD3 DNA 做为模板, P1-C1、P2-C2 为

引物, 扩增出两端与 *asd* 基因上下游序列同源, 中间为含 FRT 位点的 *cat* 基因的 DNA 片段, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定大约为 1.3 kb, 与预期值大小一致(图 2)。

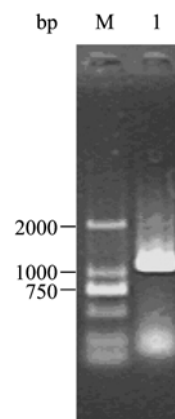


图 2 融合 PCR 扩增产物的电泳鉴定

Fig. 2 PCR products of combination of *cat* gene in plasmid pKD3 with *asd* homology extension

注: M: DL2000 DNA marker; 1: PCR 产物。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: PCR products.

2.2 第一次同源重组菌 DH5 α ($\Delta asd::cat$)的 PCR 鉴定

对筛选出的重组菌 DH5 α ($\Delta asd::cat$), 制备出基因组模板 DNA, 以 P3 和 P5 引物进行 PCR 扩增, 结果扩增出含 *cat* 基因、大小约 1.1 kb 的片段, 而对照的野生菌 DH5 α 未能扩增出该大小片段(图 3)。

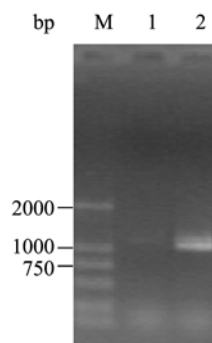


图 3 重组菌 DH5 α 缺失株($\Delta asd::cat$)的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR products of *E. coli* DH5 α ($\Delta asd::cat$) strain

注: M: DL2000 DNA marker; 1: 野生型大肠杆菌 DH5 α ; 2: 重组大肠杆菌 DH5 α ($\Delta asd::cat$)缺失株。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Wild type *E. coli* DH5 α ; 2: Recombinant *E. coli* DH5 α ($\Delta asd::cat$) mutant.

2.3 第 2 次同源重组菌 DH5 α Δasd 的鉴定

以重组菌 DH5 α Δasd 基因组为模板, 以 P3、P4 引物进行 PCR 扩增, 结果扩增出的片段长度约为

232 bp, 该片段不含 *cat* 基因, 仅含 *asd* 基因的 5'端和 3'端部分序列, 缺失 *asd* 基因大部分, 而在对照菌 DH5 α , 扩增的片段含整个 *asd* 基因, 长度约为 1104 bp, 与预期结果相符(图 4)。进一步将大小为 232 bp 片段克隆进 pGEM-T Easy 载体并测序, 结果证实重组菌 DH5 α Δ *asd* 中 *cat* 基因已丢失, 在同源区内只留下一个 FRT 位点, FRT 位点的结构如下: 左右两个方向相反的箭头是两个反向重复序列, 为 FLP 的结合元件, 重组就发生在结合元件和 8 bp 画框的核心区之间 (图 5)。

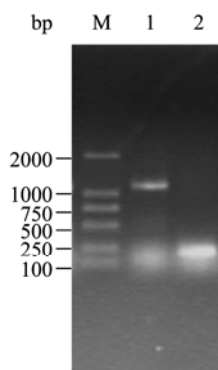


图 4 DH5 α Δ *asd* 缺失突变株 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR products for *E. coli* DH5 α Δ *asd* mutant and wild type

注: M: DL2000 DNA marker; 1: 野生型大肠杆菌 DH5 α ; 2: 大肠杆菌 DH5 α Δ *asd* 缺失株。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Wild type *E. coli* DH5 α ; 2: *E. coli* DH5 α Δ *asd* mutant.

5'-GAAGTTCCTAT AC[TTCTAGA]GA ATAGGAACTTC-3'
3'-CTTCAAGGATAAGAGATCTTCT TATCCTTGAAG-5'

图 5 两端反向重复序列 FRT 位点和 8 bp 序列核心区
Fig. 5 FRT site inverted repeats and an identical scar

2.4 重组菌 DH5 α Δ *asd* 与表达 *asd*⁺ 质粒 pYA3341 的功能性互补

含质粒 pYA3341 的重组菌 DH5 α Δ *asd* 能在不含 DAP 的 LB 培养基上生长, 其单个菌落形态和大小与 DH5 α 相似, 说明缺陷型重组菌 DH5 α Δ *asd* 与 *asd*⁺ 质粒 pYA3341 形成功能性互补(图 6)。

2.5 重组菌 DH5 α Δ *asd* 在含 DAP 的 LB 培养基中生长

重组菌 DH5 α Δ *asd* 能在含 DAP 的 LB 培养基中生长, 将各时间点所测定的菌密度对培养时间做图(图 7)。结果表明, 在各生长阶段和对数生长期, DH5 α Δ *asd* 的菌密度稍低于 DH5 α 。



图 6 缺陷型重组菌 DH5 α Δ *asd* 与 *asd*⁺ 质粒 pYA3341 形成功能性互补

Fig. 6 *E. coli* DH5 α Δ *asd* mutant was compensated by the plasmid pYA3341 expressing *asd* gene

注: 上: LB 平板上生长的大肠杆菌 DH5 α ; 下: 与表达 *asd* 质粒 pYA3341 互补的大肠杆菌 DH5 α Δ *asd* 缺失株在 LB 培养基上的生长情况。

Note: Top part: The growth of DH5 α on LB plate; Down part: The growth of DH5 α Δ *asd* transformed with pYA3341 expressing *asd* gene.

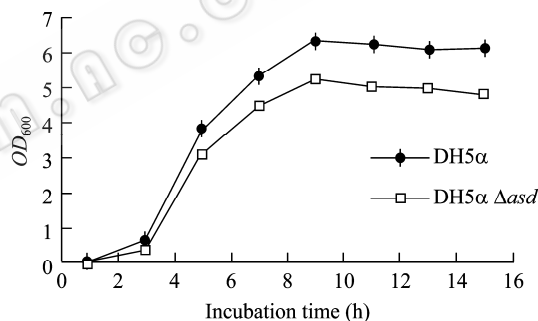


图 7 重组菌 DH5 α Δ *asd* 在含 DAP 的 LB 培养基中生长

Fig. 7 The growth curves in LB medium with DAP for both parent strain DH5 α and *asd* deletion mutant DH5 α Δ *asd*

2.6 重组菌 DH5 α Δ *asd* 转化效率

用 CaCl₂ 法将表达 *asd* 基因的高拷贝数质粒 pYA3341 转化重组菌 DH5 α Δ *asd*, 在 LB 培养基上, 与对照菌 DH5 α 基本一致, 转化效率可达到 2×10^6 – 5×10^6 转化子/ μ g DNA, 电转化法则可达 4×10^7 – 6×10^7 转化子/ μ g DNA。在此基础上, 我们又利用中、低拷贝数的质粒 pYA3342 和 pYA3332 DNA 分别转化, 结果这些质粒均可转化 DH5 α Δ *asd* 和对照菌 DH5 α , 并且各种质粒并没有转化效率上的差异。

2.7 F18 大肠杆菌黏附素 FedF 在 DH5 α Δ *asd* 介导的染色体-质粒平衡致死系统中的功能性表达

经厌氧诱导表达的第 1、10、20、30、40 和 50 代次重组菌 p*ni*rBM*s*L-f*ed*F-*asd* 同表达 F18ab 或 F18ac 的 *E. coli* 标准株 107/86 和 2134P 一样, 均能

与兔抗 F18ab 菌毛 FedF 亚单位单因子血清(1:100 稀释)、兔抗 F18ab 或 F18ac IgG 产生明显的凝集反应, 而含 pnirBMisL-*asd* 空载体的大肠杆菌 DH5 α 与上述血清不产生凝集现象。显微镜下观察表明, 诱导表达的 pnirBMisL-*fedF*-*asd* 重组菌均能较好地吸附于易感仔猪小肠上皮细胞(图 8A), 但含 pnirBMisL-*asd* 空载体的大肠杆菌 DH5 α 没有黏附小肠上皮细胞的特性(图 8B)。当诱导表达的重组菌 pnirBMisL-*fedF*-*asd* 分别与兔抗 F18ab 菌毛 FedF 亚单位单因子血清作用 30 min 后几乎丧失了吸附易感仔猪小肠上皮细胞的能力。

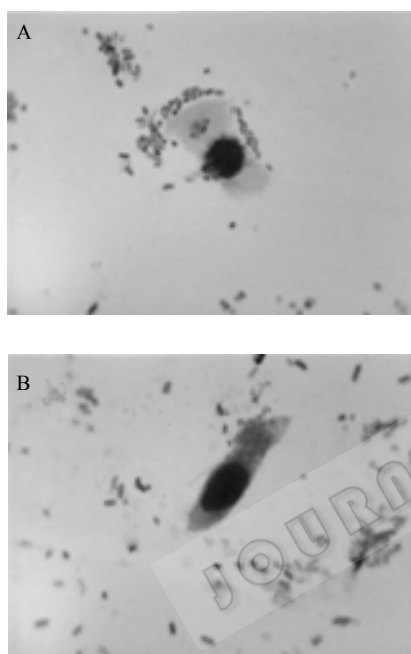


图 8 诱导表达的重组菌 pnirBMisL-*fedF*-*asd* 黏附易感仔猪小肠上皮细胞

Fig. 8 adherence of the recombinant *E. coli* DH5 α displaying *fedF*-*asd* to the small intestine epithelial cells

注: A: 表面表达 *fedF*-*asd* 的重组大肠杆菌 DH5 α ; B: 表面不表达 *fedF* 的大肠杆菌 DH5 α 。

Note: A: The recombinant *E. coli* DH5 α displaying *fedF*-*asd*; B: *E. coli* DH5 α not displaying *fedF*.

3 讨论

染色体-质粒平衡致死系统缺陷型菌株的早期构建主要是利用理化因素诱变、转座子随机插入以及自杀性载体同源重组技术。理化因素造成的基因突变多为点突变, 有较大回复突变的可能性, 从而增加了平衡致死系统的不稳定性^[18-19]; 利用转座子插入技术可以造成宿主菌中大片段外源基因的插入

或缺失突变, 但它不能精确定位其靶基因的插入位置, 而仅能依赖细菌的表型改变来进行判断和筛选; 自杀性载体同源重组技术的应用虽然广泛, 但它的操作较为繁琐, 构建时需较大的同源片段(两端的同源序列一般不低于 200 bp), 且必须构建靶位点的打靶质粒^[11,17]。而新近发展的 Red 同源重组技术只需要短的同源臂(两端各有 30–50 bp 同源臂片段, 与目的基因侧翼序列同源)即可对染色体上的任意基因实现定点重组。该同源臂核酸序列完全可以人工合成, 且 Red 系统重组效率高、操作简便。

本试验采用 Red 同源重组技术对大肠杆菌 DH5 α 染色体上的 *asd* 基因进行敲除, 构建了重组效率高的缺失突变株。该缺失突变株失去了在普通 LB 培养基上生长的能力, 这是由于 *asd* 基因编码天冬氨酸 β -半醛脱氢酶, 是细菌赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、二氨基庚二酸(DAP)合成途径中的关键酶, DAP 是革兰氏阴性菌细胞壁上肽聚糖的基本成分, *asd* 基因发生缺失突变后, 由于不能合成细胞壁 DAP 而导致溶菌死亡。该营养缺陷型细菌只有在补加 DAP 的培养或导入 *asd*⁺ 质粒才能在 LB 培养基上生长^[12]。在本研究中, 在普通 LB 培养基上补加 DAP 或将表达 *asd* 基因的质粒 pYA3341 转化重组菌 DH5 α Δasd , *asd* 缺陷型重组菌得到功能性互补而生长。经测序鉴定 DH5 α Δasd 染色体上的 *asd* 基因序列大部分已缺失, *asd* 缺陷型重组菌造成回复突变的可能性极低。

基于构建的重组菌 DH5 α Δasd 接受不同拷贝数的质粒、转化效率高, 与原型 DH5 α 工程菌比较, 其生长速度和生长对数期没有显著差异等优点, 能够成为 DH5 α Δasd 工程菌, 并进一步构建出以 *asd* 营养基因为标志 *E. coli* 染色体-质粒平衡致死系统。事实上, 在 DH5 α Δasd 介导的染色体-质粒平衡致死系统中, 体外培养连续传代 50 代次, pnirBMisL-*fedF*-*asd* 质粒不丢失, 并功能性表达 F18 大肠杆菌黏附素 FedF。

Red 系统实验中也遇到假阳性的存在, 这是由于基因敲除所用的线性打靶 DNA 的 PCR 模板通常是质粒(例如 pKD3), 该质粒本身具有筛选重组子的抗药性基因。可以把第 1 次 PCR 的产物稀释 200–1000 倍, 然后以稀释液为模板进行二次 PCR, 用第 2 次 PCR 产物去转化宿主菌, 可大大减少假阳

性^[20-21]。也可以利用 *Dpn* I 消化处理 PCR 产物, *Dpn* I 只作用于甲基化的底物, 大多数从常用菌株提取的质粒都被甲基化, 而 PCR 得到的线性 DNA 没有甲基化, 这样 *Dpn* I 限制性内切酶专一性地降解模板质粒, 而且 *Dpn* I 的识别序列只有 4 个核苷酸残基, 在 DNA 分子中出现的频率高, 模板质粒可被完全降解^[14-22]。

参 考 文 献

- [1] Chen HQ, Schifferli DM. Comparison of a fimbrial versus an autotransporter display system for viral epitopes on an attenuated *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine*, 2007, **25**(9): 1626-1633.
- [2] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002(36): 361-388.
- [3] Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine*, 2007, **25**(30): 5598-5605.
- [4] Fu X, Xu JG. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker. *Microbiol Immunol*, 2000, **44**(7): 551-556.
- [5] Ryan ET, Crean TI, Kochi SK, *et al.* Development of a Δ *glnA* balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 2000, **68**(1): 221-226.
- [6] Spreng S, Viret JF. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine*, 2005, **23**(17/18): 2060-2065.
- [7] Tacket CO, Kelly SM, Schödel F, *et al.* Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun*, 1997, **65**(8): 3381-3385.
- [8] Zhao ZQ, Xue Y, Wu B, *et al.* Subcutaneous vaccination with attenuated *Salmonella enterica* serovar choleraesuis C500 expressing recombinant filamentous hamagglutinin and pertactin antigens protects mice against fatal infections with both *S. enterica* serovar choleraesuis and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 2008, **76**(5): 2157-2163.
- [9] Nakayama K, Kelly SM, Curtiss R III, *et al.* Construction of an ASD⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Bio/Technology*, 1988(6): 693-697.
- [10] Murphy KC, Campellone KG. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC Mol Biol*, 2003, **4**(1): 11-17.
- [11] Yu D, Ellis HM, Lee EC, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(11): 5978-5983.
- [12] 黄维, 钟辉, 曹诚. 染色体-质粒平衡致死系统的构建及应用. *生物技术通讯*, 2002, **13**(5): 378-382.
- [13] 王恒樑, 冯尔玲, 林云, 等. 弗氏志贺菌 2a T32 株 *asd* 基因缺失突变体的构建. *军事医学科学院院刊*, 2000, **24**(2): 81-87.
- [14] 原志伟, 蒋颖, 王建业, 等. V 型分泌系统菌体表面展示 F18 大肠杆菌黏附素及其受体结合位点的确定. *微生物学报*, 2007, **47**(2): 319-323.
- [15] 何素芬, 原志伟, 朱国强. 禽大肠杆菌 I 型菌毛黏附素 *fimH* 缺失株的构建及生物学特性的分析比较研究. *微生物学报*, 2008, **48**(2): 252-256.
- [16] 原志伟. F18 大肠杆菌黏附素菌体表面功能性展呈及其染色体-质粒平衡致死系统的构建. 扬州大学硕士生毕业论文, 2007.
- [17] 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.
- [18] 余风刚. 霍乱弧菌 *thyA* 致死平衡系统的构建及病毒来源蛋白的表达. 中国预防医科院博士生毕业论文, 1999.
- [19] Belfort M, Maley G, Pedersen-Lane J, *et al.* Primary structure of the *Escherichia coli thyA* gene and its thymidylate synthase product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(16): 4914-4918.
- [20] 王恒樑, 冯尔玲, 史兆兴. 用 Red 系统快速敲除痢疾杆菌 *asd* 基因. *军事医学科学院院刊*, 2002, **26**(3): 172-175.
- [21] 胡堃, 史兆兴, 王恒樑. Red 重组系统在痢疾杆菌基因敲除中的应用研究. *微生物学报*, 2003, **43**(6): 740-746.
- [22] Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, 2000, **246**(1/2): 321-330.