

基于 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌多基因删除方法

周丽 牛丹丹 李宁 陈献忠 石贵阳 王正祥*

(江南大学生物工程学院生物资源与生物能源研究中心 江苏 无锡 214122)

摘要: 快速、高效删除大肠杆菌染色体 DNA 的目的基因是大肠杆菌代谢工程研究的前提和基础。利用 Red 重组系统结合 Xer 重组系统删除了野生型大肠杆菌 CICIM B0013 的 *ackA-pta* 基因和 *pps* 基因。实验证明了可重复应用 *dif* 位点实现大肠杆菌染色体上多基因突变的叠加, 同时, 在染色体上并未留下抗生素标记, 借此能够高效地实现多基因缺失突变株的构建。此外, 本方法重组效率高, 实验步骤较简便。

关键词: Xer 重组系统, *dif* 位点, 基因删除

Multiple Gene Inactivation Approach in *Escherichia coli* Mediated by a Combination of Red Recombination and Xer Recombination

ZHOU Li NIU Dan-Dan LI Ning CHEN Xian-Zhong SHI Gui-Yang
WANG Zheng-Xiang*

(Center of Bioresource & Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: Rapid and efficient inactivation of the target gene on *Escherichia coli* chromosome is the precondition and groundwork of researches on metabolic engineering. In the present study, we demonstrated a multiple gene inactivation approach in *E. coli* mediated by Red recombination and Xer recombination. The chromosomal genes, *ackA-pta* and *pps*, in a wild type strain *E. coli* CICIM B0013 were inactivated by this method indicating that *dif* sites can be reused to inactivate multiple chromosomal genes with no antibiotic resistance selectable marker remain. Furthermore, this method has high recombination efficiency and simplified steps.

Keywords: Xer recombination, *dif* sites, Gene inactivation

高效基因删除技术是研究和深入了解微生物生理和遗传特性的重要技术保障, 近年来大肠杆菌染色体基因删除技术更是得到了快速的发展。

Datsenko 等^[1]报道的应用 Red 重组系统-FLP 重组系统的大肠杆菌基因删除方法是目前最为成功的、应用最为广泛的大肠杆菌基因删除方法。Baba 等^[2]通

* 通讯作者: Tel: 86-510-85918121; ✉ zxwang@jiangnan.edu.cn
收稿日期: 2009-12-08; 接受日期: 2010-02-02

过该方法构建了 3985 株单基因突变的大肠杆菌菌株。目前,许多国内研究者也成功应用该方法构建了大肠杆菌基因突变菌株^[3-4],王恒樑等还成功利用该方法删除了痢疾杆菌的染色体基因^[5]。这种方法利用 Red 重组系统(包含在辅助质粒 pKD46 上),在两端同源臂的介导下,用抗生素抗性基因-FRT 基因片段替换染色体上的目的基因,再将转化子中的辅助质粒 pKD46 去除,并转化、表达来源于酿酒酵母的 FLP 蛋白(包含在辅助质粒 pCP20 上),利用该蛋白识别抗生素抗性基因两端的 FRT 序列,从而去除抗生素抗性基因。当然,在多基因突变菌株的构建过程中,通过表达外源重组蛋白去除突变株中的抗性基因,需要反复转化或丢失辅助质粒 pKD46 及 pCP20,使得实验操作变得繁琐、实验周期变长。

dif 位点能够由大肠杆菌自身所含有的 Xer 重组酶进行识别^[6],因此在基因删除方法中运用 *dif* 位点取代 FRT 位点,在去除抗生素抗性基因时,不需要将携带外源重组酶基因的质粒转化于目的转化子并表达,可以简化实验操作。然而,迄今为止,仅 Bloor 等^[6]研究者报道了应用 Red 重组系统-Xer 重组系统成功删除大肠杆菌基因组中的一个基因;其是否适用于基因组中多基因的删除及其基因删除效率等至今未有报道。

大肠杆菌高密度培养过程中产生大量的乙酸副产物,乙酸的产生不仅明显减缓大肠杆菌的生长速度而且抑制外源基因的表达^[7]。乙酸主要通过乙酸激酶-磷酸转乙酰酶途径合成(分别由 *ackA*、*pta* 基因编码,且这两个基因在大肠杆菌染色体上的位置相邻),其编码基因的删除有助于减少乙酸的合成。此外,删除代谢丙酮酸的 PEP 合酶途径(由 *pps* 基因编码)有助于研究丙酮酸代谢节点的调控。本文应用 Red 重组系统、Xer 重组系统对一株野生型大肠杆菌基因组中 *ackA-pta* 和 *pps* 基因进行了成功删除,此工作为野生型大肠杆菌代谢工程研究提供了有力的实验方法与实验材料。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与引物

Escherichia coli CICIM B0013 由本中心筛选、保藏(<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn/>);质粒 pKD46 (温度敏感型,含有阿拉伯糖启动子调控的 *gam*、*bet* 和

exo 基因, Amp^r)购于 CGSC^[1], pSK-*EcdifGm* (含有两边带有 *dif* 位点的庆大霉素抗性基因, Amp^r , Gm^r)由本研究前期构建。pMD18-T 购自 TaKaRa (大连)公司。本文所用引物序列见表 1。

表 1 本研究中所使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')
AckA-Pta1	TGAACATCATCACCTGCCACCTG
AckA-Pta2	CAGCGCAAAGCTGCGGATG
AckA-Pta3	GGTGATACTCAGGTTTCGCTGCTT
Pps1	CGGCATGAATGATGTAGACAGGGTT
Pps2	TAACCAGGTTTGACACCGGTGT
RPps1	TGTGGCGAAACCATTCGGAAC
RPps2	GTCCGACCACGAAGACTTTGCC
Pps3	CGTGGCGATCAACAGCATTATCC

1.2 *ackA-pta* 基因删除用线性化 DNA 片段的制备

用引物 AckA-Pta1、AckA-Pta2 扩增菌株 B0013 染色体 DNA 上的 *ackA-pta* 基因片段(2.8 kb),PCR 产物克隆入质粒 pMD18-T 载体中,获得重组质粒 T-*ackA-pta'*。该重组质粒用 *EcoR* V 酶切,并克隆入 *dif-Gm* 片段,获得重组质粒 T-*ackA-pta'::difGm*。

重组质粒 T-*ackA-pta'::difGm* 用 *EcoR* I、*Pst* I 进行双酶切,胶回收 *ackA-pta'::difGm* DNA 片段,用引物 AckA-Pta1、AckA-Pta2 PCR 扩增该片段,PCR 产物纯化后用于转化目的菌株。

1.3 *pps* 基因删除用线性化 DNA 片段的制备

用引物 Pps1、Pps2 扩增菌株 CICIM B0013 染色体上的 *pps* 基因片段(2.3 kb),PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体中,获得重组质粒 T-*pps'*。该重组质粒用引物 RPps1、RPps2 进行反向 PCR 扩增,并克隆入 *dif-Gm* 片段,获得重组质粒 T-*pps'::difGm*。

重组质粒 T-*pps'::difGm* 用 *EcoR* I、*Pst* I 进行双酶切,胶回收 *pps'::difGm* DNA 片段,用引物 Pps1、Pps2 PCR 扩增该片段,PCR 产物纯化后用于转化目的菌株。

1.4 Red 重组系统的诱导和感受态细胞的制备

若出发菌株不含有基因删除辅助质粒 pKD46,将质粒 pKD46 按照文献[7]提供的方法电击转化入待突变菌株。含有辅助质粒 pKD46 的待突变菌株接种于液体 LB 培养基中,30℃、200 r/min 过夜培养,

以 0.5% 的接种量转接于 100 mL 含 100 mg/L 和 2 mmol/L L-阿拉伯糖的液体 LB 培养基中, 30°C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值达到 0.7 左右。立即将诱导好的培养液置于冰上, 冰浴 20 min, 离心收集菌体, 用预冷的冰水洗涤 1 次, 预冷的 10% 甘油洗涤 2 次, 收集菌体, 用于电击转化。

1.5 电击转化

将 20 μ L 基因删除用线性化 DNA 片段与所制备的感受态细胞混匀后, 加入 1 mm 电转杯中, 1800 V 电击 5 ms 左右, 立即加入含 1 mmol/L L-阿拉伯糖的液体 LB 培养基, 30°C、100 r/min 培养 1 h, 涂布于含有氨苄青霉素和庆大霉素的双抗性平板, 筛选转化子。

1.6 *dif* 位点的专一性重组

转化子接种于含有氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 30°C、200 r/min 摇瓶培养过夜, 并转接传代一次, 菌液适当稀释后涂布于氨苄青霉素抗性固体 LB

平板, 30°C 过夜培养, 挑取单菌落同时点种于含氨苄青霉素和庆大霉素双抗生素抗性的固体 LB 平板和仅含氨苄青霉素的固体 LB 平板, 挑选庆大霉素抗性丢失的转化子, 并用鉴定引物进行进一步的菌落 PCR 扩增验证。

2 结果

2.1 应用 Red 重组系统和 Xer 重组系统基因删除方案

本文所阐述的应用 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌基因删除方法原理如图 1 所示, 包括如下步骤: 从大肠杆菌染色体上 PCR 扩增目的突变基因, 并将其克隆入合适的载体中, 在该基因中部选择合适的酶切位点酶切后(如无合适的酶切位点, 可通过反向 PCR 扩增获得含有两同源臂的载体)与 *dif*-抗生素抗性基因 *dif*-基因片段(本文运用庆大霉素抗性基因)连接, 获得含有同源臂 1-*dif*-抗生素抗

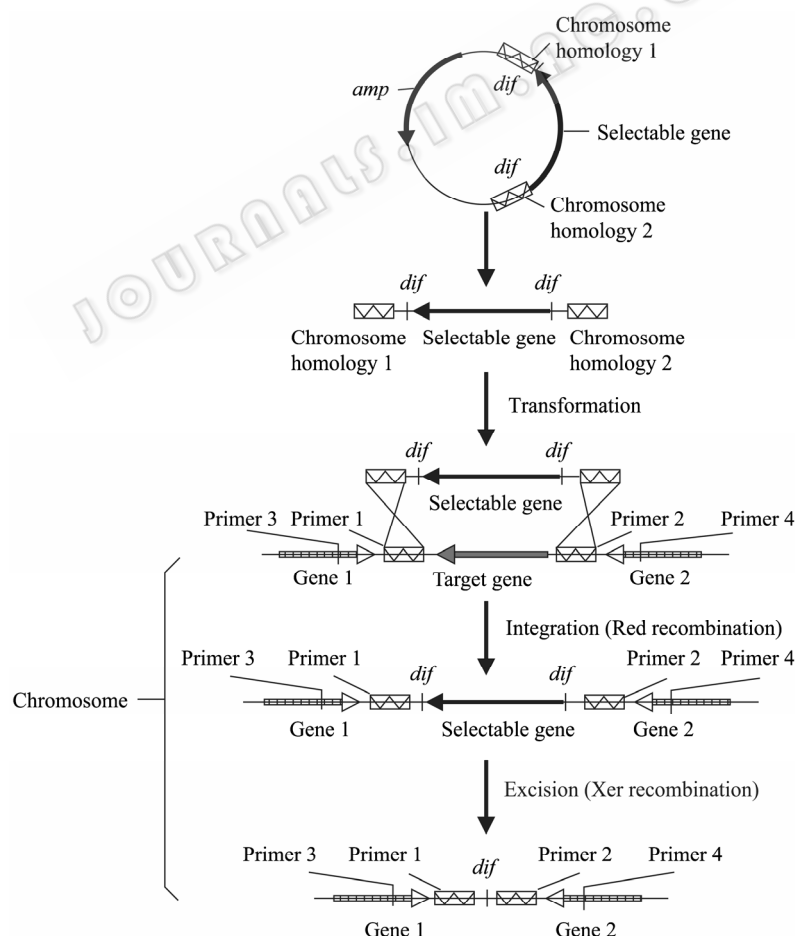


图 1 大肠杆菌染色体基因删除原理示意图

Fig. 1 Principles of *Escherichia coli* chromosomal gene inactivation approach

性基因-*dif*-同源臂 2(即突变盒)的重组质粒。将突变盒从质粒上回收下来,经 PCR 扩增可获得大量的突变盒基因片段,将该片段转化含有辅助质粒 pKD46 的目的菌株。突变盒片段的两同源臂与目的基因在 Red 重组酶的作用下进行双交换,将目的基因替换,这种突变株再在自身 Xer 重组酶的介导下进行两 *dif* 位点的重组将抗生素抗性基因去除。

2.2 重组质粒 pUC-*ackA-pta'*::*difGm* 的构建

重组质粒 T-*ackA-pta'*::*difGm*, 用 *EcoR* I、*Pst* I 进行双酶切验证, 获得 2.6 kb 和 1.2 kb 两条电泳条带, 其凝胶电泳验证图谱见图 2, 物理图谱如图 3 所示。

2.3 *E. coli* CICIM B0013 菌株 *ackA-pta* 基因的删除

用引物 AckA-pta1 和 AckA-pta3 进行菌落 PCR 扩增验证, 原始菌株 B0013 不能获得电泳图谱

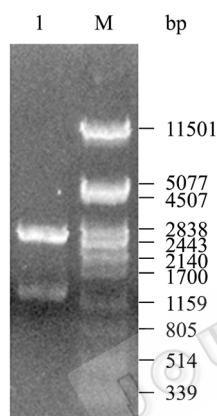


图 2 重组质粒 T-*ackA-pta'*::*difGm* 电泳验证图谱
Fig. 2 Restriction pattern of recombinant vector T-*ackA-pta'*::*difGm*

Note: 1: T-*ackA-pta'*::*difGm*/*EcoR* I, *Pst* I; M: Lambda DNA/*Pst* I marker.

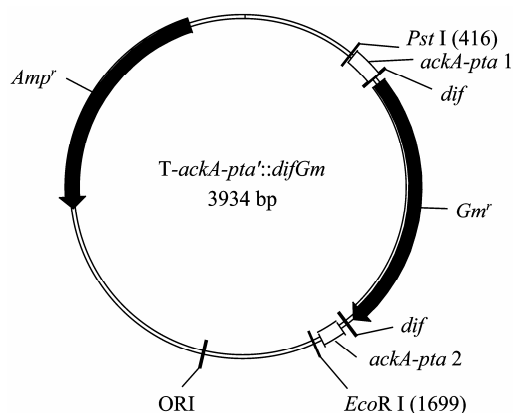


图 3 重组质粒 T-*ackA-pta'*::*difGm* 物理图谱
Fig. 3 Map of recombinant vector T-*ackA-pta'*::*difGm*

(该基因片段大小应为 3.2 kb); 转化子 B0013 (Δ *ackA-pta*::*difGm*) 获得 1.5 kb 大小电泳图谱; 其抗生素抗性基因丢失后, 转化子 B0013 (Δ *ackA-pta*::*dif*) 获得 0.5 kb 大小电泳图谱(图 4)。由于 *dif* 位点重组具有高度的专一性^[8], 抗生素抗性丢失的菌株经 PCR 扩增都只获得 0.5 kb 大小电泳图谱。

进一步发酵实验表明, 突变菌株 B0013 (Δ *ackA-pta*::*dif*) 的乙酸合成量比原始菌株 B0013 降低了 72.6%, 再次证明了 *ackA-pta* 基因已被成功删除。

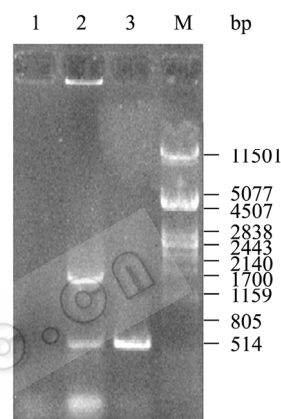


图 4 *ackA-pta* 基因突变转化子 PCR 鉴定电泳图谱

Fig. 4 PCR identification of *ackA-pta* gene mutants

Note: 1: B0013 PCR product; 2: B0013 (Δ *ackA-pta*::*difGm*) PCR product; 3: B0013 (Δ *ackA-pta*::*dif*) PCR product; M: Lambda DNA/*Pst* I marker.

2.4 重组质粒 T-*pps'*::*difGm* 的构建

重组质粒 T-*pps'*::*difGm* 用 *EcoR* I、*Pst* I 进行双酶切验证, 获得 2.6 kb 和 1.2 kb 两条电泳条带, 其凝胶电泳验证图谱见图 5, 物理图谱如图 6 所示。

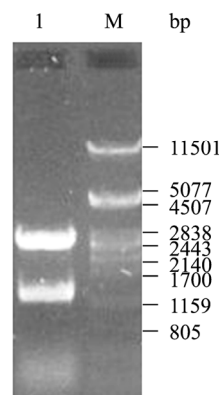


图 5 重组质粒 T-*pps'*::*difGm* 电泳验证图谱

Fig. 5 Restriction pattern of recombinant vector T-*pps'*::*difGm*

Note: 1: T-*pps'*::*difGm*/*EcoR* I, *Pst* I; M: Lambda DNA/*Pst* I marker.

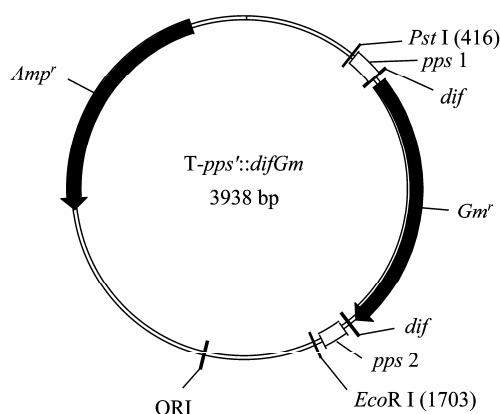
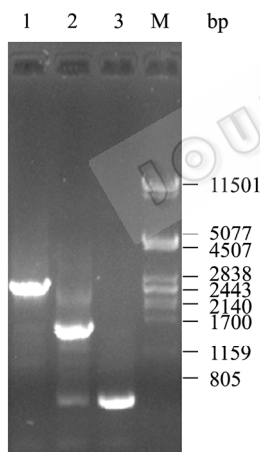


图 6 重组质粒 T-pps':difGm 物理图谱

Fig. 6 Map of recombinant vector T-pps':difGm

2.5 *E. coli* CICIM B0013 ($\Delta ackA-pt a$)菌株 *pps* 基因的删除

用引物 Pps2、Pps3 进行菌落 PCR 扩增验证, 原始菌株 B0013 获得 2.7 kb 大小电泳图谱; 转化子 B0013 ($\Delta ackA-pt a$, $\Delta pps::difGm$) 获得 1.6 kb 大小电泳图谱; 其抗生素抗性基因丢失后, 转化子 B0013 ($\Delta ackA-pt a$, $\Delta pps::dif$) 获得 0.6 kb 大小电泳图谱 (图 7)。

图 7 *pps* 基因突变转化子 PCR 鉴定电泳图谱Fig. 7 PCR identification of *pps* gene mutants

Note: 1: B0013 PCR 扩增产物; 2: B0013 ($\Delta ackA-pt a$, $\Delta pps::difGm$) PCR 扩增产物; 3: B0013 ($\Delta ackA-pt a$, $\Delta pps::dif$) PCR 扩增产物; M: Lambda DNA/Pst I marker.

2.6 *E. coli* CICIM B0013 ($\Delta ackA-pt a$, Δpps)双基因突变菌株的 PCR 验证

用引物 AckA-pt a1、AckA-pt a3 和 Pps2、Pps3 分别扩增菌株 B0013 ($\Delta ackA-pt a$, Δpps)的 *ackA-pt a* 和 *pps* 基因, 都获得 0.6 kb 左右大小的电泳图谱, 证明该菌株中同时存在 *ackA-pt a* 和 *pps* 基因突变。

3 讨论

现有研究多是以标准菌株作为基因删除的出发菌株, 这些菌株多数进行过改造, 如去除了其部分限制修饰系统等。菌株 *E. coli* CICIM B0013 是本中心从自然界中筛选的野生型大肠杆菌, 应用 Red 重组系统成功地将突变盒片段分别整合到其染色体 DNA 的 *ackA-pt a* 和 *pps* 基因上。应用 Xer/*dif* 重组系统成功将整合于染色体上的庆大霉素抗性基因去除, 获得双突变重组菌株 B0013 ($\Delta ackA-pt a::dif$, $\Delta pps::dif$)。

通常, 进行大肠杆菌电击转化的感受态细胞用培养至 OD_{600} 值约为 0.4 的菌液来制备^[9], Datsenko 等报道以 OD_{600} 值为 0.6 左右的菌液来制备感受态细胞, 而本研究中发现所用菌株培养至 OD_{600} 值为 0.70–0.73 制备的感受态细胞可获得较多的转化子, 与文献报道的差异较大。因此, 我们认为不同菌株形成感受态细胞的时间因菌株的不同而异, 应进行预实验来确定。与 Datsenko 等报道的用 50 bp 长引物作为 Red 重组的同源臂相比, 本文通过构建重组质粒来获得突变盒基因片段, 可以获得更长的同源臂, 提高了突变盒基因片段重组于染色体上的效率, 实验中发现运用具有 200 bp 左右同源臂的基因片段转化所获得的转化子是运用具有 50 bp 左右同源臂片段的数十倍。突变盒基因片段整合于染色体上的目的基因后, 通过大肠杆菌自身具有的识别 *dif* 序列的 Xer 重组酶系删除染色体上引入的抗生素抗性基因, 不需要将携带外源重组酶基因的质粒 (如携带有 FLP 重组酶的重组质粒 PCP20) 转化于目的转化子并进行表达。在多基因删除过程中, 更可将含有 Red 重组系统的辅助质粒 (如 pKD46) 保留在菌株中, 以便于下一个基因的删除, 进一步简化了实验操作。据报道 *dif* 位点的重组与抗生素的有无是无关的^[6], 即使在有抗生素的环境中, 染色体上目的基因替换为 *dif-Gm^r-dif* 片段的细胞仍可通过 Xer 重组酶进行 *dif* 位点重组, 将 *Gm^r* 基因去除, 虽然重组后的细胞会被庆大霉素杀死, PCR 验证图谱中仍可检测到庆大霉素抗性基因去除的细胞 (分别如图 4 第 2 泳道中的 0.6 kb 电泳图谱和图 7 中第 2 泳道中的 0.6 kb 电泳图谱), 这说明 Xer/*dif* 重组系统具有较高的重组效率。人们进一步推测如果染色体上引入了多个 *dif* 序列, 在菌株的培养过程中, 这些位点之间也会产

生重组,这样就使得具有多基因突变的转化子基因性状不稳定。在本研究中,我们两次利用 *dif* 位点删除了染色体上的 *ackA-pta* 部分基因(位于染色体上 2412102-2415441)和 *pps* 部分基因(位于染色体上 1782782-1785089),突变菌株染色体上留下了两个 *dif* 位点,但在后续培养中未发现这两个 *dif* 位点自发整合的现象。

本研究丰富了大肠杆菌基因删除的方法,已成功用于大肠杆菌基因组中十多个基因的删除,且这些突变株经发酵实验验证都具有相应的表现型。实验中使用的重要质粒 pSK-*EcdifGm* 为本研究先期构建,已保藏于江南大学中国高校工业微生物资源与信息中心(<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn/>),编号为 CICIM B4032。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Baba T, Ara T, Hasegawa M, *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the keio collection. *Mol Syst Biol*, 2006, **10.1038/msb4100050**.
- [3] 韩聪,张惟材,游松,等. 大肠杆菌 *ptsG* 基因敲除及其缺陷株生长特性研究. *生物工程学报*, 2004, **20**(1): 16-20.
- [4] 汪莉,王玉民. 用 Red 重组系统快速敲除大肠杆菌 *aroL* 和 *aroK* 基因. *军事医学科学院院刊*, 2007, **31**(4): 308-311.
- [5] 王恒樑,冯尔玲,史兆兴,等. 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.
- [6] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(4): 2520-2525.
- [7] De Mey M, De Maeseneire S, Soetaert W, *et al.* Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34**(11): 689-700.
- [8] Blakely GW, Sherratt DJ. Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site *dif*. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(25): 5613-5620.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1.199-1.122.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,国内外公开发行的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究;农业微生物学研究;工业微生物学研究;医学微生物学研究;食品微生物学研究;环境微生物学研究;微生物功能基因组研究;微生物蛋白组学研究;微生物模式菌株研究;微生物工程与药物研究;微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖,2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,更换了彩色封面,纸张改用铜版纸,由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297),发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2010 年的每册定价为 48 元,全年 576 元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413