

# 大肠杆菌 Zn<sup>2+</sup>敏感突变株构建及其功能验证

王玉婷<sup>1</sup>, 徐桐<sup>2</sup>, 华贝杰<sup>1</sup>, 姜巨全<sup>\*1</sup>

1 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

王玉婷, 徐桐, 华贝杰, 姜巨全. 大肠杆菌 Zn<sup>2+</sup>敏感突变株构建及其功能验证[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2538-2549  
Wang Yuting, Xu Tong, Hua Beijie, Jiang Juquan. Construction and functional verification of a Zn<sup>2+</sup> sensitive mutant of *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2538-2549

**摘要:**【背景】Zn<sup>2+</sup>在细胞解毒及许多生理过程中发挥着关键作用, Zn<sup>2+</sup>转运蛋白已逐渐引起人们的重视。在大肠杆菌中, *zntA* 和 *zitB* 是 2 个外排 Zn<sup>2+</sup>的关键基因。【目的】构建大肠杆菌 Zn<sup>2+</sup>敏感突变株, 并对其功能进行验证。【方法】以 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  为出发菌株, 利用  $\lambda$  Red 重组系统, 通过携带卡那霉素抗性基因的同源重组片段敲除 *zntA* 基因。在单基因敲除菌株基础上, 利用携带庆大霉素抗性基因的同源重组片段敲除 *zitB* 基因, 获得一株敲除了 *zntA* 和 *zitB* 的双基因敲除菌株 KZAB04。通过功能互补实验检测基因敲除菌株及对照菌株对不同浓度 Zn<sup>2+</sup>的敏感程度。【结果】基因敲除菌株 KZAB04 比出发菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  具有更高的 Zn<sup>2+</sup>敏感性。【结论】大肠杆菌 Zn<sup>2+</sup>敏感突变株构建成功。该菌株的构建为 *zntA* 和 *zitB* 基因功能的研究提供了必要条件, 同时也为其他 Zn<sup>2+</sup>转运蛋白基因的功能鉴定与分析奠定了基础。

**关键词:** 基因敲除;  $\lambda$  Red 重组; Zn<sup>2+</sup>转运蛋白; *zntA*; *zitB*

## Construction and functional verification of a Zn<sup>2+</sup> sensitive mutant of *Escherichia coli*

WANG Yuting<sup>1</sup>, XU Tong<sup>2</sup>, HUA Beijie<sup>1</sup>, JIANG Juquan<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Background] Owing to the key roles of Zn<sup>2+</sup> in cell detoxification and physiological processes, Zn<sup>2+</sup> transporters have attracted increasing attention. In *Escherichia coli*, *zntA* and *zitB* are

基金项目: 国家自然科学基金(32070031, 31770051)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32070031, 31770051)

\*Corresponding author: E-mail: jjqdainty@163.com

Received: 2021-11-12; Accepted: 2022-01-10; Published online: 2022-03-08

two key genes responsible for  $Zn^{2+}$  efflux. **[Objective]** This study aims to construct a  $Zn^{2+}$  sensitive mutant of *E. coli* and verify its function. **[Methods]** Using *E. coli* DH5 $\alpha$  as the original strain, we knocked out *zntA* via a  $\lambda$  Red recombination system by using the homologous recombinant fragment carrying a kanamycin resistance gene. On the basis of the single-gene knockout mutant, *zitB* was further knocked out via the homologous recombinant fragment carrying a gentamicin resistance gene. In this way, a mutant with the knockout of both *zntA* and *zitB* was obtained and designated as KZAB04. The functional complementation experiment was conducted to test the sensitivity of the mutants and the original strain (negative control) under different  $Zn^{2+}$  concentrations. **[Results]** KZAB04 exhibited higher  $Zn^{2+}$  sensitivity than the original strain. **[Conclusion]** A  $Zn^{2+}$  sensitive mutant of *E. coli* was successfully constructed. The construction of this mutant is the prerequisite for the functional study of *zntA* and *zitB* and lays a foundation for the functional identification of other  $Zn^{2+}$  transporter genes.

**Keywords:** gene knockout;  $\lambda$  Red recombination;  $Zn^{2+}$  transporter; *zntA*; *zitB*

随着各种微生物的基因组被测序, 功能基因组学研究越来越受到人们关注<sup>[1]</sup>。利用大肠杆菌功能缺陷菌株进行功能互补实验, 被公认为分析基因功能最快捷且有效的方法<sup>[2-4]</sup>。自 20 世纪 80 年代基因敲除技术被生物学家发展运用以来, 至今已经出现了许多基因敲除技术<sup>[5-7]</sup>, 其中 Red 重组敲除技术较常用<sup>[8-11]</sup>, 这项技术主要利用  $\lambda$  噬菌体的 3 个重组蛋白酶 Bet、Exo 和 Gam。其中 Bet 和 Exo 能够促进线性 DNA 与染色体同源区发生重组置换, 而 Gam 可以抑制 RecBCD 核酸外切酶的活性, Red 重组敲除技术重组效率比传统同源重组方法重组效率高<sup>[12-13]</sup>。 $\lambda$  Red 重组酶的表达需要辅助质粒, 如对温度敏感容易被消除的 pKD46 质粒<sup>[13]</sup>。基因敲除技术为探索基因功能及构建工程菌株提供了有效手段。

$Zn^{2+}$  参与许多生物过程, 包括增殖、发育、分化、代谢、蛋白折叠及信号转导等<sup>[14]</sup>。 $Zn^{2+}$  在治疗儿童急性腹泻、普通感冒、威尔逊氏病等疾病方面具有显著效果, 同时还具有抗炎和氧化的特性<sup>[15]</sup>。细胞内  $Zn^{2+}$  稳态失衡会导致细胞功能受损从而引发相关生理疾病, 而  $Zn^{2+}$  转运蛋白对维持细胞内  $Zn^{2+}$  稳态具有重要作

用。对  $Zn^{2+}$  转运蛋白进行深入研究可为相关疾病的治疗提供科学依据并提出新的解决思路。

ZntA 属于  $P_{1B}$ -type ATPase 家族, 广泛存在于生物体内。ZitB 属于阳离子促进扩散家族 (cation diffusion facilitators, CDF), 该家族转运蛋白与人类疾病密切相关<sup>[16-21]</sup>, 在细胞解毒过程中具有重要的作用<sup>[22]</sup>。*zntA* 和 *zitB*<sup>[23]</sup> 是在大肠杆菌中主要负责  $Zn^{2+}$  外排的基因, 负责维持细胞内  $Zn^{2+}$  稳态。CzcD 是典型的 CDF 家族转运蛋白, 该蛋白已经被鉴定具有  $Zn^{2+}$  外排功能。本研究利用  $\lambda$  Red 重组系统敲除 *E. coli* DH5 $\alpha$  中 *zntA* 和 *zitB* 基因, 并选取 CzcD 蛋白作为阳性对照进行功能互补实验; 检测基因敲除菌株及对照菌株在不同  $Zn^{2+}$  浓度平板培养基上的生长情况, 以确定  $Zn^{2+}$  敏感突变株构建成功, 该  $Zn^{2+}$  敏感突变株有利于后续对 *zntA*、*zitB* 和其他  $Zn^{2+}$  转运蛋白基因的功能及机制进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和实验所需 PCR 引物

实验所用主要菌株及质粒如表 1 所示, 所用 PCR 引物详见表 2。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

项目 Item	名称 Name	表型和遗传特征 Phenotypic and genetic characteristics	来源 Sources
菌株 Strains	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>recA gyrA</i> (Nal), $\Delta$ ( <i>lacIZYA-argF</i> ) ( $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>pir</i> RK6	TaKaRa Biotechnology (Dalian) Limited Company, China
	<i>E. coli</i> KZA07	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Delta$ <i>zntA::Km<sup>R</sup></i> )	This study
	<i>E. coli</i> KZA18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Delta$ <i>zntA::Km<sup>R</sup></i> ), pKD46	This study
	<i>E. coli</i> KZAB04	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Delta$ <i>zntA::Km<sup>R</sup></i> , $\Delta$ <i>zitB::Gm<sup>R</sup></i> )	This study
质粒 Plasmids	pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101ts</i> , <i>ParaB-gam-bet-exo</i> , Amp <sup>R</sup>	Donated by Dr. W. Todd Lowther
	pBBR1MCS-2	Cloning vector, carrying <i>Km<sup>R</sup></i> gene	Donated by Prof. Jose Enrique Ruiz-Sainz
	pBBR1MCS-5	Cloning vector, carrying <i>Gm<sup>R</sup></i> gene	Donated by Prof. Jose Enrique Ruiz-Sainz
	pTrc-HisB	<i>trc</i> promoter, 6 $\times$ His-tag, <i>lacI<sup>q</sup></i> , Amp <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc, China
	pEASY-T3	Easy tag cloning vector, Amp <sup>R</sup>	TransGen Biotech
	pTrc-HisB-CzcD	pTrc-HisB plasmid fused with <i>czcD</i>	This laboratory

表 2 PCR 引物

Table 2 Primers for PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	模板 Template
P1-FRT-MCS2	<u>TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAAAGGAACTT</u> <u>CGGGAAACCTGTCTGTG</u>	pBBR1MCS-2
P2-FRT-MCS2	<u>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTAT</u> <u>AGGAACTTCACCTTCGGGAGCGCCTGAAG</u>	pBBR1MCS-2
P1-FRT-MCS5	<u>TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTT</u> <u>CTGGACGCACACCGTGGAAC</u>	pBBR1MCS-5
P2-FRT-MCS5	<u>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTAT</u> <u>AGGAACTTCGGCGTTGTGACAATTTACC</u>	pBBR1MCS-5
<i>zntA</i> 36nt+P1F	<u>ATGTCGACTCCTGACAATCACGGCAAGAAAGCCCCTTGTGTAGGCTGGAGCTG</u> <u>CTTC</u>	T3-Km <sup>R</sup>
<i>zntA</i> 36nt+P2R	<u>TTATCTCCTGCGCAACAATCTTAACGCATTCGCTGTCATATGAATATCCTCCTTA</u>	T3-Km <sup>R</sup>
<i>zitB</i> 36nt+P1F	<u>ATGGCGCACTCACACTCACACGTCCTCACACCTGTGTGTAGGCTGGAGCTG</u> <u>CTTC</u>	T3-Gm <sup>R</sup>
<i>zitB</i> 36nt+P2R	<u>TTAATGGTGATGATGTGAATGGCCAGACACCCCTTCATATGAATATCCTCCTTA</u>	T3-Gm <sup>R</sup>
<i>zntA</i> verification F	TACTGGCGATTATCTGGACG	<i>E. coli</i> genome
<i>zntA</i> verification R	CTAGTTTGCTTACGGACTCACA	<i>E. coli</i> genome
<i>zitB</i> verification F	TTCGGATGGTTCTTCAATG	<i>E. coli</i> genome
<i>zitB</i> verification R	GACGCTTTCCCGTTCTGG	<i>E. coli</i> genome

注: 波浪线标注的是 P1 和 P2 引物序列; 下划线标注的是 FRT 序列

Note: The wavy line indicates the P1 and P2 primer sequences; The underline indicates the FRT sequence.

### 1.1.2 主要试剂和仪器

*FastPfu* DNA Polymerase、dNTPs、DMT 酶和 pEASY-T3 克隆试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司; 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal) 和 TBE 电泳缓冲液, 赛默飞世尔科技公司; DNA 胶回收试剂盒, 安诺伦生物科技有限公司; Marker IV 和 RNaseA 核糖核酸酶, 天根生化科技有限公司; 卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素和溴化乙锭染液, 北京博奥拓达科技有限公司; 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub>、含 15%甘油的 CaCl<sub>2</sub> 溶液和 ZnCl<sub>2</sub>, 天津市科密欧化学试剂有限公司; T4 DNA Ligase, 宝生物工程(大连)有限公司; L-阿拉伯糖, 北京索莱宝科技有限公司。

凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 稳压稳流电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 紫外-可见分光光度计, 天津普瑞斯仪器有限公司; PCR 仪, 艾本德公司; 恒温金属浴和高速台式离心机, 赛默飞世尔科技公司; 高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基: 酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 加水定容至 1 L, 103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 平板培养基: 酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 琼脂 15.0 g, 加水定容至 1 L, 103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

LBK 液体培养基: 酵母粉 5.0 g, KCl 6.48 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 加水定容至 1 L, 103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

LBK 平板培养基: 酵母粉 5.0 g, KCl 6.48 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 琼脂 15.0 g, 加水定容至 1 L, 103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min, 根据需求添加不同抗生素或不同浓度 ZnCl<sub>2</sub>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 抗性基因插入片段的构建

pBBR1MCS-2 提供卡那霉素抗性基因 (kanamycin resistant gene,  $Km^R$ )。以质粒 pBBR1MCS-2 为模板, 使用 P1-FRT-MCS2 和 P2-FRT-MCS2 敲除引物, 通过 PCR 对抗性基因进行扩增。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应体系: 模板 0.5  $\mu$ g, 上、下游引物终浓度 0.2  $\mu$ mol/L, *FastPfu* DNA Polymerase 2.5 U, dNTPs 终浓度 250  $\mu$ mol/L, 10 $\times$ *FastPfu* buffer 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 50  $\mu$ L。PCR 产物进行加“A”处理, 室温孵育 15 min 或者 37 °C 孵育 10 min, 即可将目的基因连接到克隆载体 pEASY-T3 上。通过蓝白斑筛选出阳性克隆, 得到两端携带 FRT 和通用引物位点 P1、P2 的抗性基因质粒 T3- $Km^R$ , 琼脂糖凝胶电泳验证质粒 T3- $Km^R$  大小。最后将大小验证正确的阳性克隆质粒 T3- $Km^R$  进行测序, 测序正确后冷冻保存以备后续使用。pBBR1MCS-5 提供庆大霉素抗性基因 (gentamycin resistant gene,  $Gm^R$ ), 使用同样的方法, 以 pBBR1MCS-5 为模板, 以 P1-FRT-MCS5 和 P2-FRT-MCS5 为敲除引物, 构建两端携带 FRT 和通用引物位点 P1、P2 的抗性基因质粒 T3- $Gm^R$ 。进一步以质粒 T3- $Km^R$  和质粒 T3- $Gm^R$  为模板通过 PCR 在抗性基因两端分别连接上基因 *zntA* 同源臂和基因 *zitB* 同源臂。构建的抗性基因插入片段用于后续电转化。

### 1.2.2 电转化感受态细胞制备

以携带 pKD46 质粒的 *E. coli* DH5 $\alpha$  为基因敲除出发菌株, 先进行菌种活化。在含 50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养基中接种 DH5 $\alpha$ /pKD46 菌液, 30 °C、160 r/min 培养过夜。菌种活化后菌液按 1% 接种量接种到 200 mL 含 50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养基中, 30 °C 恒温摇床 160 r/min 培养

2 h, 当  $OD_{600}$  值为 0.2 时加入终浓度为 100 mmol/L 且过滤灭菌的 L-阿拉伯糖母液。L-阿拉伯糖可诱导  $\lambda$  Red 系统中蛋白的表达, 30 °C 恒温摇床继续培养至  $OD_{600}$  约为 0.8, 停止培养。冰浴 20 min, 5 000×g 离心 10 min, 弃上清。加入 20 mL 预冷的去离子水重悬清洗菌体离心后弃上清液。再加入 20 mL 预冷的 0.1 mol/L  $CaCl_2$  溶液重悬清洗菌体, 离心后弃上清, 重复 2 次。每 100 mL 菌液制备的感受态细胞重悬于 2 mL 含有 0.1 mol/L  $CaCl_2$  和 15% 甘油的预冷溶液中。整个操作过程应尽量避免被污染, 在超净台内操作且要保持感受态细胞处在低温环境。

### 1.2.3 抗性基因电转化及基因敲除株筛选

在新制备的 100  $\mu$ L 感受态细胞中加入 4  $\mu$ L 胶回收纯化后的同源重组替换片段, 轻弹混匀, 用移液器吸取混合物至预冷的 0.1 cm 电转杯中。设置电转仪的电压为 2 500 V, 使用一次性无菌电转杯, 电击后吸出电转杯中混合物同时加入 700  $\mu$ L 复苏培养基, 37 °C 恒温摇床 160 r/min 复苏培养 1 h。复苏后将带有菌液的 1.5 mL 离心管放置 22 °C 摇床中 50 r/min 孵育 12 h 左右, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。重悬菌体浓缩涂布在含有 25  $\mu$ g/mL Kan 的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落分别在含 25  $\mu$ g/mL Kan 和含 25  $\mu$ g/mL Kan、50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 固体培养基上进行划线, 30 °C 培养 24 h 后观察生长情况。选取能够在含有 50  $\mu$ g/mL Amp 平板上生长的菌株用于进一步敲除实验。用同样的方法进行双基因敲除, 以带有 pKD46 质粒的单基因敲除菌株为出发菌株, 在平板筛选时同时加入卡那霉素和庆大霉素这 2 种抗生素, 控制抗生素的总浓度不可过高, 筛选重组子所用平板培养基中包含抗生素的浓度分别为 12.5  $\mu$ g/mL Kan 和 12.5  $\mu$ g/mL Gen。

### 1.2.4 基因敲除株验证与 pKD46 质粒消除

用无菌枪头挑取筛选平板上的单菌落重悬在 10  $\mu$ L 无菌水中, 取 0.5–1.0  $\mu$ L 重悬菌液作为验证重组子的 PCR 模板, 使用验证引物进行菌液 PCR, 产物测序正确后需消除 pKD46 质粒。将测序正确的基因敲除菌株放置在 42 °C 摇床 160 r/min 培养过夜, 稀释  $10^5$  倍后涂布到 LB 平板上, LB 平板不含有抗生素, 30 °C 恒温培养过夜。挑取平板中大小适中的单菌落, 接种到 5 mL 不含有抗生素的 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养 24 h 后保藏菌种。为验证 pKD46 质粒是否被完全消除, 同时进行平板实验和试管实验: 吸取 100  $\mu$ L 菌液涂布在含 50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 固体培养基上, 同时取 50  $\mu$ L 菌液接种在含 50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 30 °C 培养 24 h。菌株如有生长则表明质粒未被消除, 需重复上述步骤, 利用 pKD46 质粒温敏感的特性继续进行消除。

### 1.2.5 $Zn^{2+}$ 功能互补实验

配制含有不同  $ZnCl_2$  浓度的固体平板培养基, 浓度分别设置为 0、0.10、0.25、0.50、0.75 和 1.00 mmol/L。培养基中不加入任何抗生素。菌种活化至  $OD_{600}$  为 1.0 时将菌液以 10 倍比稀释到  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ 。以空载体作为阴性对照, 同时选取 CDF 家族中已知可以外排  $Zn^{2+}$  的蛋白 CzcD 作为阳性对照。按照浓度逐级降低的顺序从左到右依次点板, 每滴菌液体积为 2  $\mu$ L。将平板倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗性基因插入片段的构建

为敲除 *E. coli* DH5 $\alpha$  的 *zntA* 和 *zitB* 基因, 首先通过 PCR 技术克隆抗性基因, 获得带有卡那霉素抗性基因的 PCR 产物和带有庆大霉素抗

性基因的 PCR 产物。然后将携带 P1、P2 和 FRT 位点的 PCR 产物连接到克隆载体 pEASY-T3 上, 得到重组载体 T3-Km<sup>R</sup> 和 T3-Gm<sup>R</sup>。如图 1 所示, P1 和 P2 是一对通用引物位点, 该通用引物位点允许构建多种抗性基因插入片段; FRT 位点可以被 FLP 重组酶识别, 在 FLP 重组酶介导下 2 个 FRT 位点之间能够发生删除、倒位、易位、插入等重组反应。最后经单酶切验证正确后, 测序证明携带抗性基因的质粒构建成功, 保存用于后续实验。

进一步构建抗性基因插入片段, 以 T3-Km<sup>R</sup> 为模板, 通过 PCR 将目的基因同源臂连接在抗性基因两端。选取 *zntA* 基因序列两端 36 bp 的序列作为同源臂, 构建与 *zntA* 基因发生同源重组的抗性基因片段 *zntA*36nt-P1-FRT-Km<sup>R</sup>-FRT-P2-zntA36nt, 通过胶回收进行纯化。进一步利用  $\lambda$  Red 系统介导的基因重组敲除 *zntA* 基因(图 1)。用同样的方法构建与 *zitB* 基因发生同源重组的抗性基因片段 *zitB*36nt-P1-FRT-Gm<sup>R</sup>-FRT-P2-zitB36nt。

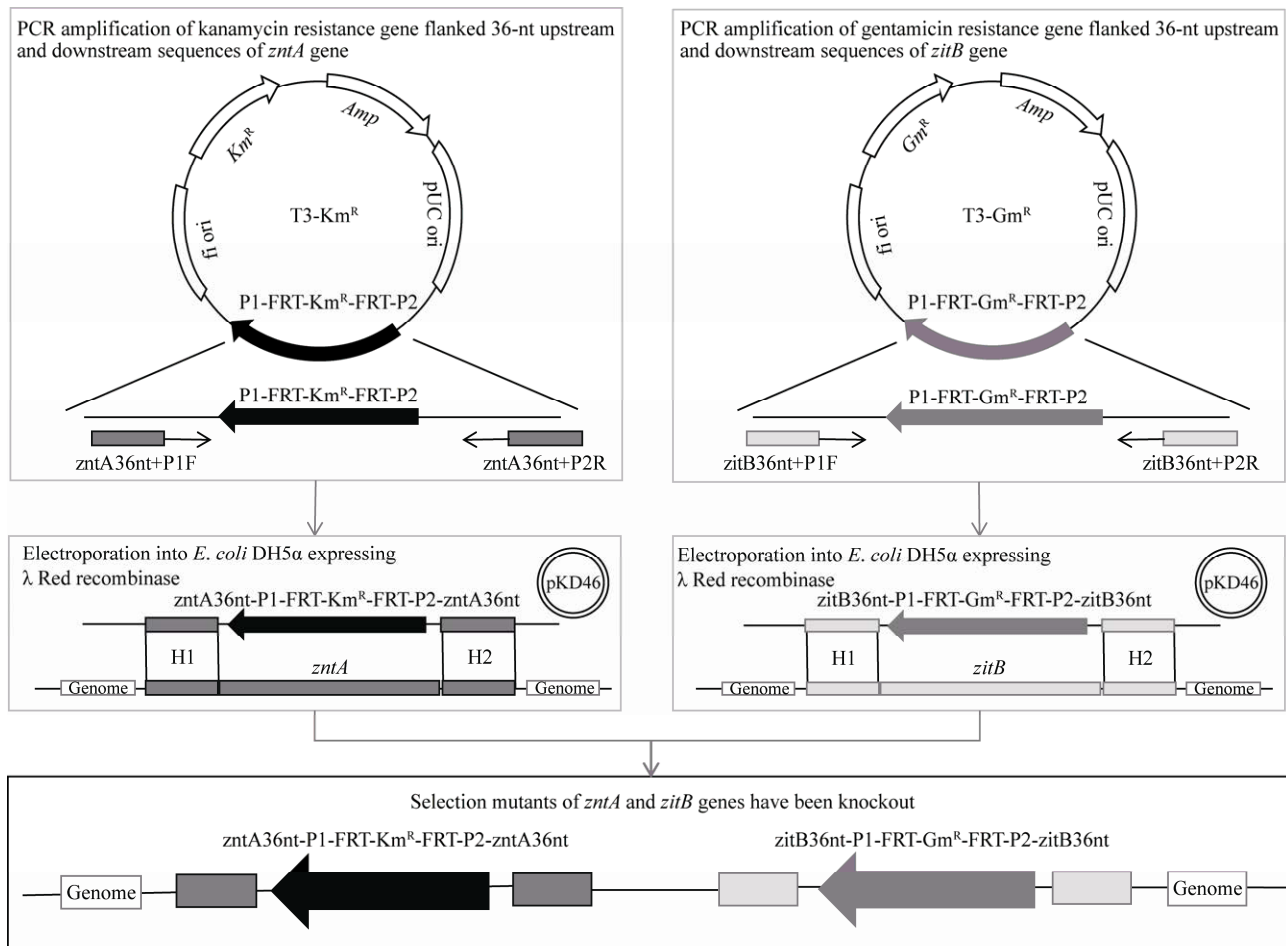


图 1  $\lambda$  Red 系统介导的基因重组 H1 和 H2 为目的基因两侧同源臂; P1 和 P2 为扩增抗性基因的通用引物位点; FRT 为酵母 FLP 重组酶识别位点

Figure 1  $\lambda$  Red system-mediated gene recombination. H1 and H2 stand for the homology arms on both sides of the target gene; P1 and P2 stand for the universal primer sites for the amplification of antibiotics resistance genes; FRT stands for the recognition site of a yeast FLP recombinase.

## 2.2 *zntA* 基因敲除与验证

先敲除 *E. coli* DH5 $\alpha$  中 *zntA* 基因, 根据图 1 所示的基因同源重组原理, 首先通过电转化将携带有同源臂、通用引物位点及酵母 FLP 重组酶识别位点 FRT 的抗性基因片段转化进入 *E. coli* DH5 $\alpha$  细胞内。以温度敏感型质粒 pKD46 为辅助质粒, 室温孵育诱导过夜发生同源重组。在含有 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan 的固体培养基中筛选出 19 株可生长菌株作为候选菌株, 19 株候选菌株在不同药物平板的生长情况见表 3, 命名方式为 KZA (knockout zinc transport gene *zntA*)

加序号。为进一步验证候选菌株基因组中是否已引入了卡那霉素抗性基因片段, 在含有 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan 的固体培养基中进行平板划线实验观察单菌落长势, 最后选取单菌落较大且长势良好的菌株 KZA07、KZA08、KZA09、KZA10、KZA11、KZA12、KZA13、KZA15、KZA18 和 KZA19 进行氨苄青霉素抗性筛选实验。pKD46 质粒具有氨苄青霉素抗性基因, 菌株在含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp 的固体培养基中生长则证明 pKD46 质粒未被消除, 反之则 pKD46 质粒被完全消除。

表 3 *zntA* 敲除候选菌株生长情况

Table 3 The growth of candidate strains that knockout *zntA*

序号 No.	菌株名称 Strain name	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 筛选平板 单菌落长势 Growth of single colony on the screening plate with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 平板划线 单菌落长势 Growth of single colony streaked on the plate with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 平板划线 单菌落长势 Growth of single colony streaked on the plate with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp	验证 PCR 电泳条带大小 Verification of the band size (bp) by PCR in the electrophoresis
1	KZA01	M	+++		
2	KZA02	M	-		
3	KZA03	M	-		
4	KZA04	M	-		
5	KZA05	L	+		
6	KZA06	S	+		
7	KZA07	L	+++	-	2 576
8	KZA08	L	+++	-	2 576
9	KZA09	L	+++	+	2 576
10	KZA10	L	+++	+	2 576
11	KZA11	L	+++	+	2 576
12	KZA12	L	+++	+	2 576
13	KZA13	L	+++	-	2 576
14	KZA14	L	-		
15	KZA15	L	+++	-	2 576
16	KZA16	L	+		
17	KZA17	S	+		
18	KZA18	L	+++	+++	2 576
19	KZA19	L	+++	+++	2 576

注: L: 大; M: 中; S: 小; 空白: 未实验; -: 不生长; +++: 生长良好, 划线形成连续菌苔; +: 生长极弱, 划线形成个别单菌落

Note: L: Large; M: Medium; S: Small; Blank: No experiment; -: No growth; +++: Good growth, streaking to form a continuous lawn; +: The growth is very weak, and individual single colonies are formed by streaking.

在 *zntA* 基因组两端约 400 bp 处设计验证引物, PCR 结果显示 *zntA* 基因片段长度为 2 960 bp, 而已经成功发生同源重组的菌株 KZA07、KZA08、KZA09、KZA10、KZA11、KZA12、KZA13、KZA15、KZA18 和 KZA19 中卡那霉素抗性基因片段长度为 2 576 bp。根据以上结果选取 KZA07 和 KZA18 两株菌进行测序, 测序结果显示 *zntA* 基因已被敲除。通过在含有 50 μg/mL Amp 的固体培养基中筛选验证,

菌株 KZA07 中 pKD46 质粒已被消除, 菌株 KZA18 则保留了 pKD46 质粒, 可用于进一步 *zitB* 基因的敲除。

### 2.3 *zntA* 基因和 *zitB* 基因双敲除与验证

以敲除掉 *zntA* 基因并且保留 pKD46 质粒的菌株 *E. coli* KZA18 为出发菌株, 同样通过电转化方法将庆大霉素抗性基因片段 *zitB*36nt-P1-FRT-Gm<sup>R</sup>-FRT-P2-*zitB*36nt 转化进入 KZA18 中, 室温孵育过夜。表 4 是 24 株菌在不同药物

表 4 *zntA* 和 *zitB* 双敲除候选菌株生长情况

Table 4 The growth of candidate strains that knockout *zntA* and *zitB*

序号 No.	菌株名称 Strain name	30 μg/mL Kan 和 25 μg/mL Gen 平板划线单菌落长势 Growth of single colony streaked on the plate with 30 μg/mL Kan and 25 μg/mL Gen	50 μg/mL Kan 平板划线单菌落长势 Growth of single colony streaked on the plate with 50 μg/mL Kan	30 μg/mL Gen 平板划线单菌落长势 Growth of single colony streaked on the plate with 30 μg/mL Gen	<i>zitB</i> 验证 PCR 电泳条带大小 Verification of the band size of <i>zitB</i> by PCR in the electrophoresis (bp)	<i>zntA</i> 验证 PCR 电泳条带大小 Verification of the band size of <i>zntA</i> by PCR in the electrophoresis (bp)
1	KZAB01	-	-	+++		
2	KZAB02	-	-	+++		
3	KZAB03	-	-	+++		
4	KZAB04	++	++	+++	1 571	2 576
5	KZAB05	-	-	+++		
6	KZAB06	-	-	+++		
7	KZAB07	-	-	+++		
8	KZAB08	-	-	+++		
9	KZAB09	-	-	+++		
10	KZAB10	-	-	+++		
11	KZAB11	-	-	+++		
12	KZAB12	++	+++	+++		
13	KZAB13	-	-	+++		
14	KZAB14	-	-	+++		
15	KZAB15	+++	+++	+++		
16	KZAB16	-	-	+++		
17	KZAB17	+++	++	+	1 571	2 576
18	KZAB18	++	++	++		
19	KZAB19	+++	+++	++		
20	KZAB20	+++	+++	++	1 571	2 576
21	KZAB21	+++	+	++		
22	KZAB22	+++	+++	+++		
23	KZAB23	+++	+++	++		
24	KZAB24	-	++	-		

注: 空白: 未实验; -: 不生长; +++: 生长良好, 划线形成连续菌苔; ++: 生长较弱, 划线形成连续密集单菌落; +: 生长极弱, 划线形成个别单菌落

Note: Blank: No experiment; -: No growth; +++: Good growth, streaking to form a continuous lawn; ++: Weak growth, streaking to form a continuous dense single colony; +: The growth is very weak, and individual single colonies are formed by streaking.



平板上的生长情况统计表,命名方式为 KZAB (knock out zinc transport gene *zntA* and *zitB*)加序号,其中可以同时耐受卡那霉素和庆大霉素的菌株可能已经发生同源重组,选取菌株 KZAB04、KZAB17 和 KZAB20 进一步进行 PCR 验证。在 *zitB* 基因两端的基因组上约 260 bp 处设计验证引物。如图 2 所示, *zntA* 验证引物对应的 PCR 产物大小为 2 576 bp, *zitB* 验证引物对应的 PCR 产物大小为 1 571 bp。对 PCR 产物进行测序验证,结果显示 *zitB* 和 *zntA* 基因已被同时敲除。在含有氨苄青霉素的筛选平板中培

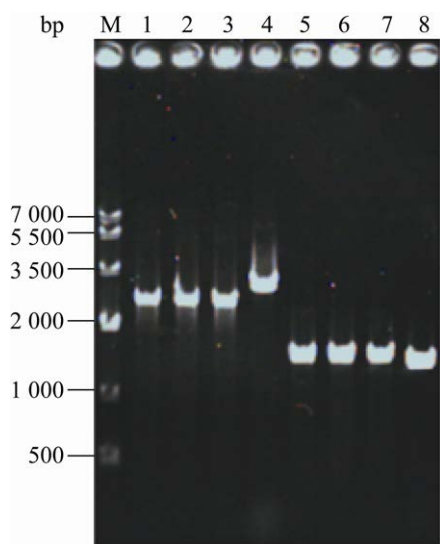


图 2 大肠杆菌(*E. coli*)  $\Delta zntA$  和  $\Delta zitB$  基因敲除菌株 PCR 验证 M: Marker IV; 1-4: *zntA* 基因敲除验证 PCR 产物; 1: KZAB04; 2: KZAB17; 3: KZAB20; 4: *E. coli* DH5 $\alpha$ 。5-8: *zitB* 基因敲除验证 PCR 产物; 5: KZAB04; 6: KZAB17; 7: KZAB20; 8: *E. coli* DH5 $\alpha$

Figure 2 Verification of the gene mutants of *E. coli* ( $\Delta zntA$ ,  $\Delta zitB$ ) by PCR. M: Marker IV; 1-4: The PCR products of *zntA* gene knockout verification; 1: KZAB04; 2: KZAB17; 3: KZAB20; 4: *E. coli* DH5 $\alpha$ . 5-8: The PCR products of *zitB* gene knockout verification; 5: KZAB04; 6: KZAB17; 7: KZAB20; 8: *E. coli* DH5 $\alpha$ .

养时菌株 KZAB04 完全不生长,表明 pKD46 质粒已被完全消除,可用于进一步实验。

#### 2.4 基因敲除菌株 $Zn^{2+}$ 功能互补实验

为验证基因敲除菌株是否构建成功,采用梯度稀释平板点样实验检测基因敲除菌株和对照菌株对不同浓度  $Zn^{2+}$  的耐受情况。将空白对照 pTrc-HisB 和阳性对照 pTrc-CzcD 分别转化进入出发菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、基因敲除菌株 KZA07 和 KZAB04 中。活化菌株并培养过夜,当  $OD_{600}$  为 1.0 时停止培养进行平板实验。图 3 结果显示,随着  $Zn^{2+}$  浓度的提高( $10^{-5}$ – $10^0$ ),出发菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  的生长几乎未受到抑制,而基因敲除菌株 KZA07 和 KZAB04 的生长分别受到不同程度的抑制,其中 KZAB04 更显著;在  $Zn^{2+}$  浓度为 0.25 mmol/L、稀释倍数为  $10^{-4}$  时 KZAB04 生长已完全被抑制;与空白对照 KZA07/pTrc 和 KZAB04/pTrc 相比,阳性对照 KZA07/pTrc-CzcD 与 KZAB04/pTrc-CzcD 长势要明显好于空白对照,明显恢复  $Zn^{2+}$  敏感突变株外排  $Zn^{2+}$  的功能。以上结果表明基因敲除菌株 KZA07 和 KZAB04 对  $Zn^{2+}$  更加敏感,  $Zn^{2+}$  敏感突变株构建成功。

### 3 讨论与结论

基因敲除是一种重要的分子生物学技术,也称为基因打靶<sup>[24]</sup>。利用该技术,人们可以通过使目标基因缺失来探索未知基因的功能<sup>[25-26]</sup>。近些年已经出现许多新的基因敲除技术,例如 CRISPR-Cas9 技术和 Split-Marker 重组技术等。以  $\lambda$  噬菌体 Red 重组系统为基础的基因敲除技术最常见,其优点在于方便简洁,仅需长度为 30–50 bp 的同源序列即可识别目标基因,通过 PCR 即可在抗性片段两端引入同源臂。本研究选取的同源序列长度为 36 nt,可实现对目标基因的识别,而且长度适中,减少了非特异性识

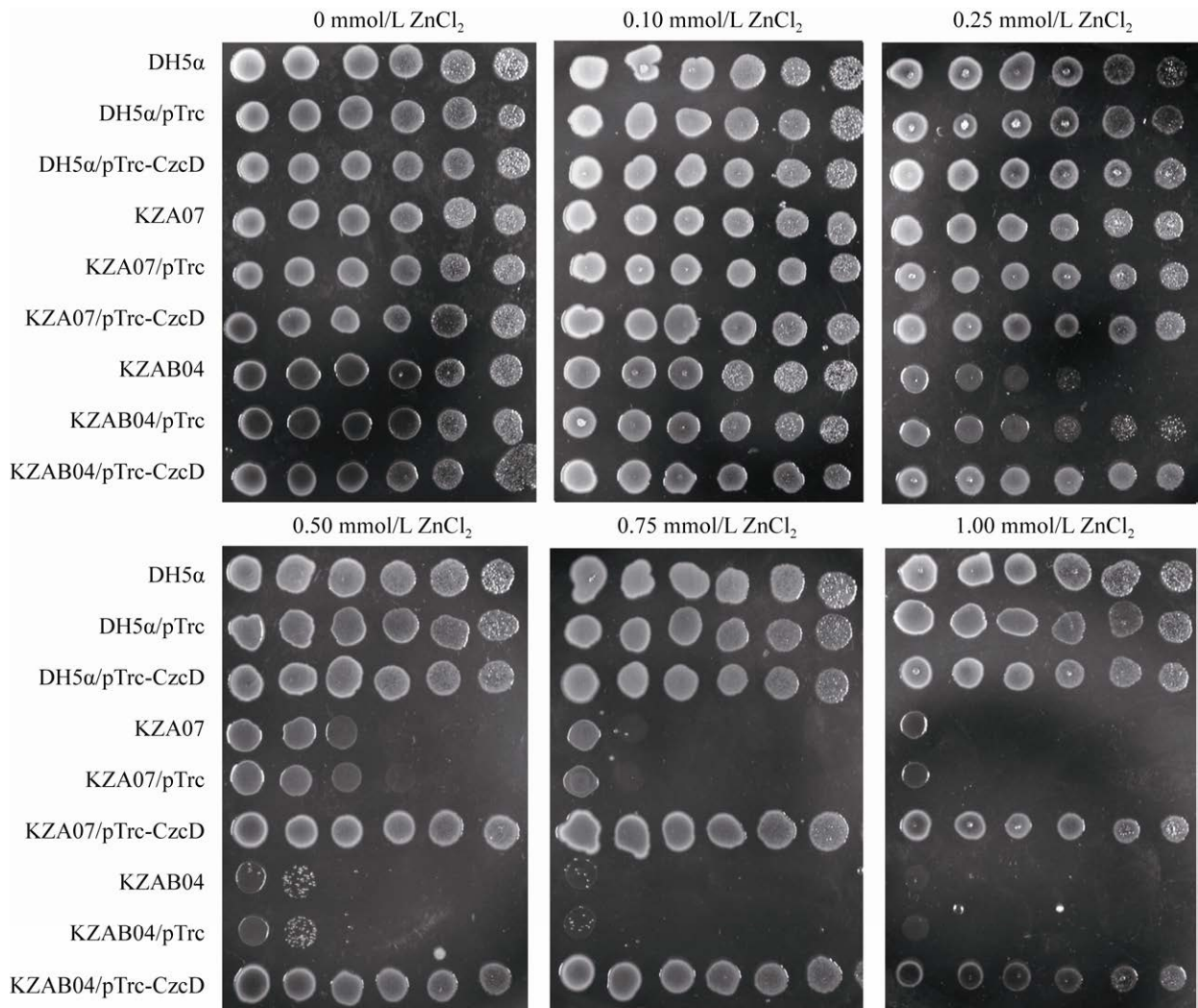


图3 基因敲除菌株功能互补实验 从左至右菌液稀释倍数依次为  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$   
 Figure 3 Functional complementarity tests of gene knockout mutants. From left to right, the dilution factor of the culture is  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , and  $10^{-5}$  in turns.

别。传统的基因敲除技术利用微生物本身的 RecA 重组系统, 重组效率低<sup>[1]</sup>, 但 Red 重组系统则具有较高的重组率。

大肠杆菌作为模式菌株, 常被用作基因敲除出发菌株。由于 *E. coli* DH5 $\alpha$  生长速度较快且易于保存质粒, 本研究选取 *E. coli* DH5 $\alpha$  作为出发菌株。在对  $\lambda$  Red 系统的蛋白进行诱导表达时, 需要 L-阿拉伯糖作为诱导物。*E. coli* DH5 $\alpha$  不是阿拉伯糖酶缺陷型菌株, 因此需要提

高 L-阿拉伯糖的浓度进行诱导。当 L-阿拉伯糖诱导浓度提高到 100 mmol/L 时, 同源重组效率显著提高, 提高了实验成功率。在  $Zn^{2+}$  功能互补实验中, 基因敲除菌株提高了出发菌株对  $Zn^{2+}$  的敏感程度, 而且阳性对照 CzcD 长势明显好于空白对照,  $Zn^{2+}$  敏感突变株构建成功。这证明此方法可以实现大肠杆菌的基因敲除, 为其他革兰氏阴性菌基因敲除菌株的构建提供了技术参考。此外, 在其他微生物中, Red 重组

系统在一定实验条件下同样可以介导基因重组的发生。本研究通过  $\lambda$  Red 重组系统成功构建了大肠杆菌  $Zn^{2+}$  敏感突变株 KZAB04, 为 *zntA* 和 *zitB* 基因功能的研究以及其他  $Zn^{2+}$  转运蛋白基因的功能鉴定与分析奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] 胡堃, 史兆兴, 赛道建, 黄留玉. Red 重组系统及在微生物基因敲除中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(5): 628-632  
Hu K, Shi ZX, Sai DJ, Huang LY. The red recombination system and its application to gene knock-out in microorganism[J]. Hereditas, 2003, 25(5): 628-632 (in Chinese)
- [2] Wang SH, Dai JJ, Meng QM, Han XG, Han Y, Zhao YC, Yang DH, Ding C, Yu SQ. DotU expression is highly induced during *in vivo* infection and responsible for virulence and Hcp1 secretion in avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 588
- [3] Wang SH, Bao YL, Meng QM, Xia YJ, Zhao YC, Wang Y, Tang F, ZhuGe XK, Yu SQ, Han XG, et al. IbeR facilitates stress-resistance, invasion and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119698
- [4] 李继东, 才学鹏. 山羊痘病毒 *TK* 基因功能缺失对其增殖的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 319-326  
Li JD, Cai XP. Effect on proliferation of goat pox virus of *TK* gene deficiency[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(2): 319-326 (in Chinese)
- [5] Russell CB, Thaler DS, Dahlquist FW. Chromosomal transformation of *Escherichia coli recD* strains with linearized plasmids[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(5): 2609-2613
- [6] Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(9): 4617-4622
- [7] Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(20): 6228-6237
- [8] 陈欣, 刘龙, 李江华, 刘杰, 堵国成, 陈坚. Red 同源重组敲除 *nagE* 和 *manX* 对大肠杆菌发酵生产氨基葡萄糖的影响[J]. 生物工程学报, 2012, 28(3): 305-319  
Chen X, Liu L, Li JH, Liu J, Du GC, Chen J. Influence of *nagE* and *manX* knockout with red homologous recombination on the microbial production of glucosamine by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(3): 305-319 (in Chinese)
- [9] 吴程华, 严玉霖, 高洪, 谭锐, 董毅. Red 同源重组技术在大肠埃希菌基因敲除中的应用[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(1): 9-11  
Wu CH, Yan YL, Gao H, Tan R, Dong Q. Application of Red homologous recombination technology in gene knockout of *Escherichia coli*[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015(1): 9-11 (in Chinese)
- [10] 李鑫, 李亚芯, 戴建君. Red 两步同源重组法在大肠杆菌基因敲除中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(7): 1934-1940  
Li X, Li YX, Dai JJ. Usage of two-step red homologous recombination method to knockout the gene of *Escherichia coli*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(7): 1934-1940 (in Chinese)
- [11] 吕沈聪, 赵颖颖, 钟卫鸿. Red 同源重组在大肠杆菌基因敲除中的应用[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(6): 1-6  
Lü Shencong, ZHAO Yingying, ZHONG Weihong. Application of red homologous recombination in gene knockout of *E. coli*[J]. Chemistry & Bioengineering, 2013, 30(6): 1-6 (in Chinese)
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. PNAS, 2000, 97(12): 6640-6645
- [13] Doublet B, Douard G, Targant H, Meunier D, Madec JY, Cloeckert A. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(2): 359-361
- [14] Barresi V, Valenti G, Spampinato G, Musso N, Castorina S, Rizzarelli E, Condorelli DF. Transcriptome analysis reveals an altered expression profile of zinc transporters in colorectal cancer[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(12): 9707-9719
- [15] Blindauer CA. Advances in the molecular understanding of biological zinc transport[J]. Chemical Communications: Cambridge, England, 2015, 51(22): 4544-4563

- [16] Lova Navarro M, Vera Casaño A, Benito López C, Fernández Ballesteros MD, Godoy Díaz DJ, Crespo Erchiga A, Romero Brufau S. Transient neonatal zinc deficiency due to a new autosomal dominant mutation in gene *SLC30A2* (ZnT-2)[J]. *Pediatric Dermatology*, 2014, 31(2): 251-252
- [17] Itsumura N, Kibihara Y, Fukue K, Miyata A, Fukushima K, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Nishito Y, Ishida R, Narita H, et al. Novel mutations in *SLC30A2* involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency[J]. *Pediatric Research*, 2016, 80(4): 586-594
- [18] Chandler P, Kochupurakkal BS, Alam S, Richardson AL, Soybel DI, Kelleher SL. Subtype-specific accumulation of intracellular zinc pools is associated with the malignant phenotype in breast cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2016, 15: 2
- [19] Pan Z, Choi S, Ouadid-Ahidouch H, Yang JM, Beattie JH, Korichneva I. Zinc transporters and dysregulated channels in cancers[J]. *Frontiers in Bioscience: Landmark Edition*, 2017, 22: 623-643
- [20] Hildebrand MS, Phillips AM, Mullen SA, Adlard PA, Hardies K, Damiano JA, Wimmer V, Bellows ST, McMahon JM, Burgess R, et al. Loss of synaptic Zn<sup>2+</sup> transporter function increases risk of febrile seizures[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17816
- [21] Kimura T, Kambe T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: an overview and perspective[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 336
- [22] Leyva-Illades D, Chen P, Zogzas CE, Hutchens S, Mercado JM, Swaim CD, Morrisett RA, Bowman AB, Aschner M, Mukhopadhyay S. *SLC30A10* is a cell surface-localized manganese efflux transporter, and Parkinsonism-causing mutations block its intracellular trafficking and efflux activity[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2014, 34(42): 14079-14095
- [23] Lee SM, Grass G, Haney CJ, Fan B, Rosen BP, Anton A, Nies DH, Rensing C. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 215(2): 273-278
- [24] 丁海峰, 李小申, 黄慧, 苑丽. 基因敲除技术研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(5): 50-54
- Ding HF, Li XS, Huang H, Yuan L. The research progress of gene knockout technology[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018(5): 50-54 (in Chinese)
- [25] 姜巨全, 张正来, 徐桐, 孟琳. 大肠杆菌中 *dctA* 基因敲除及其苹果酸摄取功能鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2018, 49(5): 45-52
- Jiang JQ, Zhang ZL, Xu T, Meng L. Knock-out of *dctA* gene from *Escherichia coli* K12 and characterization of its function for malic acid transportation[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2018, 49(5): 45-52 (in Chinese)
- [26] 姜巨全, 孙开福, 杨立娜, 陈金, 张正来. 松嫩盐单胞菌中 Group 2 *mrp* 操纵子敲除及突变株耐盐碱分析[J]. *东北农业大学学报*, 2017, 48(12): 11-20
- Jiang JQ, Sun KF, Yang LN, Chen J, Zhang ZL. Construction of Group 2-*mrp*-knockout mutant of *Halomonas songnenensis* and analysis on its halo-alkaline-tolerant capacity[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2017, 48(12): 11-20 (in Chinese)