

Red 重组系统在痢疾杆菌基因敲除中的应用研究

胡 堃^{1,2} 史兆兴¹ 王恒樑¹ 冯尔玲¹ 黄留玉^{1*}

(¹军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071) (²山东师范大学生命科学学院 济南 250014)

摘 要 利用 λ 噬菌体的 Red 系统在细菌中进行基因敲除的技术,最近发展较快,但多在大肠杆菌中进行。以 *alkA*、*wcaJ*、*yphF* 和 *dam* 4 个基因为例,分别在大肠杆菌和痢疾杆菌中利用 Red 系统进行基因敲除。对于大肠杆菌,除 *dam* 基因外,其余 3 个基因均能被有效敲除,而在痢疾杆菌中只能敲除一个 *alkA* 基因。结果表明,为使该系统能有效地应用于痢疾杆菌和其它细菌,还需对该系统进行改进。

关键词 Red 系统,基因敲除,突变体

中图分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2003)06-0740-07

Red 重组系统属于 λ 噬菌体的重组系统,其编码基因为 *exo*、*red β* 和 *red γ* 。*exo* 基因的产物是 λ 核酸外切酶,它可将 dsDNA 5'端切开,产生 3'端突出^[1]。*red β* 基因编码的 β 蛋白可与 ssDNA 结合促进互补链的复性,并可以介导 DNA 链退火和交换反应^[2]。 β 蛋白与 λ 核酸外切酶形成复合物,调节核酸溶解和重组启动。*red γ* 基因的产物是一个分子量为 16kD 的多肽,结合到宿主的 RecBCD 蛋白,形成二聚体,抑制 RecBCD 的外切酶活性^[3,4]。Murphy 和 Stewart 等^[5~10]用噬菌体 λ 的 Red 重组系统在大肠杆菌中成功建立了快速敲除原核基因的方法,简化了实验操作,缩短了实验周期,从而加快了基因功能的研究。本文从线性打靶 DNA 的引物设计、电击转化条件、不同菌株敲除不同基因等方面探讨 Red 重组系统在细菌基因敲除中的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 BW25113、痢疾杆菌 2457T 为本室保存。pKD3(带有氯霉素抗性基因)、pKD4(带有卡那霉素抗性基因)、pKD46(带有 *exo*、*red β* 和 *red γ* 基因)由 Hilary M. 实验室馈赠。pMD18-T 载体、DNA 限制性内切酶、DNA Marker、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、Ex Taq DNA 聚合酶和 CIAP 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 PCR 引物设计和扩增条件

扩增基因的名称和引物序列见表 1。

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

yphF 基因 PCR 扩增反应体系(100 μ L)为:10 μ L 10 $\times$ Ex buffer,3 μ L 2457T 过夜菌,2 μ L

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2001AA215211)、首都二四八创新工程(H010210360119)

* 通讯作者。Tel:86-10-66948805; E-mail:huangly@nic.bmi.ac.cn

作者简介:胡 堃(1975-)男,山东济南人,硕士研究生,主要从事分子生物学研究。E-mail:matthukun@sina.com

收稿日期:2003-01-23,修回日期:2003-06-25

表 1 扩增目的基因和打靶基因的名称及其引物序列

Table 1 Primers of targeting genes and targeted genes	
DNA fragment name	Primer sequence
<i>yphF</i>	Y1 5'-CGCACCATTAACATCCACAG-3'
	Y2 5'-GACTGCCTCTGTTGCCGTGA-3'
<i>yphFcm</i>	K3 5'-GTTTCAACAACCTGACCTGTTATCGCTGTATGGCGATTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
	K4 5'-AACATAGGGACCTCTGCGAATCAGCGATTAGGGCAGACCACATATGAATATCCTCCTTAGT-3'
<i>wcaJ</i>	W1 5'-GCGCCTGAATGTGGAATC-3'
	W2 5'-ATACCACAAGCCCCAGCC-3'
<i>wcaJcm</i>	K5 5'-CTCTGCTGACGTTGCTGAACGAGTAATGTCGGATCTTCCCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
	K6 5'-AGTACAGCGTGGTGAGTTCAAGGTGACTGATTCTTTTCGCATATGAATATCCTCCTTAGT-3'
<i>alkA</i>	L1 5'-ACGAGGAACGATTTTGGTGAT-3'
	L2 5'-CTCGCTGAAAGCGAATATGG-3'
<i>alkAkm</i>	K1 5'-TGTGCCAGTGAGGAAAGACCGAATGACGCTTTTCGCTGTAACTGATCAGTATAGCCGAATAGCCT -3'
	K2 5'-GAGAGAGCGTTTGCCCAATGCCCTGATGCCATGCTAACGCGTCTTATCAGGCGGCCACAGTCGATGAATCC -3'
<i>dam</i>	D1 5'-GGGGCGGTAATGCCGTGGTT-3'
	D2 5'-GGTCAGCCGTGGTATGTCCT-3'
<i>damcm</i>	K7 5'-ATCTGAAAGTAATCAAGGTTATCTCCGCAATGGTTATCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
	K8 5'-CTTCACCCAGCGCGGCAAAATCAGCCGACAGAATTGAGGGCATATGAATGTCCTCCTTAG-3'

50ng/μL Y1 引物 ,2μL 50ng/μL Y2 引物 ,8μL 2.5mmol/L dNTP ,74.5μL dH₂O ,0.5μL ExTaq 酶。反应参数为 :94℃ 预变性 10min ;94℃ 30s ,50℃ 30s ,72℃ 1min ,30 个循环 ;72℃ 延伸 10min。

yphFcm 基因片段 PCR 扩增反应体系(100μL)为 :10μL 10 × Ex buffer ,1μL 模板质粒 pKD3 2μL 50ng/μL K3 引物 ,2μL 50ng/μL K4 引物 ,8μL 2.5mmol/L dNTP ,76.5μL dH₂O , 0.5μL ExTaq 酶。反应参数为 :94℃ 预变性 10min ;94℃ 30s ,52℃ 30s ,72℃ 1min ,30 个循环 ;72℃ 延伸 10min。

wcaJ 基因、*wcaJcm* 基因片段 , *dam* 基因、*damcm* 基因片段 ,*alkA* 基因、*alkAkm* 基因片段的 PCR 扩增 ,使用各自引物 ,其它反应体系同上。反应参数 *yphF*、*wcaJ*、*dam* 相同 ,*wcaJcm*、*damcm* 的反应参数与上述 *yphFcm* 的相同。

alkA 基因的 PCR 扩增反应参数为 :94℃ 预变性 10min ;94℃ 45s ,55℃ 40s ,72℃ 3min , 30 个循环 ;72℃ 延伸 10min。 *alkAKm* 片段的 PCR 扩增条件为 :94℃ 预变性 10min ;94℃ 30s ,58℃ 40s ,72℃ 1.5min ,30 个循环 ;72℃ 延伸 7min。

1.3 含 *exo*、*redβ* 和 *redγ* 的痢疾杆菌福氏 2a 的构建

一种方法是 将 λ 噬菌体的 Red 重组系统整合至细菌染色体上 ,即用 *Pvu* I 和 *Bst* XI 从克隆有 λRed 重组系统的质粒 pKD46 中切出含 *exo*、*redβ* 和 *redγ* 的基因片段(约 4kb) ,与经 *Sma* I 酶切、并用 CIAP 去磷酸后的 pXL275 自杀载体连接 ,转化 S₁₇-1 λpir ,并经酶切鉴定得

到 pXLkd46 质粒。将此质粒诱动并整合至野生型 2457T 痢疾杆菌中,得到表达 Red γ 、Red β 和 Exo 的痢疾杆菌福氏 2a 2457T,命名为 2457T05。另一种方法是将含有编码 Red 系统的 pKD46 质粒转化到大肠杆菌 BW25113 和痢疾杆菌 2457T 中,构建成 BW25113/pKD46 和 2457T/pKD46 菌株。

1.4 电击感受态细胞的制备

将 2457T05、BW25113/pKD46 和 2457T/pKD46 菌株 30℃ 培养过夜,再将隔夜培养的菌株转接到含对应抗生素的 LB 培养基中 30℃ 继续培养,摇菌过程中,在终止前不同时间加入不同量的 L-阿拉伯糖来诱导 Red 重组系统的表达,培养至设定 OD_{600} 值如 0.5 ~ 0.6,离心收集菌体,用高压灭菌去离子水洗涤 3 次,再用 10% 的灭菌甘油洗涤一次,最后用 80 μ L 10% 的灭菌甘油重悬细菌,制成所需的电击感受态细胞。

1.5 电击转化

电击转化参数为电阻 200 Ω ,电容 25 μ F,电压设置为不同的数值,以期找到最佳的电击电压值。质粒提取等分子生物学常规方法见参考文献 [12]。

1.6 筛选和验证

由于所用的线性打靶 DNA 中间含有抗性基因,与目的基因片段置换后即可整合到宿主菌即阳性克隆的染色体上表达抗生素抗性。利用这个特点进行正向抗生素筛选,初步获得阳性克隆。由于目的基因和相应的线性打靶 DNA 的大小具有一定的差异,因此可以通过 PCR 的方法进一步筛选和验证。对野生型和敲除基因的突变株进行的 PCR 验证反应中,引物是相同的,都是用只含有目的基因的序列作引物。

2 结果和讨论

2.1 线性打靶 DNA 的设计和制备

大肠杆菌 RecA 重组系统的打靶基因在自杀性质粒上,而 Red 重组系统的打靶基因可以用线性 DNA。线性打靶 DNA 的设计和制备是利用 Red 系统进行基因敲除的首要步骤。一般打靶基因两端与靶基因两端的序列同源,RecA 重组系统两端的同源序列至少需要 200bp,而 Red 重组系统两端的同源序列只需 40 ~ 50bp。因此本实验用于敲除基因的线性打靶 DNA 两端的同源序列也设计为 40 ~ 50bp,其中间为氯霉素(C_m)抗性或卡那霉素(K_m)抗性基因,这有利于重组子的筛选。为了获得此打靶基因,需设计一对引物,其中一条引物 5'末端的 40 ~ 50bp 与靶基因 5'端同源,3'末端与抗性基因同源;另一条引物 5'末端的 40 ~ 50bp 与靶基因 3'端同源,3'末端与抗性基因的另一端同源。若用带抗性基因的质粒当模板,便能扩增出打靶基因,引物特点及 Red 系统应用于基因敲除的过程详见图 1。

本实验以敲除痢疾杆菌的 4 个基因 *alkA*、*dam*、*wcaJ* 和 *yphF* 为出发点,分别设计了 4 对引物(*yphFcm*、*wcaJcm*、*yphFcm* 和 *alkAkm*),每对引物的 5'端有 40 ~ 50bp 与靶基因同源,3'端与抗性基因同源,用于制备线性打靶 DNA。还设计了 4 对可扩增 *yphF*、*wcaJ*、*yphF* 和 *alkA* 基因的引物,用于对敲除基因的突变株进行 PCR 鉴定。

用于制备线性打靶 DNA 的 PCR 模板通常是质粒,该质粒本身具有筛选重组子的抗性基因。为了减少假阳性,可以把第一次 PCR 的产物稀释 1000 倍,然后以稀释液为模板

进行两次 PCR ,用第二次 PCR 产物去转化宿主菌 ,可大大减少假阳性。也可以利用 *DpnI* 消化处理 PCR 产物 ,*DpnI* 只作用甲基化的底物 ,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 *DpnI* 限制性内切酶专一性地降解模板质粒 ,而且 *DpnI* 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。

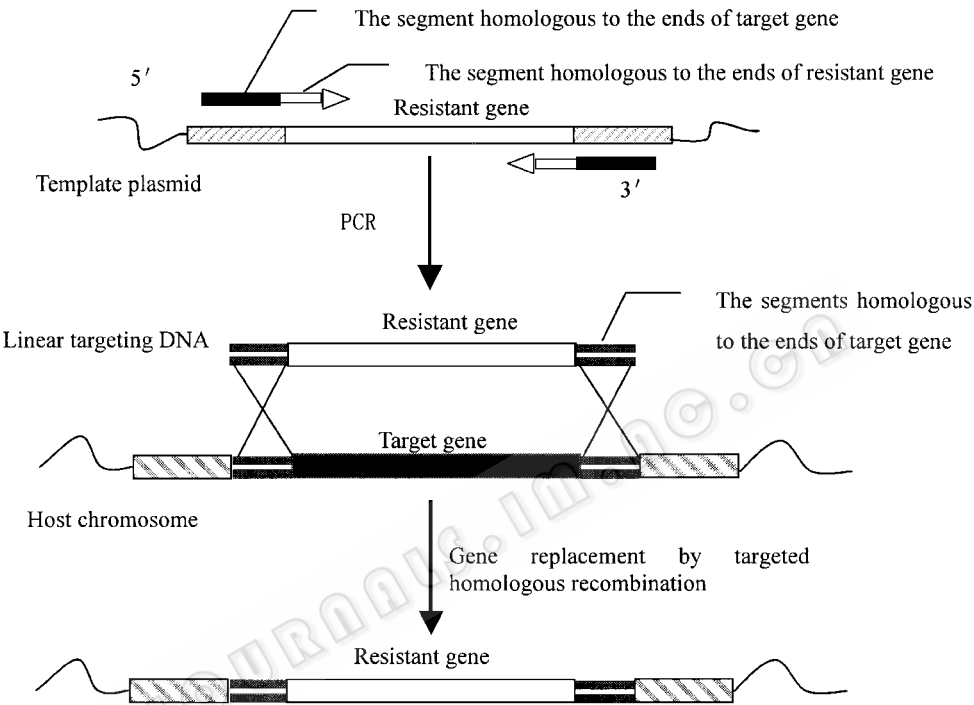


图 1 Red 系统应用于微生物基因敲除的流程

Fig.1 The process of bacteria gene knockout using Red recombination system

2.2 含有 Red 系统的宿主菌的构建

构建含有 Red 系统的宿主菌有两种方式 ,一种是将含有 Red 系统 3 个基因的 pKD46 质粒转化到宿主菌 BW25113 和 2457T 内 ;另一种是将含 *redY*、*redβ* 和 *exo* 基因片段的自杀质粒插入到宿主菌的染色体。这两种方式都有其优缺点 :前者可以通过调节温度和加入诱导剂来控制 Red 系统的表达 ,但需要将质粒转化到宿主菌内 ;后者省略了转化过程 ,可以直接应用 ,但 Red 系统一直处于表达状态 ,这样就增加了 DNA 分子间发生不必要的重组。因此实验中多采用前者作为受体菌来制备电击感受态。

2.3 电击感受态细胞的制备

为提高电击转化效率 ,电击用的感受态细胞的制备是一个需要注意的问题。如果 OD_{600} 值过低或过高都会使转化效率降低 ,导致实验的失败。实验中以大肠杆菌 BW25113 和痢疾杆菌 2457T 做 pKD3 质粒的转化实验 ,以验证感受态的收容效率 ,将电击转化后的感受态细胞孵育 40min 稀释 10 倍后各取 0.1mL 涂含有抗生素的平板各 3 块 ,计算平均值 ,得到阳性克隆数与细胞 OD_{600} 作图(图略)。结果表明细胞的 OD_{600} 一般在 0.32 ~ 0.60

间为佳。制备后感受态的终浓度控制在 $2 \sim 5 \times 10^{10}$ cells/mL ,另外对 L-阿拉伯糖的加入时间也进行了分析 ,发现以孵育终止前 30min 加入为佳 ,每毫升感受态细胞加入 1mol/L 的 L-阿拉伯糖 2 μ L。制备过程中以及电击前感受态细胞要始终置于冰上。

2.4 电击转化

为了增大线性打靶 DNA 进入受体菌的机率 ,增加了其浓度 ,最佳浓度在理论上应大于 0.3 μ g/mL^[11] ,本实验实际使用的平均浓度为 4.72 μ g/mL。

电击转化过程中 ,使用 0.1cm 电击杯 ,设计一组不同电压下的电击转化实验 ,对于大肠杆菌来说没有什么差异 ,但痢疾杆菌以 1.8kV 为好。另外转化所用电击杯在电击前需要置于冰箱预冷 ,并清洗干净。加入样品时避免有气泡产生 ,样品的离子浓度控制在一定的范围 ,否则在电击时易产生火花。

有时在筛选平板上长出的抗性克隆 ,当被转入液体筛选培养基时便不能生长。这是线性 DNA 瞬时表达了抗生素抗性蛋白导致了这一现象的出现 ,由于线性 DNA 携带供筛选用的抗药性基因及其启动子 ,即使线性 NDA 没有整合进环形靶分子 ,抗药性基因也可以短暂表达。为了使假抗性克隆的绝对数量保持在最低限度 ,电击后在无抗生素选择压力的培养基中培养的时间尽量缩短。实验中设计了几个孵育时间段 ,结果显示当孵育时间为 40min 时较为理想。

2.5 Red 系统应用于大肠杆菌和痢疾杆菌的结果比较

在上述实验条件的基础上 ,对 Red 系统应用于大肠杆菌(以 BW25113 为例)和痢疾杆菌(以福氏 2a 型 2457T 为例)敲除上述 4 个基因的结果进行了比较 ,结果显示 ,对于大肠杆菌 ,除 *dam* 基因外其余 3 个基因均被敲除(图 2~4)。说明设计的线性打靶 DNA 可以有效地与目的基因上的相应同源序列发生重组 ,达到基因敲除的目的。但对于痢疾杆菌 ,只有 *alkA* 被成功敲除(图 5) ,*wcaJ*、*yphF* 和 *dam* 均未被敲除。另外本实验室也利用 Red 系统在痢疾杆菌中成功的对 *asd* 基因实施了敲除^[13] ,线性打靶 DNA 的同源臂长度是 50bp ,Kofoid 和 Roth^[14]在沙门氏菌(*Salmonella*)中应用 Red 重组系统也获得了基因敲除 ,但所用的同源臂长度达数百碱基或更长。

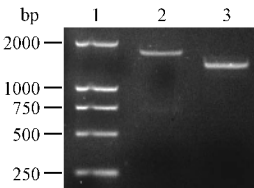


图 2 大肠杆菌 *alkA* 缺失突变体 BW25113028D 的 PCR 鉴定

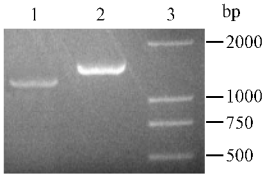


图 3 大肠杆菌 *wcaJ* 缺失突变体 BW25113035D 的 PCR 鉴定

Fig.2 Characterization of gene *alkA* deletion mutant BW25113028D by PCR analysis

1. DL2000 Marker ; 2. *alkA* PCR product (amplified from BW25113) ; 3. *alkA* PCR product (amplified from BW25113028D).

Fig.3 Characterization of gene *wcaJ* deletion mutant BW25113035D by PCR analysis

1. *wcaJm* PCR product (amplified from BW25113035D) ; 2. *wcaJ* PCR product (amplified from BW25113) ; 3. DL2000 Marker .

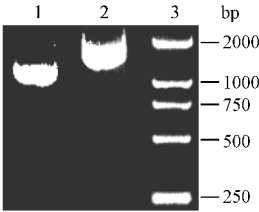


图 4 大肠杆菌 *yphF* 缺失突变体 BW25113036D 的 PCR 鉴定

Fig.4 Characterization of gene *yphF* deletion mutant BW25113036D by PCR analysis

1. *yphFcm* PCR product (amplified from BW25113036D); 2. *yphF* PCR product (amplified from BW251113); 3. DL2000 Marker .

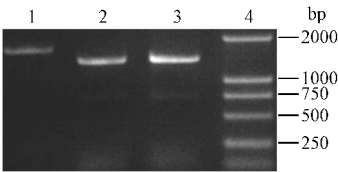


图 5 痢疾杆菌 *alkA* 缺失突变体 2457T028D 的 PCR 鉴定

Fig.5 Characterization of gene *alkA* deletion mutant 2457T028 by PCR analysis

1. *alkA* PCR product (amplified from 2457T); 2. *alkAcm* PCR product (amplified from 2457T028); 3. *alkAcm* PCR product (amplified from pKD3); 4. DL2000 Marker .

痢疾杆菌中 4 个基因只有 1 个被敲除 ,对其他 3 个基因未能成功发生敲除的原因可能有 (1)Red 系统是大肠杆菌的 λ 噬菌体或 *rac* 噬菌体的重组系统 ,因此对宿主菌有一定的要求。它可以在大肠杆菌中有效地发挥作用 ,在其他细菌中是否能够有效地发挥作用还存在一定的疑问。(2)线性打靶 DNA 的同源臂长度不够 ,不能很好地与目的基因上的同源序列发生同源重组 ,影响了基因的敲除。(3)线性打靶 DNA 同源序列及邻近序列的结构特异性 ,阻碍了 Red 重组系统的同源重组功能。(4)这 3 个基因可能是痢疾杆菌生存必需基因 ,敲除以后无法筛选到。同时 ,*dam* 基因在大肠杆菌中也未被敲除的原因值得进一步探讨 ,可能是由于其基因产物是腺嘌呤甲基化酶(Dam) ,是细菌生存和繁殖所必须的 ,敲掉后宿主菌即死亡 ,所以在大肠杆菌中亦未获得阳性克隆。Red 系统在痢疾杆菌中可以成功地敲除 *alkA* 基因 ,表明 Red 重组系统可以应用于与大肠杆菌亲缘关系较近的痢疾杆菌。

到目前为止 ,Red 系统还主要应用于大肠杆菌的基因敲除 ,但本实验结果表明 ,Red 系统也适用于痢疾杆菌 ,不足之处是效率较低。今后所要做的就是如何提高线性打靶 DNA 的转化效率 ,提高和控制 Red 系统在痢疾杆菌中的有效表达。相信随着研究工作的深入 ,该系统必将能普遍应用于多数菌株基因的敲除。为后基因组时代的功能基因组计划的成功实施提供一种新的工具。

参 考 文 献

[1] Little J W . An exonuclease induced by bacteriophage λ . II . Nature of the enzymic reaction . *Biol Chem* , 1967 , **242** : 679 ~ 686 .

[2] Li Z , Karakousis G , Chiu S K , *et al* . The beta protein of phage lambda promotes strand exchange . *Mol Biol* , 1998 , **276** : 733 ~ 744 .

[3] Murphy K C . λ gam protein inhibits the helicase and M-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme . *J Bacteriol* , 1991 , **173** : 5808 ~ 5821 .

[4] Karu A E , Sakaki Y , Echols H , *et al* . The γ protein specified by bacteriophage λ . *Biol Chem* , 1975 , **250** : 7377 ~ 7387 .

[5] 胡 堃 ,史兆兴 ,赛道建 ,等 . Red 重组系统及在微生物基因敲除中的应用 . *遗传* , 20003 , **25** (5) : 628 ~ 632 .

[6] Julio S M , Heithoff D M , Provenzano D , *et al* . DNA adenine methylase is essential for viability and plays role in the nat-

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- genesis of *Yersinia Pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 2001, **69**(12): 7610 ~ 7615.
- [7] Xu L, Hui L J, Wang S H H, *et al.* Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2001, **61**: 3176 ~ 3181.
- [8] Zhu H, Cong J P, Mamora G, *et al.* Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 14470 ~ 14475.
- [9] Belcher C E, Drenkow J, Kehoe B, *et al.* The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(25): 13847 ~ 13852.
- [10] Murphy K C. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 2063 ~ 2071.
- [11] Daiguan Yu, Hilary M Ellis, E-Chiang Lee, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(11): 5978 ~ 5983.
- [12] Sambrook J, Fritton E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] 王恒昉, 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): 161 ~ 164.
- [14] Potetee A R. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **201**(1): 9 ~ 14.

Study on Gene Knockout Using Red System in *Shigella flexneri*

Hu Kun^{1,2} Shi Zhaoxing¹ Wang Hengliang¹ Feng Erling¹ Huang Liuyu^{1*}

(¹ Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

(² College of Life Science of Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract The technology of gene knockout using λ Red system in bacteria has been developed lately, but its application being limited to *Escherichia coli*. In order to get some experiences in other bacteria we select four genes, including *alkA*, *wcaJ*, *yphF* and *dam*, to test gene knockout using Red system in *E. coli* and *Shigella*. As a result, three genes were successfully knocked out in *E. coli* except *dam* while only *alkA* gene was knocked out in *Shigella*. It showed that the Red system should be improved if it was to be effectively used in *Shigella* and other bacteria.

Key words Red system, Gene knockout, Mutant

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA215211); Capital "248" Key Innovation Project (H010210360119)

* Corresponding author. Tel 86-10-66948805; E-mail huangly@nic.bmi.ac.cn

Received date: 01-23-2003