

# 大肠杆菌胸腺嘧啶合成酶 *thyA* 缺失突变菌株的构建

黄 维 钟 辉 李 平 曹 诚 马清钧\*

( 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850 )

**摘 要** 大肠杆菌 K-12 DY330 菌株的染色体上整合有一种新型的同源重组系统——缺陷型  $\lambda$  原噬菌体同源重组系统。以 DY330 为出发菌,通过同源重组构建大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株 DY330-TI,其基因组特点是:*thyA* 基因除保留 N 端的 1~49 氨基酸残基相对应的必需核苷酸序列外,将其余部分全部缺失;此外,还敲除了 DY330-TI 中与缺陷型  $\lambda$  原噬菌体同源重组功能相关的基因,从而尽可能避免了通过同源重组产生回复突变的可能性。通过大肠杆菌 *thyA* 基因对该突变株的转化实验,检测转化子的回复突变率,进一步证实该突变株的突变性状稳定,为构建以 *thyA* 为选择标志的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统提供了合适的缺陷型宿主菌。

**关键词** *thyA*, 染色体-质粒平衡致死系统, 同源重组

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)01-0062-05

大肠杆菌是基因工程药物和核酸疫苗生产的主要宿主菌,通常使用不同的抗性基因以维持质粒在大肠杆菌中的稳定性,因此在药物生产和核酸制备过程中会导致抗生素残留及抗药性扩散<sup>[1]</sup>。染色体-质粒平衡致死系统是一类以营养选择标志代替抗性标志的质粒载体系统,它通过将细菌代谢过程中执行重要功能的管家基因,如 *thyA*、*asd*、*glnA* 等基因进行突变<sup>[2~4]</sup> 构建营养缺陷株,这些缺陷株仅能在添加有必需营养物质的基本培养基上生长;当导入带有其野生型序列的互补质粒后,缺陷株可在未添加相应营养物质的基本培养基上生长,二者以基因互补的方式构成染色体-质粒平衡致死系统。由于该系统的质粒不含抗性基因,因此首先在基因工程疫苗研究中得到了广泛应用<sup>[5~9]</sup>。

染色体-质粒平衡致死系统的稳定性与互补质粒的野生型序列及宿主菌缺陷型基因之间同源性的比例直接相关。同源率高会使缺陷型宿主菌通过同源重组回复为野生型,最终导致平衡致死系统的破坏<sup>[6]</sup>。大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株是构建以 *thyA* 为标志的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统的缺陷型宿主菌,由于目前所构建的大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株多为点突变或仅缺失小部分 *thyA* 片段<sup>[3,5,8]</sup>,容易与质粒携带的野生型 *thyA* 序列发生同源重组产生回复突变,因此构建不能通过同源重组恢复野生表型的突变株具有重要意义。

大肠杆菌 K-12 DY330 菌株的染色体上整合有一种缺陷型  $\lambda$  原噬菌体同源重组系统<sup>[10]</sup>。该系统中执行重组功能的基因 *exo*、*bet*、*gam* 的表达受温控阻遏子 *cI857* 的调控,DY330 经 42℃ 短时活化(< 15min)后,*cI857* 呈去阻遏状态,上述基因得以表达,其中 Gam 起着抵御宿主菌内 RecBCD 核酸外切酶对外源 DNA 片段的降解作用,Beta 和 Exo 则执行同源重组功能。该系统的优点是:它仅需两端具有 40~50bp 同源序列的外源线性 DNA 片段,即可使之与大肠杆菌染色体上的目的基因发生同源重组,其操作简便,重组效率高。用于重组的外源线性 DNA 可以是抗性基因片段、寡核苷酸序列或其它任何基因序列,只要便于缺陷型目的基因的筛选即可。

基于上述原理,本研究以大肠杆菌 DY330 为出发菌,通过两端带有 50bp 与 *thyA* 及其下游序列同源的卡那抗性基因片段与 DY330 基因组 *thyA* 发生同源重组,从而获得了大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株;此外,还将 *thyA*<sup>-</sup> 株中与缺陷型  $\lambda$  原噬菌体同源重组功能相关的基因敲除,从而尽可能避免了产生回复突变的可能性。通过报告基因(大肠杆菌 *thyA*)对该突变株转化的回复突变实验,进一步证实了其突变性状的稳定,为构建以该菌株为宿主菌的大肠杆菌 *thyA* 染色体-质粒平衡致死系统奠定基础。

基金项目: 国家 863 计划(2001AA215021)

\* 通讯作者。Tel 86-10-66931808;Fax 86-10-68155151;E-mail: qingjun\_ma@sohu.com

作者简介: 黄 维(1972-),女,天津蓟县人,硕士,研究方向为基因药物。E-mail: htw5666@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-02-26,修回日期: 2003-08-27

# 1 材料和方法

## 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 DY330 (W3110Δ*lacU169* gal1490λ*cl857Δ*(*cro-bioA*))由美国国立肿瘤研究院 Donald L Court 教授惠赠;质粒 pET28I(+)(卡那霉素抗性)购于 Novagen 公司;质粒 pcDNA3.1myc-his(-)(氨苄青霉素抗性, Amp)购于 Invitrogen 公司。

## 1.2 试剂

Taq plus DNA 聚合酶及 *pfu* DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术服务有限公司;PCR 产物纯化试剂盒购于 Promega 公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xba*I 购于 Promega 公司;胸腺嘧啶核苷购自美国 Sigma 公司;DNA Marker DL2000 购于 TaKaRa 公司;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

## 1.3 PCR 引物设计

P1 5'-CAGATGCGTTTTAACCTGCAAGATGGA-TTCCCGCTGGTGACAACCTAAACGACCCGTAAGAC-ACGACTTAT-3'; P2 5'-ACGTTGTGTTTTATGCCG-GCAGTATGGAGCGAGGAGAAAAAAGACGAGGGA-GAAAACTCATCGAGCAT-3'。引物 P1 5'端的 50bp (黑斜体)为 GenBank 收录的大肠杆菌 *thyA* 的 311 ~ 360bp 3'端的 21bp 为卡那抗性基因的 5'序列。引物 P2 5'端的 50bp 为大肠杆菌 *thyA* 3'-UTR (3' Untranslated region 3'端不翻译区)下游的 50bp 的互补序列 (黑斜体) 3'端的 22bp 与卡那抗性基因 C 端互补。P1、P2 合成的 PCR 产物用于大肠杆菌 DY330 基因组 *thyA* 的敲除。

P3 : 5'-AAGCTTGGCTGTCTCAGGTT-3'; P4 : 5'-ACGTTGTGTTTTATGCCGG-3'。引物 P3 5'端为 GenBank 收录的大肠杆菌 *thyA* 的 1 ~ 20bp; P4 与 P2 5'端的 1 ~ 20bp 相同,即与大肠杆菌 *thyA* 3'-UTR 下游的第 31 ~ 50bp 的序列互补。P3、P4 用于鉴别 DY330 基因组 *thyA* 是否被精确定位缺失。

P5 : 5'-CAGCCAGCTTCCCAGCCAGCGTTGCGA-GTGCAGTACTCATCAGCCAGCTTCCCAGCCAGCGTTG-CGAGTGCAGTACTCAT-3'; P6 : 5'-ATGAGTACTGCAC-TCGCAACGCTGGCTGGGAAGCTGGCTGATGAGTACTGC-ACTCGCAACGCTGGCTGGGAAGCTGGCTG-3'。P5 5'端 40bp (黑斜体)为 GenBank 收录的 λ 噬菌体 *bet* 基因的最后 40bp (λ 噬菌体基因组的 32771 ~ 32810bp), 3'端 40bp 为 λ 噬菌体 *ssb* 基因的起始 40bp (λ 噬菌体基因组的 33541 ~ 33580bp); P6 与 P5 互补。P5、P6 合成的寡核苷酸序列用于缺陷型 λ 原

噬菌体基因组 *gam-kil-cIII* 片段的敲除。

P7 : 5'-TCATGCTGCCACCTTCTGCT-3'; P8 : 5'-TCAGGAATATTTGATTTCAGAT-3'。P7 为 λ 噬菌体 *bet* 基因的起始 20bp (λ 噬菌体基因组的 32025 ~ 32044bp); P8 是与 *ssb* 基因起始第 20 ~ 40bp (λ 噬菌体基因组的 33560 ~ 33580bp) 的互补序列。P7、P8 用于鉴别缺陷型 λ 原噬菌体基因组 *gam-kil-cIII* 片段是否被敲除。

P9 5'-CG CAATTCATGATTCAGTATTTAGTTCTG-3'; P10 : 5'-CGGGATCCCTTAGATAGCCACCGGCGCTTT-3'。引物 P9、P10 用于大肠杆菌 *thyA* 基因 CDS 序列的扩增。上游引物 P9 5'端引入 *Xba*I 位点(下划线斜体);下游引物 P10 5'引入 *Bam*H I 位点(下划线斜体)。

## 1.4 质粒构建

将 P9、P10 的 PCR 产物克隆于真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)A 的 MCS 的 *Xba*I - *Bam*H I 位点处,获得含有大肠杆菌 *thyA* 基因全部氨基酸编码序列的重组质粒,命名为 pcDNA3.1-*thyA*。该质粒只能在原核细胞中(如大肠杆菌)复制,而不能表达胸腺嘧啶合成酶(大肠杆菌 *thyA* 基因的基因产物)。pcDNA3.1-*thyA* 用于转化大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株,以检测缺陷株的回复突变率。

## 1.5 同源重组

按文献 [10] 方法制备 DY330 感受态细胞,通过电转化将 P1、P2 的 PCR 产物导入 DY330 感受态细胞,转化完毕后,立即将 DY330 细胞用 1mL 含胸腺嘧啶(50μg/mL)的 LB 培养基稀释,32℃ 摇床孵育 30min,取孵育后的感受态细胞培养液 200μL 涂布于含胸腺嘧啶(50μg/mL)和卡那霉素(20μg/mL)的 MM 平板,32℃ 培养箱培养,挑取卡那抗性的菌落进行鉴定,生长依赖胸腺嘧啶、具有卡那霉素抗性的克隆即为大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株,命名为 DY330-T;再按照文献 [10] 方法,利用 P5、P6 退火而成的 Oligo 片段转化 DY330-T,获得的克隆平行点种于含/不含胸腺嘧啶的卡那霉素 MM 平板,分别置于 42℃ 和 32℃ 培养,挑选在 42℃ 和 32℃ 均能生长、且仍为胸腺嘧啶依赖型、具有卡那霉素抗性的克隆,命名为 DY330-TI。

## 1.6 大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株的稳定性试验

将获得的重组质粒 pcDNA3.1-*thyA* 转化 DY330-TI,获得的转化子在含胸腺嘧啶(50μg/mL)氨苄青霉素(50μg/mL)的 MM 培养基中接种培养 30 次,每 5 次集菌 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup>,涂布于含/不含胸腺嘧啶的氨苄青霉素 MM 平板,检测转化子的回复突变率。

2 结果

2.1 DY330 *thyA*<sup>-</sup> 株的构建、筛选和鉴定

以 P1、P2 为引物 ,pET28b( + )质粒为模板 ,经 PCR 扩增 ,获得了与预计大小( 1309bp )一致的两端带有与大肠杆菌 *thyA* 同源的卡那抗性基因扩增产物。经电转化将该片段导入大肠杆菌 DY330 感受态细胞后 ,将在含胸腺嘧啶的卡那霉素 MM 平板上获得的白色克隆 ,平行点种于含/不含胸腺嘧啶的卡那霉素 MM 平板和 LB 平板进行筛选 ,获得了胸腺嘧啶完全依赖、具有卡那霉素抗性的 *thyA*<sup>-</sup> 克隆( 图 1 ) ,即为 DY330 *thyA*<sup>-</sup> 株 ,命名为 DY330-T。DY330-T 在 MM 平板上生长速度较慢 ,菌落呈白色 ,而在 LB 培养基上生长明显增快 ,菌落呈淡黄色。

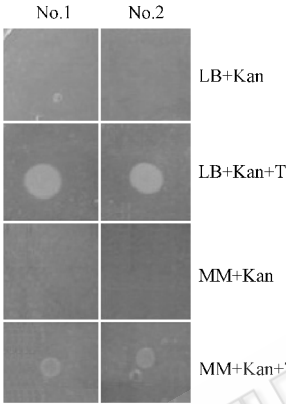


图 1 大肠杆菌 *thyA* 株 DY330-T 在不同培养基上的生长

Fig.1 The growth of *E. coli thyA* mutant DY330-T on different culture medium

LB, Luria-Bertani medium ; MM, M9 minimal salts medium ; Kan, Kanamycin( 20μg/mL ) ; T, Thymine( 50μg/mL ) .

以 DY330 DNA 及 DY330-T DNA 为模板 ,用引物 P3、P4 进行扩增。实验结果与预期一致 :DY330-T *thyA* 基因的 N 端第 50 氨基酸残基及其后的全部氨基酸及部分 3'-UTR 相应的核苷酸片段被全部缺失 ,代之以 *Kan* 基因片段 ,长度为 1619bp( 图 2 第 3 泳道 ) ;而以 DY330 DNA 为模板的扩增产物是完整的 *thyA* 基因及其下游 50bp ,长度为 1213bp( 图 2 第 4 泳道 ) 。另外 ,以 P1、P2 为引物 ,扩增 DY330-T 上的 *Kan* 基因片段 ,也得到了预期长度的 *Kan* 基因片段( 图 2 第 2 泳道 ,1309bp ) 。以上实验结果进一步证实了 DY330 染色体 *thyA* 基因除保留 N 端的第 1 ~ 49 氨基酸残基相对应的核苷酸序列外 ,其余氨基酸被全部缺失 ,此外还包括部分 3'-UTR ,代之以 *Kan* 基因片段位于 *thyA* 基因的相应位置上。

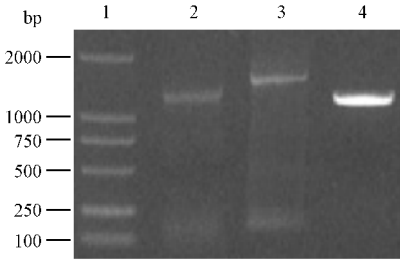


图 2 DY330-T PCR 鉴定结果

Fig.2 PCR confirmation of DY330-T

1. DNA Marker DL2000 ; 2. P1/P2 PCR product from DY330-T ( 1309bp ) ; 3. P3/P4 PCR product from DY330-T( 1619bp ) ; 4. P3/P4 PCR product from DY330( 1213bp ) .

2.2 DY330-T 菌株中缺陷型 λ 原噬菌体基因 *gam-kil-cIII* 的敲除

当获得 DY330-T 后 ,其基因组中仍整合有缺陷型 λ 原噬菌体同源重组系统。由于该系统在 42℃ 短时活化后 ,同样可以诱导 DY330-T 与外源 DNA 的同源重组( 如质粒 DNA ) ,加之该系统所需的同源序列极短( 30 ~ 50bp ) ,重组效率高( 具有重组功能的 Exo、Beta 和保护外源 DNA 的 Gam 蛋白 42℃ 短时表达即可完成同源重组功能 ) ,因此该系统的存在增加了 DY330-T 潜在的不稳定性 ,必须将其敲除。

虽然在缺陷型 λ 原噬菌体基因组中 ,不含其溶菌途径中起重要功能的 *Cro* 右侧的裂解基因 ,但在 42℃ 活化 1h 后 ,*cI857* 的长期去阻遏状态使其左侧基因的大量表达 ,同样可造成宿主菌死亡。而敲除 *gam-kil-cIII* 基因后 ,宿主菌将失去同源重组功能并具有在 42℃ 环境中生长的能力<sup>[10]</sup> ,因此用 P5、P6 退火而成的 Oligo 同源片段转化大肠杆菌 DY330-T ,获得的能在 42℃ 和 32℃ 生长、仍为胸腺嘧啶依赖型、具有卡那霉素抗性的克隆( 图 3 ) ,即为 DY330-TΔ*gam-kil-cIII* ,命名为 DY330-TI。以 P7、P8 为引物 ,以 DY330-T、DY330-TI 基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增 ,其余进一步证实了上述基因被精确敲除( 被敲除的 *gam-kil-cIII* 片段长 731bp ) 。

2.3 DY330-TI 回复突变率的检测

为进一步观察 DY330-TI 的稳定性 ,将重组质粒 pcDNA3.1-*thyA* 转化 DY330-TI ,由于 pcDNA3.1-*thyA* 只能在 DY330-TI 中复制 ,不能表达大肠杆菌 *thyA* 基因 ,因此 DY330-TI( pcDNA3.1-*thyA* ) 转化子只能在含胸腺嘧啶的氨苄青霉素 MM 培养基上生长 ;由于二者有 147bp( *thyA* 基因 N 端第 1 ~ 49 氨基酸 ) 相同 ,如果发生同源重组 ,则可使缺陷型宿主菌 DY330-TI 回复为野生型 ,此时转化子的生长无需依

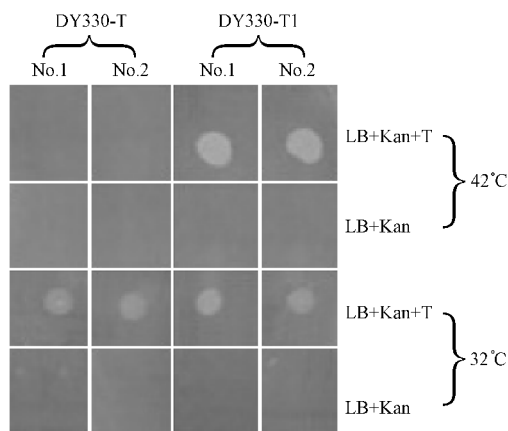


图3 大肠杆菌 *thyA* 株 DY330-T、DY330-TI 在不同培养基及培养温度的生长

Fig.3 The growth of *E. coli thyA* mutants DY330-T, DY330-TI on different culture medium and different incubative temperature

LB, Luria-Bertani medium; Kan, Kanamycin (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); T, Thymine (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Incubative temperature  $42^\circ\text{C}$ ,  $32^\circ\text{C}$ .

赖胸腺嘧啶的添加。因此,观察转化子在无胸腺嘧啶培养基上的生长情况可以检测其回复突变率的大小,以进一步了解突变株的稳定性。按 1.5 的方法将 DY330-TI (pcDNA3.1-*thyA*) 在含胸腺嘧啶 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、氨苄青霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 MM 培养基中转种培养传代,每转种 5 次集菌  $10^8 \sim 10^9$ ,涂布于不含胸腺嘧啶的氨苄青霉素 MM 平板,以含胸腺嘧啶的 MM 平板为阳性对照,结果显示转种培养 30 次后,在无胸腺嘧啶的 MM 平板上仍无转化子生长,这表明 pcDNA3.1-*thyA* 与 DY330-TI 虽有 147bp 同源 (*thyA* 基因 N 端第 1~49 氨基酸相应的核苷酸序列),但即使经过多次传代培养后,仍未有回复突变株出现。通过检测转化子的回复突变率,可进一步表明该突变株的突变性状稳定,这对于其作为以 *thyA* 为选择标志的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统的缺陷型宿主菌而言是极其重要的。

### 3 讨论

*thyA* 是一种广泛存在于噬菌体、原核细胞、真核细胞中的管家基因<sup>[11~14]</sup>。它编码胸腺嘧啶核苷酸 (dTMP) 合成酶。该酶是 dTMP 从头合成途径中的关键酶,催化 dUMP 甲基化生成 dTMP, dTMP 是 DNA 合成原料 dTTP 的前体, *thyA* 基因缺失导致 dTMP 从头合成途径受阻,虽然 dTMP 可通过补救合成途径由胸腺嘧啶或胸苷 (Thymine or thymidine) 合成,但由于胸腺嘧啶类物质在基本培养基、原核、真核细胞、人和动物的体液、乃至自然环境中含量甚微或无,以

至于 *thyA*<sup>-</sup> 株不能生长。除非在培养基中添加胸腺嘧啶或胸苷,或导入含有完整 *thyA* 基因野生型序列的互补质粒后,才能使其生存<sup>[8]</sup>。*thyA* 基因的上述特点使其成为继 *asd* 后第二个应用于染色体-质粒平衡致死系统的筛选标志基因<sup>[2]</sup>。

大肠杆菌 *thyA* 蛋白全长 264 氨基酸,该基因 5' 端的第 1~30 氨基酸残基所对应的核苷酸序列与其上游基因 *umpA* (Unidentified membrane protein gene) 的 3' 端重叠,如果将 *thyA* 全部缺失,势必造成 *umpA* 的部分缺失。而这样的双基因缺失突变体即使在有胸腺嘧啶存在的情况下也不能存活<sup>[15]</sup>;此外,大肠杆菌 *thyA* 基因突变位置不同,其残留的胸腺嘧啶合成酶功能也不同<sup>[16,17]</sup>。当突变位点在第 50~99 氨基酸残基之间时,其表型为胸腺嘧啶完全依赖型,而突变位点在第 17~49 氨基酸残基之间时,其表型为温度敏感依赖型,这类缺陷型菌株通常在  $31^\circ\text{C}$  生长时无需胸腺嘧啶,而在  $37^\circ\text{C}$  和  $43^\circ\text{C}$  生长时完全依赖于培养基中胸腺嘧啶类的添加<sup>[30]</sup>。由于本研究所用的大肠杆菌出发菌株 DY330 的生长条件为  $32^\circ\text{C}$ ,将其基因组 *thyA* 除保留 N 端的 49 个氨基酸残基相对应的必需核苷酸序列外,其余部分被全部缺失,使所获得的营养缺陷菌株为非温度敏感、胸腺嘧啶完全依赖型菌株,且使其与带有大肠杆菌 *thyA* 野生型序列的质粒发生同源重组产生回复突变的可能性降至最低,同时又与现有的基于点突变或短缺失突变的大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株有明显区别<sup>[11~14]</sup>。

本研究以一种染色体上整合有新型同源重组系统——缺陷型  $\lambda$  原噬菌体同源重组系统的大肠杆菌 K-12 DY330 为出发菌<sup>[10]</sup>,利用整合的重组系统,将 DY330 染色体上 *thyA* 进行了精确定位缺失。该重组系统操作简便,所需同源片段短,重组效率高,且能精确定位缺失目的基因。*thyA*<sup>-</sup> 株构建完毕后,我们再将这一缺陷型重组系统从其染色体上敲除,使之失去同源重组功能,进一步降低了通过同源重组产生回复突变的可能性。利用此法构建的大肠杆菌 *thyA*<sup>-</sup> 株在国内外尚属首次报道。此外,通过大肠杆菌 *thyA* 基因对该突变株的转化实验,检测转化子的回复突变率,进一步表明 *thyA*<sup>-</sup> 株的突变性状稳定。该突变株为构建以营养选择标志代替抗性基因标志的大肠杆菌 *thyA* 染色体-质粒平衡致死系统提供了稳定的宿主菌,并为应用该系统生产重组药物及核酸疫苗奠定了物质基础。

### 参 考 文 献

[1] 滕家波. 载体-宿主平衡致死系统在减毒伤寒沙门氏活菌苗中  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- 的应用. 国外医学·免疫学分册, 1999, **22** (3): 143 – 146.
- [ 2 ] Akayama K N, Kelly S M, Curtiss R. Construction of an *asd* + expression-cloning vector 'stable maintenance and high-level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnol* ,1988 **6** : 693 – 698.
- [ 3 ] Fu X, Xu J G. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker. *Microbiol Immunol* ,2000 **44** (7) :551 – 556.
- [ 4 ] Ryan E T, Crean T I, Kochi S K, *et al.* Development of a *Delta glnA* balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains for *Vibrio cholerae*. *Infect Immunol* ,2000 **68** (1) :221 – 226.
- [ 5 ] 夏晓滨, 祁国明, 刘延清, 等. 霍乱弧菌以 *thyA* 基因为选择压力的染色体-质粒致死平衡系统的构建. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, **20** (3) :223 – 227.
- [ 6 ] 王恒梁, 冯玲, 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.
- [ 7 ] Tacket C O, Kelly S M, Schodel 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 ] Morona R, Yeadon J, Considine A, *et al.* Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *E. coli thyA* <sup>+</sup> gene 'application to cholear accine development. *Gene* ,1991, **107** :139 – 144.
- [ 9 ] Galan J E, Nakayama K, Curtiss R. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium* 'use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* ,1990, **94** (1) :29 – 35.
- [ 10 ] Yu D, Ellis H M, Lee E C, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *E. coli*. *PNAS* ,2000 **97** (11) :5978 – 5983.
- [ 11 ] Hickson I D, Atkinson K E, Emmerson P T. Molecular cloning and amplification of the gene for thymidylate synthetase of *E. coli*. *Gene* , 1982, **18** :257 – 260.
- [ 12 ] Belfort L, Lane J P. Genetic system for analyzing *Escherichia coli* thymidylate synthase. *J Bacteriol* ,1984, **160** (1) :371 – 378.
- [ 13 ] Ross P, O 'Gara F, Condon S. Thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* as a genetic marker 'an alternative to antibiotic resistance genes. *Appl Environment Microbiol* ,1990 **56** (7) :2164 – 2169.
- [ 14 ] Belfort M, Moelleken A, Maley G F, *et al.* Purification and properties of T4 phage thymidylate synthetase produced by the cloned gene in an amplification vector. *J Biol Chem* ,1983, **258** (3) :2045 – 2051.
- [ 15 ] Gan K, Sankaran K, Williams M G, *et al.* The *umpA* gene of *Escherichia coli* encodes phosphatidylglycerol 'Prolipoprotein diacylglyceryl transferase ( *lgt* ) and regulates thymidylate synthase levels through translational coupling. *J Biochem* ,1995, **177** (7) :1879 – 1882.
- [ 16 ] Belfort M, Maley G F. Characterization of the *Escherichia coli thyA* gene and its amplified thymidylate synthetase product. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1983 **80** :1858 – 1861.
- [ 17 ] Belfort M, Maley G F, Line J P. Primary structure of the *Escherichia coli thyA* gene and its thymidylate synthase product. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1983 **80** :4914 – 4918.

## Construction of Thymidylate Synthetase Deficient( *thyA* ) *E. coli* Strain

HUANG Wei ZHONG Hui LI Ping CAO Cheng MA Qing-Jun\*

( Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China )

**Abstract** : To construct a thymidylate synthetase deficient( *thyA* ) *E. coli* Strain as mutant host of chromosome-plasmid balanced lethal system which was based on the *thyA* <sup>+</sup> gene/ $\Delta$ *thyA* *Escherichia coli*. *E. coli* K-12 strain DY330 is integrated an efficient homologous recombination system, a defective  $\lambda$  prophage, for chromosome engineering in *E. coli*. As the initiating strain, DY330 competent cells were electroporated with *Kan* (kanamycin-resistant) PCR product flanked by the 50bp *thyA* homology segments on each of its ends and *thyA* of DY330 was replaced by *Kan*. The new *thyA* strain named DY330-TI was constructed. It was characterized by a *thyA* deletion of the chromosome from 50-residue to COOH end and partial 3'-UTR and its growth was depended absolutely on thymidine or thymine. Moreover, the defective  $\lambda$  prophage was removed from DY330-TI to prevent its reverse mutation. In vitro gene mutation test, The plasmid pcDNA3.1-*thyA* was constructed by using PCR to generate *E. coli thyA* CDS and insertin this fragment between the *Xba* I and *Bam* I sites of the plasmid pcDNA3.1myc-hi(-)A. Then pcDNA3.1-*thyA* was transformed into DY330-TI. After 30 generations no *thyA* reverse mutant was observed in cultures without thymidine. The *E. coli thyA* strain DY330-TI has great stability and it can be used as mutant host of chromosomal-plasmid balanced lethal system.

**Key words** : *thyA*, Chromosome-plasmid balanced lethal system, Homologous recombination

Foundation item :Chinese National Programs for High Technology Research and Development( 2001AA215021 )

\* Corresponding author. Tel 86-10-66931808; Fax 86-10-68155151; E-mail qingjun\_ma@sohu.com

Received date 02-26-2003