

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52 (9) :1151 – 1159; 4 September 2012  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 结核分枝杆菌同源重组基因敲除系统的构建和应用

武晓林<sup>1</sup>, 方维焕<sup>1,2</sup>, 俞盈<sup>2</sup>, 宋厚辉<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江农林大学动物科技学院, 临安 311300

<sup>2</sup>浙江大学动物预防医学研究所, 浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310058

**摘要:** 【目的】结核分枝杆菌同源重组效率很低, 突变株的构建需要半年之久。本研究的目的在于构建一种用于在结核分枝杆菌中进行基因快速敲除、且易于筛选的高效同源重组系统。【方法】野生型结核分枝杆菌转化含有 *SacB* 反向选择标记、且能诱导表达两种同源重组酶 gp60 和 gp61 的质粒 pSL002。然后分别将靶基因的两个同源臂克隆入到含有 *hyg* (潮霉素) 抗性基因和 *gfp* (绿色荧光蛋白) 基因的重组质粒 pSL001 中, 再将靶基因同源臂 *-loxP-hyg-gfp-loxP* 片段从 pSL001 切下, 转化含有 pSL002 的野生型结核分枝杆菌, 一步得到双交换突变株。再将含有 *SacB* 反向选择标记、且表达 Cre 重组酶的质粒 pSL003 转化入结核分枝杆菌双交换突变株中, 切除两个 *loxP* 之间的 *hyg* 抗性基因和 *gfp* 基因, 得到无痕缺失突变株。最后利用含有 2% 蔗糖的琼脂糖平板去除含有 *SacB* 反向选择标记的质粒 pSL002 和 pSL003。【结果】在结核分枝杆菌中成功构建了高效同源重组系统, 利用该系统构建了 *rv1364c*、*pstP* 跨膜区、*pstP* 胞外区三个突变株, 得到双交换突变株的效率为 25% – 62.5%, 从双交换突变株得到无痕缺失突变株的效率为 100%。通过 *gfp* 作为荧光标记基因, 利用 NightSea BlueStar 蓝光手电筒和滤光眼镜, 可以对平板上的基因缺失株直接进行快速判定。【结论】该同源重组系统利用 gp60 和 gp61 重组酶, 在时间上将结核分枝杆菌中无痕缺失突变株的构建从 6 个月缩短到 3 个月。这是目前为止在结核分枝杆菌中构建突变株最快且效率最高的方法, 为加速分枝杆菌功能基因组的研究提供了新的遗传工具。

**关键词:** 结核分枝杆菌, 同源重组, 基因敲除, 重组酶, 荧光标记

**中图分类号:** Q93-3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2012) 09-1151-09

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 是引起肺结核 (Tuberculosis, TB) 的致病菌, 全球目前大约有 1/3 人口为结核阳性。根据 WHO 最新报告, 2010 年全球大约有 145 万人口死于 TB<sup>[1]</sup>。自从 *Mtb* 基因组序列公布以来<sup>[2]</sup>, TB 的功能基因组学研究进展取得了很大突破。但是, 由于 *Mtb* 生长速度慢 (大约 16 – 24 小时复制一代), 缺乏有效的重组酶, 对单个功能基因的研究一直受到限制。虽然

通过传统的同源重组方法, 利用温度敏感型复制子构建 *Mtb* 突变株已经成为可能<sup>[3-4]</sup>, 但由于重组效率低, 在时间上无痕突变株的构建目前仍需要大约 6 个月之久。考虑到生物安全三级实验室和 Southern 杂交等鉴定步骤, *Mtb* 突变株的构建在操作上比其它非病原微生物更繁琐<sup>[3-5]</sup>。

最近, van Kessel<sup>[6]</sup> 等在结核分枝杆菌噬菌体 Che9c 中发现其编码的 gp60 和 gp61 蛋白具有类似

基金项目: 国家“863 计划” (2012AA101602); 国家自然科学基金 (30800014); 浙江农林大学人才项目 (2034020075)

\* 通信作者。Tel: +86-571-63741392; E-mail: songhouhui@yahoo.com.cn

作者简介: 武晓林 (1988 -), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物遗传学研究。

收稿日期: 2012-04-16; 修回日期: 2012-05-14

大肠杆菌 Rac 前噬菌体重组蛋白 RecE 和 RecT 的功能,其中 gp60 具有 5′-3′dsDNA 外切酶活性,而 gp61 为 ssDNA 结合蛋白,可以促进互补链 DNA 的退火、交换和重组。gp60 和 gp61 可以在分枝杆菌内共同促进重组过程,缺一不可<sup>[6]</sup>。该研究发现通过 pJV53 质粒(含有 gp60 和 gp61 表达框)在耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中利用 acetamide 诱导表达 gp60 和 gp61 时,重组效率可以提高 90% 以上,但是在结核分枝杆菌中利用 gp60、gp61 和解离酶系统( $\gamma^{\delta}$  resolvase/res)进行基因敲除时,虽然同源重组效率显著提高,但容易出现异常重组现象(Illegitimate recombination)<sup>[6]</sup>。这一点,在本实验室也得到了证实,我们也发现在筛选平板上出现了非同源重组的克隆,这可能与 pJV53 质粒中 gp60 和 gp61 不稳定表达有关。此外, $\gamma^{\delta}$  resolvase/res 由于 res 序列本身含有多个翻译终止位点,因此无法实现读码框内敲除(In-frame deletion),而容易造成极性效应(Polar effect),因此急需对结核分枝杆菌同源重组系统进行优化和改进。

在本研究中,为了更稳定的表达 gp60 和 gp61,我们在 pJV53 质粒的基础上,将 Acetamidase 启动子替换成了可控制表达的 Isovaleronitrile 诱导型启动子;重组方案采用效率更高、且能实现读码框内敲除的 Cre/loxP 系统。该系统比  $\gamma^{\delta}$ /res 系统切割效率更高<sup>[4]</sup>,且避免了极性效应。除了抗性基因之外,在两个 loxP 之间,我们还增加了含有 gfp 读码框的标记片段,以加速筛选过程。本研究建立的基因敲除系统,在时间上将在结核分枝杆菌中无痕缺失突变株的构建从 6 个月缩短到 3 个月,这是目前为止在结核分枝杆菌中构建突变株最快且效率最高的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 化学试剂、菌株和质粒:**本实验室所用的化学试剂均为分析纯,购自 Sigma、USP 和 BD 等公司。结核分枝杆菌为 H37Rv 实验室菌株,由本实验室的合作实验室(西雅图生物医学研究所提供)提供。大肠杆菌克隆用菌株为 DH5a。质粒 pSL001、pSL002 和 pSL003 由本实验室构建并保存。其中 pSL001 是 pML564 的衍生质粒<sup>[5]</sup>;pSL002 是 pJV53

的衍生质粒<sup>[6]</sup>;pSL003 是 pCreSacB 的衍生质粒<sup>[3]</sup>。质粒图谱如图 1 所示。

**1.1.2 细菌培养:**大肠杆菌培养基为 LB 培养基,37°C 培养。结核分枝杆菌培养基为 7H9/OADC 培养基(液体)和 7H10/OADC 培养基(固体),37°C 培养。筛选用抗生素浓度:Hygromycin(潮霉素,50-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );Kanamycin(卡那霉素,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );Zeocin(博来霉素,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );诱导剂 Isovaleronitrile(异戊腈,IVN)浓度为 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

### 1.2 结核分枝杆菌 Rv1364c 磷酸化酶结构域、PstP 胞外结构域、PstP 跨膜结构域敲除载体的构建

**1.2.1 Rv1364c 磷酸化酶结构域基因敲除载体的构建:**本研究所用的引物名称和序列如表 1 所示。采用 rv1364c-downstream fwd/rv1364c-downstream rev 引物从结核分枝杆菌基因组中扩增 rv1364c 磷酸化酶结构域下游同源臂(446 bp),利用 Pac I/Nsi I 酶切位点连入 pSL001 中,命名为 pCL227。然后采用 rv1364c-upstream fwd/rv1364c-upstream rev 引物从结核分枝杆菌基因组中扩增 rv1364c 磷酸化酶结构域上游同源臂(542 bp),利用 Spe I/Swa I 酶切位点连入 pCL227 中,命名为 pCL211。所有插入片段均经过测序验证序列的正确性。利用 Spe I/Nsi I 从 pCL211 中切下 rv1364c upstream-loxP-gfp-hyg-loxP-rv1364c downstream 片段,割胶回收备用。

**1.2.2 PstP 胞外结构域基因敲除载体的构建:**采用 pstP EC downstream fwd/pstP EC downstream rev 引物从结核分枝杆菌基因组中扩增 pstP 胞外结构域下游同源臂(1094 bp),利用 Pac I/Nsi I 酶切位点连入 pSL001 中,命名为 pCL225。然后采用 pstP EC upstream fwd/pstP EC upstream rev 引物从结核分枝杆菌基因组中扩增 pstP 胞外结构域上游同源臂(969 bp),利用 Spe I/Swa I 酶切位点连入 pCL225 中,命名为 pCL216。所有插入片段均经过测序验证序列的正确性。利用 Spe I/Nsi I 从 pCL216 中切下 pstP EC upstream-loxP-gfp-hyg-loxP-pstP EC downstream 片段,割胶回收备用。

**1.2.3 PstP 跨膜结构域基因敲除载体的构建:**采用 pstP EC downstream fwd/pstP EC downstream rev 引物从结核分枝杆菌基因组中扩增 pstP 跨膜结构域下游同源臂(1094 bp),利用 Pac I/Nsi I 酶切位点连入 pSL001 中,命名为 pCL225(注:用于 PstP 跨膜结构域和 PstP 胞外结构域敲除的下游同源臂序列

相同)。然后采用 *pstp* EC upstream fwd/ *pstp* TM upstream rev 引物从结核分枝杆菌基因组中扩增 *pstP* 跨膜结构域上游同源臂 (849 bp), 利用 *Spe* I/ *Swa* I 酶切位点连入 pCL225 中, 命名为 pCL218。所

有插入片段均经过测序验证序列的正确性。利用 *Spe* I/ *Nsi* I 从 pCL218 中切下 *pstP* TM upstream-*loxP*-*gfp*-*hyg*-*loxP*-*pstP* TM downstream 片段, 割胶回收备用。

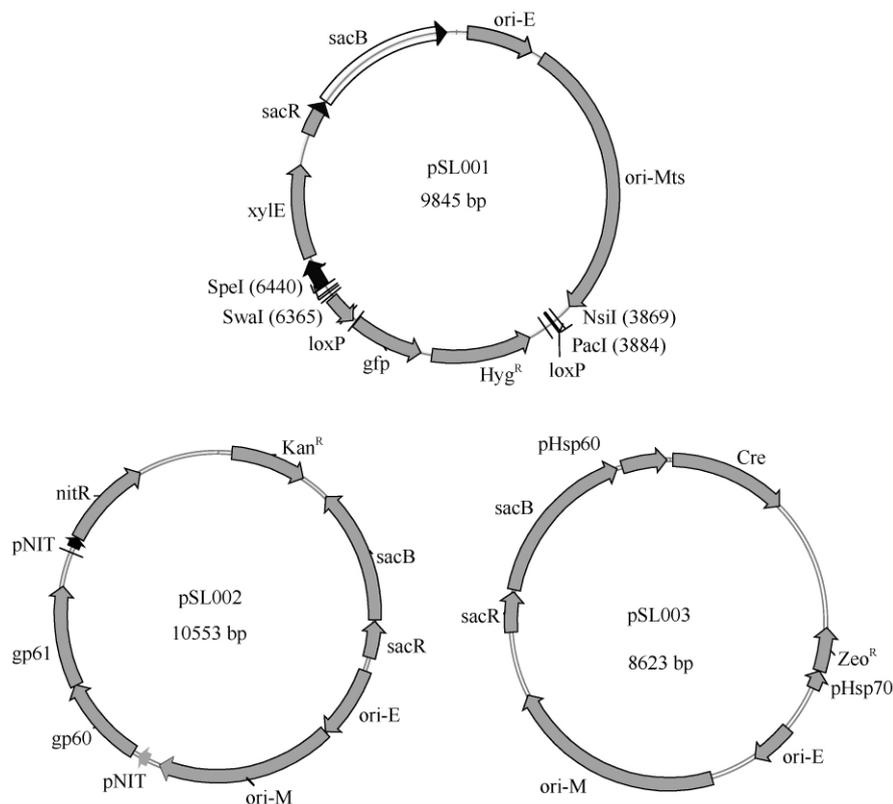


图1 结核分枝杆菌基因敲除系统

Fig. 1 Gene knock out system in *M. tuberculosis*. The plasmid pSL001 is a cloning vector for homologous arms of target gene. pSL001 is gp60 and gp61 expression vector under inducible promoter pNIT. pSL003 is Cre recombinase expression vector.

### 1.3 结核分枝杆菌基因敲除和筛选步骤

将 pSL002 质粒转化入结核分枝杆菌 (H37Rv) 野生型感受态细胞中, 在 7H10/OADC/Kan 平板上筛选, 用锡箔纸密封后于 37°C 培养。21 天后, 挑选平板上任一单菌落, 在 7H9/OADC/Kan 液体培养基中摇菌, 制备含有 pSL002 质粒的结核分枝杆菌感受态细胞, 转化分别从 pCL211、pCL216 和 pCL218 中切下的 *rv1364c* upstream-*loxP*-*gfp*-*hyg*-*loxP*-*rv1364c* downstream 片段 (见 1.2.1)、*pstP* EC upstream-*loxP*-*gfp*-*hyg*-*loxP*-*pstP* EC downstream 片段 (见 1.2.2) 和 *pstP* TM upstream-*loxP*-*gfp*-*hyg*-*loxP*-*pstP* TM downstream 片段, 在 7H10/OADC/Kan/Hyg/IVN 的平板上筛选克隆。IVN 诱导 pSL002 质粒表达 gp60 和 gp61, 此时在基因组水平上发生同源重组: 单交

换 (Single cross over, SCO) 和双交换 (Double cross over, DCO)。这两种交换方式在表型上均为表现为绿色荧光, 利用菌落 PCR 进一步鉴定是否为双交换 (双交换条带大约为 3 Kb, 单交换条带大约为 1 Kb)。其中鉴定 *Rv1364c* 磷酸化酶结构域 DCO 引物对为: *rv1364c*-RT-F/*rv1364c*-RT-R, 鉴定 *Pstp*-EC 结构域和 *Pstp*-TM 结构域引物对为: *pstP* RT-F/*pstP* RT-R (表 1)。得到 DCO 是整个突变株构建过程的关键, 如果不借助 gp60 和 gp61, 由于结核分枝杆菌内源性 Rec 重组酶活性非常低, 通过转化线性化片段得到 DCO 的可能性为零。

挑选任一阳性 DCO 克隆, 制备感受态细胞, 转化 pSL003 质粒, 在 7H10/OADC/*Zeocin* 的平板上筛选。pSL003 质粒将表达 Cre 重组酶, 切割 2 个 *loxP*

之间的 *gfp-hyg* 片段, 仅在基因组上留下一个 *loxP*, 得到无标记缺失株 (Marker-free mutant), 又称为 KO (Knock out), 阳性克隆将失去绿色荧光。KO 突变株的 PCR 鉴定引物和 DCO 相同。最后, 将 KO 突变

株涂布 7H10/OADC/2% Sucrose 平板, 由于含有反向选择标记 *SacB* 基因, pSL002 和 pSL003 质粒将自动丢失。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
rv1364c-downstream fwd	ACGGTTAATTAACCGACTCTGTTCGGACACACTTGAA
rv1364c-downstream rev	CGCCATGCATGATGCGCGCCTCCGACACTA
rv1364c-upstream fwd	CGTTACTAGTTTTGCTACATCGGTCCGTAGGAGGGA
rv1364c-upstream rev	CCAGCAACCGCTGCTGCATAACGGT
pstp-EC downstream fwd	CTGCTTAATTAAGGCATGACGACACGACTGCAAGCGCCGGT
pstp-EC -downstream rev	GCCGATGCATCCACCAACCCAAGCTCTTCGCGGAA
pstp-EC-upstream fwd	TGGTACTAGTCAACAACGAAGACTCGGTCTACGCT
pstp-EC -upstream rev	CCCGCATGATGGACACGCTGCGCGG
pstp-TM -upstream rev	GCCGTCGGCCCGACCAACCGTGGCCGA
rv1364cRT-F	AGGGCGTGCAGCTCATTGTGGACGA
rv1364cRT-R	TTGATCGTCCATCCAGCGTTATGT
pstPRT-F	CAGGCGACGACGACCAACTGACCCT
pstPRT-R	AGGGTCAGGAAGCCACTCCCTAGC

#### 1.4 结核分枝杆菌感受态细胞的制备

结核分枝杆菌感受态的制备方法采用本实验室报道的方法进行<sup>[3]</sup>。

#### 1.5 结核分枝杆菌荧光菌落的快速鉴定

利用 NightSea BlueStar 蓝光手电筒 (美国 NightSea 公司) 照射含有结核分枝杆菌菌落的平板, 戴滤光眼镜 (美国 NightSea 公司) 观察菌落。如果 *gfp* 能够正确表达, 菌落将呈现绿色荧光, 如果 *gfp* 丢失, 菌落将失去荧光。该方法的优点在于不用打开含有结核分枝杆菌的平板, 可以进行原位观察, 并快速锁定阳性克隆。

#### 1.6 结核分枝杆菌荧光菌落的形态观察

利用含有蓝光激发模块的荧光体视显微镜 (Olympus SZX-16) 观察菌落形态。

## 2 结果

### 2.1 结核分枝杆菌基因敲除系统

本实验室构建的结核分枝杆菌基因敲除系统由 3 个质粒构成, 分别为 pSL001、pSL002 和 pSL003 (图 1)。pSL001 是 pML564 的衍生载体<sup>[5]</sup>, 该质粒含有分枝杆菌温度敏感型复制子 (*ori-Mts*), 反向选择标记 *sacB*, 以及 2 个 *loxP* 之间的 *gfp-hyg* 表达盒。在未发现 gp60 和 gp61 之前, 本实验室一直采用 pSL001 系列载体在结核分枝杆菌中构建突变株, 通

过先转化, 后改变温度筛选 SCO, 再筛选 DCO, 最后得到 KO。整个过程需要半年之久, 且效率低下<sup>[3,5,7]</sup>, 严重阻碍了 *Mtb* 的研究进展。gp60 和 gp61 的功能被发现之后<sup>[6]</sup>, 本实验室向 Hatful 实验室索取了可以表达 gp60 和 gp61 的 pJV53 质粒, 但是我们发现 pJV53 质粒在快速生长的耻垢分枝杆菌中可以完全实现基因敲除, 但是在缓慢生长的 *Mtb* 中同源重组效率很低。为此, 本研究对 pJV53 质粒进行了优化, 将 pJV53 上的 Acetamide 诱导型启动子替换成了 IVN 诱导型启动子, 得到 pSL002, 这样 gp60 和 gp61 可以实现稳定表达。我们发现 pSL002 诱导表达 gp60 和 gp61 时, 没有出现任何非同源重组。由于 pSL001 质粒为潮霉素抗性, pSL002 为卡那霉素抗性, 为了引入第三种不同的抗性基因且稳定表达 Cre 重组酶, 本研究构建了携带 Zeocin 抗性基因的 pSL003 质粒。用于结核分枝杆菌基因敲除的 3 个质粒均含有反向选择标记 *sacB/sacR*, 这些质粒在含有 2% 的蔗糖平板上将自动丢失。

### 2.2 结核分枝杆菌绿色荧光蛋白菌落的快速鉴定

本研究采用 NightSea BlueStar 蓝光手电筒和滤光眼镜对平板上的结核分枝杆菌绿色荧光蛋白菌落进行快速鉴定。该方法可以从几百个菌落中瞬间锁定阳性克隆 (图 2-A、B)。平板上的菌落照片拍摄用单反相机加载滤光片 (购自 NightSea 公司) 实现。单菌落成像采用荧光体视显微镜拍摄 (图 2-C、D、

E、F)。野生型分枝杆菌和无标记突变株不呈现荧光。转化含有靶基因 2 个同源臂的 *loxP-gfp-hyg-loxP* 片段后, 由于 *gp60* 和 *gp61* 的表达, 在基因组水平将同时发生单交换和双交换。单交换和双交换菌落都为绿色荧光 (图 2-D、E、F), 其区别通过菌落

PCR 进一步验证 (见 2.3)。在平板上出现双交换突变株的几率是评价 *gp60* 和 *gp61* 重组效率的关键, 在本研究中双交换重组效率为 25% - 62.5% (见 2.3)。

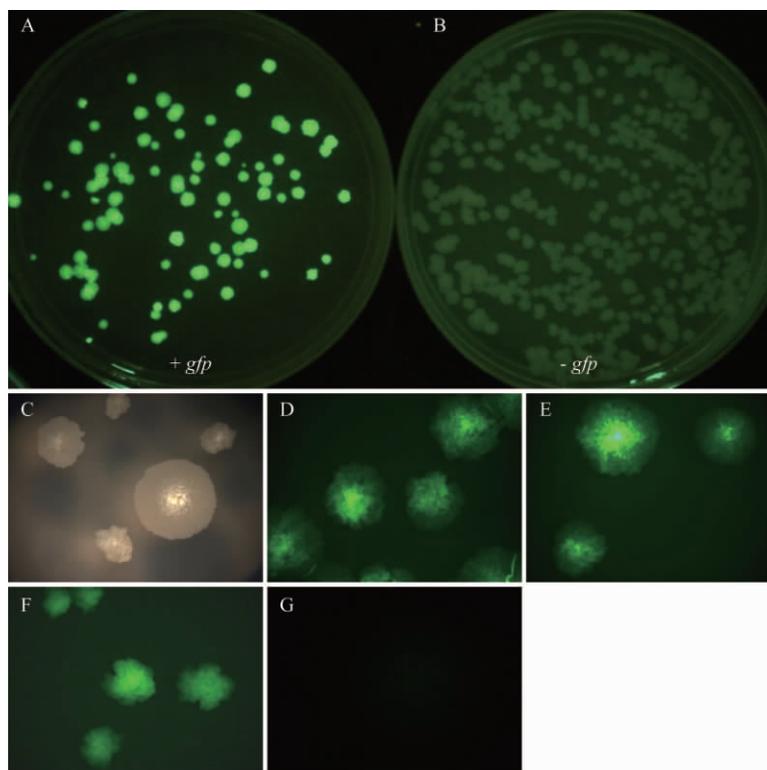


图 2 结核分枝杆菌突变株菌落的荧光鉴定

Fig. 2 Identification of *M. tuberculosis* mutants by fluorescent imaging. Pictures were taken under shining of the NightSea BlueStar flash (A and B), or under fluorescence microscope (C to G, 16x). A/D: *M. tuberculosis* was transformed with both pSL001 and *rv1364c* upstream-*LoxP-gfp-hyg-rv1364c* downstream fragment. B/C: *M. tuberculosis* was transformed with pSL001 only. E: *M. tuberculosis* was transformed with both pSL001 and *pstP* EC upstream-*LoxP-gfp-hyg-pstP* EC downstream fragment. F: *M. tuberculosis* was transformed with both pSL001 and *pstP* TM upstream-*LoxP-gfp-hyg-pstP* TM downstream fragment. G: Mock. *M. tuberculosis* wt and KO mutants under fluorescence microscope.

### 2.3 结核分枝杆菌 Rv1364c 磷酸化酶结构域、PstP 跨膜结构域、PstP 胞外结构域双交换 (DCO) 突变株的 PCR 鉴定

采用 *rv1364c*-RT-F/*rv1364c*-RT-R 和 *pstP* RT-F/*pstP* RT-R 引物对双交换突变株进行鉴定 (图 3)。在本研究构建的三种突变株中, 双交换突变株的 PCR 条带大小为 2753 - 2932 bp, 单交换和野生型条带大小为 874 - 963 bp。由于采用菌落 PCR 鉴定, 2753 - 2932 bp 因产物过大, 在胶上隐约可见 (图 3)。和野生型相比, 只要 PCR 结果不出现 874 - 963 bp 的条带, 且菌落呈现绿色荧光, 即可判定为双交换突变株。随后进行感受态细胞制备, 转化

pSL003, 表达 Cre 重组酶, 切割 *loxP-gfp-hyg-loxP*, 再对阳性克隆进行二次 PCR 鉴定。

### 2.4 结核分枝杆菌 Rv1364c 磷酸化酶结构域、PstP 跨膜结构域、PstP 胞外结构域无标记 (Marker free) 突变株 (KO) 的 PCR 鉴定和测序鉴定

本研究敲除的 3 个不同基因片段: Rv1364c 磷酸化酶结构域、PstP 胞外结构域和 PstP 跨膜结构域无标记 (Marker-free) 突变株 (KO) 的鉴定结果分别如图 4 (A-C) 所示。条带大小分别为 310 bp (Rv1364c 磷酸化酶结构域缺失株)、489 bp (PstP 胞外结构域缺失株) 和 369 bp (PstP 跨膜结构域缺失株)。KO 菌落不呈现荧光, 说明 Cre 重组酶对 *loxP*

的切割效率为 100%。随机挑取 3 个菌落, PCR 鉴定全部正确, 任选一个 KO PCR 产物进行测序, 测序

结果表明整合位点全部正确, 靶基因被敲除后, 在基因组上被 *loxP* 替代。

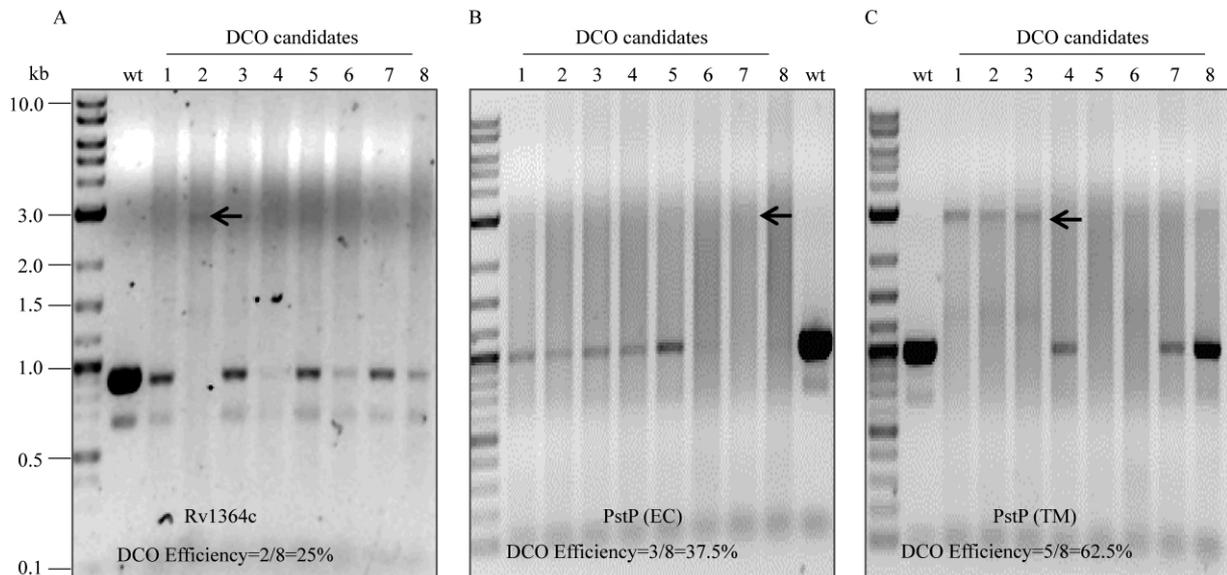


图3 结核分枝杆菌双交换突变株的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of double cross over (DCO) candidates by colony PCR.

A: DCO candidates of Rv1364c phosphatase domain were amplified using primer pair rv1364c-RT-F/rv1364c-RT-R, generating a 2753 bp band on agarose gel for DCO and 874 bp band for wt and SCO.

B: DCO candidates of PstP extracellular (EC) domain were amplified using primer pair pstP-RT-F/pstP-RT-R, generating a 2932 bp band on agarose gel for DCO and 963 bp band for wt and SCO.

C: DCO candidates of PstP transmembrane (TM) domain were amplified using primer pair pstP-RT-F/pstP-RT-R, generating a 2812 bp band on agarose gel for DCO and 963 bp band for wt and SCO.

## 2.5 读码框内敲除

为了进一步分析靶基因敲除后, 是否对上下游基因造成潜在的极性效应, 需要对 KO 突变株的测序结果进行通读分析, 确定基因敲除为读码框内敲除 (In-frame deletion)。读码框内敲除是指目的序列被敲除之后, 在基因组上会留下一个 *loxP* 和对应的酶切位点, 但仍然能够形成一个完整的读码框, 即从靶基因的 ATG (或 GTG) 开始翻译, 通读 *loxP*, 最后终止于靶基因的翻译终止密码子 (TAA, TAG 或 TGA), 而不是提前或者延迟终止。因篇幅有限, 本研究用 Rv1364c 磷酸化酶结构域的基因敲除进行说明 (序列取自图 4-A 测序结果), 如图 5 所示。

## 3 讨论

结核分枝杆菌因其生长速度慢且体内重组酶活性低等, 其分子遗传学和遗传工具的进展一直滞后于大肠杆菌、酵母等模式生物。自从温度敏感性分

枝杆菌复制子 *pAL5000* 发现以来<sup>[8]</sup>, 在快速生长的耻垢分枝杆菌很快实现了基因敲除<sup>[9-11]</sup>, 但是在缓慢生长的结核分枝杆菌中的基因敲除进展一直受到遗传工具上的限制, 在一切顺利的情况下, 整个筛选过程需要半年之久<sup>[3,12]</sup>。本研究在同源重组系统中引入了结核分枝杆菌噬菌体重组蛋白 gp60 和 gp61<sup>[6]</sup>, 以及 Cre/*loxP* 系统<sup>[3]</sup>, 可以一步得到双交换突变株, 从而缩短了突变株的构建时间。

从严格意义上讲, 基因敲除不能对靶基因的上游和下游基因产生极性效应, 基因敲除的片段并不是越长越好, 而需要综合考虑<sup>[13]</sup>。尤其在原核细胞中, 往往靶基因处于操纵子内部, 因此在敲除策略上必须考虑读码框内敲除。首先需要确定靶基因和上下游基因是否属于同一个操纵子 (Operon), 这一点可以通过操纵子预测网站预测: <http://www.microbesonline.org/operons/OperonList.html>。该网站含有目前所有已经测序的基因组序列操纵子信息。如果属于同一操纵子, 优先考虑读码框内敲除。

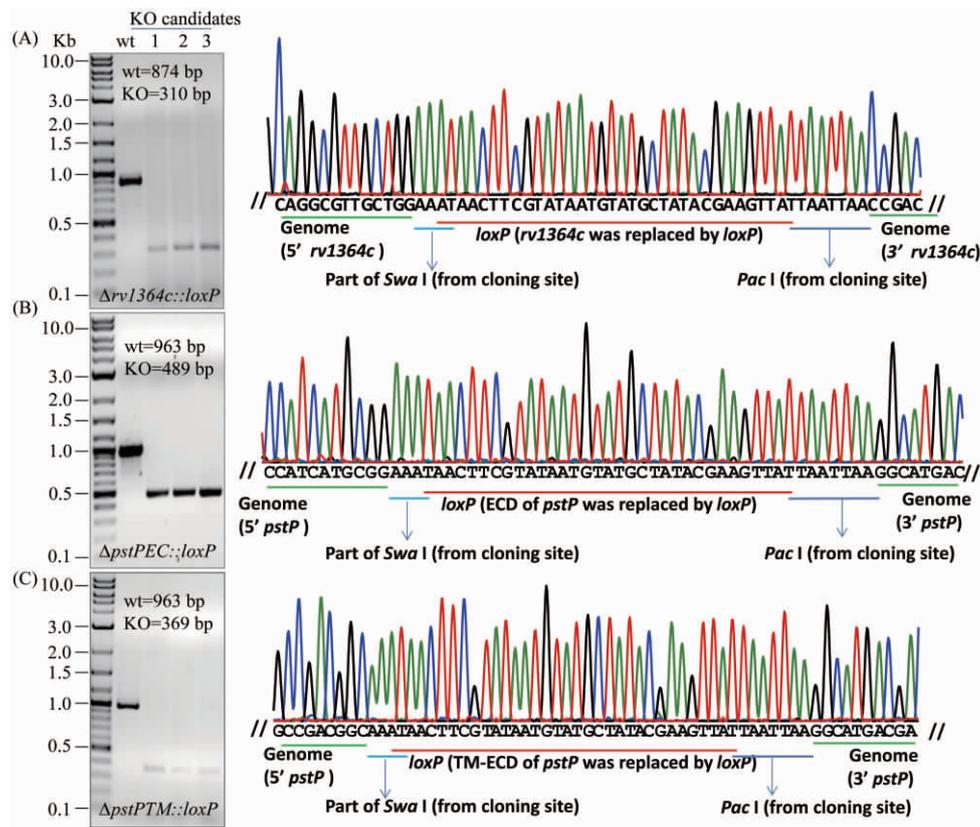


图 4 结核分枝杆菌无标记基因缺失株的 PCR 和测序鉴定结果

Fig. 4 Identification of *M. tuberculosis* marker free mutants by PCR and sequencing.

Three KO mutants were randomly chosen and amplified by colony PCR to verify the marker free deletions of Rv1364c phosphatase domain (A), PstP EC domain (B) and PstP TM domain (C). Correct bands on each agarose gel were indicated for wt (wild type) and KO mutants accordingly. PCR samples from KO candidate No. 1 were subjected for sequencing as shown on Chromas map.

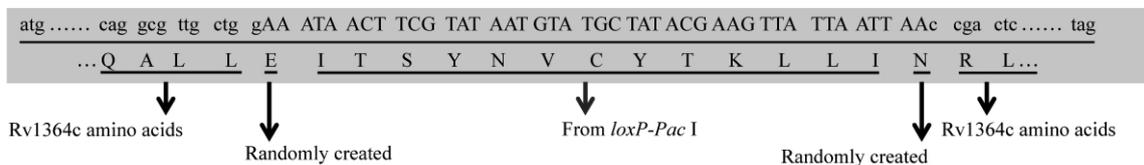


图 5 Rv1364c 磷酸化酶结构域的读码框内敲除

Fig. 5 In-frame deletion of Rv1364c phosphatase domain. The phosphatase domain was replaced by *loxP*. Reading frame is indicated by corresponding amino acids.

如果不属于同一操纵子,那么靶基因 5'端是否含有上游基因的转录终止区,3'端是否含有下游基因的启动子,这也需要通过生物信息学软件进行预测。转录终止区和启动子在线预测工具为 <http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>。如果靶基因内部含有上下游基因的信息(启动子和转录终止区),这些信息在设计基因敲除方案时必须保留,否则对上下游基因造成极性效应,在后期突变株的互补试验中无法实现互补。

基于同源重组原理的基因敲除系统是目前几乎所有真核和原核系统中共有的基因置换的系统。但是天然情况下,自发重组效率很低,因此完成基因置换和敲除需要借助外部的选择压力,因此需要遗传工具和基因操作系统不断完善和更新。与大肠杆菌不同,在结核分枝杆菌中可用的抗生素抗性基因很少。最初研究人员广泛使用潮霉素<sup>[14]</sup>和卡那霉素抗性基因<sup>[15]</sup>在分枝杆菌中实现外源基因的表达。2006年以后,研究人员才开始在分枝杆菌中使用

Zeocin 抗性基因<sup>[16]</sup>。在本研究中,我们首次将潮霉素、卡那霉素和 Zeocin 在同一系统中使用。同时在构建的所有载体中引入反向选择标记 *SacB*, 这样在实现基因敲除后,能够顺利的去除外源质粒。目前在分枝杆菌中报道可用的重组酶系统有: *Flpe/FRT* 系统<sup>[4,17]</sup>, *Cre/loxP*<sup>[3,18]</sup> 和  $\gamma^{\delta}$  resolvase/*res*<sup>[19]</sup> 系统。其中  $\gamma^{\delta}$  resolvase/*res* 因为序列本身含有多个翻译终止位点,因此不适合读码框内敲除<sup>[4]</sup>; *Flpe/FRT* 系统在快速生长的耻垢分枝杆菌中切割效率仅为 10%,在慢性生长的分枝杆菌中需要进行密码子优化,最高切割效率为 59%<sup>[4]</sup>;能在慢性生长的分枝杆菌中实现接近 100% 切割效率的只有 *Cre/loxP* 系统<sup>[5,7]</sup>。因此,在本研究中我们构建了基于 gp60 和 gp61 的 *Cre/loxP* 同源重组系统,并顺利实现 3 个不同基因片段的敲除,借助 *gfp* 和菌落 PCR 可对 SCO、DCO 和 KO 实现一步鉴定。

## 参考文献

- [1] WHO report 2011 global tuberculosis control. 2011: 1-246.
- [2] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badecock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, 393 (6685): 537-544.
- [3] Song H, Wolschendorf F, Niederweis M (2008): Construction of unmarked deletion mutants in mycobacteria. In T. Parish, and A. Brown (Eds): *Mycobacteria protocols*. Humana Press, Ottawa, pp. 279-295.
- [4] Song H, Niederweis M. Functional expression of the FLP recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene*, 2007, 399 (2): 112-119.
- [5] Song H, Huff J, Janik K, Walter K, Keller C, Ehlers S, Bossmann SH, Niederweis M. Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acidic environments. *Molecular Microbiology*, 2011, 80 (4): 900-918.
- [6] van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Methods*, 2007, 4 (2): 147-152.
- [7] Wolschendorf F, Ackart D, Shrestha TB, Hascall-Dove L, Nolan S, Lamichhane G, Wang Y, Bossmann SH, Basaraba RJ, Niederweis M. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (4): 1621-1626.
- [8] Guilhot C, Gicquel B, Martin C. Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 77 (1-3): 181-186.
- [9] Gavigan JA, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. Use of conjugative and thermosensitive cloning vectors for transposon delivery to *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 127 (1-2): 35-39.
- [10] Guilhot C, Ota I, van Rompaey I, Martin C, Gicquel B. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (2): 535-539.
- [11] Pashley CA, Parish T, McAdam RA, Duncan K, Stoker NG. Gene replacement in mycobacteria by using incompatible plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (1): 517-523.
- [12] Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (3): 1134-1140.
- [13] Merlin C, McAteer S, Masters M. Tools for characterization of *Escherichia coli* genes of unknown function. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (16): 4573-4581.
- [14] Radford AJ, Hodgson AL. Construction and characterization of a *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *Plasmid*, 1991, 25 (2): 149-153.
- [15] Das Gupta SK, Bashyam MD, Tyagi AK. Cloning and assessment of mycobacterial promoters by using a plasmid shuttle vector. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175: 5186-5192.
- [16] Raghunand TR, Bishai WR, Chen P. Towards establishing a method to screen for inhibitors of essential genes in mycobacteria: evaluation of the acetamidase promoter. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, 28 (1): 36-41.
- [17] Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology*, 1998, 16 (7): 657-662.
- [18] Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination

in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, 85 (14) : 5166-5170.

[19] Bardarov S, Bardarov Jr S, Jr., Pavelka Jr MS, Jr., Sambandamurthy V, Larsen M, Tufariello J, Chan J,

Hatfull G, Jacobs Jr WR, Jr. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*, 2002, 148 (Pt 10) : 3007-3017.

## Development and application of homologous recombination knockout system in *Mycobacterium tuberculosis*

Xiaolin Wu<sup>1</sup>, Weihuan Fang<sup>1,2</sup>, Ying Yu<sup>2</sup>, Houhui Song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Lin'an 311300, China

<sup>2</sup>Zhejiang Provincial Key lab of Preventive Veterinary Medicine, Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

**Abstract:** [Objective] We developed a homologous recombination system to make marker-free mutants in *Mtb* in an easy screening way. [Methods] The plasmid pSL002 harboring recE and recT-like protein gp60 and gp61 was transformed into wt *Mtb* in order to increase the recombining efficiency. The two homologous arms of target gene were amplified and cloned into pSL001. The purified homologous arms-loxP-gfp-hyg-loxP fragments were further transformed into *Mtb* (with pSL002 inside) competent cells to obtain the double cross over (DCO) mutants. The plasmid pSL003 was transformed into DCO competent cells to excise the two loxP sites flanked region. The plasmid pSL002 and pSL003 were removed via the counter selection marker *sacB*. [Results] An efficient homologous recombination system was developed. Three different marker free mutants: Rv1364c phosphatase domain, PstP extracellular domain and PstP transmembrane domain were created by the system developed in this study. The efficiency to obtain DCO was varying from 25% to 62.5%, while the efficiency from DCO to KO was close to 100%. The *gfp* reporter was used to screen SCO, DCO and KO. [Conclusion] The homologous system shortens the complicated screening process to 3 month in *Mtb*. This is the fastest allelic exchange system reported so far, providing novel deletion strategy to the repertoire of mycobacterial genetic tools for constructing unmarked mutations.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, homologous recombination, knock out, recombinase, fluorescence marker

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA101602), by the National Natural Science Foundation of China (30800014) and by the Zhejiang Agriculture & Forestry University Talent Starting Program (2034020075)

\* Corresponding author. Tel: +86-571-63741392; E-mail: songhouhui@yahoo.com.cn

Received: 16 April 2012/Revised: 14 May 2012