



两步 PCR 介导的 Red 重组技术快速敲除鼠疫耶尔森菌 sRNA 及染色体大片段

王仁霞¹, 刘荣娇¹, 李子微¹, 王瑞欢¹, 杨瑞馥², 韩延平², 邓仲良^{1*}

¹湖南省南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001

²军事医学科学院微生物与流行病学研究所, 北京 100071

摘要:【目的】利用 Red 同源重组系统, 通过二步 PCR 法建立一种适合鼠疫耶尔森菌 sRNA 和大片段染色体基因敲除的方法。【方法】第一步 PCR 先扩增出目的基因的上、下游同源臂(600–1000 bp)及卡那抗性盒, 再以上、下游同源臂及卡那抗性盒等摩尔混合物为模板, 通过融合 PCR 获得含上下游同源臂及卡那抗性盒的线性突变盒, 再将此突变盒的 PCR 产物电转到含有 pKD46 质粒的鼠疫 201 菌株, 在阿拉伯糖的诱导下, pKD46 质粒表达 Red 重组酶, 促使卡那抗性盒替换目的基因, 最后对获得的重组克隆进行 PCR 鉴定。【结果】本研究通过两步 PCR 法构建 600–1000 bp 的同源臂, 提高了同源重组效率, 并将鼠疫菌 sRNA RyhB1 (108 bp)和 RyhB2 (106 bp)和染色体大片段 47-2 (10.4 kb)、47-3 (21.6 kb)、47-3a (9.2 kb)及 47-3b (6.1 kb)成功敲除。【结论】基于 Red 重组系统构建的二步法突变技术, 是一种简单、高效的精确修饰鼠疫菌 sRNA 及大片段染色体的方法, 适合于鼠疫菌全基因组的基因敲除, 为鼠疫菌基因表达与调控、致病和毒力等研究提供有力的工具。

关键词: 鼠疫耶尔森菌, Red 重组系统, sRNA, 大片段染色体, 基因敲除

sRNA (small non-coding regulatory RNA, sRNA)是一类存在基因间区、长度为 50–500 bp 的非编码 RNA, 在转录后水平调控靶 mRNA 翻译和稳定性, 在调控原核生物的生理和毒力中发挥重要作用^[1–3]。随着高通量测序方法(如生物芯片、RNA-seq)的应用, 越来越多的 sRNA 被发现, 目

前在大肠杆菌中发现有 80 多种 sRNA, 而在鼠疫耶尔森菌(简称鼠疫菌)中也存在 RyhB、MicF、HmsA、ssrA、ssrS 等多种 sRNA^[4–8], 此外在鼠疫菌致病性、毒力及调控等研究中, 也需要构建染色体大片段的基因敲除。随着功能基因组学研究的深入发展, 基因敲除技术逐渐成为基因功能研

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(15A165)

*通信作者。Tel: +86-734-8281393; E-mail: dzl021015@sina.com

收稿日期: 2017-01-04; 修回日期: 2017-03-29; 网络出版日期: 2017-04-06

究的重要手段。

目前新一代 CRISPR/Cas 9 基因编辑技术具有特异切割、多基因位点突变、大片段缺失、实用等特点,但该系统可在非靶位点造成不需要的突变,甚至产生较高的脱靶率,且在很多器官组织及原代细胞中难转染,在原核生物中只成功用于肺炎链球菌和大肠埃希菌等少数细菌^[9-12]。而在原核生物中应用较广的是基于 λ Red 同源重组技术,2000 年 Datsenko 等^[13]利用 λ Red 重组系统建立的一步 PCR 法基因缺失突变技术,将 *gam*、*bet* 和 *exo* 基因置于受阿拉伯糖诱导的 ParaB 启动子的控制下,构建了具有高效重组功能的低拷贝质粒 pKD46,加入一定浓度的阿拉伯糖后诱导质粒 pKD46 表达出 Exo、Beta 和 Gam 三种蛋白质,将含有抗性基因的 PCR 片段电转入含有质粒 pKD46 的大肠埃希菌,在 Red 重组酶的作用下,PCR 片段借助两端与靶基因两翼同源的序列与染色体上靶基因发生重组,染色体上的靶基因被抗性基因所替代。其优点是用 PCR 合成双链线状 DNA 打靶分子,不需限制酶和连接酶,操作过程简单、精确和快速、经济,大大缩短了构建打靶载体的时间,成为功能基因组研究的有利工具,适用于后基因组时代功能研究中大量突变株的构建,已成功应用于大肠埃希菌属、沙门菌属、假结核耶尔森菌属、志贺菌属、沙雷菌属、克雷伯菌属、假单胞菌属等的基因敲除^[14-18]。

尽管一步法突变技术在一些革兰氏菌成功应用,但在鼠疫菌中同源重组效率较低,特别是对较短的 sRNA (小于 200 bp) 或较长的染色体片段(大于 2 kb)敲除较困难,因此构建一种适合于鼠疫菌全基因组高效的敲除方法尤为重要。RyhB 是 2002 年在大肠埃希菌发现的一种跟铁代谢相关的 sRNA,而在鼠疫菌中发现有两个同

源性很高的 RyhB 拷贝——RyhB1 和 RyhB2,大小约为 110 bp,在应用一步法 PCR 法敲除 RyhB 时,虽将同源臂由 40 bp 提高到 60 bp,但仍没成功将其敲除。有文献报道提高同源臂可有效提高同源重组效率^[19]。如经克隆连接和酶切获得痢疾杆菌 500–800 bp 的长同源臂,在较短时间内成功地敲除了痢疾杆菌等 4 个基因,但方法比较繁琐、耗时;2003 年,Derbise 报道^[18]利用三步 PCR 法获得 500 bp 的线性打靶 DNA 同源臂,不必依赖于酶切连接等传统的基因工程手段,可有效敲除假结核耶尔森菌多个基因。本研究在上述方法的基础上进行改进,通过二步 PCR 法构建 600–1000 bp 的同源臂,有效提高了同源重组效率,方法简单、快速及高效,特别适合于鼠疫菌 sRNA (36–200 bp) 及大片段染色体(2–47 kb)的敲除,并为鼠疫菌及其他微生物基因结构与功能、表达及调控、致病性和毒力等研究提供有力的工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 鼠疫菌野生株 201 株属于田鼠型菌株,其主要表型为 F1⁺ (可以形成荚膜), LcrV⁺ (合成 V 抗原), Pst⁺ (产生鼠毒素) 以及 Pgm⁺。质粒 pKD46 (温度敏感型,含有受阿拉伯糖启动子调控的 *gam*、*bet* 和 *exo* 基因, Amp^R)、pKD4 (含有两边带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因)。

1.1.2 培养基: LB 培养基(1L 水加入 10 g 胰化蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl 和 15 g 琼脂)制备好后,高压灭菌冷却到 60 °C 后,并加入相应抗性的抗生素(氨苄青霉素 100 μ g/mL、卡那霉素 50 μ g/mL)。

1.1.3 主要试剂: dNTP、PrimeSTAR™ HS DNA polymerase、TaKaRa Ex Taq 购自宝生物(大连)有限公司; PCR 纯化试剂盒及胶回收试剂盒购自德国凯杰公司。

1.2 PCR 扩增目的基因的上、下游同源臂及卡那盒

针对待敲除目的基因(如 sRNA 和大片段染色体)上下游序列,用 primer 5 设计含抗性盒的上下游同源臂引物:扩增上游同源臂的一条反向引物 RyhB1-Up-R-kan 为 5'-CGTGTAATGCTGCAA TCTGGCAATGATAATCATTATCAC-3', 5'端划线部分是与卡那盒同源的序列(18 bp), 3'端未划线部分是与敲除基因上游同源的序列;扩增下游同源臂的一条正向引物 RyhB1-down-F-kan 为 5'-GCTTCTCAGTGCGTTACATTTGCCTTTTT CTCACCCCGTTC-3', 5'端划线部分是与卡那盒同源的序列(18 bp), 3'端未划线部分是与敲除基因下游同源的序列。最终扩增的上、下游同源臂末端均含有 18 bp 卡那盒的同源序列, PCR 产物大小一般为 600–1000 bp, 而扩增的卡那盒长度为 1598 bp, 用于后续的融合 PCR (引物设计见表 1)。

PCR 扩增体系 (50 μ L): 5 \times PrimeSTAR™ buffer 10 μ L、dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, Forward primer (10 μ mol/L) 及 Reverse primer (10 μ mol/L) 各 1 μ L、DNA 模板(10 ng/ μ L) 4 μ L、PrimeSTAR™ HS DNA polymerase 0.5 μ L, 加水补足 50 μ L。PCR 扩增条件为: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C (同源臂)或 50 $^{\circ}$ C (卡那盒) 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min (同源臂)或 1.5 min (卡那盒), 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物最后进行纯化, 并测定核酸纯度和浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 融合 PCR 扩增线性突变盒(含上、下游同源臂及卡那盒)

将上、下游同源臂及卡那盒模板等摩尔混合, 以此混合产物为 DNA 模板, 用上游同源臂的正向引物及下游同源臂的反向引物扩增, 扩增含上游同源臂、卡那盒及下游同源臂的线性打靶突变盒。PCR 扩增体系(50 μ L): 5 \times PrimeSTAR™ buffer 10 μ L、dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L、上下游同源臂及卡那盒模板(10 ng/ μ L) 2 μ L、PrimeSTAR™ HS DNA polymerase 0.5 μ L, 加水补足 50 μ L。PCR 扩增条件为 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 3.5 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 回收目的带进行纯化, 并测定核酸纯度和浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 感受态细胞的制备

将含 pKD46 质粒的鼠疫菌 201 株, 接种于 5 mL LB 肉汤(Amp^R)中, 26 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{620} 为 0.6–0.8 左右, 并加入终浓度为 10 mmol/L L-阿拉伯糖诱导 2 h, 4 $^{\circ}$ C 4000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 并用等体积灭菌去离子水洗涤 2 次, 最后用 1 mL 10% 灭菌甘油悬浮均匀, 分装成每管 50 μ L, 于 -70 $^{\circ}$ C 冻存以备用。

1.5 电转

取 1–3 μ g 的 PCR 产物加入到感受态细胞并轻微混匀, 置冰上放置 15 min, 将 PCR 产物和感受态细胞的混合物加入到预冷电击杯中, 在 25 μ F 200 Ω 1.8 kV 的参数下电击, 电击完后立即加入 900 μ L 的无抗性 LB 培养基悬浮细胞, 并将电击细胞转入到离心管中, 于 26 $^{\circ}$ C 培养 2–4 h。短暂离心后, 取 200 μ L 悬浮物均匀涂布在含卡那抗性的 LB 平板上, 26 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d。

表 1. 本研究用到的引物序列
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
RyhB1-up-F	CATATTCCCCCTGAGTCAAAT
RyhB1-up-R-kan	<u>CGTGTAATGCTGCAATCTGGCAATGATAATCATTATCAC</u>
RyhB1-down-F-kan	<u>GCTTCTCAGTGC GTTACA</u> TTTGCCTTTTTCTCACCCCGTTC
RyhB1-down-R	GGTAAATCAACTTAATCCGAGAG
RyhB2-up-F	GGCGTAAACCAGTCGGTAGTCT
RyhB2-up-R-kan	<u>CGTGTAATGCTGCAATCTAAAAATGATAATACTTATCAATAT</u>
RyhB2-down-F-Kan	<u>GCTTCTCAGTGC GTTACAGT</u> GCCCAGAAAAACCCCGAGC
RyhB2-down-R	TTCCGGTGAGTGAGTACAGC
47-2-up-F	CGACCCAGTCTCACCGGCGACAAT
47-2-up-R-kan	<u>CGTGTAATGCTGCAATCTAGAGA</u> ACAGAAATTCAGGGCGACAC
47-2-down-F-kan	<u>GCTTCTCAGTGC GTTACA</u> GCCGAGGCCATAATGATTACGTTA
47-2-down-R	TCCGGGTGCAACATGAAGTACA
47-3-up-F	GTAACCAATACCCGGCGACTCTC
47-3-up-R-kan	<u>CGTGTAATGCTGCAATCT</u> TAGAGCTTGCTCACTTGGATAAG
47-3-down-F-kan	<u>GCTTCTCAGTGC GTTACA</u> GCTTCTCCTTGGCAAATTG
47-3-down-R	AATCGATGTACCCCGCAGTC
47-3a-up-F	CCCTCGGCATGGACGTTTA
47-3a-up-R-kan	<u>CGTGTAATGCTGCAATCT</u> GTGCGTACTATTACTCATC
47-3a-down-F-kan	<u>GCTTCTCAGTGC GTTACA</u> GGCCAAATGGCCCACTGATGT
47-3a-down-R	TGTTAGGCGTATTTATCGAGA
47-3b-up-F	GGGTTTCCGGCGATGTAA
47-3b-up-R-kan	<u>CGTGTAATGCTGCAATCT</u> GCCGCCTACCTGAATCTC
47-3b-down-F-kan	<u>GCTTCTCAGTGC GTTACA</u> CTAGCGTGCCAGTAGGT
47-3b-down-R	GAGGAATGCCGTCGATT
Kan-F	AGATTGCAGCATTACACG
Kan-R	TGTAACGCACTGAGAAGC
RyhB1-I-out-F	GCAACCGCGCGGCAGCATTCCCG
RyhB1-I-out-R	GCATGGCCCGGATCGTCTGCTT
RyhB2-I-out-F	GTAACGCGTTGTGTTAGTGTG
RyhB2-I-out-R	CCATCGGGTGTGCGCTAAGCTC
Kana-I-R	GCCGATTGTCTGTTGTGCC
Kana-I-F	GGCTGGGTGTGGCGGACCGC
rstA-F	GCACAAGCCGTTATTGAACAG
rstA-R	AGTGCTTCGTTATTCTCAATCG
rhsA1-F	ACGATGCGGAAGAGACG
rhsA1-R	CGGTGATTTTGTGGTGTAG
dalD-F	AACAACGGCAACAGGATAAGAG
dalD-R	CGGTAGCGGTAGGCACTC
tpx-F	GGACCCAATAATGACACAGACC
tpx-R	GCCATCCAGAACGACAACC
pspA-F	ATTGGCGGCGTACATCAC
pspA-R	AGCGAAAGTCAGCAACAGGA
hrpA-F	TGTATCTCTGCCCTCCAT
hrpA-R	TGTTTCGCACCCTCTTTG
IdhA1-F	ACAAGTGGTCCGAGTGCC
IdhA1-R	ACCTGTGCCGATAATCCC
tyrR-F	TTATCGGCTGAATGTCCT
tyrR-R	CTGCTTAAACCATACTCCC
nifJ-F	CTTCTCCGCACAGCATCT
hslJ-F	TCGTTCCAGTGGCTATTATCG
hslJ-R	GTGTGCGTACTATTACTCATCG
aesS2-F	TTTTGATGGGAGGGTCTG
aesS2-R	TCGGGATTATCTACTTGG
soxR2-F	GGTATTTACGTCATCGCTAC
soxR2-R	CTTGCACTTAACTGTGGC
YP_2127-F	CCAACAATACGGTCAATCTC
YP_2127-R	GAAACGAAACAACCCAAC

The black underlined sequence of the primer 5' end is the homologous sequence of the kanamycin cassette.

1.6 重组克隆的 PCR 鉴定

挑取在 LB 平板生长的单克隆, 转涂于另一块 LB 平板, 26 °C 培养 24 h 后, 刮取少量细菌, 洗脱至 100 μ L 无菌水中, 于 99 °C 变性 10 min, 取 5 μ L 作为模板进行 PCR 鉴定。以野生株的 DNA 和水作为对照, 用敲除基因的内部鉴定引物、外侧鉴定引物和卡那盒的内部鉴定引物交叉配对进行鉴定, 若目的基因被卡那盒置换, 则内部鉴定引物为阴性, 而外侧鉴定引物和卡那盒的交叉鉴定引物则为阳性, 说明目的基因成功敲除。

2 结果和分析

2.1 两步 PCR 介导的 Red 重组技术敲除鼠疫菌 sRNA 及染色体大片段的示意图

利用两步法 PCR 法构建含目的基因上下游同源臂(600–1000 bp)的线性抗性盒(图 1)。第一步 PCR 先扩增出目的基因上、下游同源臂(含与卡那盒末端同源的序列)及卡那抗性盒; 第二步融合 PCR 以上、下游同源臂及卡那抗性盒等摩尔混合物为模板, 以上游同源臂的上游引物(Up-F)及下游

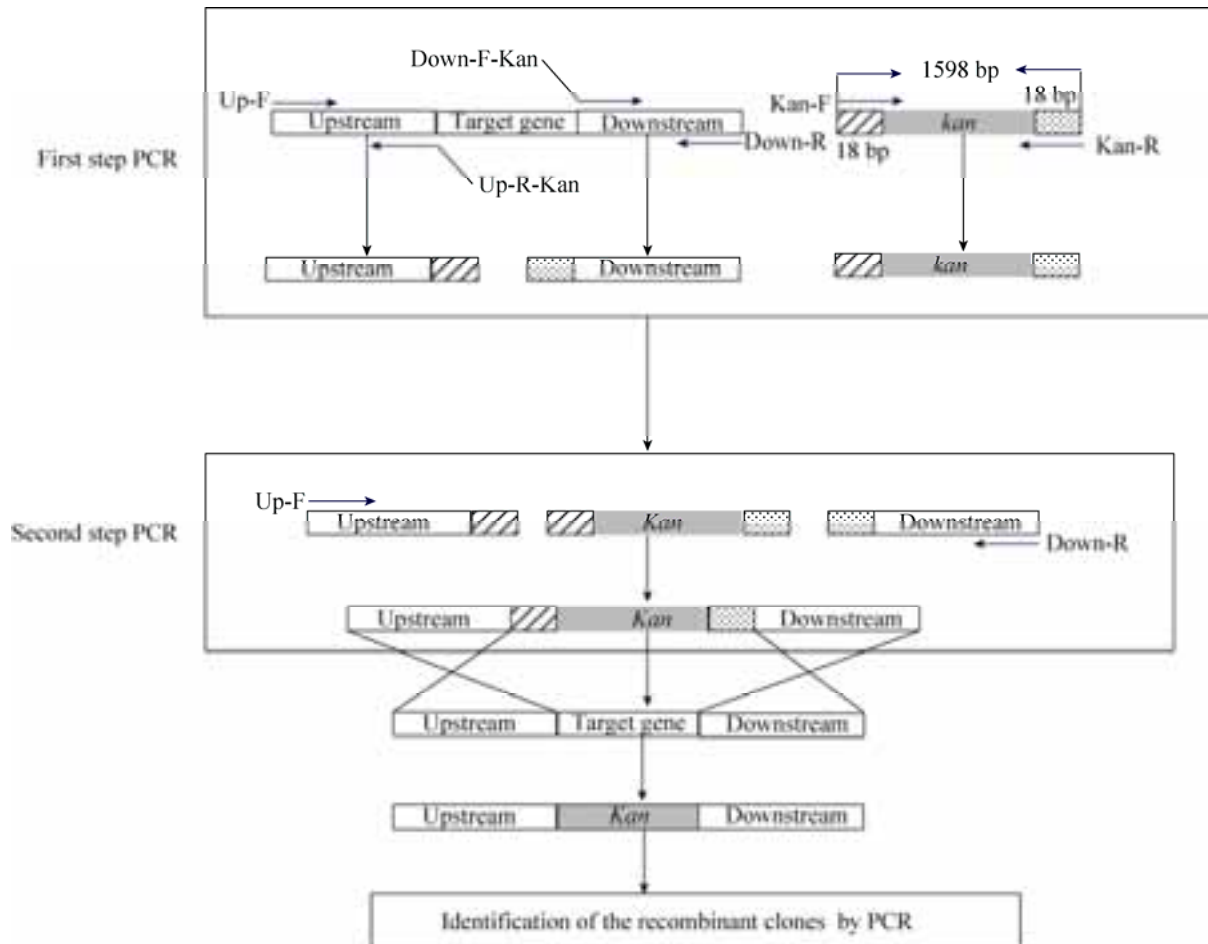


图 1. 两步 PCR 介导的 Red 重组技术敲除鼠疫菌 sRNA 及染色体大片段示意图

Figure 1. Schematic diagram of the deletion *Yersinia pestis* sRNA and large fragment chromosome by two step PCR mediated Red recombination technique.

同源臂的下游引物(Down-R)进行 3 个片段的融合, 获得含上下游同源臂及卡那盒的线性突变盒, 经胶回收后再电转到含有 pKD46 质粒的鼠疫 201 菌株, PCR 鉴定含卡那抗性的基因敲除株。

2.2 鼠疫菌 sRNA RyhB 缺失突变株的构建

2.2.1 PCR 扩增目的基因的上、下游同源臂及卡那盒: RyhB1 的上下游同源臂约为 950 bp, RyhB2 的上下游同源臂约为 740 bp, 卡那盒为 1598 bp。PCR 扩增的 RyhB1 的上下游同源臂的条带接近 1000 bp, RyhB2 的上下游同源臂的条带接近

750 bp, 卡那盒条带位于 1500–2000 bp 之间(图 2), 都与预期目的条带大小一致, 说明成功扩增 RyhB1 和 RyhB2 的上下游同源臂及卡那盒。

2.2.2 融合 PCR 构建含上、下游同源臂的线性突变盒的鉴定: 将第一步 PCR 扩增的鼠疫菌 sRNA RyhB1 及 RyhB2 的上下游同源臂及卡那盒作为模板, 通过融合 PCR 扩增卡那盒两端含上下游同源臂的线性突变盒, 图 3 结果显示 PCR 扩增的 RyhB1 和 RyhB2 的线性突变盒, 大小介于 3 kb 附近, 与目的条带大小一致, 说明成功获得 RyhB1 和 RyhB2 的线性突变盒。

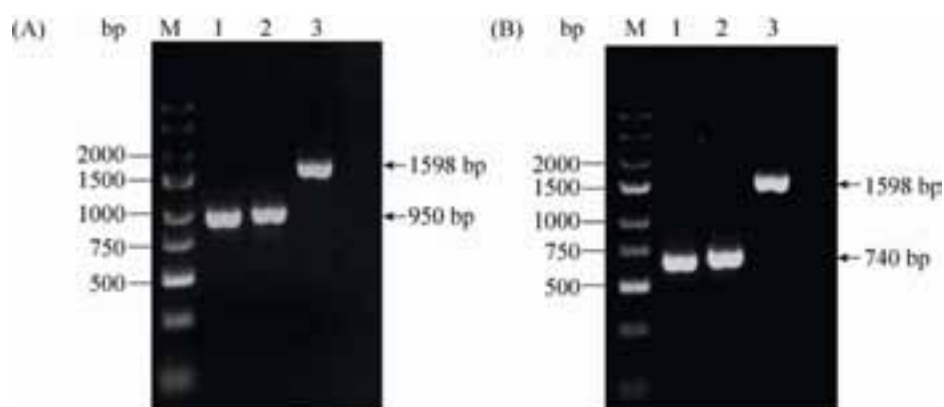


图 2. PCR 鉴定 RyhB1 和 RyhB2 的上下游同源臂及卡那盒

Figure 2. Identification of the upstream and downstream homologous arms of the target gene and the kanamycin cassette by PCR. (A) RyhB1. M: DNA marker; lane 1: upstream homologous arm; lane 2: downstream homologous arm; lane 3: kanamycin cassette. (B) RyhB2. M: DNA marker; lane 1: upstream homologous arm; lane 2: downstream homologous arm; lane 3: kanamycin cassette.

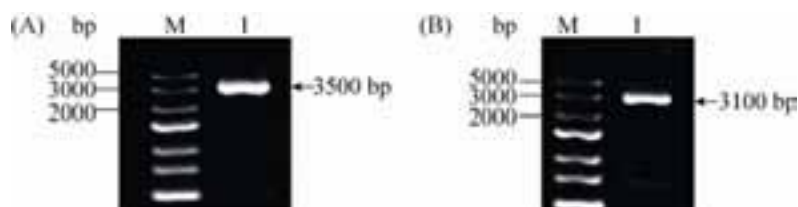


图 3. 融合 PCR 鉴定线性突变盒

Figure 3. Identification of linear mutation cassette by fusion PCR. A: RyhB1. M: DNA marker; lane 1: linear mutation cassette. B: RyhB2. M: DNA marker; lane 1: linear mutation cassette.

2.2.3 PCR 鉴定鼠疫菌 RyhB1 及 RyhB2 缺失突变株:

传统的一步法突变技术使用的同源臂较短(一般为 36–50 bp), 对小于 200 bp sRNA 的敲除比较困难。本研究以长度约为 110 bp 鼠疫菌 sRNA RyhB1 (108 bp)和 RyhB2 (106 bp)为例, 通过融合 PCR 构建较长同源臂, 提高了同源重组效率, 成功构建了 RyhB1 和 RyhB2 的缺失突变株。

当较长线性突变盒和 RyhB1 基因发生同源重组后, 卡那盒取代了 RyhB1 基因(图 4-A), 因此可用 RyhB1 外侧鉴定的上游引物(RyhB1-I-F)和卡那盒鉴定的下游引物(K-R)配对, 及用 RyhB1 外侧鉴定的下游引物(RyhB1-I-R)和卡那盒鉴定的上游引物(K-F)配对, PCR 成功扩增出 720 bp 和 765 bp 条带与预期目的带一致; 使用 RyhB1 内部引物(RyhB1-int-F/R)鉴定时, 敲除株为阴性而阳性对照

株能扩出目的带, 以上结果说明成功构建 RyhB1 缺失突变株。

图 4-B 结果表明: 用 RyhB2 外侧鉴定引物(RyhB2-I-F/R)和卡那盒鉴定引物(K-F/R)交叉配对, 成功扩增出 842 bp 和 688 bp 条带与预期目的带一致; 应用 RyhB2 外侧鉴定引物(RyhB2-I-F/R), 若敲除不成功, 目的基因未被卡那盒置换, 则只扩增与野生株一样大小的 579 bp 片段; 若敲除成功, 卡那盒完全替换 RyhB2, 敲除株能扩增出 2071 bp 的片段, 结果显示成功构建 RyhB2 缺失突变株。

2.3 鼠疫菌染色体大片段缺失突变株构建

2.3.1 鼠疫菌 47 kb 毒力大片段缺失突变株的鉴定:

通过融合 PCR 构建鼠疫菌小 RNA RyhB2 突变株时, 由于设计的同源臂含有鼠疫菌全基因组

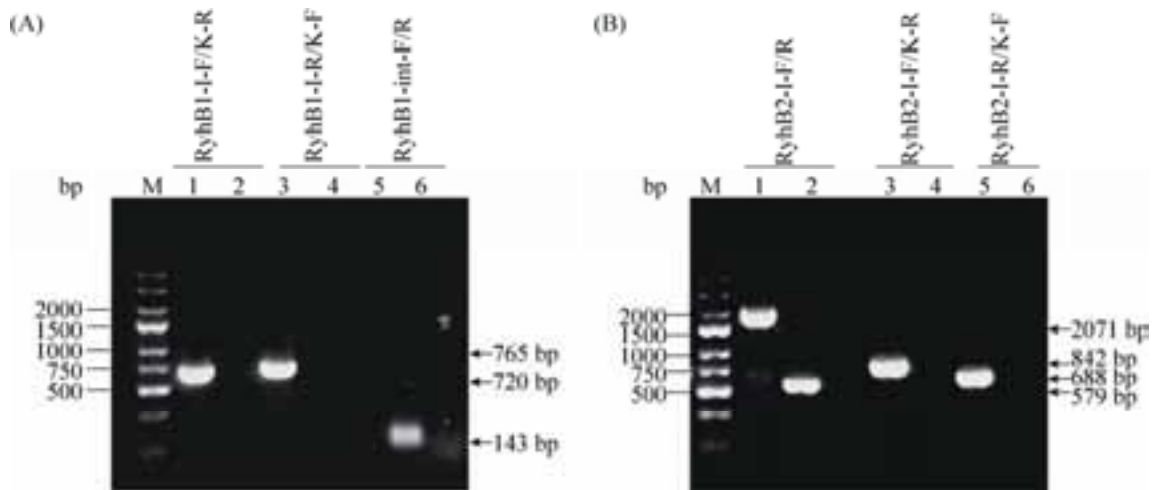


图 4. 鼠疫菌 sRNA RyhB1 和 RyhB2 缺失突变株的 PCR 鉴定

Figure 4. Identification of sRNA RyhB1 and RyhB2 deletion mutant strains of *Yersinia pestis* by PCR. A: identification of RyhB1 deletion mutant. M: DNA marker; lane 1–2 (Primer RyhB1-I-F/K-R), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3–4 (Primer RyhB1-I-R/K-F), lane 3: deletion mutant strain; lane 4: wild strain; lane 5–6 (Primer RyhB1-int-F/R), lane 5: deletion mutant strain; lane 6: wild strain. B: identification of RyhB2 deletion mutant. M: DNA marker; lane 1–2 (Primer RyhB2-I-F/R), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3–4 (Primer RyhB2-I-F/K-R), lane 3: deletion mutant strain; lane 4: wild strain; lane 5–6 (Primer RyhB2-I-R/K-F), lane 5: deletion mutant strain; lane 6: wild strain.

转座子重复序列 *tmp_22*, 结果发生非特异性同源重组, 将介于 *tmp_20* 和 *tmp_22* 转座子之间的 47 kb 大片段缺失。图 5 结果表明: 47 kb 突变株 *tmp_20* 外侧鉴定引物 *rstA* 敲除株和野生株(见第 1 和 2 泳道)都为阳性, 而内侧鉴定引物 *rhsA1*、*dalD*、*tpx* 和 *pspA* 敲除株(第 4、7、10、13 泳道)均为阴性, 而各对内侧引物野生株(第 5、8、11、14 泳道)均为阳性, 证实 47 kb 大片段成功敲除, 而 Deng 等报道 47 kb 大片段缺失后 LD₅₀ 为 1.5×10⁶ CFU, 毒力较野生株(LD₅₀ 为 6 CFU)下降约 10 万倍, 说明 47 kb 是鼠疫菌的一个毒力大片段^[20]。

2.3.2 鼠疫菌 47 kb 毒力大片段分段敲除策略:
47 kb 是一个含 40 多个基因的毒力大片段, 为确

定导致 47 kb 减毒的主要基因, 如采取单个基因逐个敲除的方法耗时而繁琐, 若采用分段敲除技术及结合 LD₅₀ 试验的策略, 则可简单、快速和高效确定 47 kb 大片段减毒的原因。如图 6 所示: 本研究将 47 kb 分为 47-1 (13177 bp)、47-2 (10468 bp) 和 47-3 (21636 bp) 3 个部分, 而 47-3 又分为 a (9168 bp)、b (6155 bp) 及 c (5892 bp) 3 个片段, 47-3c 又分为若干个小片段。

2.3.3 鼠疫菌 47 kb 大片段分段敲除株的 PCR 鉴定: 图 7-A 结果表明: 47-2 的外侧鉴定引物 *hrpA*, 突变株和野生株都为阳性(见第 1 和 2 泳道), 内部鉴定引物 *dalD* 及 *IdhA1* 敲除株(第 4 及 7 泳道)均为阴性, 而野生株(第 5 及 8 泳道)均为阳性, 说明

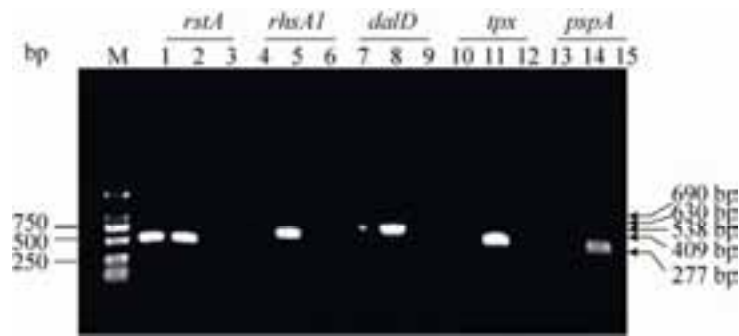


图 5. 鼠疫菌 47 kb 大片段敲除株的 PCR 鉴定

Figure 5. Identification of 47 kb deletion mutant strain of *Yersinia pestis* by PCR. M: DNA marker; lane 1–3 (Primer *rstA*), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3: negative control; lane 4–6 (Primer *rhsA1*), lane 4: deletion mutant strain; lane 5: wild strain; lane 6: negative control; lane 7–9 (Primer *dalD*), lane 7: deletion mutant strain; lane 8:wild strain; lane 9: negative control; lane 10–12 (Primer *tpx*), lane 10: deletion mutant strain; lane 11: wild strain; lane 12: negative control; lane 13–15 (Primer *pspA*), lane 13: deletion mutant strain; lane 14: wild strain; lane 15: negative control.

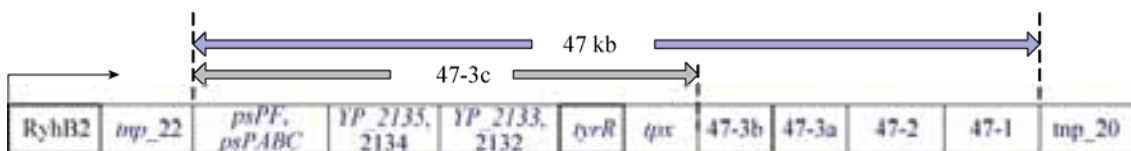


图 6. 鼠疫菌 47 kb 大片段分段敲除策略

Figure 6. Strategy for 47 kb segmented deletion of *Yersinia pestis*.

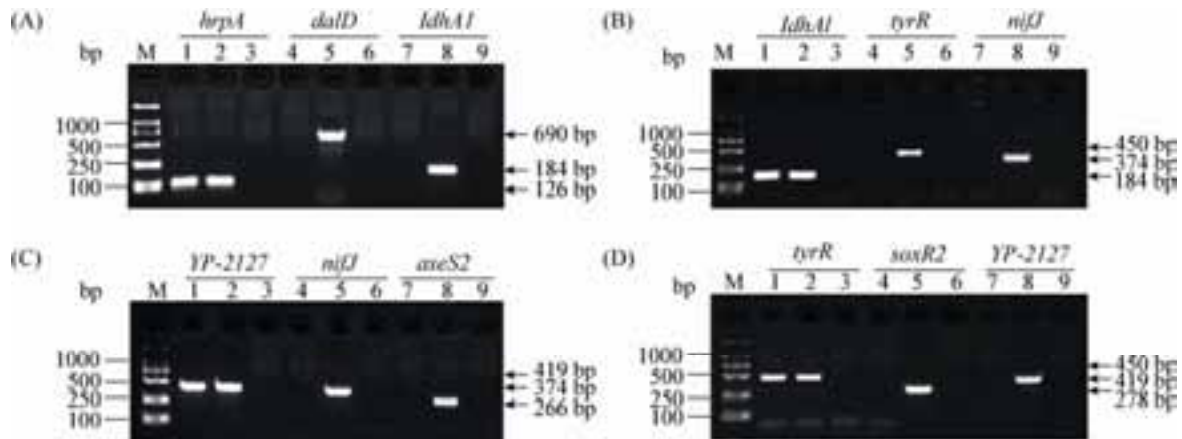


图 7. 鼠疫菌 47 kb 大片段分段敲除株的 PCR 鉴定

Figure 7. Identification of 47 kb segmented deletion mutant strains of *Yersinia pestis* by PCR. A: Identification of 47-2 deletion mutant. M: DNA marker; lane 1–3 (Primer *hrpA*), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3: negative control; lane 4–6 (Primer *dalD*), lane 4: deletion mutant strain; lane 5: wild strain; lane 6: negative control; lane 7–9 (Primer *IdhA1*), lane 7: deletion mutant strain; lane 8: wild strain; lane 9: negative control. B: identification of 47-3 deletion mutant. M: DNA marker; lane 1–3 (Primer *IdhA1*), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3: negative control; lane 4–6 (Primer *tyrR*), lane 4: deletion mutant strain; lane 5: wild strain; lane 6: negative control; lane 7–9 (Primer *nifJ*), lane 7: deletion mutant strain; lane 8: wild strain; lane 9: negative control. C: identification of 47-3a deletion mutant. M: DNA marker; lane 1–3 (Primer *YP-2127*), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3: negative control; lane 4–6 (Primer *nifJ*), lane 4: deletion mutant strain; lane 5: wild strain; lane 6: negative control; lane 7–9 (Primer *aesS2*), lane 7: deletion mutant strain; lane 8: wild strain; lane 9: negative control. D: identification of 47-3b deletion mutant. M: DNA marker; lane 1–3 (Primer *tyrR*), lane 1: deletion mutant strain; lane 2: wild strain; lane 3: negative control; lane 4–6 (Primer *soxR2*), lane 4: deletion mutant strain; lane 5: wild strain; lane 6: negative control; lane 7–9 (Primer *YP-2127*), lane 7: deletion mutant strain; lane 8: wild strain; lane 9: negative control.

47-2 成功敲除; 类似的 47-3 的外侧鉴定引物为 *IdhA1*, 突变株和野生株都为阳性(见第 1 和 2 泳道), 内部鉴定引物 *tyrR* 及 *nifJ* 敲除株(第 4 及 7 泳道)均为阴性, 而野生株(第 5 及 8 泳道)均为阳性, 说明 47-2 成功敲除(图 7-B); 47-3a 的外侧鉴定引物为 *YP-2127*, 突变株和野生株都为阳性(见第 1 和 2 泳道), 内部鉴定引物 *nifJ* 及 *aesS2* 敲除株(第 4 及 7 泳道)均为阴性, 而野生株(第 5 及 8 泳道)均为阳性, 说明 47-3a 成功敲除(图 7-C); 47-3b 的外侧鉴定引物为 *tyrR*, 突变株和野生株都为阳性(见第 1 和 2 泳道), 内部鉴定引物 *soxR2* 及 *YP-2127* 敲除株(第 4 及 7 泳道)均为阴性, 而野生

株(第 5 及 8 泳道)均为阳性, 说明 47-3b 成功敲除(图 7-D); 以上结果表明成功构建了 47-2 (10.4 kb)、47-3 (21.6 kb)、47-3a (9.2 kb) 及 47-3b (6.1 kb) 等大片段的敲除株。

3 讨论

一步法突变技术是一种快速和精确的基因突变方法, 该方法所需的同源区短, 不需构建打靶质粒, 因此实验周期大大缩短, 但有其局限性。在大肠杆菌中一步法突变技术使用较短同源臂 (36–50 bp), 其同源重组效率具有菌株及基因的依

赖性, 即不同的菌株及同一菌株不同基因的同源重组效率可能存在差异, 而增大同源臂是提高同源重组效率的有效手段。如一步法敲除技术在假结核耶尔森菌中的同源重组效率较低, 需将同源臂提高到 500 bp 才能有效敲除 *int*、*recA* 和 *gmd-fcI* 等基因^[18]; 在霍乱弧菌中, 较短的同源臂(50 bp) 只能将 N16961 型霍乱弧菌菌株的 *ctxB* 及 *toxT* 基因敲除, 而使用 1000 bp 同源臂则可将 4 种不同菌株(N16961、SY10045、V080085 及 V080080)中的 *ctxB*、*toxT*、*lacZ* 及 *recA* 等基因成功敲除^[17]。因此一步法突变技术有菌株依赖性, 并不适用于其他细菌全基因组大片段的基因敲除。

随着鼠疫 CO92 和 91001 等菌株全基因组测序的完成, 为鼠疫菌功能研究提供了非常有用的信息。鼠疫菌 RyhB 是一类新近发现的长约为 110 bp 非编码 sRNA, 在鼠疫菌基因组有 RyhB1 和 RyhB2 两个拷贝, 可参与铁利用和储存相关基因转录的调控。一步法突变技术在鼠疫菌中的同源重组效率较大肠埃希菌低, 特别是对小于 200 bp 的 sRNA 敲除较困难, RyhB 虽经多次敲除均未成功, 本研究通过融合 PCR 构建长同源臂(600–1000 bp)后, 可成功敲除鼠疫菌 RyhB1 (108 bp)、RyhB2 (106 bp)、*ssrS* (382 bp)、*ssrA* (364 bp)等 sRNA, 最短可将 36 bp 的 *ssrS* 启动子区域缺失, 此外, 本方法也适合鼠疫菌超过 2 kb 的染色体大片段的敲除。在构建 RyhB2 突变株时, 由于长同源臂包含全基因组一个转座子重复序列, 意外获得 47 kb 缺失减毒株, 通过采取分段敲除技术获得染色体大片段缺失株(大于 2 kb), 包括 47-2 (10.5 kb)、47-3 (21.6 kb)、47-3a (9.2 kb)、47-3b (6.2 kb) 及 YP_2132-2135 (3.4 kb), 并结合动物试验, 发现 TyrR 突变株的毒力较野生株降低约 1 万倍, 并构

建 TyrR 突变株的回补株且回补株的毒力恢复, 最终确定 *tyrR* 基因缺失是导致 47 kb 减毒最主要的基因^[20]。因此通过融合 PCR 法构建 600–1000 bp 的同源臂, 可有效提高同源重组效率, 特别适于鼠疫菌 sRNA (36–200 bp) 及染色体大片段(2–47 kb) 的基因敲除, 且操作简单、快速及高效, 可应用于鼠疫菌全基因组的敲除。

当然, 鼠疫菌同源重组效率除主要受到同源臂长度影响外, 也跟 PCR 突变盒的纯度和浓度、感受态的状态、阿拉伯糖诱导的浓度和时间等多因素有关。因此在同源重组过程中, 要求 PCR 扩增上下游同源臂及卡那盒时 PCR 产物特异性要好, 融合的线性突变盒纯化后需切胶回收, 且浓度一般为 200–500 ng/μL, 为提高电转效率, 制备的鼠疫菌感受态细胞的 OD_{620} 一般为 0.6–0.8, 10 mmol/L 阿拉伯糖要诱导 2 h; 为避免假阳性克隆, 若使用质粒模板扩增抗性盒, 最好使用 *Dpn I* 酶消化抗性盒以降解模板中质粒, 或直接提取含抗性盒的敲除株染色体 DNA 作为模板。另外当同源臂含非特异性重复序列时, 可能造成非必要同源重组, 像本研究中的 47 kb 缺失突变株就是非特异重组一个极好的例证。因此要根据不同靶基因设计同源臂, 避免同源臂含有靶基因本身或全基因组多个非特异性同源序列, 造成靶基因的错误敲除。需要注意的是 PCR 在扩增长同源臂时使用普通 Taq 酶可能会出现点突变, 如果同源臂包含 ORF 有可能会引起该基因的插入突变, 因此扩增时尽可能使用具有校正功能的高保真酶。一般对缺失突变株鉴定方法包括 PCR、DNA 测序、构建互补株, 此外还可利用 Northern blot、Western blot、毒力及生理等表型试验来验证。PCR 是常用的鉴定方法, 为避免插入突变对基因功能的影响, 也

可构建缺失基因的互补株进行验证, 若互补株不能有效回补敲除基因的表型或生理功能, 则说明可能有插入突变。因此在构建缺失突变株时, 要根据不同基因的生理或毒力功能, 综合选用多种方法进行验证, 以保证基因敲除结果的可靠性。

总而言之, 本研究基于 Red 重组系统构建的二步法突变技术, 避免了传统的酶切、连接构建载体的过程, 是一种简单、高效的精确修饰鼠疫菌 sRNA 及染色体大片段的方法, 适合于鼠疫菌全基因组的基因敲除, 为研究鼠疫菌 sRNA 调控及致病性研究提供有力的工具, 也为其他微生物的功能研究提供科学依据和思路。

参 考 文 献

- [1] Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 2009, 136(4): 615–628.
- [2] Babski J, Maier LK, Heyer R, Jaschinski K, Prasse D, Jäger D, Randau L, Schmitz RA, Marchfelder A, Soppa J. Small regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biology*, 2014, 11(5): 484–493.
- [3] Pappenfort K, Vanderpool CK. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(3): 362–378.
- [4] Deng ZL, Meng XR, Su SC, Liu ZZ, Ji XL, Zhang YQ, Zhao XN, Wang XY, Yang RF, Han YP. Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar *microtus* expressed *in vivo* have differential Hfq-dependent stability. *Research in Microbiology*, 2012, 163(6/7): 413–418.
- [5] Deng ZL, Liu ZZ, Bi YJ, Wang XY, Zhou DS, Yang RF, Han YP. Rapid degradation of Hfq-free RyhB in *Yersinia pestis* by PNPase independent of putative ribonucleolytic complexes. *BioMed Research International*, 2014(2): 798918.
- [6] Yan YF, Su SC, Meng XR, Ji XL, Qu Y, Liu ZZ, Wang XY, Cui YJ, Deng ZL, Zhou DS, Jiang WC, Yang RF, Han YP. Determination of sRNA expressions by RNA-seq in *Yersinia pestis* grown *in vitro* and during infection. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74495.
- [7] Liu ZZ, Wang HL, Wang HD, Wang J, Bi YJ, Wang XY, Yang RF, Han YP. Intrinsic plasmids influence MicF-mediated translational repression of *ompF* in *Yersinia pestis*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 862.
- [8] Liu ZZ, Gao XF, Wang HD, Fang HH, Yan YF, Liu L, Chen R, Zhou DS, Yang RF, Han YP. Plasmid pPCP1-derived sRNA HmsA promotes biofilm formation of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 176.
- [9] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233–239.
- [10] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [11] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [12] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 957–963.
- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [14] Husseiny MI, Hensel M. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccine carrier strains. *Infection and Immunity*, 2005, 73(3): 1598–1605.
- [15] Janes BK, Pomposiello PJ, Perez-Matos A, Najarian DJ, Goss TJ, Bender RA. Growth inhibition caused by overexpression of the structural gene for glutamate dehydrogenase (*gdhA*) from *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2709–2714.
- [16] Lesic B, Rahme LG. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9: 20.
- [17] Yamamoto S, Izumiya H, Morita M, Arakawa E, Watanabe H. Application of λ Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene*, 2009, 438(1/2): 57–64.
- [18] Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 38(2): 113–116.
- [19] Ge TD, Feng EL, Yan BJ, Wang HL, Huang LY. Construction of deletion mutant of *Shigella flexneri* acid resistance genes. *Letters in Biotechnology*, 2005, 16(5): 488–491. (in Chinese) 葛堂栋, 冯尔玲, 晏本菊, 王恒暉, 黄留玉. 痢疾杆菌酸性系统相关基因缺失突变体的构建. *生物技术通讯*, 2005, 16(5): 488–491.
- [20] Deng ZL, Liu ZZ, He JM, Wang J, Yan YF, Wang XY, Cui YJ, Bi YJ, Du ZM, Song YJ, Yang RF, Han YP. TyrR, the regulator of aromatic amino acid metabolism, is required for mice infection of *Yersinia pestis*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 110.

Two-step PCR mediated Red recombination technique for rapid deletion of *Yersinia pestis* sRNA and large fragment chromosome

Renxia Wang¹, Rongjiao Liu¹, Ziwei Li¹, Ruihuan Wang¹, Ruifu Yang², Yanping Han², Zhongliang Deng^{1*}

¹Department of Sanitary Inspection, School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] Based on the λ Red recombination system, a two-step PCR method was developed to delete small non-coding RNA (sRNA) and large chromosomal fragment in *Yersinia pestis*. [Methods] Two PCR procedures were done to amplify product formed of a kanamycin resistance gene flanked by long (600–1000 bp) homology extensions. The PCR fragment carrying a kanamycin resistance gene flanked by regions homologous to the target locus was electroporated into a recipient 201 strain of *Yersinia pestis* expressing the homologous recombination system encoded by plasmid pKD46, which promoted the replacement of the target gene with kanamycin resistant fragment. Finally, the recombinant clones were identified by PCR. [Results] The homologous extensions of 600–1000 bp were constructed by two PCR method, which increased the efficiency of homologous recombination, the sRNA RyhB1 (108 bp) and RyhB2 (106 bp) and the larger chromosome fragments 47-2 (10.4 kb), 47-3 (21.6 kb), 47-3a (9.2 kb) and 47-3b (6.1 kb) were successfully deleted. [Conclusion] The two step PCR mutation technique was a simple and efficient method for the precise modification of sRNA and large fragment chromosome of *Yersinia pestis*. This method was suitable for gene knockout of whole genome of *Yersinia pestis*, which provided a powerful tool for gene expression and regulation, pathogenicity and virulence study of *Yersinia pestis*.

Keywords: *Yersinia pestis*, Red recombination system, sRNA, large fragment chromosomes, gene knockout

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Hunan Provincial Department of Education Key Projects (15A165)

*Corresponding author. Tel: +86-734-8281393; E-mail: dzl021015@sina.com

Received: 4 January 2017; Revised: 29 March 2017; Published online: 6 April 2017