

应用基因敲除快速构建大肠杆菌突变体改造脂肪酸代谢途径

曲璟秋, 刘翠花, 刘伟丰, 陶勇, 朱坤*

中国科学院微生物研究所, 北京 100190

摘要: 【目的】基因敲除技术是研究基因功能的重要手段。我们试图建立一种快速、高效的大肠杆菌基因敲除方法。【方法】利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BW25113 单基因缺失体 Keio 文库, 将经典的 Red 同源重组技术与 P1 噬菌体转导技术相结合, 对 *E. coli* MG1655 脂肪酸代谢基因进行快速敲除。【结果】获得了大肠杆菌 β -氧化途径的缺失菌株 $\Delta fadD$ 、 $\Delta fadE$ 和 $\Delta fadD -\Delta fadE$; 脂肪酸合成途径缺失菌株 $\Delta fabH$ 、 $\Delta fabF$ 和 $\Delta fabH -\Delta fabF$ 。敲除 *fadD* 和 *fadE* 对生长情况没有影响; 敲除 *fabH* 后, 生长速度明显减慢; 敲除 *fabF* 对生长几乎没有影响。FadD、FadE 及双敲缺失体的脂肪酸含量 18.2 mg/L、20.0 mg/L 和 19.2 mg/L, 略高于野生型 17.5 mg/L; FabH、FabF 及双敲缺失体的含量分别为 12.6 mg/L、15.2 mg/L 和 11.2 mg/L, 明显低于野生型。【结论】在单基因突变体文库基础上, 利用 P1 噬菌体转导、Red 同源重组和抗性基因消除进行基因敲除, 简化了构建大肠杆菌单基因和多重突变体的方法。

关键词: 大肠杆菌, Red 同源重组, P1 噬菌体, 基因敲除, 脂肪酸含量

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 06-0608-07

Red 同源重组技术是一项应用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 基因敲除的重要手段。1998 年, 由 Murphy^[1] 首次报道。其基本原理是由 λ 噬菌体的 *exo*、*bet* 和 *gam* 3 个基因组成, 分别编码 Exo、Beta 和 Gam 3 种蛋白质。3 个基因受 L-阿拉伯糖启动子的控制, 在诱导时可以介导线性 DNA 分子和染色体分子间发生同源重组, 完成基因的插入、替换和敲除。利用 Red 重组敲除基因的主要步骤包括 4 步。第一, PCR 扩增含 FRT 位点的抗性基因; 第二, 将以上的线性片段转入表达 Red 重组酶的菌株中; 第三, 选择含抗性基因的转化子; 第四, 利用温敏型质粒 pCP20 表达 FLP 重组酶来消除抗性基因^[2-4]。目前国内的研究者在广泛使用该系统^[5-8]。

2006 年, Baba 等通过该方法构建了 1 个由 3985 株单基因突变株组成的大肠杆菌 BW25113 突变体 Keio 文库^[9]。这个文库为大肠杆菌的研究带来了许多便利^[10-11]。但是大肠杆菌的菌株有许多不同的来源和背景, 这限制了 Keio 文库的应用范围。虽然利用 Red 同源重组可以较快的完成基因敲除, 但利用已有的突变体文库, 效率可以更高。我们尝试利用 Keio 突变体文库, 在不同菌株中进行缺失基因的转移, 将上述方法中的 1-3 步由 P1 噬菌体转导的方法来代替, 缩短了获得突变体的时间。为了验证该方法, 我们将其用于大肠杆菌脂肪酸代谢的研究中。脂肪酸的合成是由一系列酶进行催化的。 β -酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH) 缩合 2 个 2 碳

基金项目: 自然科学基金项目 (31170040); 微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题项目 (20110603)

* 通信作者。Tel/Fax: + 86-10-57470235; E-mail: zhuk@im.ac.cn

作者简介: 曲璟秋 (1986-), 女, 黑龙江省人, 硕士研究生, 专业方向为微生物代谢工程。E-mail: qujingqiu1986@163.com

收稿日期: 2012-11-09; 修回日期: 2013-01-28

底物, 形成 4 碳的中间产物, 从而起始脂肪酸的体内合成。β-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的功能是合成 18 个碳的脂肪酸终产物^[12]。在脂肪酸的降解途径中, 脂肪酸首先是被脂酰 CoA 合成酶 FadD 激活, 然后在脂酰 CoA 脱氢酶 FadE 的作用下进入氧化降解途径^[13]。阻断脂肪酸降解途径, 已有报道能促进脂肪酸的积累, 从而提高脂肪酸产量^[14]。阻断或抑制脂肪酸的合成途径, 对大肠杆菌生长和脂肪酸产量的影响还很少报道。本文中 FabH 和 FabF 的单敲及双敲突变体中脂肪酸产量都是首次被报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和主要试剂: *E. coli* BW25113-Δ*fadD*、BW25113-Δ*fadE*、BW25113-Δ*fabH* 和 BW25113-Δ*fabF* 缺失体菌株来自 Keio 大肠杆菌缺失体文库^[9]。*E. coli* MG1655 和 W3110, 质粒 pCP20、pKD13 和 pKD46 以及 P1 噬菌体为本实验室保存,

Taq DNA 聚合酶和 *Pfu* DNA 聚合酶购于北京奥赛博科技发展有限公司。卡那霉素 (Km) 和氨苄青霉素 (Amp) 的使用浓度分别为 50 μg/mL 和 100 μg/mL。引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。除非特别说明, 大肠杆菌在 37°C 培养。

1.1.2 引物: 实验中用到的引物序列如下表 1。

1.2 利用 P1 噬菌体转移缺失基因

过夜培养供体菌, 即 Keio 文库中的菌株, 接种到 LB 培养基 (含 10 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L CaCl₂ 和 0.1% 葡萄糖)。培养 1 h, 加 P1 噬菌体, 培养 1 - 3 h。加氯仿混匀, 离心。上清即是携带供体 DNA 片段的 P1 噬菌体。

过夜培养受体菌, 即需要基因敲除的大肠杆菌菌株, 离心收集, 用 LB (含 100 mmol/L MgSO₄、5 mmol/L CaCl₂) 重悬细菌。P1 噬菌体与不同稀释浓度的受体菌混和, 培养 30 min, 加 LB (含 160 mmol/L 柠檬酸钠, pH5.5), 培养 1 h, 离心收集。用 LB (含 100 mmol/L 柠檬酸) 悬浮细胞, 涂布含 Km 的平板上, 筛选阳性克隆, PCR 验证受体菌是否获得了突变基因。

表 1. 扩增目的基因的名称及引物序列

Table 1. Primers of target genes

Gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>fadD</i>	FadD-F	GTGATTATGCCGCTCACCGA
	FadD-R	AGCGCATCGTCCGTGGTAATCA
<i>fadE</i>	FadE-F	GCAGGTGCTATGAGGACT
	FadE-R	CACCTGGCTGAATGTGAACGA
<i>fabH</i>	FabH-F	GTCCAGGGAACACAAATGCA
	FabH-R	GCCGCTCGCCTGGAATCTGT
<i>fabF</i>	FabF-F	GGCGGGATTCTCTTGACAC
	FabF-R	TACTGCCAGCGATTCTGTCT
	FabF-ho-F	TCTTTTGTCCCACTAGAATCATTTTTCCCTCCCTGGAGGACAAACGTG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	FabF-ho-R	CTAAGAAAAAGCCCGCAAGCGGACCTTTTATAAGGGTGGAAAAATGACAATTCGGGGATCCGCTCGACC

1.3 卡那霉素抗性基因的消除

取 pCP20 质粒加入感受态细胞, 电击转化。再加入 700 μL 预冷的 LB, 30°C 培养 1 - 2 h 后涂于含 Amp 平板, 30°C 培养过夜, 以消除 Km 抗性基因, 获得无抗性突变体。继而转接到无抗生素的 LB 培养基中, 42°C 培养过夜, 消除 pCP20 质粒, PCR 扩增方法鉴定 Km 抗性基因是否消除。

1.4 双敲基因菌株的获得

1.4.1 P1 噬菌体转导方法: 当敲除的第二个基因与第一个基因在染色体上的距离大于 100kb 时 (如 *fadE* 和 *fadD*), 以 Δ*fadD* (Km^R) 为供体菌株, 以

Δ*fadE* (Km^S) 为受体菌株, 利用 P1 噬菌体将突变的 *fadD* 基因转入 Δ*fadE* 菌株, 获得 Δ*fadD*-Δ*fadE* (Km^R) 菌株。利用 pCP20 质粒消除 Km 抗性基因, 从而得到无抗性基因标记的 Δ*fadD*-Δ*fadE* 菌株。

1.4.2 Red 同源重组的方法: 当敲除的第二个基因与第一个基因间在染色体上的距离小于 100kb 时 (如 *fabH* 和 *fabF*), 采用 Red 同源重组方法。(1) 以 pKD13 为模板, 以 FabF-ho-F、FabF-ho-R 为引物扩增 Δ*fabF* 片段。(2) 转化获得含 pKD46 的 Δ*fabH* (Km^S) 菌株。(3) 在 30°C 培养该菌株, 用 L-阿拉伯糖诱导, 在 OD₆₀₀ = 0.7 时, 制备感受态细胞, 并转化

$\Delta fabF$ 片段,涂 Km 平板。(4) 挑取 Km 平板上阳性克隆,消除 Km 抗性基因,得到无抗性的 $\Delta fabH$ - $\Delta fabF$ 菌株。

1.5 野生型和缺失体的生长曲线

挑取单克隆到含 LB 培养基试管中,过夜培养,按 1% 接种到 50mL LB 培养基中,37℃ 培养。测 OD_{600} 吸光度值,重复 3 次,绘制生长曲线。

1.6 脂肪酸甲酯提取及检测

1.6.1 脂肪酸甲酯提取:挑单克隆培养到 OD_{600} 为 1.0 左右,取 10 mL 菌液,收集菌体,用 1 mL H_2O 悬浮。加 2.4 mL 甲醇/乙酸(98:2),1 mL $CHCl_3$ 涡旋,再加 1.5 mL $CHCl_3$ 、1.2 mL H_2O 涡旋,离心分层。取下层到新管中,加 1 mL $LCHCl_3$ 到原管中再次抽提,合并样品,真空干燥。加入 1-2 mL $HCl-CH_3OH$ 涡旋,静置过夜,真空干燥。加 1 mL 正己烷和 2 mL H_2O ,离心分层。取上层到新管中,再加 1 mL 正己烷抽提,合并样品,真空干燥,用正己烷溶解。

1.6.2 气相色谱检测:气相色谱是岛津 GC-2010,检测条件为氢火焰离子检测器,毛细管色谱柱 DB-5,程序升温条件为从 190℃ (1 min) 以 2℃/min 速度至 200℃ (1 min),再以 5℃/min 至 240℃ (1min),进样器和检测器温度 270℃,进样量 1 μ L。

1.6.3 脂肪酸含量计算:以 20 个碳的饱和脂肪酸

(C20:0) 为内标测定脂肪酸的含量。大肠杆菌中以 C16:1、C16:0、C18:1 和 C18:0 为主,绘制这 4 种脂肪酸含量的标准曲线,计算脂肪酸含量。

2 结果

2.1 构建了 MG1655 单敲和双敲菌株

2.1.1 基因敲除流程:利用 *E. coli* BW25113 Keio 单基因突变体文库,可以快速构建其他大肠杆菌菌株(如 MG1655)单基因和多重突变体,具体过程如图 1。首先选取需要敲除的基因 1,以 Keio 文库中的基因 1 突变株为供体菌,用 P1 噬菌体转导受体菌株,然后消除抗性基因 Km 标记,获得无标记突变株。再选取需要敲除的基因 2 突变株为供体菌,重复噬菌体转导,即可获得双重突变株。用同样的方法可以获得三重或更多重的突变株。MG1655 的 *fadD*、*fadE* 单敲和双敲菌株及 *fabH*、*fabF* 单敲菌株就按该方法获得。如果两个需要敲除的基因在染色体上的位置较近(间距 < 100 kb),利用噬菌体进行转导可能导致第一个被敲除的基因被野生型基因置换^[15],在这种情况下,需要使用 Red 同源重组,完成对第 2 个或第 3 个基因的敲除,MG1655 中的 *fabH*、*fabF* 双敲突变菌株就是按该方法获得。

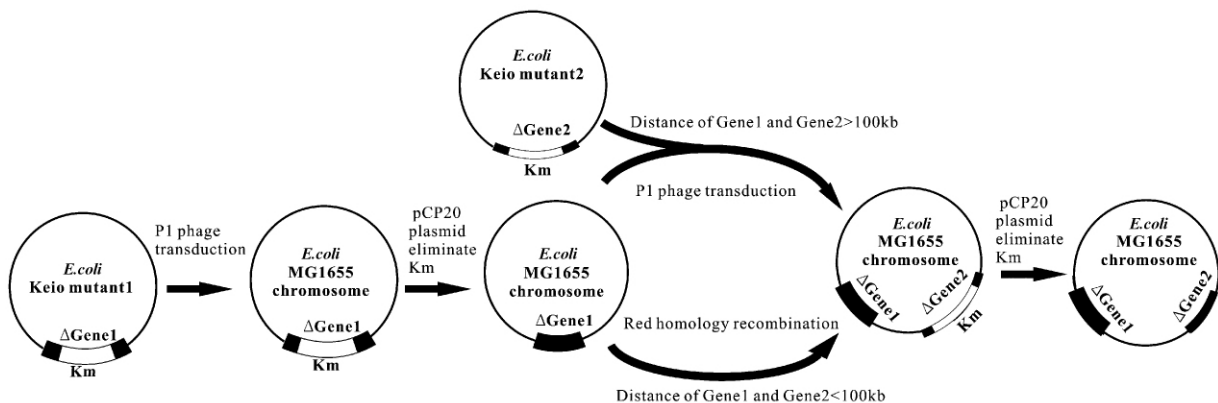


图 1. 利用 *E. coli* Keio 单基因突变体文库构建多重基因突变体示意图

Figure 1. Construction of the single and multi gene knock-out mutants using *E. coli* Keio single gene-mutant library.

2.1.2 PCR 验证:对 Km 抗性初步筛选的单克隆进一步 PCR 验证,结果如图 2 和 3 所示。图 2 中泳道 1-3 和 7 均以 *FadD*-F、*FadD*-R 为引物,扩增 *fadD* 基因;4-6 和 8 均以 *FadE*-F、*FadE*-R 为引物,扩增 *fadE* 基因。图 3 中泳道 1-3 和 7 均以 *FabH*-

F、*FabH*-R 为引物,扩增 *fabH* 基因;泳道 4-6 和 8 均以 *FabF*-F 和 *FabF*-R 为引物,扩增 *fabF* 基因。PCR 扩增片段的理论长度详见表 2,电泳图片见图 2 和图 3,扩增条带大小均与预期的理论长度一致,说明 Km 抗性基因的插入和消除都正确地完成。

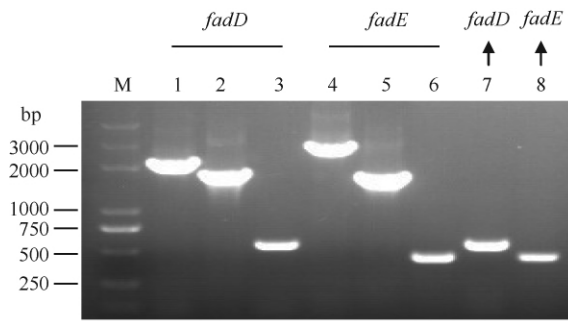


图 2. MG1655 的 $\Delta fadD$ 和 $\Delta fadE$ 缺失体的 PCR 鉴定

Figure 2. PCR analysis of MG1655 $\Delta fadD$ and $\Delta fadE$ mutants. M, DNA Marker; lane 1, MG1655; lane 2, $\Delta fadD$ (Km^R); lane 3, $\Delta fadD$ (Km^S); lane 4, MG1655; lane 5, $\Delta fadE$ (Km^R); lane 6, $\Delta fadE$ (Km^S); lane 7 and 8, $\Delta fadD-\Delta fadE$ (Km^S).

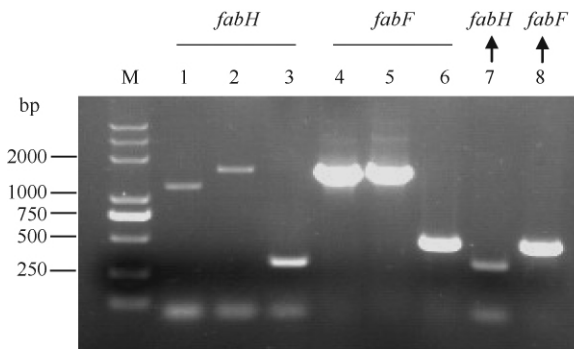


图 3. MG1655 的 $\Delta fabH$ 和 $\Delta fabF$ 缺失体的 PCR 鉴定

Figure 3. PCR analysis of MG1655 $\Delta fabH$ and $\Delta fabF$ mutants. M, DNA Marker; lane 1, MG1655; lane 2, $\Delta fabH$ (Km^R); lane 3, $\Delta fabH$ (Km^S); lane 4, MG1655; lane 5, $\Delta fabF$ (Km^R); lane 6, $\Delta fabF$ (Km^S); lane 7 and 8, $\Delta fabH-\Delta fabF$ (Km^S).

表 2. PCR 扩增片段的理论长度

Table 2. The theoretical length of PCR amplified DNA fragment

Targeting genes	Wild type / bp	Mutant Km^R /bp	Mutant Km^S /bp
<i>fadD</i>	2119	1780	558
<i>fadE</i>	2749	1633	411
<i>fadH</i>	1142	1535	313
<i>fadF</i>	1627	1732	510

2.2 缺失体和野生型菌株生长情况

大肠杆菌 MG1655 的 *FadD*、*FadE* 缺失体在液体培养基中生长情况与野生型 MG1655 相比没有明显变化(图 4), 这表明阻断脂肪酸氧化降解途径对在丰富培养基中的大肠杆菌生长没有影响。而

FabH 单敲菌株及 *FabH* 和 *FabF* 双敲缺失体生长速度均明显慢于野生型菌株的生长速度(图 4), 说明 *FabH* 对脂肪酸的合成非常重要。*FabH* 的缺失使脂肪酸起始合成受到显著抑制, 进而降低细胞的生长速度。敲除 *fabF* 对生长几乎没有减慢作用(图 4), 这表明主要由 *FabF* 合成的 18 个碳的脂肪酸对大肠杆菌生长不是不可缺少的。

2.3 气相色谱检测脂肪酸含量

采用气相色谱法检测野生型和缺失型菌株中脂肪酸含量, 结果图 5 所示。与野生型大肠杆菌 MG1655 (17.5 mg/L) 相比, *FadD* 突变体 (18.2 mg/L)、*FadE* 突变体 (20.0 mg/L) 及双敲突变体 *FadD*-*FadE* (19.2 mg/L) 的脂肪酸含量有一定增加。这表明抑制脂肪酸的降解, 对脂肪酸的积累是有帮助的, 这与其他的研究报道一致^[12]。*FabH* 突变体 (12.6 mg/L) 和 *FabF* 突变体 (15.2 mg/L) 中, 脂肪酸含量有所降低。但这种减少并不是特别巨大的, 暗示这些合成酶的功能可能被其它的酶部分替代。

3 讨论

Red 同源重组是基因敲除的重要方法, 在大肠杆菌中有广泛应用。2006 年 Baba 等人用该方法构建的大肠杆菌 BW25113 的突变体 Keio 文库, 包含了 3985 株单基因突变株^[9]。如何利用这个突变体文库提高大肠杆菌的基因敲除效率是我们想解决的问题。之前有研究报道利用噬菌体转导构建突变体, 但只是进行了单基因的敲除^[10]。我们尝试将 P1 噬菌体转导的方法和 Red 同源重组结合, 将突变基因转移到不同菌株中, 构建单基因和多重突变体。由于 *E. coli* MG1655 代谢途径改造的研究中有着很广泛的应用, 因此在本实验中我们以此为研究对象, 对其进行基因敲除, 获得了 4 株单敲菌株和 2 株双敲菌株。为了比较 P1 噬菌体转导和 Red 重组方法敲除基因的效率, 我们分别用这两种方法来敲除 MG1655 中 *fabF*。从阳性克隆的比例来看, 分别随机挑选 100 个转化子, 两种方法获得阳性克隆的比例均可达到 95% 以上; 从获得突变体所需的时间来看, Red 重组方法需要 3-4 天, 而 P1 噬菌体转导只需要 1-2 天; 从实验步骤来看, 同样获得突变菌株, Red 同源重组需要打靶片段的制备、Red 同源重组

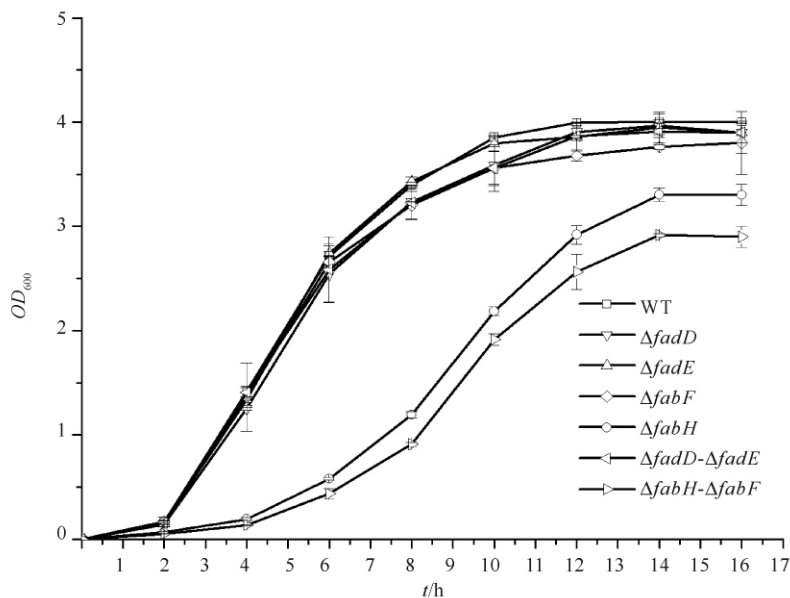


图 4. 野生型和缺失体菌株生长曲线

Figure 4. The growth curve of MG1655 and mutants.

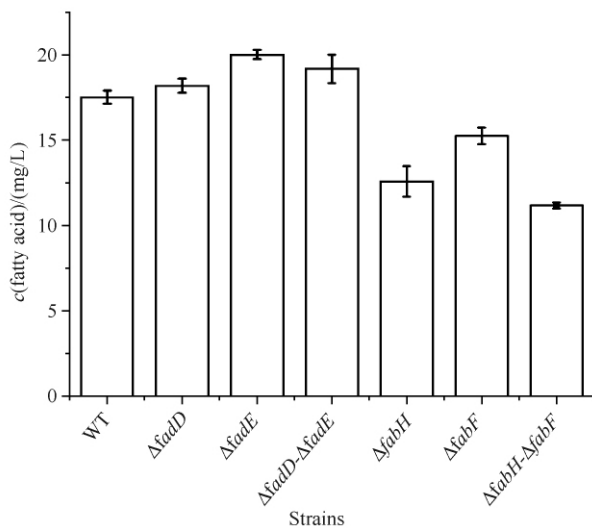


图 5. 气相色谱测大肠杆菌的脂肪酸含量

Figure 5. The detection of fatty acid content by gas chromatography.

系统的建立和将打靶片段转入系统中等步骤,而我们所改进的方法中,只需要一步 P1 噬菌体侵染就可以完成,将原本的 3 步简化为 1 步,提高了获得突变体菌株的效率。因此,利用 P1 噬菌体转导可以更加快速、高效的获得突变菌株。另外我们也对 *E. coli* W3110 进行相同的基因敲除,也获得了相应的 6 株突变体,再次证明该方法的简便性、高效性和正确性。在进行多基因敲除时,如果两个目标基因在染色体上的距离 < 100kb,就必须采用 Red 重组的方

法。之前有研究报道利用噬菌体多次转导构建多重突变体^[1],并没有考虑到这个问题。因为 P1 噬菌体包装的 DNA 分子平均为 100 kb,因此再次转导时可能会置换已经敲除的基因。我们尝试利用 P1 噬菌体多次转导的方法敲除 $\Delta fabH$ 中的 *fabF* 但并未成功,就是基于这个原因。对于本方法的这个局限,如果可以改造 P1 噬菌体,减小包装 DNA 分子的大小,将更有利于快速多基因的敲除。

我们利用上述方法,选取脂肪酸合成途径和降解途径中的关键基因进行基因敲除,阐述这些基因与脂肪酸产量的关系。通过研究发现,阻断降解途径的关键基因 *fadD*、*fadE* 会使脂肪酸积累增加,但增加幅度不是很明显,说明要提高脂肪酸产量还需要配合其他的方法。阻断了合成途径的关键基因 *fabH*、*fabF* 后,细菌体内的脂肪酸含量减少,但突变体依然能够生长,说明大肠杆菌对脂肪酸的需求有一定的弹性,并且其他的合成酶可能会有一定的弥补作用。*fabH* 和 *fabF* 的双敲突变体的构建成功暗示大肠杆菌中的第 3 个脂肪酸的缩合酶 FabB 在脂肪酸的合成中可能还有更多的作用。

参考文献

- [1] Murphy KC. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (8) : 2063-2071.

- [2] Madyagol M, Al-Alami H, Levarski Z, Drahovská H, Turňa J, Stuchlík S. Gene replacement techniques for *Escherichia coli* genome modification. *Folia Microbiologica*, 2011, 56: 253-263.
- [3] Smith GR. Mechanism and control of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 1987, 21: 179-201.
- [4] 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*, 2000, 97 (12): 6640-6645.
- [5] Han C, Zhang W, You S, Huang L. Knockout of the *ptsG* gene in *Escherichia coli* and cultural characterization of the mutants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20 (1): 16-20. (in Chinese)
韩聪,张惟材,游松,黄留玉. 大肠杆菌 *ptsG* 基因敲除及其缺陷株生长特性研究. 生物工程学报, 2004, 20 (1): 16-20.
- [6] Wang L, Wang Y. Quick knockout of *aroK* and *aroL* genes from the chromosome of *E. coli* BW25113 by using Red system. *Bulletin of the Academy of Military Medical Science*, 2007, 31 (4): 308-311. (in Chinese)
汪莉,王玉民. 用 Red 重组系统快速敲除大肠杆菌 *aroL* 和 *aroK* 基因. 军事医学院院刊, 2007, 31 (4): 308-311.
- [7] Wang H, Feng E, Shi Z, Yao X, Su G, Huang F. Quick knockout of *Shigella flexneri* *asd* gene with Red system. *Bulletin of the Academy of Military Medical Science*, 2002, 26 (3): 172-175. (in Chinese)
王恒樑,冯尔玲,史兆兴,姚潇,苏国富,黄留玉. 用 Red 系统快速敲除痢疾杆菌 *asd* 基因. 军事医学院院刊, 2002, 26 (3): 172-175.
- [8] Huang J, Shi J, Liu Q, Xu Q, Xie X, Wen T, Chen N. Effects of gene *pta* disruption on L-tryptophan fermentation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (4): 480-487. (in Chinese)
黄静,史建明,刘倩,徐庆阳,谢希贤,温廷益,陈宁. *pta* 基因敲除对 L-色氨酸发酵的影响. 微生物学报, 2011, 51 (4): 480-487.
- [9] Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2006, 8: 1-11.
- [10] Donath MJ, Dominguez MA, Withers ST. Development of an automated platform for high-throughput P1-phage transduction of *Escherichia coli*. *Journal of Laboratory Automation*, 2011, 16 (2): 141-147.
- [11] Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood TK. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 77 (4): 879-890.
- [12] Rock CO, Jackowski S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292: 1155 - 1166.
- [13] Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, Cronan J. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1993, 57 (3): 522-542.
- [14] Lu XF, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production. *Metabolic Engineering*, 2008, 10: 333-339.
- [15] Sternberg N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87: 103-107.

Construction of *Escherichia coli* gene knock-out mutants for engineering of fatty acid metabolism

Jingqiu Qu, Cuihua Liu, Weifeng Liu, Yong Tao, Kun Zhu*

Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: [Objective] Gene knock out technique is very important for gene function study. We developed a simple and efficient method to knock out chromosomal genes in *Escherichia coli*. [Methods] Using the *Escherichia coli* Keio single-mutant library, we combined Red homology recombination with P1 phage transduction and developed a method to knock out the genes in *Escherichia coli* MG1655. [Results] We obtained β -oxidation mutants $\Delta fadD$, $\Delta fadE$ and $\Delta fadD$ - $\Delta fadE$ and fatty acid synthesis mutants $\Delta fabH$, $\Delta fabF$ and $\Delta fabH$ - $\Delta fabF$. There were no obvious growth changes between $\Delta fadD$ or $\Delta fadE$ mutant strains and MG1655. However, $\Delta fabH$ and $\Delta fabH$ - $\Delta fabF$ mutant strains grew much slower than the wild type strain. The fatty acid contents in $\Delta fadD$, $\Delta fadE$ and $\Delta fadD$ - $\Delta fadE$ were 18.2 mg/L, 20.0 mg/L and 19.2 mg/L respectively, higher than 17.5 mg/L in wild type. The fatty acid contents in $\Delta fabH$, $\Delta fabF$ and $\Delta fabH$ - $\Delta fabF$ were 12.6 mg/L, 15.2 mg/L and 11.2mg/L respectively, lower than that in wild type. [Conclusion] Using Keio mutant library, P1 phage transduction and resistant gene elimination, we have established a simple and efficient method for gene knock-out in *Escherichia coli*.

Keywords: *Escherichia coli*, Red homology recombination, P1 phage, gene knock-out, fatty acid content

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170040) and by the State Key Laboratory of Microbial Resources (20110603)

* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-10-57470235; E-mail: zhuk@im.ac.cn

Received: 9 November 2012/Revised: 28 January 2013

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请参考下列具体要求写作 [参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应标明“树”上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为“Time New Roman”,字号为“8p”。可以选用两种方式——(A)文件格式为“*.Tif”,分辨率为 600 线;(B)文件格式为“word”,画出树,输入文字。