文章编号:1000-5404(2009)23-2299-03

论著

革兰阴性菌基因敲除载体的构建及其应用

王 景[1*],穆媛媛[2*],黎 庶[1],陈志瑾[1],熊 坤[1],丛延广[1] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2]遵义医学院研究生院,贵州 遵义 563003)

摘 要:目的 构建1个适用于革兰阴性菌的精确基因敲除载体并证明其有效性。**方法** 构建的载体主要包括以下成分:π蛋白依赖性复制起点 ori R6K;接合转移基因 *mob*,使载体可以通过简单的接合方式实现转移;多克隆位点序列:*Eco*RⅠ-*Xba*Ⅰ-*Apa*Ⅰ-*Sfi*Ⅰ-*Sac*Ⅰ-*Not*Ⅰ-*Spe*Ⅰ-*Nde*Ⅰ-*Sac*Ⅱ-*Bgl*Ⅱ;反向选择标志 *Sac*B;正向选择标志卡那霉素抗性片段。载体构建完成后,采用该载体对弗氏枸橼酸杆菌的 *yeeZ* 基因进行框架内敲除,以验证其有效性。**结果** 成功构建了敲除载体,命名为 pYG4,并对 *yeeZ* 基因进行了框架内精确敲除获得突变株。**结论** 本研究构建的载体适用于对革兰阴性菌进行目的基因的精确敲除,将在细菌基因功能研究中得到广泛的应用。

关键词: 敲除;载体构建;突变株;基因功能
中图法分类号: R378; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Construction and application of a vector for gene deletion in gram-negative bacteria

WANG Jing[1a], MU Yuan-yuan[2a], LI Shu[1], CHEN Zhi-jin[1], XIONG Kun[1], CONG Yan-guang[1] ([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]The graduate school of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China) [a]Co-author

Abstract: Objective To construct a vector plasmid which facilitates generating precise deletion in the genes of gram-negative bacteria. Methods The vector was designed to encode following fragments; the replication origin of the π protein-dependent origin of plasmid R6K (not replicate in bacteria other than π protein-producing bacteria and function as "suicide vector"), the mob region from the broad-host-range plasmid RP4 (mobilizable by conjugation into a wide range of Gram-negative bacteria), a multiple cloning sites (*Eco*RⅠ-*Xba*Ⅰ-*Apa*Ⅰ-*Sfi*Ⅰ-*Sac*Ⅰ-*Not*Ⅰ-*Spe*Ⅰ-*Nde*Ⅰ-*Sac*Ⅱ-*Bgl*Ⅱ), a kanamycin resistance marker for orthoselection, and a sacB gene for inverse selection. After the construction, the vector was used to carry out a gene deletion experiment by deleting yeeZ gene from Citrobacter freundii. Results The designed vector plasmid was constructed successfully and named as pYG4. It did work in the gene deletion experiment. Conclusion Our constructed vector plasmid is useful and convenient for generating gene deletion in gram-negative bacteria.

Key words: gene deletion; vector construction; mutant strain; gene function

众多细菌的全基因组测序为深入认识这些细菌的生命活动规律奠定了基础,但到目前为止,对已测序基因的功能认识还很不足[1,2]。因此,如何认识这些未知基因的功能已成为当前微生物学研究的重要任务。而研究细菌基因功能的一个重要方式,就是设法获得该基因的突变株,然后根据突变株表型变化来确定基因产物的功能。

目前最常用的细菌基因突变方式为同源重组,采用这种方式对于酵母以及少数天然感受态细菌的基因突变相对简单,因为它们可以进行线性DNA的转化,然而大多数细菌由于胞内核酸外切酶(降解线性DNA)的存在,是不易进行线性DNA转化的,除非提前对细菌进行核酸酶的突变操作。对于这一类细菌的基因突变目前一般采取这样的策略:先在合适的质粒上构建突变的基因,然后再重组到染色体上[3]。同源重组突变的类型也有多种,包括有插入突变、点突变、敲除、基因取代等。但这些类型仍然存在一些待解决的问题,因为细菌基因往往以基因簇或者操纵子的方式聚集在一起,并且常常有基因重叠的情况,因此任何操作导致目的基因被插入、编码框移位、无意或者反意突变,都可能会影响操纵子内其他基因的表达,这类极效应(polar effect)会干扰对目的基因功能的准确分析。另外一方面,虽然点突变不造成极效应,但由于基因几

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30500435)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30500435)
作者简介:王 景,女,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事细菌致病机制方面的研究。电话:(023)68771935
*:同等贡献者
通信作者:丛延广,电话:(023)68752241,E-mail:ygcong@tmmu.edu.cn
收稿日期:2009-05-25;修回日期:2009-09-01

乎完整存在(可能保有一定甚至完整的功能),也可能会干扰对基因的分析。为了避免这些问题,有学者建立了在交叠 PCR(crossover PCR)基础上的基因框架内精确敲除方法[4]。本研究根据其原理,利用正向和反向载体选择片段以及其他成分,构建了 1 个适用于革兰阴性菌的敲除载体,旨在对革兰阴性菌进行目的基因的精确敲除,为细菌基因功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠埃希菌 DH5α、大肠埃希菌 S17-1/λpir、弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 为本教研室保存菌株。质粒 pUT-mini-Tn5[5],pACYC177、pYLTAC7 为本教研室保存。胶回收试剂盒购自 Watson,各种内切酶和连接酶均购自宝生物。

1.2 载体构建

用 *Bgl* Ⅱ、*Eco*R Ⅰ双酶切 pUT-mini-Tn5 Km 质粒,琼脂糖凝胶电泳并胶回收 3.59 kb 片段。该片段包括了来源于 R6K 质粒的 π 蛋白依赖性复制起点 ori R6K 和来源于 RP4 质粒的接合转移起点 *mob* 以及氨苄抗性片段。设计合成含有多克隆位点的寡核酸链,多克隆位点的顺序为 *Eco*R Ⅰ-*Xba* Ⅰ-*Apa* Ⅰ-*Sfi* Ⅰ-*Sac* Ⅰ-*Not* Ⅰ-*Spe* Ⅰ-*Nde* Ⅰ-*Sac* Ⅱ-*Bgl* Ⅱ,通过 *Bgl* Ⅱ、*Eco*R Ⅰ双酶切后,与上述胶回收片段连接,转化到大肠埃希菌 S17-1,采用氨苄抗性筛选,获得的质粒命名为 pYG1。在 pYG1 中加入卡那霉素抗性片段(KmR),抗性片段来自于 pACYC177,采用 PCR 方式克隆加入到 pYG1 载体中,引物序列见表 1,获得的载体命名为 pYG2。采用 *Eco*R Ⅰ酶切 pYLTAC7,取 *sac B* 片段与同样酶切的 pYG2 连接,获得 pYG3。最后用 *Apa*l Ⅰ 酶切去除氨苄抗性片段,获得最终的敲除载体 pYG4。

1.3 载体有效性验证

为验证构建载体的有效性,采用该载体对弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 的 *yeeZ* 基因进行框架内精确敲除。首先设计 2 对 PCR 引物(P11、P8 和 P9 、P12,引物序列见表 1),分别扩增 *yeeZ* 基因上游和下游各 1 000 bp 片段,由于 2 对引物中的内侧引物(P8、P9)有 21 个碱基的重叠,故可以采用 2 个外侧引物(P11、P12 两端设计了 *Bgl* Ⅱ酶切位点)对前述 PCR 产物进行交叠 PCR,获得去除了 *yeeZ* 基因的序列。将 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上,再经 *Bgl* Ⅱ酶切后,连接到同样酶切并去磷酸化的敲除载体 pYG4,将连接产物转化大肠埃希菌 S17-1/λpir,卡那霉素平板上筛选阳性克隆,对获得的阳性克隆进行酶切和 PCR 鉴定。将载体通过接合方式转移到受体菌——弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 中,即将 2 种菌混合培养于 LB 平板中 1 张无菌滤膜上,经过 10 h 以上培养后,将菌苔洗下,然后采用双抗培养基(分别含有卡那霉素 75 μg/ml,利福平 100 μg/ml)进行筛选。大肠埃希菌 S17-1/pYG4-△yeeZ 对卡那霉素耐受但对利福平敏感,而弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 对卡那霉素敏感但对利福平耐受,因此只有当载体整合到弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 的染色体上后,才能在双抗平板上生长。获得的整合体细菌在无选择培养基中扩大培养,然后将培养液经适当稀释后涂布于含有 5% 蔗糖的 LB 平板,利用 *sac*B 基因表达产物的反向选择作用进行第 2 次筛选,对获得的重组菌株进行 PCR 鉴定,筛选敲除株。整个敲除过程如图 1 所示。

表 1 合成的 PCR 引物和寡核酸链序列

编号	序列	用途
Km1	5′- TTAGCGGCCGCGTTGTGTCTCAAAATCTCTG-3′	卡那霉素抗性片段扩增
Km2	5′- CCGGAGCTCGCGCTGAGGTCTGCCTCGTG-3′	
MCS1	5′-AGATCTCCGCGGCATATGACTAGTGCGGCCGCGAGC TCGGCCGCCTAGGCCGGCCCTCTAGAGAATTC -3′	多克隆位点
MCS2	5′-GAATTCTCTAGAGGGCCCGGCCTAGGCGGCCGAGCTC GCGGCCGCACTAGTCATATGCCGCGGAGATCT -3′	
P11	5′-GGGAGATCTCGTCCCAGGCTTCATCGA-3′	突变株构建和鉴定
P8	5′-GTTATAAATTTGGAGTGTGAAGGTTATT-GCGTGAATTGCGACCTTTTTCATGC-3′	
P9	5′-CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTA-TAACCAGTATCCTGATCCGCTGGT-3′	
P12	5′-GGGAGATCTAATAACCGACGCGTATTAAA-3′	
P7	5′-GGGAGATCTAGCACACATCGCCTGAAAGA-3′	突变株鉴定
P10	5′-GGGAGATCTTTCGTTCTCCCAGCCTTCGT-3′	

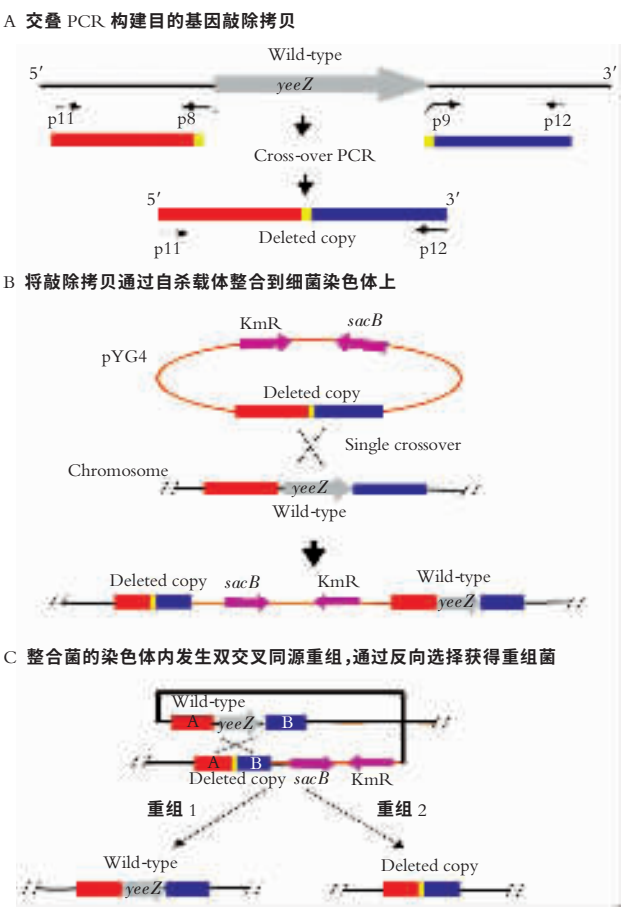


图 1 基因敲除策略

2 结果

2.1 自杀载体 pYG4 的构建

载体图谱见图 2。载体包含以下成分:ori R6K,来源于 R6K 质粒的 π 蛋白依赖性复制起点,使构建的质粒只能在表达 π 蛋白的菌株中复制(如大肠埃希菌 S17-1/λpir),对于其他细菌表现自杀性。*mob* 基因,来源于 RP4 质粒的接合转移基因,

使构建的载体可通过接合方式转移至很多受体菌中[6],大大简化载体转入过程,并有很高的转化率。多克隆位点序列:*Eco*R Ⅰ-*Xba* Ⅰ-*Apa* Ⅰ-*Sfi* Ⅰ-*Sac* Ⅰ-*Not* Ⅰ-*Spe* Ⅰ-*Nde* Ⅰ-*Sac* Ⅱ-*Bgl* Ⅱ,可以满足克隆需要;卡那霉素抗性片段,用于正向选择;*sacB* 基因用于反向选择。

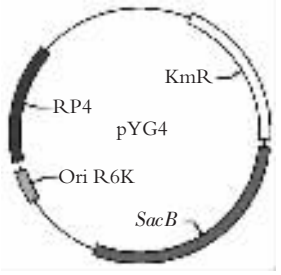
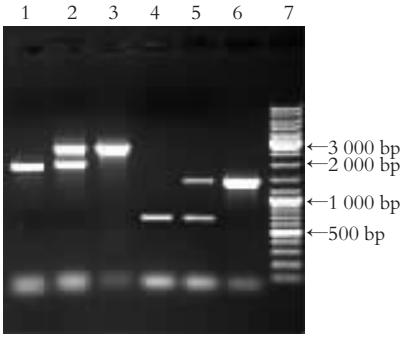


图 2　pYG4 载体构建示意图

2.2　载体有效性验证

为验证构建载体的有效性,采用该载体对弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 的 *yeeZ* 基因进行框架内精确敲除,基本过程如图 1 所示。最后采用 PCR 方式进行筛选鉴定,即分别采用 P11、P12 以及 P7、P10 两对引物对野生株、整合株以及野生株进行 PCR 鉴定。如图 3 所示,用 P11、P12 扩增野生株得到了 2 800 bp 左右的条带,扩增敲除株时得到 2 000 bp 左右的条带,二者的大小差异是 *yeeZ* 基因的片段大小。而扩增整合株时则存在野生株和敲除株 2 个拷贝的条带,与预期结果相符合。同理,P7、P10 分别为 *yeeZ* 上游和下游 300 bp 左右的位置设计的引物,结果也进一步得到了验证,说明 *yeeZ* 基因实现了敲除。



1,4:敲除株;2,5:整合株;3,6:野生株;7:DNA 标准
1~3:以 P7、P10 为引物;4~6:以 P11、P12 为引物

图 3　构建的弗氏枸橼酸杆菌敲除株△yeeZ 的 PCR 鉴定

3　讨论

利用同源重组方式进行细菌基因敲除的一个主要策略就是构建一个自杀载体,所谓载体的自杀性,就是指载体在受体菌中不能复制,或者在某些条件下不能复制(例如具有温敏特点的载体等)。由于不能复制,载体中的成分就只能以整合到染色体上的方式存在。通过控制整合方式以及其他的操作例如切离等,就可以实现对目的基因的突变。突变的形式也有很多,例如完整敲除、插入突变、插入取代、点突变等,这些形式在细菌突变研究中的应用已经有很多了。但这些方式存在不同程度的缺陷,如前言所述,细菌基因往往以基因簇或者操纵子的方式聚集在一起,并且常常有基因重叠的情况,因此任何操作导致目的基因被插入、编码框移位、无意或者反意突变,都可能会影响操纵子内其他基因的表达,这类极效应(polar effect)会干扰对目的基因功能的准确分析[4]。另外一方面,虽然点突变不造成极效应,但由于基因几乎完整存在(可能保有一定甚至完整的功能),也可能会干扰对基因的分析。因此有必要建立一种突变方法,既可以敲除掉大部分的目的基因片段,以去除其功能,又能够保留该基因 5′端和 3′端部分的碱基,以避免由于基因重叠的情况,破坏了敲除基因的上下游基因的表达,即必须进行目的基因的框架内精确敲除。

本研究中构建的自杀载体 pYG4,适用于对革兰阴性菌进行目的基因的精确敲除。在构建载体时,采用交叠 PCR 方式将 *yeeZ* 基因的上下游序列拼接在一起。考虑到细菌染色体中广泛存在的基因重叠现象,为最大程度减少可能对邻近基因表达上的影响,对 *yeeZ* 基因的敲除是从转录起始位点下游 18 bp 处开始,到终止子上游 36 bp 处终止,即保留了原基因共 54 bp 的片段(保留碱基为 3 的倍数,以避免移码突变)。研究表明,细菌基因虽然存在广泛的重叠现象,但重叠片段的大小都不超过上述的碱基数。因此,保留 54 bp 的片段能够既不影响上下游基因的表达,也不会造成移码突变,又能去除目的基因的功能。

虽然本研究构建的载体主要目的是进行敲除突变,但根据需要也可以进行插入突变、抗性片段的取代突变等。在使用上比较方便,也具有较广泛的"失活谱"(在大多数细菌中都不能复制),因此理论上对于其他类细菌的基因突变也可应用,只不过不能采用接合方式转移,但可以采用电转化的方式。因此,该载体可在细菌基因功能研究中得到很好的应用。

参考文献:

[1] Riley M. Genes and proteins of Escherichia coli K-12 (GenProtEC) [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(1):51-52.

[2] Giaever G, Chu A M, Ni L, *et al*. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome[J]. Nature, 2002,418(6896):387-391.

[3] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12):6640-6645.

[4] Link A J, Phillips D, Church G M. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization[J]. J Bacteriol, 1997, 179(20): 6228-6237.

[5] 丛延广,徐启旺. 利用 Mini-Tn5 转座子诱导弗氏枸橼酸杆菌插入突变的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004,26(13):1145-1147.

[6] de-Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, *et al*. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria[J]. J Bacteriol, 1990, 172(11): 6568-6572.

(编辑　王小寒)