论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2240-03

革兰阴性菌基因快速失活载体的构建及其应用

龚明福,滕 亮,张金龙,黎 庶,胡晓梅,陈志瑾,熊 坤,丛延广 (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)

摘 要:目的 构建适用于革兰阴性菌的快速基因失活载体系统并进行初步应用。**方法** 应用分子克隆技术构建快速基因失活载体系统。载体成分主要包括:π蛋白依赖性复制起点 ori R6K;编码接合转移的 mob 片段;多克隆位点序列;含有2个 *Xcm* Ⅰ酶切位点的T载体形成片段以及多种耐药片段,包括 Chl(氯霉素抗性)、Tet(四环素抗性)、Km(卡那霉素抗性),获得的载体分别命名为 EK3-Chl、EK3-Tet、EK3-Km。采用构建的 EK3-Tet 载体对弗氏枸橼酸杆菌的 yeeZ 基因进行插入突变,以验证其有效性。通过 *Xcm* Ⅰ酶切 EK3-Tet 质粒形成T载体状态,将 PCR 扩增得到的两端截短的 yeeZ 基因与该T载体直接连接,获得的质粒采用接合方式转移到弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 中以实现整合,双抗培养基筛选整合突变株,对获得的突变株进行鉴定和形态观察。**结果** 成功构建了 EK3-Chl、EK3-Tet 和 EK3-Km,并对 yeeZ 基因进行插入突变获得突变株,步骤简便,工作周期短。**结论** 上述构建的载体系统能够对革兰阴性菌进行目的基因的快速插入失活,该载体可在细菌基因功能研究中得到一定的应用。

关键词: 载体;基因失活;单交叉同源重组

中图法分类号: R378;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Construction and application of a vector system for rapid gene disruption in gram-negative bacteria

GONG Ming-fu, TENG Liang, ZHANG Jin-long, LI Shu, HU Xiao-mei, CHEN Zhi-jin, XIONG Kun, CONG Yan-guang (Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a set of vector plasmids which facilitates rapid gene disruption in gram-negative bacteria and to perform a primary application. **Methods** A rapid gene inactivation vector system was constructed by using molecular cloning technology. The vectors were based on the protein-dependent origin of plasmid R6K. And they carried the mob region which encoded conjugative transfer, multiple cloning sites, an *Xcm* Ⅰ-containing vector for direct cloning of PCR products and 3 convenient antibiotic-resistance markers (chloromycetin, tetracycline and kanamycin resistance). The vectors were named as EK3-Chl, EK-Tet and EK-Km according to the antibiotic-resistance markers they contained. In order to verify its effectiveness, the vector EK3-Tet was used to carry out gene disruption experiments in the yeeZ gene of *Citrobacter freundii*. The plasmid was digested by *Xcm* Ⅰ to form the state of T-vector. The yeeZ gene truncated at both ends was amplified by PCR and was then ligated to the T-vector. The plasmid obtained was integrated into the yeeZ gene of *Citrobacter freundii* with conjugation method. The integration mutants were screened using double-antibiotic medium and were then identified by PCR and morphological observation. **Results** Three plasmids EK3-Chl, EK-Tet and EK-Km were successfully constructed. They did work in the yeeZ gene disruption experiments in a convenient way. **Conclusion** The vector plasmids constructed in the present study are useful and convenient in gene disruption experiments of gram-negative bacteria and may have a certain application in the study of bacterial gene function.

Key words: vector plasmid; gene disruption; single-crossover homologous recombination

众多种类细菌全基因组测序的完成为深入认识这些细菌的生命活动规律奠定了基础,但即使在研究得最深入的细菌中(例如大肠埃希菌),仍然有30%~50%基因的功能是未知的[1]。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。

研究细菌基因功能的一个重要方式,就是设法获

基金项目: 国家自然科学基金(30500435)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500435)
作者简介: 龚明福,男,湖南省益阳市人,第三军医大学学员旅七队五年制本科学员。E-mail:hummer198625@yahoo.com
通信作者: 丛延广,电话:(023)68752241,E-mail:ygcong@tmmu.edu.cn
收稿日期: 2009-03-19;**修回日期:** 2009-06-01

得该基因的突变株,然后根据突变株表型变化来确定该基因的功能。获得细菌突变株的方式很多,较常见的是采用同源重组方式进行插入或者敲除,经典的做法是采用双臂同源的同源重组敲除方式。针对 1 个基因进行敲除研究,这种方式无疑是最佳选择。然而如果是进行较大量的甚至系统性的突变,这种方式则很难有效工作,因为双交叉同源重组的操作比较繁琐。如采用自杀性载体,一般要经过整合和切离 2 个步骤;采用线性化 DNA 进行突变,虽然操作简单,但对于多数菌种不适用(因为线性化 DNA 进入菌细胞后容易降解)[2]。为避免这一缺陷,Miller 和 Mekalanos[3] 曾经提出:在自杀性载体中加入两端都截短的目的基因片段,然后将载体整合到细菌的目的基因中,从而获得 2 个都截短的目的基因拷贝,实现突变。依据以上机制,本研究尝试构建一个适用于革兰阴性菌的基因快速插入失活载体。

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、质粒 pUT-mini-Tn5-Km[4]、PBR322、pSET1、pACYC177、PSK-2[5] 为本教研室保存。Watson 胶回收试剂盒,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。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 EK1。用 PCR 方式得到多种抗性片段并加入到 EK1 载体中,其中四环素抗性片段来自于 PBR322,氯霉素抗性片段来自于 pSET1,卡那抗性片段来自于 pACYC177,获得的载体命名为 EK2-Tet、EK2-Chl、EK2-Km。采用 *Apa* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切 PSK-2,获得 T 载体形成片段,将获得的 T 载体形成片段与同样酶切的 EK2-Chl、EK2-Tet、EK2-Km 连接,获得最终的 EK3 质粒。T 载体形成片段中含有 2 个 *Xcm* Ⅰ酶切位点,通过 *Xcm* Ⅰ酶切可以使质粒线性化,并且形成 T 载体。

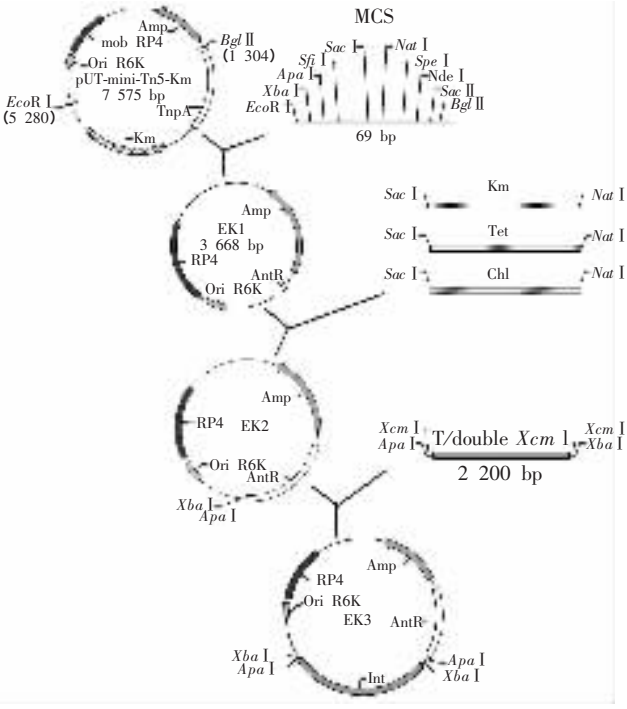
1.3　载体有效性验证

用构建的载体,对弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 的 yeeZ 基因进行突变尝试。之所以选择 yeeZ 基因,是因为前期研究发现,该基因被插入突变后,菌体会变长,这一性状改变容易观察,便于我们对构建载体的评价。首先设计 PCR 引物扩增截短的 yeeZ 基因(中间部分),控制长度在 300 bp 左右;*Xcm* Ⅰ酶切已构建的 EK3-Tet 质粒,胶回收后与上述 PCR 产物直接连接过夜;将连接产物转化到大肠埃希菌 S17-1 中,四环素平板上筛选阳性克隆,对获得的阳性克隆进行酶切鉴定;将鉴定的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(大肠埃希菌 S17-1/EK3-Tet-△yeeZ 和弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090)混合培养 10 h 后,洗下菌苔,采用双抗培养基(分别含有四环素 75 μg/ml,利福平 100 μg/ml)进行筛选。大肠埃希菌 S17-1/ EK3-Tet-△yeeZ 对四环素耐受但对利福平敏感,而弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 对四环素敏感但对利福平耐受,因此这 2 种细菌在双抗平板上都不能生长,同时作为自杀载体,EK3-Tet-△yeeZ 无法在弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 中复制,因此只有基因组上整合了载体的弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090,才能在双抗平板上生长,而整合后即实现目的基因的突变。对突变株进行 PCR 鉴定和表型变化的观察。

2　结果

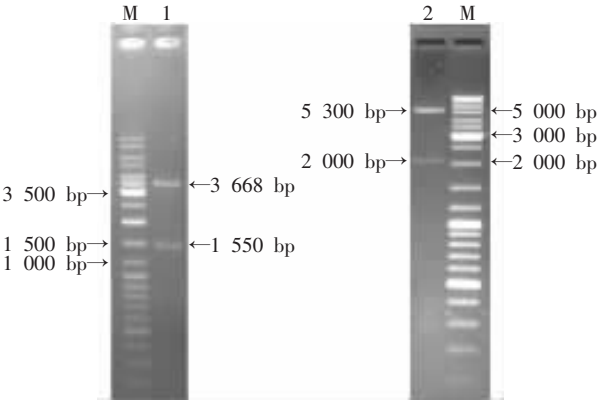
2.1　载体的构建

成功构建分别具有 3 种抗生素选择标志的载体系统。见载体构建以及结构示意图 1 及酶切鉴定图 2。



AntR 统一代表插入的抗性片段(Chl, Tet, Km)

图 1　EK3 载体构建过程示意图



M:标准; 1: EK2-Tet 经 *Bgl* Ⅱ、*Eco*R Ⅰ双酶切;2: EK3-Tet 经 *Xcm* Ⅰ酶切,2 000 bp 的片段即为 Int 片段,切除 Int 后的线性化质粒即形成 T 载体状态

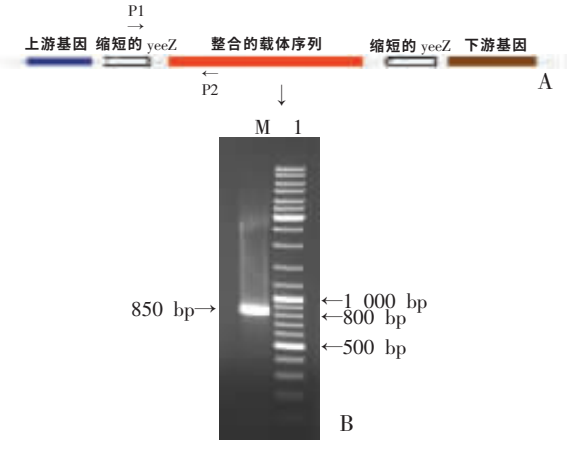
图 2　构建载体(EK3-Tet)的酶切鉴定电泳结果

2.2　载体的应用

为了证明载体的有效性,采用构建的载体 EK3-Tet 对弗氏

枸橼酸杆菌 yeeZ 基因进行突变。由于构建的载体经过 *Xcm* Ⅰ酶切后会形成 T 载体状态，故可以用 PCR 产物与载体进行直接连接，简化了步骤。构建好的载体经接合方式转入弗氏枸橼酸杆菌中，经双抗平板可筛选出整合菌株，对整合菌株的 PCR 鉴定如图 3 所示。用分别位于 yeeZ 基因中和整合质粒中的 P1 和 P2 作为引物进行 PCR 扩增，电泳可见扩增出 850 bp 片段，片段大小符合预期。说明携带截短 yeeZ 基因的载体成功整合到了弗氏枸橼酸杆菌的基因组中，并位于 yeeZ 基因的中间位置，造成 yeeZ 基因的插入突变。

将弗氏枸橼酸杆菌野生株和突变株分别培养后，取菌涂片经革兰染色后观察其形态，如图 4 所示，可以清楚看到获得的 yeeZ 基因突变株出现显著的形态变长，符合预期。由此说明载体以预期方式整合到弗氏枸橼酸杆菌的基因组中，并实现了 yeeZ 基因的失活。



A：扩增突变株序列的 PCR 引物的相对位置；B：PCR 产物的电泳图
M：标准；1：以 P1 和 P2 为引物对突变株做的 PCR 产物

图 3 yeeZ 基因突变株的 PCR 鉴定（A）和 PCR 产物电泳结果（B）

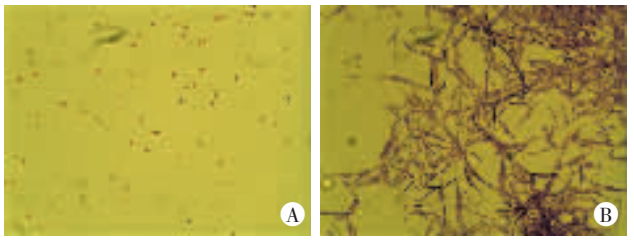


图 4 弗氏枸橼酸杆菌野生株（A）和 yeeZ 基因突变株（B）革兰染色结果 （×1 000）

3 讨论

目前已建立了很多细菌突变株的构建策略和方法，并已构建了大量适用载体。对于肠杆菌科细菌来说，针对某个基因建立突变株有很多载体选择，已不存在突出的技术问题。然而，对于较系统地研究细菌的基因功能，目前载体多不适用。针对这种情况，本研究构建了一套突变载体系统，其工作策略是采用单交叉同源重组方式：①将 5′和 3′端均截短的目的基因片段克隆到自杀载体中；②将该载体转入目的细菌中；③通过同源重组，截短的基因片段整合到染色体的目的基因中，基因组中最终包含 2 个目的基因拷贝，一个在 3′端有截短，另一个在 5′端有截短，2 个拷贝均失活，中间被载体序列分开；④通过抗性筛选获得上述重组突变株。

为了能够实现快速突变的目的，我们在载体中加入了一些特殊成分：来源于 RP4 质粒的编码接合转移的 mob 片段，使构建的载体可以接合方式转移至很多受体菌中，简化载体转入过程，并提高转化率。这种接合转移方式在肠杆菌科细菌以及很多革兰阴性菌中广泛存在，因此非常实用[6]；在载体的多克隆位点中加入含有双 *Xcm* Ⅰ酶切位点的序列，使质粒通过 *Xcm* Ⅰ酶切可以成为一个 T 载体，可以直接把 PCR 产物连接到载体上[5]；加入了多种抗性片段，构成一个载体系统。上述设计使得整个突变过程操作简单，周期较短，顺利的话可以在 7 d 内完成（不算引物合成时间），且不需要电转仪等特殊设备。我们采用该载体尝试对弗氏枸橼酸杆菌 yeeZ 基因进行突变，结果在较短时间内即获得突变株，证明了其有效性。

当然，单交叉同源重组方式构建突变株存在一定的局限性，由于是载体整合到目的基因中，有可能破坏下游非目的基因的序列和完整性，使其不能正常表达，因此存在极效应的可能，会影响对突变基因功能的准确分析；由于目的基因并未完整敲除，仍然有存在部分功能的可能性，这同样可能对研究的准确性造成干扰；由于基因组中整合了质粒的抗性成分，该种方式不利于对突变株进行进一步的突变研究。因此，单纯针对 1 个基因进行突变，单交叉同源重组并非最佳选择。然而，虽然有这些缺陷，该方式还是有其应用的价值，特别是在对较多基因进行功能分析时最为适用，同时当结合互补实验时，也可以应用于某一特定基因的分析。因此，本实验构建的包含 3 种抗性的基因快速失活载体，适用于对革兰阴性菌进行目的基因的快速插入失活，为细菌基因功能研究提供了一个有用的分子工具。

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] Ortiz-Martin I, Macho A P, Lambersten L, *et al*. Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria[J]. J Microbiol Methods, 2006, 67(3): 395-407.

[3] Miller V L, Mekalanos J J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR[J]. J Bacteriol, 1988, 170(6): 2575-2583.

[4] 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.

[5] 胡晓梅，胡福泉，饶贤才，等. 利用人工合成 *Xcm* Ⅰ接头盒构建 T-载体[J]. 第三军医大学学报，2001，23(5)：608-610.

[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）