

# 一种新的基于 Red 重组及 *I-Sec I* 体内切割的大肠杆菌基因组无痕删减方法

朱美勤<sup>1,2</sup>, 虞剑<sup>1,2</sup>, 周长林<sup>1</sup>, 方宏清<sup>2</sup>

1 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

2 中国人民解放军军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

朱美勤, 虞剑, 周长林, 等. 一种新的基于 Red 重组及 *I-Sec I* 体内切割的大肠杆菌基因组无痕删减方法. 生物工程学报, 2016, 32(1): 114–126.

Zhu MQ, Yu J, Zhou CL, et al. Markerless DNA deletion based on Red recombination and *in vivo I-Sec I* endonuclease cleavage in *Escherichia coli* chromosome. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 114–126.

**摘要:** 目前常用的基因修饰方法是在 Red 同源重组介导下, 电转线性 PCR 片段替换染色体上指定序列。因 PCR 过程错误掺入, 该方法常常会在同源序列部位产生一些突变。为了避免此类突变, 我们建立了一种新的无痕删除方法。首先将含有抗性标记 (两侧带有 *I-Sec I* 识别位点) 的线性 DNA 电转到 Red 重组感受态细胞内, 用抗性基因替换基因组上指定序列; 然后, 将携带融合同源臂 (两侧带有 *I-Sec I* 位点) 的供体质粒导入上述细胞, 诱导表达 *I-Sec I* 内切酶切割供体质粒释放同源片段, 同时切除染色体上抗性基因产生双链断裂, 通过分子间同源重组实现无痕删除。我们应用该方法连续删除了大肠杆菌 DH1 基因组上 11 个非必需区, 使基因组减小 10.59%。PCR 测序证明所有删减区域同源臂未发生突变, 基因组重测序证明指定区域被删除。删减菌的生长变化不大, 但耐酸能力有所改变, 并对番茄红素合成有不同影响。

**关键词:** 大肠杆菌 DH1, Red 同源重组, 无痕删除

**Received:** February 10, 2015; **Accepted:** March 24, 2015

**Corresponding author:** Hongqing Fang. Tel: +86-10-66948827; E-mail: fanghongqing@vip.sina.com

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00800), National Natural Science Foundation of China (No. 81373286).

国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2011CBA00800), 国家自然科学基金 (No. 81373286)资助。

网络出版时间: 2015-05-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150513.1532.003.html>

# Markerless DNA deletion based on Red recombination and *in vivo I-Sec I* endonuclease cleavage in *Escherichia coli* chromosome

Meiqin Zhu<sup>1,2</sup>, Jian Yu<sup>1,2</sup>, Changlin Zhou<sup>1</sup>, and Hongqing Fang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

**Abstract:** Red-based recombineering has been widely used in *Escherichia coli* genome modification through electroporating PCR fragments into electrocompetent cells to replace target sequences. Some mutations in the PCR fragments may be brought into the homologous regions near the target. To solve this problem in markerless gene deletion we developed a novel method characterized with two-step recombination and a donor plasmid. First, generated by PCR a linear DNA cassette which comprises a *I-Sec I* site-containing marker gene and homologous arms was electroporated into cells for marker-substitution deletion of the target sequence. Second, after a donor plasmid carrying the *I-Sec I* site-containing fusion homologous arm was chemically transformed into the marker-containing cells, the fusion arms and the marker was simultaneously cleaved by *I-Sec I* endonuclease and the marker-free deletion was stimulated by double-strand break-mediated intermolecular recombination. Eleven nonessential regions in *E. coli* DH1 genome were sequentially deleted by our method, resulting in a 10.59% reduced genome size. These precise deletions were also verified by PCR sequencing and genome resequencing. Though no change in the growth rate on the minimal medium, we found the genome-reduced strains have some alteration in the acid resistance and for the synthesis of lycopene.

**Keywords:** *Escherichia coli* DH1, Red homologous recombination, markerless deletion

大肠杆菌是工业上应用最广泛的宿主之一,如生产重组蛋白<sup>[1]</sup>和生物基产品<sup>[2]</sup>等。1997年大肠杆菌 MG1655 的基因组完整序列公布以来<sup>[3]</sup>,已经有一系列大肠杆菌基因组序列被测定,促进了大肠杆菌基因组功能研究。尽管大肠杆菌是人们最了解的模式生物,但其基因组中还有很多基因序列的功能未知<sup>[4]</sup>,增加了其代谢网络设计及调控的复杂性。为此,人们希望将一些不影响细胞生长的基因删除,构建一个所有基因功能确定的最小细胞底盘<sup>[5]</sup>。

最常见的基因无痕删除方法分为两类。一是通过一次电转将 PCR 扩增的带有 Cm-IS 序列(带有 *I-Sec I* 切割位点的 Cm 抗性基因)的打靶片段导入细胞内<sup>[6]</sup>,在 Red 重组酶帮助下,借助

50 bp 左右的同源臂,与染色体对应区域发生同源重组,使 Cm-IS 替换染色体上序列,然后再诱导表达 *I-Sec I* 内切酶,在 Cm-IS 处产生双链断裂,再次发生同源重组,实现染色体上基因无痕删除。第二种方法,通过两次电转入打靶片段<sup>[5]</sup>。第一次导入的打靶片段中含有正负筛选标记,通过正筛选获得重组子。第二次导入的打靶片段不含筛选标记,通过负筛选标记筛选获得重组子,从而实现无痕删除。对基因组上 DNA 序列进行无痕删除操作,不仅可以获得特定 DNA 序列的功能信息,而且通过连续删减操作可以精简微生物基因组,构建合成生物学底盘细胞。2006年, Pósfai 等<sup>[7]</sup>通过删除大肠杆菌 MG1655 中的非必需序列,获得了基因组减

少了 15% 的大肠杆菌 MDS42, 菌株的生长特性没有发生改变, 同时基因组稳定性和电转效率得到提高, 并可表达一些毒素蛋白。2008 年, Mizoquchi 等<sup>[8]</sup>对大肠杆菌 W3110 基因组进行删减, 获得了基因组减小 22% 的大肠杆菌 MFG-01, 菌株的生长特性并没有发生改变, 细胞密度提高了 1.5 倍, 苏氨酸的产量提高了 2.4 倍。最近 Hirokawa 等<sup>[9]</sup>将 W3110 基因组减小至 2.98 Mbp, 删减菌保持正常生长, 但测序结果发现, 删减区域同源臂发生一些碱基突变, 可能是 PCR 扩增重组片段时碱基错误掺入引起。

为了避免在删除区域两侧同源区引入突变, 我们建立了一种新的无痕删除方法。首先通过电转将 PCR 扩增的含有 Cm-IS 序列的打靶片段导入到基因组上, 再导入一个带有融合同源臂 LR-IS (融合同源臂 LR 的两侧含有 *I-Sec I* 切割位点) 的供体质粒, 然后表达 *I-Sec I* 内切酶切割供体质粒释放融合同源臂与染色体发生

重组实现无痕删除。只要供体质粒上的同源臂测序确证, 就不会在染色体上对应区域引入突变。我们应用基因组比对方法从大肠杆菌 DH1 基因组中筛选出了 64 个非必需区<sup>[10]</sup>。利用本文方法对大肠杆菌 DH1 基因组进行了无痕删减, 连续删除 11 个非必需区 (6、12、13、27、29、41、47、50、51、53 和 55 等区<sup>[10]</sup>), 获得了基因组减小了 10.59% 的删减菌 DH11。相比原始菌株 DH1, 基因组删减菌的生长变化不大, 但耐酸能力有所改变, 并对番茄红素的合成有不同影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及引物

菌株及质粒见表 1, 本实验室保存或本研究中构建。涉及的引物序列详见表 2, 由北京中科希林生物技术公司或上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 本实验中所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
DH1	ATCC 33849. The genomic sequence is listed in Accession No. CP001637	This lab
BL21 (AI)	F' <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	This lab
MG1655T7	Derivative of wild type MG1655 <sup>[7]</sup> , <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	This study
MDS42T7	Derivative of MDS42 <sup>[7]</sup> , a minimized MG1655, <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	This study
DH06T7	Derivative of DH06 (Table 3), <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	This study
DH11T7	Derivative of DH11 (Table 3), <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	This study
Other DHx series	See in the Table 3	This study
<b>Plasmids</b>		
pUCIS	Derivative of pUC19 including Cm <sup>r</sup> with <i>I-Sec I</i> recognition site ( <i>IS</i> ) in its both sides	This lab
pBRIS	Derivative of pBR322 has a cloning site which containing <i>IS</i> site, <i>Apa I</i> site and <i>Mlu I</i> site	This lab
pAAGBE	Derivative of pKOBEG <sup>[11]</sup> with Cm <sup>r</sup> replaced by Amp <sup>r</sup> . A temperature-sensitive helper plasmid expresses <i>Red</i> recombinase by adding L-arabinose	This lab
pKAISGBE	A temperature-sensitive helper plasmid expresses <i>I-Sec I</i> endonuclease and <i>Red</i> recombinase by adding L-arabinose, Kan <sup>r</sup>	This lab
pAOC-GPS-CrtIB	The p15A ori plasmid including <i>gps</i> (multifunctional GGPP synthase), <i>crtB</i> and <i>crtI</i> expressing under control of T7 promoter, Cm <sup>r</sup>	This lab
pBRIS-XLR series	Derivatives of pBRIS, containing <i>IS</i> site, XL arm and XR arm. Also see in Table 3	This study

表 2 本实验中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Primer name	Primer sequence (5'-3')
BC5	GTAGCACACGAGGTCTCT	50L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCAATCACCTCCAGCCTGAATAA
BC3	TACGACTCACTATAGGGAGA	50L2	CTGACGTCCGGCGAAAGT
ISF	ACGATGAGCGCATTGTTAG	50R1 <sup>§</sup>	ACTTTCGCCGGACGTCAGCAGCGCAACCAA ACTCCA
ISR	GAGTTGGTAGCTCTTGATC	50R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTCGCAGTGACCGTGAGAAG
51L5	TATTCGACCAAGTTCGCCTC	50-0	TTCTCGGCGGTCTGATTG
51L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACGTAATACGA GAGTGGACGGT	50-1	CCAGAGTCGCGTCGTTGT
51R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTAAGTGAGC GAAGCC TATC	53L5	CGGGTTTCGCCTGTCTGA
51R3	CTCCGATGCGATCCTGAC	53L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACTTCCATATAACG GCCCTGTA
51L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCTATTCGACCAAGTTCGCCT C	53R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTACCACCGCTGC AAACAAAGT
51L2	GTAATACGAGAGTGGACGGT	53R3	ACTGGGCGTACCGAAAGAT
51R1 <sup>§</sup>	ACCGTCCACTCTCGTATTACAGTGAGCG AAGCCCTATC	53L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCGGGTTTCGCCTGTCTGA
51R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTCTCCGATGCGATCCTGAC	53L2	TTCCATATAACGGCCCTGTA
51-0	TGGACGCT GCGGGATTA	53R1 <sup>§</sup>	TACAGGGCCGTATATGGAACCACCGCTGC AAACAAAGT
51-1	GCTGTAAAGCCGAAGAGTA	53R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTACTGGGCGTACCGAAAGAT
13L5	TCATTGATCT GTAACGCACT	53-0	GTGGTCGTCTGTATGTAATG
13L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACAGTCGCTTC AAATATATGATGC	53-1	TGAACGTGCCGACGGTAAAT
13R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTACCACAGA GTTTCTTCTTTAG	41L5	AACAGGAGGATGCCAGAC
13R3	AAACGCTATTAGGCAGACCA	41L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACCGTTCACGGTC TGTCCTCAA
13L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCTCATTGATCT GTAACGCACT	41R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTAGCCAGCACCG CTTACAGT
13L2	AGTCGCTTCAAATATATGATGC	41R3	TACAACGCACGCCAGAGG
13R1 <sup>§</sup>	GCATCATATATTGAAGCGACTCCACAG AGTT TCTTCTTTAG	41L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCAACAGGAGGATGCCAGAC
13R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTAAACGCTATTAGGCAGAC CA	41L2	CGTTCACGGTCTGTCTCAA
13-0	C ACCATCCACG GACTGAA	41R1 <sup>§</sup>	TTGGACAGACCGTGAACGGCCAGCACCGCT TACAGT
13-1	AATATCAGCCTCGCCACACT	41R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTTACAACGCACGCCAGAGG
6L5	CTT TCGGGATATT GAGTGC	41-0	TGCCTGTAGCTTGCTCAAA
6L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACCCACGTTGC GCTCCTCTT	41-1	CGGTAAGCCTCGCATCAA
6R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTAAGCGTGA TGGTGACTCGTT	55L5	CAACATCGCCAGCTTCATC
6R3	GTTGCTGGTGGGTTTAGAAT	55L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACCATCATCATTAC TCAAGGTGG
6L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCTTTCGGGATATTGAGTGC	55R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTATAGATGTACGT TGATATCGGTT

续表 2

6L2	CCACGTTGCGCTCCTCTT	55R3	GACAGATCGGAATGGCAGA
6R1 <sup>S</sup>	AAGAGGAGCGCAACGTGGAGCGTGATG GTGACTCGT T	55L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCAACATCGCCAGCTTCATC
6R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTGTTGCTGGTGGGTTTAGAA T	55L2	CATCATCATTACTCAAGGTGG
6-0	CACCAGGCCGACA ATAGG	55R1 <sup>S</sup>	CCACCTTGAGTAATGATGATGTAGATGTACG TTGATATCGGTT
6-1	CGGCCTTCCCATCACTA	55R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTGACAGATCGGAATGGCAGA
29L5	GT GCCGAAGGAG TGGGTT	55-0	AAACGGGTGAAGAACTACTG
29L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACCACGCACG CAGAAACTCC	55-1	TCCAGCCAATCCCGACAC
29R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTACCCCACTT ATTCGCACCT	12L5	CCCGCACCATCGTTACCT
29R3	CCGCCATAATCAAACAACAG	12L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACATGCCAGAGCA AGCAATAAC
29L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCGTGCCGAAGGAGTGGGTT	12R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTAGGGGTAAAGT ATCAGGAGA
29L2	CACGCACGCAGAAACTCC	12R3	TCGGTGATTAGTATCCCATTA
29R1 <sup>S</sup>	GGAGTTTCTGCGTGCGTGCCCACTTA TTCGCACCT	12L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCGCCGACCATCGTTACCT
29R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTCCGCCATAATCAAACAAC AG	12L2	ATGCCAGAGCAAGCAATAAC
29-0	GGCTTTGAGCAGTT GATG	12R1 <sup>S</sup>	GTTATTGCTTGCTCTGGCATGGGGTAAAGTA TCAGGAGA
29-1	CCCATTCCCACCTTCGTTA	12R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTTCGGTGATTAGTATCCCATTA
47L5	AGCTACGCCAACCTGTCT	12-0	GATTCTGCCGATCCTCTG
47L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACAGTTAGCG CTTATGGGAGTA	12-1	ATGATCTTCGCTGTCTCG
47R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTAATCAGCTT GTCGTCTGTC	27L5	GTTGAAGCGGTGGCAGAA
47R3	TAGGTCGGGAAATTGTACTT	27L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACTGCATTGGTTTC ATCCCTG
47L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCAGCTACGCCAACCTGTCT	27R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTACATTACCGCTT TATCCGCAA
47L2	AGTTAGCGCTTATGGGAGTA	27R3	CGCTGGGATGGTCGTAGTT
47R1 <sup>S</sup>	TACTCCATAAGCGCTAACTATCAGCTT GTCGTCTGTC	27L1 <sup>#</sup>	CGGGGCCCGTTGAAGCGGTGGCAGAA
47R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTTAGGTCGGGAAATTGTACT T	27L2	TGCATTGGTTTCATCCCTG
47-0	ACTGCAACACGCTGGACG	27R1 <sup>S</sup>	CAGGGATGAAACCAATGCACATTACCGCTTT ATCCGCAA
47-1	ACAGGACGGGTTCCGAGA	27R2 <sup>##</sup>	CGACGCGTCGCTGGGATGGTCGTAGTT
50L5	AATCACCTCCAGCCTGAATAA	27-0	GGTGTTCCAGCGATGTGCG
50L3 <sup>*</sup>	AGAGACCTCGTGTGCTACCTGACGTCC GGCGAAAGT	27-1	CGTCACCGTTTCTTTCATAC
50R5 <sup>**</sup>	TCTCCCTATAGTGAGTCGTACAGCGCA ACCAAATCCA	AT5	ACTTTATCGCCATCGGTGAC
50R3	CGCAGTGACCGTGAGAAG	AT3	GTAGTGATGAATCTCTCCTG

\*: The shadowy sequece is reverse complement of BC5. \*\*: The shadowy sequece is reverse complement of BC3. #: the underlined sequence is *Apa* I site. ##: the underlined sequence is *Mlu* I site. \$: the italic sequence in the XR1 is reverse complementary to XL2. X=6, 12, 13, 27, 29, 41, 47, 50, 51, 53 and 55.

## 1.2 主要试剂及仪器

质粒小量快速提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术公司。基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司。高保真 *Prime STAR<sup>TM</sup> HS* DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Apa I*、*Mlu I*、15 000、250 bp DNA Ladder marker 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、*EasyTaq* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术公司; *Dpn I* 购自 NEB 公司。番茄红素标准品购自 Sigma 公司。DNA Thermal Cycler T Personal 购自 Biometra 公司; 电转仪 ECM399 购自美国 BTX 公司; 1 mm 电击杯购自美国 BIO-RAD 公司。

## 1.3 基因无痕敲除

在进行基因无痕删除准备阶段, 需要 PCR

扩增第一步的打靶片段, 并构建第二步的供体质粒。

以 DH1 基因组为模板, 分别以 XL5&XL3、XR5&XR3 为引物, 用 *Prime STAR<sup>TM</sup> HS* DNA 聚合酶 PCR 扩增获得约 500 bp 的同源臂 XL53、XR53 (X 为表 3 中不同非必需区编号); 以 pUCIS 质粒为模板, 以 BC5&BC3 为引物, PCR 扩增两侧含有 *I-Sec I* 位点 Cm 抗性片段 BC, 对 BC 片段进行 *Dpn I* 处理消除残余模板质粒; 以 XL、BC、XR 为共同模板, 以 XL5&XR3 为引物, 重叠 PCR 扩增得到约 2.5 kb 的打靶片段 XLRC (参见图 1A 和表 3)。

供体质粒构建过程如图 1B 所示。以 DH1 基因组为模板, 用 *Prime STAR<sup>TM</sup> HS* DNA 聚合

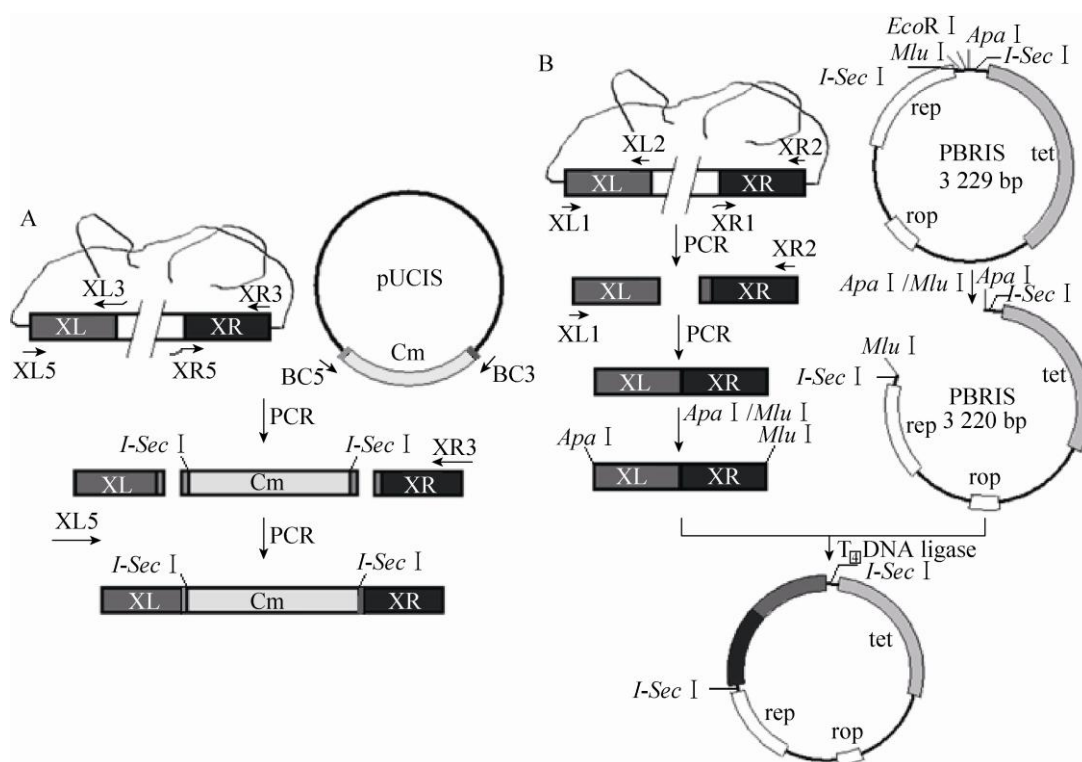


图 1 打靶片段 (A) 和供体质粒 (B) 的构建

Fig. 1 Construction of targeting PCR fragments (A) and plasmid PBRIS-XLR (B).

表 3 累积删除基因组中 11 个非必需区

Table 3 The 11 nonessential sequences in the *Escherichia coli* DH1 genome and their cumulative deletion

Deletion region/Length	PCR fragment in first recombination	The donor plasmid in second Recombination	Strains after cumulative deletion in order
51 (3482313...3609066)/126 754 bp	51LRC	pBRIS-51LR	DH01
13 (850854...897880)/47 027 bp	13LRC	pBRIS-13LR	DH02
6 (246357...265152)/18 796 bp	6LRC	pBRIS-6LR	DH03
29 (1797471...1811875)/14 405 bp	29LRC	pBRIS-29LR	DH04
47 (3271785...3305875)/34 091 bp	47LRC	pBRIS-47LR	DH05
50 (3466141...3481012)/14 872 bp	50LRC	pBRIS-50LR	DH06
53 (3697930...3704311)/6 382 bp	53LRC	pBRIS-53LR	DH07
41 (2782237...2839088)/56 852 bp	41LRC	pBRIS-41LR	DH08
55 (3912835...4017200)/104 366 bp	55LRC	pBRIS-55LR	DH09
12 (747456...773166)/25 711 bp	12LRC	pBRIS-12LR	DH10
27 (1693213...1734787)/41 575 bp	27LRC	pBRIS-27LR	DH11

酶, 分别以 XL1&XL2、XR1&XR2 为引物扩增 L5'端和 R3'端分别带有 *Apa* I 和 *Mlu* I 酶切位点的 XL、XR 片段, R 的 5'端引入 XL 的反向互补序列。以同源臂 XL 和 XR 为共同模板, 以 XL1&XR2 为引物, 重叠 PCR 扩增约 1.2 kb 融合同源臂片段 XLR, 电泳回收。质粒 pBRIS 和融合同源臂片段 XLR 先经 *Apa* I 和 *Mlu* I 双酶切, 再用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 涂布 Tet (10 mg/L) 抗性 LB 平板筛选, 以测序引物 ISF&ISR 进行菌落 PCR 验证, 再送北京中科希林生物技术公司测序确证, 测序正确的质粒命名为 pBRIS-XLR (参见表 3)。

基因无痕删减实验过程分为两步进行 (图 2)。

第一步重组, 含有辅助质粒 pAAGBE 的菌株接入含有 100 mg/L Amp 的 LB 液体培养基 (10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母抽提物, 10 g/L NaCl) 中, 于 30 °C 培养至  $OD_{600} \approx 0.6$ , 加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导 1 h 制备电转感受态<sup>[10]</sup>,

电转入打靶片段 XLRC, 在 Red 同源重组酶介导下, 两端带有 *I-Sec* I 位点的 Cm 抗性基因筛选标记替换了基因组上左右同源臂 XL 和 XR 之间的区域序列, 涂 Cm (50 mg/L) 平板。用敲除区同源臂外侧引物 X-0&X-1 进行 PCR 鉴定, 阳性条带约为 2.3 kb。保存阳性菌株, 命名为 DH-XLRC。

第二步重组, 将辅助质粒 pKAISGBE 和供体质粒 pBRIS-XLR 化转至 DH-XLRC, 涂 Kan/Tet 平板。挑取单菌落过夜培养。次日, 转接至 5 mL 液体 LB (含 50 mg/L Kan) 中培养到  $OD_{600} \approx 0.3$  时加入 0.2% L-阿拉伯糖, 继续培养 4–5 h。诱导后菌液稀释到  $10^{-4}$  或  $10^{-5}$ , 涂无抗性的 LB 平板。以 X-0&X-1 为引物进行 PCR 鉴定, 阳性重组约为 1.3 kb。阳性菌株转接至 Cm 液体 LB 和 Tet 液体 LB 中, 验证 Cm 及 Tet 的敏感性。将 PCR 产物送北京中科希林生物技术公司测序, 序列正确的菌株保存, 根据删除顺序命名为 DH01–DH11 (参见表 3)。

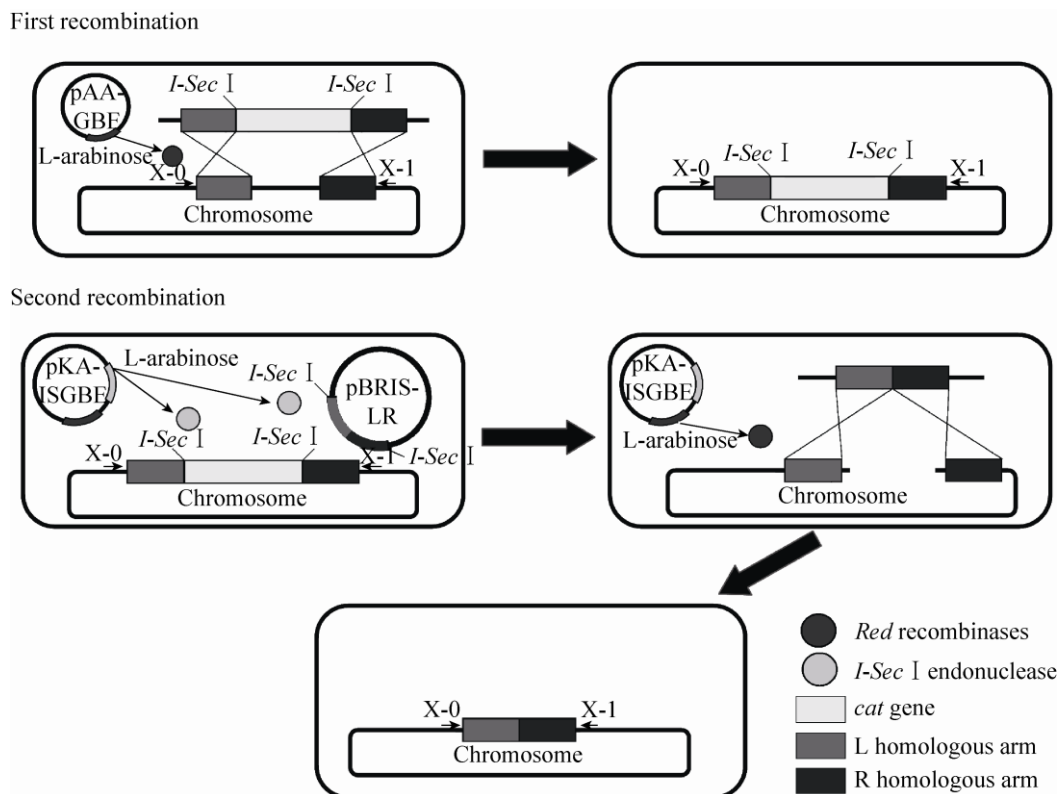


图 2 基因组无痕敲除技术原理

Fig. 2 The schematic diagram of gene knockout.

#### 1.4 基因组重测序

在连续删除 11 个区域后, 将删减菌株 DH08、DH11 和出发菌株 DH1 接入 LB 培养基中培养至对数生长末期, 收集菌液, 用基因组提取试剂盒提取基因组 DNA, 送北京新基永康基因科技公司进行基因组重测序分析, 以 CP001637 为参考序列。

#### 1.5 菌株在 M9 培养基中的生长

采用 M9 培养基 (1 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2407 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.011 1 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 4 g/L 葡萄糖, 5 mg/L 维生素 B1) 培养 DH1 菌株及其删减菌株 DH1-06、DH1-11。将过夜培养菌液分别转至含 30 mL M9 培养基的 150 mL 三角瓶中, 37 °C、220 r/min

培养。每 2 h 取一次样品测  $OD_{600}$ 。

#### 1.6 菌株的耐酸性

转接过夜培养菌液至装有 5 mL LB 培养基的大试管中, 于 37 °C、220 r/min 培养 3 h。用 LB 培养基稀释至  $OD_{600}=0.3$ 。取 1 mL 稀释后菌液, 4 °C 离心 5 min, 去上清, 菌体沉淀用 1 mL 酸化 LB 培养基 (用 1 mol/L 盐酸将 LB 培养基调至 pH 2.45) 重悬, 移至试管中, 于 37 °C、220 r/min 培养 30 min 后, 离心去上清。菌体沉淀再用 1 mL LB 培养基洗涤 2 次; 最后菌体沉淀用 4 mL LB 培养基重悬移至大试管中, 于 37 °C、220 r/min 培养 2 h 后, 测  $OD_{600}$ 。同时以未酸化处理的菌体为对照, 以两者的比值表示菌株的耐酸能力<sup>[12]</sup>。以 DH1 菌株的耐酸能力为基准 (设为 100), 计



算各个删减菌株的相对耐酸能力值。值越小表示耐酸能力越弱。

### 1.7 番茄红素的合成

为了表达 T7 启动子控制番茄红素合成途径,首先将来自 BL21 (AI) 基因组的 T7RNA 聚合酶表达元件,整合到 DH1、DH06、DH11、MG1655 和 MDS42 菌株的基因组上。以 BL21 (AI) 基因组为模板,以 AT5&AT3 为引物,用 *Prime STAR<sup>TM</sup> HS* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,获得 T7 RNA 聚合酶表达元件与 Tet 元件融合片段。然后电转到 Red 重组感受态细胞中,通过 Tet (10 mg/L) 抗性 LB 平板筛选,PCR 验证,获得 DH1-T7、DH06-T7、DH11-T7、MG1655T7 和 MDS42T7 菌株。

绘制番茄红素标准曲线:用丙酮配制不同浓度的番茄红素标准品 (0.5、1、1.5、2、2.5 mg/L),测样品  $OD_{474}$ ,绘制番茄红素浓度与  $OD_{474}$  值的标准曲线。

将具有 Cm 抗性质粒 pAOC-GPS-CrtIB 分别转化至 DH1-T7、06-T7、11-T7、MG1655T7 和 MDS42T7 中,构建表达番茄红素的菌株。含质粒 pAOC-GPS-CrtIB 菌株接种到 Cm 抗性 LB 培养基中,于 30 °C、220 r/min 培养过夜。将过夜菌液转接至 FM2GA 培养基 (15 g/L 蛋白胨, 12 g/L 酵母抽提物, 3 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g/L NaCl, 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.5% Tween 80, 1.5% 甘油, 0.2% 葡萄糖, 0.2% L-阿拉伯糖) 中,调整接种量使起始  $OD_{600}=0.2$ ,于 30 °C、220 r/min 培养 12 h,测定  $OD_{600}$  值,同时取 3 mL 菌液离心 4 min,去上清,3 mL 超纯水重悬去上清;加 3 mL 丙酮,充分重悬后 55 °C 水浴避光孵育 15 min,离心取上清测  $OD_{474}$  数值<sup>[13]</sup>。根据标准曲线计算原菌液番茄红素浓

度  $C_L$  (mg/L)。计算单位番茄红素含量  $Y_{sc}$  (mg/g DCW),计算公式如下:  $Y_{sc}=C_L/(0.37 \times OD_{600})$  (每个  $OD_{600}$  每升菌液的细胞干重约为 0.37 g)。

## 2 结果

### 2.1 删减菌 DH11 的构建

对表 3 中 11 个非必需区进行连续删减获得了删减菌 DH11,总删减长度为 490.8 kb,使基因组减小了 10.59%。

为了证明该方法可以避免在同源臂区域产生突变,在完成每一步无痕删除后,挑 4 个 PCR 阳性克隆,对 PCR 产物进行测序,发现删减后菌株基因组在同源臂区域序列均没有发生突变。

为了确证累积删减菌株 DH11 中 11 个敲除区的成功去除,用 11 对引物进行 PCR 鉴定电泳 (结果见图 3),各敲除区的鉴定都呈现阳性条带,约 1.3 kb,对照菌 DH1 因该区域长度均在 10 kb 以上,所以在相同条件下的 PCR 扩增不出条带。其中 47 区同源臂外引物 47-0&47-1 鉴定 DH1 时出现条带,且条带大小大于阳性条带,可能是非特异性扩增导致。基因组重测序结果也证明 DH08 及 DH11 中 47 区均被删除。

基因组重测序分析结果表明, DH08 和 DH11 中分别有 8 个和 11 个指定区域被删除 (图 4)。与报道的大肠杆菌 DH1 基因组序列 AP012030.1 和 CP001637 进行比对,发现本实验室保存的 DH1 菌株与 CP001637 相似度更高。

### 2.2 基因敲除突变菌株在 M9 培养基中的生长

选择 MY9 培养基,是为了排除其他碳源对菌体生长的影响,比较准确地测定出发菌 DH1 和敲除菌 DH1-06、DH1-11 的生长特征。敲除菌 DH1-06、DH1-11 在 MY9 培养基中的生长曲线与出发菌 DH1 差别不大 (图 5),说明基因组

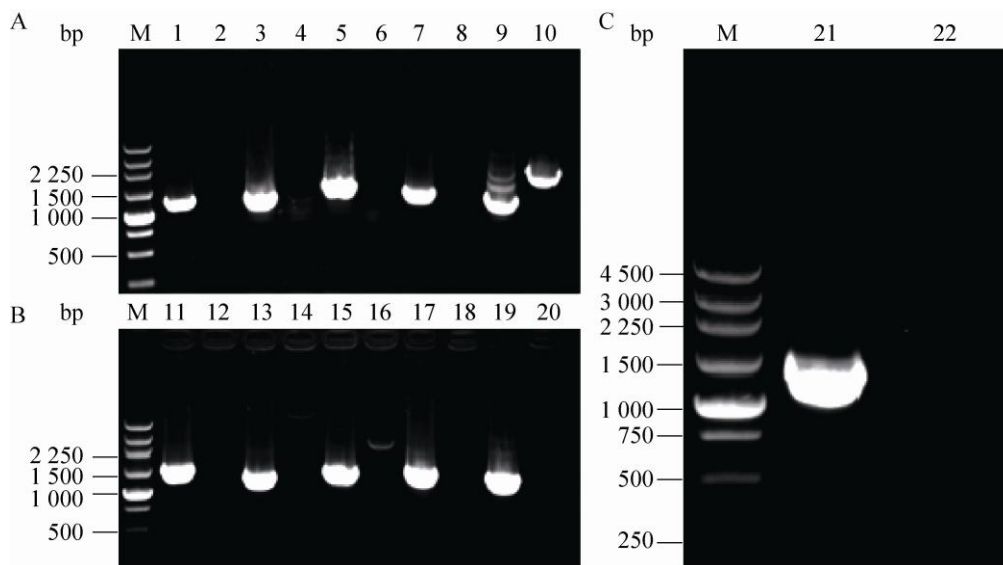


图 3 PCR 验证删减菌 DH11

Fig. 3 Verification of the minimized strain DH11 by PCR. 1–2: primers 51-0&51-1; 3–4: primers 13-0&13-1; 5–6: primers 6-0&6-1; 7–8: primers 29-0&29-1; 9–10: primers 47-0&47-1; 11–12: primers 50-0&50-1; 13–14: primers 53-0&53-1; 15–16: primers 41-0&41-1; 17–18: primers 55-0&55-1; 19–20: primers 12-0&12-1; 21–22: primers 27-0&27-1; M: DNA marker; 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19 & 21: DH11; 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 & 22: DH1.

敲除后, 菌株在 MY9 培养基中的生长代谢特征与出发菌株相比, 变化不大。

### 2.3 基因敲除突变菌株的耐酸性

为了耐酸性实验结果进行统一性分析, 先减去处理过程的损耗再将酸处理后测得的  $OD_{600}$  值与未经酸处理的对照  $OD_{600}$  值相除, 得到代表耐酸能力的比值, 然后以 DH1 的耐酸能力为基准, 设定其为 100, 计算敲除菌株的相对耐酸能力。结果见图 6。在累积敲除 51、13、6、29 和 47 区后, 即 DH01、DH02、DH03、DH04 和 DH05 等菌株的耐酸能力没有变化, 说明这些非必需区与菌株的耐酸能力不相关。但在继续敲除 50 区后, DH06、DH07、DH08、DH09、DH10 和 DH11 等菌株的耐酸能力下降了约 40%。推测 50 区存在菌株耐酸能力相关基因, 具体哪些基因有待后续研究。

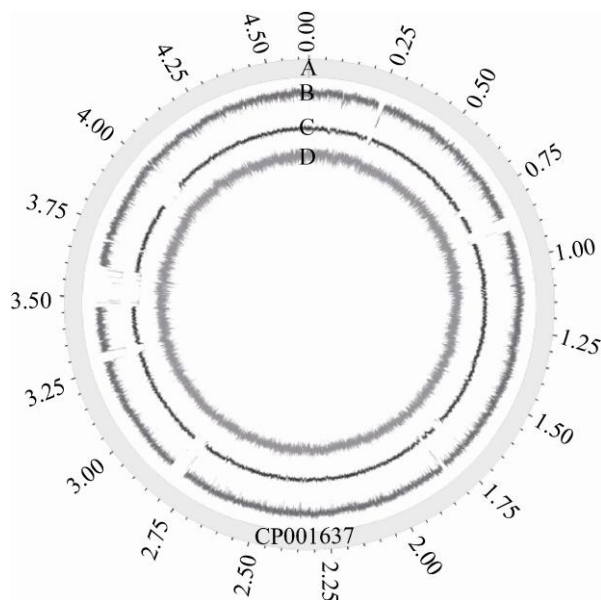


图 4 基因组重测序结果比较

Fig. 4 The comparison of the genome resequencing results. (A) The reference sequence CP001637. (B) The genome-reduced strain DH08. (C) The genome-reduced strain DH11. (D) Lab strain DH1.

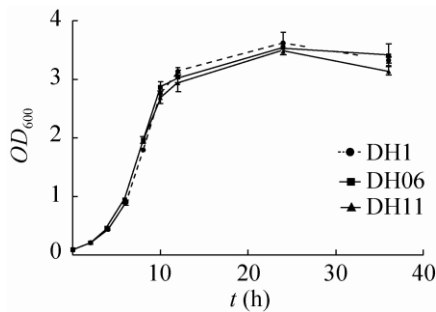


图5 DH1、DH06、DH11在M9培养基中生长代谢图  
Fig. 5 Growth curves of DH1, DH06 and DH11 in the minimal medium M9.

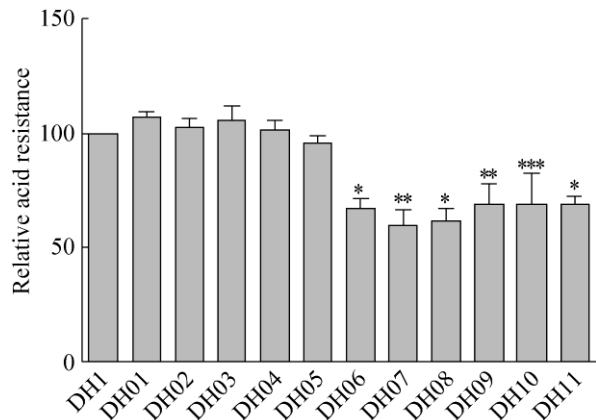


图6 DH1及其基因组删减菌的相对耐酸能力(与DH1比较。\*  $P < 0.01$ ; \*\*  $P < 0.03$ ; \*\*\*  $P < 0.06$ )

Fig. 6 Relative acid resistance of DH1 and its reduced-genome strains. Comparing with DH1, \*  $P < 0.01$ ; \*\*  $P < 0.03$ ; \*\*\*  $P < 0.06$ .

## 2.4 基因敲除对番茄红素合成的影响

为了能够表达T7启动子控制下番茄红素合成途径(pAOC-GPS-crtBI),我们先应用Red重组技术将来自BL21(AI)基因组上阿拉伯糖诱导的T7 RNA聚合酶元件,移植到DH1、DH06、DH11、MG1655和MDS42基因组上,分别构建了DH1T7、DH06T7、DH11T7、MG1655T7和MDS42T7等菌株。在FM2GA自诱导培养基中培养,L-阿拉伯糖诱导表达基因组上的T7-RNA聚合酶基因,然后启动质粒上番茄红素合成途径表达,合成番茄红素。如图7所示,相比DH1,

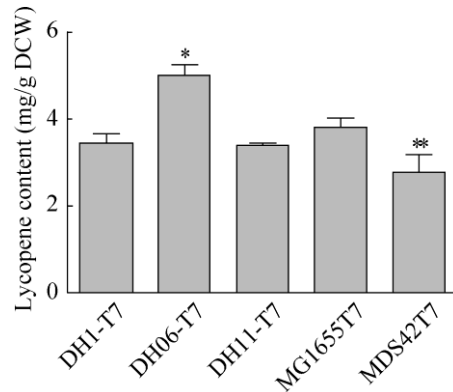


图7 不同菌株合成番茄红素的能力(与DH1-T7比较,\*  $P < 0.01$ ;与MG1655T7比较,\*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 7 Lycogene specific production in the different strains. Comparing with DH1-T7, \*  $P < 0.01$ ; comparing with MG1655T7, \*\*  $P < 0.01$ .

其删减菌DH06合成番茄红素的能力提升,DH11合成番茄红素的能力没有变化。而相比MG1655,其删减菌MDS42合成番茄红素的能力明显下降。

## 3 讨论

基因组无痕删减技术是研究微生物基因组功能的有效工具。Red同源重组技术目前已广泛应用于基因删除、突变<sup>[14]</sup>以及基因整合<sup>[15]</sup>。应用Red同源重组技术进行基因无痕删除是大肠杆菌基因组删减的主要方法<sup>[16-19]</sup>。文献中主要研究对象为大肠杆菌MG1655<sup>[6-7]</sup>和W3110<sup>[5,8]</sup>,分别采用了两种不同的策略。前者采用50 bp左右的同源臂及双链断裂促进同源重组;后者采用约1 kb的同源臂和正负筛选标记。

大肠杆菌DH1是实验室常用菌株之一。为了构建大肠杆菌DH1的基因组删减菌,我们对Red同源重组过程进行了优化。首先优化了大肠杆菌DH1的电转条件。开始按文献报道的电转

条件进行电转,在抗性筛选平板上没有长出菌落。所以我们优化了电转感受态的制备条件,发现将  $OD_{600}$  从 0.3 提高到 0.6,同时将 L-阿拉伯糖诱导时间从 45 min 延长至 1 h,电转后可以得到阳性克隆。其次,采用 500 bp 左右的同源臂,提高第一步的重组效率。再次,在第二次同源重组中采用供体质粒引入融合同源臂,在双链断裂后与染色体进行同源重组,即提高重组效率,也可以消除 PCR 产生的突变。我们没有采用负筛选标记,第二步重组的阳性率仍然能够高于 30%。采用这种策略,成功地连续敲除了 DH1 基因组上 11 个区域,总删除长度约 0.49 Mbp,获得了基因组减小了 10.59% 的删减菌 DH11。PCR 产物测序以及基因组重测序结果表明,所有删除区域的同源臂没有发生突变,目标区域均被删除。经过基因组敲除减小的菌株 DH06、DH11 和出发菌 DH1 相比,在 M9 培养基中,生长没有受到明显改变。

野生型大肠杆菌具有较好的耐酸能力。大肠杆菌的耐酸性机制非常复杂,受到很多调节子的递阶调控<sup>[20-22]</sup>。我们对不同基因组减小菌株的耐酸能力做了测定。与出发菌对比,在敲除 50 区后,所有敲除菌的耐酸能力有所下降,推测 50 区中存在调节耐酸能力的相关基因,可以作进一步的分析研究。目前我们已经连续删除了 DH1 基因组中 56 个非必需区,发现继续删除后,菌株的耐酸能力又得到恢复。说明大肠杆菌其耐酸能力的调节机制非常复杂<sup>[22]</sup>。

我们以番茄红素的合成能力来考察基因组删减菌对产物合成能力的影响。结果显示,相比 DH1, DH06 (基因组减小了 5.53%) 合成番茄红素的能力有较明显提高,但 DH11 (基因组减小了 10.59%) 合成番茄红素能力没有明显改变。

而相比野生菌 MG1655,其删减菌 MDS42 (基因组减小了 15%) 的番茄红素合成能力则明显下降。由此可见,不同程度的删减菌对产物合成能力的影响不同,其原因需要从代谢网络调控方面进行深入研究。基因组中很多基因序列的功能还不清楚,虽然对生长影响不大,但可能对产物合成有抑制作用或促进作用。目前正确地分析细胞代谢网络还有很多困难<sup>[23-24]</sup>,构建一个代谢网络调控路径清晰的最小底盘细胞将会促进产物合成研究的发展<sup>[25]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*, 2014, 5: 172.
- [2] Chen XZ, Zhou L, Tian KM, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1200–1223.
- [3] Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453–1462.
- [4] Riley M, Abe T, Arnaud MB, et al. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(1): 1–9.
- [5] Mizoguchi H, Mori H, Fujio T. *Escherichia coli* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46(3): 157–167.
- [6] Kolisnychenko V, Plunkett III G, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res*, 2002, 12(4): 640–647.
- [7] Pósfai G, Plunkett III G, Fehér T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312(5776): 1044–1046.
- [8] Mizoquchi H, Sawano Y, Kato JI, et al. Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. *DNA Res*,

- 2008, 15(5): 277–284.
- [9] Hirokawa Y, Kawano H, Tanaka-Masuda K, et al. Genetic manipulations restored the growth fitness of reduced-genome *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 116(1): 52–58.
- [10] Yu J, Huang Y, Zhou CL, et al. Discovery of nonessential sequences in *Escherichia coli* DH1 genome based on genomic comparison. *Lett Biotechnol*, 2014, 25(5): 640–643 (in Chinese). 虞剑, 黄勇, 周长林, 等. 利用基因组比对方法寻找大肠杆菌 DH1 基因组中的非必需序列. *生物技术通讯*, 2014, 25(5): 640–643.
- [11] Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(22): E97.
- [12] Jin Y, Watt RM, Danchin A, et al. Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, 2009, 10: 165.
- [13] Yoon SH, Lee YM, Kim JE, et al. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(6): 1025–1032.
- [14] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*, 2009, 4(2): 206–223.
- [15] Kuhlman TE, Cox EC. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(6): e92.
- [16] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [17] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002, 36: 361–388.
- [18] Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, et al. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol*, 2005, 55(1): 137–149.
- [19] Yu BJ, Kang KH, Lee JH, et al. Rapid and efficient construction of markerless deletions in the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(14): e84.
- [20] Masuda N, Church GM. Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2003, 48(3): 699–712.
- [21] Hobbs EC, Astarita JL, Storz G. Small RNAs and small proteins involved in resistance to cell envelope stress and acid shock in *Escherichia coli*: analysis of a bar-coded mutant collection. *J Bacteriol*, 2010, 192(1): 59–67.
- [22] Kanjee U, Houry WA. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 2013, 67:65–81.
- [23] Tang BC, Hao T, Yuan QQ, et al. Genome minimization method based on metabolic network analysis and its application to *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(8): 1173–1184 (in Chinese). 汤彬彩, 郝彤, 袁倩倩, 等. 一种基于代谢网络分析最小化基因组的方法及其在大肠杆菌中的应用. *生物工程学报*, 2013, 29(8): 1173–1184.
- [24] Pey J, Valgepea K, Rubio A, et al. Integrating gene and protein expression data with genome-scale metabolic networks to infer functional pathways. *BMC Syst Biol*, 2013, 7: 134.
- [25] Leprince A, van Passel MW, dos Santos VAM. Streamlining genomes: toward the generation of simplified and stabilized microbial systems. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(5): 651–658.

(本文责编 郝丽芳)