

pSim6 质粒与新型反选择 *kil* 系统联用在重组工程的应用

李玉娟, 陈如意, 杨缅峰, 陈伟

广东药科大学 生命科学与生物制药学院 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

李玉娟, 陈如意, 杨缅峰, 等. pSim6 质粒与新型反选择 *kil* 系统联用在重组工程的应用. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1761-1770.

Li YJ, Chen RY, Yang MF, et al. Combination of novel counter-selection system *kil* and pSim6 plasmid in recombination engineering. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1761-1770.

摘要: 基因工程中, 无痕修饰是一种很受欢迎的基因组操作技术。反选择系统的严谨性决定了无痕修饰的效率。近期有文献报道了一种新型的反选择系统 *kil*, 该系统与质粒 pSim6 联用后反选择严谨性较 pKD46 质粒更高, 预示着 *kil* 与 pSim6 质粒联用可以更高效地选择出重组子。据此, 对大肠杆菌菌株 W3110、MG1655 和 DH10B 中的 4 个不同的非必需基因位点 (*lacI*、*dbpa*、*ack* 和 *glk*) 进行了分析, 将不同长度的外源基因片段对预先插入这些位点的 *tet/kil* 进行基因替换。结果表明 *kil* 与 pSim6 质粒联用较其与 pKD46 质粒联用, 重组效率均有显著提高, 并且随着外源片段的生长, 效果更明显。外源片段为 1 000 bp 时, *kil* 与 pSim6 质粒联用是其与 pKD46 联用的 1.2-2 倍; 外源片段为 2 000 bp 时, 则是 pKD46 的 2.2-5 倍。综上, *kil* 与 pSim6 联用具有更高的重组效率, 更有利于大肠杆菌基因组的无痕修饰操作, 这为大肠杆菌重组工程提供了更多的选择。

关键词: Red 重组系统, 选择反选择系统, 无痕修饰, 大肠杆菌

Combination of novel counter-selection system *kil* and pSim6 plasmid in recombination engineering

Yujuan Li, Ruyi Chen, Mianfeng Yang, and Wei Chen

Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates, School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: Seamless modification is a popular genomic manipulation technique in genetic engineering. Selection stringency of the counter-selection system determines the efficiency of the seamless modification. Recently, a novel counter-selection system, *kil*, was constructed. It is reported that the selection selectivity of *kil* is higher in host bacteria harboring plasmid pSim6 than that harboring pKD46, indicating that recombinants could be selected out more efficiently by combining *kil* counter-selection system and plasmid pSim6. In order to confirm this speculation, four different loci (*lacI*, *dbpa*, *ack*, *glk*) in *Escherichia coli* strains W3110, MG1655 and DH10B were selected for testing: dsDNA fragments of different sizes (500 bp,

Received: February 27, 2019; **Accepted:** May 20, 2019

Supported by: Science and Technology Program of Guangdong Province (No. 2015A010107014), National Natural Science Foundation of China (No. 31501895).

Corresponding author: Wei Chen. Tel: +86-20-39352201; E-mail: thinker98@163.com.

广东省科技计划项目 (No. 2015A01017014) 资助, 国家自然科学基金 (No. 31501895)。

网络出版时间: 2019-06-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190628.1331.002.html>

1 000 bp, and 2 000 bp) were used to substitute *tet/kil*. As expected, recombination efficiency was higher in host bacteria harboring plasmid pSim6 than that harboring pKD46, and the results were more obvious with the length of dsDNA increasing. Specifically, recombination efficiency was 1.2 to 2 fold higher in pSim6 harboring bacteria than in pKD46 harboring bacteria when dsDNA fragments were 1 000 bp in length. With the length of dsDNA increasing up to 2 000 bp, the gap increased to 2.2–5 fold. In conclusion, it is easier to perform seamless modification by combining *kil* counter-selection system and plasmid pSim6 than combining *kil* and pKD46. An alternative tool in genomic engineering is provided in this study.

Keywords: Red recombination system, selection/counter-selection system, seamless modification, *Escherichia coli*

同源重组是在基因工程中常用的技术手段,并且在基因打靶和基因克隆方面有着极其重要的作用。运用同源重组技术,可以对巨大、复杂的染色体进行修饰^[1]。在代谢工程与功能基因组分析中,对大肠杆菌基因组修饰(点突变、插入、删除、替换)的同源重组,一般用 35–50 bp 的同源臂,就可以发生有效的重组并且不需要限制性酶切位点。这种重组是由噬菌体重组酶(λ -Red 系统)介导的, λ -Red 系统是目前研究相对比较丰富的系统,它存在于 λ -噬菌体左向操纵子上,其表达受 pL 启动子和 CI857 阻遏蛋白控制,由 *exo*、*bet* 和 *gam* 这 3 个基因组成,表达蛋白产物分别为 Exo、Beta 和 Gam^[2]。Exo 蛋白具有核酸外切酶活性,能以 5'–3'方向降解双链 DNA 末端,从而留下 3'单链突出端 DNA 分子^[3–4]; Beta 蛋白能结合由 Exo 消化产生的 3'单链末端,防止 DNA 被单链核酸酶消化,同时促进互补单链 DNA 区域间的退火,其在 Red 同源重组过程中起着决定性的作用^[5]; Gam 蛋白抑制核酸 RecBCD 和 SbcCD 对线性双链 DNA 分子的降解,协助 Exo 和 Beta 共同完成同源重组过程。运用 Red 重组技术进行染色体修饰主要有 3 种操作策略: DNA 双链介导的重组^[6]、单链重组^[7]和重叠引物介导的重组^[8]。

在 Red 同源重组操作策略中,两步选择反选择重组法^[9]是报道最多且应用最广泛的策略,改造后不会产生多余的基因序列变化,可以达到“无痕修饰”的目的。其策略分为两步: 1) 通过电击转化将带有同源臂的选择反选择片段转入大肠杆菌感受态细胞中,在 Red 重组系统的表达下发生

同源重组,通过正向选择标记(一般为抗性基因如 *neo*)筛选阳性克隆; 2) 同样用电转化将带有同源臂的外源片段转入细胞中,在 Red 重组系统的作用下进行重组,完成基因敲除、替换或插入,通过反向选择标记基因(如 *sacB*、*tolC*、*thyA*、*ccdB* 和 *galk*)进行筛选^[10–15]。

一般来说,反向选择比正向选择效率低,并且都有很高的背景^[16]或者特殊的要求,如宿主基因型需要在使用阴性选择标记基因之前修饰^[17],或者依靠最低限度的培养基来实现更好的选择严谨性或需要特殊的选择性条件。2019 年,本实验室构建并发表了一个新型的 *kil* 反选择标记基因^[18]。 λ 噬菌体的 *kil* 基因由温度敏感的 cI857 阻遏物操控下的 pL 启动子控制^[19],其表达可有效地导致宿主细胞存活力的丧失,因此将其作为反选择标记基因。研究中发现新构建的反选择基因比其他各种负选择基因具有显著的优势:高选择严谨性、低背景、不需要特殊的试剂。我们在之前的研究中,在大肠杆菌 MG1655 的 *lacI*、*ack*、*dbpa* 非必需位点分别测试了含有 pSim6 质粒或含有 pKD46 质粒与 *kil* 反选择系统联用的选择严谨性。发现 pKD46 质粒与 *kil* 联用后选择严谨性为 7.6×10^{-7} – 9.3×10^{-7} , pSim6 质粒与 *kil* 联用后选择严谨性低至 2.3×10^{-6} – 5.1×10^{-6} ,较 pKD46 高了 2–5 倍。因此,我们推断, pSim6 质粒与 *kil* 反选择基因联用后,双链 DNA 片段的重组效率会比 pKD46 质粒与 *kil* 反选择基因联用时有所提高。

因此本研究采用含有 Red 同源系统的 pSim6 质粒,与新型的 *kil* 选择反选择系统联合使用,在

不同大肠杆菌菌株 (W3110、MG1655 和 DH10B) 中的 4 个不同位点 (*lacI*、*dbpa*、*ack* 和 *glk*) 进行不同片段长度 (500 bp、1 000 bp 和 2 000 bp) 的替换, 分析其重组效率, 期望可以建立一个高选择效率的重组工程系统, 为更好地将重组工程无痕修饰提供了更多的选择。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和质粒: 大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* W3110、MG1655 和 DH10B 均为本室保存, GYpk1-tet (含有 *tet/kil* 选择反选择系统) 为本室

构建, pSim6 质粒为美国国立卫生研究院 Court DL 博士惠赠。

工具酶和试剂: *PrimerSTAR*[®] GXL DNA 高保真酶购自日本 TaKaRa 生物公司, PCR *mix* 酶购自民赛生物 (广州) 科技有限公司; Tet (四环素)、Amp (氨苄霉素) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 质粒提取试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自 Axygen 公司; PCR 引物为生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

PCR 扩增及鉴定引物: 带同源臂引物序列见表 1, 带有下划线的代表同源臂序列, 不带下划线的代表 PCR 扩增引物序列; 鉴定引物序列见表 2。

表 1 本研究所用带同源臂引物

Table 1 Primers with homology arms used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
lacI-tkF	<u>CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGTCCTAATTTTTGTTGACACTC</u>
lacI-tkR	<u>GATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATTTAGTGAATGCTTTTGCTTG</u>
lacI-500F	<u>GATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAAT</u> AGTACCAGATACCATCGTC
lacI-500R	<u>CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCGAGTAGCTTGATCAACTCTG</u>
lacI-1 000R	<u>CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTAAGAGCGCATGATACGGAC</u>
lacI-2 000R	<u>CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCGCTGCTGCATAGGTTGCTAC</u>
ack-tkF	<u>TTACAAAACAGCACCGCCAGCTGAGCTGGCGGTGTGAAATCCTAATTTTTGTTGACACTC</u>
ack-tkR	<u>TGACGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTACTTCCCTTAGTGAATGCTTTTGCTTG</u>
ack-500F	<u>TGACGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTACTTCCAGCTACCAGATACCATCGTC</u>
ack-500R	<u>TTACAAAACAGCACCGCCAGCTGAGCTGGCGGTGTGAAAAGAGTAGCTTGATCAACTCTG</u>
ack-1 000R	<u>TTACAAAACAGCACCGCCAGCTGAGCTGGCGGTGTGAAAATAAGAGCGCATGATACGGAC</u>
ack-2 000R	<u>TTACAAAACAGCACCGCCAGCTGAGCTGGCGGTGTGAAAAGCTGCTGCATAGGTTGCTAC</u>
dbpa-tkF	<u>TCTCATAAAATTGTTGTTCAATGGGTGGCAAAGCATCTGTCCTAATTTTTGTTGACACT</u>
dbpa-tkR	<u>CGCCTGCTAACTTTGCGTCGATGACCACGAGAATAGATTTTAGTGAATGCTTTTGCTTG</u>
dbpa-500F	<u>CGCCTGCTAACTTTGCGTCGATGACCACGAGAATAGATTAGTACCAGATACCATCGTC</u>
dbpa-500R	<u>TCTCATAAAATTGTTGTTCAATGGGTGGCAAAGCATCTGGAGTAGCTTGATCAACTCTG</u>
dbpa-1 000R	<u>TCTCATAAAATTGTTGTTCAATGGGTGGCAAAGCATCTGTAAGAGCGCATGATACGGAC</u>
dbpa-2 000R	<u>TCTCATAAAATTGTTGTTCAATGGGTGGCAAAGCATCTGGCTGCTGCATAGGTTGCTAC</u>
glk-tkF	<u>AACAGCGACAATGCGCGGCGGCAATCGGTGCAGCTGTCACTAATTTTTGTTGACACT</u>
glk-tkR	<u>CAGGGCTTGATTACCCAGCCTCGAAGCGGTCATTTCGCTTAGTGAATGCTTTTGCTTG</u>
glk-500F	<u>CAGGGCTTGATTACCCAGCCTCGAAGCGGTCATTTCGCGAGCTACCAGATACCATCGTC</u>
glk-500R	<u>AACAGCGACAATGCGCGGCGGCAATCGGTGCAGCTGTCAAGAGTAGCTTGATCAACTCTG</u>
glk-1 000R	<u>AACAGCGACAATGCGCGGCGGCAATCGGTGCAGCTGTCAATAAGAGCGCATGATACGGAC</u>
glk-2 000R	<u>AACAGCGACAATGCGCGGCGGCAATCGGTGCAGCTGTCAAGCTGCTGCATAGGTTGCTAC</u>

The single underlined sequences indicate homology arms.

表 2 本研究所用鉴定引物

Table 2 Identification primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
lacIF	GCATCTTCCGGCGCTACAAC
lacIR	CGCTCACAAATCCACACAAC
ackF	TGCAGTGCATGATGTTAATC
ackR	GGGATCAGCATAATAATACG
dbpaF	CACCACCCGATGAAGAACC
dbpaR	GAGGATGGCTGATGCAAGC
glkF	GATATTTACAGGGAGCCTG
glkR	GATTGTCATGGACGATGAG
catjdf	TGGAGGAAGGCATTGAGATC
TetA-R	TCCTAATTTTTGTTGACACTCTA

1.2 方法

1.2.1 甘油/甘露醇梯度^[20]感受态的制备与电击转化

将过夜培养的大肠杆菌 W3110 等 3 个菌株按 1 : 100 (500 μ L) 稀释到 50 mL SOB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 在 0.4–0.6 之间。然后冰浴 30 min (含有 pSim6 质粒的菌株在 42 $^{\circ}$ C 诱导 15 min 后冰浴 30 min)。将上述培养液转移至高压灭菌处理的 50 mL 聚丙烯离心管中, 4 $^{\circ}$ C、5 500 r/min、7 min 离心收集菌体, 弃上清, 加 1 mL 预冷的 ddH₂O 重悬, 再加 15 mL ddH₂O 混匀, 加 15 mL 甘油/甘露醇溶液伸到管底, 缓慢加入, 形成分层, 4 500 r/min、6 min、4 $^{\circ}$ C 离心; 重复 3 次后加 1 mL 甘油/甘露醇溶液重悬于 1.5 mL 的 EP 管, 6 500 r/min、4 min、4 $^{\circ}$ C 离心; 后弃上清, 加甘油/甘露醇溶液使总体积约为 200 μ L。取 50 μ L 感受态与 300 ng 的打靶分子 DNA 片段进行电转 (条件为电压 1.8 kV, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω), 立即用 2 mL SOC 培养基复苏 2 h。

1.2.2 线性双链 DNA 介导的 DNA 重组

同源臂的设计遵循 GC 含量分布均匀且含量约为 50% 的原则, 长度在 35–50 bp 最佳, 本实验扩增含同源臂的基因片段由同源臂长度为 38 bp 以及 21 bp 的扩增引物组成。使用高保真酶扩增,

扩增条件是: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 kb/min (31 个循环); 68 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增的线性双链 DNA 分子经纯化回收后与感受态混合, 进行电击转化。用含筛选标记 (Amp/Tet) 的 LB 平板或者其他条件 (42 $^{\circ}$ C) 的 LB 平板筛选发生基因重组后的阳性克隆。

1.2.3 Tet/kil 选择反选择方法

① 通过 *tet* 抗性基因进行正向选择, PCR 合成打靶分子 (两侧带有同源臂的 *tet/kil* 片段), 取约 300 ng 的回收产物与 50 μ L 的感受态细菌混合, 电击转化后复苏 2 h, 涂于含 Amp (25 μ g/mL) 和 Tet (10 μ g/mL) 的 LB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养过夜后筛选阳性克隆。② 利用 *kil* 基因在 42 $^{\circ}$ C 下的致死效应进行第二步反选择筛选, 使用 *catenin* 基因为模板, 通过高保真酶扩增两侧带有同源臂的线性化 DNA 分子, 扩增不同长度的外源片段 (500 bp, 1 000 bp 和 2 000 bp)。试剂盒纯化后取 300 ng 的回收产物与①中鉴定正确的 50 μ L 阳性克隆感受态混合, 电击转化后培养 2 h, 涂于无抗板 (200 μ L 菌液混合物) 在 42 $^{\circ}$ C 过夜培养筛选。

1.2.4 重组克隆的鉴定

① *tet/kil* 选择反选择系统的鉴定: 用各个位点的扩增上游引物 (lacIF、ackF、dbpaF 和 glkF) 与 *tet/kil* 片段中的下游引物 (TetA-R) 进行 PCR 鉴定。② 外源片段的鉴定: 用外源基因片段中上游引物 (catjdf) 与各个位点的扩增下游引物 (lacIR、ackR、dbpaR 和 glkR) 进行 PCR 鉴定。用 mix 聚合酶鉴定, 扩增条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 kb/min (31 个循环); 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

1.2.5 重组效率的计算

从 42 $^{\circ}$ C 无抗板各挑取 23 个单克隆与一个阴性克隆 (未转外源片段的 42 $^{\circ}$ C 平板) 进行 PCR 鉴定, 通过琼脂糖凝胶电泳分析, 出现正确条带的数目与总数的比值则为重组效率, 重复 3 次取

平均值。

2 结果与分析

2.1 *ack* 位点的 pSim6 与 *kil* 联用

ack 基因 (GenBank 登录号: BAA16135.1) 是大肠杆菌基因组上的非必需基因, 其表达乙酸激酶, 它的缺失可使乙酸减少, 增加谷氨酸的产量^[21]。因此我们在此位点用不同长度的外源片段进行替换。图 1A 为重组后 *tet/kil* 鉴定图, 然后从菌落表型 (图 1B、1C) 上可以观察到: pSim6 与

kil 联用后与 pKD46 与 *kil* 联用后相比较, 空转菌落数量差不多, 转 *cat500* 的外源片段, pSim6 菌落数量相对较多; 转 *cat1k* 的外源片段, pSim6 菌落数量与 pKD46 差异较为明显; 转 *cat2k* 的外源片段, pSim6 菌落数量与 pKD46 差异更为明显。因此我们对 pSim6 质粒与 *kil* 联用的重组克隆进行 PCR 鉴定, 每次挑选 23 个, 重复 3 次, 图 1D 为琼脂糖凝胶电泳分析。图 1E 为从图 1D 得到的数据进行重组效率分析图, 图中可以观察到 500 bp 片段很容易被替换, 重组率高达 90% 以上,

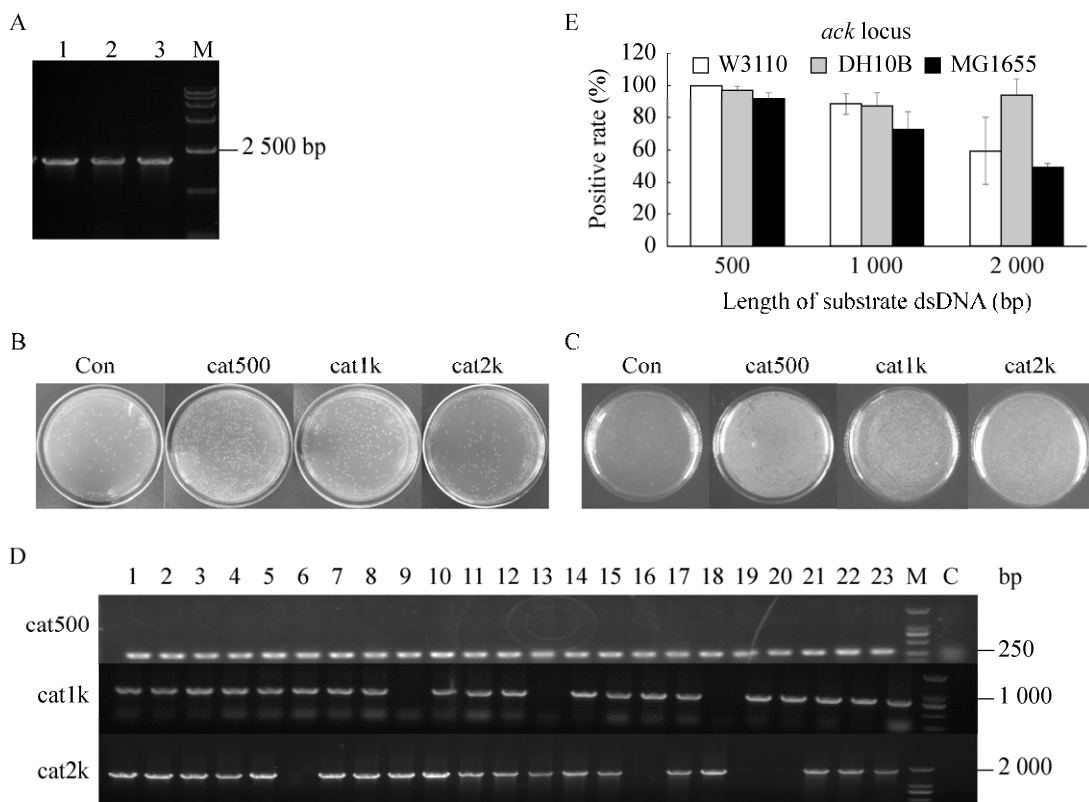


图 1 *ack* 位点的重组效率分析

Fig. 1 Recombination efficiency analysis of the *ack* locus. (A) Identification of recombinants harboring *tet/kil* by PCR. 1–3: PCR identification of recombinants; M: DNA marker DL 15 000. (B) *tet/kil* substitution with dsDNA in different length (500 bp, 1 000 bp, or 2 000 bp) using plasmid pKD46. Three independent experiments were performed, and a representative replicate is shown. (C) *tet/kil* substitution with dsDNA in different length (500 bp, 1 000 bp or 2 000 bp) using plasmid pSim6. Three independent experiments were performed, and a representative replicate is shown. (D) PCR detection of the *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. A total of 23 colonies (lane 1 to lane 23) were screened and a 234 bp (*cat500*), 746 bp (*cat1k*), or 1 733 bp (*cat2k*) product indicates successful substitution by donor dsDNA in the *ack* locus. M: DNA marker DL 2 000; C: control. (E) Positive rates of *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. Results of three independent experiments mentioned above were analyzed and positive rates were calculated.

长度增加至 1 000 bp, 重组率在 71%–88%之间, 外源片段为 2 000 bp 时, 同源重组的重组率约为 50%–94%。pKD46 与 *kil* 联用后的重组效率^[18]分别为 82.61% (500 bp)、47.83% (1 000 bp) 和 13.04% (2 000 bp)。结果表明 pSim6 与 *kil* 联用后比 pKD46 与 *kil* 联用后的重组效率有明显的提高。

2.2 *lacI* 位点的 pSim6 与 *kil* 联用

通过在 *ack* 位点进行不同片段同源重组后, pSim6 质粒与 *kil* 两者联用, 与 pKD46 质粒与 *kil* 联用相比较, 重组效率相对提高。对此, 我们在其他非必需位点对 pSim6 质粒和 *kil* 反选择系统联用进行多基因位点验证, 观察是否有同样的重组效率。挑选了另外 3 个大肠杆菌非必需位点 *lacI*^[22]

(GenBank 登录号: BAE76127.1)、*dbpa*^[23] (GenBank 登录号: BAA14946.1)、*glk*^[24] (GenBank 登录号: BAA16258.1) 进行分析。首先对 *lacI* 基因位点进行 PCR 分析, 结果如图 2 所示, 用引物 *lacIF* 和 *tetA-R* (*tet* 末端序列) 鉴定长度为 1 931 bp, 证明成功得到阳性重组菌 (图 2A)。从图 2B 中可以看到 500 bp 片段很容易被替换, 重组率为 85%–100%。长度增加至 1 000 bp, 重组率在 60%–80%, 外源片段为 2 000 bp 时, 同源重组的重组率约为 50%–60%。

2.3 *dbpa* 位点的 pSim6 与 *kil* 联用

接下来对 *dbpa* 位点进行分析, 用引物 *dbpaF* 和 *tetA-R* (*tet* 末端序列) 鉴定长度为 1 833 bp, 证明成功得到阳性重组菌 (图 3A)。同样挑选 23 个

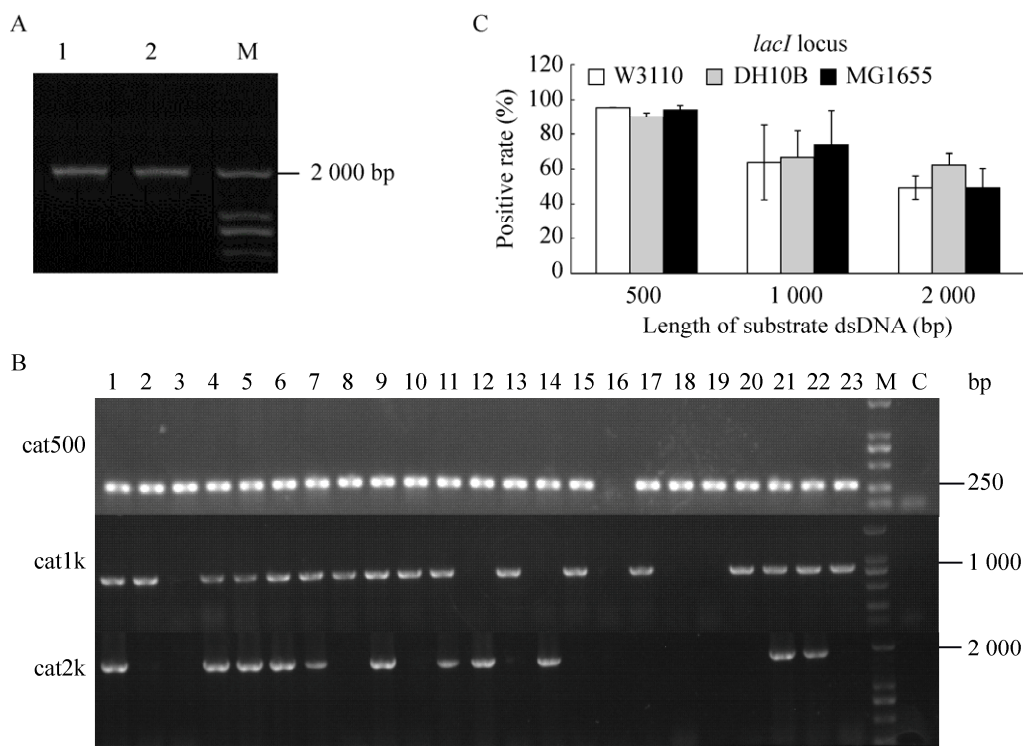


图 2 *lacI* 位点的重组效率分析

Fig. 2 Recombination efficiency analysis of *lacI* locus. (A) Identification of recombinants harboring *tet/kil* by PCR. 1 and 2: PCR identification of recombinants; M: DNA marker DL 2 000. (B) PCR detection of the *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. A total of 23 colonies (lane 1 to lane 23) were screened and a 268 bp (cat500), 780 bp (cat1k), or 1 767 bp (cat2k) product indicates successful substitution by donor dsDNA in the *lacI* locus. M: DNA marker DL 2 000; C: control. (C) Positive rates of *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. Results of three independent experiments mentioned above were analyzed and positive rates were calculated.

单克隆与 1 个未转外源片段单克隆作对照, 用引物 *catjdF* (外源片段上的基因序列) 与 *dbpaR* 扩增, 琼脂糖凝胶电泳并拍照观察正确条带。重复 3 次取平均值, 结果如图 3C 所示。从图 3B 观察到 500 bp 片段很容易被替换, 重组率高达 97% 以上, 长度增加至 1 000 bp, 重组率在 82%–95% 之间, 外源片段为 2 000 bp 时, 同源重组的重组率约为 75%–82%。

2.4 *glk* 位点的 pSim6 与 *kil* 联用

最后选择了在非必需基因 *glk* 位点进行分析,

用引物 *glkF* 和 *tetA-R* (*tet* 末端序列) 鉴定长度为 1 969 bp, 证明成功得到阳性重组菌 (图 4A)。同样挑选 23 个单克隆与 1 个未转外源片段单克隆作对照, 用引物 *catjdF* (外源片段上的基因序列) 与 *glkR* 扩增, 琼脂糖凝胶电泳并拍照观察正确条带。重复 3 次取平均值, 结果如图 4B 所示。从图 4C 观察到 500 bp 片段很容易被替换, 重组率高达 85% 以上, 长度增加至 1 000 bp, 重组率在 63%–100% 之间, 外源片段为 2 000 bp 时, 同源重组的重组率约为 42%–84%。

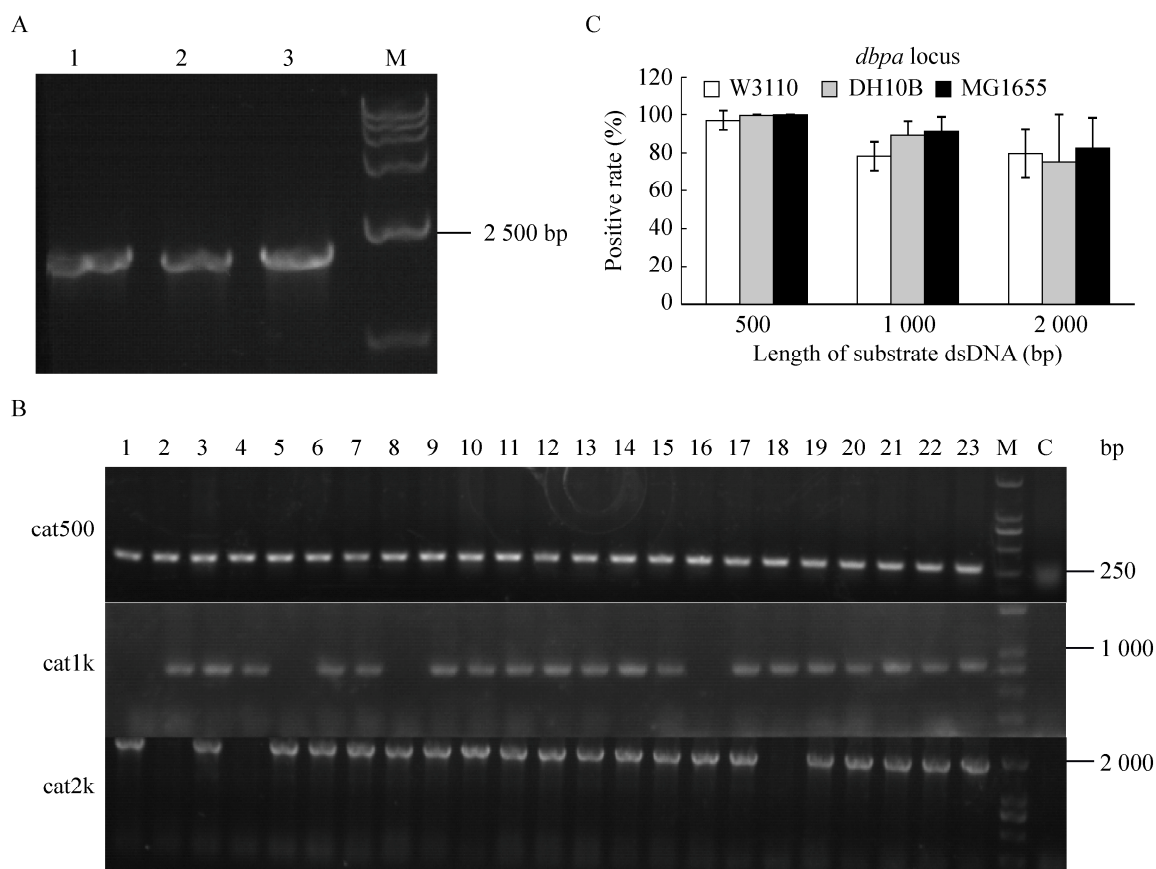


图 3 *dbpa* 位点的重组效率分析

Fig. 3 Recombination efficiency analysis of *dbpa* locus. (A) Identification of recombinants harboring *tet/kil* by PCR. 1–3: PCR identification of recombinants; M: DNA marker DL 15 000. (B) PCR detection of the *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. A total of 23 colonies (lane 1 to lane 23) were screened and a 234 bp (*cat500*), 746 bp (*cat1k*), or 1 733 bp (*cat2k*) product indicates successful substitution by donor dsDNA in the *dbpa* locus. M: DNA marker DL 2 000; C: control. (C) Positive rates of *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. Results of three independent experiments mentioned above were analyzed and positive rates were calculated.

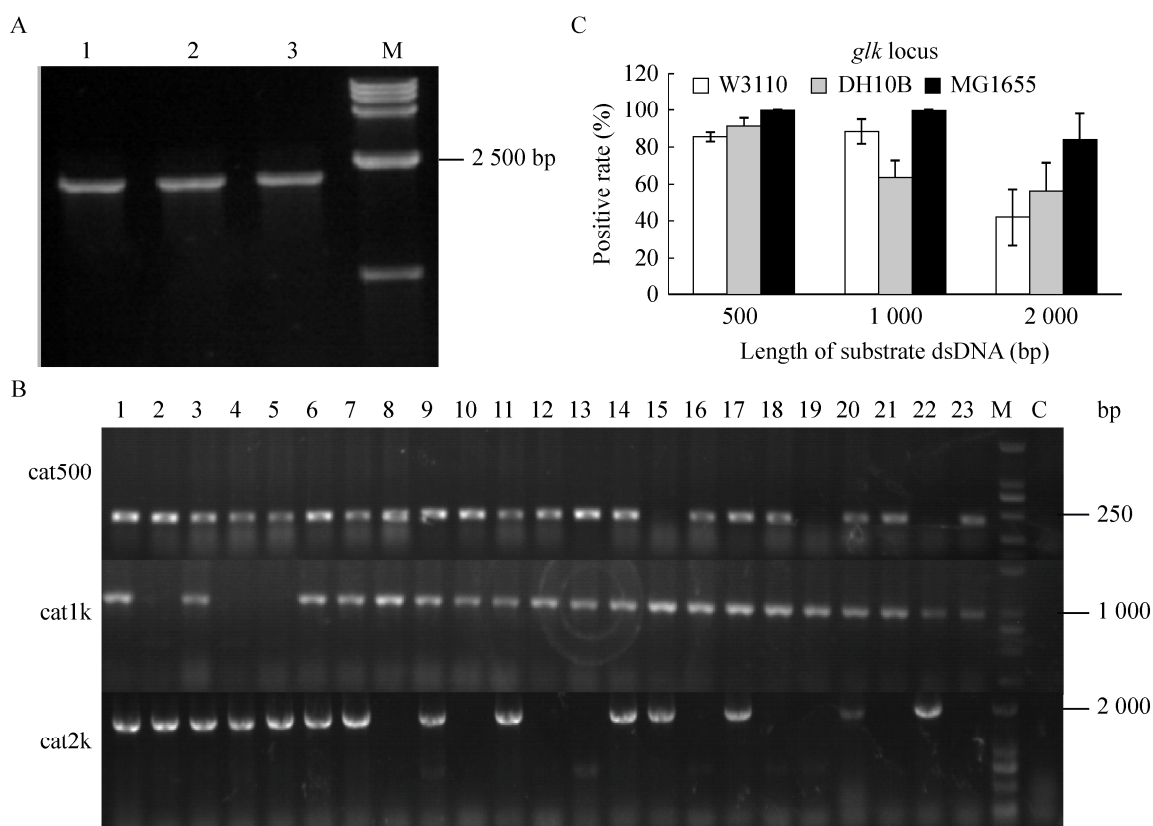


图4 *glk* 位点的重组效率分析

Fig. 4 Recombination efficiency analysis of *glk* locus. (A) Identification of recombinants harboring *tet/kil* by PCR. 1–3: PCR identification of recombinants; M: DNA marker DL 15 000. (B) PCR detection of the *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. A total of 23 colonies (lane 1 to lane 23) were screened and a 373 bp (cat500), 885 bp (cat1k), or 1 872 bp (cat2k) product indicates successful substitution by donor dsDNA in the *glk* locus. M: DNA marker DL 2 000; C: control. (C) Positive rates of *tet/kil* substitution using plasmid pSim6. Results of three independent experiments mentioned above were analyzed and positive rates were calculated.

3 讨论

重组工程是一种应用广泛的体内基因工程方法，它使 DNA 修饰变得简单有效，并对其修饰时不需要限制性内切酶。Datta 等^[25]构建了一系列的重组质粒，pSim6 是里面选择强度较高的质粒。它是从 pSim5 质粒衍生出来的，来源于严紧型复制质粒 pSC101，16 个低拷贝数，在质粒中保留了 Exo 下游的天然 tL3 转录终止子，这可以防止 Exo 的过度转录产物进入 *ori* 区域。质粒中的 Red 重组系统在温度敏感 (YS) 抑制因子 CI857 控制 pL 操纵子表达，在 30–34 °C 下抑制因子有活性从

而阻止 pL 操纵子表达，遏止 Red 重组酶的转录。温度短暂升至 42 °C，阻遏物瞬时变性，启动 Red 系统的表达；再回到低温时，阻遏基因重新复制，结合 pL 操纵子，重新阻遏 Red 系统。在多次实验中发现诱导 42 °C、15 min 为高效表达 Red 重组酶的最佳条件^[26]。相对比之前所用的 pKD46 质粒^[19]，不需要诱导物 (L-阿拉伯糖) 的诱导，且选择强度高，简捷方便。

为了在基因组工程中为反选基因提供一种替代方法，在本研究中我们使用了一种新型的反选标记基因 *kil*^[27]。*kil* 基因在低温条件下 (如 30 °C)，pL 被 cI857 抑制，从而抑制 *kil* 基因表达。

当温度升高至到 42 °C 时,因为失活的 cI857 阻遏蛋白不能阻遏 pL 启动子,启动了 *kil* 基因的转录和表达,最终造成了宿主菌的死亡。在之前的研究^[19]中已经对 *kil* 基因的选择严谨性在 3 个大肠杆菌菌株的 3 个位点进行了分析,发现其选择严谨性相对较高(几乎等同于 tet-sacB 选择反选择系统^[28])。因此我们将 pSim6 质粒与 *kil* 基因联合使用,在 3 个不同的大肠杆菌菌株 W3110、MG1655 和 DH10B 的 4 个非必需基因位点 *lacI*、*ack*、*dbpa* 和 *glk* 进行重组效率分析。两者联用后,与研究中 *kil* 重组效率相比较,从而得出以下结果:外源片段 500 bp 重组效率两者联用与之前 *kil* 均很高,在 80% 以上;当外源片段增加至 1 000 bp 时,联用后的重组效率约是之前 *kil* 基因的 1.2–2 倍;当外源片段增加至 2 000 bp 时,联用后的重组效率约是之前 *kil* 基因的 2.2–5 倍。

两者联用后重组效率增长的原因是未知的。可能来自 pSim6 的多个 cI 拷贝在未诱导的情况下赋予对 *kil* 基因更高水平的调控,因此在 42 °C 条件下 *kil* 蛋白可以高效表达进而有效地杀死宿主菌株。这种效率上的差异可能归因于 *kil* 基因的更高的选择严谨性。

随着基因工程发展越来越快,基因编辑的方法日益增加。从而,本研究用含有高效的 Red 重组系统的 pSim6 质粒通过与新颖的 *kil* 反选择系统这一技术融合,降低了反选择标记的高背景,同时提高了对基因无痕修饰重组效率。虽然诱导性毒素系统^[10]目前是反选择系统中最好的一种,在一些条件下,*kil* 的选择严谨性比不上诱导型毒素系统的选择严谨性,但是在该技术中不需要延长的孵育、特殊的试剂以及选择性条件,*kil* 基因除了有杀菌作用之外,还有抑菌的作用。这种思路在某些情况下还是有一定的优势,向研究者提供了更多的方向和方法。为代谢工程和功能基因组的分析研究缩短了时间,提高了效率,使大肠杆

菌的染色体改造更加便捷,从而推动了微生物科学的前进与发展。

REFERENCES

- [1] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*, 2009, 4(2): 206–223.
- [2] Jeong J, Cho N, Jung D, et al. Genome-scale genetic engineering in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 804–810.
- [3] Egan M, Ramirez J, Xander C, et al. Lambda Red-mediated recombineering in the attaching and effacing pathogen *Escherichia albertii*. *Biol Proced Online*, 2016, 18: 3.
- [4] Poteete AR. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 201(1): 9–14.
- [5] Yu DG, Sawitzke JA, Ellis H, et al. Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7207–7212.
- [6] Yu DG, Ellis HM, Lee EC, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5978–5983.
- [7] Ellis HM, Yu DG, DiTizio T, et al. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6742–6746.
- [8] Li XT, Costantino N, Lu LY, et al. Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(22): 6674–6687.
- [9] Lalioti MD, Heath JK. A new method for generating point mutations in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(3): e14.
- [10] Khetrpal V, Mehershahi K, Rafee S, et al. A set of powerful negative selection systems for unmodified enterobacteriaceae. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(13): e83.
- [11] Madyagol M, Al-Alami H, Levarski Z, et al. *Gene*

- replacement techniques for *Escherichia coli* genome modification. *Folia Microbiol (Praha)*, 2011, 56(3): 253–263.
- [12] Wong QNY, Ng VCW, Lin MCM, et al. Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(6): e59.
- [13] Gregg CJ, Lajoie MJ, Napolitano MG, et al. Rational optimization of *tolC* as a powerful dual selectable marker for genome engineering. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(7): 4779–4790.
- [14] DeVito JA. Recombineering with *tolC* as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(1): e4.
- [15] Stavropoulos TA, Strathdee CA. Synergy between *tetA* and *rpsL* Provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors. *Genomics*, 2001, 72(1): 99–104.
- [16] Muyrers JPP, Zhang YM, Benes V, et al. Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep*, 2000, 1(3): 239–243.
- [17] Wang HL, Bian XY, Xia LQ, et al. Improved seamless mutagenesis by recombineering using *ccdB* for counterselection. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(5): e37.
- [18] Chen W, Li YJ, Wu GJ, et al. Simple and efficient genome recombineering using *kil* counter-selection in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2019, 294: 58–66.
- [19] 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.
- [20] Warren DJ. Preparation of highly efficient electrocompetent *Escherichia coli* using glycerol/mannitol density step centrifugation. *Anal Biochem*, 2011, 413(2): 206–207.
- [21] Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, et al. Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda Red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2015, 81(15): 5103–5114.
- [22] Malakar P, Singh VK, Karmakar R, et al. Effect on β -galactosidase synthesis and burden on growth of osmotic stress in *Escherichia coli*. *Springerplus*, 2014, 3: 748.
- [23] Liu RT, Wang GR, Liu C, et al. Gene expression profile analysis of *dbpA* knockdown in colorectal cancer cells. *Cell Biol Int*, 2016, 40(12): 1280–1293.
- [24] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2506–2514.
- [25] Datta S, Costantino N, Court DL. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene*, 2006, 379: 109–115.
- [26] Chen W. The application of Red engineering on *Escherichia coli*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2005 (in Chinese).
陈伟. Red 重组工程技术在大肠杆菌中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2005.
- [27] Haeusser DP, Hoashi M, Weaver A, et al. The *kil* peptide of bacteriophage lambda blocks *Escherichia coli* cytokinesis via ZipA-dependent inhibition of FtsZ assembly. *PLoS Genet*, 2014, 10(3): e1004217.
- [28] Li XT, Thomason LC, Sawitzke JA, et al. Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(22): e204.

(本文责编 陈宏宇)