

温度诱导 Targetron 系统用于大肠杆菌高效基因失活

赵行行¹, 程玉梅², 吴昌学¹, 任玮³, 饶凤琴¹, 周倩¹, 崔古贞⁴, 齐晓岚¹, 洪伟¹

1 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004

2 贵州医科大学 附属医院 ICU, 贵州 贵阳 550004

3 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004

4 贵州医科大学 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550025

赵行行, 程玉梅, 吴昌学, 等. 温度诱导 Targetron 系统用于大肠杆菌高效基因失活. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1659–1671.

Zhao XX, Cheng YM, Wu CX, et al. A temperature-inducible Targetron system for efficient gene inactivation in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1659–1671.

摘要: 构建基于 TeI3c/4c 嗜热二型内含子的温度诱导 Targetron 基因失活系统 (Thermotargetron), 并应用于中温微生物基因编辑。在大肠杆菌 HMS174 (DE3) 基因组中, 选择 Subunit of flagellum 基因 (*fliC*) 和 C4 dicarboxylate orotate:H⁺ symporter 基因 (*dctA*) 为靶基因。根据 TeI3c/4c DNA 识别规则, 在 *fliC* 和 *dctA* 基因中选择 *fliC*489a、*fliC*828s、*fliC*1038s 和 *dctA*2a 位点为基因打靶位点。使用重叠延伸 PCR 方法, 基于 pHK-TT1A 质粒构建打靶载体。打靶载体转化 HMS174 菌株, 对数期转化子培养液 48 °C 热激 1 h 后涂布于氯霉素抗性 LB 平板上。使用菌落 PCR 和 DNA 测序检测突变株并计算基因失活效率。获得突变株后, 通过琼脂穿刺和碳源代谢实验, 鉴定 $\Delta fliC$ 、 $\Delta dctA$ 突变株表型变化。菌落 PCR 测序结果表明, TeI3c/4c 插入到 *fliC* 和 *dctA* 基因设计位点, 且打靶效率高达 100%。突变株表型验证实验表明, $\Delta fliC$ 突变株运动能力显著下降, $\Delta dctA$ 突变株苹果酸代谢能力缺失。综上所述, 文中建立了一套适用于嗜中温生物的温度诱导型、高效基因失活系统, 该系统可通过控制宿主菌在 48 °C 保温时间实现高效、靶向、精准基因失活。

关键词: 嗜热 targetron, II 型内含子, 温度诱导, 基因失活, 大肠杆菌, *fliC*, *dctA*

A temperature-inducible Targetron system for efficient gene inactivation in *Escherichia coli*

Xingxing Zhao¹, Yumei Cheng², Changxue Wu¹, Wei Ren³, Fengqin Rao¹, Qian Zhou¹, Guzhen Cui⁴, Xiaolan Qi¹, and Wei Hong¹

1 Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

2 Department of ICU, The Affiliate Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

3 Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

4 Department of Microbiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: To construct TeI3c/4c-based and temperature-inducible gene inactivation system (Thermotargetron) and to apply

Received: December 9, 2019; **Accepted:** February 26, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31560318, 31760318), Natural Science Foundation of Guizhou Province (Nos. [2020]1Z067, [2019]1441, [2018]1132, [2018]5779-17).

Corresponding authors: Wei Hong. Tel: +86-851-86752814; E-mail: hongwei@gmc.edu.cn

Xiaolan Qi. Tel: +86-851-86752814; E-mail: xiaolan76@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 31560318, 31760318), 贵州省自然科学基金 (Nos. [2020]1Z067, [2019]1441, [2018]1132, [2018]5779-17) 资助。

网络出版时间: 2020-03-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200316.1434.001.html>

it to gene inactivation of mesophilic bacteria. The subunit of flagellum (*fliC*) and C4 dicarboxylate orotate:H⁺ symporter (*dctA*) genes were chosen as targets in the genome of *Escherichia coli* HMS174 (DE3) strain. According to recognition roles of TeI3c/4c intron, the *fliC*489a, *fliC*828s, *fliC*1038s and *dctA*2a sites were chosen as target sites. Gene-targeting plasmids were constructed based on pHK-TT1A by using overlap PCR method and transformed into HMS174 cells. An aliquot mid-log phase cultures of the transformants were shocked at 48 °C and plated on LB plate (containing chloramphenicol). Afterwards, gene mutants were screened by using colony PCR and DNA sequencing. After the mutants were obtained, the phenotypes of Δ *fliC* and Δ *dctA* gene mutants were characterized by using agar puncture and carbon metabolism experiments. Colony PCR and sequencing results show that TeI3c/4c intron was inserted in the designed sites of *fliC* and *dctA* genes. The gene-targeting efficiency of Thermotargetron system was 100%. Phenotype verification experiments of the mutants demonstrated that the cell motility of all Δ *fliC* mutants was damaged and the malate assimilation ability of Δ *dctA* mutant was deprived comparing to wild-type HMS174 strain. In our study, a temperature-inducible and high-efficiency gene inactivation system was established for mesophilic bacteria. This system could achieve high efficiency and precise gene inactivation by modulation of the incubation duration of the transformants at 48 °C.

Keywords: Thermotargetron, group II intron, temperature inducible, gene inactivation, *Escherichia coli*, *fliC*, *dctA*

可迁移二型内含子 (Mobile group II intron) 是自我拼接内含子的一个亚类, 具有在基因组 DNA 中自发迁移的能力, 其迁移过程具有靶向性, 并且这种靶向性可以通过突变二型内含子靶位点识别序列而改变, 因此具有改造成为基因打靶系统的潜力^[1-2]。2001 年 Karberg 等利用来源于乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 的二型内含子元件 L1.LtrB, 构建了一套靶向基因失活系统, 实现了中温微生物基因的靶向失活^[3-7]。2007 年, Heap 等进一步发展了这种基因靶向失活系统并将其命名为 ClosTron^[8]。ClosTron 系统具有不依赖很高的外源 DNA 转化效率、基因失活效率高和操作简单等优点, 适合用于外源 DNA 转化效率低的微生物基因编辑。然而, ClosTron 系统也存在一定的局限性: (1) 在中温微生物中使用 ClosTron 系统, 需要首先构建适用于该中温微生物的诱导表达系统, 以严格控制 L1.LtrB 元件的表达量 (间接控制其活性), 否则 L1.LtrB 元件会多拷贝插入靶基因组中, 出现“脱靶”现象^[9]。(2) ClosTron 系统在高温条件下 (48–60 °C), 因 L1.LtrB 元件失活, 不能正常工作^[10]。

为了克服 ClosTron 系统存在的不足, 我们前期研究中使用来源于嗜热聚球藻 *Thermosynechococcus elongatus* 的 TeI3c/4c 二型内

含子 (II B 亚类) 开发了温敏 Targetron 系统——Thermotargetron^[10](图 1)。该系统由嗜热二型内含子 RNA (TeI3c/4c) 和逆转录酶 (Reverse transcriptase, RT) 组成^[11]。其中, TeI3c/4c 通过碱基互补配对原则识别基因组 DNA 双链上的靶位点, RT 具有逆转录酶和脱氧核糖核酸内切酶的活性^[12-13]。TeI3c/4c 和 RT 共同组装成为核糖核蛋白复合体(RNP)。RNP 通过“归巢 (Retrohoming)”特异性插入靶基因组位点, 其过程如下 (图 1): (A) RNP 中 TeI3c/4c 识别基因组 DNA 靶位点; (B) RT 切割靶位点双链 DNA 并以内含子 RNA 为模板合成 cDNA (逆转录酶); (C) 将新合成 TeI3c/4c 的 cDNA 插入到靶位点。由于二型内含子编码序列中含有较多的终止密码子且转录成 RNA 后含有许多发夹结构, 因此可以实现靶基因在翻译水平失活。

值得注意的是 Thermotargetron 核心元件 TeI3c/4c 二型内含子只在高温时 (48–60 °C) 具有“归巢”活性。因此, Thermotargetron 具有 2 个特征: (1) 适用于嗜热微生物基因失活^[14]; (2) 在可耐高温的中温微生物中, 具有温度诱导特征。温度诱导属于物理诱导, 相比 ClosTron 系统的化学诱导, 具有易实现 (无需从头构建诱导表达系统)、更精确 (精确控制保温时间)

和更直接 (直接控制 TeI3c/4c 活性) 等优点。除此之外 Thermotargetron 系统识别序列为 “AAnnnnnnnnnnnnA”, 对于 GC 含量比较低的中

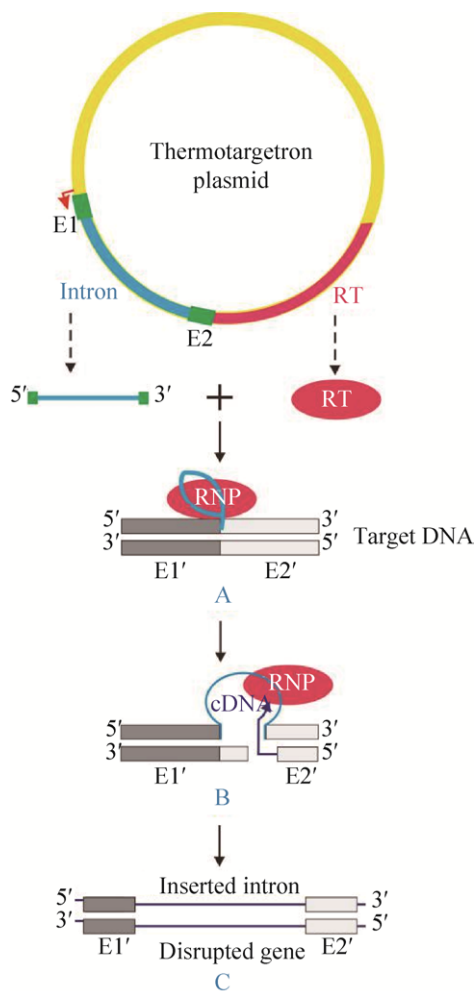


图 1 Thermotargetron 基因“打靶”原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the Thermotargetron system. (A) The mature ribonucleoprotein complex (RNP) was composed of the group II intron RNA (TeI3c/4c) and its RT enzyme. RNP recognizes the target DNA by the principle of base complementary pairing (mainly by TeI3c/4c), and the recognition target is “5'-AAnnnnnnnnnnnnA-3'” (16 bases in total, $n=A, T, G$ or C). (B) The TeI3c/4c intron sequence was reverse transcribed into cDNA and inserted into the target site by the reverse splicing process. (C) DNA gaps were repaired by the host DNA repairing system. As the TeI3c/4c cDNA sequence contains stop codons and could easily form hairpins after transcription, thus the translation of the target gene is terminated at translation level.

温微生物具有更多的靶点可供选择, 即其更适合低 GC 含量微生物的基因打靶。本研究利用来源于热纤梭菌 groEL 启动子表达 Thermotargetron 核心元件 TeI3c/4c 二型内含子, 以 HMS174 (DE3) 为可耐高温的中温微生物模型, 并以其 *fliC* 和 *dctA* 基因为靶基因, 验证温度诱导型 Thermotargetron 基因失活系统的可行性, 为中温微生物的基因编辑提供新的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和培养基配方

氯化钠 (NaCl)、酵母提取物 (Yeast extract)、胰蛋白胨 (Tryptone)、琼脂粉 (Agar power)、氯霉素 (Chloramphenicol, Chl)、七水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氯化铵 (NH_4Cl)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、硫酸镁 (MgSO_4)、氯化钙 (CaCl_2)、葡萄糖 (Glucose) 和 L-苹果酸 (L-malic acid) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司 (Aladdin, 上海)。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司 (TIANGEN, 北京); *BsiW I*-HF (R3133L) 和 *Spe I*-HF (R3553L) 购自 New England BioLabs (NEB, 北京)。所有引物合成及测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司 (Sangon Biotech, 上海) 完成。

Luria-Bertani (LB) 培养基: 氯化钠 10 g、酵母提取物 5 g、胰蛋白胨 10 g, 定容至 1 L。在转化子筛选时, 向培养基中添加终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素。M9 培养基: 5 \times M9 培养基母液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g、NaCl 0.5 g、 NH_4Cl 1 g 和 KH_2PO_4 3 g), 突变株表型鉴定时加入 0.2% (W/W) 葡萄糖或苹果酸, 其中 MgSO_4 、 CaCl_2 、葡萄糖和 L-苹果酸均溶解于 ddH_2O , 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.1.2 菌株与培养条件

大肠杆菌 *Escherichia coli* NEBExpress 高效

感受态 (NEB, 北京) 作为分子克隆和质粒构建的宿主细胞。Thermotargetron 基因打靶实验在大肠杆菌 HMS174 (DE3) 细胞中进行 (诺禾致源科技股份有限公司, Novogene, 北京), 以下简称 HMS174。E. coli NEBExpress、E. coli HMS174 菌株在 LB 培养基中, 37 °C 好氧培养。LB 培养基中加入氯霉素 (10 µg/mL, LB-Chl) 以筛选转化子。本研究用到的所有大肠杆菌菌株在 7% (V/V) 二甲基亚砜中长期冻存 (-80 °C)。

1.2 方法

1.2.1 目标基因打靶引物的设计

从 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库中获得 HMS174 菌株 *fliC* 和 *dctA* 基因序列。根据 TeI3c/4c 识别位点规律“5'-AAAnnnnnnnnnnnA-3'”位点设计 HMS174

fliC 和 *dctA* 基因打靶载体引物 (表 1)。每个打靶位点需要设计 4 条引物, 即内含子结合位点 12 (Intron-binding site 12, IBS12)、外显子正义链结合位点 2 (Exon-binding site 2 sense, EBS2s)、外显子反义链结合位点 1 (Exon-binding site 1 antisense, EBS1a) 和通用引物 (TeI3c-universal primer, TeI3c-UNV)。

1.2.2 质粒构建

打靶质粒构建过程需要进行两次 PCR 反应和一次连接反应。第一次 PCR 以 pHK-TT1A 质粒为模板 (表 2), IBS12/TeI3c-UNV 和 EBS2s/EBS1a 作引物分别进行扩增; 第二次 PCR 反应以上一次 PCR 产物作为模板, IBS12 与 EBS1a 作为引物, 将第一次 PCR 产物连接成为一个携带与目标基因互补配对的基因打靶片段。基因打靶片段与

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer | Sequence (5'-3') | Description |
|------------------------|--|-------------------------------------|
| TeI3c-UNV | TAACGAGGCTTCTAGCG | Universal primer |
| <i>fliC</i> 489aIBS12 | AGCCAAAGCAGGTTGACTAGTAAgagtttagcatcGTGCGACGCGAAAGCTAG | <i>fliC</i> 489a targeting primers |
| <i>fliC</i> 489aEBS2s | CGCTAGAAGCCTCGTTAaactcAGCAGGCCAAAGATGCTG | |
| <i>fliC</i> 489aEBS1a | CGGAGTTGCTGTCCCCGTACGCTGAagcatcAGCAGCGtATCCAATCC | |
| <i>fliC</i> 828sIBS12 | AGCCAAAGCAGGTTGACTAGTAAaactactaaagctGTGCGACGCGAAAGCTAG | <i>fliC</i> 828s targeting primers |
| <i>fliC</i> 828sEBS2s | CGCTAGAAGCCTCGTTAtagtaAGCAGGCCAAAGATGCTG | |
| <i>fliC</i> 828sEBS1a | CGGAGTTGCTGTCCCCGTACGCTGAaaagctAGCAGCGTATCCAATCC | |
| <i>fliC</i> 1038sIBS12 | AGCCAAAGCAGGTTGACTAGTAAaactattaccatGTGCGACGCGAAAGCTAG | <i>fliC</i> 1038s targeting primers |
| <i>fliC</i> 1038sEBS2s | CGCTAGAAGCCTCGTTAtagttAGCAGGCCAAAGATGCTG | |
| <i>fliC</i> 1038sEBS1a | CGGAGTTGCTGTCCCCGTACGCTGAacctatAGCAGCGTATCCAATCC | |
| <i>dctA</i> 2aIBS12 | AGCCAAAGCAGGTTGACTAGTAAcagagaggtttcGTGCGACGCGAAAGCTAG | <i>dctA</i> 2a targeting primers |
| <i>dctA</i> 2aEBS2s | CGCTAGAAGCCTCGTTActctgAGCAGGCCAAAGATGCTG | |
| <i>dctA</i> 2aEBS1a | CGGAGTTGCTGTCCCCGTACGCTGAgtttcAGCAGCGtATCCAATCC | |
| DP <i>fliC</i> -F | AATTACAGTCAGGACGCGT | <i>fliC</i> gene detection primers |
| DP <i>fliC</i> -R | ATGTGACCGGGTTAGCC | |
| DP <i>dctA</i> -F | CCGCAGGTACCCATAAC | <i>dctA</i> gene detection primers |
| DP <i>dctA</i> -R | CACTCGGGGAAGGGAGT | |
| DPjunction-U | GAGGAGGTGGGAAAAAGCGA | junction detection primers |
| DPjunction-D | TCGCTTTTTCCACCTCCTC | |

表 2 文中所用菌株及质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Relevant features | Source or reference |
|--|--|---------------------|
| Strains | | |
| NEB Express Competent <i>E. coli</i> (High efficiency) | <i>fhuA2 [Ion] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2[dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S)endA1delta(mcrC-mrr)114::lS10</i> | NEB |
| <i>E. coli</i> HMS174(DE3) | F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) (DE3) (Rif ^R) | Novogene |
| Δ <i>fliC</i> 489a | Derived from <i>E. coli</i> HMS174(DE3), Δ <i>fliC</i> 489a | This work |
| Δ <i>fliC</i> 828s | Derived from <i>E. coli</i> HMS174(DE3), Δ <i>fliC</i> 828s | This work |
| Δ <i>fliC</i> 1038s | Derived from <i>E. coli</i> HMS174(DE3), Δ <i>fliC</i> 1038s | This work |
| Δ <i>dctA</i> 2a | Derived from <i>E. coli</i> HMS174(DE3), Δ <i>dctA</i> 2a | This work |
| Plasmids | | |
| pHK-TT1A | Targetron vector, GroEL promoter, Cm ^R | [10] |
| pHK-TT1A- <i>fliC</i> 489a | Derived from pHK-TT1A, targeting the antisense strand 489 site of <i>fliC</i> in HMS174(DE3) | This work |
| pHK-TT1A- <i>fliC</i> 828s | Derived from pHK-TT1A, targeting the sense strand 828 site of <i>fliC</i> in HMS174(DE3) | This work |
| pHK-TT1A- <i>fliC</i> 1038s | Derived from pHK-TT1A, targeting the sense strand 1038 site of <i>fliC</i> in HMS174(DE3) | This work |
| pHK-TT1A- <i>dctA</i> 2a | Derived from pHK-TT1A, targeting the antisense strand 2 site of <i>dctA</i> in HMS174(DE3) | This work |

*Bsi*W I -HF 和 *Spe* I -HF 线性化的 pHK-TT1A 载体, 使用 T5 exonuclease DNA assembly 方法 (TEDA) 进行重组连接^[15]。重组质粒送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.2.3 打靶质粒转化及突变株筛选

测序验证正确的 Thermotargetron 打靶质粒使用化学热激法转化 HMS174 感受态细胞, 并涂布于 LB-Chl 平板以筛选转化子。单个转化子挑取至 LB-Chl 液体培养基中培养过夜。培养过夜物稀释 100 倍后, 置于 1.5 mL 无菌离心管中, 37 °C 继续培养 1 h, 随后将培养温度提高到 48 °C, 热激 1 h (关键步骤, 激活 TeI3c/4c“归巢”活性)。热激后的培养液, 稀释 100 倍后, 均匀涂布于 LB-Chl 平板上, 37 °C 过夜培养, 平板上形成菌落待 PCR 验证。

上一步实验获得的菌落, 使用 *fliC* 和 *dctA* 检测引物 (表 1), PCR 检测是否发生 TeI3c/4c 插入突变。使用 Green Taq Mix 试剂盒进行 PCR (诺唯赞, 南京), 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 延伸 150 s, 30 次循环; 72 °C

5 min, 4 °C 10 min。基因失活效率根据如下公式计算:

基因失活效率=突变株数量/检测菌株数量。

1.2.4 质粒丢失

基因失活突变株通过连续在无抗性培养基中传代的方法丢失质粒, 过程如下: 吸取 50 μ L 突变株培养液 (OD_{600} =0.8–1.2) 到 5 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 8 h, 培养物在相同培养基中连续转接 10 次, 最后划线于 LB 平板上。待平板长出单克隆后, 使用影印平板法^[16], 将同一克隆挑取至 LB-Chl 和 LB 平板上, 并置于恒温培养箱 37 °C 培养 24 h。质粒丢失效率使用如下公式计算: 丢失氯霉素抗性克隆数/总检测克隆数。

1.2.5 突变株表型检测

突变株运动能力检测方法如下: 将野生型 HMS174 与 Δ *fliC* 突变株穿刺接种于含有 0.8% (W/V) 琼脂的 LB 半固体培养基的试管中, 37 °C 恒温培养过夜, 穿刺培养管使用佳能 G11 相机拍照记录。苹果酸代谢能力检测方法: 野生型 HMS174 与 Δ *dctA* 突变株经 LB 培养基活化, 以

1%接种量 (V/V) 接种于含 0.2%葡萄糖的 M9 液体培养基中, 培养至对数生长中期 ($OD_{600}=0.5-0.8$) 以去除 LB 培养基中痕量苹果酸^[17]。培养物转接至含 0.2%苹果酸作为唯一碳源的 M9 液体培养基中, 200 r/min、37 °C 培养 24 h, 定时取样, 测定 OD_{600} 值。

2 结果与分析

2.1 基因打靶位点设计

HMS174 *fliC* 基因 (ECHMS174_01916) 和 *dctA* 基因 (ECHMS174_03796) 全长分别为 1 497 bp 和 1 287 bp (图 2A)。在 *fliC* 基因中选择位点符合 TeI3c/4c 识别规律的 *fliC*489a (5'-AAgagtttagcatcA-3')、*fliC*828s (5'-AAactactaaagctA-3')和 *fliC*1038s (5'-AAaactattacctatA-3') 位点。

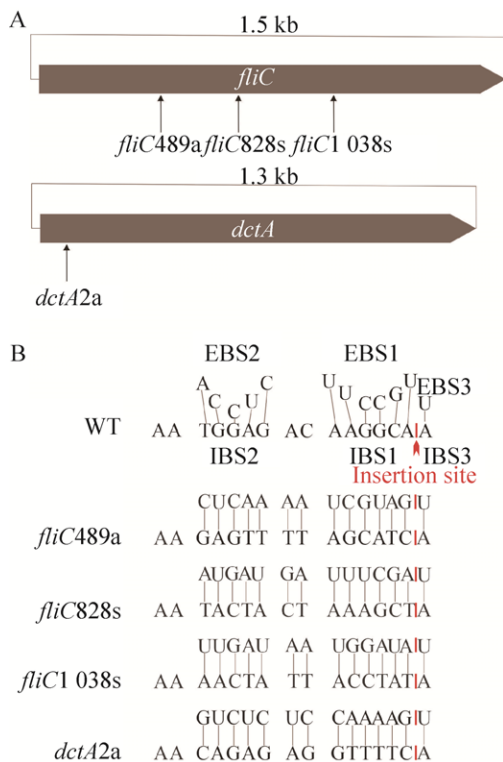


图2 HMS174 *fliC* 与 *dctA* 基因中的 Thermotargetron 打靶识别位点

Fig. 2 Gene targeting sites in *fliC* and *dctA* genes. (A) Gene targeting sites in *fliC* and *dctA* genes. (B) The bases composition of *fliC*489a, *fliC*828s, *fliC*1038s and *dctA*2a targeting sites.

在 *dctA* 基因中选择 *dctA*2a (5'-AAcagagaggttttcA-3') 位点。使用 PCR 突变野生型 TeI3c/4c IBS1、IBS2、EBS1 和 EBS2 位点, 构建针对 *fliC*489a、828s、1038s 和 *dctA*2a 四个识别位点的打靶质粒 pHK-TT1A-*fliC*489a、pHK-TT1A-*fliC*828s、pHK-TT1A-*fliC*1038s 和 pHK-TT1A-*dctA*2a (图 2B)。

2.2 Thermotargetron 打靶质粒构建

以 pHK-TT1A-*fliC*489a 打靶载体构建过程为例 (图 3), 详述 Thermotargetron 打靶质粒的构建过程如下: (1) 以 pHK-TT1A 为载体模板, 使用 *fliC*489aIBS12/TeI3c-UNV, *fliC*489aEBS2s/*fliC*489aEBS1a 引物 (表 1), PCR 扩增获得 IBS1/2 和 EBS1/2 突变片段, 其长度分别为 296 bp (IBS1/2) 和 114 bp (EBS1/2) (图 4A)。第二次通过重叠延伸 PCR 反应, 以 *fliC*489aIBS12/*fliC*489aEBS1a 为引物, 上一步 PCR 获得的 IBS1/2 和 EBS1/2 突变片段为模板, 重叠延伸 PCR 扩增获得打靶片段 (393 bp) (图 4B)。打靶片段与线性化的 pHK-TT1A 载体 (*Bsi*W I -*Spe* I 双酶切), 使用 TEDA 法重组连接^[15], 获得 pHK-TT1A-*fliC*489a 打靶质粒。使用相同的方法构建 pHK-TT1A-*fliC*828s、pHK-TT1A-*fliC*1038s 和 pHK-TT1A-*dctA*2a 打靶质粒, 测序结果表明 4 个打靶质粒均构建成功。

2.3 突变株筛选

使用 HMS174 *fliC* 和 *dctA* 两侧检测引物 (DP*fliC*-F/DP*fliC*-R 和 DP*dctA*-F/DP*dctA*-R, 表 1) PCR 鉴定经 48 °C 热激诱导 1 h 后的转化子, 突变株 PCR 扩增条带比野生型菌株增加 839 bp, 检测结果表明 TeI3c/4c 二型内含子成功失活 *fliC* (1 558 vs. 2 397bp) 和 *dctA* 基因 (1 376 vs. 2 215 bp), 且 4 个打靶质粒基因失活效率均为 100% (表 3, 每个打靶位点检测 15 个克隆)。测序结果表明, TeI3c/4c 二型内含子插入到 HMS174 Δ *fliC*489a (图 5A)、 Δ *fliC*828s (图 5B)、 Δ *fliC*1038s (图 5C) 和 Δ *dctA*2a (图 5D) 突变株基因组中的设计位点 (图 5)。

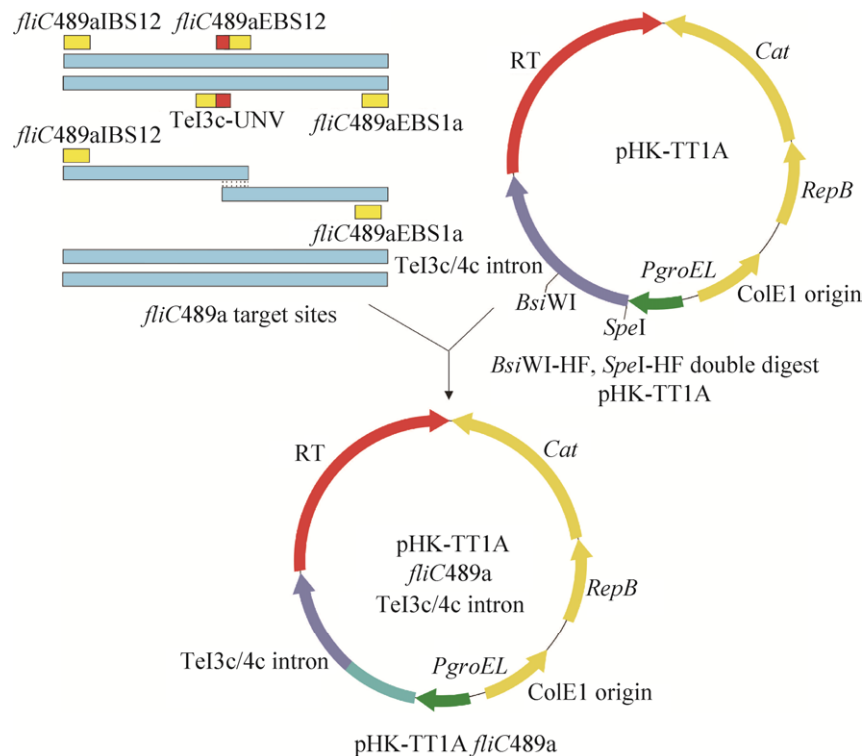


图 3 Thermotargetron 载体构建

Fig. 3 The construction of Thermotargetron gene-targeting vectors. Two rounds of PCRs were carried to construct pHK-TT1A-*fliC489a* plasmid, which targeting *fliC* gene. Firstly, *fliC489a*IBS12/Tel3c-UNV and *fliC489a*EBS2s/*fliC489a*EBS1a primer pairs were used to generate mutations in IBS1/2, EBS1/2 sites of wild-type Tel3c/4c intron, which produce 296 bp and 114 bp amplicons. Secondly, the 296 bp and 114 bp amplicons were assembled together by using overlap PCR, in which *fliC489a*IBS12/*fliC489a*EBS1a primers were used. The overlap PCR produce 393 bp amplicon, which containing desire mutations for targeting *fliC* gene. Finally, 393 bp amplicon were assembled with *BsiWI*-*SpeI* linearized pHK-TT1A plasmid by using TEDA method and the resultant plasmid was denoted pHK-TT1A-*fliC489a*. Same work flow was carried out to construct pHK-TT1A-*fliC828s*, pHK-TT1A-*fliC1038s* and pHK-TT1A-*dctA2a* plasmids.

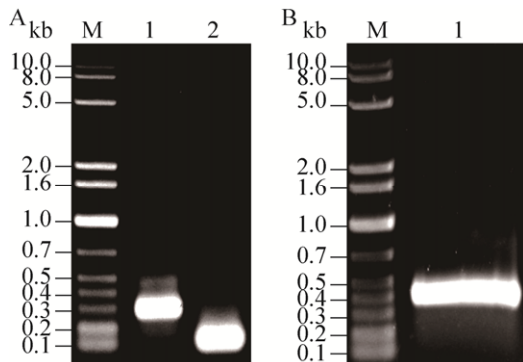


图 4 两轮 PCR 突变 TeI3c/4c 靶序列识别位点

Fig. 4 Mutate TeI3c/4c gene-targeting sites by two-rounds PCRs. (A) Amplicons containing mutated IBS1/2 (296 bp) and EBS1/2 (114 bp) sites. (B) Assemble 296 bp and 114 bp amplicons, containing mutated IBS1/2 and EBS1/2 sites, by using overlap PCR, which produce the gene-targeting fragment.

表 3 Thermotargetron 基因失活效率

Table 3 Gene inactivation efficiency of Thermotargetron system

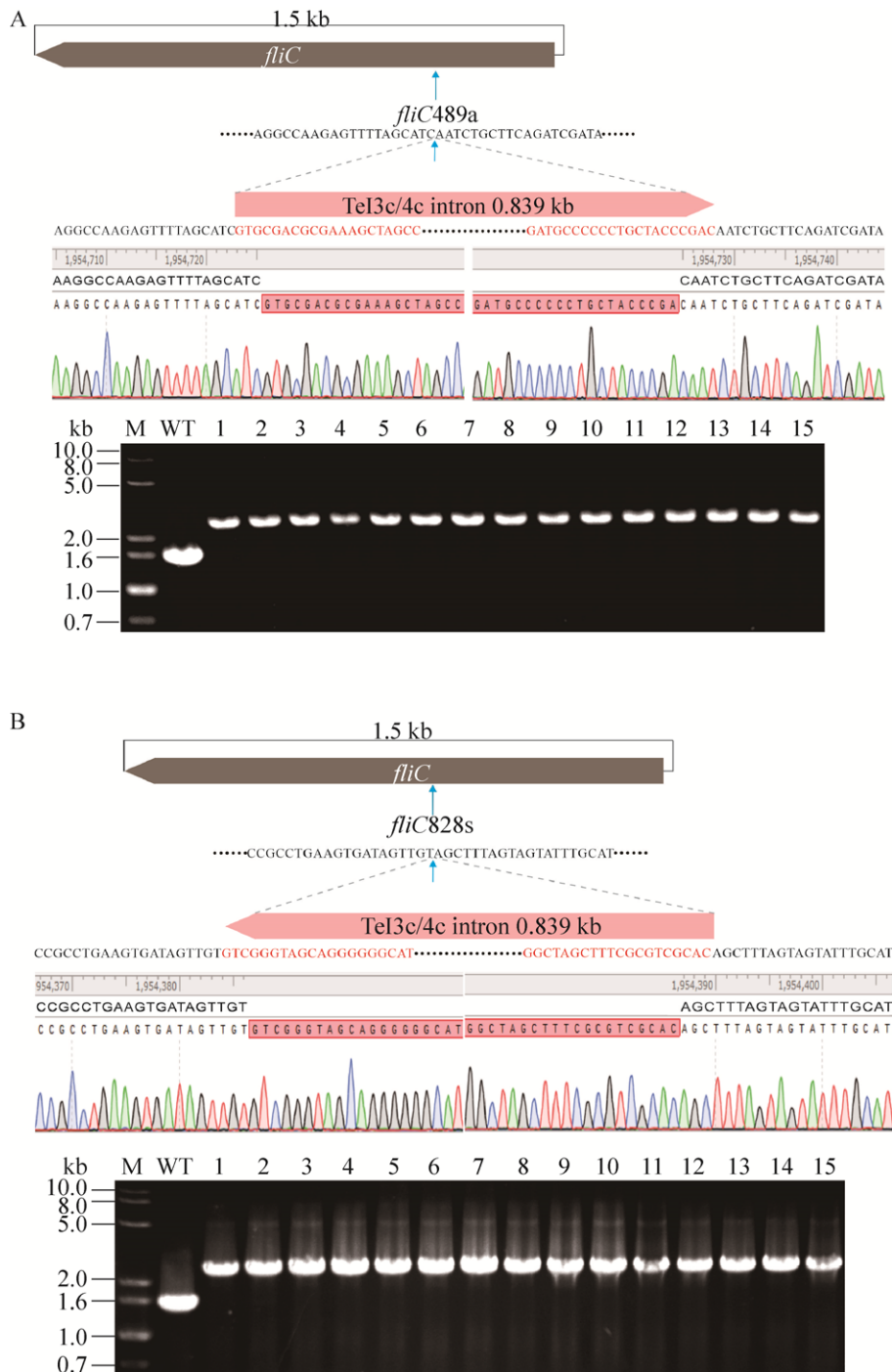
| Mutant strain | Target sites | Gene inactivation efficiency (%) |
|--------------------|----------------|----------------------------------|
| $\Delta fliC489a$ | GAGTTTTAGCATC | 100 |
| $\Delta fliC828s$ | TACTACTAAAGCT | 100 |
| $\Delta fliC1038s$ | AACTATTACCTAT | 100 |
| $\Delta dctA2a$ | CAGAGAGGTTTTTC | 100 |

2.4 质粒丢失

筛选获得的大肠杆菌 HMS174 $\Delta fliC489a$ 、 $\Delta fliC828s$ 、 $\Delta fliC1038s$ 和 $\Delta dctA2a$ 突变株仍携带其基因打靶质粒 (分别为 pHK-TT1A-*fliC489a*、pHK-TT1A-*fliC828s*、pHK-TT1A-*fliC1038s* 和

pHK-TT1A-*dctA2a*)。该突变株连续 10 次无抗性培养传代后, 使用克隆平板法筛选在有抗性的平板上不能生长, 而在无抗性平板上能生长的为质粒丢失单克隆。如图 6 所示, 经过连续 10 次无抗

性培养传代后, 大肠杆菌 HMS174 Δ *fliC489a*、 Δ *fliC828s*、 Δ *fliC1038s* 和 Δ *dctA2a* 突变株质粒成功丢失 (质粒丢失效率为 100%, 每个突变株检测 15–24 个克隆)。



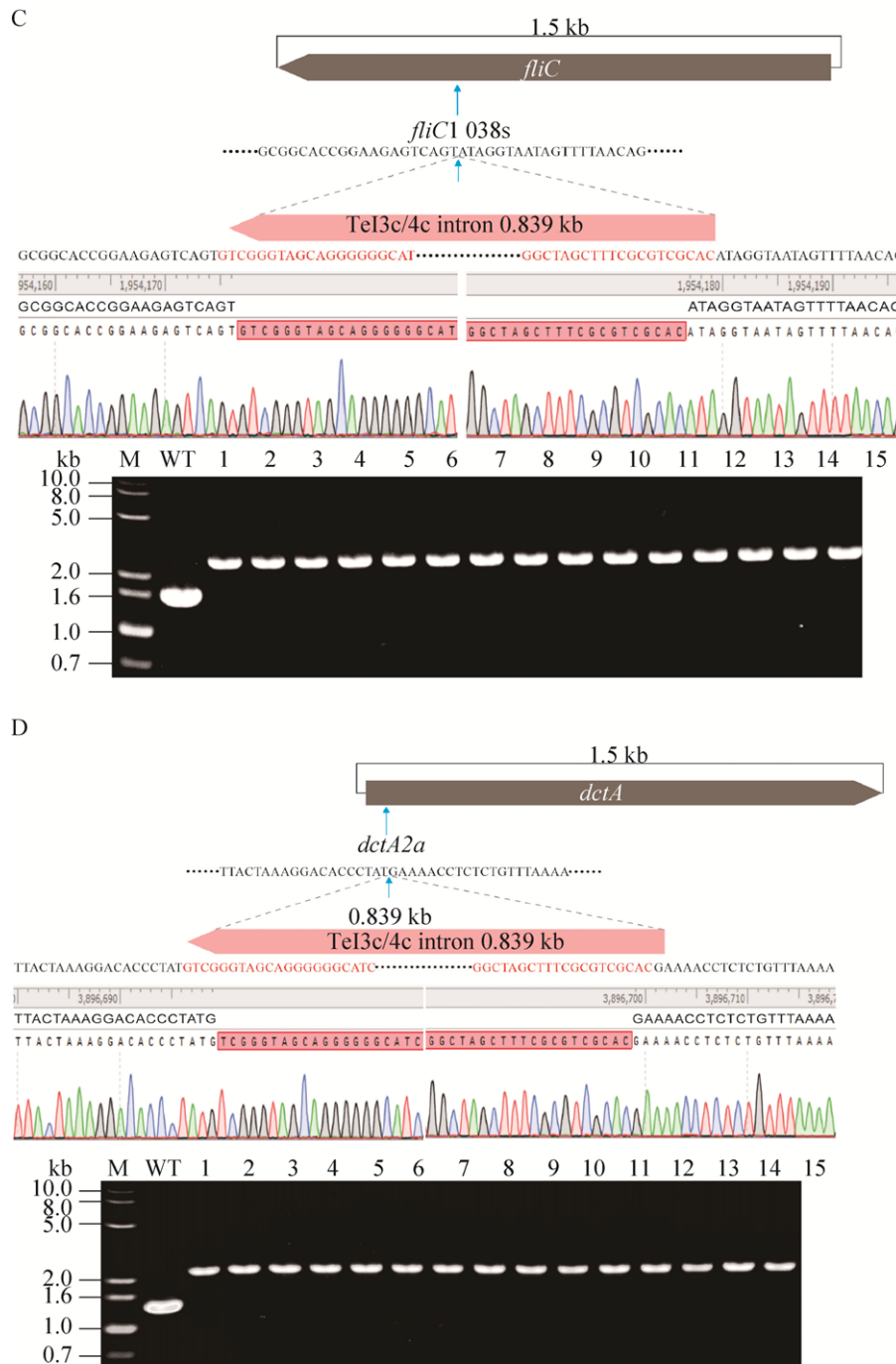


图 5 突变株筛选及测序验证

Fig. 5 Screen mutants by using PCR and DNA sequencing. (A) Screen *E. coli* HMS174 $\Delta fliC489a$ mutants by using PCR. M: DNA marker; WT: wild type; lane 1–15: *E. coli* HMS174 $\Delta fliC489a$ mutants. (B) Screen *E. coli* HMS174 $\Delta fliC828s$ mutants by using PCR. M: DNA marker; WT: wild type; lane 1–15: *E. coli* HMS174 $\Delta fliC828s$ mutants. (C) Screen *E. coli* HMS174 $\Delta fliC1038s$ mutants by using PCR. M: DNA marker; WT: wild type; Lane 1–15: *E. coli* HMS174 $\Delta fliC1038s$ mutants. (D) Screen *E. coli* HMS174 $\Delta dctA2a$ mutants by using PCR. M: DNA marker; WT: wild type; lane 1–15: *E. coli* HMS174 $\Delta dctA2a$ mutants. The TeI3c/4c insertion sites in *E. coli* HMS174 genome are indicated as blue arrows. TeI3c/4c intron is depicted in red, *E. coli* HMS174 genomic DNA was depicted in black. The junctions between TeI3c/4c intron DNA and *E. coli* HMS 174 genomic DNA are sequenced by using primers DPjunction-U/DPjunction-D. Sequencing data are visualized using the SnapGene software (GSL Biotech; available at snapgene.com).

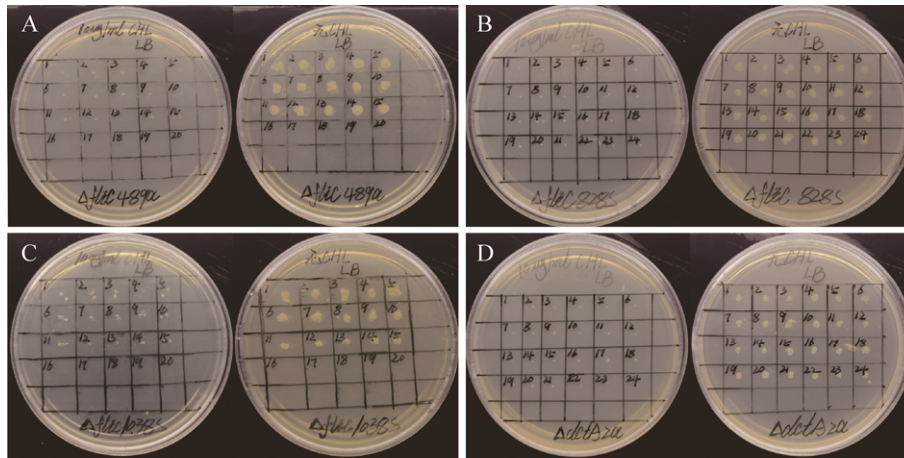


图 6 克隆平板实验验证基因失活质粒丢失情况

Fig. 6 Detection of plasmids curing by using replica plate method. (A) Replica plate of *E. coli* $\Delta fliC489a$ mutants. (B) Replica plate of *E. coli* $\Delta fliC828s$ mutants. (C) Replica plate of *E. coli* $\Delta fliC1038s$ mutants. (D) Replica plate of *E. coli* $\Delta dctA2a$ mutants; Colonies only formed on LB plate but not on LB-Chl plate, this result indicate that gene targeting plasmids were cured in all mutants and the plasmids curing efficiency was 100%.

2.5 HMS174 $\Delta fliC$ 突变株运动能力变化检测

通过穿刺培养法对比野生型 HMS174 菌株与 $\Delta fliC489a$ 、 $\Delta fliC828s$ 和 $\Delta fliC1038s$ 突变株运动能力变化。野生型菌株经过 12 h 培养后可以均匀扩散至培养管中， $\Delta fliC$ 突变株只局限于接种针接触培养基的位置生长 (图 7)，提示 $\Delta fliC$ 突变株在琼脂中运动能力明显下降。

2.6 HMS174 $\Delta dctA$ 突变株苹果酸代谢能力测定为测试 HMS174 $\Delta dctA2a$ 基因失活突变株的

苹果酸代谢能力变化，首先将野生型 HMS174 菌株和 HMS174 $\Delta dctA2a$ 突变株培养于以 0.2% 葡萄糖作为唯一碳源的 M9 液体培养基中，再转接至以 0.2% 苹果酸作为唯一碳源的 M9 液体培养基。野生型大肠杆菌 HMS174 在以上两种碳源的 M9 培养基中均能正常生长， $\Delta dctA2a$ 则只能在 0.2% 葡萄糖作为唯一碳源的 M9 液体培养基中生长，不能在 0.2% 苹果酸作为唯一碳源的 M9 培养基中生长 (图 8)。提示 *dctA* 基因是大肠杆菌苹果酸利用的关键基因。

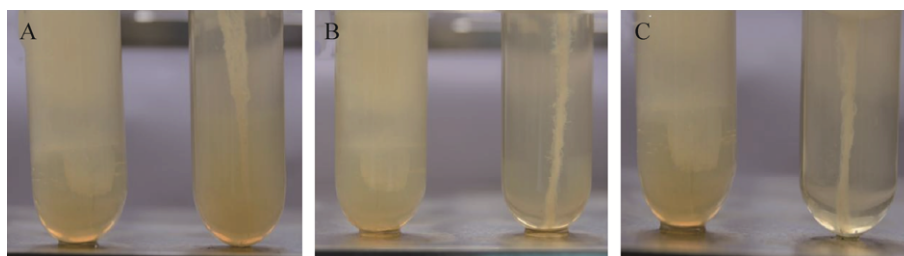


图 7 野生型 HMS174 与 $\Delta fliC$ 突变株运动能力对比

Fig. 7 Comparison motility of HMS174 strains. (A) Comparison of motility *E. coli* HMS174 wild-type strain and *E. coli* HMS174 $\Delta fliC489a$ mutant. (B) Comparison of *E. coli* HMS174 wild-type strain and *E. coli* HMS174 $\Delta fliC828s$ mutant. (C) Comparison of *E. coli* HMS174 wild-type strain and *E. coli* HMS174 $\Delta fliC1038s$ mutant. Wild-type *E. coli* HMS174 strain (left), *E. coli* HMS174 $\Delta fliC$ mutants (right).

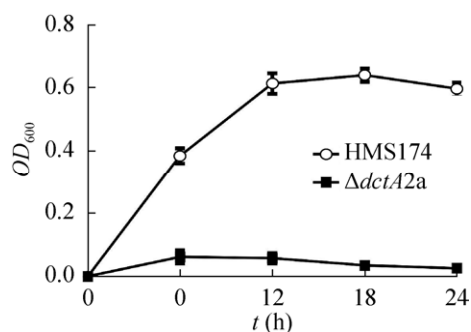


图 8 对比 HMS174 野生型与 $\Delta dctA2a$ 突变株苹果酸利用能力

Fig. 8 Comparison of L-malic acid utilization ability of wild-type *E. coli* HMS174 and *E. coli* HMS174 $\Delta dctA2a$ mutant.

3 讨论

Thermotargetron 是基于嗜热聚球藻 *Thermosynechococcus elongatus* TeI3c/4c 嗜热二型内含子建立的靶向基因失活系统^[10]。TeI3c/4c 最大的特点是只在高温 (48–60 °C) 时具有活性, 这种特性是实现温度诱导的关键。对于可耐受高温的中温微生物 (如 *Clostridium* 属和 *Escherichia* 属的大多数微生物), 将 Thermotargetron 打靶质粒转入宿主细胞, 经 48 °C 高温诱导, 即可激活 TeI3c/4c 的“归巢”活性, 从而实现靶向基因失活。温度诱导相比化学诱导 (如脱水四环素^[18]、乳糖诱导^[19]) 具有诱导条件简单、易控(控制保温时间)、打靶元件活力易控制(恢复至 37 °C 打靶元件即失活)等优点。不仅如此, Thermotargetron 还具有基因失活效率高的优点, 在本研究中设计的 4 个打靶位点基因失活效率高达 100%, 明显高于化学诱导系统^[10]。可见, Thermotargetron 系统具有广泛应用于耐高温中温菌的潜力, 可在中温菌中实现高效、精确的基因失活。

在前期的研究中, T7 启动子被用于控制 TeI3c/4c 的表达, 打靶效率在 50% 左右^[10]。但是 T7 启动子具有以下两个缺点: (1) T7 启动子为强启动子, 启动表达效率很高, 导致诱导试剂的加

入量比较难控制, 容易造成 TeI3c/4c 表达过量, 过多的 TeI3c/4c 表达量是造成其脱靶的主要原因; (2) T7 启动子并不能在嗜热菌中工作。为了改善以上问题, 本研究在打靶质粒的设计上作出了两点改进: (1) 将打靶质粒中的 T7 启动子改为热纤梭菌中的 groEL 启动子, 该启动子表达量适中, 易于在打靶高效和严谨性上找到平衡点; (2) 将化学诱导改为通过温度诱导 (控制 48 °C 保温时间, 控制过程直接、精确)^[10]。改进后的 Thermotargetron 系统打靶效率高达 100%, 明显优于 T7 启动子介导的化学诱导系统。

使用大肠杆菌作为 Thermotargetron 基因打靶的模式生物主要有两个原因: (1) 大肠杆菌外源基因转化方法成熟且基因组背景清楚; (2) 大肠杆菌作为革兰氏阴性菌的代表, 对高温的耐受性低于细胞壁结构复杂的革兰氏阳性菌。以热耐受性低的微生物为起点, 温度诱导更易推广。除此之外, 化学法热激转化大肠杆菌是大肠杆菌的常规实验操作, 学界普遍认为热激不会改变大肠杆菌基因背景^[20]。为了最大限度保证热激前、后大肠杆菌的基因背景的一致性, 所有突变株均在无抗性的 LB 培养基中 37 °C 连续转接 10 次, 此步骤有两个目的: (1) 使突变株从热应激状态恢复为正常状态; (2) 将突变株中的 Thermotargetron 打靶质粒丢失。

HMS174 中 *fliC* 基因编码的鞭毛蛋白是鞭毛丝的主要结构亚基, 参与细菌的一系列致病过程^[21]。*fliC* 参与形成的鞭毛结构是多种细菌最主要的运动器官, 主要介导细菌的运动、趋化和黏附, 帮助细菌附着于宿主体内并迁移到营养物质丰富的位置去, 在细菌的感染与免疫过程中发挥着重要的作用: (1) 鞭毛在生物膜的扩大阶段介导菌体-菌体之间的相互作用, 从而产生较强的毒性与抗生素耐药性^[22]; (2) 鞭毛介导的运动性对于沙门氏菌、大肠杆菌、李氏杆菌和耶尔森氏菌等微生物的生物膜的形成和成熟起着关键作用^[23]。通过对大肠杆菌 HMS174 $\Delta fliC$ 突变株和野生型菌

株运动能力的分析,证明了 *fliC* 基因编码产物对于鞭毛的运动功能至关重要。

在无氧条件下,大肠杆菌 3 个独立二羧酸摄取 (*Dcu*) 系统 *DcuA*、*DcuB* 和 *DcuC* 共同介导对四碳-二羧酸和 L-天冬氨酸的摄取、交换和外排^[24]。在有氧条件下, *dctA* 基因编码 2-羟基羧酸摄取的转运蛋白 (2-hydroxycarboxylic acid transporter, 2-HCT) 以 Na^+ 或 H^+ 作为共转运阳离子驱动柠檬酸、苹果酸或乳酸等的转运^[25], 该蛋白也介导对四碳-二羧酸的摄取^[26]。苹果酸是四碳-2-羟基羧酸的代表, 常用作 2-HCT 转运蛋白功能鉴定底物。Jiang 等报道了 *dctA* 基因参与了苹果酸的摄入过程^[17]。本研究通过 *dctA* 基因的靶向失活, 验证了 *dctA* 是大肠杆菌中苹果酸利用的必需基因。

综上所述, 本研究通过温度诱导控制 TeI3c/4c 的活力, 高效失活了 4 个靶基因位点 (效率均为 100%), 并在基因和表型两个不同层次, 验证了 Thermotargetron 可用于嗜中温 (可耐高温的) 微生物基因靶向失活。相比于前期研究中使用的化学诱导方式, 温度诱导对 TeI3c/4c“归巢”活力的控制比化学诱导更加直接和便捷, 因此, 温度诱导 Targetron 系统的构建为中温微生物的基因编辑提供了可靠、高效和便捷的新方法。

REFERENCES

- [1] Lambowitz AM, Zimmerly S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. Cold Spring Harbor Perspect Biol, 2011, 3(8): a003616.
- [2] Lambowitz AM, Zimmerly S. Mobile group II introns. Ann Rev Genet, 2004, 38: 1–35.
- [3] Karberg M, Guo HT, Zhong J, et al. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. Nat Biotechnol, 2001, 19(12): 1162–1167.
- [4] McNeil BA, Semper C, Zimmerly S. Group II introns: versatile ribozymes and retroelements. Wiley Interdiscipl Rev: RNA, 2016, 7(3): 341–355.
- [5] Zimmerly S, Semper C. Evolution of group II introns. Mobile DNA, 2015, 6: 7.
- [6] Qu GS, Kaushal PS, Wang J, et al. Structure of a group II intron in complex with its reverse transcriptase. Nat Struct Mol Biol, 2016, 23(6): 549–557.
- [7] Novikova O, Belfort M. Mobile group II introns as ancestral eukaryotic elements. Trends Genet, 2017, 33(11): 773–783.
- [8] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. J Microbiol Methods, 2007, 70(3): 452–464.
- [9] Zhang J, Liu YJ, Cui GZ, et al. A novel arabinose-inducible genetic operation system developed for *Clostridium cellulolyticum*. Biotechnol Biof, 2015, 8: 36.
- [10] Mohr G, Hong W, Zhang J, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*. PLoS ONE, 2013, 8(7): e69032.
- [11] Zhao C, Pyle AM. The group II intron maturase: a reverse transcriptase and splicing factor go hand in hand. Curr Opin Struct Biol, 2017, 47: 30–39.
- [12] Liu YJ, Zhang J, Cui GZ, et al. Current progress of targetron technology: Development, improvement and application in metabolic engineering. Biotechnol J, 2015, 10(6): 855–865.
- [13] Zimmerly S, Guo HT, Perlman PS, et al. Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription. Cell, 1995, 82(4): 545–554.
- [14] Hong W, Zhang J, Feng YG, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons. Biotechnol Biof, 2014, 7: 80.
- [15] Xia YZ, Li K, Li JJ, et al. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res, 2018, 47(3): e15.
- [16] Hong W, Zhang J, Cui GZ, et al. Multiplexed CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in *Clostridium difficile* toward the understanding of pathogenesis of *C. difficile* infection. ACS Synth Biol, 2018, 7(6): 1588–1600.
- [17] Jiang JQ, Zhang ZL, Xu T, et al. Knock-out of *dctA* gene from *Escherichia coli* K12 and characterization

- of its function for malic acid transportation. *J Northeast Agric Univ*, 2018, 49(5): 45–52 (in Chinese).
- 姜巨全, 张正来, 徐桐, 等. 大肠杆菌中 *dctA* 基因敲除及其苹果酸摄取功能鉴定. *东北农业大学学报*, 2018, 49(5): 45–52.
- [18] Stebbins MJ, Urlinger S, Byrne G, et al. Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10775–10780.
- [19] Banerjee A, Leang C, Ueki T, et al. Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii*. *Appl & Environ Microbiol*, 2014, 80(8): 2410–2416.
- [20] Murano EA, Pierson MD. Effect of heat shock and incubation atmosphere on injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot*, 1993, 56(7): 568–572.
- [21] Yu HY, Ma Y. Influence of *FliC* knock-out *Escherichia coli* on the biofilm formation. *Chin J Vet Sci*, 2016, 36(8): 1301–1306 (in Chinese).
- 喻华英, 马燕. 大肠杆菌 *FliC* 基因敲除后对大肠杆菌生物膜形成的影响. *中国兽医学报*, 2016, 36(8): 1301–1306.
- [22] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, 1998, 30(2): 285–293.
- [23] Wolska KI, Grudniak AM, Rudnicka Z, et al. Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet*, 2016, 57(2): 225–238.
- [24] Golby P, Davies S, Kelly DJ, et al. Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, 181(4): 1238–1248.
- [25] Sobczak I, Lolkema JS. The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(4): 665–695.
- [26] Davies SJ, Golby P, Omrani D, et al. Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, 181(18): 5624–5635.

(本文责编 陈宏宇)