

# 基于染色体的重组工程系统的改进

樊 丹,石牡丹,杨运文,尚广东

(南京师范大学生命科学学院,江苏省微生物工程技术研究中心,江苏省微生物与功能基因组学重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 重组工程是指通过重组酶催化 DNA 之间的同源重组,实现 DNA 克隆和修饰的一种基因工程技术.本研究从重组酶基因整合至大肠杆菌 DH10B 所获得的基于染色体的重组工程系统菌株 LS-GR 出发,利用菌株自身的重组工程系统和双链断裂修复功能,敲除了编码 5'->3'单链 DNA 外切酶的 *recJ* 基因和编码 3'->5' DNA 外切核酸酶的 *sbcB* 基因,获得重组效率得以提高的菌株 LS2002 和 LS2004.单链寡核苷酸修复和双链断裂修复实验表明所得菌株较 LS-GR 的重组效率有明显提高,对需要重组效率高的重组工程实验具有重要的应用价值.

[关键词] 重组工程,基因敲除,重组效率,单链寡核苷酸修复,双链断裂修复

[中图分类号] Q819 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)01-0099-05

## Improvement of the Chromosome-based Recombineering System

Fan Dan, Shi Mudan, Yang Yunwen, Shang Guangdong

(Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Recombineering is a genetic engineering technology for the DNA cloning and modification based on the recombinase-catalyzed homologous recombination. In this study, starting from previous obtained LS-GR, a chromosome-based recombineering strain, the 5'->3' single stranded DNA exonuclease coding gene *recJ* and exonucleolytic cleavage in the 3'->5' DNA exonuclease coding gene *sbcB* were knocked out via LS-GR's recombineering function as well as its inherent double strand break repair (DSBR) function. Compared with LS-GR, the obtained strains LS2002 and LS2004 show higher single strand oligonucleotide repair (SSOR) activity and DSBR activities, showing that they have the potential to be used in the recombineering experiments for high recombination efficiency.

**Key words:** recombineering, knock-out, recombination efficiency, SSOR, DSBR

重组工程利用重组酶催化常常是较短的 DNA 片段之间的同源重组而实现对 DNA 克隆和修饰.重组酶基因来源于大肠杆菌前噬菌体 Rac 的 *recET* 基因或  $\lambda$  噬菌体的 *red $\alpha$*  和 *red $\beta$*  基因. *recE* 和 *red $\alpha$*  编码 5'->3' DNA 外切酶,作用于双链 DNA 分子而产生 3'端突出的分子;*recT* 和 *red $\beta$*  编码单链结合蛋白,其结合在 DNA 分子的 3'突出端,同时还行使重组酶活性,即促进 2 个单链的同源 DNA 分子通过退火或链侵入的机制进行同源重组而获得重组分子.  $\lambda$  噬菌体的重组系统中还需要 *red $\gamma$*  基因所编码的 Gam 蛋白来抑制大肠杆菌 RecBCD 对外源 DNA 的降解<sup>[1]</sup>. 根据重组酶基因的存在状态可将重组工程分为基于质粒的重组工程系统和基于染色体的重组工程系统,前者的重组酶基因克隆在质粒上,代表质粒为 pKD46<sup>[2]</sup> 和 pSC101-BAD-*gbaA*<sup>[3]</sup>; 后者的重组酶基因整合在染色体上,如美国 Court 研究组构建的将包含 *red $\alpha\beta\gamma$*  及其调控基因的  $\lambda$  缺陷噬菌体整合至大肠杆菌基因组的菌株,在此系统中, *red* 基因是受热诱导控制,在 30℃ 时 Red 蛋白为 CI857 抑制子所抑制,42℃ 时抑制解除而发挥催化功能,这类菌株的代表是 DY380 及其衍生菌株<sup>[4]</sup>. 另外一类是我们研究组构建的将 *red $\alpha\beta\gamma$* 、*recA* 和庆大霉素抗性基因(*aacCI*)整合至 *Escherichia coli* DH10B 的菌株 LS-GR<sup>[5]</sup> 和德国 Stewart 研究组报道的 GB05-Red<sup>[6]</sup>. LS-GR 和 GB05-Red 中的重组酶基因置于受诱导的阿拉伯糖诱导的启动子控制之下,瞬时诱导表达以行使催化活性. 与 DY380 相比,LS-GR 和

收稿日期:2012-07-03.  
基金项目:江苏省科技厅工程中心创新能力提升项目、南京市科委工程中心创新能力提升项目(201105058).  
通讯联系人:尚广东,副教授,研究方向:微生物药物的研发. E-mail:shanggd@hotmail.com

GB05-Red 的优点是在大肠杆菌常规培养的 37℃ 下培养和诱导,且直接诱导,无需转换培养容器.

重组工程的突出优点是可以通过化学合成的短寡核苷酸来进行操作,这就避免了基因克隆的烦琐步骤.重组工程因其鉴别高效和快捷的突出优点已成为基因操作和基因组工程的强大工具<sup>[7]</sup>.

目前重组工程的重组效率(即重组子在细胞总量中的比例)约为  $1 \times 10^{-4}$ ,可以实现一般的实验要求,但在克隆大片段或修饰复杂的 DNA 大分子如基因组或细菌人工染色体时则略为不足.

Murphy<sup>[8]</sup>使用基于质粒的重组工程系统,将宿主菌的 *recJ* 敲除后,双链断裂修复(DSBR)活性提高了 2~25 倍,Sawizke 等<sup>[9]</sup>发现基于缺陷噬菌体的重组工程菌株的 *recJ* 敲除后单链寡核苷酸修复(SSOR)活性提高了约 5 倍,Maresca 等<sup>[10]</sup>报道了 DH10B 衍生菌株的 *sbcB* 敲除后,SSOR 活性提高了 15 倍以上.为进一步提高 LS-GR 的重组效率,本研究将 LS-GR 菌株中的 *recJ* 和 *sbcB* 基因敲除,获得了重组效率更高的重组工程菌株.

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌种和质粒

pACYC17,pACYC184,pKS(-),pECBAC1,*E. coli* DH10B 和 *E. coli* GM119 由本课题组保存.pKD4 和 *E. coli* BW25141 由美国 Purdue University 的 Barry Wanner 教授惠赠,pST98-AS 由美国威斯康星大学麦迪逊分校的 Frederick Blattner 教授惠赠.

### 1.1.2 试剂和仪器

PCR 引物盒抗生素购自上海生工公司;rTaq 聚合酶,T4 DNA 连接酶,各种限制性内切酶,PCR 产物纯化试剂盒以及 DNA 胶回收试剂盒购自大连宝生物公司.PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 S1000,电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser<sup>II</sup>.

### 1.1.3 DNA 测序

由南京思普金生物科技有限公司和华大基因测序公司完成.

## 1.2 方法

### 1.2.1 分子生物学常规操作

大肠杆菌培养以及感受态细胞的转化,质粒提取和鉴定等按手册<sup>[11]</sup>进行.表达重组酶的电转化感受态的制备,DNA 的电转化以及筛选等步骤均采用文献<sup>[6]</sup>的方法.

### 1.2.2 PCR 扩增

本实验使用 PCR 时主要采用 50  $\mu$ L 反应体系:含 5  $\mu$ L rTaq 缓冲液(10 $\times$ );质粒 50 ng 或基因组 DNA 200 ng;4  $\mu$ L dNTP(2.5 mM);4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mM);0.3  $\mu$ L 上游引物和下游引物(终浓度均为 25 mM);0.3  $\mu$ L rTaq(5U/ $\mu$ L),剩余用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 4  $\mu$ L.PCR 反应程序为:94℃ 变性处理 5 min,94℃ 30 s,60℃ 45 s,72℃ 1 min(目的产物长度 1 kb 为 2 min,根据产物长度自行确定),共 30 个循环.最后在 72℃ 延伸 10 min.本实验所使用的引物见表 1.

### 1.2.3 基因敲除

重组工程和 DSBR 相结合,进行无冗余的大肠杆菌基因组基因敲除的实验参照文献[12]进行.扩增含有两侧为 I-SceI 位点的卡那霉素抗性基因 *neo* 的模板质粒 pLS1662 构建如下:以 pKD4 作为模板,分别以 R1115-R1102 和 R1103-R1116 PCR 扩增出 0.3 kb 和 0.6 kb 片段,分别以 *Cla*I-PstI 和 *Pst*I-XbaI 酶切,和以 *Cla*I 和 *Xba*I 酶切的 pKS(-)进行 3 片段连接,得到重组质粒 pLS1661.随后将其中 0.9 kb 的插入片段克隆至 pKD4 的 *Cla*I 和 *Xba*I 位点得到 pLS1662.pLS1662 使用需要 Pir 蛋白才能行使功能的 R6K 复制子,宿主菌为 *E. coli* BW25141,这样以之为模板所扩增的片段转化至常规的大肠杆菌如 MG1655 就不会有质粒的背景干扰.表达 I-SceI 的温敏型质粒载体 pLS2031 是将 pST98-AS 用 *Sal*II 进行酶切自连后去除一段 I-SceI 酶切位点序列而获得.pLS2031 自重组菌株中的去除是将菌体 37℃ 培养过夜,涂布至固体平板 42℃ 培养后,检查氨苄青霉素抗性失去的单菌落即可,高温去除 pLS2031 的效率高达 100%.

综合运用重组工程和 DSBR 法进行基因敲除的基本步骤如下:首先通过重组工程法以左侧同源臂(片段 A)和右侧同源臂(片段 B)与基因组上等位基因的同源重组实现靶基因的敲除,同时引入片段 B 上游

的一段同源序列(片段 C)以及两侧为归巢核酸酶 I-SceI 酶切位点的抗性基因,随后诱导 I-SceI 的表达, I-SceI 作用于所引入的酶切位点引起大肠杆菌基因组双链的断裂(大肠杆菌原基因组不含有 I-SceI 位点),此时促使菌体利用自身的重组功能催化同源序列之间的重组,将片段 C、抗性基因及其两侧的 I-SceI 酶切位点去除,因而实现无冗余的基因敲除. Kolisnychenko<sup>[12]</sup>等使用的是 40 bp ~ 60 bp 大小的 C 片段,用于去除抗性基因及其两侧的 I-SceI 酶切位点区域. 我们的实验发现,短至 20 bp 的 C 片段即可高效地实现同源重组(80% ~ 100%)(结果未发表),本研究我们采用的是 26 bp 的 C 片段,碱基长度的缩短降低了费用,也减少了长引物合成中的错误几率. 我们同时发现诱导重组酶可提高重组效率,但菌体自身的重组功能已足够.

表 1 引物序列  
Table 1 Primers used in this study

名称	序列(5'-3')
R1102	GCCTCGTCTGCACTTCATT
R1103	GAATGAACTGCAGGACGAGGC
R1115	GGAATCGATATGGATGCATATGGCGGCCGTAGGATAACAGGGTAATGGATCCTATGGACAGCAACCGAACCGG
R1116	GGGTCTAGACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCATTACCCTGTTATCCCTAGGATCCTCAGAAGAAGCTCAAGAAG
R1601	ttgtacccaatccacgctctttttatagagaagatgacgtaCAGCGGAATTATTTACCGCTGGTCATAACAAATAGGGGTTCCGCGC
R1602	aaacaacagatacaacttcgtcgccgtgaagtcgatgaaaggTCCTTAGTTCTCTATTCCGAAG
R1603	TAAGAACGTCGGAGCGTTCC
R1604	GGATATTGCCGACCATTACG
R1611	tgatactctggcagacagcagaaataacggatttaacctaagtTAATTTGAAGCCTCCGCCGCTGGTACAACAAATAGGGGTTCCGCGC
R1612	gacaatctcttcgctactgccaagtgttttaacagegcTCCTTAGTTCTCTATTCCGAAG
R1613	TTCAACAGCAAACCCCTCAGG
R1614	CAGAAGAAGGACATGCCATC
K71	GGGTCTAGA AAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATC
K72	GGGGGATCCTTAGAAAACTCATCGAGCATC
R608	GGAATCGATAGTATGGGAAGCCCGATGCGCC
R609	CAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAG
KR1	ctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgatTgtatgggaagcccgatgcgccagagtgtttctgaaacatgg

同源臂以小写字母表示,同源片段以下划线字母表示,粗体表示 SSOR 中的突变碱基.

1.2.4 重组酶活性测定

1.2.4.1 SSOR

SSOR 实验所使用的突变载体 pACYC-mKan 构建如下:以 pACYC177 为模板,K71 和 K72 为引物,PCR 扩增出 0.9 kb 的卡那霉素抗性基因 *kan*(与 *neo* 不同)片段,以 *Xba*I-*Bam*HI 酶切后克隆至 pACYC184 的 *Xba*I-*Bcl*II 位点(pACYC184 提取自 *E. coli* GM119 以去除 *Bcl*II 位点的甲基化),得到重组质粒 pACYC-KC. 以之为模板,R608 和 R609 为引物,扩增出 0.4 kb 的片段,*Cla*I-*Hind*III 酶切后克隆至同样酶切的 pACYC-KC 的 2.6 kb 载体部分,得到 pACYC-*mKan*. 在 pACYC-mKan 中,*Kan* 读码框的第 1 088 位碱基 T 突变为 A,TTG 密码子琥珀型突变为 TAG,*Kan* 因此失活为 *mKan*. SSOR 的实验原理是当突变的寡核苷酸通过重组工程和 *mKan* 重组后,*mKan* 发生点突变而恢复活性,因此可通过卡那霉素的抗性选择,以抗性菌落数和总细胞数的比例来确定重组效率. 本研究使用的寡核苷酸 KR1 两侧为 42 个碱基的同源臂,中间为回复突变的碱基 T.

1.2.4.2 DSBR

以两侧为同源臂的 *neo* 来取代 pECBAC1 中的链霉素抗性基因 *cat* 的 DSBR 实验过程参照文献[5] 进行.

2 结果

2.1 基于染色体的重组工程菌株 LS-GR 中 *recJ* 和 *sbcB* 的基因敲除

首先进行 *recJ* 的基因敲除. 以 pLS1662 作为模板,R1601 和 R1602 扩增的 1.2 kb *neo* 基因片段电转化至由 0.2% L-阿拉伯糖重组酶表达的 LS-GR 菌株的感受态细胞中,以卡那霉素抗性进行选择. 所得菌株以 R1603 和 R1604 为引物扩增得到 1.5 kb 的产物,酶切和测序正确后即得到抗性突变菌株,命名为

LS2001-1. 随之转化 pLS2031, 以 25  $\mu\text{g/mL}$  的热失活的氯四环素诱导 I-SceI 的表达, 筛选得到卡那霉素敏感性菌株, 再以分别位于整合位点上游和下游的各约 100 个碱基处的分析引物 R1603 和 R1604 扩增得到 322 bp 的 DNA 片段, 以 R1603 为测序引物, 序列正确的菌株命名为 LS2001-2, pLS2031 自 LS2001-2 中消除的菌株命名为 LS2002. *recJ* 的基因敲除菌株基因型验证结果见图 1A.

*sbcB* 的基因敲除采用同样的步骤, 是将以 R1611 和 R1612 为引物自 pLS1662 中扩增的 *neo* 片段电转化至表达重组酶的 LS2001 电转化感受态细胞中, 以分别位于整合位点上游和下游的各约 100 个碱基处的分析引物 R1613 和 R1614 扩增, 验证得到的抗性菌株为 LS2003-1, 表达 I-SceI 后去除抗性基因的菌株为 LS2003-2, 去除 pLS2031 的菌株为 LS2004, 以 R1613 为测序引物对 LS2004 的基因型进行测序验证, 菌株 LS2004 分别保留 *recJ* 基因读码框的起始密码子 GTG 和终止密码子 TGA 以及 *sbcB* 基因读码框的起始密码 ATG 和终止密码子 TAA. 这种读码框内基因敲除的菌株不含有任何多余的碱基序列, 最大限度地保留了菌株的基因组结构. *sbcB* 的基因敲除菌株基因型验证结果见图 1B.

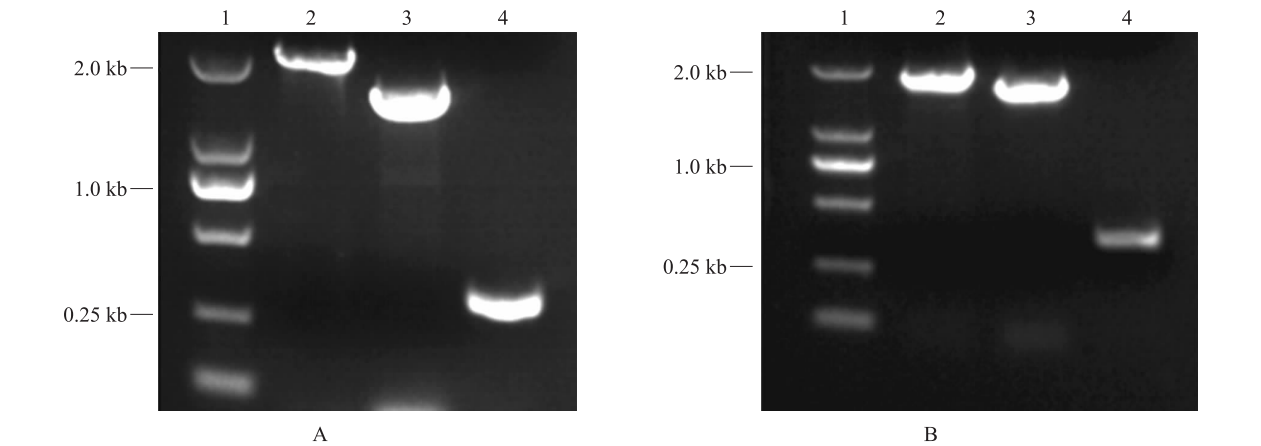


图 1 *recJ*(A) 和 *sbcB*(B) 基因敲除菌株的基因型分析

Fig. 1 Agarose electrophoresis of the genotypes of *recJ*(A) and *sbcB*(B) deletion mutants

1. DL2000 DNA 分子量标准: (2.0, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1) kb. (A) 2, 3, 4 分别以 LS-GR、LS2001-1 和 LS2002 的基因组为模板, R1603-R1604 扩增得到 2 050 bp、1 516 bp 和 322 bp 片段; (B) 2, 3, 4 分别以 LS-GR、LS2003-1 和 LS2004 的基因组为模板, R1613-R1614 扩增得到长为 1 760 bp、1 532 bp 和 338 bp 片段.

2.2 *recJ* 和 *sbcB* 突变菌株的重组效率检测

为研究 *recJ* 单基因敲除以及 *recJ* 和 *sbcB* 双基因敲除菌株的重组工程活性, 分别将 pACYC-mKan 和 pECBAC1 转化至 LS-GR、LS2002 和 LS2004 中, 以 SSOR 和 DSBR 法比较这 3 个菌株的重组活性, 所有的实验均进行 3 次以上, 取相近数值进行计算, 结果见表 2.

可见, *recJ* 单基因敲除菌株 LS2002 的 SSOR 和 DSBR 活性较出发菌株 LS-GR 分别提高了约 2.0 倍和 5.2 倍. *recJ* 和 *sbcB* 双基因敲除菌株 LS2004 的 SSOR 的活性较 LS-GR 提高了 21.0 倍, 较 LS2002 提高了 10.5 倍; DSBR 活性较 LS-GR 提高了 2.7 倍, 但与 LS2002 相比反而略有下降, 其中的机理有待研究.

3 讨论

为进一步获得重组效率高的重组工程菌株, 我们对此前获得的基于染色体的重组工程系统进行了改进, 获得 *recJ* 单基因敲除菌株 LS2002 以及 *recJ* 和 *sbcB* 双基因敲除菌株 LS2004, 各基因敲除的活性提高与文献报道的大致相似. *sbcB* 基因敲除无助于 DSBR, 这提示我们 SSOR 实验可选择 LS2002, 而 DSBR 实验可选择 LS2002. 本研究所获得重组效率高的菌株对具复杂结构、数量较少或者难以重组的 DNA 分子的操作具有实际的应用意义. 所获得菌株仍有进一步通过基因敲除等方法以提高活性的潜力.

表 2 LS-GR、LS2002 和 LS2004 菌株重组率的比较

Table 2 Comparison of recombination efficiency among the LS-GR, LS2002 and LS2004

菌株	SSOR	DSBR
	重组效率 ( $\times 10^{-3}$ )	重组效率 ( $\times 10^{-5}$ )
LS-GR	3.29	0.67
LS2002	6.54	3.50
LS2004	68.84	2.50

我们推测 *recJ* 和 *sbcB* 基因敲除能够提高重组效率的机理如下:*recJ* 编码的 5'->3' 单链 DNA 外切酶可能降解经 Red $\alpha$  作用后产生的单链 DNA 分子,而 *sbcB* 编码的 3'->5' DNA 外切核酸酶可能同时作用于双链底物 DNA 分子和单链 DNA 分子。*recJ* 和 *sbcB* 基因敲除则使 DNA 分子修饰免受降解,因而提高重组效率。

重组工程已成为常规的基因方法,其应用正在不断得以拓展,优化的重组工程菌株将在具体的基因操作方面得以有效地应用。

### [参考文献]

- [1] Sharan S K, Thomason L C, Kuznetsov S G, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. Nat Protoc, 2009, 4(2): 206-223.
- [2] 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.
- [3] Wang J, Sarov M, Rientjes J, et al. An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination[J]. Mol Biotechnol, 2006, 32(1): 43-53.
- [4] Lee E C, Yu D, Martinez de Velasco J, et al. A highly efficient escherichia coli based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA[J]. Genomics, 2001, 73(1): 56-65.
- [5] Song J, Dong H, Ma C, et al. Construction and functional characterization of an integrative form lambda Red recombineering *Escherichia coli* strain[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 309(2): 178-183.
- [6] Fu J, Teucher M, Anastassiadis K, et al. A recombineering pipeline to make conditional targeting constructs[J]. Methods Enzymol, 2010, 477: 125-144.
- [7] Isaacs F J, Carr P A, Wang H H et al. Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement[J]. Science, 2011, 333(6040): 348-353.
- [8] Murphy K C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 1998, 180(8): 2063-2071.
- [9] Sawitzke J A, Costantino N, Li X T, et al. Probing cellular processes with oligo-mediated recombination and using the knowledge gained to optimize recombineering[J]. J Mol Biol, 2011, 407(1): 45-59.
- [10] Maresca M, Erler A, Fu J, et al. Single-stranded heteroduplex intermediates in lambda Red homologous recombination[J]. BMC Mol Biol, 2011, 11: 54.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 16-34.
- [12] Kolisnychenko V, Plunkett G, Herring C D, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome[J]. Genome Res, 2002, 12(4): 640-647.

[责任编辑:黄 敏]