

# 寡核苷酸介导的重组工程法构建容纳 毒性基因 *ccdB* 的新型菌株

严振亚, 柴美霞, 张青, 骆希, 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]** 毒性基因 *ccdB* 是最为常用的一种负筛选标记, *ccdB* 基因和 R6K 复制子一起组成了高效的基因克隆和基因组修饰的遗传操作元件. 为获得高转化效率的容纳 *ccdB* 基因的菌株, 本研究采用重组工程手段, 以经优化去除了错配修复的寡核苷酸与 pUC 骨架、含有 *ccdB* 基因的质粒 pMK2010 共转化, 直接对含 *pir116* 基因型的大肠杆菌 DH10B 衍生菌株的基因组进行修饰. 在筛选的 10 个菌株中, 7 个为预期的 GyrA462 基因型. 为消除 pMK2010, 构建了一个 pUC 骨架、氨苄青霉素抗性的诱导自剪切质粒 pLS2750. pLS2750 通过质粒不相容性去除 pMK2010 后, 经诱导 I-SceI 自剪切而消除. 所得菌株 LS027 的电转化效率为  $6.9 \times 10^8/\mu\text{g}$ , 是对照菌株的约 100 倍, R6K 质粒呈现高拷贝. 以 LS027 为宿主菌的构建了系列克隆载体, 以只进行基因克隆可避免载体自连的干扰. 新型 *ccdB* 基因容纳菌株 LS027 有着基因操作方面广泛运用的潜力.

**[关键词]** *ccdB*, R6K, 寡核苷酸, 重组工程

**[中图分类号]** Q819 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)02-0066-07

## Construction of A New *ccdB* Tolerant Strain Through Oligonucleotide Mediated Recombineering

Yan Zhenya, Chai Meixia, Zhang Qing, Luo Xi, Shang Guangdong

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

**Abstract:** Toxic gene *ccdB* is the most often used counter selection marker, together with R6K replicon, they constitute the highly efficient gene cloning and genome modification genetic elements. To obtain a high transformation efficiency *ccdB* tolerant strain, in this study, a single-stranded oligonucleotide designed to circumvent the mismatch repair was co-transformed with pUC backbone, *ccdB* harboring plasmid pMK2010 into *Escherichia coli* BUN20, a DH10B derivative with *pir116* genotype. Seven out of ten strains exhibited the expected GyrA462 genotype. To eliminate pMK2010, a pUC backbone, auto-cleavable vector pLS2750 was constructed. pMK2010 was replaced by pLS2750 under ampicillin selection via incompatibility mechanism, then pLS2750 was self eliminated under the I-SceI self cleavage. The engineered strain LS027 shows an electroporation efficiency of  $6.9 \times 10^8/\mu\text{g}$ , which is about 100 fold higher than that of the control strain; and R6K plasmid shows high copy number. Serial gene cloning vectors were constructed with LS027 as host, the vector will eliminate self-ligated background. The new *ccdB* tolerant strain LS027 will find general applications in gene manipulation.

**Key words:** *ccdB*, R6K, single-stranded oligonucleotide, recombineering

随着代谢工程、基因组工程和合成生物学的迅速发展,开发简便高效的基因操作工具越来越重要. 负筛选标记是相对于抗生素的正筛选而言的、含有此基因时不能存活的一种基因类型,广泛运用于基因克隆和 DNA 修饰. 与 *galK*<sup>[1]</sup>, *thyA*<sup>[2]</sup>, *sacB*<sup>[3]</sup> 和 *tolC*<sup>[4]</sup> 等负筛选标记相比,来源于 F 质粒、作用于 DNA

收稿日期: 2015-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC81273412).

通讯联系人: 尚广东, 副教授, 研究方向: 合成生物学. E-mail: shanggd@hotmail.com

拓朴异构酶 II 而呈现毒性的 *ccdB* 基因(control of cell death gene B)最为高效和常用<sup>[5-7]</sup>. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)编码 DNA 拓朴异构酶 II 的 A 亚单位的 DNA 螺旋酶 GyrA462 突变株(R462C,即 GyrA 蛋白的第 462 位精氨酸突变为半胱氨酸)可抵抗 *ccdB* 的毒性,因此成为质粒上或基因组上含 *ccdB* 基因的宿主菌<sup>[8]</sup>.

菌株存在着抵抗毒性基因的机制,在某些情况下可造成 *ccdB* 基因的缺失或终止突变. 避免这个不足的方法之一是将 *ccdB* 基因和另一个常用于 *E. coli* 基因操作元件 R6K 复制子联合使用. R6K 需要 Pir 蛋白才能复制,常用的大肠杆菌如 MG1655、DH10B 和 BL21(DE3)等基因组上均不含 *pir* 基因,故含 R6K 复制子的质粒不在其中复制. 在实际操作中,以 R6K 复制子的质粒为模板所扩增的片段转化这些菌株时,不会有残留的超螺旋构型质粒转化所引起的大量克隆背景,这就大大简化了实验操作步骤<sup>[9]</sup>. House<sup>[6]</sup>等从美国 Invitrogen 公司含 GyrA462 R462C 位点的 *E. coli* DB3.1 出发,运用噬菌体溶原菌侵染法将 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 中的 *pir* 基因整合至 *E. coli* DB3.1 获得了同时含有 *gyrA462* 和 *pir* 基因的菌株 *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir. 但 *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 有一些不足:转化效率不高,制约了以之为克隆宿主菌;R6K 质粒表现为低拷贝,难以获得大量的质粒或 DNA 片段.

具高转化效率的 *E. coli* DH10B 衍生菌株 *E. coli* BUN20 的基因组中含有 *pir* 突变体 *pir116*,*pir116* 赋予 R6K 质粒高拷贝,拷贝数由 *pir* 基因时的每细胞 15 个拷贝增加至每细胞 200 个拷贝<sup>[10]</sup>. 本研究中,将优化设计的、可避免菌体错配修复的突变寡核苷酸和含 *ccdB* 基因的质粒 pMK2010 共转化至表达  $\lambda$  Red 重组酶的 BUN20 中,高效地筛选得到了 GyrA462 突变株. 随之运用质粒不相容原理,以诱导自剪切的载体消除了 pMK2010. 所得菌株 LS027 的转化效率约为 *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 的 100 倍,同时 R6K 质粒表现出高拷贝. 以 LS027 为宿主菌的构建了系列克隆载体并得到较好的应用.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

*E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 pMK2010<sup>[6]</sup>由美国华盛顿州立大学 Michael Kahn 教授惠赠. *E. coli* DH10B,*E. coli* BUN20<sup>[10]</sup>,pKD46<sup>[9]</sup>,pKD4 和 pST98-AS<sup>[11]</sup>均为本研究组保存.

#### 1.1.2 试剂和仪器

寡核苷酸、PCR 引物、pfu 聚合酶和抗生素霉素等购自上海生工公司;限制性内切酶、T4 连接酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和 DNA 分子量标准购自大连宝生物公司;其余试剂均为国产分析纯. PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 S1000 型热循环仪,电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser<sup>II</sup>.

#### 1.1.3 DNA 测序

由南京赛因斯生物科技有限公司完成.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分子生物学操作

大肠杆菌的培养、电转化感受态细胞的制备和转化、质粒提取、酶切鉴定和 PCR 扩增等常规实验按分子克隆手册<sup>[12]</sup>进行. 重组工程电转化感受态细胞的制备和转化按文献[9]操作. 本研究所使用的寡核苷酸和 PCR 引物见表 1.

#### 1.2.2 诱导自消除质粒的构建

pST98-AS 以 *Sal* I 酶切,胶回收 4.5 kb 片段自连得到去除了多余位点的重组质粒 pLS2031. 以 pMK2010 为模板,C045 和 C046 为引物扩增得到 0.8 kb 两侧带有 18 个碱基 *I*-*Sce*I 识别位点的 pUC 复制子,0.8 kb 以 *Not* I 和 *Nco* I 双酶切后和 pLS2031 以同样酶切的 3.0 kb 载体部分连接,转化 DH10B 的感受态细胞,筛选得到重组质粒 pLS2750. pLS2750 以 *I*-*Sce*I 酶切、C047 和 C048 为引物测序验证序列的正确性.

表1 本研究所使用的寡核苷酸和PCR引物

Table 1 Oligonucleotides and PCR primers used in this study

名称	序列(5'-3')	酶切位点
GYRA3	C* <b>C</b> *T*C*GAGCAGTTTTTCGTGCTCAAGACCGT <b>CAGTTTTT</b> GTAAACATAGGTCCAGAATCGCCTGAGCTTGC TGTTCCGGTCAGGTAGTACAG	
R481	CGACGCCTGCAGAAGCGAAAAC	
R482	ACCGAACTGTTACGAACCAG	
C045	GGACCATGGTAGGGATAACAGGGTAATGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAG	
C046	GGAAGCGGCCGGGATCCATT <b>ACCCTGTTATCCCT</b> AAAAAGGATCTAGGTGAAGATCC	<i>Not I</i>
C047	TGATCAAACCGTACCTGATC	
C048	AGCGACTCAGGTGCCTGATG	
C053	GGCAGATCTGGGATTTTGCCGATTTTCGGCC	<i>Bgl II</i>
C054	GGGAGATCTCTGTCAGACCAAGTTTACTC	<i>Bgl II</i>
C055	GGCGGATCCTCGAATTGACATAAGCCTGTTC	<i>BamH I</i>
C056	GGGGGATCCTTAGGTGGCGGTA <b>CTTGGTTCGAT</b> TCAAAGTG	<i>BamH I</i>
C073	GGAGGATCCTCTTGAAATAAGATCACTACCGGG	<i>BamH I</i>
C074	GAAGGATCCTTACGCCCGCCCTGCCACTCATC	<i>BamH I</i>
R476F	GGAATCGATGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAAC	<i>Cla I, BamH I</i>
R476R	GGACTGCAGAGATCTTTATATTCCCAGAACATCAGG	<i>Bgl II, Pst I</i>

注:突变的寡核苷酸位点以粗体表示,'表示5'最末端为4个磷硫酰连接的寡核苷酸(即硫代磷酸寡核苷酸),限制性酶切位点以下划线表示,I-SceI 识别位点以斜体表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 寡核苷酸和 pMK2010 共转化实现 GyrA462 突变

Sawitzke 等<sup>[13]</sup>报道了除目的碱基突变位点之外,在其两侧各两个氨基酸密码子的第三位(即 Wobble 位点)引入额外的突变可有效地避免大肠杆菌体内的纠正碱基突变的错配修复机制。由于 *gyrA* 基因位于基因组的终止位点(ter)的后端,突变寡核苷酸的设计为基因组上序列的顺时针方向(即开放阅读框的反向互补序列)<sup>[14]</sup>。遵循这些设计原则,设计了引入 GyrA462 的突变寡核苷酸 GRYA3。从开放阅读框的方向来看,5 个氨基酸的密码子为 GATCTG。

CGTTTGCAG 突变为 GACCTATGTTTACAA(突变位点以粗体表示),中间编码精氨酸(R)的 CGT 密码子突变为半胱氨酸(C)密码子 TGT,两侧各两个密码子均为第三位碱基突变,不改变所编码的氨基酸。在 5' 最末端引入 4 个磷硫酰连接的寡核苷酸可有效地避免体内核酸酶的降解<sup>[14-15]</sup>。

将含 λ 重组酶基因的质粒 pKD46 转化 *E. coli* BUN20,所得菌株在 L-阿拉伯糖诱导之下制备重组酶表达的电转化感受态细胞,共转化 5 pmol 的 GYRA3 和 10 ng 的 pMK2010。pMK2010<sup>[6]</sup>为 pUC 骨架,含 *ccdB* 基因和卡那霉素抗性基因的质粒,在 *ccdB* 毒性基因的作用下,只有那些 GyrA462 突变菌株才能在卡那霉素筛选下存在。随机跳取 10 个卡那霉素抗性克隆,以 R481 和 R482 为引物菌落 PCR 扩增得到 340 bp 的 DNA 片段,以 R481 为引物进行测序发现 7 个菌株均发生了目的突变。典型测序结果如图 1 所示。

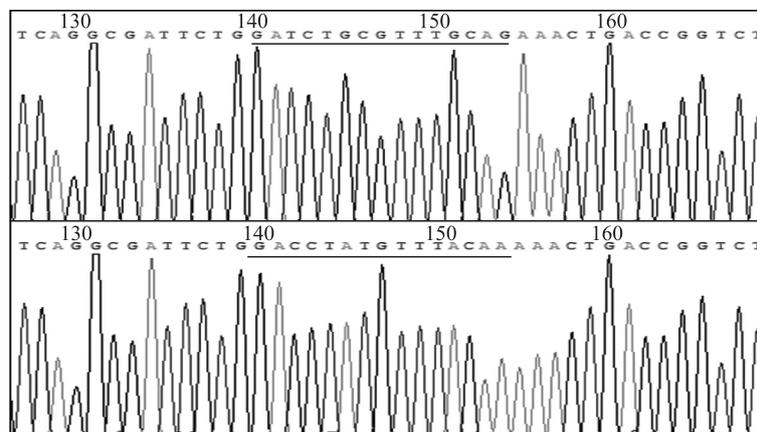


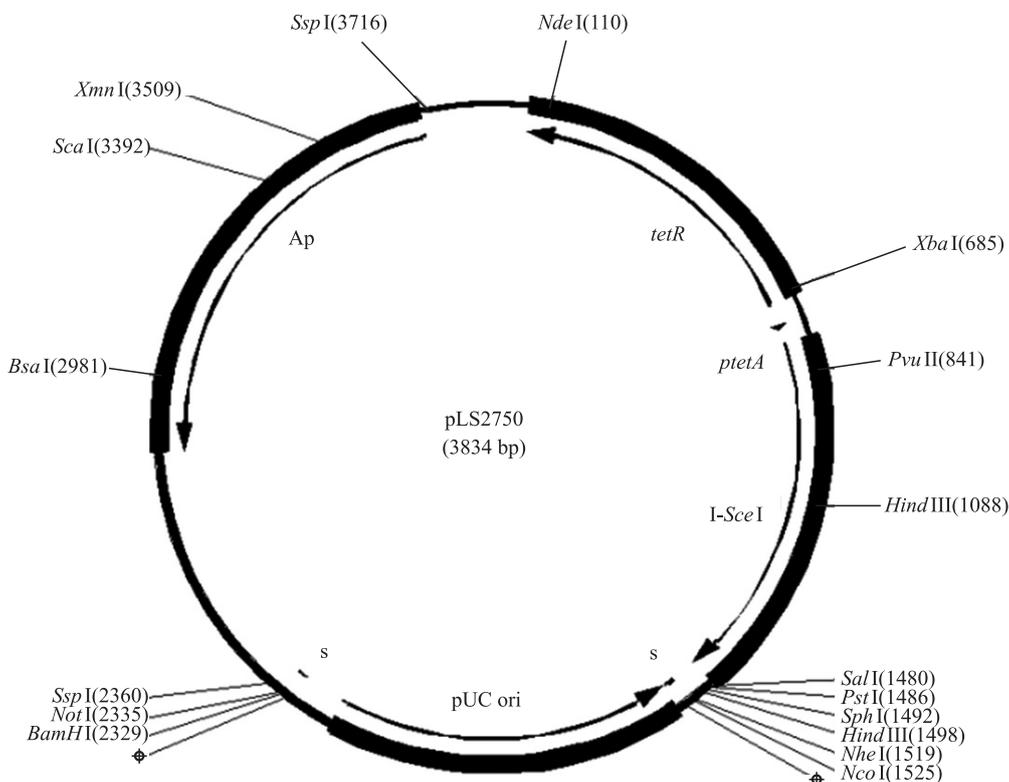
图1 寡核苷酸介导的 GyrA462 突变区域的测序分析

Fig.1 Nucleotide sequencing of GyrA462 region generated through single-stranded oligonucleotide mediated mutagenesis

图 1 中,上方为原株 BUN20 测序对照,下方为 GyrA462 突变株.可见原株中的 GATCTGCGTTTG-CAG 序列突变为变株中的 GACCTATGTTTACAA(突变位点以粗体表示,中间编码精氨酸密码子 CGT 突变为半胱氨酸密码子 TGT;序列在图中均以下划线表示).

## 2.2 pMK2010 的消除

为将 pMK2010 自基因工程菌株中消除,首先尝试在无抗之下连续培养 3 代,稀释得到单菌落,影印观察,结果发现挑取的 200 个克隆全部保留卡那霉素抗性.继续延长至 5 代,质粒仍然存在.因为 pMK2010 为高拷贝(每个细胞中含 500~700 个拷贝),推测虽然没有抗生素压力,但仍然难以去除所有的 DNA 分子.其次,选择质粒不相容性原理(即相同复制子性质粒不能共存于一个细胞中)来驱除 pMK2010.首先转化氨苄青霉素抗性质粒 pKsacB<sup>[17]</sup>,当培养中添加蔗糖时,*sacB* 基因编码的果聚糖蔗糖酶,可转化蔗糖为细菌毒素聚蔗糖而表现对菌株的毒性,即含有 *sacB* 基因的菌株不能生存.因此当 pMK2010 被驱除后,可加蔗糖来消除 pKsacB.但出乎意料的是,随机挑取 200 个氨苄青霉素抗性克隆,影印结果显示仍全部含有卡那霉素抗性,表明 pMK2010 和 pKsacB 共存于菌体中,质粒提取也验证了这一点.推测 pKsacB 和 pMK2010 大小相近(4761 bp 对 4892 bp),pKsacB 不能完全驱除 pMK2010,仍有少量 pMK2010 分子存在.在这种设想之下,构建了诱导自剪切载体 pLS2750(3824bp).pLS2750 的酶切图谱如图 2 所示.



*tetR*:抑制基因,*ptetA*:启动子,pUC:复制子区域,Ap:氨苄青霉素抗性基因,S:I-SceI 识别位点

图 2 诱导自剪切质粒 pLS2750 的限制性酶切图谱

Fig.2 Restriction map of auto-cleavable vector pLS2750

pLS2750 含有与 pMK2010 相同的 pUC 复制子和 *tetR-ptetA-I-SceI* 元件. pUC 复制子两侧设计 18 个碱基的 I-SceI 识别位点,此位点在大肠杆菌基因组中不存在,故不会干扰大肠杆菌的生存.四环素类化合物可解除 TetR 抑制,诱导基于质粒的 I-SceI 表达,I-SceI 酶切自身质粒即可获得子代细胞群体中失去质粒的个体. pLS2750 转化含 pMK2010 的 GyrA462 菌株,随机挑取 50 个克隆,影印发现其中 4 个表现为氨苄青霉素抗性和卡那霉素敏感性,表明在这 4 个菌株中,pLS2750 驱除了 pMK2010.随机挑取一个菌株转接至含 25 μg/mL 热诱导失活的四环素的 3 ml LB 中培养过夜,10<sup>-6</sup> 稀释得到单菌落.以 45 个克隆影印发现其中 3 个表现出氨苄青霉素抗性敏感性,表明 pLS2750 失去,至此获得了最终的无质粒存在的基因工程菌株,命名为 *E. coli* LS027,GyrA462 区域的 PCR 扩增和测序验证了菌株的正确性.

**2.3 *E.coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 *E. coli* LS027 转化效率的比较**

平行培养 *E.coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 *E. coli* LS027, 制备电转化感受态细胞, 分别以 5 ng pMK2010 电转化. 3 次平行试验, 计算存活细胞数和卡那霉素抗性菌落数. 结果显示, 二者的存活细胞数相当. 统一至每  $10^8$  细胞数, *E.coli* DB3.1  $\lambda$ pir 的转化效率和 LS027 的转化效率分别为  $7.2 \times 10^6/\mu\text{g}$  和  $6.9 \times 10^8/\mu\text{g}$ , 即后者约为前者的 100 倍. LS027 的转化效率略低于 DH10B (一般  $>10^9/\mu\text{g}$ ), 这与以 4.9 kb 的 pMK2010 检测 *E. coli* LS027 而以 2.7 kb 的 pUC19 检测 DH10B 有关, 质粒越大, 转化效率越低. 可见 GyrA462 基因型维持了宿主菌的转化效率.

**2.4 *E.coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 *E. coli* LS027 中 R6K 复制子质粒的拷贝数的比较**

5 ng R6K 复制子质粒 pKD4 分别转化 *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 *E. coli* LS027, 转化子单克隆转接 5 ml 含 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氨苄青霉素的 LB 培养基, 提取质粒以凝胶电泳和紫外光测定所得质粒的量. 结果显示, 自 *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 *E. coli* LS027 中所提取的质粒产量分别约为 150 ng/ml 和 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 表明 *pir116* 使 R6K 质粒拷贝数增加约 20 倍, 与预期相符. 20 ng 质粒和 100 ng 质粒酶切的电泳结果见图 3, 可见两个来源的质粒所得结果完全一致.

泳道 M: DL2000 分子量标准 (2.0 kb, 1.0 kb, 0.75 kb, 0.5 kb, 0.25 kb, 0.1 kb); 泳道 1, 2, 3 分别为

*E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 中提取的 pKD4, pKD4 以 *Sph* I 及 *Xba* I 酶切; 泳道 4, 5, 6 分别为 *E. coli* LS027 中提取的 pKD4, pKD4 以 *Sph* I 及 *Xba* I 酶切. *Sph* I 酶切获得 1.0 kb 和 2.3 kb; *Xba* I 酶切获得 1.4 kb 和 1.9 kb.

**2.5 构建以 *E. coli* LS027 为宿主菌的系列克隆载体**

合成生物学和代谢工程研究常涉及构建大量的重组克隆. 以蓝白筛选为代表的克隆方法的一个常见的问题是克隆效率不高(即可能有着较高的载体自连)且大量使用 IPTG 和 X-Gal 的价格不菲. 而以 *ccdB* 克隆至多克隆位点所得载体方法进行克隆, 由于宿主菌的不同, 原质粒载体的背景将得以消除. 首先构建了系列不同抗性的克隆载体, pKR 为通过重组方法所构建的将 pBluescript II KS(-) 的氨苄青霉素抗性基因和 f1(-) 部分以卡那霉素抗性基因所取代的克隆载体<sup>[18]</sup>. 庆大霉素抗性克隆载体 pKG 是以 pBluescript II KS(-) 为模板, C053 和 C054 为引物扩增的 1.6 kb pUC-MCS 的质粒骨架部分, 以 *Bgl* II 酶切和 C055-C056 为引物扩增的 0.8 kb 庆大霉素抗性基因(设计引物以突变其中的 *EcoR* V 位点)以 *Bam*HI 连接而获得. 氯霉素抗性克隆载体 pKC 是 *Bgl* II 酶切的 pUC-MCS 和 C073-C074 为引物扩增的氯霉素抗性基因, 经 *Bam*HI 酶切连接而获得. 其次, 为克隆方便, 以 pMK2010 为模板, R476F-R476R PCR 扩增后克隆至 pBluescript II KS(-) 的 *Cla* I 和 *Pst* I 位点, 获得 *ccdB* 基因两侧分别引入 *Bam*HI 和 *Bgl* II 位点的 pLS2723. 最后将 0.7 kb *Bam*HI-*Bgl* II 和不同抗性的克隆载体连接, 转化 *E. coli* LS027, 筛选得到系列克隆载体, 结果如表 2 所示.

表 2 以 *E. coli* LS027 为宿主菌的系列克隆载体

Table 2 Serial cloning vectors with *E. coli* LS027 as host strain

名称	抗性	大小/bp	质粒骨架	注释
pLS3123	Ap	3 168	pBluescript II KS(-)	
pLS3124	Ap	3 618	pBluescript II KS(-)	<i>ccdB</i> 为反方向
pLS3170	Kan	3 161	pKR	
pLS3170-2	Kan	3 161	pKR	<i>ccdB</i> 为反方向
pLS3172	Gm	3 016	pKG	
pLS3172-2	Gm	3 016	pKG	<i>ccdB</i> 为反方向
pLS3173	Cm	2 990	pKC	
pLS3173-2	Cm	2 990	pKC	<i>ccdB</i> 为反方向

注: Ap: 氨苄青霉素抗性; Kan: 卡那霉素抗性; Gm: 庆大霉素抗性; Cm: 氯霉素抗性.

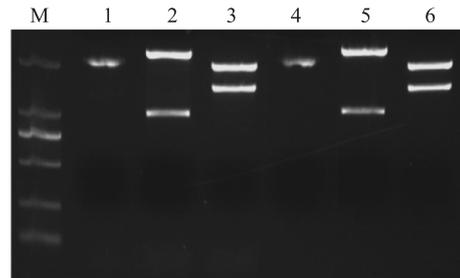
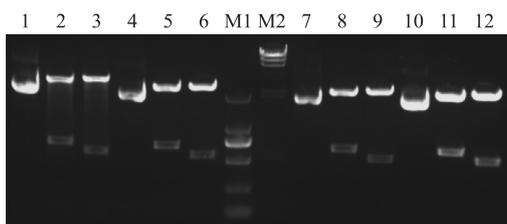


图 3 琼脂糖凝胶电泳分析 *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir 和 *E. coli* LS027 来源的 pKD4

Fig.3 Agarose electrophoresis of pKD4 isolated from *E. coli* DB3.1  $\lambda$ pir and *E. coli* LS027

重组质粒均经测序验证,部分质粒的凝胶电泳图谱如图 4 所示.



1: pLS3123 未酶切; 2: pLS3123 以 *Spe I-Pst I* 双酶切获得 0.68 kb 和 2.94 kb; 3: pLS3123 以 *Hinc II* 酶切获得 0.55 kb 和 3.07 kb; 4: pLS3170 未酶切; 5: pLS3170 以 *Spe I-Pst I* 双酶切获得 0.66 kb 和 2.50 kb; 6: pLS3170 以 *Hinc II* 酶切获得 0.55 kb 和 2.61 kb; 7: pLS3172 未酶切; 8: pLS3172 以 *Spe I-Pst I* 双酶切获得 0.65 kb 和 2.36 kb; 9: pLS3172 以 *Hinc II* 酶切获得 0.55 kb 和 2.64 kb; 10: pLS3173 未酶切; 11: pLS3173 以 *Spe I-Pst I* 双酶切获得 0.66 kb 和 2.33 kb; 12: pLS3173 以 *Hinc II* 酶切获得 0.55 kb 和 2.44 kb. M1: DL2000 分子量标准; M2:  $\lambda$ /*Hind III* 分子量标准 (23.1 kb, 9.4 kb, 6.6 kb, 4.4 kb, 2.3 kb, 2.0 kb).

图 4 以 *E. coli* LS027 为宿主菌所构建的质粒的酶切验证

Fig.4 Restriction digestions of cloning vectors constructed with *E. coli* LS027 as host strain

多个抗性以及两个克隆方向有更多的克隆方式可供选择. *ccdB* 基因同时用作填充片段,其可确保双酶切后所回收的载体均为酶切完全的,避免了如无填充片段时的不确定的问题.为验证所得质粒的使用性,使用 pLS3123 进行了系列的异源基因克隆,克隆宿主菌为 DH10B,正确率高达 100%,迄今未发现任何载体自连的现象,且筛选时无需 IPTG 和 X-Gal.

### 3 讨论

高效率和高通量的基因操作工具是合成生物学等研究的关键. *ccdB* 基因由于其高效和易于操作等优点而广泛运用于基因克隆、质粒修饰以及 *E. coli* 基因组工程等研究.本研究针对现有的菌株或转化效率不高或 R6K 复制子表现低拷贝等问题,运用重组酶催化优化的寡核苷酸的同源重组构建了 *E. coli* DH10B 衍生的基因工程菌株 *E. coli* LS027.

重组工程是上世纪末兴起并得到迅速发展的一种基于  $\lambda$  噬菌体来源的或类似功能的重组酶所催化的 DNA 之间同源重组而实现 DNA 克隆和修饰的生物技术手段.重组工程已成为对 DNA 大片段、微生物基因组以及难以进行的 DNA 操作的必不可少的策略之一<sup>[9-10,15-16]</sup>.

以寡核苷酸实现基因突变近几年发展较快.本研究中使用避免细胞内的错配修饰机制的突变寡核苷酸对实验的成败至关重要.此前选择的单个碱基突变的寡核苷酸(无论 5'-最末端含或不含 4 个磷硫酰寡核苷酸)均未获得 GryA462 突变.但菌株能够在卡那霉素筛选下存在,其机理可能是由于菌株的保护机制,破坏了 pMK2010 上的 *ccdB* 基因.本实验中另外 3 个未突变的菌株也属这种情形.在将 *ccdB* 基因克隆至 DH10B 时,发现 *ccdB* 缺失和截断等情形,这也是将 *ccdB* 基因和 R6K 复制子联合使用的依据.

在系列稀释和转化相近大小但不同抗性质粒均未能实现质粒消除之后,诱导自剪切型质粒 pLS2750 表现出很好的质粒消除功能,将之抗性基因置换或复制子置换则可用于其他抗性或复制子类型的质粒消除.研究中发现大量的两种相同复制子但不同抗性的质粒共存,其机理有待深入研究.

相对于基因组上含有重组酶基因的菌株而言<sup>[7]</sup>,*E. coli* LS027 的遗传背景更为清晰. LS027 的高转化效率可作为良好的克隆宿主菌来使用,以 *E. coli* LS027 为宿主菌构建了系列克隆载体(部分载体以 DB3.1  $\lambda$ pir 为宿主菌所未能获得),以所得载体进行克隆实验可完全去除背景干扰,进一步表明了 *E. coli* LS027 的适用性.综上所述,具良好 *ccdB* 容纳性能和促进 R6K 质粒高拷贝复制的基因工程菌株 LS027 在基因操作以及合成生物学研究中有着良好的应用前景.

#### [参考文献]

- [1] WARMING S, COSTANTINO N, COURT D L, et al. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): e36.
- [2] WONG Q N, NG V C, LIN M C, et al. Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase a selection

- system in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(6): e59.
- [3] LI X T, THOMASON L C, SAWITZKE J A, et al. Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(22): e204.
- [4] GREGG C J, LAJOIE M J, NAPOLITANO M G, et al. Rational optimization of tolC as a powerful dual selectable marker for genome engineering[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(7): 4 779–4 790.
- [5] HARTLEY J L, TEMPLE G F, BRASCH M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination[J]. Genome Res, 2000, 10(11): 1 788–1 795.
- [6] HOUSE B L, MORTIMER M W, KAHN M L. New recombination methods for *Sinorhizobium meliloti* genetics[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(5): 2 806–2 815.
- [7] WANG H, BIAN X, XIA L, et al. Improved seamless mutagenesis by recombineering using ccdB for counterselection[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(5): e37.
- [8] BERNARD P, COUTURIER M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes[J]. J Mol Biol, 1992, 226(3): 735–745.
- [9] 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 USA, 2000, 97(12): 6 640–6 645.
- [10] LI M Z, ELLEDGE S J. Magic, an *in vivo* genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules [J]. Nat Genet, 2005, 37(3): 311–319.
- [11] POSFAI G, KOLISNYCHENKO V, BERECZKI Z, et al. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(22): 4 409–4 415.
- [12] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] 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.
- [14] ELLIS H M, YU D, DITIZIO T, et al. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(12): 6 742–6 746.
- [15] LAJOIE M J, ROVNER A J, GOODMAN D B, et al. Genomically recoded organisms expand biological functions[J]. Science, 2013, 342(6 156): 357–360.
- [16] THOMASON L C, SAWITZKE J A, LI X, et al. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2014, 106(1): 39.
- [17] 杨运文, 蒋伏欢, 宋杰, 等. 重组工程法敲除恶臭假单胞菌 KT2440 的染色体基因[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2011, 34(4): 96–101.
- [18] 高九彩. *orf60a* 和 *recA* 对 Red 重组效率的影响及新型载体 pKR 和 pRedIG 的构建[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.

[责任编辑: 黄 敏]