

# Red 重组系统介导下大肠杆菌改造体系的优化\*

## Optimizing the Conditions for Red-mediated Recombinogenic Engineering of *E. coli*

张穗生<sup>1\*\*</sup>, 郭媛<sup>2\*\*</sup>, 韦廷宗<sup>1</sup>, 裴建新<sup>1</sup>, 黎贞崇<sup>1</sup>, 陈东<sup>1</sup>, 黄志民<sup>1</sup>, 黄日波<sup>1</sup>  
ZHANG Sui-sheng<sup>1</sup>, GUO Yuan<sup>2</sup>, WEI Ting-zong<sup>1</sup>, PEI Jian-xin<sup>1</sup>, LI Zhen-chong<sup>1</sup>,  
CHEN Dong<sup>1</sup>, HUANG Zhi-min<sup>1</sup>, HUANG Ri-bo<sup>1</sup>

(1. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**对 Red 重组系统介导下大肠杆菌进行遗传改造的转化条件、诱导条件、复苏条件三方面实验参数进行优化研究。结果表明:电转化加入的 DNA 为 20ng, Red 重组系统感受态细胞培养浓度为  $OD_{600}=0.60$ , 所需的电击感受态细胞数为  $3 \times 10^8$ ; 对大肠杆菌基因做双敲除时, 突变第 2 个基因的阿拉伯糖诱导最适时间比突变首个基因延长, 诱导浓度为  $40 \mu\text{m}$ , 复苏时间变化对体系影响不显著。

**关键词:**Red 重组系统 转化条件 诱导条件 复苏条件

**中图分类号:**Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2010)02-0160-04

**Abstract:** Red recombination system, one of important tools for gene replacement, has been applied in *Escherichia coli* metabolism engineering. Optimization of experimental parameters of this system is necessary for improving the efficiency of mutation. The goal of our research is to optimize the manipulation parameters by comparing the effect of transformation conditions, induction condition and cell recovery conditions on the gene knock-out results of *E. coli*. The optimized transformation condition was that 20ng DNA is added into  $3 \times 10^8$  cells per transformation, culture used for preparation of competent cell is at concentration of 0.60  $OD_{600}$  value. The induction time required for knocking-out the second gene was relative longer comparing with that for first gene, the ideal concentration for arabinose induction was  $40 \mu\text{m}$ . No obvious influence was found when the recovery time was adjusted.

**Key words:** lambda red recombination, transformation condition, induction condition, cell recovery condition

Red 重组系统依靠噬菌体  $\lambda_{exo}$ ,  $\beta$ et 和  $\gamma$ am 编码的 3 个蛋白质提高重组效率<sup>[1]</sup>, 是基因敲除的有力工具, 已经被成功地应用于大肠杆菌的代谢工程<sup>[2]</sup>。Exo 蛋白具有对双链 DNA 5'-3' 核酸外切酶的活力, Bet 蛋白是一个单链 DNA 结合蛋白, 影响互补单链

DNA 间的退火, Gam 蛋白则抑制 RecBCD 核酸外切酶的活力。利用这个系统, PCR 扩增的 DNA 同源片段可以替换大肠杆菌目标基因, 实现基因敲除<sup>[3]</sup>。pKD46 是 Datsenko 和 Wanner 构建的表达 Exo、Bet 和 Gam 三基因片段的质粒, 3 个基因置于阿拉伯糖启动子下, 经 L- 阿拉伯糖诱导就可以大量表达<sup>[3]</sup>。同时 pKD46 还具有温度敏感型复制子, 该质粒在  $42^\circ\text{C}$  时不能复制, 自然丢失。pKD3 是带有氯霉素抗性基因的质粒, 抗性基因两侧有 FRT 位点 (FLP 重组酶识别位点), 是 Red 重组系统中抗性标记扩增的模板。pCP20 是表达 FLP 重组酶基因的质粒, FLP 重组酶可以与 FRT 位点结合, 在 FLP 重组酶的作用下,

收稿日期: 2009-07-09

修回日期: 2009-09-03

作者简介: 张穗生 (1972-), 女, 博士, 主要从事微生物学、分子生物学研究。

\* 广西科学院基本科研业务费资助项目“甘蔗渣生产丁醇技术和工艺研究”(08YJ16SW05), 广西科学研究与技术开发计划项目“利用禾本纤维生产丁醇菌株的选育及其中试”(桂科攻0992022-1)资助。

\*\* 同等贡献。

FRT 位点自身发生同源重组,从而消除 FRT 位点及抗性基因。复制子为温度敏感型,重组酶 FLP 在 42℃ 时诱导表达,同时质粒也逐渐被消除<sup>[4]</sup>。Red 重组系统敲除基因的效率受实验条件影响<sup>[5]</sup>。本研究对 Red 重组系统介导下大肠杆菌遗传改造的转化条件、诱导条件、复苏条件进行优化,为高效突变大肠杆菌基因,进行菌株代谢工程改造提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BW25113 (lacI<sup>q</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub>) 由本研究中心保存。大肠杆菌 BW 25113adh 突变体(大肠杆菌 BW 25113 Δadh) 由本研究中心构建。质粒 pKD46 (Ampr, λ Red recombinase expression)、pKD3 (Ampr, Cmr, chloramphenicol-resistant cassette template)、pCP20 (Amp<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, FLP recombinase expression)、pMD18-T (Amp<sup>r</sup>, cloning vector) 由本研究中心保存。

### 1.2 培养基和抗性筛选

LB 培养基:蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、氯化钠 5g、去离子水 1000ml、pH 值 7.0。LA 培养基:LB 培养基添加琼脂 15~20g。

SOC 培养基:蛋白胨 20g、酵母提取物 5g、NaCl 0.5g、2.5 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM 葡萄糖、去离子水 950ml、pH 值 7.0。培养基灭菌待用。抗生素筛选浓度:Ampr:氨苄青霉素添加至 50μg/ml, Cm<sup>r</sup>:氯霉素添加至 12.5μg/ml。

### 1.3 引物

oxyRcmF: 5'-ATGAATATTCGTGATCTTGAGTACCTGGTGGCATTGGTCTTGAGCGATTGTGTAGG-3'

oxyRcmR: 5'-TTAAACCGCCTGTTTTAAACTTTATCGAAATGGCCCTTAACGGCTGACATGGGAA-3'

oxyRF: 5'-CGCGGATCCGTGGCGATGGAGGATGGATA-3'

oxyRR: 5'-CCCAAGCTTGGGTAGCTGCGTTAAACGGT-3'

oxyRcmF、oxyRcmR 是以 pKD3 为模板,扩增突变 oxyR 基因同源片段的引物,划线部分为 oxyR 基因同源区。oxyRF、oxyRR 是鉴定 oxyR 基因是否正确突变的引物。

### 1.4 突变方法

将 BW25113/pKD46 菌株接种至 LB 培养基,置于 30℃ 摇床振荡培养过夜,次日按 1:100 接种于 100ml LB 培养基中,30℃ 振荡培养,加入阿拉伯糖培

养,诱导 Red 重组系统 Exo、Bet 和 Gam 三基因表达,冰上预冷 10min 以上,3500r/min、4℃ 离心 10min,弃培养基,用高压灭菌去离子水洗涤 3 次,最后用少灭菌去离子水重悬细菌,制备感受态细胞,随后立刻进行电转化。将含有同源臂引物扩增的抗性基因片段用 DpnI 酶切后回收,转入 0.2cm 电击杯,用电击仪作电转化。电击条件:200Ω, 25μF, 电击电压 2500V, 电击时间 4~5ms。转化后在摇床 150r/min, 37℃ 振荡培养进行细胞复苏,之后取 500μl 涂于抗性平板上,培养后用 PCR 法鉴定长出的阳性克隆。制备 pCP20 感受态细胞,利用化学转化将 pCP20 转入氯霉素抗性阳性菌株,转化后涂无抗性平板到 42℃ 培养过夜,筛选阳性突变子。即,用牙签挑相同单菌落,在无抗性和抗性平板上做对照实验,获得在无抗性平板生长而在抗性平板未生长的菌落。初步断定抗性基因已被 FLP 重组酶删除,随后用鉴定引物对抗性消失的菌落进行 PCR 鉴定,同时进行测序验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 oxyR 基因的突变

在利用 Red 重组系统突变的多个大肠杆菌基因中,选取 oxyR 基因突变作为代表。以 pKD3 为模板,使用引物 oxyRcmF、oxyRcmR 扩增突变 oxyR 基因同源片段,扩增产物长度 1.131kb(图 1),经过电转化后,基因 oxyR 被缺失突变, oxyR 基因被氯霉素抗性盒两侧分别附带 36bp oxyR 基因同源片段所替换。oxyRF、oxyRR 鉴定 oxyR 基因是否正确突变,扩增野生型大肠杆菌 BW25113 产物长度 0.976kb,扩增 oxyR 基因被氯霉素基因替换后基因长度 1.189kb(图 2),抗性消除则是将质粒 pCP20 转化至带氯霉素抗性盒的 oxyR 缺失突变体菌株,以帮助突变体消除抗性,用验证引物 PCR 验证突变体消除氯霉素抗性盒,PCR 长度 0.3kb(图 3),测序也证明 oxyR 缺失突变体构建成功,并且消除氯霉素抗性盒。

### 2.2 转化条件对突变的影响

#### 2.2.1 外源 DNA 量对突变的影响

pKD3 为模板扩增敲除 oxyR 的片断。分别取纯化后的 5ng、10ng、20ng、30ng、40ng PCR 产物,加入至新鲜制备的大肠杆菌 BW 25113/pKD46 感受态细胞中,混匀电转化,结果以加入 20ng DNA 片段为最佳(表 1)。外源 DNA 片段量小于 5ng 或大于 40ng,电转化后用添加氯霉素 LA 平板筛选到的阳性克隆数明显下降,获得的 oxyR 基因缺失突变体仅是加入 20ng DNA 片段的 24.36%、21.79%。

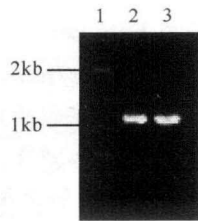


图1 敲除 *oxyR* 基因的 PCR 产物电泳

Fig. 1 PCR product of *oxyR* deleted

1:DL2000 DNA marker, 2,3:p KD3为模板扩增的敲除 *oxyR* 基因片段。

1:DL2000 DNA marker, 2,3:PCR products for deletion of *oxyR* using pKD3 as template.

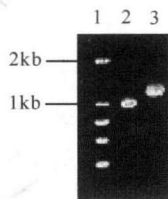


图2 *oxyR* 基因被敲除(突变体带氯霉素抗性盒)验证电泳  
Fig. 2 Verification of deletion of *oxyR* (mutant containing chloramphenicol-resistant cassette)

1:DL2000 DNA marker, 2:野生型菌株验证 PCR 产物, 3: *oxyR* 基因缺失突变体(带氯霉素抗性盒)验证 PCR 产物。

1:DL2000 DNA marker, 2:PCR product of verification of wild type strain, 3: PCR product of verification of *oxyR*-deleted mutant containing chloramphenicol-resistant cassette.

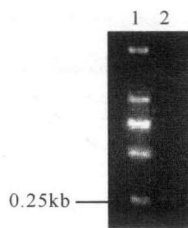


图3 *oxyR* 基因缺失突变体(氯霉素抗性盒消除后)验证电泳

Fig. 3 Verification of deletion of *oxyR* (mutant without chloramphenicol-resistant cassette)

1:DL2000 DNA marker, 2: *oxyR* 基因缺失突变体(氯霉素抗性盒消除后)验证 PCR 产物。

1:DL2000 DNA marker, 2:PCR products of verification of *oxyR* knock-out mutant without chloramphenicol-resistant cassette.

表1 外源 DNA 量对突变的影响

Table 1 Effect of foreign DNA amount on the mutagenesis

处理 Process	外源 DNA 量 Foreign DNA (ng)	<i>oxyR</i> 基因缺失突变体阳性克隆数* (个) <i>oxyR</i> gene positive deletion mutations (unit)
1	5	19
2	10	37
3	20	78
4	30	50
5	40	17

\* 平均值,每次实验重复3次,采用 Dixon 检验法检测未发现异常数据,突变体带氯霉素抗性盒。

\* Mean value of three experiments, no abnormal result was found by Dixon test, the mutation was with chloramphenicol-resistant cassette.

## 2.2.2 感受态细胞对突变的影响

BW25113/p KD46过夜培养物转接培养,经阿拉伯糖诱导后,多次实验转接培养至  $OD_{600}$  值0.2、0.4、0.6、0.8、1.0,制成所需的电击感受态细胞,随后立刻进行电转化。使用  $OD_{600}$  值0.2~0.6培养液制备感受态细胞可取得高突变效率,以  $OD_{600}$  值0.6为最佳,  $OD_{600}$  值提高对突变影响不利,尤其  $OD_{600}$  值>0.8时,几乎得不到 *oxyR* 基因缺失突变体(表2)。另外,电转化的感受态细胞浓度对突变也有影响,测试显示感受态细胞浓度以  $3 \times 10^8/50\mu\text{l}$  较好,  $0.5 \times 10^8/50\mu\text{l}$ 、 $6 \times 10^8/50\mu\text{l}$  使 *oxyR* 基因缺失突变体阳性克隆数比  $0.5 \times 10^8/50\mu\text{l}$  下降至4.48%、22.39%(表3)。这与文献[6~9]报道的结果基本一致。

表2 培养液(用于制备感受态细胞) $OD_{600}$ 对突变的影响

Table 2 Effect of  $OD_{600}$  of the culture for preparation of competent cell on the mutagenesis

处理 Process	感受态细胞液 Competent cell ( $OD_{600}$ )	<i>oxyR</i> 基因缺失突变体阳性克隆数* (突变体/微克) <i>oxyR</i> gene deletion mutations (positive mutation/ $\mu\text{g}$ )
1	0.2	1100
2	0.4	2420
3	0.6	3200
4	0.8	36
5	1.0	8

\* 平均值,每次实验重复3次,采用 Dixon 检验法检测未发现异常数据,突变体带氯霉素抗性盒。

\* mean value of three experiments, no abnormal result was found by Dixon test, the mutation was with chloramphenicol-resistant cassette.

## 2.3 诱导条件对突变的影响

### 2.3.1 阿拉伯糖诱导浓度对突变的影响

将 BW25113/p KD46 菌株置于  $30^\circ\text{C}$  转接培养,  $30^\circ\text{C}$  培养至  $OD_{600} = 0.6$  时,分别加入阿拉伯糖至终浓度为  $20\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ , 比较不同阿拉伯糖诱导浓度对突变的影响结果(表4)显示,阿拉伯糖诱导浓度为  $40\mu\text{m}$  时突变效率最高。浓度高至  $100\mu\text{m}$  或低至  $20\mu\text{m}$  均会使诱导效率下降而导致所得突变体减少。实验结果与文献[6~9]报道的基本一致。

表3 感受态细胞浓度对突变的影响

Table 3 Effect of competent cell concentration on the mutagenesis

处理 Process	感受态细胞数量(细胞数 $\times 10^8/50\mu\text{l}$ ) Competent cell number (cells $\times 10^8/50\mu\text{l}$ )	<i>oxyR</i> 基因缺失突变体阳性克隆数* (突变体/微克) <i>oxyR</i> gene deletion mutations (positive mutation/ $\mu\text{g}$ )
1	0.5	150
2	1.5	450
3	3	3350
4	4.5	2000
5	6	750

\* 平均值,每次实验重复3次,采用 Dixon 检验法检测未发现异常数据,突变体带氯霉素抗性盒。

\* Mean value of three experiments, no abnormal result was found by Dixon test, the mutation was with chloramphenicol-resistant cassette.

表4 不同阿拉伯糖诱导浓度对突变的影响

Table 4 Effect of concentration of arabinose on the mutagenesis

处理 Process	阿拉伯糖诱导浓度 Arabinose concentration( $\mu\text{m}$ )	<i>oxyR</i> 基因缺失突变体阳性克 隆数* (突变体/微克) <i>oxyR</i> gene deletion mutations (positive mutation/ $\mu\text{g}$ )
1	20	1800
2	40	3180
3	60	1200
4	80	1080
5	100	360

\* 平均值,每次实验重复3次,采用 Dixon 检验法检测未发现异常数据,突变体带氯霉素抗性盒。

\* Mean value of three experiments, no abnormal result was found by Dixon test, the mutation was with chloramphenicol-resistant cassette.

### 2.3.2 基因双敲除所需阿拉伯糖诱导时间

经多次实验发现,基因双敲除时,敲除第2个基因时阿拉伯糖诱导时间需要延长。以大肠杆菌 BW25113adh 突变体为材料,再敲除 *oxyR* 基因阿拉伯糖诱导时间以2h 为佳,过短或过长均会使诱导效果不佳(表5),比突变首个基因的1h 延长1h,即诱导时间为2h。

### 2.4 复苏时间对突变的影响

电击后迅速加入1 ml 的 SOC 培养基,150 r/min, 37℃ 振荡复苏培养,分别复苏培养15min、30min、45min、60min、90min、120min、200min、240min 和360 min,取500 $\mu\text{l}$  涂于氯霉素抗性平板上筛选,37℃ 培养24h 后用 PCR 法鉴定长出的克隆。鉴定出的阳性克隆需培养后反复涂布3次以上,确保正常传代。实验发现不同复苏时间对阳性突变菌株产生影响不明显。与已有报道<sup>[6-9]</sup>不同,推测复苏时间对突变的作用受其它实验条件影响而变化。

表5 不同诱导时间对双突变的影响

Table 5 Effect of induction time on the double mutagenesis

处理 Process	阿拉伯糖诱导时间 Induction time of arabinose (min)	<i>adhE</i> 、 <i>oxyR</i> 基因双缺失突变体 阳性克隆数(突变体/微克)* <i>adhE</i> 、 <i>oxyR</i> gens double deletion mutation(positive mutation/ $\mu\text{g}$ )
1	30	1020
2	60	1500
3	90	1815
4	120	2790
5	150	1520

\* 平均值,每次实验重复3次,采用 Dixon 检验法检测未发现异常数据,突变体带氯霉素抗性盒。

\* Mean value of three experiments, no abnormal result was found by Dixon test, the mutation was with chloramphenicol-resistant cassette.

## 3 结论

本研究将 Red 重组系统介导下大肠杆菌遗传改造体系的转化条件、诱导条件、复苏条件三方面操作

参数优化为:在电转化过程中加入20ng 外源 DNA 片段,制备后感受态细胞的终浓度 $3 \times 10^8/50\mu\text{l}$ ,诱导过程中加入40 $\mu\text{m}$  阿拉伯糖,用于制备感受态细胞的大肠杆菌液体培养物  $OD_{600} = 0.6$  为佳。加入的外源 DNA 片段的量、感受态细胞的制备浓度、 $OD_{600}$  值过低或过高都会使转化效率降低。本研究的复苏时间对突变的影响不显著。

本研究新发现基因连续敲除时诱导时间需要延长,大肠杆菌 BW25113adh 突变体再敲除 *oxyR* 基因阿拉伯糖诱导时间以2h 为佳,比敲除单个基因所需时间延长1h。

本研究的优化结果,提高了 Red 重组系统介导下大肠杆菌改造体系的实验效率,可以在大肠杆菌代谢途径改造上推广应用。

### 参考文献:

- [1] Murphy K C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1998, 180(8): 2063-2071.
- [2] Gaur R, Varshney U. Genetic analysis identifies a function for the queC (*ybaX*) gene product at an initial step in the queuosine biosynthetic pathway in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2005, 187(20): 6893-6901.
- [3] Poteete A R. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 201(1): 9-14.
- [4] 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): 6640-6645.
- [5] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 89-93.
- [6] Murphy K C, Campellone K G, Poteete A R. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli* [J]. Gene, 2000, 246: 321-330.
- [7] 白光兴, 孙志伟, 黄莺, 等. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 ClpP 基因的敲除 [J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 21: 35-38.
- [8] 陈五九, 王成华, 王利英, 等. 产 L-乳酸的大肠杆菌基因工程菌的构建 [J]. 广西农业生物科学, 2007, 26: 16-21.
- [9] Yu D, Ellis H M, Lee E C, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(11): 5978-5983.

(责任编辑:邓大玉)