

研究简报

利用 Red 重组工程技术解决外源基因在大肠杆菌染色体 *lac* 操纵子中的表达

李山虎, 施庆国, 黄翠芬, 周建光

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850

摘要: 为了应用 Red 重组工程技术实现外源基因在大肠杆菌染色体上的表达, 寻找染色体上外源蛋白的稳定高效表达位点, 使用 Red 重组工程系统和 *kan/sacB* 无痕修饰技术, 将易于定量分析的荧光素酶报告基因替换 DY330 染色体 *lac* 操纵子中的 *lacZ* 基因。检测该位点的表达效率结果显示: 大肠杆菌染色体上 *lac* 操纵子能够高效稳定表达外源基因, 初步证明了染色体可以作为外源蛋白或抗原的表达载体, 不会影响细菌的生长繁殖。

关键词: 重组工程, 同源重组, 荧光素酶报告基因, 原核表达

Heterologous Genes Expression on *Escherichia coli* Chromosome *lac* Operon Using Red Recombination

Shanhu Li, Qingguo Shi, Cuifen Huang, and Jianguang Zhou

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: To achieve efficient and stable expression of heterologous exogenous protein or antigen in *E. coli* chromosome, the luciferase report gene was knocked in *lacZ* site of chromosome *lac* operon by using Red recombination system and selection-counterselection *kan/sacB* technology. The quantitative analysis of exogenous gene expression indicated that the target gene could be efficiently expressed at *lacZ* site of *lac* operon. The results confirmed the efficient screening and stable expression of heterologous protein or antigen on chromosome by using the recombinant engineering technique. This study demonstrated that the chromosome could be used as a vector for heterologous protein or antigen and the stable expression of exogenous gene on *E. coli* chromosome had no side effect on the bacterial growth and propagation.

Keywords: recombination, homologous recombination, luciferase report gene, prokaryotic expression

重组工程(Recombineering)是一种近年来兴起的基于λ噬菌体 Red 重组酶和体内同源重组反应的新型遗传工程技术^[1]。使用该技术不需要限制性内切酶和连接酶, 即可在大肠杆菌体内对染色体 DNA、细菌人工染色体(BAC)进行高效精确的敲除、

敲入和突变等修饰^[2,3]。目前大肠杆菌 K12 株测序工作已经完成, 大肠杆菌染色体本身可以作为一个大载体携带多种外源基因。应用重组工程技术寻找染色体上适合外源基因的敲入位点, 替代质粒作为外源基因表达的载体, 有望解决质粒在没有抗生素

Received: August 26, 2007; Accepted: January 10, 2008

Supported by: the Medical Science Foundation of PLA (No. 06MA329).

Corresponding author: Jianguang Zhou. Tel: +86-10-66931807; Fax: +86-10-68248045; E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn

全军医药卫生科研基金项目 (No. 06MA329)资助。

等筛选压力下丢失的问题^[4]。

为进一步探索外源基因敲入到大肠杆菌染色体中的合适位点和方法, 我们应用大肠杆菌 DY330 介导的重组工程系统和 *kan/sacB* 无痕修饰技术^[5,6], 选择了大肠杆菌 *lac* 操纵子中的 *lacZ* 基因为外源基因的敲入的位点。将荧光素酶报告基因(*luc*)敲入染色体 *lacZ* 处, 对报告基因的表达分析表明 *lac* 操纵子 *lacZ* 基因位点适应外源基因表达。初步证明了大肠杆菌染色体可以作为外源蛋白或抗原的稳定高效表达载体, 为以后在 *E. coli* 染色体上表达病原体的抗原基因奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株质粒的基因型见表 1。

表 1 菌株和质粒及基因型
Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains	Genotype
DY330	W3110 $\Delta lacU169 gal490 \lambda cl857 \Delta(cro-bioA) \Delta lacI$
Lis12	W3110 <i>lacZ</i> <> <i>luc</i> $\Delta lacI$
plasmid pUC19	<i>lacZ</i> <i>Ap^R</i>
pUC-KS	pUC19 <i>kan^R sacB+</i>
pGL3-Basic	<i>Ap^R luc+</i>
pUC19-luc	pUC19 <i>lacZ</i> <> <i>luc</i>

菌株 DY330 为 Court DL 博士馈赠, 是将带有 Red 重组酶基因(*gam*、*bet* 和 *exo*)的缺陷型 λ 前噬菌体左向操纵子整合在大肠杆菌 W3110 的染色体上, 染色体上 *lac* 操纵子中的 *lacI* 基因缺失。Lis12 菌株为本研究构建的荧光素酶报告基因替换染色体上 *lac* 操纵子中的 *lacZ* 基因, 质粒 pUC19-luc 为本研究

构建的荧光素酶基因在 *lac* 启动子调控下由 IPTG 诱导表达。质粒 pUC-KS 为 pUC19 质粒携带 *kan/sacB* 双向筛选标记由本研究室构建并保存, 质粒 pGL3-Basic、pUC19 为 Promega 公司产品, 由本研究室保存。

1.2 培养基和试剂

LB 培养基, *sacB* 反向筛选培养基: M63, 琼脂 15 g/L, 0.2% 甘油, 1 mg/L 生物素, 7% 蔗糖, pH 值 7.0。抗生素浓度为氨苄青霉素(*Amp*) 50 μ g/mL、卡那霉素(*Kan*) 25 μ g/mL, 为 Sigma 公司产品。各种限制酶、聚合酶、DNA marker 均为 TaKaRa 公司产品。质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、单荧光素酶分析试剂盒均为 Promega 公司产品, 试剂均为分析纯试剂。

1.3 同源臂及引物设计、打靶片段的制备

同源臂决定了目的基因插入的位置, 按照 GC 分布均匀含量约为 50%, 长度约为 40 bp 的原则设计。扩增引物部分按照常规方法设计, 引物序列中小写字母代表与打靶区同源的序列, 大写字母代表扩增引物序列, 下划线的字母为限制性内切酶切位点序列。本研究所用引物及序列见表 2。

PCR 扩增采用 The GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), 高保真 *SuperTaq* 酶购自上海申能博彩生物科技有限公司。kansacB-lacZ1 和 2 引物扩增得到 3100 bp 的 *kan/sacB* 双向筛选标记替换染色体上 *lacZ* 编码区的双链 DNA 打靶片段。*lacZ-luc1* 和 2 引物扩增得到 1653 bp 的 *luc* 基因替换位于 *lacZ* 编码区的 *kan/sacB* 双链 DNA 打靶片段。*lacZ-T1* 和 2 是位于 *lacZ* 打靶区左右两侧的鉴定引物。*pUC-luc1* 和 2 引物用于扩增 *luc* 基因两侧分别带有 *Pst* I 和 *EcoR* I 酶切位点。引物合成及 DNA 测序由上海英俊生物技术公司完成。

表 2 引物及序列
Table 2 Primers for this work

Primers	Sequences (5' to 3')
kansacB-lacZ1	gtgaatttagctgtagatgccataagtgtttgatccat CATCACATATACCTGCCGTTTC
kansacB-lacZ2	gccacacaccaccaaagtaactgacaggagaatccagTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG
<i>lacZ-luc1</i>	ttgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
<i>lacZ-luc2</i>	ttacgcgaaatcggcagacatgctgcccgggttattaTTACACGGCGATCTTTCCGC
<i>lacZ-T1</i>	GAGTTAGCTCACTCATTAGG
<i>lacZ-T2</i>	CCGGTAATAATCCACAGCAG
pUC-luc1	aactgcagaaccaatgcattggATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
pUC-luc2	cggattccgTTACACGGCGATCTTTCCGC

1.4 电击转化及感受态细胞的制备

大肠杆菌接种于 LB 培养液, 30°C 空气摇床过夜培养, 取培养物按 1:50 转接于 20 mL 液体 LB, 诱导重组酶表达: 30°C 震荡培养至 $OD_{600}=0.4\sim 0.6$, 取 15 mL 培养物置于 150 mL 锥形瓶中, 42°C 水浴震荡培养 15 min; 立刻将上述培养物转移至无菌预冷聚丙烯离心管中, 冰浴 30 min; 4°C 5200 r/min 离心 8 min, 弃上清, 加入 30 mL 冰冷无菌水重悬菌体, 6500 r/min 离心 8 min, 弃上清以清洗除盐。再加入 30 mL 冰冷无菌水重悬菌体, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 1 mL 冰冷无菌水重悬于 1.5 mL 预冷 Eppendorf 管中。最后在 4°C, 12000 r/min 离心 30 s, 小心弃去上清, 重悬于 50 μ L 冰冷的无菌水。取 2 μ L 线性 DNA(100 ng/ μ L)和 48 μ L 上述冰冷感受态细胞, 混匀后加入预冷的 0.1 mL 电击杯中, 使用 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪, 按 1.8 kV, 25 μ F, 200 ohms 条件电穿孔转化。电击后立即加入 1 mL 液体 LB 培养液。30°C 震荡培养 2 h。利用 *kan* 基因筛选将菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上, 30°C 过夜培养, 挑选重组子, 菌液涂布于含 7%蔗糖的 M63 培养基上培养利用 *sacB* 基因反向筛选重组子。

1.5 *lacZ* <> *luc* 菌株(Lis12)的构建

首先将 *kansacB-lacZ1* 和 2 引物扩增得到 3100 bp 的 *kan/sacB* 双向筛选标记双链 DNA 打靶片段电击转化至按照上述方法制备的感受态细菌, 利用 DY330 所提供的 Red 系统, 体内同源重组替换染色体上 *lac* 操纵子中 *lacZ* 编码区, 重组菌涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上, 30°C 过夜培养, 利用 *kan* 基因筛选重组子。然后由 *lacZ-luc1* 和 2 引物扩增得到 1653 bp 的 *luc* 基因双链 DNA 打靶片段替换位于 *lacZ* 编码区的 *kan/sacB*, 菌液涂布于含 7%蔗糖的 M63 培养基上利用 *sacB* 基因反向筛选重组子。

1.6 重组质粒 pUC19-*luc* 的构建

使用 pUC-*luc1* 和 2 引物和高保真聚合酶 Pyrobest 以 pGL3-Basic 质粒为模板, 普通 PCR 方法扩增得到荧光素酶编码区 DNA。用 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切 PCR 片段, DNA 片段纯化回收后与经过相同双酶切处理的 pUC19 载体连接。质粒提取、酶切等步骤均按常规分子克隆方法进行。

1.7 荧光素酶定量分析

将过夜培养的细菌 1:50 接种于液体 LB 培养基 30°C 振荡培养 3 h 使 OD_{600} 达到 1.0; 取 2 mL 菌液

离心后溶于 90 μ L LB 加 10 μ L 1 mol/L K_2HPO_4 (pH 7.8), 20 mmol/L EDTA; 速冻置于室温水浴溶解后加 300 μ L lysis mix 溶液, 室温放置 10 min; 取裂解物 20 μ L 与 100 μ L 的 luciferase assay reagent 底物溶液混合后在荧光素酶分析仪上测值。实验重复 3 次, 实验数据使用 Excel 软件求平均值和标准差。

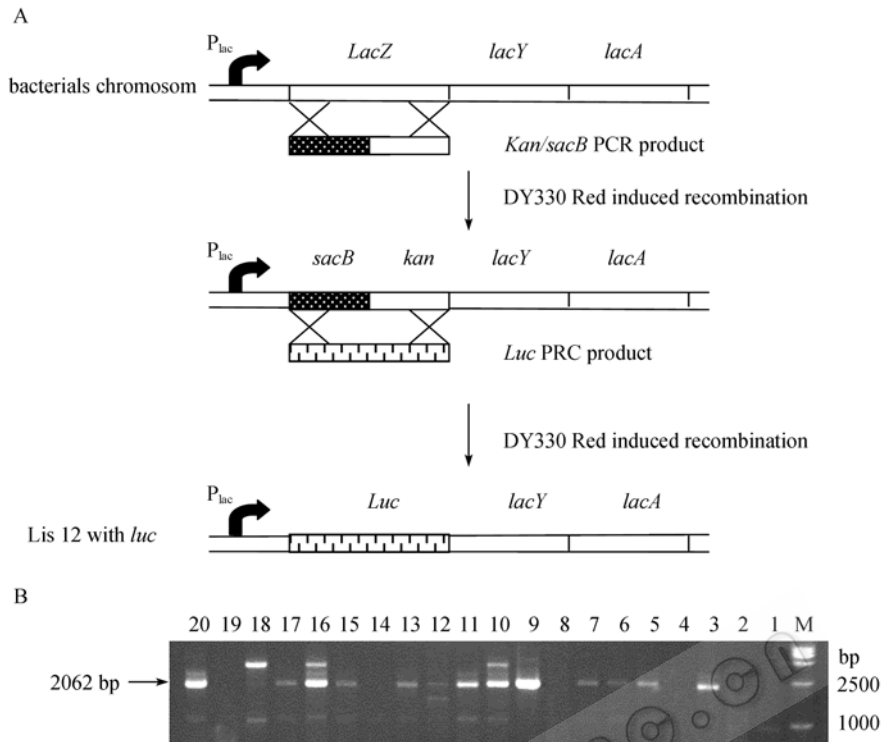
2 结果

2.1 *lacZ* <> *luc* 菌株(Lis12)的构建

本研究选择定量分析操作简便并具有非常高敏感度和特异性的 *luc* 作为分析表达效率的报道基因, 在 Red 重组酶介导下采用 *kan/sacB* 选择与反选择方法, 通过两步体内同源重组将 1653 bp 的 *luc* 编码序列敲入大肠杆菌 DY330 染色体 *lac* 操纵子中 *lacZ* 基因位置。第一步在 42°C 的温度诱导下 Red 重组酶表达, 将通过 PCR 扩增得到的两侧各带有 40 bp 与 *lacZ* 基因插入位点同源的双链线型 DNA 打靶片段 *sacB/kan* 与大肠杆菌染色体 *lacZ* 基因发生同源重组, 用含卡那霉素的 LB 平板筛选靶基因被 *kan/sacB* 基因替换的阳性的克隆(*kan*^R); 第二步同源重组是用 *luc* 报告基因替换染色体 *lacZ* 位置上的 *kan/sacB* 基因, 利用 *sacB* 基因反向筛选阳性克隆, 重组菌使用含 7%蔗糖的 M63 平板筛选 *kan/sacB* 基因被替换的阳性的克隆(*sacB*^R), 随机挑取 20 个单菌落 PCR 鉴定, 结果显示 13 个菌落能够扩增出 *luc* 基因特异条带, 阳性率约为 65%。挑取 9 号 *luc* 报告基因替换 *lacZ* 的菌株命名为 Lis12(*lacZ* <> *luc*), 其中 A <> B 代表 A 基因被 B 基因替换(重组策略及鉴定见图 1)。

2.2 荧光素酶报告基因表达分析

按照材料与方法中荧光素酶定量分析的步骤对以染色体为载体表达 *Luc* 的 Lis12 菌株和以 pUC19 质粒为载体在 IPTG 诱导下表达 *Luc* 的 pUC19-*luc* 重组质粒进行外源基因的表达效率分析, DY330 为阴性对照。定量分析结果显示: Lis12 菌株的 *luc* 报告基因在染色体 *lacZ* 位置上的表达水平高于质粒 pUC19-*luc*, 阴性对照未检测到 *luc* 表达(图 2A)。将 Lis12 菌在无抗生素的筛选压力下进行 120 h 传代培养, 分别在不同时间点检测其荧光素酶表达活性并观察细菌的浓度和生长繁殖状态。结果显示: Lis12 菌株染色体上的 *luc* 基因在各时间点的表达效率无明显波动, 在无抗生素的筛选压力培养条件下能够

图1 *luc* 敲入大肠杆菌染色体 *lacZ* 的构建筛选过程及鉴定Fig. 1 Strategies for construction of a *lacZ <-> luc* bacterial strain (Lis12)

A: generation of a *lacZ <-> luc* bacterial strain (Lis12); B: PCR analysis of the resultant colonies: lanes 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 and 20 are PCR products (2062 bp) from *lacZ <-> luc* colonies; M: DL15000 DNA marker

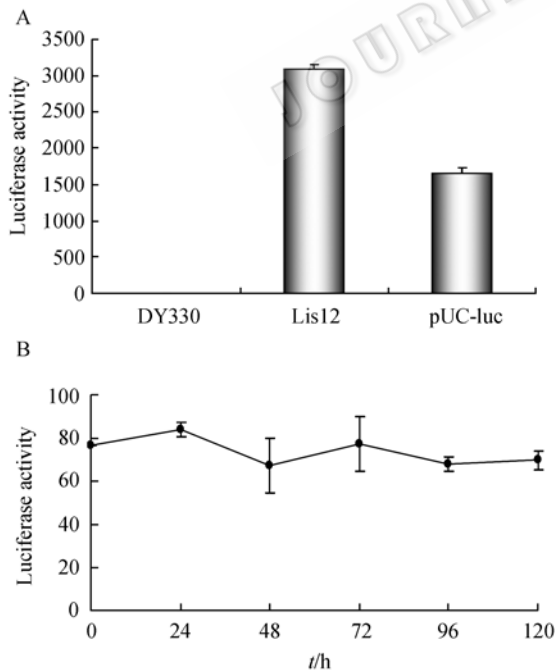


图2 荧光素酶活性分析

Fig. 2 Analysis of luciferase activity

A: analysis of luciferase expression on Lis12 chromosome and pUC-luc plasmid; B: stability of luciferase expression on Lis12 chromosome

稳定表达(图 2B); 细菌的生长状态良好, 生长周期正常。以上研究结果证明: 大肠杆菌染色体可以作为外源蛋白或抗原的稳定高效表达载体, 不会影响细菌的正常生长繁殖。

3 讨论

目前, 活菌重组疫苗常用质粒载体携带并表达外源抗原基因, 但在研究中发现表达外源基因的质粒进入体内后, 常因无抗生素选择压力而丢失, 影响疫苗的免疫效果。另外, 质粒载体表达较大的抗原基因和多个抗原基因也存在一定的困难^[7]。

将外源基因敲入染色体并整合于特定位点可稳定存在表达。传统的染色体基因修饰是利用细菌本身所存在的 *RecA* 内源性重组系统, 构建含 500~1000 bp 同源臂的质粒打靶载体的过程繁琐, 重组后通常利用耐药性选择标记筛选, 每敲除一个基因就要引入宿主一个耐药基因。*RecA* 介导的重组率很低, 要进行大量的筛选才能得到重组子^[8,9]。近年来, 由 Murphy 以及 Wanner 等发展起来的一种基于噬菌体

重组酶 Red/RecET 的重组系统, 不依赖于 RecA 蛋白, 重组效率远高于传统技术, 仅需 PCR 扩增得到 35~40 bp 短同源臂的线性 DNA 靶片段即可直接用于体内重组, 极大简化了实验操作、缩短了实验周期^[10,11]。应用重组工程技术可以比较容易的在大肠杆菌体内对染色体中的靶标 DNA 进行基因敲除、敲入、克隆和突变等修饰^[12]。

为了方便地将目的基因敲入细菌染色体特定区域而不留下任何抗生素筛选标记, 保证高效表达并随宿主稳定遗传, 不影响细菌的正常生长, 选择合适的敲入位置和敲入方法是研究的关键。我们运用大肠杆菌 DY330 介导的重组工程系统和 *kan/sacB* 无痕修饰技术, 将报告基因 *luc* 敲入到染色体 *lac* 操纵子中 *lacZ* 位置上, 分析了荧光素酶的表达情况。另外, 我们把 *luc* 基因克隆进质粒 pUC19, 由可诱导的 *lac* 启动子控制, 发现其表达产量不及 *luc* 基因在 *lacZ* 基因在染色体上的组成型表达。提示在除去阻遏基因 *lacI* 后, 外源基因有可能在 *lac* 操纵子的结构基因处高效表达。在无抗生素的筛选压力下连续培养并检测染色体上的 *luc* 基因的表达水平显示外源基因在染色体上能够持续稳定表达。此外我们的初步观察表明, 敲除 *lacI* 后外源基因组成型表达对细菌的生长速率无显著影响, 至少在 *lac* 操纵子上组成性表达 *luc* 基因对细菌的毒害不大。使用大肠杆菌染色体作为一个大载体高效稳定表达外源基因, 解决了外源抗原基因在无抗生素选择压力下随宿主稳定遗传的问题, 为抗原蛋白在体内的表达提供一种新的策略。

REFERENCES

- [1] Zhou JG, Hong X, Huang CF. Recombineering and its application. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(9): 40–45.
周建光, 洪鑫, 黄翠芬. 重组工程及其应用. *遗传学报*, 2003, **30**(9): 40–45.
- [2] Yu DG, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97**(11): 5978–5983.
- [3] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annual Review Genetics*, 2002, **36**: 361–388.
- [4] Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(4): e36.
- [5] Ellis HM, Yu DG, DiTizio T, Court DL. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, **98**(12): 6742–6746.
- [6] Huen SM, Li XT, Lu LY, Watt RM, Liu DP, Huang JD. The involvement of replication in single stranded oligonucleotide-mediated gene repair. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(21): 6183–6194.
- [7] Elisabetta V, Giulia C, Manuela G, Angelo M, Annalucia S, Vittorio C, Nunzia S, Francesca M. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 2006, **118**(4): 449–460.
- [8] Konstantin YS, Alex AN. Efficient gene inactivation in *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **245**: 315–319.
- [9] Brian KJ, Scott S. Routine markerless gene replacement in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*, 2006, **74**(3): 1949–1953.
- [10] Zhang YM, Muyrers PJ, Rientjes J, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, **20**(2): 123–128.
- [11] Muyrers JP, Zhang Y, Testa G, Stewart AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**: 1555–1557.
- [12] Yu DG, Sawitzke JA, Ellis H, Court DL. Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: Testing a recombination intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, **100** (12): 7202–7212.