

## 利用 Red 重组系统敲除大肠杆菌 *O157:H7* 的 *waaL* 基因\*

杨公进 马中瑞 信 国 陈 敏\*\*

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室 国家糖工程技术研究中心 济南 250100)

**摘要** 目的:利用  $\lambda$  噬菌体 Red 重组系统敲除大肠杆菌 *O157:H7* 的 *waaL* 基因。方法:以 pKD4 为模板扩增出与 *waaL* 基因上下游同源的、含有卡那霉素抗性基因的 PCR 产物。然后电击转化到大肠杆菌 *O157:H7* 中,利用 Red 重组系统,通过卡那霉素抗性基因两侧的 *waaL* 基因序列在体内与 *waaL* 基因发生同源重组,置换了 *O157:H7* 基因组中的 *waaL* 基因。并进一步利用卡那霉素抗性基因两侧的 FRT 位点,通过 FLP 位点专一性重组将卡那霉素抗性基因敲除。结果:成功构建了敲除 *waaL* 基因且不带卡那霉素抗性基因的菌株。

**关键词** *O157:H7*  $\lambda$ -Red 重组系统 *waaL* 基因

**中图分类号** Q789

大肠杆菌 *O157:H7* 属于肠出血性大肠埃希菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC), 主要通过食物传播疾病。该菌可引起轻度腹泻、出血性结肠炎 (hemorrhagic, HC)、溶血性尿毒综合症 (hemolytic uremic syndrome, HUS)、血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) 等。牛和羊是该菌天然的宿主,同时也是重要的传播载体<sup>[1-3]</sup>。

LPS (Lipopolysaccharide) 位于革兰氏阴性菌细胞壁的外层,同磷脂层构成细菌外膜,是细菌的一层保护性屏障。LPS 从内到外依次为类脂 A (lipid A)、核心寡糖 (core oligosaccharide) 和 O-多糖 (O-polysaccharide, O-PS)。其中, O-PS 处于细菌细胞壁的最外层,决定细菌的抗原多样性<sup>[4]</sup>。编码 O-PS 合成所需的酶包括糖-核苷酸前体合成酶、各种 GT 及与 O-PS 翻转、聚合等过程相关的酶。其中 *waaL* 基因是寡糖基转移酶基因,其编码蛋白负责将新合成的 O-PS 连接到核心寡糖上,形成 LPS。

因此,利用基因工程方法敲除 *waaL* 基因,可能会

影响大肠杆菌 *O157:H7* 的形态结构、环境适应性及侵染毒性,对于研究大肠杆菌 *O157:H7* 的致病性具有重要意义,对于研究该菌的疫苗开发会有重要意义。

Red 重组系统在大肠杆菌等一系列基因工程菌的基因敲除中发挥着重要作用。Red 重组系统由噬菌体的 *exo*, *bet*, *gam* 3 个基因组成,分别编码 Exo, Beta, Gam3 种蛋白质。Exo 是 5' - 3' 外切酶,能降解线性 DNA 的 5' 末端<sup>[5]</sup>。Beta 蛋白是单链 DNA 结合蛋白,可结合在 Exo 产生的 DNA 的 3' 末端,以启动互补 DNA 链的退火,引发 DNA 链的交换反应。Gam 蛋白与宿主的 RecBCD 复合体结合并抑制宿主外切核酸酶活性,阻止外源线性 DNA 片段被降解<sup>[6-8]</sup>。

本研究中,我们借助 Red 重组酶的作用,同源序列与目的基因发生重组作用,从而用标记基因替换靶基因。为了消除筛选标记基因的痕迹,我们在其两侧加上能被 FLP 位点特异性重组酶识别的特殊位点 FRT,可通过位点特异性重组酶的作用将筛选标记基因删除。从而构建了一株 *waaL* 基因缺陷型的重组菌。

*waaL* 基因缺陷的重组菌株中, LPS 无法形成,由于 LPS 决定细菌的抗原多样性,因此通过改造 *O157:H7*, 对于了解 LPS 在细菌中的吸附,侵染,以及后期的疫苗开发有重要意义。

收稿日期:2011-05-12 修回日期:2011-06-03

\* 国家自然科学基金 (3107082)、国家“863”计划 (2007AA10Z404)、山东省自然科学基金 (2009ZRB019SQ) 资助项目

\*\* 通讯作者, 电子信箱: chenmin@sdu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株: EHEC *O157:H7* 是用于基因敲除的原始菌株, 由本室保存。

质粒: pKD46 (*Bla*  $\gamma$   $\beta$  *exo*, temperature-conditional replicon) 为 Red 同源重组质粒, 对温度敏感, 高于 37℃ 质粒丢失、阿拉伯糖诱导表达: pKD4 (*bla*, *FRT-kan-FRT*) 为卡那霉素抗性基因的质粒, 两侧带有翻转酶结合位点 FRT; pCP20 (*bla*, *cat*, temperature-conditional replicon) 为抗性基因消除质粒, 42℃ 诱导 FLP 重组酶表达, FLP 重组酶能够识别卡那霉素抗性基因两侧 34 bp 的 FRT 位点, 通过位点特异性重组将中间的抗性基因去除, 仅在作用位点处留下一个单拷贝 FRT 位点, 因其对温度敏感, 质粒逐渐丢失。

试剂: 质粒快速提取试剂盒 (Fermentas)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN)、Fast *pfu* DNA 聚合酶 (Tansgen)、Easy TaqDNA 聚合酶 (Tansgen)、L-阿拉伯糖 (SIGMA)、限制性内切酶 *Dpn* I (Fermentas)、其他化学试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 引物设计

根据 *waaL* 基因及其上下游的序列, 和质粒 pKD4 上 *kan* (卡那霉素抗性基因) 基因两侧自带的引物序列, 设计表 1 所示敲除引物 k-*waaL*-F/k-*waaL*-R, 以 pKD4 为模板 PCR 扩增 *kan* 基因 (两侧带有 FRT 位点), 使扩增片段两侧带有 39bp 的 *waaL* 基因同源臂。

表 1 敲除引物和检测引物  
Table 1 Knockout primers and detection primers

敲除引物	
k- <i>waaL</i> -F	CTCGAGAAAAAACTGGATAGCGTACTGGAACA GAGCTgttagctggagctgcttc
k- <i>waaL</i> -R	TTACTTGTTTTCATCGCTAATAATAAGCCGGCGT AAACatgggaattagccatgttcc
检测引物	
t- <i>waaL</i> -F	GTATGTCTCTTCAGATTTG
t- <i>waaL</i> -R	ATGGCGTAACTCAAAGATTC

注: 大写字母表示 *waaL* 基因同源臂, 小写字母表示 *kan* 基因同源臂

### 1.3 PCR 扩增含有 *waaL* 基因同源臂的 *kan* 基因

用上述敲除引物, 以 pKD4 为模板, PCR 合成含 FRT 位点的 *kan* 片段, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收。由于 PCR 产物中混有的极少量模板质粒会造成重组子的假阳性, 所以用限制性内切酶 *Dpn* I 专一性

切割甲基化的 *dam* 位点, 可以将模板质粒降解从而降低假阳性率。然后切胶回收 *Dpn* I 酶切后 PCR 片段<sup>[9]</sup>, 体系参考说明书。

### 1.4 pKD46 的转化与 Red 重组系统的诱导表达

将编码 Red 重组基因的质粒 pKD46 用化学法转化入大肠杆菌 *O157:H7* 中, 接种于含 100  $\mu$ g/ml Amp 的 LB 液体培养基中, 30℃ 250 r/min 培养过夜。然后以 1% 接种量转接于 50ml 新鲜的含 1% Amp LB 液体培养基中, 培养 1 h *OD*<sub>600</sub> 约为 0.2 ~ 0.4, 添加终浓度为 1% L-阿拉伯糖, 30℃ 250 r/min 培养至 *OD*<sub>600</sub> 约为 0.6 ~ 0.8。

### 1.5 感受态细胞的制备与电击转化

30 度培养 *O157:H7* pKD46 菌株, 待长至合适的状态时, 用 10% 的甘油重悬 3 次。转移至预冷的电转杯中, 电击转化 (设置电压为 2500 kV, 脉冲为 25  $\mu$ F, 控制器为 200  $\Omega$ ), 电击完成后即向电转杯中加入 1ml SOC 培养基, 混匀后转入 EP 管中, 30℃ 200 r/min 培养 1 h。涂布于含 50  $\mu$ g/ml *kan* 的 LB 平板, 挑取单菌落用检测引物 PCR 验证, 结果如图 1 所示。42℃ 培养 16 ~ 24 h, 此时, pKD46 丢失。

### 1.6 翻转酶重组酶 (FLP) 位点专一性重组敲除 *kan* 基因

挑取以上获得的 *O157:H7*/ $\Delta$ *waaL*: FRT-*kan*-FRT 重组子, 制备化学感受态细胞, 用 pCP20 转化感受态细胞, 得 *O157:H7*/pCP20  $\Delta$ *waaL*: FRT-*kan*-FRT。接种于 5 ml LB 液体培养基中, 42℃ 250 r/min 培养过夜, 获得 *O157:H7*/ $\Delta$ *waaL*: FRT。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增含有 *waaL* 基因同源臂的 *kan* 基因

由于 *kan* 基因大小为 1496bp, 敲除引物的同源臂长度共有 78bp, 可得 PCR 产物大小约为 1574bp。以表 1 所示敲除引物为引物, 以 pKD4 为模板 PCR, 电泳结果如图 1 所示, 确定与理论值一致。

### 2.2 *O157:H7*/pKD46 $\Delta$ *waaL*: FRT-*kan*-FRT 的验证

在 *E. coli* *O157:H7* 基因组中, 敲除引物之间相距 1107 bp, 检测引物之间相距 1384 bp。因此在以检测引物菌落 PCR 验证 *O157:H7*/pKD46  $\Delta$ *waaL*: FRT-*kan*-FRT 阳性重组子时, 以 *O157:H7* (阴性对照) 为模板的 PCR 产物大小为 1384 bp。而阳性重组子 *O157:H7*/pKD46  $\Delta$ *waaL*: FRT-*kan*-FRT 的敲除引物之间由于重组了大小为 1496 bp 的 *kan* 抗性基因, 因此检测引物之间

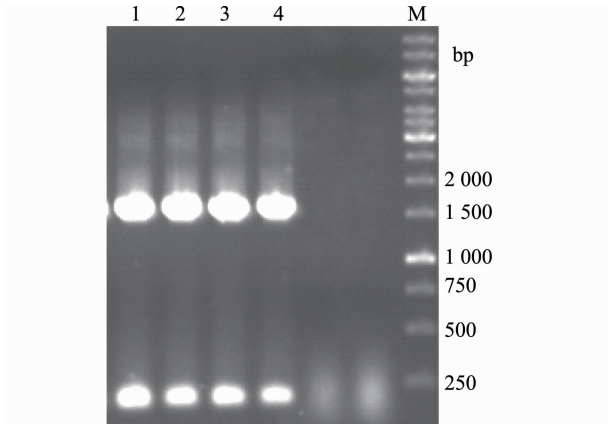


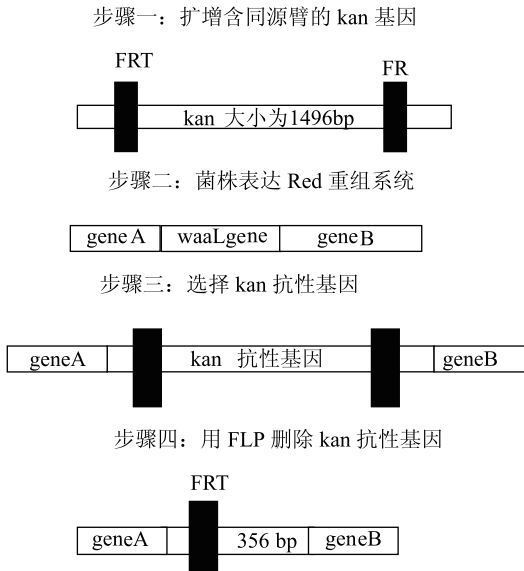
图1 PCR 扩增含有 *waaL* 基因同源臂的卡那霉素抗性基因电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of homologous regions of *kan* amplified by PCR

M: GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1~4:Products of *kan* amplified by PCR

相距 1773 bp。基因敲除的策略如表 2 所示。以表 1 所示检测引物为引物,以 *O157:H7* 为阴性对照,菌落 PCR 验证阳性重组子,抗性基因取代了 *waaL* 基因,敲除成功电泳结果如图 2 所示。

表 2 简单的基因敲除的策略图  
Table 2 A simple way of knock-out gene



2.3 *O175:H7/ΔwaaL:FRT* 的验证

*O157:H7 ΔwaaL:FRT* 基因组中,敲除引物之间由于 *kan* 基因的消除,只留有一个 39 bp 的 FRT 位点及各 20 bp 的抗性基因引物序列,因此检测引物之间相距 356 bp。

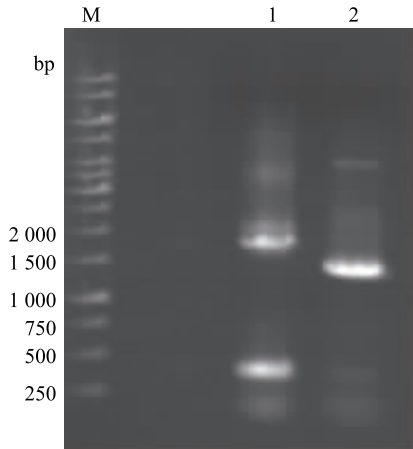


图2 敲除 *waaL* 基因菌株 PCR 产物电泳图  
Fig. 2 Gel electrophoresis of products of PCR of knock-out *waaL* gene

M:GeneRuler 1kb DNA Ladder;1:Products of amplified by PCR of knock-out *waaL* gene; 2:Product of *waaL* amplified by PCR

以表 1 所示检测引物为引物,以 *O157:H7/pKD46 ΔwaaL::FRT-kan-FRT* 为对照,菌落 PCR 验证阳性重组子 *O175:H7/ΔwaaL:FRT*,用 FLP 除去了抗性基因,电泳结果如图 3 所示。

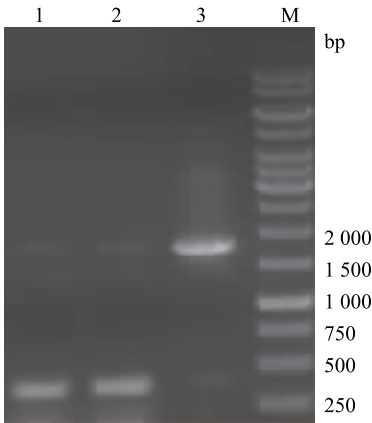


图3 消除 *kan* 抗性基因的电泳图  
Fig.3 Gel electrophoresis of product of elimination *kan* gene amplified by PCR

M:GeneRuler 1kb DNA Ladder;1~2:Product of elimination *kan* gene amplified by PCR;3: Product of *kan* gene amplified by PCR

3 讨 论

本实验成功地将 *E. coli O157:H7* 中脂多糖(LPS)合成相关基因 *waaL* 敲除, 并进行了验证。所得到的

*waaL* 基因缺失的菌株可用于今后进一步的实验,如 O157:H7  $\Delta waaL$ :FRT 致病性的研究,还可研究 *wzy* 和 *wzz* 等基因,进一步对 *E. coli* O157:H7 进行基因改造,达到使得该菌株能够合成糖蛋白的目的。

本实验采用的  $\lambda$  噬菌体 Red 重组系统因为其重组效率高步骤简便而逐渐为大家所接受,但是在实际操作过程中该系统也暴露出一些缺点。

首先在设计敲除引物的过程中同源臂的长短问题。同源臂较短(30~50bp)时,同源重组效率较高,重组菌株在卡那霉素抗性平板上数量较多。但是菌株大部分是假阳性,大约每挑去 60~90 个左右的单菌落才会有一个特异性的重组菌株,特异性重组的菌株较少。同源臂较长时(150~200bp),在抗性平板上单菌落的数目较少,同源重组的特异性高,每挑取 5~10 个左右的单菌落就会有一个特异性重组菌株。同时设计较长的引物耗时长,花费大,一般要获得较长的同源臂多选择设计几对引物依次 PCR,最终获得较长的同源臂。因此在设计敲除引物时应根据实验室条件选择合适的长度。

其次在基因敲除的过程中尽量减少可能出现假阳性的因素。以质粒 pKD4 为模板 PCR 后,用 *DpnI* 限制性内切酶处理 PCR 产物,该酶专一降解甲基化位点,从而有效地除去含有甲基化位点模板的影响,而对没有甲基化的 PCR 产物没有影响。此外,在电击转化 *kan* 基因后,细菌的活性损失严重,因此一般选择营养较丰富的 SOC 培养基培养,保证菌株的电击后的成活率。

综上所述,通过优化各个实验步骤,我们顺利构建了 O157:H7 *waaL* 基因缺失突变体。为后续研究奠定了基础。

**致谢:** 国家自然科学基金项目(3107082),国家“863”计划(2007AA10Z404)山东省自然科学基金重点项目(2009ZRB019SQ)。

## 参考文献

- [1] Theresa D H, Matthew K W. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 gal mutants are sensitive to bacteriophage P1 and defective in intestinal colonization infection and immunity, 2007, 75(4):1661-1666.
- [2] Zapata-Quintanilla L B, Palmeira P, Tino-De-Franco M. Systemic antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy brazilian adults. Scandinavian Journal of Immunology, 2006, 64(6):661-667.
- [3] Chapman P A, Siddons C A, Cerdan M A. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol Infect, 1997, 119(2): 245-250.
- [4] Elliott B G, Thomas J M. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine. Infection and Immunity, 2000, 68(11):6202-6208.
- [5] 刘徐兵, 周围, 李玉霞, 等. 用 Red 系统敲除大肠杆菌 O157:H7 的 *ecs4553* 以及 *ecs4563* 基因. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(2):101-106.  
Liu X B, Zhou W, Li Y X, et al. the Academy of Military Medical Sciences, 2007, 31(2):101-106.
- [6] 张雪, 温延益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12):89-93.  
Zhang X, Wen Y Y. China Biotechnology, 2008, 28(12): 89-93.
- [7] 胡堃, 史兆兴, 赛道建, 等. Red 重组系统及其在微生物基因敲除中的应用. 遗传, 2003, 25(5):628-632.  
Hu K, Shi Z X, Sai D J, et al. Hereditas, 2003, 25(5): 628-632.
- [8] 冯尔玲, 史兆兴, 姚潇, 等. 用 Red 系统快速敲除痢疾杆菌 *asd* 基因. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(3):172-175.  
Feng E L, Shi Z X, Yao X, et al. The Academy of Military Medical Sciences, 2002, 26(3):172-175.
- [9] 韩聪, 张惟材, 游松. Red 同源重组技术研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12):17-21.  
Han C, Zhang W C, You S. China Biotchnology, 2003, 23(12):17-21.

## Knockout of *waaL* Gene of *Escherichia coli* *O157:H7* by Red Recombination System

YANG Gong-jin MA Zhong-rui XIN Guo CHEN Min

( National Glycoengineering Research Center of The State Key Laboratory of Microbial Technology,  
College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China )

**Abstract** Objective: To construct a *waaL* knockout mutant of *Escherichia coli* *O157:H7*. Methods: Using plasmid pKD4 as a template, the kanamycin-resistant gene flanked by homologues of *waaL* gene was amplified by PCR. The PCR products were electro-transferred into the *O157:H7*, with the help of the Red recombinant system, *WaaL* gene were replaced by the kanamycin-resistant gene. Then the kanamycin-resistant gene was eliminated by FLP-promoted recombination system. Result: *waaL* gene of the *E. coli* *O157:H7* was completely eliminated and the kanamycin-resistant gene was also eliminated.

**Key words** *O157:H7*  $\lambda$ -Red recombination system *WaaL* gene