

Development of a New Recombining System by Gap Repair

LI Shan-Hu¹, HONG Xin¹, YU Mei¹, CHEN Wei², HUANG Cui-Fen¹, ZHOU Jian-Guang¹

(1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using lambda phage Red recombinase mediated in vivo homologous recombination system, a 6.7 kb lambda PL operon sequence including the Red encoding genes was subcloned into pBR322 by gap repair technique, and generated a pBR322-Red recombinant plasmid that can provide the Red recombination function and can be transferred into many kinds of bacteria. To confirm the recombination functions of pBR322-Red, a single-stranded 70-bases oligo was introduced into W3110 by electroporation to create a single base T → G mutation in *galK* gene on the bacterial chromosome. The result demonstrated that a new Red-mediated recombining system based on pBR322-Red was successfully established.

Key words: Gap-Repair; Red recombination system; recombining

Gap-Repair方式建立一种基于
pBR322-Red的新型重组工程系统李山虎¹, 洪鑫¹, 于梅¹, 陈伟², 黄翠芬¹, 周建光¹

(1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850;

2. 厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

摘要: 应用 Gap-Repair新技术, 以 pBR322为载体, 在噬菌体 Red重组酶的作用下, 通过同源重组直接从大肠杆菌 DY330染色体上亚克隆了长度为 6.7 kb的包含 *Red*重组酶基因的噬菌体左向操纵子基因序列。建立了一种能够随意在不同细菌宿主中转移的基于 pBR322-Red的重组工程系统。为了验证 pBR322-Red的生物功能, 以大肠杆菌染色体上的 *galK*基因为靶标, 用 Red介导的单链 DNA重组技术敲入 T → G单碱基突变, 使 *galK*基因内编码第 145位氨基酸的密码子由 TAT转变成 TAG, 产生了一个琥珀突变。确定了 pBR322-Red系统的重组功能。

关键词: Gap-Repair; Red重组酶; 重组工程

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0379-4172(2005)05-0533-05

1998年, Francis Stewart等^[1]发现: 由于大肠杆菌 K12中 RAC噬菌体 *sbcA* 突变激活 *recE*和 *recT*基因表达, 使大肠杆菌能像酵母菌一样, 能利用线性

DNA分子进行体内同源重组, 不再需要通过多个步骤事先建立携带长同源臂的打靶载体。这一系统被称作 ET克隆或者 RecET克隆。2000年, Daiguan

收稿日期: 2004 - 04 - 14; 修回日期: 2004 - 08 - 27

基金项目: 军队“十五”医药卫生科学基金 (编号: 01MA089) [Supported by Medical Science Foundation of PLA (No. 01MA089)]

作者简介: 李山虎 (1976 -), 男, 辽宁辽阳人, 博士研究生, 研究方向: 分子遗传学

通讯作者: 周建光 (1956 -), E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn; Tel: 010-66931323

Yu和Court博士^[2]将缺陷型噬菌体左向操纵子从 *att*位点整合到大肠杆菌 W3110染色体上,建立了基于缺陷型噬菌体 Red重组酶的重组工程菌株 DY330等。2001年,Copeland博士^[3]在《*Nat Rev Genet*》杂志发表综述,将这种十分有用的新技术定义为“重组工程(Recombineering)”。目前,重组工程已经成为基因功能研究的有力工具,被成功地应用于染色体 DNA、BAC、病毒载体或普通质粒 DNA分子的基因剔除、敲入和克隆工作中。

重组工程系统主要分为2类:1)人工克隆 *Red/RecET*重组酶基因,其中重组酶基因或者组成性表达或者受 pBAD启动子调控;2)缺陷型噬菌体整合到大肠杆菌 W3110染色体上携带 *Red*重组酶系统,其特点是 *Red*基因以其自然状态存在于 *PL*操纵子上并按时空有序的方式调控和表达,重组效率最高,但存在在不同的菌株中不方便转移靶基因的问题^[4]。

Gap-Repair是一种新型重组工程技术。采用PCR方法产生携带40~50 bp同源臂的线形质粒载体DNA,电击转化到 *Red*表达的重组工程菌株中,通过同源重组将目的基因从染色体上精确下载到质粒载体中^[5]。拟采用这种新型的体内亚克隆技术,建立一种以 pBR322质粒携带缺陷型噬菌体左向操纵子的重组工程系统,以便将 *-Red*转移到任意的大肠杆菌菌株中。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 DY330、W3110由美国国立卫生院肿瘤研究所 Donald Court博士赠送。W3110为野生型,DY330基因型为:W3110 *lacU169 gal490 cI857 (cno-biaA)*^[6]。pBR322质粒由本研究室保存。各种限制酶、聚合酶为 TaKaRa公司产品。MacConkey Agar为 DIFCO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均为 Promega公司产品。

1.2 PCR引物

引物由上海博亚公司合成。按照 GenBank提

供的噬菌体序列(GenBank登录号:J02459)和 pBR322质粒序列设计 P1、P2引物。在 P1、P2引物中,小写部分与噬菌体 31 301 bp~31 340 bp和 38 010 bp~38 040 bp处序列同源,大写部分与 pBR322质粒载体同源。P3是按照 GenBank提供的大肠杆菌 *gal*序列(AE000178)设计的携带琥珀突变密码子的单链 DNA,下划线部分为琥珀突变密码子。P4、P5的 PCR扩增产物为噬菌体 *Red*基因内部(33 037 bp~35 705 bp)2.6 kb的 DNA片段。引物序列如下:

P1: 5 agtgc tatta taggcca tccgc gtagt gaaagc ag-at-gCGTCGCGGTGCA TGGAGC3;

P2: 5 acaacctccttagtacctgcaaccattaccgccca-gag-GTGCCTGACTGCGTTA GC3;

P3: 5 AAGTCGCGGTCGGAACCGTATTGC-AG-CAGCTTTAGCATCTGCCGCTGGACGGCGC-ACAAA TCGCGCTTAA3;

P4: 5 TA GCAA TTCA GA TCTCTCACC3;

P5: 5 CCA GTTCTGCCTCTTCTCTC3。

1.3 感受态细胞的制备和电穿孔转化

挑取大肠杆菌 DY330单菌落接种于5 mL液体 LB培养基,30 °C空气摇床过夜培养,取过夜培养物按1:50接种于100 mL液体 LB,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(200 r/min)15 min,立刻冰浴30 min。同时做未经42 °C诱导的阴性对照。将上述培养物转移至到高压灭菌处理的聚丙烯离心管中,4 °C条件下,5 500 g离心8 min,弃去上清。再加入30 mL冰冷的无菌水重悬菌体以清洗除盐,5 500 g离心8 min,小心弃去上清,再用1 mL冰冷的无菌水重悬于1.5 mL Eppendorf管中。最后在4 °C高速离心30 s,小心弃去上清,重悬于200 μL冰冷的无菌水中。

取2 μL线性DNA(100 ng/μL)和48 μL上述冰冷的感受态细胞,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 μF、200 ohms条件电穿孔转化。电击后立即加入1 mL LB液体培养液。30 °C振动培养2 h。涂布于氨苄青霉素抗性 LB平板筛选阳性克隆^[6]。

1.4 重组质粒的鉴定

质粒提取、酶切等步骤均按常规分子克隆方法

进行。

1.5 重组功能的鉴定

电穿孔转化 P3 单链 DNA 至带有 pBR322-Red 质粒的大肠杆菌 W3110,感受态细胞的制备和电穿孔转化方法同上。培养液涂布 MacConkey 指示平板筛选阳性克隆。

2 结果

2.1 同源臂的设计

同源臂决定了体内亚克隆目的基因的大小和区域。为了从大肠杆菌染色体上直接亚克隆 Red 重组酶基因及完整的调控元件,首先按照 GenBank 提供的信息 (GenBank 登录号: J02459)设计同源臂。第一条同源臂位于噬菌体 *exo* 基因下游 31 301 bp ~ 31 340 bp 处;第二条同源臂位于阻遏基因 *CI 857* 启动子 *PL* 上游 38 010 bp ~ 38 040 bp 处,两条同源臂中间包含了 6.7 kb 的噬菌体左向操纵子基因和调控元件。同源臂设计遵循 GC 分布均匀含量约 50% 原则,长度均为 40 bp。

2.2 打靶载体的制备

本研究中选择低拷贝 pBR322 为打靶载体。扩增线形 pBR322 打靶载体的 PCR 引物包括两部分,5 端为 40 bp 的同源臂序列,3 端为 18 bp 的与 pBR322 模版互补的 PCR 引物。通过 PCR 反应将上述同源臂加载到线形 pBR322 打靶载体的双侧。按照 5'→3' 方向,上游同源臂引物 DNA 为:噬菌体 31 340 bp ~ 31 301 bp 连接 pBR322 载体 1 241 bp ~ 1 258 bp 共 58 bp;下游同源臂引物 DNA 为:噬菌体 38 040 bp ~ 38 010 bp 连接 pBR322 载体 80 bp ~ 63 bp 共 58 bp。用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 反应。线形 pBR322 打靶载体保留了一个 Ap 抗性筛选标记和复制起始点,总长度为 3 181 bp。

2.3 体内亚克隆

将上述线形 pBR322 打靶载体电击转化进 DY330 菌株中。42℃ 温度诱导 15 min,线形 pBR322 载体通过同源重组捕获 DY330 染色体上 6.7 kb 长的目的基因,在体内形成环型 pBR322-Red 重组 DNA 分子。经过 Ap 抗性筛选,用外源片段内部引

物进行 PCR 鉴定,并在重组质粒的插入片段中选取两个单一的酶切位点 *EcoR I*、*BamH I* 和载体片段中选取两个单一的酶切位点 *Xho I*、*Hind III*,分别进行单酶切鉴定和双酶切鉴定。所抽提的 5 个质粒 DNA 中,经 PCR 和酶切鉴定后 4 个为正确的重组质粒,外源片段正确插入率为 80%,证实我们获得了正确的重组质粒。质粒构建过程和鉴定见图 1。

2.4 Red 介导的重组功能分析

为确定 pBR322-Red 系统中 Red 重组酶的生物功能,以菌株 W3110 中染色体上功能已知的 *galk* 基因为靶标,进行了 pBR322-Red 质粒介导的大肠杆菌染色体上 *galk* 琥珀突变研究。*galk* 基因内编码第 145 位氨基酸的密码子为 TAT,其中 T→G 单碱基改变将产生 TAG 的琥珀突变,使脯氨酸变为终止密码子。按照 *galk* 基因内编码第 135 至 156 位氨基酸的基因序列合成一条 70 个碱基的寡核苷酸,在第 35 nt 处人为引进 T→G 单碱基改变。将两端带有 35 nt *galk* 基因同源臂的寡核苷酸 DNA 片段电穿孔转化到带有 pBR322-Red 质粒的大肠杆菌 W3110 中,并设未诱导的 W3110 (pBR322-Red) 和不带有 pBR322-Red 质粒的大肠杆菌 W3110 为对照,在 Red 的作用下,染色体 DNA 和打靶序列在 *galk* 基因内的同源序列处发生重组,结果使 *galk* 基因产生琥珀突变^[7]。*galk*⁺ 表型的菌落在 MacConkey gal 指示平板上呈红色,发生琥珀突变的 *galk* 表型的菌落呈白色。为了获得 pBR322-Red 质粒携带重组系统的最佳温度诱导时间。将 42℃ 诱导时间分别设定为 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 min。计数并计算重组效率 (数据未列出),研究证明 pBR322-Red 质粒携带重组系统进行单链重组在 42℃ 诱导 7.5 min 时重组效率最高。经 42℃ 诱导 7.5 min 时每一千个单克隆中有一个单菌落呈现 *galk*⁻ 表型,证明 pBR322-Red 质粒中 Red 重组酶的重组功能正常。*galk* 基因琥珀突变和筛选见图 2。

3 讨论

体内同源重组现象在生物体中普遍存在,但自然发生的频率极低,受到复杂而严格的调控。应用噬菌体 Red 重组酶系统,PCR 方法获得的线形打靶载体和长度仅为 40~50 bp 同源臂序列,就能达到万分之一或者更高的重组效率。以上优点使得重

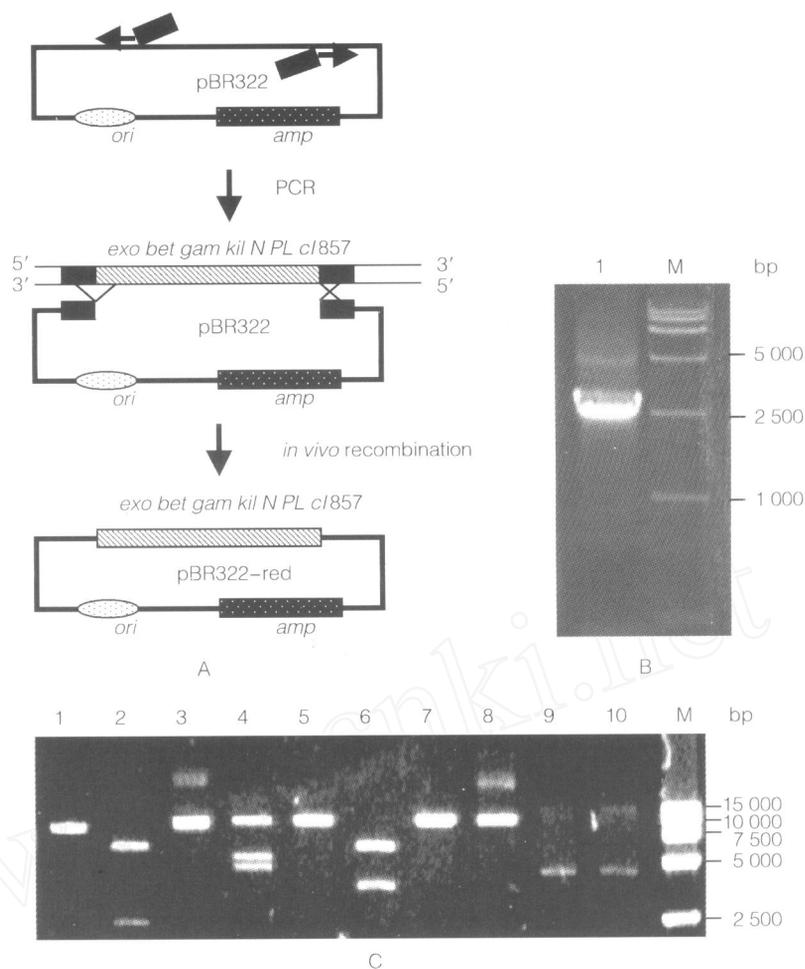


图 1 pBR322-Red 质粒的构建及鉴定

A. pBR322-Red 质粒的构建; B. PCR 鉴定。1: PCR 产物; M: DL15 000 DNA 分子量标记物。C. 酶切鉴定, 1: *Hind* / *EcoR* 消化的 pBR322-Red; 2: *Hind* / *BamH* 消化的 pBR322-Red; 3: *Hind* 消化的 pBR322-Red; 4: *Xho* / *EcoR* 消化的 pBR322-Red; 5: *Xho* 消化的 pBR322-Red; 6: *EcoR* / *BamH* 消化的 pBR322-Red; 7: *BamH* 消化的 pBR322-Red; 8: *EcoR* 消化的 pBR322-Red; 9: *BamH* 消化的 pBR322; 10: *EcoR* 消化的 pBR322; M: DL15 000 DNA 分子量标记物。

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pBR322-Red and analysis

A. Construction of recombinant plasmid pBR322-Red B. PCR analysis 1: PCR fragment; M: DL15 000 DNA marker C. Restriction enzyme digestion analysis 1: *Hind* / *EcoR* digested pBR322-Red; 2: *Hind* / *BamH* digested pBR322-Red; 3: *Hind* digested pBR322-Red; 4: *Xho* / *EcoR* digested pBR322-Red; 5: *Xho* digested pBR322-Red; 6: *EcoR* / *BamH* digested pBR322-Red; 7: *BamH* digested pBR322-Red; 8: *EcoR* digested pBR322-Red; 9: *BamH* digested pBR322; 10: *EcoR* digested pBR322; M: DL 15 000 DNA marker

组工程发展成为基因组研究中一种有力的研究手段。

Gap-Repair 整个过程是在体内 DNA 聚合酶作用下完成, 因此所克隆的目的基因完全忠实于模板 DNA, 不会产生任何突变, 因此免除了 DNA 测序等复杂昂贵的过程。国外研究人员证明用这种方法在体内可以直接从 BAC 中亚克隆 80kb 的 DNA 片

段^[8,9]。

为了使 Red 重组酶系统能够方便的在细菌 (如不同的大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌等) 中广泛的应用, 我们以 Gap-Repair 的方式, 直接从重组工程宿主菌 DY330 的染色体上将 6.7 kb 的 Red 重组酶基因及其相应的调控序列克隆到了质粒载体上, 获得了由 pBR322 携带 Red 重组酶基因的新型重组系



图 2 *galk* 基因琥珀突变及筛选

A: MacConkey 指示平板筛选。1: 琥珀突变; 2: 阴性对照; 3: 空白对照。B: *galk* 基因琥珀突变。

Fig. 2 *Galk* gene for an amber mutation and selection

A: MacConkey galactose indicator agar showing recombinant colonies. 1: Amber mutation; 2: Negative reaction;

3: Control of W3110. B: *Galk* gene for an amber mutation

统。该系统中 *exa*, *beta*, *gam* 基因受温度敏感型 *PL* 启动子严格调控, 32 时 CI857 阻遏物结合启动子区, 关闭下游基因的表达, 只有在 42 时 CI857 失活, Red 重组酶基因才可以得以表达。这种非常严格的调控体系防止了 *Gam* 基因表达泄漏导致的质粒丢失和细胞死亡, 质粒携带的 Red 重组酶系统可以方便的在各种细菌中转移, 使得该系统的应用更为广泛。

参考文献 (References):

[1] Zhang Y M, Frank B, Muylers J P, Francis S A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* *Nature Genetics*, 1998, 20: 123 ~ 128.

[2] Lee E C, Yu D G, deMartinez V J, Lino T, Deborah A S, Donald L C, Nancy A J, Neal G C A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genetics*, 2001, 73: 56 ~ 65.

[3] Zhang Y M, Muylers J P, Giuseppe T, Francis S DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli* *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 1314 ~ 1317.

[4] ZHOU Jian-Guang, HONG Xin, HUANG Cui-Fen Recombineering and its application *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30 (10): 983 ~ 988.
周建光, 洪鑫, 黄翠芬. 重组工程及其应用. *遗传学报*, 2003, 30 (10): 983 ~ 988.

[5] Muylers J P, Zhang Y M, Giuseppe T, Francis S Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination *Nucleic Acids Research*, 1999, 27: 1555 ~ 1557.

[6] Yu D G, Hilary M E, Lee E C, Nancy A J, Neal G C, Donald L C. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* *PNAS*, 2000, 97: 5978 ~ 5983.

[7] Hilary M E, Yu D G, Tina D, Donald L C. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides *PNAS*, 2001, 98: 6742 ~ 6746.

[8] Kirill A D, Barry L W. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products *PNAS*, 2000, 97: 6640 ~ 6645.

[9] Donald L C, James A S, Lynn C. Thomason Genetic engineering using homologous recombination *Annu Rev Genet*, 2002, 36: 361 ~ 388.