

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.03.027

短小芽孢杆菌基因无痕修饰系统的建立及应用

张长斌, 徐云帆, 李茜, 覃佳, 王海燕

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 为了实现对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) SCU11 基因组连续地无痕改造, 提高碱性蛋白酶产量, 本文建立了基于 *Upp* 基因反向筛选的短小芽孢杆菌基因无痕修饰系统, 将碱性蛋白酶基因 *AprE* 的 1 份拷贝无痕插入至短小芽孢杆菌染色体 16S rDNA 区. 摇瓶发酵实验显示, 突变菌株碱性蛋白酶活最高达到 7125 U/mL, 与出发菌株相比提高了 33.1%. 结果表明利用该系统可实现对短小芽孢杆菌基因组的无痕修饰, 对 *AprE* 插入突变菌株进行双交换筛选的最终效率约为 23.07%.

关键词: 短小芽孢杆菌; 无痕修饰; 反向筛选; 碱性蛋白酶

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)03-0544-09

Establishment and application of a markerless genetic modification system in *Bacillus pumilus*

ZHANG Chang-Bin, XU Yun-Fan, LI Xi, QIN Jia, WANG Hai-Yan

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract: In order to achieve consecutive and markerless modification in *B. pumilus* SCU11 genome and increase the production of alkaline protease, we established a markerless genetic modification system for *B. pumilus* based on counter-selection of *Upp* gene, and a copy of the alkaline protease gene *AprE* was inserted into the 16S rDNA region in the genome of *B. pumilus*. The shaking flask fermentation experiment showed that the alkaline protease activity of mutant strain reached 7125 U/mL, which was 33.1% higher than that of the parental strain. The results showed that the system can achieve markerless genetic modification to the *Bacillus pumilus* genome, and the final screening efficiency in double-crossover of *AprE* insertion strains was about 23.07%.

Keywords: *Bacillus pumilus*; Markerless modification; Counter-selection; Alkaline protease

1 引言

细菌是重要的蛋白酶生产者, 而芽孢杆菌属是最主要的来源. 由本实验室分离并采用复合诱变得到的菌株碱性蛋白酶高产短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) SCU11, 其发酵上清液具有很好的生皮

脱毛效果, 在生物制革领域具有广阔的应用前景^[1-3]. 虽然复合诱变使得短小芽孢杆菌的酶活达到 4000~6000 U/mL^[4], 采用响应面法进行发酵条件优化使蛋白酶产量进一步得到提高^[5], 但和商业化蛋白酶生产菌株(20000~30000 U/mL)相比, 还有一定差距, 因此可以通过基因工程改造菌种进

收稿日期: 2018-4-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA022204)

作者简介: 张长斌(1991-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传学与基因工程. E-mail: changbinzhang@foxmail.com

通讯作者: 王海燕. E-mail: hayawang@scu.edu.cn

一步提高酶的产量。

目前基因敲除、敲入等基因组改造技术中, 大多采用抗性筛选标记。但是抗性本身并不是宿主菌生长所必须的, 抗性基因的引入存在诸多缺点和隐患^[6]。例如, 被改造菌株可被使用的抗生素种类有限, 多抗性选择压力可能会影响目的菌的正常生长等^[7, 8]。因此, 迫切需要研发短小芽孢杆菌基因组的无痕改造技术, 以克服传统的基因组改造技术中“疤痕”的存在和筛选标记不能反复使用等缺点, 实现多个基因连续敲除或敲入, 最终获得蛋白酶高产菌株。王超等人^[9]在枯草芽孢杆菌转化法的基础上探索并建立了适合短小芽孢杆菌的高渗透压电转化方法, 该方法的建立为我们开展短小芽孢杆菌基因工程改造奠定了基础。

反向筛选标记能在一定选择条件下使含有标记基因的菌株死亡, 不含有标记基因的菌株存活, 达到既能筛选目的基因, 又不引入抗性基因的目的。*Upp* 基因作为原核和某些低等真核细胞中广泛存在的反向筛选基因最初于大肠杆菌中发现^[10], 目前已被广泛应用于多种模式菌株的遗传改造, 其应用的前提是依赖于 *Upp* 基因敲除的宿主菌。*Upp* 基因全长 630 bp, 编码含有 208 个氨基酸的尿嘧啶磷酸核糖转移酶 (uracil phosphoribosyl transferase, UPRT)。该酶参与嘧啶合成的补救途径, 催化尿嘧啶与磷酸核糖焦磷酸生成尿苷酸 (UMP), 从而实现对尿嘧啶的重新利用^[10]。培养基中添加胸腺嘧啶类似物 5-氟尿嘧啶 (5-fluorou-

racil, 5-FU) 时, 5-FU 在 UPRT 等酶的催化下生成 5-F-dUMP, 5-F-dUMP 可抑制胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase) 的活性, 阻止 dTMP 的合成, 进而影响 DNA 的合成, 最终导致细菌死亡^[11], 而 *Upp* 基因突变的细菌则可在含有 5-FU 的培养基中存活。利用这一特性, 以 *Upp* 基因敲除菌作为宿主菌, 以 *Upp* 基因作为转化载体的反向筛选标记, 获得整合型转化子后根据其是否具有 5-FU 的抗性可对 *Upp* 基因敲除菌株进行筛选, 最终得到不含标记基因的遗传改造菌株。由于受到宿主菌遗传操作背景的限制, 在重要的非模式工业菌株中对该系统的应用还比较少。

本实验利用同源重组无痕敲除了短小芽孢杆菌 SCU11 的 *Upp* 基因, 经过 *Upp* 基因回补实验, 验证了 *Upp* 作为反向筛选标记的可行性; 利用 SCU11 Δ *Upp* 作为出发菌株, 以 *Upp* 基因作为反向筛选标记结合温敏性载体构建了短小芽孢杆菌基因无痕修饰系统; 利用该系统实现了 *AprE* 基因在短小芽孢杆菌染色体中的无痕插入。短小芽孢杆菌无痕修饰系统的建立使得对短小芽孢杆菌靶基因进行连续地加工和修饰如基因插入、缺失、基因置换等成为可能。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种和质粒 本研究所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒性质

Tab. 1 Bacteria and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Description	Resource
<i>B. pumilus</i> strains		
SCU11	<i>B. pumilus</i> strain producing alkaline proteases	This laboratory
SCU11 Δ <i>Upp</i>	SCU11 carrying an in-frame deletion in the <i>Upp</i> gene	This study
SCU11 Δ <i>Upp</i> pUCETs- <i>Upp</i>	SCU11 Δ <i>Upp</i> carrying the rescue plasmid pUCETs- <i>Upp</i>	This study
SCU11 Δ <i>Upp</i> 16S rDNA:: <i>AprE</i>	SCU11 Δ <i>Upp</i> carrying an insertion of <i>AprE</i> gene into 16S rDNA	This study
<i>E. coli</i> strains		
JM109	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 Δ(lac-proAB) F'(traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)</i>	This laboratory
Plasmids		
pUCETs	<i>E. coli/Bacillus</i> shuttle vector; <i>ermCR Amp^R, Ori_{E. coli}, Ori-ts, LacZ</i>	This laboratory ^[9]
pUCETs- Δ <i>Upp</i>	pUCETs derivative, carrying a deletion cassette for <i>Upp</i> gene	This study
pUCETs- <i>Upp</i>	Rescue plasmid for the <i>Upp</i> mutant, pUCETs derivative	This study
pUCETs- <i>AprE</i>	pUCETs derivative, carrying an insertion cassette for the <i>AprE</i> gene	This study

2.1.2 培养基与试剂 LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L;

GM 培养基: 在 LB 培养基中添加 0.5 mol/L 山梨醇和 7.5% (m/v) 的甜菜碱;

RM 培养基: 在 LB 培养基中添加 0.5 mol/L 山梨醇和 0.38 mol/L 的甘露醇;

发酵培养基: 麸皮 25 g/L, 黄豆粉 20 g/L, 酵母膏 3 g/L, K₂HPO₄ 4 g/L, NaH₂PO₄ 0.4 g/L,

CaCO₃ 3 g/L, pH 8.3.

M9 基本培养基: Na₂HPO₄ · 12H₂O 17.096 g/L, NaCl 0.5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NH₄Cl 1 g/L, 酵母膏 0.1 g/L, 葡萄糖 0.2%, Casamino Acid 0.02%, 生物素 1 μg/mL, MgSO₄ 2 mmol/L, CaCl₂ 0.1 mmol/L.

W-buffer: 山梨醇 0.5 mol/L, 甘露醇 0.5 mol/L, 甜菜碱 7.5% (m/v), 甘油 10% (v/v);

E-buffer: 山梨醇 0.5 mol/L, 甘露醇 1 mol/L, 甜菜碱 7.5% (m/v), 甘油 10% (v/v);

2.1.3 主要试剂 山梨醇、甘露醇、甜菜碱、5-氟尿嘧啶等购自生工生物工程上海(股份)有限公司; Taq DNA 聚合酶、Prime Star MAX DNA 聚合酶、多片段克隆连接 In-Fusion[®] HD Cloning Kit、

T4 DNA ligase 等购自 TaKaRa (大连) 公司; 限制性内切酶购自 Fermentas (Thermo) 公司; 胶回收和纯化试剂盒购自 OMEGA 公司; 酪素购自 Sigma 公司; 福林酚购自科伦公司; 其它试剂均为国产分析纯.

2.2 方法

2.2.1 基因组及质粒提取、*E. coli* 的转化 参照《分子克隆实验指南第三版》^[12] 或产品说明书进行.

2.2.2 引物设计 根据 NCBI 公布的 *B. pumilus* BA06 基因序列及 pUCETs 序列, 采用 Primer 5 软件进行引物设计, 表 2 列出了本研究所使用引物的信息.

表 2 本研究所用引物及其信息
Tab. 2 Primers used for this study

引物名称	用途	序列(5'-3')
<i>Upp</i> flank1 F	<i>Upp</i> 同源臂 A	GCTCTGCAGAGGTGATAAAATGGTGATGAAAAC
<i>Upp</i> flank1 R		ATTCAAGCACAAGTGATGCTGGTGACCGTATG
<i>Upp</i> flank2 F	<i>Upp</i> 同源臂 B	ACCAGCATCACTGTGTCTGAATAAGCGGGTGAT
<i>Upp</i> flank2 R		CGCGGATCCCGGTGAAGTATTGAACGGAGATTT
<i>Upp</i> screen F	<i>Upp</i> 筛选	CGATAATGAAACCAAGAAACAGTG
<i>Upp</i> screen R		CGACAACACAAAAACATTACGC
SCU11 <i>Upp</i> F	<i>Upp</i> 回补	CGCGGATCCTAGGTACAGCAGCAGTGACAAG
SCU11 <i>Upp</i> R		AGACTGCAGCCCTCGTTTAGCATACAATAGC
16S flank1 F	16S rDNA 同源臂 A	ATGCCTGCAGGTCGACGATGAAAGACGGTTTCGGCT
16S flank1 R		CTGTCCATTCCAAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAG
<i>AprE</i> F	<i>AprE</i>	GTAACCTGACGCTTGAATGGACAGATGGTCAATG
<i>AprE</i> R		GTTTCGCTCCCAGTGAACCTGACGAAAGATGGAGAG
16S flank2 F	16S rDNA 同源臂 B	CGTCAAGTTCACTGGGGAGCGAACAGGATTAG
16S flank2 R		CTGCTGTACCTATGGGATTGGCTAAACCTTGC
SCU11 <i>Upp-AprE</i> F	靶向载体中的 <i>Upp</i>	TAGCCAATCCCATAGGTACAGCAGCAGTGACAAG
SCU11 <i>Upp-AprE</i> R		CGGTACCCGGGGATCCCCCTCGTTTAGCATACAATAGC
16SscreenF	16S rDNA 筛选	GGGTAACCTGCCTGTAAAGACTG
16SscreenR		GACTTCACCCCAATCATCTGC
16S- <i>AprE</i> -screenR	<i>AprE</i> 内部筛选	CAAACCCTGCTGAAAACAGAAGAG
16S-RS04200F	RI02_RS04200	GTCGCTAATGAGCAACCGAG
16S-screen(通用)R	16S rDNA 通用筛选	CGTACTCAGGGAATCGCAT
16S-RS13950F	RI02_RSRS13950	TGTTCACTCTCAGCACGAGGC
16S-RS00320F	RI02_RSRS00320	CCAACAGGCGGACTAGGAAT
16S-RS00740F	RI02_RSRS00740	CGCTAAGAACGGCGAAGATG
16S-RS02845F	RI02_RSRS02845	GTCGCTGATGACGAAGAAACG
16S-RS02735F	RI02_RSRS02735	TGATTAAGCGCCCGTAGCTC
16S-RS18870F	RI02_RSRS18870	GTGGTCGCTTTGAGAGAGTGAC

注: 下划线是设计的限制酶位点和保护碱基.

2.2.3 短小芽孢杆菌电转化 短小芽孢杆菌 SCU11 的电转化参考王超等^[9] 建立的高渗透压电转化方法, 在对菌株 SCU11Δ*Upp* 进行电转化时

将电压调整至 2200 V, 其余条件与上述方法一致.

2.2.4 *Upp* 基因敲除打靶载体的构建 以温度敏感性质粒 pUCETs 为骨架载体, 构建短小芽孢

杆菌 *Upp* 基因的敲除质粒, 构建策略如图 1 所示.

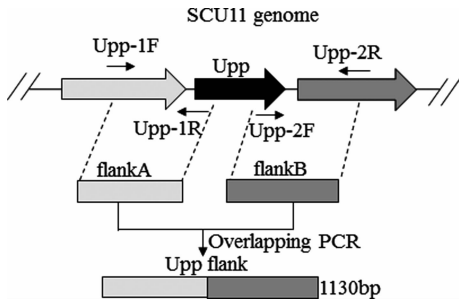


图 1 重组质粒 pUCETs- ΔUpp 同源臂构建策略

Fig. 1 Construction strategy of homologous arms in recombinant plasmid pUCETs- ΔUpp

2.2.5 *Upp* 基因回补载体的构建 以质粒 pUCETs 为骨架载体, 构建短小芽孢杆菌 *Upp* 基因回补质粒. 以 SCU11 基因组为模板, 用引物 SCU11*Upp* F/R 扩增短小芽孢杆菌 SCU11 *Upp* 基因编码区及上下游的启动子、终止子序列(1201 bp), 用 *Bam*H I / *Pst* I 双酶切载体及 *Upp* 片段并回收, 用 T4 DNA 连接酶将片段与载体相连, 转化 *E. coli* JM109, 于 100 μ g/mL 氨苄青霉素平板上筛选, 得到用于基因回补的质粒 pUCETs-*Upp*.

2.2.6 靶向插入载体 pUCETs-*AprE* 的构建 以 pUCETs 为骨架载体, 构建短小芽孢杆菌 *AprE* 基因靶向插入基因组 16S rDNA 位点的靶向载体, 构建策略如图 2 所示.

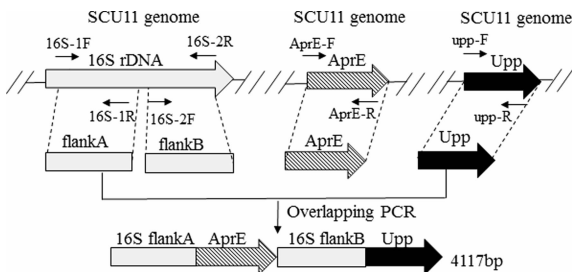


图 2 靶向插入载体 pUCETs-*AprE* 同源臂构建策略

Fig. 2 Construction strategy of homologous arms in plasmid pUCETs-*AprE*

2.2.7 *Upp* 无痕缺失菌株的筛选及鉴定 将构建的 pUCETs- ΔUpp 质粒采用高渗透压电转化法转化短小芽孢杆菌 SCU11, 在含有 5 μ g/mL 红霉素的 LB 平板上筛选转化子. 挑取经鉴定含有质粒 pUCETs- ΔUpp 的转化子接种于不含抗生素的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 震荡过夜培养 24 ~ 30 h. 将培养物转移至 42 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养, 每

隔 6 h 转种于新的 LB 液体培养基中传代培养 2 次促进质粒丢失. 将培养物稀释至合适浓度, 涂布于 50 μ g/mL 5-FU-M9 固体平板, 42 $^{\circ}$ C 过夜培养 18 h. 为了排除敲除菌株中残留质粒的影响, 将上述转化子点种于含有 5 μ g/mL 红霉素的平板, 挑取 5-FU 抗性、红霉素敏感的重组子用同源臂外侧引物 *Upp* screen F/R 对双交换个体进行 PCR 验证.

2.2.8 *AprE* 无痕插入突变菌株的筛选及鉴定

将 *AprE* 无痕插入基因组 16S rDNA 位点的筛选策略如图 3 所示. 将构建的 pUCETs-*AprE* 质粒采用高渗透压电转化法转化短小芽孢杆菌 SCU11 ΔUpp , 在含有 5 μ g/mL 红霉素的 LB 平板上筛选转化子. 挑取一个经鉴定含有质粒 pUCETs-*AprE* 的转化子接种于不含抗生素的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 震荡过夜培养 24 ~ 30 h. 将培养物转移至 42 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养, 每隔 6 h 转种于新的 LB 液体培养基中传代培养 2 次促进质粒丢失. 将培养物稀释至合适浓度, 涂布于含有 5 μ g/mL 红霉素的 LB 平板, 用 16S rDNA 同源臂外侧引物及 *AprE* 基因内部引物进行 PCR 筛选单交换个体, 将符合预期的单交换个体接种于 LB 液体培养基中, 42 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养 12 h, 将培养物稀释至合适浓度, 涂布于含 50 μ g/mL 5-FU-M9 固体平板, 42 $^{\circ}$ C 过夜培养 18 h. 将上述转化子点种于含有 5 μ g/mL 红霉素的平板, 挑取 5-FU 抗性、红霉素敏感的重组子用同源臂外侧引物对双交换菌落进行 PCR 验证.

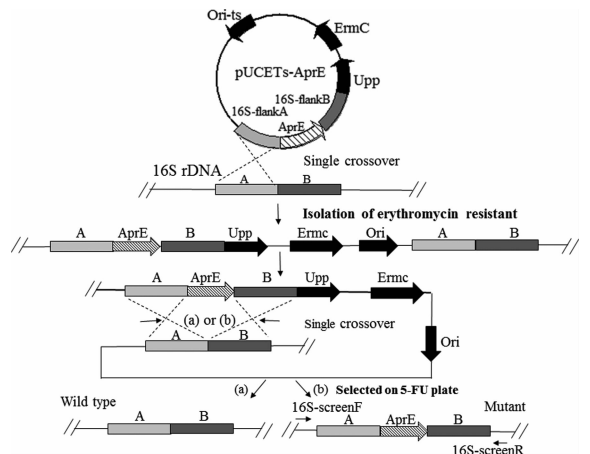


图 3 利用无痕修饰系统进行基因插入策略

图中 A、B 及 16S-FlankA、16S-FlankB 表示靶基因的上下游同源臂

Fig. 3 Gene insertion strategy of the markerless modification system

2.2.9 生长曲线的测定 将菌株划线于相应平板,挑单菌落接种于 5 mL LB 培养基,过夜培养 12~15 h,按 2%接种量将过夜培养物转种于 50 mL LB 培养基,37 °C,200 r/min 培养,分别每隔 2 h 取样,梯度稀释至合适浓度后用紫外分光光度计测量在 600 nm 下的吸光度,将测量得到的 OD 值乘以稀释倍数得到实际吸光度.以时间为横坐标,OD₆₀₀ 值为纵坐标作图,得到短小芽孢杆菌生长曲线.

2.2.10 短小芽孢杆菌蛋白酶发酵及酶活力测定 挑取活化后的单菌落接种于含 20 mL LB 培养基的锥形瓶中,37 °C 培养 12 h,以 4%的接种量接种至装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,34 °C、200 r/min 培养,分别在 36、48、54、60 及 72 h 收集发酵液,13,000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清测定蛋白酶活力,每个样品做三个重复,按照蛋白酶活力的测定 GB/T 23527-2009^[13] 标准进行酶活力测定.

3 结果

3.1 短小芽孢杆菌 *Upp* 基因的敲除

3.1.1 *B. pumilus* SCU11 对 5-FU 敏感性实验 为了确定 5-FU 对短小芽孢杆菌的最低抑菌浓度,将不同浓度的 5-FU 分别加入 LB 液体培养基及 M9 固体培养基中进行测试.结果表明,在 LB 液体培养基中,仅 5-FU 浓度为 90、100 μg/mL 的实验组培养物未生长,呈清亮颜色;在 M9 平板中,5-FU 浓度为 30 μg/mL 及以上的实验组未出现菌落.因此,短小芽孢杆菌 SCU11 菌株在液体 LB 培养基中 5-FU 的筛选浓度至少为 90 μg/mL;在 M9 固体培养基中 5-FU 的筛选浓度至少为 30 μg/mL.

3.1.2 *Upp* 基因敲除打靶载体的构建 将 PCR 扩增得到的 *Upp* 同源臂 *Upp*-flank A 和 *Upp*-flank B 利用重叠 PCR 连接得到 DNA 片段 *Upp* flank,将线性化的温敏性载体 pUCETs 与重叠片段经双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接并转化 *E. coli* JM109(见材料与方法).将转化子提取质粒进行双酶切(*Bam*H I / *Pst* I)鉴定,结果表明酶切片段与预期一致,进一步经测序验证表明插入片段正确,敲除载体 pUCETs-Δ*Upp* 构建成功.

3.1.3 *Upp* 基因的无痕敲除及筛选 将重组质粒 pUCETs-Δ*Upp* 采用高渗透压电转化法转化 SCU11,涂布于含有 5 μg/mL 红霉素的 LB 平板上

筛选转化子.将经过 PCR 验证得到的正确转化子命名为 SCU11 pUCETs-Δ*Upp*.

根据前面已经确定的 5-FU 对短小芽孢杆菌的筛选浓度,在 *Upp* 的敲除中可以利用 5-FU 的选择压力直接筛选发生同源重组的双交换突变体菌株.将 SCU11 pUCETs-Δ*Upp* 经过 30 °C 许可温度培养使其质粒复制并有机会发生同源重组,42 °C 高温传代培养以使温度敏感性质粒丢失,将培养物稀释至合适浓度涂布于 5-FU-M9 平板,长出的单菌落经红霉素平板验证不含质粒后,随机挑选 52 个单菌落用 *Upp* 基因同源臂外侧引物做菌落 PCR,野生型与突变型菌株的 PCR 条带大小分别是 1980 bp 与 1350 bp.结果如图 4(部分展示)所示,共有 4 个菌落同时出现野生型和突变型两条带(如图 4-11#),只有 1 个出现突变型大小的条带(如图 4-10#),其余均为野生型条带大小.将 10# 菌落 PCR 产物测序,结果表明,该菌株基因组上 *Upp* 基因编码区 630 bp 中的 559 bp 已被无痕敲除.将得到的突变菌株命名为短小芽孢杆菌 SCU11Δ*Upp*.由于筛选引物位于同源臂外侧,理论上扩增出突变型大小的均为发生双交换的个体,推测出现两条带的原因所挑菌落不纯导致,因此,在 *Upp* 基因敲除实验中,利用 5-FU 直接筛选双交换个体的筛选效率为 9.6%.

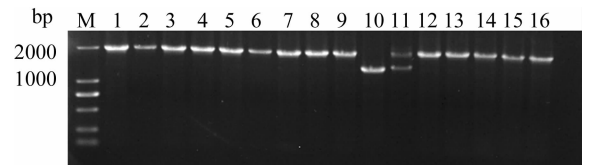


图 4 *Upp* 基因敲除菌株的 PCR 验证
M: DL2000 DNA marker; 1~16 为实验组,引物为 *Upp* screen F/R
Fig. 4 PCR verification of *Upp* gene knockout strain

3.2 *Upp* 基因作为反向筛选标记基因的有效性分析

将 PCR 扩增得到的短小芽孢杆菌 SCU11*Upp* 基因及载体 pUCETs 经双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接,将连接产物转化 *E. coli* JM109.挑取转化子经过酶切和测序验证后表明插入片段正确,*Upp* 基因回补质粒 pUCETs-*Upp* 构建成功.

将质粒 pUCETs-*Upp* 利用高渗透压电转化法转入菌株 SCU11Δ*Upp*,将得到的转化子命名为 SCU11Δ*Upp* pUCETs-*Upp*.将 *Upp* 回补菌株 SCU11Δ*Upp* pUCETs-*Upp*、含有空载体的原始

菌株 SCU11 pUCETs 及含有空载体的敲除菌株 SCU11 Δ Upp pUCETs 分别经过液体活化后, 划线于含有 5 μ g/mL 红霉素同时含有不同浓度(0、10、30、50 μ g/mL)的 5-FU-M9 平板, 于 30 $^{\circ}$ C 培养, 观察记录其生长状况。结果如图 5 所示, 在 M9 基本培养基中三种菌生长良好; 添加 5-FU 时抑制野生型菌株 SCU11 生长, 敲除菌株 SCU11 Δ Upp 对 5-FU 产生抗性, 敲除菌株回补 Upp 基因后恢复对 5-FU 的敏感性。由于回补的 Upp 基因表达出有活性的 UPRT 并且发挥了功能, 可以用此 Upp 基因作为基因靶向插入载体中的反向筛选基因用于接下来的基因无痕插入。

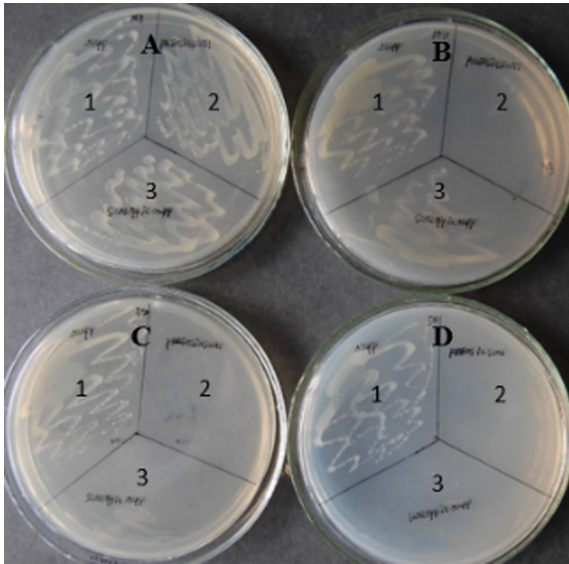


图 5 Upp 基因缺失菌株及回补菌株的 5-FU 敏感性实验

A~D: 含有 5 μ g/mL 红霉素的 M9 平板分别添加 0、10、30 和 50 μ g/mL 的 5-FU; 1: SCU11 Δ Upp pUCETs; 2: SCU11 pUCETs; 3: SCU11 Δ Upp pUCETs-Upp

Fig. 5 5-FU sensitivity assay in Upp gene knockout and rescue strain

3.3 短小芽孢杆菌基因无痕修饰体系的应用

同源过表达是提高酶活的一种方法, 而基因的染色体整合过表达策略相比用质粒过表达的方法具有表达稳定、可稳定遗传等优点。将外源基因插入染色体上时, 插入位点的选择是非常重要的。由于 16S rDNA 基因间隔区在细菌中通常有多份拷贝, 即使破坏其中 1 份基因的拷贝, 其余几份拷贝仍能正常发挥作用, 同时多份拷贝在一定程度上提高了同源重组发生的频率, 因此经常被作为遗传改造的切入点。16S rDNA 在短小芽孢杆菌 SCU11 中含有 7 份拷贝, 因此我们选择该位点作为短小芽孢杆菌蛋白酶基因 AprE 的过表达整合位点。

3.3.1 靶向插入载体 pUCETs-AprE 的构建
利用重叠 PCR 将 16S rDNA 同源臂、AprE 及 Upp 四个片段重叠成一个片段, 用 In-Fusion[®] HD Cloning Kit 将重叠后的片段与线性化载体连接, 将连接产物转化 E. coli JM109。挑取转化子提取质粒进行双酶切(BamH I /Sal I)鉴定, 进一步经测序验证表明插入片段正确, 质粒 pUCETs-AprE 构建成功。

3.3.2 短小芽孢杆菌 AprE 插入菌株的筛选鉴定

利用高渗透压电转化法将 pUCETs-AprE 转入 SCU11 Δ Upp 菌株, 将经过验证的转化子接种于不含抗生素的 LB 液体培养基, 经 30 $^{\circ}$ C 培养复制质粒, 42 $^{\circ}$ C 传代培养丢失质粒后, 涂布于红霉素平板, 挑取 13 个单菌落进行 PCR 验证, 引物位置如图 6 所示。首先用 16S rDNA 同源臂外侧引物(16S screenF)与 AprE 内部引物(16S-AprE-screenR)对单交换个体进行 PCR 筛选, 结果如图 7A 所示, 仅 5 个菌落扩增出目的条带(1172bp), 表明其发生了单交换。将其中一个单交换菌落接种至 LB 液体培养基, 42 $^{\circ}$ C 培养后涂布于 5-FU 平板, 经红霉素平板验证得到 5 个 5-FU 抗性、红霉素敏感的菌落, 用同源臂外侧引物 16S screen F/R 对双交换个体进行 PCR 验证, 野生型条带的理论大小为 1382 bp, 插入突变型为 3209 bp。结果如图 7B 所示, 与 6 泳道对照组相比, 2、3、4 泳道扩增出突变型大小的目的条带, 因此, 对 AprE 插入突变菌株进行双交换筛选的效率为 60%。由于在染色体上 16S rDNA 基因拷贝数有 7 个, 为了确定 AprE 插入的具体位置, 需要设计特异性更高的引物进行区分。

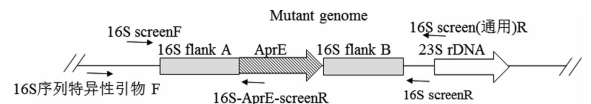


图 6 16S rDNA 验证引物位置

其中 16S 序列特异性引物 F 按位于染色体上的顺序分别为 RS13950F、RS02845F、RS00320F、RS00740F、RS04200F、RS02735F、RS18870F

Fig. 6 Primer positions of 16S rDNA

根据 Genbank 数据库公布的资料显示: 短小芽孢杆菌 BA06 16S rDNA 在基因组上的 7 份拷贝中, 上游表现出序列特异性, 下游与 23S 相连高度保守。因此, 我们在短小芽孢杆菌 BA06 16S rDNA 基因 7 份拷贝上游远端的特异性区域分别设计了 7 个 16S rDNA 位置特异性引物, 验证引物的

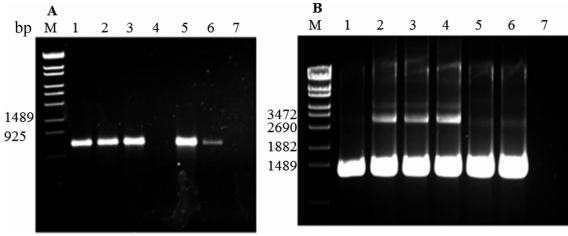


图 7 *AprE* 基因的无痕插入验证

(A) 16S 同源臂外侧与 *AprE* 内部引物扩增片段 M: λ -EcoT14 DNA marker; 1~6: 实验组; 7: 负对照(模板为 ddH₂O), 1~7 引物为 16S screenF/16S-*AprE*-screenR; (B) 16S 同源臂外侧引物扩增 M: λ -EcoT14 DNA marker; 1~5: 实验组; 6: 对照组(模板为 SCU11 Δ *Upp* DNA); 7: 负对照(模板为 ddH₂O), 1~7 引物为 16S screenF/R

Fig. 7 Verification of *AprE* gene insertion

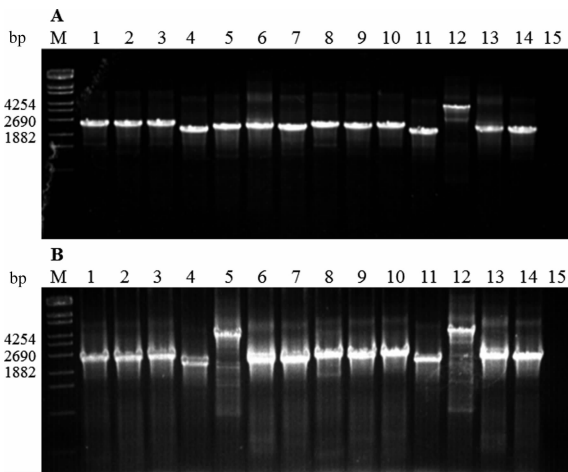


图 8 *AprE* 插入 16S rDNA 位置的 PCR 验证

(A) 3# 双交换菌落基因插入位置的 PCR 验证 M: λ -EcoT14 DNA marker; 1~7: 对照组(模板为 SCU11 Δ *Upp* DNA); 8~14: 实验组(模板为 3# 双交换菌落 DNA); 15: 负对照(模板为 ddH₂O), 1~15 上游引物均为按顺序排列的特异性引物, 下游为 16S screen(通用)R; (B) 2#、4# 双交换菌落基因插入位置的 PCR 验证 M: λ -EcoT14 DNA marker; 1~7: 对照组(模板为 2# 双交换 DNA); 8~14: 实验组(模板为 4# 双交换菌落 DNA); 15: 负对照(模板为 ddH₂O), 1~15 上游引物均为按顺序排列的特异性引物, 下游为 16S screen(通用)R

Fig. 8 Specific PCR verification of the *AprE* insertion site

位置如图 6 所示。按 16S rDNA 基因在基因组的排列先后顺序分别为: RS13950F、RS02845F、RS00320F、RS00740F、RS04200F、RS02735F、RS18870F, 与下游 16S screen(通用)R 搭配使用, 野生型菌株扩增条带大小分别为 2453、2387、2427、2122、2273、2286 与 2308 bp, 插入突变型则比野生型增加 1841 bp。分别以上述验证的 2#、3#、4# 三个双交换菌落基因组 DNA 为模板, 用 7 对引物做 PCR, 结果如图 8 所示: 三个双交换菌落均在第五对引物(如图 8-A 第 12 泳道, 图 8-B 第 5、12 泳道)扩增出 4114 bp 条带, 而对照组用第五

对引物扩增产物(如图 8-A 第 5 泳道)为野生型大小(2273 bp)。将目的条带对应 PCR 产物胶回收后连至 pUC18 T 载体进行测序, 结果表明, 16S rDNA 基因中已无痕插入了 1841 bp 的 *AprE* 基因。综上所述, 利用 *Upp* 无痕修饰系统, 在短小芽孢杆菌 SCU11 Δ *Upp* 的第 5 份 16S rDNA 基因拷贝(RI02-RS04200)处成功地无痕插入 1 份 *AprE* 基因拷贝, 将这个菌株命名为 SCU11 Δ *Upp* 16S rDNA::*AprE*。

3.3.3 野生型与突变体菌株生长曲线的测定 测定三个菌株 SCU11、SCU11 Δ *Upp* 及 SCU11 Δ *Upp* 16S rDNA::*AprE* 在 LB 培养基中的生长状况, 每组做三个平行样, 测定在 600 nm 下的吸光度并取其平均值。结果如图 9 所示, 在 37°C 培养条件下, 三种菌株的生长变化趋势基本一致, 但出发菌株 SCU11 达到稳定期产生的菌体量多于突变菌株 SCU11 Δ *Upp* 与 SCU11 Δ *Upp* 16S rDNA::*AprE*。

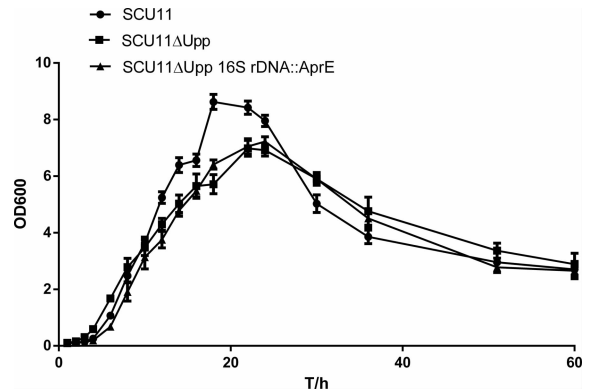


图 9 野生型与突变体菌株生长曲线
Fig. 9 Growth curves of wild-type and mutant strains

3.3.4 野生型与突变株摇瓶发酵及酶活力测定 将短小芽孢杆菌原始菌株 SCU11 与 SCU11 Δ *Upp*、SCU11 Δ *Upp* 16S rDNA::*AprE* 菌株经液体 LB 培养基活化后接种于发酵培养基, 在不同时间点取样, 按照蛋白酶活力的测定 GB/T 23527—2009 标准进行测定, 结果如图 10 所示, 从 36 h 起, 酶活开始有显著差异, 三菌株达到最大酶活的时间均在 54 h, 分别为 SCU11 4311 U/mL, SCU11 Δ *Upp* 5343 U/mL, SCU11 Δ *Upp* 16S rDNA::*AprE* 7125 U/mL。 *AprE* 插入突变株的最大酶活与出发菌株 SCU11 Δ *Upp* 相比, 提高了 33.1%; 与原始菌株 SCU11 相比, 提高了 65.27%, 同时 *AprE* 插入突变菌株的酶活水平在发酵后期高于出发菌株, 维持在 5000 U/mL 左右。值得一提

的是,SCU11 Δ *Upp* 菌株相对原始菌株 SCU11 最大酶活也提高了 24%,我们推测,由于 *Upp* 基因缺失导致细菌内微环境发生变化,菌体自身的一些调节机制有所调整从而导致了胞外蛋白酶产量的提高,具体原因有待进一步探究。

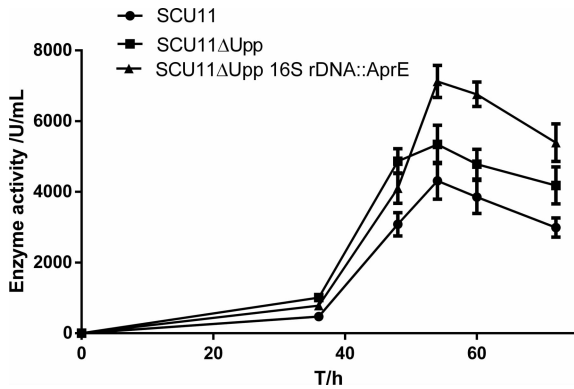


图10 野生型与突变体菌株蛋白酶酶活测定

Fig. 10 The protease enzyme activity in wild-type and mutant strains

4 讨论

本实验以 *Upp* 反向筛选标记基因与温敏性载体 pUCETs 为基础,构建了一个高效的短小芽孢杆菌基因无痕修饰系统.该系统主要由三个部分组成:*Upp* 基因缺失的短小芽孢杆菌,短小芽孢杆菌完整的 *Upp* 基因以及含有红霉素抗性基因的温度敏感性穿梭载体.通过温敏性载体构建同源重组片段,借助 *Upp* 基因作为反向筛选标记,利用 5-FU 筛选重组子,理论上可以完成对出发菌株 SCU11 Δ *Upp* 任何基因的无痕敲除或敲入,但前提是突变体必须有明显的可检测差异,才能被诸如 PCR 等检测手段方便地筛选出。

在该系统的应用中,需要通过两步筛选来分别完成对同源重组单交换与双交换突变体的分离与鉴定工作.在对双交换个体进行鉴定时发现获得的三个突变菌株插入突变均发生在第五份 16S rDNA 处,这是由于三个双交换个体均由同一个单交换突变体发生第二次同源重组得到的,第一次同源重组发生单交换的位置决定了最终整合在 16S rDNA 基因的哪份拷贝.如果要得到在 16S rDNA 不同位点发生插入突变的个体,需要在进行单交换筛选时使用 16S rDNA 基因上游的特异性引物进行验证,然后将不同位置发生单交换的个体进行培养筛选,最终可获得插入不同 16S rDNA 位点的双交换突变体.在一些细菌中的研究表明,由于沿

着复制起始位点到复制终止位点基因顺序是高度保守的,并且基因在染色体上的顺序与其在生长周期的表达阶段有关,即基因的表达受到时空的限制^[14],因此在不同位点发生插入的蛋白酶基因的表达水平可能受到细菌染色体位置效应的影响,从而产生不同的酶活水平。

本实验利用该系统完成了碱性蛋白酶基因 *AprE* 在短小芽孢杆菌染色体的无痕插入,这种方法最大的好处是并不在宿主染色体上留下标记基因,因而可以对染色体进行连续地改造.虽然可以将正向筛选结合 I-SceI 等改造工具使用,达到最终消除抗性基因的目的,但往往需要构建多个载体及经过多重筛选步骤,而达到同样的改造目的,单一载体的反向筛选策略明显更加省时省力.除此之外,与在基因组引入 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs)的核酸酶类改造工具相比,依靠 *Upp* 的反向筛选改造方式基于细菌内部自发的同源重组,相对比较温和,同时也不会出现基因打靶过程中“脱靶”错配的现象^[15]。

Wemhoff 等^[16]利用 *RpoB* 启动子表达 *Upp* (来源于地衣芽孢杆菌 DSM13)结合含氯霉素抗性基因的温敏性载体完成了对短小芽孢杆菌 Jo2 菌株基因的无痕敲除,但未进行外源基因的定点插入.本实验与 Wemhoff 等不同的是采用短小芽孢杆菌自身的 *Upp* 基因作为筛选标记,打靶载体不含接合转移的复制起点 *OriT*,因此不需要借助大肠杆菌进行接合转移转化,而是通过高渗透压电转化法转入菌株,简化了实验操作,具有更广的适应性.在筛选策略方面,增加了对单交换整合型突变体的 PCR 筛选步骤,一定程度上降低了直接筛选双交换突变体带来的假阳性率.对 16S rDNA 靶向插入 *AprE* 突变体进行单交换筛选的效率为 38.46%,对双交换筛选的效率为 60%,使基因插入最终筛选效率达到 23.07%,虽然这一数字仍落后于 CRISPR 等核酸酶类遗传改造工具(60%~100%^[17]),但相对传统的基于正向抗性筛选的方法来说,已经明显地提高了筛选效率,减少了工作量。

利用基因无痕修饰系统,通过将蛋白酶基因整合至染色体,使突变菌株最大酶活相对出发菌株提高了 33.1%,证明该方法稳定、可靠,可以作为提高短小芽孢杆菌蛋白酶产量的一种策略.在此基础上,还可以通过对蛋白酶基因表达中负调控转录因子基因如 *AbrB*、*SinR*、*ScoC* 以及一些非目的蛋白

基因进行连续地基因敲除,甚至在这些位点直接进行碱性蛋白酶基因的插入,破坏该基因表达的同时增加 *AprE* 拷贝数,逐步提高酶活。短小芽孢杆菌基因无痕修饰系统的建立使得对短小芽孢杆菌基因组进行连续地改造成为可能,也为蛋白酶生产菌株进一步改良及日后开展系统性功能基因组学的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Huang Q, Peng Y, Li X, *et al.* Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* [J]. *Curr Microbiol*, 2003, 46: 169.
- [2] 黄蓉,冯红. 脱毛碱性蛋白酶(DHAP)的饱和突变[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52: 1177.
- [3] 于士强,桂俊鸿,王海燕. 短小芽孢杆菌胞外蛋白质组双向电泳分析及碱性胁迫下胞外差异蛋白鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20: 217.
- [4] Wang H Y, Liu D M, Liu Y, *et al.* Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44: 1.
- [5] 尹萌萌,贺婷婷,王超,等. 响应面法优化短小芽孢杆菌 SCU11 发酵产碱性蛋白酶及关键基因转录调控分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 3: 371.
- [6] Liu P T, Jenkins N A, Copeland N G. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations [J]. *Genome Res*, 2003, 13: 476.
- [7] Bailey J E. Toward a Science of Metabolic Engineering [J]. *Science*, 1991, 252: 1668.
- [8] 胡逢雪,丁锐,崔震海,等. 大肠杆菌基因无痕敲除技术及策略[J]. *生物技术通讯*, 2013, 4: 552.
- [9] 王超,贺婷婷,宋婷,等. 短小芽孢杆菌遗传操作系统的建立及应用 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2017, 5: 1083.
- [10] Andersen P S, Smith J M, Mygind B. Characterization of the *uppP*-gene encoding uracil phosphoribosyl-transferase of *Escherichia-Coli* K12 [J]. *Europ J Biochem*, 1992, 204: 51.
- [11] Hasegawa N, Abei M, Yokoyama K K, *et al.* Cyclophosphamide enhances antitumor efficacy of oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyl-transferase (UPRT) in immunocompetent *Syrian hamsters* [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133: 1479.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 张晶雪,李永其,张蔚,等. 中华人民共和国国家标准, GB/T 23527-2009, 蛋白酶制剂, 蛋白酶活力的测定, 福林法[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2009.
- [14] Sobetzko P, Travers A, Muskhelishvili G. Gene order and chromosome dynamics coordinate spatiotemporal gene expression during the bacterial growth cycle [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E42.
- [15] Yan Q, Fong S S. Challenges and advances for genetic engineering of non-model bacteria and uses in consolidated bioprocessing [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2060.
- [16] Wemhoff S, Meinhardt F. Generation of biologically contained, readily transformable, and genetically manageable mutants of the biotechnologically important *Bacillus pumilus* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2013, 97: 7805.
- [17] Zhang M M, Wang Y J, Ang E L, *et al.* Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 963.

引用本文格式:

中文: 张长斌,徐云帆,李茜,等. 短小芽孢杆菌基因无痕修饰系统的建立及应用 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2019, 56: 544.

英文: Zhang C B, Xu Y F, Li X, *et al.* Establishment and application of a markerless genetic modification system in *Bacillus pumilus* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 544.