

· 全健康 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230056



主持人: 韩 谦、刘萌萌

pSETsacB 质粒构建及其对达卡气单胞菌 *kdpE* 基因的有痕与无痕敲除效率评价

凌 博³, 陈丽青¹, 王 宇², 杨 诺³, 范丽霞³, 郭桂英⁴,
李雪松³, 曾纪锋¹, 李 迁⁵, 郑继平³

(1. 海南大学 动物科技学院, 海口 570228; 2. 上海市农业科学院 生物技术研究所, 上海 201106; 3. 海南大学 生命科学学院, 海口 570228; 4. 海南大学 理学院, 海口 570228; 5. 海南大学 网络与技术中心, 海口 570228)

摘 要: 为构建一种新型基因敲除质粒, 以 pSET4s 和 pK18mobsacB 质粒为基础, 通过 PCR 和酶切连接的方法, 构建了新质粒 pSETsacB, 然后以 pK18mobsacB 质粒为对照, 评价新建质粒对达卡气单胞菌 *kdpE* 基因的有痕敲除 (带有四环素筛选标记) 和无痕敲除效率。结果表明, 两种质粒在有痕敲除效率上无差别, 但在无痕敲除上, pSETsacB 的敲除效率显著高于对照质粒 pK18mobsacB。由于 pSETsacB 为穿梭性温敏质粒, 因此, 该质粒可望在革兰氏阳性和阴性菌的遗传机制研究中皆可发挥作用, 本研究同时也为检视 *kdpE* 基因在达卡气单胞菌中的功能提供了前期的突变体材料。

关键词: pSETsacB; *kdpE* 基因; 基因敲除

中图分类号: Q784

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054 (2024) 04-0452-08

凌博, 陈丽青, 王宇, 等. pSETsacB 质粒构建及其对达卡气单胞菌 *kdpE* 基因的有痕与无痕敲除效率评价 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(4): 453-460. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230056

达卡气单胞菌 (*Aeromonas. dhakensis*) 是一种重要的人类病原体, 但在临床上常被误诊为嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)^[1], 在气单胞菌伤口分离株中, 达卡气单胞菌是优势种且表现出比嗜水气单胞菌更强的毒性^[2]; *KdpE* 通过调控钾离子来控制细菌的正常生命活动, 这对于调节达卡气单胞菌的毒力和代谢具有重要意义^[3], 如在鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 中, *kdpE* 基因的缺失会减弱使菌株的毒力及生存力^[4]。本研究旨在提高 *kdpE* 基因敲除筛选效率, 为后续解析 *kdpE* 基因功能提供 *kdpE* 敲除株。而通过传统的同源重组技术进行基因敲除是研究单基因功能的理想方法^[5-6]。目前, 基因敲除技术在气单胞菌中的运用, 主要集中在两个方面: 一个是自杀质粒介导的同源重组

技术^[7-8]; 另一个是转座子诱变技术^[9]。相对于转座子诱变技术, 有关利用自杀性质粒技术对气单胞菌基因功能的研究报道更多且应用最广, 然而使用自杀质粒进行基因敲除效率不高、工作量大。

现阶段对于气单胞菌使用质粒进行基因敲除一般采用 2 种办法, 一种是插入失活法, 既在靶基因的内部插入抗性基因, 从而使靶基因失活。首先, 这种做法虽然有利于利用插入的外源抗生素片段筛选到突变株, 但是也会将外源抗生素片段引入气单胞菌的基因组, 容易造成基因污染、抗性滥用, 存在危害; 其次, 如果每次进行基因敲除都将抗生素基因片段保留在宿主中, 那么若需要分析多种突变组合, 则会产生超级细菌且敲除变难; 最后, 将外源抗生素片段插入靶基因可能会对下

收稿日期: 2023-04-26

修回日期: 2023-09-20

基金项目: 国家自然科学基金 (32060788, 32060131), 海南省自然科学基金 (321MS007, 821MS029, 821RC1052, 2019RC084)

第一作者: 凌博 (1997-), 女, 海南大学生命科学学院 2020 级硕士研究生。E-mail: 895418919@qq.com

通信作者: 郭桂英 (1973-), 女, 高级实验师, 硕士。研究方向: 微生物。E-mail: 815827434@qq.com

游基因的表达产生影响,给表型分析带来麻烦,阻碍对基因功能的研究。另一种是基因无痕敲除法,即利用有效的反向筛选标记来高效获得无标记的基因突变株。虽然不使用反向筛选标记也可以得到无痕突变株,但可能需要手动筛选数百或数千个单菌落,耗时数月^[10]。在报道的许多反选择标记中,枯草芽孢杆菌的 *sacB* 基因可能是最受欢迎的。来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 *sacB* 基因表达对革兰氏阴性细菌(如大肠埃希菌)是致死型的^[11],因此, *sacB* 基因已被用作许多革兰氏阴性细菌的阴性选择标记,例如,在支气管败血波氏杆菌中, *sacB* 基因用于促进双交叉重组的等位基因交换筛选^[12],因此,本研究拟构建将 *sacB* 基因

整合到更小的载体温敏型自杀性质粒 pSET4s^[13], 形成整合型载体 pSETsacB, 进而构建基于 *sacB* 负筛选标记的、高效快捷的 $\Delta kdpE$ 突变株,为探究达卡气单胞菌 *kdpE* 基因功能及应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、引物 质粒 pBR322、pK18mob-*sacB*、pSET4s 及大肠杆菌 DH5 α 菌株、达卡气单胞菌 C160501 菌株均由本实验室提供。基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、产物纯化回收试剂盒、2 \times PCR MIX 购自诺维赞生物科技有限公司;本实验用到的验证及扩增引物序列信息如表1所示,由海南擎科生物科技有限公司提供测序及引物合成。

表1 基因敲除所用引物序列

Tab. 1 Primer sequence for gene knockout

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	备注 Annotation
<i>kdpE</i> -up-F	ACGAATTCGGATCTGGTGGAGAACGCC (EcoRI)	扩增 <i>kdpE</i> 上游同源臂
<i>kdpE</i> -up-R	CGGTAGCCGATGCCGATGACCAGTATGTGAGCCATTCA	
<i>kdpE</i> -down-F	CCTCGCTAACGGATACCACGGCATCGGCTACCGTTTTA	扩增 <i>kdpE</i> 下游同源臂
<i>kdpE</i> -down-R	ACCTGCAGCTGTTCGGCTACTACAGCCT (PstI)	
P _{Amp} -F	ACAGATCTACTTTTCGGGGAAATGTGCG (BglII)	扩增氨苄的启动子(P _{Amp})
P _{Amp} -R	CTTTTGTATGTTTCATAAGGGCCGACACGGAAATGT	
<i>sacB</i> -F	TTCCGTGTCGCCCTTATGAACATCAAAAAGTTTGCA	扩增 <i>sacB</i> 基因
<i>sacB</i> -R	ACGAATTCCTTATTTGTTAACTGTTAATTGTCC (EcoRI)	
<i>tet</i> -F	TGAATGGCTCACATACTGCTCATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG	扩增 <i>tet</i> 基因
<i>tet</i> -R	TAAAACGGTAGCCGATGCCGTGGTGAATCCGTTAGCGAGG	
E1	ATTTCCAGCTCAAACGGGACT	敲除 <i>kdpE</i> 基因验证引物
E2	GGATTACTGCTGGTCACTTGC	

1.2 *kdpE* 基因上下游同源臂的扩增 以达卡气单胞菌 C160501 为模板,分别用 *kdpE*-up-F/R 和 *kdpE*-down-F/R 进行 PCR 扩增目的片段。30 μ L PCR 体系:2 \times PCR MIX 15 μ L,基因组 DNA 1 μ L, ddH₂O 12 μ L,上下游同源臂引物各1。PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,Tm-5 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 停止反应。使用产物纯化试剂盒纯化回收扩增的 DNA 片段并保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱待用,同时使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带大小是否正确。

1.3 构建 pSETsacB 质粒 以自带氨苄抗性基因质粒 pBR322 为模板,P_{Amp}-F 为上游引物(含 BglII 酶切位点),以 P_{Amp}-R 为下游引物(包含与 *sacB* 基因 15 bp 重叠部分),扩增氨苄的启动子(P_{Amp});以质粒 pK18mobsacB 作为模板,以 *sacB*-F 作为上游引物(包含与 Amp 启动子 15 bp 重叠区域),以 *sacB*-R 作为下游引物(包含 EcoRI 酶切位点),扩增 *sacB* 基

因;扩增完电泳检测并切胶回收,根据融合 PCR 的原理,两片段以 1:1 的摩尔比,充当模板进行融合,将融合片端和 pSET4s 质粒利用限制性内切酶 BglII 和 EcoRI 进行双酶切,连接转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态,涂带质粒抗性的平板,过夜培养后挑选生长出的单菌落 PCR 验证并进行酶切验证。将酶切验证成功并测序无突变的质粒 pSETsacB 分别转入大肠杆菌与达卡气单胞菌中,挑选出重组菌后;分别涂布于 LB 固体平板和含有 20% 蔗糖的 LB 平板,观察它们各自在两种平板的生长情况。检验 pSETsacB 质粒在宿主菌中的致死效果。

1.4 构建有痕和无痕基因敲除质粒 以质粒 pBR322 为模板,*tet*-F/R 为上下游引物(包含与 *kdpE* 下游同源臂重叠区域)。PCR 扩增 *tet* 抗性基因片段,构建无痕基因敲除质粒则无需扩增此片段,利用融合 PCR 将 *tet* 抗性基因片段和上下游同源臂片段,上下游同源臂片段无缝连接成一个片

段,并胶回收,将融合片段 $\Delta kdpE(tet)$ (上游同源臂 + *tet* + 下游同源臂)或者和融合片段 $\Delta kdpE$ (上游同源臂 + 下游同源臂)、质粒 pSET*sacB*、质粒 pK18*mobsacB* 分别利用限制性内切酶 PstI 和 EcoRI 进行双酶切,然后连接转化,挑选阳性克隆,并进行酶切验证,同时测序确保无突变。

1.5 电转及筛选敲除菌株 将敲除质粒 pSET-*sacB*- $\Delta kdpE(tet)$ 与 pK18- $\Delta kdpE(tet)$ 分别导入野生型达卡气单胞菌中,利用引物鉴定出含有重组质粒的达卡气单胞菌。将含有重组质粒的达卡气单胞菌在 5 mL LB 培养基中培养,稀释涂布于含有 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TET 的 20% 蔗糖 LB 平板上,利用四环素作为正筛选标记,*sacB* 作为负筛选标记,进行二次同源重组菌的筛选,每个板随机挑选单菌落,利用特异性引物 E1/E2(引物在上下游同源臂外侧)PCR 验证是否存在敲除株;同理,将无痕敲除质粒 pSET-*sacB*- $\Delta kdpE$ 与 pK18- $\Delta kdpE$ 分别导入野生型达卡气单胞菌中,但只利用高浓度蔗糖进行负筛选。

2 结果

2.1 构建 pSET*sacB* 质粒

2.1.1 Amp 启动子、*sacB* 基因的扩增及片段融合 以质粒 pBR322 为模板,以 Amp-F/R 为上游引物,扩增氨苄的启动子(P_{Amp}),片段大小为 153 bp;以质粒 pK18*mobsacB* 作为模板,以 *sacB*-F/R 作为上下游引物,扩增 *sacB* 基因,片段大小为 1 422 bp。将 Amp 启动子与 *sacB* 基因 PCR 融合成一个大小为 1 575 bp 片段。PCR 扩增结果如图 1 所示。

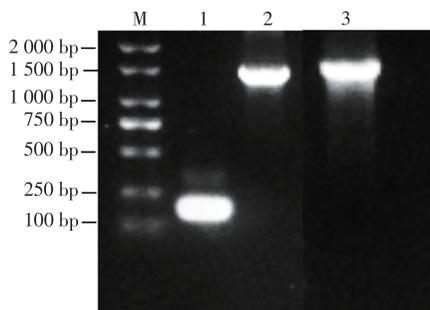


图1 PCR扩增Amp启动子及*sacB*基因及融合片段

M: 分子量 2 000 bp 的 Marker; 1: Amp 启动子(P_{Amp})片段; 2: *sacB* 基因片段; 3: Amp 启动子与 *sacB* 基因的融合 PCR 产物。

Fig. 1 PCR amplification of P_{Amp} and *sacB* and overlapping PCR amplification

M: 5 000bp Marker; 1: Amp promoter fragment (P_{Amp}); 2: *sacB* gene fragment; 3: Overlapping PCR productst.

2.1.2 P_{Amp} 与 *sacB* 基因重叠片段与质粒 pSET4s 的连接转移 将融合片段和 pSET4s 质粒双酶切,连接后热击转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态,涂带 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壮观霉素抗性的平板,过夜培养后,菌落 PCR 筛选阳性克隆,并进行酶切验证,如图 2 所示。同时进行测序,质粒 pSET*sacB* 如图 3。

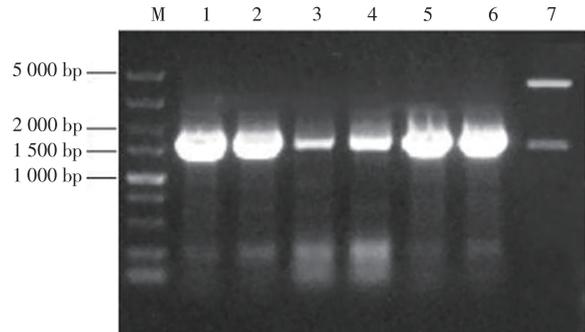


图2 重组质粒 pSET*sacB* 的菌落 PCR 和双酶切验证

M: 分子量 5 000 bp 的 Marker; 1~6: 菌落 PCR 验证片段; 7: 酶切片段。

Fig. 2 Colony PCR and double enzyme digestion validation of recombinant plasmid pSET*sacB*

M: 5 000 bp Marker; 1-6: PCR products of strain colonies; 7: Double digestion fragment.

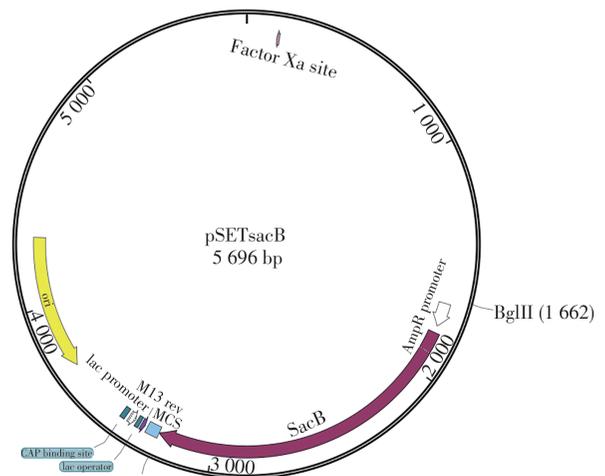


图3 重组质粒 pSET*sacB*

Fig. 3 Recombinant plasmid pSET*sacB*

2.1.3 检验 pSET*sacB* 质粒在宿主菌中的致死效果

将带有 pSET*sacB* 质粒的大肠杆菌及达卡气单胞菌分别涂布于不含蔗糖和含有 20% 蔗糖的 LB 固体培养基,结果如图 4 所示,在 20% 蔗糖平板上含有质粒 pSET*sacB* 的大肠杆菌 DH5 α 及达卡气单胞菌不能生长。因此质粒 pSET*sacB* 中的 *sacB* 基因可以正常发挥功能,具有蔗糖致死效果。

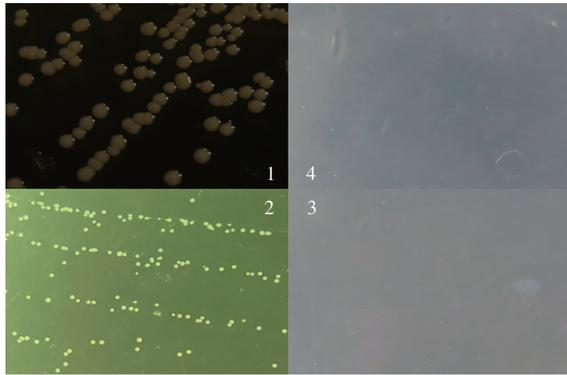


图 4 含有质粒 pSETsacB 的大肠杆菌 DH5α 和达卡气单胞菌在有蔗糖时的生长差异

1: 大肠杆菌 DH5α (pSETsacB)/无蔗糖; 2: 达卡气单胞菌 (pSETsacB)/无蔗糖; 3: 达卡气单胞菌 (pSETsacB)/20% 蔗糖; 4: 大肠杆菌 DH5α (pSETsacB)/20% 蔗糖。

Fig. 4 Growth Differences of *E. coli* and *A. Dhakensis* containing plasmid pSETsacB

1, 3: *E. coli* (pSETsacB); 2, 4: *A. dhakensis* (pSETsacB).

2.2 构建有痕和无痕基因敲除质粒 四环素 (*tet*) 基因、*kdpE* 基因上下游同源臂的扩增并将其融合, 形成 $\Delta kdpE(tet)$ (上游同源臂 + *tet* + 下游同源臂) 片段和

$\Delta kdpE$ (上游同源臂 + 下游同源臂) 片段, 将这两个融合片段与质粒 pSETsacB、质粒 pK18mobsacB 分别进行双酶切, 然后连接转化, 挑选阳性克隆, 并进行酶切验证, 如图 5 所示。同时进行测序, 质粒如图 6。

2.3 电转及敲菌株的筛选

2.3.1 构建有痕敲除株 使用电转的方法将有痕基因敲除质粒 pSETsacB- $\Delta kdpE(tet)$ 与 pK18- $\Delta kdpE(tet)$ 转移到达卡气单胞菌中, 四环素抗性平板筛选后进行菌落 PCR 验证。如图 7 所示。使用敲除质粒 pSETsacB- $\Delta kdpE(tet)$ 成功电转的敲除株有 6 株; 使用敲除质粒 pK18- $\Delta kdpE(tet)$ 成功电转的敲除株有 5 株, 其中野生型扩增条带为约 1 800 bp, 敲除株扩增条带约 2 400 bp; 同时敲除株测序结果与预期一致。

2.3.2 构建无痕敲除株 使用电转的方法将大肠杆菌中的无痕敲除质粒 pSETsacB- $\Delta kdpE$ 与 pK18- $\Delta kdpE$ 转入达卡气单胞菌中, 通过抗性平板筛选并进行菌落 PCR 验证。如图 8 所示。使用质粒 pK18- $\Delta kdpE$ 进行基因敲除, 未发现敲除株; 使用质粒

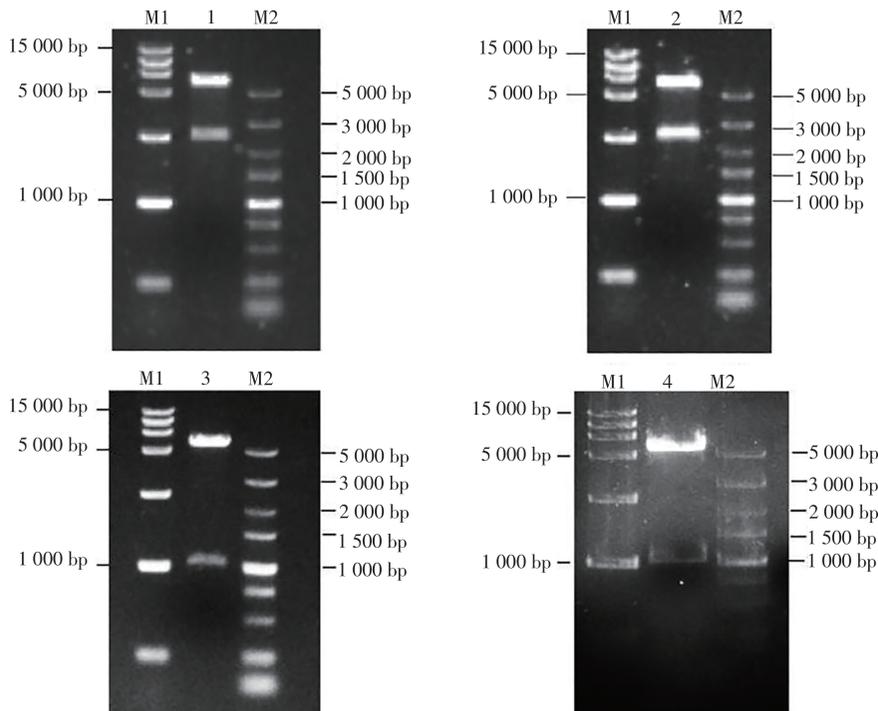


图 5 重组质粒 pK18- $\Delta kdpE(tet)$ 、pSETsacB- $\Delta kdpE(tet)$ 、pK18- $\Delta kdpE$ 、pSETsacB- $\Delta kdpE$ 的双酶切验证

M1: 分子量 15 000 bp 的 Marker; M2: 分子量 5 000 bp 的 Marker; 1: pK18- $\Delta kdpE(tet)$ 双酶切片段; 2: pSETsacB- $\Delta kdpE(tet)$ 双酶切片段; 3: pK18- $\Delta kdpE$ 双酶切片段; 4: pSETsacB- $\Delta kdpE$ 双酶切片段。

Fig. 5 Double enzyme digestion of recombinant plasmid pK18- $\Delta kdpE(tet)$ and pSETsacB- $\Delta kdpE(tet)$

M1: 15 000bp Marker; M2: 5 000bp Marker; 1: Double digestion fragment of pK18- $\Delta kdpE(tet)$; 2: Double digestion fragment of pSETsacB- $\Delta kdpE(tet)$; 3: Double digestion fragment of pK18- $\Delta kdpE$; 2: Double digestion fragment of pSETsacB- $\Delta kdpE$.

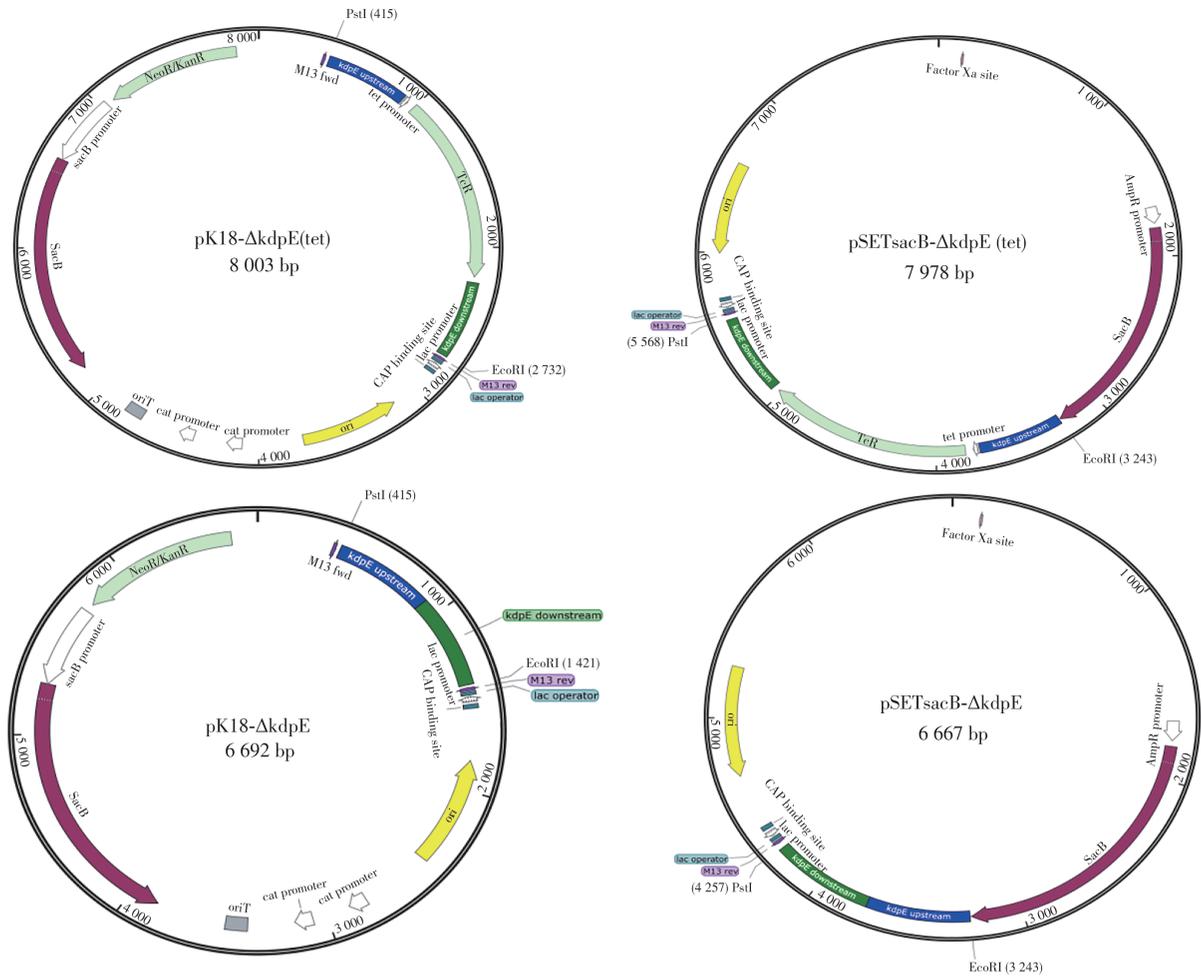


图6 重组质粒 pK18-ΔkdpE(tet)、pSETsacB-ΔkdpE(tet)、pK18-ΔkdpE、pSETsacB-ΔkdpE 的质粒图

Fig. 6 Recombinant plasmid pK18-ΔkdpE(tet)、pSETsacB-ΔkdpE(tet)、pK18-ΔkdpE、pSETsacB-ΔkdpE

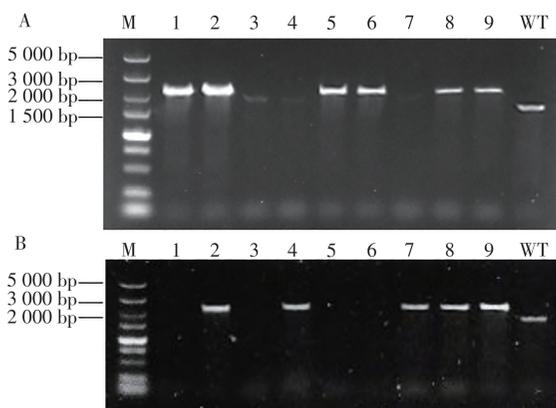


图7 PCR 检测敲除菌株

M: 分子量 5 000 bp Marker; WT: 野生菌株; A: 使用质粒 pSETsacB-ΔkdpE(tet) 扩增结果, B: 使用质粒 pK18-ΔkdpE(tet) 扩增结果。

Fig. 7 Verification of knockout strains

M: 5 000bp DNA Marker; WT: wild strain; A: Amplification results using plasmid pSETsacB-ΔkdpE(tet); B: Amplification results using plasmid pK18-ΔkdpE(tet).

pSETsacB-ΔkdpE 进行基因敲除, 发现 5 株敲除株。其中野生型扩增条带约 1 800 bp 左右, 敲除株扩增条带约 1 100 bp, 同时敲除株测序结果与预期一致。

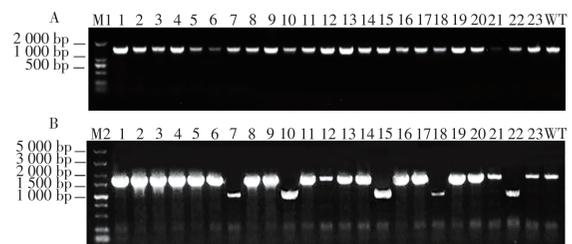


图8 PCR 检测无痕敲除菌株

M1: 分子量 5 000 bp Marker; M2: 分子量 2 000 bp Marker; WT: 野生菌株; A: 使用质粒 pK18-ΔkdpE; B: 使用质粒 pSETsacB-ΔkdpE。

Fig. 8 Verification of non-marking knockout strains

M1: 2 000bp DNA Marker; M2: 5 000bp DNA Marker; WT: PCR products of wild strain; A: Amplification results using plasmid pSETsacB-ΔkdpE; B: Amplification results using plasmid pK18-ΔkdpE.

2.4 无痕突变株筛选效率检测 分别挑取四种敲除质粒的敲除株各200个单菌落,3次重复,用软件SPSS对不同质粒之间的敲除株筛选效率差异进行统计分析。通过单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行分类变量比较,结果如图9所示,以四环素为正筛选标记,*sacB*作为负筛选标记时,优化质粒pSET_{sacB}与原质粒pK18mobsacB相比,并未提高突变株获得率,无显著性差异($P=1.000>0.05$);而只有*sacB*作为负筛选标记时,优化质粒pSET_{sacB}比原质粒pK18mobsacB效率显著性提高($P<0.0001$),易筛选到无痕突变株。

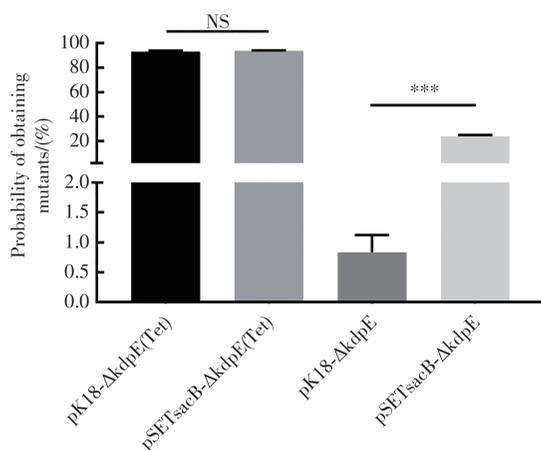


图9 使用不同质粒获得突变株的概率

***: $P<0.001$.

Fig. 9 Probability of obtaining mutants using different plasmids

***: $P<0.001$.

2.5 敲除株遗传稳定性 将无痕突变株 $\Delta kdpE$ 划线至LB无抗平板上,连续传代30次后,用引物E1/E2检测突变株的遗传稳定性。结果如图10所示,无痕敲除株 $\Delta kdpE$ 能稳定遗传,同时测序结果与初代一致,无突变。

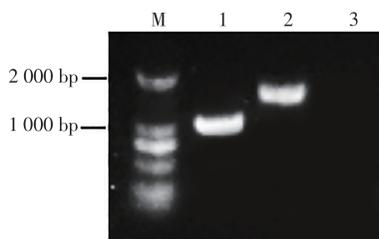


图10 无痕突变株的遗传稳定性

M: 分子量2000 bp的Marker; 1: 第30代突变株; 2: 野生株; 3: 阴性对照。

Fig. 10 Genetic stability of knockout mutants

M: 2000 bp DNA Marker; 1: 30 th generation mutant; 2: WT; 3: Negative control.

3 讨论

利用基因敲除技术验证细菌基因的功能一直是研究的热点^[14],随着对基因探索的不断深入和技术的改进,一系列基因敲除技术相继出现,基因敲除技术在应用方面大同小异,各有优缺点和适用范围,如:根据RNA干扰原理实现基因敲除,目前已在线虫、果蝇、真菌及拟南芥等生物中建立,用于研究特定基因的功能^[15],但很多设计的dsRNA不能产生抑制靶基因转录后沉默的效果^[16]、利用锌指核酸酶技术(ZFNs)技术实现基因的定点修饰^[17],该方法特异性较高,较适用于体内疗法,且已在基因治疗领域显示出良好的前景,但ZFNs构建过程较复杂^[18]、利用细菌自有免疫系统发展得到的CRISPR-Cas9介导的基因敲除,可以通过DNA电泳快速筛选敲除基因型,对细菌的基因组进行精确修饰,从而用于研究靶基因的功能或者抵抗外源物质的侵入^[19],但CRISPR-Cas9系统具有脱靶效应的弊端^[20]。而使用传统同源重组技术进行基因敲除较为普遍,例如:在耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中,使用同源重组的方法构建 $\Delta kdpE$ 和 $\Delta kdpD$ 突变株^[21],在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中,使用同源重组构建PAO1/pUCP-Red基因敲除体系^[22]。因为该方法简单、容易操作,不需要任何复杂先进的设备或高超的经验。因此在构建敲除株上具有广泛的应用。

穿梭载体pSET4s是一种用于基因缺失的新型自杀穿梭质粒,使用pSET4s进行等位基因交换^[23],枯草芽孢杆菌*sacB*基因编码分泌型蔗糖果聚糖酶,该酶能催化蔗糖水解和合成高分子量的果聚糖,但高分子量果聚糖积累对细胞存在潜在的毒性作用,可造成细胞死亡^[24],*sacB*基因能否在宿主菌中高效的表达会影响二次同源重组菌株的筛选。据相关文献报道^[25-27],在兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中,因改变了*sacB*基因的启动子,导致细菌突变率显著提高。在这里,本实验首先通过将*sacB*基因的启动子变为可以在气单胞菌中表达的P_{Amp}启动子来修改该载体,构建了一种基于*sacB*反筛选的质粒pSET_{sacB},可以灵活用于在达卡气单胞菌中的突变。

使用构建的载体(pSETsacB)及原载体(pK18mobsacB)对*kdpE*基因进行有痕敲除(带有四环素筛选标记)和无痕敲除,得到pSETsacB- Δ *kdpE*(*tet*)、pK18- Δ *kdpE*(*tet*)有痕敲除质粒和pSETsacB- Δ *kdpE*、pK18- Δ *kdpE*无痕敲除质粒,将四种质粒分别电转移至宿主菌,用氨苄抗生素进行筛选,随后将所得菌株接种到补充有蔗糖的板上进行第二次重组交换;有痕敲除株因为pSETsacB- Δ *kdpE*(*tet*)与pK18- Δ *kdpE*(*tet*)质粒带有四环素片段代替达卡气单胞菌基因组中的*kdpE*基因,导致敲除株扩增条带变长;使用两种质粒获得带四环素抗性的敲除株数目基本相同。无痕敲除株由于*kdpE*基因的缺失导致敲除株扩增条带变短。当只有*sacB*作为负筛选标记时,优化质粒pSETsacB比原质粒pK18mobsacB更有效,更易筛选到无痕突变株。但样本量较少,容易出现误差,因此对四种敲除质粒的野生达卡气单胞菌各挑取200个单菌落,三次重复,统计突变株筛选效率。证明了质粒pSETsacB比原质粒pK18mobsacB更有效,易筛选到无痕突变株。将其连续传代30次后,突变株仍能稳定遗传。本文通过比较无痕敲除株和有痕敲除敲除株的敲除效率,为有效地选择基因敲除提供一定的参考。

综上所述,构建的pSETsacB比对照质粒pK18mobsacB在达卡气单胞菌的基因敲除中更具优势,即可实现基因的无痕敲除,提高敲除效率。尽管如此,该方法在某些方面也有待进一步完善,如假阳性菌株数目仍较多,给质粒构建和菌株筛选工作带来一定的压力。因而,在构建达卡气单胞菌其它基因敲除株中,应从筛选抗性基因、减少基因突变以及优化同源臂的长度等方面入手,使基因敲除的效率更高。

本研究构建了一种新型基因敲除质粒,可以灵活用于在达卡气单胞菌基因上的敲除,对达卡气单胞菌*kdpE*基因功能的研究及弱毒活疫苗的应用将是后续研究的方向,将为深入研究*kdpE*基因在达卡气单胞菌中的详细作用机理提供材料和基础。

参考文献:

- [1] KITAGAWA H, OHGE H, YU L, et al. *Aeromonas dhakensis* is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan [J]. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 2020, 26(2): 316-320.
- [2] CHEN P L, WU C J, CHEN C S, et al. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20(7): 0428-0434.
- [3] HEERMANN R, JUNG K. The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 304(2): 97-106.
- [4] FREEMAN Z N, DORUS S, WATERFIELD N R. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K⁺ homeostasis and virulence [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(3): e1003201.
- [5] 丁海峰, 李小申, 黄慧, 等. 基因敲除技术研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(5): 50-54.
- [6] WANG C, SUN H. Progress in gene knockout mice [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2019, 35(5): 784-794.
- [7] LIU Z, LIU P, LIU S, et al. Small protein B upregulates sensor kinase *bvgS* expression in *Aeromonas veronii* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 16: 6: 579.
- [8] SONG T, TOMA C, NAKASONE N, et al. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53(6): 477-482.
- [9] SILVER A C, RABINOWITZ N M, KUFFER S, et al. Identification of *Aeromonas veronii* genes required for colonization of the medicinal leech, *Hirudo verbana* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(19): 6763-6772.
- [10] WEI Z, FU Q, CHEN Y, et al. The capsule of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* is a target for attenuation in vaccine development [J]. *Vaccine*, 2012, 30(31): 4670-4675.
- [11] QUÉNÉE L, LAMOTTE D, POLACK B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *BioTechniques*, 2005, 38(1): 63-67.
- [12] AMBROSIS N, FERNÁNDEZ J, SISTI F. Counter-selection method for markerless allelic exchange in *Bordetella bronchiseptica* based on *sacB* gene from *Bacillus subtilis* [J]. *Current Protocols in Microbiology*, 2020, 59(1): e125.
- [13] TAKAMATSU D, OSAKI M, SEKIZAKI T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis* [J]. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140-148.
- [14] 常雅洁, 丁雪燕, 王思权, 等. 常见细菌基因敲除技术的研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(10): 1118-1123.
- [15] 李颖平, 张映, 邵国青. 一种新的基因敲除术-RNAi [J]. *生物技术通报*, 2006(3): 42-45.
- [16] 李今煜, 陈健铭, 彭振坤. 几种常用的基因敲除技术 [J]. *武夷科学*, 2007, 23(0): 187-190.
- [17] MILLER J C, HOLMES M C, WANG J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(7): 778-785.

- [18] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS III C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(7): 397–405.
- [19] JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG J S, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening [J]. Nature Protocols, 2017, 12(4): 828–863.
- [20] DALVIE N C, LORGEREE T, BIEDERMANN A M, et al. Simplified gene knockout by CRISPR-Cas9-induced homologous recombination [J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(1): 497–501.
- [21] ALI M K, LI X, TANG Q, et al. Regulation of inducible potassium transporter KdpFABC by the KdpD/KdpE two-component system in *Mycobacterium smegmatis* [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 570.
- [22] 余华, 熊浚智, 何晓梅, 等. 采用 Red 重组系统敲除铜绿假单胞菌弹性蛋白酶基因[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(2): 129–132.
- [23] LIU R, ZHANG P, SU Y, et al. A novel suicide shuttle plasmid for *Streptococcus suis* serotype 2 and *Streptococcus equi* ssp. zooepidemicus gene mutation [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27133.
- [24] 吴菁, 刘秀敏, 张维, 等. 枯草芽孢杆菌 *sacB* 基因的功能验证及应用[J]. 核农学报, 2008, 22(5): 590–594.
- [25] SUN X, YANG D, WANG Y, et al. Development of a markerless gene deletion system for *Streptococcus zooepidemicus*: functional characterization of hyaluronan synthase gene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19): 8629–8636.
- [26] HOOVEN T A, BONAKDAR M, CHAMBY A B, et al. A counterselectable sucrose sensitivity marker permits efficient and flexible mutagenesis in *Streptococcus agalactiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(7): e03009–e03018.
- [27] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Gene, 1994, 145(1): 69–73.

Construction of pSET_{sacB} plasmid and evaluation of *kdpE* gene knockout efficiency with and without markers in *Aeromonas dhakensis*

LING Bo³, CHEN Liqing¹, WANG Yu², YANG Nuo³, FAN Lixia³, GUO Guiying⁴,
LI Xuesong³, ZENG Jifeng¹, LI Qian⁵, ZHENG Jiping³

(1. School of Animal Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106; 3. School of Life Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 4. School of Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 5. Network and Technology Center, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In order to construct a novel gene-knockout plasmid, a novel plasmid pSET_{sacB} was constructed based on the plasmids pSET4s and pK18mobsacB by using PCR and cloning techniques. Then pK18mobsacB was used as control, the knockout efficiency of *kdpE* gene in *Aeromonas dhakensis* was evaluated via the newly constructed plasmid with or without *tet*^r marker. The results showed that there was no difference in the knockout efficiency between the two plasmids with *tet*^r marker, but the efficiency of scarless deletion by pSET_{sacB} was significantly higher than that of the control plasmid pK18mobsacB. pSET_{sacB} is a thermosensitive shuttle plasmid, and is hence expected to play a role in the genetic mechanism of Gram-positive and Gram-negative bacteria. This study also provides important mutant material for investigating the *kdpE* gene of *A. dhakensis*.

Keywords: pSET_{sacB}; *kdpE* gene; gene knockout