

获得四环素抗性的温敏同源重组载体质粒 pRNT15 的构建*

贾艳华, 孙 钊, 庞 义

(中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 苏云金芽孢杆菌工程菌株 TnX 对蚊幼虫具有高毒力, 但红霉素抗性基因的存在限制了其商品化。根据转座子 Tn917 载体的基因序列, 利用重叠延伸 PCR 法克隆同源重组序列到 pRN5101 上得到 pRN15, 根据 pBU4 载体上的四环素抗性基因序列, 对 pRN15 进行改造, 使其失去红霉素抗性, 获得四环素抗性, 载体命名为 pRNT15。重组载体四环素抗性的获得, 使之扩大了使用范围, 也为工程菌株染色体中红霉素抗性基因的敲除奠定了基础。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 重叠延伸 PCR; 抗性基因; 基因敲除

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 05-0081-05

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种分布极其广泛的革兰氏阳性细菌, 为芽孢杆菌属的一个种。2001 年, 本实验室利用 Tn917 转座子通过转座作用成功地将两个杀蚊蛋白基因整合到 Bt 染色体中, 构建了高效杀蚊幼虫 Bt 工程菌株 TnX^[1], 并获得授权专利^[2], TnX 中转座酶已失活, 因此工程菌具有遗传稳定性。TnX 对传染多种人类重要疾病的双翅目昆虫的幼虫 (孑孓) 具有高毒力, 对库蚊的 LC₅₀ 为 5.12 ng/mL, 比商品化的以色列亚种 4Q2 高 1.82 倍, 因此极具商品化潜力^[1]。但是工程菌株 TnX 在构建中同时获得了红霉素抗性, 此抗性基因的存在可能引发生物安全性问题, 因而限制了 TnX 的商品化和田间应用。

温敏载体 pRN5101 源于 pE194, 含有大肠杆菌和苏云金芽孢杆菌两个复制原点, 在大肠杆菌中为氨苄青霉素抗性, 在 Bt 中为红霉素抗性^[3]。1999 年, Servant 等人^[4]利用 pRN5101 获得 *cry* 基因在球状芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 中的体内重组; 2005 年, Rigoulay 等人^[5]利用这一载体以氯霉素为抗性选择压力成功地沉默了金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) RN4220 的 *htrA* 基因。

在此文中, 我们以温敏载体 pRN5101 为基础, 对 pRN5101 进行了改造, 使其丢失了红霉素抗性, 并获得了四环素抗性, 得到抗性基因敲除工具—载体 pRNT15, 为 Bt 工程菌株 TnX 中红霉素基因的敲除奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 苏云金芽孢杆菌菌株 TnX 为本实验构建的高效杀蚊工程菌株^[1]; 大肠杆菌 TG1 为本实验室保存菌株。

1.1.2 主要试剂 温敏穿梭载体 pRN5101^[3] 为中国农业科学院植物保护研究所生物技术组张杰研究员惠赠, 克隆载体质粒 pMD18-T、pBU4^[6] 为本实验室保存; 限制性内切酶等酶类、质粒快速提取纯化试剂盒, DNA 相对分子质量标准等分别购自 TaKaRa、Omega、天根生化科技公司。

1.2 方 法

1.2.1 同源重组片段的合成与克隆 根据转座子 Tn917^[7] 的基因序列设计两对特异引物 (P097F: 5'-3'GGATCCGTCCTCCGAGCGCCTACGAG; P839R1: 5'-3'GATTTTGCTACTTGCGGCCGCAATGCCCTTTACCTGTTCC; P1710F1: 5'-3'GTAAAGGGCATTGCGGCCGCAAGTACCAAAATCCGTTTCT; P2442R1: 5'-3'CAGCTGCGCTTTAAAATCCTCTTCTG)。其中 P839R1 和 P1710F1 之间互补碱基为 33 bps, 通过引物设计使 *erm* 基因缺失 870 bps, 并在引物 P097F 和 P2442R1 中分别引入 *Bam*HI 和 *Pvu*II 酶切位点。以 TnX 总 DNA 为模版, 分别以 P097F / P839R1 和 P1710F1 / P2442R1 为引物, 扩增 *erm* 的缺失突变盒 A 片段和 B 片段, 回收两种 PCR 产物并作为模

* 收稿日期: 2008-04-15

基金项目: 国家高技术发展计划 (863) 资助项目 (2001AA214011)

作者简介: 贾艳华 (1978 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 庞义; E-mail: pangy@mail.sysu.edu.cn

板, 以 P097F / P2442R1 为引物进行重叠 PCR, 获得完整的缺失突变盒 C。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。并从琼脂糖凝胶上切下含目的片段的电泳条带, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 操作按说明书进行。取 PCR 胶回收产物与 pMD18 - T 载体以 3:1 混合, 加入 LigationMix 5 μ L, 于 16 $^{\circ}$ C 反应过夜进行连接后, 即为重组质粒 pMD18 - T15。将得到的阳性重组质粒 pMD18 - T15 及质粒 pRN5101 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Pvu* II, 胶回收相应的目的片段, 进行连接反应, 转化大肠杆菌 TG1, 得到阳性转化子 pRN15。

1.2.2 四环素抗性基因的合成 根据 pBU4 的基因序列设计一对对引物 (PtetF: 5' - 3' CCG-GAGCTC TATTGTTGTATAAGTGATGA; PtetR: 5' - 3' CCATGCAT TTTAATGGAACAAAAAGATTTG)。以 pBU4 为模板进行 PCR 扩增, 产物连接 pMD18 - T 载体, 得到重组载体 pMD18 - Tet, 将得到的阳性重组质粒 pMD18 - Tet 及质粒 pRN15 用限制性内切酶 *Eco*T221 和 *Sac* I 双酶切, 胶回收相应的目的片段, 进行连接反应, 得到重组质粒 pRNT15, 质粒构建见图 1。方法同上。

1.2.3 重组质粒转化大肠杆菌 TG1 感受态宿主菌和苏云金芽孢杆菌感受态 采用 CaCl_2 法常规制备 TG1 感受态宿主菌, 方法参见文献[8]。苏云金芽孢杆菌电击感受态的制备方法参见 Chang 等[9]。将 200 μ L 感受态细胞与待转质粒混匀, 电击转化, 参数设置: 2.2 kV, 1 000 Ω , 25 μ f。加入 800 μ L LB 培养基 30 $^{\circ}$ C 培养 60 min, 取 200 μ L 涂含四环素的 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养[8]。以引物对 PgfF/Pgf-pR 为引物, PCR 方法验证阳性转化子。

1.2.4 重组质粒的筛选和鉴定 重组质粒 pMD18 - T15 转化 TG1 后, 从平板上随机挑选几个白色菌落, 接种于含 3 mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 以 200 r/min 振荡过夜。用质粒提取试剂盒提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Pvu* II 双酶切鉴定。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。重组质粒 pRN15、pRNT15 转化 TG1 后, 从平板上随机挑选几个菌落, 提取质粒, pRN15 用 *Bam*H I 和 *Pvu* II 双酶切, pRNT15 用 *Eco*T221、*Sac* I 双酶切, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 测序 将含目的基因片段的重组质粒寄上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

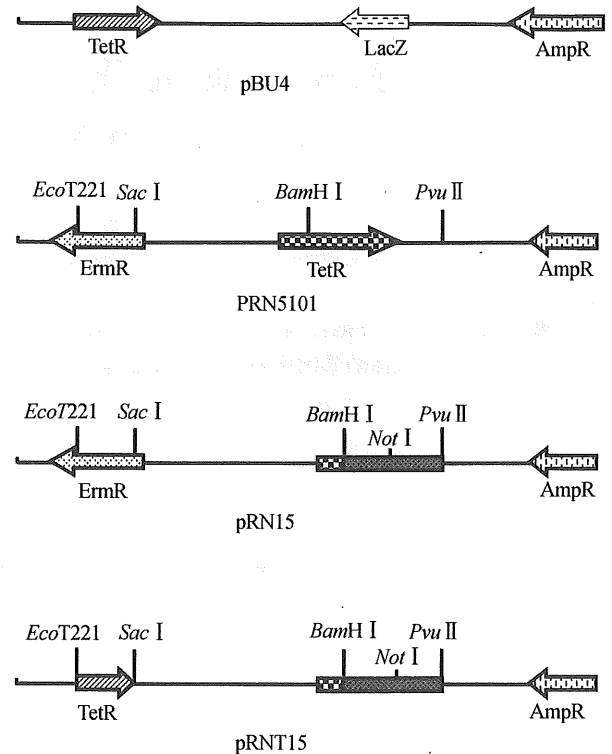


图 1 重组质粒 pRNT15 的构建图

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pRNT15

2 结果

2.1 同源重组片段的合成

以 TnX 总 DNA 为模版, 分别以 P097F / P839R1 和 P1710F1 / P2442R1 为引物, 扩增 *erm* 的缺失突变盒 A 片段和 B 片段, 回收两种 PCR 产物并作为模板, 以 P097F / P2442R1 为引物进行重叠 PCR, 获得完整的缺失突变盒 C。进行琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 得到约 1.5 kb 的 DNA 片段, 见图 2。

2.2 重组质粒的筛选和鉴定

将同源重组 PCR 扩增片段的凝胶回收产物, 与线性 pMD18 - T 载体连接。以连接产物转化 TG1 感受态菌, 从选择性培养基上挑选几个白色菌落, 采用质粒提取试剂盒提取质粒, 用 *Bam*H I、*Pvu* II 对重组质粒进行双酶切后琼脂糖电泳检测得到 1 条约 2.9 kb 的小片段和 1 条约 1.5 kb 的载体片段 (图 2)。分别用 *Bam*H I、*Pvu* II 酶切重组质粒 pMD18 - T15, 凝胶回收 1.5 kb 片段, 用 *Bam*H I、*Pvu* II 酶切质粒 pRN5101, 凝胶回收 6.4 kb 片段; 连接 1.5 kb 片段与 6.4 kb 片段, 得到 pRN15; 分别用 *Not*I 单酶切, *Bam*H I、*Pvu* II 双酶切 pRN15, 经电泳检测证实目的 DNA 片段已成功地克隆入 pRN5101 载体中 (图 3)。将四环素抗性基因的

PCR 产物 2.0 kb 片段连接到 pMD18 - T, 得到 pMD18 - Tet, 用 *Eco*T221, *Sac* I 双酶切 pMD18 - Tet, 凝胶回收 2.0 kb 片段, 用 *Eco*T221, *Sac* I 双酶切 pRN15, 凝胶回收得到 7.0 kb 片段连接 2.0 kb 片段与 7.0 kb 片段, 得到 pRNT15,

用 *Eco*T221, *Sac* I 双酶切 pRNT15, 证实目的 DNA 片段已成功地克隆入 pRN15 载体中 (图 4)。

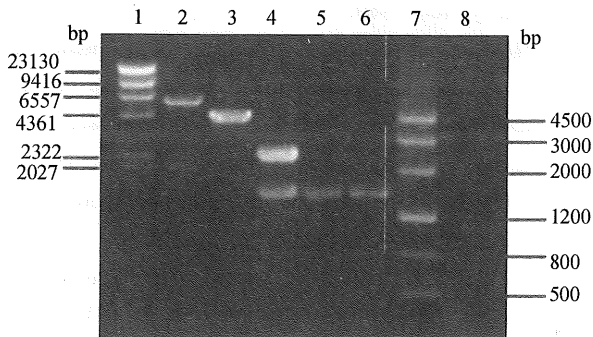


图 2 质粒 pRN5101 和重组质粒 pMD18 - T15 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of plasmid pRN5101 and recombinant plasmid pMD18 - T15

- 1: Marker/ λ DNA/*Hind* III; 2: pRN5101/*Bam*HI, *Pvu* II;
3: pMD18 - T15/*Not* I; 4: pMD18 - T15/*Bam*HI, *Pvu* II;
5: PCR - 1, 5 kb; 6: Positive CK of PCR - 1, 5 kb;
7: Marker III; 8: Negative CK of PCR Product

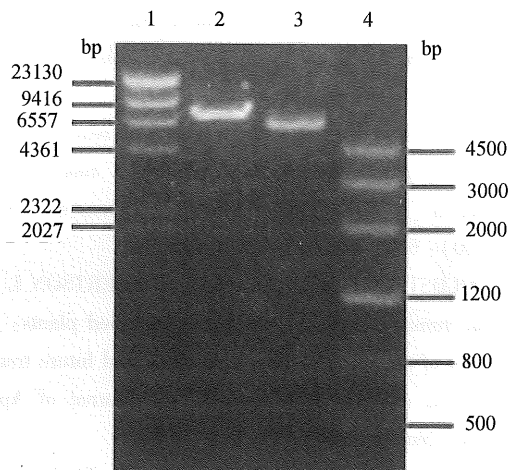


图 3 pRN15 酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of plasmid pRN15

- 1: Marker/ λ DNA/*Hind* III; 2: pRN15/*Not* I;
3: pRN15/*Bam*HI, *Pvu* II; 4: Marker III

2.3 重组质粒的序列分析

测序结果表明, 重组质粒 pRN15 中插入片段的序列, 与预期的基因编码序列同源性达 99%, 重组质粒 pRNT15 中插入片段的序列, 与预期的基因编码序列同源性达 100%。

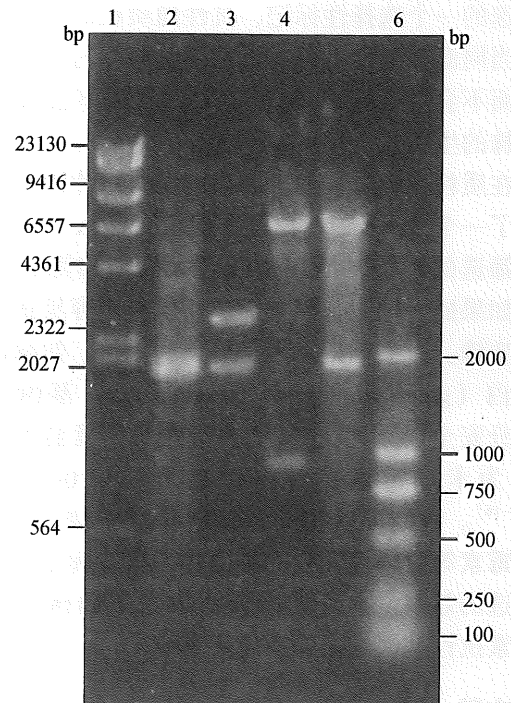


图 4 *tet* 基因酶切鉴定

Fig. 4 Restriction analysis of *tet* gene

- 1: Marker/ λ DNA/*Hind* III; 2: *tet*/PCR;
3: pMD18 - Tet; 4: pRN15/*Eco*T221, *Sac* I;
5: pRNT15/*Eco*T221, *Sac* I; 6: Marker/ DL2 000

2.4 抗性筛选

在 10 μ g/mL 的 Tet 浓度下转化 pRNT15 的大肠杆菌 TG1 和 *Bt* 均可生长, 表明 Tet 抗性基因得到了表达。

3 讨论

评价重组微生物的环境生态安全性有很多的内容, 其中重要的一项就是抗性基因水平转移^[10]。转基因生物中使用的抗性标记基因, 如果进入人体, 可能使人体对某类抗生素产生耐药性。有些影响还需要经过很长时间才能表现和监测出来。若抗性标记基因转移至致病性微生物中, 可能会引发更大的麻烦。

考虑高效杀蚊工程菌株 TnX 有潜在的应用前景, 因此, 我们要达到的目的不仅仅是抗生素抗性基因的沉默, 而是消除或降低红霉素抗性基因在自然环境中水平转移的危险性, 最好的解决方法就是破坏它的 ORF 或使其从染色体上消失, 基因敲除应该是一种比较可靠的方法。为此我们构建了基因敲除质粒 pRNT15。在构建载体的过程中, 重组载体获得了四环素抗性, 这一特点不但扩大了温敏穿梭载体的使用范围, 同时也有利于在 TnX 中转化的抗性筛选。不过这一抗性只是作为质粒载体的转

化筛选的一个选择性标记,抗性随质粒的存在而存在,当同源重组发生时,抗性随着载体的自杀而丢失,而不会整合到 Bt 染色体中,因而不会影响工程菌株的生物安全性。

在质粒构建过程中,两段同源重组片段相连处增加了一个 Not I 酶切位点,但没有插入可供同源重组筛选的标记基因,这样会大大增加筛选工作量,如果插入标记基因来筛选,就有望容易获得目的突变株。有些标记基因是可以利用的,如绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, *gfp*) 基因对环境十分安全^[11],经过多年的研究及环境监测,欧盟认为卡那霉素抗性基因在环境中也是安全的^[12-16]。我们可以在同源重组片段中插入 *gfp* 或卡那霉素等对环境安全的基因作为筛选标记,以提高筛选的效率。本研究结果为 Bt 工程菌株 TnX 中红霉素抗性基因的敲除奠定了基础。

参考文献:

- [1] YU J, PANG Y, TANG M, et al. Highly toxic and broad-spectrum insecticidal *Bacillus thuringiensis* engineered by using the transposon Tn917 and protoplast fusion [J]. *Current Microbiology*, 2001, 43(2): 112-119.
- [2] 庞义, 余健秀, 邓日强, 等. 苏云金杆菌杀虫工程菌及其构建方法. 中国发明专利 [P]. CN: ZL 98 1 22231. 5, 2003.
PANG Yi, YU Jianxiu, DENG Riqiang, et al. Engineered insecticidal *Bacillus thuringiensis* and its construction methods. Invented patent of China [P]. CN: ZL 98 1 22231. 5, 2003.
- [3] VILLAFANE R, BECHHOFFER D H, NARAYANAN C S, et al. Replication control genes of plasmid pE194 [J]. *The Journal of Bacteriology*, 1987, 169: 4822-4829.
- [4] SERVANT P, ROSSO M L, HAMON S, et al. Production of Cry11A and Cry11Ba toxins in *Bacillus sphaericus* confers toxicity towards *Aedes aegypti* and resistant *Culex* populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(7): 3021-3026.
- [5] RIGOULAY C, ENTENZA J M, HALPERN D, et al. Comparative analysis of the roles of HtrA-like surface proteases in two virulent *Staphylococcus aureus* strains [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(1): 563-572.
- [6] PALVA A, VIGREN G, SIMONEN M et al. Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pBC16 from *Bacillus cereus* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(6): 1635.
- [7] SHAW J H, CLEWELL D B. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin fl-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis* [J]. *The Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 782-796.
- [8] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] CHANG C, DAI S M, FRUTOS R, et al. Properties of a 72-kilodalton mosquitocidal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 expressed in *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* by using the shuttle vector pHT3101 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 507-512.
- [10] DAVISON J. Genetic exchange between bacteria in the environment [J]. *Plasmid*, 1999, 42: 73-91.
- [11] OLOFSSON A C, ZITA A, HEMANSSON M. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology* [J]. 1998, 144(Pt2): 519-528.
- [12] STEWART C N Jr, RICHARDS H A 4th, HALFHILL M D. Transgenic plants and biosafety: science, misconceptions and public perceptions [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(4): 838-843.
- [13] European Food Safety Authority. Statement of the scientific panel on genetically modified organisms on the safe use of the *npt II* antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants [R]. 2007.
- [14] GAY P B, GILLESPIE S H. Antibiotic resistance markers in genetically modified plants: a risk to human health [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2005, 5(10): 637-646.
- [15] GOLDSTEIN D A, TINLAND B, GILBERTSON L A, et al. Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(1): 7-23.
- [16] VRIES J, MEIER P, WACLEMAGEL W. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195(2): 211-215.

Construction of Temperature Sensitivity Recombinant Plasmid pRNT15 with Tetracycline Resistance Gene

JIA Yan-hua, SUN Fan, PANG Yi

(State Key Laboratory of Biocontrol and Institute of Entomology,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The engineered strain *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) TnX, which has high virulence to mosquito larvae, was confined in commercial application due to the existence of erythromycin gene in its chromosome. Plasmid pRN15 was constructed by ligating a homologous recombination sequence, primers of which were synthesized according to the sequence of transposon Tn917, to plasmid pRN5101 by means of overlap polymerase chain reaction (PCR). According to the sequence of plasmid pBU4, a tetracycline resistance gene sequence was synthesized and ligated to pRN15, with the previous erythromycin gene deleted at the meantime, constructing a recombinant plasmid pRNT15 by PCR. The characteristic of tetracycline resistance expanded the application of pRNT15. The recombinant plasmid was significant for its expanding use in genetic engineering, such as for knocking out the erythromycin resistance gene from the chromosome of engineered strain Bt Tnx.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; overlap PCR; resistance gene; knock out