

基因敲除技术在芽胞杆菌中的应用研究

肖水华^{1,2}, 洪钦阳^{1,3}, 林燕珍^{1,2}, 李今煜^{1,2*}

1. 福建农林大学教育部生物农药与化学生物学重点实验室, 福州 350002;

2. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002;

3. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002

摘 要: 芽胞杆菌作为益生菌的一种, 在工业、农业、食品及医疗等领域都有着重要的应用价值。基因敲除技术是研究基因功能的重要手段, 利用该技术进行分子生物学研究有利于加深对芽胞杆菌生物防治作用机理和调控机制的认识。本文综述了利用同源重组和随机插入突变两种基因敲除方式进行基因敲除的原理、特点及在芽胞杆菌中研究应用现状。最后探讨了该技术存在的局限性, 并提出展望。

关键词: 芽胞杆菌; 基因敲除; 同源重组; 插入突变

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2013.02.01

Research and Application of Gene Knockout Technology in *Bacillus*

XIAO Shui-hua^{1,2}, HONG Qin-yang^{1,3}, LIN Yan-zhen^{1,2}, LI Jin-yu^{1,2*}

1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: As a kind of probiotics, *Bacillus* was widely used in industrial, agriculture, medical treatment and public health fields. Gene knockout technology is an important mean for gene function research which is conducive to understand the biological control and regulation mechanisms in *Bacillus*. This paper reviews the principles and characteristics of two kinds of gene knockout technology methods which are homologous recombination and insertion mutation, and their application advance in *Bacillus*, discusses the limitation of gene knockout technology, finally prospects the research and development in the future.

Key words: *Bacillus*; gene knockout; homologous recombination; insertion mutation

芽胞杆菌 (*Bacillus*) 是一类需氧或兼性厌氧的革兰氏阳性细菌 (G^+), 在一定条件下能产生抗逆性内生孢子, 种类多样, 包括非致病性的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*)、短小芽胞杆菌 (*B. pumilus*)、环状芽胞杆菌 (*B. circulans*)、多粘类芽胞杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 及对人 and 动物有致病性的炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 及可引起食物中毒的蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*) 等近 50 种^[1]。它在自然界中分布广、多样性丰富, 具有抗逆性强、耐高温高压、易贮存等生物特性, 广泛应用于工业、农业、食

品、医药和饲料等行业。已有大量研究表明芽胞杆菌能够产生许多重要的生物活性物质, 可以抑制多种植物病原菌, 是重要的植物病害生防微生物; 利用芽胞杆菌制成的微生态饲料添加剂具有提高动物生产性能、增加饲料利用率、促进机体免疫、抗菌防病及促进动物胃肠道微生态平衡等功效, 在动物生产应用中潜力巨大^[2~4]。

分子克隆技术日渐成熟, 芽胞杆菌的研究也进入到分子水平。通过研究完整基因组信息, 开发和利用芽胞杆菌重要的功能基因, 可以加深对生防芽胞杆菌的防病机理、重要代谢和调控机制

收稿日期: 2013-02-20; 接受日期: 2013-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31041745); 国家 863 计划项目 (2011AA10A203); 福建省高校服务海西建设重点项目 (0108b005) 资助。

作者简介: 肖水华, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: xiaosh1989@163.com。* 通讯作者: 李今煜, 讲师, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: lijinyuli@163.com

的认识。基因敲除(gene knockout)是一种反向的遗传学研究方法,通过一定途径从分子水平上将机体特定的基因失活或者缺失,对比表观性状的变化,可以对该基因的功能有所了解,该方法在生物学、医学等许多研究领域都具有极其重要的理论意义和实践意义^[5]。在芽胞杆菌中,实现基因敲除主要有两种方式:一是利用同源重组进行基因敲除,二是利用随机插入突变进行基因敲除。本文详细介绍了这两种基因敲除技术的原理、特点及研究应用现状,探讨其存在的缺陷和不足,并对其未来的研究与应用提出展望。

1 利用同源重组进行基因敲除

基因的同源重组(homologous recombination),又叫基因打靶(gene targeting),是指外源 DNA 与受体细胞染色体 DNA 上的同源序列之间发生重组,并整合至受体细胞基因组中得以表达,从而改变了细胞某些遗传特性的方法^[6]。利用同源重组进行基因敲除能够精确地定点修饰和改造 DNA 片段,既可以用正常基因敲除突变的基因,以进行性状的改良和遗传病的治疗,又可以用突变的基因敲除正常的基因,以研究此基因在发育和调控方面的作用^[7]。

目前,利用同源重组法已成功应用于多种芽胞杆菌基因缺失突变株的构建。余志强等^[8]应用同源重组法构建了枯草芽胞杆菌 *spoOA* 基因缺失突变株,发现该基因缺失后,枯草芽胞杆菌完全丧失了生成孢子的能力,证明 SpoOA 是孢子形成早期因子之一。彭其安等^[9]构建了枯草芽胞杆菌转酮酶(*tkl*)缺失突变株,为 D-核糖工程菌的研究奠定了基础。刘杰等^[10]从枯草芽胞杆菌 224 的基因组 DNA 中扩增出溶血样基因 *yugS* 的上下游片段,并利用携带新霉素抗性基因(*neo^r*)的重组质粒 pMD18-T-*neo* 作为骨架,构建了基因阻断质粒 pMD18-T-*neo-yugS*。通过电击转化、抗性筛选后获得 *yugS* 缺失突变株,为完善 BS224 菌株在医学上的应用提供新的思路。余贤美等^[11]在同源重组法构建枯草芽胞杆菌 *dhbC* 基因缺失突变株和回复株的研究中,不仅验证了 *dhbC* 基因与枯草芽胞杆菌 CAS15 嗜铁素的产生密切相关,而且进一步证实该方法用于芽胞杆菌基因敲除可行性。为提高枯草芽胞杆菌核黄素的产量,张西锋

等^[12]以 *B. subtilis* GJ06 的 *guaC* 基因为同源重组指导序列,构建整合表达载体 pGT9GH,利用双交叉同源重组的方法将线性化的载体表达整合到受体菌的染色体上,并且加入一个拷贝的核黄素操纵子,获得 *guaC* 基因的缺失突变株。实验结果表明该突变株的核黄素产量提高了 24.5%。同时该作者为提高葡萄糖激酶的表达,在葡萄糖酸操纵子 *gntR* 和 *gntK* 基因之间引入强启动子 PB14,构建整合表达载体 pRKS-14,通过同源重组诱导基因敲除获得葡萄糖激酶高表达的突变株,为进一步提高核黄素的产量提供原料保障^[13]。

已有多个芽胞杆菌的基因敲除实验利用 pRN5101 质粒构建基因敲除载体,成功获得基因敲除突变株。温敏载体 pRN5101 源于 pE194,含有大肠杆菌和苏云金芽胞杆菌两个复制原点,在大肠杆菌中为氨苄青霉素抗性,在苏云金芽胞杆菌中为红霉素抗性^[14]。1999 年, Servant 等^[15]最早利用 pRN5101 获得 *cry* 基因在球状芽胞杆菌中的体内重组;2004 年, Espinasse 等^[16,17]利用 pRN5101 质粒构建的载体在苏云金芽胞杆菌中成功获得 *berAB*、*sigW*、*ecfX* 和 *ecfY* 等基因缺失突变株;2007 年,孙长坡等^[18]通过基因重组方法,利用温敏穿梭载体 pRN5101 敲除了苏云金芽胞杆菌 G03 菌株中的 *spoIVF* 操纵子,获得了相应的缺失突变株。诸多学者利用同源重组基因敲除技术对苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 Bt HD-73 等菌株进行特殊功能基因的敲除,对于明确 Bt 晶体形成机制以及芽胞与晶体之间的关系提供了一定的借鉴依据^[19,20]。另外,为实现改造抗生素糖基的目的,有研究利用基因敲除技术使糖基转移酶 EryC III 失活,构建了红色糖多胞菌 A226- Δ eryC III 突变体,为下一步改造红霉素糖基、合成新型红霉素类似物打下基础^[21]。

2 利用随机插入突变进行基因敲除

插入突变是指利用某些能够随机插入宿主细胞染色体的基因序列(如转座子、T-DNA 等),在目标细胞基因组中进行插入突变,构建基因突变体库,通过相应标记或已知的序列标签进行侧翼序列分析,获得相应的基因敲除细胞。获得突变体后,可以进行功能基因组学的研究。构建饱和的基因突变体库是一种直接、有效的分析鉴定基

因功能的方法。

转座子随机诱变技术操作简便且作用直接,现已发展成为一种强有力的遗传分析工具,可用于微生物基因功能的确定、菌株鉴别及群体的多样性分析等许多研究^[22]。在芽胞杆菌突变库的构建研究中,早期主要利用人工 Mu 转座复合物、Tn917 转座子以及 mini-Tn10 转座插入等方法。2006 年,郝建安等^[23]利用人工 Mu 转座技术研究解淀粉酶芽胞杆菌的功能基因,通过对解淀粉芽胞杆菌 Mu 转座突变子进行表型筛选、克隆和测序后发现了 2 个新的抑真菌作用调节基因。同时也对地衣芽胞杆菌进行了 Mu 转座突变的研究,成功获得了突变子。在 G⁺ 菌的分子遗传研究中通常利用 pTV1、pTV1Ts 等温度敏感型质粒,这类质粒上带有红霉素抗性基因的 Tn917 转座子,可以进行插入突变^[24]。齐勇等^[25]建立了携带转座子 Tn917 的质粒 pTV1 对野生型巨大芽胞杆菌 B1301 菌株的转化体系与转座子突变技术,获得 1 000 多个转座插入突变子。抑菌试验结果表明转座子 Tn917 插入到 B1301 基因组中,不仅改变了分泌细胞分裂素基因功能,同时也抑制了该菌抑菌基因功能,使得突变子的抑菌效果降低。高卫华等^[26]则利用 mini-Tn10 转座系统研究野生型解淀粉芽胞杆菌生物被膜形成相关基因。研究中用到的转座质粒 pIC333 具有壮观霉素抗性基因、红霉素抗性基因、ColE1 复制起点、一个能在芽胞杆菌中复制的温度敏感型复制子,以及来自于鼠伤寒沙门氏菌 mini-Tn10 转座子,是针对芽胞杆菌而构建的转座插入载体,非常利于突变子的筛选以及插入基因的鉴定^[27]。

Tn5 转座子及其衍生载体是应用非常广泛的插入突变系统之一。Tn5 转座子结构较为简单,属于非复制型转座子,转座机理已阐明。Tn5 的转座通常用于 G⁻ 菌,特备是大肠杆菌的研究中,现在也在芽胞杆菌等 G⁺ 菌中成功应用,有助于芽胞杆菌的新基因挖掘、基因功能研究和突变体库构建等研究。胡晓璐等^[28,29]为分离短小芽胞杆菌 DX01 菌株中稻瘟病拮抗物质及相关基因,利用 Tn5 转座子插入突变获得大量突变株,自 2 633 个突变株中筛选出 6 株抑制稻瘟病菌活性显著变化的突变株。

Mariner 转座元件,简称 MELs,是 Mariner/Tc1 超家族 II 型转座元件中分布最广、种类最多

的超家族之一,宿主具有广泛性和多样化的特征。Himar1 转座元件属于 Mariner 家族转座子,常用于细菌诱变,基于此所构建的穿梭载体 pMarA 携带有 TnYLB 转座子,已成功应用于芽胞杆菌基因功能研究中^[30~32]。马欣等^[32]利用 Himar1 转座诱变体系构建了枯草芽胞杆菌 OKB105 菌株的突变体文库,为克隆该菌株的生防基因奠定了基础。彭玲^[33]也利用该转座系统建立了植物内生防蜡样芽胞杆菌 0-9 菌株的突变体库,并对突变体库进行了表型评价。

3 展望

芽胞杆菌是一个多样性十分丰富的微生物类群,分布广泛,是重要的生物防治微生物,在植物病害综合治理中有重要作用。近年来,芽胞杆菌的生理生态、生防机理等方面一直是国内外研究的热点。而对生防微生物的研究已不再局限于寻找发现新的生防菌株,而是通过构建生防菌突变体库或者生防工程菌等手段,筛选生防相关基因,探索生防机制,提高生防效果。

当前利用同源重组进行芽胞杆菌基因敲除已成为主流,同源重组的目的性强,重组过程具有高度特异性和保守性。而利用随机插入突变诱导基因敲除的方法随机性强,筛选过程繁琐,通常用于构建突变体库。除此之外,还有其他机理的基因敲除技术正在不断发掘和完善,如基于 RNAi 的基因敲除技术等。随着对基因组的认识不断深入,我们也认识到基因敲除技术还具有一些局限性。基因敲除技术不适用于对生命必需基因和功能冗余基因的研究,敲除这类基因可能会导致无法获得突变体,或者突变体没有明显表型变化,因此必须采用其他分子生物学手段进行研究。基因敲除技术是遗传工程的重大飞跃,已经在疾病机理、医疗、动植物、微生物等基因功能的研究中体现出强有力的作用,随着分子生物学理论的发展,新基因敲除原理也在不断发现和发掘中,无论是在基础理论还是在实际应用中都将有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 李媛媛,关树文,安伟,等. 分子生物技术在芽胞杆菌快速鉴定的应用研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22

- (2):412-416.
- [2] 鲍振国,张文举,胡猛,等.芽胞杆菌的研究进展及其在动物生产中的应用[J].动物营养,2012,1:17-20.
 - [3] 齐爱勇,赵绪生,刘大群.芽胞杆菌生物防治植物病害研究现状[J].中国农学通报,2011,27(12):277-280.
 - [4] 施伟达,章文敏,周冬仁,等.芽胞杆菌研究进展及其在水产养殖中的应用[J].动物科学,2012,2:310-312.
 - [5] 黄敏.基因敲除技术及应用[J].广东轻工职业技术学院学报,2009,8(4):11-14.
 - [6] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science,1989,224(4910):1288-1292.
 - [7] 谢承佳,何冰芳,李霜.基因敲除技术及其在微生物代谢工程方面的应用[J].生物加工过程,2007,5(3):10-14.
 - [8] 余志强,杨明明,杨朝霞,等.同源重组法构建枯草杆菌 *spoOA* 基因缺失突变株[J].武汉大学学报(理学版),2004,50(2):229-233.
 - [9] 彭其安,张西峰,吴思方,等.同源重组法构建枯草芽胞杆菌转酮酶缺失突变菌株[J].生物技术,2006,16(6):23-26.
 - [10] 刘杰,房春红,李琬,等.同源重组法构建枯草芽胞杆菌 224 *yugS* 基因缺失突变株[J].生物技术通报,2007,4:148-151.
 - [11] 余贤美,林超,杨芬,等.同源重组法构建枯草芽胞杆菌 *dhbC* 基因缺失突变株和回复株[J].热带作物学报,2009,30(10):1517-1521.
 - [12] 张西峰,李万芬.枯草芽胞杆菌 GMP 还原酶基因(*guaC*)突变株的构建[J].安徽农业科学,2011,39(5):2556-2558.
 - [13] 张西峰,王丽梅,李万芬.枯草芽胞杆菌葡萄糖酸操纵子突变株的构建[J].江苏农业科学,2012,40(1):50-51.
 - [14] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(11):6887-6891.
 - [15] 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* population [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(7):3021-3026.
 - [16] Espinasse S, Gohar M, Lereclus D, et al.. An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling β -exotoxin I production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 407-1 [J]. J. Bacteriol., 2004, 186(10):3108-3116.
 - [17] Espinasse S, Gohar M, Lereclus D, et al.. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β -exotoxin I production [J]. J. Bacteriol., 2004, 184(21):5848-5854.
 - [18] 孙长坡,宋福平,张杰,等.苏云金芽胞杆菌 G03spoIVF 操纵子对芽胞和晶体形成的影响[J].微生物学报,2007,47(4):583-587.
 - [19] Zhu L, Peng Q, Song F, et al.. Structure and regulation of the *gab* gene cluster, involved in the γ -aminobutyric acid shunt, are controlled by a σ^{54} factor in *Bacillus thuringiensis* [J]. J. Bacteriol., 2010, 192(1):346-355.
 - [20] Groulx N, McGuire H, Laprade R, et al.. Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization [J]. J. Biol. Chem., 2011, 286(49):42274-42282.
 - [21] 许晓娟,黄训瑞,赵玮,等.红色糖多孢菌 A226- Δ eryC III 突变体的构建及产物分析[J].军事医学科学院院刊,2010,34(3):247-250.
 - [22] McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1950(36):344-55.
 - [23] 郝建安,曹志辉,徐海津,等.利用人工 Mu 转座技术研究解淀粉芽胞杆菌的功能基因[J].生物技术通讯,2006,17(3):311-313.
 - [24] Hartley R W, Paddon C J. Use of plasmid pTV1 in transposon mutagenesis and gene cloning in *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Plasmid, 1986, 16:45-51.
 - [25] 齐勇,黄玉杰,李茹美,等.巨大芽胞杆菌 *Bacillus megaterium* 1301 的转座诱变[J].山东农业大学学报(自然科学版),2008,39(3):407-412.
 - [26] 高卫华,郝建安,夏思源,等.利用 mini-Tn10 转座系统研究芽胞杆菌生物被膜形成相关基因[J].微生物学通报,2009,36(3):345-349.
 - [27] Steinmetz M, Richter R. Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome [J]. J. Bacteriol., 1994, 176(6):1761-1763.
 - [28] 胡晓璐,沈新迁,傅科鹤,等.短小芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus*) DX01 转座突变株的构建及转化体系的优化[J].上海交通大学学报(农业科学版),2011,29(1):68-74.
 - [29] 胡晓璐,陈云鹏,沈新迁,等.短小芽胞杆菌 DX01 菌株 Tn5 转座突变株的抑菌活性筛选体系的建立[J].植物保护学报,2012,5:406-410.
 - [30] LeBreton Y, Mohapatra N P, Haldenwan W G. In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, an aminocyclitol-based transposon [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72(1):327-333.
 - [30] Patrick J E, Kearns D B. Min J (YjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis* [J]. Mol. Microbiol., 2008, 70(5):1166-1179.
 - [31] Schirner K, Errington J. The cell wall regulator δ^1 specifically suppresses the lethal phenotype of *mbl* mutants in *Bacillus subtilis* [J]. J. Bacteriol., 2009, 191(5):1404-1413.
 - [32] 马欣,刘俊,乔俊卿,等.利用转座子 TnYLB-1 构建枯草芽胞杆菌的突变体文库[J].南京农业大学学报,2011,34(6):77-81.
 - [33] 彭玲.植物内生防蜡芽孢杆菌 0-9 菌株转座子插入突变体库的建立及评价[D].河南开封:河南大学,硕士学位论文,2011.