

# 大肠杆菌 *Targetron* 基因打靶载体构建及应用\*

黄瑾<sup>1,2</sup>, 陈相好<sup>1,3</sup>, 吴晓娟<sup>1,2</sup>, 张峥嵘<sup>1,2</sup>, 谷俊莹<sup>3</sup>, 陈峥宏<sup>1,2\*\*</sup>, 崔古贞<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 构建基于细菌 II 型内含子的 *Targetron* 基因打靶载体, 并在大肠杆菌中验证其功能。方法: 以构建的 pSY7 载体为基础、以大肠杆菌 *lacZ* 基因为例, 选择 *lacZ*-1683a 和 *lacZ*-1874s 位点为靶位点, 利用在线设计软件设计打靶引物, 通过重叠延伸 PCR 方法获得特异性打靶序列, 并将其克隆到 pSY7 载体, 获得 pSY7-*lacZ*-1683a 和 pSY7-*lacZ*-1874s 打靶载体, 转化大肠杆菌后利用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导插入型内含子的表达, 最后利用菌落 PCR 和蓝白斑计数法验证其功能及打靶效率。结果: 成功构建了 pSY7-*lacZ*-1683a 和 pSY7-*lacZ*-1874s 两种 *Targetron* 打靶载体, 通过 0.5 mmol/L IPTG 诱导 45 min 后, 菌落 PCR 显示 II 型内含子能特异性插入到 *lacZ*-1683a、*lacZ*-1874s 位点, 蓝白斑计数显示 *lacZ*-1683a 位点的打靶效率为  $(14.299 \pm 1.271)\%$ , *lacZ*-1874s 位点的打靶效率为  $(9.217 \pm 1.024)\%$ 。结论: 构建的 *Targetron* 打靶载体能够特异性的插入大肠杆菌染色体靶位点。

**[关键词]** II 型内含子; 打靶载体; 大肠杆菌; 重叠延伸 PCR; *Targetron* 基因

**[中图分类号]** R378.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0745-06

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.001

## Construction and Application of *E. coli Targetron* Gene Targeting Vectors

HUANG Jin<sup>1,2</sup>, CHEN Xianghao<sup>1,3</sup>, WU Xiaojuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhengrong<sup>1,2</sup>,  
GU Junying<sup>3</sup>, CHEN Zhenghong<sup>1,2</sup>, CUI Guzhen<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Pathogen Biology of Higher Learning of Guizhou, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct *Targetron* targeting vector based on bacteria group II and verify its function in *E. coli*. **Methods:** Based on the constructed pSY7 vector and taking *lacZ* gene of *E. coli* as an example, *lacZ*-1683a and *lacZ*-1874s loci were selected as target sites. Targeting primers were designed by on-line design software. Specific targeting sequences were obtained by overlapping extended PCR and then cloned into pSY7 vectors. The pSY7-*lacZ*-1683a and pSY7-*lacZ*-1874s targeting vectors were obtained and transformed into *E. coli*. IPTG was used to induce the expression of insertional group II introns. Finally, colony PCR and blue-white spot counting were used to verify the function and targeting efficiency. **Results:** Two *Targetron* vectors, pSY7-*lacZ*-1683a and pSY7-*lacZ*-1874s, were successfully constructed. After 45 minutes of induction by 0.5 mmol/L IPTG, colony PCR showed that Group II intron could be specifically inserted into *lacZ*-1683a and *lacZ*-1874s sites. The targeting efficiency of *lacZ*-1683a site was  $(14.299 \pm 1.271)\%$  and that of *lacZ*-1874s site was  $(9.217 \pm 1.024)\%$ .

\*[基金项目] 国家自然科学基金(31760318,31500078,31560318,31601012); 贵州省科技计划项目[黔科合基础(2018)1132]; 贵州省研究生科研基金立项项目(11348)

\*\*通信作者 E-mail: cuiguzhen@hotmail.com; chengzhenghong@gmc.edu.cn

网络出版时间:2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0039.001.html>

1.024) % . **Conclusion:** Targetron vectors constructed in this paper can specifically insert into the target site in *E. coli*.

[ **Key words** ] group II introns; *Targetron*; targeting vector; *Escherichia coli*; overlapping extension PCR

Ⅱ型内含子(group II introns)是一类具有自我剪接功能、可在染色体不同位置移动的反转录转座子,广泛存在于细菌、古细菌和植物的细胞器基因组中<sup>[1-2]</sup>。来源于乳酸乳球菌(*lactococcus lactis*)的 Ll. LtrB 内含子由内含子 RNA 和内含子编码蛋白(intron-encoded protein, IEP)两部分组成,其中内含子编码蛋白 IEP 由反转录结构域、成熟酶结构域、DNA 结合域和核酸内切酶结构域等多个功能结构域组成<sup>[2-6]</sup>。Ⅱ型内含子发挥功能时,IEP 蛋白利用其核酸内切酶活性切割靶位点,并通过其自身携带的反转录活性将内含子 RNA 以 cDNA 的形式插入到靶位点,最后细胞通过修复机制再以 cDNA 为模板合成互补 DNA,从而将内含子 RNA 以 DNA 的形式插入到 DNA 靶位点<sup>[6-8]</sup>。基于Ⅱ型内含子的这种迁移特性开发出的 *Targetron* 基因打靶技术被广泛应用于多个物种的基因失活<sup>[8-19]</sup>。本研究以课题组前期建立诱导型 *targetron* 质粒为基础,选择大肠杆菌 *lacZ*-1683a 和 *lacZ*-1874s 为靶位点,构建了两种 *Targetron* 打靶载体,经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后验证其功能及其效率,

为下一步对Ⅱ型内含子的移动机制研究及应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 DNA Marker 购自北京全式金公司, TRYPTONE、YEAST EXTRACT 购自美国 OXID 公司,琼脂糖、Agar Powder、氨苄青霉素、X-gal 以及 IPTG 购自索莱宝公司,限制性内切酶 *Xho*I 和 *Bsr*GI 购自赛默飞公司,菌落 PCR 所使用的 2 × Taq Master Mix 购自诺唯赞公司,DNA 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒以及质粒提取试剂盒购自天根公司。

1.1.2 菌株的培养 菌株均用 LB 液体培养基(1% Tryptone,0.5% Yeast Extract,1% NaCl)37℃进行培养,必要时加入 1.5% Agar Powder 配制成 LB 固体培养基,采用 100 mg/L 氨苄青霉素,蓝白斑筛选时加入 40 mg/L X-gal 和 0.1 mmol/L IPTG。

1.1.3 菌株及质粒 所用的菌株及质粒见表 1。

表 1 所用菌株及质粒的特征和来源  
Tab.1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	特征	来源
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	Clone strain, F <sup>-</sup> <i>lacZ</i> ΔM15Δ ( <i>lacZ</i> YA-argF) relA1	Takara
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS ( rBB-mB), gal, dem ( DE3)	Takara
BL21-pSY7-lacZ-1683a	Derived from BL21(DE3), carrying plasmid pSY7-lacZ-1683a	This study
BL21-pSY7-lacZ-1874s	Derived from BL21(DE3), carrying plasmid pSY7-lacZ-1874s	This study
Plasmids		
pSY7	Derived from pSY6, <i>lacI</i> , T7 promoter, Amp <sup>r</sup>	This lab <sup>(1)</sup>
pSY7-lacZ-1683a	Derived from pSY7, targeting the antisense strand 1683 site of <i>lacZ</i> in BL21(DE3)	This study
pSY7-lacZ-1874s	Derived from pSY7, targeting the sense strand 1874 site of <i>lacZ</i> in BL21(DE3)	This study

注:<sup>(1)</sup>表示该质粒已在生物技术通报中使用(《生物技术通报》2019 年 35 卷 6 期,已录用、待发表)

1.1.4 引物 引物合成由上海生工合成,详细序列信息见表 2。

1.2 方法

1.2.1 打靶引物设计 将大肠杆菌 BL21(DE3)的 *lacZ* 全基因序列输入到在线网址(www.clostron.com),根据评分高低,选择 *lacZ* 基因反义

链第 1 683 位点(*lacZ*-1683a)及正义链第 1 874 位点(*lacZ*-1874s)作为打靶位点,在线设计程序会给出相应位点的打靶引物序列,每个位点会给出 4 种引物 ( *lacZ*-1683a-IBS、*lacZ*-1683a-EBS1d、*lacZ*-1683a-EBS2 以及 EBS Universal),详细引物序列见表 2。

表 2 引物序列及描述  
Tab.2 Primers used in this study

引物	序列( 5'→3')	描述
EBS Universal	CGAAATTAGAAACTTGCGTTCAGTAAAC	打靶序列通用引物
lacZ-1683a-IBS	GCAAAACTCGAGATAATTATCCTTAGCCCTCTAAACGGTGCGCCCA GATAGGGTG	lacZ-1683a 打靶引物
lacZ-1683a-EBS1d	CCAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTAAACGGGTAAC TTACCTTTCCTTTGT	
lacZ-1683a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTAGGGCTCGATAGAGGAAAGTGCT	
lacZ-1874s-IBS	GCAAAACTCGAGATAATTATCCTTAAAAACCCCAGCAGTGCGCCCCAG ATAGGGTG	lacZ-1874s 打靶引物
lacZ-1874s-EBS1d	CCAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCCAGCAGCTAAC TTACCTTTCCTTTGT	
lacZ-1874s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGTTGTTTTCCGATAGAGGAAAGTGCT	
lacZ-1	GGCCCGCACCGATCGCCCTTC	lacZ 基因检测引物
lacZ-2	GCTCTCCGGCTGCGGTAGTTACG	

**1.2.2 打靶载体的构建** 以 pSY7 质粒为模板, 用相应打靶位点的引物 (lacZ-1683a-IBS/EBS Universal 和 lacZ-1683a-EBS2/lacZ-1874s-EBS1d) 进行第一轮 PCR, 条件为 95 ℃ 3 min, 95 ℃ 20 s, 55 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s, 循环数为 30, PCR 产物采用琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒回收特异条带, 以第一轮

的 PCR 产物及打靶位点引物 (lacZ-1683a-IBS lacZ-1874s-EBS1d) 进行第二轮 PCR, PCR 条件同上, 产物再采用 DNA 纯化试剂盒回收特异性条带。利用限制性内切酶 *Xho*I/*Bsr*GI 双酶切质粒 pSY7 和第二轮 PCR 产物, 通过 DNA 凝胶试剂盒回收, T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5a, 菌落 PCR 鉴定及测序后获得打靶载体 pSY7-lacZ-1683a 和 pSY7-lacZ-1874s。见图 1。

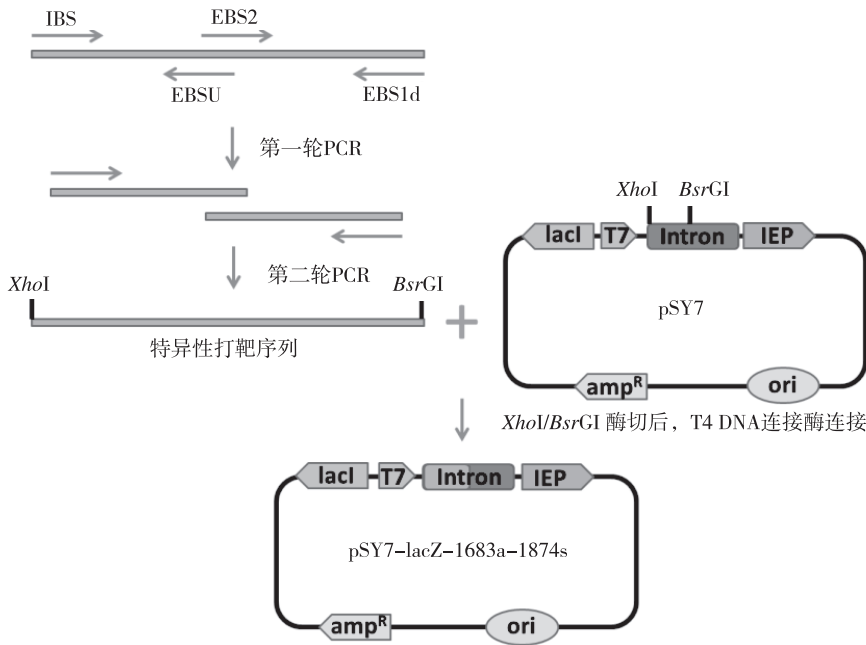


图 1 打靶载体 pSY7-lacZ-1683a 和 pSY7-lacZ-1874s 的构建流程  
Fig.1 Flow chart of Targetron vectors construction

**1.2.3 大肠杆菌 BL21(DE3) 的转化** 将 3  $\mu\text{L}$  的质粒 pSY7-lacZ-1683a、pSY7-lacZ-1874s 分别加入到 50  $\mu\text{L}$  大肠杆菌的 BL21(DE3) 感受态细胞中,冰上孵育 30 min,42  $^{\circ}\text{C}$  热激 90 s 后,置于冰上 5 min,加入 900  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  180 r/min 复苏 1 h 后,离心取细胞沉淀加入 100 mg/L 氨苄青霉素 LB 液体培养基 5 mL 中,37  $^{\circ}\text{C}$  180 r/min 过夜培养。

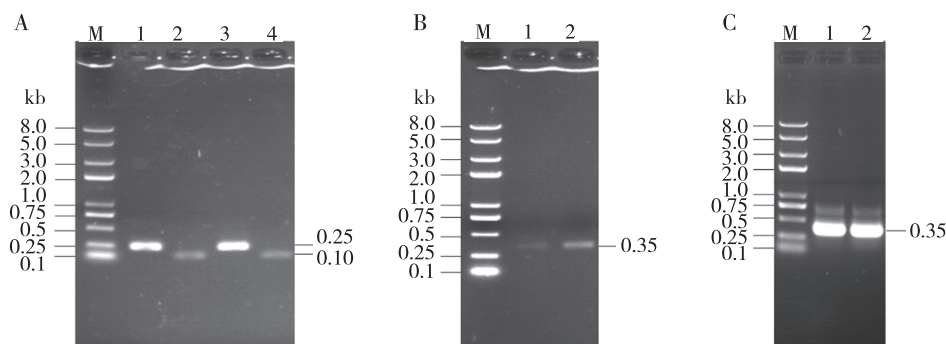
**1.2.4 打靶载体功能的检测** 取 40  $\mu\text{L}$  过夜培养的菌液加入 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基 4 mL 中,37  $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 进行增菌培养 1 h,再加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导质粒表达 45 min,离心取细胞沉淀稀释涂布 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素,40 mg/L X-gal 和 0.1 mmol/L IPTG),37  $^{\circ}\text{C}$  过夜,挑取平板上的白色菌落和蓝色菌落进

行菌落 PCR 验证以检测内含子序列插入基因组的特异性,通过蓝白斑计数计算打靶效率,打靶效率 = 白斑/(白斑 + 蓝斑)  $\times$  100%。

## 2 结果

### 2.1 打靶载体的构建

图 2A 为第一轮 PCR 的电泳图,成功扩增出两个打靶序列 0.1 kb 和 0.25 kb 的特异性条带;图 2B 为进行第二轮 PCR 的电泳图,成功将第一轮 PCR 的 0.1 kb 和 0.25 kb 的产物进行了连接;图 2C 为所构建质粒菌落的 PCR 结果,可见明显的 0.35 kb 的打靶序列条带。通过测序,表明本研究成功构建了打靶载体 pSY7-lacZ-1683a、pSY7-lacZ-1874s。



注:M 为 8 000 Marker,A 为第一轮 PCR,1 为 lacZ-1683a-IBS/EBSU,2 为 lacZ-1683a-EBS2/lacZ-1683s-EBS1d,3 为 lacZ-1874s-IBS/EBSU,4 为 lacZ-1874s-EBS2/lacZ-1874s-EBS1d;B 为第二轮 PCR,1 为 lacZ-1683a-IBS/lacZ-1683a-EBS1d,2 为 lacZ-1874s-IBS/lacZ-1874s-EBS1d;C 为菌落 PCR,1 为 lacZ-1683a-IBS/lacZ-1683a-EBS1d,2 为 lacZ-1874s-IBS/lacZ-1874s-EBS1d

图 2 打靶载体构建电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis detection for Targetron construction

### 2.2 打靶载体的功能检测

如图 3 所示,当用打靶位点的上下游引物进行菌落 PCR 时,白色菌落比野生型蓝色菌落多了 0.9 kb 的条带大小,而且通过特异性引物进行菌落 PCR,可得到相应大小的条带,表明本研究所构建的打靶载体经过诱导后,内含子序列成功的特异性地插入了相应的打靶位点。

### 2.3 Targetron 载体的打靶效率

如图 4 所示,lacZ-1683a 的打靶效率为  $(14.299 \pm 1.271)\%$ ,lacZ-1874s 的打靶效率为  $(9.217 \pm 1.024)\%$ 。

## 3 讨论

来源于乳酸乳球菌的 Ll.LtrB 内含子是目前研究得最为广泛的细菌 II 型内含子,基于其在细菌中的特异转移机制,已被开发为高效的 Targetron 基因打靶技术<sup>[9,14,18,20-21]</sup>。由于该技术操作简便,实验周期短,基因打靶效率高等优点,已在多种革兰氏阳性菌及革兰阴性菌中获得广泛应用<sup>[8]</sup>。根据 II 型内含子的靶位点识别机制,已开发出通用的特异性打靶引物设计软件,并可利用在线设计软件

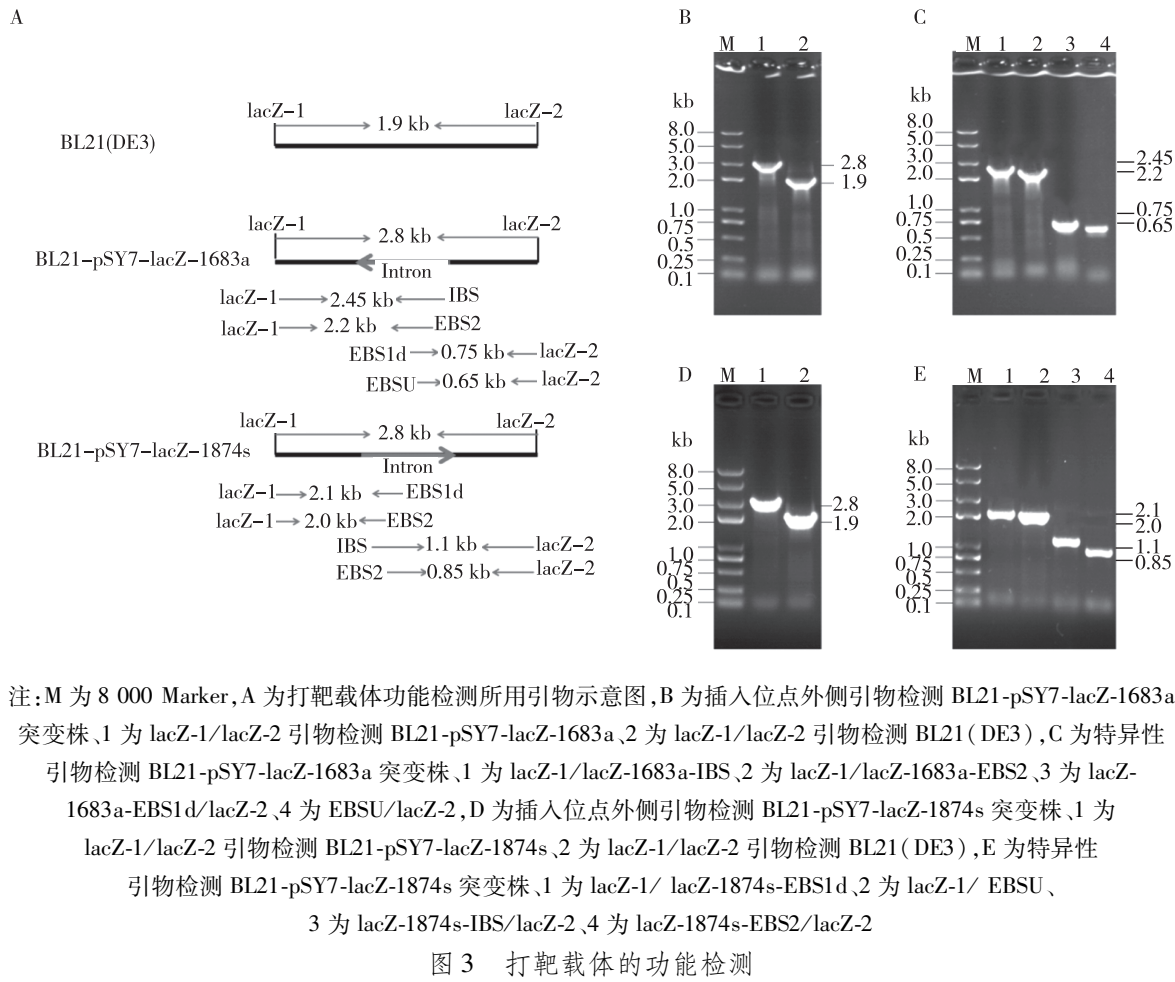


Fig. 3 Function verification of Targetron vectors

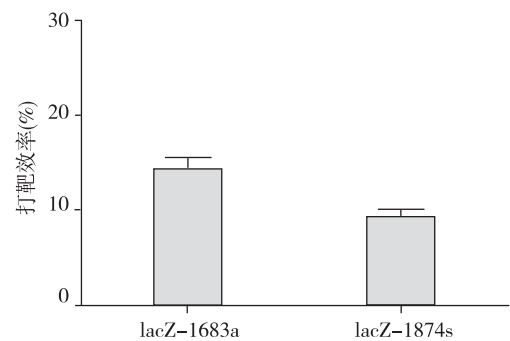


图 4 Targetron 载体的打靶效率

Fig. 4 Targeting efficiency of Targetron vectors

(www.clostron.com),仅输入靶基因即可自动生成特异性引物,并获得各打靶位点的评分情况;其次,在基因打靶载体构建方面,通过重叠延伸 PCR 获得特异性的内含子打靶序列,结合单次质粒克隆,便可获得针对目标基因的打靶载体。本研究以大肠杆菌 *lacZ* 基因为例,设计并构建了针对 *lacZ*-

1683a 和 *lacZ*-1874s 两个位点的 Targetron 载体,通过转化、诱导及菌落 PCR 验证获得较好的打靶效率。总之,本研究成功构建的 Targetron 打靶载体为 II 型内含子的机理研究及应用奠定了基础。

## 4 参考文献

[1] LAMBOWITZ A M, ZIMMERLY S. Mobile group II introns[J]. Annu Rev Genet, 2004,38:1-35.

[2] MCNEIL B A, SEMPER C, ZIMMERLY S. Group II introns: versatile ribozymes and retroelements[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016,7(3):341-355.

[3] QU G, KAUSHAL P S, WANG J, et al. Structure of a group II intron in complex with its reverse transcriptase[J]. Nat Struct Mol Biol, 2016,23(6):549-557.

[4] TORO N, JIMENEZ-ZURDO J I, GARCIA-RODRIGUEZ F M. Bacterial group II introns: not just splicing[J]. FEMS Microbiol Rev, 2007,31(3):342-358.

[5] ZIMMERLY S, SEMPER C. Evolution of group II introns

- [J]. Mob DNA, 2015,6:7.
- [6] NOVIKOVA O, BELFORT M. Mobile group II introns as ancestral eukaryotic elements[J]. Trends Genet, 2017, 33(11):773–783.
- [7] ZIMMERLY S, GUO H, PERLMAN P S, et al. Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription[J]. Cell, 1995,82(4):545–554.
- [8] LIU Y J, ZHANG J, CUI G Z, et al. Current progress of targetron technology: development, improvement and application in metabolic engineering [J]. Biotechnol J, 2015,10(6):855–865.
- [9] SHAO L, HU S, YANG Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in Clostridium acetobutylicum[J]. Cell Res, 2007,17(11):963–965.
- [10] ENYEART P J, MOHR G, ELLINGTON A D, et al. Biotechnological applications of mobile group II introns and their reverse transcriptases: gene targeting, RNA-seq, and non-coding RNA analysis [J]. Mob DNA, 2014,5(1):2.
- [11] SASIKUMAR P, PAUL E, GOMATHI S, et al. Mobile group II intron based gene targeting in lactobacillus plantarum WCFS1 [J]. J Basic Microbiol, 2016,56(10):1107–1116.
- [12] KARBERG M, GUO H, ZHONG J, et al. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(12):1162–1167.
- [13] YAO J, ZHONG J, FANG Y, et al. Use of targetrons to disrupt essential and nonessential genes in Staphylococcus aureus reveals temperature sensitivity of Ll LtrB group II intron splicing[J]. RNA, 2006,12(7):1271–1281.
- [14] YAO J, LAMBOWITZ A M. Gene targeting in gram-negative bacteria by use of a mobile group II intron ("Targetron") expressed from a broad-host-range vector [J]. Appl Environ Microbiol, 2007,73(8):2735–2743.
- [15] KEY C E, FISHER D J. Use of group II intron technology for targeted mutagenesis in chlamydia trachomatis[J]. Methods Mol Biol, 2017,1498:163–177.
- [16] LAMBOWITZ A M, ZIMMERLY S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011,3(8):a003616.
- [17] FRAZIER C L, SAN FILIPPO J, LAMBOWITZ A M, et al. Genetic manipulation of lactococcus lactis by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection[J]. Appl Environ Microbiol, 2003,69(2):1121–1128.
- [18] YAO J, ZHONG J, LAMBOWITZ A M. Gene targeting using randomly inserted group II introns (targetrons) recovered from an escherichia coli gene disruption library [J]. Nucleic Acids Res, 2005,33(10):3351–3362.
- [19] CHEN Y, MCCLANE B A, FISHER D J, et al. Construction of an alpha toxin gene knockout mutant of clostridium perfringens type a by use of a mobile group II intron[J]. Appl Environ Microbiol, 2005,71(11):7542–7547.
- [20] MOHR G, HONG W, ZHANG J, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in clostridium thermocellum [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69032.
- [21] ZHONG J, KARBERG M, LAMBOWITZ A M. Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(6):1656–1664.

(2019-04-17 收稿,2019-06-25 修回)

中文编辑: 文箴颖; 英文编辑: 赵毅