

# CRISPR/Cas9和λ-Red基因敲除技术在大肠杆菌中的应用比较

吕言, 任晓昕, 徐大庆\*

河北农业大学生命科学学院, 河北 保定

收稿日期: 2022年2月1日; 录用日期: 2022年2月19日; 发布日期: 2022年3月2日

## 摘要

**摘要:** λ-Red和CRISPR/Cas9基因敲除技术已被广泛应用于染色体基因敲除。本研究分别采用λ-Red和CRISPR/Cas9技术对大肠杆菌BL21菌株染色体丙氨酸消旋酶基因 $alr$ 进行了敲除, 并比较了其敲除效率。对于Red敲除技术而言, 首先构建由 $alr$ 上下游同源臂和卡那抗性盒FLT- $kan^R$ -FLT组成的打靶片段L $alr$ -FLT- $kan^R$ -FLT-R $alr$ , 转化 $E. coli$  BL21/pKD46感受态细胞, 在pKD46表达的Red重组酶作用下发生同源重组, 使染色体 $alr$ 被卡那抗性盒FLT- $kan^R$ -FLT替换; 然后, 质粒pCP20转化上述发生了 $alr$ 替换的 $E. coli$ 菌株感受态细胞, 在pCP20表达的FLP重组酶作用下发生位点特异性重组, 删除卡那抗性基因 $kan^R$ ; 最后, 对温敏型质粒进行消除, 获得 $alr$ 敲除突变株 $E. coli$  BL21 Δ $alr$ -Red。对于CRISPR/Cas9技术而言, 首先构建敲除质粒pTargetF- $alr$ , 制备打靶供体DNA片段L- $alr$ -R; 接着, pTargetF- $alr$ 和L- $alr$ -R共转化 $E. coli$  BL21/pCas感受态细胞, 在pTargetF- $alr$ 编码的sgRNA序列引导下, 质粒pCas编码的Cas9蛋白结合到 $alr$ 基因切割靶点DNA, 通过对双链断裂的同源重组修复实现对 $alr$ 基因的无痕敲除, 获得 $alr$ 敲除突变株 $E. coli$  BL21 Δ $alr$ -CRISPR。实验结果显示: 使用基于短、长同源臂靶打靶片段的Red技术,  $E. coli$  BL21 Δ $alr$ -Red阳性转化子检出率分别为5%和55%; 而使用CRISPR/Cas9技术,  $E. coli$  BL21 Δ $alr$ -CRISPR阳性转化子检出率为95%。实验结果表明: 在 $E. coli$ 中, 使用短同源臂靶打靶片段的Red敲除技术, 转化子脱靶率超高, 这使阳性转化子鉴定工作量大增; 使用长同源臂打靶片段的Red敲除技术, 较为容易检测到阳性转化子; 使用CRISPR/Cas9技术, 敲除效率显著优于λ-Red技术。

## 关键词

大肠杆菌, CRISPR/Cas9, λ-Red, 基因敲除, 丙氨酸消旋酶基因

## Comparative Study of CRISPR/Cas9 and λ-Red Gene Knockout Techniques in *Escherichia coli*

\*通讯作者。

**Yan Lyu, Xiaoxin Ren, Daqing Xu\***

College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding Hebei

Received: Feb. 1<sup>st</sup>, 2022; accepted: Feb. 19<sup>th</sup>, 2022; published: Mar. 2<sup>nd</sup>, 2022**Abstract**

CRISPR/Cas9 and  $\lambda$ -Red techniques have been widely used for chromosomal gene knockout. In this study, the alanine racemase gene *alr* on the genome of *Escherichia coli* BL21 strain was deleted using the two gene knockout methods, respectively, and the efficiencies of knockout were compared. For  $\lambda$ -Red technique, firstly, the targeting fragments *Lalr*-FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT-*Ralr* consisting of the upstream and downstream homologous arms of the gene *alr* and the kanamycin-resistant cassette FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT were prepared, transformed into the *E. coli* BL21/pKD46 competent cells, and chromosomal *alr* was replaced by FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT by pKD46-Red enzymes-mediated homologous recombination; secondly, *kan<sup>R</sup>* was deleted by pCP20-FLP enzyme-mediated site-specific recombination; finally, temperature-sensitive plasmids were eliminated, generating the mutant strain *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-Red. For CRISPR/Cas9 technique, firstly, knockout plasmid pTargetF-*alr* was constructed and targeting donor fragment L-*alr*-R was prepared; secondly, pTargetF-*alr* and L-*alr*-R were co-transformed into the *E. coli* BL21/pCas competent cells; scarless knockout of *alr* was achieved by cleavage of *alr* by sgRNA guiding-Cas9 protein and sequential double strands breakage repair based on homologous recombination, generating the mutant strain *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-CRISPR. The experimental results showed that the rates of the *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-Red positive transformants were 5% and 55% using short homologous arms and long homologous arms  $\lambda$ -Red techniques, respectively, while the rate of the *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-CRISPR positive transformants was 95% using CRISPR/Cas9 techniques. These results demonstrate that in *E. coli*, short homologous arms  $\lambda$ -Red technique leads to a superhigh off-target rate of transformants, which would increase work intensity for positive transformants screening; positive transformants are relatively easy to obtain using long homologous arms  $\lambda$ -Red technique; the knockout rate of CRISPR/Cas9 technique is significantly higher than that of  $\lambda$ -Red technique.

**Keywords***Escherichia coli*, CRISPR/Cas9,  $\lambda$ -Red, Gene Konckout, Alanine Racemase Gene

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

**1. 引言**

基因敲除技术的发展源于 20 世纪 80 年代末期分子生物学的进步, 其中基于细菌 RecA 重组酶的基因敲除系统是最为传统的技术手段[1]。RecA 基因敲除技术主要利用细菌内源性同源重组酶 RecA 蛋白和 RecBCD 蛋白复合体来对基因进行编辑[2], 其必须通过体外酶切连接等操作将带有待敲除序列两翼同源臂序列构建到环状质粒或 BAC 载体上, 目前, 人们已经很少使用这种复杂的技术来对目的基因进行敲除[3]。更为高效基因敲除技术, 如  $\lambda$ -Red 和 CRISPR/Cas 基因敲除技术, 已经被广泛用于生物体遗传改造[4]。

$\lambda$ -Red 重组技术源于  $\lambda$ -噬菌体 Red 基因座表达的 Exo、Beta、Gam 三个功能蛋白, 其能介导基因组序

列与外源供体 DNA 发生同源重组。Exo 是一种双功能蛋白，其主要功能是作为核酸外切酶自 5'端降解 DNA，其次是作为重组酶直接促使基因重组；Beta 蛋白功能是作为单链结合蛋白保护来 3'突出端，介导已经完成互补链的退火；Gam 蛋白功能主要是作为阻遏蛋白来防止外源 DNA 被内源性核酸酶降解[5]。

CRISPR/Cas 系统产生于细菌在进化过程中对外源物种入侵的适应性免疫反应[6]。自 1987 年科学家在分析大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因组时发现带有重复的有间隔的序列开始，至今 CRISPR/Cas 技术发展全面突破，CRISPR/Cas9 成为其中研究最为透彻和主流的技术[7]。Cas9 主要来源于酿脓链球菌，该系统发挥作用首先需要 CRISPR 基因座上上游的 trans-activating RNA (tracrRNA)表达，其与 Cas9 共同参加 CRISPR-derived RNA (crRNA)的成熟，成熟的 crRNA 与 tracrRNA 形成 gRNA [8]。Cas9 蛋白携带 gRNA 与 DNA 序列扫描比对，如果靶 DNA 与 gRNA 携带的 crRNA 序列一致，则 DNA 将被“扣留”，tracrRNA 激活 Cas9 切断这条 DNA，而达到敲除该 DNA 的效果[9]。

丙氨酸消旋酶参与 *E. coli* 细胞壁合成，研究表明丙氨酸消旋酶基因的失活会导致 *E. coli* 无法正常合成细胞壁而导致死亡[10]。*E. coli* 丙氨酸消旋酶基因分两种类型：组成型基因 *alr* 和诱导表达型基因 *dadX*。其中 *alr* 可以稳定地为细胞提供大量充足的 D-丙氨酸，而 *dadX* 主要受到 L-丙氨酸诱导调控而表达[11]。丙氨酸消旋酶编码基因可作为互补型筛选标记，用来取代载体抗生素抗性标记，使基因工程表达载体其更适合于大范围使用。*E. coli alr* 基因的敲除，可为构建使用 *alr* 作为互补型筛选标记的质粒提供缺陷型宿主。本文拟利用基于不同长度同源修复供体的  $\lambda$ -Red 技术和 CRISPR/Cas9 技术对 *E. coli* 丙氨酸消旋酶 *alr* 基因进行敲除，并比较不同技术的敲除效率。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 菌株和质粒

本研究所需菌株和质粒信息见表 1。

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

**表 1.** 本研究所使用的菌株和质粒

菌株或质粒	特性	来源
菌株		
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>omp T gal dcm lon hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)</i>	本实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21 $\Delta$ <i>alr</i> -Red	derivative of BL21, <i>alr</i> deletion using $\lambda$ -Red	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21 $\Delta$ <i>alr</i> -CRISPR	derivative of BL21, <i>alr</i> deletion using CRISPR/Cas9	本研究构建
质粒		
pKD46	<i>oriR101 Rep101(Ts) araC-P<sub>BAD</sub> Amp<sup>r</sup></i>	Datsenko and Wanner [12]
pKD13	<i>Kan<sup>r</sup> FRT</i>	Datsenko and Wanner [12]
pCP20	<i>TS-rep FLT Cm<sup>r</sup> Amp<sup>r</sup></i>	Datsenko and Wanner [12]
pCas	<i>Rep101(Ts) P<sub>cas</sub>-Cas9 P<sub>araB</sub>-Red P<sub>trc</sub>-sgRNA-pMB1</i>	Jiang et al. [13]
pTargetF	<i>pMB1 aadA sgRNA</i>	Jiang et al. [13]
pTargetF- <i>alr</i>	<i>pMB1 aadA sgRNA-alr</i>	本研究构建

### 2.1.2. 主要试剂

DNA 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒(北京天根生化技术有限公司);DNA 聚合酶PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、*Dpn* I 限制性内切酶(大连宝生物有限公司)。

### 2.1.3. 引物序列

本研究所需引物及其序列信息见表 2。

**Table 2.** Primers used in this study  
**表 2.** 本研究中所使用的引物

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>alr</i> -sgRNA	CTGTTCTTCGTTATGCACGG
<i>alr</i> -N <sub>20</sub> -F	CTGTTCTTCGTTATGCACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>alr</i> -N <sub>20</sub> -R	CCGTGCATAACGAAGAACAGACTAGTATTATACCTAGGAC
<i>alr</i> -U-F	TCGACTACCTGCAACTGATG
<i>alr</i> -U-R	CATCGCGACCCTTGAAGTCAACGAAGACGTTGCAGGTTGT
<i>alr</i> -D-F	ACAACCTGCAACGTCTTCGATGACTTCAAGGGTCGCGATG
<i>alr</i> -D-R	ATGGCGATAGCAGTTAAGCC
<i>alr</i> -JC-F	GTCGCGCTTCGACAACCTATG
<i>alr</i> -JC-R	GTTCTCCAGGTTTACGGGCA
P1	ATGCAAGCGGCAACTGTTGTGATTAACCGCCGCGCTCTGC GACACAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
P2	TTAATCCACGTATTTTCATCGCGACCCTTGAAGTCAGGCGC GTAATAACTGTCAAACATGAGAATTAATTCCG
P3	GCGTGAATCTGGCTCTATCG
P4	GCGTAAGAATCGGGTCGCCA
P5	CTATATCGATGACTCCTCCGGC
P6	CTCCAGCCTACACTAATCACAACAGTTGCCGCTTG
P7	GTGATTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
P8	CCACGTATTTTCATCTGTCAAACATGAGAATTAATTCCG
P9	TTGACAGATGAAATACGTGGATTAATCGTTCTG
P10	GGTCCGCACCAAACAGCAGC

## 2.2. 应用 $\lambda$ -Red 系统敲除 *E. coli alr* 基因

### 2.2.1. 分别携带短、长同源臂的卡那抗性盒打靶片段的扩增

以质粒 pKD13 为模板, 利用引物对 P1/P2 扩增由 *alr* 上下游短同源臂和卡那抗性盒 FLT-*kan*<sup>R</sup>-FLT 组成的短同源臂打靶片段 *Lalr*-FLT-*kan*<sup>R</sup>-FLT-*Ralr*。以 *E. coli* BL21 基因组 DNA 为模板, 分别利用引物对 P5/P6 和 P9/P10 扩增得到 *alr* 基因的上下游同源片段; 以质粒 pKD13 为模板, 利用引物对 P7/P8 扩增得

到卡那抗性盒片段 FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT; 利用重叠 PCR 将这三条线性片段融合成由 *alr* 长同源臂及卡那抗性盒 FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT 组成的打靶片段 *Lalr*-FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT-*Ralr*。

### 2.2.2. 电转感受态细胞的制备及转化

将编码含有 Red 重组系统的 pKD46 质粒转化进入 *E. coli* BL21 中, 筛选转化子并将其命名为 *E. coli* BL21/pKD46。将该菌株经 30℃ 过夜培养后, 按照 1% 接种比例转接到含有卡那霉素抗性的 LB 培养基中, 并向其中加入终浓度为 50 mM 的 L-阿拉伯糖。将菌株培养至 OD<sub>600</sub> = 1.0 时停止, 以使同源重组酶大量表达而提升敲除效率, 并按照 Dower [14] 方法进行 *E. coli* BL21/pKD46 感受态细胞的制备及转化。

### 2.2.3. *E. coli* BL21Δ*alr*-Red 敲除菌株的构建

分别取 1 μg 两种同源臂长度不同打靶片段进行电转化, 利用引物对 P3/P4 鉴定 Red 重组酶活性下 *E. coli* BL21 菌株 *alr* 基因是否被替换成两端带有 *FRT* 位点的 *kan<sup>R</sup>* 片段。

通过 42℃ 高温培养可以将 *alr* 基因已被 *kan<sup>R</sup>* 替换的突变株中的温敏型 pKD46 质粒消除。将表达 FLT 重组酶活性的氯霉素抗性载体 pCP20 电转到消除 pKD46 的突变株中, 在 FLT 重组酶作用进行第二次发生基因交换, 进而删除 *kan<sup>R</sup>* 片段。42℃ 培养条件下消除温敏型的 pCP20 质粒, 并进行抗性平板验证, 敲除突变体命名为 *E. coli* BL21 Δ*alr*-Red。

## 2.3. 应用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *E. coli alr* 基因

### 2.3.1. sgRNA 敲除质粒的构建

通过在线网站(<http://chopchop.cbu.uib.no/>)设计出 *alr* 基因的 gRNA。将设计好的 20 bp 序列引入到引物 *alr*-N20-F/*alr*-N20-R 中, 以 pTargetF 为模板进行反向 PCR, 获得带有 *alr* 基因 sgRNA 编码序列的线性 pTargetF 质粒全长。Dpn I 限制性内切酶消除母本质粒, 经纯化后转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中进行环化, 提质粒并进行测序验证, 将正确的质粒命名为 pTargetF-*alr*。

### 2.3.2. 打靶供体 DNA 片段的获得

以 *E. coli* BL21 基因组 DNA 为模板, 分别利用引物对 *alr*-U-F/*alr*-U-R 和 *alr*-D-F/*alr*-D-R 扩增 *alr* 基因上下游同源片段, 然后利用重叠 PCR 将这两条线性片段融合成一条打靶供体 DNA 片段 L-*alr*-R。

### 2.3.3. *E. coli* BL21 Δ*alr*-CRISPR 敲除菌株的构建

将含有 CRISPR/Cas9 重组系统的 pCas 质粒电转化进入 *E. coli* BL21 中, 筛选出正确转化子将其命名为 *E. coli* BL21/pCas。 *E. coli* BL21/pCas 电转化感受态细胞的制备及转化方法参照 2.2.2 中所述。

取 1 μg 供体 DNA 片段和 200 ng pTargetF-*alr* 敲除质粒进行共转化, 在 sgRNA 序列的作用下, Cas9 蛋白结合到 *alr* 基因特异位点上切割靶 DNA, 再经同源重组实现对 *alr* 基因的敲除, 利用引物对 *alr*-JC-F/*alr*-JC-R 对转化子进行 PCR 验证。

利用 IPTG 将鉴定正确的菌株进行诱导, 使 pCas 质粒上的 sgRNA-pMB1 表达, 靶向切割 pTargetF-*alr* 质粒的 pMB1 复制子, 消除 pTargetF-*alr* 质粒。42℃ 培养条件下消除温敏型 pCas 质粒, 并进行抗性平板验证, 敲除突变体命名为 *E. coli* BL21Δ*alr*-CRISPR。

## 3. 结果分析

### 3.1. λ-Red 系统构建 *E. coli alr* 基因敲除突变株

#### 3.1.1. Red 同源打靶片段的获得

引物 P1、P2 的 5'端分别引入了 *alr* 基因上下游 47 bp 的同源臂, 以质粒 pKD13 为模板, 扩增两端带

有 *alr* 基因 47 bp 短同源臂的打靶片段 *Lalr*-FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT-*Ralr*。PCR 扩增产物长度为 1.41 kb，与预期片段长度相符，成功获得短同源臂打靶片段。

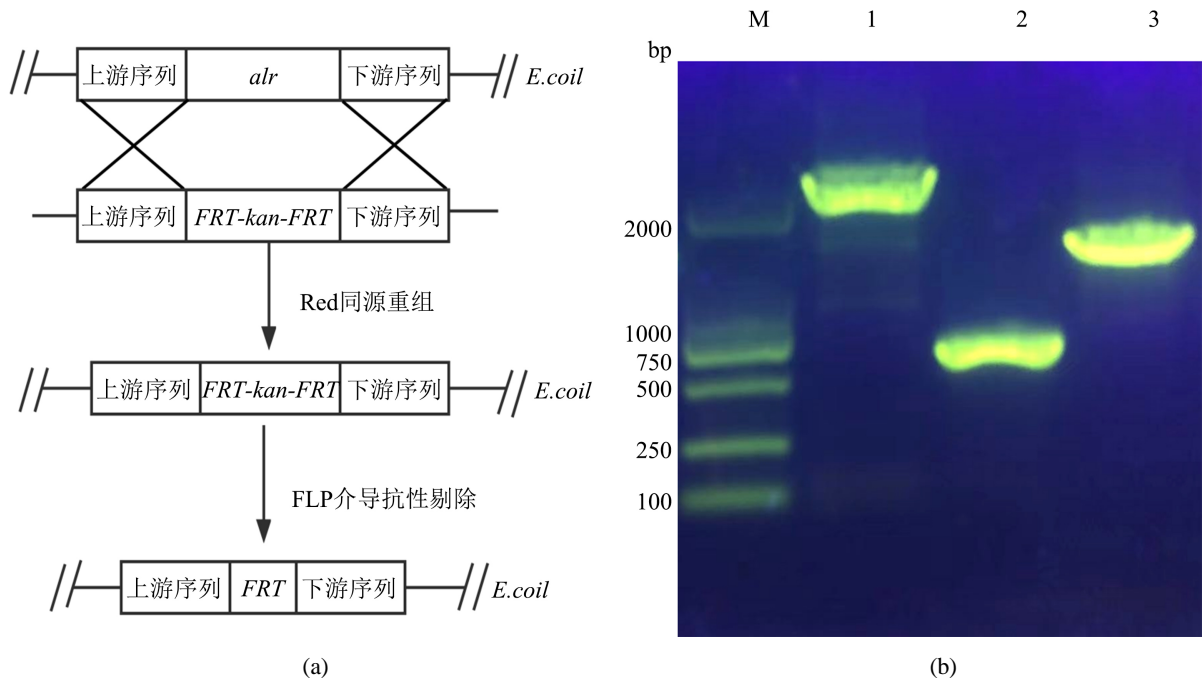
以大肠杆菌基因组为模板，分别扩增 *alr* 基因上下游长同源臂 *Lalr* (577 bp) 和 *Ralr* (539 bp)；以质粒 pKD13 为模板，扩增仅带有 FLP 位点的卡那霉素抗性片段 FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT (1.34 kb)；进一步，通过重叠 PCR 将这 3 个片段融合成长同源臂打靶片段 *Lalr*-FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT-*Ralr* (2.46 kb)。每一步 PCR 扩增产物都与预期片段长度相符，成功获得长同源臂打靶片段。

### 3.1.2. 敲除突变株 *E. coli* BL21 $\Delta$ *alr*-Red 的构建

$\lambda$ -Red 系统基因敲除流程如下：首先在 pKD46 质粒所表达 Red 重组酶作用下，由 *alr* 上下游短同源臂和卡那抗性盒 FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT 组成的打靶片段 *Lalr*-FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT-*Ralr* 与 *E. coli* 染色体 DNA 发生同源重组，FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT 替换 *alr* 基因；然后在质粒 pCP20 编码 FLP 重组酶识别 FRT 位点，发生位点特异性重组，进一步消除 *kan<sup>R</sup>* 片段，完成对目的基因的敲除(图 1(a))。

两种不同同源臂长度打靶片段电转化 *E. coli* BL21/pKD46 感受态细胞，进行基于 Red 重组酶的同源重组，挑取卡那霉素抗性平板上转化子，利用引物 P3/P4 进行 PCR 鉴定。野生型 *E. coli* BL21 扩增产物长度为 1.64 kb，*alr* 基因被卡那抗性盒 FLT-*kan<sup>R</sup>*-FLT 替换后的突变株 *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*::*kan* 扩增产物长度为 2.01 kb，与预期片段长度相符(图 1(b))。

将表达 FLP 重组酶的 pCP20 质粒电转化至 *E. coli* BL21 $\Delta$ *alr*::*kan* 感受态细胞中，进行基于 FLP 重组酶的位点特异性重组，消除卡那霉素抗性基因。挑取转化子，同样利用引物 P3/P4 进行 PCR 鉴定。卡那霉素抗性基因消除突变株 *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-Red 扩增片段电泳检测结果长度为 594 bp，与预期片段长度相符(图 1(b))。



注：(a)  $\lambda$ -Red 基因敲除技术流程图；(b) 敲除突变株 *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-Red 的 PCR 鉴定。M：DNA marker；1：product of BL21 $\Delta$ *alr*::*kan*，2.01 kb；2：product of BL21 $\Delta$ *alr*-Red，594 bp；3：product of wide type，1.64 kb。

Figure 1. Construction of *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-Red

图 1. 敲除突变株 *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-Red 的构建

## 3.2. CRISPR/Cas9 系统构建 *alr* 基因敲除株

### 3.2.1. 同源修复供体 DNA 的制备

以 *E. coli* BL21 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增分别获得大肠杆菌 *alr* 基因上下游两端同源臂 L-*alr* 和 R-*alr*, 进一步, 通过重叠 PCR 将这两个片段融合成长同源臂打靶片段 L-*alr*-R (1.06 kb)。每一步 PCR 扩增产物都与预期片段长度相符, 成功获得同源修复供体 DNA。

### 3.2.2. pTargetF-*alr* 的制备

以 pTargetF 质粒为模板进行反向 PCR 扩增, 获得带有可以靶向定位 *E. coli* BL21 基因组 DNA *alr* 基因序列的 sgRNA 编码序列的线性化质粒, 经 *Dpn* I 限制性内切酶消化母本 pTargetF 质粒并转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞自身环化。测序验证结果表明 20 bp 的特异打靶序列已成功构建到母本 pTargetF 质粒上 (图 2), 打靶质粒 pTargetF-*alr*-sgRNA 构建成功。

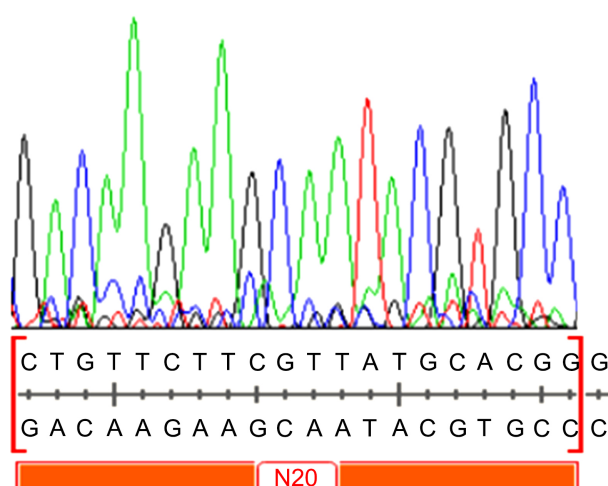


Figure 2. Identification of the *alr* targeting sequence by Sanger sequencing

图 2. *alr* 基因特异打靶序列测序结果图

### 3.2.3. 敲除突变株 *E. coli* BL21 $\Delta$ *alr*-CRISPR 的构建

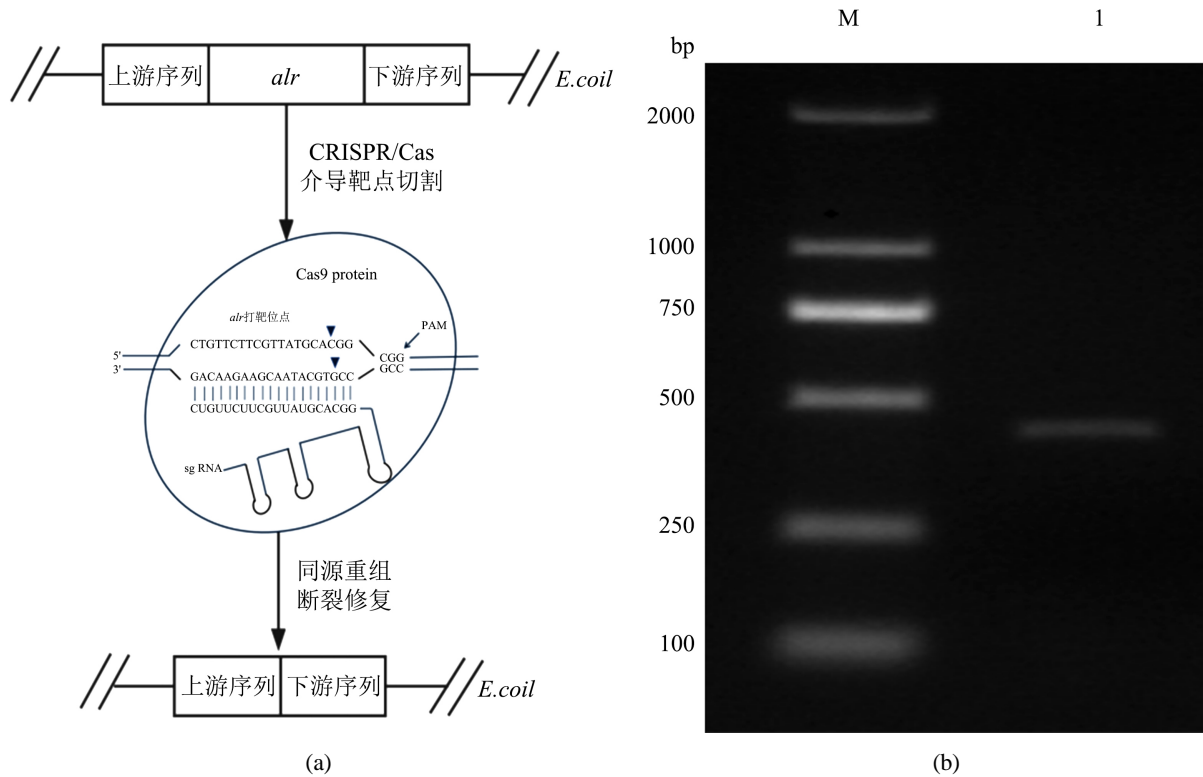
基于双质粒的 CRISPR/Cas9 敲除系统基因编辑流程如下: 首先制备特异性的打靶质粒 pTargetF-*alr*, 然后通过 pCas9 质粒所表达的 Cas9 蛋白来介导特异 sgRNA 与目的基因的结合以及剪切, 最后断裂双链通过宿主自身同源重组修复进而完成基因的编辑 (图 3(a))。

将质粒 pTargetF-*alr* 与同源修复供体 DNA 片段共转化至 *E. coli* BL21/pCas 感受态细胞中, 挑取转化子, 利用引物 *alr*-JC-F/*alr*-JC-R 进行 PCR 鉴定。电泳结果显示 PCR 扩增产物长度为 422 bp, 表明 *alr* 基因已被成功敲除 (图 3(b))。进一步, 通过 42 $^{\circ}$ C 培养对温敏型 pCas 质粒进行消除, 最终获得敲除突变株 *E. coli* BL21 $\Delta$ *alr*-CRISPR。

## 3.3. CRISPR/Cas9 与 $\lambda$ -Red 敲除效率比较

统计结果显示, 将 1  $\mu$ g 短同源臂打靶片段电转化 *E. coli* BL21/pKD46 感受态细胞, 抗性平板上生长出 80 个转化子, 进一步使用 P3/P4 引物对转化子作 PCR 鉴定, 结果显示 5% 的转化子属于 *alr* 敲除突变体, 其余 95% 皆为假阳性, 属于脱靶抗性转化子。而将 1  $\mu$ g 长同源臂打靶片段电转化 *E. coli* BL21/pKD46 感受态细胞, 抗性平板上生长出 130 个转化子, 进一步 PCR 鉴定结果显示, 有 55% 的转化子属于 *alr* 敲

除突变体，其余 45% 为假阳性，属于脱靶抗性转化子。以上结果尤其体现出，使用短同源臂及长同源臂打靶片段， $\lambda$ -Red 介导的同源重组脱靶率差异巨大。对于 CRISPR/Cas9 技术敲除，将 1  $\mu$ g 的同源修复供体 DNA 片段电转化 *E. coli* BL21/pCas 感受态，平板上长出的转化子数量约为 325 个，进一步使用 *alr*-JC-F/*alr*-JC-R 为引物对转化子作 PCR 鉴定，结果显示 95% 的转化子属于 *alr* 敲除突变体。



注: (a) CRISPR/Cas9 基因敲除技术流程图; (b) 敲除突变株 *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-CRISPR 的 PCR 鉴定。M: DNA marker; 1: product of BL21 $\Delta$ *alr*-CRISPR, 422 bp。

**Figure 3.** Construction of *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-CRISPR  
**图 3.** 敲除突变株 *E. coli* BL21  $\Delta$ *alr*-CRISPR 的构建

#### 4. 结论与讨论

$\lambda$ -Red 和 CRISPR/Cas9 技术进行 *E. coli* BL21 *alr* 基因敲除实验结果表明：在 *E. coli* 中，使用短同源臂靶打靶片段的 Red 敲除技术，转化子脱靶率超高，这使阳性转化子鉴定工作量大增；使用长同源臂打靶片段的 Red 敲除技术，较为容易检测到阳性转化子；使用 CRISPR/Cas9 技术，敲除效率显著优于  $\lambda$ -Red 技术。基于长同源臂打靶片段的 Red 敲除技术和 CRISPR/Cas9 技术都能够对 *E. coli* 染色体进行高效的基因敲除。

在  $\lambda$ -Red 两步同源重组敲除系统中，本实验进行了短、长两种不同同源臂打靶片段的基因敲除。短同源臂打靶片段基因敲除，以 pKD13 质粒为模板，使用分别携带 40~60 nt 上下游同源臂的引物进行 PCR 扩增，可直接获得包含卡那抗性盒 FLT-*kan*<sup>R</sup>-FLT 的短同源臂打靶片段[12]，这省去了酶切、连接或重叠 PCR 等步骤，在一定程度上缩短了实验进程[15]，但本研究表明了其具有超高的脱靶率。长同源臂打靶片段基因敲除，需要连续的酶切、连接或重叠 PCR 才能将上下游片段和卡那抗性盒 FLT-*kan*<sup>R</sup>-FLT 连接起来。实验结果表明，打靶片段同源臂长度的增加，通过降低脱靶率，提升了打靶效率。在 Red 基因敲



除技术中,需要 pCP20 质粒编码的 FLP 重组酶来介导第二次位点特异性重组进行卡那霉素抗性标记的彻底删除,第二次重组后 *FRT* 位点遗留在染色体上。因此,Red 基因敲除技术属于无标记敲除(markerless knockout),没有做到真正的无痕敲除(Scarless knockout)。另外,Red 系统不能做到连续敲除,在敲除后续基因时仍然需要将 pKD46 质粒转入细胞中,这成为其又一缺陷[16]。

基于 pCas 和 pTargetF 双质粒系统,CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以对大肠杆菌基因组 DNA 进行高效的基因敲除。本研究结果显示了 CRISPR/Cas9 技术敲除效率显著优于  $\lambda$ -Red 技术。由于 sgRNA 的介导,Cas9 蛋白能精确结合到待编辑基因片段,其可经一次重组就可以达到理性化的编辑效果,可以做到无痕敲除或者定向敲入,不会在基因组 DNA 上留下特殊位点。由于 pCas 质粒的稳定性,在构建双基因敲除实验中,若有下一轮敲除需求,率先获得的基因突变株就可以先不消除 pCas 质粒而直接用于另一基因的敲除。另外,该系统可进行多基因的同时编辑,只需将识别靶向基因的 20 bp 寡核苷酸连入到 pTargetF 质粒中,再将这一新的 pTargetF-sgRNA 和相应的同源修复供体 DNA 共转到含有 pCas 质粒的菌株当中,就可以实现多个基因的同时打靶操作[13]。

综上所述,长同源臂打靶片段 Red 敲除技术和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,都可用于 *E. coli* 染色体基因的高效敲除。CRISPR/Cas9 介导的基因敲除更具有优势,其只需要一次同源重组修复便可实现无痕且可连续的基因敲除。另外,由于 Cas9 蛋白对靶点 20 bp 序列的识别选择,CRISPR/Cas9 技术亦可能会在某些基因序列中产生大范围程度脱靶现象[17]。

## 基金项目

河北省自然科学基金(C2020204085)。

## 参考文献

- [1] 黄星樾, 隋明宇, 侯文清, 等. RecA 蛋白介导同源重组的步进式链交换[J]. 物理学报, 2020, 69(20): 351-358.
- [2] 张宇微. RecA 蛋白所介导的同源重组机制的研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [3] Yang, D., Boyer, B., Prévost, C., *et al.* (2015) Integrating Multi-Scale Data on Homologous Recombination into a New Recognition Mechanism Based on Simulations of the RecA-ssDNA/dsDNA Structure. *Nucleic Acids Research*, **43**, 10251-10263. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv883>
- [4] Jelinkova, S., Martyniak, A., Dulak, J., *et al.* (2021) Derivation of Human Pluripotent Stem Cell Line via CRISPR/Cas9 Mediated Deletion of Exon *LAMA2* Gene (DMBi001-A-1). *Stem Cell Research*, **56**, Article ID: 102529. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102529>
- [5] Marisa, E., Jasmine, R., Christian, X., *et al.* (2016) Lambda Red-Mediated Recombineering in the Attaching and Effacing Pathogen *Escherichia albertii*. *Biological Procedures Online*, **18**, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0032-8>
- [6] 林锦莹, 赵兰, 欧阳松应. CRISPR/Cas9: 基因编辑的新时代[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(3): 647-654.
- [7] Zhao, R., Lu, J., Li, Q., *et al.* (2021) Single-Cell Heterogeneity Analysis and CRISPR Screens in MIN6 Cell Line Reveal Transcriptional Regulators of Insulin. *Cell Cycle*, **20**, 1-13. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1969204>
- [8] Yang, G. and Huang, X. (2019) Methods and Applications of CRISPR/Cas System for Genome Editing in Stem Cells. *Cell Regeneration*, **8**, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.cr.2019.08.001>
- [9] 雷恩, 苗明三, 曹艺明, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在病毒感染性疾病研究中的应用[J]. 军事医学, 2021, 45(5): 384-389.
- [10] 邱伟, 周学东, 李明云. 丙氨酸消旋酶的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(2): 228-232.
- [11] Liu, L., Yoshimura, T., Endo, K., *et al.* (1998) Compensation for D-Glutamate Auxotrophy of *Escherichia coli* WM335 by D-Amino Acid Aminotransferase Gene and Regulation of *murI* Expression. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, **62**, 193-195. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.193>
- [12] Datsenko, K.A. and Wanner, B. (2000) One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 6640-6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

- [13] Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., *et al.* (2015) Multigene Editing in the *Escherichia coli* Genome via the Crispr-Cas9 System. *Applied & Environmental Microbiology*, **81**, 2506-2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>
- [14] Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High Efficiency Transformation of *E. coli* by High Voltage Electroporation. *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127-6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>
- [15] 李鑫, 李亚芯, 戴建君. Red 两步同源重组法在大肠杆菌基因敲除中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(7): 1934-1940.
- [16] Mohammad, J.H., Charles, M.T., Dawei, S., *et al.* (2015) Genome Modifications and Cloning Using a Conjugally Transferable Recombineering System. *Biotechnology Reports*, **8**, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.005>
- [17] 许元, 金玉翠, 乐琿. CRISPR 基因编辑的脱靶效应应对策略综述[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(6): 2921-2929.