

Génkiütés λ -Red rekombinációval *Escherichia coli*-ban

Gene Knockout using λ -Red Recombination System in *Escherichia Coli*

Eliminarea genelor în *Escherichia coli* folosind sistemul de recombinare λ -Red

FAZAKAS (IUHASZ) Andrea¹, BODOR Zsolt¹,
KOVÁCS Erika², LÁNYI Szabolcs^{1,2}, ÁBRAHÁM Beáta²

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Kémia és Anyagtudományok Kar,
RO-060042, Bukarest, Splaiul Independenței 313, tel. 4021-402 96 24, fax 4021-402 39 34,
iuhaszandrea@sapientia.siculatorum.ro, www.upb.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda, RO-530104,
Szabadság tér 1, tel. 40-266-31 71 21, fax 40-266-37 20 99, www.sapientia.siculatorum.ro

ABSTRACT

*Industrial biotechnology is an important tool for the production of many commodity and specialty chemicals using microorganisms. Many microorganisms are able to produce industrially important organic compounds, but there are some barriers in the economical production. Metabolic engineering can be used to overcome these problems. The λ -Red recombination system is an efficient method for preparing precisely defined insertions, deletions, and point mutations in the *Escherichia coli* genome. In this study the λ -Red recombination system has been used to knockout the pyruvate formate lyase gene from the *E. coli* genome which was isolated from animal faeces.*

ÖSSZEFOGLALÓ

*Az ipari biotechnológia nagyon fontos eszköz sok alap-, illetve speciális vegyi anyag előállítására mikroorganizmusokkal. Több mikroorganizmus képes iparilag hasznos szerves vegyületek előállítására, azonban a gazdaságos termelésnek van néhány akadálya. Ezen problémák megoldására az anyagcsere mérnökség ad lehetőséget. A λ -Red rekombinációs rendszer egy olyan hatékony módszer, amelynek alkalmazásával pontosan meghatározott beillesztéseket, törléseket illetve pontmutációkat lehet végezni az *Escherichia coli* genomjában. Kutatásunk során λ -Red rekombinációs rendszer alkalmazásával elimináltuk a piruvát-formát liáz génjét állati eredetű fekáliából izolált *E. coli* genomból.*

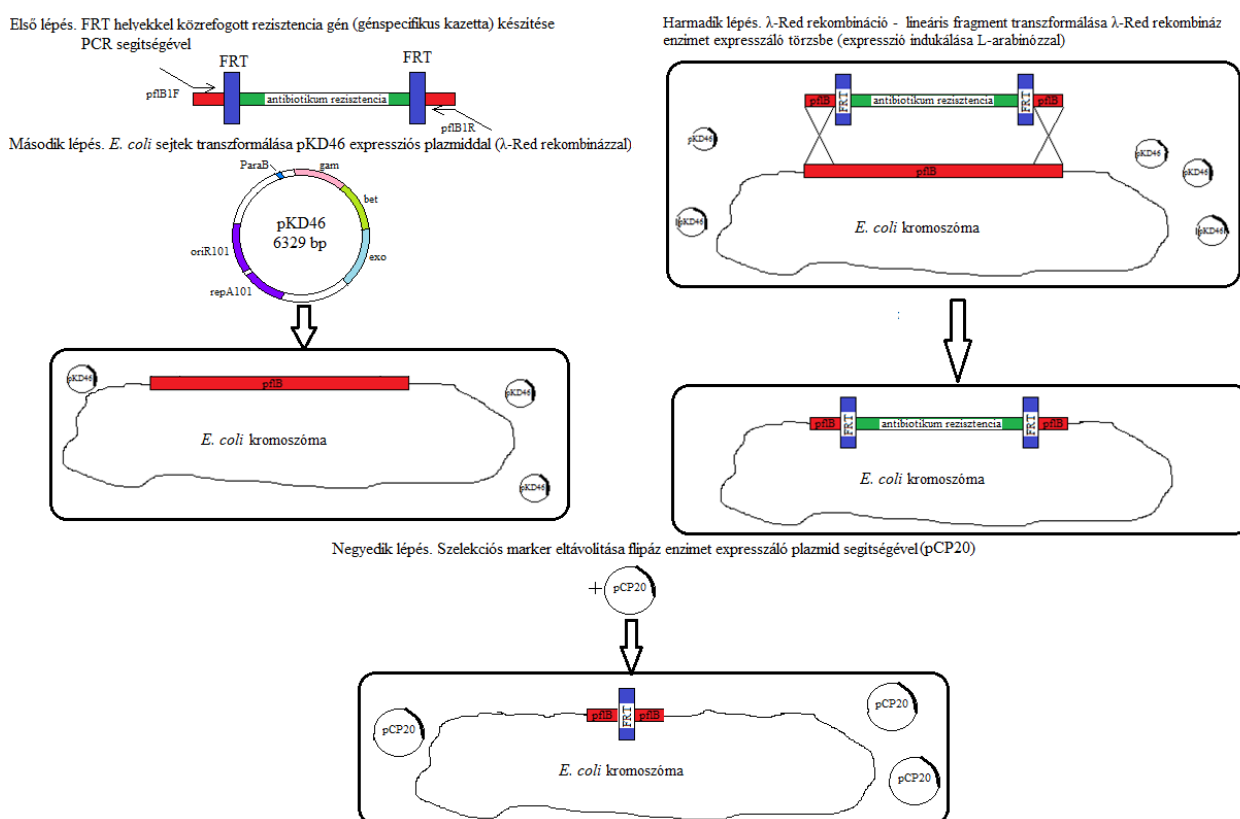
Kulcsszavak: génkiütés, λ -Red rekombináció, *Escherichia coli*, piruvát-formát liáz, anyagcsere mérnökség

1. BEVEZETŐ

Napjainkban számos szerves anyagot biotechnológiai úton állítanak elő, mégpedig fermentációval [1]. Fermentáció során a mikroorganizmusok saját élettevékenységükhöz szükséges energiát termelnek, miközben iparilag hasznos metabolitokat állítanak elő [2]. Viszont ezen anyagok ily módon való gazdaságos előállításának korlátai vannak, mint például az alacsony termelékenység, illetve hozam, problémák a mikroorganizmus nevelési körülményeivel stb. [3] Ezen problémák megoldására az anyagcsere mérnökség ad lehetőséget [1]. Az anyagcsere mérnökség a sejt tulajdonságainak irányított megváltoztatását teszi lehetővé, meghatározott biokémiai reakciók módosításával vagy újak bevezetésével, a rekombináns DNS technológiát felhasználva. Olyan törzsek kialakítása a cél, ahol a kívánt metabolit nagy mennyiségben tudja előállítani a sejt [4].

Ennek megvalósításához új anyagcsere útvonalakat lehet beépíteni a sejtbe, enzimaktivitást lehet növelni, vagy a már meglévő útvonalakat meg lehet változtatni génkiütéssel [3, 5]. A λ -Red rekombinációs rendszer egy olyan hatékony módszer, amelynek alkalmazásával pontosan meghatározott beillesztéseket, törléseket illetve pontmutációkat lehet végezni a sejtek genomjában [6]. A rendszer működéséhez a λ -fág három génjére van szükség: az exo, bet és gam génekre [7].

A génkiütés lépéseit az 1. ábra szemlélteti. Első lépésben egy génspecifikus kazettát kell készíteni, amely polimeráz láncreakció segítségével valósítható meg. Ez a génspecifikus kazetta tartalmaz egy antibiotikum rezisztenciáért felelős szakaszt, amelyet két FRT szakasz (flipáz rekombinááz felismerő helyek) határol. A polimeráz láncreakció során olyan primereket kell használni, amelyek lehetővé teszik, hogy a génspecifikus kazetta végei homológok legyenek az eliminálandó gén két határoló régiójával. A génspecifikus kazetta bejuttatása előtt, a sejteket transzformálni kell egy pKD46 nevű plazmiddal. Ez a plazmid a homológ rekombinációért felelős gént tartalmazza, vagyis a Red rekombinááz részeit (exo, bet, gam). A következő lépés a génspecifikus kazetta bejuttatása a sejtekbe, ami elektroporálás révén valósítható meg. Miután a kazetta bejuttatott a sejtekbe, megtörténik a homológ rekombináció. A génmegszakított törzsek szelektálása antibiotikum tartalmú táptalajon történik, a kazettát alkotó antibiotikum rezisztenciáért felelős szakasznak köszönhetően. A rezisztencia megszüntetéséhez pCP20-as plazmidot lehet alkalmazni, amely egy flipáz enzimet kódol. Ez az enzim felismeri az FRT helyeket és kivágja a köztük lévő génszakaszt, vagyis az antibiotikum rezisztenciáért felelős részt.



1. ábra

Génkiütés lépései λ -Red rekombinációs rendszerrel

Kutatásunk célja, hogy a különböző állati eredetű fekáliákból izolált, és a legjobb glicerinnel hasznosító *Escherichia coli* törzsben alkalmazzunk egy génmódosító technikát, a λ -Red rekombinááz rendszert. A folyamat során a piruvát formát liáz (*pflB*) gént elimináltuk a sejt genomjából, annak érdekében, hogy iparilag hasznos törzset állítsunk elő.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A génspecifikus kazetta elkészítése polimeráz láncreakcióval

A génkiütéshez első lépésben elkészítettük a génspecifikus kazettát polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával, templátként pKD3 plazmidot használva, amely FRT-vel közrefogott kloramfenikol kazettát tartalmaz. Az PCR során alkalmazott oligonukleotidokat OligoExplorer 1.2 programmal terveztük. Ezek a primerek lehetővé tették, hogy a génspecifikus kazetta végei homológok legyenek a *pflB* gén 5' és 3' végével. A forward primer, pflB 1F 5' CGATTTCAGTCAAATCTAATTACATA GATTGAGTGAAGGTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3', a reverse primer, pflB 2R: 5' AGC

TTAATGAAAAGTTAGCCACAGCCTGGGAAGGTTTTACATGGGAATTAGCCATGGTCC 3`.

A PCR sikerességét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, ezt követően PCR tisztító kitt alkalmazásával tisztítottuk a gyártó utasításait követve, és 4°C-on tároltuk a felhasználásig.

Annak érdekében, hogy eltávolítsuk a fel nem sokszorozott DNS-t, a tisztított PCR terméket *DpnI* restrikciós enzimmel emésztettük. Az emésztési reakció során 30 µl tisztított PCR terméket 1U *DpnI* restrikciós enzimmel emésztettünk 1x Tango puffer jelenlétében, 37°C-on 3 órán keresztül. Ezt követően az enzim inaktiválása érdekében a reakcióelegyet 80°C-on 20 percig inkubáltuk, majd a DNS-t 2,5 térfogat jéghideg abszolút etanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t 1 ml jéghideg 70%-os etanollal mostuk, majd a centrifugálás és szárítása után a pelletet felszuszpendáltuk 20 µl desztillált vízzel.

2.2. *E. coli* KCTC2441:pflB null mutáns létrehozása λ-Red rekombinációval

Kémiai kompetens *E. coli* KCTC2441 sejteket készítettünk, a sejtek MgCl₂ és CaCl₂ oldatával való többszöri mosása által, és pKD46-os plazmiddal transzformáltuk, amely a homológ rekombinációért felelős Red rekombinázió géneit tartalmazza (beta, gam és exo). Ezek transzkripciója arabinóz indukálható P_{araB} promotor szabályozása alatt áll.

A transzformáláshoz 100 µl kémiai kompetens *E. coli* sejthez hozzáadtunk 1 µl pKD46 hőrezisztens plazmidot. A transzformációs keveréket 20 percen át jégen tartottuk, majd 1 percre 42°C-ra helyeztük, ezután ismét jégre tettük. Az optimális 37°C-ról 42°C-ra emeltük a hőmérsékletet, mely idő alatt a felületre tapadt plazmidok a fluid membránon keresztül nagyobb valószínűséggel kerülnek a sejt belsejébe. Ezt követően hozzáadtunk 900 µl LB tápoldatot, és ezzel inkubáltuk egy órát 30°C-on rázatva. Végül a transzformálási mixből 100 µl-t ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettünk és 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

Egy telepből kiindulva, amely pKD46 plazmid tartalmú *E. coli* (*E. coli* + pKD46) sejteket tartalmaz, elektrokompetens sejteket készítettünk, a sejtek glicerinnel való mosása által. Az 50 µl elektrokompetensé tett sejtszuszpenzióhoz 1 µl génspecifikus kazettát adunk, 1 percig jégen inkubáljuk, majd a lehűtött elektroporáló küvetkék alá pipettázunk, és az elektroporáló kamrába helyeztük. Az elektroporálás körülményei C=25 µF, PC=200 ohm, V=2,5 kV. Az elektrosokkot követően azonnal 1 ml steril, szobahőmérsékletű SOC tápoldatban szuszpendáljuk a sejteket, és steril Eppendorfba pipettázunk. A felszuszpendált sejteket 37°C-on 2 órán keresztül inkubáljuk 250 rpm-en rázatva. Végül a transzformálási mixből 100 µl-ert szélesztünk kloramfenikol tartalmú LB táptalajra, és 37°C-on inkubáljuk egy éjszakán át a telepek megjelenéséig.

SOC tápoldat elkészítéséhez 100 ml SOB oldathoz hozzáadunk (2 g tripton, 0,5 g élesztőkivonat, 0,2 ml 5 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 90 ml desztillált víz, pH=7, 100 ml-ig kiegészíteni desztillált vízzel, autoklaválás 20 percig 121°C-n) 2 ml steril 1 M glükóz oldatot.

2.3. A piruvát formát liáz gén eliminációjának ellenőrzése PCR-el

A piruvát formát liáz gén megszakítását az *E. coli* törzsben PCR segítségével igazoltuk.

A piruvát formát liáz gén megszakítását a pflB 3F: 5'-AAATCCACTTAAGAAGGTAG GTG -3' és pflB 4R: 5'-TCGTGGAGCCTTTATTGTAC -3' primerekkel végeztük. 4 db *E. coli* null *pflB* telepet ellenőriztünk. A PCR mixbe templátként egy steril fogpiszkáló segítségével jutattuk bele a transzformált telepeket. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük.

A piruvát formát liáz gént eliminált telepeket LB-kloramfenikol tartalmú táptalajra szélesztettük, és 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk a telepek kifejlődéséig, majd ismét ellenőrző PCR-t készítettünk.

2.4. Antibiotikum rezisztencia gén eltávolítása

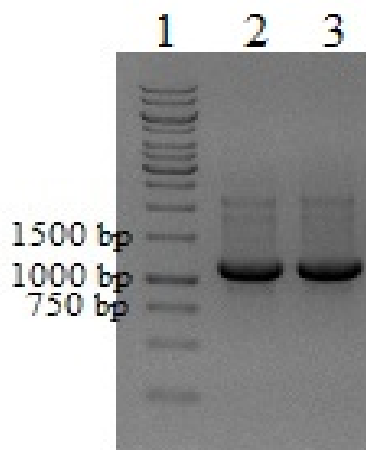
Annak érdekében, hogy eltávolítsuk az antibiotikum rezisztencia gént egy mutáns telepből kiindulva, elektrokompetens sejteket készítettünk, és a sejteket pCP20 hőmérséklet-szenzitív plazmiddal transzformáltuk. A pCP20 egy flipáz nevű enzimet kódol, valamint kloramfenikol rezisztenciáért felelős gént tartalmaz. Ez az enzim felismeri az FRT helyeket és kivágja a köztük lévő génszakaszt, esetünkben az antibiotikum rezisztenciáért felelős szakaszt. A transzformált telepeket egy újabb kloramfenikol táptalajra oltottuk át és 2 napon keresztül 43°C-on inkubáltuk, annak érdekében, hogy a sejtek elveszítsék a plazmidot.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. A génspecifikus kazetta elkészítése polimeráz láncreakcióval

Gének inaktiválása, vagy új gének bevitele egy eukarióta vagy prokarióta sejt genomjába az anyagcseremérnökség segítségével valósítható meg, amelynek során a sejt valamilyen metabolitot nagyobb mennyiségben fog termelni a vad típusú sejthez képest. A piruvát formát liáz gén inaktiválását λ-Red rekombinációval valósítottuk meg, amely homológ rekombináción alapul.

A géniütéshez használt génspecifikus kazettát polimeráz láncreakcióval készítettük el, amelynek eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A 2. ábrán látható, hogy a PCR termék 1100 bp, ami megfelel a génspecifikus kazetta méretének.



2. ábra

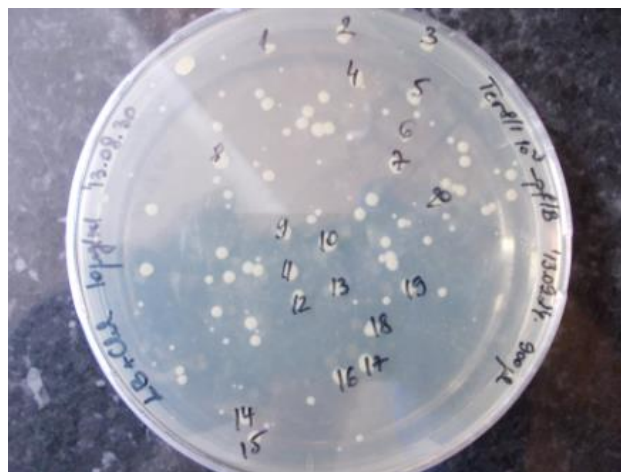
PCR amplifikált génspecifikus kazetta ellenőrzése 1%-os agaróz gélen

1: 1 kb DNS molekulaszúly-marker (Fermentas, 1 µl); 2, 3: piruvát formát liáz génspecifikus kazetta.

3.2. *E. coli* KCTC2441:*pflB* null mutáns létrehozása λ -Red rekombinációval

A génspecifikus kazetta elkészítését követően, *E. coli* kémiai kompetens sejteket hoztunk létre a sejtek kétértékű kationokkal való mosásával, és pKD46 ampicillin rezisztenciáért felelős gént tartalmazó plazmával transzformáltuk. Innen, egy telepből kiindulva, elektrokompetens sejteket készítettünk, amelyekbe elektroporálással bejuttatuk a génspecifikus kazettát. Az elektroporálás eredménye a 3. ábrán látható.

Az antibiotikum tartalmú táptalajon kinőtt telepek arra engednek következtetni, hogy a bakteriális genomon megtörtént a rekombináció, vagyis a *pflB* gén kicserélődött a génspecifikus kazettára a homológ szakaszok mentén.

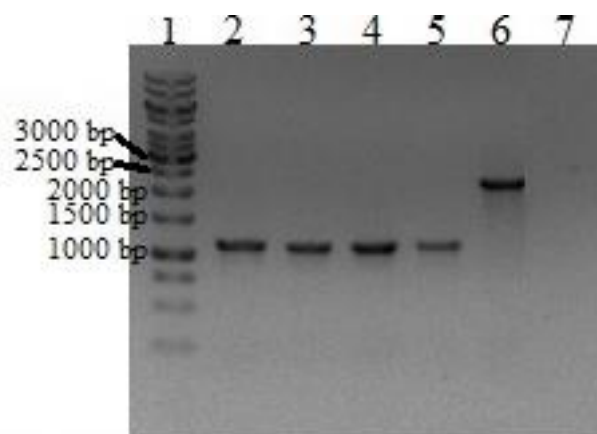


3. ábra

A génspecifikus kloramfenikol kazettát tartalmazó elektroporált sejtek LB-kloramfenikol tartalmú táptalajon

3.3. A piruvát formát liáz gén eliminációjának ellenőrzése PCR-el

A *pflB* gén eliminációjának sikerességét *E. coli* törzsből egy újabb polimeráz láncreakcióval valósítottuk meg, amelynek eredménye a 4. ábrán látható.



4. ábra

A génspecifikus kazetta bejuttatásának ellenőrzése polimeráz láncreakcióval, és a PCR termékek futtatása 1%-os agaróz gélen

1: 1 kb DNS molekulásúly-marker (Fermentas, 1 µl); 2, 3, 4, 5: génspecifikus PCR termékek; 6: az *E. coli* piruvát formát liáz génje; 7: kontroll reakció.

A transzformált telepek közül négyben ellenőriztük le a gén kiütését, kontrollként a vad *Escherichia coli* KCTC2441 törzset használtuk. Az eredmények azt mutatják, hogy sikerült a *pflB* gén cseréje a kloramfenikol kazettára. A második, harmadik, negyedik és ötödik oszlopokban négy telepből kapott PCR termék látható, amelyek mérete megegyezik a génspecifikus kazetta méretével (1100 bp). A 6. oszlopban található kb. 2300 bp nagyságú termék megfelel a vad típusú törzsből felszaporított *pflB* gén méretének (2295 bp). Tehát elmondhatjuk, hogy a transzformált sejtekben a gén helyét a genomban a génspecifikus kazetta vette át.

3.4. Antibiotikum rezisztencia gén eltávolítása

Az antibiotikum rezisztencia gén eltávolítása érdekében pCP20 plazmidot juttattunk a sejtekbe elektroporálással, majd ampicillin tartalmú táptalajon szelektáltuk a plazmidot tartalmazó sejteket. Ezt követően a kinőtt telepeket új lemezre oltottuk át, és 2 napig 43°C-on inkubáltuk. Mivel a pCP20 egy hőmérséklet-szenzitív plazmid, ezért 43°C-on a sejtek elveszítik. Ezt követően a 2 napos telepeket három új lemezre oltottuk át, egy antibiotikum nélküli, egy ampicillin tartalmú és egy kloramfenikol tartalmú lemezre. Amint az 5. ábrán látható, a sejtek csak az antibiotikum nélküli táptalajon fejlődtek. Ez azt jelenti, hogy a génspecifikus kazetta kloramfenikolt kódoló része sikeresen eliminálódott, mivel a telepek nem fejlődtek a kloramfenikol tartalmú táptalajon, és a sejtek elveszítették a pCP20 plazmidot is, mivel már nem rendelkeznek ampicillin rezisztenciával sem.



5. ábra

A mutáns törzs különböző antibiotikum tartalmú táptalajon

A. Antibiotikumot nem tartalmazó LB táptalajon fejlődött telepek.

B. Ampicillint tartalmazó táptalajra oltott mutáns törzs.

C. Kloramfenikolt tartalmazó táptalajra oltott mutáns törzs.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Következtetésként elmondható, hogy sikeresen megvalósítottuk a *pflB* gén kiütését egy izolált *E. coli* törzsben, λ -Red rekombinációs rendszert alkalmazva.

További céljaink közé tartozik, hogy a létrehozott mutáns törzset minimál tápvelesben neveljük, ahol a baktérium sejt szénforrásként glicerint hasznosíthat, és meghatározzuk a termelt metabolitokat kromatográfiás módszerekkel. Ezek mellett további gének kiütését szeretnénk megvalósítani annak érdekében, hogy egy ipari-
lag hasznos *E. coli* törzset alakítsunk ki.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a „Sectoral Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/6/1.5/S/19.”, valamint a "BIOBUILD-Synthesis of some C4, C5 carboxylic acid building block chemicals from renewable biomass resources" PN-II-PCCA-2011-3.2-1367 programoknak az anyagiak biztosításáért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Yu C., Cao Y., Zou H., Xian M., Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89, 573-583
- [2] Hatti-Kaul R., Törnvall U., Gustafsson L., Börjesson P., Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective, *TRENDS in Biotechnology*, 2007, 25 (3), 119-124
- [3] Ch. Thakker, Martínez I., San K.-Y., Benett G.N., Succinate production in *Escherichia coli*, *Biotechnology Journal*, 2012, 7, 213-224
- [4] Stephanopoulos, G., Metabolic fluxes and metabolic engineering, *Metabolic Engineering*, 1999, 1 (1) 1-11
- [5] Th. Willke, Vorlop K.-D., Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 66, 131-142
- [6] Mosberg J.A., Lajoie M.J., Church G.M., Lambda Red Recombineering in *Escherichia coli* Occurs Through a Fully Single-Stranded Intermediate, *Genetics*, 2010, 186, 791-799
- [7] K.A. Datsenko, Wanner B.L., One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *PNAS*, 2000, 97 (12), 6640-6645