

## 重叠 PCR 法构建嗜酸乳杆菌分选酶 A 基因外源打靶片段

何嘉怡<sup>1</sup>, 王文文<sup>1</sup>, 吴京<sup>1</sup>, 潘道东<sup>1,2</sup>, 吴振<sup>1\*</sup>, 曾小群<sup>1</sup>

(1. 宁波大学 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 南京师范大学 食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)

**摘要:** 为比较单步法、分步法重叠 PCR 在构建嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 分选酶 A (*SrtA*) 外源打靶片段的差异性, 设计了 5 对具有 20~25 bp 互补末端的引物, 分别扩增两对上下游同源臂和卡那霉素基因, 先采用分步法、单步法重叠 PCR 构建不含筛选基因的外源打靶片段 *SrtA-up2-SrtA-down2*, 比较两者优劣, 随后取较优者构建含抗生素筛选基因的打靶片段 *SrtA-up1-Kan-SrtA-down1*. 结果显示单步法优于分步法, 非特异性扩增少, 拖尾现象少, 且扩增打靶片段 *SrtA-up1-Kan-SrtA-down1* 条带单一, 无非特异性扩增. 即在构建两种外源打靶片段时, 单步法重叠 PCR 优于分步法 PCR, 为之后构建嗜酸乳杆菌基因打靶载体、构建融合基因打下了基础.

**关键词:** 嗜酸乳杆菌; 外源打靶片段; 单步法重叠 PCR; 分步法重叠 PCR

中图分类号: Q784

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 06-0021-07

嗜酸乳杆菌是一种兼性厌氧, 耐酸性强, 对人和动物肠道有益生功能的微生物菌群<sup>[1]</sup>, 因其具有较好的保健功能: 缓解呼吸道感染、婴幼儿乳糖不耐受等症状<sup>[2-3]</sup>而被广泛应用于乳品、保健品等行业中. Meng 等<sup>[4]</sup>研究证明 *Lactobacillus acidophilus* NCFM 表面蛋白能降低 HT-29 的由 *E. coli* ATCC 43893 和 *S. typhimurium* CMCC 50013 所引发的凋亡率; Othman 等<sup>[5]</sup>研究发现酸奶发酵期间添加嗜酸乳杆菌能够有效抵抗金黄色葡萄球菌的繁殖. 分选酶 A 被普遍认为是管家分选酶, 广泛存在于革兰氏阳性菌如芽孢杆菌、肠球菌、乳杆菌等<sup>[6-7]</sup>中, 其可以识别含 LPXTG 基序的分选酶相关黏附蛋白 (SDPs) 并将其锚定在细胞壁上<sup>[8]</sup>, 因而与菌体的黏附性能<sup>[9]</sup>有关. 为进一步研究分选酶 A, 研究者普遍采用基因敲除对分选酶 A 的功能做进一步探索. Remus 等<sup>[10]</sup>研究发现植物乳杆菌 WCFS1 分选酶 A 缺失株与野生株相比, 丧失了分选酶活力, 无法对 SDPs 蛋白定位而降低了细菌的黏附性; Call 等<sup>[11]</sup>

也表明 *SrtA* 的缺失降低了嗜酸乳杆菌的体外黏附性能.

基因敲除技术指利用特定方法使目标基因缺失或失活, 对染色体进行定点修饰改造, 从而改变细胞遗传特性的生物手段<sup>[12]</sup>. 乳酸菌基因敲除多采用构建环状载体进行单双交换基因敲除<sup>[12-13]</sup>, 包括温敏敲除系统<sup>[14]</sup>、自杀载体敲除系统<sup>[15]</sup>等. 构建外源打靶片段时, 既可设置抗生素抗性基因如 kanamycin<sup>[16]</sup>、spectinomycin<sup>[17]</sup>、chloramphenicol<sup>[18]</sup>为筛选标记, Feraint 等<sup>[15]</sup>融合 D-乳酸脱氢酶基因的上下游同源臂与氯霉素抗性基因, 转入 PJDC9 质粒中, 进行单双交换筛选, 成功构建了 *ldhD* 缺失菌; 也可只含目的基因上下游同源臂<sup>[19]</sup>, Okano 等<sup>[13]</sup>人连接植物乳杆菌 *ldh* 的上下游同源臂至 pGHOST<sup>+</sup>9 中, 成功构建了敲除载体 pGh9-*ldh*. 在一定长度范围内, 同源重组效率与上下游同源臂长度成正比<sup>[14]</sup>.

重叠延伸 PCR 技术 (Splicing by Overlap Extension

收稿日期: 2017-04-10.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金 (31671487, 31471598); 浙江省自然科学基金青年基金 (LQ16C200002); 宁波市富民项目 (2016C10022); 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室开放基金 (ZX2015000928).

第一作者: 何嘉怡 (1992-), 女, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 乳品科学. E-mail: 478809548@qq.com

\*通信作者: 吴振 (1985-), 男, 河南新乡人, 讲师, 主要研究方向: 乳品科学. E-mail: woodsens@163.com

PCR, SOE-PCR)可不需要内切酶消化和连接酶处理,简单快速地拼接多个异源 DNA 片段<sup>[20-21]</sup>,其原理是根据目的基因设计具有互补末端的引物,先独立合成具有重叠序列的待融合片段,随后以片段间的重叠部分互为模板,互相搭桥,形成重叠链,通过重叠链的延伸将扩增片段拼接起来<sup>[22-24]</sup>. Shevchuk 等<sup>[25]</sup>结合重叠 PCR 技术与长片段 PCR 技术,成功构建了 3~20 kb 的 DNA 分子. 王宝利等<sup>[26]</sup>通过此技术成功拼接了 OPG 基因外显子 2 和外显子 3. 重叠 PCR 技术构建融合基因可避免加入连接序列而出现不必要的碱基序列,正确率较高<sup>[21,27]</sup>,因而广泛用于构建基因敲除打靶片段<sup>[28-29]</sup>. 目前对分步法重叠 PCR 研究较多,有采用分步法重叠 PCR 构建外源打靶片段<sup>[28,30]</sup>,构建多位点突变<sup>[31]</sup>,优化分步法重叠 PCR 反应条件<sup>[32]</sup>,但鲜有文章比较单步法与分步法重叠 PCR 的差异性<sup>[33-34]</sup>.

实验以嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 分选酶 A 基因(*SrtA*)为例,设置 5 对具有 20~25 bp 互补重叠的引物,先采用单步法、分步法重叠 PCR 构建不含抗性筛选基因打靶片段 *SrtA*-up2-*SrtA*-down2 并比较两者优劣,之后,取较优者用于构建含抗性筛选基因的打靶片段,为后续构建嗜酸乳杆菌打靶载体、多个 DNA 片段的融合打下了理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, 本实验室保存; PrimeSTAR HS DNA Polymerase、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、pMD18-T 载体用于融合片段的亚克隆及测序分析,购于大连 TAKARA 宝生物公司; DNA 标准分子质量(2 kb DNA ladder, 5 kb DNA ladder, 1.5 kb DNA ladder); DNA 凝胶回收试剂盒、pEASY-blunt Zero 质粒购于北京全式金生物技术有限公司; X-gal(20 mg·mL<sup>-1</sup>)、氨苄青霉素购于北京索莱宝有限公司.

### 1.2 仪器与设备

Multigene Thermal Cycler 型 PCR 仪,美国莱伯特(Labnet)公司; Universal Hood 型凝胶成像系统, Bio-Rad 公司.

### 1.3 方法

1.3.1 *SrtA* 基因上下游同源臂、卡那霉素基因扩增  
设计并合成 3 对引物见表 1(下划线部分为引物之间的碱基重叠序列). 以纯化后的 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 基因组 DNA 为模板,用常规 PCR 法扩增两对不同长度的 *SrtA* 基因上下游同源臂(*SrtA*-up1 与 *SrtA*-down1, *SrtA*-up2 与 *SrtA*-down2),反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 98 ℃

表 1 引物序列

| 待融合片段              | 引物名称         | 引物序列(5' - 3')                    | 扩增长度/bp |
|--------------------|--------------|----------------------------------|---------|
| <i>SrtA</i> -up1   | SrtA-up1 F   | CCTGTTACACCGTTATCT               | 552     |
|                    | SrtA-up1 R   | <u>GATAATCTCATGCCTGACAT</u>      |         |
| <i>SrtA</i> -down1 | SrtA-down1 F | AAACGTAGATCTTTTATGAAG            | 592     |
|                    |              | <u>CACACCGCATCAGGTGGCAC</u>      |         |
|                    | SrtA-down1 R | CTTTCCTTTTATTTTTTATATCCC         |         |
| <i>Kan</i>         | Kan F        | TAAGGGCTATGCCTCACT               | 1 224   |
|                    | Kan R        | ATGTCAGGCATGAGATTATC             |         |
| <i>SrtA</i> -up2   | SrtA-up2 F   | GTGCCACCTGATGCGGTGTG             | 720     |
|                    | SrtA-up2 R   | ATAGTATAGGCAACTCCA               |         |
| <i>SrtA</i> -down2 | SrtA-down2 F | <u>GGGATATAAAAAATAAAAAGGAAAG</u> | 720     |
|                    |              | AAACGTAGATCTTTTATGAAG            |         |
|                    | SrtA-down2 R | CTTTCCTTTTATTTTTTATATCCC         |         |
|                    |              | CTTTGCCAACGTAAACGC               |         |

注: 表中下划线部分为引物之间的碱基重叠序列.

10 s、55 °C 15 s、72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 以质粒 pEASY-blunt Zero 为模板, 采用常规 PCR 程序扩增卡那霉素基因(*Kan*), 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s、55 °C 15 s、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化回收后作为后续重叠 PCR 的模板.

### 1.3.2 单步法构建不含筛选基因的外源打靶片段

测定纯化后的上下游同源臂 *SrtA-up2*、*SrtA-down2* 的浓度, 在 50  $\mu\text{L}$  体系中加入等摩尔比例的待融合片段, PCR 反应体系: 5 $\times$ PrimeSTAR Buffer( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 10  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture(2.5 mM) 4  $\mu\text{L}$ , 引物 *SrtA-up2* F 和 *SrtA-down2* R 各 1  $\mu\text{L}$ , 纯化后的 *SrtA-up2*、*SrtA-down2* 片段各 2  $\mu\text{L}$ , Primer STAR HS DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 29.5  $\mu\text{L}$ . PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s、55 °C 15 s、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测.

### 1.3.3 分步法构建不含筛选基因的外源打靶片段

测定纯化后上下游同源臂 *SrtA-up2*、*SrtA-down2* 的浓度, 在 PCR 体系中加入等摩尔比例的待融合片段, 第一轮 PCR 反应体系: 5 $\times$ PrimeSTAR Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 10  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mM) 4  $\mu\text{L}$ , Primer STAR HS DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ , *SrtA-up2*、*SrtA-down2* 各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 40  $\mu\text{L}$ . 第一轮反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s、50 °C 1 min、72 °C 2 min, 共 10 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 第二轮 PCR: 取出第一轮反应液, 补充 dNTP Mixture (2.5 mM) 2  $\mu\text{L}$ , Primer STAR HS DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ , 引物 *SrtA-up2* F 和 *SrtA-down2* R 各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu\text{L}$ . 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s、56 °C 30 s、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 比较单步法、分步法重叠 PCR 的电泳检测结果, 取较优者, 割胶纯化后连接 pMD18-T 载体, 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单菌落, 送检测序.

### 1.3.4 单步法构建含筛选基因的打靶基因

向 50  $\mu\text{L}$  体系中加入等摩尔比例纯化后的待融合片段(*SrtA-down1* 约 15  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , *Kan* 约 14.5  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), PCR 反应体系为: 5 $\times$ PrimeSTAR Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 10  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mM) 4  $\mu\text{L}$ , 引

物 *Kan* F 和 *SrtA-down1* R 各 1  $\mu\text{L}$ , *SrtA-down1* 1  $\mu\text{L}$ , *Kan* 2  $\mu\text{L}$ , 灭菌水 31  $\mu\text{L}$ . PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s、55 °C 10 s、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测, 割胶回收目的条带, 得到融合片段 *SrtA-down1-Kan*(约 12  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 采用上述 PCR 体系, 只将引物改为 *SrtA-up1* F, *SrtA-down1* R, 模板改为 *SrtA-down1-Kan* 1.5  $\mu\text{L}$ (约 12  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), *SrtA-up1*(约 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s、60 °C 15 s、72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 扩增片段经 1% 琼脂糖电泳检测.

## 2 结果与分析

### 2.1 待融合片段的 PCR 结果分析

以嗜酸乳杆菌 ATCC4356 为模板扩增得到的上下游同源臂片段: *SrtA-up1*(552 bp)和 *SrtA-down2* (592 bp)(图 1(a)), *SrtA-up2*(720 bp)和 *SrtA-down2* (720 bp)(图 1(c)), 从质粒 pEASY-blunt Zero 扩增出的 *Kan* 片段(1 224 bp)(图 1(b)), 在理论大小的位置, 均可以见到单一、明亮的条带.

### 2.2 构建不含筛选基因的打靶片段结果比较分析

单步法、分步法重叠 PCR 终产物, 各取 5  $\mu\text{L}$  凝胶电泳检测, 均能在理论位置得到目的条带(图 2), 约 1 400 bp. 然而, 分步法重叠 PCR(图 2(b))非特异性条带较多, 拖尾现象较严重; 相对而言, 单步法重叠 PCR(图 2(a))因模板延伸与基因的扩增同时进行, 导致拖尾现象较少, 具有较高的特异性. 测定两者纯化后的终产物浓度, 分步法重叠 PCR 产物浓度略高于单步法重叠 PCR. 综合而言, 单步法重叠 PCR 优于分步法 PCR. 将单步法重叠 PCR 终产物割胶纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 随机挑取 6 个单菌落培养, 并菌落 PCR 验证, 将 PCR 验证正确的单菌落送检测序, 并用 NCBI 进行比对, 结果表明 DNA 序列正确.

### 2.3 单步法构建含筛选基因的打靶基因结果分析

鉴于步骤 2.2 的结果, 采用单步法重叠 PCR 构建含筛选基因的打靶片段 *SrtA-up1-Kan-SrtA-down1*. 实验采用两两融合方式, 先将下游同源臂与卡那霉素基因等摩尔比例反应后取 5  $\mu\text{L}$  凝胶电泳检测, 在 2 000 bp 附近有目的条带 *Kan-SrtA-down1*(1 800

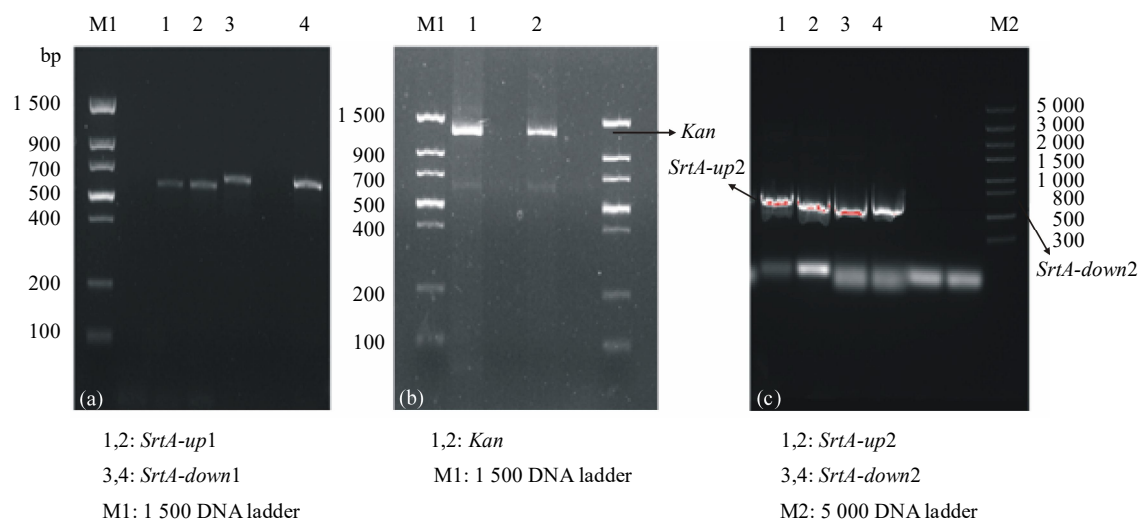


图1 PCR 扩增独立片段

bp 左右), 但同时也存在一些非特异性条带、较严重的拖尾现象. 割胶纯化目的条带, 与纯化后的 *SrtA-up1* 片段等摩尔比例混合, 得到最终的融合片

段(图 3)*SrtA-up1-Kan-SrtA-down1*(大约 2 400 bp), 条带单一, 大小正确, 但拖尾现象严重且浓度较低.

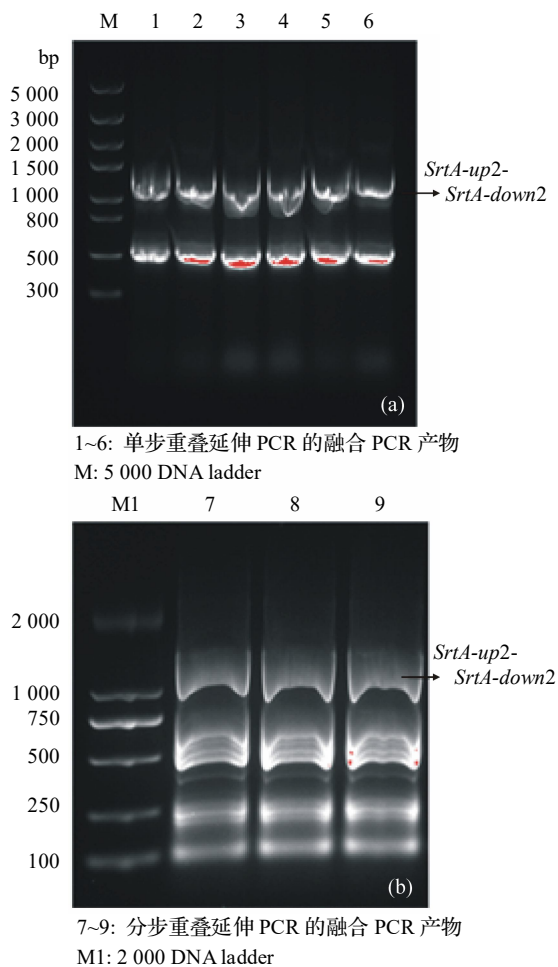


图2 分步法重叠 PCR 与单步法重叠 PCR 结果比较

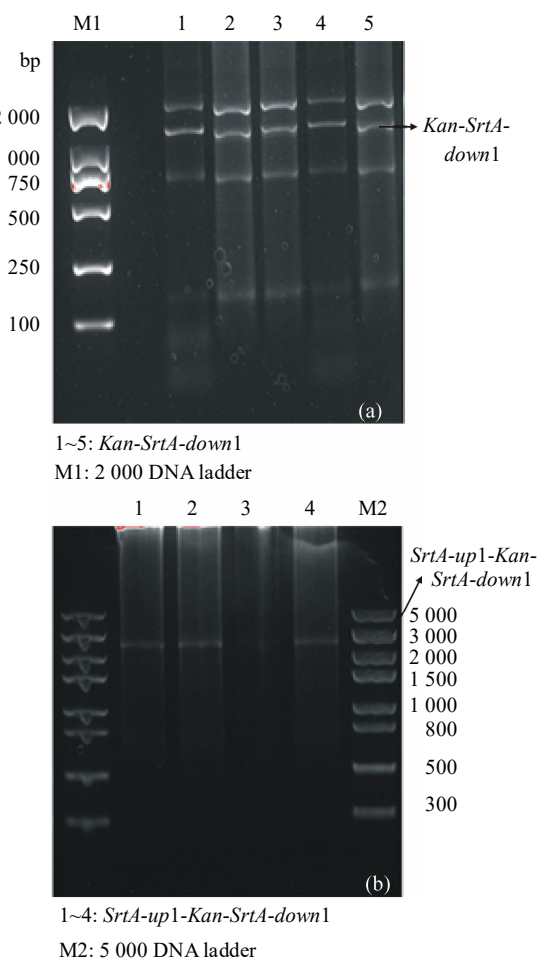


图3 单步延伸 PCR 融合产物

### 3 讨论

重叠PCR可以简单快速地将异源,独立的多个基因片段进行连接<sup>[35]</sup>,步骤简单,Davidson、Kuwayama等<sup>[36-37]</sup>均用此方法成功融合约4kb的DNA长片段,因而多用于构建突变基因、基因敲除等分子领域<sup>[27]</sup>。之前构建基因敲除外源打靶片段多通过酶连法连接各个独立片段,费事费力<sup>[38]</sup>,Zhang等<sup>[39]</sup>也认为采用重叠PCR技术简化了链球菌等位基因置换突变株的构建步骤,同时避免了重复序列的干扰,省时省力。传统重叠PCR为分步法重叠PCR,之前有较多研究采用分步法重叠PCR构建融合基因,定点突变,但也有学者表明采用单步法重叠PCR构建融合基因(DNA长度可达1kb),相对于传统重叠PCR操作更方便,碱基错配率低<sup>[34]</sup>。

本研究首先比较了分步法与单步法重叠PCR在构建嗜酸乳杆菌分选酶A基因外源打靶片段*SrtA-up2-SrtA-down2*的优劣性,结果表明单步法重叠PCR产物虽浓度略低于分步法PCR产物<sup>[33]</sup>,但特异性高<sup>[32,35]</sup>,而且外源打靶片段*SrtA-up1-Kan-SrtA-down1*的扩增单一性更加肯定了单步法重叠PCR更适合多个DNA片段间的融合反应。单步法重叠PCR拼接融合片段,模板用量,退火温度、引物设计、聚合酶的选择等都是影响扩增效率的关键因素。重叠PCR的引物与普通PCR不同之处即为相邻的两对引物之间有碱基重叠区域,研究表明互补序列长度在15~25bp之间,扩增效果较好,大于30bp时容易出现弥散现象<sup>[33]</sup>,且接头区尽量避免A、T以免增加错配率,另外引物的退火温度 $T_m$ 均取接近独立片段的退火温度<sup>[21,40]</sup>,以便融合步骤的顺利进行。重叠PCR虽以PCR为基础,但其为多重扩增,易发生碱基错配,因此一般选择高保真聚合酶而不选用Taq酶<sup>[41]</sup>,而且Taq酶在其PCR产物的3'端添加了一个突出的“A”易造成移码,本实验选用的是Primerstar HS polymerases,此外还有Pfu polymerases<sup>[42]</sup>,KOD HiFi polymerases。Nicholas Harrison等人表明模板浓度对重叠PCR扩增结果的影响较小<sup>[43]</sup>,但融合片段时,传统方法为取模板间的摩尔比例为1:1<sup>[44]</sup>,所以在本研究中,无论是单步法还是分步法,融合反应体系中模板

浓度均以等摩尔比例混合。除此之外,有文献表明引物的浓度也是影响扩增结果的因素,Davidson等人研究表明为获得浓度较高的融合片段,引物的浓度应至少高于模板浓度的10倍<sup>[34]</sup>。

### 4 结论

实验同时采用单步法、分步法重叠PCR,构建不含抗性筛选基因的打靶片段*SrtA-up2-SrtA-down2*,并对这两种重叠PCR法进行比较分析。结果表明,单步重叠PCR扩增非特异性条带少,拖尾现象少,优于分步法PCR,但分步延伸PCR扩增产物浓度略高于单步延伸PCR。综合以上结果,采取单步法重叠PCR构建含筛选基因的打靶片段*SrtA-up1-Kan-SrtA-down2*,电泳显示条带单一,大小正确且无杂带(图3b),因此实验表明融合多个片段,宜采取单步法重叠PCR,为构建乳酸菌敲除载体和多个DNA片段的融合奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 邢海楠,姜颖越,李艳茹,等.不同低聚糖对嗜酸乳杆菌增殖的影响研究[J].延边大学农学报,2014,36(2):155-159.
- [2] LEYER G J, LI S, MUBASHER M E, et al. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children[J]. Pediatrics, 2009, 124(2):e172-e179.
- [3] LALIČIĆ-PETRONIJEVIĆ J, POPOV-RALJIĆ J, OBRADOVIĆ D, et al. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 15:541-550.
- [4] MENG J, ZHANG Q X, LU R R. Surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM inhibit intestinal pathogen-induced apoptosis in HT-29 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96:766-774.
- [5] OTHMAN H E, ABDELSAMEI H M, ABDOL A M, et al. Evaluation the effect of *Lactobacillus acidophilus* probiotic culture over *Staphylococcus aureus* during the production and storage of acidophilus yoghurt[J]. Benha Veterinary Medical Journal, 2017, 32(1):127-131.
- [6] 朱芳.金黄色葡萄球菌分选酶A基因的原核表达、纯化及活性测定[D].广州:华南理工大学,2011.
- [7] 姜利滨,文莹,陈芝.分选酶的研究进展及其在生物技术中的应用[J].生物技术进展,2011,1(3):184-188.

- [8] CALL E K, KLAENHAMMER T R. Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4(3):73.
- [9] 王刚, 吴振, 彭刘杨, 等. 不同 pH 对嗜酸乳杆菌分选酶相关基因表达及菌体黏附能力的影响[J]. *食品工业科技*, 2016(21):166-171.
- [10] REMUS D M, BONGERS R S, MEIJERINK M, et al. Impact of *Lactobacillus plantarum* sortase on target protein sorting, gastrointestinal persistence, and host immune response modulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(3):502-509.
- [11] CALL E K, GOH Y J, SELLE K, et al. Sortase-deficient lactobacilli: Effect on immunomodulation and gut retention [J]. *Microbiology*, 2015, 161(2):311-321.
- [12] 杜胜阳, 王斌斌, 冯佳, 等. 乳酸菌基因敲除技术的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1):244-251.
- [13] OKANO K, ZHANG Q, SHINKAWA S, et al. Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and alpha-amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 75(2):462-467.
- [14] BISWAS I, GRUSS A, EHRLICH S D, et al. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(11):3628-3635.
- [15] FERAIN T, JR J N H, RICHARDSON J, et al. Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(18):5431-5437.
- [16] LIU G, TIAN Y, YANG H, et al. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(6):1855-1866.
- [17] ARNAUD M, CHASTANET A, DÉBARBOUILLÉ M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6887-6891.
- [18] MALLERET C, LAURET R, EHRLICH S D, et al. Disruption of the sole *IdhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-lactate[J]. *Microbiology*, 1998, 144(12):3327-3333.
- [19] 白向阳, 吕安国, 吴文芳, 等. 用改进的重叠PCR引入血管内皮生长因子基因突变[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(2):181-184.
- [20] WARRENS A N, JONES M D, LECHLER R I. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: An improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest[J]. *Gene*, 1997, 186(1):29-35.
- [21] 魏薇, 李凡, 陈海如. 利用重叠延伸 PCR 技术扩增长片段 DNA[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2008, 30(S1):86-88; 93.
- [22] HO S N, HUNT H D, HORTON R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. *Gene*, 1989, 77(1):51-59.
- [23] 李守宇. 重叠延伸PCR技术及其在生物学中的应用[J]. *生物学教学*, 2013, 38(4):65-66.
- [24] JONES M L, BARNARD R T. Chimerization of multiple antibody classes using splice overlap extension PCR[J]. *Biotechniques*, 2005, 38(2):181-182.
- [25] SHEVCHUK N A, BRYKSIN A V, NUSINOVICH Y A, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(2):e19.
- [26] 王宝利, 梁晖, 戴芳, 等. 重叠延伸PCR法在合成人骨保护素 N 端编码序列中的应用[J]. *天津医科大学学报*, 2004, 10(3):343-345.
- [27] 徐芳, 姚泉洪, 熊爱生, 等. 重叠延伸PCR技术及其在基因工程上的应用[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(5):747-750.
- [28] 张念章, 储岳峰, 赵萍, 等. 重叠PCR法构建副猪嗜血杆菌外源打靶基因[J]. *生物技术通报*, 2011(7):186-190.
- [29] 李爽. D-乳酸产生菌株的基因敲除[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [30] 赵莹, 张丽仪, 刘昌政, 等. 植物偏爱密码子优化 HPV18L1 全长基因的重叠PCR合成[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(3):387-392.
- [31] AN Y, JI J, WU W, et al. A rapid and efficient method for multiple-site mutagenesis with a modified overlap extension PCR[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(6):774-778.
- [32] 孟祥平, 杨建英, 乔晓岚, 等. 优化重叠延伸PCR条件构建 BTRCP-CypA 融合基因[J]. *生物技术*, 2013(6): 51-54.
- [33] 张丽丽, 李振军, 李景富, 等. 融合基因构建方法的建立[J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43(1):155-160.
- [34] WU G, WOLF J B, IBRAHIM A F, et al. Simplified gene synthesis: A one-step approach to PCR-based gene construction[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(3):

- 496-503.
- [35] 黄卓. 重叠延伸 PCR(SOE PCR)技术在洛伐他汀九酮合成酶基因克隆中的应用[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [36] DAVIDSON R C, BLANKENSHIP J R, KRAUS P R, et al. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology[J]. Microbiology, 2002, 148(8):2607-2615.
- [37] KUWAYAMA H, OBARA S, MORIO T, et al. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(2):e2.
- [38] 李娅妮, 赵国芬, 包秋华, 等. 植物乳杆菌 lai 基因同源重组敲除载体的构建与鉴定[J]. 农产品加工(学刊), 2014(6):51-53; 59.
- [39] ZHANG S, ZOU Z, KRETH J, et al. Recombineering in streptococcus mutans using direct repeat-mediated cloning-independent markerless mutagenesis (DR-CIMM) [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7:202.
- [40] 李敏, 杨谦. 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法——融合 PCR[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(8):53-58.
- [41] TINDALL K R, KUNKEL T A. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase[J]. Biochemistry, 1988, 27(16):6008-6013.
- [42] TAKAGI M, NISHIOKA M, KAKIHARA H, et al. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11):4504-4510.
- [43] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12):6640-6645.
- [44] WITHERS-MARTINEZ C, CARPENTER E P, HACKETT F, et al. PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A+ T-rich malaria genome[J]. Protein Engineering, 1999, 12(12):1113-1120.

## Construction of exogenous targeting fragments of sortase A from *Lactobacillus acidophilus* by overlap extension PCR

HE Jia-yi<sup>1</sup>, WANG Wen-wen<sup>1</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, PAN Dao-dong<sup>1,2</sup>, WU Zhen<sup>1\*</sup>, ZENG Xiao-qun<sup>1</sup>

( 1.Key Laboratory of Animal Protein Food Deep Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2.Food Science and Nutrition Department, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China )

**Abstract:** To compare the efficiency of one-step and two-step overlap extension PCR in constructing exogenous targeting fragments of sortase A gene (*srtA*) from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, 5 couples of primers with 20–25 bp complementary ends were designed to amplify two pairs of upstream and downstream homologous genes as well as kanamycin resistant gene. Firstly, the exogenous targeting fragment, *SrtA-up2-SrtA-down2*, which included no selective gene, was constructed by one-step and two-step overlap extension PCR respectively. After comparing the advantages and disadvantages of two methods, the exogenous targeting fragment including antibiotic screening gene, *SrtA-up1-Kan-SrtA-down1*, was constructed by the better one. It is found that one-step overlap extension PCR is more efficient than two-step, causing less nonspecific amplification and smearing. Furthermore, the amplification result of exogenous targeting fragment, *SrtA-up1-Kan-SrtA-down1*, suggested no nonspecific amplification. One-step overlap extension PCR is more efficient in constructing the exogenous targeting fragment, which lays a solid foundation on constructing targeting vector of *Lactobacillus acidophilus* and the fusion genes.

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus*; exogenous targeting fragment; one-step overlap extension PCR; two-step overlap extension PCR

( 责任编辑 韩 超 )