**基因敲除方法**

基因敲除方法采用Red重组一步法敲除。操作过程：

**1获得重组片段**

克隆重组片断，设计引物，其中含有200-50bp的敲除目的基因的同源臂和20bp的克隆抗性基因 (kan, 卡那霉素基因；或Cm, 氯霉素基因)。克隆的重组片断采用DpnI内切酶消化处理以去除相应的模板质粒pKD4 或者pKD3； 或者采用琼脂糖凝胶回收纯化重组片断。

**2 电转化感受态细胞的制备**

⑴制备大肠杆菌感受态，转化重组质粒pTKRED (spc抗性), 该质粒为温度敏感性，菌株培养温度为30℃。挑取已转化pTKRED的大肠杆菌单菌落于SOB培养基中30℃，250 rpm过夜培养。

⑵ 转接2%的过夜培养物于新的SOB培养基中，添加200 μl IPTG (0.5 M)，培养2~3h，至OD600≈0.6时开始制备电转化感受态细胞。

⑶ 将菌体转至50 ml 无菌离心管内，冰浴10 min。

⑷ 4℃，4000 rpm离心10 min，弃上清。

⑸ 用0.7 ml无菌的三蒸水重悬菌体，转移至1.5 ml EP管，4℃，12000 rpm离心1 min，弃上清。

⑹ 再用0.75 ml无菌的三蒸水重悬菌体，4℃，12000 rpm离心1 min，，弃上清。

⑺ 重复⑹三次。

⑻ 加入< 50 μl无菌的三蒸水，重悬菌体，电转感受态细胞制备完成。

**3 电转化**

⑴ 吸取10 μl 纯化回收的同源重组片段，加入上述< 50 μl电转化感受态细胞中，混匀，冰浴2 min。

⑵ 将上述混合物转入预冷的无菌的0.2 mm电转杯中，冰浴2 min，擦拭，于电压2.5 kv，电击。

⑶ 迅速加入1 ml 预冷的SOB培养基，37℃，100 rpm恢复培养1h。

⑷ 将所得菌体全部涂布于相应抗生素平板，37℃培养过夜。

**4 阳性克隆的筛选和重组质粒的去除**

⑴ 挑取抗性平板上的单菌落，利用检测引物进行菌落PCR，筛选成功敲除的阳性重组子。

⑵ 挑取阳性克隆接种于LB培养基，42℃培养16小时，划线挑取单菌落分别涂布含有壮观霉素和氯霉素或卡那霉素的LB平板，挑取在壮观霉素平板上不能生长而在氯霉素或卡那霉素平板上可以生长的菌落，即为消除重组质粒pTKRED的大肠杆菌工程菌株。

**5 抗性基因的去除**

将上述消除pTKRED的大肠杆菌菌株按照制备成感受态细胞，将质粒pCP20转入大肠杆菌工程菌株。然后，将携带有pCP20质粒的菌株转接到LB液体培养基中42℃培养12~16小时，划线挑取单菌落，分别涂布氯霉素或卡那霉素平板和无抗性LB平板，获得去除抗性筛选标记的无抗生素抗性的大肠杆菌工程菌株。

参考文献

**Datsenko**， **K. A.**， **and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl.Acad. Sci. U S A. **97:**6640-5.