

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :366 – 371; 4 March 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140383

mariner 转座子 pKKma 的序列分析及转座性能

张翠坤, 石礼涛, 于越, 杨洪江*

工业微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学, 天津 300457

摘要:【目的】本研究针对携带 mariner 转座子的质粒 pKKma, 进行序列分析和功能注释。【方法】根据已知序列设计引物测定质粒序列。构建转座子突变文库, 分析转座子转座效率。【结果】序列分析发现, 质粒 pKKma 全长 6879 bp, 具有 7 个开放阅读框。其中, 阅读框 ORF6 编码 mariner 转座酶 (348 aa), 属于 mariner 转座子 *Himar1* 转座酶的 C9 变种; pKKma 有 2 个相同的 27 bp 的反向重复序列 (inverted terminal repeats); 阅读框 ORF7 为庆大霉素抗性基因 *aacC1*, 位于转座子反向重复序列之间, 与其它 mariner 转座子可转移序列比对发现, 覆盖率仅为 2.0% – 47.7%, 相应同源程度为 3.2% – 99.7%, 可转移序列具有较大差异。转座效率分析显示, 该转座子对于粘质沙雷氏菌的转座效率为 $(3.1 \times 10^{-4}) - (4.8 \times 10^{-4})$, 对于弗氏柠檬酸菌的转座效率为 $(1.3 \times 10^{-3}) - (1.7 \times 10^{-3})$ 。【结论】质粒 pKKma 携带一种新的 mariner 转座子, 可在多种细菌中构建转座子文库, 研究细菌基因的功能。

关键词: mariner 转座子, 测序, 功能注释, 转座效率

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0366-06

转座子是一类可在基因组不同位置间移动的序列。转座子的转移能够导致基因失活、调节基因表达、非常规重组等, 在基因组进化中起了非常重要的作用。作为基因元件, 转座子的插入并不受宿主因素的影响^[1], 它们还能够携带外源基因一起插入新的基因组中。DNA 转座子是分析基因组功能、研究胚胎发育、鉴定疾病中相关的基因和代谢途径以及发现病原菌的致病机制的有用工具。

转座子分为 RNA 转座子 (Class I) 和 DNA 转座子 (Class II)^[2]。大多数的 DNA 转座子通过非复制型机制转移, DNA 转座子含有一个转座酶基因, 两端分别是末端反向重复序列。转座酶识别并剪切反向重复序列, 将转座子 DNA 插入基因组新的位置。

自然中最为广泛分布的是 Tc1/mariner 亚家族, 它的长度一般在 1300 – 2400 bp, 编码 350 aa 左右的转座酶^[3], 具有 30 bp 左右的反向末端重复序列 (ITRs)^[4]。不同的 Tc1/mariner 转座酶的氨基酸序列存在较大差异, 但是它们都含有两个特征性的结构域。氨基末端是一个含有螺旋-转角-螺旋的区域, 负责反向重复序列的识别与结合, 羧基末端是由 3 个氨基酸组成的催化基团^[2]。

实际应用中, mariner 转座子经过了遗传改造, 转座酶被放置在末端重复序列之外, 避免了转座子不稳定的状况^[5]。目前, mariner 转座子广泛应用于基因组功能注释、代谢途径及调控途径的研究。Sandy M Wong 和 John J Mekalanos 构建了 mariner

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31370205)

* 通信作者。Tel: +86-22-60601396; E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

作者简介: 张翠坤 (1990 –), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 从事微生物研究。E-mail: zhangcuikun@126.com

收稿日期: 2014-07-31; 修回日期: 2014-11-05

转座子质粒 pFAC, 验证了铜绿假单胞菌中的必需基因^[6]。Martin Nilsson 等构建了 mariner 转座子质粒 pMN100, 携带温度敏感型复制起始区, 诱变变形链球菌 UA159, 研究了与蔗糖代谢途径相关的基因^[7]。

本实验室保藏有一个质粒携带 mariner 转座子, 具有很高的转座效率, 但转座子的序列未知。本文对质粒进行了测序, 并采用生物信息学方法, 进行了功能注释和同源性分析。另外, 我们还以粘质沙雷氏菌和弗氏柠檬酸菌为受体菌, 构建相应的转座子突变文库, 来检测此转座子的效率, 并采用 genome walking PCR 的方法鉴定了转座子插入的位点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) SM10 λ pir 携带质粒 pKKma, 该质粒上有 mariner 转座子, 插入序列携带庆大霉素抗性基因, 质粒载体携带氨基青霉素抗性。粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) G12 具有四环素抗性^[8], 弗氏柠檬酸菌 (*Citrobacter freundii*) CF-5 具有红霉素抗性。

1.1.2 培养基: LB 培养基, 牛肉膏蛋白胨培养基, 用于接合实验 (mating), 构建转座子突变文库。MH 琼脂 (Mueller-Hinton Agar) 培养基, 用于细菌的抗菌素耐药性的测定。

1.1.3 主要试剂和仪器: 文中所用引物由苏州金维智生物科技有限公司合成; rTaq 酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 庆大霉素、氨基青霉素、红霉素和四环素等抗菌素购自北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司。PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 转座子 pKKma 的序列分析

将菌株 *E. coli* SM10 λ pir/ pKKma 单菌落接种到含有 Gm¹⁰ 的液体 LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜, 利用试剂盒提取质粒 DNA。pKKma 携带庆大霉素基因 *aacC1*, 其余序列信息未知, 因此根据 GenBank 中基因 *aacC1* (*gentamycin acetyltransferase*, CAC14454) 的序列设计 1 对测序引物 GmF 和 GmR, 利用 PCR 方法扩增基因 *aacC1*, 对扩增产物进行双向测序, 验证基因 *aacC1* 的序列。

以质粒 pKKma DNA 为模板, 采用引物 GmF 和 GmR 对质粒 pKKma 进行测序, 根据获得的序列设

计第 2 对测序引物 GmF1 和 GmR1, 继续测序, 直至完成。所有引物序列如表 1 所示, 获得的序列用 DNAMAN 软件拼接^[9]。

表 1. 所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' → 3')	Uses
GmF	ACTTCTCCCGTATGCCCAACT	sequencing
GmR	GGCCCTGACCAAGTCAAATC	sequencing
GmF1	TCGGTCTTGCTTGCTCGTC	sequencing
GmF2	CAGAGCAGGATTCCCGTTGA	sequencing
GmF3	TTCACCTTCAACCCAACACC	sequencing
GmR1	CACGCTTCGGAGACGGTTCA	sequencing
GmR2	CAACTTTATCCGCCTCCATC	sequencing
SP1	TTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGT	genome walking PCR
SP2	ATTACAGTTTACGAACCGAACAGGC	genome walking PCR
SP3	TCATCGGCTCGTATAATGTGTGGA	genome walking PCR
SP4	TCACACAGGAAACAGGAC	sequencing
OPA-01	CAGGCCCTTC	genome walking PCR
OPA-02	TGCCGAGCTG	genome walking PCR
OPA-03	AGTCAGCCAC	genome walking PCR
OPA-04	AATCGGGCTG	genome walking PCR
OPA-05	AGGGTCTCTG	genome walking PCR

1.3 基因功能注释

采用美国国家生物信息中心 (NCBI) 提供的程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 对获得序列的开放阅读框 (ORF) 及 DNA 同源性进行分析, 并使用作图软件 Winplasm 做质粒图谱^[10]。

1.4 分析 pKKma 的转座效率

选择粘质沙雷氏菌 *S. marcescens* G12 和弗氏柠檬酸菌 *C. freundii* CF-5 菌株作为受体菌, 以大肠杆菌 *E. coli* SM10 λ pir/pKKma 为供体菌, 参考文献提供的接合转移方法 (mating)^[11], 将质粒 pKKma 转移至受体菌中, 在转座酶作用下, 转座子的可转移序列插入到受体菌染色体上, 分别构建相应的转座子突变文库, 测定转座子 pKKma 的转座效率。选用 Gm 10 μ g/mL 和 Tc 50 μ g/mL LB 平板, 筛选粘质沙雷氏菌的突变子。选用 Gm 10 μ g/mL 和 Em 50 μ g/mL 的 LB 平板, 筛选弗氏柠檬酸菌突变子。37°C 培养 24 - 48 h, 观察不同培养基上菌落的数量, 计算文库大小和转座效率。转座效率的计算公式为: 转座效率 = 突变子数 / 受体菌数。

1.5 转座子插入位点的鉴定

采用染色体步移技术 (genome walking), 鉴定突变子染色体上转座子的插入位点^[12]。首先根据质粒 pKKma 的序列, 分别设计 3 条同向且退火温度较

高的特异性引物 (specific primer, SP) SP1、SP2、SP3。另外,设计退火温度较低的 5 条随机引物 (arbitrary primer, AP)。按照 TAKARA (宝生物大连生物工程有限公司)提供的 genome walking 试剂盒说明书的步骤,进行三轮热不对称 PCR 反应,扩增产物用 SP4 引物进行测序,获得侧翼序列。

2 结果和分析

2.1 质粒 pKKma 的序列测定

质粒 pKKma 携带庆大霉素抗性基因,根据 GenBank 中 *aacC1* 基因序列 (CAC14454) 设计了引物 GmF 和 GmR,对质粒进行 PCR 扩增,获得了预知大小的片段。结果显示,可以用引物 GmF 和 GmR 对质粒 pKKma 进行测序,测序引物还包括 GmF1、GmF2、GmF3、GmR1 和 GmR2 (表 1)。测序片段经过拼接后,组装成大小为 6879 bp 环状 DNA 分子。

2.2 质粒 pKKma 序列的功能注释

采用 NCBI 的 Blast 工具,在 GenBank 中查找质粒 pKKma 序列的同源序列。结果如表 2 所示,质粒 pKKma 上存在 7 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs)。读码框 ORF6 编码转座酶,大小为

348 aa,与转座子 pZXL5 的转座酶 100% 一致,同属于 mariner 转座子 *Himar1* 转座酶的 C9 变种^[13]。质粒的可转移序列 (Transposable elements) 两端是反向重复序列 (ITRs),ITRs 之间的序列长度为 1788 bp,之间只有一个编码庆大霉素乙酰转移酶的基因,与基因 *aacC1* (CAC14454) 100% 同源,是庆大霉素抗性基因。末端重复片段长度为 27 bp,序列为 5' -ACCGGGGACTTATCAGCCAACCTGTTA-3',在质粒上的位置为 4851-4877 和 6612-6638。

读码框 ORF1 和 ORF2 分别编码与细菌接合转移相关的蛋白 TraI 和 TraJ,它们负责完成接合转移释放,*traK* 基因编码 *oriT* 结合蛋白 TraK。*oriT* 序列是接合转移的起始位点,属于顺式反应元件,序列相对保守,在接合转移过程中起着十分重要的作用。接合反应开始时,TraK 蛋白结合到 *oriT* 序列上,释放酶首先在 *oriT* 序列位点上切开质粒形成缺刻,经过解旋后再切割、转移到受体菌中。读码框 ORF5 为 *bla* 基因,编码 β -内酰胺酶,对氨苄青霉素具有抗性。根据预测的结果,使用 Winplasm 软件制作质粒 pKKma 的物理图谱 (图 1)。质粒 pKKma 的序列已提交到 GenBank,序列接收号为 KJ933396。

表 2. 质粒 pKKma 基因的功能注释

Table 2. Annotation of plasmid pKKma

ORF	Position	Gene	Product	Length/aa	Protein	Identity/%
1	415 - 1041	<i>traI</i>	conjugal transfer relaxase	208	AG064132	100
2	1097 - 1468	<i>traJ</i>	conjugal transfer relaxosome component	123	AA047401	99
3	1502 - 1743	<i>oriT</i>	an origin of transfer	242	EF153732	100
4	1836 - 2333	<i>traK</i>	the <i>oriT</i> binding protein	165	BAJ06614	100
5	2381 - 3241	<i>bla</i>	β -lactamase	286	AAS78499	100
6	3567 - 4613	<i>tnpA</i>	C9 mariner transposase	348	ADJ00075	100
7	5053 - 5586	<i>aacC1</i>	gentamycin acetyltransferase	177	CAC14454	100

2.3 转座子同源分析

我们进一步将 pKKma 质粒与 6 个其它 mariner 转座子质粒功能区进行了对比,结果如表 3 所示。转座酶长度均为 348 aa,相似度为 98.9% - 100%。质粒 pKKma 转座酶的核苷酸序列与 pZXL5 转座酶序列完全一致;pMaEvo、pAW068 和 pSC189 三个质粒转座酶的核苷酸序列与上述序列具有一个碱基的区别,但是编码的转座酶氨基酸序列完全相同;pFNLTP16 H3 编码的转座酶与 pKKma 编码的转座酶具有两个氨基酸的差异,分别为 Gln 131 Arg 和

Glu 137 Lys^[14];pRIE 编码的转座酶与 pKKma 转座酶差异最大,变化了 4 个氨基酸,包括 Gln 131 Arg, Glu 137 Lys, Arg 267 His, Arg 326 Gln^[15]。

ITRs 是转座酶识别和切割的位点,pKKma 的 ITR 长度为 27 bp,质粒 pMaEvo、pAW068 和 pSC189 的 ITR 长度也是 27 bp,但后两者的 ITR 序列却与 pKKma 的 ITR 序列有两个碱基的区别。质粒 pFNLTP16 H3 的 ITR 长度为 29 bp,覆盖率为 93.1%,同源性和为 100%,而 pRIE 的 ITR 长度为 36 bp,覆盖率为 75%,同源性和为 100% (表 3)。

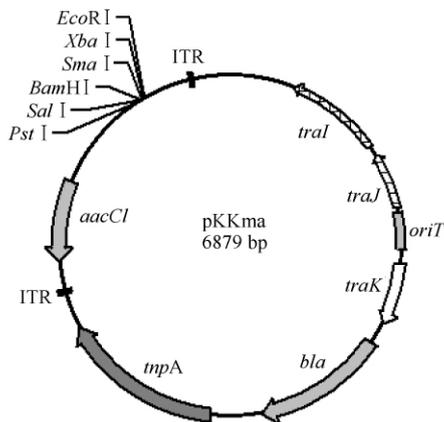


图 1. 质粒 pKKma 物理图谱

Figure 1. The plasmid map of pKKma. ITR: the inverted terminal repeats; *aacCI* encodes gentamycin acetyltransferase; *bla* encodes β -lactamase; *tnpA* encodes C9 mariner transposase; *traK* encodes the *oriT* binding protein; *traI* encodes conjugal transfer relaxase; *traJ* encodes conjugal transfer relaxosome component; *oriT* is an conjugal origin of transfer. The locations and directions of sequencing primers were showed on the figure.

可移动元件是反向重复序列之间的一段序列, 可以插入基因组新的位置造成基因失活等。pMaEvo 的可移动元件长度为 3732 bp, 与 pKKma 的

可移动元件分两段匹配分别为 1-336 bp 和 2277-3732 bp, 匹配度为 99.7%, 抗性标记除了庆大霉素抗性外还具有卡那霉素抗性。除 pMaEvo 外, 其他 5 个质粒的可移动元件与 pKKma 的可移动元件匹配度都很低, 在 3.2% - 11.7%。具有的抗性选择标记也不尽相同(表 3)。

2.4 质粒 pKKma 诱变粘质沙雷氏菌的效率分析

按照材料与方法所述, 将粘质沙雷氏菌作为受体菌, 进行接合 mating 实验。接合后的细菌分别涂布于 $Tc^{50} Gm^{10}$ 平板和 Tc^{50} 平板上, 两种平板上菌落数的比值即为转座效率。粘质沙雷氏菌的转座子 pKKma 突变文库包括约 $(2.1 \times 10^4) - (3.2 \times 10^4)$ 个突变子, 转座效率约为 $(3.1 \times 10^{-4}) - (4.8 \times 10^{-4})$ 。

随机挑选 1 个突变子, 提取相应的基因组 DNA, 利用 genome walking PCR 方法鉴定转座子的插入位点。结果显示, 序列中包括 mariner 转座子末端的序列和反向重复序列, 其余序列在 GenBank 中进行比对分析, 发现转座子插入基因 *glnK* (NC_000913) 的 564 bp 的位置, 该基因编码的蛋白为 nitrogen regulatory protein。

表 3. 携带 mariner 转座子相关质粒对比

Table 3. Comparison analysis of the related plasmids carrying mariner transposons

Plasmid	Accession No.	Transpose		ITR sequence		Mobile element		
		N. S.	P. S.	Length	N. S.	Coverage / %	Homology / %	Marker
pKKma	KJ933396	0	0	27	0	100	100	Gm
pZXL5	JQ088279	0	0	79/100 ^a	52/73	2.7	3.2	Gm
pMaEvo	HMO49182	1	0	27	0	47.7	99.7 ^b	Km & Gm
pAW068	EU146228	1	0	27	2	2.0	3.7	Sp
pSC189	AY115560	1	0	27	2	2.9	3.7	Km
pFNLTP16 H3	DQ236098	5	2	29	2	2.3	3.2	Neo
pRIE	JQ638951	9	4	36	9	10.0	11.7	Rif

N. S. represents the difference between nucleotides. P. S. represents the amino acid difference. Gm: gentamicin; Km: kanamycin; Sp: streptomycin; Neo: Neomycin; Rif: rifampin. a: the length of the inverted sequences is 79 bp and 100 bp, respectively. b: The mobile element of pKKma covers two separate regions of the 3732 bp fragment, 1-336 bp and 2277-3732 bp, respectively.

2.5 质粒 pKKma 诱变弗氏柠檬酸菌的效率分析

按照材料与方法所示, 将弗氏柠檬酸菌作为受体菌进行接合转移实验。供体菌与受体菌接合后分别涂布于抗性平板 $Em^{50} Gm^{10}$ 和 Em^{50} 上。培养后进行菌落计数, 前者为转座子插入的突变子数, 后者为受体菌数, 二者的比值即为转座效率。结果显示, 转座子突变文库约包括 $(6.3 \times 10^4) - (8.0 \times 10^4)$ 个

突变子, 转座效率约为 $(1.3 \times 10^{-3}) - (1.7 \times 10^{-3})$ 。

随机选取 1 个突变子, 提取基因组 DNA, 利用 genome walking PCR 方法鉴定转座子的插入位点。结果显示, 获得的序列与 *C. freundii* CFNIH1 中 *lacI* (CP007557) 基因的同源性为 94%, mariner 转座子插入了 *lacI* 的第 240 bp 处。突变导致了乳糖操纵子抑制蛋白 LacI 失活, 将突变子在含有 x-gal 的 LB

平板上划线,培养后菌落为蓝色,乳糖酶活性有了显著提高,从另一个侧面证实了 genome walking 鉴定的突变位点。

3 结论

转座子随机插入的方法,可以用于细菌的遗传调控和代谢途径的研究。Koehler^[16], Welkos^[17] 等曾经使用转座子突变的方法,鉴定炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*) 中的毒性调控因子。Mariner 类型的转座子插入位点更具随机性,且受受体菌内源性转座子的影响较小^[18]。

本研究对实验室保藏菌株 *E. coli* SM10λpir 中 mariner 质粒进行了测序、功能注释以及转座子效率检测。测序得到了长度为 6879 bp 的 pKKma 质粒完整序列。经同源性分析,转座酶 *tnpA* 属于 mariner 转座子 Himar1 转座酶 C9 变种^[12]。末端反向重复序列 (ITR) 长度为 27 bp, 序列为 ACCGGGGACTT ATCAGCCAACCTGTTA。将 pKKma 与 6 个其他携带 mariner 转座子的质粒对比,转座酶的同源性在 98.9% - 100%, 反向重复序列有 0 - 9 个碱基的差异,而可转移序列之间的覆盖率仅为 2.0% - 47.7%, 相应同源程度为 3.2% - 99.7%。因此,可认为 pKKma 是一个新的 mariner 转座子。

Izsvak 等发现转座子每增加 1 kb, 转座效率会降低 30%^[19]。pKKma 两个 ITRs 之间即可转移序列长度为 1788 bp, 只含有一个 ORF, 即 *gentamycin acetyltransferase* (*aacC1*), 负责编码庆大霉素抗性。既具有选择标记, 又将转座子可转移序列控制在了很短, 某种程度上保证了转座效率。

本实验分别构建了粘质沙雷氏菌 (*S. marcescens*) 和弗氏柠檬酸菌 (*C. freundii*) 的转座子突变文库。对于这两种受体菌的转座效率分别为 $(3.1 \times 10^{-4}) - (4.8 \times 10^{-4})$ 和 $(1.3 \times 10^{-3}) - (1.7 \times 10^{-3})$ 。

参考文献

[1] Jaillet J, Genty M, Cambefort J, Rouault JD, Gouillou CA. Regulation of mariner transposition: the peculiar case of Mos1. *PLoS One*, 2012, 7 (8) : e43365.

[2] Lorite P, Maside X, Sanllorente O, Torres M, Periquet G, Palomeque T. The ant genomes have been invaded by

several types of mariner transposable elements. *Naturwissenschaften*, 2012, 99 (12) :1007-1020.

[3] Hartl DL. Discovery of the transposable element mariner. *Genetics Society of America*, 2001, 157 (2) : 471-476.

[4] Kumaresan G, Mathavan S. Molecular diversity and phylogenetic analysis of mariner-like transposons in the genome of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13 (3) : 259-271.

[5] Muñoz-López M, García-Pérez JL. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current Genomics*, 2010, 11 (2) : 115-128.

[6] Wong SM, Mekalanos JJ. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 (8) : 10191-10196.

[7] Nilsson M, Christiansen N, Høiby N, Twetman S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. A mariner transposon vector adapted for mutagenesis in *Oral streptococci*. *Microbiology Open*, 2014, 171 (3) : 1-8.

[8] Shi L, Gao S, Yu Y, Yang H. Microbial production of 2, 3-butanediol by a newly-isolated strain of *Serratia marcescens*. *Biotechnology Letters*, 2014, 36 (5) : 969-973.

[9] Abdallah KS, Cao Y, Wei D. Epidemiologic investigation of extra intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) based on PCR phylogenetic group and fimH single nucleotide polymorphisms (SNPs) in China. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2011, 2 (4) : 339-353.

[10] Wu Q, Bai L, Liu W, Li Y, Lu C, Li Y, Fu K, Yu C, Chen J. Construction of a *Streptomyces lydicus* A01 transformant with a chit42 gene from *Trichoderma harzianum* P1 and evaluation of its biocontrol activity against *Botrytis cinerea*. *Journal of Microbiology*, 2013, 51 (2) : 166-173.

[11] Wang J, Mushegian A, Lory S, Jin S. Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by in vivo selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93 (19) : 10434-10439.

[12] Leoni C, Gallerani R, Ceci LR. A genome walking strategy for the identification of eukaryotic nucleotide sequences adjacent to known regions. *Short Technical Reports*, 2008, 44 (2) : 229-235.

[13] Zhang X, Paganelli FL, Bierschenk D, Kuipers A, Bonten MJ, Willems RJ, van SW. Genome-wide

- identification of ampicillin resistance determinants in *Enterococcus faecium*. *PLoS Genetics*, 2012, 8 (6): e1002804.
- [14] Maier TM, Pechous R, Casey M, Zahrt TC, Frank DW. In vivo *Himar1*-based transposon mutagenesis of *Francisella tularensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (3): 1878-1885.
- [15] Welch MD, Reed SC, Lamason RL, Serio AW. Expression of an epitope-tagged virulence protein in *Rickettsia parkeri* using transposon insertion. *Plos One*, 2012, 7 (5): e37310.
- [16] Koehler TM, Dai Z, Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (3): 586-595.
- [17] Welkos SL. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pX01-) *Bacillus anthracis*. *Microbial Pathogenesis*, 1991, 10 (3): 183-198.
- [18] Wilson AC, Perego C, Hoch JA. New transposon delivery plasmids for insertional mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71 (3): 332-335.
- [19] Krol JE, Rogers LM, Krone SM, Top EM. Dual reporter system for in situ detection of plasmid transfer under aerobic and anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (13): 4553-4556.

Characterization of a mariner transposon pKKma

Cuikun Zhang, Litao Shi, Yue Yu, Hongjiang Yang*

Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology; Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] This study was aimed at sequence analysis and function annotation of plasmid pKKma carrying a mariner transposon. [Methods] Primers were designed based on the partial known sequence and used for directly sequencing plasmid pKKma. Transposon mutagenesis libraries were constructed to analyze the mutagenesis efficiency of plasmid pKKma. [Results] pKKma comprises 6879 bp with 7 open reading frames (ORFs). Among them, ORF6 encodes a mariner transposase of 348 amino acids (aa), a C9 variant of *Himar1* type transposase. Two inverted terminal repeats (ITRs) are identified and of 27 bp each. ORF7 encodes gentamycin resistance gene *aacC1*, locating between two ITRs. Transposable sequence alignment with other mariner transposons shows that the coverage is 2.0% - 47.7% and the homology is 3.2% to 99.7%. The result indicates pKKma is significantly different from the other vectors with mariner transposon. The transposition efficiency is also analyzed. It's $(3.1 \times 10^{-4}) - (4.8 \times 10^{-4})$ for *S. marcescens* and $(1.3 \times 10^{-3}) - (1.7 \times 10^{-3})$ for *C. freundii*, respectively. [Conclusion] pKKma carries a new mariner transposon and could be used to study the role of genes by constructing transposon libraries in bacteria.

Keywords: mariner, sequencing, annotation, transposition efficiency

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31370205)

* Corresponding author. Tel: +86-22-60601396; E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

Received: 31 July 2014/ Revised: 5 November 2014