

利用 Tn5 定位诱变筛选紫云英根瘤菌 Exo⁻变种

周蓓芸 黄建斌 粟文英 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 利用 Tn5 定位诱变方法,对质粒 pJB-B5 进行 Tn5 插入诱变,得到 10 个 Tn5 在 5.9kb B5 外源片段上有不同插入位点的质粒 TN1-1, TN1-12, TN2-2, TN2-3, TN3-1, TN4-1, TN9-1, TN10-1, TN13-1, TN14-1。将 Tn1-1 等分别转移到已经含有不相容质粒 pPH1JI 的紫云英根瘤菌 107 菌株中,使之发生同源交换。通过抗性选择及表型鉴别,筛选到 3 株菌落表型干燥(Muc⁻)的酸性胞外多糖(EPS)合成缺陷菌株(Exo⁻)107(TN2-2), 107(TN10-1), 107(TN13-1)。Southern 杂交分析证明这 3 株变种的 Tn5 插入确实是同源交换而不是转座产生,表明经过适当改良的 Tn5 定位诱变法可以应用于紫云英根瘤菌 Exo⁻变种的筛选。

关键词 Tn5 定位诱变, Exo⁻变种筛选, 紫云英根瘤菌

学科分类号 Q939.44

Tn5 作为一个经典的转座子^[1], 广泛应用于基因的诱变分析中。Tn5 诱变可分为随机诱变和定位诱变两种^[2]。随机诱变是将带有 Tn5 的自杀质粒(Suicide plasmid)利用转化, 转染, 接合等手段导入受体菌中, 通过 Tn5 携带的抗性选择及表型分析筛选 Tn5 插入突变变种的一种方法。Tn5 定位诱变^[3]是对克隆于质粒内的目的 DNA 片段进行 Tn5 插入, 经过同源交换, Tn5 标记被转移到野生型菌株的相应基因位点上, 再通过表型分析筛选变种的一种方法。与随机诱变相比, 定位诱变得到的变种已经确定了基因失活所在的部位, 因此更适合于基因的精细结构分析。目前, 这一方法已在根瘤菌 nod, exo, nif 基因的定位分析中得到应用^[4-6]。

紫云英根瘤菌(*Rhizobium huakuii*)是我国特有的温带快生型菌种, 分泌大量的酸性胞外多糖(EPS), 在 BMM 固体培养基上菌落呈粘液光滑型(Muc⁺)。已证明 EPS 在根瘤菌侵染宿主植物形成有固氮活性根瘤等过程中有重要作用^[7,8], 因此探明控制 EPS 合成有关的 exo 基因位点, 将有助于深入了解 EPS 在共生固氮体系中的合成, 调节及作用机理。龙北国等^[9]利用 Tn5 随机诱变方法, 从紫云英根瘤菌 107 中分离到一批 Exo⁻变种。对这些变种的 Tn5 插入位点确定, 相应的野生型 exo 基因克隆, 序列分析正在进行中^[10,11]。EPS 合成是一个复杂的过程, 有许多基因参与且这些基因是成簇存在的^[10], 因此, Tn5 定位诱变法可用来探明已克隆 DNA 片段是否含有 exo 基因位点, 但至今未见这一方法在紫云英根瘤菌中应用。本实验改进 Tn5 定位诱变操作技术, 对位于质粒 pJB-B5 上的 B5 外源片段作 Tn5 插入诱变, 筛选得到 3 株 EPS 合成缺陷突变体。

国家攀登计划资助项目。

收稿日期:1996-12-16, 修回日期:1997-07-07。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

实验所用菌株与质粒见表 1

表 1 菌株及质粒
Table 1 The bacteria and plasmid

Strains and plasmids	Description	Source and reference
<i>E. coli</i>		
HB101	pro. leu. thi. lac Y. Sm ^r , endoI ⁻ recA ⁻ , hsrk ⁻ . hsmk ⁻	
S17-1	294 recA, chrom, RP4 derivative	[12]
MT614	MT607 mal ⁺ ::Tn5 Km ^r	[13]
C2110	his, pha, polA, Nal ^r	[14]
<i>R. huakuii</i>		
107	wild type, Exo ⁺ Rif	This laboratory
Plasmid		
pRK600	Cm ^r , pRK2013 Nm ^r ::Tn9	[15]
pPH1JI	Gm ^r , Sp ^r , Sm ^r , IncP plasmid	[16]
pJB-B5	Tc ^r , pRK415 carrying 5.9kb BamHI fragment from exoR ⁻ -11	This laboratory
pJB-5a	Tc ^r , pRK415 carrying 2.6kb BamHI-PstI fragment from B5	This laboratory
pJB-5b	Tc ^r , pRK415 carrying 2.5kb PstII - PstI fragment from B5	This laboratory
pJB-5c	Tc ^r , pRK415 carrying 0.8kb BamHI - PstI fragment from B5	This laboratory
exoR ⁻ -11	Km ^r , Tc ^r , constructed from mutant NA-11	[9]

1.2 培养方法

根瘤菌生长培养基为 TY, Muc⁺ 及 Muc⁻, 鉴别培养基为 BMM^[17], 培养温度 28℃, 大肠杆菌培养基 LB, 培养温度 37℃。根据实验添加不同的抗生素, 如: 四环素(Tc); 卡那霉素(Km); 新霉素(Nm); 萘丁酸(Nal); 利福霉素(Rf); 壮管霉素(Sp); 庆大霉素(Gm); 氯霉素(Cm)。

1.3 双亲本杂交

取供体菌 S17-1(pJB-B5)及受体菌 MT614(mal⁺::Tn5)培养液(LB, 37℃, 16-24h)各 200μl 于 Eppendorf 管内, 离心去上清。把菌体混匀滴加在 LB 培养基上(不加抗生素)吹干, 37℃ 培养过夜。从杂交斑内挑一接种环细胞在 LB(Km 50μg/ml, Tc 20μg/ml)培养基上划线 37℃ 培养 1d, 得到菌株 MT614(pJB-B5::Tn5)。

1.4 三亲本杂交

1.4.1 筛选在质粒 pJB-B5 外源片上有 Tn5 插入的菌株: 取供体菌 MT614(pJB-B5::Tn5), 受体菌 C2110 及助质粒 HB101(pRK600)(LB, 37℃, 16-24h)各 200μl 于 Eppendorf 管中, 离心去上清。把菌体混匀滴加在 LB 培养基上(不加抗生素)吹干, 37℃ 杂交过夜。从杂交斑内挑几环菌体制成悬液, 稀释涂布在 LB(Nal 10μg/ml, Km 200μg/ml, Tc

20 μ g/ml)培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养。将得到的单菌落 C2110(pJB-B5::Tn5)在同样培养基上点种培养作质粒抽提用。

1.4.2 在野生型 107 菌株中导入不相容质粒 pPH1J1: 取供体菌 HB101(pPH1J1)及助质粒 HB101(pRK600)(LB, 37 $^{\circ}$ C, 16~24h)各 200 μ l 离心去上清,用 200 μ l TY 培养基悬浮菌体再离心去上清,加 400 μ l 受体菌紫云英根瘤菌 107 菌株(TY, 28 $^{\circ}$ C, 48h)离心去上清。把菌体混匀滴加在 TY 固体培养基上(不加抗生素)吹干后,28 $^{\circ}$ C 杂交 12h。从杂交斑中挑一接种环菌在 TY (Rif 50 μ g/ml, Gm 50 μ g/ml)上划线,28 $^{\circ}$ C 培养得到菌株 107 (pPH1J1)。

1.4.3 筛选 Exo⁻ 变种: 取供体菌 C2110(pJB-B5::Tn5),助质粒 HB101(pRK600)(LB, 37 $^{\circ}$ C, 16~24h)各 200 μ l 离心去上清,与受体菌 107(pPH1J1)杂交,其余步骤如 1.4.2。从杂交斑内挑几环菌制成悬液,稀释涂布于 BMM(Rif 50 μ g/ml, Gm 50 μ g/ml, Nm 25 μ g/ml)培养基上,选取表型干燥的 Exo⁻ 突变株 107(pJB-B5::Tn5)。

1.5 DNA 操作

质粒抽提,酶切电泳, DNA 片段回收, Southern 转移杂交均参见分子克隆一书^[18]。

2 结 果

2.1 Tn5 插入诱变质粒 pJB-B5

pMN2 是一个广宿主可自行转移的质粒,有很强的染色体转移能力,能整合宿主菌大片的染色体或质粒 DNA 形成类似于 F' 的杂合质粒,称为 R' 质粒。龙北国等^[9]利用 pMN2 从紫云英根瘤菌 EPS 合成缺陷变种 NA-11 构建到一个嵌合质粒 exoR'-11,可互补多种变种恢复 EPS 合成能力,其整合的外源片段含有 Tn5 及 Tn5 插入位点附近的 DNA 片段。exoR'-11 的部分物理图谱如图 1,其中 5.9kb BamHI 片段(B5)被克隆于 pRK415 上得到质粒 pJB-B5。用 Tn5 插入诱变质粒 pJB-B5,通过酶切分析选取 Tn5 在 B5 外源片

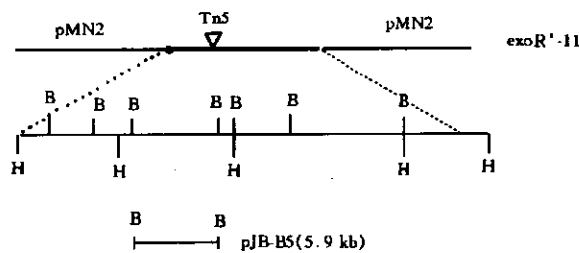


图 1. exoR'-11 中外源片段的部分酶切图谱

Fig. 1 Physical map of the inserted DNA of exoR'-11

Abbreviation: H, Hind III, B, BamHI

段上有不同插入位点的质粒,操作步骤如下:(1)转化 pJB-B5 到菌株 S17-1 中得到 S17-1 (pJB-B5)。(2)S17-1(pJB-B5)×MT614(mal::Tn5)双亲本杂交得到菌株 MT614(pJB-B5::Tn5)。(3)MT614(pJB-B5::Tn5)×HB101(pRK600)×C2110 三亲本杂交筛选得到单菌落命名 C2110(pJB-B5::Tn5)₁……C2110(pJB-B5::Tn5)_n。

抽提质粒 pJB-B5::Tn5_{1-n}, 用 BamHI 酶切, 经电泳分析筛选得到 10 个 Tn5 在 B5 外源片段上有不同插入位点的质粒, 分别命名为 TN1-1, TN1-12, TN2-2, TN2-3, TN3-1, TN4-1, TN9-1, TN10-1, TN13-1, TN14-1 (图 2), 相应的菌株命名为 C2110(TN1-1), C2110(TN1-12), C2110(TN2-2), C2110(TN2-3), C2110(TN3-1), C2110(TN4-1), C2110(TN9-1), C2110(TN10-1), C2110(TN13-1), C2110(TN14-1)。及时用 15% 甘油低温保藏这些菌株, 因为 C2110 在 4℃ 存活仅 20d 左右。

2.2 Tn5 在 B5 外源片段上的插入位点分析

载体 pRK415 多克隆位点上邻近 BamHI 处有 HindIII 单酶位点, Tn5 内有两个 HindIII 位点, B5 片段内无 HindIII 酶切位点, 因此用 HindIII 酶切质粒 Tn1-1 等可计算 10 个质粒中 Tn5 在 B5 片段内的插入位点(图 2)。

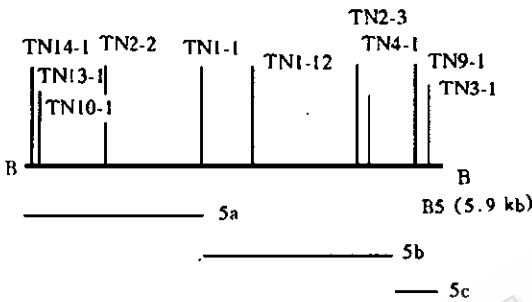


图 2 Tn5 在质粒 TN1-1 等 B5 外源片段上的插入位点

Fig. 2 Insertion site of Tn5 in B5 fragment of plasmid TN1-1

2.3 Tn5 定位插入到紫云英根瘤菌野生型 107 菌株中

用三亲本杂交法将 TN1-1 等质粒结合转移至 107(pPH1J1)后, TN1-1 等与 107 基因有同源交换发生(图 3)。由于 pPH1J1 与 TN1-1 不相容, 用 Nm (来自 Tn5)及 Gm(来自 pPH1J1)抗性选择得到的结合子失去 pRK415 为 Tc^r。如果 Tn5 恰好插入在与 EPS 合成有关的基因中, 则同源交换后就会产生 Exo⁻菌株(图 4a. b. c.), 菌落呈 Muc⁻。结果发现用 BMM 培养基筛选

107(TN1-1)等菌株时, 先有 Muc⁺ 菌落产生, 在此背景下如有 Muc⁻ 变种产生一般在第 10~12d。继续培养则不会有新的 Muc⁻ 菌落产生。因为变种菌落干燥致密难分散, 故需经过多次单菌分离才能将其从 Muc⁺ 菌落中分纯。纯化培养基宜用 BMM(Rif 50μg/ml, Gm 50μg/ml, Km 50μg/ml)。实验结果获得 3 株 Exo⁻ 变种 107(TN2-2), 107(TN10-1), 107(TN13-1), 其相应的供体质粒分别为 TN2-2, TN10-1, TN13-1。

2.4 Southern 杂交验证

用以上方法得到的 Exo⁻ 变种除了是同源交换产生外还可能是 Tn5 转座引起。抽提 3 株 Exo⁻ 变种 107(TN2-2), 107(TN10-1), 107(TN13-1)的总 DNA, 用 BamHI 酶切电泳, Southern 转移, 用³²P 标记的 B5 片段作探针进行杂交。结果如图 4d, 107 菌株只有 5.9kb 的杂交带, 而 107(TN2-2), 107(TN10-1), 107(TN13-1)菌株均为两条杂交带, 且大小与相应质粒 TN2-2, TN10-1, TN13-1 经 BamHI 后的大小相等(图略)。说明变种有 Tn5 插入且此插入确实是同源交换引起。

2.5 互补试验

将 pJB-B5 及 pJB-5a(图 2)转移到 Exo⁻ 变种 107(TN2-2), 107(TN10-1), 107(TN13-1)中, 能使变种恢复 EPS 合成, 菌落呈 Muc⁺, 而有 Tn5 插入的质粒 TN2-2, TN10-1, TN13-1 及 pJB-5b, pJB-5c 则不能恢复变种的产多糖表型。同样, B5 及 5a 片段也能恢复

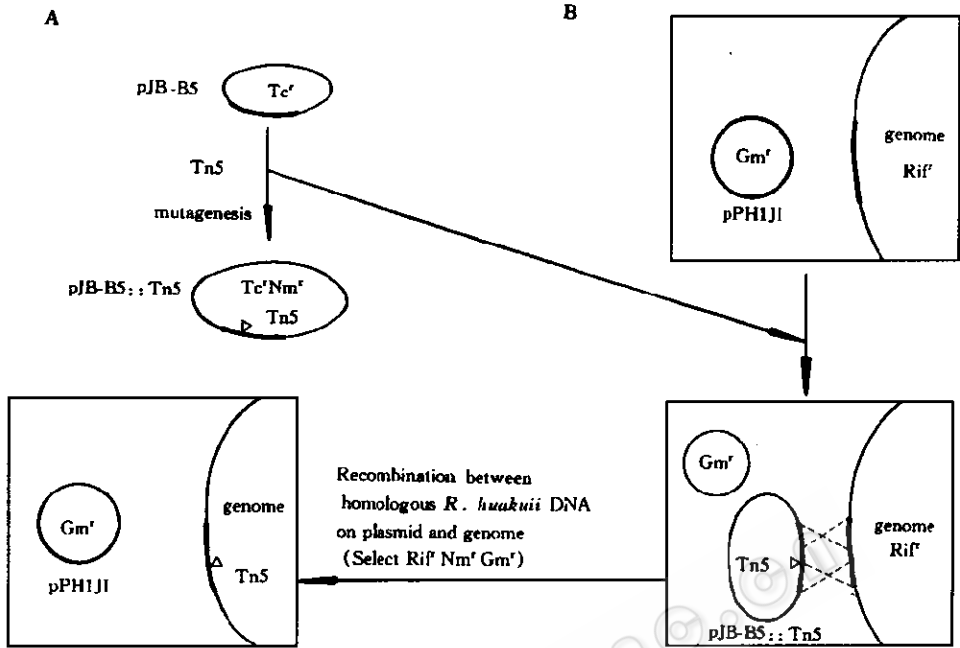


图 3 Tn5 定位诱变法示意图

Fig. 3 Outline of experimental strategy of Tn5 region-directed mutagenesis

a. Mutagenesis of pJB-B5 with Tn5, b. Selection of *R. huakuii* strains in which the $exo::Tn5$ mutants had recombined in the genome

龙北国^[9]用 Tn5 随机诱变得到的 3 个变种 NA-01, NA-02, NA-04, 而有 Tn5 插入的质粒 TN2-2, TN10-1, TN13-1 及 pJB-5b, pJB-5c 不能恢复变种的产多糖表型。这说明变种 107 (TN2-2), 107 (TN10-1), 107 (TN13-1) 的 Tn5 插入位点与 NA-01, NA-02, NA-04 的 Tn5 插入位点在同一基因内, 有关 5a 片段的测序及阅读框架分析正在进行中。

3 讨论

Ruvkun GB^[3]报道先将插有 Tn5 的质粒导入根瘤菌, 再导入不相容质粒 pR751, 使进行同源交换获得 Nif 变种。本实验也尝试将插有 Tn5 的 TN1-1 等导入紫云英根瘤菌 107 中, 再将 pPH1J1 导入, 但结果没有获得 Exo^- 变种。

研究实验表明, 抗生素及其浓度对选择很关键。在筛选 C2110(pJB-B5::Tn5) 时, Km 浓度需高达 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 如只用 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 得到的菌株经质粒抽提酶切分析可知实际并无 Tn5 插入。在结果 2.3 中筛选 107 (TN1-1) 等时, Tn5 有 Nm, Km 等抗性, pPH1J1 有 Sp, Gm, Sm 抗性, 选用何种抗生素及什么浓度会影响实验结果。选用 R50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Gm 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Nm 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 筛选到了紫云英根瘤菌 Exo^- 变种, 而用其它的抗生素及浓度组合则没有获得变种。另外, 为得到在 B5 片段内有不同 Tn5 插入位点的质粒 pJB-B5::Tn5, 需要重复进行结果 2.1 中 2) 至 3) 的步骤, 否则得到的质粒往往具有相同的 Tn5 插入位点。

本实验将 Tn5 插入在 B5 片段的 10 个不同位点上, 其中 3 个插入位点 TN2-2, TN10-

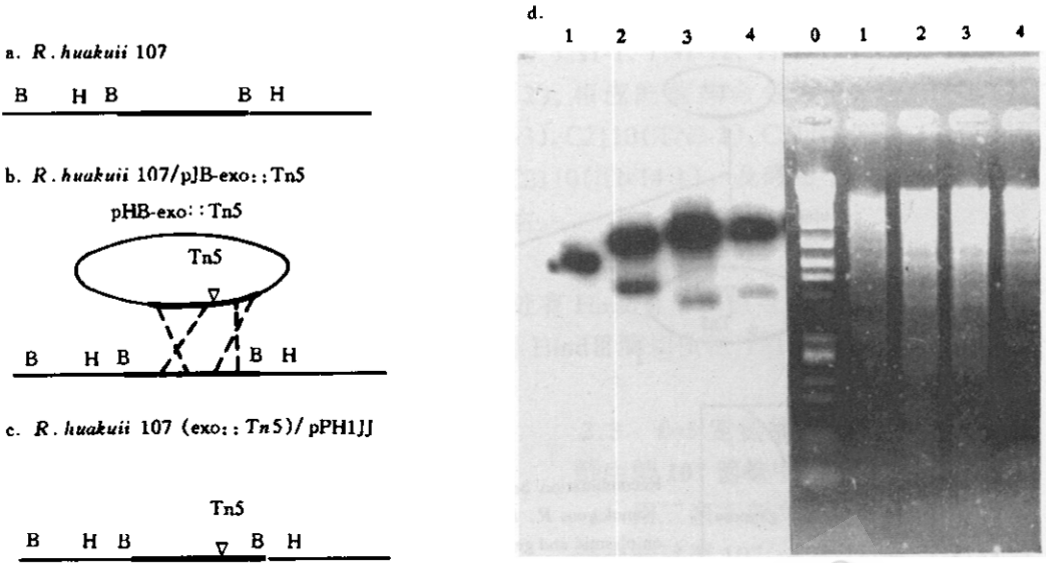


图 4 同源交换导致紫云英根瘤菌 107 菌株 *exo* 基因区域酶切图谱的改变

Fig. 4 Change in *R. huakuii* 107 *exo* region restriction map due to homologous recombination of pJB-*exo*::Tn5 to *R. huakuii* genome

a. Restriction map of the normal *exo* region of *R. huakuii* 107

b. Recombination between homologous *R. huakuii* 107 DNA on pJB-B5 and genome

c. Restriction map of the *exo* region of *R. huakuii* 107 following homologous combination

d. Autoradiogram of hybridization of ^{32}P -labelled B5 fragment to BamHI digested total DNA from wild type 107(1) and mutants 107(TN2-2)(2), 107(TN10-1)(3), 107(TN13-1)(4). 0. $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III} + \lambda\text{DNA}/\text{Hind III} + \text{EcoRI}$ marker.

1, TN13-1 经同源交换后获得 Exo^- 变种, 证明这 3 个插入位点的基因与 EPS 合成有关。其余 7 个位点可能与 EPS 合成无关, 但也可能是调节位点, 能导致 EPS 过量产生 (Overproduction), 从而不能在 Muc^+ 的背景下将其鉴别出来。如何消除这些背景菌落, 将有待于实验方法的进一步改良。另外, 这些位点也许是生长必需的, 失活后菌落不能生长, 故筛选不到。

以上实验结果说明, Tn5 定位诱变是一种有效的紫云英根瘤菌 Exo^- 变种筛选途径。我们正利用这一原理对来自质粒 *exoR'*-11 的其它 DNA 片段进行 Tn5 定位诱变, 以便得到更多的 EPS 合成缺陷菌株进行 *exo* 基因簇的定位及其功能研究。

参 考 文 献

- 1 Berg D E. In: Berg D E eds. Bobile DNA. Washinton D C; American Society for Microbiology, 1989, pp. 185~210
- 2 Frans J B, Silvia R. In: Philipp G eds. Methods for General and Molecular Bacteriology, Washington D C; American Society for Microbiology, 1994, pp. 189~404
- 3 Ruvkun G B, Ausubel F M. Nature, 1981, 289: 85~88

- 4 Jacobs T W, Egelhoff T T, Long S R. J Bacteriol, 1985, **162**: 469~476
- 5 Long S, Reed J W, Himawan J *et al.* J Bacteriol, 1988, **170**: 4239~4248
- 6 Ruvkun G B, Sundarsan V, Ausubel F M. Cell, 1982, **29**: 551~559
- 7 Sonders R, Raleigh E, Signer E. Nature, 1986, **292**: 148
- 8 Chen H C, Batley M, Redmond J *et al.* J Plant Physiol, 1985, **120**: 331
- 9 龙北国, 华征, 郭一松等. 植物生理学报, 1995, **21**: 183~188
- 10 黄建斌, 王江海, 华征等. 植物生理学报, 1996, **22**: 184~190
- 11 曾维清, 宋鸿遇. 植物生理学报, 1997, **12**: (待发表)
- 12 Simon R, Priefer V, Puhler A. Biotechnology, 1983, **1**: 784
- 13 Finan T M, Hartweg E, Lemieux K *et al.* Bacteriol, 1984, **159**: 120~124
- 14 Stacher S E, An G, Flores G *et al.* EMBO J, 1985, **4**: 891~898
- 15 Finan T M, Kunkel B, Devas G F *et al.* J Bacteriol, 1986, **167**: 66~72
- 16 Hirsch P R, Deringer Plasmid, 1984, **12**: 139~141
- 17 Rolfe B G, Gresshoff, P M, Shine J. Plant Sci Lett, 1980, **19**: 277
- 18 萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1993

Selection of EPS-deficient Mutants (Exo^-) from *Rhizobium huakuii* 107 by Tn5 Region-directed Mutagenesis

Zhou Beiyun · Huang Jianbin · Su Wenyong · Song Hongyu

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Recombinant plasmid pJB-B5 was mutagenized by MT614($mal::Tn5$) and 10 plasmids TN1-1, TN1-12, TN2-2, TN2-3, TN3-1, TN4-1, TN9-1, TN10-1, TN13-1, TN14-1 with different Tn5 insertion in the 5.9kb foreign fragment were constructed. By conjugation of TN1-1 etc. into *Rhizobium huakuii* 107 containing the P-group plasmid pPH1JI which is incompatible with pRK415 and simultaneous selection for Rf^+ (conferred by strain 107) Gm^r (conferred by pPH1JI) Nm^r (retention of Tn5), *R. huakuii* 107 transconjugant yields strain in which Tn5 has recombined into *R. huakuii* 107 genome. Three EPS-deficient (Exo^-) mutants 107(TN2-2), 107(TN10-1), 107(TN13-1) were isolated and their inserted Tn5 was certified as the result of a double homologous recombinant event by Southern hybridization analysis. This result showed the Tn5 region-directed mutagenesis is an efficient way to select for Exo^- mutant in *R. huakuii*

Key words Tn5 region-directed mutagenesis, selection of EPS-deficient mutant (Exo^-), *Rhizobium huakuii*