

# 野油菜黄单胞菌 NK-01 编码生物合成多糖基因的克隆

李时岩

(河南师范大学生物系, 新乡 453002)

赵大健 刘锡锰 王玉香 杨建华 牛淑敏

(南开大学生物系, 天津 300071)

**摘要** 采用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变野油菜黄单胞菌 NK-01 得到多糖合成缺陷的不产粘突变株。经 Sall 部分酶切得到的野生型 NK-01 染色体 DNA 片段, 连接到广泛寄主载体 pRK293 上, 在 *E. coli* 中建立完整的 NK-01 基因文库。通过使一株不产多糖突变株在协助质粒 pRK2013 存在下, 分别与含基因文库的 *E. coli* 菌落群进行三亲结合转移筛选具有卡那霉素抗性的产粘接合后体, 对接合后体进行的重组质粒的酶切分析表明, 所克隆的 DNA 具有片段的重叠部分。上述重组质粒对另外 9 株不产多糖突变株互补检测及遗传分析的结果表明, 一段 13.4kb DNA 片段含有合成黄单胞菌多糖所必需的基因。

**关键词** 野油菜黄单胞菌 NK-01; 突变株; 基因文库; 接合转移

野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)NK-01 是一株由南开大学生物系课题组分离到的产黄单胞菌多糖的革兰氏阴性细菌。该课题组对 NK-01 发酵生产黄单胞菌多糖及多糖的理化特性已有较系统的研究<sup>[1-3]</sup>。

国外对野油菜黄单胞菌生物合成多糖的研究开展较活跃, 尤其对该菌合成多糖所涉及基因及其代谢调控的研究开展的较深入<sup>[4,5]</sup>。本研究从分子遗传学角度初步探讨了 NK-01 生物合成黄单胞菌多糖所涉及的基因, 为深入了解 NK-01 合成多糖的分子遗传机理及选育高效发酵工程菌, 提供了有益的参考。

## 材料和方法

### 1. 实验所用菌株和质粒(表 1):

*X. campestris* NK-R<sub>1</sub> 是由 NK-01 自发突变筛选得到的抗利福平(Rif<sup>r</sup>)的产黄单胞菌多糖菌株。

### 2. 培养基:

LB 培养基: 用于 *E. coli* 的培养, 固体培养

基琼脂浓度为 1.5%。

表 1 实验所用的细菌菌株及质粒

名称	基因型或表型	来源
<i>E. coli</i>	recA56 Lacy galk2 galT22 MetB <sup>-</sup>	
JZ279	trpR55 SupE44 SupF58 hsdR514	N. E. Harding 惠赠
HB101	F <sup>-</sup> hsdts20 recA13 ara-14 proA	南开大学生物系
	Lacy1 galk2 xyl-5 mt1-1 SupE44A	微生物室保藏
Plasmids <sup>[6]</sup>		
pRK293	Tet <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup>	N. E. Harding
pRK2013	ColE1 Mob <sup>+</sup> Tra <sup>+</sup> (RK)Km <sup>r</sup>	惠赠

YT 培养基<sup>[1]</sup>: 用于 NK-01, NK-R<sub>1</sub> 及不产黄单胞菌多糖突变型菌株的培养。

YM 培养基<sup>[1]</sup>: 用于 NK-R<sub>1</sub> 诱变得到的不产黄单胞菌多糖突变株的分离及三亲转移实验中互补检测获得的不产黄单胞菌多糖菌株的筛选。

IXA 培养基<sup>[7]</sup>: 用于 NK-R<sub>1</sub> 的诱变。

M9 基本培养基: 用于由 NK-R<sub>1</sub> 诱变得到

的不产黄单胞菌多糖突变株的进一步鉴定。根据不同的营养缺陷型在 M9 无机盐基本培养基中补加葡萄糖或甘露糖(1% W/V)。

3. *X. campestris* NK-01 的诱变:

*X. campestris* NK-R<sub>1</sub> 突变株的分离<sup>[7]</sup>: 以 NK-01 为出发菌株在含 Rif 终浓度 80μg/ml 的 YM 平板上, 分离筛选产黄单胞菌多糖的自发 Rif 抗性突变株 NK-R<sub>1</sub>。

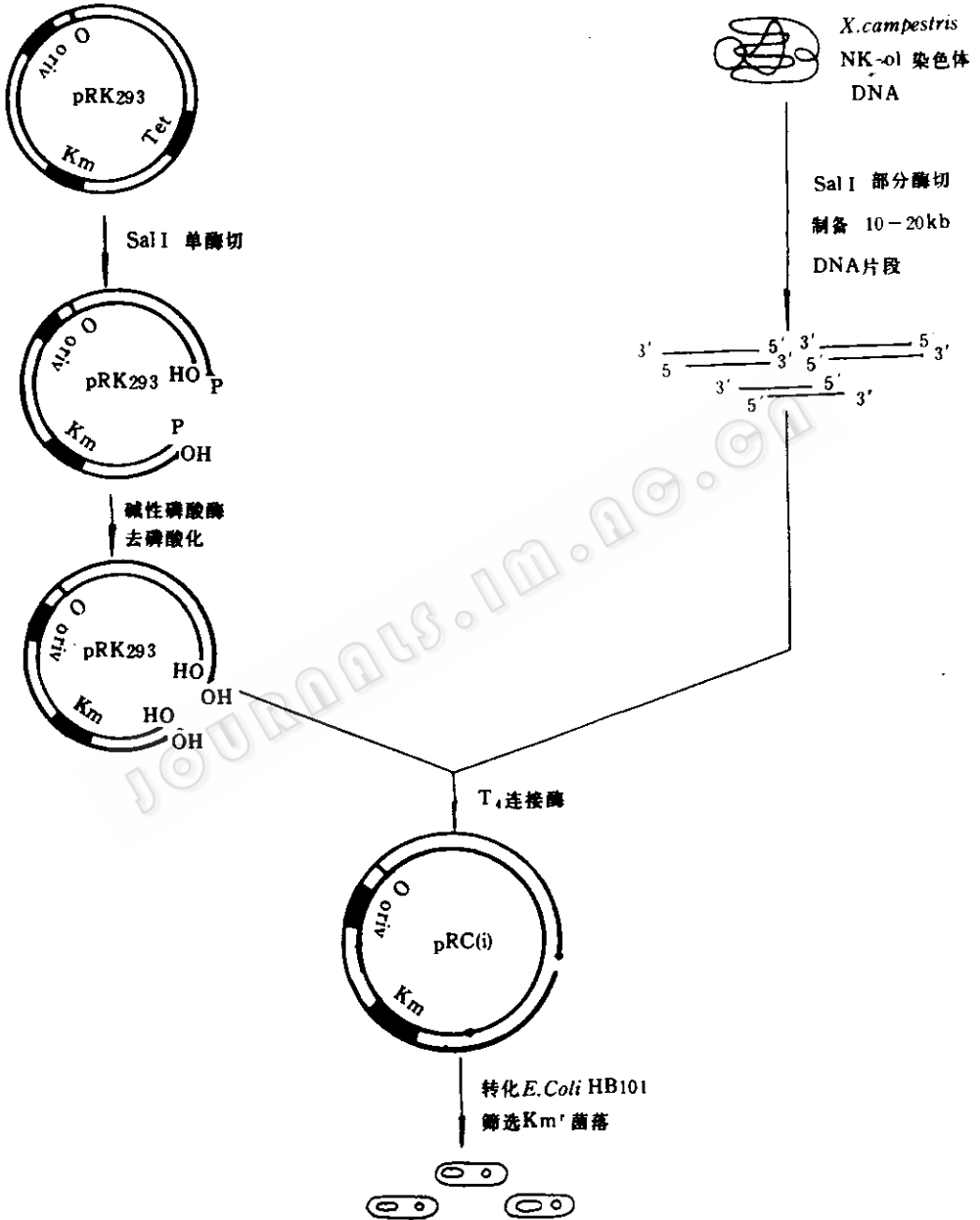


图1 *Xanthomonas campestris* NK-01 基因文库的构建示意图

NK-R<sub>1</sub> 的诱变及黄单胞菌多糖合成缺陷的不产粘突变株的筛选、鉴定<sup>[7]</sup>；以 NK-R<sub>1</sub> 为出发菌株，用 EMS 对 NK-R<sub>1</sub> 进行诱变处理，筛选具有 Rif<sup>r</sup> 且菌落表现不产粘的 NK-R<sub>1</sub>-M<sub>1</sub> 突变株。将所得突变株接种在含 Rif 80μg/ml，补充含葡萄糖或甘露糖的 M9 基本培养基上，进一步鉴定突变株利用不同碳源的能力。

4. DNA 的制备及 NK-01 基因文库的构建：

NK-01 染色体 DNA 的制备参照 Davis 法<sup>[8]</sup>。

质粒 pRK293 的大量提取与制备参照 Maniats 法<sup>[9]</sup>。

染色体 DNA 的 Sal I 10—20kb DNA 部分酶切片段的制备参照 Maniats 法。

NK-01 基因文库的构建按图 1 所示方法进行<sup>[10]</sup>。

5. 三亲接合转移产多糖的分子遗传学检测：

小规模三亲接合转移产多糖的分子遗传学互补检测参照 Turner 法<sup>[11]</sup>。

大规模三亲接合转移产多糖的分子遗传学互补检测参照 Miller 法<sup>[7]</sup>。

结果与讨论

(一) NK-01 的诱变

1. NK-R<sub>1</sub> 自发突变株的分离：由 NK-01 经自发突变筛选产多糖的 Rif<sup>r</sup> 突变株 NK-R<sub>1</sub>，自发突变率为 10<sup>-8</sup>。NK-R<sub>1</sub> 在 YM 平板上生长的菌落特征与出发菌株无区别，均为表观产粘。

2. NK-R<sub>1</sub> 的诱变及不产多糖突变株的分离、鉴定：采用 EMS 20μl/ml(终浓度)在不同时间条件下处理 NK-R<sub>1</sub> 菌悬液。

实验结果表明：

(1) 突变率高的区域发生在致死率 82—99% 之间，最高突变率为 10<sup>-2</sup>。

(2) 诱变剂量与时间的选择应采用 20μl/ml(终浓度)的 EMS 处理 4—5 小时为宜。

本研究共获得 233 株不产粘的突变株，从

中筛出 10 株进行摇瓶发酵实验，该 10 株菌株不产黄单胞菌多糖。将该 10 株突变株接种在 M9 基本培养基中，结果均能正常生长，说明这 10 株菌不是碳水化合物代谢的突变型，而是有关黄单胞菌多糖合成酶基因的突变型。将这 10 株突变株分别命名为 NK-R<sub>1</sub>-M<sub>1</sub>、-M<sub>2</sub>、-M<sub>3</sub>、-M<sub>4</sub>、……、-M<sub>10</sub>。

(二) NK-01 有关黄单胞菌多糖合成基因的遗传互补分析

通过三亲结合转移，进行不产黄单胞菌多糖突变株的遗传学互补检测分析，并在此基础上获得与黄单胞菌多糖合成有关的基因克隆。

就目前已知的方法，对 *X. campestris* 目前还没有比接合转移更有效的方法使外源 DNA 进入细胞体内。

质粒 pRK293 是由 PK-2 衍生来的广泛宿主载体，但该质粒不能自主转移，在 pRK293 的 Sal I 单酶切点上插入外源 10—20kb DNA 片段，用所得的重组质粒转化 *E. coli* HB101，得到的菌落群即构成 NK-01 基因文库。通过 *E. coli* HB101 菌落群与不产黄单胞菌多糖突变株接合并存在 *E. coli* JZ297(含协助质粒 2013)存在下，重组质粒能转移到 *X. campestris* 细胞中<sup>[12]</sup>。

用不产黄单胞菌多糖的突变株 NK-R<sub>1</sub>-M<sub>1</sub> 按大规模三亲接合转移进行产多糖的分子遗传学互补检测，通过在含有 Rif 80μg/ml，Km50μg/ml 的 YM 平板上筛选能通过互补作用产粘的菌落，即从基因文库中将有关合成黄单胞菌多糖的部分基因克隆出来，互补检测结果见表 2。

表 2 通过基因文库互补检测获得的突变互补检测表

通过结合转移获得的 <i>X. campestris</i> Rif <sup>r</sup> -Km <sup>r</sup> 数(a)	通过互补产生多糖 的产粘菌落数(b)	b/a
1232	7	0.57%

由表 2 可见从基因文库中克隆到 7 个与黄单胞菌多糖合成有关的基因，将得到的含有这些基因的克隆分别命名为 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>……C<sub>7</sub>，对

应克隆的重组质粒分别命名为 pRC<sub>1</sub>, pRC<sub>2</sub>, ……pRC<sub>7</sub>。

将 C<sub>1</sub> 至 C<sub>7</sub> 进行质粒的提取与 Sal I 酶切电泳, 结果见表 3。pRC<sub>1</sub> 至 pRC<sub>7</sub> 的酶切物理图谱如图 2 所示。

表 3 各重组质粒 Sal I 酶切片段大小

被互补的突变株	重组质粒	重组质粒经 Sal I 酶切后各片段的大小(kb)
NK-R <sub>1</sub> -M <sub>1</sub>	pRC <sub>1</sub>	21.4, 5.8, 4.4, 4.3, 2.1
	pRC <sub>2</sub>	21.4, 5.8, 4.4, 2.1
	pRC <sub>3</sub> , pRC <sub>5</sub>	21.4, 5.8, 4.4
	pRC <sub>4</sub>	21.4, 5.8, 4.4, 3.2
	pRC <sub>6</sub>	21.4, 5.8, 2.1
	pRC <sub>7</sub>	21.4, 5.8

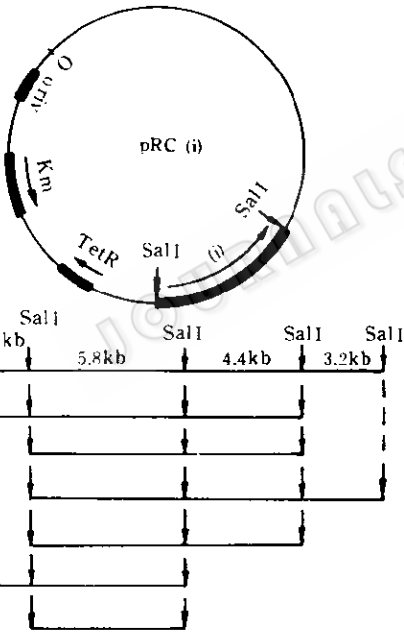


图 2 各重组质粒 Sal I 酶切物理图谱

将 pRC<sub>1</sub> 至 pRC<sub>7</sub> 7 个重组质粒分别重新转化 *E. coli* HB101, 并筛选 Km 抗性菌落, 然后采用小规模三亲结合转移进行产黄单胞菌多糖的分子遗传互补检测, 并在含 Rif 80μg/ml, Km 50μg/ml 的 YM 平板上鉴定产生黄单胞菌多糖的互补作用, 结果见表 4。

表 4 pRC<sub>1</sub> 重组质粒对不产多糖突变株的互补作用

突变株	重组质粒						
	pRC <sub>1</sub>	pRC <sub>2</sub>	pRC <sub>3</sub>	pRC <sub>4</sub>	pRC <sub>5</sub>	pRC <sub>6</sub>	pRC <sub>7</sub> pRK <sub>293</sub>
NK-R <sub>1</sub> -M <sub>1</sub>	±	+	+	+	+	+	-
-M <sub>2</sub>	±	-	-	+	-	-	-
-M <sub>3</sub>	±	+	+	+	+	-	-
-M <sub>4</sub>	±	-	-	+	-	-	-
-M <sub>5</sub>	±	+	+	+	+	-	-
-M <sub>6</sub>	±	-	-	+	-	-	-
-M <sub>7</sub>	±	-	-	+	-	-	-
-M <sub>8</sub>	±	+	+	+	+	+	-
-M <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-
-M <sub>10</sub>	-	-	-	-	-	-	-

+: 在 YM 平板上正常生长, 且能产多糖使菌落表现产粘。  
 ±: 在 YM 平板上能产粘, 但菌落生长缓慢, 形成菌落较小。  
 -: 在 YM 平板上不产多糖, 菌落表现不产粘。

由表 4 可见 NK-R<sub>1</sub>-M<sub>1</sub>, -M<sub>2</sub>, -M<sub>3</sub>, -M<sub>4</sub>, -M<sub>5</sub>, -M<sub>6</sub>, -M<sub>7</sub>, -M<sub>8</sub> 都能被 7 个重组子中的部分或全部互补产生黄单胞菌多糖, 而 -M<sub>9</sub>, -M<sub>10</sub> 不能被 7 个重组子中任何一个重组子互补产粘。结合图 2, 可以初步确定如图 3 所示的 -M<sub>1</sub> 至 -M<sub>8</sub> 突变株的基因突变区域。

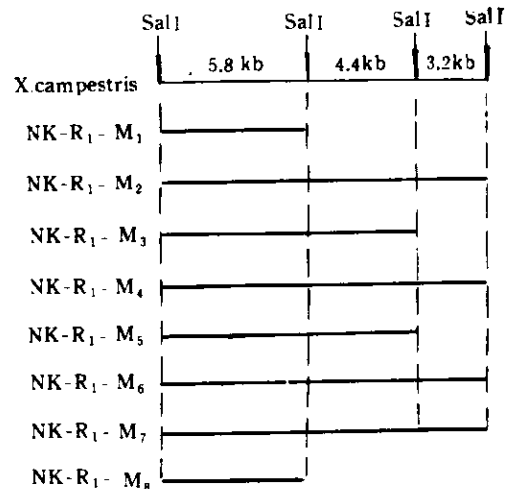


图 3 各突变株基因突变发生的区域

NK-R<sub>1</sub>-M<sub>9</sub>, -M<sub>10</sub> 不能被 7 个重组子中任何一个互补产生黄单胞菌多糖, 说明 -M<sub>9</sub>, -M<sub>10</sub>

的基因突变发生在已克隆基因片段之外,或与已克隆到的基因片段毗邻或不毗邻而参与黄单胞菌多糖合成的代谢调节与控制。有关结论有待进一步研究证实。

从以上结果及分析可以看出,NK-01参与黄单胞菌多糖合成的基因是簇丛的(cluster),即黄单胞菌多糖的生物合成是由多个酶参与代谢调节的结果<sup>[13,14]</sup>。

### 参 考 文 献

1. 赵大健等:工业微生物,16(3):11-20,1986.
2. 刘如林等:南开大学学报(自然科学),1:57-64,1989.
3. 刁虎欣等:食品与发酵工业,5:47-52,1989.
4. Harding, N. E. et al.; *J. Bacteriol.*, **169**(6):2854-2861, 1987.
5. Thorne Let al.; *J. Bacteriol.*, **169**(8):3593-3600,1987.
6. Ditta G et al.; *Plasmid*, **13**:149-153,1985.
7. Miller J H et al.; *Experiment in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory,1972.
8. Davis L. et al.; *Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1986.
9. Maniats T et al.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory,1982.
10. Perbal B; *A Practical Guide to Molecular Cloning*. John Wiley & Sons, Inc.,1984.
11. Turner P et al.; *Mol. Gen. Genet.*, **195**:101-107,1984.
12. Ditta G et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**(12):7347-7351,1980.
13. Ielpi L. et al.; *Biochem. Res. Comm.*, **120**:1400-1408, 1981.
14. Ielpi L. et al.; *Biochem. Intern.*, **6**:323-333,1983.

(1992-09-12 收稿)

## CLONING OF GENES ESSENTIAL FOR XANTHAN POLYSACCHARIDE BIOSYNTHESIS FROM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* NK-01

Li Shiyan

(Dept. of Biology, Henan Normal University, Xinxiang 453002, Henan)

Zhao Dajian Liu Ximeng Wang Yuxing Yang Jianhua Niu Shumin

(Dept. of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

*Xanthomonas campestris* NK-01 produces amounts of xanthan polysaccharide. Nonmucoid mutants, defective in synthesis of xanthan polysaccharide, were isolate after treatment with ethylmethanesulfonate. To isolate genes essential for xanthan polysaccharide synthesis complete libraries of DNA fragments from wild-type *Xanthomonas campestris* NK-01 were constructed in *E. coli* HB101. The pooled clone bank was conjugated en masse from *E. coli* into a nonmucoid mutant. Kanamycin-resistant exconjugants were then screened for the ability to form mucoid colonies. Analysis plasmids form muciod exconjugants indicated that overlapping segments of DNA had been cloned. These plasmids were tested for complementation of nine additional nonmucoid mutants. A 13.4 kb region of DNA was determined to contain at least some genes essential for xanthan polysacchdride synthesis.

**Key words** *Xanthomonas campestris* NK-01; Mutants; Genes libraries; Conjugal transfor