

费氏中华根瘤菌腺嘌呤缺陷突变株的构建与筛选

谢 波 陈大松 李友国 周俊初*

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘 要 构建出费氏中华根瘤菌嘌呤合成酶基因 *purL* 的基因置换载体 pHN701, *purL* 内部 *Not I*-*Xho I* 片段被 *luxAB* 基因取代,造成正常基因的破坏。用该载体对野生型费氏中华根瘤菌 HH103 进行 *purL* 的基因置换,筛选到腺嘌呤缺陷型突变株 P825。波动实验和连续转接试验结果表明该突变菌株表型十分稳定。*purL* 表达载体 pBBR-PG 在 P825 中可恢复其在基本培养基上的生长情况,证明突变株确实为 *purL* 单基因破坏。盆栽结瘤实验结果表明,该突变株只能侵染大豆根系形成不固氮的根瘤。

关键词 费氏中华根瘤菌 嘌呤缺陷型 基因置换 基因工程微生物

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)01-0045-05

营养缺陷型突变株与野生型菌株不同,它们在环境缺乏必需的营养成分时将不能繁殖。这一特性已应用于以下研究领域:如研究质粒在不同细菌之间的水平转移,利用营养缺陷型突变株作为供体菌,可以在基本培养基上快速地筛选转移接合子^[1];利用一系列根瘤菌营养缺陷型突变株研究共生固氮的代谢途径^[2,3];新发展的用体内表达技术研究微生物与宿主相互作用^[4,5],也常利用不能正常寄生或共生的营养缺陷型突变株,以正常的营养合成基因为报告基因,开展时空特异表达基因的研究等。获得稳定的、表型明显的营养突变体是开展上述研究的前提。常用的突变体筛选方法如物理化学诱变和转座子插入存在效率低、目标不明确且突变体易回复等缺点。与上述方法相比,基因置换(Gene replacement)技术能够较好的弥补这些缺点,定点地得到所需的稳定突变体。

purL 基因在生物体中编码甲酰甘氨酸核苷酸合成酶,在嘌呤核苷酸的合成途径中催化由甲酰甘氨酸核苷酸到甲酰甘氨酸核苷酸的转变过程。最近 Buendia-Claveria A M 等^[6]获得一株 Tn5 转座子插入 *purL* 的费氏中华根瘤菌突变株,该突变株为不能正常共生固氮的腺嘌呤缺陷型菌株。本研究在费氏中华根瘤菌中应用基因置换技术将原养型根瘤菌 HH103 的嘌呤合成酶基因 *purL* 定点破坏,阻断腺嘌呤的合成途径,得到了一株稳定的腺嘌呤缺陷型突

变株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 参见表 1。

1.1.2 培养条件和抗生素:大肠杆菌 37℃ 培养于 LB 培养基(每升含酵母粉 5g,蛋白胨 10g,NaCl 10g),根瘤菌培养于 TY 培养基(每升含酵母粉 3g,蛋白胨 5g,CaCl₂ 0.65g)或 SM 基本培养基(每升含甘露醇 10g,K₂HPO₄ 0.5g,KNO₃ 0.5g,MgSO₄·7H₂O 0.2g,NaCl 0.1g,CaCl₂ 0.05g,H₃BO₃ 0.02g,Na₂MoO₄ 0.02g,硫胺素、烟酰胺、泛酸钙和生物素各 10⁻⁴g)(28℃),验证突变株的 SMA 培养基是在 SM 中添加 50μg/mL 的腺嘌呤。抗生素链霉素(Str)200μg/mL,庆大霉素(Gm)20μg/mL,氨苄青霉素(Ap)100μg/mL。

1.1.3 试剂和工具酶:实验所用各种试剂均为分析纯,各种工具酶均购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作:质粒 DNA 抽提、限制性内切酶反应与连接酶反应均按《分子克隆实验指南》^[9]操作。

PCR 扩增 *purL* 基因所用 5' 端引物为 5'-ACATCTAGAACGATGACGATTTCCAACACC-3',3' 端引物为 5'-CATGTCTTCGCTATCGCCTG-3',扩增条件为:96℃ 3min,96℃ 1min,57℃ 2min,72℃ 4min,循环 25 次,72℃ 10min。

基金项目 国家 863 计划(2001AA214021)

* 通讯作者。Tel:86-27-87282431;Fax:86-27-87280670;E-mail:zjc42926@public.wh.hb.cn

作者简介 谢 波(1978-)男,安徽亳州人,博士研究生,目前从事微生物与植物相互作用研究。E-mail:bioxiebo@163.com

收稿日期:2003-03-31,修回日期:2003-08-02

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids tested

Strains	Character	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ <i>lacZYA-argF</i>)U169	This lab
S17-1	<i>recA pro hsdR</i> (RP4-2 Tc : 3Mu Km : 3Tn7)	[7]
<i>Sinorhizobium fredii</i>		
HH103	Wild type ,Nod ⁺ ,Fix ⁺ ,Str ^R	This lab
Plasmid		
pUCm-T	Cloning vector ,Ap ^R	Bicolor Biological Science & Technology Co. ,Ltd
pHN101	Carries <i>luxAB</i> gene , Ap ^R	This lab
pJQ200SK	Suicide vector , carries <i>sacB</i> gene , Gm ^R	[8]
pHN701	<i>purL</i> gene replacement vector , Gm ^R	This work
pBBR-PG	<i>purL</i> gene expressed under LacZ promoter , Gm ^R	This work

PCR 扩增 *luxAB* 片段所用 5'端引物为 5'-ACTG-GATCCTAAGGAAATGTTATGAAATTTGG-3' , 3'端引物为 5'-ACTGGTACCAATCAAGTCATCGATTCTGTG -3'。扩增条件为 :96℃ 3 min ;96℃ 1 min ;56℃ 2 min ;72℃ 3.5 min ,循环 25 次 ;72℃延伸 10 min。

1.2.2 接合转移 :按文献 [7] 的方法进行。将含待转移质粒的供体菌和受体菌分别培养至对数中期 ,等体积混合后 ,离心去除培养液 ,将菌体均匀涂抹在 TY 平板上的微孔滤膜上 ,28℃下静置 24 ~ 48h ,再在筛选培养基上筛选转移接合子。

1.2.3 盆栽实验 :大豆品种鄂豆 4 号 ,种子经表面灭菌催芽后播种于含无氮植物营养液的无菌沙钵中 ,待第一子叶绽开时接种根瘤菌 ,接种量约 10⁸CFU/株 ,于光照室栽培 25 ~ 30d 后观察结瘤情况。

2 结果

2.1 *purL* 基因置换载体的构建

根据 *Sinorhizobium fredii* 的 *purL* 基因序列 (Accession No. AF275718) 设计引物 ,PCR 扩增出 2.4kb *purL* 结构基因 ,扩增产物纯化后用 *Xba* I 和 *EcoR* V 双酶切并与同样双酶切的 pUCm-T 载体连接 ,得到重组载体 pUCm-T-*purL*。pHN101 质粒上携带有约 3.3kb 的 *luxAB* 片段 ,可用 *Bgl* II 切下后与 *Bgl* II 酶切的 pUCm-T 载体相连 ,得到 pUCm-T-*lux* 重组载体 ,再用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切下 *luxAB* 片段 ,与经同样双酶切的 pUCm-T-*purL* 连接 ,可得到 pUCm-T-*purL*-

lux 载体 ,*purL* 结构基因中的 *Not* I -*Xho* I 片段已被取代为 *luxAB* ,造成基因的缺失破坏。再用 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切下已插入 *luxAB* 的 4.7kb *purL* 片段 ,与用 *Xba* I 和 *Kpn* I 部分酶切的 pJQ200SK 载体相连 ,得到基因置换载体 pHN701。

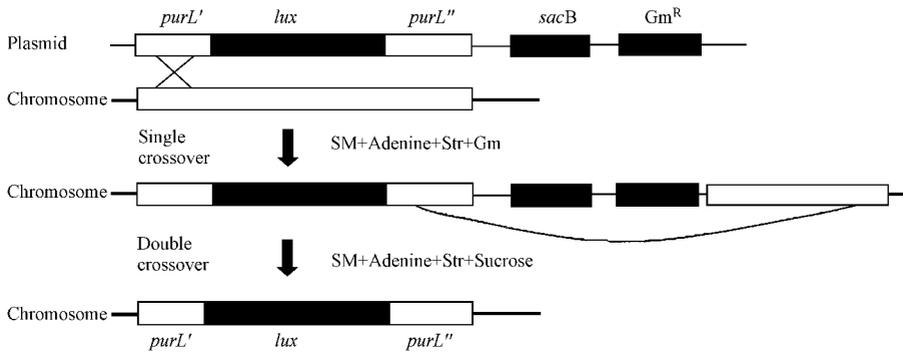
purL 结构基因内部各含一个 *Xho* I 和 *Pst* I 位点 ,两个 *EcoR* I 位点。*Xho* I 可以在 *purL* 片段内部进行单酶切得到约 5.1kb 的线状化质粒 ;*Pst* I 可以切割 *purL* 内部和载体上的位点 ,得到 1.3kb 和 3.8kb 两个片段 ;*EcoR* I 酶切得到 1.6kb 和 3.5kb 两个片段 ;*Xba* I 和 *EcoR* I 双酶切可得到 2.4kb 的 *purL* 和 2.7kb 载体片段。结果表明 *purL* 结构基因已正确克隆到 pUCm-T 载体上。

用 *Bgl* II 酶切 pHN701 可以得到 3.3kb *luxAB* 片段 ;*Xho* I 和 *Xba* I 分别可以将质粒单酶切得到约 10kb 的线状化质粒 ;*Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切可得到 4.7kb 插入 *luxAB* 的 *purL* 片段。结果表明体外突变的 *purL* 已正确克隆到 pJQ200SK 上。

2.2 费氏中华根瘤菌中 *purL* 基因的置换

质粒 pHN701 上有可供协助转移的 *mob* 基因和蔗糖敏感基因 *sacB* ,其复制子不能在根瘤菌中复制 ,因此在 Gm 选择压力下可以筛选到发生单交换的重组子 ,进而再在蔗糖平板上可筛选到发生双交换的重组子 (图 1)。

将 pHN701 转化大肠杆菌 S17-1 ,转化子经活化后在 LB 液体培养基中培养至对数中期 ,与培养至对数中期的 *S. fredii* HH103 等体积混合 ,菌体加

图1 *purL* 基因发生双交换的筛选路线Fig.1 Outline of screening double crossover of *purL* in *S. fredii* HH103

2mL 无菌水, 将菌液均匀涂在 SMA + Gm + Str 的固体培养基上, 28℃ 培养 1 周, 长出的菌落在 TY 平板活化, 共得到 9 个可能发生了单交换的菌株。选取 5 株在 SMA 液体中培养 24h 后稀释 10^{-3} , 均匀涂在添加了 10% 蔗糖的 SMA 平板上, 同时设置不加蔗糖的平板作为对照。培养 7d 后可以发现在含蔗糖平板上各长出 23、40、9、6 和 38 个菌落, 而不加蔗糖的平板上菌落数均达 10^4 左右, 这些在蔗糖平板上长出的菌落即可能是发生了双交换而丢失了 *sacB* 基因。为了验证是否发生了基因交换并且破坏了其原有正常的 *purL* 基因, 选取部分菌落分别点种在 SM 和 SMA 平板上, 28℃ 培养 3d 后, 发现有一些菌落在 SMA 平板上长势与野生型相同, 而在 SM 培养基上不生长或生长极其缓慢, 将这些生长需要腺嘌呤的菌落接种在液体培养基上检验, 亦得到同样的结果, 将该腺嘌呤缺陷型突变菌株命名为 P825。

为了验证该腺嘌呤缺陷型确实是由于原养型菌株的 *purL* 基因的破坏而产生, 将 *purL-gusA* 表达单元克隆在 *lacZ* 启动子之后, 构建成组成型表达 *purL* 的重组质粒 pBBR-PG, 将该质粒转入 P825 后发现转化子 P825(pBBR-PG) 在 SM 平板上恢复了生长(图 2), 表明原腺嘌呤缺陷型 P825 确实是发生了 *purL* 的单基因破坏。

用 *luxAB* 基因特异性引物和 *purL* 引物对 P825 总 DNA 进行检测。只有 P825 和 pHN701 能扩增出 *lux*, 表明 *lux* 片段已经整合到根瘤菌基因组中。用 *purL* 引物扩增 P825 DNA 所得片段约为 4.7kb, 与 pHN701 扩增结果一致。

2.3 突变体稳定性测定

参照文献 [10] 介绍的波动实验方法, 将 P825 菌液稀释至约 10^3 CFU/mL, 首先取部分菌液接种 SM 和 SMA 培养基验证菌体确实是腺嘌呤缺陷型后, 再分



图2 菌株在 SM 基本培养基和添加腺嘌呤后的 SMA 培养基上的生长情况

Fig.2 Growth of wildtype and mutant *S. fredii* in SM plat(A) and SMA plat(B)

1. Wildtype strains HH103; 2. Mutant strains carrying *purL* express vector pBBR-PG; 3. Mutant strains P825.

别取 $100\mu\text{L}$ 接种至 20 份 0.2mL TY 液体培养基中, 培养 30h 至菌体浓度约 10^7 CFU/mL, 再分别将它们涂在 SM 平板上。28℃ 培养 7d 后未观察到任何一份培养液有菌落长出。另外, P825 连续在 TY 液体中传接 10 次后, 经在 SM 培养基上验证, 也没有原养型菌落的产生。上述结果表明突变体 P825 极为稳定。

2.4 腺嘌呤缺陷型突变株的共生固氮特性

在大豆砂培盆栽结瘤实验中, 发现 P825 只能形成微小的白色无效瘤, 含有 *purL* 基因表达载体的菌株 P825(pBBR-PG) 能够正常形成有效瘤。与野生型 HH103 相比, P825 接种的植物鲜重也明显减轻(表 2), 表明该腺嘌呤缺陷型菌株虽能侵染植物根系结瘤, 但未能与植物建立起有效的共生固氮体系。

表 2 结瘤实验结果

Table 2 Results of plant assays

Inoculant	No inoculant(CK)	HH103	P825
Phenotype	Nod ⁻	Nod ⁺ , Fix ⁺	Nod ⁺ , Fix ⁻
Top fresh weight/g	2.18	4.98	2.41

3 讨论

基因置换技术能够将已知基因破坏,可以定位引入缺失、插入或碱基转换等突变而广泛用于基因功能研究,在转基因生物应用方面也有广阔的前景。本研究在野生型根瘤菌 *purL* 基因中引入的 *luxAB* 基因,已广泛用于土壤微生物生态学研究,本研究获得的腺嘌呤缺陷型菌株的生长实验结果也表明,在补充腺嘌呤之后,*luxAB* 对该菌生长没有明显影响。然而遗憾的是,由于未知的原因,在癸醛作用下我们未能检测到 P825 的发光,可能是由于 *luxAB* 在染色体中只有单拷贝,表达量小,且受染色体 *purL* 启动子转录的影响而不能检测到发光。另外,本研究在蔗糖平板上能快速筛选到目的菌株,表明蔗糖敏感基因 *sacB* 适用于基因置换研究。

purL 基因的破坏既导致菌株内源性腺嘌呤的丧失,亦不能合成 ATP。在结瘤实验中 P825 能够侵染大豆根系,但不能形成有效的固氮根瘤,表明植物根系不能提供菌体所需的腺嘌呤,根瘤菌不能从植物直接得到碳源和能量,自身也不能进一步繁殖分化,因此大量消耗能量且机制复杂的共生固氮体系不会建立。本菌株也因此可作为研究共生固氮体系中植物向根瘤类菌体供应能量效率以及代谢产物种类的研究材料。

基因工程菌(GEM)在投放到自然环境后可能会带来不必要的风险,如何评估其外源基因的水平转移,以及设计防范手段来尽可能减少其定殖和竞争生态危害等已成为国内外日益关注的问题。腺嘌呤缺陷型根瘤菌 P825 可以携带外源载体,在测定其外源载体或外源基因转移时可以用不添加腺嘌呤的抗性平板筛选转移结合子,此法将比用原养型菌株出发材料更方便。本研究已证明腺嘌呤缺陷突变株 P825 确实是发生了 *purL* 单基因破坏,进一步让 *purL* 处于已知的启动子下表达将不难恢复其生长状态和共生固氮能力,因此可以用 *purL* 为报告基因设计出体内表达系统进行共生特异型的启动子的捕获。所得到的含共生特异型表达系统的菌株既能有效结瘤和固氮,在环境中自由生长时又难以繁殖,因此将大大降低其生态风险,适于作为生态防范型根

瘤菌进行环境释放实验。

致谢 感谢西班牙 Sevilla 大学 Ruiz-Sainz J E 博士提供 *purL* 核酸序列,感谢加拿大 Calgary 大学 Michael F Hynes 博士惠赠 pJQ200SK 质粒。

参 考 文 献

- [1] Gitte Sengeløv, Søren J Sørensen. Methods for detection of conjugative plasmid transfer in aquatic environments. *Curr microbiol*, 1998, **37**: 274 - 280.
- [2] Kerppola T, Kahn M L. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 913 - 919.
- [3] Noel D K, Stacey G, Tandon S R, et al. *Rhizobium japonicum* mutants defective in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol*, 1982, **152**: 485 - 494.
- [4] Mahan M J, Schlauch J M, Mekalanos J J. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*, 1993, **259**: 686 - 688.
- [5] Oke V, Long S R. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol Microbiol*, 1999, **32**(4): 837 - 849.
- [6] Buendia-Claveria A M, Moussaid A, Ollero F J, et al. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology*, 2003, **149**: 1807 - 1818.
- [7] Simon R, Priefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteris. *Bio Technology*, 1983, **1**: 748 - 791.
- [8] Quandt J, Hynes M F. Versatile suicide vectors allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 1993, **127**: 15 - 21.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著(金冬雁, 黎孟枫, 译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] Knudsen S M, Karlström O H. Development of efficient suicide mechanisms for biological containment of bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 85 - 92.

Construction and Screening of Purine Auxotroph Mutant of *Sinorhizobium fredii*

XIE Bo CHEN Da-Song LI You-Guo ZHOU Jun-Chu

(Huazhong Agricultural University Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China)

Abstract : The *Sinorhizobium fredii purL* gene replacement vector pHN701 was constructed. The *Not I* - *Xho I* fragment inside *purL* was replaced with *luxAB*, resulting a mutant *purL*. The *purL* gene replacement in wide-type *Sinorhizobium fredii* HH103 was performed with pHN701, and the purine mutant P825 was screened. Fluctuation experiment and continuous reinoculation experiment showed that P825 was a very stable purine auxotroph mutant. Mutant P825 could be complemented by *purL* expressing vector pBBR-PG to grow in minimal media, which confirmed that P825 was the result of mutagenized *purL* gene. In pot plant test, this mutant could infect legume plant, but only form defective nodules.

Key words : *Sinorhizobium fredii*, Purine auxotroph mutant, Gene replacement, Genetic engineered microbes

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214021)

* Corresponding author. Tel : 86-27-87282431 ; Fax : 86-27-87280670 ; E-mail : zjc42926@public.wh.hb.cn

Received date : 03-31-2003

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-Lun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-Rong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LU De-Ru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

WANG Ao-Quan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

QU Yin-Bo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

XU Jian-Guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-Feng

CHEN Yong-Qing

CHENG Chi

DONG Xiu-Zhu

FAN Yun-Liu

GUO Jun

HU Fu-Quan

HU Yuan-Yang

HUANG Li

LU Cheng-Ping

MIN Hang

QIAN Shi-Jun

SHAO Yi-Ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-Ming (USA)

XIE Hong

YANG Su-Sheng

ZHAI Zhong-He

ZHANG Yao-Ping (USA)

ZHENG Tian-Ling

ZHU Bao-Quan

ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-Fang

WANG Min