

粪产碱菌的 Tn5 转座诱变及吲哚乙酸生物合成特性的研究*

李法峰^{1,2} 平淑珍¹ 苏宝林² 林 敏^{1* * *}

(¹ 中国农业科学院原子能利用研究所 北京 100094)

(² 中国农业大学植物科技学院 北京 100094)

摘 要 粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*) A1501 的吲哚乙酸(IAA)合成需要外源色氨酸参与。在不含色氨酸的限制性培养基中, A1501 能良好生长,但不能合成 IAA,表明在 A1501 中存在一条依赖于色氨酸的 IAA 合成途径。A1501 的 IAA 合成具有菌体密度依赖特性。采用 Tn5 转座诱变技术构建 A1501 的突变库,从 3500 多株 Tn5 转染子中分离到一株色氨酸营养缺陷型突变株 AT63。该 Tn5 突变株在不含色氨酸的限制性培养基上不能生长,但仍能进行 IAA 的生物合成,每毫升菌体密度等于 1.0 的突变株菌体的 IAA 合成量为 2.24 μ g。对突变株 AT63 的研究表明在 A1501 中至少存在两条 IAA 合成途径:一条以色氨酸为合成前体,另一条以吲哚-3-磷酸甘油为前体。southern 杂交结果表明突变株中 Tn5 插入位点可能位于编码色氨酸合成酶基因上。

关键词 粪产碱菌 A1501, Tn5 诱变, 色氨酸营养缺陷型, IAA 生物合成

中图分类号 Q78 文献标识码: A 文章编号 0001-6209(2000)05-0551-55

粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*) A1501 分离自我国南方水稻根际土壤^[1],能固氮和分泌吲哚乙酸(IAA)和赤霉素等多种植物激素,对宿主植物有明显的促生长效应,但该菌的 IAA 合成途径尚不完全清楚。据报道,细菌中依赖于色氨酸的 IAA 生物合成途径因前体不同分为以下四类^[2]: 1) 吲哚乙酰胺途径; 2) 吲哚丙酮酸途径; 3) 色胺途径; 4) 吲哚乙腈途径。最近, Prinson 等发现在巴西固氮螺菌中还有一条不依赖于色氨酸的 IAA 合成途径^[3]。我们从 Tn5 突变库中筛选粪产碱菌色氨酸营养缺陷型突变株 AT63,研究该突变株 IAA 的合成特性和合成途径,初步开展了 IAA 合成基因位点的鉴定工作。

1 材料和方法

1.1 培养基

LB 培养基、限制性培养基配方及粪产碱菌的培养条件参见林敏等^[4]的方法。外源色氨酸浓度为 100 μ g/mL,培养条件参照 Tien 等^[5]的方法。

1.2 DNA 操作

质粒 DNA 和总 DNA 提取、限制性内切酶酶切、以及野生型和 Tn5 突变株总 DNA 的 southern 杂交试验均按分子克隆实验指南所述进行操作。Tn5 探针和 ipdC 基因探针由

* 国家自然科学基金(39580001)和 863 计划(863-101-03-04-01)资助课题

* * 联系人,通讯地址 北京 5109 信箱生物技术室,邮政编码 100094

作者简介 李法峰(1971—),男,山东省苍山县人,1998 年毕业于中国农业大学植物科技学院获硕士学位,现于北京市农林科学院植物营养与资源研究所,主要从事微生物学方面的研究

收稿日期:1999-08-20,修回日期:1999-11-22 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

法国巴斯德研究所 Elmerich 博士惠赠。

1.3 菌株和质粒

本实验所采用的菌种和质粒列于表 1

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 Strains and Plasmids used in this work

Strains and plasmids	Genotypes and phenotypes	Sources or references
Strains		
<i>A. faecalis</i> A1501	Wild type	(1)
<i>Escherichia coli</i> S17.1	High frequency transfection strain	(6)
<i>A. faecalis</i> AT63	Km ^r , Trp auxotrophic mutant	This work
Plasmids		
pSUP5011	Km ^r	(6)

1.4 突变库的构建

A1501 的 Tn5 突变库的构建参照 Rhijn 等^[7]的方法进行。在含有色氨酸和卡那霉素的限制性培养基上筛选色氨酸营养缺陷型突变株。

1.5 IAA 合成量的测定

A1501 及其突变株 IAA 合成量的测定参见 Hartmann 等^[8]的方法。本工作中, IAA 合成能力的单位“ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ”定义为菌体密度(OD_{600})等于 1.0 时 1mL 培养液中的 IAA 含量。

2 结果和分析

2.1 色氨酸对粪产碱菌 IAA 合成的影响

固氮菌合成 IAA 时, 一般都需要色氨酸作为前体, 向培养基中加入色氨酸, IAA 的生物合成会明显增加^[9]。当色氨酸浓度在 0~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 而培养时间超过 24h 后, 色氨酸浓度与 IAA 合成之间呈正相关。在无色氨酸的限制性培养基中, 粪产碱菌 A1501 不能合成 IAA, 随着色氨酸浓度的升高, A1501 的 IAA 合成量逐渐增多, 当色氨酸浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的 IAA 合成量达 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 是通常培条件下色氨酸浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的 10 倍左右。表明在 A1501 中存在着依赖于色氨酸的 IAA 合成途径。

2.2 粪产碱菌 IAA 合成的菌体密度依赖特性

为研究不同菌体密度下 A1501 的 IAA 合成状况, 通过不断添加无菌培养液, 可使培养体系中菌体密度始终保持在某一水平上。在低密度培养条件即菌体密度低于 1.0 时, A1501 的 IAA 合成始终处于低水平, 经 44h 培养后其 IAA 的合成总量仍低于 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在相同色氨酸浓度和培养条件下, 当培养体系中菌体密度保持 1.6 时, 随着培养时间的延长, 菌体的 IAA 合成量剧增, 培养至 44h 后, 其 IAA 合成量是低密度培养条件下的 6 倍以上(图 1)。这说明粪产碱菌 A1501 中 IAA 生物合成具有菌体密度依赖特性。这一现象与胶粘发光杆菌(*Photobacterium fischeri*) 中发光基因表达的密度依赖特性类似^[10]。

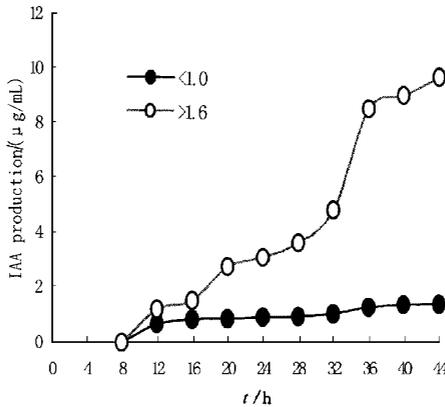


图1 固氮粪产碱菌 IAA 生物合成的菌体密度依赖型现象

Fig. 1 cell-density dependent IAA production of A1501

<math><1.0</math> indicates the cell-density of *A. feacalis* A1501 (OD_{600}) below 1.0 ;

>1.6 indicates the cell-density of *A. feacalis* A1501 (OD_{600}) above 1.6.

2.3 粪产碱菌 Tn5 突变库的构建和色氨酸营养缺陷型突变株的筛选

采用携带自杀性 Tn5 转座质粒 pSUP5011 的供体菌 *E. coli* S17-1 与受体菌 A1501 两亲结合, Tn5 转座序列随机插入到 A1501 的基因组中, 在含色氨酸和卡那霉素的限制性培养基上挑选结合转移子 3500 多株, 建立 A1501 的 Tn5 突变库。在本试验中, 结合转染的频率在 10^{-5} 左右。以含卡那霉素但不含色氨酸的限制性培养基为对照平板, 从突变库中筛选到一株具有 Km 抗性的色氨酸营养缺陷型突变株 AT63, 该突变株不能在无色氨酸的限制性培养基中生长。

2.4 Tn5 插入突变株的特性及插入位点

为进一步探讨 A1501 的 IAA 合成途径, 我们对粪产碱菌色氨酸营养缺陷型突变株 AT63 的 IAA 合成特性进行研究。在不添加色氨酸的 LB 培养基中, 该突变株 IAA 合成量为 $8.46\mu\text{g}/\text{mL}$, 比野生型 ($3.95\mu\text{g}/\text{mL}$) 高一倍以上。培养基中添加色氨酸 ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) 后, 突变株 AT63 IAA 合成能力无明显变化, 但野生型 A1501 比未添加色氨酸条件下的 IAA 合成能力高一倍多 (图 2)。在无色氨酸的限制性培养基中, 未检测到 A1501 的 IAA 合成, 而 AT63 显示一定的 IAA 合成能力, 其每毫升菌体密度等于 1.0 的菌液的 IAA 合成量为 $2.24\mu\text{g}$ (表 2)。

我们采用 Tn5 探针和色氨酸合成酶 *ipdC* 基因探针, 与野生型和突变株的经 *EcoRI* 完全酶解的总 DNA 样品进行 southern 杂交试验, 结果发现在突变株中一个约 6.6kb 的 *EcoRI* 片段与 Tn5 探针和色氨酸合成酶基因探针杂交均出现强的阳性信号, 在野生型中一个约 2.0kb 的 *EcoRI* 片段与色氨酸合成酶基因探针杂交出现强的阳性信号 (图 3)。

表 2 突变株 AT63 在无色氨酸限制性 A15 培养基中的 IAA 生物合成

Table 2 The IAA production of A1501 and AT63 in A15 minimal medium without L-Trp

Strains	IAA Production($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Strain A1501	/
Mutant AT63	2.24

(图 3)。由此可见, Tn5 转座序列确实插入到了 1 no IAA was detected

突变株的基因组中,插入位点在大小约 2.0kb 的含 *ipdC* 基因的 DNA 片段上,大小约 4.5kb 的 Tn5 转座片段的插入使突变株的阳性杂交信号带增至 6.6kb,同时引起以色氨酸为前体的 IAA 合成途径的阻断(图 3)。

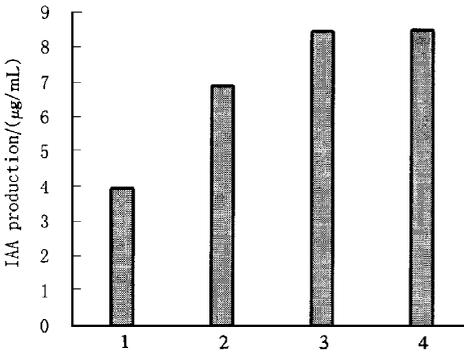


图 2 突变株 AT63 在 LB 培养基中的 IAA 生物合成

Fig. 2 The IAA production of Trp auxotrophic mutant AT63 in LB medium

1. A1501 2. A1501 + Trp 3. AT63 4. AT63 + Trp.

3 讨论

与其它根际微生物一样,粪产碱菌 A1501 可以分泌赤霉素,生长素,细胞分裂素等植物激素^[4]。由于结构上的相似性,普遍认为色氨酸是微生物合成 IAA 的重要前体之一^[2]。据报道,粪产碱菌可以通过依赖于色氨酸的吲哚乙腈途径合成 IAA^[11]。本工作证明,在无氮的限制性培养基中,检测不到 A1501 有 IAA 的生成;加入色氨酸后, A1501 合成 IAA 的量明显增加,这说明在固氮粪产碱菌 A1501 中的确存在依赖于色氨酸的 IAA 生物合成途径。我们对粪产碱菌营养缺陷型突变株 AT63 进行研究发现,该突变株具有两个完全不同于野生型的 IAA 合成特性,即在营养成分十分丰富的 LB 培养基中其 IAA 合成不受色氨酸浓度变化的影响,在不含色氨酸的限制性培养基条件下仍具有一定的 IAA 合成能力。由此推测, A1501 除了具有以色氨酸为前体的 IAA 合成途径外,还可能存在着另一条以吲哚-3-磷酸甘油为前体的合成途径如下:



根据所示的合成途径分析,在不含色氨酸的限制性培养基中,野生型菌株由于生长代谢需要大量细胞蛋白,胞内吲哚-3-磷酸甘油和色氨酸因代谢消耗其浓度极低,以吲哚

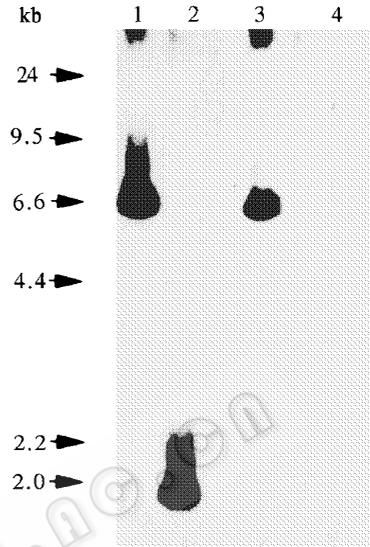


图 3 野生型和 Tn5 突变株总 DNA 的 southern 杂交结果

Fig. 3 Southern hybridization of Total DNA from wild type strain A1501 and Tn5-induced mutant AT63

Lane 1 or 3 :EcoRI-digested total DNA from Tn5-induced mutant AT63 ; 2 or 4 :EcoRI-digested total DNA from wild type strain A1501. Lane 1 or 2 with *ipdC* probe ; 3 or 4 with Tn5 probe.

本工作证明,在无氮的限制性培养基中,检测不到 A1501 有 IAA 的生成;加入色氨酸后, A1501 合成 IAA 的量明显增加,这说明在固氮粪产碱菌 A1501 中的确存在依赖于色氨酸的 IAA 生物合成途径。我们对粪产碱菌营养缺陷型突变株 AT63 进行研究发现,该突变株具有两个完全不同于野生型的 IAA 合成特性,即在营养成分十分丰富的 LB 培养基中其 IAA 合成不受色氨酸浓度变化的影响,在不含色氨酸的限制性培养基条件下仍具有一定的 IAA 合成能力。由此推测, A1501 除了具有以色氨酸为前体的 IAA 合成途径外,还可能存在着另一条以吲哚-3-磷酸甘油为前体的合成途径如下:

-3-磷酸甘油和色氨酸为前体的 IAA 合成难以检测到。在突变株中,由于 Tn5 插入导致色氨酸合成酶失活,由该酶催化的吲哚-3-磷酸甘油(IGP)转化为色氨酸的生物合成被阻断,进而引起细胞内 IGP 的积累,当 IGP 积累到一定浓度时,以吲哚-3-磷酸甘油为前体的 IAA 合成途径启动,突变株在不含色氨酸的限制性培养条件下仍能合成 IAA。

参 考 文 献

- [1] 丘元盛,周淑萍,莫小真,等.微生物学报,1981,21(4):468~472.
- [2] Cheryl L P, Bernard R G. *Can J Microbiol*, 1996, 42: 207~220.
- [3] Prinson E, Costacurta A, Michiles K, et al. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1993, 6(5): 609~615.
- [4] 林敏,尤崇杓.中国农业科学,1989,22(6):6~12.
- [5] Tien T M, Gaskins M H, Hubbell D H. *Appl & Envir Microbiol*, 1979, 37(5):1016~1024.
- [6] Simor R. *Mol Gen Genet*, 1984, 196: 413~420.
- [7] Rhijn P V, Vanstocken M. *Appl & Envir Microbiol*, 1990, 56(4):990~996.
- [8] Hartmann A, Singh M. *Can J Microbiol*, 1983, 29: 916~923.
- [9] Wright A D, Sampson M B, Newffer M G, et al. *Science*, 1991, 254: 999~1001.
- [10] Greenberg E P. *ASM News*, 1997, 63: 371~376.
- [11] Michihi Kobayashi, Hiroshi, Toru Nagasawa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 247~251.

TN5 MUTAGENESIS AND THE CHARACTERISTICS OF INDOLE-3-ACETIC ACID BIOSYNTHESIS IN *ALCALIGENES FAECALIS* A1501*

Li Fafeng^{1,2} Ping Shuzhen¹ Su Baolin² Lin Min¹

(¹The Institute for Application of Atomic Energy, CAAS, Beijing 100094)

(²China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The IAA production of *Alcaligenes faecalis* wild type strain A1501 depended on addition of L-tryptophan (trp). A1501 could grow well in minimal medium without Trp, but could not produce IAA. The results indicated that there was Trp-dependent IAA biosynthesis pathway in *A. faecalis* A1501. A1501 shows a characteristic of cell density-dependent IAA biosynthesis. The Tn5-induced mutant bank of A1501 was constructed using Tn5 mutagenesis and one Trp auxotrophic mutant AT63 was selected and identified. The Tn5-induced mutant AT63 could synthesis 2.24 μ g/mL IAA in minimal medium without L-Trp. It indicated there were at least two IAA biosynthesis pathways in *A. faecalis* one needed Trp, the other needed IGP as precursor. The results of southern hybridization also suggested that the Tn5-insertion might locate in gene locus encoded IAA synthetase.

Key words: *Alcaligenes faecalis*, Tn5 mutagenesis, Tryptophan auxotrophic mutant, IAA biosynthesis

* Financed by National Natural Scientific Foundation(39580001) and National High Technology Project(863-101-03-04-01)