用 TnV 分离粘细菌发育回复突变株*

毛晓华 汪道涌 李新荣
(东南大学医学院生化教研室 南京 210009)

关键词:粘细菌,发育,回复突变
中图分类号:Q933 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2001)02-0241-03

粘细菌是具有社会性行为的一类原核生物[1]。当处于营养缺乏的饥饿状态时,数以万计的细胞可装配成一种复杂的多细胞结构,即子实体(fruiting body)。现在粘细菌已作为一种模式生物研究多细胞结构的形成机制。FruA 是粘细菌中发现的第 1 个发育特异性转录因子[2],但其对靶基因的特异性调控机制尚未完全弄清。我们在研究 FruA 生物学功能的同时,应用转座子 TnV 对发育缺陷的 *fruA* 阻断株 *fruA*::TcΩ5 进行随机突变,分离出一株能恢复正常发育(形成子实体)的回复突变株 XM1206。为了研究 TnV 插入位点的结构和功能,我们进一步从 XM1206 中分离出被 TnV 插入而阻断的 DNA 片段。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种、培养基、试剂和酶

1.1.1 质粒和菌株:*Myxococcus xamthus* DZF1 为粘细菌野生型菌株;*fruA*::TcΩ5 为 *fruA* 阻断变株,在 *fruA* 基因中插入了四环素抗性基因;质粒 pTF1 为 pBR322 中克隆了长 6kb 和 TnV(pBR322::TnV),由 Dr. S. Inouye 赠送。

1.1.2 培养基:TPM 固体培养基:10mmol/L Tris-HCl(pH7.6),1mmol/L KH_2PO4,8mmol/L $MgSO_4$,1.5%琼脂;CYE 液体培养基(%):Casitone 1,Yeast extract 0.5,$MgSO_47H_2O$ 0.1,pH7.6。

1.1.3 试剂和工具酶:实验用酶购自华美生物工程公司和 BM 公司,非同位素 DNA 标记、杂交和检测试剂盒为 amersham pharmacia biotech 产品。

1.2 DNA 操作

DNA 的提取、纯化、酶切、电泳按常规方法进行[3];Southern 杂交按产品说明书进行操作。

1.3 TnV 导入 *fruA*::*TcΩ5*

采用电穿孔法。接种 *fruA*::TcΩ5 于 CYE 液体培养基,30℃震荡培养至菌体密度达 10^9 细胞/mL,离心收集细胞,无菌水洗涤 3 次,最后悬浮细胞于 1/100 体积的无菌水中。取 40μL 细胞与 2μL DNA(0.5~1.5μg)混匀,转至 cuvette(Bio-Rad)。电穿孔条件为 0.65kV,400Ω,25μF,9msec,电穿孔后的细胞加 1mL CYE,30℃震荡培养 5h 后与半固体 CYE (0.7%琼脂)混匀,均匀铺于含 40μg/mL 卡那霉素的 CYE 固体平板,30℃继续培养 4~5d。

1.4 发育回复突变株的筛选

将 CYE 固体平板中的卡那霉素抗性菌落直接接点种于 TPM 平板,30℃培养 1~2d。挑选有发育倾向的菌落接种于 CYE 液体培养基,30℃震荡培养至菌体密度达 10^9 细胞/mL,离心(4000×g,4℃,10min),重悬细胞于 1/15 体积的 TM 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH7.6,8mmol/L $MgSO_4$),点样于

*国家自然科学基金资助项目(39800079)
作者简介:毛晓华(1965-),男,博士,副教授,研究方向:粘细菌发育调控和基因工程药物。
收稿日期:2000-04-28,修回日期:2000-07-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

TPM 琼脂平板(10μL/spot),30℃ 培养 1～2d,进一步确证子实体的形成。

2 结果

2.1 发育回复突变株的分离

TnV 是 Tn5 的衍生物,它在卡那霉素抗性基因和反向重复序列 $IS50_R$ 之间插入了来自大肠杆菌质粒 pSC101 的复制起点,TnV 可以随机转座到粘细菌染色体的不同位点。同 Tn5 一样,TnV 插入突变株表现出卡那霉素抗性,易于筛选。*fruA*::TcΩ5 为发育缺陷的 *fruA* 阻断变株,用 TnV 对 *fruA*::*Tc*Ω5 进行随机突变,从近两千个卡那霉素抗性菌落中筛选出了能重新形成子实体的发育回复突变株 XM1206。

2.2 XM1206 染色体 TnV 位点的分析

为了确认 XM1206 染色体中插入有 TnV,将 XM1206 染色体 DNA 用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 分别酶切,以 pTF1 为探针进行 Southern 杂交分析。由于 TnV 无 *Eco*RI 和 *Bam*HI 识别位点,因此杂交图谱中如出现阳性条带,其大小应为 TnV 和插入 TnV 前该位点 *Eco*RI 或 *Bam*HI 片段之和。从图 1－a 可以直接看出:(1)*Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切产物均出现杂交信号,说明 XM1206 基因组中插入了 TnV;(2)*Eco*RI 酶切后产生 10kb 左右的阳性片段,*Bam*HI 酶切后产生 7.5kb 左右的阳性片段。由于 TnV 的大小为 6kb,因此可以推测插入 TnV 之前该野生型基因座位 *Eco*RI 片段 4kb,*Bam*HI 片段长 1.5kb.为了验证这一推论,从野生型菌株 DZF1 抽提染色体 DNA,*Eco*RI 或 *Bam*HI 酶切后电泳、转膜,与从 XM1206 中分离的 TnV 及其侧翼染色体序列(见结果 2.3)进行 Southern 杂交,图 1-b 可以看出,阳性条带的大小与预期的基本吻合。此外图 1-a 中还出现约 23kb 的弱杂交信号,估计是酶切不全所致。

2.3 XM1206 染色体中 TnV 位点的克隆

从 XM1206 基因组中分离 TnV 及其两侧染色体序列如图 2 所示。用 *Eco*RI 酶切染色体 DNA 产生大小不同的片段,灭活内切酶,连接酶连接后转化大肠杆菌感受态细胞,只有带 TnV 的连接体才能在大肠杆菌中复制繁殖,因为 TnV 含有大肠杆菌质粒 pSC101 的复制起点(ori)。此外由于 TnV 携带卡那霉素抗性,可以直接用卡那霉素筛选出带质粒的转化子。

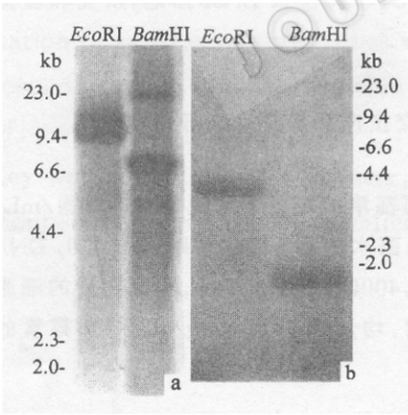

图 1 Southern 杂交分析

Fig.1 Southern blot analysis

a. XM1206 chromosomal digests probed with pTF1;

b. DZF1 chromosomal digests probed with TnV-inserted target DNA.

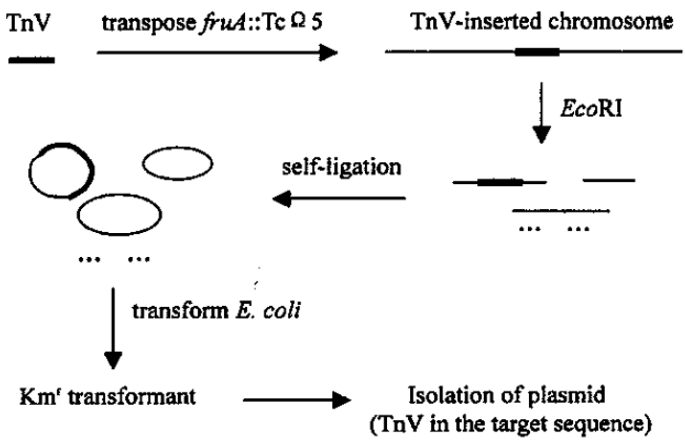

图 2 分离插入 TnV 的靶基因片段

Fig.2 Isolation of TnV-inserted DNA fragment

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

3 讨论

粘细菌在系统分类上属于原核生物，但却与真核生物具有一定的相似性。例如该细菌中存在真核样的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族[4]，提示粘细菌存在真核生物样的信号转导级联反应，因此研究粘细菌多细胞结构形成的分子机制，不仅有助于认识原核生物生命现象中的一些基本规律，而且对理解真核生物发育分化及生物进化有一定意义。目前对参与粘细菌发育分子调控的反式作用因子了解不多，如果不计 σ 因子，FruA 是粘细菌中被明确的第一个发育特异性表达的转录因子[2]，它调控其他基因的表达，而且是粘细菌发育进程中协调细胞间某些信号的调节点[5]。我们在研究 FruA 对靶基因的特异性调控作用机制时，用转座子 TnV 对发育缺陷的 *fruA* 阻断株 *fruA*∷TcΩ5 进行随机突变，分离出一株能恢复正常发育的回复突变株 XM1206。本文应用的转座子 TnV 与通常使用的转座子如 Tn5 的作用机制相同，可以随机转座到细菌染色体的不同位点而使靶基因破坏，推测 XM1206 染色体中被 TnV 阻断的基因座位对粘细菌的发育起负调节作用，而在正常情况下该基因或它的编码产物抑制发育的功能被某些正调控因子例如 FruA 所拮抗。TnV 与其它转座子的不同之处在于前者含有大肠杆菌质粒 pSC101 的复制起点，利用 TnV 的这一特点可以方便地获得插入有 TnV 的 DNA 片段，再以此片段作探针从野生型基因文库中筛选出正常的未被 TnV 阻断的 DNA 位点，因此应用 TnV 进行阻断分析的优点是在后续工作中能方便地对所阻断的位点进行克隆。*fruA*∷TcΩ5 是 *fruA* 功能缺失菌株，不能正常发育，经 TnV 突变后筛选得到的 XM1206 又恢复了正常发育，能够形成子实体，说明 TnV 阻断的座位与粘细菌发育密切相关，可能是一种发育抑制基因(suppressor)。我们准备从野生菌株中克隆该基因，明确它的基因结构和功能，这有助于增进对粘细菌发育调节网络的认识。本文自 XM1206 分离的插入 TnV 的 DNA 片段为从野生菌株中完整克隆该基因奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Dworkin M. *Microbiol Rev*, 1996, **60**: 70～102.

[2] Ogawa M, Fujitani S, Mao X, *et al*. *Mol Microbiol*, 1996, **22**(4): 757～767.

[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著(金冬雁等译). 分子克隆. 北京：科学出版社, 1992.

[4] Munoz-Dorado J. Inouye S, Inouye M. *Cell*, 1991, **67**: 995～1006.

[5] Ellehauge E, Norregaard-Madsen M, Sogaard-Andersen L. *Mol Microbiol*, 1998, **30**(4): 807～817.

ISOLATION OF A DEVELOPMENT REVERTANT OF *MYXOCOCUS XAMTHUS* *

Mao Xiaohua　Wang Daoyong　Li Xinrong

(*Department of Biochemistry, Southeast University Medical College, Nanjing* 210009, *China*)

Abstract: *fruA*∷TcΩ5 is a development deficient strain of *M. Xamthus*. Transposon TnV was used to randomly mutagenize various sites of *fruA*∷TcΩ5 chromosome. Fruiting body formation was restored in one TnV insertion mutant, designated XM1206. The TnV-inserted DNA fragment from XM1206 chromosome was cloned, which may be served as a probe to isolate the corresponding allele from wild-type strain.

Key words: Myxbacteria, Development, Revertant mutant

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39800097)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn