

转座子挽救法对转座子突变菌株中插入位点的定位分析*

阮红¹ Bernhard Eikmanns²

(¹ 浙江大学生命科学学院 杭州 310027) (² Ulm 大学微生物与生物技术学系 德国)

摘要: 为寻找谷氨酸棒杆菌转座子插入突变菌株中的转座子插入位点, 采用了转座子挽救法对转座子及其插入位点附近的序列进行分离, 并测定插入位点相邻 DNA 序列, 获得了三个转座子插入位点 DNA 序列, 其中一个是柠檬酸合成酶基因, 另两个为目前未知基因, 暂命名为 *orfA* 和 *orfB*。该方法简便易行, 是分析转座子插入位点的理想方法。

关键词: 转座子挽救法, 插入突变, 谷氨酸棒杆菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)03-0326-05

采用转座子插入突变方法, 将转座子导入染色体 DNA 并利用转座子插入位点处基因发生插入突变, 从而筛选功能发生变化的突变株, 最后来研究突变株中被插入的基因的功能。该方法已经成为当今定向研究基因的行之有效的方[1-5]。本研究在谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 中成功引入了转座子 Tn5531 的基础上, 对实验室筛选到的乙酸代谢调控功能突变株 G25 上的插入位点进行了定向分析和研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

菌株、质粒及其相关特性见表 1。其中转座子插入突变菌株 G25 是将含 Tn5531 的质粒 pCGL0040 对 *C. glutamicum* 14752 进行 DNA 转化而筛选获得, 测得其表型变化与乙酸代谢调控直接相关。

表 1 本研究菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/plasmid	Relevant characteristics	Source/reference
Strains:		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>tih-1</i> , <i>endA1</i> , <i>lacZα</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1985 ^[6]
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 14752	wide type strain of ATCC 14752	Kinoshita, 1985 ^[7]
G25	transposon mutant of ATCC 14752	keeping in lab
Plasmids:		
pUC18	Amp ^R ori colE1	Vieira, Messing, 1982 ^[8]
pCGL0040	Km ^R oriBR322, Tn5531	Ankri et al., 1996 ^[9]

1.2 培养基

用于 *E. coli* 培养的 LB (Luria-Bertani) 培养基和 *C. glutamicum* 培养的 LB 或 2 × TY 培养基参照 Sambrook 等^[10]。根据实验要求, 在不同的培养基中加入 50 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 卡那霉素。 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 分别置于 30°C 和 37°C 下培养。

1.3 DNA 操作

C. glutamicum 14752 总 DNA 抽提参照 Eikmanns 等方法^[11]。质粒的酶切降解、脱磷酸化和连接反应、 *E. coli* 电激转化等参照 Sambrook 等方法^[10]; *C. glutamicum* 14752 中引入含

* 本课题由德国政府 DAAD 奖学金和国家教育部联合资助

作者简介 阮红(1968 -)女, 讲师, 博士, 从事微生物基因调控和生物活性成分研究。

收稿日期 2001-08-16, 修回日期 2001-10-22

转座子 Tn5531 的质粒 pCGL0040 的电激转化参照 Van der Rest 等方法^[12];DNA 引物制备和样品测序由德国 MWG-Biotech AG 公司测序中心完成。

1.4 转座子挽救法

转座子挽救法是一类能有效定位分析转座子插入位点的方法,通过对转座子及插入位点附近的序列的克隆分离,并进一步测定插入位点相邻 DNA 序列,可获得转座子插入位点处的 DNA 序列,从而达到转座子插入位点的精确定位。本实验转座子突变菌 *C. glutamicum* G25 含有源于 *E. coli* GM2929 的质粒 pCGL0040 中

的 Tn 5531 转座子,它是在革兰氏阳性菌 *C. glutamicum* 中成功应用的含有 Km^R 抗性基因的一类转座子^[9]。由于转座子基因两侧具有 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切位点(图 1),可将转座子突变菌株 *C. glutamicum* G25 进行染色体 DNA 分离并且将之分别进行 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切,回收各自的酶切片段克隆至带有 Amp^R 抗性标记的 pUC18 载体中,转化 *E. coli* DH5 α ,在含有 50 μ g/mL 卡那霉素和 50 μ g/mL 氨苄青霉素的双抗培养基上筛选转化子

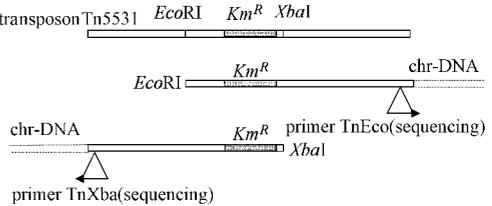


图 1 转座子 Tn5531 的结构和相邻染色体 DNA 测序的引物设计

Fig.1 Structure of Tn5531 and primer design of sequencing the adjacent chromosomal DNA

对 *EcoRI* 酶切片段克隆转化子以及 *XbaI* 酶切片段克隆的转化子进行质粒的检测。检测插入片段大小和方向,挑不同转化子,抽提质粒后以 Tn5531 序列设计的引物 TnEco(5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3')和 TnXba(5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3')进行 DNA 序列测定,与 *C. glutamicum* 基因库的序列进行比较分析获得插入位点序列。

2 结果

2.1 双抗转化子的筛选和质粒检测

在含有 50 μ g/mL 卡那霉素和 50 μ g/mL 氨苄青霉素双抗筛选平皿上,挑取 20 个 *EcoRI* 酶切后经克隆的转化子和 25 个 *XbaI* 酶切后经克隆的转化子,进行质粒抽提和检测,并对这些转化子的质粒进行进一步的不同酶切分析,获得了可能含有不同 DNA 克隆片段或不同 DNA 插入方向的 7 个转化子。对这 7 个转化子进行了质粒的大量抽提,其中从 *EcoRI* 酶切后经克隆获得的 4 个转化子含质粒命名为 pEB4、pEB5、pEB10 和 pES3,从 *XbaI* 酶切后经克隆的 3 个转化子中含质粒名为 pXB1、pXB3 和 pXB6。

2.2 DNA 测序结果分析和比较

分别通过引物 TnEco 和 TnXba 对上述质粒中 Km^R 基因相邻的染色体 DNA 的序列进行测定获得了 4 组不同的 DNA 测序结果,它们分别来自于 pEB10 和 pES3, pXB1 和 pXB6; pXB3, pEB4 和 pEB5 等四组相同的结果,这可能和测序前的不同质粒含有相同插入片段,它们以不同方向插入了载体有关。

对所得的测序结果进行互联网下 *C. glutamicum* 基因库检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)发现,该转座子突变菌含有三个以上的转座子插入位点。发现所有插入位点序列都存在于 *C. glutamicum* 染色体 DNA 上,其中一个转座子插入位点位于柠檬酸合成酶基因 *gltA* 的上游区,另两个插入位点为至今尚未报道的开读框内(这两个对应的开读框

暂命名为 *orfA* 和 *orfB* ,它们的详细序列见图 2 和图 3)

TGCACTTTGCGCCAGAGGGCGACATTGATGGTGAGATCCGCCCGGCATTTTGTCACTGTCACGGTGACTGA
GGCCAAGCCTTTCTTCCTCATCGAGACTCCGGTGTGCAGACCCACCGCCACCAAAGCTGGTGACAACCTCT
GCAGTTGGTCAAGTTCACCAACAGCAGCATCGGTGTGGGCTTGGGACTGCCACAATCGGCCACCAAAG
GTGGCTCTGCCACAGAACTGCCTGCTGCCATTAACTAAAAAT**TGC**AGGCTAGAATAGAGGGTCGATTAG
GAGTCGATGAAAAAGTCGGCGCCAACGAGGAGATGAACAACAACGTGAGTGATCAAAAAGCTAAGTGGTAAA
GAGCTTGCGGCACTAGAGAAAACAAGCCGCAAAAACCTCTCGAACTTGGTGATAAGAAGTGGTATCTCATCCGG
GGAGTCGTGCTTTTCGCCATCGCATCTGCTCCACATATCCGTGGAGTGATGGGCTGGCAGGTTCTGACGGCT
GTCGAATGTCCGCGAGGATGCCGGCAT**TACC**CTTGGTGAGTACGGTTTCTACTGTTGGGCACCATCGGTGTGA
TTCTGCTTTCTTTGGGCACGTGCGTGTTAAGCGCACGTGGATGGCGTGGATTCATGGATTTTCTCCTGCGTC
ACTCTTGTGTTCGCTGTGTTTGGCATCTGGATGCGCCAAACAACCACCGACCCAAAGTGAATTTTCGTCAACAT
TGCCATGATGCTTGTGATGTCAGCGATCCTTGTGTGGGGTCTATCTTCGGTGATTTTGGCCCGCAGTG
ATCGCCAAATGGAGATCGTGAAATGCGCGCCGAGAACCAGACCTTGTATGGTGTTCAGCTACCCAGCGCG
CACTTCTTGGAGCAGCAGAAAGCAACCCAGAAGATAATCTTTGCTTGTGACGATCGTCCGCCCATCCG
CCGCGCCCGCAGCGTGAACAGGATGCACAAGGGGAGCAGGCTTAAAGTCTAGTTCAAGCGGTTGATCACA
TACAAGTGGTCAACCGCTTTTCCGTGCCCGCTGGGATGCGATTTTAAAGGCTCGTTTCTTCGGAATGAGTGT
GTATCGCTTGAGGTGTTTAGCGCTTAGAAGCCATTCTGTGAGGTCGCTTTTTCAGGTTGGGGTCAAGTTT
ACCTCTCTTCGCTGCGAACTGTCGAAATAAACCAAGCGCACTTACTGCGCTGAGCTTTTGGCCTAAAAAGA
CACTAATCGGCTCTCGAA

图 2 从谷氨酸棒杆菌基因库中获得开读框 *orfA* 全序列

Fig.2 The sequence of *orfA* from the genome bank of *C. glutamicum*

Underline sequence showed up to 99.9% identity with the sequence of pXB3 plasmid from transposon rescue , and TTG is the start coden , TAA is the stop codon.

AGGGACACCACCATCACCTGGTCTGCACCAATTGCGGTGCGACAGTCGAAATCGATGGCGGTCCAGTAGAGA
CATGGGCACAGGAAATTGCACATAAAAAACGGCTTTGCTCTCAGTAGTCACGAGGCTGAAATCTTTGGACTTTG
CGCTGATTTGTAAGGAAAAAGTACGTAGTTCAAGGACATATGAAGCTGTGCAACATGTGAGTGCTCGACAGC
TTTTCTATTTTCGAAAAATAGCCTTGTATTTCGAAAAATTTGATCGGGTATGGTGGTTGGTATTAGCACAGGAACT
AAACGGGAAAGGGGAAGACACC**ATG**AGCATCACACACAGTCCAAGCACTCACACAGCACTCAACGCC
ATCGACAACCAATTTGGCCAGCATGCTTGACCATGGTGTACCCCGAGACCAATACAAGCCCTCGAGCCCGACC
TCATCGCCCTAGAACACACCATCAACCCACAGCCACATCGCCGCCAAACCACCGCCATGCGCGAAGCAGCA
CAATGTGCGCAGTCGATTTGGTCTCACCCACCTCATCGACTACCTCACCAACCTTCGGCCTATCTAAAGCA
CGCGCCACCACCGCATCAATCTCGCCACTCCCTCTACCCCATACCGAAGCCAAACTCTGGATCTGGCAACG
GCGGTAATGGTGGCAATCCCGATGGCGTCTGATGGTGGCGACTCGGGTGTGACGACTCCGCGGATGATG
ACCCGACCCCGAACCGGACAAGCTGAAGACGGCAAAACCTGATAGTGAATAGCCCGGTAGGCCACGGATCA
GCGCGGAAAAACACGCCATCATCACCGACGAACCTCGCCGCTCAACCCGAATACCACACCCAGCGCGGAGG
AACTACGCACCCAAAGCCCTGAGTCAAGCGATCTGGCGCACCCCGAGAAGACCTCCGCACGTGGCTACGCCACC
AGGTCACACCCGGAACAAAAACAACCCCAACCCCATACCGCCATGAAAAGGCGCTACCTCTCAGTAGGTA
AACCCGATGCGCGAACACATGGTCCGATCAGCGGCCTGTGCCCGCAGCCACCGACGCATGATCACCCGGA
ACACCGCACCGTTAAACCAACGTGGCAACCTCGTGGATCTACCAGCAGCAGAAGATATGCGCACCCGCGGGC
AACGCCATGCGGATGCGTTCATCATATGAGATCTACAACACCGTATTGTCACCCAGCTCGTGGTGG
AACAGCCAGCATCATCTCCATGACCACCGATGATCTTGACGAGATCAACCACGGTATCATGGCGATGCG
AGTCTACTTAACAACCTGTACCCACGAAACCGGTTACTACTTGAACCTTGGCGGAGTACATAAACCTCATCG
CTGCGAAATACGACTTCGCTGTGCTCCTCGATGGTGAAGCGGGCAGCCGTTGAACGTCAATAGGATGCAGC
GCTCAGCGAACCTGATCAACCGCATCGCGTGTGTTGCTTGAAGTGGTGTGCTCGGCACCCAAATGTGACAG
CGCGCAGTTAGAGTGCAGGTTTCATCATTAGATCCCTGGATGAGAGGTGGGTGACCAACCTGGTCAATCTC
ACGCATCAGTGCTTTAATCACCCACCGCAACGATGATCCAGGATGGGGTCAATGGTAAAGGGTTTATGG
ACCGCATCCTGCTACTGGAAGAGTGGGGCACTACCCAGTGGGTGGTGAAGGGCCCGTGTTTAACCGGTCCG
CTGCTGCTGATAGTTCCGGTGGTGGCTGGGGCAGACGTAAACATCATGGCCACCCGAAACCCGCGGACCC
CGCGGATCCACCTGGTCTGAGCCGATCCTGGTGTGAGGGCAGATTGTTCT**TAG**CCCTTGTATTGCTGAGT
TGTGTGATGTTGTTGTGCTGTTGTCAGTTCGCCCCAGTGTGTCTGATACCGGACACACCCATGCCTTGCATCA
ACATACCGACAAGCCAGCACACCCGAACTGGCCAGCCGGGCCCGGGCCGCTGCAACCTGACCTGACGTGAGAA
CAAGAGCTTTTAAAGGATGATCGCCGAACAGGAGGACGACGTAGGTGACCCAGCCGCGCGCTAGCCGAT
CGACAGCTGACGACCCGCGGATTTCCCGTGGCTTTCCCGATAGCAGGCGCGGTGGTTCGCGCCCGCTTGGCCATC
AGTGATAGTCCGACGAGGACTAGGGACACCACTGCCCGCGGAGGCGCTTCCATGCCGAAGACGATGGGACG
ATCGGGAGGAATGCGCGGATGGCAAAGGACAGGAAGCTGAATGTGGCGGCCGAACGAGCGGAGCCGCGCT
TTGGATTTCCGGTGTGCGGAGGACGTTGTCGCTGATGCGTTTTTGGTTCGCTGATCTTTGGAACACTGTGACG
CTTTTGGCCGCGCTTCGCTTCGCTCATTCGCGGGCTCGGTAGACGATTCAGTTCGCTGGATT

图 3 从谷氨酸棒杆菌基因库中获得开读框 *orfB* 全序列

Fig.3 The sequence of *orfB* from the genome bank of *C. glutamicum*

Underline sequence showed up to 99.0% identity with the sequence of pEB4 or pEB5 plasmid from transposon rescue , and ATG is the start coden , TAA is the stop codon.

四组测序结果分别对应如下(图 4):① pEB10 和 pES3(距柠檬酸合成酶基因 *gltA* 起始密码子上游第 51 个核苷酸处,与基因库及发表的序列^[11]同源率 99.6%);② pXB1 和 pXB6(始于 *gltA* 起始密码子上游的第 42 个核苷酸处,与基因库及发表的序列^[11]同源率 100%);③ pEB4 和 pEB5(插入位点为基因库 *orfB* 中起始密码子下游第 1345 个核苷酸处,同源率为 99.9%);④ pXB3(插入位点为基因库 *orfA* 中起始密码子下游第 93 个核苷酸处,同源率为 99.9%)。

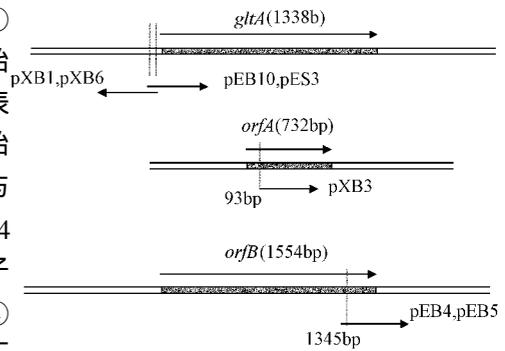


图 4 转座子插入位点处三个开读框的发现

Fig. 4 Three transposon integrations within orfs were found

3 讨论

运用各种转座子插入突变手段进行基因相关功能的研究,是目前开展基因定位及其功能研究,特别是一系列调控基因研究的首先方法,至今该方法已成功地运用并发现了 *Alcaligenes eutrophus* 中参与苯酚代谢的调节基因 *phlR1* 和 *phlR2*^[21]; *Bacillus subtilis* 中的调节基因 *degR*^[31]; *Pseudomonas Putida* 中调节基因 *asfR*^[41]; *Streptococcus aureus* 中毒力调控基因 *rot*^[51]; *E coli* 中调节镍转运的基因 *nikR*^[131] 和 Group A *Streptococcus* 涉及阻遏透明质酸合成的双成分 CsrR-CsrS 调节系统^[141]等。

采用曾在 *C. glutamicum* 中使用有效的转座子 Tn5531^[91]进行插入突变,获得了乙酸代谢中呈现解调控表型变化的突变株 *C. glutamicum* G25,进一步对 *C. glutamicum* G25 的 Southern 杂交实验发现,有明显的三个杂交带,在此工作基础上,本研究采用了转座子挽救法,将转座子及其插入位点附近的染色体 DNA 一起被克隆至载体中,通过其克隆片段的部分 DNA 序列的测定找到了三个不同的转座子插入的位点。经英特网上 *C. glutamicum* 基因库搜寻,发现了这三个转座子插入的部位为:柠檬酸合成酶基因 *gltA* 的上游区域; 732bp 大小的未知基因 *orfA* 内部和 1554bp 大小的未知基因 *orfB* 内部,该两个未知基因与目前在其它微生物乙酸和脂肪酸等代谢中发现的 *fadR*、*iclR* 和 *ccpA* 等一系列调控基因并无同源性。鉴于以上结果,有必要对柠檬酸合成酶基因和两个未知基因开展定向的深入的研究。本实验对于乙酸代谢功能突变株 *C. glutamicum* G25 中插入突变位点的分析,将把乙酸代谢功能变化的研究与该插入位点处的三个基因紧密地联系在一起,以进一步寻求插入突变株 *C. glutamicum* G25 的表型变化的真正原因。

参 考 文 献

- [1] Singer M, Berg P. Genes and genomes. Mill Valley, California: Blackwell scientific publications, 1991.
- [2] Kim Y, Harker A R. *Mol Cells*, 1997, 7: 620 ~ 629.
- [3] Ogura M, Hirao S, Ohshiro Y, et al. *FEBS Lett*, 1999, 457: 112 ~ 116.
- [4] Vermeij P, Wietek C, Kahnert A, et al. *Mol Microbiol*, 1999, 32: 913 ~ 926.
- [5] Menamara P J, Milligan-Monroe K C, Khalili S, et al. *J Bacteriol*, 2000, 182: 3197 ~ 3203.
- [6] Hanahan D. Techniques for transformation of *E. coli*. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, 1985, 109 ~ 135. journals. im. ac. cn

- [7] Kinoshita S. Glutamic acid bacteria. London :The Benjamin/Cummings Publishing Company ,1985. 115 ~ 142.
- [8] Viera J , Messing J. *Gene* ,1982 ,**19** :259 ~ 268.
- [9] Ankri S , Serebrijski I , Reyes O , *et al.* *J Bacteriol* ,1996 ,**178** :4412 ~ 4419.
- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis J. Molecular cloning. 2nd. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [11] Eikmanns B J , Thum-Schmitz N , Eggeling L , *et al.* *Microbiology* ,1994 ,**140** :1817 ~ 1828.
- [12] Van der Rest M E , Lange C , Molenaar D. *Appl Microbio Biotech* ,1999 ,**52** :541 ~ 545.
- [13] De Pina K , Desjardin V , Mandrand-Berthelot , *et al.* *J Bacteriol* ,1999 ,**181** :670 ~ 674.
- [14] Levin J C , Wessels M R. *Mol Microbiol* ,1998 ,**30** :209 ~ 219.

Analysis on Integration Sites of Transposon-insertion Mutant by Transposon Rescue

Ruan Hong¹ Bernhard Eikmanns²

(¹ College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310027 , China)

(² Department of Microbiology & Biotechnology , Ulm University , Germany)

Abstract : In order to define the chromosomal locus of the transposon integration in a mutant of *Corynebacterium glutamicum* , transposon rescue experiments were performed. By isolating parts of the transposon together with adjacent parts of the bacterial chromosome and subsequent sequencing of the adjacent parts , the mutant was found to have three transposon integrations , one just in front of the citrate synthase gene *gltA* , the other two in hitherto unknown open reading frames designated *orfA* and *orfB* . The transposon rescue experiments are proven to be a easy , practical and ideal way in analyzing the transposon integration sites.

Key words : Transposon rescue , Insertion mutagenesis , *Corynebacterium glutamicum*

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自2001年41卷第1期开始继续扩版,双月刊,每册128面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期缩短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部