

假单胞菌 M18 转录调节因子 σ^S 基因与无启动子 *lacZ* 基因融合突变株的构建和鉴定

葛宜和^{1,2}, 许煜泉^{1*}

(¹ 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(² 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

摘 要 通过菌落原位杂交和 Southern 杂交,从假单胞菌 M18 基因组文库中克隆了 *rpoS* 基因及相邻序列。为了深入研究影响 *rpoS* 基因表达的调控因素,运用同源重组技术,将无启动子 β -半乳糖苷酶基因(-'*lacZ*)插入并融合于 *rpoS* 基因中,构建了假单胞菌 M18 *rpoS* 基因突变株 M18SZ。Miller 法测定显示,突变株 M18SZ 的 β -半乳糖苷酶可高达 480U,而野生株检测不到 β -半乳糖苷酶活性。表明,突变株中的 *rpoS* 基因与无启动子 β -半乳糖苷酶基因已融合并且表达。在 KMB 培养基中生长量测定(OD_{600})的结果表明,突变株与野生株生长存在显著差异。

关键词: 假单胞菌 M18; *rpoS*; *lacZ*; 插入突变; 融合; 鉴定

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0709-05

原核生物在不同生长时期和不同的环境胁迫因子作用下,通过表达不同的 σ 因子并与 RNA 聚合酶核心酶结合,从而启动一系列不同的基因转录^[1,2]。在多种革兰氏阴性菌和一些革兰氏阳性菌中,已发现并证实的 σ 因子包括 RpoD、RpoE、RpoF、RpoN、RpoS、PvdS 等 20 多种。其中大多数 σ 因子在对数期的后期及稳定期中得以表达,尤其是在环境中营养成分消耗殆尽时,通过与核心酶竞争结合以调节并控制细菌不同次生代谢物的代谢过程^[3]。

RpoS,即 σ^S ,一般认为在细菌由对数期进入静止期时转录并表达的一种转录调节因子。当 *rpoS* 基因突变后,*E. coli* 对各种胁迫因子如温度、盐浓度、 H_2O_2 及各种营养因子等的敏感性增强^[4]。在荧光假单胞菌 Pf-5 和 CHA0 中,当 RpoS 缺失时,突变株的胞外分泌物及抗生物物质合成等次生代谢受到显著影响^[3,5]。在铜绿假单胞菌 PAO1 等病原菌中,*rpoS* 基因的突变导致毒力因子的合成与分泌的改变^[6]。尽管许多细菌 *rpoS* 基因对次生代谢的影响为人们所知,但是其作用机制和调控路径并不十分清楚。不过一般认为,RpoS 对抗生物物质的合成代谢的影响是间接的,可能通过 σ^S 启动某些迄今未知的调节因子的表达,并以此直接或者间接地调控抗生物物质的基因表达^[3]。

假单胞菌 M18 因其分泌两种抗生物物质吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿脓菌素(Plt),表现出强大的生物防治功能,在绿色农业中有潜在的应用前景^[7]。作为一种重要的次生代谢调控因子,其研究主要集中在为 RpoS 所调控的基因或序列的鉴定、调控的方式与机制等方面,对 *rpoS* 基因的自身表达与调控的研究较少。目前,只是在铜绿假单胞菌等菌株中报道并鉴定了一个 *rpoS* 基因的调控因子 P_{SrA}^[8]。为了研究 RpoS 因子对抗生物物质合成代谢的影响,尤其是 *rpoS* 基因自身表达与调控的方式与机制,本研究通过菌落原位杂交从假单胞菌 M18 基因组文库中克隆了 *rpoS* 基因及其相邻片段,然后将无启动子的 *lacZ* 基因插入并融合于 *rpoS* 基因,再通过同源重组技术构建融合突变株。为进一步筛选 *rpoS* 基因表达与调控相关基因或序列创造条件。利用该方法进行 *rpoS* 基因表达调控的研究未见文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所涉及的菌株、质粒及来源详见表 1。

1.1.2 试剂和仪器: 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA 分子量标记物均购自 MBI 公司

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA308A02-14)、国家自然科学基金项目(30370041)

* 通讯作者。Tel: 86-21-54743347; Fax: 86-21-54743348; E-mail: xuyq@situ.edu.cn

作者简介: 葛宜和(1969-)男,江苏宿迁人,讲师,博士,研究方向为微生物次生代谢的分子调控机制。E-mail: geyihe@126.com

收稿日期: 2005-11-08; 接受日期: 2006-03-10; 修回日期: 2006-03-14

(Fermentas, Lithuania); DNA 胶回收试剂盒购于上海华舜生物科技公司; 用于原位杂交和 Southern 杂交标记探针的同位素 [α - 32 P] 购自北京亚辉生物科技公司; 5-溴-4-氢-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 和 O-硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 购自上海 Sangon 公司;

其它生化试剂级别均为分析纯。本实验所需主要仪器有分子杂交仪 (HBSNSR220, Thermo Electron Corporation, USA)、恒温振荡摇床 (CLASSIC C25KC, New Brunswick Scientific Edison NJ, USA) 和高效液相色谱仪 (LC-10ATvp Shimadzu, Japan) 等。

表 1 菌株和质粒

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>hsdR17 recA1 endA1 thi-1</i>	Lab collection
SM10	F- <i>thi-1 thr-1 leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44</i> Mu $_C^+$ λ -Km r	Lab collection
<i>Pseudomonas</i> sp.		
M18	Wild type, PCA, Plt producer, Sp r Rf r	Lab collection
M18SZ	<i>rpoS</i> gene inserted and fused with <i>lacZ</i> in frame, Sp r Rf r	This study
Plasmids		
pBluescript SK+	cloning vector, ColE1 replicon, Ap r	Lab collection
pGEMS	pGEM-T easy vector carrying 1.0kb PCR fragment of <i>rpoS</i> , Ap r	Lab collection
pBLS	pBluescript SK $^+$ carrying 3.1kb <i>EcoRI-XhoI</i> fragment of <i>rpoS</i> , Ap r	This study
pNM481	' <i>lacZ</i> fusion vector, Ap r	Heeb S.
pNM482	' <i>lacZ</i> fusion vector, Ap r	Heeb S.
pBLSZ	<i>rpoS</i> inactivated and fused in frame with <i>lacZ</i> in pBluescript SK $^+$, Ap r	This study
PEX18Gm	gene replacement vector, Gm r oriT $^+$ <i>sacB</i> $^+$	Schweizer HP.
pEXGSZ	<i>rpoS</i> inactivated and fused in frame with <i>lacZ</i> in PEX18Gm, Gm r	This study
pRKS1	cosmid containing the <i>rpoS</i> gene screened from genomic library of <i>Pseudomonas</i> sp. M18	This study
pRKS2	cosmid containing the <i>rpoS</i> gene screened from genomic library of <i>Pseudomonas</i> sp. M18	This study

1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌菌株采用 Luria-Bertani (LB) 标准培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养^[9]。假单胞菌 M18 及其衍生株采用 King's medium B (KMB) 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养^[10]。相应固体培养基每升加 15~20g 琼脂。液体培养时, 摇床转速为 180r/min (大肠杆菌) 和 220r/min (假单胞菌)。培养时所需抗生素 (μ g/mL): 氨基青霉素 (Ap) 100, 庆大霉素 (Gm) 40, 壮观霉素 (Sp) 100。

1.3 菌落原位杂交与 *rpoS* 基因片段的克隆和测序

质粒和柯斯质粒的提取采用碱裂解法进行。与之相关的酶切、修饰、回收、连接、转化等 DNA 操作以及探针标记与制备、菌落原位杂交与 Southern blots 均按文献 [9] 提供的常规方法进行。其中杂交探针采用克隆在 pGEM-T 中 *rpoS* 基因的 PCR 产物, M18 基因组文库的构建与特征参见文献 [11]。DNA 序列测定委托上海博亚生物技术有限公司承担。基因序列分析所需软件包括 DNA Club、DNAMAN 和 BLAST 等。

1.4 融合突变株的构建

依据双亲杂交法进行同源重组^[12], 通过固相滤膜细菌结合转移技术完成突变株的构建^[13]。

1.5 融合突变株的生长曲线测定

将野生菌株 M18 与融合突变株 M18SZ 分别同时培养于 KMB 中, 28 $^{\circ}$ C 培养且每隔 8h 取样测定光

密度 (OD_{600}) 重复 3 次, 取平均值。

1.6 β -半乳糖苷酶活性的表达和突变株的鉴定

为了鉴定融合突变株构建是否正确, 将野生型与融合型菌株在相同条件下分别同时培养。培养条件为: 菌株接种于盛有 50mL KMB 培养基的 250mL 三角瓶中, 220r/min, 28 $^{\circ}$ C。定时取样并按 Miller 法进行 β -半乳糖苷酶活性测定^[9]。

2 结果

2.1 *rpoS* 基因及相邻片段的克隆

从 pGEMS 中酶切得 *rpoS* 的 PCR 片段为探针, 进行菌落原位杂交获得 2 个阳性克隆 pRKS1、pRKS2。提取柯斯质粒 pRKS1 用 *Bam* H I、*Eco* R I、*Eco* RV、*Hind* III、*Pst* I、*Sal* I、*Xho* I 等多种常规的限制性内切酶进行酶切、电泳。进一步进行 Southern 杂交分析 (图 1), 因引物标记过程中添加 0.01 μ g 的 1kb DNA Ladder, Marker 中故出现杂交带。在同源重组过程中, 插入位点两侧的片段越长双交换的机会就越大, 同时考虑到 *rpoS* 基因中合适插入位点的选取及插入片段 (*lacZ*) 较大等因素, 故选取泳道 4 中约 3kb 的最常用酶 *Eco* R I - *Xho* I 双酶切片段进行克隆。该片段经割胶回收克隆于 pBluescript SK+ 相应位点之处, 相应的质粒为 pBLS。测序结果显示, 其中含有 *rpoS* 基因序列的 ORF 共 1005bp, 编码 334

个氨基酸。至此,通过上述过程获得并克隆了 *rpoS* 基因和其相邻序列,长度为 3164bp,该片段在 GenBank 中的登录号为 AY728157。不同菌株的相应序列同源比对结果显示,不仅 *rpoS* 基因本身与其它假单胞菌菌株的同源性很高,而且其上下游基因片段与其它假单胞菌菌株的同源性也很高。其中 RpoS 与 *P. aeruginosa* PAO1 的 RpoS 同源性高达 99%^[6]。

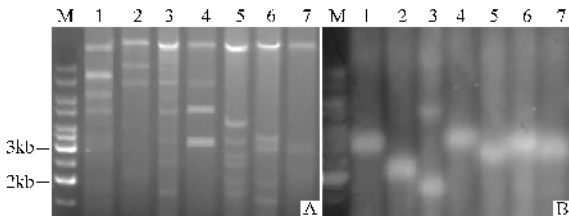


图 1 阳性克隆的酶切图谱(A)和 Southern 杂交分析(B)

Fig. 1 Restriction map of positive clone (A) and Southern blot analysis (B). M, 1kb DNA ladder; 1, *EcoRI*; 2, *EcoRI*-*PstI*; 3, *BamHI*; 4, *EcoRI*-*XhoI*; 5, *EcoRV*-*XhoI*; 6, *HindIII*-*XhoI*; 7, *SalI*.

2.2 *rpoS* 基因与 *lacZ* 基因的体外融合突变

在 *rpoS-lacZ* 融合突变株的构建过程中,首先必需在体外构建基因 *rpoS* 与 *lacZ* 按照读码框顺序的基因插入与融合。具体步骤为:根据序列分析,选取位于质粒 pBLS 上 3.1kb *rpoS* 基因片段中的 *StuI* 酶切位点,以 *StuI* 酶切之。胶回收后,使之与来自质粒 pNM481 的 *lacZ* 基因片段^[4]相连接,所获得的阳性克隆命名为 pBLSZ(图 2)。由图 2 可知,来自 pNM481 的 *SmaI*-*DraI* 双酶切 *lacZ* 基因片段,长度约为 3.0kb。按正确的方向插入于距翻译起始点

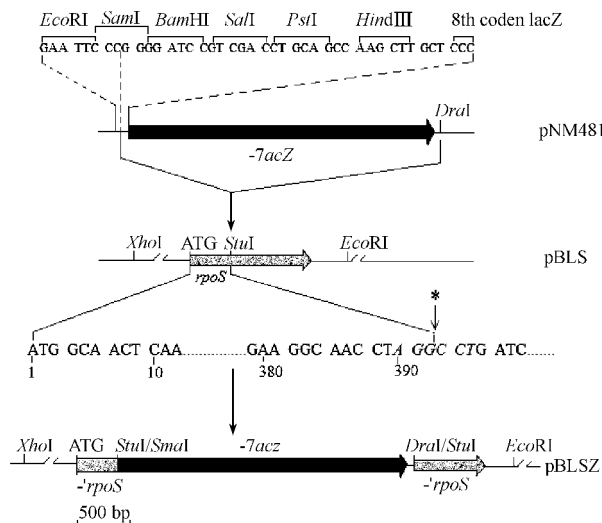


图 2 质粒 pBLS 中 *rpoS* 基因与无启动子 *lacZ* 基因融合

Fig. 2 Construction of *rpoS* gene fusion with promoterless *lacZ* in pBLS. * indicates the *StuI* site where the promoterless *lacZ* was inserted in.

(ATG)390bp 的 *StuI* 位点,则使 RpoS 因子上游 130 氨基酸的肽链与缺失前 8 个氨基酸的 *lacZ* 基因片段恰好按读码顺序融合。所得克隆 pBLSZ 的酶切分析表明,完成并获得了 *rpoS* 基因与 *lacZ* 基因的体外融合突变。为实施同源重组并构建融合突变株,用 *EcoRI*、*XhoI* 双酶切 pBLSZ,再将经回收和纯化的长度 6.1kb 的 *rpoS-lacZ* 融合基因片段与经 *EcoRI*-*SalI* 双酶切的自杀质粒 pEX18Gm 相连接^[12]。连接产物经化学转化法转化感受态的 *E. coli* DH5 α 并通过 α -互补筛选阳性克隆。经酶切验证后的阳性克隆 pEXGSZ 转化 *E. coli* SM10,得到的转化子 *E. coli* SM10(pEXGSZ)可用于两亲杂交。

2.3 两亲杂交与融合突变株的筛选

将供体菌 *E. coli* SM10(pEXGSZ) 受体菌假单胞菌 M18 分别在含庆大霉素(20 μ g/mL)壮观霉素(100 μ g/mL)的液体培养基中培养过夜。分别取上述菌液 500 μ L 经离心、两次无菌水洗涤后混合并悬浮于 100 μ L 的 LB 培养基中。将此混合菌液涂布于无抗生素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24h。挑取菌斑悬浮于一定的 LB 培养基中并涂布于 Sp¹⁰⁰和 Gm⁴⁰ 的双抗平板。将该种平板上的克隆接种于仅含壮观霉素(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中作传代培养。经 5~10 代后稀释涂平板获得单克隆。将单克隆菌影印于分别含 Sp¹⁰⁰、Sp¹⁰⁰Gm⁴⁰ 的 LB 平板上。其中 Sp¹⁰⁰Gm⁴⁰ LB 平板上不生长,而对应 Sp¹⁰⁰平板上生长的克隆即为双交换的阳性克隆菌株。通过此法,在 4 对 200 个克隆中获得 1 个庆大霉素敏感的 M18 菌株,该菌株即为 *rpoS* 融合突变株且命名为 M18SZ。

2.4 *rpoS* 基因融合突变株 M18SZ 的生长曲线

融合突变株 M18SZ 与野生株 M18 的生长曲线图 3。在营养丰富的生长前期,尤其是在菌体密度小于 4.0 时它们生长状况相似。但在生长中、后期,随着菌体密度的增加、菌体总量的增大,培养基中营养因子消耗速率增加。融合突变株 M18SZ 的菌体密度只有野生株 M18 的 1/2。说明 *rpoS* 基因突变引起菌体生长对环境因子的变化比野生株更敏感。该结果与其它革兰氏阴性菌的 *rpoS* 基因突变结果相似^[5,6]。

2.5 *rpoS* 基因融合突变株 M18SZ 的鉴定

双交换株鉴定可以菌落颜色初步鉴定。将野生株和抗性筛选得到的双交换株同时接种于含有 X-gal(60mg/mL)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24h。平板直接观察结果显示,双交换株菌落呈蓝色,而野生株则为白色或淡黄色。表明所得双交换株中的

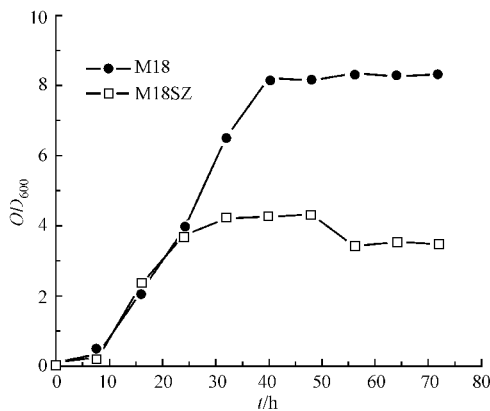


图3 假单胞菌野生株 M18 及衍生株 M18SZ 在 KMB 培养基中的生长曲线

Fig.3 Growth curves of wild type strain M18 and its derivatives M18SZ in KMB medium.

lacZ 基因表达了。

-lacZ 基因是否按照读码框正确插入 *rpoS* 基因并融合,还可以通过比较野生株 M18 与衍生株 M18SZ 的 β -半乳糖苷酶活性表达进行定量鉴定。 β -半乳糖苷酶活性测定如图 4 所示。从图中显示,野生株的 β -半乳糖苷酶活性在整个生长周期中没有变化,活性单位几乎为零。表明野生株 β -半乳糖苷酶基因未曾表达。而衍生株 M18SZ 的 β -半乳糖苷酶活性表达不断增大,可高达 480U。表明衍生株 M18SZ 中与 *rpoS* 基因融合的 β -半乳糖苷酶基因得以表达。由此推断,*rpoS* 基因确已被 *-lacZ* 基因插入且融合了。

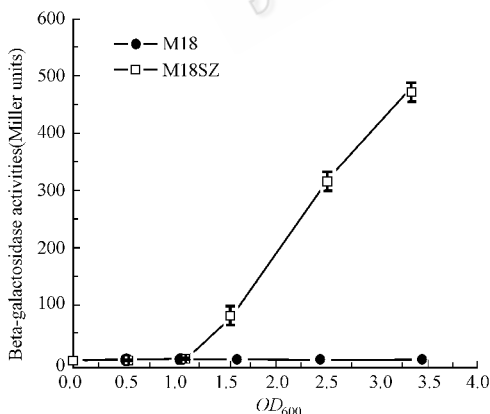


图4 *rpoS* 与 *-lacZ* 融合突变株 M18SZ 与野生株 M18 的 β -半乳糖苷酶活性测定

Fig.4 β -Galactosidase activities detected in mutant M18SZ or wild type strain M18. Each point is the mean of three measurements \pm standard derivation.

3 讨论

本研究从假单胞菌 M18 基因组中克隆了 *rpoS* 基因及其相邻片段,然后通过同源重组将无启动子

的 β -半乳糖苷酶基因(*-lacZ*)按读码框顺序插入并融合于 *rpoS* 基因,最终成功表达。由此构建的融合突变株为进一步研究因 RpoS 缺失导致的细菌生长、生理、次生代谢等变化构筑了平台。同时,因融合突变株的 β -半乳糖苷酶(融合蛋白)活性表达水平完全由 *rpoS* 基因的启动子决定,此衍生株有利于进一步研究调控 *rpoS* 基因表达的内、外因素。

就目前研究方法而言,插入突变株构建的验证主要采用 Southern 杂交或 PCR 方法。对于一般插入突变株的构建,Southern 杂交或 PCR 证据是不可缺少的。如采用抗性基因(如抗卡那、抗庆大霉素等基因盒)插入引发的突变,就必需有 Southern 杂交或 PCR 证据。原因在于抗性基因盒不论通过同源重组定点插入于特定部位,还是随机插入在基因组 DNA 的其它部位,突变株都有抗性性状出现。因此定点突变必需通过 Southern 杂交或 PCR 方法来证明。

然而,运用本文相应方法构建的融合突变株可以采用生化测定法(Miller 法)而省略 Southern 杂交或 PCR 法进行验证。鉴于在体外(克隆载体)进行 *rpoS* 基因与 *-lacZ* 插入融合操作时,选择 *rpoS* 基因的合适的酶切位点并按照正确的读码顺序使 *rpoS* 基因与无启动子和缺失前 8 个氨基酸编码序列的 β -半乳糖苷酶基因准确融合。显然,融合的结果表明插入的存在(而且是定点融合插入),插入的发生引发被插基因或序列的突变。只要 β -半乳糖苷酶基因按读码框顺序正确插入,通过简单的生化方法(Miller 法)对突变株与野生株的 β -半乳糖苷酶活性进行测定并比较就可证实。尽管 Southern 杂交是目前常用的且最令人信服的有力证据,但该方法步骤多、费用高。即便 Southern 杂交验证获得了阳性结果,虽可证实 β -半乳糖苷酶基因插入的事实,但仍不能证实 β -半乳糖苷酶基因按正确的读码顺序插入,即可证实是否插入,不可证实是否融合。因此仅有 Southern 杂交是不够的。PCR 是目前用于验证突变株的另一种常规方法。此法需设计引物、PCR、产物测序等,方可验证位点的正确插入。因此 PCR 也不是一种鉴定此类型突变株的最佳选择。

由此推断,通过与 β -半乳糖苷酶基因构建融合突变株具有鉴定方法简单、直观、价格低廉等优点。不过此法构建突变株也有其缺点与局限性。一是对实施融合突变的基因(目标基因)的结构、核苷酸顺序要明确,目标基因或序列必须能够表达。二是由于插入的基因片段(*-lacZ*)较长(约 3.0kb),若目标基因插入位点两侧的序列相对较短,双交换的频率低,筛选突变株的难度相对较大。因此,利用 β -半乳

糖苷酶基因构建融合突变株还是利用抗性基因插入构建一般突变株或其他方法构建突变株应根据实验需要、目的和条件等因素确定。

参 考 文 献

[1] Ihssen J, Egli T. Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2004, **150** :1637 – 1648.

[2] Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66** :373 – 395.

[3] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, **41** :117 – 153.

[4] Richard RB, Larry A. How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4** :126 – 131.

[5] Kabir MS, Sagara T, Oshima T, et al. Effects of mutation in the rpoS gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2004, **150** :2543 – 2553.

[6] Whiteley M, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2000, **182** :4356 – 4360.

[7] Ge YH, Huang XQ, Wang SL, et al. Pyoluteorin is positively regulated

and phenazine-1-carboxylic acid negatively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Letts*, 2004, **237** :41 – 47.

[8] Kojic M, Aguilar C, Venturi V. TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J Bacteriol*, 2002, **184** :2324 – 2330.

[9] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

[10] King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*, 1954, **44** :301 – 307.

[11] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Letts*, 2004, **232** :197 – 202.

[12] Schweizer HP, Hoang TT. An improved system for gene replacement and xylE fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 1995, **158** :15 – 22.

[13] 张惠展. 途径工程-第三代基因工程. 北京:中国轻工业出版社, 2002.

[14] Minton NP. Improved plasmid vectors for isolation of translational lac gene fusions. *Gene*, 1984, **31** :269 – 273.

[15] Cheryl A, Whistler S, Pierson LS, et al. Repression of phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* strain 30-84 by RpeA. *J Bacteriol*, 2003, **185** :3718 – 3725.

Construction and identification of *rpoS* gene inserted and fused in frame with the promoterless *lacZ* in *Pseudomonas* sp. M18

GE Yi-he^{1,2}, XU Yu-quan^{1*}

(¹ School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

(² School of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract :With hybridization *in situ* and Southern blots, an *EcoRI-XhoI* DNA fragment of 3.1kb in length containing an *rpoS* gene and its flanking sequence was first cloned into pBluescript SK to generate pBLS by screening the genomic DNA library of *Pseudomonas* sp. M18. In order to identify the potential factors involved in *rpoS* gene expression and the regulatory mechanism of RpoS in strain M18, the *rpoS* gene was inserted and fused in frame with a promoterless and truncated *lacZ* gene, and a mutant named as M18SZ was then constructed through homologous recombination. Growth curves in KMB medium indicated that loss of RpoS made the mutant strain M18SZ more sensitive to alteration of some environmental factors. With detection and comparison of β -galactosidase activities from both the wild type strain M18 and its derivative M18SZ cultivated in KMB medium respectively, it was found that the expression level of β -galactosidase activities in the mutant M18SZ was high and could come to 480U. Expression of β -galactosidase activities of the wild type strain M18 in KMB medium was not almost detected during its whole growth phase. With these results, it was confirmed that the *rpoS* gene did be fused in frame with the truncated *lacZ* gene in chromosome of the mutant M18SZ. Meanwhile, it is suggested that construction of a mutation, which is made with fusion in frame with the truncated *lacZ* gene, may be verified by detecting its β -galactosidase activity, not using Southern blot or PCR.

Keywords : *Pseudomonas* sp. M18 ; *rpoS* ; *lacZ* ; Insertional mutation ; Fusion ; Identification

Foundation item : The 10th Five-Year Programs of Chinese National Science and Technology (2001BA308A02-14); Chinese National Natural Science Foundation (30370041)

* Corresponding author. Tel : 86-21-54743347 ; Fax : 86-21-54743348 ; E-mail : xuyq@sjtu.edu.cn

Received 8 November 2005 / Accepted 10 March 2006 / Revised : 14 March 2006

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