

一个圆褐固氮菌的转导系统

杜千有 陈可泳 范成英

(中国科学院植物研究所, 北京)

分离了圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcus*)无荚膜变异株 Aw 的营养缺陷突变株和不固氮突变株以及 Aw 的噬菌体。以 Aw 菌株为给体, Aw 的各种突变株为受体, 通过噬菌体转导, 证明圆褐固氮菌噬菌体 AC-5.1 是一株普遍性转导噬菌体。通过 AC-5.1 的转导, 这些突变株都能成为原养型并恢复固氮能力。

对好气固氮菌的遗传学研究, 不仅有利于固氮基因的无性繁殖, 而且有可能阐明固氮酶的氧保护机制, 最终将有益于固氮基因引入植物细胞并表达其功能。圆褐固氮菌是好气性自生固氮菌, 它的遗传系统至今未见报道过。下面报道的一个圆褐固氮菌的转导系统, 为开展好气性固氮菌的遗传研究, 建立了一个遗传分析方法。

材料和方法

(一) 菌株和噬菌体

圆褐固氮菌无荚膜变异株 Aw 及其噬菌体 AC-2.1、AC-2.2、AC-2.6、AC-5.1、AC-5.2、AC-5.3、AC-5.9、AC-100 均系本室自行分离得到。

(二) 培养基和培养条件

基本培养基: 采用 Burk's^[1] 无氮培养基稍加修改后作为基本培养基 (简称 Bu)。每升中含 (毫克): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 895, KH_2PO_4 11, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200, NaCl 10, FeSO_4 6, NaMoO_4 0.71, NaHCO_3 50, 蔗糖 20 克, 用 1 N NaOH 调节 pH 至 7.8。固体培养基加 1.8% 或 0.9% 琼脂。

完全培养基: Bu 培养基每升中加 5 克酪蛋白水解物即为完全培养基 (简称 CA)。

富铵培养基: Bu 培养基每升中加入 2 克 NH_4Ac 即为富铵培养基。

限量培养基: Bu 培养基每升中加入 50 毫克酪蛋白水解物即为限量培养基。

保藏培养基: Ashby's^[2] 琼脂每升加入酪蛋

白水解物 4 克, 酵母膏 2 克, 制成菌种保藏斜面培养基。

培养温度为 30℃, 液体培养物采用 130 次/分的旋转式摇床振荡培养。

(三) 突变体的分离

参照 Adelberg 等^[3]的方法, 用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (简称 NTG) 对 Aw 菌株进行诱变。NTG 溶于 pH 6.0 的 0.05 M Tris-Malate (简称 TM) 缓冲液中。被处理菌在 TM 缓冲液中配成 10^8 细胞/毫升。NTG 最终浓度为 100 微克/毫升, 30℃ 下处理 15 分钟。处理后, 将菌液适当稀释铺于限量培养基平皿上。培养 3—5 天, 用灭菌牙签挑取小菌落做复制平皿。

(四) 噬菌体裂解液的制备

噬菌体的增殖、效价测定和噬菌体保存均采用 Hegazi^[4] 等的方法, 仅将蔗糖浓度改为 2%。噬菌体裂解液经微孔滤膜过滤除菌, 效价为 1×10^{10} 单位/毫升。

(五) 转导

参照范云六等^[5]的方法并稍加修改。将对数生长期的受体菌悬液稀释至 1×10^7 细胞/毫升。菌悬液与噬菌体的混合比例为 2:1 (v/v)。30℃ 保温 30 分钟。置冰浴中并在 4℃ 下离心。用 Bu 培养液重新悬浮菌体至原体积。取 0.1 毫升菌液于 Bu 琼脂上铺平皿。同时取噬菌体裂解液和受体菌悬液分别在 Bu 琼脂上铺平皿, 以作对照 (转导用 Bu 培养基的琼脂都经热水浸泡, 自来水冲洗, 蒸馏水漂洗, 酒精脱水后烘干。)

本文于 1980 年 5 月 9 日收到。

本工作得到范云六、李季伦同志的帮助, 特致谢意。

(六) 固氮酶的诱导和测定

参照 Sorger, G. J. 等的方法诱导固氮酶。菌体在富铵培养基中培养 20 小时,以 4000 转/分离心收集细胞,用 Bu 培养基洗一次,然后悬浮于原体积的新鲜 Bu 培养基中。30℃ 振荡培养 6 小时,立即用乙炔还原法测定固氮酶活性。在 20 毫升三角瓶中加入 10 毫升菌悬液,密封后注入 1 毫升乙炔,30℃ 振荡 20 分钟,在气相色谱仪(上海 102 型)上用氢火焰检测。按峰高比法^[7]计算。

结果和讨论

(一) 圆褐固氮菌 Aw 的营养缺陷突变型

经 NTG 诱变后,选出的 DC-7、DC-10、DC-14、DC-17 等营养缺陷突变株,在补加单一氨基酸的 Bu 培养基上能正常生长。它们的菌落周围,同原始出发菌株 Aw 一样,都具有由其分泌物形成的白色晕圈,它们都能被圆褐固氮菌噬菌体 AC-5.1 所感染,说明这些菌株都是 Aw 的突变体。营养要求测定表明: DC-7 是 *Met*⁻, DC-10 是 *Gln*⁻, DC-14 是 *Cys*⁻, DC-17 是 *Arg*⁻。

(二) 圆褐固氮菌 Aw 的不固氮突变体

经诱变选出的另一类变异菌株在补加铵或某些氨基酸或酪蛋白水解物的培养基上都能正常生长,亦能被圆褐固氮菌噬菌体 AC-5.1 感染,在其菌落周围亦有特异晕圈。DC-2、DC-5、DC-6、DC-31 四株突变体经诱导固氮酶,并通过乙炔还原法测定细胞的固氮酶活性,这四株菌均未测出产生乙烯,说明这四株菌的遗传损伤是在与固氮有关的基因位点上。关于它们的突变位点的详细测定有待进一步研究。

(三) 普遍性转导噬菌体 AC-5.1

从土壤中分离到圆褐固氮菌 Aw 的温和噬菌体 8 株: AC-2.1、AC-2.2、AC-2.6、AC-5.1、AC-5.2、AC-5.3、AC-5.9 和 AC-

100。以 Aw 为给体,以 DC-14 为受体进行转导,结果表明,8 株噬菌体中只有 AC-5.1 具有转导能力,以 Aw 为给体,以 DC-7、DC-10、DC-17 为受体,通过噬菌体 AC-5.1 进行转导。为排除在噬菌体裂解液中有寄主细胞 DNA 导致转化的可能性,转导时添加 50 微克/毫升的 DNA 酶,作为对照。通过转导, *Met*⁻、*Gln*⁻、*Cys*⁻ 和 *Arg*⁻ 都能恢复为原养型。各标记菌株的转导频率都在 10^{-5} 左右。并且不因 DNA 酶处理而受影响(表 1)。由此可知 AC-5.1 是圆褐固氮菌 Aw 的一株普遍性转导噬菌体。

表 1 AC-5.1 对营养缺陷标记的转导频率

受体菌株	表现型	自发回复突变率($\times 10^{-4}$)	转导子数/ 10^6 细胞	
			无 DNA 酶处理	DNA 酶处理
DC-7	<i>Met</i> ⁻	0.6	41.5	40.0
DC-10	<i>Gln</i> ⁻	0.45	49.5	51.2
DC-14	<i>Cys</i> ⁻	0.3	9.0	
DC-17	<i>Arg</i> ⁻	0.3	23.9	24.3

(四) AC-5.1 对不固氮突变株的转导

噬菌体 AC-5.1 不仅能转导营养缺陷株为原养型,也能转导固氮缺陷标记(*Nif*⁻)菌株。转导频率似乎与自发回复突变率成正相关(表 2)。自发回复突变率是否与 DNA 损伤的碱基对数有关,从而影响了转导频率尚待进一步研究。各受体菌

表 2 AC-5.1 转导 *Nif*⁻ 标记的频率和转导子的固氮酶活性

受体菌株	自发回复突变率($\times 10^{-3}$)	<i>Nif</i> ⁺ 菌落/ 10^6 细胞	固氮酶活性(以 Aw 为 100)
DC-2	0.1	10.0	73.5
DC-5	<0.1	9.0	97.1
DC-6	<0.1	9.2	100.0
DC-31	0.7	26.0	64.7

的转导子经纯化后, 用乙炔还原法测定其固氮酶活性, 证明它们的乙炔还原能力与原始出发菌株 Aw 相当或略低。至于为什么有的转导子的固氮酶活性偏低, 目前还不清楚。

关于圆褐固氮菌的遗传图谱目前还未见报道。需要弄清它的固氮基因区段是紧密连锁还是分散的, 以便与其它固氮菌的固氮基因作比较, 以进一步分析其细微结构。

参 考 文 献

- [1] Strandberg, G. W. and P. W. Wilson: *J. Microbiol.*, 14: 25, 1967.
- [2] Mira, Sen and S. P. Sen: *J. Gen. Microbiol.*, 41(1): 1—6, 1965.
- [3] Adelberg, E. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 788—795, 1965.
- [4] Hegazi, N. A. and V. Jensen: *Soil. Biol. Biochem.*, 5: 231—243, 1973.
- [5] 范云六等: 微生物学报, 16(1): 63—69, 1976.
- [6] Sorger, G. J. and D. Trofimenkoff: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 65: 74—80, 1970.
- [7] 上海植物生理研究所固氮研究室: 植物学报, 16(4): 382—384, 1974.

A TRANSDUCING SYSTEM IN AZOTOBACTER CHROOCOCCUM

Du Qianyou Chen Keyong Fan Chengying

(Institute of Botany, Academia Sinica Beijing)

In order to carry out studying on genetics of aerobic azotobacteria, auxotroph mutants *Met*⁻, *Gln*⁻, *Cys*⁻, *Arg*⁻ and mutants DC-2, DC-5, DC-6, DC-31 which have lost their nitrogen fixation activity have been isolated from capsularless mutant Aw of *Azotobacter chroococcum*. Also phage AC-5.1 of mutant Aw

has been isolated.

Autotroph Aw and its various mutants were used as donor and receptor respectively, auxotrophs have been reverted to prototroph and the lost nitrogen fixation activity in the mutants can be restored by the transducing of phage AC-5.1.