

大肠杆菌 *dnaB* 基因参与 Tn2 转座

陆德如 戴秀玉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过诱变和选择获得了 12 株寄主转座突变体, 其中八株是温度敏感突变体。快速定位、P1 噬菌体转导和质粒 R100.1 对它们的温度敏感抑制试验表明, 其中有两株是 *dnaB* 温度敏感突变体。在 40℃ 时, Tn2 在这两株突变体中的转座频率比野生型菌株低 30 倍。由此我们认为, 大肠杆菌 *dnaB* 基因参与 Tn2 转座。其他转座突变体还在研究中。

转座子是一种能在细胞内从一个基因组转座到另一个基因组的 DNA 序列。它的转座能引起缺失、重复等 DNA 重排。许多试验表明在原核生物和真核生物中都存在着这种现象^[1-5]。

关于转座子转座的机制, 从 Tn3 的研究知道^[6-8] Tn3 的基因编码两种蛋白, 一种是在转座中起关键作用的转座酶, 另一种是对转座有调节作用的阻遏蛋白。此外, 在 Tn3 两端有与转座酶识别有关反向重复序列, 中间还有一个与转座过程中位点特异性重组有关的序列。至于转座子所在的细菌起什么作用, 现在只知道转座不依赖于一般重组系统(*rec A*), 其它还不清楚。根据 λ 噬菌体研究知道, 噬菌体感染大肠杆菌细胞后, 在溶源化过程中, 噬菌体的基因组与寄主染色体发生位点特异性重组时, 寄主的 *himA*、*himB*、*himC* 等参与作用^[9]。那么转座子在转座中寄主是否也参与呢? 虽然有一些实验室正在研究, 但还未见报道, 我们在这方面作了探索, 取得了一些结果, 现报道如下。

材料与方法

1. 菌种: 见表 1。

2. 培养基、P1 噬菌体转导方法见 Miller^[10]。
培养基中抗生素浓度: 氨基苄青霉素 (Ap)、卡

那霉素 (Km)、四环素 (Tc) 均为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 链霉素 (Sm) 为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 突变基因的快速定位按 Low 的方法^[12]。

4. 转座突变体选择方法: 先用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NG) 诱变大肠杆菌 K12 K11802^[11], 然后用 DNA 转化和 F 因子接合转移将带有 Tn2 的质粒 RSF1030 和 F'Km 引入诱变过的细胞, 并将这些细胞涂布在含有 Ap 和 Km 的 LB 平皿, 置 37℃ 培养。待上述平皿长出菌落后, 将单菌落接种到 LB 液, 37℃ 振荡培养过夜。然后将此菌液与大肠杆菌 K12 JG112(F⁻) 交配, 测定该菌落的转座频率。为了检查大量菌落, 交配在平皿上进行, 其步骤是: 先将上述从单菌落接出的过夜培养物接种到 LB 液, 37℃ 静止培养 2 小时, 然后用接种环将此培养物滴到已涂有处于对数生长期的 JG112 平皿上 (含有 Ap、Km、Sm 的 LB 培养基), 37℃ 培养 24 小时, 选择已接受 Tn2 转座的 F'Km 转移接合子, 如果在此平皿上不产生菌落者即为转座突变体。

结 果

(一) 转座突变体的选择

为了研究寄主在转座子转座中的作用, 我们从选择转座突变体入手。由于先诱变细菌细胞, 然后再引入带有 Tn2 的质粒 RSF1030 和 F'Km, 避免了 NG 对 Tn2

本文于 1981 年 5 月 3 日收到。

表 1 细菌和噬菌体菌株
Table 1 Bacterial and phage strains

菌 株 Strain	性别 Sex	基 因 型 Genotype	来 源 Source
KH802	F ⁻	<i>r_{km} sulli met</i>	H. Boyer
JG112	F ⁻	<i>polA strA</i>	R. Rownd
SF800	F ⁻	<i>polA nalA</i>	F. Hefferon
Q90C	F ⁻	<i>strA malB</i>	J. H. Miller
A8	F ⁻	<i>groP (dnaB)</i>	C. P. Georgopoulos
B534	F ⁻	<i>groP (dnaB)</i>	C. P. Georgopoulos
RS149	F ⁻	<i>dnaB zjb-504::Tn10</i>	R. Sclafani
BT43	F ⁻	<i>dnaB</i>	R. Sclafani
Am8305	F ⁺	F' <i>pro lacZ::Muc₁₁b2 strA</i>	A. I. Bukhari
C600	F ⁺	F'Km	J. H. Miller
LC468	R100.1	<i>set cm fus str sul mer</i>	L. Caro
KH802 (RSF1030)	F ⁻	<i>amp</i>	F. Heffron
GM1	F ⁺	Tn5	J. H. Miller
λ		<i>cl857</i>	L. Caro
A561		<i>b221 cl857 cl::Tn10 0₂₉ P₁₀</i>	N. Kleckner
P1		<i>vir</i>	J. H. Miller

表 2 转座突变体特性初步测定
Table 2 Preliminary characterization of host mutants for transposition

菌 株* Strain	生 长 Growth		对λ噬菌体敏感性 Sensitivity to phageλ	对Mu噬菌体敏感性 Sensitivity to phage Mu
	30℃	42℃		
KH802-1	+	-	+	+
KH802-2	+	-	+	+
KH802-4	+	-	+	+
KH802-5	+	-	+	+
KH802-6	+	-	+	+
KH802-23	+	-	+	+
KH802-27	+	-	+	+
KH802-29	+	+	+	+
KH802-35	+	+	+	+
KH802-39	+	-	+	+
KH802-42	+	+	+	+
KH802	+	+	+	+

* 菌株都带有质粒 RSF 1030 和 F'Km
All strains carrying plasmids RSF 1030 and F'Km

和 F'Km 的诱变, 这样选择到的转座突变体只能是寄主转座突变体。测定转座频率的方法是利用 F'Km 接合转移的特性, 将 F'Km 转移到一株抗 Sm 的 F⁻ 菌株 (JG 112), 然后在含有 Ap、Km、Sm 的 LB

平皿上测定 Tn2 是否转座到 F'Km。这里质粒 RSF1030 虽然是个非接合型质粒, 但当与 F 因子共存时, F 因子能诱动 RSF 1030 以 10⁻⁴ 的频率向 F⁻ 菌株转移。为了防止此现象与转座混淆, 我们所用的 F⁻ 菌

株 JG112 是 DNA 多聚酶 A 缺陷型 ($polA^-$), 所以即使 RSF1030 转移到该菌株也不能复制, 对转座频率没有影响。利用上述方法我们测定了 4,000 余个菌落, 选到了 12 株转座突变体。

(二) 转座突变体特性的初步测定

为了进一步研究这些转座突变体, 我们测定了它们对温度、 λ 噬菌体、Mu 噬菌体的敏感性 (测定对 λ 噬菌体敏感性时将供试菌在加有 0.2% 麦芽糖的 TB 液中 30℃ 振荡培养至对数期, 取 0.1ml 培养物加入噬菌体 30℃ 水浴吸附 10 分钟, 以 2.5ml TB 软琼脂铺 TB 平皿, 30℃ 过夜培养后观察能否形成溶菌斑。测定对 Mu 噬菌体敏感性方法与此相同, 但培养基用 LB)。表 2 是测定结果。从表 2 可看出这些突变体对 λ 噬菌体和 Mu 噬菌体的敏感性没有变化, 但其中有 8 株在 30℃ 生长正常, 42℃ 不能生长, 这是典型的温度敏感突变体。

(三) 温度对转座突变体转座的影响

既然有些转座突变体是温度敏感突变体, 那么温度对转座是否有影响呢? 我们测定了不同温度对突变体转座频率的影响, 发现即使在低于限制生长温度的条件下, 也使突变体的转座频率有很大的降低。现将温度对转座频率影响最大的两株突变体的结果列于表 3 [将表 2 中所列菌株在不同温度下培养过夜后再接种 10^7 细胞/ml 至新鲜 LB 液体, 在 34℃ 水浴培养 2 小时, 然后与 JG112 ($F^- pol A str^r$) 等量混合 (0.1ml) 于同一水浴交配, 2 小时后将此交配混合液适当稀释后涂布于两种选择培养基, 一种为含 Km、Sm LB 平皿 (测定 $F'Km$ 至 JG112 的转移频率), 另一种为含 Ap、Km、Sm LB 平皿 (测定已插入 Tn2 的 $F'Km$ 至 JG112 的转移频率)。转座频率以 $Ap^r Km^r (Sm^r)$ 转移接合

表 3 温度对转座突变体转座的影响

Table 3 Temperature effect on transposition efficiency of mutants

温度 Temperature	菌株 Strain	相对转座频率 Relative transposition efficiency
30℃	KH802	1.0
	KH802-27	1.0
	KH802-39	1.0
35℃	KH802	1.0
	KH802-27	0.83
	KH802-39	0.92
40℃	KH802	1.0
	KH802-27	0.03
	KH802-39	0.03

子数/ $Km^r(Sm^r)$ 转移接合子数来表示, 并把对照菌 KH802 的转座频率 (2×10^{-4}) 定为 1]。从表 3 可看出在 40℃ 时突变体的转座频率仅及对照的 3%, 而 30℃ 时突变体和对照相同。由于转座频率是以转移到 F^- 中的 $F'Km::Tn2/F'Km$ 表示的, 与菌的生长无关, 所以即使突变体在 40℃ 时生长略为差些, 但不影响转座频率。由此可得出结论, 这两株突变体是转座温度敏感突变体 (tp_{ts})。

(四) 转座突变的遗传学定位

由于 KH802-27、KH802-39 是转座温度敏感突变体, 就可利用温度敏感作为一个性状来确定转座突变体在大肠杆菌 K12 遗传图上的位置。我们先将这两株突变体分别与一系列起始标记不同的 *E. coli* K12 Hfr 菌株进行交配 (Hfr 菌株与转座突变体交配前, 将 Hfr 菌株接种于 LB 液体, 37℃ 静止培养 2 小时, 突变体 30℃ 振荡培养 2 小时, 然后各取 0.1ml 涂布于 42℃ 预热过的含 Ap、Km 的 LB 平皿进行交配, 并立即置 42℃ 培养 24 小时, 选择重组子), 结果见表 4。由表 4 可见这两株突变体在含有 Ap、Km 的 LB 平皿上, 42℃ 培养, 与 CSH78 交配能产生大量重组子, 而与其他 Hfr 菌株产生很少或不产

表 4 转座突变体与 Hfr 菌株交配后,在选择条件下重组子的出现

Table 4 After mating between mutants and Hfr, recombinant appearance under selective condition

Hfr 菌株 Hfr strain	重组子出现* Recombinant appearance	
	KH802-27	KH802-39
CSH47	-	-
CSH60	+	+
CSH61	-	-
CSH62	-	-
CSH64	-	-
CSH68	-	-
CSH69	-	-
CSH70	-	-
CSH74	-	-
CSH77	-	-
CSH78	+++	+++
CSH79	-	-

* 重组子菌落: +++500 以上; +10 以下; - 无。

Colonies of recombinants: +++ more than 500; + less than 10; - none.

生。已知 CSH78 的起始位点在 91 分钟^[13],在这附近有 *lexA*、*dnaB*、*malB* 等基因(图 1)。从上述对 λ 噬菌体敏感试验表明,它们对 λ 噬菌体是敏感的,所以这两株菌的突变不是发生在 *malB*,因 *malB* 野生型的表型对 λ 噬菌体是敏感的。为了进一步确定转座温度敏感突变在遗传图上的精确位置,我们又作了 P1 噬菌体转导定位,转导以 *malB* 为参考标记,测定转座温度敏感突变与它的连锁程度。实验用 *malB*⁻

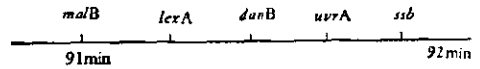


图 1 大肠杆菌 K12 遗传图中 91 至 92 分钟的基因

Fig. 1 Genes on *E. coli* K12 genetic map from 91' to 92'

tp⁺ 菌株 Q90c 为供体,分别以突变体 *malB*⁺*tp*_{ts} 菌株 KH802-27、KH802-39 为受体在 42℃ 选择 *tp*⁺ 转导子,并测定转导子对 λ 噬菌体的敏感性 (*malB*)。转导前,先将 P1_{vir} 在供体菌 Q90C (*malB*⁻*tp*⁺) 增殖三次,裂解液效价约为 10⁹/ml,然后用此转导 KH 802-27 (*malB*⁺*tp*_{ts})、KH 802-39 (*malB*⁺*tp*_{ts}) 用含有 Ap、Km 的 LB 平皿,在 42℃ 选择转导子 (*tp*⁺)。转导子在上述选择条件下纯化三次,并测定它们对 λ 噬菌体的敏感性,不敏感者为 *malB*⁻,也表明与温度敏感共转导)结果见表 5。由表 5 可见温度敏感性与 *malB* 的共转导频率各为 70%、75%,这和 *dnaB* 与 *malB* 的共转导频率十分接近,所以这两个突变体可能就是 *dnaB* 温度敏感突变体。

(五) 质粒 R100.1 对 *dnaB* 温度敏感突变的抑制作用

据 Wang 和 Iyer 的研究^[14],在细胞中引入 R100.1 等质粒可以抑制 *dnaB* 温度敏感性,这一特性可用来鉴定 *dnaB* 温度敏感突变体。为了进一步证实 KH802-27、KH802-39 就是 *dnaB* 温度敏感突变体,我们将质粒 R100.1 引入这两个突变

表 5 转座突变体温度敏感性与 *malB* 的共转导

Table 5 Cotransduction of *tp*_{ts} and *malB* in mutants

菌株 Strain	转导频率 Transduction efficiency	测定 60 株转导子中 <i>malB</i> 数 Number of <i>malB</i> among 60 transductants	共转导频率 Cotransduction efficiency
KH802-27	2.5×10^{-6}	42	70%
KH802-39	2.0×10^{-6}	45	75%

表 6 R100.1 质粒对转座突变体温度敏感性的抑制作用

Table 6 Plasmid R100.1 suppression of temperature sensitivity of mutants

菌株 Strain	菌落数/ml number of colonies/ml	
	30℃	42℃
KH802-27	1.2×10^9	0
KH802-27 (R100.1)	1.2×10^9	1.2×10^8
KH802-39	1.1×10^9	0
KH802-39 (R100.1)	1.1×10^9	2.0×10^8

体,(先将菌株在 LB 液, 30℃ 振荡培养过夜, 稀释后取 0.1ml 涂布于两份 LB 琼脂平皿, 一份置 30℃ 培养, 另一份置 42℃ 培养, 24 小时后计数菌落), 其抑制作用的结果见表 6。数据表明 R100.1 的存在对 KH802-27、KH802-39 的温度敏感性有明显的抑制作用。

从以上三方面实验结果, 我们认为转座突变体 KH802-27、KH802-39 就是 *dnaB* 温度敏感突变体。也就是说, 寄主的 *dnaB* 基因参与 Tn2 转座。

(六) 已知 *dnaB* 突变体中转座子的转座

既然 KH802-27、KH802-39 是 *dnaB* 温度敏感突变体, 那么现有的为研究 DNA 复制而分离得到的 *dnaB* 突变是否也影响转座呢? 我们比较了不同位点突变的 *dnaB* 突变体及其回复突变体的转座频率, 数据表明 *dnaB* 突变也降低了转座频率, 但只降低了 3—4 倍, 没有 KH802-27、KH802-39 那样明显。Clements 在研究寄主转座突变体时也发现, 由研究 DNA 复制得到的 DNA 多聚酶 A 突变体 (*pol A*⁻) 对转座的影响, 没有以转座频率降低为选择标记所得到的 *pol A*⁻ 突变体那样大。他认为这与选择突变体时所选择的表型有关。例如, 同样都是 *pol A*⁻, 但以不同选择方法得到的突变体, 突变对基因产物损伤位置也

不同。

讨 论

本工作用一系列遗传学实验证明, 控制细菌 DNA 合成的基因之一——*dnaB* 基因参与 Tn2 转座。这个发现不仅证明了寄主参与转座子转座, 而且对搞清转座机制有重要意义。目前关于转座机制有两个假定, 一个为 D. Berg 提出的切离转座学说, 另一个为 A. Bukhari 提出的复制转座学说。前者认为转座子转座必须先从原来的位置上切离, 然后转座; 后者认为转座子在转座时先进行 DNA 复制, 然后, 复制出来的一份拷贝转座到别的位置上去。现在较多的人支持复制转座学说, J. Shapiro 还在此基础上提出了更为具体的转座模型。该模型假定, 当转座子和受体 DNA 被转座酶切开后, 两者能相互连接起来, 并在连接处形成复制叉, 进行局部 DNA 复制, 最后通过重组使复制出来的转座子和原来的分开。这个模型虽能解释当前的一些主要实验事实, 但模型所涉及的各阶段还缺乏实验证据, 特别是其中的 DNA 复制还没有证据, 本文提出了这方面的证据。细菌 DNA 复制是由一系列基因控制的, *dnaB* 仅是其中之一。可以预料, 随着研究的深入将会发现更多的与 DNA 复制有关的基因参与转座。

参 考 文 献

- [1] Starlinger, P. and H. Saedler: *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **75**: 111—152, 1975.
- [2] Bukhari, A. I. et al.: *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
- [3] Kleckner, N.: *Cell*, **11**: 11-23, 1977.
- [4] Colos, M. P. and J. H. Miller: *Cell*, **20**: 579—595, 1980.
- [5] Starlinger, P.: *Plasmid*, **3**: 241—259, 1980.
- [6] Hefferon, F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*

- USA, 74: 702—706, 1977.
- [7] Dougan, G. et al.: *J. Bacteriol.*, 138: 48, 1979.
- [8] Chou, J. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 4020—4024, 1979.
- [9] Miller, H. I. and D. I. Friedman; cell, 20 711—719, 1980.
- [10] Miller, J. H.: Experiments in Molecular Genetics, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- [11] Adeberg, E. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 788, 1965.
- [12] Low, B.: *J. Bacteriol.*, 113: 798—812, 1973.
- [13] Barbara, J. B. and K. B. Low: *Microbiol. Rev.*, 44: 1—56, 1980.
- [14] Wang, P. Y. and V. N. Iyer: *Plasmid*, 1: 19—23, 1977.
- [15] Shapiro, J. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 1933—1937, 1979.

***E. COLI dnaB* GENE INVOLVEMENT IN Tn2 TRANSPOSITION**

Lu Deru Dai Xiuyu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Twelve *E. coli* K12 transposition mutants have been selected, among them eight were temperature sensitive mutants. Rapid mapping, P1 transduction and suppression of temperature sensitivity by plasmid R100.1 showed that two of them were *dnaB* mu-

tants. At 40°C Tn2 transposition in these two mutants was 30 times lower than that of wild type. It is demonstrated that *dnaB* of *E. coli* K12 is involved in Tn2 transposition. The other transposition mutants are under characterization.