

## Tn2 促进基因缺失与 R 质粒接合转移有关的遗传学证据

王 敖 全 陆 德 如

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过 R100-1 的接合转移和非接合转移的温度选择两种方法分别获得了一系列 *mer::Tn2* 突变体。回复试验和杂交结果表明, 通过接合转移分得的 22 株 *mer::Tn2* 突变体中有 7 株发生了长度不等的缺失; 但通过非接合转移的温度选择法获得的 17 株 *mer::Tn2* 突变体中没有发现缺失株。这一结果进一步证明 Tn2 促进缺失形成与 R 因子的接合转移有关。

在原核和真核生物中存在着一系列转座因子<sup>[1-3]</sup>。这些转座因子有一个共同的特征, 它们能不依赖于普通 DNA 重组功能 (*recA*) 从一个复制子转座到另一个复制子。也有证据表明, 几乎所有已研究过的转座子都能促进其它一系列不正常重组事件, 例如缺失<sup>[6-9]</sup>、倒位<sup>[10]</sup> 和重复<sup>[11]</sup>。前文我们报道了 Tn2 在大肠杆菌中的转座特性<sup>[12]</sup>, 当 Tn2 从质粒 RSF1030 转座到 *F'lac* 或 *F'lacproB* 时, 伴有很高比例的缺失形成, 但当 Tn2 从同一质粒转座到染色体时无此现象。据此, 我们推测, 这种高频缺失形成可能是 Tn2 转座过程与接合型质粒相互作用的结果, 很可能与质粒的转移过程有关。本文对这一假设提供了进一步的遗传学证据。

### 材料和方法

(一) 菌株和质粒: 见表 1。

(二) 插入突变体的分离

1. 接合转移法: 将质粒 RSF1030 和 R100-1 分别通过转化和接合转移引入同一受体菌 *C<sub>600</sub> pol<sup>y</sup> A12* 将所得菌株 *C<sub>600</sub> pol<sup>y</sup> A12* (R100-1) (RSF1030) 于 LB 皿划线分离单菌落, 挑单菌接入 LB 液管, 30°C 摇床培养过夜, 次日转移至新鲜的 LB 液中, 30°C 培养至对数期作供体, 分别与对数

生长的受体菌 P90C 等体积混合, 37°C 杂交 2 小时, 适当稀释后涂布于含氯霉素和萘啶酮酸及青霉素和萘啶酮酸的 LB 选择皿上, 测定 R100-1 的转移频率和分离 Tn2 的插入突变体。

2. 非转移的温度选择法: 将在 LB 液中, 30°C 摇床培养过夜的 *C<sub>600</sub> pol<sup>y</sup> A12* (RSF1030) (R100-1) 培养物于 45°C 恒温水浴预热 5 分钟, 取 0.05ml 接入以同样温度预热过的含 40μg/ml 青霉素的 LB 液管, 置 45°C 水浴摇床快速振荡培养至细胞浓度约为  $5 \times 10^8$ /ml, 再取 0.05ml 转接入新鲜的同样培养液中, 45°C 继续振荡培养。此步骤重复二次, 适当稀释后涂布于含同样浓度青霉素的 LB 平皿(已预热)上, 置 45°C 培养 36 小时, 形成的单菌落供进一步鉴定 R100-1::Tn2 突变体。

(三) 抗性水平的测定:

将试验菌的过夜培养物稀释至  $10^4$ , 取 0.01ml 涂于含不同浓度的 HgCl<sub>2</sub> LB 平皿上, 置 37°C 培养过夜, 以出现正常菌落的最高 HgCl<sub>2</sub> 浓度作为该菌的抗性水平。此外, 对 HgCl<sub>2</sub> 的敏感性和抗性还通过在含药物的滤纸片周围出现抑菌圈大小来测定。

(四) P<sub>1</sub> 噬菌体转导 (参照 Miller 的方法)<sup>[14]</sup>

(五) 互补试验

将一系列 R100-1 *mer::Tn2* 突变体于 LB

本文于 1981 年 5 月 3 日收到。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and Plasmids

菌株或质粒 Strain or plasmid	遗传型 Genotype	来源 Source
菌 株		
<i>C<sub>600</sub> poly A<sub>15</sub></i>	<i>rK<sub>m</sub>K lacY thi, Poly A<sub>15</sub></i>	T. Mattson
P90C	<i>araΔ(lac proB) nal<sup>r</sup></i>	J. H. Miller
MPC4	<i>araΔ(lac proB) val<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup></i>	
质粒		
R100-1	Tet <sup>r</sup> Chl <sup>r</sup> Mer <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Fus <sup>r</sup>	"
pDU3302	Tet <sup>r</sup> Chl <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Fus <sup>r</sup>	T. J. Foster
pDU3316	"	"
pDU3325	"	"
1101-1122	"	本研究所 Our institute
1201-1218	"	"

质粒抗性标记缩写如下 (Abbreviation): 卡那霉素 (Kanamycin), Kan<sup>r</sup>; 四环素 (Tetracylin), Tet<sup>r</sup>; 氯霉素 (Chloramphenicol), Chl<sup>r</sup>; 链霉素 (Streptomycin), Str<sup>r</sup>; 青霉素 (Ampicilin), Amp<sup>r</sup>; 汞 (Mercuric), Mer<sup>r</sup>。

液过夜培养, 1:5 稀释后作受体(为降低细胞表面的排斥力, 使细胞保持在稳定期)。将过夜培养的 pDU3316 以 1:40 稀释, 37℃ 培养至对数期(此时细胞数约为  $2 \times 10^8$ /ml) 作供体。供体和受体等体积混合后于 37℃ 培养 2 小时, 取 0.1ml 涂布于含 20μg/ml HgCl<sub>2</sub> 的 LB 平皿上, 置 37℃ 培养 24 小时, 若在选择皿上出现密集菌落, 表明有互补作用。

#### (六) 回复试验

试验菌株接于 LB 液管 37℃ 培养过夜, 取 0.1ml 涂布于含有 20μg/ml HgCl<sub>2</sub> 的 LB 皿上, 37℃ 培养 36 小时, 计算回复子数。同时活菌计数算出每个菌株的回复突变频率。初试不回复菌株可扩大培养物体积, 接入装有 5ml LB 液的大试管中, 过夜培养后离心, 菌体悬浮于 0.5ml 生理盐水中, 取 0.1ml 涂于选择平皿上(细胞浓度提高约 10 倍)。

#### (七) 缺失定位

将 7 株不能回复的 *mer::Tn2* 突变体接于 LB 液中, 37℃ 过夜培养后作杂交受体。将已知突变位点的菌株过夜培养后以 1:40 稀释, 37℃ 静止培养至对数期作供体, 每一供体分别与 7 个受体等体积混合, 37℃ 杂交 2 小时, 取 0.1ml 涂布于补加 20μg/ml HgCl<sub>2</sub> 的 LB 平皿上, 培养 48 小时, 不形成 Mer<sup>r</sup> 重组子表明有缺失。根据不

出现重组子的杂交组合确定其缺失长度。

## 结 果

### (一) R100-1 *mer::Tn2* 突变体的分离和特性

下列步骤用于分离 R100-1::Tn2 突变体。将带有质粒 RSF1030 和 R100-1 的菌株 *C<sub>600</sub> poly A<sub>15</sub>* 与受体 P90C, 37℃ 杂交 2 小时后涂于含氯霉素和萘啶酮酸的 LB 选择平皿上, 测定 R100-1 的转移频率, 取同一杂交物 0.1ml 涂于含青霉素和萘啶酮酸的 LB 选择平皿, 测定 Amp<sup>r</sup>Nal<sup>r</sup> 接合转座频率, 并用灭菌牙签挑取单菌落复印分离 R100::Tn2 突变体。结果表明, R100-1 转移频率约为 0.2% (每个供体细胞), Amp<sup>r</sup> 转座频率约为  $3 \times 10^{-3}$ 。在 Amp<sup>r</sup> 接合转移子中约有 4% 的细胞对汞离子全部是抗的(试验了 500 个菌落), 因此上述结果说明 Tn2 已优势地插入到 R100-1 的汞区域。为了弄清楚 Tn2 促进缺失形成是否和质粒的传递过程有关, 我们还采用了同一个 Tn2 转座受体(即 R100-1) 不经转移来分离 R100-1::

Tn2 突变体。菌株 *C<sub>600</sub> poly A<sub>ts</sub>* (RSF1030) (R100-1) 带有温度敏感的 DNA 合成多聚酶 A 突变, ColE 型质粒 RSF1030, 由于 RSF1030 质粒复制依赖于 DNA 合成多聚酶 A, 所以在限制性温度下 (45°C) 长出的菌落可能就是 R100::Tn2 突变体。在出现的 Amp<sup>r</sup> 菌落中有 7.4% 表现为 Mer<sup>s</sup> (562 个菌落中有 42 个 Mer<sup>s</sup>, 一次试验)。通过杂交转移法, 我们独立分得 22 株 Mer<sup>s</sup> 突变体, 非转移法分得 17 株。为证明这些突变体是 Tn2 插入的结果。分别将这些菌株的 R100-1 质粒接合转移到 MPC 受体 (Kan<sup>r</sup>), 在含氯霉素和卡那霉素的选择皿上选择 Chl<sup>r</sup> (Kan<sup>r</sup>) 接合子并测定它们对青霉素的抗性。结果表明, 这些接合转移子 100% 对青霉素有正常抗性 (20 μg/ml), 说明 Chl<sup>r</sup> 和 Amp<sup>r</sup> 是紧密连锁的。用 P<sub>1</sub> 噬菌体作转导亦得到同样的结果, 进一步证明 Mer<sup>s</sup> 表型和 Amp<sup>r</sup> 发生于同一遗传事件。

### (二) 突变体的表型特性

对由两种方法独立分得的 *mer*::Tn2 突变体的抗汞水平作了定量测定, 结果见表 2 和图 1。这些突变体对汞的敏感性可分成两类, 一类突变体的抗汞水平与无 R100-1 质粒一样, 为 3 μg/ml, 我们称之为敏感突变体; 另一类约为 1—2 μg/ml, 其敏感性是前者的 1.5—3 倍, 我们称之为超敏感突变体。两种方法获得的 *mer*::Tn2 突变体, 它们的表型特性是一致的。

### (三) *mer*::Tn2 突变体和 pDU3316 的互补试验

已知 pDU3316 为 *mer*::Tn2 突变体<sup>[15]</sup>, TnA 插入位点位于 *mer* 操纵子的结构基因区 (见图 2), 因此可以用该菌与我们分离到的一系列 *mer*::Tn2 突变体作互补试验来分析 Tn2 在 *mer* 区域中的大致分布。结果表明, 由两种方法获得

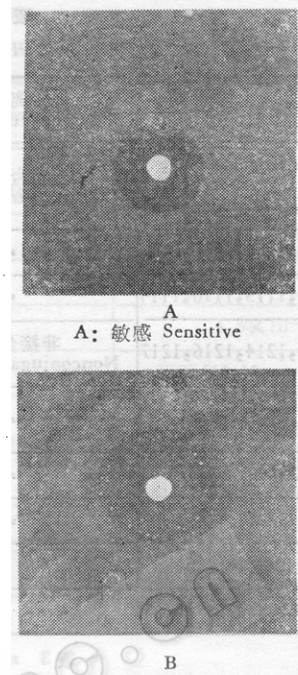


图 1 含汞滤纸片周围的生长抑制图

Fig. 1 Growth inhibition on zones surrounding disks containing HgCl<sub>2</sub>

的突变体, 按它们与 pDu3316 互补的能力均可分成两类, 一类在 HgCl<sub>2</sub> 选择皿上形成密集的 Mer<sup>r</sup> 菌落 (1000/皿以上), 这些菌落在不含 HgCl<sub>2</sub> 的 LB 培养基中培养能分离为 Mer<sup>r</sup> 和 Mer<sup>s</sup>, 说明这是互补的结果。此类共五株。另一类在 HgCl<sub>2</sub> 平皿上不能形成 Mer<sup>r</sup>, 或仅出现少数菌落, 表明它们不能与 pDU3316 互补。由此可以推测能与 pDU3316 互补的一类突变体, 它们的 Tn2 可能插在 *mer* 的调控区, 不能互补者则可能插在结构区, 见表 3。

### (四) 回复试验

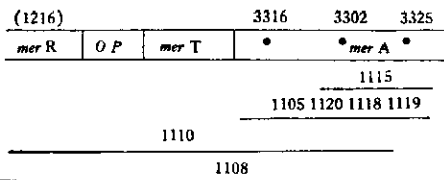
按材料方法对两种方法分离到的每一株 *mer*::Tn2 突变体作了回复突变试验, 结果见表 4。分离方法不同, 所得突变体的回复突变特性亦不同。非转移的温度选择法分得的 17 株 Mer<sup>s</sup> 突变体可 100% 回复到 Mer<sup>r</sup>, 这表明 Tn2 的插入并没有

表 2 *mer::Tn2* 突变体的表型特性Table 2 Phenotypic properties of *mer::Tn2* mutants

突变体 Mutants	分离方法 Method of isolation	抗汞水平 $\mu\text{g/ml}$ Level of resistance to $\text{Hg}^{2+}$	敏感类型 Type of sensitivity
1103,1105,1106,1115, 1117,1118,1119,1120, 1121,1122,1111,	接合转移 Conjugating transfer	1	超敏感 Hypersensitive
1101,1107,1108,1112,1116	”	2	”
1102,1104,1113,1110,1114	”	3	敏感 Sensitive
1201,1211,1214,1216,1217	非接合转移 Nonconjugating transfer	1	超敏感 Hypersensitive
1202,1203,1204,1205, 1206,1207,1210,1212,	”	2	”
1208,1213	”	3	敏感 Sensitive
1215	”	5	敏感 Sensitive
P90C	”	3	敏感 Sensitive
R100-1	”	15	抗 Resistant

表 3 *mer::Tn2* 突变体和 pDU 3316 的互补Table 3 Complementation between *mer::Tn2* and pDU3316

突变体 Mutants	分离方法 Method of isolation	互补能力 Complementation	Tu2 插入区域 The region of Tn2 insertion
1102,1114	接合转移 Conjugating transfer	+++	调控区 Regulation region
1101,1103,1105-1113, 1115-1122	”	-	结构区 Structure region
1203,1213,1216	非接合转移 Nonconjugating transfer	+++	调控区 Regulation region
1201,1202,1204-1215,1217	”	-	结构区 Structure region

图 2 R100-1 的 *mer* 区域缺失定位Fig. 2 Deletion map in *mer* of plasmid R100-1

点代表点突变位置<sup>[1]</sup>, 平行线代表缺失长度。*mer* R 为调节基因; OP 为假定的操纵基因和促进子; *merA* 为结构基因; *merT* 为与汞传递功能有关的基因。

Dots represent the location of point mutation. The horizontal lines represent the deletion mutations. *merR* is regulatory gene, OP are presumed operator and promoter, *merA* is structure gene, *merT* is  $\text{Hg}^{2+}$  transport system gene.

引起缺失, 但通过接合转移法分得的 22 株突变体中, 有 7 株即使细胞浓度达  $10^{10}/\text{ml}$  也不能获抗汞的回复子, 这可以认为 Tn2 插入 *mer* 区域已导致该区域发生了缺失。这一结果证明 Tn2 促进缺失形成与质粒的转移有关。

### (五) 缺失定位

我们采用一系列已知突变位点的汞敏感株作受体分别与每一缺失株作杂交, 粗略地定出了这些缺失的长度。突变株 1115 与 3316 能杂交形成  $\text{Mer}^r$  重组子, 不能与 3302、3325 杂交, 表明该菌缺失发生在结

表 4 *mer::Tn2* 突变体的回复频率  
Table 4 Reversion frequency of *mer::Tn2* mutants

突变体质粒 Plasmid mutant	分离方法 Method of isolation	回复突变频率 Reversion frequency
1102,1103,1104,1106,1107,1109, 1111,1112,1113,1114,1117,1121,	接合转移 Conjugating transfer	$1.0-5.0 \times 10^{-7}$
1116	”	$9.2 \times 10^{-8}$
1101	”	$3.5 \times 10^{-9}$
1122	”	$4.8 \times 10^{-9}$
1105,1108,1110,1115,1118,1119,1120,	”	不回复* Nonreverting
1201,1203,1204,1207,1208,1210 1211,1212,1213	非接合转移 Nonconjugating transfer	$1.0-3.0 \times 10^{-7}$
1202,1206,1209,1215,1216	”	$3.0-5.0 \times 10^{-8}$
1217	”	$4.8 \times 10^{-9}$
1214	”	$1.7 \times 10^{-9}$

\* 细胞浓度  $> 10^{10}/\text{ml}$   
Cell Concentration  $> 10^{10}/\text{ml}$

构基因 *merA* 的右边。突变体 1105、1118、1119、1120 能与 1216 杂交, 不能与 3316、3302 和 3325 杂交, 表明这些突变体的整个 *merA* 基因发生了缺失; 突变体 1110 能与 1216、3302、3316 杂交, 不能与 3325 杂交, 表明缺失发生在点突变 3325 的左边; 突变体 1108 与 4 株点突变体均不能杂交, 表明 *mer* 区域发生了广泛的缺失, 见图 2。

## 讨 论

我们采用两种不同的方法各自分离了一系列 *mer::Tn2* 突变体, 并对它们的某些特性作了比较。通过传递性质粒的接合转移法获得的 22 株 *mer::Tn2* 突变体中有 7 株不能回复突变到 *Mer<sup>r</sup>* (占 31.8%), 与点突变体的杂交结果表明, 这些菌株的 *mer* 区域发生了长度不等的缺失。但同一系统不经接合转移获得的 17 株 *mer::Tn2* 突变体确能 100% 以不同频率回复突变到对汞抗性。这一发现进一步为 Tn2 促进

高频缺失形成与传递性质粒的转移有关提供了证据。

文中的结果表明, 虽然分离 *mer::Tn2* 突变体的方法不同, 但都可观察到 Tn2 对 R100-1 汞区域的优势插入 (前者 4%, 后者 7.4%)。Tn2 的这种插入区域特异性也已在类似的转座子 Tn3<sup>[16]</sup> 和 Tn1<sup>[17]</sup> 中观察到。

已有的研究表明, R100-1 的汞抗性基因位于 *EcoRI* 的 H 和 I 片段上<sup>[18,19]</sup>。当用汞诱导时, 至少可以发现三种分子量不等的蛋白质, 其中之一已鉴定为结构基因 *merA* 编码的产物 (汞还原酶), 它催化  $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}$ , 使汞失去毒性。另外两个蛋白质可能是与汞进入细胞有关的传递基因 *merT* 基因产物<sup>[20]</sup>。在我们分离的 39 个 *mer::Tn2* 突变体中, 按其对于汞的敏感性可分成两类, 即超敏感和敏感。前者的敏感性是后者的 1.5—3 倍。我们推测这可能与 Tn2 插入 *mer* 区域的位置有关, 当 Tn2 插到 *merA* 时汞还原酶不能形成, 但

*merT* 基因功能正常, 继续不断向细胞内输入  $Hg^{2+}$ , 使胞内  $Hg^{2+}$  浓度增加, 但此推测尚待实验证实。

### 参 考 文 献

- [1] Starlinger, P. and H. Saedler: *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 75: 111—122, 1976.
- [2] Kleckner, N.: *Cell*, 11: 11—23, 1977.
- [3] Bukhari, A. I. et al.: DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
- [4] Calos, M. P. and J. H. Miller: *Cell*, 20: 579—595, 1980.
- [5] Berg, C. M. and D. E. Berg: *Microbiology*, 107—116, 1981.
- [6] Miller, J. H. et al.: *J. Mol. Biol.*, 144: 1—18.
- [7] Calos, M. P. and J. H. Miller: *Nature*, 285: 38—41, 1980.
- [8] Reif, H. J. and H. Saedler: DNA Insertion Elements Plasmids, and Episomes (Edited by A. I. Bukhari et al.) 81—91, 1977.

- [9] Kohoe, M. A. and T. J. Foster: *Mol. Gen. Genet.*, 176: 113—399.
- [10] Faelen, M. and A. Toussaint: *J. Bacteriol.*, 142: 391—399, 1980.
- [11] Anderson, R. P. and J. R. Roth: Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Volume XLIII.
- [12] Wang Aoquan et al.: *Cell*, 21: 251—255, 1980.
- [13] Bachmann, B. J. et al.: *Bacteriol. Rev.*, 40: 116—167, 1976.
- [14] Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [15] Foster, T. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 140: 167—181, 1979.
- [16] Nisen, P. D. et al.: *J. Mol. Biol.*, 117: 975—998, 1977.
- [17] Weinstock, G. M. and D. Botstein: Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Volume XLIII.
- [18] Dempsey, W. B. et al.: *J. Bacteriol.*, 136: 1084—1093, 1978.
- [19] Lane, D. and M. Chandler: *Mol. Gen. Genet.*, 157: 17—23, 1977.
- [20] Miki, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 158: 217—224, 1978.

## GENETIC EVIDENCE THAT THE PROMOTION OF Tn2-MEDIATED DELETION IS RELATED TO R FACTOR CONJUGATION TRANSFER

Wang Aoquan Lu Deru

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A series of *mer::Tn2* insertion mutants of R100-1 have been isolated by two different procedures, R factor conjugation transfer and temperature selection. Reversion test and point cross showed that 7 out of 22 *mer::Tn2* mutants isolated by conju-

gation transfer were deleted but none of the 17 *mer::Tn2* mutants isolated by temperature selection was deleted. The result provided further evidence that promotion of Tn2-mediated deletion is related to R factor conjugation transfer.