

转座子 Tn5 诱变慢生大豆根瘤菌

陈珞京 周路明 宁林夫 王子芳 岑英华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

用 pSUP1011 载体系统, Tn5 诱变慢生大豆根瘤菌 110、123, 其 Km^R 菌落出现频率为 $5 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-7}$ 。Tn5 的 Sm^R 基因能在慢生大豆根瘤菌中表达。用卡那霉素加链霉素来筛选插入变株, 可完全排除自然突变的干扰。从 4450 个 Km^R 变株中检出营养缺陷型 7 株, 其中 His^- (4)、 Glu^- (1) 和 Trp^- (2), 吸氢功能缺陷型 10 株, 其中 2 株 His^- 同时是吸氢缺陷(Hup^-)和共生固氮缺陷(Nif^-), 其原养型回变体(回变频率为 0.5×10^{-4})都同时恢复了吸氢与固氮功能, 又失去了对卡那霉素的抗性。4 株对氧特别敏感的 Hup^- 缺陷型, 在培养状态下无吸氢活性, 但结瘤固氮时不放氢。

关键词 转座子 Tn5; 慢生大豆根瘤菌; 营养缺陷型; 吸氢功能缺陷

生物固氮过程中, 固氮酶在还原 N_2 为 NH_3 时也把质子(H^+)还原为氢。所以许多豆类——根瘤菌共生固氮体系因放氢损失的能量可占固氮耗用能量的 30—50%^[1,2]。有少数根瘤菌在结瘤固氮时不放氢或放出很少氢^[1,2]。原因是该根瘤菌有一种吸氢酶, 能把氢回收利用, 产生 ATP^[3]。这类具吸氢功能的根瘤菌固氮效率高, 有一定增产作用^[4]。Cantrell 等^[5]用 pLAFRI 克隆系统构建大豆根瘤菌 122(Hup^+)菌株的基因文库, 用 PJ17 Hup^- 菌株来钓取能补偿吸氢功能缺陷的 DNA 片段, 得到一段与吸氢功能有关的基因成份。Hom 等^[6]也从 Hup^+ 菌的基因文库中检出了一段与固氮酶和氢酶活性都有关的 DNA。

Tn5 诱变是一种很有潜力的方法, 近年根瘤菌研究上许多突破性的进展都涉及 Tn5 的运用。本文介绍用 Tn5 诱变获得慢生大豆根瘤菌多种营养缺陷型及吸氢功能缺陷的 Hup^- 变株, 为分离与克隆大豆根瘤菌有关吸氢功能的基因提供必需材料。

材料与 方法

(一) 菌株与质粒

慢生大豆根瘤菌 110、123 两菌株来自中国农科院, 具较强吸氢活性, 对卡那霉素和链霉素都十分敏感。携带转座子 Tn5 的菌株为 *Escherichia coli* SM10(pSUP1011) $Km^R Cm^R$ 来自 R.Simon^[7]。Inc P1 组质粒 pRP1::Tn 501 的携带菌株为铜绿色假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO 9501^[8]。质粒 pKan2 是由质粒 pBR322 加上 3.5 kb Tn5 核心序列组成。

(二) 培养基

1. L 培养基^[9]。

2. TY 培养基^[10]。

3. YM 培养基^[11], 是根瘤菌常规培养基。

4. M 培养基成分除用 0.05% 硫酸铵代替 YM 中的酵母粉外, 其它成分与 YM 相同。

5. SM 培养基成分(%): 磷酸二氢钠 0.03, 硫酸镁 0.02, 氯化钙 0.01, 谷氨酸钠 0.04, 胰蛋白胍 0.1, 酵母粉 0.04, 葡萄糖酸钠 0.3, 甘油 0.25, 琼脂 1.6, 每升上述培养基中加 4ml 微量

本文于 1985 年 10 月 7 日收到。

本工作得到中国科学院科学基金资助。

元素母液 (0.5% 硼酸, 0.5% 钼酸钠) 和 2ml 1mM 的氯化镍溶液, 调 pH6.0。

6. PA 培养基含 0.4% 胰蛋白胨, 0.05% 硫酸镁。

各种抗生素根据选择需要进行补充。

(三) 细菌杂交方法

基本参照 Cen 等^[10]的方法。

(四) 营养缺陷型的检出

将 Km^R 变株点种在 M 平板和 YM Sm Km 选择平板上, 28℃ 培养 4—5 天, 某变株如在 M 平板上不生长, 但在选择平板上生长正常, 即可初定为营养缺陷型。从选择平板的对应点取菌体做悬浮液, 按 Pain^[11] 介绍的 12 个营养库方阵法判断其具体的营养要求。

(五) 培养状态下 (in vitro) 吸氢活性缺陷的判断

以 Km^R 变株逐号接种 SM 斜面, 28℃ 培养 3 天, 菌苔生长基本丰满, 用无菌反口橡皮塞换下棉塞, 每管注入 H_2 1ml。继续培养 2 天后, 用气相色谱法测定 0.2ml 气样中的 H_2 峰值^[12]。正常条件下, 无菌斜面与接 PJ18 菌株 (Hup^-) 的斜面其 0.2ml 气样的 H_2 峰值在 160—180mm, 而接种 110 和 123 等有吸氢活性的菌株的试管测不到 H_2 的存在。所测变株如保留 H_2 峰值在 130mm 以上者, 经多次复查, Hup^- 性状稳定者保留。

(六) 大豆结瘤试验

参照 [11] 介绍的砂培法进行, 收获时剪下根区上部的大型根瘤, 先测第一小时放氢量, 然后测乙炔还原活性, 再根据需要分离根瘤内的根瘤菌, 方法见文献 [11]。

(七) 根瘤菌总 DNA 的分离

根瘤菌接 PA 培养基, 30℃ 摇动培养 48 小时, 离心收菌体, 重悬于 10ml TE 缓冲液中, 加入链霉菌蛋白酶 5ml (2mg/ml), 2M 氯化钠 0.2ml, 5% SDS + 0.2N 氢氧化钠混合液 3 ml, 250mM EDTA 0.8ml, 总体积约 20ml。37℃ 作用 4—6 小时, 裂解液达到清澈透明。然后加入苯酚氯仿 (1:1) 混合液, 乳化去除蛋白, 6℃ 8000r/min 离心 10 分钟分层, 收取上清液 (约 17ml), 加入 3M 醋酸钠 2ml 和冷乙醇 40ml, 收取絮状沉淀, 溶于 1.0ml TE, 透析后供试。

(八) 质粒 pKan 2 的分离纯化

E. coli RR1 (pKan2) 培养在 100ml L 液体培养基中, 30℃ 摇动 8 小时后离心收集细胞, 按 Birnboim 和 Doly^[13] 的方法获得 2ml pKan 2 的粗制品, 经琼脂糖凝胶电泳分离, 切取 pKan 2 的质粒带, 装入透析袋中作电泳洗脱^[14]。用 $2 \frac{1}{2}$ 体积冷乙醇沉淀洗脱液中的核酸 (−40℃ 过液)。离心收集沉淀, 并溶于 50μl 10mM Tris-HCl pH 7.5 的缓冲液中, 取 10μl 进行电泳, 检查质量, 其余储存备用。

(九) DNA-DNA 分子杂交法

经限制性内切酶 *Eco* RI 消化的根瘤菌总 DNA 作电泳分离后, 按 Southern 方法^[15] 转移到硝酸纤维素膜上, 80℃ 干后备用。点杂交或菌落原位杂交的前处理过程如文献 [9] 所述。³²P 标记 Tn5 探针的制备按 New England Nuclear 公司说明书进行。杂交条件为 68℃ 水浴 36 小时, 洗脱用 $2 \times SSC$, 用 0.1% SDS 缓冲液洗三次, 每次 15 分钟, 最后用 $0.1 \times SSC$, 0.1% SDS, 65℃ 洗 30 分钟, 滤膜干后, 压 X 光片进行放射自显影 (−40℃)。

结 果

(一) Inc P1 组质粒 (pRP1::Tn501) 接合转移试验

以慢生大豆根瘤菌 113-2、110 和 123 等为受体, 用含卡那霉素 (Km) 80μg/ml 的 M 平板来选取接合子, Km^R 根瘤菌接合子出现频率为 8.5×10^{-5} — 1×10^{-4} /每个受体菌。从琼脂糖凝胶电泳中可检测到此 44Md 的 RP1::Tn501 质粒带存在于这些接合子中。这类 Km^R 变株的共生固氮功能及吸氢功能都没改变。而慢生大豆根瘤菌在此选择条件下其 Km^R 自然突变频率为 10^{-8} 。为有效地选出 Tn5 插入致变的变株提供了条件。

(二) Tn5 插入引起的各类变株的分离

采用 R. Simon^[7] 的 Tn5 传送系统, 以 *E. Coli* SM10 (pSUP1011) 为供体, 慢生大豆根瘤菌 110、123 为受体。为了获

得根瘤菌营养缺陷型变株, 所以先选出大豆根瘤菌链霉素抗性 (Sm^R) 自然突变系, 这些 Sm^R 菌株都保持与亲株一样的吸氢、固氮功能。用 $YM + Sm200\mu g/ml + Km80\mu g/ml$ 来选取接合子, 可选出包括营养缺陷型的大豆根瘤菌变株。综合多批滤膜杂交试验结果, Tn5 插入引起的慢生大豆根瘤菌 Km^R 菌落出现频率为 $5 \times 10^{-6} - 10^{-7}$ /每个受体细胞。工作进程中获悉 Tn5 序列含编码 Sm^R 功能的基因, 能在某些快生型根瘤菌和土壤农杆菌中表达^[13,14]。我们用对链霉素敏感的 110 菌株作受体, 检查 Tn5 携带的 Sm^R 基因能否在慢生大豆根瘤菌中表达。三次滤膜杂交试验表明, Tn5 插入能引致大豆根瘤菌出现 $Km^R Sm^R$ 菌落, 其出现频率为 $1 - 5 \times 10^{-7}$ /每个受体细胞。而对照处理 (110 菌株单独) 从未出现过 $Km^R Sm^R$ 菌落。结果说明, 以链霉素敏感的野生型菌株上试, 可完全排除自然突变抗药菌落的干扰。Tn5 序列中的 Sm^R 基因能在慢生大豆根瘤菌中表达对工作会带来很大方便。

Km^R 单菌落经过纯化后, 作营养缺陷

型和 *in vitro* 吸氢功能缺陷型的筛选, 结果见表 1。110 起源的 3500 个 $Km^R Sm^R$ 菌落中, 选出 7 株营养缺陷型 (His^- 4 株, Glu^- 1 株, Trp^- 2 株) 和 *in vitro* Hup^- 变株 10 株 (其中 4 株为上述的 His^-)。结瘤实验结果证明所试 2 株 $His^- Hup^-$ 同时是 Nif^- 。从 123 菌株起源的 950 Km^R 变株中获得 2 株 *in vitro* Hup^- 变株, 它们在结瘤固氮时却不放氢, 但从根瘤分离物看, 仍具 $Km^R Sm^R$ 标记, 并非外来污染, 再用这批根瘤 (16 个样品) 分离物接种 SM 斜面检查 *in vitro* 吸氢功能, 仍都是 Hup^- 性状。110 起源的 74, 389 变株也属这种类型。

(三) 营养缺陷型的回变频率

用选择平板增殖各 His^- 、 Glu^- 变株, 28℃ 培养 5 天, 刮取细胞作菌悬液 ($>5 \times 10^6$ 细胞/ml); 以 0.2ml/皿涂布一批 M 培养基平板, 28℃ 10—15 天每皿长出 0—2 个单菌落, 原养型回变频率为 0.5×10^{-8} , 经 M 平板纯化一次后, 检查抗药标记。2 个 His^- 变株共得原养型回变体 4 个, Glu^- 变株获 5 个原养型回变体, 所有这 9 个原养型回变体都同时失去了对卡那霉素的抗性。其中 His^- 变株的原养型回变体都恢复了吸氢功能 (由 SM 斜面法判定) 和共生固氮功能 (由砂培结瘤试验判定)。其表型同出发菌株 110。这些结果反映 Tn5 序列既能插入到受体菌的基因组中引起变异, 又能以一定频率 10^{-8} 准确脱离插入位点。

Trp^- 变株的原养型回变频率为 10^{-6} , 所测 40 号原养型回变体仍保持 Km^R 性状。Beringer^[15] 和 Duncar^[16] 也曾报道过这种回变频率较高又保持 Km^R 标记的现象。

(四) ³²P 标记 Tn5 DNA 分子杂交

结果

以电泳纯 pKan2 DNA 做成 ³²P 标记的分子探针, 对有关变株分别采用菌落原位杂交法、点杂交法和 Southern 转移后杂

表 1 Tn5 引起各种变株的表型

Table 1 Phenotypes of Tn5 induced mutants

变株 Mutants	表 型 Phenotypes	
	自由生活状态 In free living	共生状态* In symbiosis
T-1; T-2	His ⁻ Hup ⁻	Nod ⁺ Nif ⁻
707;356	His ⁻ Hup ⁻	未测 N. D.
512	Glu ⁻ Hup ⁺	Nod ⁺ Nif ⁺
604;703	Trp ⁻ Hup ⁺	Nod ⁺ Nif ⁺
311;313	Hup ⁻	Nod ⁺ Nif ⁻
469;470		
389;74	Hup ⁻	Nod ⁺ Nif ⁺ Hup ⁺
84;947	Hup ⁻	Nod ⁺ Nif ⁺ Hup ⁻

* 结瘤试验所用大豆品种为鄂豆 2 号。
The soybean (*Glycine max* L. Merr.) Hubei No. 2 cultivar was used for nodulation test.

交法来检查。 ^{32}P 标记的探针与表 1 列出的各变株都有可判断的阳性反应,而与野生型慢生大豆根瘤菌无反应,说明这些缺陷变株的基因组中确有 Tn5 序列存在(图略)。

讨 论

自 Cen 等^[10]用 Tn5 插入诱变一些能与非豆科植物 *Parasponia* sp. 结瘤的慢生豇豆互接种族根瘤菌,得到营养缺陷型与共生缺陷型变株后, Hom 等^[17]也用 Tn5 诱变慢生大豆根瘤菌,选出了营养缺陷型和 Nif⁻ 变株。本文除选营养缺陷型外,还侧重于 Hup⁻ 变株的筛选。Maier 等也用 Tn5 诱变获得 Hup⁻ 变株 SR47。

我们检出 4 株 Tn5 插入引致 His⁻Hup⁻Nif⁻Km^R 表型的变株,其原养型回变体一步恢复了三项功能缺陷。Moshiri 等^[18]由化学诱变得 78 个 Hup⁻ 变株,从中选出 2 个 Hup⁻ Nif⁻ 变株,其中的 SR139 是不能通过任何互补试验复现吸氢或固氮活性,但能以 7×10^{-7} 的频率一步回变成 Hup⁺, Nif⁺ 的原型。这是一个点突变阻止三种铁硫蛋白(固氮酶 I、II 和氢酶)的合成的例子。Siefert^[19]报道了 *Rhodospseudomonas acidophila* 的 Hup⁻ Nif⁻ 变株也一步回变为 Hup⁺ Nif⁺ 原型。Hom 等^[6]已克隆了一段约 23kb 的 DNA,能补偿 Hup⁻ Nif⁻ 缺陷。固氮螺菌 *Azospirillum brasilense* W251-10 也因 Tn5 插入导致 Hup⁻Nif⁻ 突变。从这些事实说明在某些细菌中固氮酶与吸氢酶之间在基因组织和遗传调控上有很密切的关系。

In vitro Hup⁻ 变株 469、470、74 和 389 等在结瘤固氮时不放氢,其乙炔还原活性与亲株相同。这种表型也不是没有先例的, Maier 等^[20]对 78 个 *in vitro* Hup⁻ 变株作结瘤试验时,其中 22 株在结瘤固氮时

并不放氢,它们并不缺少与 *in vitro* 吸氢有关的环状 AMP 或呼吸链中的电子传递成分。他们称此类变株为对氧特别敏感 Hup⁻ 型。因为一般 *in vitro* 氢酶表达要求 $p\text{O}_2$ 为 1% (约 $11 \mu\text{M}$),而根瘤内豆血红蛋白的缓冲作用可使类菌体周围的氧浓度维持在 $0.01 \mu\text{M}$ 水平,在这环境下这类变株能脱阻抑表达吸氢功能。

参 考 文 献

- [1] Schubert, K. R. and H. J. Evans: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1207—1211, 1976.
- [2] 黎耀辉等: *微生物学报*, **20** (2): 180—184, 1980.
- [3] Nelson, L. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **151**: 989—995, 1982.
- [4] Hanus, F. J. et al.: *J. Agronomy*, **73**: 368—372, 1981.
- [5] Cantrell, M. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 181—185, 1983.
- [6] Hom, S. S. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **161**: 882—887, 1985.
- [7] Simon, R. et al.: *Bio/Technology*, **1**: 784—791, 1983.
- [8] Stanisich, V. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **129**: 1227—1233, 1977.
- [9] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning, A laboratory Manual*, Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, N. Y., 1982.
- [10] Cen, Y. et al.: *Appl. Environ. microbiol.*, **43**: 233—236, 1982.
- [11] 湖北省微生物所生物固氮组: *微生物学报*, **17**: 217—222, 1977.
- [12] Pain, A. N.: *J. Appl. Bacteriol.*, **47**: 53—64, 1979.
- [13] Selvaraj, G. and Iyer, V. N.: *J. Bacteriol.*, **158**: 580—589, 1984.
- [14] O'Neill, E. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **159**: 388—389, 1984.
- [15] Beringer, J. E. et al.: *Nature*, **276**: 633—635, 1978.
- [16] Duncan, M. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **122**: 61—67, 1981.
- [17] Hom, S. S. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **159**: 335—340, 1984.
- [18] Moshiri, F. et al.: *J. Bacteriol.*, **155**: 926—929, 1983.
- [19] Siefert, E. and N. Pfennig: *Biochimie*, **60**: 261—265, 1978.
- [20] Maier, R. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **150**: 161—167, 1982.

TRANSPOSON Tn5 MUTAGENESIS IN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Chen Luoqing Zhou Luming Ning Linfu Wang Zifang Cen Yinghua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

When the "suicide" Tn5 vector pSUP1011 was introduced by filter matings into *B. japonicum* strains 110 and 123, the frequencies of Kanamycin-resistant (Km^R) colonies were 5×10^{-8} — 5×10^{-7} , 5—50 times greater than the frequency of spontaneous kanamycin-resistance (10^{-8}). The streptomycin-resistant gene carried by Tn5 was also expressed in these recipient strains. More than 4450 Km^R mutants were isolated and tested for nutritional auxotrophy and hydrogen uptake function. The following classes of auxotrophs were identified: His⁻ (four), Glu⁻ (one), and Trp⁻ (two). Mutants blocked in Hydrogen uptake function (Hup⁻) were also identified at a frequency of 0.2%. Two of the His⁻ mutants tested were

defective in hydrogen uptake and nitrogen fixation (Nif⁻). Prototrophic revertants have been obtained from these His⁻ Hup⁻ Nif⁻ mutants at a frequency of 0.5×10^{-8} and all of these revertants regained the Hup⁺ Nif⁺ function and sensitive to kanamycin simultaneously. In some mutants, the Hup⁻ phenotype were observed only in free living cultures but not in symbiosis state.

Key words

Transposon Tn5; *Bradyrhizobium japonicum*; Auxotroph; Defective in hydrogen uptake