

由质粒介导的浑球红假单胞菌的染色体基因转移*

吴永强 郁宝麟 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

通过接合转移, 质粒 pR751::813、pACYC184::Tn5 和 RP4::Mu 从大肠杆菌引入浑球红假单胞菌。以质粒 pR751::813 和 RP1::Tn501 为介导的染色体转移, 构成了一条染色体基因连锁图, 并确定了包括半胱氨酸和胞嘧啶在内的六个遗传标记的相对位置。决定卡那霉素抗性的转座子 Tn5 以每供体 4.3×10^{-7} 频率从大肠杆菌转入浑球红假单胞菌。约 1.5% 的 Km^r 分离物是营养缺陷型。形成的半胱氨酸变种是稳定的, 回复突变频率约为 4×10^{-10} 。转座子插入诱变产生的变种可用于遗传分析研究。

关键词 浑球红假单胞菌; 质粒转移; 染色体转移; Tn5 插入诱变

尽管光合细菌已广泛用于光合、固氮及膜形成等问题的生化和生物物理研究中, 但是其遗传研究却开展得较晚, 至今比较粗浅^[1]。1974 年, Marrs 首先发现荚膜红假单胞菌的遗传交换过程 (Capsduction)。它以基因转移子 (Gene Transfer Agent) 为媒介, 并具有严格的种的专一性^[2]。至今尚未发现其它天然存在于光合细菌中可用于遗传分析的遗传系统。近年来, Sistrion^[3]、Miller 和 Kaplan^[4] 以及 Pemberton^[5] 已分别将 R68.45、RP4 和 RP1::Tn501 等质粒引入浑球红假单胞菌。本文试图将其它携带转座子的质粒转移至该菌。同时, 利用转座子 Tn5 插入该菌染色体引起高频突变, 达到分离突变体的目的。根据对浑球红假单胞菌质粒及染色体转移的研究, 提供了包括半胱氨酸和胞嘧啶标记在内的染色体连锁图。

材料与方法

(一) 实验菌株

细菌菌株和质粒列于表 1。

(二) 培养基和培养条件

1. Z 培养基^[6]

2. 无机盐低限培养基: RCVBN 培养基^[7]。

全部培养物在 35℃ 培养。

(三) 氨基酸、碱基、抗生素和汞盐

在低限培养基中补充各种氨基酸或碱基的最终浓度为 20 μg/ml; 抗生素和汞盐的最终浓度如下: 卡那霉素 20 μg/ml; 三甲氧二氢嘧啶 50 μg/ml; 链霉素 30 μg/ml; 利福平 10 μg/ml (利福平溶于甲醇); 氯化汞 7 μg/ml。

(四) 突变体的获得

1. 转座子 Tn5 插入诱变: 用大肠杆菌 1041 菌株与浑球红假单胞菌 7009-3 菌株在 Z 平皿上杂交, 35℃ 培养过夜, 将菌苔悬浮液涂布在含 Km 和 Sm 的 Z 平皿上。选择 Km^r 转移接合子, 在含 Km 和 Sm 的培养基上纯化三次后对营养缺陷型突变株作进一步鉴定。

2. 甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变处理: 参照文献^[8]。然后分离并鉴定营养缺陷型。

(五) 杂交^[9]

本文于 1986 年 6 月 3 日收到。

* 承蒙 Pemberton, J. M., Rolf, B. 博士和洪孟民先生惠赠有关菌种, 特此致谢。

缩写符号: Hg^r : 承盐抗性; Pc^r 或 Ap^r : 青霉素抗性; Cm^r : 氯霉素抗性; Sm 或 Str: 链霉素抗性; Km^r : 卡那霉素抗性; ade : 腺嘌呤; Crt : 类胡萝卜素; ams : 谷氨酸合成酶; cys : 半胱氨酸; his : 组氨酸; cyt : 胞嘧啶。

表 1 细菌菌株与质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株与质粒 Strains and plasmids	有关基因型或表型 Relevant genotype or phenotype	来源与文献 Source or reference
1. 浑球红假单胞菌 <i>Rhodospseudomonas</i> <i>spacroides</i>		
6128	his	Pemberton, J. M.
6152	ade crt	Pemberton, J. M.
6178	met phe	Pemberton, J. M.
7001	ade str ^r Res ⁻	Pemberton, J. M.
7009-3	ade rif ^r str ^r crtA	Pemberton, J. M.
204/Rc6p	ams per	文献 [6]
G5/R6p	ams per	文献 [6]
G6/R6p	ams per	文献 [6]
S11	ade cys rif ^r crtA	本文 This paper
Tc24/RP1::Tn501	his Km ^r Hg ^r	本文 This paper
30511/pR751::813	his ura crt Tp ^r Hg ^r	本文 This paper
2. 真养产碱杆菌 <i>Aliccaligenes</i> <i>entrophus</i>		
JMP593/RP1::Tn 501	rif ^r Km ^r Hg ^r	Pemberton, J. M.
3. 大肠杆菌 <i>Escherichia</i> <i>coli</i>		
CSH358/pR751::813	φ80 ^r Tp ^r Hg ^r	Pemberton, J. M.
C600/R144drd::Tn3	rif ^r Km ^r Ap ^r	洪孟民 Hong, M. M.
Sb49/R7K::Tn7	rif ^r Tp ^r Ap ^r Sm ^r	洪孟民 Hong, M. M.
1041/pACYC184::Tn5	thr Cm ^r Km ^r	Rolf, B.
1039/RP4::Mu	thr Km ^r	Rolf, B.

结 果

(一) 种间的质粒转移

从各地收集到一些大肠杆菌和真养产碱杆菌,它们都含有带转座子的质粒。经接合转移,可使其中一些质粒从大肠杆菌转移至浑球红假单胞菌。质粒 pR751::813, pACYC 184::Tn 5 和 Rp₄::Mu 分别以 10^{-6} — 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} 频率将抗性标记转入受体。它们携带的 Tp^r, Hg^r 和 Km^r 可在受体菌中表达 (表 2)。然而, R144 drd3::Tn 3 和 P7K::Tn 7 未能引入受体菌, RP 1::Tn 501 也不能从真养产碱杆菌引入浑球红假单胞菌。试验表明,转

座子 Tn 5 可以 pACYC 184 为载体进入浑球红假单胞菌,并插入受体的染色体,产生营养缺陷型。通过接合转移, pR 751::813 能带动浑球红假单胞菌染色体转移。Rp₄::Mu 在浑球红假单胞菌遗传分析中的作用有待进一步研究。

(二) 质粒的种内转移

质粒 RP1::Tn 501 和 pR 751::813 能在浑球红假单胞菌菌株间进行转移,转移频率分别为 $1-5 \times 10^{-2}$ 和 6×10^{-5} (表 3)。然而 RP 1::Tn 501 不能转入含天然质粒 R6p 的谷氨酸合成酶突变株 204, G5 和 G6。可能 RP 1::Tn 501 与 R6p 在该菌中是不相容的。从质粒在种间转移

表 2 携带转座子的 R 质粒从大肠杆菌或真养产碱菌向浑球红假单胞菌转移
Table 2 Transfer of R plasmids carrying transposon from *E. coli* or *A. entrophus* to *R. spaeroides*

供 体 Donor	质粒和转座子 Plasmid and transposon	受体 Recipient	筛选性状 Selected marker	质粒转移频率/每供体 Frequency of plasmid per donor cell	自发突变频率 Spontaneous mutation rate
<i>A. entrophus</i> JMP593	RP1::Tn501	<i>R. spaeroides</i> 6128	Km Crt	1×10^{-8}	—
<i>E. coli</i> CSH358	pR751::813	6128	Sm Tp Hg	2×10^{-7}	5×10^{-10}
CSH358	pR751::813	30511	Sm Tp Hg	2×10^{-7}	6×10^{-10}
CSH358	pR751::813	6152	Sm Tp Hg	3×10^{-6}	—
1041	PACYC184::Tn5	7009-3	Km Crt	9×10^{-6}	1×10^{-10}
1039	RP4::Mu	7001	Sm Km	1×10^{-7}	9×10^{-10}
C600	R144drd::Tn3	6128	Km Crt	4×10^{-7}	—
Sb49	R7K::Tn7	6178	Sm Crt	1×10^{-8}	—

表 3 RP1::Tn501 和 pR751::813 在浑球红假单胞菌中的转移
Table 3 Transfer of Plasmid in *R. spaeroides* mediated by RP1::Tn501 and pR751::813

供 体 Donor	质粒和转座子 Plasmid and transposon	受 体 Recipient	筛选性状 Selected marker	质粒转移频率 Frequency of plasmid per donor cell
6152	RP1::Tn501	6128	Km	3×10^{-2}
6152	RP1::Tn501	204	Km	$< 1 \times 10^{-7}$
6152	RP1::Tn501	G5	Km	$< 3 \times 10^{-6}$
6152	RP1::Tn501	G6	Km	$< 5 \times 10^{-6}$
Tc24	RP1::Tn501	6152	Km	5×10^{-2}
Tc24	RP1::Tn501	7009-3	Km	4×10^{-2}
Tc24	RP1::Tn501	7001	Km	1×10^{-2}
6152	pR751::813	7009-3	Tp Hg	6×10^{-2}

表 4 49 株转移接合子的表型特征
Table 4 Phenotype of 49 transconjugats

结果 Result	项目 Item	生 长 Growth			抗 性 Resistance		类胡萝卜素 Crt
		低限培养基 Mm	腺嘌呤 Ade	组氨酸 His	卡那霉素 Km	汞 Hg ⁺⁺	
菌株 Strain							
49 株转移接合子 49 transconjugats		—	+	—	+	+	—
供体 Donor Tc24		—	—	+	+	+	+
受体 Recipient 6125		—	+	—	—	—	—

频率较低而种内转移频率较高的现象推测,浑球红假单胞菌存在限制系统。

为了证明 RP1::Tn501 在浑球红假

单胞菌中的稳定性,将含 RP1::Tn501 的菌株 6152 与 6128 杂交,分离获得了转移接合子 Tc24。然后用 Tc24 作供体再与

表 5 部分三点杂交分析

Table 5 Partial analysis of three-factor crosses

杂交组 Cross	选择的供体标记 Selected donor marker	重组子/每供体 Recombinants per donor cell	重组子非选择标记的基因型 Genotype of recombinants in respect of nonselected marker			重组子数目 No. of re- combinant	各类百分数 % in each class
Tc24×7009-3 [his(RP1::Tn501) ×ade crt rif ^r]	ade	2×10 ⁻³	ade	crt	rif ^s		
			+	+	+	34	0.18
			+	+	-	92	0.49
			+	-	+	7	0.04
			+	-	-	55	0.28
Tc24×S11 [his(RP1::Tn501) ×ade crt cys rif ^r]	cys	1×10 ⁻⁶	cys	crt	rif ^s		
			+	+	-	4	0.01
			+	+	+	15	0.03
			+	-	-	323	0.70
			+	-	+	117	0.26
	cys	1×10 ⁻⁶	cys	crt	ade		
			+	+	+	15	0.03
			+	+	-	5	0.01
			+	-	+	6	0.01
			+	-	-	459	0.95
30511×S11 [his cyt (pP751:: 813)×ade crt cys rif ^r]	ade	5×10 ⁻⁶	ade	crt	his		
			+	+	-	115	0.51
			+	+	+	98	0.43
			+	-	-	2	0.01
			+	-	+	11	0.05
	ade	5×10 ⁻⁶	ade	crt	cyt		
			+	+	-	81	0.33
			+	+	+	147	0.61
			+	-	-	1	0.00
			+	-	+	14	0.06

6152 进行杂交, 分离、纯化 49 株转移接合子并分析它们的表型。结果表明(表 4), 染色体控制的 *ade*、*his* 和 *crt* 等性状与受体 6152 相同, 但同时获得了抗药质粒 RP 1::Tn 501 的 *Km^r* 和 *Hg^r* 特征。这表明 RP 1::Tn 501 在种内是很稳定的。Tc 24 菌株带紫红色素, 是一个很容易鉴别的供体。其质粒的转移频率并不比原 6152 (RP 1::Tn 501) 高, 仍然保持在 10⁻² 相同的水平。

(三) 插入突变体的获得

质粒 PALYC 184::Tn 5 经接合转移从大肠杆菌转入浑球红假单胞菌时, Tn 5 携带的 *Km^r* 标记以 4.3×10⁻⁵ 频率在转移

接合子中表达, 同时产生大量的营养缺陷型。初步试验表明, 有 1.5% 的 *Km^r* 接合转移子是营养缺陷型, 可能是由于 Tn 5 插入受体染色体引起的。在 14 个营养缺陷型中, 有 3 个是半胱氨酸缺陷型。这些突变株的性状稳定, 经多次转接, 性状不变。*cys* 回复突变频率约为 4×10⁻¹⁰。

6128 菌株经 EMS 诱变获得 305 蓝绿色突变株^[8]。将 305 再进行 EMS 处理得到 30511 突变株。经鉴定它是组氨酸, 类胡萝卜素和胞嘧啶缺陷型。用大肠杆菌 CSH 358 菌株与 30511 杂交, pR 751::813 以 2×10⁻⁷ 频率转入受体。在基因连锁试验中, 含 pR 751::813 质粒的 30511 菌

株是有效的供体菌。

(四) 染色体的转移和重组

试验分别用 Tc 24 或 30511(pR 751::813) 作供体, 用 7009-3 或 S 11 作受体。质粒 RP 1::Tn 501 和 pR 751::813 都可诱动浑球红假单胞菌染色体转移。用 RP 1::Tn 501 时, *ade* 的重组频率高达 2×10^{-3} , 用 pR 751::813 时, *ade* 的重组频率为 5×10^{-6} , 它们都能有效地促使染色体转移, 并产生足够的重组子供连锁分析。

各杂交组采用适当的筛选培养基, 选择 200—500 个重组子菌落, 鉴定重组子非选择标记的基因型。从表 5 可见, 在 Tc 24 $\times$ 7009-3 杂交中, *ade*⁺*crt*⁻*rif*⁺ 的重组频率最低, 受体的遗传标记 *crt* 应处于 *ade* 和 *rif* 之间, 因此这三个标记的排列顺序应是 *ade crt rif*, 根据非选择标记的共转频率, 可确定它们在连锁图谱上的相对距离。在 30511 (pR 751::813) $\times$ S 11 杂交中, *his* 也是与 *ade crt* 连锁的, *his* 与 *ade* 和 *crt* 的共转频率高达 51%。*cys* 和 *cyt* 这两个标记也都与 *ade crt* 连锁。重组分析表明, 供体菌相当长的染色体片段是可以被转移的。

讨 论

Sistrion^[3] 首次发现光合细菌接合转移遗传系统。他将广宿主范围的质粒 pR 68.45 从铜绿假单胞杆菌转入浑球红假单胞菌, 然后在种内进行接合转移, 并证明 *str* 或 *rif* 与 *lys*、*met*、*ilv* 连锁; *ilv* 与 *pro* 连锁, 但与 *his* 不连锁; *met* 或 *lys* 与 *his*、*pro* 也不连锁。尽管 Miller 和 Kaplan^[4] 采用质粒 RP4 也能促使浑球红假单胞菌染色体转移, 但由于频率很低, 因而在基因分析中价值不大。Pemberton^[5] 发现携带转座子 Tn 501 的 RP 1 质粒能促进染色体在浑球红假单胞菌间高频转移。并用 RP

1::Tn 501 完成了染色体图。它是由二个连锁群构成的。较短的连锁群含有 *met*、*try* 和 *his* 基因, 较长的含 *ade*、*rif* 和 *crt* 等基因。

本工作证实了 Pemberton 的某些结论, 表明 *ade*、*crt*、*rif* 的确连锁。同时, 由 pR 751::813 介导的杂交所作的重组分析表明, *his* 与 *ade* 和 *crt* 也是连锁的, 而且新获得的 *cys* 和 *cyt* 标记也与 *ade* 和 *crt* 连锁。在浑球红假单胞菌染色体上可能只有一个连锁群。用 Kondorosi 等^[9,10] 的经验公式, 从共转移频率推算出连锁图上各标记间的距离, 如图 1 所示, 这六个遗传标记在同一个连锁群上。



图 1 浑球红假单胞菌染色体连锁图
标记的相对位置用三点杂交分析测定。

Fig 1 Linkage Map of the *Rhodospseudomonas spaeuroides* Chromosome

The relative positions of markers were determined by three factor crosses.

转座子不仅能在基因组间跳跃, 而且带有易于选择的抗性标记, 它是一个有用的遗传分析工具。一些作者已使用 Tn 插入诱变革兰氏阴性菌, 但是用质粒 pACYC 184 作 Tn5 载体的工作只见于根瘤菌^[11]。本文首次将 pACYC 184::Tn 5 从大肠杆菌引入浑球红假单胞菌, 高效地产生了 Tn 5 插入突变体, 并用 *cys* 基因进行染色体的重组研究。估计这个手段对于浑球红假单胞菌的其它基因有普遍的意义。目前我们实验室正对光合固氮、光合放氢和吸氢等重要的生物过程进行研究。这些表型特征在诸如大肠杆菌等一些异养菌中是没有的, 如果能用 Tn5 插入染色体造成参与上述过程基因的突变, 同时用质粒 RP1::Tn

501 和 R 751::813 进行重组频率的测定, 那么构建它们详细的物理及遗传图谱也是可能的。

pACYC 184 质粒在根瘤菌中是极不稳定的, 被称之为自杀质粒。该质粒在浑球红假单胞菌中的稳定性有待进一步做质粒分析。

参 考 文 献

- [1] Saunders, V. A.: in Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity, Academic Press, Inc., New York, Vol. 3, 1982.
[2] 吴永强等: 微生物学通报, 10: 174~177,

1983。

- [3] Sistrup, W. R.: *J. Bacteriol.*, 131: 526—532, 1977.
[4] Miller, L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 187: 229—234, 1978.
[5] Pemberton, J. N. et al.: *J. Bacteriol.*, 147: 110—117, 1981.
[6] 宋鸿遇等: 微生物学报, 24: 149—155, 1984.
[7] Weaver, P. F. et al.: *Arch. Microbiol.*, 105: 207—216, 1975.
[8] 吴永强等: 植物生理学报, 11: 286—291, 1985。
[9] Kondorosi, A. et al.: *Nature*, 264: 525—527, 1977.
[10] Kondorosi, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 178: 403—408, 1980.
[11] Berg, D. E.: *Biotechnology*, 1: 417—435, 1983.

PLASMID TRANSFER, CHROMOSOME MOBILIZATION AND GENETIC LINKAGE IN *RHODOPSEUDOMONAS SPAEROIDES*

Wu Yongqiang Yu Baolin Song Hongyu

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Plasmid pR751::813, pACYC184::Tn5 and RP4::Mu were introduced from *Escherichia coli* into the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides* by conjugation. Chromosome transfer in *R. sphaeroides* is mediated by RPI::Tn501 and pR751::813, and a single linkage map was constructed by using these systems. The relative position of each of six markers including *cys* and *cyt* were determined by linkage to surrounding genes. Tn5, transposed from *E. coli* to the *R. sphaeroides* at a frequency of 4.3×10^{-5} per donor

cell. About 1.5% kanamycin resistant of isolates were auxotrophic. Cysteine insertion mutants were stable with a revertant frequency about 4×10^{-10} . The mutant generated by transposon Tn5 mutagenesis was suitable for mapping.

Key words

Rhodospseudomonas sphaeroides; Plasmid transfer; Chromosome mobilization; Tn5 insertion mutagenesis