

固氮螺菌氢代谢与固氮作用的关系

III. 转座子 Tn5 诱变的 *Azospirillum brasilense* 吸氢活性缺陷株的筛选

王子芳 郭俊

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

以携带有自杀性质粒 pR64::Tn5 的大肠杆菌 (*E. coli* RL29) 为供体菌株, 与受体菌巴西固氮螺菌 W251-10 (*Azospirillum brasilense* W251-10) 进行杂交, 在选择性平板上测得卡那霉素抗性菌落与受体菌菌落之比为 5.0×10^{-7} 。受体菌 W251-10 的卡那霉素抗性自发突变频率小于 1.14×10^{-9} 。经气相色谱仪分析测得一株丧失吸氢酶 (Hydrogen Uptake Hydrogenase) 活性的突变株(编号为 *Azospirillum brasilense* WG15), 同时发现其固氮酶 (Nitrogenase) 活性也已丧失。DNA 分子杂交结果表明, 所获得的突变株 WG15 的总 DNA 中存在有 Tn5 的序列, 而 W251-10 呈阴性结果, 从而证实了 WG15 吸氢活性的丧失是由于 Tn5 在 DNA 中的插入引起的, 同时也揭示了巴西固氮螺菌的吸氢酶基因 (*hup*) 和固氮基因 (*nif*) 在遗传学上有着连锁的关系。

关键词 巴西固氮螺菌; 吸氢酶; 转座子 Tn5; 固氮酶

Burris 及 Hoch 等人在 50 年代观察到了固氮微生物和豆科植物根瘤在固氮过程中伴随着 H_2 的释放^[1]。这种依赖于 ATP 的 H_2 释放造成能量的浪费^[2,3]。后来, 研究者在许多不同类群的微生物中发现了吸氢酶^[4], 这种吸氢酶能氧化 H_2 , 进一步支持固氮作用。因此, 有的研究者认为具有吸氢酶的菌株能提高固氮效率^[4,5]。

在共生固氮体系中, Evans 等人实验证明用 Hup^+ 菌株接种的植物干物质产量和总氮量都比对照要高些^[6]。Schubert 用大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) Hup^+ 菌株 USD 110 和 Hup^- 菌株 USD 31 接种大豆结果表明, 前者接种的植物干重、含氮量和全氮量都比后者分别高出 24%、7% 和 31%^[2]。

Gibson 等人认为 H_2 的氧化和电子再循环并不促进固氮作用, 他们在实验中没

有得到同 Evans 和 Schubert 等一样的正结果^[7]。因此, 在共生固氮体系中 H_2 的再循环是否对固氮作用有促进的问题有二种不同意见。

近年来, 研究者在巴西固氮螺菌的许多菌株中发现了吸氢酶活性^[8]。由于自生固氮菌难以象共生固氮菌那样通过接种寄主植物的效果来评价 H_2 的再循环对固氮效率的影响, 因此, 筛选 Hup^- 菌株与 Hup^+ 亲本菌株进行比较是一个较好的途径。转座子 Tn5 用于根瘤菌遗传诱变的研究已有许多报道^[9-12]。但是, 把转座子 Tn5 用于固氮螺菌的诱变目前尚未见报道。

本文着重介绍用转座子 Tn5 诱变巴西固氮螺菌, 筛选 Hup^- 突变株的工作。

本文于 1986 年 8 月 11 日收到。
作者对提供菌株的同事表示谢忱。

表 1 菌株、相关特性及其来源

Table 1 Characteristics and sources of used bacteria

菌株 Strain	相关特性 Characteristic	来源 Source
供体 Donor 大肠杆菌 RL29 <i>E. coli</i> RL29	thr, leu, thi, kan ^r 携带 pR64::Tn5	Li Fudi ^[13]
受体 Recipient 巴西固氮螺菌 W251-10 <i>A. brasilense</i> W251-10	Fix ⁺ Hup ⁺ Sm ^r Kan ^r	本实验室分离 ^[13] Author's Lab.

材料与方 法

(一) 菌株

本研究所用的菌株及其相关特性和来源列于表 1。

(二) 主要试剂、溶液和培养基

TE 缓冲液、SDS 裂解液、苯酚乳化液、Dobereiner 溶液、SSC 溶液按文献报道的方法配制^[14,15]。卡那霉素溶液用无菌蒸馏水配制并经微孔滤膜过滤。

LB 培养基每升含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 5g。

Dobereiner 培养基每升含 K_2HPO_4 0.1g, KH_2PO_4 0.4g, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002g, $FeCl_3$ 0.01g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, CaCl 0.02g, 苯果酸钠 5.0g, 另加琼脂粉(固体培养基 20.0g, 半固体培养基 1.75g)。上述培养基均在 $1.05kg/cm^2$ 灭菌 30 分钟, pH7.0—7.2。

选择性培养基为 Dobereiner 固体培养基, 另每升加入 5g 的 NH_4Cl 和 50mg 的卡那霉素。

SDS 购自 Sigma 公司, 蛋白胨购自 Daigo 公司, 酵母粉购自 Oxoid 公司, 其它试剂均为国产。

(三) 转座子 Tn5 诱变技术

供体菌 *E. coli* RL29 接种于 LB 培养基中, 37℃ 静置培养过夜, 加入 1/2 体积预热的 LB 培养基, 继续培养 3 小时。受体菌巴西固氮螺菌 W251-10 接种于液体 Dobereiner 培养基中, 28℃ 摇床培养 24 小时至对数后期备用。分别取供体菌液

和受体菌液按 2:1(V/V) 混合, 轻轻摇匀后, 通过细胞过滤器将菌收集在孔径为 $0.45\mu m$ 的滤膜上。取下滤膜, 置于 Dobereiner 固体培养基平板上, 28℃ 培养 20 小时后, 将滤膜放入装有 3—5ml 生理盐水的三角瓶中, 轻摇 20 分钟, 取 0.1ml 菌悬液涂抹在选择性培养基平板上, 28℃ 培养 5 天后挑单菌落纯化。以选择性培养基上出现的 Kan^r 接合子数与杂交洗脱菌悬液中受体菌数之比来表示卡那霉素抗性 (Kan^r) 的接合转移频率。

(四) 吸氢酶活性和固氮酶活性测定

按文献 [8] 介绍的方法进行。

(五) 荧光抗体的血清学反应

菌体经培养后, 3000r/min 离心 5 分钟收集, 然后用 PBS (磷酸缓冲液生理盐水) 制成约 1.0×10^{10} 细胞/ml 的悬液。

用牙签取悬液涂片, 火焰固定后加一滴荧光抗体, 在饱和湿度下染色 30 分钟, 然后用 PBS 冲洗一次, 再置于 PBS 中浸泡 15 分钟, 用蒸馏水反复冲洗 PBS, 空气干燥后用 1:9 的水、甘油封片, 在莱芝显微镜下观察并摄影。

(六) 总 DNA 的提取、制备

总 DNA 的提取、制备采用 Kado 和 Liu^[14] 的方法, 但作如下修改:

裂解液改用 8:1:1 (V/V/V) 的 TE 缓冲液、链霉蛋白酶 E (5mg/ml) 和 10% 的 SDS 溶液。裂解条件为 37℃, 45 分钟。

苯酚沉淀蛋白后, 再用氯仿抽提二次, 以除去残留苯酚。

提取的 DNA 置 4℃ 冰箱保存, 分子杂交前

需用琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的存在。

(七) DNA-DNA 分子杂交

1. Tn5 探针的制备: 制备探针的模板 DNA, 即 pKan 2 片断由本室岑英华提供。采用缺口平移方法制备探针, 反应系统按 New England Nuclear 公司出产的缺口平移药盒说明, 加入各种反应试剂到 Eppendorf 管中, 12°C—14°C 保温 2 小时, 加入终止液后经葡聚糖 G-50 柱层析分离, 收集第一峰的洗脱液。

2. 点杂交 (Dot Hybridization): 点杂交在硝酸纤维素膜上进行。预杂交和杂交按已报道的方法操作^[16,17]。杂交后的放射性自显影条件为 -40°C, 3—4 天。

结果和讨论

(一) Tn5 插入巴西固氮螺菌 W251-10 的诱变

供体菌 *E. coli* RL29 带有 pR64::Tn5 而抗 50 μg/ml 的卡那霉素。由于它是三重缺陷型, 因此不能在 Doberiner 培养基上生长。受体菌巴西固氮螺菌 W251-10 对卡那霉素敏感, 因而本实验采用含 50 μg/ml 卡那霉素的 Doberiner 培养基淘汰双亲本, 筛选 Tn5 插入的受体变株。用微孔滤膜杂交获得卡那霉素的接合转移频率为 5.0×10^{-7} , 受体菌 W251-10 的抗卡那霉素自发突变频率小于 1.14×10^{-9} 。供体菌 *E. coli* RL29 的缺陷回复突变频率小于 1.65×10^{-9} 。受体菌 W251-10 的 Kan^r 的接合转移频率远高于其 Kan^r 自发突变频率, 这种现象解释为由于 Tn5 从供体菌 *E. coli* RL29 中通过接合转移到受体菌 W251-10 的 DNA 基因组中, 从而产生了比自发突变高出许多倍的抗卡那霉素的菌落。这样的接合转移频率同 Li Fudi^[23] 等人报道的用紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*) 作受体时杂交的频率近似。

由于缺陷型的菌株在选择性培养基上

不能生长, 因此本实验的抗卡那霉素菌落出现的频率计数中没有包括由于 Tn5 插入产生的缺陷型突变菌株。在多次的杂交试验中, 从选择性平板上获得 362 个抗卡那霉素的受体菌落, 经气相色谱仪分析测出一株吸氢活性缺陷的突变株 (编号为 WG15)。这一菌株经纯化, 检测为 Hup⁻, 而亲本株 W251-10 为 Hup⁺。

(二) 荧光抗体测定菌株同源性

用巴西固氮螺菌 W251-10 的荧光抗体与 W251-10、WG15、*E. coli* RL29 的细胞涂片染色反应的结果: W251-10 和 WG15 的细胞与荧光抗体起抗原抗体结合反应, 即呈阳性结果, 而供体菌 *E. coli* RL29 与荧光抗体反应呈阴性结果 (图略)。

荧光抗体测定菌株同源性的结果说明 WG15 和 W251-10 的菌体一样, 能同抗体产生特异性的结合, 这为证实 WG15 是由亲本株 W251-10 突变而产生的变株提供了重要依据。

(三) WG15 与 W251-10 菌株的氢酶和固氮酶活性测定

采用平行试验方法, 在同样的培养条件下同时测定 W251-10 和筛选出的 WG15 的固氮酶活性和吸氢酶活性 (表 2)。

表明 WG15 的吸氢能力已明显丧失, 与此同时, 其固氮酶的活性也降为“0”, 而亲本株 W251-10 的吸氢酶活性和乙炔还原活性分别达 181.77 和 423.44 nmol · h⁻¹ · ml 菌液⁻¹。

WG15 丧失吸氢酶活性的同时伴随着固氮酶活性的丧失, 这种活性的丧失是由于转座子 Tn5 在基因组中的插入引起的, 因此, 这一生理代谢上的连锁现象提示我们考虑 hup 基因与 nif 基因之间在遗传学关系上的几种可能性: (1) hup 基因与 nif 基因丛中的某一结构基因位于同一操纵子内, 共用同一操纵基因或调节基因。这

表 2 WG15 和 W251-10 酶活性的比较

Table 2 Comparison of enzyme activities between WG15 and W251-10

菌株 Strain	培养时间 Time of culture (h)	注 H ₂ 量 H ₂ volume (ml)	注乙炔量 C ₂ H ₂ volume (ml)	吸氢酶活性 Hup activity (nmol·h ⁻¹ ·ml culture ⁻¹)	固氮酶活性 Nase activity (nmol·h ⁻¹ ·ml culture ⁻¹)
WG15	24	1	3	0	0
W251-10	24	1	3	181.77	423.44

样, Tn5 插入操纵或调节基因就会造成 *hup* 和另一基因的失活; (2) *hup* 基因和 *nif* 基因的表达需要某一共同的基因产物的存在。这一基因产物由于 Tn5 插入后不能产生时也影响 *hup* 和 *nif* 基因的表达; (3) *hup* 基因与 *nif* 基因相距很近, Tn5 插入后引起的强极性效应使二种功能同时丧失。Casadseus 报道了 Tn1 这种转座子有专一性的插入偏爱序列^[18], 即所谓“热点”, Kleckner 叙述了 Tn5 的极性效应^[19], 我们认为 Tn5 插入的极性效应可能存在, 但有无所谓相似于 Tn1 的插入“热点”, 尚待大量的接合转移试验证实。

(四) DNA · DNA 分子杂交结果

以 ³²P 标记的 pKan 2 为探针, 分别与

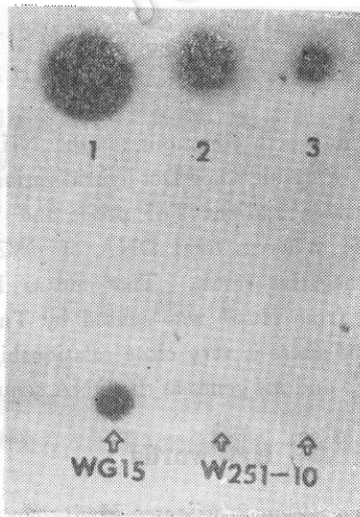


图 1 分子杂交自显影结果 (1、2、3 为正对照)

Fig. 1 Result of Dot hybridization
(1, 2, 3 as positive control)

WG15 和 W251-10 的总 DNA 进行杂交, pKan 2 的 DNA 样品为阳性对照。结果表明 WG15 与探针杂交呈阳性结果, 而 W251-10 的 DNA 与探针杂交呈阴性结果 (图 1)。

pKan 2 质粒是由 pBR322 加上一个 3.5kb 的 Tn5 *Hind* III 片断构成^[19]。在 DNA · DNA 的杂交中, WG15 能与 Tn5 探针杂交, 说明在 WG15 的基因组中具有 Tn5 的序列存在。

在我们的 Tn5 插入诱变中, Hup⁺Fix⁺ 的菌株突变为 Hup⁻Fix⁻ 的突变株。由点突变诱变剂 Tn5 插入引起如此密切的生理代谢的连锁效应; 说明 *hup* 基因与 *nif* 基因在遗传顺序上有关系, 因为 Tn5 的插入只钝化被插入基因和某些情况下的强极性效应^[19]。

nif A 基因的产物是固氮酶蛋白的特异性激活剂, 而巴西固氮螺菌中 *nif A* 无固定位置, 因此, *hup* 基因与 *nif* 基因丛中的 *A* 基因靠近的可能性是存在的。根据 Plazinski 等人^[20]的分子杂交试验结果, 固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 的供试菌株中 *nif* 基因丛的十七个基因都位于染色体上, 我们在试验中发现 *hup* 基因与 *nif* 基因丛的某些遗传学上的密切关系, 认为它们的位置是靠近的, 因此, 推测在巴西固氮螺菌 W251-10 中 *hup* 基因定位于染色体上, 即 *hup* 与 *nif* 基因丛位于同一复制子中, 而且 *hup* 基因与 *nif* 基因丛的某个基

因遗传顺序靠近, Tn5 插入引起强极性效应使二个基因同时钝化失活。

参 考 文 献

- [1] Burris, R. H.: *Nature*, **179**: 430—431, 1957.
 [2] Schubert, E. et al.: *Plants Physiol.*, **61**: 398—401, 1978.
 [3] Haugland, R. A.: *J. Bacteriol.*, **159**: 1006—1012, 1984.
 [4] 许良树等: 中国科学(B辑), **9**: 819—827, 1985.
 [5] Eisbrenner, G. et al.: *Annu. Rev. Plantphysiol.*, **34**: 105—136, 1983.
 [6] Evans, H. J. et al.: Current Perspective in Nitrogen Fixation, (ed. Gibson, A. H. et al.) Australian Academy of Science, Canberra, p. 84—97, 1981.
 [7] Gibson, A. H. et al.: *ibid.*, p. 373, 1981.
 [8] 王子芳等: 微生物学报, **25**(1): 54—59, 1985.
 [9] Beringer, J. E. et al.: *Nature*, **276**: 633—634, 1978.
 [10] Buchanan-Wollaston, A. V. et al.: *Mol. Gen.*

- Genet.*, **178**: 185—190, 1980.
 [11] Downie, J. A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **190**: 359—365, 1983.
 [12] 陈珞京等: 微生物学报: **26**(4): 321—325, 1986.
 [13] Li Fudi. et al.: Advances in Nitrogen Fixation, (ed. Veeger, C. and Newton, W. E.) Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague and Pudoc, Wageningen, p. 689, 1984.
 [14] Kado, C. I. et al.: *J. Bacteriol.*, **145**: 1365—1373, 1981.
 [15] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning, (ed. Cold Spring Harbor) New York, p. 383—387, 1982.
 [16] Maniatis, T. et al.: *ibid.*, p. 68, 1982.
 [17] 周与良等译: 高级细菌遗传学-遗传工程手册, 天津科学技术出版社, p. 134—149, 1984.
 [18] Casadesus, J. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **174**: 203—209, 1979.
 [19] Kleckner, N.: *Annu. Rev. Genet.*, **15**: 341—404, 1981.
 [20] Plazinsk, J. et al.: *J. Bacteriol.*, **9**: 1429—1433, 1983.

RELATION BETWEEN HYDROGEN METABOLISM AND NITROGEN FIXATION IN *AZOSPIRILLUM* SPP.

III. A HUP⁻ MUTANT OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* BY TRANSPOSON Tn5 MUTAGENESIS

Wang Zifang Guo Jun

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Cell conjugation was carried out between the donor *E. coli* RL29 (pR64::Tn5) and recipient *Azospirillum brasilense* W251-10. The frequency of transposon Tn5 transfer was 5.0×10^{-7} , spontaneous Kanamycin resistance mutation of recipient cell W251-10 was less than 1.14×10^{-9} . One of the transconjugants named WG15 was obtained from the medium containing Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Hydrogen Uptake Hydrogenase and Nitrogenase activities of WG15 were compared with parent strain W251-10 by using Gas Chromatography. WG15 were defective in hydrogen uptake and nitrogen fixation (Hup⁻ Nif⁻) while parent strain

W251-10 had both functions (Hup⁺ Nif⁺). It was positive result when Dot hybridization was made between radiant Tn5 probe and DNA of WG15, Whereas total DNA of W251-10 showed negative result. That means Hup⁻ mutation from Hup⁺ was caused by Tn5 insertion and there is very close relationship between *hup* and *nif* genes at the DNA sequence.

Key words

Azospirillum brasilense; Hydrogen uptake hydrogenase; Transposon Tn5; Nitrogenase