

## 转座子 Tn5 对柠檬酸细菌的诱变

王敖全 尹萍 陈秀珠

(中国科学院微生物研究所, 北京)

含自杀性质粒 PJB4J1::Mu::Tn5 的大肠杆菌 1830 与四株柠檬酸细菌作接合杂交均能获得 Kan<sup>r</sup> 转移接合子。其中一株 (C-3-1) 的 Kan<sup>r</sup> 转移接合子中绝大部分对庆大霉素敏感。鉴别了 3000 个这样的转移接合子菌落获得了 21 株营养缺陷型, 其中赖氨酸 1 株, 尿嘧啶 1 株, 精氨酸 2 株, 异亮氨酸 2 株, 组氨酸 2 株, 甲硫氨酸 1 株, 苯丙氨酸 1 株, 酪氨酸 1 株, 丝氨酸 1 株, 苏氨酸 1 株, 亮氨酸 3 株, 脯氨酸 1 株, 腺嘌呤 3 株和乳糖利用 1 株。用琼脂糖电泳检查部分营养缺陷型突变体 DNA 均未发现自杀性质粒 PJB4J1::Mu::Tn5, 以 <sup>32</sup>P 标记的 Tn5 DNA 为探针与每个营养缺陷型的染色体作杂交均看到了 Tn5 DNA 同源序列的存在。由此得出结论, 这些营养缺陷型产生于转座子 Tn5 从自杀性质粒 PJB4J1 到 C-3-1 染色体的转座。

**关键词** 柠檬酸细菌; 转座子诱变; 转座子; 自杀性质粒

柠檬酸细菌 (*Citrobacter*) 能有效地将 TNT 转化为对人体和动物无害的物质, 并成功地应用于 TNT 炸药厂的废水处理, 作者试图在这一微生物中开展遗传研究。

由于转座子运载体的不断改进, 转座子在细菌遗传操作中的应用日趋广泛。目前人们已能对大肠杆菌以外的许多革兰氏阴性菌作转座子诱变。Meade, H. M. 等用 Tn5 诱变苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 获得了共生缺陷突变体和各种营养缺陷型突变体<sup>[1]</sup>。在此微生物中, Duncan 等用 Tn5 诱变还分离到一系列不能利用碳水化合物插入突变体<sup>[2]</sup>; 此外转座子还成功地用于假单胞菌亚种 (*Pseudomonas* spp)<sup>[3]</sup>, 土壤农杆菌 (*Agrobacterium*)<sup>[4]</sup> 和软腐病欧文氏菌 (*Erwinia*)<sup>[5]</sup> 等, 以研究染色体 DNA 和质粒 DNA 的功能。本文报导转座子 Tn5 对柠檬酸细菌 *Citrobacter* 的诱变结果。

## 材料和 方法

### (一) 细菌菌株和质粒

见表 1。

### (二) 培养基

LB 培养基和基础培养基按参考文献 [6] 配制。

### (三) 转座子诱变

分别取 0.1ml 对数生长期的供体和受体细胞于 LB 培养基上混合, 并涂匀, 置 30℃ 培养 8h, 取等体积的供体和受体细胞单独涂布 LB 培养基作对照。以生理盐水将上述培养基上生长的菌体洗下, 适当稀释后涂布于含卡那霉素和利福平的 LB 选择培养基上, 对受体细胞作活菌计数, 以计算 Kan<sup>r</sup> 转移频率。

### (四) 营养缺陷型的测定

本文于 1988 年 9 月 21 日收到。

致谢: 本工作曾得到相彦希、李文忠二位同志的热情帮助, 作者深表感谢。

表 1 细菌菌株和质粒  
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株 Strain	遗传型 Genotype	来源或参考文献 Source or References
<i>Citrobacter</i> -3-1	Wild type	[7]
C-14-2	Wild type	[7]
C-17-3	Wild type	[7]
C-23-1	Wild type	[7]
C-3-1-1	<i>lys</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-2	<i>ura</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-3	<i>leu</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-4	<i>arg</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-5	<i>iso</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-6	<i>his</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-7	<i>phe</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-8	<i>met</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-9	<i>tyr</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-10	<i>ade</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-11	<i>ser</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-12	<i>ade</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-13	<i>thr</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-14	<i>arg</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-15	<i>leu</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-16	<i>his</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-17	<i>leu</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-18	<i>pro</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-19	<i>ade</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-20	<i>iso</i> ::Tn5	本研究
C-3-1-21	<i>lac</i> ::Tn5	本研究
<i>E. coli</i> 1830	pJB4JI	[8]
Plasmid		
pJB4JI	pJB4JI::Mu::Tn5, Kan <sup>r</sup> Gen <sup>r</sup>	[8]
pRZ102	pRZ::Tn5 Kan <sup>r</sup>	Rezonikoff <sup>[9]</sup>

按 R. W. Davis 和 J. Roth 方法<sup>[10]</sup>进行。

### (五) 质粒 DNA 的提取, 琼脂糖电泳分析以及 DNA-DNA 杂交

均按文献<sup>[11]</sup>进行。

## 结 果

### (一) “自杀性”质粒 PJB4JI 向受体的转移

以能降解三硝基甲苯(简称 TNT)的柠檬酸细菌 C-3-1、C-14-2、C-17-3 和

C-23-1 为受体,(为对供体作反向选择,通过自发突变给受体菌标记利福平抗性),与带有“自杀性”质粒的大肠杆菌 1830 进行接合杂交,在含 50mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 利福平的 LB 培养基上选择 Kan<sup>r</sup> rif<sup>r</sup> 接合子。卡那霉素抗性基因向四株柠檬酸细菌转移频率见表 2。四株柠檬酸细菌获得 Kan<sup>r</sup> 基因的频率明显不同。为测定“自杀性”质粒进入细胞后的稳定性,将各个杂交组合出现的 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 转移接合子菌落分别以牙签接种到含有 20 μg/ml 庆

表 2 Kan<sup>r</sup> 从大肠杆菌1830到柠檬酸细菌的转移频率和转移接合子中 Gen<sup>r</sup> 的频率Table 2 Frequency of Tn5 transfer from *E. coli* 1830 to *Citrobacter* and Gen<sup>r</sup> frequency in Kan<sup>r</sup> transconjugants

菌株 Strain	Kan <sup>r</sup> 转移频率 Kan <sup>r</sup> transfer frequency Kan <sup>r</sup> /ml recipient cells	Kan <sup>r</sup> Gen <sup>r</sup> /Kan <sup>r</sup> rif <sup>r</sup> (%)
C-3-1	$2.6 \times 10^{-6}$	100
C-14-2	$2.0 \times 10^{-6}$	0
C-17-3	$7.5 \times 10^{-2}$	0
C-23-1	$5.5 \times 10^{-2}$	0

大霉素的 LB 培养基。已知质粒 PJB4JI 带有编码卡那霉素抗性和庆大霉素抗性二个基因,因此质粒在柠檬酸细菌中的稳定性可通过测定转移接合子 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 的庆大霉素敏感性得知(各测定 50 个 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 菌落),其结果见表 2。四个受试的柠檬酸细菌中, C-3-1 的 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 转移接合子为 100% 庆大霉素敏感,这说明质粒 PJB4J 在 C-3-1 细胞中很不稳定(具有“自杀性”),它是对 C-3-1 作转座子诱变的理想载体。

## (二) 营养缺陷型突变体的分离和鉴定

实验以含“自杀性”质粒 PJB4JI 的大肠杆菌 1830 为供体,以 C-3-1 为受体作接合杂交,在补加卡那霉素和利福平的 LB 固体培养基上选择 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 转移接合子,在此选择条件下单独的供体和受体均不能生长,从转移实验可知质粒 PJB4JI 不能在 C-3-1 中复制,因此在选择培养基上形成的 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 菌落可初步判定产生于 Tn5 的转座。也可以预期在这些 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 的转移接合子中存在着各种营养缺陷型。为此我们检查了 3000 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 转移接合子的营养要求,共获得了 21 株营养缺陷型突变体,占所测定转移接合子的 0.7%,这与 Tn5 诱变大肠杆菌所获得的频率很接近<sup>[12]</sup>。21 株营养缺陷型中有:赖氨酸 (Lys<sup>-</sup>) 1 株,

尿嘧啶 (Ura<sup>-</sup>) 1 株,精氨酸 (Arg<sup>-</sup>) 2 株,异亮氨酸 (Iso<sup>-</sup>) 2 株,组氨酸 (His<sup>-</sup>) 2 株,蛋氨酸 (Met<sup>-</sup>) 1 株,苯丙氨酸 (Phe<sup>-</sup>) 1 株,酪氨酸 (Tyr<sup>-</sup>) 1 株,丝氨酸 (Ser<sup>-</sup>) 1 株,苏氨酸 (Thr<sup>-</sup>) 1 株,亮氨酸 (Leu<sup>-</sup>) 3 株,肤氨酸 (Pro<sup>-</sup>) 1 株,腺嘌呤 (Ade<sup>-</sup>) 3 株,乳糖利用 (Lac<sup>-</sup>) 1 株。这表明 Tn5 在柠檬酸细菌染色体 DNA 上有着广泛的插入位点。

## (三) 营养缺陷型突变体 DNA 的琼脂糖电泳

虽然已证明了质粒 PJB4JI 在 C-3-1 中不能稳定存在(共测定 350 个 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 转移接合子),但仍不能完全排除营养缺陷型突变体中存在 PJB4JI 质粒的可能性,所以除了确证 21 株营养缺陷型均为 Kan<sup>r</sup> Gen<sup>r</sup> 外,还对其中部分突变体提取质粒作琼脂糖电泳分析(图 1)。受试的 8 株营养缺陷型突变体中均无 PJB4JI 存在,进一步证明了这些突变体产生于 Tn5 的转座。

## (四) 营养缺陷型突变体 DNA 与 Tn5 DNA 的杂交

营养缺陷型产生于 Tn5 转座的最直接证据是在突变体的基因组中找到 Tn5 序列,为此我们提取每一个营养缺陷型突变体的染色体 (*lac*:Tn5 除外),分别与以 <sup>32</sup>P 标记的 Tn5 探针 DNA 进行点杂交。图

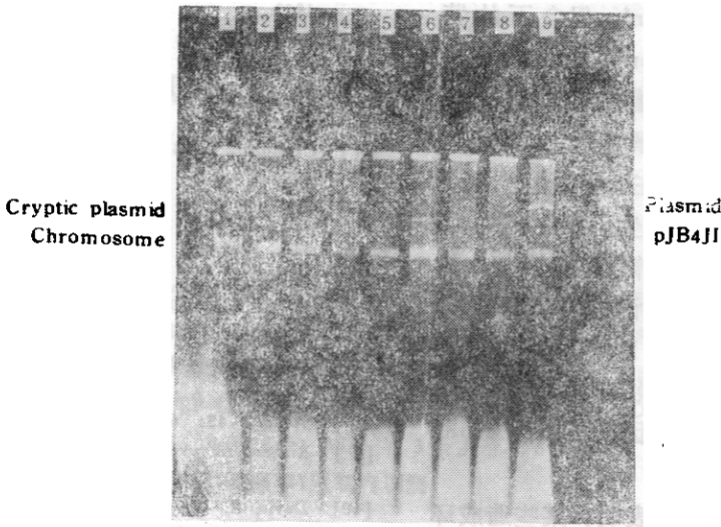


图1 部分营养缺陷型突变体的琼脂糖电泳琼脂糖浓度 0.7%, 电泳缓冲液为 TAE, 电压 75V, 室温, 2h。样品 1.C-3-1; 2—8. 营养缺陷型突变体; 样品 9.1830 (PJB4JI)

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of part of auxotrophs Agarose gel concentration:0.7%, electrophoresis buffer:TAE, Voltage 75V for 2h. lane 1.C-3-1; lane 2—8. auxotrophs mutants; lane9. 1830 (PJB4JI)

注: C-3-1 本身有一隐蔽质粒 Note: There is a cryptic plasmid in the C-3-1

2 表明 20 个营养缺陷型突变体的 DNA 均能与探针杂交呈阳性。而受体 C-3-1 尽

管 DNA 的用量加倍仍为阴性, 说明 C-3-1 基因组中原无 Tn5 同源序列存在。

## 讨 论

本文首次报导利用转座子 Tn5 对柠檬酸细菌的诱变结果。我们采用“自杀性”质粒 PJB4JI 为 Tn5 的载体, 通过接合转移将该质粒引入受体细胞, 实验表明, PJB4JI 质粒在四株来源不同的柠檬酸细菌中稳定性不同(见表 2), 造成这一差别的机理尚不清楚。在 C-3-1 的 Kan<sup>r</sup>rif<sup>r</sup> 转移接合子中有 0.7% 为各种营养缺陷型, 这些突变体对庆大霉素敏感, 无 PJB4JI 质粒, 而且存在 Tn5 同源序列。这证明 Tn5 在柠檬酸细菌 C-3-1 染色体上不同位点的插入造成了基因型的改变。从所得突变体类型之多, 充分显示出 Tn5 在柠檬酸细菌 C-3-1 中转座的随机性。此外还观察到半数以上的营养缺陷型突变体在自发回

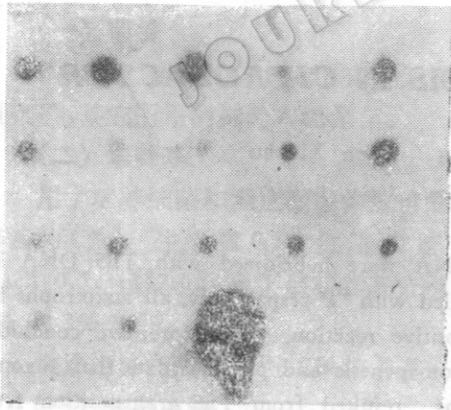


图2 部分营养缺陷型突变体 DNA 与 Tn5 DNA 的点杂交

第四排从左到右第三斑点为 pRZ102 (Col E1::Tn5) 第四(无斑点可见者)为 C-3-1

Fig. 2 Hybridization of auxotrophy mutants DNA with Tn5 probe

The third blot from Left to right in the fourth row is

pRZ102 (Col E1::Tn5); In the same row the fourth one (without blot) is C-3-1

复到原养型时同时为 Kan<sup>r</sup>, 但余下的营养缺陷型回复子仍为 Kan<sup>s</sup>。Zink 在研究 Tn5 诱变软腐病欧文氏菌中有过类似报导<sup>[7]</sup>, 对这一现象的可能解释是 Kan<sup>r</sup> 来自 Tn5 的双重转座, 或是在营养缺陷型突变体的保存过程中 Tn5 发生了新的转座。当用 EcoRI 酶切部分营养缺陷型突变体的 DNA, 然后与用 <sup>32</sup>P 标记的 Tn5 探针 DNA 杂交, 我们观察到 Kan<sup>r</sup> 的原养型回复子出现二条放射自显影带(结果未列出), 这结果支持前一种解释(因为 Tn5 无 EcoRI 切点, 预期为一条带)。

近年来的一些研究表明, 某些造成环境污染的化合物如氯化汞、苯、甲苯、水合盐酸等的降解基因位于质粒上, 我们在能转化 TNT 的柠檬酸细菌 C-3-1 中也观察了隐蔽质粒的存在(图 1), 但是转化基因是否位于该质粒上, 有待进一步研究。

### 参 考 文 献

[1] Meade, H. et al.: *J. Bacteriol.*, 149, 114—122,

1982.

- [2] Duncan, M. G.: *G. Gen. Microbiol.*, 122: 61—67, 1981.
- [3] Boucher, C. et al.: *Phytopathology*, 71: 639—642, 1981.
- [4] Carfinkel, D. G.: *G. Bacteriol.*, 144: 732—743, 1980.
- [5] Zink, R. T. et al.: *G. Bacteriol.*, 160: 809—814, 1984.
- [6] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 431—434, 1972.
- [7] 杨彦希等: *微生物学报*, 4: 408, 1979.
- [8] Chatterjee, A. K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 644, 1983.
- [9] Richard, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 177: 65—72, 1979.
- [10] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial genetics, A manual for Genetic Engineering*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, P. 209—210, 1980.
- [11] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [12] Shaw, K. J. et al.: *Genetics*, 92: 741—747, 1979.

## TRANSPON Tn5 MUTAGENESIS IN *CITROBACTER*

Wang Aoquan Yin Ping Chen Xiuzhu

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

When *E. coli* 1830/PJB4JI mating with four *Citrobacter* strains all were Kanamycin resistant, but a majority of Kan<sup>r</sup>Gen<sup>s</sup> transconjugants were obtained from C-3-1. Among 3000 Kan<sup>r</sup>Gen<sup>s</sup> 21 were auxotrophs, these are Lys<sup>-</sup>(1), Ura<sup>-</sup>(1), Arg<sup>-</sup>(2), Iso<sup>-</sup>(2), His<sup>-</sup>(2), Met<sup>-</sup>(1), Phe<sup>-</sup>(1), Tyr<sup>-</sup>(1), Ser<sup>-</sup>(1), Thr<sup>-</sup>(1), Leu<sup>-</sup>(3), Pro<sup>-</sup>(1), Ade<sup>-</sup>(3), Lac<sup>-</sup>(1), PJB4JI plasmid DNA were detected in parent strain *E. coli* 1830, but not in auxotrophs strains which carrying Tn5 induced mutations. Twenty auxotrophs chromosome

DNA were hybridized with Tn5 DNA labeled with <sup>32</sup>P respectively, all auxotrophs has positive reaction. Therefore, we concluded from genetic and physical data that auxotrophs resulted from Tn5 transposition from PJB4JI into C-3-1 chromosome.

### Key words

*Citrobacter*; Transposon mutagenesis; Transposon; Suicide plasmid