

嘌呤生物合成调控研究

1. *add::MudJ (lacZ, Kan^r)* 的分离和遗传定位*

王敖全 陈秀珠 戴秀玉 唐国敏

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

本文报道采用工程转座子 *MudJ (lacZ, Kan^r)* (以下简称 *MudJ*) 诱变分离 *add::MudJ* 插入突变体和遗传定位的结果。从鉴别 20 000 个 *Kan^r* 转导子中获得了 6 株 *add::MudJ* 突变体。酶活性测定表明, 这些突变体无一有可检测的腺苷脱氨酶活性。转导分析证明, *add* 与 *pmi* 基因和与 *pur R* 基因有 10% 连锁的 *xxs1900::Tn10d-tes* 插入物分别有 70% 和 37% 的共转导。三点杂交的结果确定 *add* 位于 *pmi* 和 *xxs1900::Tn10d-tes* 之间, 基因顺序为 *pmi (31.5')-add-xxs1900::Tn10d-tespur R(30')*

关键词 鼠伤寒沙门氏菌; 腺嘌呤核苷脱氨酶突变体; 遗传定位; 工程转座子

嘌呤生物合成途径由从头合成途径 (*de novo pathway*) 和分段合成途径 (*salvage pathway*) 组成^[1], 至少涉及 14 个结构基因, 且分散于染色体上。 *add* 基因属嘌呤分段合成途径中的一个结构基因, 它编码腺嘌呤核苷脱氨酶, 催化腺嘌呤核苷脱氨生成次黄嘌呤核苷 (HR)。这一基因在嘌呤分段合成途径中将腺嘌呤转变成鸟嘌呤中起重要作用^[2]。但在鼠伤寒沙门氏菌中至今尚未作遗传定位。本文报道鼠伤寒沙门氏菌中 *add::MudJ* 的分离和遗传定位。

材料和 方法

(一) 菌株

实验所用菌株列于表 1。

(二) 培养基

补加 0.2% 葡萄糖的 Vogel 和 Bonoev E^[3] 培养基作基本培养基, 丰富培养基用 LB, 绿色指示平板、NCE 平板均按文献[4]配制。

(三) 遗传技术

1. 带有 *Mu* 转座基因和 *MudJ* 的 P22 噬菌体裂解物的制备按文献[5]进行。
2. *MudJ* 的诱变按文献[6]。
3. 转导杂交: 所有转导杂交均用高频转导噬菌体 P22 (HT105/i) int 201^[7], 将受体细胞与作供体的噬菌体按感染系数 (moi) 为 1 于选择平板混合并涂布。但在选择 *Kan^r* 转导子时, 为使 *Kan^r* 得到表达, 将混合物(于小试管中)置室温放 1—2 小时后再作

本文于 1991 年 2 月 27 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

表 1 实验所用菌株
Table 1 Strains used in experiments

| 菌株 Strain | 遗传型 Genotype | 来源 Source |
|--------------|---|----------------|
| LT2 | wild type | J. Roth's lab. |
| his646 | $\Delta his646$ | J. Roth's lab. |
| TT315 | <i>purG1739::Tn10</i> | J. Roth's lab. |
| TT10289 | <i>hisD9955::MudJ, his A9949::MudA</i> | J. Roth's lab. |
| TT10290 | <i>purR2319::Tn10d-res</i> | J. Roth's lab. |
| TT12348 | <i>xxx1900::Tn10d-res</i> 95% linked to <i>purR</i> | J. Roth's lab. |
| TT12350 | <i>xxx1900::Tn10d-res</i> 34% linked to <i>purR</i> | J. Roth's lab. |
| TT12352 | <i>xxx1900::Tn10d-res</i> 10% linked to <i>purR</i> | J. Roth's lab. |
| TT1025 | <i>pmi51::MudA</i> | J. Roth's lab. |
| TGA01 | <i>hisG646 pur G1739::Tn10</i> | This study |
| TGA02 | <i>add1::MudJ his646 purG1739::Tn10</i> | This study |
| TGA03 | <i>add2::MudJ his646 purG1739::Tn10</i> | This study |
| TGA04 | <i>add3::MudJ his646 purG1739::Tn10</i> | This study |
| TGA05 | <i>add4::MudJ his646 purG1739::Tn10</i> | This study |
| TGA06 | <i>add5::MudJ his646 purG1739::Tn10</i> | This study |
| TGA07 | <i>add6::MudJ his646 purG1739::Tn10</i> | This study |
| TGA08 | <i>add01::MudJ</i> | This study |
| TGA09 | <i>add02::MudJ</i> | This study |

涂布。

4. 腺苷脱氨酶活性测定按文献[8]进行。

结果和讨论

(一) *add::MudJ* 插入突变体的分离和鉴别

已知鼠伤寒沙门氏菌野生型菌株可通过从头合成途径和以 ATP 为底物的组氨酸生物合成途径合成肌苷 (HR) 和肌苷酸 (IMP), 因此野生型菌株不宜作为诱变分离 *add* 突变体的出发株。为能在补加腺苷或肌苷的选择平板上检出 *add* 突变体, 应采用嘌呤和组氨酸双重突变体。这一突变体的构建如下: 以含 *purG1739::Tn10* 的 TT315 制备的 P22 为供体, 含 Δhis 的 *his646* 为受体作转导, 在补加四环素的 LB 平板上选择 *Tet^r* 转导子并检测 *pur⁻* 表型, 这样构建的双重突变体其遗传型为 $\Delta his646 purG1739::Tn10$, 择其一用作转座子诱变分离 *add::MudJ* 的出发株, 编为 TGA01。实验时以 TT10289 制备的 P22 裂解物(效价约 10^{10} pfu/ml) 作供体, 以 TGA01 为受体作转导杂交, 在补加卡那霉素的 LB 平板上选择 *Kan^r* 转导子。为使 *Kan^r* 基因充分表达, 当 P22 和受体混合后先涂 LB 平板, 37°C 培养 8—10 小时再影印到 LB + *Kan* 平板上。培养后每平板应出现 300—500 个 *Kan^r* 转导子菌落。再以此为母板先后复印到下列选择培养基平板: E/Ado, His, Kan 和 E/HR, His, Kan。在前一种平板上不长而在后一种平板上生长者即为 *add* 的 *MudJ* 插入突变体。共影印了 20000 个 *Kan^r* 转导子, 获得 6 株 *add::MudJ*。这 6 株突变体的生长需要和 *MudJ* 的插入方向列于表 2。

为证实上述突变体确是腺苷脱氨酶缺陷株, 进行了腺苷脱氨酶活性测定。结果表明,

6株突变体均无可检测到的酶活性(数据未列出)。其中4株在 X-gal 平板上生长呈蓝色,表明在这些突变体中, *add* 结构基因与 MudJ 中的 *lacZ* 有相同的转录方向。这些突变体为开展 *add* 基因表达调控研究提供了材料。

表 2 *add::MudJ* 的生长需要和 MudJ 的插入方向

Table 2 Growth requirement of *add::MudJ* and insertion orientation of MudJ

| 菌株 Strain | 在选择培养基上的生长 Growth on the selected medium | | 在 X-gal 平板上 的菌落颜色 Colonies color on the X-gal medium |
|--------------|--|---|---|
| | E培养基含组氨酸、卡那霉 素和腺苷 E medium with His Kan and Ado | E培养基含组氨酸、卡那霉 素和肌苷 E medium with His Kan and HR | |
| TGA01 | + | + | 白色 white |
| TGA02 | - | + | 蓝色 blue |
| TGA03 | - | + | 蓝色 blue |
| TGA04 | - | + | 蓝色 blue |
| TGA05 | - | + | 白色 white |
| TGA06 | - | + | 白色 white |
| TGA07 | - | + | 蓝色 blue |

(二) *add::MudJ* 的遗传定位

大肠杆菌 *add* 基因位于染色体遗传图 36 分钟,与 *purR* 有一定的连锁关系^[9]。鉴于鼠伤寒沙门氏菌与大肠杆菌有很高的同源性,鼠伤寒沙门氏菌 *add* 基因定位首先从测试它与鼠伤寒沙门氏菌嘌呤调节基因 *purR*^[10] 的连锁开始。为便于共转导标记的选择和检测,以 *add::MudJ* 的 P22 制备物为供体,以 *purR::Tn10d-tet* 为受体作转导,选择 Kan^r 转导子,检测 Tet^r 以计算 Kan^r 和 Tet^r 间的共转导频率。已证明 Kan^r 和 Tet^r 分别与 *add* 和 *purR* 100% 连锁(数据未列出),因此可用 Kan^r 和 Tet^r 间的共转导频率表示 *add* 和 *purR* 这两个基因间的连锁频率。

由于用 MudJ 诱变分离 *add::MudJ* 突变体时有可能发生双拷贝 MudJ 的插入,因此必须先证明供体基因组只有一拷贝 MudJ,且插在 *add* 基因。为此作了以下实验:

表 3 *add::MudJ* 和 *purR::Tn10d-tet* 间的共转导

Table 3 Cotransduction between *add::MudJ* and *purR::Tn10d-tet*

| 受体 Recipient | 供体稀释倍数 Diluted time of donor | 观察 Tet ^r 菌落数 Observed number of Tet ^r colonies | Kan ^r 菌落数 Number of Kan ^r colonies | 共转导频率(%) Cotransduction Freq. (%) |
|-----------------|------------------------------------|--|--|---|
| TGA02 | 1:100 | 200 | 1 | 1 |
| TGA03 | 1:100 | 200 | 3 | 3 |

以 LT2 (野生型)制备的 P22 裂解物作供体分别转导 6 株 *add::MudJ*, 在含 Ado + His 的 E 培养基平板上选择 Add⁺ 转导子,并各取 100 个影印到 LB + Kan 平板上检测是否均为 Kan^r。结果表明,在 LB + Kan 平板上,这些转导子无一生长,说明在 6 个 *add::MudJ* 突变体中都只有一拷贝 MudJ,且插在 *add* 基因。以含 *purR::Tn10d-tet* 的 TT12890 的 P22 裂解物为供体,任选 2 株 *add::MudJ* 为受体进行共转导,结果列

于表 3。

由表 3 可见, *add* 与 *purR* 间存在着一定的共转导频率。为排除双片段转导的可能性, 我们将供体作进一步稀释, 同时用已知与 *purR* 有不同连锁频率的 *Tn10d-tet* 插入物作供体进行转导。表 4 列出的结果进一步证明了 *add* 与 *purR* 间的确存在着频率很低的连锁关系。这是迄今所知与鼠伤寒沙门氏菌嘌呤生物合成调节基因 *purR* 有共转导的唯一嘌呤基因。已有的实验证明, TT12348、TT12350 和 TT12352 的 *Tn10d-tet* 插在 *purR* 的外侧(30' 处, 未发表结果), 可以推测 *add* 也可能位于 *purR* 的外侧。这一推测得到下面实验的有力支持。基因 *pml* (编码甘露醇利用的结构基因) 位于染色体遗传图 31.5', 如果 *add* 的确位于 *purR* 外侧, 那么 *add* 与 *pml* 应有一定的共转导频

表 4 *add* 和与 *purR* 连锁的 *Tn10d-tet* 插入物的共转导

Table 4 Cotransduction between *add* and *Tn10d-tet* insertions linked to *purR*

| 供体 Donor | 供体与 <i>purR</i> 的共转导频率(%) Cotransduction Freq. of donor and <i>purR</i> (%) | 供体稀释倍数 Diluted time of donor | Kan ^r /Tet ^r | 共转导频率(%) Cotransduction Freq. (%) |
|-------------|---|------------------------------------|------------------------------------|---|
| TT12348 | 95 | 1:100 | 1/100 | 1 |
| | | 1:500 | 2/100 | 2 |
| | | 1:2000 | 1/100 | 1 |
| TT12350 | 34 | 1:500 | 37/100 | 37 |
| TT12352 | 10 | 1:500 | 57/100 | 57 |

率。以 TGA02 为供体, TT1025 (*pml::MudA*) 为受体作转导, 在 LB + Kan 平板上选择 Kan^r 转导子, 并挑取 100 个转导子检测它们对甘露醇的利用。表 5 结果证明 *add* 的确位于 *purR* 的外侧, 因它与 *pml* 的共转导频率显著高于与 *purR* 的共转导频率 (~74% 和 ~1% 之比)。但以上的实验数据仍不足以定出 *add* 在遗传图上的位置, 即 *add* 位于 *pml* 的外侧还是内侧。为此在 *pml*、TT12352 的 *Tn10d-tet* 和 *add* 间进行了三点杂交试验。先通过转导将 TT12352 中的 *xxx1900::Tn10d-tet* 引入 TAG02, 并制备 P22 裂解物, 以此为供体对 TT1025 作转导, 选择 Tet^r 转导子。随机挑取 100 个 Tet^r 转导子复印于 LB/Kan 和 NCE/Man 平板, 分别检测 Kan^r 和甘露醇利用(Man⁺), 结果列于表 6。

表 5 *add* 与 *pml* 的共转导

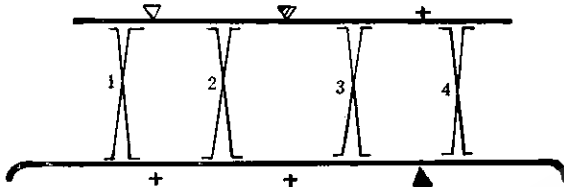
Table 5 Cotransduction between *add* and *pml*

| 实验次数 Exp. no. | 转导子菌落数 Transductant number LB/Kan NCE/Man | | 共转导频率(%) Cotransductant Freq. (%) |
|------------------|---|----|---|
| 1 | 100 | 78 | 78 |
| 2 | 100 | 74 | 74 |

从表 6 可见, 表型为 Kan^rMan⁺ 的转导子数为 0, 这一结果只有当 *add* 位于 *pml* 和 *xxx1900::Tn10d-tet* 之间才能发生。如图 1 所示, 要获得上述表型的转导子需发生 4 次交换(即交换 1、2、3 和 4)才能实现。因此可以得出结论, *add* 位于 *pml* 和与 *purR* 连锁的 *xxx1900::Tn10d-tet* 插入物之间, 在遗传图上的基因顺序为 *pml* (31.5')-*add*-*xxx*

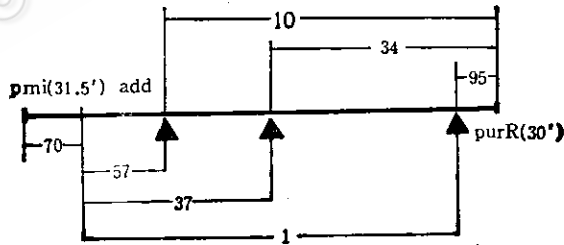
表 6 *add*, *pmi* 和 *zxx1900::Tn10d-tet* 间的三点杂交Table 6 Three point cross between *add*, *pmi* and *zxx1900::Tn10d-tet*

| 转导子表型 Phenotype of transductants | 转导子数 Number of transductants | | | |
|--|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 实验 1 Exp. 1 | 实验 2 Exp. 2 | 实验 3 Exp. 3 | 实验 4 Exp. 4 |
| Kan ⁺ Man ⁻ | 68 | 64 | 66 | 68 |
| Kan ⁺ Man ⁺ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kan ⁻ Man ⁻ | 12 | 14 | 16 | 12 |
| Kan ⁻ Man ⁺ | 20 | 22 | 18 | 20 |

图 1 *add*, *pmi* 和 *Tn10d-tet* 插入物的三点杂交模式Fig. 1 Diagram of three point cross of *add*, *pmi* and *Tn10d-tet* insertion▽表示 *Tn10d-tet* 插入物 Represent *Tn10d-tet* insertion;▽表示 *add::MudJ* 插入物 Represent *add::MudJ* insertions;▲表示 *pmi::MudA* 插入物 Represent *pmi::MudA* insertions;

+表示野生型基因 Represent wild genotype;

数字1、2、3和4表示供体和受体染色体间的交换 Figure represent cross over between donor and recipient chromosome

1900*Tn10d-tet-purR*(30')(图 2)。图 2 *add* 基因的遗传图Fig. 2 Genetic map of *add* gene▲表示 *Tn10d-tet* 插入物 Represent *Tn10d-tet* insertions;

数字表示共转导频率,代表基因间的距离 Figures are cotransduction frequency and represent the distance of genes

参 考 文 献

- [1] Neuhaard, J. et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology (ed. Neidhardt, F. C.), p. 445—473, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988.
- [2] Nygaard, R.: Molecular and Cellular Regulation of Enzyme Activity (ed. Barth, A. et al.), p. 96—125, German Democratic Republic, 1984.

- [3] Vogel, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 213: 97—106, 1956.
- [4] Davis, R. W. et al.: *A Manual for Genetic Engineering. Advanced Bacterial Genetics*, p. 203, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1980.
- [5] Castilho, B. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 158: 488—495, 1984.
- [6] Maloy, S. R. *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*, p. 22, Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1990.
- [7] Schmeiger, H.: *Mol. Gen. Genet.*, 119: 75—88, 1972.
- [8] Karlstrom, O.: *J. Bacteriol.*, 95: 1069—1077, 1968.
- [9] Kilstrup, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 171: 2124—2127, 1989.
- [10] Sanderson, K. E. and J. R. Roth: *Microbiological Review*, p. 500, 1988.

REGULATION OF PURINE BIOSYNTHESIS

I. ISOLATION OF *add::MudJ (lacZ, Kan^r)* INSERTIONS AND GENETIC MAPPING

Wang Aoquan Chen Xiuzhu Dai Xiuyu Tang Guomin

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Report here is the isolation of adenosine deaminase deficient mutants and genetic mapping. Engineering transposon *MudJ (lacZ, Kan^r)* was used for mutagenesis and six *add::MudJ* were obtained among 20 000 *Kan^r* transductants. Adenosine deaminase activity of these mutants were assayed and all are negative. Cotransduction analysis of *add::MudJ* indicated that *add* is 70% linked to *pmi*(31') and 37% linked to *zxx1900::Tn10d-tet* insertion which is 10% linked to *purR*(30'). Three points cross showed that *add* is located between *pmi* and *Tn10d-tet* insertion. Therefore the gene order is *purR-zxx1900::Tn10d-tet-add-pmi*.

Key words *Salmonella typhimurium*; Adenosine deaminase deficient mutant; Genetic mapping; Engineering transposon