

## 粘球菌基因功能和表达情况分析质粒 pZCY11 的构建及其应用

张翠英, 蔡轲, 潘宏伟, 刘红, 李越中\*

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要:**【目的】旨在构建一个用于粘球菌基因插入失活、同时可通过报告基因分析插入位点基因表达情况的质粒载体,并应用该质粒对黄色粘球菌 *MXANI334* 基因功能和表达情况进行分析。【方法】通过 PCR、酶切和连接等方法构建质粒载体 pZCY11。从黄色粘球菌 DK1622 基因组上 PCR 扩增 *MXANI334* 基因内部部分片段,插入载体 pZCY11 上 *lacZ* 基因的上游,构建重组质粒 pZCY13,将其转入 DK1622 菌株,获得 *MXANI334* 基因插入失活突变株 ZC16-18。【结果】基因功能和表达情况分析质粒载体 pZCY11 含有抗性标记基因 *aph*、自杀性质粒复制子 *OriR6K* 和无启动子的报告基因 *lacZ*。突变株 ZC16-18 在 CTT 软硬琼脂平板上菌落扩展结果显示,*MXANI334* 基因插入失活会造成黄色粘球菌 S 运动能力缺陷。通过 X-gal 检测突变株 ZC16-18 中  $\beta$ -半乳糖苷酶酶活,实验结果显示,含有 X-gal 的平板上培养的 ZC16-18 菌落呈现蓝色,表明 *MXANI334* 基因能够表达;颜色呈现的时间分析结果显示,*MXANI334* 基因表达时间较早。【结论】构建的质粒载体 pZCY11 不仅能够对目的基因进行功能的分析,而且能够同时通过报告基因分析基因的表达情况,可简化粘球菌中基因功能及表达情况的研究。

**关键词:** 黄色粘球菌;插入突变;基因表达;*lacZ*;运动相关基因

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0029-07

粘细菌是一类革兰氏阴性细菌,能够滑动运动<sup>[1-2]</sup>。在营养贫乏的条件下,粘细菌表现为细胞间互相协作的复杂的形态发生过程:在固体表面上菌落中的营养细胞通过滑动运动,聚集形成多细胞的子实体 (fruiting body) 结构;在子实体中,营养细胞发育形成休眠性的粘孢子<sup>[3-5]</sup>。以模式菌黄色粘球菌的研究表明,粘细菌的运动由两个不同的运动调控系统控制:A (adventurous) 运动系统,调控个体或小的群体细胞运动;S (social) 运动系统,主要在细胞聚集、子实体形成和大菌落的运动中起作用<sup>[6-7]</sup>。

原核生物中粘细菌因其滑动运动和子实体发育而被认为是非常特殊的群体,也是细菌细胞群体行为研究的良好材料。目前,以黄色粘球菌 DK1622

为模式材料,已确定了许多粘细菌运动和发育相关的基因座<sup>[6-11]</sup>。近年来,对其他种属粘细菌,如纤维堆囊菌和海洋耐盐橙色粘球菌的运动基因也开始报道<sup>[12-13]</sup>。在非模式粘细菌中发现运动和发育相关基因后,分析其在模式菌黄色粘球菌中同源基因的功能和表达情况是非常必要的。同时,随着大规模基因组的测序和生物信息学的发展,预测的基因功能和表达情况也需实验进行验证。因而在粘细菌中建立一种有效且简单的基因功能和表达情况分析系统对粘细菌运动和发育相关基因的研究非常重要。质粒载体的构建是建立该系统的关键,质粒能够通过自身的复制子在合适的宿主中进行自主复制,而不与宿主染色体发生重组;为了保证带

基金项目:国家自然科学基金(30671192,30600007);国家“863 计划”(2007AA021500)

\* 通信作者。Tel: +86-531-88564288; Fax: +86-531-88564288; E-mail: lilab@sdu.edu.cn

作者简介:张翠英(1979-),女(满),河北人,讲师,博士研究生,从事发酵工程、微生物分子遗传学教学及研究。E-mail: cyzhangcy@tust.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期:2009-08-24;修回日期:2009-09-30

有同源臂的质粒整合到宿主染色体上,采用自杀性质粒复制子是解决问题的良好途径。*OriR6K* 是一种自杀性质粒复制子,只有在含有 *pir* 基因的菌株中,质粒才能进行自主复制;在不含有 *pir* 基因的菌株中,质粒必须整合到宿主染色体上才能存活,否则将随着宿主细胞的生长繁殖而丢失<sup>[14]</sup>。

在我们前期实验中,发现海洋耐盐橙色粘球菌 HW-1 的运动和发育相关新基因簇 *mts* (*mtsA* - *mtsF*), *mtsC* 基因的插入失活使突变株运动能力和子实体形成能力缺陷<sup>[13]</sup>。*mtsC* 基因与黄色粘球菌 DK1622 中的 *MXANI334* 基因同源, DNA 序列同源比对比分析结果显示 *MXANI334* 与 *mtsC* 基因的一致性达 91%<sup>[13]</sup>,因而有必要对这 2 个同源基因的功能进行比较。橙色粘球菌 HW-1 的分子遗传操作非常困难,虽然我们做了大量的工作,但一直没有获得 *mtsC* 基因缺失突变株<sup>[13]</sup>,因此为了提高可比性,构建黄色粘球菌 DK1622 的插入失活突变株非常重要。本文构建了一个能够用于同时分析基因功能和基因表达情况的质粒载体,并应用该质粒对黄色粘球菌 DK1622 中的 *MXANI334* 基因进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**黄色粘球菌 *Myxococcus xanthus* DK1622 菌株由美国斯坦福大学 D. Kaiser 教授惠赠,大肠杆菌 Top10 由本实验室保存。质粒 pSL1180 购于 Pharmacia Biotech 公司, pMiniHimar1-*lacZ* 由美国德克萨斯大学 H. B. Kaplan 教授惠赠, ColE1 由本实验室保存。

**1.1.2 酶和试剂盒:**限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司或 Fermentas 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均购于 Omega biotek 公司。

### 1.2 培养基与 DNA 操作技术

培养大肠杆菌用 LB 培养基,培养粘球菌用 CTT 培养基,使用前根据需要添加抗生素卡那霉素,终浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用 CTAB/NaCl 的方法提取粘细菌染色体 DNA<sup>[15]</sup>。质粒 DNA 的提取、纯化按试剂盒说明书操作。

### 1.3 质粒的构建

根据质粒 ColE1 DNA 序列设计扩增 Kan<sup>r</sup> 基因的引物 Km-up 和 Km-down。Km-up: 5'-GCTGACCCCGGGTGAATGTCAG-3', Km-down: 5'-

ATCGAGCCCGGGGTGGGCGAAGA A-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Sma*I 识别位点)。

以质粒 ColE1 DNA 为模板, Km-up 和 Km-down 为引物扩增 Kan<sup>r</sup> 基因片段,经 *Sma*I 酶切后连入 pSL1180 质粒的 *Sma*I 酶切位点,构建 pSL1180-km 质粒。*Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切 pSL1180-km 质粒,切胶回收带有 Kan<sup>r</sup> 基因的片段 km-MCS; *Kpn*I 酶切质粒 pMiniHimar1-*lacZ*,切胶回收带有 *lacZ* 和质粒复制子的片段 *lacZ*-R6K,平末端化后与平末端化的 km-MCS 片段连接,构建质粒 pZCY11。

根据黄色粘球菌 DK1622 基因组序列设计引物 DKIS-S2 和 DKIS-A2。DKIS-S2: 5'-ACTAGTCCGCTGACTACGAGCGGGTGA-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Spe*I 识别位点), DKIS-A2: 5'-GTCGACGCCCTGTCGCTCCATCAGATCCAAC-3' (下划线部分为限制性内切酶 *Kpn*I 识别位点)。

以 DK1622 染色体 DNA 为模板, DKIS-S2 和 DKIS-A2 为引物,扩增部分 *MXANI334* 基因片段,经 *Spe*I 和 *Kpn*I 双酶切后,连入 *Spe*I 和 *Kpn*I 双酶切的质粒 pZCY11 上,构建同源重组质粒 pZCY13。

### 1.4 粘球菌电转化方法

通过电转化将质粒转入粘球菌细胞<sup>[16]</sup>,方法如下:粘球菌 DK1622 于 CTT 液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 培养至细胞浓度为  $5 \times 10^8$  cell/mL, 室温 10000  $\times g$  离心 2 min 收集菌体细胞, 1 倍体积的灭菌 dd H<sub>2</sub>O 洗涤 3 次, 最后重悬于 0.01 倍体积的灭菌 dd H<sub>2</sub>O 中, 置于冰上。与质粒混合, 转入电转化杯, 于 0.65 kV、400  $\Omega$ 、25  $\mu\text{F}$  条件下电击。电击后的菌液立即用 30 $^{\circ}\text{C}$  预热的 CTT 液体冲出, 于 2.5 mL CTT 液体中恢复培养 4-6 h。恢复培养后的菌液与 CTT 半固体混合倒 CTT(Km 40) 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 6-7 d。

### 1.5 运动能力的检测

用 CTT 固体和半固体平板检测细胞的运动能力。在含有 1.5% 琼脂的固体平板上, 细胞主要表现为 A 运动; 在含有 0.3% 琼脂的半固体平板上, 细胞主要表现为 S 运动<sup>[17]</sup>。为了检测细胞运动能力, 取 2  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^9$  cells/mL 的细胞悬液, 点接在 CTT 平板上, 于 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 5 天后测量菌落直径 (菌落初始直径约为 0.2 cm)。

### 1.6 X-gal 平板显色实验

转接菌株于 VY/2 或 VY/2(Km 40) 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d 后, 接种于含有 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-gal (X-Gal 40) 的 VY/2 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养观察, 5 d 后拍照。

## 2 结果

### 2.1 基因功能和表达情况分析质粒 pZCY11 的构建

构建质粒 pZCY11, 用于粘球菌基因插入失活, 并同时可通过报告基因分析插入位点基因表达情

况, 其构建流程如图 1 所示. *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切质粒 pSL1180-km 后, 切胶回收 km-MCS 片段; *KpnI* 酶切质粒 pMiniHimar1-*lacZ* 后, 切胶回收 *lacZ*-R6K 片段. 从琼脂糖凝胶电泳结果 (图 2) 可以看出, 获得的 1.5 kb km-MCS 片段和 4.6 kb *lacZ*-R6K 片段条带单一, 回收效果良好. 将这两个片段平末

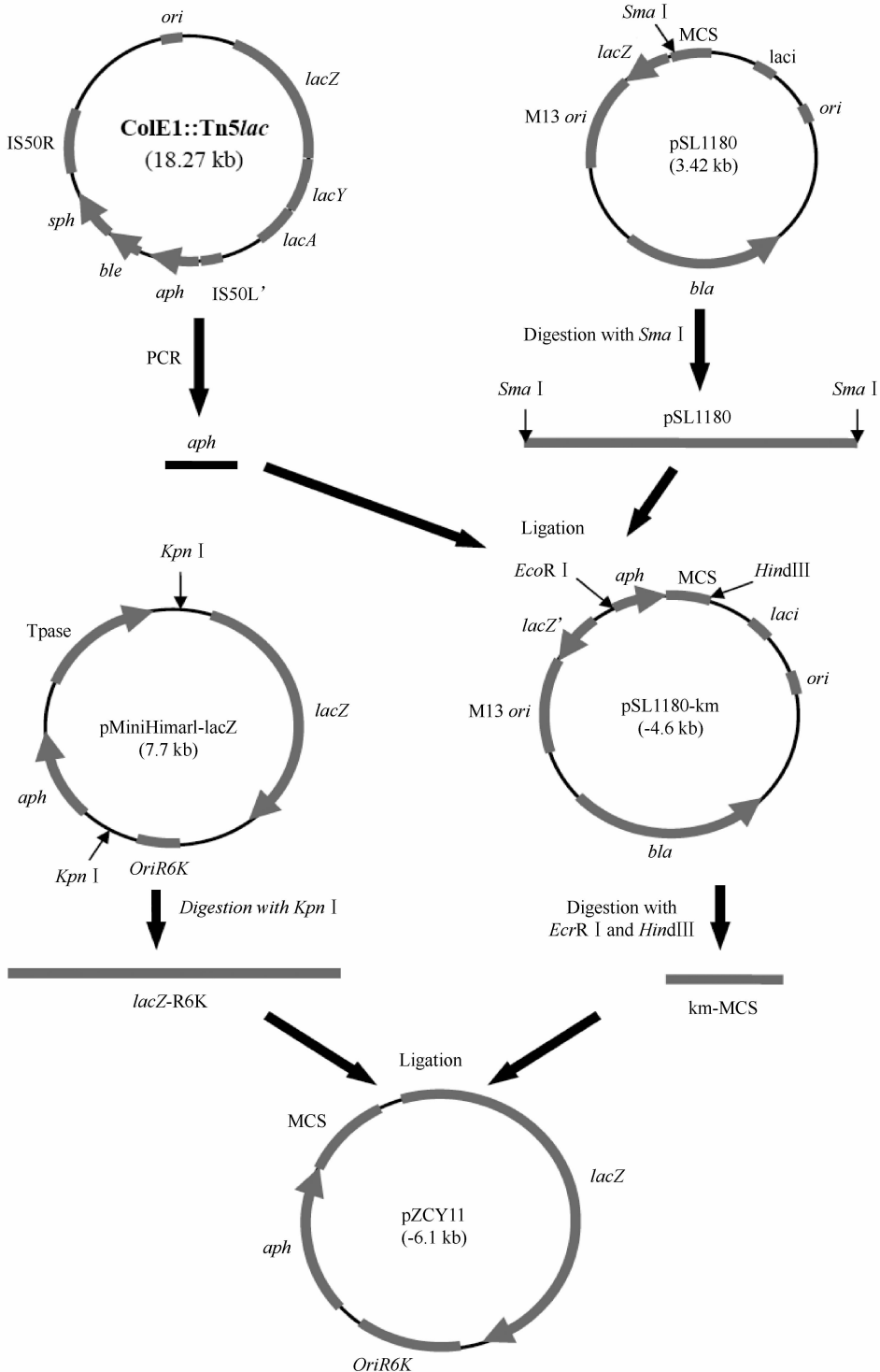


图 1 质粒 pZCY11 的构建

端化后连接,获得质粒载体 pZCY11, *KpnI* 酶切后获得单一片段,且与预测的片断大小 6.1 kb 一致, *SacII* 酶切后获得 3.7 kb 和 2.4 kb 片段(图 2),证明两片段连接方向与目的方向一致(如果方向相反,则获得 5.3 kb 和 0.8 kb 片段)。

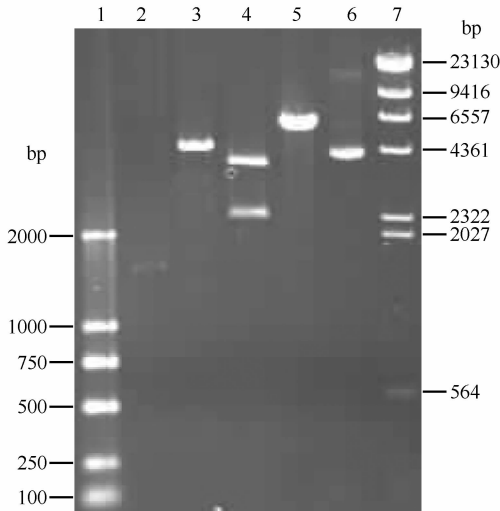


图 2 质粒 pZCY11 及其酶切分析

Fig.2 Restriction endonuclease analysis of the plasmid pZCY11. 1. DL2000; 2. km-MCS; 3. *lacZ*-R6K; 4. pZCY11/*SacII*; 5. pZCY11/*KpnI*; 6. pZCY11; 7.  $\lambda$ /*Hind III*.

## 2.2 同源重组质粒 pZCY13 的构建

以 DK1622 基因组为模板, PCR 扩增 *MXANI334* 基因保守区片段 *MXANI334'*, 琼脂糖凝胶电泳结果(图 3)显示, PCR 扩增的 986 bp *MXANI334'* 片段条带单一, 扩增良好。 *MXANI334'* 片段经 *SpeI* 和 *KpnI* 双酶切后连入载体 pZCY11, 获得同源重组质粒 pZCY13。如图 3 所示, 用 *KpnI* 酶切质粒 pZCY13, 获得了与预测大小一致的 7.1 kb 片段; *KpnI* 和 *SpeI* 双酶切后将同源臂片段切下, 获得的 6.1 kb 片段为载体 pZCY11, 与单酶切的 pZCY11 载体大小一致, 1 kb 片段为同源臂片段 *MXANI334'*, 与 PCR 从质粒 pZCY13 及 DK1622 基因组上扩增片段大小一致。这些结果充分证明同源重组质粒 pZCY13 构建成功。

## 2.3 突变株 ZC16-18 的构建

将构建好的质粒 pZCY13 电转化入 DK1622 细胞, 通过一次同源重组将质粒整合到 DK1622 基因组的 ORF *MXANI334* 上。经 Km 抗性筛选、菌株纯化后, 获得 DK1622 的 *MXANI334* 表达分析突变株 ZC16-18。对突变株 ZC16-18 的 *aph* 和 *lacZ* 基因片段进行了 PCR 分子验证, 琼脂糖凝胶电泳结果(图 4)显示, 在 DK1622 菌株中不能扩增到特异性片段,

在 ZC16-18 菌株中扩增到的特异性片段均与阳性对照一致, 证明质粒 pZCY13 已插入到 ZC16-18 染色

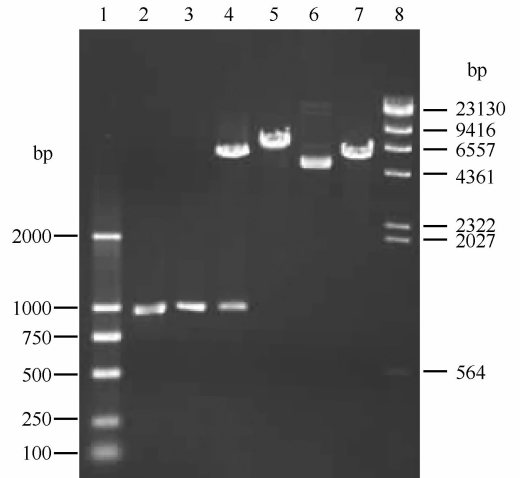


图 3 同源臂 *MXANI334'* DNA 片段的 PCR 扩增和同源重组质粒 pZCY13 的酶切分析及 PCR 验证

Fig. 3 PCR amplified products of the homologous fragment *MXANI334'*, restriction endonuclease analysis and PCR confirmation of the recombinant plasmid pZCY13. 1. DL2000; 2. PCR amplified product of the homologous fragment *MXANI334'* with genomic DNA from DK1622 as the template; 3. PCR amplified product of *MXANI334'* with plasmid pZCY13 as the template; 4. pZCY13/*KpnI/SpeI*; 5. pZCY13/*KpnI*; 6. pZCY13; 7. pZCY11/*KpnI*; 8.  $\lambda$ /*Hind III*.



图 4 *MXANI334* 插入失活突变株 ZC16-18 的 PCR 验证

Fig. 4 PCR confirmation of the mutant ZC16-18 ( $\Delta$ *MXANI334*). 1. DL2000; 2. PCR amplified product of *lacZ* with ddH<sub>2</sub>O as the template; 3. PCR amplified product of *lacZ* with genomic DNA from DK1622 as the template; 4. PCR amplified product of *lacZ* with plasmid pZCY13 as the template; 5. PCR amplified product of *lacZ* with genomic DNA from ZC16-18 as the template; 6. PCR amplified product of *km* with ddH<sub>2</sub>O as the template; 7. PCR amplified product of *km* with genomic DNA from DK1622 as the template; 8. PCR amplified product of *km* with plasmid pZCY13 as the template; 9. PCR amplified product of *km* with genomic DNA from ZC16-18 as the template; 10. PCR amplified product of *MXANI334-lacZ* with ddH<sub>2</sub>O as the template; 11. PCR amplified product of *MXANI334-lacZ* with genomic DNA from DK1622 as the template; 12. PCR amplified product of *MXANI334-lacZ* with genomic DNA from ZC16-18 as the template; 13.  $\lambda$ /*Hind III*.

体上。利用分别来源于 DK1622 染色体和质粒 pZCY13 上的引物进行 PCR 扩增,只能在 ZC16-18 菌株中获得特异性 DNA 片段(图 4),且大小与预测结果一致,证明 *lacZ* 基因正确地插入到 *MXAN1334* 基因中。

#### 2.4 黄色粘球菌中 *MXAN1334* 基因功能的分析

用 CTT 软硬琼脂平板分析 *MXAN1334* 插入失活突变株 ZC16-18 的运动能力。如图 5 所示,在 1.5% 和 0.3% 琼脂浓度 CTT 平板上,突变株 ZC16-18 的菌落扩展面积分别为野生菌株 DK1622 菌落扩展面积的 82.1% 和 92.5%,且在 0.3% 琼脂浓度平板上,ZC16-18 菌落边缘呈锯齿状。这些结果充分证明 *MXAN1334* 基因插入失活会造成黄色粘球菌 S 运动能力缺陷,*MXAN1334* 基因可能参与粘球菌的滑动运动。

#### 2.5 黄色粘球菌中 *MXAN1334* 基因表达情况的分析

通过 X-gal 平板检测 ZC16-18 菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶酶活。从图 6 可以看出,突变株 ZC16-18 菌落显现较深的蓝色,这说明该菌株具有  $\beta$ -半乳糖苷酶酶活。而 DK1622 本身不编码  $\beta$ -半乳糖苷酶,在 X-gal 平板上不显蓝色(图 6)。在突变株 ZC16-18 染色体上插入的报告基因 *lacZ* 没有启动子,通过与 *MXAN1334* 基因共转录而表达,产生  $\beta$ -半乳糖苷酶,降解 X-Gal 产生蓝色,因此在某种程度上,*lacZ* 基因的表达情况直接反映了 *lacZ* 基因插入位点突变基因的表达情况。菌株 ZC16-18 菌落呈现蓝色表明 *MXAN1334* 基因能够表达;且观察结果显示,突变株 ZC16-18 在 X-gal 平板上仅培养 0.5 h 后,菌落就呈现蓝色,这反映了 *MXAN1334* 基因表达时间较早。

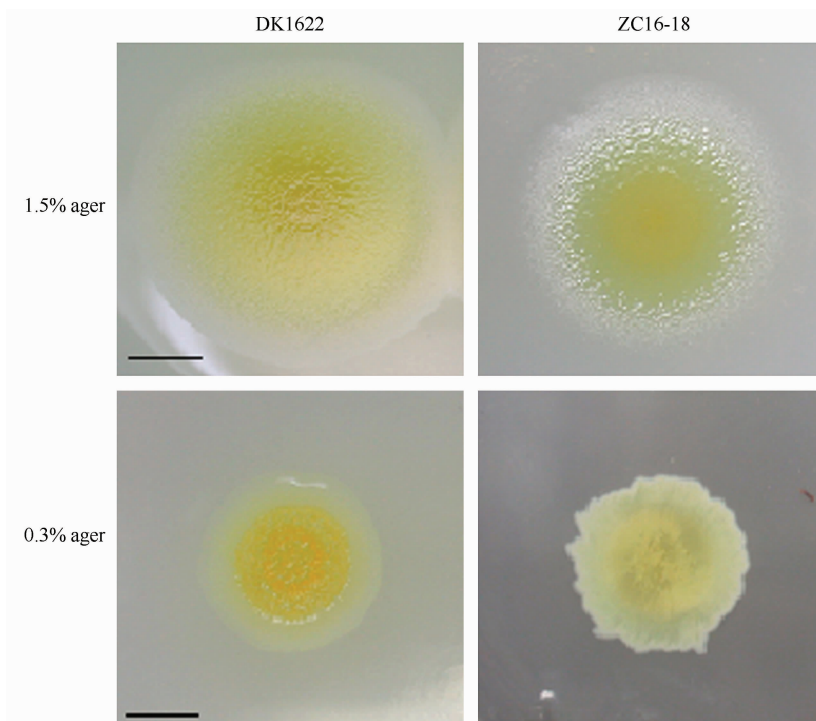


图 5 *MXAN1334* 插入失活突变株 ZC16-18 和野生型菌株 DK1622 的运动能力

Fig. 5 Gliding motility of the mutant ZC16-18 ( $\Delta$ *MXAN1334*) and the wild-type strain DK1622. Colony expansions were on CTT medium with 0.3% and 1.5% agar for 5 days. Bars = 1.4 cm.

### 3 讨论

细菌特定基因功能分析方法中,与基因缺失、免疫荧光技术和微阵列技术等相比,基因插入失活是最简单且行之有效的办法。通常只需要扩增目的基因内部一小段保守区,连入特定载体后,转入出发菌株中通过一次抗性筛选就可获得目的突变株。其中,特定载体的构建是基因插入失活方法成功的关键之一。

本文构建了应用于粘球菌基因插入失活的质粒载体 pZCY11,该载体包含抗性基因 *aph*,无论是在大肠杆菌中,还是在粘球菌中,抗性基因 *aph* 均能够正常表达,卡那霉素抗性可作为筛选标记。质粒载体 pZCY11 的复制子为 *OriR6K*,该复制子为自杀性复制子,只有在含有 *pir* 基因的菌株中,质粒才能进行自主复制,存活于染色体之外<sup>[14]</sup>;而粘球菌菌株一般都不含有 *pir* 基因,因此确保经过卡那霉素抗性筛选获得的突变株为插入失活突变株,即重组

质粒整合到突变株染色体上。在质粒 pZCY11 的构建中,除抗性基因 *aph* 和自杀性质粒复制子 *OriR6K* 的精巧设计外,我们还将无启动子的报告基因 *lacZ* 整合于该质粒载体的多克隆位点下游,使其不仅能够对目的基因进行功能的分析,而且能够同时研究基因的表达情况。通过应用质粒载体 pZCY11,成功构建了黄色粘球菌突变株 ZC16-18 (*MXANI334* 基因插入失活突变株),通过对突变株 ZC16-18 运动能力的分析证明 *MXANI334* 基因插入失活会造成黄色粘球菌 S 运动能力缺陷;同时利用整合于 *MXANI334* 基因内部的报告基因 *lacZ* 对 *MXANI334* 基因表达情况进行了分析,研究结果显示 *MXANI334* 基因能够表达,且表达时间较早。

由于原核生物染色体中操纵子的存在,很多原核生物的基因与上下游相邻基因是共转录的,在基因功能研究中,插入失活方法可能会引起极性效应,使位于同一操纵子中的下游基因转录失常。因而利用本文建立的系统进行粘球菌基因功能分析,在获得基因插入失活突变株表型改变后,还需要利用其它更精细

的方法如基因缺失或遗传互补分析对基因功能进行验证。另外,原核生物中基因的转录和翻译是耦连的,一般而言,基因被插入失活后会使其转录及翻译过程失常,在这种情况下,通过基因 3'端融和报告基因来检测其转录水平不一定能够反映基因真实的表达情况,因而利用本文建立的系统能够对粘球菌基因的表达情况进行定性分析。

在前期实验中,我们曾报道在 1.5% 和 0.3% 琼脂浓度 CTT 平板上,与野生橙色粘球菌 HW-1 相比,其 *mtsC* (*MXANI334* 同源基因)插入失活突变株 HL-1 菌落扩展分别降低了 90.4% 和 84.2%<sup>[13]</sup>,显然,远远高于本文构建的 *MXANI334* 插入失活突变株 ZC16-18 菌落扩展面积的降低程度(分别为 17.9% 和 7.5%)。这些结果显示,*MXANI334* 的插入失活对黄色粘球菌 DK1622 运动能力的影响远低于 *mtsC* 插入失活对 HW-1 运动能力的影响,证明与 *MXANI334* 在黄色粘球菌 DK1622 运动过程中发挥的作用相比,*mtsC* 基因在海洋耐盐粘球菌 HW-1 运动过程中可能发挥更重要的作用。

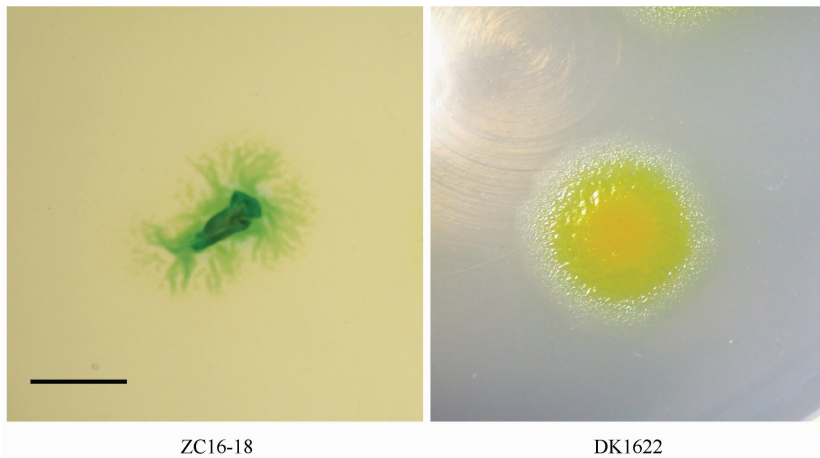


图 6 *MXANI334* 基因表达情况分析

Fig. 6 Expression analysis of *MXANI334* gene. The mutant ZC16-18 and the wild-type strain DK1622 were inoculated on CTT (X-Gal 40) plates and incubated at 30°C for 3 days. Bar = 1.2 cm.

本文整合无启动子的报告基因 *lacZ*、抗性标记基因 *aph* 和自杀性质粒复制子 *OriR6K*,构建粘球菌质粒载体 pZCY11,不仅能够对目的基因进行功能的分析,而且能够同时研究基因的表达情况;对粘球菌基因功能和表达的研究、滑动运动和子实体发育等社会行为的深入理解,具有重要意义。

## 参考文献

[ 1 ] Shimkets L, Woese CR. A p-hylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(20): 9459-9463.

[ 2 ] Sproer C, Reichenbach H, Stackebrandt E. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(3): 1255-1262.

[ 3 ] Jelsbak L, Sogaard-Andersen L. Pattern formation: fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(6): 637-642.

[ 4 ] Kaplan HB. Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(6): 572-577.

[ 5 ] Kaiser D. Signaling in myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 75-98.

- [ 6 ] Spormann AM. Gliding motility in bacteria : insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(3) : 621-641.
- [ 7 ] Reichenbach H, Dworkin M. The myxobacteria. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, *et al* (Eds). *The Prokaryotes*, 2nd Edn, New York: Springer, 1992.
- [ 8 ] Lu A, Cho K, Black WP, *et al*. Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55 (1) : 206-220.
- [ 9 ] Pham VD, Shebelut CW, Mukherjee B, *et al*. RasA is required for *Myxococcus xanthus* development and social motility. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 ( 19 ) : 6845-6848.
- [10] Youderian P, Burke N, White DJ, *et al*. Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(2) : 555-570.
- [11] Youderian P, Hartzell PL. Transposon insertions of *magellan-4* that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics*, 2005, 172(3) : 1397-1410.
- [12] Zirkle R, Ligon JM, Molnár I. Cloning, sequence analysis and disruption of the *mglA* gene involved in swarming motility of *Sorangium cellulosum* So ce26, a producer of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97 (4) : 267-274.
- [13] Zhang CY, Cai K, Liu H, *et al*. New locus important for *Myxococcus* social motility and development. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(21) : 7937-7941.
- [14] Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria; inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, 1991, 109(1) : 137-141.
- [15] Ward MJ, Mok KC, Astling DP *et al*. An ABC transporter plays a developmental aggregation role in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (21) : 5697-5703.
- [16] Kashefi K, Hartzell PL. Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*<sup>-</sup> defect. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(3) : 483-394.
- [17] Shi W, Zusman DR. The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90 (8) : 3378-3382.

## Construction and application of plasmid pZCY11 for analyzing gene functions and expressions in *Myxococcus*

Cuiying Zhang, Ke Cai, Hongwei Pan, Hong Liu, Yuezhong Li\*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To construct a plasmid for analyzing gene functions and expressions and to study the *MXANI334* gene in *Myxococcus xanthus* with the plasmid. [ **Methods** ] We constructed the plasmid vector pZCY11, amplified *MXANI334* gene fragment from *M. xanthus* DK1622 by PCR, and inserted the fragment into a site upstream of *lacZ*, resulting in the recombinant plasmid pZCY13. The plasmid pZCY13 was transformed by electroporation to DK1622, producing a mutant ZC16-18 ( $\Delta$ *MXANI334*). [ **Results** ] The plasmid pZCY11 carried the resistance gene *aph* as the selectable marker, the replication origin of *OriR6K* and promoterless reporter gene *lacZ*. We examined the swarm expansions of ZC16-18 on CTT hard and soft agar, and the result indicated that *MXANI334* gene was probably involved in gliding motility in *M. xanthus*. In addition,  $\beta$ -galactosidase activity of ZC16-18 was detected by X-gal assay and the blue color developed was used to mark the colony growth. Time of colour showed that *MXANI334* gene was expressed in the early stage in *M. xanthus*. [ **Conclusion** ] The plasmid vector pZCY11 made it more convenient for the study on functions and the expressions of target gene in *M. xanthus*.

**Keywords:** *Myxococcus xanthus*; insertion mutagenesis; gene expression; *lacZ*; gene required for gliding motility

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 30671192, 30600007 ) and the National High Technology Research and Development Program of China ( 2007AA021500 )

\* Corresponding author. Tel.: +86-531-88564288; Fax: +86-531-88564288; E-mail: lrtab@sdu.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>

Received : 24 August 2009/Revised : 30 September 2009