

插入诱变在固氮细菌中的应用

马旅雁 何路红 闫大来 李季伦

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

现代分子生物学及生化技术的发展导致产生了一种新的诱变技术, 即定位诱变技术。所谓定位诱变就是通过对克隆得到的 DNA 片段进行插入、缺失、个别碱基替换等处理而获得我们需要的突变的过程。定位诱变与化学诱变相比目的性强, 可产生较精确的变化, 是研究蛋白结构与功能、基因调控、基因定位等有效手段。其中插入诱变较为简单、应用较广。一般来说, 用作插入的 DNA 片段必须具备三个特点: ①易插入; ②存在可选择标记; ③可阻断所插入基因的表达。在此介绍两种应用于革兰氏阴性菌的插入诱变方法: 转座子诱变和抗性基因插入诱变。

1 转座子诱变

转座子是能以转座方式进行增殖或移位的 DNA 序列。它通常在一些特定序列(被称为目标序列; target sequence)上进行插入, 这些短序列在基因组上的排列是相对随机的, 因而转座子在基因组上的排列是随机的, 它的插入导致被插入基因的突变。用于诱变的转座子

一般都是复合型转座子, 如: Tn5、Tn9、Tn10 等。这一类转座子两端为 IS 因子(插入序列), 中间携带与转座无关的基因, 通常为抗性基因^[1]。其中用的较多的是 Tn5, 它两端为 IS50 因子, 中间携带的 DNA 片段含有卡那霉素(Km)和新霉素(Nm)抗性基因(被称为 neo 基因, 编码氨基糖苷 3' 磷酸转移酶 I, 对氨基糖苷类抗生素 Km 和 Nm 都有抗性)^[2]及 B1 抗性基因(是链霉素抗性基因, 但它只在一些非肠道细菌中表达)^[3]。Tn5 具有转座频率高, 对目标序列特异性要求低, 且转座不需与细菌的基因组存在同源性等优点, 因而被广泛用于许多革兰氏阴性菌的转座子诱变。

早期人们主要是利用转座子随机转座的特性将其用于随机诱变。在这一诱变方法中, 转座子是通过特定载体转入受体菌, 在一定选择压力下迫使转座子转座而导致受体菌某些基因的突变。诱变的过程发生在受体菌内, 而不是在体外体系中。因而, 如果严格划分, 它

并不属于体外 DNA 的定位诱变而应属于化学诱变、物理诱变一样归入体内诱变范畴。但转座子随机诱变在目的菌株遗传背景不很清楚时，仍是一个产生突变的有效方法，且利用转座子进行的定位诱变与随机诱变有些关联，所以在此先介绍转座子随机诱变。

进行转座子随机诱变，首先必须选择一个合适的转座子载体。这一载体应具备两个功能：①可通过转化和接合转入受体菌；②在受体菌中不能自我复制，即必须为自杀型质粒，从而使转座子存在转座压力，且保证抗性筛选得到的接合子都为转座子整合于基因组上的。为此已构建了一系列的载体，如应用于格兰氏阴性菌随机诱变的自杀型质粒载体：pSUP101、pSUP201、pSUP301、pSUP202 等（图 1）。它们是在 pACYC184、pACYC177、

pBR325 等质粒载体上插入诱动位点（Mob-site）而获得，都具有在非肠道细菌中不能自我复制的特性^[4]。此处的诱动位点是来自 RP4 质粒 Tra 基因的 OirT（origin of transfer）区段，它是 RP4 型质粒接合转移的识别位点。当存在 RP4 型质粒或含 Tra 基因的质粒，如：帮助质粒 pRK2013 时^[5]，此片段可使其所在的非自我转移质粒通过接合发生转移^[6]。这些自杀型质粒载体中，用的较多的是 pSUP202，它是在氯霉素（Cm）与四环素（Tc）抗性基因之间插入 Mob-site 而获得。在 pSUP202 上插入 Tn5 得到用于随机诱变的质粒 pSUP2021。类似的质粒：pGS9（Tn5）、pGS18（Tn1）、pGS27（Tn9）等也被用于固氮螺菌^[7]、苜蓿根瘤菌、大豆根瘤菌^[8]等的随机诱变。

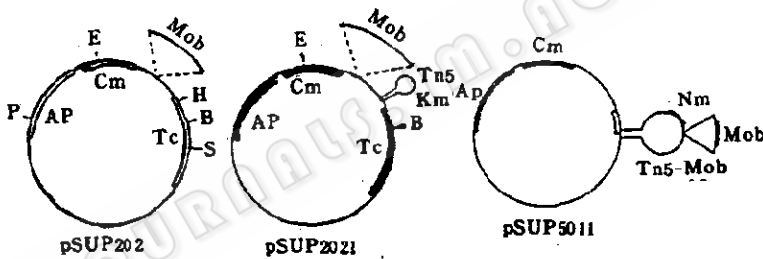


图 1 用于转座子诱变的质粒

随机诱变的具体操作较简单，只要将含有转座子的自杀型质粒转入目标菌株，然后在抗性平板上筛选突变菌株（图 2），进一步用特定方法选择和鉴定目的突变株。其中质粒通过接合引入目的菌。接合实验可选用基因组中整合有 RP4 质粒的供体菌（如：S17.1::RP4-2）^[4]，直接与目的菌杂交，或者加帮助质粒，如 pRK2013，进行三亲杂交（即含三个亲本：供体菌、受体菌和含帮助质粒的菌株）。由于载体自身不能复制，因而具 Nm 抗性的接合子只能为 Tn5 整合于基因组上的。且现已证实 Tn5 在基因组上的插入一般只有一个拷贝^[9]。因而用这种方法进行诱变不会产生多点突变，是一个

较可靠的方法。用此法已在根瘤菌和固氮菌中得到许多突变株，如 IAA、met 营养缺陷型突变株等^[7,9,10]。

在研究固氮螺菌、根瘤菌的内源大质粒时，还利用 Tn5-Mob 进行随机诱变。这里诱动位点被直接插在 Tn5 内，而不是载体质粒上（如图 1），这样当携带 Tn5-Mob 的自杀型质粒转入螺菌后，如果 Tn5 转座到其内源质粒上，则不仅使质粒具有 Km 抗性标记，而且带上了诱动位点，可在帮助质粒协助下发生接合。这是研究固氮螺菌、根瘤菌大质粒的一个有效方法。1988 年，Bally 等人就用此法对 *Azospirillum lipoferum* 的部分内源质粒进行

了标记^[11]。

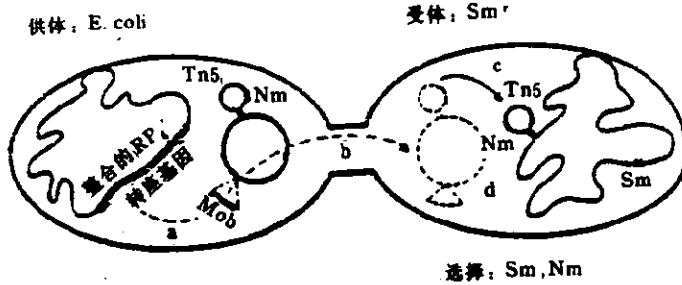


图2 转座子随机诱变示意图

随机诱变时, Tn5 是随机插到菌体的基因组上, 只有经过定向筛选才可得到所需突变株。如要获得某特定基因的突变, 则必须进行区域定位诱变。用 Tn5 进行的区域定位诱变包括以下几个步骤: ①将目的基因的同源片段克隆到自杀型质粒 pSUP202 载体上, 然后转入基因组已整合有 Tn5 的大肠杆菌 (如: S17.1::Tn5) 中进行 Tn5 诱变; ②将已诱变的质粒通过接合转入其它大肠杆菌 (如 C600、S17.1::RP4-2 等) 中。纯化质粒, 酶切分析确

定插入位点; ③将目的片段上不同位点插入 Tn5 的质粒分别经过接合转入目的菌, 然后用 Km^r 或 Nm^r 选择接合子。由于载体不能复制, Tn5 介导的 Km 或 Nm 抗性只能通过同源重组而存活。载体与受体基因组 DNA 间的单交换导致整个载体的整合, 而双交换则使目的菌野生型基因与载体的突变基因间发生交换, 从而产生所需突变株。双交换重组子可进一步通过抗性平板筛选 (如图 3)。④检测各突变子表型效应。

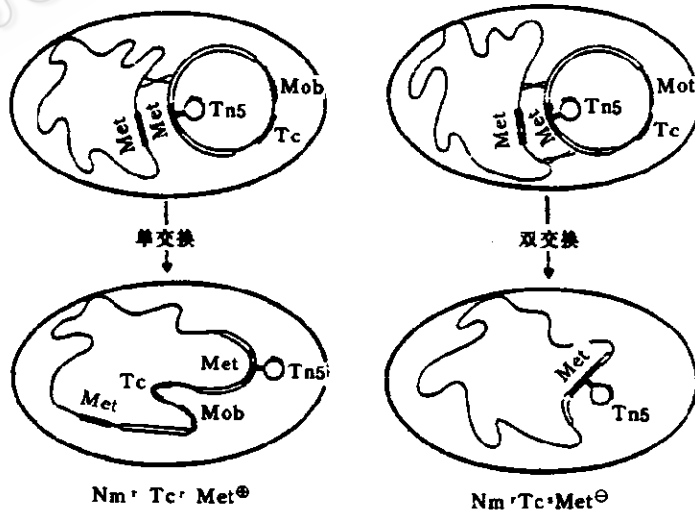


图3 Tn5 区域定位诱变示意图

有突变基因的载体与目的基因组 DNA 序列间的同源重组:
 单交换导致整个载体的整合, 产生 Nm⁺Met⁺表型。双交换使同源基因发生交换, 表现 Nm⁺Tc⁺Met⁻表型

1985年, Singh 等人^[12]就是用这一方法对 6.7kb *nifHDK* 片段(固氮酶结构基因)进行 Tn5 定位诱变, 获得巴西固氮螺菌 *A. brasilense* SP7 的 *nif*⁻ 突变株。同年, Perroud 等人^[13]亦用此法得到了 *nifHDK* 片段不同位点插入 Tn5 的一系列突变株, 检测这些突变株固氮酶表达情况, 证实了 *nifHDK* 的转录方向与肺炎克氏杆菌一致。

由以上可见, 转座子定位诱变不仅用于突变株的筛选, 也是研究基因定位、基因功能鉴定及调控的有效手段。但转座子诱变仍存在一些缺陷: ①步骤多、繁琐; ②转座子有转座到邻近 DNA 上可能性; 转座子的插入可能会引起随后 DNA 的缺失、倒位等。由于这些原因, 人们开始改用抗性基因片段替代转座子进行定位诱变。

2 抗性基因定位诱变

这一方法较 Tn5 定位诱变要简单, 它省去了在大肠杆菌中的随机诱变及鉴定的繁琐过程, 可根据 DNA 片段的物理图谱直接将抗性基因片段插入。尤其是 DNA 序列分析技术的发展, 使研究人员可先对克隆片段进行序列测定, 再在特定的 ORF (开放阅读框架: open reading frame) 或调控区内插入抗性基因片段, 然后进行定位诱变分析, 这样使研究的目的性更强, 工作量大大减少(具体流程可参见图 4) 当目的基因或 ORF 内不含有所需单一内切酶位点时, 可用 Dnase I 处理进行随机位点插入。由于抗性基因不存在转座功能, 因而使用比 Tn5 可靠。另外还可用不同的基因片段依次对同一菌株进行双重突变, 获得双重突变株, 这使突变范围大大扩展。现介绍两种抗性基因诱变方法: 卡那霉素盒诱变 (Km-Cassette) 和 Ω-诱变。

2.1 卡那霉素盒诱变

诱变的原理和 Tn5 定位诱变一致, 其具体流程如图 4。其中用于诱变的 1.2kb 卡那霉素抗性基因片段(称为 Km-cassette)从转座子 Tn903 上获得^[14]。此片段被克隆在 pUC-4k 上, 在此质粒上, Km^r 基因的两端具有反向重

复的多酶切位点, 可根据需要进行酶切, 很方便。如果需要用其它的抗性基因进行诱变时, 可将相应的抗性基因片段克隆到 pUC7、pUC8、pUC9 等质粒载体上获得类似 pUC-4k 的质粒^[15]。

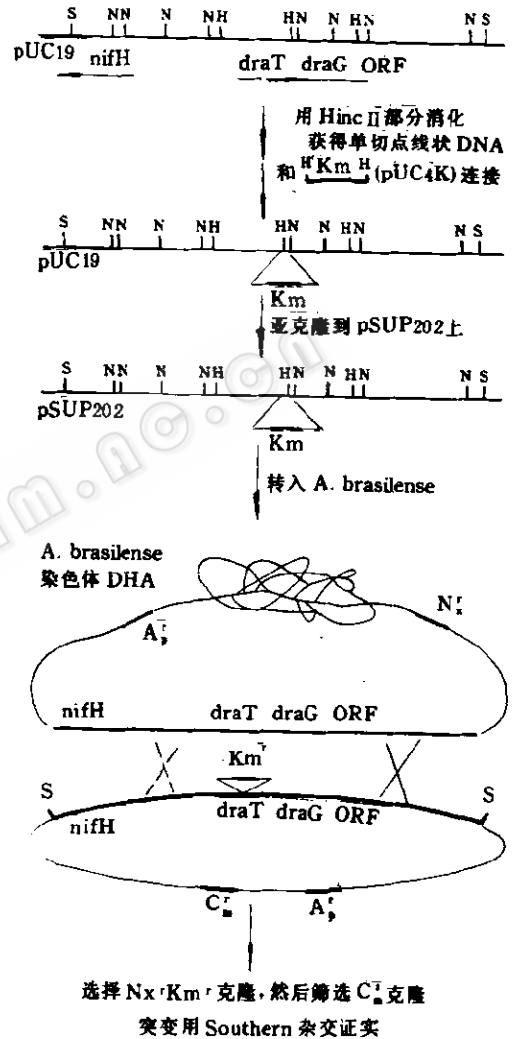


图 4 Km-Cassette 诱变示意图

近年还用 Km-lacZ 进行定位诱变, 这一片段不仅用于诱变, 还可用于检测启动子活性, 而且它避免了 Km 抗性基因片段依赖于插入方向的极性效应这一缺陷^[18], 有一定优势。

2.2 Ω-诱变

此法所用抗性基因片段是 2.0kb 的被称

为 Ω 的DNA片段,它中部区域含抗性基因(来自R100.1质粒的Sm^r/Sp^c基因),两侧以反向重复方式排列着转录和翻译的终止信号及多酶切位点。此片段被克隆到pHP45质粒上,得到pHP45 Ω 质粒^[17]。1987年,Fellary等人^[18]进一步对此片段进行改造,得到其Sm^r/sp^c片段被Ap^r、Cm^r、Tc^r、Hg^r(Hg²⁺抗性)基因片段替换的质粒pHP45 Ω -Km、pHP45 Ω -Tc、pHP45 Ω -Cm、pHP45 Ω -Hg等,从而使其应用范围进一步扩展。

由于 Ω -片段两端含有DNA转录和翻译终止信号,可使插入位点两侧的DNA和蛋白质合成终止,因而是用于极性突变的理想插入片段。当希望得到非极性突变时,也可用此片段。首先将 Ω 片段插入目的基因,然后利用两端的酶切位点,如BamHI、SmaI等将 Ω 片段切离;留下原多酶切位点中的几个碱基。载体重新连接后,目的基因中便有几个碱基的插入。为了筛选方便,可再引入抗性基因做筛选标记。1991年,Liang等人^[19]便是用这一方法获得深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)draTG基因的非极性突变。

体外DNA的定位诱变方法很多。除了以上介绍的插入诱变外,利用单链线状噬菌体进行的寡聚核苷酸介导的诱变及利用多聚酶链反应(PCR)进行的DNA序列的重组和诱变是两个较新的诱变方法,它们都能在DNA上产生精确的变化,是研究蛋白结构与功能的有效手段。因篇幅有限,在此不再做介绍。

参 考 文 献

- [1] Lewin B, Genes IV. Oxford University, Oxford, 1990, 649—668.
- [2] Berg D E, Davies J, Allet B *et al.* Proc Natl Acad sci USA, 1975, **72**: 3628—3632.
- [3] Mazodier P, Giraud B, Gasser F *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1982, **13**: 27—30.
- [4] Simon R, Priefer U, Puhler A. Bio/technology, 1983, **1**: 784—791.
- [5] Figurski D H, Helinsk D R. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, **76**: 1648—1652.
- [6] Simon R, Priefer U Puhler A. Molecular Genetic of the Bateria-Plant Interaction. Springer-verlag, Berlin Heidelberg. 1983, 98—106.
- [7] Vanstockem M, Michiels K, Vanderleyen J *et al.* Azospirillum ■. Genetic Physiology Eccology, Springer-Verlag Heidelberg. 1985: 74—84.
- [8] Selvaraj G, Iyer V N. J Bacteriol, 1983, **156**: 1291—1300.
- [9] Abdel-Salam S M, Klingmüller W. Mol Gen Genet, 1987, **210**: 165—170.
- [10] Safwat M A-S, Klingmüller W, Azospirillum N. Genetic physiology Ecology. Springer-Verlag, Heidelberg. 1988, 40—47.
- [11] Bally R, Givaudan A. Can J Microbiol, 1988, **34**: 1354—1357.
- [12] Singh M, Klingmüller W. Azospirillum ■. Genetic Physiology Eccology. Springer-Verlag Heidelberg. 1985, 20—29.
- [13] Perroud B, Bandhari S K, Elmerich C. *et al.* Azospirillum ■. Genetic Physiology Eccology. Springer-Verlag Heidelberg, 1985, 10—19.
- [14] Laura A T, Rose R E. Nucl Acids Res, 1988, **16**: 358.
- [15] Vieira J, Messing J. Gene, 1982, **19**: 259—268.
- [16] Kokotek W, Lotz W. Gene, 1989, **84**: 467—471.
- [17] Prentki P, Krisch H M. Gene, 1984, **229**: 303—313.
- [18] Fellay R, Frey J, Krisch H. Gene, 1987, **52**: 147—154.
- [19] Liang J H, Nielsen G M, Lies D P *et al.* J. Bacteriol, 1991, **173**: 6903—6909.