

# 体内遗传标记成团肠杆菌固氮质粒 pEA9

刘成君<sup>1</sup>, Walter Klingmüller<sup>2</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 德国拜罗伊特大学遗传研究所, 拜罗伊特, D-95440, 德国)

**摘要:**用卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)基因对成团肠杆菌固氮质粒 pEA9 进行活体遗传标记。将来自质粒 pEA9 的 3.0 kb 片段(*nif* ENX)克隆到 pBR322 载体中, 再将卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)基因插入到 3.0 kb 的片段中, 构建成供体质粒 pST5。将该质粒转化到含有待标记质粒 pEA9 的 *E. a.* 339 菌株中, 然后在 AP 培养基中消除供体质粒, 筛选得到 40 个失去了 pST5 并保持卡那霉素抗性的克隆, 分析表明它们不是质粒 pEA9 和 pST5 的共整合体, 而是卡那霉素抗性基因通过两个质粒在 *nif*ENX 区域内的 DNA 间的同源重组整合到了质粒 pEA9 上。

**关键词:**成团肠杆菌; 遗传标记; 卡那霉素抗性; 质粒消除; 同源重组

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)04-0455-04

## *in vivo* Labelling of *nif*-plasmid pEA9 from *Enterobacter agglomerans* 339

LIU Cheng-jun<sup>1</sup>, Walter Klingmüller<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Institute of Genetics, University Bayreuth, Bayreuth D-95440, Germany)

**Abstract:** The authors describe the *in vivo* labelling of the plasmid pEA9 in *Enterobacter agglomerans* 339 with a kanamycin resistance gene. For labelling purposes the donor plasmid pST5 was constructed. This plasmid contains the *nif* ENX region from pEA9, in which a kanamycin resistance gene is cloned. pST5 was transformed into *E. a.* 339 and subsequently cured from the host. Curing was achieved with AP medium. Fourty strains that had lost pST5, but retained the kanamycin resistance, could be isolated. It showed that none of these clones contained co-integrates of pST5 and pEA9. This is evident that in all clones the kanamycin resistance gene was integrated into pEA9 by homologous recombination.

**Key words:** *Enterobacter agglomerans*; labelling; kanamycin resistance; curing; homologous recombination

从自然界分离到的许多细菌都含有质粒, 但這些质粒大多是隱秘型的, 沒有可供篩選的抗性標記。要對這些质粒的特性進行研究, 首先必經對它們進行特殊的遗传標記——加入抗性基因。

成团肠杆菌 *E. a.* 339 是一种自生固氮菌, 从德国 Bayreuth 市小麦田中的小麦根部分离得到<sup>[1]</sup>, 它拥有一个大约 200 kb 的质粒 pEA9, 固氮基因位于质粒上。该质粒不带有任何抗性筛选标记, 要研究

它是否有自身接合转移能力和重组质粒在土壤中的行为特征等问题, 首先要做的工作就是对它进行抗性遗传标记。本工作采用体内(*in vivo*)遗传标记方法, 将来自转座子 Tn903 的卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)基因通过 DNA 同源重组的方式整合到质粒 pEA9 上。首先以质粒 pBR322 为载体, 克隆来自 pEA9 的 3.0 kb *Bam*HI 片段<sup>[2]</sup>, 得到重组质粒 pLC3, 再将卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)基因插入到 3.0 kb 片段中

收稿日期: 2001-09-25; 修回日期: 2001-12-14

作者简介: 刘成君(1962-), 男, 汉族, 四川营山县人, 博士, 副教授, 从事微生物分子遗传学研究。Tel: 028-85470039

本工作在德国拜罗伊特大学遗传研究所完成。

的 *Pst* I 位点上,构建成供体质粒 pST5。将 pST5 转入含有 pEA9 的 *E. a.* 339 野生型菌株中,构建成同时含有待标记质粒 pEA9 和供体质粒 pST5 的出发菌株 *E. a.* 339—L6,期望在该菌株中两个质粒的同源 DNA (*nif* ENX) 区域内发生一次双交换而将卡那霉素抗性基因 (*Kan<sup>r</sup>*) 整合到 pEA9 上,再在磷酸基团限量的 AP 培养基<sup>[8]</sup>中消除供体质粒 pST5,得到期望的含重组质粒 pEA9::*Kan* 的克隆。

用同源重组方式整合到 pEA9 上的卡那霉素抗性标记基因比直接用转座子通过转座作用进行的遗传标记<sup>[3]</sup>更加稳定,同时标记基因无接合转移能力和转座活性,是用来研究重组菌野外释放的生物安全性等问题的理想材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 所用的菌株与质粒列于表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

	特性	来源和文献
菌株 Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$		[4]
<i>E. a.</i> 339(pEA9)	<i>nif<sup>+</sup></i> Rif <sup>r</sup> Smr <i>recA<sup>+</sup></i>	[1]
<i>E. a.</i> 339—L6(pEA9, pST5)	Rif <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	本工作构建
<i>E. a.</i> 339—12—2(pEA9:: <i>Kan</i> )	Rif <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	本工作构建
质粒 Plasmids		
pEA9	<i>nif<sup>+</sup></i>	[1]
pBR322	Tc <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	[4]
pLC3	Ap <sup>r</sup>	本工作构建
pUC4K	Kan <sup>r</sup>	[9]
pST5	Ap <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	本工作构建
pEA9:: <i>Kan</i>	Kan <sup>r</sup>	本工作构建

1.1.2 培养基与培养条件 *E. coli* 和 *E. a.* 均采用 LB 培养基<sup>[4]</sup>。在选择性培养基中,各种抗生素的浓度分别为利福霉素 (Rif) 100 $\mu$ g/ml;卡那霉素 (Kan) 20 $\mu$ g/ml;链霉素 (Sm) 200 $\mu$ g/ml;氨基青霉素 (Ap) *E. coli* 为 100 $\mu$ g/ml,而 *E. a.* 为 200 $\mu$ g/ml;四环素 (Tc) 15 $\mu$ g/ml。质粒消除采用 AP 培养基<sup>[8]</sup>。*E. coli* 和 *E. a.* 分别在 37 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 下培养。

1.1.3 试剂 各种限制性内切核酸酶为 BRL 和 Boehringer Mannheim 公司产品。各种生化试剂分别是 Serva、Merk、Sigma 及 Roth 等公司产品。生物素标记试剂盒购自 BRL 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 操作技术 质粒 DNA 提取采用文献[4]的方法进行,大质粒 pEA9 按文献[5]经修改的方法制备,总 DNA 提取按文献[6]经修改的方法制备,DNA 印迹杂交采用 Southern 所述方法进行<sup>[7]</sup>,DNA 限制酶酶切,质粒 DNA 的转化等按文献[4]的标准方法进行。

1.2.2 质粒消除 用文献[8]经修改后的方法进行:将菌株接种于含 10ml AP 液体培养基的三角瓶中,180r/min,30 $^{\circ}$ C 下振荡培养 2d 后,取 100 $\mu$ l 转接于新的 AP 培养基中,重复此操作 6 次,将菌悬液稀释至合适浓度后涂平板,用影印培养法在选择性平板上筛选阳性克隆。

## 2 结果与讨论

### 2.1 供体质粒 pST5 的构建

以 pBR322 为载体克隆来自质粒 pEA9 的 3.0 kb *Bam*HI 片段<sup>[2]</sup>,构建成质粒 pLC3,该克隆片段包含 *nif* ENX 3 个基因。从质粒 pUC4K 中分离来自转座子 Tn903 的 1.24 kb *Pst* I 片段,该片段含有卡那霉素抗性基因,将该片段克隆到质粒 pLC3 的 3.0 kb 片段的 *Pst* I 位点上,构建成供体质粒 pST5。该质粒 3.0 kb 的 DNA 片段,作为与被标记质粒 pEA9 进行同源重组的同源 DNA 片段,同时在该片段中插入了 1.24 kb 的卡那霉素抗性标记基因。

### 2.2 出发菌株的构建

将构建好的供体质粒 pST5 用电转化方法<sup>[4]</sup>导入含有待标记质粒 pEA9 的 *E. a.* 339 野生型菌株中,实验发现供体质粒 pST5 在该菌株中稳定存在,并且表达卡那霉素抗性基因,从而构建成出发菌株 *E. a.* 339—L6。该菌株既含待标记的质粒 pEA9,又含带标记基因的供体质粒 pST5。期望在该菌株的质粒 pST5 和 pEA9 的 *nif* ENX 同源 DNA 区域内发生双交换,使卡那霉素抗性基因整合到固氮质粒 pEA9 上,再消除供体质粒 pST5,就可得到带有卡那霉素抗性标记的重组质粒 pEA9::*Kan*。

### 2.3 供体质粒的消除与重组克隆的筛选

要得到含重组质粒 pEA9::*Kan* 的克隆,必须消除供体质粒 pST5。出发菌株失去 pST5 同时伴随氨基青霉素抗性的消失,而应保持卡那霉素抗性。根据这一特性,可以在选择性平板上筛选含重组质

粒 pEA9::Kan 的克隆。实验发现菌株 *E. a.* 339 对氨基青霉素有耐受性,预备实验表明其耐受浓度低于 2mg/ml。质粒的消除在磷酸基团限量的 AP 液体培养基中进行,预备实验显示,在无选择压力下 pEA9 在 AP 培养基中多次转接培养后仍稳定存在,说明用 AP 液体培养基消除供体质粒 pST5 是可行的。将出发菌株 *E. a.* 339—L6 接种于装有 10ml AP 培养基的三角瓶中,30℃,180r/min 振摇 2d,取 100 $\mu$ l 接种于新的培养基中继续振摇培养,这种方式重复 6 次后将菌悬液稀释到 10<sup>-5</sup>,涂 LB 平板上,待菌落形成后,分别影印培养到含有 Rif、Sm、Kan 和 Rif、Sm、Ap 两种 LB 选择性平板上,形成菌落后,统计实验结果(表 2)。

由表 2 可见,出发菌株在 AP 培养基中经多次传代培养后,在被检测的 27052 个菌落中,有 139 个菌落具有卡那霉素抗性,其中 40 个菌落由于供体质粒 pST5 的消除,失去了氨基青霉素抗性,但仍保持卡那霉素抗性,这是我们期望得到的克隆。

表 2 在 AP 培养基中消除供体质粒实验结果

Table 2 Curing results in AP Medium

出发菌株	<i>E. a.</i> 339—L6
培养液体积	10 ml
菌体浓度	4.5 $\times$ 10 <sup>8</sup>
检测菌落总数	27052
Kan <sup>r</sup> 菌落数	139
Kan <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> 菌落数	99
Kan <sup>r</sup> Ap <sup>s</sup> 菌落数	40

## 2.4 重组质粒 pEA9::Kan 的鉴定

选取 Kan<sup>r</sup>Ap<sup>s</sup> 克隆,检查这些菌株中是否真正在 pEA9 与 pST5 之间发生了同源重组,进行了如下分子水平上的实验。

2.4.1 琼脂糖凝胶电泳分析 选取 6 个 Kan<sup>r</sup>Ap<sup>s</sup> 克隆,分别命名为 *E. a.* 339—12—1 至—6,经强碱裂解<sup>[5]</sup>后,进行琼脂糖凝胶电泳(图 1A),结果显示供体质粒 pST5 消失了,而质粒 pEA9 依然存在;然后按 Southern 法<sup>[7]</sup>转膜,以 1.24 kb 的卡那霉素抗性基因为探针进行分子杂交,在质粒 pEA9 带的位置上与 Kan<sup>r</sup> 基因有杂交(图 1B),证实卡那霉素抗性基因与 pEA9 发生了整合。在染色体带的位置也有杂交,这是因为在 DNA 分离纯化过程中,少量线性化质粒 DNA 与染色体 DNA 相互紧密缠绕,无法

彼此分开,因而出现相同的电泳行为所致。

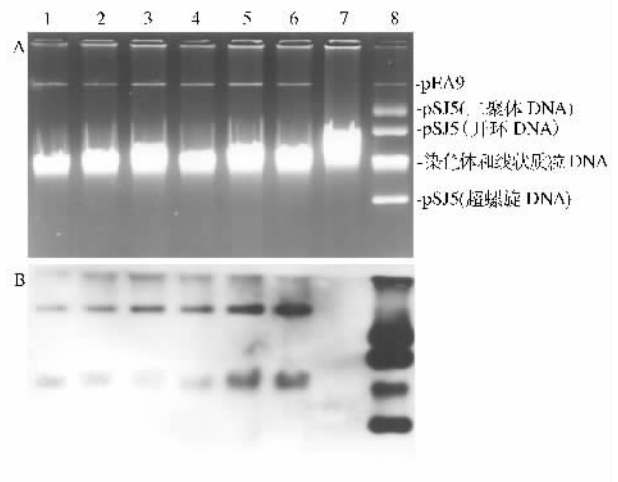


图 1 Kan<sup>r</sup>Ap<sup>s</sup> 克隆总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析(A)和卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)基因为探针的 Southern 杂交(B)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis (A) and of Kan<sup>r</sup>Ap<sup>s</sup> clone hybridization with Kan<sup>r</sup> gene probe(B)

1: *E. a.* 339—12—1; 2: *E. a.* 339—12—2; 3: *E. a.* 339—12—3; 4: *E. a.* 339—12—4; 5: *E. a.* 339—12—5; 6: *E. a.* 339—12—6; 7: *E. a.* 339<sup>-</sup> (negative control); 8: *E. a.* 339—L6.

2.4.2 限制酶酶切分析 选取 *E. a.* 339—12—2 菌株,提取重组质粒 pEA9::Kan 和总 DNA,经 BamHI 酶切,电泳后转膜,用 1.24 kb 的卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)基因为探针进行 Southern 杂交(图 2),在 4.24 kb 的位置只出现了一个杂交带(第 3 道),说明卡那霉素抗性基因确实与 pEA9 发生了整合。由于质粒 pUC4K(第 5 道)酶切不完全,因此产生了两条杂交带。

为了进一步检测质粒 pEA9 与 pST5 是否形成共整合体,供体质粒载体 pBR322 用作探针对 *E. a.* 339—12—2 总 DNA 进行了 Southern 杂交(图 3),结果显示无杂交带形成(第 3 道),这就排除了 pEA9 与 pST5 形成共整合体的可能性。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] Singh M, Kleeberger A, Klingmüller W. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*[J]. Mol Gen Genet, 1983, 190: 373~378.
- [2] Steibl H D. Klonierung des Plasmids pEA9 von *Enterobacter agglomerans* 339 und Analyse der plasmidalen *nif*-Genorganisation[D]. Diplomarbeit, University Bayreuth, 1989.

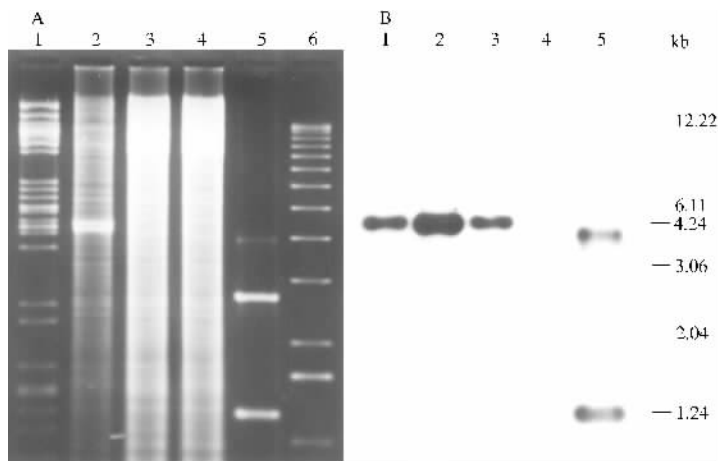


图 2 菌株 *E. a.* 339—12—2 总 DNA 经 *Bam*HI 限制酶酶切后的电泳图谱 (A) 和卡那霉素抗性 (*Kan*<sup>r</sup>) 基因为探针的 Southern 杂交 (B)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis(A)and hybridization with *Kan*<sup>r</sup> gene probe(B)

1:pEA9::*Kan*; 2:*E. a.* 339—L6(positive control); 3:*E. a.* 339—12—2;  
4:*E. a.* 339<sup>-</sup> (negative control); 5:pUC4K(*Pst*I 酶切); 6:KBL.

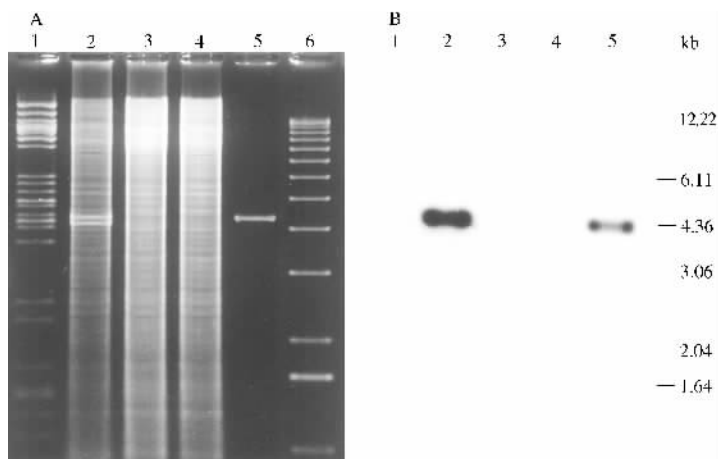


图 3 菌株 *E. a.* 339—12—2 总 DNA 经 *Bam*HI 限制酶酶切后的电泳图谱 (A) 和 pBR322 为探针的 Southern 杂交 (B)

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis analysis(A)and hybridization with *Kan*<sup>r</sup> gene probe(B)

1:pEA9::*Kan*; 2:*E. a.* 339—L6(positive control); 3:*E. a.* 339—12—2;  
4:*E. a.* 339<sup>-</sup> (negative control); 5:pBR322(*Bam*HI 酶切); 6:KBL.

[3] Min B W. Erzeugung von *nif*<sup>-</sup> Mutanten des Stammes *Enterobacter agglomerans* 339 durch Transposon—Mutagenese und Untersuchung der Transfereigenschaft seines Plasmids pEA9 [D]. Diplomarbeit, University Bayreuth, 1986.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd) [M]. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989.

[5] Kado C I, Liu S T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid[J]. J Bacteriol, 1981, 145:1365~1373.

[6] Masterson R V, Prakash R K, Atherly A G. Conservation of symbi-

otic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*[J]. J Bacteriol, 1985, 163:2~26.

[7] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. J Mol Biol, 1975, 98:503~517.

[8] Torriani A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli* [J]. Biochim Biophys Acta, 1960, 38:460~469.

[9] Vieira J, Messing J. R—plasmid transfer in soil and water[J]. Can J Microbiol, 1986, 32:610~613.