DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.007
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1145-03

论著

利用 Mini-Tn5 转座子诱导弗氏枸橼酸杆菌插入突变的研究

丛延广,徐启旺 (第三军医大学科研部生物波研究中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究以自杀性质粒 pUT 携带的 Mini-Tn5 转座子对弗氏枸橼酸杆菌进行转座诱变。方法 转座采用双亲本接合法,对获得的接合子进行无抗性选择条件下的连续传代测定其稳定性,并测其氨苄青霉素耐性及进行质粒提取以排除质粒传代原因造成假阳性的可能。对接合子进行营养缺陷株和运动突变株的筛选。结果 Mini-Tn5 Km 转座率约为每受体菌 9.2×10^{-6},接合子在无抗性选择的情况下培养 3 代仍保持稳定,卡那霉素抗性不消失,说明插入到染色体上的转座序列是稳定传代的。接合子的抗性是染色体而非质粒编码的结果。对营养缺陷株的筛选和分析提示,转座子的插入是随机的,弗氏枸橼酸杆菌染色体中无明显的转座插入热区。使用该转座子能有效筛出运动突变株。结论 Mini-Tn5 系列转座子适于大规模筛选弗氏枸橼酸杆菌突变株。

关键词:转座子;弗氏枸橼酸杆菌
中图法分类号:Q933;Q939.121 文献标识码:A

Insertion mutagenesis in *Citrobacter freundii* by Mini-Tn5 transposon

CONG Yan-guang, XU Qi-wang (Research Center of Biological Wave, Division of Scientific Affairs, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the technique of transposon mutagenesis involving the use of Mini-Tn5 on a suicide plasmid for *Citrobacter freundii* (*C. freundii*). Methods A conjugation method was used in transposon mutagenesis. The stability of exconjugants was confirmed by series passages under nonselective condition. Detection of anti-ampicillin resistance and purification of the plasmid were conducted for excluding the possibility of plasmid-encoded antibiotic resistance. All exconjugants were screened for auxotrophic mutants and swarming motility mutants. Results Analysis of the generated exconjugants indicated that Mini-Tn5 Km was transposed in *C. freundii* at a high frequency (ca. 9.2×10^{-6}). The mutants were stable and retained the transposon-encoded antibiotic resistance after incubation for three passages under nonselective condition. The frequency of auxotrophic mutants in the population confirmed that the insertion of the transposon was random and the *C. freundii* chromosome did not contain significant insertional hot spots of transposition. No extrachromosomal plasmid DNA was found. Conclusion Transposon mutagenesis of Mini-Tn5 is a suitable technique for the study of differentiation in *C. freundii*.

Key words: transposon; *Citrobacter freundii*

表面分化是细菌存在于表面环境中所发生的适应性分化现象,在固体培养基表面生长时,部分细菌能在代谢、形态、蛋白表达等方面发生分化,从而表现群集运动(swarming motility)[1,2]。对变形杆菌的研究表明,其调节过程十分复杂,有几十种基因参与,并且其运动和分化的能力与致病性有关[3]。在细菌与机体的相互作用过程中,多数情况下处于各种表面环境,如泌尿道、消化道、呼吸道表面等,对其在表面环境中分化特征的研究有助于对细菌致病过程的认识。本实验室以往中也曾发现包括弗氏枸橼酸杆菌在内的多个菌株在某些条件下表现出类似的分化[4~6],由于对弗氏枸橼酸杆菌这一现象的调节机制一无所知,我们采用 Mini-Tn5 转座子对该菌进行转座插入诱变,分离群集运动突变株进行研究。Mini-Tn5 系列还没有应用于弗氏枸橼酸杆菌的报道,我们在建立方法的同时,还对其转座的基本情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究中所用菌株和质粒见表 1。

卡那霉素(Km)、利福平(Rif)和氨苄青霉素(Ap)3 种抗生素使用浓度均为 100 μg/ml。LB 培养基用于细菌的正常传代。基本培养基[10.5 g/L K_2HPO_4, 4.5 g/L KH_2PO_4, 0.47 g/L 枸橼酸钠, 1.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, pH7.2]用于营养缺陷株的筛选。

作者简介:丛延广(1973-),男,辽宁省盘锦市人,硕士,讲师,主要从事细菌学方面的研究。电话:(023)68752190

收稿日期:2003-06-05;修回日期:2003-12-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 菌株及质粒

Tab 1 Strains and plasmids used

Strains or plasmids	Genotype of phenotype *	Reference or source
E. coli		
S17-1(λpir)	Rec- RP4-2Tc::Mu Km::Tn7λpir	De Lorenzo[7]
CC118(λpir)	araD139 (ara leu)7697 lacX74 phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recA1λpir	De Lorenzo[7]
SM10(λpir)	thi recA thr leu tonA lacY supE RP4-2-Tc::Mu::pir	De Lorenzo[7]
C. freundii		
ATCC8090	Wild type Rifr	Tomofusa Tsuchiya
YG-0604	swr⁻; Tn5 Km Swr⁻Mot⁻Fla⁻	This study
Plasmids		
pUT/mini-Tn5 Sm/Sp	Apr Smr Spr	De Lorenzo[7]
pUT/mini-Tn5 Km	Apr Kmr	C. S. Harwood
pUT/mini-Tn5 Km1	Apr Kmr	Manuel Espinosa Urgel

*: Swr⁻, absence of swarming on plate surface; Mot⁻, no motility in liquid; Fla⁻, no flagellin produced

1.2 方法

1.2.1 转座方法为双亲本滤膜接合法 供体为携带 PUT Mini Tn5 Km(或 Km1)质粒的大肠杆菌 S17-1(λ pir),受体为弗氏枸橼酸杆菌 ATCC 8090。两种细菌分别于含相应抗生素的 LB 培养基中过夜培养。离心后,以 10 mmol/L $MgSO_4$ 溶液悬浮并调整菌浓度。分别取 100 μl 供体菌(约 4.5×10^8 个菌体)和 200 μl 受体菌(约 1.0×10^9 菌体)滤过于同一张 0.45 μm 的无菌滤膜上,取下滤膜置于 LB 平板中央,于 37 ℃培养 12 h。然后用无菌 PBS 缓冲液将滤膜上生长的菌苔洗下,以双抗 LB 平板(Km 100 μg/ml, Rif 100 μg/ml)进行选择培养。

1.2.2 质粒提取 按碱裂解法提取,琼脂糖凝胶电泳观察,溴化乙锭染色。

1.2.3 接合子氨苄青霉素抗性的测定 将待测菌点种于含氨苄青霉素 100 μg/ml 的 LB 平板上,37 ℃培养过夜后观察。

1.2.4 营养缺陷株的筛选 将待测菌点种于基本培养基平板上,同时按相同次序点种于 LB 平板上,37 ℃培养过夜,在基本培养基平板上未长的菌落就是营养缺陷株,对照其次序取相应 LB 平板上的菌落进行保存。

1.2.5 群集运动突变株的筛选 新鲜配制 LB 培养基平板(琼脂浓度 0.5%,补加 0.2% 葡萄糖),将接合子点种于平板表面,每个平板点种 10 株,于 37 ℃培养 8 h,观察接种菌株的菌落形成情况,对菌落局限没有扩散的菌株和虽有扩散但显著不同于野生株对照的菌株进一步筛选,每个平板只点种 3 株。对第 2 次筛选仍无典型扩散的菌株,收集于双抗 LB 平板上,这些菌株构成运动突变株库。

2 结果

采用接合方式进行转座,受体菌须与供菌区分开,一般根据两菌耐药谱的差异,选择一种供菌敏感而受体菌耐受的抗生素即可。因此也提供了多个供体菌供选择,如大肠杆菌 CC118(λpir)、S17-1(λpir)、SM10(λpir)等,它们的共同特征为 λpir 所溶源性感染,但耐药谱有差异。所以,为了选择合适的转座子标志,需要首先对受体菌的耐药谱进行测定。由于本研究所用的弗氏枸橼酸杆菌菌株对卡那霉素敏感,对利福平耐受,故转座子选择 Mini-Tn5 Km 和 Km1,其宿主菌采用对利福平敏感的大肠杆菌 S17-1(λpir)。

实验结果表明,无论是 Mini-Tn5 Km 或 Km1,均可以获得高效的转座效果,分别可达每受体菌 9.2×10^{-6}、、7.6×10^{-6}(图 1)。所以其后的实验只采用 Mini-Tn5 Km 转座子进行转座诱导,初步共筛选了 4 047 个接合子。

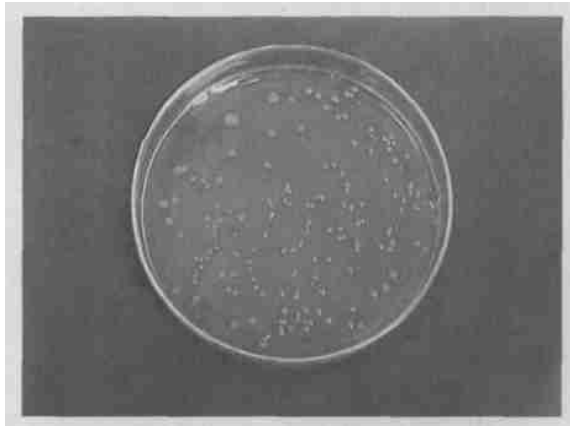


图 1 选择平板上的弗氏枸橼酸杆菌突变株菌落

Fig 1 *C. freundii* mutant colonies on the selective plate

为确定传代的稳定性,我们对 500 株转座接合子在无抗生素平板上连续传代 3 次,再转入抗生素平板,结果所有菌株均可继续生长,没有 1 株在无卡那霉素的环境下传代丢失了抗性的菌株,证明在弗氏枸橼酸杆菌染色体上的转座子序列是稳定传代的。

pUT 质粒中编码氨苄青霉素抗性的片段位于可移动片段外,不会转座到受体菌染色体上(弗氏枸橼酸杆菌 ATCC 8090 野生株对氨苄青霉素敏感),通过对 500 株接合子氨苄青霉素抗性的测定,发现所有受测株均对氨苄青霉素敏感,说明没有 pUT 质粒存在于这些接合子中。我们还随机对 30 株转座接合子进行质粒提取,结果没有 1 株提取出质粒成分,说明接合子对卡那霉素的抗性是由染色体而非质粒编码的。为确定转座的随机性,我们对转座后产生的营养缺陷株进行了筛选,从 4 047 株转座接合子中共筛选出 97 株不能在基本培养基上生长的营养缺陷株,分离比率为 2.4%,与同属肠杆菌科的变形杆菌营养缺陷株出现比率基本一致[7]。结果提示转座子对弗氏枸橼酸杆菌染色体序列没有明显的结合热区(hot spot),如果存在这样一个热区,营养缺陷株的分离比率会明显偏离。

对接合子进行群集运动能力的筛选,初步在 4 047 株转座接合子中共筛选出 85 株运动突变株(图 2),其中有完全无运动能力的(包括不能合成鞭毛和能合成鞭毛两种),也有虽能运动但不能向外扩展的,并结合有形态方面的变异(详细分类分析另文发表)。说明 Mini-Tn5 转座子用于弗氏枸橼酸杆菌表面分化的分子机制研究是可行的,事实上,对于这种大规模分析,也是最适宜的办法。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

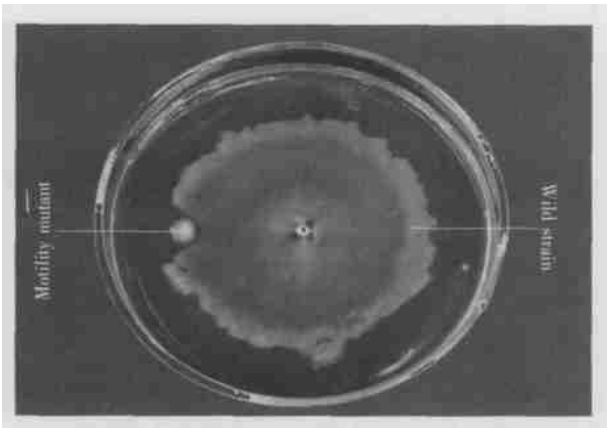


图 2　弗氏枸橼酸杆菌 ATCC8090 野生株及运动突变株 YG-0604 的菌落形态

Fig 2　Colonies of *C. freundii* wild strain and its motility mutant YG0604

3　讨论

Mini-Tn5 系列转座子构建于自杀性质粒 pUT 上, 序列中有来自 R6K 质粒的π 蛋白依赖性复制起点, 故质粒只能在表达π 蛋白的菌株中复制, 如λpir 溶源性感染的大肠杆菌 K-12。质粒中有 RP4 质粒的转移起点 oriT, 因此可以接合性转移至受体菌。另外序列中还带有 tnp *, 即去掉了 *Not* Ⅰ 位点的 IS50Rtnp 基因。它编码转座酶, 是 Mini-Tn5 转座必需的。转座时该片段不进入受体菌的染色体, 故转座后, 染色体上的转座片段不会发生二次转移。该系列转座子对一大类革兰阴性菌均能发生转座诱变, 适用范围较广[1-8]。Mini-Tn5 系列转座子包括多个抗生素选择标志, 如耐受卡那霉素、壮观霉素/链霉素、四环素、氯霉素等的序列。当转座子结合到受体菌的染色体后, 该菌就获得该标志所编码的性状, 能很容易地与未诱变的菌体区分开来。

与普通诱变法如亚硝基胍诱变、紫外线照射诱变比较, 采用 Mini-Tn5 系列转座子诱导突变株有明显的优势。第一诱变率较高。第二导致插入性单突变, 不会出现多重突变, 有利于研究的准确。第三插入序列已知, 便于对基因定位。本研究建立 Mini-Tn5 系列转座子诱导弗氏枸橼酸杆菌运动突变株的方法, 为进一步深入研究弗氏枸橼酸杆菌表面分化的分子调节机制奠定基础。

参考文献:

[1] Allison C, Hughes C. Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour[J]. Sci Prog, 1991, 75(298 Pt 3-4): 403－422.

[2] Eberl L, Molin S, Givskov M. Surface motility of Serratia liquefaciens MG1 [J]. J Bacteriol, 1999, 181(6): 1703－1712.

[3] Allison C, Coleman N, Jones P L, *et al*. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation[J]. Infect Immun, 1992, 60(11): 4740－4746.

[4] 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 等. 单种群菌落分形结构的形成及其机制研究[J]. 生物物理学报, 1999, 15(1): 69－73.

[5] 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 等. 不同生长形态绿脓杆菌胞外粘液多糖的含量及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 571－574.

[6] 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 等. 形态受培养温度影响的绿脓杆菌菌株[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 76－80.

[7] De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, *et al*. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negetive eubactaria[J]. J Bacteriol, 1990, 172 (11): 6568－6572.

[8] Belas R, Erskine D, Flaherty D. Transposon mutagenesis in *Proteus mirabilis*[J]. J Bacteriol, 1991, 173(19): 6289－6293.

（编辑　薛国文）

欢迎订阅《创伤外科杂志》

《创伤外科杂志》是反映创伤外科临床和基础研究内容的学术性期刊, 国内外公开发行, 中国科技部中国科技论文统计源核心期刊。《创伤外科杂志》是中国学术期刊光盘版-数据库、中国生物医学文献光盘数据库(CBM)、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、万方数据库-数字化期刊群、国家版本数据库、《中文科技资料目录》等收录期刊。

主要栏目包括: 创伤临床研究、基础研究、药物应用方面论著; 国内外创伤救治和研究进展方面的综述、评论等; 创伤救治新成果、新技术、新方法介绍; 创伤临床方面的经验交流、病例报告、误诊分析、短篇报道、基层园地、国外医学报道、临床问答、专题讲座等。

主要读者对象为从事创伤外科相关学科工作的临床、教学、科研人员。《创伤外科杂志》为大 16 开 80 页, 双月刊(铜版纸), 单月 15 日发行; 全国邮政局发行, 邮发代号: 78－111; 定价: 每期 10.00 元, 全年 60.00 元。

地　址: 重庆市大坪长江支路 10 号《创伤外科杂志》编辑部　　邮　编: 400042

电　话: (023)68757134; 68706804　　传　真: (023)68705417　　E-mail: jtrasurg@cta.cq.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net