

产酸克雷伯氏菌游动性减弱突变体的筛选

江绍锋^{1,2,3} 黄金清¹ 于晓宇¹ 李云飞¹ 蓝运华¹ 陆祖军^{1,2}

1.广西师范大学生命科学学院/珍稀濒危动植物生态与环境保护部共建教育部重点实验室,桂林 541004;

2.广西高校野生动植物生态学重点实验室,桂林 541004; 3.华南农业大学农学院,广州 510642

摘要 以产酸克雷伯氏菌 KO108 为研究对象,通过构建转座子突变体文库,筛选获得 2 株游动性显著降低的突变菌株,并以转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 构建突变体库,利用地高辛生物标记 *gfp* 基因序列作为探针, Southern 杂交验证突变体库的质量,根据杂交条带判断 *mTn5gusA-pgfp21* 转座子插入染色体的拷贝数,以反向 PCR 获取未知序列,通过基因组学分析预测游动性相关基因。结果表明:产酸克雷伯氏菌 KO108 具 Kan 抗性标记、GUS 活性、GFP 遗传标记的突变体库可由两亲结合经转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 转座突变获得;随机选择 100 株突变体进行游动性筛选,仅获得 2 株游动性显著降低的目标菌株 MA 和 MD; MA、MD 与 KO108 差异显著($P < 0.05$),而 MA 和 MD 之间没有显著差异;Southern 杂交结果显示 MA 和 MD 的转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 为单插入,且插入位点所在的酶切片段大小不同;经反向 PCR、测序、序列分析,发现 MA 突变基因为醌类氧化还原酶(NAD(P) H:quinone oxidoreductase)(NQR)基因簇的 *NqrA*, MD 突变基因为 LPS 脂多糖生物合成基因簇基因;生长曲线检测显示 KO108 和 MA、MD 无显著差异;菌膜检测发现 MD 与 KO108、MA 有一定差异,但 KO108 与 MA 之间无显著性差异;以 Biolog ECO 检测 KO108 和 MA、MD 的碳源利用情况,结果表明 MA 和 MD 72 h 后仍然不能利用羧酸类碳源 D-半乳糖酸 γ -内酯和 2-羟基苯甲酸。

关键词 产酸克雷伯氏菌; Tn5 插入突变; 突变体; 游动性

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0068-08

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)为革兰氏阴性菌,不仅能自生固氮,合成植物生长激素 IAA,而且可以和植物根系建立联合固氮体系促进植物生长及增强植物抗性^[1-3],也是氯氰菊酯农药的高效降解者^[4]。其中不少菌株因具有高效的 2,3-丁二醇合成能力而成为重要的工业菌株^[5],其耐氧产氢特性和降解工业污染物的性能也逐渐被人们重视^[6]。产酸克雷伯氏菌是条件性致病菌,其分泌的耐热肠毒素可导致食物中毒^[7]、腹泻^[8]、肠炎^[9],受其感染可导致尿路感染^[10]、脑膜炎^[11]、败血症^[12]。最新研究显示产酸克雷伯氏菌乃桑树细菌性枯萎病的病原菌之一^[13]。游动性是运动型细胞和生物体的一种普遍特性。细菌主要通过鞭毛逆时针(counter-clockwise, CCW)发生直线运动和顺时针(clockwise, CW)发生翻滚运动的交替进行使自身处于一种随机运动状态^[14]。细菌的运动能力影响其致病性^[15]。

突变体库是研究功能基因组学的基础,DNA 转座是介导细菌基因组重排的一个重要生物学现象^[16]。转座子(transposon)依赖转座酶在细菌的染色体和质粒之间进行 DNA 剪切、粘贴。由于转座子具有体内移动和体外驱动转座 DNA 同时不受宿主种类、生长周期等影响的特点,当前被广泛用于突变体库的构建^[17]。mini-Tn5 转座子是 Tn5 转座子的衍生物,能将外源基因随机整合到细菌染色体上,不以游离质粒的形式存在,具有高表达稳定性^[18]。转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 不仅有 Tn5 的特性,同时携带有绿色荧光蛋白基因 *gfp*。由于 *gfp* 能够在活细胞中表达且其产物在紫外光及蓝光下持续发出荧光,检测非常方便,同时其对目的基因功能干扰极少,转化后的细胞株可以继续稳定传代保留,因此被广泛用于表达载体构建。有研究表明被 *gfp* 标记的目标菌所发出绿色荧光的强弱除了与宿主菌的生理状态有关外,还与选用的 *gfp* 类型以及 *gfp* 基

收稿日期: 2016-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060120); 广西壮族自治区自然科学基金项目(2013GXNSFAA019059); 广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2014090)

江绍锋,博士研究生,研究方向: 病原微生物学。E-mail: jiangshaofeng98@foxmail.com

通信作者: 陆祖军,博士,教授。研究方向: 微生物学。E-mail: luzujun2002@aliyun.com

因的拷贝数有关^[19]。Abdel-Salam 等^[20]用 Tn5 转座固氮螺菌获得 1 株以色氨酸(tryptophan)为前体的吲哚乙酸(IAA)合成途径被阻断的突变体。Pistorio 等^[21]以荧光显微镜观察被 *gfp* 基因标记的苜蓿根瘤菌在植物根部的动态,如根部菌落的变化、根瘤的发展和侵染路线的形成。安千里等^[22]、Bertsova 等^[23]证实 *gfp* 基因标记的 *Klebsiella oxytoca* SA2 可在甘蔗、玉米、水稻根内定殖。

目前有关产酸克雷伯菌游动性的报道还较少,本研究以转座子 *mTn5gusA-pgfp*21 构建突变体库,利用地高辛生物标记 *gfp* 基因序列作为探针, Southern 杂交验证突变体库的质量,根据杂交条带判断 *mTn5gusA-pgfp*21 转座子插入染色体的拷贝数,以反向 PCR 获取未知序列,通过基因组学分析

预测游动性相关基因,旨在为进一步揭示产酸克雷伯氏菌游动性的功能基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所使用的菌株与质粒列于表 1。

1.2 主要试剂

PCR 引物合成由生工生物工程上海(股份)有限公司完成,基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司,限制性内切酶 *Eco*R I、*Sau*3A I、T4-DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司,DIG Random Labeling and Detection Kit I(POD)和硫酸卡那霉素分别由博士德公司和北京索莱宝科技有限公司提供。

表 1 本研究用到的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性 Characteristics	来源 Sources
<i>Escherichia coli</i> S17.1 Lambda pir	pFAJ1819::21 Amp ^r Km ^r	美国密歇根大学奚传武博士惠赠 From Chuanwu XI, University of Michigan, USA
<i>Klebsiella oxytoca</i> 108	Wild type Ery ^r	笔者所在实验室 This laboratory
<i>Klebsiella oxytoca</i> mutants	K-M:: <i>mTn5gusA-pgfp</i> 21 Km ^r	本研究 This work
MA mutant	Tn5 insert mutant of KO108,ΔNADP(H)gene,Km ^r	本研究 This work
MD mutant	Tn5 insert mutant of KO108,Δ LPS gene, Km ^r	本研究 This work

1.3 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g,蒸馏水定容至 1 L,pH 7.0~7.2;LA 固体培养基为每升 LB 液体培养基加入 15 g 琼脂。

阿须贝无氮液体培养基:葡萄糖 10 g,KH₂PO₄ 0.2 g,MgSO₄·7H₂O 0.4 g,NaCl 0.2 g,蒸馏水定容至 1 L,pH 7.0~7.2;阿须贝无氮固体培养基为每升阿须贝无氮液体培养基加入 15 g 琼脂。

1.4 引物

用于检测产酸克雷伯氏菌 KO108 突变体中 *gfp* 基因的引物为引物 OJM091:CTGAGGTAC-CTGACTAGCTAAGGAGGATATACATATGG-CTAGC 和引物 OJM092:CTGAGGTACCAT-TATTTGTAGAGCTCATCC;定位突变体 Tn5 插入位点的引物为引物 IS50R1:GATCTGATCTTC-CATGTGACCTCC 及引物 GUS1:AGACTGAAT-GCCCACAGGCC。

1.5 突变体库的构建

采用两亲接合法构建突变体库。

1) 菌体培养。以 pFAJ1819/*E. coli* S17.1 Lambda pir 为供体菌,KO108 为受体菌,挑取新活

化的供体菌单菌落接种于含 50 μg/mL Kan 的 10 mL LB 液体培养基中,37℃摇床 200 r/min 震荡培养 12~18 h;挑取新活化的受体菌单菌落接种于 10 mL LB 中 30℃摇床 200 r/min 震荡 14~18 h。

2) 菌液处理。第 2 天,将 0.1 mL 的 2 种菌液分别接种于 10 mL 的 LB 培养液,震荡培养至 *D*₆₀₀≈0.5;各取 1 mL 菌液于 4℃下 5 000 r/min 离心 5 min,弃上清。

3) 菌体接合。制备 LA 培养基平板,将直径为 1.5 cm、孔径为 0.45 μm 的无菌硝酸纤维膜置于该平板中央,吸取供体菌和受体菌菌泥于膜中央混匀,菌泥水分绝大多数被培养基吸收后 30℃倒置培养 12~16 h。

4) 接合子筛选。以 1 mL 无菌生理盐水将混合菌泥从硝酸纤维膜上洗下,分别吸取 150 μL 涂布于含有 50 μg/mL Kan、吡啶橙的无氮固体培养基 30℃培养 3~4 d 观察,长出的菌落即为接合子。利用无氮培养基筛选供体菌,因其不能自生固氮,受体菌具自生固氮性能生长;吡啶橙对游离质粒复制的抑制作用较强,但对于染色体的复制抑制作用较弱,起到消除假接合子(pFAJ1819 游离存在)的作用;

同时当 *mTn5gusA-pgfp21* 转座子不插入 KO108 基因组 DNA 时,由于 KO108 不合成 pFAJ1819 复制所需的复制蛋白,此类假接合子被稀释。接合子基因组由于转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 插入并一起复制使其具 Kan 抗性标记。

1.6 目标突变体的筛选及游动性检测

随机从突变体库中选取 100 个克隆筛选游动性显著减弱的目标突变体。具体方法为:挑取出发菌株 KO108 和随机选取的突变体单菌落分别接种于装有 10 mL LB 培养基的指形瓶,30 ℃、200 r/min 培养 24 h,测定 D_{600} 值。用 LB 培养基将过夜培养物调节到 $D_{600}=0.2$,各取 2 μL 点接于含有 0.3% (W/V) 琼脂的 LB 培养基上。30 ℃ 静置培养 3 d 后比较菌株 KO108 和突变体游动性大小,采用交叉法测量直径,3 次重复。以菌落直径最小者为目标突变体。筛选到菌落直径最小的菌株 2 株,分别命名为 MA 和 MD。

1.7 目标突变体 *mTn5gusA-pgfp21* 随机插入拷贝数检测

将目标突变体和出发菌株 KO108 用无菌牙签接种于 4 种培养基上:①含有 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gluc 的 LA 培养基;②含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gluc 的 LA 培养基;③含有 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gluc 的无氮固体培养基;④含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gluc 的无氮固体培养基;置于 30 ℃ 培养箱培养,48 h 后观察菌体生长及 *gus*、*gfp* 基因表达情况。

目标突变体的 *mTn5gusA-pgfp21* 插入以 *gfp* 基因 PCR 验证。PCR 反应体系为:10 $\times$ *Taq* Buffer 5 μL ,2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μL ,引物 OJM091 1 μL ,引物 OJM092 1 μL ,模板 DNA 1 μL ,*Taq* 酶 0.3 μL ,补足 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环,72 ℃ 7 min,4 ℃ 保存,产物送生工生物工程上海(股份)有限公司测序。

目标突变体 *mTn5gusA-pgfp21* 随机插入拷贝数检测以 Southern 杂交完成。运用上述 *gfp* 基因 PCR 产物制备杂交探针,具体操作参考 DIG Random Labeling and Detection Kit I(POD)使用手册进行。

1.8 目标突变体 Tn5 插入位点的定位

提取目标突变体总 DNA,*Sau*3A I 完全酶切,产物纯化后在低浓度下 T4 连接酶 4 ℃ 过夜连接,然后用上述连接产物进行 PCR。PCR 反应体系为:

10 $\times$ *Taq* Buffer 5 μL ,2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μL ,引物 IS50R1 1 μL ,引物 GUS1 1 μL ,连接 DNA 1 μL ,*Taq* 酶 0.5 μL ,补足 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35 个循环,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存,产物送生工生物工程上海(股份)有限公司测序。

1.9 生长曲线的测定

在 LA 平板上挑取 KO108 和目标突变体单菌落分别接种于装有 50 mL LB 培养基的三角瓶中,30 ℃、200 r/min 培养 24 h,测定 D_{600} 值。用 LB 培养基将过夜培养物调节至 $D_{600}=0.1$,各取 1 mL 接种于装有 200 mL LB 培养基的三角瓶中,30 ℃、200 r/min 震荡培养,每 2 h 测定 D_{600} 值,绘制 KO108 菌株和目标突变体的生长曲线,3 次重复。

1.10 菌膜的检测

KO108 和目标突变体过夜震荡培养并用 LB 培养基将培养物调至 $D_{600}=0.1$ 。将 1 mL 的菌液接种于含有 9 mL LB 培养基指形瓶中,30 ℃ 静置培养 10 d,比较 KO108 和目标突变体在 LB 培养基的絮凝程度,3 次重复。

1.11 Biolog ECO 对碳源利用的检测

采用 Biolog ECO 对菌株 KO108 和目标突变体的碳源利用多样性进行检测。在富集培养基上划线活化 KO108 和目标突变体 2 次,用无菌棉签挑取少量菌体于无菌的 0.9% 生理盐水中,调整浊度直至达到允许的范围;将上述稀释液用八通道移液枪加入 Biolog ECO 平板,每孔接种菌液 150 μL ,在 20 min 内完成,编号并 30 ℃ 恒温培养。为避免 96 孔板边缘孔口干燥,在平板下面垫置湿毛巾,每隔 24 h 用 Biolog 读数仪读取结果,上述操作均在无菌条件下进行,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 突变体库的构建和筛选

菌株 KO108 和突变体在 4 种不同培养基上的显色和生长情况见表 2,接合子筛选结果如图 1。由于被 *gfp* 标记的突变体发射绿色荧光强弱与宿主菌的生理状态有关^[19],所以在同一强度紫外光激发时可看到不同的突变体绿光强度有差别,在 LA 培养基上突变体的绿色大部分都在菌落的中央形成,成雪花状,而野生菌株 KO108 不发出绿光。不同突变体 *gus* 基因表达强度也不同,蓝色越深指示表达越强,反之越弱;同一突变体的 *gus* 基因表达强度,

LA 培养基的优于无氮培养基者(图 1)。

2.2 目标突变体转座子 Tn5 插入的确定

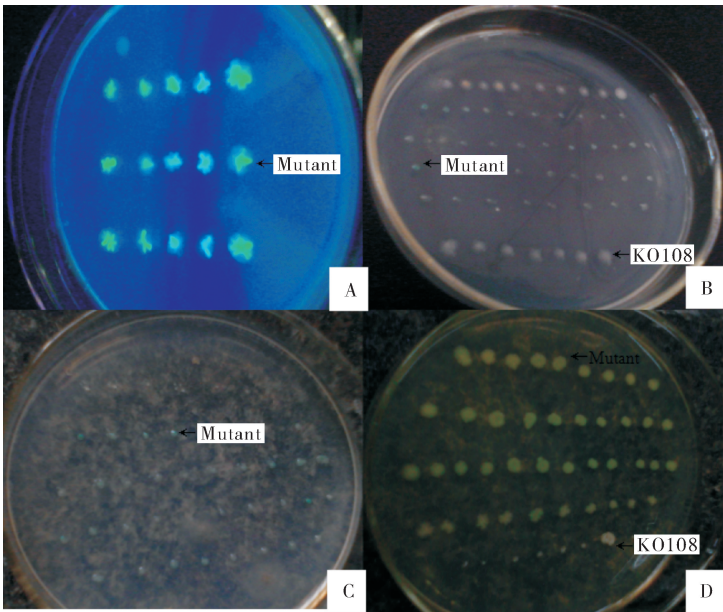
以转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 的绿色荧光蛋白转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 已经插入到突变体菌株基因(*gfp*)的 DNA 序列的引物 OJM091 和染色体中。

表 2 4 组培养基上供体菌、受体菌及接合子生长及标记基因的表达

Table 2 Growth and gene expression of the strains on the screening medium

菌株 Strain	无氮培养基+X-Gluc Ashby medium+X-Gluc			无氮培养+Kan+X-Gluc Ashby medium+Kan+X-Gluc			LA+ X-Gluc			LA+X-Gluc+Kan		
	生长	荧光	蓝色	生长	荧光	蓝色	生长	荧光	蓝色	生长	荧光	蓝色
	Growth	Fluorescence	Blue	Growth	Fluorescence	Blue	Growth	Fluorescence	Blue	Growth	Fluorescence	Blue
供体菌 Donor	—	/	—	—	/	/	+	+	—	+	+	—
受体菌 Recipient	+	—	+	—	/	/	+	—	+	—	—	—
接合子 Transformant	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+表示阳性，—表示阴性，/表示无法观察。Note: It is shown as “+” positive; “—” negative; “/” not observed.



A.培养基是 LA+Kan+X-Gluc(紫外光); B.无氮+X-Gluc(自然光); C.无氮+Kan+X-Gluc(自然光); D. LA+X-Gluc(自然光)。
A.Kan and X-Gluc with LA(UV) ; B.X-Gluc with nitrogen-free medium(Natural light); C.Kan+X-Gluc with nitrogen-free medium (Natural light); D.X-Gluc with LA(Natural light).

图 1 不同培养基及不同光照条件下 *gfp*、*gus* 和 *Kan* 基因表达强度的比较

Fig.1 The expression compare of *gfp*, *gus* and *Kan* with different medium under visible and ultraviolet light

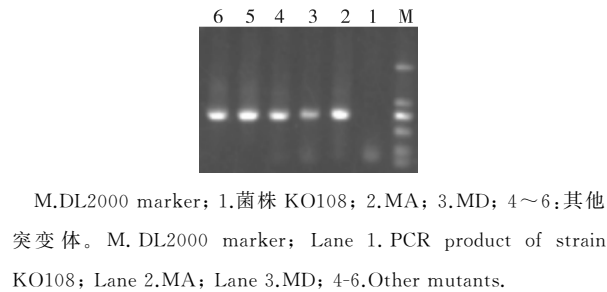


图 2 *gus* 基因产物 PCR 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of *gus* gene PCR product

2.3 Southern 杂交

提取 MA、MD 总 DNA,加入 1 μL 的 10 mg/μL RNA 酶去除 RNA (5~10 min),以超微量分光光度计检测 D_{260}/D_{280} 比值为 1.6~1.8,证明所提取的细菌组 DNA 符合实验要求。经限制性内切酶 *EcoR* I 酶切,以绿色荧光蛋白基因(*gfp*)PCR 产物进行 DIG 标记作为探针,Southern 杂交说明 MA、MD 的 *mTn5gusA-pgfp21* 为单插入,插入位点所在酶切片段大小不同,证明突变体库随机性较

好(图 3)。

2.4 游动性检测结果

图 4 为 KO108 和 MA、MD 菌落直径的统计结果。由图 4 可知,MA 和 MD 游动性没有显著性差异($P<0.05$),但是两者与野生株 KO108 相比差异显著($P<0.05$),很显然是 Tn5 插入突变的基因控制 KO108 的运动性。

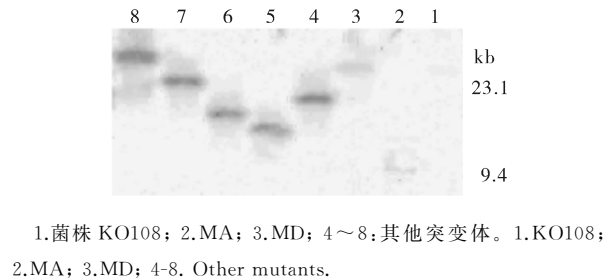
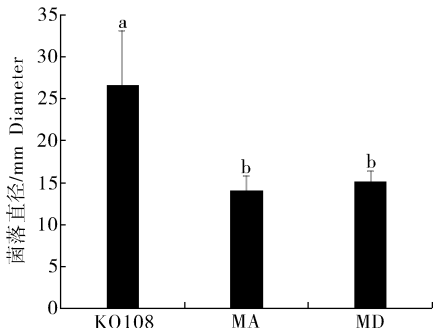


图 3 以 *gfp* 基因 DNA 序列为探针的 Southern 杂交
Fig.3 Southern hybridization with probe of *gfp* gene



注:图中数据表示为平均值±标准差,柱形图上的不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Note: Error bars indicate the mean and standard deviation, different letters above each bar indicate statistical difference($P<0.05$).

图 4 菌株 KO108 和突变体 MA、MD 的游动性分析
Fig.4 Motility analysis of strain KO108 and mutant MA,MD

2.5 MA 和 MD Tn5 插入位点侧翼序列的确定

利用反向 PCR 的方法,对 MA 和 MD 基因组的转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 插入位点进行定位。首先提取突变体 MA 和 MD 的总 DNA,然后用 *Sau3A* I 酶切总 DNA,再用 T4-DNA 连接酶在低浓度下随机连接酶切片段;以自连接成环的产物为模板进行反向 PCR,用 1%的琼脂糖凝胶,120 V 电压下电泳,电泳结果如图 5 所示;回收目标 PCR 产物并纯化回收后送上海生工测序。所得序列经 NC-BI 比对显示转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 插入 MA 的基因为编码醌类氧化还原酶(NAD(P) H: quinone oxidoreductase)(NQR)的基因簇的 *NqrA*;插入 MD 者为编码脂多糖合成基因簇相关基因。

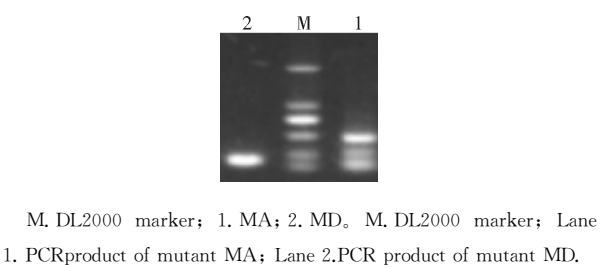


图 5 突变体 MA 和 MD 反向 PCR 产物
Fig.5 Electrophoresis of mutant MA and MD inverse PCR product

2.6 生长曲线的测定

菌株 KO108 和突变体 MA、MD 生长曲线如图 6。三者的生长曲线没有明显的差异,延滞期为 4 h, 4~12 h 为指数期,12 h 以后进入稳定期。

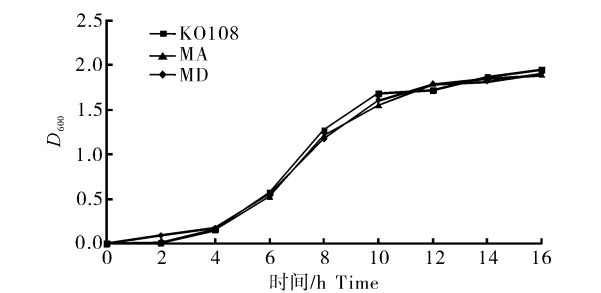


图 6 菌株 KO108 和突变体 MA、MD 生长曲线
Fig.6 Growth curves of strain KO108 and mutant MA,MD

2.7 菌膜的检测结果

菌株 KO108 和 MA、MD 菌膜检测结果如图 7。培养 10 d 后,KO108 和 MA、MD 在 LB 培养基中生长都出现了浑浊,其中 KO108 和 MA 在 LB 培养基表面形成絮状圆形菌膜,MD 的菌膜不呈大片絮状体,可能是受 *mTn5gusA-pgfp21* 插入脂多糖合成基因簇的影响。

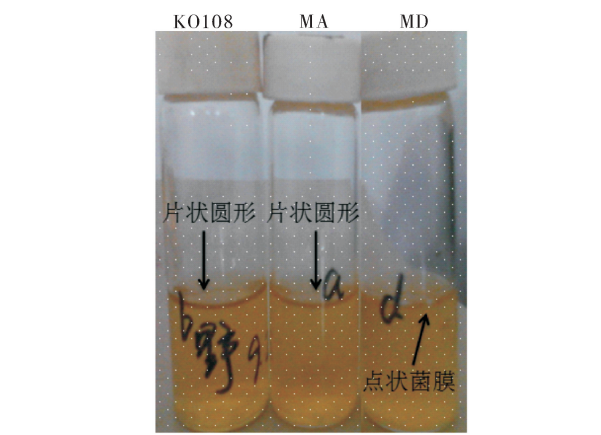
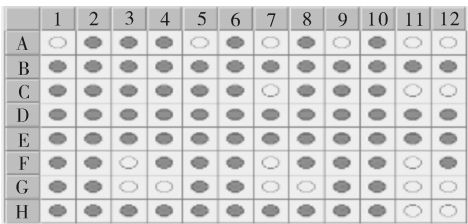


图 7 菌株 KO108 和突变体 MA、MD 菌膜的检测
Fig.7 Biofilm testing for mation of strain KO108 and mutant MA,MD

2.8 目标突变体碳源利用检测

菌株 KO108 和 MA、MD 碳源利用的 Biolog ECO 检测结果如图 8 所示。72 h 后 MA 仍然不能利用 *D*-半乳糖酸 γ -内酯(*D*-galactonic acid γ -lactone(A7))和 2-羟基苯甲酸(2-hydroxy benzoic acid (C7)); 72 h 后 MD 仍然不能利用 *D*-半乳糖酸 γ -内酯(*D*-galactonic acid γ -lactone (A11))、*L*-精氨酸(*L*-arginine (A12))、2-羟基苯甲酸(2-hydroxy benzoic acid (C11))、*L*-苯丙氨酸(*L*-phenylalanine (C12))、*D*-苹果酸(*D*-malic acid (H11))和腐胺(putrescine (H12))。KO108 和突变体 MA、MD 72 h 后都不能利用的碳源为衣康酸(itaconic acid (F3))、 α -丁酮酸(α -keto butyric acid(G3))和苯乙胺(phenylethyl-amine(G4))。



1~4:菌株 KO108; 5~8:突变体 MA; 9~12:突变体 MD。*D*-半乳糖酸 γ -内酯(A3、A7、A11); *L*-精氨酸(A4、A8、A12); 2-羟基苯甲酸(C3、C7、C11); *L*-苯丙氨酸(C4、C8、C12); *D*-苹果酸(H3、H7、H11); 腐胺(H4、H8、H12)。1-4: Strain KO108; 5-8: Mutant MA; 9-12: Mutant MD. Note: *D*-galactonic acid γ -lactone (A3, A7, A11); *L*-Arginine (A4, A8, A12); 2-Hydroxy benzoic acid(C3, C7, C11); *L*-Phenylalanine(C4, C8, C12); *D*-Malic acid (H3, H7, H11); Putrescine(H4H8H12)。

图 8 菌株 KO108 和突变体 MA、MD 的碳源利用结果 (72 h)

Fig.8 Utilization carbon source for strain of KO108 and mutant MA,MD (72 h)

3 讨论

为系统研究产酸克雷伯氏菌 KO108 的游动性相关基因,本研究将其与 *Escherichia coli* S17.1 两亲结合,经转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 转座突变技术获得 KO108 的 Kan 抗性、GUS 活性和 GFP 遗传标记的突变体库,说明以转座子 *mTn5gusA-pgfp21* 插入产酸克雷伯氏菌 KO108 构建突变体是可行的。从中筛选到的目标突变体 MA、MD 以 *gfp* 基因为探针, Southern 杂交结果显示两者的 *mTn5gusA-pgfp21* 插入为单拷贝,且插入位点所在的酶切片段大小不同,提示突变体库随机性良好。

MA、MD 的游动性与 KO108 的差异显著

($P<0.05$),显然 Tn5 插入的基因与 KO108 的游动性密切相关。反向 PCR 产物测序表明 MA 突变基因为 NQR 基因簇的 A 亚基(NqrA)基因,MD 突变基因为脂多糖生物合成基因簇基因。NQR 基因簇乃 6 个 ORF 组成的操纵子,编码该酶的 6 个亚基(NqrA-F) [23];此酶也称为钠泵-NADPH 醌类氧化还原酶 (Na^+ -pumping NADH: quinone oxidoreductase (Na^+ -NQR)) [24],镶嵌于膜上, NqrA 位于细胞膜的细胞质一侧,有证据显示该亚基包含醌的结合位点 [25]。NQR 是细菌最重要的 Na^+ 转运载体,在 NqrF 亚基氧化 NADH,于 NqrA 亚基还原醌成氢醌(醌醇)而实现电子传递的同时偶联 Na^+ 外运形成 Na^+ 电化学梯度,此梯度势能可用于细菌 ATP 的合成、鞭毛 Mot 蛋白的旋转、养分的转运、抗生素抗性相关的多种药物转运 [26]。NQR 最先发现于溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) [26],目前已在 100 多种细菌,包括海洋细菌及病原菌和其他细菌中注释 [25]。经检索发现,全基因组测序的克雷伯氏菌属所有菌株均包含此酶的基因。

MA 与 KO108 相比,显著的变化是游动性降低和碳源 *D*-半乳糖酸- γ -内酯 (*D*-galactonic acid γ -lactone(A7))、2-羟基苯甲酸 (2-hydroxy benzoic acid (C7))代谢的缺陷。NQR 是众多细菌(包括产酸克雷伯氏菌)生物能形成的关键组分 [25],MA 编码 A 亚基(NqrA)的基因被突变,可能降低其对醌类物质的亲和性,导致产能效率下降进而使鞭毛的 Mot 蛋白的转速率降低,从而减低其游动性。当然, Tn5 插入 *NqrA* 也会使其下游的基因发生移码突变,降低电子传递速率从而降低产能。主动运输及基团移位是细菌逆浓度梯度吸收养分的 2 种主要方式,两者均耗能且由构象可变化的特异性载体蛋白参与 [27]。MA 的 *D*-半乳糖酸- γ -内酯、2-羟基苯甲酸代谢缺陷表型显然不能完全用 NQR 醌类物质亲和性下降、产能效率降低来解释,因为 LB 培养基内 MA 和 KO108 的生长曲线无显著差别,可能的原因是转运 *D*-半乳糖酸- γ -内酯、2-羟基苯甲酸的特异受体蛋白对底物的转运完全或者更多地依赖 NQR 参与的产能代谢途径。

革兰氏阴性细菌胞外膜的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)一般由三部分组成,由内向外依次是疏水性的类脂 A、核心寡糖和由重复性糖单元构成的 O-抗原;它的组成和结构与细胞完整性、外膜通透性、菌膜的形成及细菌抗干燥能力和运动能力等细胞生化特性密切相关 [28]。大豆慢生根瘤菌 *Rhi*-

zobium leguminosarum biovar *viciae* 3841 胞外脂多糖的类脂 A 缺失羟基 28 烷酸(27-hydroxyoctacosanoate)修饰时,对干旱和渗透压极为敏感,对固体基质的固着能力下降,无鞭毛不能运动,但仍然能固氮^[29]。MD 的 Tn5 插入基因为编码脂多糖合成的基因簇。与 KO108 相比,MD 的显著差异是游动性降低、菌膜的形成量减少和碳源 *D*-半乳糖酸- γ -内酯(*D*-galactonic acid γ -lactone(A11))、*L*-精氨酸(*L*-arginine (A12))、2-羟基苯甲酸(2-hydroxy benzoic acid (C11))、*L*-苯丙氨酸(*L*-phenylalanine (C12))、*D*-苹果酸(*D*-malic acid (H11))和腐胺(putrescine(H12))代谢的缺陷。游动性降低的成因很可能是鞭毛的缺失;菌膜的形成量减少应是脂多糖组分减少或者结构的改变;碳源代谢的缺陷推测为外膜通透性改变所致。由于本研究所得的 MD Tn5 插入位点两翼序列很短(200 bp),还无法确定脂多糖合成基因簇被突变的具体基因,MD 表型变异的相关功能基因及其与这些表型的关联机制成为后续研究工作的主要内容。产酸克雷伯氏菌乃高效自生固氮的植物促长菌,同时其条件性致病频率不断增加,由于细菌的运动能力影响其致病性^[15],也与其在植物根系表面及内部定殖的程度有关,确定其游动性决定性基因,对产酸克雷伯氏菌致病及定殖的控制是有帮助的。

参 考 文 献

- [1] 安千里,杨学健.用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根[J].植物学报,2001,43(6):558-564.
- [2] 陆俊锬,陈俊,康丽华.四株红树林促生菌的遗传分析鉴定及其促生能力[J].微生物学报,2010,50(10):1358-1365.
- [3] 吕泽勋,宋未.高效液相色谱和质谱法对产酸克雷伯氏菌 SG-11 生物合成吡啶-3-乙酸代谢[J].色谱,2000,18(4):328-331.
- [4] 米兰,刘书亮,杨芳,等.茶园土壤中可高效降解氯氧菊酯微生物的筛选及其降解特性研究[J].食品科技,2009(4):2-5.
- [5] KIM D K, RATHNASINGH C, SONG H, et al. Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2013, 116(2):186-192.
- [6] BAI L, WU X, JIANG L, et al. Hydrogen production by over-expression of hydrogenase subunit in oxygen-tolerant *Klebsiella oxytoca* HP1[J]. International journal of hydrogen energy, 2012, 37(17):13227-13233.
- [7] 于兰,董捷.产酸克雷伯氏菌引起食物中毒 15 例报告[J].武警医学,2003,14(2):108-109.
- [8] 任启智,刘洪博,张燕,等.2012 年哈尔滨市细菌感染性腹泻病原菌监测结果分析[J].中国公共卫生管理,2015,31(4):561-562.
- [9] 王正连,李德东.克雷伯氏菌肠炎临床与实验研究[J].中国实用儿科杂志,1993,8(4):223-225.
- [10] 程波,程勇,杨海帆,等.353 例泌尿科住院患者尿培养分离病原菌分布及耐药性监测[J].泸州医学院学报,2013,36(6):597-600.
- [11] 姜健阁,崔福庆,薛万华.产酸克雷伯氏菌致脑膜炎 1 例[J].实用医技杂志,1998,5(5):286-287.
- [12] 孔海深,沈乃仙,朱建国,等.呼吸机传播产酸克雷伯氏菌败血症一例[J].浙江医科大学学报,1994(4):149,184.
- [13] 蒙姣荣,蒙姣荣,欧阳秋飞,等.广西桑树细菌性枯萎病菌致病力和遗传多样性分析[J].基因组学与应用生物学,2014,33(5):998-1006.
- [14] ADLER J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*[J]. Journal of general microbiology, 1973, 74(1):77-91.
- [15] 丘献娟,吴柳,陈正培,等.十字花科黑腐病菌中一个与趋化性相关基因的突变分析[J].基因组学与应用生物学,2015,34(6):1225-1231.
- [16] MOLINA-HENARES M A, DE LA TORRE J, GARCÍA -SALAMANCA A, et al. Identification of conditionally essential genes for growth of *Pseudomonas putida* KT2440 on minimal medium through the screening of a genome-wide mutant library[J]. Environmental microbiology, 2010, 12(6):1468-1485.
- [17] JAILLET J, GENTY M, CAMBEFORT J, et al. Regulation of mariner transposition: the peculiar case of Mos1[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8):e43365.
- [18] KIRBY J R. *In vivo* mutagenesis using EZ-Tn5TM[J]. Methods in enzymology, 2007, 421:17-21.
- [19] BLOEMBERG G V, OTOOLE G A, LUGTENBERG B J, et al. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp [J]. Applied and environmental microbiology, 1997, 63(11):4543-4551.
- [20] ABDEL-SALAM M S, KLINGMÜLLER W. Transposon Tn5 mutagenesis in *Azospirillum lipoferum*: isolation of indole acetic acid mutants[J]. Molecular and general genetics MGG, 1987, 210(1):165-170.
- [21] PISTORIO M, BALAGUÉ L J, DEL PAPA M F, et al. Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP-P64L/S65T[J]. FEMS microbiology letters, 2002, 214(2):165-170.
- [22] 安千里,杨学健,冯利,等.利用激光扫描共聚焦显微成像系统的正交切割成像确证 GFP 标记细菌在植物根内定殖[J].电子显微学报,2010,29(4):354-360.
- [23] BERTSOVA Y V, KOSTYRKO V A, BAYKOV A A, et al. Localization-controlled specificity of FAD: threonine flavin transferases in *Klebsiella pneumoniae* and its implications for the mechanism of Na⁺-translocating NADH: quinone oxi-

- doreductase[J]. Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics, 2014, 1837(7): 1122-1129.
- [24] BOGACHEV A. Flavinylation of Na^+ -translocating NADH: quinone oxidoreductase[J]. Biochimica et biophysica acta BBA-Bioenergetics, 2014, 1837: 79-92.
- [25] JUÁREZ O, BARQUERA B. Insights into the mechanism of electron transfer and sodium translocation of the Na^+ -pumping NADH:quinone oxidoreductase[J]. Biochimica et biophysica acta (BBA)-Bioenergetics, 2012, 1817(10): 1823-1832.
- [26] UNEMOTO T, HAYASHI M, HAYASHI M. Na^+ -dependent activation of NADH oxidase in membrane fractions from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *V. costicola*[J]. Journal of biochemistry, 1977, 82(5): 1389-1395.
- [27] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [28] 王金星,费娜,王睿瑞,等.阴沟肠杆菌 B29 菌株脂多糖合成基因(waaL, waaG)缺失突变株的构建及分析[J].基因组学与应用生物学, 2014, 33(1): 1-9.
- [29] VANDERLINDE E M, MUSZYŃSKI A, HARRISON J J, et al. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility[J]. Microbiology, 2009, 155(9): 3055-3069.

Screening for motility reduction mutants of *Klebsiella oxytoca*

JIANG Shaofeng^{1,2,3} HUANG Jinjing¹ YU Xiaoyu¹

LI Yunfei¹ LAN Yunhua¹ LU Zujun^{1,2}

1.College of Life Science/Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection(Ministry of Education), Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;

2.Key Ecological Laboratory of Wild Animal and Plant Species of Guangxi Colleges and Universities, Guilin 541004, China;

3.College of Agriculture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China

Abstract Methods including insertion mutagenesis with transposon *mTn5gusA-pgfp21*, inverse PCR, DNA sequencing, Southern blot, motility tests and Biolog ECO were used to study the motility correlated genes in *Klebsiella oxytoca* KO108. The results showed that a mutant library of KO108 with Kan resistance, GUS and GFP marker was constructed by conjugating KO108 with pFAJ1819::21/*Escherichia coli* S17.1. Two strains with striking decrease in motility ability, named as MA and MD, were screened from 100 mutants randomly selected from the library. The solo insertion of transposon *mTn5gusA-pgfp21* in the MA and MD was verified with Southern blot by using *gfp* as probe. The size of fragments inserted by *mTn5gusA-pgfp21* was confirmed with the same method. Results of motility tests showed that the movement ability of KO108 was distinctly stronger than that of MA and MD ($P < 0.05$). There was no significant difference of movement ability between MA and MD. Results of inverse PCR and DNA sequencing proved that the flanking sequence of *mTn5gusA-pgfp21* integration sites in the genome of MA was homologous with gene of NAD(P)H quinone oxidoreductase(*NqrA*) for the MA and the flanking sequence of *mTn5gusA-pgfp21* integration sites in the genome of MD was homologous with the gene cluster of lipopolysaccharide synthesis for the MD. The growth curves among the strains of MA, MD and KO108 were not obviously different. Results of velum tests showed that MD was different from KO108 and MA, but it could not be distinguished easily between the later two. Results of assaying carbon source utilization with Biolog ECO showed that MA and MD could not use gamma-D-galactose acid lactone and 2-hydroxy benzoic acid in 72 h. It will lay a solid foundation for further studying genes involved in motility of *K. oxytoca*.

Keywords *Klebsiella oxytoca*; Tn5 insertion mutagenesis; mutants; cell motility

(责任编辑:张志钰)