

百脉根根瘤菌 MAFF303099 Tn5 转座子 插入突变体库的构建及筛选

周向珍 朱 辉

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以百脉根根瘤菌 MAFF303099 为材料, 利用转座子 Tn5-sacB 转座技术得到了约 10 000 个 MAFF303099 的转座接合子, 构建随机插入突变体库进行保藏; 同时建立了一套能从突变体库中快速筛选突变菌株的方法, 且鉴定到共同结瘤基因 *nodB* 的突变体。结果表明: 组成突变体库的接合子基因组中均有 Tn5-sacB 插入, 三亲本转化效率为 3.75×10^{-5} ; 与野生型相比, MAFF303099 *nodB* 的突变体在表型上不能使其宿主百脉根形成根瘤。

关键词 *Mesorhizobium loti* MAFF303099; Tn5 转座子; 突变体; *nodB*

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0016-07

Tn5 转座子插入突变技术已被广泛运用在革兰氏阴性菌的分子遗传学研究中^[1], 用于研究已知基因的功能及探索未知的功能基因。随机插入转座子目前在分子遗传学研究中也作为一种常见的技术手段而应用^[2], 如遗传足迹、基因转录、翻译融合、标记诱变 (STM) 等^[3-4]。根瘤菌和豆科植物共生固氮体系的建立是一个非常复杂的过程^[5], 涉及二者间复杂的信号转导及许多相关基因的表达调控^[6-9]。百脉根根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 是中慢生根瘤菌属内最早完成全基因组测序的菌株^[10]。根瘤菌染色体上的共生岛也首次在 MAFF303099 菌株中被报道。百脉根根瘤菌与百脉根 (*Lotus japonicus*) 的共生在共生固氮体系中极具代表性, 对揭示共生固氮机制有重要的研究价值。

本研究以百脉根根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 为研究对象, 构建 Tn5-sacB 转座子插入突变体, 组成 MAFF303099 菌株的随机插入突变体库。对于细菌突变体库, 一般的筛选方法为反向筛选, 多为筛选细菌生理及发病机制相关基因突变体, 而对百脉根根瘤菌来说, 这种筛选方法并不合适。MAFF303099 菌株中研究较多的为其共生结瘤相关机制, 传统的结瘤实验筛选周期长且易交叉污染。为此, 本研究构建了一套能从 Tn5 转座子插

入突变体库中快速筛选目的突变体的方法, 以期筛选到与共生结瘤过程相关的基因突变体, 为 MAFF303099 与百脉根共生固氮相关机制研究提供试验材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1) 植物、菌株和质粒。百脉根 (*Lotus japonicus*) MG20 种子和大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α /pRK2073^[11] (pRK2073 为辅助转移质粒) 以及根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099, 为笔者所在实验室保存。 *Escherichia coli* S17-1/pMH1701^[12] (pMH1701 为含 Tn5-sacB 转座子的质粒) 由华中师范大学生命科学学院谢波教授馈赠。

2) 酶和试剂。质粒抽提试剂盒、抗生素均购自 Sigma 公司, DNA 聚合酶 (2 $\times$ Ftaq PCR Master-Mix) 和 DNA marker 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 引物合成及 DNA 测序服务由昆泰锐生物技术有限责任公司完成, 其他生化试剂均为上海国药分析纯产品。

3) 培养基。SM 培养基: 5.0 g 甘露醇, 0.5 g KH₂PO₄, 0.1 g NaCl, 0.2 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g CaCl₂ · 6H₂O, 4 mL Rh 微量元素液 (5.0 g

收稿日期: 2017-05-25
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2662015PY230); 国家科技基础性工作专项 (2015FY110700-S3)
周向珍, 硕士研究生, 研究方向: 固氮微生物学。E-mail: xiangzhen711@sina.com
通信作者: 朱辉, 副教授, 研究方向: 共生固氮。E-mail: zhuhui@mail.hzau.edu.cn

H₃BO₃, 5.0 g Na₂MoO₄, 蒸馏水定容至 1 000 mL), 1 mL 混合维生素液(10.0 mg 硫胺素, 10.0 mg 泛酸钙, 10.0 mg 烟酰胺, 1.0 mg 生物素, 蒸馏水定容至 1 000 mL), ddH₂O 定容至 1 000 mL, 调节 pH 至 6.8~7.0。TY 培养基: 5.0 g 胰蛋白胨, 3.0 g 酵母粉, 0.69 g CaCl₂, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 调节 pH 至 7.0。LB 培养基: 10.0 g 胰蛋白胨, 5.0 g 酵母提取物, 10.0 g NaCl, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 调节 pH 至 7.0。

1.2 突变体库的构建

将供体菌 *E. coli* S17-1/pMH1701、受体菌 MAFF303099、辅助菌 *E. coli*/pRK2073 分别接种至含有卡那霉素(50 μg/mL)的液体 LB 培养基、TY 液体培养基及含壮观霉素(50 μg/mL)的液体 LB 培养基中, 供体菌和辅助菌分别在 37 ℃ 培养至 D_{600} 在 0.6~0.8, 受体菌在 30 ℃ 培养至 D_{600} 在 0.8~1.0, 分别以 2:2:1(1 mL:1 mL:500 μL)的比例离心收集并洗涤菌体, 用 60 μL 液体 TY 重悬转移到 TY 平板的微孔滤膜上, 于 28 ℃ 倒置培养 2 d; 用 4 mL 无菌水将菌体从滤膜洗脱下来并将原液稀释 100 倍和 1 000 倍, 涂卡那霉素 SM 平板, 10⁶ 和 10⁷ 倍稀释涂 SM 平板, 28 ℃ 倒置培养 5~7 d, 待长出菌落后计算转化效率并挑取卡那霉素 SM 平板上长出的菌落于新鲜的卡那霉素 SM 平板复筛, 复筛后的菌落转移至卡那霉素 SM 平板、卡那霉素和四环素(10 μg/mL)SM 平板、卡那霉素和 7% 蔗糖的 SM 平板进一步筛选; 用牙签挑取只能在卡那霉素 SM 平板上生长的菌落至卡那霉素 TY 平板, 长出后转移至含卡那霉素 TY 液体培养基的 96 孔板中培养, 并对 96 孔板进行编号(M1-M96), 2 d 后向每孔中加甘油并每孔吸出 50 μL 混合, 于 -80 ℃ 保存备用。

1.3 Tn5-sacB 侧翼基因的扩增

根据 Tn5 序列设计了 3 个嵌套引物 PF₁、PF₂ 和 PF₃ 作为长引物, 短引物为随机简并引物 AD (AD1 或 AD2) 进行三轮 PCR 扩增。以 PF₁ 和 AD 为引物, 菌体 DNA 为模板进行 PCR 扩增; 第二轮 PCR 扩增以第一轮产物为模板, PF₂ 和 AD 为引物, 同理, 第三轮 PCR 扩增以第二轮产物为模板, PF₃ 和 AD 为引物。第三轮反应产物经琼脂糖电泳分离纯化后, 连接到 pMD-19T 载体并测序。

1.4 目的基因突变体的筛选

在目的基因上下游 200~300 bp 处各设计 1 条

引物(F/R), 引物长度约 25 bp, 在转座子 Tn5-sacB 两侧距末端 200 bp 左右处设计引物 Tn-P, 以每个 96 孔板的混合菌液为模板, 引物对 F/Tn-P 和 Tn-P/R 分别扩增, 若 2 对引物均扩增出特异性条带, 且 2 条带大小加起来近似于目的基因的大小, 则将 2 条带切胶回收并测序, 确定是否插入目的基因, 并确定其对应编号的 96 孔板培养皿; 对确定有目的基因插入的 96 孔板培养皿中 96 个突变菌株逐个筛选, 以每孔 1 μL 菌液为模板, 以引物 F/Tn-P 或 Tn-P/R 扩增, 确定目的基因突变菌株所在的孔, 并对其转接扩大培养; 将初步筛选到的目的突变株转接培养物在卡那霉素 TY 平板上划线培养, 分离单菌落; 对划线分离到的单菌落进行 PCR 鉴定, 以 3 对引物 F/Tn-P、Tn-P/R 和 F/R 对目的菌株进行菌落 PCR 鉴定, 若 F/Tn-P 和 Tn-P/R 可以扩增出特异性条带, 且总和为目的基因大小, F/R 不能扩增出任何条带, 即可确定筛选并纯化到目的基因的 Tn5-sacB 插入突变体。

1.5 突变体共生表型观察

1) 百脉根种子的萌发。在 50 mL 无菌三角瓶中倒入适量种子, 浓硫酸处理 8 min, 无菌水漂洗 5~6 次至澄清; 加入次氯酸钠溶液(有效质量分数 0.5%)处理 10~15 min, 无菌水漂洗 4~5 次, 留少量水并置 37 ℃ 培养箱 30 min, 种子吸胀后于 4 ℃ 春化 2 d; 将已吸胀的种子移入含 MS(MS 基础盐培养基, MS 维生素粉 0.103 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL) 平板上, 经 23 ℃ 暗培养 2 d 后, 光照培养 2 d 备用。

2) 百脉根盆栽接种试验。将植株种植在无菌的珍珠岩+蛭石(体积比为 1:1)的混合基质中, 5 d 后接种根瘤菌, 提前 1~2 d 培养根瘤菌至 D_{600} = 0.8~1.0, 集菌后用 1/2 B&D(1 mmol/L CaCl₂, 0.5 mol/L KH₂PO₄, 10 μmol/L 柠檬酸铁, 0.25 mmol/L MgSO₄, 0.25 mmol/L K₂SO₄, 1 μmol/L MnSO₄, 2 μmol/L H₃BO₃, 0.5 μmol/L ZnSO₄, 0.2 μmol/L CuSO₄, 0.1 μmol/L CoSO₄, 0.1 μmol/L NaMoO₄)重悬将其稀释至 D_{600} = 0.02~0.04, 接种到植株根系周围, 期间浇以 1/2 B&D 无氮营养液, 14 d 后观察表型。

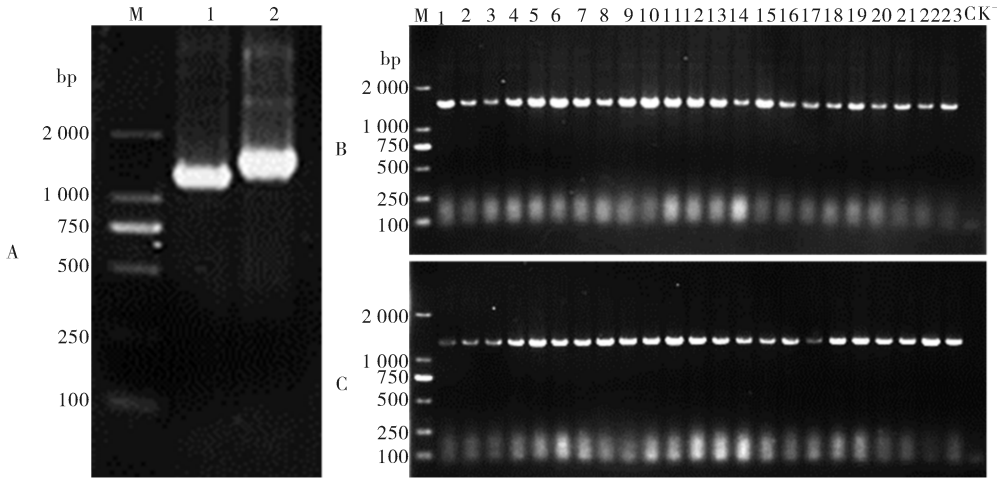
2 结果与分析

2.1 pMH1701 转入 MAFF303099 的鉴定

含 pMH1701 的大肠杆菌、根瘤菌 MAFF303099 及含质粒 pRK2073 的大肠杆菌在滤膜上杂交 2 d 后,

稀释至适宜浓度涂布 SM+Km 平板,待长出菌落进行 PCR 验证。质粒 pMH1701 中含有 Tn5-sacB 随机转座子,Tn5-sacB 中含 *IS50* 及 *sacB* 基因(图 1A)。随机挑取 SM+Km 平板上长出的接合子 23 个,用 2 对引物 Tn-PF/Tn-PR 和 *sacB*-MF/*sacB*-

MR 分别扩增 *IS50* 及 *sacB* 基因,均可扩增出目的条带,大小分别为 1.5 kb(图 1B)和 1.3 kb(图 1C),同时对对照组以野生型根瘤菌为模板,均未扩增出目的条带。说明初筛得到的菌落均有 pMH1701 质粒转入。



A:以 *sacB*-MF/*sacB*-MR 和 Tn-PF/Tn-PR 为引物、质粒 pMH1701 为模板进行 PCR 扩增的 *sacB* 及 *IS50* 片段。泳道 1:*sacB* 扩增片段;泳道 2:*IS50* 扩增片段; M:DNA marker;B-C:菌落 PCR 鉴定。B:*IS50* 扩增片段; C: *sacB* 扩增片段;泳道 1~23 为阳性克隆;CK⁻:以野生型根瘤菌为负对照; M:DNA marker。A:The fragments *sacB* and *IS50* of the plasmid pMH1701 amplified by PCR using the primers *sacB*-MF/*sacB*-MR and Tn-PF/Tn-PR.Lane 1:PCR fragment of *sacB*; Lane 2:PCR fragment of *IS50*; M:DNA marker; B-C:Coloneis detected by PCR.B:PCR fragments of *IS50*; C:PCR fragments of *sacB*; Lane 1-23 are positive colonies; CK⁻:The negative control of wild type; M:DNA marker.

图 1 SM+Km 平板上长出的单菌落中 pMH1701 的鉴定

Fig.1 Identification of pMH1701 in colonies grown on SM+Km plate

2.2 三亲本杂交转化效率的计算

含 pMH1701 的供体大肠杆菌、MAFF303099 及含辅助质粒 pRK2073 的大肠杆菌(1 mL : 1 mL : 500 μ L)在滤膜上杂交 2 d 后,稀释至适宜浓度涂布 SM+Km 及 SM 平板,待长出菌落后统计各个平板菌落数量(表 1),根据公式(转化效率= SM+Km 平板上长出的菌落数/SM 平板上长出的菌落数)得出转化效率为 3.75×10^{-5} 。

表 1 平板菌落数据统计结果

Table 1 Results of colony count

项目 Items	稀释倍数 Dilution ratio			
	SM+Km		SM	
	102	103	106	107
菌落数 Colony count	111	15	282	39
	132	14	296	32
	105	7	344	24
平均值 Average value	116	12	307	32

2.3 Tn5-sacB 插入 MAFF303099 基因组的鉴定

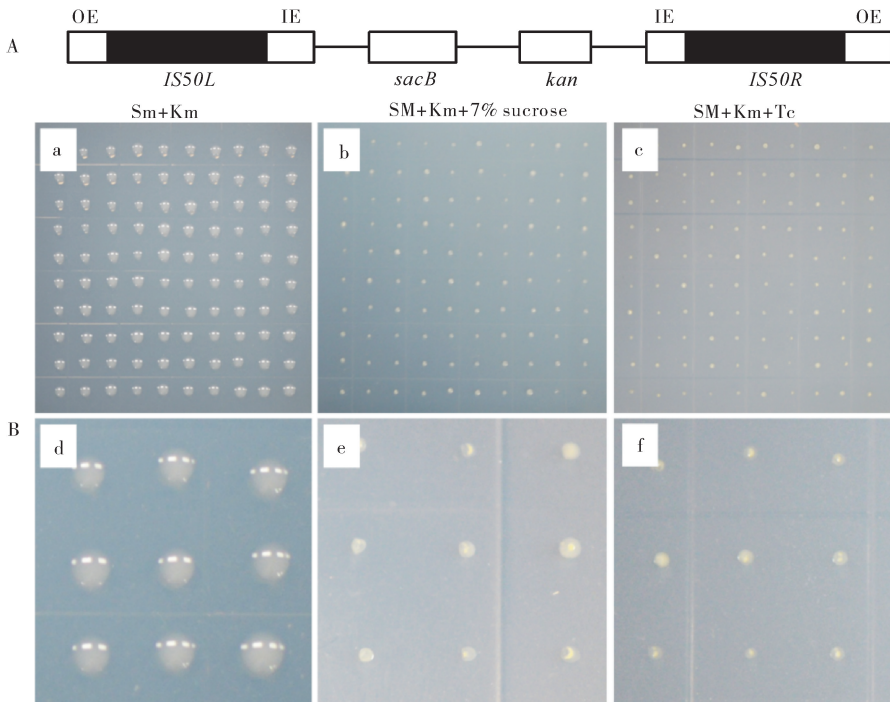
质粒 pMH1701 中可以行使转座功能的为 Tn5-sacB 结构单元(图 2A),Tn5-sacB 中含有卡那霉素抗性基因(*kan*),蔗糖筛选标记基因 *sacB*(可以

合成高分子质量的果聚糖,高分子质量果聚糖积累可造成细胞死亡)。此外,质粒上还有四环素抗性基因,且 pMH1701 为自杀性质粒,转座子 Tn5-sacB 只有插入基因组中才能在根瘤菌中存在。随机挑取复筛后的突变菌株 100 个,分别点板于 SM+Km、SM+Km+Tc(四环素质量浓度为 10 μ g/mL)、SM+Km+7%蔗糖的平板上,SM+Km 平板上的菌株均可以正常生长,SM+Km+Tc 及 SM+Km+7%蔗糖的平板上菌株均不能正常生长(图 2B),证实突变菌株中 Tn5-sacB 均插入基因组中,且突变菌株中已丢失完整质粒 pMH1701。

2.4 TAIL-PCR 扩增 Tn5-sacB 插入位点侧翼序列

为了更直观明确地证实转座子 Tn5-sacB 确实插入根瘤菌 MAFF303099 基因组,并估算其插入位点位于基因编码框的效率,本研究用 TAIL-PCR 的方法鉴定转座子插入的具体位点。选取复筛后的 16 个突变菌株,用 TAIL-PCR 方法扩增并回收其插入位点的侧翼序列,通过 NCBI 的序列比对确定了 10 株突变菌株的具体插入位点(表 2),且有

1 株中 Tn5-sacB 插入在 MAFF303099 的大质粒 pMLa 中的 *mlr0321* 基因,证实突变体库中的菌株确有 Tn5-sacB 插入,且插入基因编码框的效率约为 62%。



A: Tn5-sacB 的结构示意图, 包含 *IS50L*、*IS50R*、*sacB* 和 *kan* 基因, OE 和 IE 为转座酶作用位点; B: 平板鉴定 Tn5-sacB 插入 MAFF303099 基因组; a, d 为 SM+Km 平板上的菌落, d 为 a 的部分放大图; b, e 为 SM+Km+7% 蔗糖平板上的菌落, e 为 b 的部分放大图; c, f 为 SM+Km+Tc 平板上的菌落, f 为 c 的部分放大图。A: Schematic structure of Tn5-sacB, Tn5-sacB contains *IS50L*, *IS50R*, *sacB* and *kan* genes, OE and IE are action sites of transposase; B: Identification of Tn5-sacB inserted in genome of MAFF303099 on plates; a and d are colonies on SM+Km plates, d is partial enlarged of a; b and e are colonies on SM+Km+7% sucrose plates, e is partial enlarged of b; c and f are colonies on SM+Km+Tc plates, f is partial enlarged of c.

图 2 基因组中 Tn5-sacB 的鉴定

Fig.2 Identification of Tn5-sacB in genome

表 2 TAIL-PCR 鉴定 Tn5-sacB 插入位点数据

Table 2 The data of Tn5-sacB insertion site identified by TAIL-PCR

基因 ID 号 ID	基因位置 Location	插入位点 Insertion site	基因产物 Gene product
<i>mll2850</i>	Chr:2287737..2288495	2 288 495	未知蛋白 Unknown protein
<i>mll2877</i>	Chr:2314592..2317951	2 317 274	假定蛋白 Hypothetical protein
<i>mll3110</i>	Chr:2500169..2500591	2 500 580	未知蛋白 Unknown protein
<i>mll5679</i>	Chr:4565948..4566850	4 566 723	假定蛋白 Hypothetical protein
<i>mll6391</i>	Chr:5216029..5216304	5 216 053	未知蛋白 Unknown protein
<i>mll8552</i>	Chr:7012986..7014623	7 013 681	未知蛋白 Unknown protein
<i>mll8554</i>	Chr:7015794..7016855	7 016 780	DPM1 Dolichol-phosphate mannosyltransferase
<i>mll6358</i>	Chr:5172841..5175279	5 173 284	未知蛋白 Unknown protein
<i>mlr0321</i>	Chr:219149..220489	219 382	分泌蛋白 Secretion protein
<i>mll0826</i>	Chr:654855..656228	655 814	2-脱氢-3-脱氧葡萄糖二醛缩酶 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase

2.5 突变体库中 MAFF303099 *nodB* 基因突变体的鉴定

在 *nodB* 基因上下游 200~300 bp 处各设计 1 条引物 *nodB*-Tn5-F/*nodB*-Tn5-R, 在转座子 Tn5-

sacB 两侧距末端 200 bp 左右处设计引物 Tn-P。引物对 *nodB*-Tn5-F/Tn-P 及 Tn-P/*nodB*-Tn5-R 分别以编号为 M1-M96 的 96 孔板中的混合菌液为模板扩增, 分别对有特异性条带扩增出的编号为 M7

及 M48 两个 96 孔板中的菌落进行验证,筛选到了 2 个*nodB* 基因的 Tn5-sacB 插入突变体,以引物 *nodB*-Tn5-F/Tn-P、Tn-P/*nodB*-Tn5-R 及 *nodB*-Tn5-F/*nodB*-Tn5-R 验证无误(图 3A、B),即得到 2 个 *nodB* 不同位点插入的突变体,命名为

MAFF303099/*nodB*-1 和 MAFF303099/*nodB*-2, 简称为 M-*nodB*-1 和 M-*nodB*-2。并通过测序确定了其插入位点(图 3C),发现 M-*nodB*-1 中转座子插入 *nodB* (Chr: 4995963.. 4996622) 基因中,而 M-*nodB*-2 转座子插入位点在 *nodB* 后 198 bp 处。

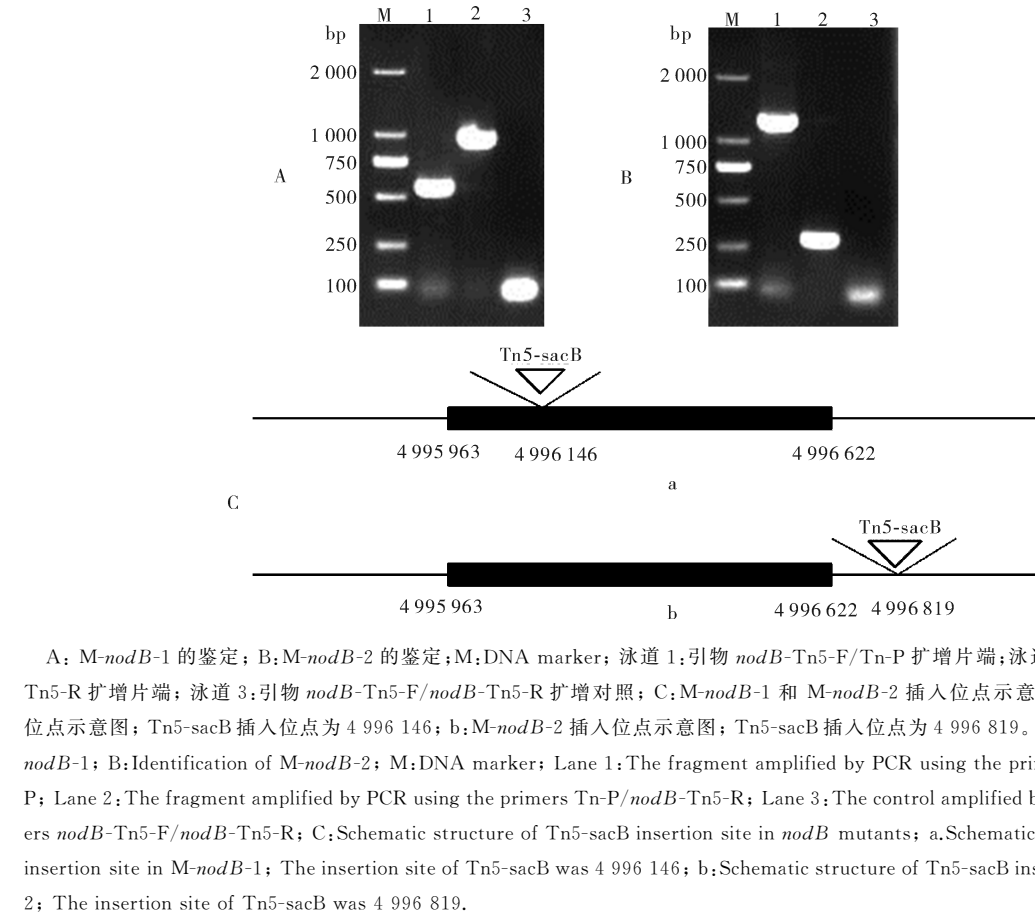


图 3 *nodB* 突变体的鉴定

Fig.3 Identification of *nodB* mutants

2.6 MAFF303099*nodB* 的突变体共生表型分析

野生型百脉根 MG-20 盆栽生长 5 d 后,分别接种野生型 MAFF303099、MAFF303099/*nodB*-2 及 MAFF303099/*nodB*-1,接种后 12 d 观察表型。结果表明;MAFF303099/*nodB*-2 可以使百脉根形成正常根瘤,与野生型无异;MAFF303099/*nodB*-1 不能使百脉根形成根瘤(图 4),说明 MAFF303099 中 *nodB* 基因的突变体不能使百脉根结瘤。

3 讨 论

细菌突变体的构建可以通过对其染色体的整合或敲除来实现,主要遗传操作手段有同源重组、位点特异性重组、转座子介导的基因整合^[13]。转座子介

导的基因整合不需要同源序列的匹配^[14],可以广泛地用于产生随机突变体。这也使转座子介导的遗传工程在宿主细菌生理学和发病机制研究中占据重要位值。Tn 系列的转座子在细菌突变体的构建中较为常用^[15]。Tn5 转座技术构建突变体相较于传统的物理化学诱变等技术有着明显的优势。含 Tn5 的质粒均为自杀性质粒,其转座区域中的抗性筛选基因也保证了转座子只有插入宿主基因组才能在抗性筛选条件下存活。Tn5 插入的随机稳定性为突变体构建提供了更多可能。Tn5 系列的衍生物也被广泛运用,如构建于 pUT 质粒上的一系列 mini-Tn5^[16]。根瘤菌中常见的定点突变基因的方法为同源重组交换。Patsarin 等^[17]用同源重组的方法在



百脉根 MG20 野生型植株分别接种野生型 MAFF303099、MAFF303099/*nodB*-2 及 MAFF303099/*nodB*-1,12 d 后观察植株表型。
a:依次为接种野生型根瘤菌、接种 MAFF303099/*nodB*-2 及接种 MAFF303099/*nodB*-1 的植株；b:a 图植株的根部放大图。Phenotype of *Lotus japonicus* MG20 wild type, inoculated with wild type MAFF303099, MAFF303099/*nodB*-2, and MAFF303099/*nodB*-1 in 12 days.a: Follows are control plant, inoculated with wild type MAFF303099, the test plants, inoculated with MAFF303099/*nodB*-2 and MAFF303099/*nodB*-1; b: The roots partial enlarged of a.

图 4 MAFF303099 *nodB* 突变体共生表型

Fig.4 Symbiotic phenotype of the *nodB* mutant of MAFF303099

Mesorhizobium loti R7A 中构建了十多种结瘤基因的相关突变体,如 *nodABCD* 等结瘤关键基因及结瘤调控基因 *nodZ*、*nodS*、*nolL* 等的突变体。同源重组交换构建突变体可以准确得到目的菌株,其弊端是耗时周期长、突变效率低。前期实验发现,在 MAFF303099 中利用同源重组突变效率极低,很难得到目的突变株。本研究利用 Tn5-sacB 转座子构建了百脉根根瘤菌 MAFF303099 的插入突变体库,包含约 10 000 个插入突变体,并构建了一套快速筛选突变体的方法,可以在 1 周内分离纯化到目的突变菌株,但转座子插入的随机性及偏好性可能会导致转座子的插入位点并不在基因编码框内。TAIL-PCR 鉴定结果说明,本研究中转座子插入菌株基因组编码框的效率约为 62%,对筛选相关突变体影响并不大。本研究构建的突变体库中约有 10 000 个突变菌株,在筛选方法已经成熟的前提下,还可以通过扩大突变体库来得到更多的有效插入突变体。

在种类繁多的根瘤菌中,均具有负责合成结瘤因子(*nod* factor)核心结构的 N-酰化寡糖的保守的 *nodABC* 基因,其中 *nodB* 负责合成低聚壳聚糖脱乙酰酶^[18],本研究中发现 MAFF303099 *nodB* 基因的突变体使其宿主百脉根不结瘤,与预期的 *nodB* 突变体因不能合成完整的结瘤因子而不能使宿主结瘤的表型一致。但在 *Mesorhizobium loti* R7A 中,

nodB 的突变体可以使百脉根正常结瘤^[17]。在 R7A 中可能是菌株中其他脱乙酰酶代替了 NodB 的作用,允许宿主结瘤,但 MAFF303099 中可能有所不同,导致了宿主不结瘤的现象。本研究构建的 MAFF303099 突变体库为共生相关研究提供了重要材料,快速筛选方法也更利于快速定位并获得目的突变菌株,同时 *nodB* 突变体相关表型的发现,也说明 NodB 在不同根瘤菌中的功能还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 年洪娟,陈丽梅,李昆志.Tn5 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用[J].中国生物工程杂志,2009,29(12): 114-118.

[2] CHOI K H,KIM K J.Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria[J].J Microbiol Biotechnol,2009,19 (3):217-228.

[3] GRANT A J,COWARD C,JONES M A, et al. Signature-tagged transposon mutagenesis studies demonstrate the dynamic nature of cecal colonization of 2-week-old chickens by *Campylobacter jejuni* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (12):8031-8041.

[4] SMITH V,CHOU K N,LASHKARI D,et al.Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting[J].Science,1996,274(5295):2069-2074.

[5] REMIGI P,ZHU J,YOUNG J P,et al.Symbiosis within sym-

biosis; evolving nitrogen-fixing legume symbionts[J]. Trends Microbiol, 2016, 24(1): 63-75.

[6] WANG D, YANG S, TANG F, et al. Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism[J]. Cell Microbiol, 2012, 14(3): 334-342.

[7] 李振鹏, 马春草, 谢福莉, 等. 华癸中慢生根瘤菌 7653R SraG sRNA 的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 51-57.

[8] 路达, 彭杰丽, 谢福莉, 等. 华癸中慢生根瘤菌 7653R MCHK_8182 基因的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(4): 56-61.

[9] 田梦洋, 何冬兰, 李晓华, 等. 豌豆根瘤菌 ohrB 基因的抗氧化和共生固氮表型[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 54-60.

[10] KANEKO T, NAKAMURA Y, SATO S, et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*[J]. DNA Res, 2000, 7(6): 381-406.

[11] LEONG S A, DITTA G S, HELINSKI D R. Heme biosynthesis in *Rhizobium* identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*[J]. J Biol Chem, 1982, 257(15): 8724-8730.

[12] HYNES M F, QUANDT J, O'CONNELL M P, et al. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene[J]. Gene, 1989, 78(1): 111-120.

[13] BAITIN D M, BAKHLANOVA I V, KIL Y V, et al. Distinguishing characteristics of hyperrecombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* acting in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(16): 5812-5820.

[14] REZNIKOFF W S. Transposon Tn5[J]. Annu Rev Genet, 2008, 42: 269-286.

[15] 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-negative eubacteria[J]. J Bacteriol, 1990, 172(11): 6568-6572.

[16] AMADOR C I, LOPEZ-SANCHEZ A, GOVANTES F, et al. A *Pseudomonas putida* *cbrB* transposon insertion mutant displays a biofilm hyperproducing phenotype that is resistant to dispersal[J]. Environmental microbiology reports, 2016, 8(5): 622-629.

[17] RODPOTHONG P, SULLIVAN J T, SONGSRIROTE K, et al. Nodulation gene mutants of *Mesorhizobium loti* R7A-*nodZ* and *nolL* mutants have host-specific phenotypes on *Lotus* spp. [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2009, 22(12): 1546-1554.

[18] JOHN M, ROHRIG H, SCHMIDT J, et al. Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(2): 625-629.

Constructing and screening a Tn5 transposon inserted mutant library of *Mesorhizobium loti* MAFF303099

ZHOU Xiangzhen ZHU Hui

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract *Mesorhizobium loti* MAFF303099 was used to construct a random mutant library with transposon Tn5-sacB mutagenesis technique. A total of about 10 000 independent mutants were obtained. A method for rapidly identifying mutants from the library was established. The mutant of the symbiotic nodule gene *nodB* was identified through screening the mutant library. The results showed that the transposon Tn5-sacB was inserted into the genome DNA of all the mutants in the mutant library, with the tri-parental mating transformation efficiency of 3.75×10^{-5} . The MAFF303099 mutant of *nodB* did not form nodules on *Lotus japonicus* roots comparing with the wildtype.

Keywords *Mesorhizobium loti* MAFF303099; Tn5 transposon; mutant; *nodB*

(责任编辑: 张志钰)