

草生欧文氏菌CSH1065Fib 基因定位、克隆 及酶切分析

赵 扬

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

P. Tenning

(PGS遗传工程公司, 根特, 比利时)

利用Tn5诱导突变, DNA分子杂交及克隆技术发现并证实了草生欧文氏菌 *Erwinia herbicola* CSH1065Fib (Funginhibition) 基因定位于其180kb质粒上, 包含彼此分离的8.3、8.5、8.6和9.5kb EcoRI片段, 建立了CSH1065质粒基因组pBR325及pLAFB1基因库, 通过DNA酶切分析及亚克隆 (Subclone) 证实获得了CSH1065部分Fib基因(群)及其物理图谱。

关键词 Fib基因; Tn5诱导突变; DNA分子克隆; cosmid基因库

细菌抑制真菌的本质是能分泌某种抗真菌化合物 (Fungicide), 对这类化合物的结构及其在细胞内的生化代谢过程, 人们已进行了大量研究^[1,2]。但有关这些抗真菌化合物的合成及其分泌相关的基因 (Fib) 的分子生物学的研究, 近些年才有报道^[3,4]。*E. herbicola* CSH1065是比利时PGS遗传工程公司微生物组从植物根际分离得到的一株对许多植物病原真菌具有广泛抗性的细菌^[5]。本文通过对*E. herbicola* CSH1065Fib基因的Tn 5诱导突变分子遗传学定位, cosmid 克隆, 物理图谱分析及互补实验, 证明了*E. herbicola* CSH1065Fib 基因位于细胞内 180 kb 的质粒上^[6,7], 并且可能涉及四个彼此分离的基因区域, 它们大小分别约为 8.3、8.5、8.6及9.5kb的EcoRI片段。

材料与 方法

(一) 材料

1. 菌株: *E. herbicola* CSH 1065; 实验中使用的CSH 1065 Rif^R是 CSH1065 经连续培养后(100μg/ml的利福霉素(Rif)筛选)所得的天然Rif^R突变株, CSH1065 Rif^R与 CSH 1065 表型及抗真菌活性相同(材料未发表)。*E. coli* HB101; F⁻hsa1₂ (r₅m₅) recAB ara-14 ProA₂ lacY₁ galK₂ rspl₂ (Sm^r) xy1-5 mtl-1 supE44 λ⁻; *E. coli* K514; thi⁻ thr⁻ leu⁻ tanA lacA lacY supE r_K⁻ n_K⁻, *E. coli* K111; thi⁻ thr⁻ leu⁻ tanA lacI-lacZΔm15 lacY⁺ supE p_i⁺ r_K⁻ n_K⁺/F'。

2. 质粒: pBR325Ap^RTc^RCm^R^[8], pUC 8 Ap^R^[9], pRK2013Km^R^[10], pLAFB1 Tc^R 是将pLAFR 1^[11]的EcoRI位点转换成BamHI位点。

3. 抗菌素使用浓度: 氨基青霉素 (Ap)100μg/ml, 氯霉素 (Cm)25μg/ml, 四环素 (Tc) 10 μg/ml, 利福霉素 (Rif)

本文于1988年1月22日收到。

100 μ g/ml, 卡那霉素 (Km) 25 μ g/ml, 链霉素 (Str) 100 μ g/ml。

4. 培养基及培养条件: LB 培养基 (液), x-gal 培养基按文献 [12]; PDA 培养基 (Difco); 真菌孢子培养基: 融化 PDA 培养基冷却到 45 $^{\circ}$ C 加入适量抗菌素 (Km & Rif), 按 5.9×10^6 孢子/40ml PDA 培养基比例加入豆刺盘孢 (*Colletotrichum lindemuthianum*) 孢子悬液 (PGS 微生物组制) 混匀后倒平皿。

所有 *E. coli* 菌株以 LB 培养基 (液) 37 $^{\circ}$ C 培养过夜; *E. herbicola* CSH 1065 以 LB 培养基 (液) 28 $^{\circ}$ C 培养过夜。

5. 缓冲液: TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L EDTA, pH7.9; TE₂ 缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl, 20mmol/L EDTA, pH8.0; TES 缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA, 15%蔗糖, pH8.0, PBS 缓冲液 (Oxoid)。琼脂糖凝胶电泳缓冲液 (1L, 10 \times): Tris 109g 硼酸钠 55.5%, EDTA 0.5mol/L, pH8.0, 0.5 μ g/ml 溴化乙锭。溶菌液 [13]: 3% SDS, 50mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris, pH12.4 (用 3mol/L NaOH 调) DNA 限制性内切酶缓冲液 (10 \times), T4-DNA 连接酶缓冲液 (10 \times), 缺刻转译缓冲液 (10 \times), 小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 缓冲液 (10 \times) 按文献 [12] 配制。

6. DNA 酶: DNA 限制性内切酶, DNA 聚合酶 (I), T4-DNA 连接酶, DNA 内切酶, 小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 来自以下厂家: Bethesda, Research Lab, Pharmacia, Biolabs, Amersham 各种酶的使用参照厂家提供的使用说明书及文献 [12] 的方法。

7. 同位素标记核苷酸: 实验中用 32 P 标记的 dCTP (Amersham, 3000mCi/ml) 标记 DNA。

(二) 方法

1. DNA 制备及电泳: 细菌培养液经离心沉淀, 悬液用 5% Sarkosyl 及 2.5 mg/ml 蛋白酶 K (Sigma, Co) 混合溶菌, 苯酚-氯仿 (1:1) 抽提, 异丙醇沉淀制备总体 DNA; 按文献 [14] 的方法小规模制备 cosmid DNA; 按文献 [12] 用溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心法大量分离纯化质粒及 cosmid DNA, 实验中采用 Beckman 超速离心机, 在 Vti65 转头上 55000rpm \times 15h 离心, 采用文献 [13, 15] 的方法小规模制备 CSH 1065 质粒 DNA; *E. coli* 质粒制备采用溶菌酶 (10 mg/ml) (Sigma) 溶菌, 用苯酚、氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提, 异丙醇沉淀的方法; 电泳分离的 DNA 片段纯化, 采用 -70 $^{\circ}$ C—37 $^{\circ}$ C 冻融 3 次离心, 苯酚-氯仿 (1:1) 抽提上清液, 异丙醇沉淀的方法。

电泳采用水平琼脂糖凝胶电泳, DNA 酶切分析用 1% 的凝胶, 含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭; 大质粒 DNA 用 0.7% 的凝胶, 电泳完成后在 0.5 μ g/ml 溴化乙锭溶液中染色 30min。

电泳照像以 AppliTek 紫外透射灯为光源, POLAROID 一次成像。

2. 感受态细胞 (*E. coli*) 的制备及其转化: 挑单细胞菌落接种于 5 ml LB 培养液中培养过夜, 参照文献 [12] 的方法, 最终将细胞悬浮于 2ml 0.1mol/L MgCl₂ 中并加丙三醇至终浓度为 15%, 以 100 μ l 分装于 Eppendorf 管中, -70 $^{\circ}$ C 贮存备用。

细胞转化时, 每管置冰上化冻的感受态细胞, 加入 6—10 μ g 经 65 $^{\circ}$ C 水浴 10min 的含 0.1—0.5 μ g DNA 的连结反应混合物, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 加入 1ml LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 保温致载体标记基因充分表达。实验中 Ap^R 基因保温 30min, Cm^R、Km^R 或 Tc^R 基因保温 2h。再将菌液涂布在含上述

抗菌素的培养基上进行筛选。

3. 细菌 *E. coli* HB 101 激活及体外重组噬菌体的转染: 挑 HB101 单细胞菌落接种于 5ml 含 0.1% 麦芽糖的 LB 液中培养过夜, 6000rpm × 6min (Sorvall RC-3B) 离心细胞悬浮于 2.5ml 0.01mol/L $MgSO_4$ 溶液中, 转染时取 100μl 菌液加入 50μl 体外重组噬菌体液并按厂家提供的使用说明进行转染, 最终将菌液涂布于含抗菌素的 LB 培养基上, 培养过夜, 筛选转染子。

4. DNA 分子克隆: 按文献〔12〕的方法, 细胞总体 DNA、载体 DNA 经限制性内切酶完全酶解, 苯酚-氯仿 (1:1) 纯化, 异丙醇沉淀, CIP 处理载体 DNA, DNA 连接反应及细胞转化按文献〔3〕。实验中使用 T4-DNA 连接酶。

Cosmid 克隆按文献〔12〕的方法, 采用 Sau 3 A 部分降解的 CSH 106 质粒 DNA (20μg DNA, 1u Sau 3 A 作用 10—15 min) 及 pLAFB1 的 BamHI 位点。经苯酚-氯仿 (1:1) 纯化的 DNA 用 Amersham 的 λ 噬菌体体外包装系统, 按厂品使用说明进行 cosmid 体外包装及转染。

5. CSH 1065 质粒基因组的基因库: 将 CSH1065 质粒 DNA BamHI 酶解片段克隆到 pBR325 中, 转化 *E. coli* K 514 并筛选 $Ap^R Tc^R$ 转染子得基因库, 通过 BamHI 酶切分析确定外源插入率及插入片段平均大小, 根据公式 $N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$ 计算 CSH 1065 质粒基因组 pBR 325 基因库大小〔12〕。

CSH1065 质粒基因组 pLAFB1 cosmid 基因库通过筛选 Tc^R 转染子获得, 用 Bgl II 酶切分析估计 cosmid 外源插入率及插入片段平均大小, 依上述公式计算 cosmid 基因库大小。

6. Fib 基因活性测试, 诱导突变及

其片段分离: 将被试菌株接种到新制孢子培养基上, 28℃ 培养 48h, Fib^+ 菌株可产生明显真菌抑制圈, 而 Fib^- 则无抑制圈产生。

利用 PMO 75::Tn5 突变诱导体系〔16〕, 通过筛选 $Km^R Rif^R$ 接合转移子获得 Tn5 插入突变株。对它们进行 Fib 活性测试得到 CSH1065 Fib^- 突变株。

将 CSH1065 Fib^- 的总 DNA BamHI 酶解片段克隆到 pBR 325 中, 转化 *E. coli* K514 筛选 $Ap^R Km^R Tc^R$ 转染子〔17〕得到含 Tn5 Km 基因及其侧翼 Fib 基因片段 FF (Flanking fragment) 的克隆。

7. DNA 分子杂交: DNA 分子吸附转移, 缺刻转译及放射性探针分离按文献〔12〕的方法。用 Hyband-N 膜进行 DNA 分子杂交, 杂交反应及其洗涤按厂家提供的使用手册进行。放射自显影用富士 X 光感光胶片, 在 -70℃ 下进行 2h 到 3 天。

进行菌落原位 DNA 分子杂交时, 将待筛选的克隆及阳性、阴性对照的菌株转接到每孔含 250μl 抗菌素 Ap 的 LB 培养液的 microtitre 培养皿中 (6 × 12) 培养过夜, 再用 microtitre 将培养皿中的克隆转接到平铺于 LB 培养基 (含适当抗菌素) 的 Hyband-N 膜 (灭菌) 上, 培养过夜将膜取下按 Hyband-N 使用手册提供的方法进行菌落原位溶菌, 置 80℃ 烘烤 2h, 按文献〔12〕的方法进行预杂交, 分子杂交及洗涤。预杂交时, 加入 0.5ml 1mg/ml 的热变性鲑鱼精子 DNA (Amersham), 洗涤在 6 × SSC, 5 × Denhardt's, 3% SDS 液中进行, 用硬塑料薄片括洗菌落生长面。

用 AGFA-GEVAERT GEVAMAT-LC 60 冲洗机进行 X 光胶片显影。

8. 接合转移及互补实验: 将受体、供体、辅助质粒细胞经 LB 液培养过夜, 各取 1ml 沉淀细胞 50μl PBS 悬浮, 将三种

菌液混匀, 移到LB培养基上铺平, 在超净工作台上风干, 28℃培养过夜, 括下菌斑用1ml PBS悬浮, 制成 10^{-1} — 10^{-10} 稀释液, 以受体细胞计算接合转移率。

进行 $pYD(Ap^R Cm^R) \times CSH 1065 M 7 (Rif^R Km^R) \times pRK2013(Km^R)$, 取 10^{-1} 接合后稀释液每200 μ l铺于 $Ap^R Km^R$ LB培养基上, 筛选接合后转移子。取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 接合后稀释液每200 μ l铺于 Rif^R LB培养基上, 计算受体数, 对所得的接合后转移子测其Fib⁺活性。

进行 $C39(Tc^R) \times CSH1065M(Rif^R Km^R) \times pRK2013(Km^R)$, 取 10^{-1} 接合后稀释液每200 μ l铺于 $Tc^R Km^R$ LB培养基上, 筛选结合后转移子, 取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 接合后稀释液每200 μ l铺于 Rif^R LB培养基上, 计算受体数, 对所得的接合后转移子测其Fib⁺活性。

9. C39插入片段物理图谱: 利用亚克隆(Subclone)的方法, 将C39的插入片段酶解克隆到pBR325的EcoRI、BamHI位点及pUC8的HindIII位点。并分别转化*E. coli* K514及*E. coli* K111, 筛选 $Ap^R Cm^R$, $Ap^R Tc^R$ 及 $Ap^R lacZ^-$ 转化子。通过对这些克隆的酶切分析, 同时对C39的酶切分析结果, 推导出C39中插入片段的物理图谱。利用C39作探针对CSH1065Fib⁻突变株总DNA BamHI降解产物进行分子杂交, 推出C39插入片段中包含的Fib⁻突变位点及其相对位置。

结果与讨论

(一) CSH 1065 Fib⁻ 突变株的获得及其Fib基因定位

从筛选 $Km^R Rif^R$ 接合转移子获得1695个Tn5插入突变株, 对它们进行抗真菌生长活体测试, 筛选出11个Fib⁻突变株CSH

1065M1-M11。其中CSH1065M11与CSH1065M1-M10不同, 表型呈浅黄色, 而不是桔黄色, 在以后的研究中发现CSH1065M11在Fib基因区域发生很大的缺失(材料未发表), 没有对它作进一步研究。

从CSH1065M7总DNA pBR325的BamHI克隆中, 通过筛选 $Ap^R Km^R Tc^R$ 转化子, 得到含Tn5插入Fib基因区侧翼FF片段的克隆pBM。对pBM作酶切分析(图1)确定Fib基因片段FF为1.8kb, 无BglI, HindIII, EcoRI, EcoRV, SalI, HapI切点。

用pBM插入片段对制备的CSH1065总体质粒及染色体DNA进行分子杂交(图版I-1), 发现CSH1065质粒及染色体DNA都给出杂交信号, 由此推断质粒上存在Fib基因同源区, 但不能确定染色体DNA杂交信号来源, 因为按文献[16]方法制备质粒DNA不能保证不损伤质粒而使其在电泳时迁移到染色体DNA位置。或染色体DNA本身具Fib同源区, 也可能两种情况兼而有之。为此, 利用pBM中

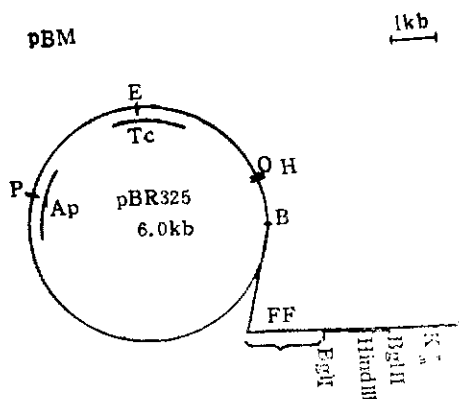


图1 pBM的物理图谱

Fig.1 pBM Physical map

插入片段包括侧翼1.8kb FF片段Tn5末端反向重复序列(粗线部分)及Tn5的 Km^R 基因。

The insert fragment includes 1.8kb flanking fragment(FF), Tn5 inverse repeat sequence (heavy line) and Tn5 kanamycin resistant gene(Km^R).

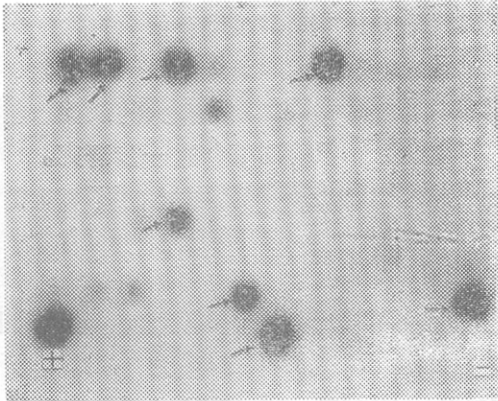


图 2 以FF为探针对CSH1065质粒基因组
pBR325基因库进行菌落原位DNA分子杂交
Fig.2 In situ colony hybridization for the
pBR325 gene bank of CSH1065 plasmid
genome with FF probe
(+) 为阳性对照 pBR 菌落, (-) 为阴性对照
pBR325菌落, 箭头表示阳性反应菌落pYD

Tn 5 片段的末端反向重复序列 Bgl I / BamH I 片段对用文献 [15] 的方法制备的 CSH1065M1—M10 总体DNA进行分子杂交 (图版 I -2,5), 表明CSH1065M 1—M10的插入突变都位于质粒上, 与染色体无关, 这证明了CSH 1065 Fib基因定位于其180Kb^[8,9]质粒上。

(二) CSH 1065 质粒基因库建立, Fib基因克隆分离及体外互补

为获得完整Fib基因, 将CSH1065质粒DNA BamHI降解片段克隆到pBR325 BamHI位点, 筛选获得68.3%的Ap^rTc^s重组子, 任选其中9个进行BamHI酶切分析(图版 II -2)表明, 真正外源插入重组子为62.5%, 插入片段平均大小为4.8kb, 由此可计算出我们获得的基因库为含264个Ap^rTc^s克隆。利用pBM片段对基因库进行菌落原位杂交(图2), 获得阳性克隆pYD 11个, 对它们进行酶切分析(图版 II -3)表明, 只有8个真正含有2.3Kb BamHI片段(CSH1065M7 突变位置即此2.3kb片段, 见C39物理图谱), 利用这些

克隆分别对CSH1065 M7 进行互补实验, 获得转移频率为 5.8×10^{-6} /受体细胞的Ap^rKm^r接合后转移子。抗真菌活性测试表明所有以上测试的pYD克隆对CSH1065 M7 Fib⁻都无基因互补作用, 说明这些克隆没有包含CSH1065M7 Fib⁻基因互补所需要的全部Fib基因。

为了克隆足够大的DNA片段以便进行Fib基因分析, 将Sau 3 A部分降解的CSH1065质粒DNA克隆到pLAFB 1的BamHI位点, 通过 λ 噬菌体体外包装, E. coli HB101的转染及Tc^r转染子筛选, 建立了CSH1065及CSH1065M 9质粒基因组cosmid基因库。从CSH1065M 9基因库中, 通过进一步筛选Km^r克隆获得6个含有Tn5插入的cosmid M 9 C1—C 6, 对它们进行Hind III酶切分析(图版 II -1)表明它们都含特征3.3Kb Tn 5 Hind III片段^[19], 进一步酶切分析, 获得了其中插入片段最大(20kb)的cosmid M9C1的物理图谱及CSH1065 M 9 Tn 5插入位点(材料未出示)。从CSH1065基因库任挑10个克隆进行Bgl II酶切分析(图版 II -4), 表明基因库含外源插入片段占70%, 插入片段平均大小为20.5kb, 由此可计算

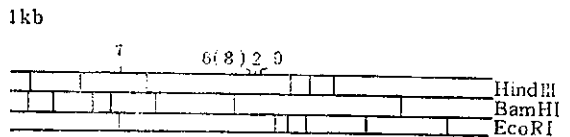


图 3 CSH1065 Fib基因cosmid克隆C39 EcoR I、
BamH I、HindIII物理图谱

Fig.3 CSH1065 Fib gene cosmid C39 physical
map. number 2, 6(8), 7, 9 indicate
the Tn5 inserts mutagenesis sites of
CSH1065 M2, M6(8), M7 and M9

出我们获得的基因库含54个Tc^r克隆。对比M9C1物理图谱对CSH1065基因库中的cosmid克隆进行酶切分析, 找出了覆盖整个M 9 C 1区域的cosmid C39, 并利用

DNA 分子杂交证实了这一结果 (材料未出示), 用 C39 作探针对 CSH1065 M1—M10 总 DNA BamHI 降解产物进行分子杂交, 发现 C39 区域包含 CSH1065 M2, M6(M8), M7, M9 的突变位点 (参看图 3)。测试 C39 的抗真菌生长活性, 表明阴性。以 C39 对 CSH1065 M2, M6, M7, M9 进行基因互补实验, 获得转移频率为 4.4×10^{-5} /受体细胞的 Tc^R Km^R 接合后转移子, 测试其抗真菌生长活性, 结果都是阴性。说明 C39 仍没有完整的包含 Tn 5 插入突变影响的整个 Fib 基因区, 此外测试了 200 个 cosmid 克隆约 4 倍于整个基因库 (54 个) 的抗真菌生长活性, 结果都为阴性。还用上述 200 个 cosmid 克隆分别对 CSH1065 M9、CSH1065 M5 进行基因互补实验 (在 microtitre 中进行) 结果也是阴性, 从以上结果, 我们推测 CSH1065 Fib 基因可能涉及几个大的基因区域, 它们彼此间有一定距离, 很可能相互间有一定作用顺序。

(三) CSH1065 部分 Fib 基因物理图谱及其 Fib 基因排布初步推测

通过亚克隆, 利用 pBR325、pUC8 获得了 C39 插入片段的 EcoRI、BamHI、HindIII 克隆, 利用酶切分析, DNA 分子杂交, 获得了 C39 插入片段 (25kb) 即 CSH1065 部分 Fib 基因的物理图谱。C39 与 CSH1065 M1—M10 总 DNA 酶解产物分子杂交, 确定了 C39 插入片段包含 CSH

1065 M2, M6(M8), M7, M9 的突变位点及其确切位置 (图 3)。

以 Tn 5 末端反向重复序列的 BglI / BamHI^[10] 片段为探针对 CSH1065 及其 Fib⁻ 突变株总体 DNA EcoRI 降解产物进行分子杂交 (图版 I-3,4), 表明 CSH1065 Fib⁻ 突变位点分别处于四个不同的 EcoRI 片段上; 即 CSH1065 M2, M6(M8), M7, M9 处在同一 8.3kb 片段上, CSH1065 M1, M3 处在同一 8.6kb 片段上, CSH1065 M5, M10 处在同一 9.5kb 片段上, 而 CSH1065 M4 处在 8.5kb 片段上。从这里及 C39 物理图谱可初步推断: CSH1065 Fib 基因可能由彼此分离的几个基因群组成, 这种分离的基因群在调控过程中可能有一定的作用顺序。

(四) CSH1065 Fib⁻ 突变株之间的体外互补

对以上四类突变区域不同的 CSH1065 Fib⁻ 突变株进行彼此间的体外基因互补 (共合成互补)^[10] 实验表明, CSH1065 M4 与 M2(M6, M7, M9), CSH1065 M4 与 M5(M10), CSH1065 M4 与 M1(M3), M2(M6, M7, M9), CSH1065 M5(M10) 与 M1(M3), M2(M6, M7, M9), CSH1065 M5(M10) 与 M1(M3) 的共培养混合物没有一个具抗真菌生长 (Fib⁺) 活性, 推测可能由于涉及 Fib 基因功能有关的酶并不是可分泌性的, 不能穿过彼此间的细胞膜屏障实现功能互补。

参 考 文 献

- [1] Gurusidiah, S. et al.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29:482—495, 1986.
- [2] Joshi, S. et al.: *Third International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction*, July 27—31 1986.
- [3] Brend, S.L. et al.: *ibid.*
- [4] Gutherson, I.N. et al.: *J. Bacteriol.* 165:696—705, 1986.
- [5] Gossele, F. & Leyns, F. et al.: *PGS Report*, June 1985.
- [6] Basappa et al.: *J. Bacteriol.*, 151:1627—1629, 1982.
- [7] Keith et al.: *J. Bacteriol.*, 167:607—612, 1986.

- [8] Bolivar, F. et al.: *Gene*, 4:121—136, 1978.
[9] Viera, J. et al.: *Gene*, 19:259—268, 1982.
[10] Simon, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 196:413—420, 1984.
[11] Figurski, D.H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6:1644—1652, 1979.
[12] Manatis, T. & Fritsch, B.F. et al.: *Molecular Cloning*, 3rd edition, 1984.
[13] 陈月仙, 赵杨: 北京大学学报 (自然科学版), (6):112—115, 1986.
[14] Birnboim, H.C. et al.: *Nucleic Acids Res.* 7:1513—1523, 1979.
[15] Kido, C.I. & Liu S.T.: *J. Bacteriol.*, 145:1365, 1981.
[16] Whitta, S. et al.: *J. of General Microbiology*, 131:1547—1549, 1985.
[17] Bruijn, F.J. et al.: *Gene*, 27:131—149, 1984.

LOCATING, CLONING AND ENZYME ANALYSIS OF *ERWINIA HERBICOLA* CSH1065 FIB GENE

Zhao Yang

(Kunming Institute of Botany, the Academy of Science of China, Kunming)

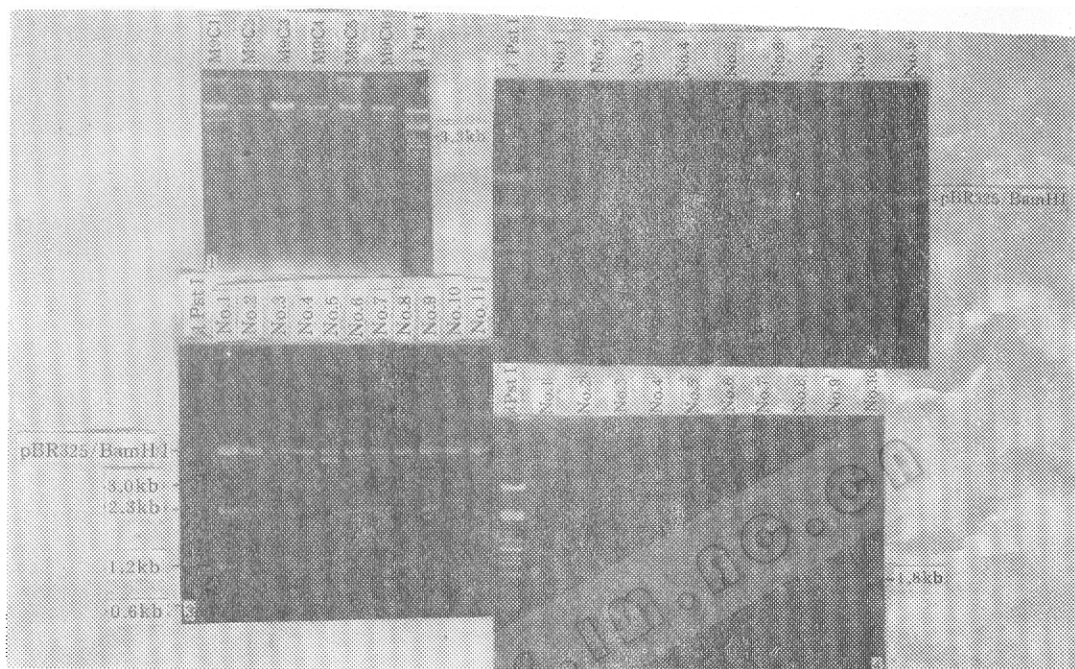
P. Tenning

(PGS co, 9000-Gent, Belgium)

By using Tn5 mutagenesis, DNA molecular hybridization and DNA molecular cloning techniques. We found and confirmed that fungi inhibition (Fib) genes of *E. herbicola* CSH 1065 are located on its 180 kb plasmid and may involve some separated 8.3kb, 8.6kb, 9.5kb, 8.5kb EcoRI fragments. We constructed the gene bank of the plasmid genome from *E. herbicola* CSH 1065 with pBR 325 and cosmid vector pLAFB1. Through restriction enzyme analysis, cosmid subcloning, We mapped some part of the Fib genes from *E. herbicola* CSH 1065.

Key words

Fungi inhibition genes; Tn5 mutagenesis; DNA molecular cloning; cosmid gene bank



1. Cosmid M9C1—C6 HindIII酶切电泳, 它们都含Tn5特征的3.3kb Hind III片段, 除M9C2外
Cosmids M9C1—C6/Hind III DNA run agarose gel, it shows they all contain characteristic 3.3 kb Tn5/Hind III fragment except M9C1
2. BamHI 酶切分析CSH1065质粒基因组pBR325基因库。分析的9个转化子中真正的重组转化子是No.1,2, No.4—6。
Analysing the pBR 325 gene bank of CSH 1065 plasmid genome with BamHI, it shows that only No.1, 2 and No. 4—6 are true recombinant transformants from 9 analysed ones
3. pYD BamHI 酶切分析, No.1—4及No.6—9都含有2.3kb BamHI片段, 认为是真正的含Fib基因片段克隆。No.2,3含额外3.0kb片段, No.1, No.6及No.8含额外1.2kb片段, No.7和No.9含额外0.6kb片段
Analysing pYD with BamHI, it shows that No.1—4 and No.6—9 contain 2.3kb BamHI fragment, it means these colonies do contain Fib gene fragment. meanwhile No.2—3 contain extre
4. BglI 酶切分析CSH1065质粒基因组pLAFB1 Cosmid基因库。分析的转染子都含1.8kb pLAFB1/BglI 片段, 但真正重组转染子是No.1—5, No.7, 8它们含有不同大小的插入片段
Analysing the pLAFB1 cosmid gene bank of CSH 1065 plasmid genome with BamHI. all analysed transfectants contain 1.8kb pLAFB1/BglI fragment. but those true recombinant transfectants are No.1—5 and No.7, 8. They contain different size insert fragments