

## ***Enterobacter agglomerans* 339에 있어서 transposon mutagenesis를 통한 Nif<sup>-</sup>-mutants 분리 동정**

민병환·이호자

경희대학교 문리과대학 생물학과

### **Isolation of Nif<sup>-</sup>-mutants through transposon mutagenesis in *Enterobacter agglomerans* 339**

Min, Byung Whan and Ho Sa Lee

*Department of Biology, College of Liberal arts and Sciences, Kyung Hee Univ. Seoul, Korea*

**ABSTRACT:** Three Nif<sup>-</sup>-mutants were isolated from *Enterobacter agglomerans* 339 through the transposon mutagenesis using a RP4-mobilising system for its nif-gene characterization. All mutants hadn't acetylene-reduction ability. Then we confirmed that Tn5 was inserted into all conserved nif-plasmids through the Southern Hybridization.

**KEY WORDS** □ *Enterobacter agglomerans*, transposon mutagenesis, Nif<sup>-</sup>-mutants, RP4-mobilising-system.

생물학적 질소고정에 있어서 공기중의 질소로부터 nitrogenase에 의한 ammonium에로의 전환은 원시핵균의 질소고정유전자군을 가진 세균에 의해 이루어진다. 이러한 세균들의 질소고정에 있어서 서로 다른 생리학적 조건에도 불구하고 nitrogenase의 구조는 매우 유사하다. 질소고정에 대한 유전학적 생리학적 연구는 무엇보다도 *Klebsiella pneumoniae*에 있어서 상세히 보고되었고 그 결과에 따르면 이 nif-cluster는 17개의 nif-gene이 7-8개의 operon속에 배열되어 있음이 밝혀졌고 nitrogenase의 합성을 위한 구조유전자, 즉 nif H, nif D, nif K 유전자는 하나의 operon을 형성하고 있음도 보고된 바 있다(Kennedy 등, 1981).

이러한 개개의 nif-gene의 특성은 서로 다른 여러종류의 Nif<sup>-</sup>-mutant의 동정을 통해 밝혀졌으며 이 Nif<sup>-</sup>-mutant는 앞으로 nif-gene의 구조 및 기능의 연구를 위해 중요할 뿐 아니라 최근에 와서는 질소고정세균의 식물체와의 상호작용에 관한 연구에 있어서 control 균주로서 매우 이용가치가 높

다고 사료된다.

최근에 와서 이러한 Nif<sup>-</sup>-mutant의 유발을 위해 여러가지 유전학적 방법 및 기술이 개발되었는데 그중 가장 효과적인 방법의 하나가 바로 transposon을 이용한 mutagenesis이다. transposon을 이용한 mutagenesis는 이미 여러종류의 세균의 유전학적 분석에 응용되었고 그중 Tn5를 이용한 연구는 *Escherichia coli*나 *Salmonella typhimurium*에 있어 여러 chromosome과 operon, 즉 예를들어 *his*(Berg 등, 1979), *trg*(Harayama 등, 1979), *ksg*(Fouts와 Barbour, 1981), *pnp*(Portier, 1980) 등의 분석에 사용되었음이 보고된 바 있다. 특히 *Klebsiella pneumoniae*의 nif-cluster의 Tn5-mutation을 통한 연구는 Riedel(1979) 등에 의해 상세히 밝혀진 바 있으며 더 나아가 Ruvkum과 Ausubel(1981)은 Tn5를 이용하여 site-directed mutagenesis 방법을 발전시켰다.

본 실험에서는 밀의 뿌리에서 분리 동정한 질소 고정능력을 가진 균주 *Enterobacter agglomerans*

339 (Kleeberger 등, 1983)로부터 앞으로의 질소고정세균과 식물체와의 상호작용연구에 이용하기 위해 아직 국내에서는 크게 알려진 바 없는 transposon-mutation을 통해 Nif<sup>-</sup>mutant를 분리 동정하였으며 더 나아가 site-directed-mutagenesis를 통한 Nif<sup>-</sup>mutant의 분리 동정을 시도해 보았고 그의 여러 nif-plasmid의 성질을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

**재료 및 방법**

**균 주**

사용된 균주와 plasmid는 Table 1과 2와 같다.

**배 지**

일반적인 액체완전배지로서 LB(Luria Broth) 완전배지가 사용되었고 평판배지는 1.2% Agar를 첨가해서 사용했다. Citrate-effect의 확인을 위해서는 Simon-Citrate-Agar(Merck), acetylenere-duction 측정을 위해 NFDM(Table 3) 배지를 사용했다.

**Transformation** : Cohen 등(1972)에 의한 방법을 사용했다.

**Conjugation** : Singh과 Klingmüller(1986)에 의해 변형된 effendorf-conjugation 방법을 사용하였다.

**Plasmid-DNA-분리**

비교적 크기가 큰 plasmid-DNA의 분리를 위해 Kado와 Liu(1981)의 방법을 사용하였고 vector plasmid-DNA의 분리를 위해 Rodriguez와 Tait(1983)의 miniscreen 방법을 사용하였다.

**Agarose gel electrophoresis** : 0.7% Agarose concentration으로 서로 다른 vertical gel과 horizontal gel을 사용했고 buffer로는 TBE buffer(90mM Tris, 90 mM Boric acid, 1.25 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetate), pH 8.3)를 사용하여 3-10 v/cm의 전압을 걸어 electrophoresis 하였다.

stopmix로는 Ficoll stopmix(20% Ficoll 400, 0.05% bromphenol blue in TBE buffer)를 사용했으며 1 μg/ml ethidiumbromid 용액에 염색하여 ultraviolet-light를 통해 관찰했다.

**Southern-Hybridization** : Southern(1975)의 transfer 방법에 의해 Nitrocellulose Filter로

**Table 1. Properties of strains**

Strains	Genetic markers	Reference
<i>Escherichia coli</i> S17-1	pro, r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> , Tp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>Enterobacter agglomerans</i> 339	wildtype, prototroph Nif <sup>+</sup> , Rif <sup>r</sup> , pEA9	Kleeberger <i>et al.</i> (1983)
<i>Enterobacter agglomerans</i> 333	wildtype, prototroph Nif <sup>+</sup> , Rif <sup>r</sup> , pEA3	Kleeberger <i>et al.</i> (1983)
<i>Enterobacter agglomerans</i> 339/22-1	prototroph, Nif <sup>-</sup> , Rif <sup>r</sup>	Singh <i>et al.</i> (1983)

**Table 2. Properties of plasmids**

Plasmids	Genetic markers	Reference
pSUP5011	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , mob <sup>+</sup> , pBR325::Tn5-Mob (Fig. 1)	Simon (1984) Berg <i>et al.</i> (1975)
pSUP202	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , mob <sup>+</sup> (Fig. 1)	Simon <i>et al.</i> (1983)
pEA9	Nif <sup>+</sup>	Singh <i>et al.</i> (1983)
pEA3	Nif <sup>+</sup>	Singh <i>et al.</i> (1983)
pMK21-2Kan	Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Kreutzer (1986)
pKT231	Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Bagdasarian <i>et al.</i> (1981)

**Table 3. Composition of NFDM (nitrogen free dextrose medium)**

Solution 1: 20g glucose, 0.1g MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 25mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, and 1000 ml distilled water
Solution 2: 68g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 241g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , and 1000 ml distilled water (final pH 7.4)
Solution 3: 3.6g Fe(III)-citrate, and 1000 ml distilled water

The solutions were prepared and sterilized separately. Before use 950 ml of solution 1, 50 ml of solution 2, and 10 ml of solution 3 were mixed.

transfer 하여 <sup>32</sup>P-desoxycytidintriphosphat 와 nick-translation-kit를 사용해 hybridization 시켰다.

**Acetylene reduction 측정**

nitrogenase activity의 측정은 acetylene에서 ethylene으로의 reduction을 gaschromatography 를 통해 측정하였다. 13.5 ml volume의 vial에 7 ml NFDM 배지를 넣고 산소 indicator로 0.1 ml/100 ml NFDM 배지 methylene blue(10 mg/ ml 의 stock solution)를 첨가한 후 0.1 ml의 새로 배양된 균주를 접종하고 고무마개로 밀봉하여 24 시간 30°C로 보정된 incubator에서 진탕시킨 후 0.5 ml acetylene gas를 주사기로 주입시킨 다음 24시간 진탕배양하여 0.2 ml의 gas를 뽑아내어 gaschromatography로 측정하고 controll과 비교 하였다.

**결과 및 고찰**

**RP 4-mobilising system을 통한 transposon-mutagenesis**

Tn5-Mob을 가진 vectorplasmid pSUP 5011 (Fig.1)는 RP 4-mobilising system을 통해 *Escherichia coli* S17-1로부터 *Enterobacter agglomerans* 339로 전이되었고 Chloramphenicol, Kanamycin과 Rifampicin이 첨가된 LB 고체배지에서 selection 되었다.

균주 *Escherichia coli* S17-1은 chromosome에 plasmid RP4가 integration 되어있기 때문에 이 RP4의 tra-gene의 도움으로 Mob-site를 가진 모든 vectorplasmid를 mobilization 시킬 수 있다 (Simon 등, 1983).

이 transconjugants는 Kado와 Liu(1981)의 plasmid DNA 분리방법과 agarose gel electro-

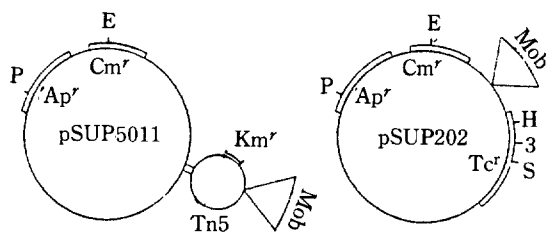


Fig. 1. Restriction map of pSUP5011 and pSUP202.

E: EcoRI H: HindIII B: BamHI S: Sal I P: Pst I

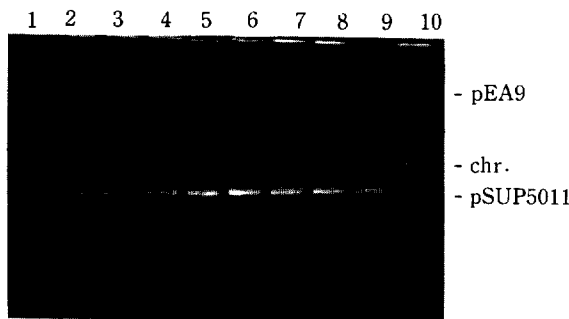


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of transconjugants.

- 1-8 *Enterobacter agglomerans* 339 (pSUP5011) different isolates
- 9 plasmid pSUP5011
- 10 *Enterobacter agglomerans* 339

phoresis를 통해 vectorplasmid pSUP 5011의 전이가 확인되었다(Fig. 2).

vectorplasmid pSUP 5011의 전이가 확인된 균주, 즉 *Enterobacter agglomerans* 339(pSUP 5011)는 같은 incompatibility group에 속하는 또 다른 vectorplasmid pSUP 202를 가진 *Escherichia coli* S17-1(pSUP 202)와의 conjugation에 의해 pSUP 5011를 curing시킴과 동시에 transposonmutation을 야기시켰고 이 mutant는 Tetracyclin, Kanamycin과 Rifampicin을 첨가한 LB 고체배지에서 selection 되었으며 miniscreen

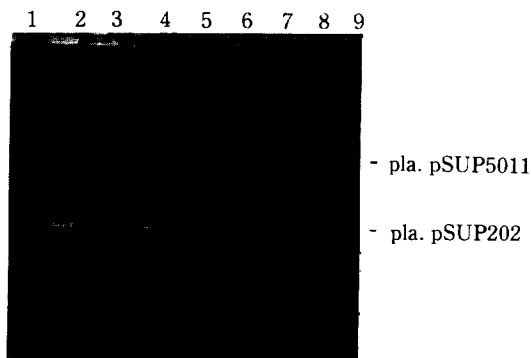


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of transconjugants.

- 1-6 transconjugants, *Escherichia coli* S17-1 (pSUP202) × *Enterobacter agglomerans* 339 (pSUP5011)
- 7 plasmid pSUP202
- 8 *Enterobacter agglomerans* 339
- 9 plasmid pSUP5011

과 agarose gel electrophoresis를 통해 pSUP 5011의 curing과 pSUP 202의 존재를 확인하였다 (Fig. 3).

selection된 transposonmutants는 두 가지의 transposon insertion 가능성을 생각할 수 있다. 첫째 transposon이 *nif*-plasmid pEA 9에 insertion된 경우 이중 특히 transposon이 특정 *nif*-gene에 insertion된 경우 *Nif*<sup>-</sup>표현형질을 나타내게 되며 또 다른 가능성은 *Enterobacter agglomerans* 339의 chromosome에의 insertion을 생각할 수 있다. 더 나아가 역시 Kanamycin에 대한 spontaneous mutants의 출현을 생각할 수 있는데 본 실험에서는 Kanamycin의 배지에의 첨가능도를 두배로 하여 이 mutants의 출현을 배제하였다.

**Acetylene reduction 측정을 통한 *Nif*<sup>-</sup>mutants의 동정**

selection된 500여 transposonmutants를 gas-chromatography를 통해 acetylene으로부터 ethylene에로의 환원능력을 상실한 *Nif*<sup>-</sup>mutants를 찾아 본 결과 그중 3개의 mutants를 동정하였다. Fig.4에서 보는 바와 같이 야생주인 control *Enterobacter agglomerans* 339가 acetylene 주입 후 24시간만에 24.37%의 acetylene 환원능력을 보인데 반해 이 *Nif*<sup>-</sup>mutants는 0.01%-0.02%의 환원능력을 보였고 이 수치는 *nif*-plasmid

pEA 9이 curing된 또 다른 control 균주인 *Enterobacter agglomerans* 339/ 22-1의 0.01%와 거의 흡사함을 나타내었으므로 *Nif*<sup>-</sup>mutants임을 확신하였다.

**Southern-Hybridization 방법을 통한 *Nif*<sup>-</sup>mutants의 확인**

*Nif*<sup>-</sup>mutants로 확인된 균주로부터 *nif*-plasmid pEA 9에 Tn5-Mob이 insertion되어 있나를 확인하기 위하여 Tn5-Mob을 포함하는 vector-plasmid pSUP5011 DNA를 *Hind* III로 처리하여 4.6 kb 크기의 fragment를 gel elution하여 probe로써 hybridization 시켰다 (Fig.5).

Fig.6에서 보는 바와 같이 southern-hybridization을 통해 3개의 *Nif*<sup>-</sup>mutants(c, d, e)들은 Tn5-Mob probe에 강한 homology signal을 나타내었고 control 균주인 *Enterobacter agglomerans* 339 wildtype(a)와 *nif*-plasmid curing 균주인 *Enterobacter agglomerans* 339/ 22-1 (b)에서는 negative를 나타내고 있다. *nif*-cluster의 특징유전자내의 Tn5-Mob의 존재에 대해서는 complementation test를 통해 밝혀질 수도 있으나 transposon-insertion-mutant는 같은 operon내의 유전자들에 대해 매우 강한 극성효과를 나타내므로 (Kleckner, 1981) 같은 operon 내의 유전자들 중 complementation test를 통한 Tn5-Mob insertion 위치를 확인하는 것은 매우 어려움을 갖

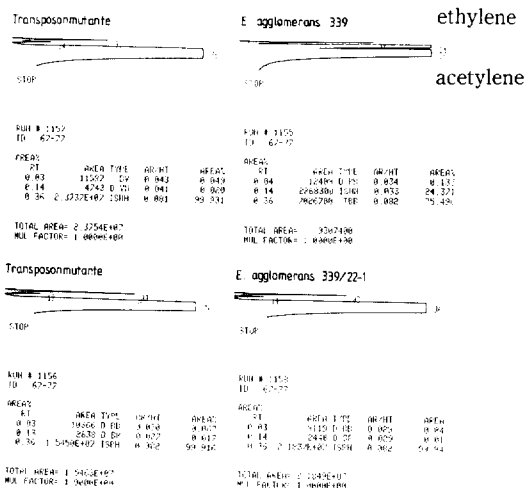


Fig. 4. Acetylene reduction activity of transposon-*Nif*<sup>-</sup>mutants.

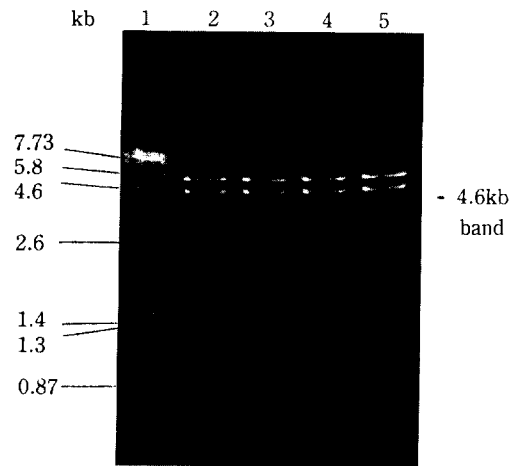


Fig. 5. Digestion of pSUP5011 with *Hind* III.  
1 standard SPP1/ *Eco*RI  
2-5 plasmid pSUP5011/ *Hind* III

는 것으로 보고되고 있다(De Bruijn과 Ausubel, 1981). 다만 본 실험에서 동정한 Nif<sup>-</sup>-mutants는 Dixon 등(1977)이 *Klebsiella pneumoniae*의 nif-cluster 연구결과에 미루어 7개의 nif-gene, 즉 nif B, A, F, E, K, D, H 중 어느 한 유전자에 Tn5-Mob이 insertion 되었음을 추측할 수 있다.

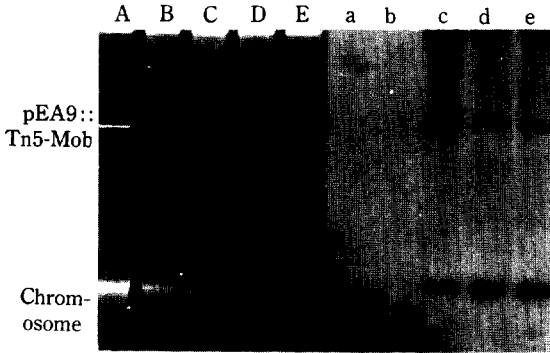


Fig. 6. Southern hybridization.  
 1 controll *Enterobacter agglomerans* 339  
 2 controll *Enterobacter agglomerans* 339/22-1  
 3-5 transposon- Nif<sup>-</sup>-mutants

**Site-directed-mutagenesis를 통한 Nif-mutants 동정에서의 시도**

일반적인 transposon mutagenesis와는 달리 정확한 mutation 부위를 알기위해 *Enterobacter agglomerans* 333으로부터 subcloning된 vector-plasmid pMK 212 Kan(Kreutzer, 1986)와 nif-plasmid pEA9과의 recombination을 통해 Fig.7의 원리와 같이 Nif<sup>-</sup>-mutant의 동정을 시도해 보았다.

이 방법 역시 *Escherichia coli* 17-1(pMK 212 Kan)과 *Enterobacter agglomerans* 339와의 conjugation을 유도한 후 Kanamycin과 Rifampicin을 첨가한 LB 고체배지에서 transcon-

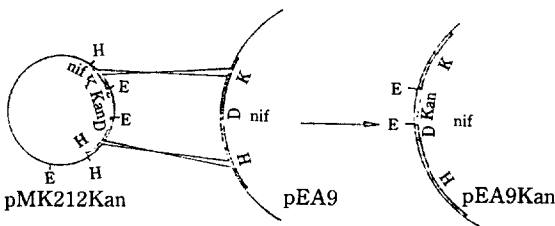


Fig. 7. Experimental design for site directed recombination.

jugants를 selection하여 일차적인 site-directed-recombination을 확인하기 위해 acetylene reduction test를 해본 결과 acetylene 주입 후 24 시간 만에 0.03%-0.05%의 환원율을 나타내어 기대했던 recombinants를 얻었다고 생각했으나 vectorplasmid pMK 212 Kan과 같은 incompatibility group에 속하는 또 다른 vectorplasmid pKT 231를 transconjugant내로 전이시킨 후 transconjugant 내에 존재하는 pMK 212 Kan을 curing하여 완전한 nif D-gene의 site-directed-mutants를 예상하여 acetylenereduction test를 해본 결과 wiltype과 같은 30% 정도의 환원율을 나타내었다.

이 사실로 미루어 보아 pMK212 Kan의 nif-H, D, K-gene과 *Enterobacter agglomerans* 339의 nif-plasmid pEA9과의 recombination은 전혀 일어나지 않았으며 아마 이것은 *Enterobacter agglomerans* 339와 333의 유전자적인 차이에 기인된 것이 아닌가 사료된다. 만약 이 두 plasmid 간의 nif-H, D, K-gene 들이 완전한 homology라면 singh과 klingmuller(1985)나 Kreutzer(1986)가 이 방법을 통해 얻었던 것과 같은 Nif<sup>-</sup>-mutant를 동정할 수 있었으리라 기대된다.

다만 vectorplasmid pMK 212 Kan가 *Enterobacter agglomerans* 339내로 전이된 후의 acetylenereduction test에서 낮은 환원율을 나타냈다가 vectorplasmid pKT 231로 pMK 212 Kan을 curing시킨 후의 acetylenereduction test에서 다시 wildtype과 같은 환원율을 나타낸 것은 Buchanan-wollaston 등(1981)과 Riedel 등(1983)이 밝힌 것처럼 multicopy plasmid의 효과에 기인된 것으로 사료된다.

Buchanan-Wollaston 등(1981)의 보고에 의하면 multicopy plasmid에 존재하는 nif-DNA-fragment에 의해 *Klebsiella pneumoniae*의 nif-gene-expression이 억제되며 nif L-geneproduct의 과잉생산에 의해 nif J와 nif HDKY operon의 transcription이 많은 영향을 받는다고 하였다. 본 실험에서도 multicopy plasmid인 pMK 212 Kan 내의 nif-HDK-operon의 gene-expression에 의해 singlecopy plasmid인 pEA 9의 gene-expression이 영향을 받아 그 결과 낮은 환원율을 나타낸 것

이라 생각된다.

### Citrate-effect

vectorplasmid pMK 212 Kan의 curing 과정에서 나타난 또 하나의 현상은 *Enterobacter agglomerans* 339는 citrate 평판(Simon-citrate-agar)에서 쉽게 그들의 vectorplasmid를 curing시켜 버린다는 사실이다. 이 사실을 통해 vectorplasmid의 안정성을 가늠하는 하나의 척도로 생각할 수 있는데 여러 vectorplasmid를 통해 실험해 본

결과 하나의 replicon을 가진 vectorplasmid 즉 plasmid pSUP 5011이나 pSUP 202 등은 쉽게 curing 되었으며 2개 이상의 replicon을 가진 vectorplasmid는 curing 되지않고 매우 안정성을 나타내었다.

vectorplasmid pMK 212 Kan 역시 2개의 replicon을 가지고 있는 관계로 citrate-effect에 매우 안정성을 나타내었으므로 citrate-effect에 의한 pMK 212 Kan의 curing은 불가능하였다.

## 적 요

*Enterobacter agglomerans* 339로부터 질소고정유전자의 특성규명을 위해 RP4-mobilising system을 이용한 transposonmutagenesis를 통하여 3개의 *Nif*<sup>-</sup> mutants를 분리했다.

이 3개의 *Nif*<sup>-</sup> mutants는 acetylene 환원능력을 잃었으며 Southern Hybridization을 통해 Tn5가 *nif*-plasmid에 insertion된 것을 확인하였다.

## 사 사

본 연구를 위해 군주 및 plasmid를 보내주시고 많은 조언을 해주신 독일 Bayreuth 대학 생물학과의 Klingmüller 교수님께 감사드리는 바이다.

## REFERENCES

1. Bagdasarian, P.R., Ruckert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J., Timmis, K.N., 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors, II. broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and hostvector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *gene* **16**: 237-247.
2. Berg, D., Davies, J., Allet, B., Rochaix, J.D., 1975. Transposition of R-factor genes to bacteriophage Lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 3628-3632.
3. Berg, C.M., Shaw, W.J., Vender, J. and Borucha-Mankiewicz, M., 1979. Physiological characterization of polar Tn5-induced isoleucine-valine auxotrophs in *Escherichia coli* K-12: Evidence for an internal promoter in *ilv* OGEDA operon. *Genetics* **93**: 309-319.
4. Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M.C., and Cannon, F.C., 1981. The use of cloned *nif*(nitrogen fixation) DNA to investigate transcriptional regulation or *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 102-106.
5. Cohen, S.N., Chang, A.Y.C., Shu, L., 1972. Nonchromosomal antibiotics resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 2110-2114.
6. De Bruijn, F.J. and Ausubel, F.M., 1981. The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the *gln A* region of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of *gln R*, a gene involved in the regulation of the *nif* and *hut* operons. *Mol. Gen. Genet.* **183**: 289-297.
7. Dixon, R., Kennedy, C., Kondorosi, A., Krishnapillai, V., Merrick, M., 1977. Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae*, Mutants defective in nitrogen fixation.
8. Fouts, K.E., and Barbour, S.D., 1981. Transductional mapping of *ksg B* and a new Tn5-induced kasugamycin-resistance gene, *ksg D*, in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **145**: 914-919.
9. Harayama, S., Palva, E.T. and Hazelbauer, G.L., 1979. Transposon insert mutants of *Es-*

- cherichia coli* K12 defective in a component common to galactose and ribose chemotaxis. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 193-203.
10. Kado, C.I., Liu, S.-T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
  11. Kennedy, C., Cannon, M., Cannon, F., Dixon, R., Hill, S., Jensen, J., Kumar, S., Mclean, P., Merrick, M., Robson, R., Postgate, J., 1981. Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In: Current Perspectives in Nitrogen Fixation, 146-156. Gibson, A.H. and Newton, W.E. (eds.), Australian Academy of Science, Canberra.
  12. Kleckner, N., 1981. Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **15**: 341-404.
  13. Kleeberger, A., Castorph, H., Klingmüller, W., 1983. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special regard to the gramnegative bacteria. *Arch. Microbiol.* **136**: 306-311.
  14. Kreutzer, R., 1986. Restriktionskatierung eines *nif*-plasmids von *Enterobacter agglomerans* und genetische Charakterisierung der von ihm getragenen *nif*-gene. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth.
  15. Portier, C., 1980. Isolation of a polynucleotide phosphorylase mutant using a kanamycin resistant determinant. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 343-349.
  16. Riedel, G.E., Ausubel, F.M. and Cannon, F.C., 1979. Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 2866-2870.
  17. Riedel, G.E., Brown, S.E. and Ausubel, F.M., 1983. Nitrogen fixation by *Klebsiella pneumoniae* is inhibited by certain multicopy hybrid *nif* plasmids. *J. Bacteriol.* **153**: 45-56.
  18. Rodriguez, R.L. and Tait, R.C., 1983. Recombinant DNA techniques: An introduction. Addison-Wesley Publishing House, London, Amsterdam.
  19. Ruvkun, G.B. and Ausubel, F.M., 1981. A general method for site directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* **289**: 85-88.
  20. Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. Vector for *in vivo* and *in vitro* manipulation of gramnegative bacteria. In: Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction, Pühler, A. (ed.), 98-105. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. New York, Tokyo.
  21. Simon, R., 1984. High frequency mobilization of gramnegative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 413-420.
  22. Singh, M., Kleeberger, A., Klingmüller, W., 1983. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 373-378.
  23. Singh, M. and Klingmüller, W., 1985. A problems and prospects of site directed transposon mutagenesis in *Azospirillum*. In: *Azospirillum* III, Genetics, Physiology Ecology, 20-29, Klingmüller, W. (ed.) Springer-Verlag, Berlin.
  24. Singh, M. and Klingmüller, W., 1986. Transposonmutagenesis in *Azospirillum brasilense*: Isolation of auxotrophic and *nif*<sup>-</sup> mutants and molecular cloning of the mutagenized *nif* DNA. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 136-142.
  25. Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

(Received Nov. 2, 1987)