

郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所)

自从 1974 年细菌 DNA 的体外重组技术问世以来,以大肠杆菌为材料所做的 DNA 克隆的努力,已经取得了很大的成就。人的生长激素、胰岛素、干扰素等已经可望利用微生物来生产。DNA 体外重组技术在生产实践上的应用,必将对人类带来深远的影响。

以 DNA 重组技术为基础的遗传工程能不能应用于放线菌?由于放线菌这一类微生物所产生重要的次级代谢产物如抗生素等,对医药、农业诸方面有着不容置疑的重要性,而且在探索次级代谢途径的调节等理论问题上也有特殊的兴趣,因之这个问题深为广大放线菌遗传学家及抗生素研究工作者所关切。企图用基因工程使放线菌基因克隆以实现提高产量、改进质量以及培育新抗生素产生菌的目的,从而使放线菌工业菌株改良的经典育种方法发生革命性的变革,这是许多人追求的目标。

进行遗传工程有几个基本的技术环节,如 DNA 的切割和连接,适宜运载体的选择以及重组 DNA 分子的转化(或转染)。虽然用于细菌 DNA 切割和连接的各种酶类,同样可以应用于放线菌,但是重组 DNA 分子的转化(或转染)技术却需要发展适合于放线菌的专门系统。从最近几年的报道中表明,一些放线菌质粒已可用作基因载体,原生质体转化及转染技术已经初步建立起来,链霉菌的基因克隆也已经在几个例子中获得了成功。以下主要介绍近年来链霉菌基因克隆研究的进展。

一、链霉菌基因载体

到现在为止已经证明适合于作为链霉菌基因载体的质粒有二组。第一组是天蓝色链霉菌 $A_3(2)$ 的 SCP2 及其高致育性变种 SCP2*。这两个质粒已经作了比较详尽的遗传和物理的分

析^[1,2],它们携带的一些基因除了决定寄主细胞的致育性外,还决定致死接合的特性 (lethal zygois, ltz),即当含 SCP2* 质粒的菌株生长在涂布了 SCP2⁻ 菌株孢子液的平板上时,在此菌落的周围出现一个细狭的抑制圈,叫做“pock”,ltz 这个特性随质粒的转移而转移,因之以 ltz 为标记,很容易从转化混合液中检出所生成“pock”的少数转化子。如果在含有 10^9 个 SCP2⁻ 孢子的群体中,只存在一个带 SCP2* 质粒的转化子,也同样因出现“pock”而不至于被遗漏。因之,这个标记在选择上的意义可以说和抗生素抗性标记同样的有用。SCP2 及 SCP2* 在物理性质上没有差异,用 CsCl-EtBr 密度梯度离心,很容易从清亮裂解液中分离得到纯的 SCP2 DNA,其分子量为 20×10^6 道尔顿 (31kb),对一般常用限制性内切酶的切点数为: EcoRI, 1; HindIII, 1; BamHI, 5; PstI (SalpI), 4; SalGI, 20 多个,其酶切图如图 1 所示。

第二组是变青链霉菌的 SCP 1 族质粒。这是一组最近在研究变青链霉菌时被发现的新质粒^[3,4],当携带这种质粒的菌株和不携带这种质粒的菌株一起生长时,出现“pock”而被偶然发现。从“pock”的中心挑取的孢子就是带有这个质粒的 ltz⁺ 菌株。和 SCP 2* 一样,由这个质粒所决定的 ltz 特性,可以有效地转移,这从遗传上证明这个质粒为转移性质粒。因为它是从变青链霉菌 (*S. lividans*) 中分到的,所以叫做 SLP 1。

从不同“pock”中挑取的 ltz⁺ 菌株中分离到的质粒 DNA,经内切酶消化,琼脂糖凝胶电

* 承焦瑞身教授审阅此文,谨致谢意。

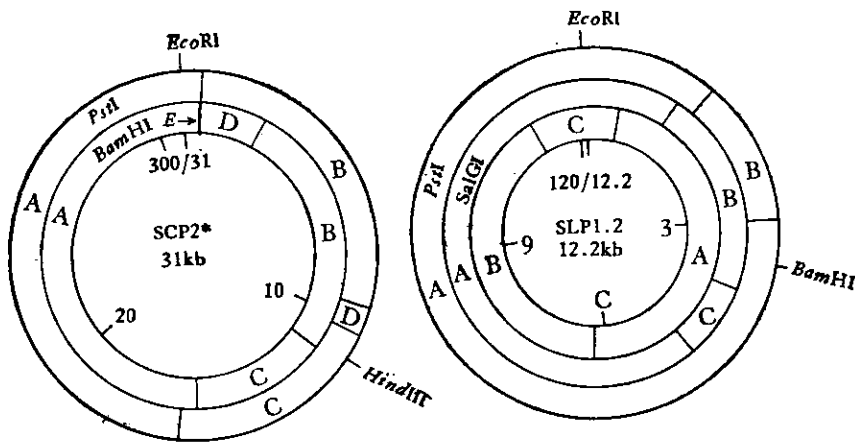
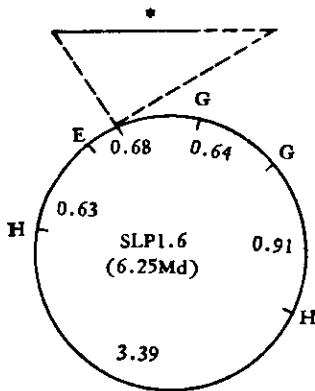


图1 SCP2*、SLP1.2 质粒的内切酶切割图^[3]



质粒大小 (Md)	限制位点				额外片段*		
	E	H	G	B			
SLP1.6	6.25	1	2	2	0	0	无
SLP1.4	6.4	1	3	2	0	0	H
SLP1.3	6.88	1	3	3	0	0	HG
SLP1.1	7.13	1	3	3	0	1	HGP
SLP1.5	7.28	1	3	3	0	1	HGP
SLP1.2	8.23	1	3	3	1	2	HGPPB

图2 SLP1 族质粒的分子大小和限制图^[4]

泳分析表明从不同类型“pock”中挑到的无性繁殖系中所分离的质粒 DNA，其分子大小和酶切方式各不相同，其中六个分别编号为 SLP 1.1、SLP 1.2……SLP1.6。图 2 是对 SLP 1.1—SLP 1.6 六个变种物理数据的总结。

图中，前面三个是从变青链霉菌 1326 中分离得到的，另外三个是从 SLP1.1⁺ 或 SLP1.2⁺ 的变青链霉菌和天蓝色链霉菌杂交中分离 ltz⁺ 的天蓝色链霉菌再和变青链霉菌回交产生 ltz⁺ 的变青链霉菌中分离得到的，从图可见，SLP 1.6 最小，分子量只有 6.25Md，内切酶的切点数为：EcoRI，1；HindIII，2；SalGI，2；SalpI R。BamHI 则没有切点。其余变种和 SLP1.6 不同之处在于有一个大小不同的额外片段，它总是在同一个位置上插入，当分子量增大时，插入的额外片段向一个方向延伸(顺时针)，因之一些变种质粒多了几个另外的酶切位点。由于

SLP1.2 在插入的额外片段上有一个 BamHI 切点、二个 PstI 切点，这对于以这个质粒作为载体进行 DNA 体外重组时以保持质粒的完整性比较有利，所以在基因工程中选用 SLP1.2 作为载体。SLP1.2 的酶切图如图 1 所示。

放线菌中除了以上二组质粒已经成功地用作载体以外，还从其它许多种中分离到了质粒 DNA，如春日链霉菌^[5]、委内瑞拉链霉菌^[6]、费氏链霉菌^[7]、天蓝色链霉菌 ATCC10147 菌株^[8] 等。国内科技工作者也先后在灰色链霉菌^[9]、卡那链霉菌^[10]以及庆丰链霉菌^[11]中证明有质粒存在，其中已经分离提纯质粒 DNA 并建成限制图的只有委内瑞拉链霉菌的 pUC3 质粒及天蓝色链霉菌的 pS₁₀₁₄₇ 质粒，但是由于还没有发现它们有可以被用来进行选择标记，所以尚未被应用为载体。

除了质粒以外，以噬菌体为载体的研究也

表 1 链霉菌噬菌体 DNA 的物理性质^[12]

噬菌体	免疫组	G + C (mol%)	DNA 大小		限制酶靶点				
			分子量 (md)	kb	EcoRI	HindIII	BamHI	PxI	SalG
温和型									
φC31	φC43、φC62 (I 组)	63	26.01	39.02	6	13	0	0	~31
VP5	VP7, VP14 ACPB (II 组)	59	27	40.5	6	8	0	?	8
S14	φ448 (III 组)	59	34	51	7	~10	0	1	5
R4	SH10 (VI 组)	67	30	45	1	0	0	1	>30
SH3	?	73	34	51	2	?	8	?	?
SH10	R4	69	26.7	40.05	1	0	0	0	>10
SH11	?	71	26.1	39.15	0	?	0	?	?
SH12	?	69	28.7	43.15	2	?	0	?	?
烈性型									
VP12	—	67	26.3	39.45	0	0	0	0	~30
Pa16	—	55	66	99	>40	>40	0	0	1
S1	—	64	45	67.5	4	?	?	?	?
FP4	—	65	39	58.5	0	0	0	?	>20

正在积极进行。作为应用克隆的载体,那些宿主范围广、酶切位点少、又能产生缺失变种的温和性噬菌体应该是理想的候选者。已经有一些链霉菌噬菌体 DNA 的物理性质作了比较详细的研究(表 1)^[12],其中有三个噬菌体具备作为载体的条件,即 φC31、R4 及 SH10,但近来在 DNA 克隆研究中主要应用 φC31,其原因可能是:①对它的遗传研究最详尽^[13,14],②它有一个较大缺失的突变种,③已经证明它能对不止一种链霉菌的原生质体进行转染。

二、DNA 的转化和转染

放线菌中典型的转化只存在于嗜高温的普通高温放线菌中^[14],一般的链霉菌除了少数例外^[15,16],大多数由于菌丝细胞不呈感受态,不利于摄入 DNA,因而不能成功地实现转化。自从 Okanishi 等^[17]报道了链霉菌原生质体的形成和回复, Hopwood 等^[18]实现了链霉菌原生质体通过聚乙二醇(PEG)诱导融合的遗传重组以后, Bibb 等就试验以质粒 DNA 来转化原生质体并获得成功^[19]。他们从天蓝色链霉菌 A3127 中提取出共价闭环的 SCP2* 质粒 DNA^[1],并按 Hopwood 的方法^[18]将天蓝色链霉菌、小小链霉菌的菌丝制备成原生质体,取大约含 2×10^7 原生质体的悬液,离心沉淀后,将

原生质体重悬于管底最后一点缓冲液中,加入 20 微升 SCP2* DNA 溶液,混匀,加入 4.5 ml 20% PEG 1000 溶液,混匀后保持约 4 分钟,然后离心除去上清液,将原生质体沉淀重新悬于 0.2ml 的 P 缓冲液中,取一定体积此转化混合液涂布到补充有受体菌生长因子的 R₂ 再生培养基平板上,置 30℃ 培养,以形成“pock”为标记检出含 SCP2* 质粒的 *ltz*⁺ 转化子,这样得到的转化子经分离纯化,再提取出质粒 DNA,经内切酶分析,其性质和原来的 SCP2* 完全一样,由此证明以 SCP2* DNA 为媒介的转化过程确实是存在的。除了 SCP2* 能转化天蓝色链霉菌及小小链霉菌以外,SLP1.2 对变青链霉菌的转化也已经证明转化频率在最适条件下,对天蓝色链霉菌的再生质体数为 20%,转化效率大约为 $10^6/\mu\text{g}$ DNA。如果质粒 DNA 经切割后再连接,转化效率降低一个级数,为 $10^5/\mu\text{g}$ DNA,如果为线形质粒则降低一到二个级数^[3]。

使噬菌体 DNA 进入细胞并使之表达的系统,在噬菌体遗传研究及把噬菌体作为遗传工程载体的研究中十分重要,在细菌中已经用得很多。放线菌中已经报道的唯一例子为用生理上是感受态的正常维及尼链霉菌菌丝作受体,

以烈性噬菌体 S1 转染的系统^[20], 此外未见更多的报道用原生质体为受体的转染系统最早是由 Okanishi 建立起来的。他以 pk66 噬菌体 DNA 对卡那链霉菌的原生质体进行转染^[21,22], 转染频率大约为 10^{-6} /每一个菌落形成单位 (cfu) 或一个原生质体, 对每一个 DNA 分子则为 10^{-9} 。此后 Suarez 等^[23]参考 Bibb 等的方法, 以 PEG 诱导噬菌体 DNA 对原生质体的转染, 频率有了显著的提高 (表 2), 这对链霉菌的基因克隆提供了一个十分有用的手段。

表 2 聚乙二醇诱导链霉菌原生质体的转染^[12]

寄主原生质体	噬菌体 DNA	最高转染频率($\times 10^{-6}$)	
		每个 DNA 分子	每个活原生质体
天蓝色链霉菌 A ₃ (2)	φC31	7.5	2000
	VP5	2.8	15
变青链霉菌 66	φC31	3.26	416
	VP5	0.6	40
	φ448	1.32	51
	R4	3.06	11.5

三、链霉菌基因克隆的几个例子

Bibb 等首先以 SCP2* 及 SLP1.2 为载体, 将由天蓝色链霉菌 SCP1 质粒所携带的次甲基毒素 A 抗性 (Mm^r) 基因 DNA 片段进行克隆。SCP1 质粒是天蓝色链霉菌的性因子^[24], 同时编码次甲基毒素 A (Mm) 合成途径酶的结构基因, 并决定对 Mm 的抗性^[25], 这个质粒的存在已从遗传上作了充分的证明, 但至今仍未能把质粒 DNA 分离出来, 这可能是由于 SCP1 和染色体 DNA 整合在一起的缘故。Bibb 等的实验是将天蓝色链霉菌 A332(SCP1⁺) 菌株的全 DNA 以 PstI 消化, 和已经 PstI 消化的载体 SCP2* 或 SLP1.2 相混合, 以 T₄ 连接酶连接, 然后将连接混合液对 SCP2⁻ 的天蓝色链霉菌或变青链霉菌的原生质体进行转化。以 Mm^r 及 ltz^+ 表型作为筛选的标记, 结果在自生平板上筛选得到了含有杂合质粒 pSCP111、pSLP111 和 pSLP112 的无性繁殖系, 它们都同时具备 Mm^r 及 ltz^+ 特性 (图 3)。这表明载体 SCP2* 及

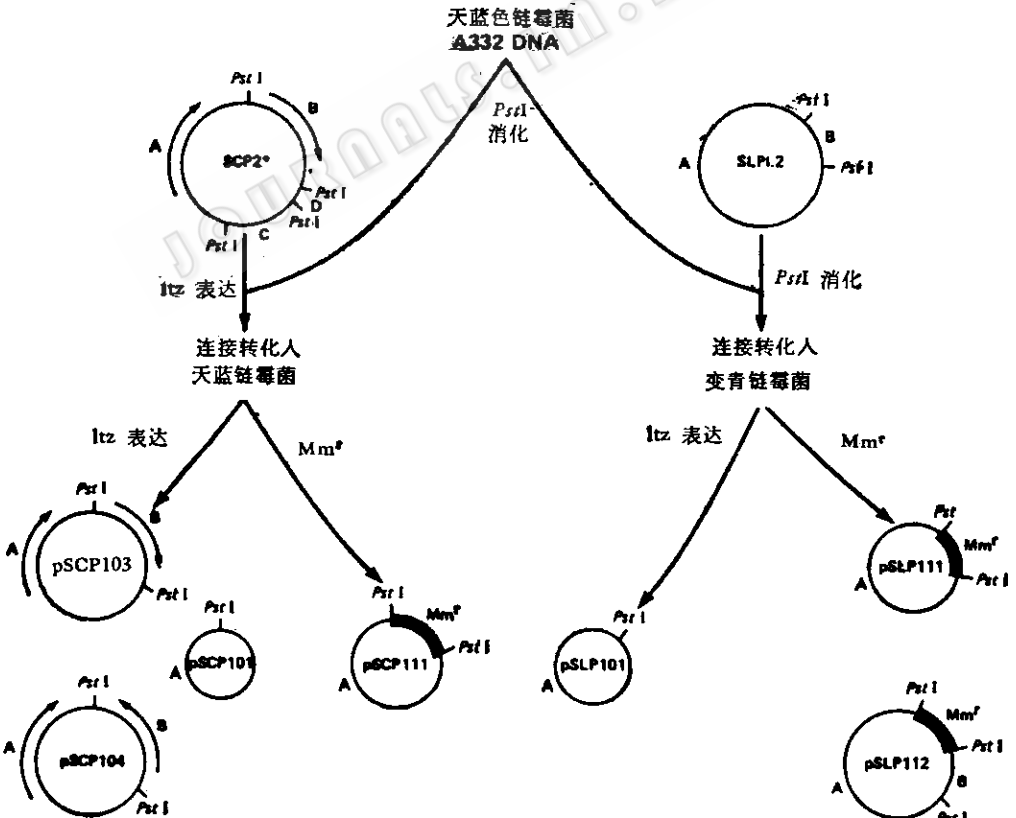


图 3 把 Mm^r 基因克隆到 SCP2* 及 SLP1.2 载体上去的操作略图^[13]

SLP1.2 已经和含 Mm^r 基因的 DNA 片段拼接成杂合质粒。他们将从转化子中提取出来的质粒 DNA 进行内切酶切割,以琼脂糖凝胶电泳分析,证明在杂合质粒 pSCP111 和 pSLP111 中均含有一个长度为 2.55kb 的来自 A332 菌株全 DNA 的 $PstI$ 片断, Mm^r 基因就编码在这一片段上。同时还证明 SCP2* 质粒的复制起点、*ltz* 基因及性决定基因都位于 $PstI$ 的 A 片段上,而 B 片段则可能与细胞分裂时质粒的分配有关。杂合质粒 pSCP111 还可以种间转化到变青链霉菌及小小链霉菌中,并在这些菌株中表达。Bibb 的这个实验证明,在链霉菌中把 DNA 克隆到本身的载体质粒上是十分有效的。

克隆基因的种间转移和表达也从生化角度作了证明,在四个新霉素抗性的无性繁殖系中,测得了 APH 及 AAC 的活性;从二个硫链丝菌素抗性的无性繁殖系中,也测得了核糖体 RNA 甲基化酶的活性。

Suarez 和 Chater 把放线菌噬菌体 $\phi C31cts\Delta 23$ (它比野生型 $\phi C31$ 大约少 8% 的 DNA,约 3.25 kb) 和大肠杆菌的小质粒 pBR322 组成一个杂种质粒 $\phi C31cts\Delta 23-pBR322$ ^[26],它是一个既可以在放线菌中又可以在大肠杆菌中表达的双复制子 (bireplicon)。 $\phi C31cts\Delta 23$ 先用 T_4 连接酶处理,使其粘性末端以共价相连接,再以 $EcoRI$ 部份切割,使每分子产生一个切点; pBR322 以 $EcoRI$ 消化,将二者相混,并连接,混合液对变青链霉菌转染而产生噬菌斑,从噬菌体中分离杂种 DNA,经内切酶消化、凝胶电泳分析,证明在杂种 DNA 中多了一个原来噬菌体所没有的 4.34kb 的 $EcoRI$ 片段,并在此片段中增加了对 $BamHI$ 及 $pstI$ 的单一切点,所产生的 $BamHI$ 小片段为 10.8 kb, $PstI$ 小片段为 7.4kb,这些都证明 pBR322 插入到 $\phi C31cts\Delta 23$ 中的位置和方向(图 4)。这个杂种 DNA 很容易被转化到大肠杆菌中表现 Tc^r 及 Ap^r ,再从大肠杆菌中分离质粒 DNA,经分析和原来的杂种质粒完全一样,并仍能转染变青链霉菌。这个工作指出了在遗传工程中利用杂种载体进行基因移植的可能性,是十分有趣的。

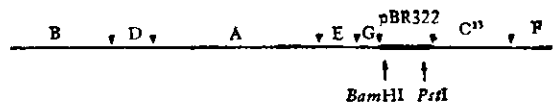


图 4 $\phi C31cts\Delta 23-pBR322$ 杂种 DNA 的可能结构^[26]

此外,关于链霉菌的基因是否能引入大肠杆菌细胞中并使之表达也有不同的报道。Horinouchi^[27] 等企图利用大肠杆菌的质粒 pBR322 及 pTA2070 作载体,使链霉菌的抗生素抗性基因克隆到大肠杆菌中去,结果虽然建成了杂种质粒,却没有能获得表达抗性基因的无性繁殖系。他们认为,由于种的差异,链霉菌的 DNA 顺序不能在大肠杆菌中表达。

Okanishi 的工作得到了和上面不同的结果,他把春日链霉菌中同金丝菌素生物合成有关的中型质粒 (6.8Md) 和大肠杆菌的 pACYC168 质粒 (2.4Md) 做成杂合质粒,转化入大肠杆菌,结果使大肠杆菌获得了合成一个新四环素类抗生素的能力,这个抗生素被命名为衣可霉素^[28]。

最近 Schottel 等^[29]把大肠杆菌 pACYC184 质粒 ($Cm^r Tc^r$) 或 pACYC177 质粒 ($Km^r AP^r$) 和变青链霉菌的杂合质粒 pSLP111 (Mm^r/ltz^+) 建立复合复制子,再把它们转化到变青链霉菌中,分别得到了表达 Cm^r (pSLP120) 及 Km^r (pSLP125) 的无性繁殖系(图 5)。

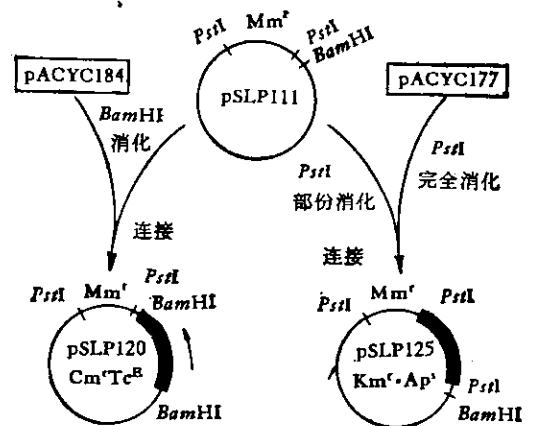


图 5 包含大肠杆菌及变青链霉菌质粒 DNA 的复合复制子的建成^[29]

综上所述,可见近几年来链霉菌基因克隆

系统的研究进展甚速。虽然成功的例子还不多,但已足以显示它将在应用和基础遗传学方面会起重要的作用。可以预料,在今后几年将会有更多的报道。但是正如细菌基本遗传规律、分子遗传学及质粒遗传的研究成果是细菌基因工程迅速发展的坚实基础一样,欲求得放线菌基因工程研究的高速发展和对生产实际的推动,同时还需要十分重视和大力加强放线菌本身、放线菌质粒(噬菌体)及次级代谢产物产生的调节和控制的研究,这一点是十分重要的。

参 考 文 献

- [1] Bibb, M. J.: *MGG*, **154**: 155. 1977.
[2] Schrempf, H. and W. Goebel: *J. Bact.* **131**: 251. 1977.
[3] Bibb, M. J.: *Nature*, **284**: 572. 1980.
[4] Hopwood, D. A. et al.: In K. N. Timmis and A. Puhler (ed) *Plasmids of medical, environmental and commercial importans*. Elsevier/North-Holland Biochemical press. Amsterdam. 1979.
[5] 崎西昌刚: *Amino Acid Nuclie Acid*, **35**: 15. 1977.
[6] Malik, V. S. and F. Reusser: *Plasmid*, **2**: 627. 1979.
[7] Yagisawa, M. et al.: *J. Antibiotics*, **31**(8): 809. 1978.
[8] Pernodet, J. L. and M. Guerineau: *MGG*, **182** (1), 53. 1981.

- [9] 薛禹谷等: *微生物学报*, **18**(4): 287, 1978.
[10] 王猷五等: *遗传学报*, **7**(2): 123, 1980.
[11] 郑幼履等: *中国微生物学会, 1979年学术年会论文摘要汇编*, 72页, 1979.
[12] Lomovskaya, N. D. et al.: *Microbiol. Rev.*, **44** (2): 206. 1980.
[13] Chater, K. F.: *Dev. Ind. Microbiol.* in press. 1980.
[14] Hopwood, D. A. and H. M. Wright: *J. Gen. Microbiol.* **71**: 383. 1972.
[15] 庄增辉等: *遗传学报*, **7**(4): 291, 1980.
[16] 王猷五等: *遗传学报*, **7**(3): 276, 1980.
[17] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.* **80**: 389. 1974.
[18] Hopwood, D. A.: *Nature*, **268**: 171. 1977.
[19] Bibb, M. J. et al.: *Nature*, **274**(5669), 389. 1978.
[20] Kouvalinkova, V. et al.: *Biochem. Soc. Trans.* **5**: 941. 1977.
[21] Okanishi, M. et al.: *J. Virology*, **2**: 686. 1968.
[22] Okanishi, M. et al.: *J. Bact.* **92**: 1850. 1966.
[23] Suarez, J. E. and K. F. Chater: *J. Bact.*, **142** (1): 8. 1980.
[24] Hopwood, D. A. et al.: *Bact. Rev.* **37**(3): 371. 1973.
[25] Hopwood, D. A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**: 373. 1978.
[26] Suarez, J. E. and K. F. Chater: *Nature*, **286**: 527. 1980.
[27] Horinouchi, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **44**(2): 367. 1980.
[28] 别府辉彦: 蛋白质,核酸,酵素临时增刊: 遗传子操作 **26**(4):286, 1981。
[29] Schottel, J. L.: *J. Bact.*, **146**(1): 360. 1981.