

# 接合性转座子 Tn916 的研究进展

管 征 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

80年代以来, 国外科学家们陆续发现了一类具有特殊性质的转座因子, 虽然它们的末端也具有不完全的反向重复序列, 但在转座时却不引起靶 DNA 上核苷酸序列的重复, 其转座过程通过一种切除插入机制来实现。尤为特殊的是, 它可以在无质粒带动下直接在同种或不同种的细菌间进行接合转移并插入到受体染色体或质粒的不同位点上。在这一类转座因子中, 发现最早和研究最深入的, 是在粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) DS16 的染色体上分离到的 Tn916。

## 1 Tn916 的发现和性质

1981年, Clewell 等人<sup>[1]</sup>在研究粪链球菌 DS16 中的接合性质粒 pAD1 时发现, 以 DS16 做供体, 在接合转移后, pAD1 上编码的溶血性 (hemolytic) 基因的表达出现异常。进一步的研究和限制酶切分析表明, 接合子中的染色体和质粒上都存在一个 15—16kb 的染色体片段, 它可以插入到不同位点并都表现四环素 (tetracycline, Tc) 抗性, 这一片段的插入造成了溶血性基因表达的异常。不但如此, Clewell 等人还惊奇地发现, 在一部分四环素抗性 (Tc<sup>r</sup>) 接合子中, 并没有质粒 DNA 转入, 只在染色体上检测到 Tc 抗性基因 tet, 而且, 在没有质粒的 DS16 的衍生菌中, tet 基因也可以通过滤膜接合以 10<sup>-7</sup> 左右的频率转移到受体中去, 而在相同条件下, 其它染色体标记都不

能发生转移<sup>[1]</sup>。实验还表明, 这种转移不受 DNA 酶的影响; 对供体进行过滤或用三氯甲烷处理后, 转移现象消失, 这不仅说明转移不是转化和转导作用的结果, 还说明这种无质粒存在的转移需要供体与受体细胞的直接接触才能完成。因此, Clewell 得出结论: 这种转移是接合作用 (conjugation) 的结果。研究中还发现, 所有的转移过程都可以在重组缺陷 (rec<sup>-</sup>) 的寄主中实现, 这不但进一步证明了转移不是转化和转导所致, 而且还表现出转座子的特征。进一步测定插入片段在染色体和质粒间的转座频率, 同已知的转座子的转座频率在同一范围内<sup>[1]</sup>。所有这些结果都显示出, 这一插入片段是一个可接合转移的转座因子 (conjugative transposon)。Clewell 等人把它命名为 Tn916<sup>[1,2]</sup>。

自从 Tn916 被发现后, 人们对它的性质进行了深入的研究探索。研究发现 Tn916 是一个 16.4kb 大小的染色体片段<sup>[3]</sup>, 上面带有 Tc<sup>r</sup> 基因 tetM; 它可以在染色体上以及染色体和质粒之间发生转座; 并能在无质粒带动下在同种或不同种的细菌间进行接合转移; 转座作用在靶 DNA 处不引起序列重复。分子杂交实验表明, Tn916 能以多拷贝方式同时插入到受体染色体的不同位点<sup>[4]</sup>。Tn916 接合转移的频

率视受体供体的不同而发生变化，一般在  $10^{-4}$ — $10^{-9}$  之间。

从 80 年代末开始，人们对 Tn916 的研究逐步深入，尤其对它的转移特性和转移机制做了大量探索工作。研究发现 Tn916 没有免疫性，即受体中 Tn916 的存在对其同类因子的再吸收无阻碍作用<sup>[5]</sup>。Tn916 在接合转移时不能带动与其相连的基因发生共转移<sup>[6]</sup>。Tn916 的转移是由其自身编码的蛋白质参与完成的<sup>[7]</sup>，其转移过程通过一种切除插入机制来实现<sup>[8,9]</sup>。Tn916 还具有广泛的寄主范围，它已经被转移到多种 G<sup>+</sup> 菌和 G<sup>-</sup> 菌中并得到表达<sup>[10]</sup>。

### 2 Tn916 的转移机制

在对 Tn916 的转移机制进行了深入研究后，Clewell、Scott 等研究小组相继在 1988 年<sup>[9]</sup>和 1989 年<sup>[8]</sup>提出了一种切除-插入模型：Tn916 首先从供体 DNA 上切下，形成一环状中间体，此中间体可以直接插入到质粒或染色体上，也可以通过接合转移到受体细胞中，再插入到染色体或质粒上，另外，此中间环还可能由于其它原因而丢失（图 1）。

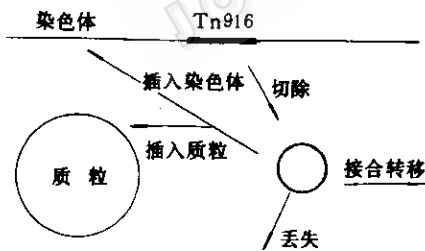


图 1 Tn916 转移模型

这一模型得到了大量实验结果的支持：带有 Tn916 的接合性质粒在接合转移后，恢复到 Tn916 插入前的初始质粒状态<sup>[4]</sup>；由于 Tn916 插入失活的标记基因，可在接合转移后得到恢复<sup>[2,4]</sup>。这些都说明 Tn916 在转移时首先被从插入片段中切离下来，而且这种切除是非常精确严格的，可以使插入失活的基因得到完全恢复。推断，Tn916 的切除作用可能是

通过转座子编码的某种产物的负调节来实现的，它是接合转移的限速步骤。

1988 年，Scott 发现并分离到 Tn916 的环状中间体<sup>[11]</sup>，它可以以超螺旋状态存在，是接合转移的前体。它还能编码与转移和插入有关的酶，并且这种编码功能很可能比环化前有所增强，因为对 Tn916 的末端序列进行分析，发现其右端有一个潜在的外向启动子 (outwardly promoter)<sup>[9]</sup>，环化后可以通过连接区对左端序列的编码起增强作用<sup>[11]</sup>。

1989 年 Scott 等提出 Tn916 切除和插入的模型（图 2，3），它包含一个特殊的、不同于其它转座子的重组过程。Scott 对共价闭合的转座子环的接合部 (joint) 进行了克隆和序列分析，并同 Tn916 切除后原有靶 DNA 上的连接区进行比较，发现转座子环中包含一段异源双链结构 (heteroduplex)，这种结构的形成起因于靶 DNA 上与转座子紧密相连的偶联序列 (coupling sequences)。限制酶切分析和分子杂交实验都证实了异源双链结构的存在<sup>[8]</sup>。

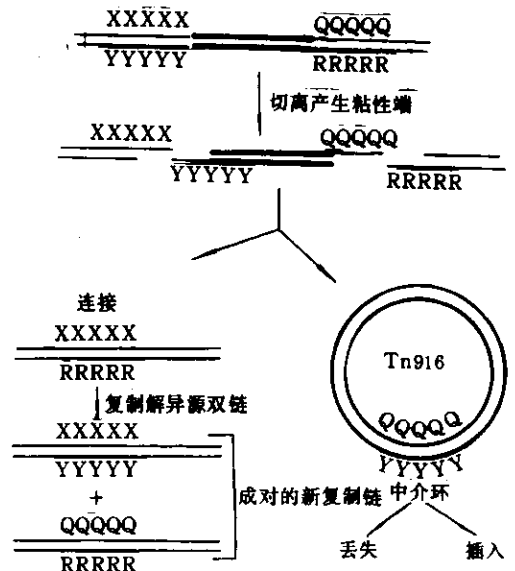


图 2 Tn916 切除模型

(X—Y, Q—R 代表符合配对原则的不同核苷酸对)

近年来的研究还表明，Tn916 的接合转移需要转座子编码的整合酶和切除酶活性<sup>[7]</sup>。切

除过程同时需要两种酶活性,插入时则只需要整合酶活性。对 Tn916 的末端序列分析表明<sup>[10]</sup>,在 Tn916 中确实存在编码整合酶和切除酶的基因 *int* 和 *xis*,它们同在 Tn916 的左侧末端<sup>[6,10]</sup>。最新的研究还发现,在以 G<sup>+</sup> 菌为受体的接合转移中,转座子的整合基因 *int*,只在供体中是必须的<sup>[12]</sup>。这表明 G<sup>+</sup> 菌中 Tn916 的整合不需要 *int* 基因作用,或者供体中产生的整合酶在接合转移过程中被从供体转移到接合子中。

和数量。在对这株菌进行深入研究时,还发现了一种非转座性质的 Tn916 转移,它是在染色体上一种被称为 Laff 的性因子作用下发生的,这种性因子经研究可能与早期发现的启动乳糖质粒 (lactose plasmid) 转移的 Clu 因子相同<sup>[13]</sup>。总之,有关 Tn916 的转移机制仍有许多问题有待进一步研究探索,以寻求正确的答案。

### 3 Tn916 的广泛寄主性

自从 Tn916 被发现以来,越来越多的实验结果表明,Tn916 存在广泛的寄主范围。虽然 Tn916 是从革兰氏阳性的链球菌 (*Streptococcus*) 中分离到的,但它不仅可以在链球菌的不同菌种之间发生接合转移<sup>[14]</sup>,还可以在多种 G<sup>-</sup> 菌以及 G<sup>+</sup> 菌和 G<sup>-</sup> 菌之间发生接合转移<sup>[7]</sup>。另外,通过原生质体转化,Tn916 还可在更广泛的寄主内表达<sup>[15,16]</sup>。已知的 Tn916 寄主有:链球菌属 (*Streptococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 等菌属中的许多 G<sup>-</sup> 菌<sup>[17-20]</sup>,以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、弗氏柠檬酸菌 (*Citrobacter freundii*)、真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 等 G<sup>-</sup> 菌<sup>[10]</sup>,另外,某些支原体 (*Mycoplasma*)<sup>[16]</sup>、放线菌 (*Actinomyces*)<sup>[21]</sup> 等也可以作为 Tn916 的寄主。随着 Tn916 插入诱变效应的应用,Tn916 已经被转移到越来越多的寄主内。

Tn916 已经在大肠杆菌中被克隆并表达<sup>[3]</sup>。pAM120 嵌合质粒是通过 pAD1 质粒上带有 Tn916 的一个 EcoRI 酶切片段 F,同 pBR322 的一个衍生质粒 pGL101 连接而成的,其大小为 21.4kb,带有青霉素抗性 (Ap<sup>r</sup>) 和四环素抗性 (Tc<sup>r</sup>) 标记。此克隆子可以作为供体把 Tn916 转移到 G<sup>+</sup> 菌中,但在大肠杆菌之间却不能发生接合转移。而且用 pAM120 质粒 DNA 转化大肠杆菌也得不到转化子<sup>[3]</sup>。另外,此克隆子在不含 Tc 的非选择性培养基中培养,Tn916 会迅速丢失 (> 90%),并无法恢复<sup>[3]</sup>。造成这一现象的原因还

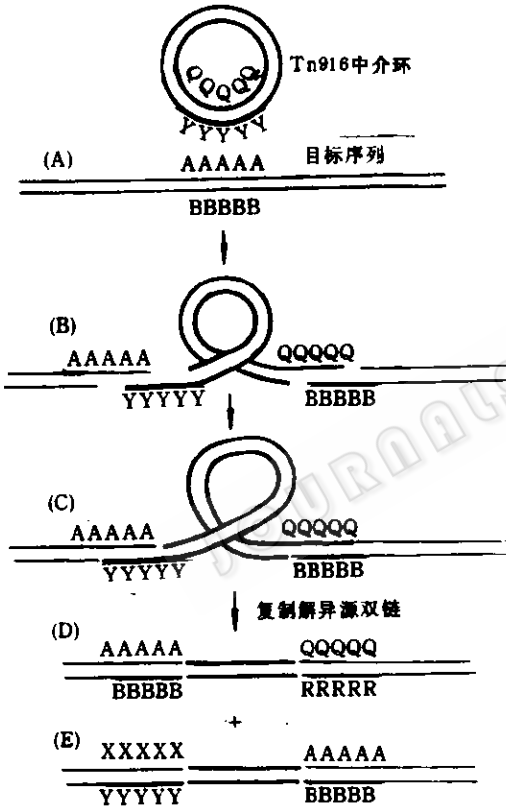


图3 Tn916 插入模型

(X-Y, Q-R, A-B 代表符合配对原则的不同核苷酸对)

另外, Scott 等人最近在研究 Tn916 的切除作用时发现,在乳酸乳球菌的一个亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 中, Tn916 不能被切除<sup>[13]</sup>,这说明在寄主中至少存在一种因子,它对 Tn916 的切除是必须的。它可能直接参与切除作用,或者影响相关蛋白质的合成

不清楚,据推测可能同缺少某种寄主因子有关,也可能因为转座子编码的一种或几种蛋白质不能顺利表达而引起。

#### 4 Tn916 的物理图谱及转座特性分析

Tn916 在 *E. coli* 中的克隆,为 Tn916 的遗传基础研究提供了很大方便。Tn916 的限制

酶切图谱就是在此基础上建立起来的<sup>[14]</sup>。Tn916 中的单一酶切位点有 Hind III、Bst XI、Sst I 和 Kpn I。多酶切位点有 Hinc I、Hpa I 和 Sau3A。其它限制性内切酶在 Tn916 上没有识别位点(图4)。

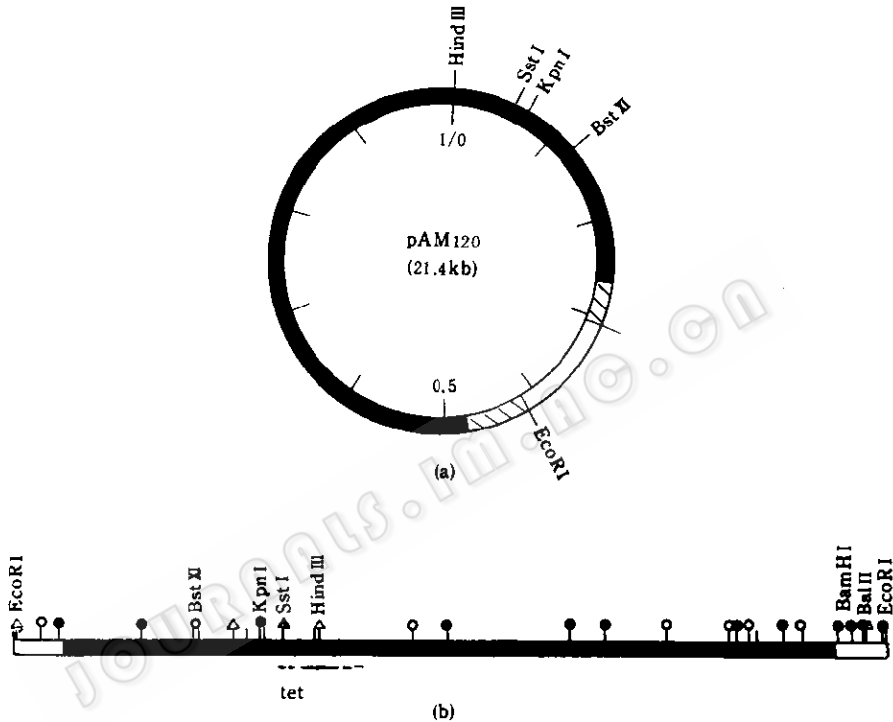


图4 Tn916 限制酶切图谱

(a) pAM120 (b) Tn916 及两侧 DNA 片段

多酶切位点的表示符号:

“●”: Sau3A, “○”: Hinc I, “△”: Hpa I, “tet” 示 Tc 抗性基因位置

对 Tn916 的全序列分析尚未见报道,但对其末端序列, Clewell 等人已在 1988 年进行了测序和分析<sup>[9]</sup>。分析结果表明,在 Tn916 的末端序列中存在 20—26 个核苷酸的不完全反向重复序列, 24—27 个核苷酸的不完全正向重复序列。在 Tn916 的右侧末端,有一个潜在的外向启动子,而与转座子切除、整合有关的基因却在序列的左侧。对其左端 1737 个核苷酸序列的深入分析显示,其中包括 4 个阅读框架: ORF1、ORF2、ORF3、ORF4。而 ORF3、

ORF4 包含在 ORF2 之中。ORF1 和 ORF2 对 Tn916 的切除作用是必不可少的,它们编码的两种蛋白质同 Lambda (λ) 噬菌体的 Xis 酶和 Int 酶存在一定的同源性,被命名为 Xis-Tn 和 Int-Tn<sup>[6,22]</sup>。

有关 Tn916 在染色体上插入位点的研究,近来也有新发现。虽然已经知道 Tn916 可以插入到染色体的不同位点上,但研究发现,至少在某些菌中, Tn916 存在插入热点<sup>[23]</sup>。它们是一些高度富含 A-T 碱基对的序列,它们

同 Tn916 的右侧末端存在同源性。另外在同一插入热点, Tn916 插入的频率也存在很大差异。分析表明, 这与环化时形成的连接区的序列不同有关。

## 5 其它接合转座子

Tn916 发现以来, 人们对接合性转座子的研究日益深入, 并陆续发现了一些同 Tn916 有类似性质的转座子。其中包括 Tn918、Tn919、Tn925、Tn1545、Tn3701、Tn5253、Tn5381 等。它们之中大多数是从链球菌属以及相关的 G<sup>+</sup> 细菌中的染色体上分离到的。它们都具有广泛的寄主范围, 能在多种 G<sup>+</sup> 菌和 G<sup>-</sup> 菌之间进行接合转移, 转移机制也是通过切除插入机制。分子杂交实验表明, 它们同 Tn916 存在很大的同源性, 而且都带有抗性基因。另外, 在一些厌氧的 G<sup>-</sup> 菌。如脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 中, 也发现了可接合转移的非质粒因子, 它们同接合转座子有相似的性质<sup>[24]</sup>。但到目前还未分离或克隆到这种因子。

对这些接合转座子的研究, 为其转移模型提供了新的证据。Courvalin 等人分离到与 Tn1545 切除整合有关的两种蛋白质, 并对编码它们的基因进行了分离、测序, 结果发现它们同其它位点特异性重组酶存在一定的同源性<sup>[25]</sup>。Rice 等人在对 *Enterococcus faecalis* 中的 Tn5381 研究中, 分离到它的环状超螺旋中间体, 这是第一次在 G<sup>+</sup> 菌中分离到这种环状中间体<sup>[26]</sup>。另外, 在对 Tn925 的研究中, Forres 等人发现它能带动非接合性质粒和染色体基因发生共转移<sup>[27]</sup>, 这在其它接合转座子中还很少发现。这也许会对接合转座子在遗传学研究中的应用产生积极的影响。

## 6 Tn916 在分子生物学研究中的应用

由于 Tn916 的特殊性质和它的广泛寄主性, 使它在分子生物学研究中有广泛的应用前景。Tn916 可以通过接合或转化, 转移到受体中并插入到染色体或质粒上, 从而造成插入失活, 这作为一种插入诱变的方法已广泛应用到菌种改造和选育中<sup>[23, 28]</sup>。利用这一方法诱变

有它独特的优点: Tc<sup>r</sup> 标记使筛选变得简便易行, 并有利于菌种的鉴定和保藏; Tn916 可以在不同位点多拷贝插入, 增加了发生有意突变的机率; 转座子插入后稳定性好, 不易发生恢复突变。

Tn916 还可以作为基因克隆的重要工具。首先, Tn916 本身可以作为基因载体, 把标记基因转移到受体中。又由于 Tn916 不具有免疫性, 因此可在受体中同时引入带有不同标记的 Tn916 的衍生子, 这在菌种诱变和基因工程研究中有重要价值。例如, 已经有实验把 Tn916 中的 Tc<sup>r</sup> 基因 tet 置换为红霉素抗性 (Er<sup>r</sup>) 基因<sup>[29]</sup>, 还有在 tet 基因的 Hind III 位点插入氯霉素抗性 (Cm<sup>r</sup>) 基因<sup>[14]</sup>, 这并不改变 Tn916 原有的接合转移特性, 利用 Er<sup>r</sup> 和 Cm<sup>r</sup> 作为选择标记, 可在插入诱变中得到更广泛的应用。另外, 由于与切除插入相关的基因都在 Tn916 的左端, 可以把右侧的一部分片段删去或置换上其它基因。有实验表明<sup>[14]</sup>, 在置换了右侧的一部分后, Tn916 仍能被切除, 也可以通过转化插入到 G<sup>-</sup> 菌的染色体上, 但它的接合转移活性却丧失了。其次, 由于 Tn916 在 *E. coli* 中能从克隆片段中被自然切除, 可利用这一点来克隆目的基因。当一段由于 Tn916 插入而失活的目的基因片段, 通过选择抗性标记被克隆到 *E. coli* 中后, 在不加抗生素的非选择条件下培养, Tn916 会被自然切除, 而使原来的基因片段重新连接而恢复活性, 这一被克隆的基因可以在 *E. coli* 中直接表达, 也可以通过其它遗传载体克隆到其它受体中去。如果克隆到的不是完整的基因, 也仍可以用它做探针去检测或钓取基因文库中的相应基因。有关这一点已经有成功的报道<sup>[14]</sup>。

此外, 在用 pAM120 转化某种支原体时, 还发现了共整合的现象<sup>[16]</sup>。转化后, 象在其它寄主中一样, Tn916 被多拷贝的插入到受体染色体的不同位点, 这并无特殊之处。但是, 在转化子的染色体上还发现了完整的 pAM120 片段。经分析研究提出了一种可能的解释: 受体同时被两分子 pAM120 转化, 其中一分子

通过切除、整合, Tn916 插入到受体染色体中, 然后染色体上的 Tn916 与仍以质粒形式存在的 pAM120 发生同源交换, 从而使完整的 pAM120 被整合到染色体上。如果这种解释成立, 就可以利用 Tn916 作为载体, 实现染色体的基因插入。

接合转座子诱动转移现象的发现, 也许会给它们在遗传研究中的应用开辟新的领域。已知的接合转座子诱动转移的例子有: Tn916 在苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中诱动非接合性质粒转移<sup>[30]</sup>, Tn925 在粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中诱动非接合性质粒和染色体基因转移等<sup>[27]</sup>。

总之, 以 Tn916 为代表的接合转座子, 是一类能在无质粒带动下发生接合转移的新型转座因子, 其大小从十几 kb 到几十 kb 不等, 一般都带有抗性基因。虽然在它们的性质、遗传特性、转移机理等方面, 有许多不清楚的问题还有待进一步探讨, 但它们的众多特殊性质已经受到了人们的重视, 并已开始应用到遗传育种和基因工程研究中去。将成为今后研究接合转座子的一个重要课题。

### 参 考 文 献

- [1] Clewell D B, Franke A E. *J Bacteriol.* 1981, **145**: 394-502.
- [2] Clewell D B. *Microbiol Rev.* 1981, **45**: 409-436.
- [3] Gawron-Burke C, D B Clewell. *J Bacteriol.* 1984, **159** (9): 214-221.
- [4] Gawron-Burke C, D B Clewell. *Nature* 1982, **300**: 281-284.
- [5] Norgaren M G, J R Scott. *J Bacteriol.* 1991, **173**: 319-324.
- [6] Clewell D B, S E Flannagan, L A Zitzow, *et al.* *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, Enterococci.* Amer. Soc. Microbiol. Washington D C, 1991, 39-44.
- [7] Storrs M J, P Trieu-Cuot, P Courvain, *et al.* *J Bacteriol.* 1991, **173** (14): 4347-4352.
- [8] M G Caparon, J R Scott. *Cell.* 1989, **59**: 1027-1034.
- [9] Clewell D B, S E Flannagan, J M Jones, *et al.* *J Bacteriol.* 1988, **170** (7): 3046-3052.
- [10] Bertram J, Stratz M, Peter Durre. *J Bacteriol.* 1991, **173**: 443-448.
- [11] Scott J R, P A Kirchman, M G Caparon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, **85**: 4809-4813.
- [12] F Bringel, L Van Alstine, J R Scott. *J Bacteriol.* 1992, **174**: 4036-4041.
- [13] F Bringel, L Van Alstine, J R Scott. *J Bacteriol.* 1992, **174**: 5840-5847.
- [14] Clewell D B, Gawron-Burke C. *Ann Rev Microbiol.* 1986, **40**: 635-659.
- [15] Susan C Y, J M Jones, P A Pattee. *Plasmid*, 1988, **19**: 13-20.
- [16] Kevin D, Tason A. *Plasmid*, 1988, **20**: 33-41.
- [17] J G Naglich, Robert F A JR. *Plasmid*, 1988, **19**: 84-93.
- [18] Volk W A, B Bizzini, K R Jones, *et al.* *Plasmid*, 1988, **19**: 225-259.
- [19] Robert B H, Terence R W. *A. E. M.*, 1991, **57**: 2703-2709.
- [20] Carol A H, L K Jolmsen, Nancy J T, *et al.* *Plasmid*, 1991, **26**: 1-9.
- [21] M R Natarajan, P Oriol. *A. E. M.* 1992, **58** (8): 2701-2703.
- [22] Yan A Su, D B Clewell. *Abstracts of the Annual Meeting of ASM*, 1992. 183, H-2.
- [23] D Jaworski. *Abstracts of the Annual Meeting of ASM*, 1992. 183, H-3.
- [24] David A O, Jeanette L R, C J Smith, *et al.* *Plasmid*, 1987, **17**: 87-109.
- [25] Poyart-Salmeron C, P Trieu-Cuot, C Carlier, *et al.* *EMBO.*, 1989, **J. 8**: 2425-2433.
- [26] L B Rice, Steven H M, Lenore L C. *J Bacteriol.* 1992, **174**: 7308-7315.
- [27] Olgak Torres, Ruth Z K, Stauley A Z. *M G G.* 1991, **225**: 395-400.
- [28] Eric A J, Wei-Jen Lin. *A E M.* 1991, **57** (10): 2946-2950.
- [29] Craig E R, Laura M H. *Plasmid*, 1988, **20**: 137-142.
- [30] Joseph G N, Robert E A JR. *Plasmid*, 1988, **20**: 113-126.