

转座子 Tn917 及其应用

余健秀 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

关键词 转座子, 外源基因

分类号 Q93-933

利用转座子和整合载体发展了一系列技术, 这些技术包括: (1) 插入中断染色体基因, 确定基因是否有功能; (2) 在所感兴趣的基因近侧翼插入筛选标记和报告基因 (reporter gene), 使研究基因结构及转录调节方式等变得容易; (3) 经改造的基因再导入染色体和通过重组把外源基因导入质粒、噬菌体及宿主菌的基因组, 进行菌种改良。近年来, 转座子 Tn917 及其衍生载体被用于枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*, Bs) 或其它革兰氏阳性 (G^+) 菌的染色体突变、基因转移等, 并已成为改良菌种的一种新途径。

1 Tn917 的发现和性质

1979年 Tomich 等^[1]首先发现粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 菌株 DS16 含有两个质粒, 一个是共价接合质粒 pAD1, 含编码溶血素和溶菌素基因; 另一个是非共价接合质粒 pAD2, 带有抗链霉素 (Streptomycin, Sm)、卡那霉素 (Kanamycin, Km) 和红霉素 (Erythromycin, Em) 的编码基因。红霉素抗性基因 (*erm*) 的表达是可诱导的, 它定位于 3.3MD 转座子即 Tn917 上, 可从 pAD2 转座到 pAD1 及其它两个质粒 pAM γ 1 和 pAM α 1。当菌株 DS16 在低浓度 Em 下经几小时诱导, Tn917 从 pAD2 到 pAD1 的转座频率增大, 这种诱导作用与红霉素抗药性诱导显示出同一动力学曲线^[2]。后来, 1981年 Clewell 等^[3]又发现在接合性质粒 pAD1 上存在另一类性质不同的接合性转座子 Tn916。

Tn917 作为较有效的插入突变介导具有如下特征: (a) Tn917 插入染色体、质粒或噬菌体 DNA 具有相当高的随机性。Tn917 可在不同染色体或染色体不同位点上形成插入子^[4-6], 但存在区域优先性。 (b) Tn917 转座频率相当高, 转座染色体的频率为 10^{-5} , 质粒为 10^{-4} 。 (c) Tn917 插入突变非常稳定, 回复率小于 10^{-10} 。 (d)

Tn917 允许容纳 8kbp 的外源 DNA 而对转座频率无影响。 (e) 在 Bs 或其它许多 G^+ 菌中, 可利用 Tn917 携带的 *Em^r* 作选择压力。已对 *Em* 有抗性的细菌, 可通过改造 Tn917 非必须区使之携带其它抗药性基因。在 Tn917 非必须区的一个克隆位点中插入其它抗药性基因构建新的衍生载体, 这样不仅扩大转座子可能的应用范围, 而且也扩大潜在的宿主范围包括许多野生型具 MLS (Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Antibiotics) 抗性的 G^+ 菌^[7]。 (f) Tn917 有相当广阔的宿主范围甚至包括大肠杆菌。

最初构建的 Tn917 的衍生载体 pTV1, 它含有来源于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 叫 pE194 的温度敏感复制子^[8], 但 pTV1 有一个很大的缺点是其复制子热敏感性差, 当温度高达 50℃ 才不能复制。新一代的温度敏感突变复制子 pE194Ts 是 pE194 的点突变或可能紧密相连的双点突变的突变体^[9], 在 37℃ 以上它不能自主复制。含有 Ts 成份的 Tn917 载体具有如下两大优点: (a) 较低温 (38~48℃) 可以富集染色体上有插入的菌落。 (b) 染色体上有插入的菌落可以不必在选择压力温度而在 32℃ 下直接铺平板而得到。因此, 几种 Tn917 的衍生载体已被构建, 如 pTV32TS、pTV51TS、pTV53TS、pLTV1 和 pLTV3, 它们都含有对温度特异敏感的复制子 pE194TS, 且带有改造过的在杆菌属中能高效翻译的 *E. coli* 的 *lacZ* 基因^[10], 它们的结构和功能特征主要是: (a) pTV32TS, 长 15.6kbp, 转座时 *erm* 基因作选择标记; *cat* 基因存在于转座子序列外。 (b) pTV51TS, 长 15.5kbp, 转座时 *erm* 基因作选择标记; *tet*

863计划(项目号863-101-03-01-01)和广东省自然科学基金资助项目
1997-03-03收稿

基因存在于转座子序列之外。除了在无启动子的 *lacZ* 基因序列区的 3' 端有单一的 *Bam*HI 和 *Sma*I 酶切位点之外,其转座子序列区类似于 pTV32TS。在上述两个位点允许插入其它抗药性基因,作为己对 *Em* 有抗性的细菌之用。(c)pTV53TS,长 16.9kbp,同样也以 *erm* 基因作为转座时的选择标记;*tet* 基因存在于转座子序列之外。它包含有串联的无启动子 *lacZ* 基因和 *cat*-86 基因,两基因之间无转录终止子。(d)pLTV1,长 20.6kbp,*erm* 基因和 *cat* 基因作为转座时的选择标记,*tet* 基因存在于转座子序列之外。在转座子序列区包含有 5.0kbp 插入成分,包括一个衍生于 *ColE1* 的复制子、一个来源于 *E. coli* 的选择标记基因——*bla* 基因、一个衍生于 M13 的复制子和一个多克隆位点^[11]。(e)pLTV3,长 22.1kbp,这个载体衍生于 pLTV1,部分消除了 *bla* 基因而插入来源于 Tn5 的包含有 *neo* 和 *ble* 基因的 DNA 片段^[11]。这个载体比 pLTV1 还有一个优点,可在病原菌里产生转座并形成 *lacZ* 融合子。当 pLTV1 和 pLTV3 转入单核细胞增多性李司忒氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 时,虽 pLTV1 和 pLTV3 比 pTVITS 多 10kbp 的外源 DNA,但转座频率比 pTVITS 高达 50~100 倍,且不引起任何结构上的不稳定性,其机理仍未清楚。这种增强的转座作用导致一个重要的结果是插入文库的范围可大大缩小。

2 类似 Tn917 的转座子

已经证明,转座子 Tn917 属 Tn3 家庭。Tn3 类转座子具有一些共同特征: Tn3 类转座子较长,约 5000bp,比插入序列 *Is* (Insertion sequences) 长得多;其两端存在约 38~40bp 的 IRs (inverted repeat sequences, 倒转重复序列);转座时在其靶点两侧产生 5bp 同向重复序列;与复合转座元相同, Tn3 类也携带自身的转座基因和抗药性基因(如 Tn917 带有 *erm* 基因)等;大部分 Tn3 类都能进行抗药性诱导而发生转座作用,对 G^+ 菌具有转座功能的 Tn551 也属 Tn3 类^[12],但它不能进行抗药性诱导。

在粪链球菌 R 因子质粒 pJH1 含有类似于 Tn917 的转座子 Tn3871,长 5.1kbp,也含 *erm* 基因,用 *Ava*I 酶可切出三个在大小上与 Tn917 的 *Ava*I 酶切片相同^[13]。最近,在单核细胞增多性李司忒氏菌中发现一个天然的、全长为 6449bp 的转座子 Tn5422 也属 Tn3 家族,线型,含不完全对称的 40bp 的 IRs;它含有包括与镉抗性有关的两个基因^[14]和分别编码一个含 971 氨基酸的 TnpA (transposase, 转座酶) 和一个含 184 氨基酸的

TnpR (resolvase, 拆分酶) 的两个 ORFs, 镉抗性基因和与转座有关的基因有不同的转录方向,且它们之间隔之以 Res (internal resolution sequences, 内部拆分序列) 位点。与 Tn5422 转座作用有关的结构元素包括 IRs, TnpA, TnpR 和 Res 都非常类似于 Tn917 的对应元素,暗示着可能有共同的起源。

3 Tn917 在分子生物学中的应用和其寄主范围

众多的实验结果表明, Tn917 存在广泛的寄主范围。1983 年 Youngman 等^[4]利用细胞融合的方法把质粒 pAM $\alpha 1$: Tn917 转入 *Bs* 中,发现 Tn917 在 *Bs* 染色体上有很多插入位点,可产生各种营养突变体及孢子缺陷表型等,这说明利用 Tn917 的插入突变可作为遗传育种的一种潜在工具。通过把来源于质粒 pBR322 的复制子和来源于 G^+ 菌的 *cat* 基因,以两个方向连接插入于近 Tn917 中间的 *Sal*I 酶切位点,构建了新的线型质粒,当它转化具氯霉素抗性且在染色体上已整合 Tn917 的 *Bs* 时, pBR322 序列部分能通过同源重组有效地整合到染色体上的转座子拷贝区域;然后用合适的限制性内切酶裂解总染色体 DNA,适当稀释后再自连,转化 *E. coli*,从而可快速克隆 *Bs* 染色体上的 Tn917 插入侧翼 DNA^[15]。还构建了一个比较典型的 Tn917 衍生转座子 Tn917-lac,它能够使 *Bs* 染色体基因的转录单位与 *E. coli* 的 *lacZ* 基因编码序列相偶联形成融合子,利用这衍生转座子已得到两个稳定的 *gluA* 基因和 *trpE* 基因的插入子,结果证实 Tn917-lac 介导的转录融合子产生 β -半乳糖苷酶的水平可以准确反映中断基因的调节表达情况;还可通过分析 Tn917-lac 介导的融合子部分二倍体的情况而推测中断基因的调节表达,部分二倍体是利用完整基因与中断基因的互补而得到的。已知 Tn917 在三种典型的 G^+ 菌: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* 和其它 G^+ 菌中显示相当高的转座随机性,因此 Tn917-lac 对研究 G^+ 菌属的众多基因的表达调控将极为有利^[10]。1986 年 Vandeyar 等^[5]把 Tn917 插入到 *Bs* 染色体上,筛选到 46 种插入子,其中一些属营养缺陷型,而另一些还未知其性质;这些插入位点分布于整个染色体。1987 年 Sandman 等^[6]详细研究了 24 个 *Bs* 的 *Spo*: Tn917 突变体,发现有 20 个清楚的 *spo* 位点,至少有 9 个区别于先前发现的 40 个 *spo* 位点;这些突变导致在不同时期孢子的形成被阻断,相应地,可以确定在孢子形成的不同时期的基因激活情况。1989 年

Gavrilova 等^[16]研究了在 Bs 中 11 个 rec-基因对 Tn917 转座频率的影响,发现 RecP、RecF15、RecB3 突变株的转座频率与对照菌株的不一样。大部分转座子插入使基因失活,但在某些情况下可顺式地激活插入位点附近的基因,如有人发现 Tn917 在 Bs 的插入具有双重效应,如使 sacX 基因失活和增加 sacY 基因的转录^[17]。1991 年 Zagorec 等^[18]构建了 Tn917PF1 衍生载体,它含有一个近某一端的强外向型启动子,可以启动插入位置附近的基因转录,有三个 Tn917PF1-Bs 的突变体被认为获得了基因的过量表达。

还陆续发现 Tn917 可在其它许多杆菌中发生转座作用。如 pTV1 转入巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)时,能有效并随机地发生转座,插入位点至少包括八个与营养缺陷型有关的位点、两个与碳源代谢有关的位点和一个与孢子萌发有关的位点,其中一个 urp: Tn917 突变株被进一步证明能够发生回复和转导作用^[19]。pTV1 还成功地用来诱变短杆菌(*B. brevis*)^[20]。当用电激法把 pTV1Ts 导入胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),经过在 40℃、MLS 药物下两次液体培养筛选,然后铺平板,筛选到丢失了 Cm 抗性而保留了 MLS 抗性的两个菌株,分别为 NC4Ts1 和 NC7Ts5,表明 Tn917 转座到宿主基因组上^[21]。采用原生质体融合的方法,把 pTV32TS 导入短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)中,其复制的温度敏感性仍存在,转座频率为 4.8×10^{-4} ,在所有插入子中,营养缺陷型占 0.65%^[22]。Tn917 在地衣型芽孢杆菌(*B. licheniformis*)中也有插入突变的现象^[23]。最近,我们利用电激法把 pTV1Ts 及其衍生载体 pTYP26、pTYP45 等转入苏云金杆菌中,筛选到几个丢失了 Cm 的抗性而保留了 Em 的抗性的工程菌株, Southern 及斑点杂交证明 Tn917 和外源基因已整合到 Bt 染色体上,并且外源基因具有较高的表达水平。

在一些球菌中,Tn917 也能发生转座作用。如 pTV1 被转入表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)中,在 47℃ 丢失了质粒的复制子,能有效并随机地发生转座,且被 Em 诱导^[24],可获得许多不同突变株的表型^[25,26]。在金黄色葡萄球菌中,Tn917 也能诱发突变^[27]。当 pLTV1 作用于乳球菌(*Lactococcus lactis*)时,筛选到 2500 个无启动子的 lacZ 基因整合于染色体敏感位点的插入子,其中有 222 个在平板上于 30℃ 表达了 β -半乳糖苷酶,特别有一个插入子 PA170,在 pH5.2 而不

在 pH7.0 时产生 β -半乳糖苷酶,且在 15℃ 比 30℃ 产生的数量更多和生长平稳期的 β -半乳糖苷酶活性更强。在研究 Tn917 转座乳球菌的插入子中,得到了潜在含有启动子的 DNA 片段,这个片段已被克隆于 *E. coli* 中^[28],构建了新启动子探针载体 pAK80,进一步研究了基因表达的启动子调节机制。

另外,对 G⁺ 菌具有转座功能的 Tn917,能通过 Bs-E. coli 的穿梭质粒 pHK1207 转座到 *E. coli* 中一个 F' 衍生质粒上,接着从这个 F' 因子强烈转座进入另一个质粒 pACYC184,这表明属 G⁺ 的转座子 Tn917 对 G⁻ 菌也有较强的转座作用^[29]。

参 考 文 献

- [1] Tomich P K, An F Y, Clewell D B. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1979, 43 Pt2:1217~1221.
- [2] Clewell D B, Tomich P K, Gawron-Burke M C, et al. J Bacteriol, 1982, 152:1220~1230.
- [3] Clewell D B, Franke A E. J Bacteriol, 1981, 145:394~502.
- [4] Youngman P J, Perkins J B, Losick R. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80:2305~2309.
- [5] Vandeyar M A, Zahler S A. J Bacteriol, 1986, 167:530~534.
- [6] Sandman K, Losick R, Youngman P. Genetics, 1987, 117:603~617.
- [7] Youngman P, Perkins J B, Losick R. Plasmid, 1984, 12:1~9.
- [8] Iordanescu S. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. 1976, 35:111~118.
- [9] Villafane R, Bechhofer D H, Narayanan C S, et al. J Bacteriol, 1987, 169:4822~4829.
- [10] Perkins J B, Youngman P J. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:140~144.
- [11] Camilli A, Portnoy A, Youngman P. J Bacteriol, 1990, 172:3738~3744.
- [12] Perkins J B, Youngman P J. Plasmids, 1984, 12:119~138.
- [13] Rollins L D, Lee L N, LeBlanc D J. Antimicrob Agents Chemother, 1985, 27:439~444.
- [14] Lebrun M, Audurier A, Cossart P. J Bacteriol, 1994, 176:3049~3061.
- [15] Youngman P J, Perkins J B, Losick R. Mol Gen Genet, 1984, 195:424~433.
- [16] Gavrilova A, Savchenko G V, Prozorov A A. Mol (下转第 238 页)

(上接第 241 页)

- Gen Microbiol Virusol, 1989, 38~40.
- [17] Le Coq, D, Aymerich S, Steinmetz M. J Gen Microbiol, 1991, 137(Pt 1):101~106.
- [18] Zagorec M, Steinmetz M. J Gen Microbiol, 1991, 137(Pt1)107~112.
- [19] Bohall N A, Vary P S. J Bacteriol, 1986, 167:716~718.
- [20] Mishra H S, Mishra D P, Garg G K. Indian J Biochem Biophys, 1991, 28:472~475.
- [21] Cosby W M, Axelsson L T, Dobrogosz W J. Plasmid, 1989, 22:236~243.
- [22] Geng Y, Jiang R. Wei Sheng Wu Hsueh Pao, 1992, 32:305~307.
- [23] Herzog-Velikonja B, Podlessek Z, Grabnar M. FEMS Microbiol Lett, 1994, 121:147~152.
- [24] Grueter L, Koenig O, Laufs R. FEMS Microbiol Lett, 1991, 66:215~218.
- [25] Grueter L, Feucht H, Mempel M, et al. Microbiol Immunol, 1993, 37:35~40.
- [26] Heilmann C, Gerke, C, Perdreau-Remington, et al. Infect Immun, 1996, 64:277~282.
- [27] Mani N, Tobin P, Jayaswal R K. J Bacteriol, 1993, 175:1493~1499.
- [28] Israelsen H, Madsen S M, Vrang A Et al. Appl Environ Microbiol, 61:2540~2547.
- [29] Kuramitsu H K, Casadaban M J. J Bacteriol, 1986, 167:711~712.
- [30] 余健秀, 庞义. 转座子Tn917的DNA序列计算机分析. 中山大学学报(自然科学版), 1997(4), 已接受.