

评论

芽孢杆菌属中发现的第一个转座子——Tn4430

范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室, 北京)

在革兰氏阳性菌中有两个转座子, 一个是Tn551, 来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[1], 另一个是Tn917, 来自粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)^[2]。这两个转座子均含有红霉素抗性基因, 具有DNA同源性。它们的末端反向重复序列(Inverted repeated sequence)与革兰氏阴性的Tn-3家族的末端反向重复序列之间有很高的同源性^[3,4]。

最近, 法国巴斯德研究所的科学工作者报道了一个新的转座子^[5] Tn4430, 这是芽孢杆菌属中报道的第一个转座子, 它来源于苏云金芽孢杆菌属(*Bacillus thuringiensis*)。

1982年Gonzalez及Carlton^[6]发现BT的质粒接合转移系统(Plasmid mediated conjugation), 揭示了BT菌株中遗传物质交换的一个新途径, 具有重要意义。在Gonzalez等的工作启发下, Lereclus等^[7]利用质粒接合转移方法来研究BT晶体毒素基因的定位及质粒间相互关系, 考虑到BT中的传递性质粒(Transmissible plasmid)缺乏选择标记, 不易筛选接合转移子。因此, 他们利用了粪链球菌JH2-2(革兰氏阳性菌)中的一个带有红霉素及林肯霉素抗性基因的传递性质粒pAM β 1^[8], 对不同的BT菌株进行接合转移试验。结果表明, pAM β 1质粒可从*S. faecalis*中转移至不同BT菌株中。在BT菌株间的接合转移频率为 10^{-4} /受体细胞。在

他的工作中发现了一个有趣的事实, 即当用Kurstaki KT。(pAM β 1) Em'作给体, 以Kurstaki HD-1 B cry⁻ str'为受体时, 在一个接合转移子中出现了三个新的质粒, 其中有一个质粒分子量大于pAM β 1。这个克隆命名为HD-1 B cry⁻(β T)。通过再一次的接合转移, 证明原先在Kurstaki HD-1 B cry⁻中的5.2Md质粒是不能转移的, 而该质粒是传递性质粒, 分子量为20Md, 定名为pAM β 1T。用EcoRI, Pvu II (或KpnI) 酶切pAM β 1及pAM β 1T, 发现后者比前者大3Md, 插在3Md大小的EcoRI片段中。

为了阐明pAM β 1上3Md片段的来源, 用pAM β T DNA作探针, 与BTKT。的质粒进行分子杂交, 或者反过来, 用KT。的不同质粒DNA为探针, 对pAM β 1T质粒的不同构形DNA进行分子杂交。结果表明^[7]: pAM β 1T质粒只与KT。菌株中的54Md质粒杂交, 对照用的pAM β 1作探针, 不与KT。中任何质粒杂交。因此, pAM β 1T上的3Md插入物(称为T_h序列)是来自KT。菌株中的54Md质粒, pAM β 1T质粒(20Md)的形成是BTKT。中54Md质粒上的3Md DNA片段插入至*S. faecalis*中的pAM β 1(17Md)的结果。

对pAM β 1T质粒的特性及T_h序列进行研究^[9]发现: (1) pAM β 1T质粒在BT

本文于1987年2月6日收到。

菌株中不稳定,经常以高频率发生缺失。在缺失质粒上保留了红霉素抗性基因,但失去-11Md的tra⁺基因,使质粒不再有接合转移特性。缺失质粒的分子量在8Md至10Md的范围;(2)缺失质粒的缺失部位发生在pAMβ1质粒上的Th序列末端;

(3)Th序列存在于不同血清型的BT菌株中;即令在同一个BT菌株中,Th序列也可分布在多个位点上。例如,Th序列不仅在KT₀中,而且在sotto(血清型4), aizawai(血清型7), berliner1715(血清型1)等菌中均有分布:Th与KT₀的54Md质粒、sotto的35Md质粒, aizawai的10Md、45Md的质粒、berliner 1715的9Md、20Md、40Md的质粒均呈杂交阳性。

由于发现Th序列在δ-内毒素质粒上的分布,因此,Lereclus等研究Th序列与δ-内毒素基因的关系^[11]。δ-内毒素基因与Th序列的两侧有两套反向重复序列即IR1及IR2,在δ-内毒素基因与Th序列两者之间还有一个拷贝的IR1。他们称这样一个复合结构为与δ-内毒素基因有关的类转座结构^[11]。这是在1986年他们证明Th序列本身为转座子之前对Th可能参与转座结构的第一个推测。他们是根据Th的插入、引起缺失、广泛分布于BT中以及从BT质粒上跳到*S. faecalis*中的pAM1等特性作出的推测。1985年Mahillon^[10]等对IR1(1750bp)的DNA进行了序列分析,揭示了IR1具有插入序列(Insertion sequence)的所有特征,将IR1定名为IS230。那么Th到底是什么性质的DNA序列?1986年Lereclus等通过转座实验提供了直接的证据^[9],确定了Th序列就是一个转座子,命名为:Tn4430。

在他们设计的转座实验中,利用pMT9质粒*中Th序列的单一HpaII切点与*S. faecalis*中位一个能在*B. subtilis*及

*E. coli*中表达的卡那霉素抗性基因APH-III^[12,13]连接,然后转化至*B. subtilis*中(原生质体转化途径),得到pHT921质粒。在pHT921质粒上带有Tn4430ΩAPH-III,使得易于选择Tn4430的转座。它的复制区是来自pAMβ1,因此不能在*E. coli*中复制,有利于测定Tn4430转座至*E. coli*的能力。但在以pHT921为转座给体和pBR322为靶子受体进行的转座实验中,没有得到转座的正结果。分析可能的原因有二:第一是Tn4430在*E. coli*中根本不能转座;第二,Tn4430能在*E. coli*中转座,只是由于APH-III基因插在Tn4430的HpaII位点后,破坏了它的转座能力。进一步的实验证明了是属于第二种判断的情况。他们用同样的转座方法,只是用的转座质粒(pHT429)上除带有Tn4430ΩAPH-III外,还有另一个Tn4430的完整拷贝,在这种情况下,发现Tn4430ΩAPH-III成功地转座至pBR322上。在这个实验中所用的pHT429是来自pHV33质粒,而pHV33质粒乃由pBR322与pC194建构而成的穿梭质粒,既能在*E. coli*中复制,也能在*B. subtilis*中复制,他们巧妙的设计在于利用了质粒的不相容性(Incompatibility)特点,因而简便地检测出Tn4430ΩAPH-III从pHT429上转座至pBR322·Tn4430ΩAPH-III,转座频率为10⁻⁶/给体世代。

Tn4430ΩAPH-III转座需要有一个完整Tn4430的拷贝存在,但究竟后者如何作用?通过另一个实验证明了后者是以trans方式作用于Tn4430ΩAPH-III的转座。可以推测,APH-III的插入破坏了Tn4430转座时必需的基因产物。至于该产物的性质是蛋白质或RNA,尚待进一步研究。上述

* pMT9是pAMβ1T转化至*Bac. subtilis*后得到的缺失质粒,分子量为9Md,带有红霉素抗性基因及一个拷贝的Th序列。

结果为阐明 Tn4430 的转座分子机制提供了有价值的材料。

由于所用的转座靶子质粒为 pBR322，它的核苷酸序列是已知的，因此Tn4430转座至 pBR322 上后，可直接检测出它的末端反向重复序列的核苷酸顺序，以及在

pBR322 上插入位点的序列。结果表明：
(1) Tn4430ΩAPH-Ⅲ在pBR322的插入位点上有 5bp 的同向重复序列：5'-AGCAA-3'。(2) 在Tn4430ΩAPH-Ⅲ的两端有方向相反的38个相同的碱基对(图1)。进一步将 Tn4430 末端反向重复序列

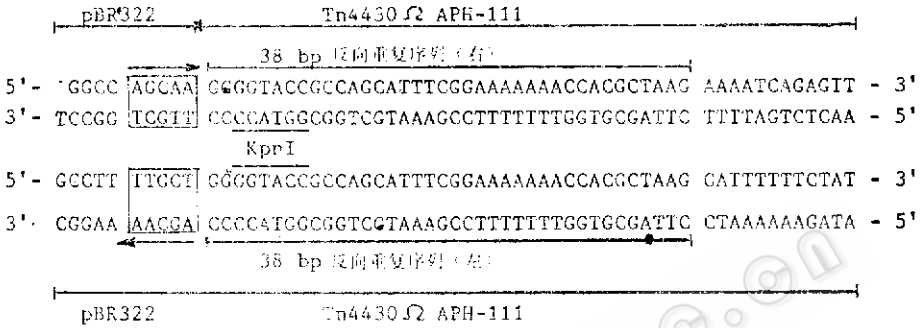


图1 Tn4430的末端反向重复序列(以大写字母表示)以及由于Tn4430ΩAPH-Ⅲ插入至pBR322后产生的5bp的同向重复序列(以括号表示)[5]

与E. coli的Tn3、Tn1721及属于Tn3族的Tn917的末端反向重复序列加以比较，发现Tn4430的38bp反向重复序列与Tn3、Tn1721、Tn917的类似(图2)：38bp中有25bp与Tn3的相同，30bp与Tn1721的相同，21bp与Tn917的相同。说明Tn4430与Tn3族中的转座子可能由同一祖先进化而来。

Tn4430是芽孢杆菌属中被发现的第一个转座子。它的发现不仅对BT的遗传学研究有重要意义，而且提示在革兰氏阳性菌和阴性菌间转座因子进行交换的可能性。芽孢杆菌在工农业上应用广泛(如各种酶制剂、杀虫剂等)，在分子遗传学及

| | |
|--------|--------------------------------------------|
| Tn4430 | CCGGTACC GCCACATTTTCGGAAAAAACCCAGCTAAG |
| Tn917 | CCGCTCCGAGCGCTACGCGGAATTTTCATCGATAAG |
| Tn3 | CCGGTACC GCGCTCAGTCCAGCAACGAAAACTCAGCTTAAG |
| Tn4430 | CCGGTACC GCCACATTTTCGGAAAAAACCCAGCTAAG |
| Tn1721 | CCGGTACC GCGGAATTTTCGGAAAAAACCCAGCTAAG |

图2 Tn4430、Tn3、Tn1721及Tn917末端38bp的反向重复序列的比较[5]

发育遗传学的理论研究方面是一个很好的研究对象，在基因工程方面不仅是一些有重要商品价值的基因来源，而且也是外源基因表达和蛋白质分泌的重要受体。对于芽孢杆菌中转座子的研究是一个值得重视的问题。

参 考 文 献

- [1] Novick, R.P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:400—404, 1979.
- [2] Tomich, P.K. et al.: *J. Bacteriology*, 141:1366—1374, 1980.
- [3] Khan, S.A. and Novick, R.P.: *Plasmid*, 4:148—154, 1980.
- [4] Perkins, J.B. and Youngman, P.J.: *Plasmid*, 12:119—138, 1984.
- [5] Lereclus, D. et al.: *MGG*, 204:52—57, 1986.
- [6] Gonzalez, J.M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6951—6955, 1982.
- [7] Lereclus, D. et al.: *MGG*, 191:307—313, 1983.
- [8] Clewell, D.B. et al.: *J. Bacteriol.*, 117:283—289, 1974.
- [9] Lereclus, D. et al.: *EMBO. J.*, 3:2561—2567, 1984.
- [10] Mahillon, J. et al.: *EMBO. J.*, 4:3890—3899, 1985.
- [11] Lereclus, D. et al.: *Biochimie*, 67:91—99, 1985.
- [12] Trieu-Cuot, P. et al.: *Gene*, 23:331—341, 1983.
- [13] Trieu-Cuot, P. et al.: *MGG*, 198:348—352, 1985.

JOURNALS.IM.AC.CN