

转座子在遗传分析和体内基因操作中的应用

王 敖 全

(中国科学院微生物研究所,北京)

能在基因组间或组内跳跃的 DNA 片段称之为 DNA 插入因子 (Insertion element)。这种跳跃不需要插入因子和插入位点间的广泛同源性,也不需要进行一般杂交所必须的重组基因。这类插入因子不仅广泛存在于原核生物^[1-3],也在不少真核生物如玉米、果蝇、酵母等中发现^[4,5]。

DNA 插入因子按其大小和结构复杂性可分为三类: 1. 结构简单, 大小仅 800—1500 碱基对的 IS 因子, 这类因子只含有与转座功能有关的基因; 2. 结构复杂, 分子量大的噬菌体 Mu 和 λ , 分别有 3.75×10^4 和 4.62×10^4 碱基对; 3. 大小和复杂性介于前二者之间的转座子 (Tn)。

转座子除带有转座必须的基因外, 还带有药物抗性基因和与转座无关的一些附带结构。近十年来, 人们对插入因子的普遍存在及其在寄主基因组内能插入到许多位点的事实有着强烈兴趣。已有证据表明, 这些 DNA 插入因子是自然界大部分自发突变和染色体

DNA 重排的根源; 它们能改变靠近插入位点附近的基因的表达, 还能促进某些基因如抗生素抗性基因, 病源性基因等在不同细菌种间的流动。由于转座子不仅能凭借不正常重组机制在 DNA 分子间或分子内跳跃, 还带有易于选择的抗药性标记, 因此它已发展成为一个强有力的遗传分析工具。本文以大肠杆菌转座子 Tn5 和 Tn10 为例, 讨论转座子作为一种新技术在分子遗传和体内基因操作中的应用。这些新技术为: 转座子诱变; 局部诱变; 对克隆 DNA 片段的诱变; 缺失突变体的分离; 实验菌株的构建; 邻近某特定基因的转座子插入物的分离。

(一) 转座子诱变

当转座子转座到某个基因时, 该基因连续性遭到破坏, 导致基因功能消失造成突变。通常由此产生的突变是稳定的和非泄漏的。其行为类似点突变。这样的突变往往仅涉及一个遗传位点。对大多数细菌转座子而言, 它们的转座频率是相当低的, Tn5 和 Tn10

分别为 10^{-4} 和 10^{-5} Tn2 为 10^{-6} 。这样在一个经转座子诱变的细胞群体中, 双重转座的频率低于 10^{-10} 。所以双重突变体几乎是不存在的。与化学或物理诱变常常造成突变位点以外染色体损伤相比, 这是转座子诱变的一大优点。转座子插入突变构成了一个新的遗传和物理标记(前者可用 DNA-DNA 杂交加以鉴别, 后者可通过限制性核酸内切酶分析鉴别)。这样的插入突变如果发生在多基因的操纵子内, 通常导致插入位点下游基因的极性效应, 现认为这可能是转座子本身持有转录和翻译终止信号所致。转座子插入突变产生极性效应这一特性已广泛用于对细菌操纵子的结构分析。用四环素抗性转座子 Tn10 诱变大肠杆菌或鼠伤寒沙门氏菌染色体 DNA 时, 如果通过选择 Tce^r 来筛选突变体, 并假定 Tn10 插入染色体 DNA 是随机发生的, 那么从理论上讲, 产生每一种染色体突变的频

率约为 1/3,000, 其理由是大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌染色体都由约 3000 个基因组成。在细菌遗传分析和体内基因操作中广为使用的转座子是卡那霉素抗性转座子 Tn5。它的遗传结构和酶切位点见图 1^[1]。Tn5 因其某些特性成了当今遗传分析和体内基因操作的有力工具。这些特性是(1)当转座子一旦被引入细胞就能以很高频率发生转座,(2)一旦转座到某个 DNA 位点就能比较稳定地保持住,(3)能转座到染色体或其它基因组的许多位点(质粒, 噬菌体等)(偶见插入热点),(4)卡那霉素抗性标记不但在原核生物中容易选择, 在某些真核生物中亦一样^[9,10]。迄今为止, 用 Tn5 诱变过的大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的染色体结构基因和操纵子有组氨酸操纵子^[11]、乳糖操纵子^[12]、异亮氨酸缬氨酸操纵子^[13]等。

由于 Tn5 转座运载体的改进, Tn5 诱变已扩展到大

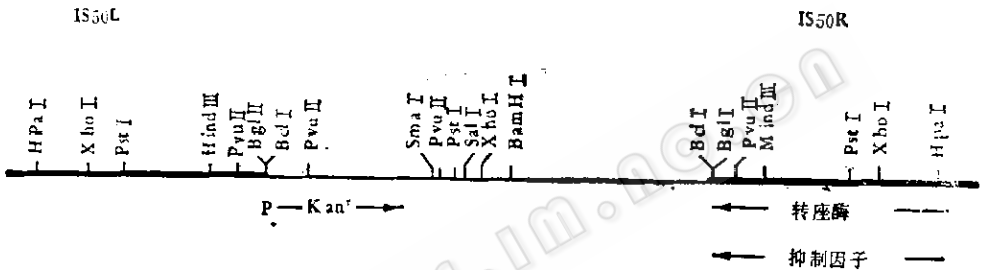


图 1 Tn5 的结构和酶切位点

肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌以外的一些革兰氏阴性菌。目前使用较多的载体是 pJB4JI。它是 P1 类型的 R 因子(RP4), 编码庆大霉素抗性, 带有一拷贝 Mu, 在 Mu 基因组插入一个 Tn5。当 pJB4JI 被引入到某些革兰氏阴性菌时, 推测由于 Mu 引起的不正常重组, 使该质粒的存在极不稳定, 故称之为“自杀性”质粒。所以只要通过接合转移, 将 pJB4JI 引入到合适的受体菌(Kan^r Gen^r) 并选择 Kan^r 转移接合子便可获得 Tn5 的插入突变体。用此载体已分离到新日杆菌, (*Calobacter crescentus*), 黄色球粘细菌 (*Myxococcus xanthus*) 和 *Erwinia herbicola* 的 Tn5 插入突变体, 促进了对这些菌株有关基因的克隆。这样的运载体也已用于研究 *Vibrio fischeri* 和 *Vibrio harveyi* 的生物发光基因, 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 的 IgA1 蛋白酶基因, 鼠伤寒沙门氏菌相变基因, 樟脑降解基因等。已被 Tn5 诱变过的细菌和所使用的运载体列于表 1。

(二) 局部诱变

一旦一个基因在染色体上的位置被确定, 那么在此基因附近诱发种种新的突变就常常为遗传分析所需要。如果能把强烈诱变局限于感兴趣的染色体区域, 这样既可以避免常规诱变导致的多重突变, 而且当多

个点突变有同一表型时亦可选择性地诱变局限某一目的区域。Hong 和 Amc 提出了这样一种诱变方法^[14]: 首先诱变普遍性转导噬菌体 P22 (一种鼠伤寒沙门氏菌温和噬菌体), 然后以此噬菌体转导适当的受体, 选择与所需突变相邻的可选择标记, 如营养需要, 药物抗性等。如此获得的转导子通常都带有除选择标记以外的供体染色体 DNA 片段, 而这些小片段是已受到诱变处理的, 因此只要对这些转导子作适当的测定就不难找到一些与选择标记相邻接的各种新突变。药物抗性转座子的应用大, 增加了局部诱变的普遍性和实用性, 因为现在几乎能将转座子(如 Tn10)通过适当的遗传学方法(见本文最后一节)放到感兴趣的任何染色体区域, 这样使局部诱变有了易于选择的抗性标记, 也使它的应用范围扩大到了染色体的任何区域。其方法是(1)分离靠近待诱变染色体区域的转座子 Tn10 插入突变体;(2)以此突变体为供体制备噬菌体;(3)对噬菌体作强烈诱变;(4)转导 Tet^r 受体菌, 选择 Tet^r 转导子;(5)测定 Tet^r 转导子以获得发生在感兴趣的染色体 DNA 区域的新突变。因为在 Tet^r 转导子中只有与转座子 Tn10 一起被噬菌体包裹的供体 DNA 小片段受到过诱变处理, 所以不可能带有该小片段以外的多重突变。实验证明, 这样获得的各种新突变绝

表 1 Tn5 诱变过的细菌^[14]

续表 1

细菌名称	诱变对象	运载体
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	染色体	pJB4JI
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	毒性质粒	pJB4JI
<i>A. tumefaciens</i>	染色体和 Ti 质粒	pJB4JI
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	基因组	pJB4JI
<i>Azospirillum brasilense</i>	基因组	pLB4JI
<i>A. vinelandii</i>	基因组	RP4-ColE::Tn5-132
<i>Bordetella pertussis</i>	染色体	RP4-ColE::Tn5
<i>Caulobacter crescentus</i>	染色体	pJB4JI
<i>Erwinia carotovora</i>	基因组	pJB4JI
<i>E. chrysanthemi</i>	基因组	pJB4JI
<i>Escherichia coli</i> B	染色体	Pl::Tn5
<i>E. coli</i> k-12	染色体	λ::Tn5
<i>E. coli</i>	噬菌体 λ 噬菌体 Pl 噬菌体 fd F, F' R 因子 毒性质粒	R 因子, 染色体 染色体 λ::Tn5 染色体, 质粒 λ::Tn5 λ::Tn5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	染色体	Pl::Tn5
<i>Myxococcus xanthus</i>	染色体	Pl::Tn5
<i>Pseudomonas putida</i>	基因组	PRKTV14
<i>Pseu. solanacearum</i>	基因组	RP4::Tn5
<i>Rhizobium japonicum</i>	质粒 基因组	自杀性质粒 PACYC184::Tn5
<i>R. leguminosarum</i>	染色体 质粒	pJB4JI 染色体
<i>R. meliloti</i>	染色体 质粒	pJB4JI pJB4JI
<i>R. phaseoli</i>	染色体 质粒	pJB4JI pJB4JI
<i>Rhizobium trifolii</i>	染色体 染色体, 质粒 质粒	λ::Tn5 λ::Tn5 λ::Tn5
<i>Rhizobium slow growing</i>	染色体, 质粒	λ::Tn5

细菌名称	诱变对象	运载体
<i>Salmonella enteritidis</i>	染色体	Pl::Tn5
<i>Salmonella typhimurium</i>	染色体 染色体 染色体	λ::Tn5 Pl::Tn5 p22
<i>Serratia marcescens</i>	染色体	Pl::Tn5
<i>Vibrio cholerae</i>	染色体	Pl::Tn5-132

大多数是与转座子 Tn10 相邻接的。

(三) 克隆 DNA 片段的诱变

当一特定基因或操纵子被克隆到多拷贝质粒(如 PBR322)后常需对它们作进一步的精细分析,以期对基因或操纵子的结构组成、功能表达以及调节等有深入的了解。制定物理和遗传图谱是这些分析中的重要一项。由于有效的转座子运载体的构建,加之快速提取质粒方法的建立,现已能很容易地分离到大量独立的克隆 DNA 片段的转座子插入物,因此采用转座子对克隆 DNA 片段的诱变,使绘制克隆基因的物理和遗传图谱已不再是一件困难的工作。实验表明噬菌体 λ::Tn5(λ467)(复制和整合突变)是最有用的转座子运载体之一。它具有如下优点:(1)很易获得高效价的噬菌体制备物;(2) Tn5 从噬菌体转座到靶 DNA 的频率高;(3)诱变后它能有效地消失。用此运载体诱变克隆 DNA 的简单步骤如下:(1)以 λ::Tn5 噬菌体感染细胞(带有含克隆基因的多拷贝质粒),(2)涂布感染细胞于含有卡那霉素(或新霉素)和用于选择质粒的抗生素平皿;(3)提取质粒并转化对卡那霉素敏感和带有克隆基因突变的受体(互补试验),选择 Kan^r 转化子;(4)挑取 Kan^r 单菌提取质粒,以适当的限制性核酸内切酶作酶切分析,确定转座子在克隆基因中的位置;(5)将步骤(3)和(4)的结果合在一起就能制出该基因或操纵子的物理和遗传图。

(四) 缺失突变体的分离

缺失突变在基因精细结构定位和分子遗传分析中占据十分重要位置。常规方法分离缺失突变不是件容易的事,常常受所研究基因的限制。已知不少 DNA 插入因子能产生缺失,如 IS₁, Tn2^[7], Tn10, Mu 等。实验证明转座子产生缺失与其重复序列末端有关。缺失常常发生在插入位点附近。用转座子 Tn10 分离缺失突变时发现,在所获得的缺失株中有不少同时缺失了四环素抗性基因,这一发现为利用转座子产生缺失提供了一个简易的筛选方法。只要将 Tn10 转座到感兴趣的染色体区域,然后选择四环素敏感细胞即可。新近 BocK 等提出了一个选择四环素敏感细胞的正选择法。^[46] 使用这种方法已在鼠伤寒沙门氏菌成功地分

离到一系列 *his* 缺失突变体。Roth 实验室利用该法分离到了一系列 *nadB* 缺失株,并已绘制出该基因的精细结构缺失图。

(五) 实验室菌株的构建

细菌遗传学的大量工作是组建含有多种突变基因组合的菌株,这是遗传分析中一项难度较大的工作。但自从有了转座子这个有力工具后,菌株构建工作就不再令人生畏了。因为利用转座子 Tn5 或 Tn10 诱变大肠杆菌后获得了几乎应有尽有的突变体类型,而且这些插入突变均可以通过 P1 噬菌体的转导杂交转移到任何菌株(通过选择 *Kan*^r 或 *Tet*^r, *Kan*^r 或 *Tet*^r 与其相应的插入突变的共转导频率为 15—75%)^[1]。这种突变基因转移实验还能获得遗传分析所必需的同源菌株对(isogenic pair),即仅仅在引入突变区域有所不同,其一带有突变其二不带突变的一对菌株。利用转座子不仅可以实现任何插入突变基因的转移,而且也能将邻接转座子的基因(野生型基因或突变型基因)通过同样的转导杂交引入所希望的菌株。方法上只要对所选择的药物抗性转导子作一测定即可。如果转移的是野生型等位基因,则从转导子中挑取药物抗性和恢复基因功能的转导子(受体应是野生型等位基因的突变型)。如果转移的是突变基因,则应挑取药物抗性和失去基因功能的转导子(受体应是突变型的野生型等位基因)。在此实验中同样可以得到同源的菌株对。

(六) 邻近某特定基因的转座子插入物的分离

上面讨论的几个遗传学技术,其中三个都依赖于能否分离到邻近某个特定基因的转座子插入物。下面以分离鼠伤寒沙门氏菌染色体 DNA 的 Tn10 插入物为例,对此遗传学方法作一介绍。Tn10 转座采用经过改造的噬菌体 p22 作载体,该噬菌体除带有一拷贝 Tn10 外还带有复制突变(*amb*12⁻),裂介突变(*amb*13⁻),整入突变(*int*⁻)和温度敏感的阻抑突变(*C2ts29*)。这些突变防止了 p22 在受体细胞中通过正常的遗传途径(如溶源化质粒形成)产生 *Tee*^r。实验方法如下:(1)40℃诱导溶源菌(*supE*)制备噬菌体(每个噬菌体都带有一拷贝 Tn10), (2)以无 Tn10 并对 p22 敏感的受体菌作转导,选择 *Tee*^r。由于 p22 与受体无同源性,它亦不能在受体中复制和整入,因此 *Tee*^r 转导

子只可能产生于 Tn10 从 p22 到染色体 DNA 的转座。(3)收集 2000—5000 个 *Tee*^r 转导子作成菌落混合物。(4)以此菌落混合物为供体制备普遍性转导噬菌体。(5)转导在特定基因附近带有一突变的受体选择 *Tee*^r 或受体突变的野生型等位基因。(6)测定转导子。那些既是 *Tee*^r 又带有受体突变的野生型等位基因的转导子必定获得了供体的一个单一片段,亦即实验所希望分离的与某特定基因邻近的 Tn10 插入物。经验表明,如果收集的 *Tee*^r 菌落混合物为 5000,那么从中选到任何与某一特定基因相邻的 Tn10 插入物的频率是总的 *Tee*^r 转导子的 0.3%。

参 考 文 献

- [1] Calos, M. P. and J. H. Miller: *Cell*, **20**: 579, 1980.
- [2] Starlinger, P.: *Plasmid*, **3**: 241, 1980.
- [3] Kleckner, B.: *Annu. Rev. Genet.*, **15**: 341—404, 1981.
- [4] McClintock, B.: *Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **16**: 13—47, 1951.
- [5] Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. 45, 1980.
- [6] 王教金、陆德如: 遗传学报, **6**(4): 392—395, 1979.
- [7] Aoquan Wang et al.: *Cell*, **21**: 251—255, 1980.
- [8] Berg, C. et al.: *Genetics*, **105**: 259—263, 1983.
- [9] Colbere-Garapin, E. et al.: *J. Mol. Biol.*, **150**: 1—14, 1982.
- [10] Southern, P. J. and P. Berg: *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**: 327—341, 1982.
- [11] Kleckner, N. et al.: *J. Mol. Biol.*, **116**: 125—159, 1977.
- [12] Miller, J. H. et al.: *J. Mol. Biol.*, **144**: 1—18, 1980.
- [13] Berg, C. M. et al.: *Genetics*, **93**: 309—319, 1979.
- [14] Berg, D. E. and C. Berg: *Biotechnology*, **1**: 417—435, 1983.
- [15] Hong, J. S. and B. N. Ames: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 3158, 1971.
- [16] Bochner, B. et al.: *J. Bacteriol.*, **143**: 926, 1980.