

专论与综述

枯草芽孢杆菌中质粒的稳定性问题

陈乃用

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

枯草芽孢杆菌是仅次于大肠杆菌, 在遗传上和生理、生化上研究较为详尽的一种原核生物。但枯草芽孢杆菌的质粒载体系统, 以及它们在遗传工程中的应用和发展, 却不很顺利。枯草芽孢杆菌中质粒载体系统的开发, 从一开始就碰到一些困难。枯草芽孢杆菌常用的可转化菌株 168 中不含质粒, 其他芽孢杆菌中曾找到一些隐蔽性质粒, 但没有可供选择的表型标记。因此, 枯草芽孢杆菌中最初采用的质粒载体都是来自金黄色葡萄球菌^[19], 这些质粒可以在枯草芽孢杆菌中复制, 并表达其抗生素抗性。目前, 枯草芽孢杆菌中应用的载体仍然以这些金黄色葡萄球菌质粒为基础^[18]。这些质粒虽然可以用于分子克隆, 但对枯草芽孢杆菌来说, 是远不够理想的。主要的问题是分子克隆效率低^[1,18]和质粒的不稳定性^[8,26]。本文主要通过革兰氏阳性细菌小质粒的复制机制, 讨论质粒的稳定性问题。

(一) 革兰氏阳性细菌质粒的基本结构

G(+)细菌中各种衍生的小质粒(<10kb)关系都很密切。它们的结构和功能组织有许多共同性^[26]。如图 1 所示, 它们在功能上都可分为四部分: ①初级复制功能; ②次级复制功能; ③抗生素抗性(隐蔽性质粒无此功能); ④一个附加的可读框(Orf)。不同质粒中, 这四部分的相对次序可以不同, 各部分的组合也会有区别, 例如某种初级复制功能可以和不同的抗性标记或不同的次级复制功能结合等等。但在不同质粒中, 各相应部分的 DNA 序列和蛋白质结构通常都有很大的同源性。

(1) 初级复制功能: 包括编码复制起始蛋白(Rep)基因和正链复制起始点(ori⁺)。ori⁺位于 Rep 可读框的上游或里面。在滚环复制

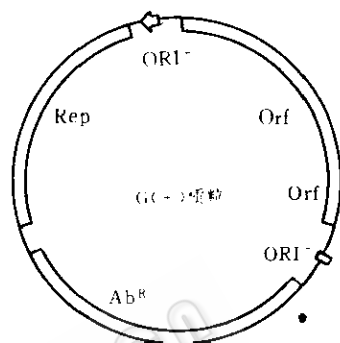


图 1 G(+)质粒的模型图

ORI⁺: 正链合成起始点;

Rep: 复制起始蛋白;

ORI⁻: 复制负起始点;

Orf: 可读框编码 Pre/Mob 蛋白;

Ab^R: 抗生素抗性标记

中, ori⁺被 Rep 识别两次, 一次是 Rep 在 ori⁺序列上产生断口^[35], 并以负链为模板起始合成替代的新正链; 另一次是新链合成后的终止。ori⁺中, 起始和终止的识别位点是重叠的, 但不是等同的^[24,26]。根据 DNA 的同源性, ori⁺可分为三种类型, 其同源性最强的部位在断口位点附近^[26]。已知的 Rep 蛋白至少有四类, 它们的代表性质粒分别是: pT181/pC221, pC194/pUB110, pE194 和 pSN2 (其他质粒请参见文献 [26])。其中研究最详细的是金黄色葡萄球菌质粒 pT181^[43], 这个质粒可以在枯草芽孢杆菌中复制, 它的复制控制系统可视为许多 G(+)小质粒的典型系统。

(2) 次级复制功能: 是指负链复制起始点 MO (Minus origins)。在滚环复制 (RCR) 中, MO 充当滞后负链合成的起始位点 (ori⁻)。MOs 在质粒中通常不是必不可少的。当然, 如果质粒上没有 MO 功能, 细胞中单链 DNA 数量就会增加, 同时也会增加质粒的不稳定性。

MOs 是高度回文的非编码序列, 大约 200—300bp, 它和初级复制功能的相对位置并不重要。已知的 MOs 至少有三种类型: 即 *palA* *palU* 和 *palT* 型^[8]。它们分别只在有限的几种宿主中有功能, 由宿主编码的 RNA 聚合酶起始复制。第一类葡萄球菌质粒 pT181, pC194 和 pE194 中的 *palA* 型 MOs^[27] 在枯草芽孢杆菌中是没有功能的。这类质粒在枯草芽孢杆菌中也是不稳定的。

第二类 *palU* 型^[8] MOs (曾用名 BA3 型^[7,57]) 存在于金黄色葡萄球菌质粒 pUB110 以及耐热芽孢杆菌质粒 pTB913 和无乳链球菌质粒 pWV158 中。*palU* 型 MOs 在枯草芽孢杆菌中是有功能的。pMV158 中除了 *palU* 型还有 *palA* 型 MO。

第三类 *palT* 型^[8] MOs (曾用名 *stab*^[10,11,13]), 存在于芽孢杆菌质粒 pTA1060, pBAA 1 和 p1S11 中, 它们在枯草芽孢杆菌中是有功能的。

此外, 许多 G (+) ssDNA 质粒还有复制起始蛋白 *rep* 基因和抗生素抗性基因; 以及另一个可读框 (*orf*), 它通常编码一种位点专一的质粒重组酶, 如 pE194 和 pT181 中有一个参与质粒共整合的 *pre* 基因。pUB110, pMV158 和 pTB913 中也有编码相关蛋白的基因。最近研究表明 pMV158^[51] 的 *pre* 基因能参与乳球菌和链球菌中质粒的接合诱动, 故又名 *mob* 基因^[58]。pUB110 也可以在纳豆芽孢杆菌中进行接合转移^[34]。

(二) 质粒的滚环复制 (RCR)

G (+) 细菌中质粒复制研究大多取材于金黄色葡萄球菌小质粒。这些质粒的复制都要经过单链 DNA 中间体^[55,56], 所以又称 ssDNA 质粒。ssDNA 质粒的复制方式可能和大肠杆菌单链 DNA 噬菌体滚环复制过程^[5] 相类似。图 2 是正常滚环复制的步骤, 图中每一步都注明可能发生的差错和重排^[26]。

滚环复制开始, Rep 蛋白识别 *ori*⁺ 起始序列, 并在 *ori*⁺ 序列上产生断口 [1] (pT181 具有拓扑异构酶活性^[36])。亲本正链被替代, 并以

负链为模板合成新的正链 [2], 新正链合成一整圈后 [3], Rep 再次识别 *ori*⁺ 序列中的终止序列并产生第二个断口, 随即封闭替位的正链, 产生一个双链和一个单链环状质粒分子 [4]; 其中单链环状分子从质粒的 MO 开始, 由宿主的 RNA 聚合酶合成一小段 RNA 引物, 并以 ssDNA 为模板合成双链 DNA 单体 [5, 6]。如果 MO 缺失或没有功能, 则 ssDNA 中间体就不能转变成 dsDNA。细胞内 ssDNA 比例增加。

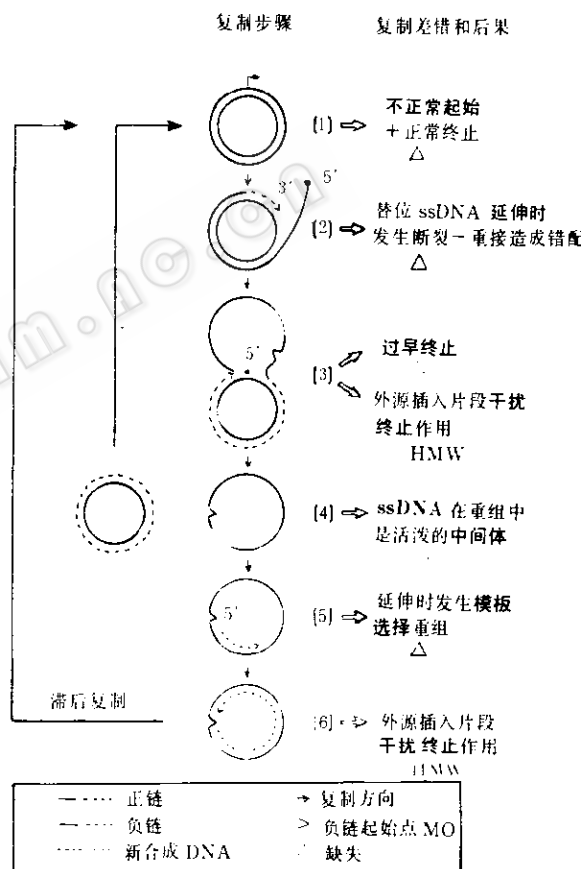


图 2 正常滚环复制的步骤^[26]

图左侧是可能发生的复制差错和重排

(三) 质粒的不稳定性分析

重组质粒在枯草芽孢杆菌中通常不很稳定。这些不稳定性可以分成两类: 即分离型的和结构型的。分离型不稳定性是指整个质粒从细胞中丢失, 而结构型不稳定性则是质粒本身发生重排, 通常是产生缺失。造成这两类不稳

定性的重要因素^[20,21,26],就是质粒在滚环复制过程中产生单链DNA(ssDNA)分子,和高分子量畸型复制产物(HMW DNA)^[25]。

许多金黄色葡萄球菌衍生质粒在枯草芽孢杆菌中都积累相当多的ssDNA,因为它们的次级复制功能MOs在这种细菌中没有功能。通常质粒有没有MO功能可作为判断质粒稳定性的一个标准。pUB110衍生质粒的MO在枯草芽孢杆菌中是有功能的,但许多以pUB110为基础构建的小质粒载体,如pBD64^[28]和穿梭质粒pLB5^[9]等,MO部分在构建中已被切除,这类质粒无论在分离上还是结构上都是很不稳定的。由此看来,在构建分子克隆载体时,一味追求把质粒切小,以容纳较大外源DNA片段的这种设想是不尽合理的。

当质粒上插入外源DNA后,细胞内会积累一些**高分子量畸形复制产物(HMW DNA)**^[25]。HMW DNA是由线型质粒DNA头尾相接的多聚体,包含五个或更多质粒拷贝连接成串。HMW DNA的产生和插入片段的性质有关。例如插入大肠杆菌质粒pBR322或pUC类质粒起始位点的DNA片段,就会促进HMW DNA产生,而插入其他类型的DNA则影响很小。一般说, HMW DNA产生的多少和插入片段的大小有关。HMW DNA产物最多时可占质粒DNA量的90%,而小的质粒衍生物通常只有很少量HMW DNA。在不产生ssDNA的G(+)质粒,如pAM β 1中(见本文第(四)节)。没有看到HMW DNA产生^[25],说明HMW DNA产生可能和ssDNA质粒滚环复制有关系。

HMW DNA产生的机制目前尚不清楚,不同类型的HMW DNA,产生机制可能并不相同。但有一点可能是共同的,即质粒在滚环复制中,RCR的终止区受到损害。pUB110衍生质粒愈大,细胞中HMW DNA愈多^[25],质粒在分离上也愈不稳定^[11,12,25]。说明HMW DNA产生和分离型不稳定性有关。含有HMW DNA的细胞,生长速度明显减慢,在生长上竞争不过不含质粒的细胞。

在枯草芽孢杆菌*addA5*突变型^[59]中,缺少依赖于ATP的DNA酶,细胞中HMW DNA大幅度增加。这个现象很可能与质粒的复制方式无关。然而,有些缺少MO片段的pUB110衍生质粒,即使在野生型菌株中, HMW DNA量也会增加^[7]。

(1) **分离型不稳定性**: 质粒保持稳定需要正确的拷贝数控制。这点对大多数G(+)细菌质粒来说是特别重要的。因为ssDNA质粒上没有*par*基因座。以往在pLS11^[50], pTA1060^[9]和pBAA1^[17]中报道的*par*功能,实际上都是MO功能^[13,50]。*par*功能是在细胞分裂时,主动把质粒拷贝分配到各子细胞。没有*par*功能,子细胞中的质粒就靠随机分配,如果质粒拷贝数发生波动,就会导致分离型不稳定性。G(+)细菌中质粒的拷贝数是由质粒编码的功能控制的,在一定条件下,质粒的拷贝数是恒定的。当一个细胞通过随机分配或质粒转化接受一个或几个拷贝质粒后,质粒的拷贝数能够迅速调整,也是十分重要的。

质粒pT181在金黄色葡萄球菌中,具有迅速调整拷贝数的能力^[36],当个别细胞中质粒拷贝数偏低时,可以加快复制速度,迅速纠正。

在pT181质粒滚环复制中,复制速度是由RepC控制的^[41]。控制RepC蛋白的合成速度,就能调节质粒的拷贝数。在这个控制系统中,有两个起抑制作用的反义小RNAs,它们是由RepC 5'端开始转录的。在pUB110质粒中也有控制拷贝数的类似机构^[40]。反义RNA大概是通过干扰RepC mRNA的转译来调节复制。在正常情况下,这种自我调节系统可以保证每个细胞中的拷贝数保持合理和正确。但是如果拷贝数波动的校正机制受到干扰,就会发生质粒分离型不稳定性。例如,当质粒在不同宿主中,如果宿主和质粒复制功能之间的配合不够默契,就会造成拷贝数下降。再者,在质粒pT181中还有一个*cmp*功能^[22],它的作用是提高RepC对*ori*'的利用效率^[22,23],并影响质粒的复制速度和拷贝数调整。其他G(+)小质粒也有类似的功能。但在一些常用的质粒载体中,这

个功能区已在构建中被切除,因而增加了质粒分离型不稳定性。此外,*cmp* 功能的活性和它与 *ori*⁺ 之间的距离成反比^[23],质粒上插入大的 DNA 片段可能会干扰 Rep 对 *ori*⁺ 的利用效率^[26,45]。

质粒的不相容性也受质粒拷贝数调节系统的控制^[44]。两个相关的质粒在没有选择压力下,不能在一个细胞中稳定共存。当质粒混杂存在时,细胞中两个相关质粒的拷贝数总和,相当于其中任一个质粒单独存在时的拷贝数,即细胞中质粒总数分成为两份,而两个质粒的比例取决于质粒拷贝在复制时的随机选择,最后以一定的速率分离出只含一种质粒的分离子。

pUB110 衍生质粒的分离型不稳定性和质粒大小有关^[11,13]。在没有选择压力下,小质粒是相当稳定的。当插入片段大于 3kb 时,质粒就很不稳定了。主要原因可能是大质粒的拷贝数调整迟缓,或由于产生大量 HMW DNA^[25]。如果没有 MO,分离型稳定性甚至更差。pTA1060^[10-12]和 pBAA1^[28]的分离型稳定性也需要有功能的 MO,说明滚环复制在 ssDNA 质粒分离型稳定性中起着重要的作用。

嗜热脂肪芽孢杆菌 CU21 中, pUB110 类质粒也发生大量分离型不稳定性^[33],由耐热芽孢杆菌质粒 pTB19 衍生的小质粒 pTB913 和 pUB110 一样具有 *palU* 型 MO,它在嗜热脂肪芽孢杆菌中的稳定性和菌株有关^[38]。在菌株 CU21 中, *palU* 没有功能,在 48℃ 和 57℃ 培养 20 代后,只有 1% 细胞中含有质粒,细胞生长缓慢,40% 质粒为 ssDNA。而在限制缺陷型菌株 NUB3621 中, pTB913 的 *palU* 有功能,细胞中 ssDNA 很少,在 57℃ 条件下,质粒相当稳定,是一株理想的受体菌株。其他芽孢杆菌中的质粒稳定性问题的研究尚少。

除了上述分离型不稳定性造成部分细胞中质粒丢失外,通常不含质粒的细胞比含质粒的细胞生长较快。例如,质粒上编码有害蛋白产物,对细胞生长不利。质粒产生的 ssDNA 和 HMW DNA 等也影响细胞的生长速度。结果在细胞总体中,容易生长的细胞类型就得到富集,

使质粒的不稳定性水平进一步扩大^[3]。

质粒上克隆基因的高水平表达并转译通读到质粒的主要复制区,也会干扰质粒复制,造成分离型不稳定性。如果在克隆位点的侧翼插入转录终止区可以减免这种作用。在大肠杆菌质粒中,曾利用 T₁T₂ 串联重复的大肠杆菌 *rrnB* 终止子,和噬菌体 λ _o 终止子以提高质粒的稳定性^[16]。这种方法对枯草芽孢杆菌也是有效的。

(2) **结构型不稳定性**: 质粒结构型不稳定性并不需要质粒内部有很长的重复序列,因此可以看作是非常规重组的结果^[20,21]。质粒结构型不稳定性的机制可分为两类:**模板选择的差错**,和**断裂-重接**中的差错。

复制作用中**模板选择**的差错,是指在 3—20bp 短的同向重复 (DRs) 处,复制作用发生**滑移(滑移错配)**,结果其中一个重复和 DRs 之间的序列没有被复制,并在子代中形成缺失^[20,21,36]。ssDNA 是促发模板选择差错的重要因素。由于滚环复制中产生 ssDNA,更增加缺失发生的频率,这也是 ssDNA 质粒通常在结构上不稳定的原因之一。不经过 ssDNA 中间体的质粒,如 pAM β 1 或 MO 活性高的 pTA1060 衍生质粒,模板选择差错就很少^[3](参见第(四)节)。

除了上述模板选择型非常规重组外, ssDNA 质粒在滚环复制的每一步都可能会背离常规而影响 DNA 序列的重排^[26]。图 2 中列出每一步中可能出现的重排:〔1〕**起始不正常**,而终止点是正常的。如 pC194 诱导的缺失中能找到终止点^[4,21,42],可以由此来解释。〔2〕**正链延伸和替位**中的差错。替位正链的合成是以原来的负链为模板,在延伸过程中可能发生断裂重接和同源重组,造成缺失。〔3A〕正链合成中因识别了错误序列而**提早终止**。pC194^[39]和 pUB110^[41]序列中都能找到缺失的热点。热点是在起始区断口处,位于 18bp 序列之中^[24]。Rep 识别 pC194 起始点需要 55bp 序列,而识别正常终止点只需要 18bp 序列^[24]。复制也可能在类似的终止起始序列处不正常终止^[39]。由

于终止序列识别的差错,可造成提早终止和缺失^[26]。〔3B〕正链合成中错过了正确终止区。前面已经提到,插入的外源 DNA 片段会干扰质粒 RCR 复制的正常终止,而在细胞中积累大量 HMW DNA。〔4〕环状 ssDNA 是活泼的重组中间体,容易促发分子间同源重组。〔5〕负链合成延伸中发生模板选择型重组,造成缺失是常见的。缺失频率和 ssDNA 质粒中同向重复的长度成正比^[46]。〔6〕负链合成未能正常终止,也会和〔3B〕一样形成 HMW DNA。

第二大类缺失是由断裂-重接机制引起的。除了上面所述,由于 Rep 识别的差错,发生不正常起始和终止造成的缺失可归入这一类外,还有一些缺失既不能用模板选择机制,也不能用不正常起始和终止的机制来解释。如枯草芽孢杆菌 168 中的 *BsuM* 系统,可以限制性切割未恰当修饰的 DNA 并形成缺失^[33,48]。还有另一类缺失则是由断裂-重接酶,例如拓扑异构酶 I^[48,49]和拓扑异构酶 II (DNA 促旋酶)^[38]引起的。这类缺失的连接处通常没有重复的序列。

Peijnenburg 等^[47,50]设计了一个分析缺失的系统。在他们构建的质粒 pGP1 中,将地衣芽孢杆菌 *penP* 基因和大肠杆菌 *lacZ* 基因融合, *penP-lacZ* 区域的缺失可以直接在 X-gal 平板上检出。这个系统中的缺失,主要不是来自 DRs,滚环复制也不影响缺失发生的频率,因此大概是由断裂-重接机制引起的。此外,在这个系统中,许多缺失末端位于转录/转译控制区域,说明基因表达也可以影响质粒的稳定性。pGP1 还可以用于研究宿主条件对缺失频率的影响,如宿主的 Add 和 RecE 蛋白可间接影响质粒的缺失频率。Add 复合体中依赖于 ATP 的解螺旋酶活性可干扰二级结构的形成。在枯草芽孢杆菌 *add* 突变株中缺失频率高,而 *recE* 和 *recF* 突变株中,缺失频率比野生型低^[47]。说明选择适当的宿主也可以克服部分结构型不稳定性。

(四) 改进质粒稳定性的一些措施

质粒保持稳定要求在复制和分配中都和宿主密切配合。因此,枯草芽孢杆菌中理想的载

体系统应该从芽孢杆菌中去开发。前面已经提到,芽孢杆菌的质粒大多数是隐蔽性的,例如 pTA1060^[16], pLS11^[15]和 pBAA1^[17]等。从蜡状芽孢杆菌中分离到的一种四环素抗性质粒 pBC16^[6],它的复制功能和金黄色葡萄球菌质粒 pUB110 非常相似。

pTA1060 (8.6kb)^[16]是一个低拷贝 ssDNA 质粒,它的 *palT* 型 MO 包含在 550bp 片段中。pTA1060 和它的衍生质粒 pBB2^[7,11,12] (11.2kb,含 pUB110 Km^R 和 pC194 Cm^R 抗性基因),拷贝数为 5。它们的分离型稳定性比 pUB110 好得多。*palT* MO 缺失的衍生质粒,分离型稳定性下降,但不影响质粒的拷贝数。

pHP13^[29]是 pTA1060 的衍生质粒,包含 pTA1060 的初级复制功能(*rep*), (但不含 *palT* MO),加上 pE194 Em^R, pC194 Cm^R 抗性基因和 pUC19 的 *lacZα* 和复制功能。两个抗性基因在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中均能表达。但 *lacZα* 基因只在大肠杆菌中表达,这个 4.9kb 的穿梭质粒在枯草芽孢杆菌中的拷贝数为 5,在大肠杆菌中的拷贝数是 200。pHP13 在枯草芽孢杆菌限制缺陷型宿主中,克隆效率很高(占转化子 30%以上),其中大的插入片段(>16kb)相当多^[29]。

ssDNA 质粒在复制过程中都经过重组活泼的 ssDNA 中间体,这是这类质粒在结构上不稳定的根源。如果质粒复制不经过 ssDNA 中间体,它的稳定性可能会有所提高。Jannièr 等^[32]最近证实,有些 G(+)大质粒(>25kb)的复制是经过单向 θ 型复制(UTR)机制^[44]。如粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 大质粒 pAMβ1^[39]和耐热芽孢杆菌质粒 pTB19^[31]。这类质粒可以在枯草芽孢杆菌中复制,它们的复制区序列和 ssDNA 质粒复制区的保守序列没有相似之处^[54],转化的细胞中也没有发现 ssDNA 中间体^[32]。正如所料,pAMβ1 和 pTB19 的衍生质粒在枯草芽孢杆菌中的结构型稳定性和克隆性质都比 ssDNA 质粒好得多^[32]。pAMβ1 衍生的质粒载体^[32],如 pHV1431 (10.9kb)和 pHV1432 (8.9kb)带有 pAMβ1 和 pUB222 的

复制区。在大肠杆菌中表达氨苄青霉素,四环素和氯霉素抗性,在枯草芽孢杆菌中只表达氯霉素抗性标记,这两个质粒在枯草芽孢杆菌中拷贝数很高(约200拷贝)。在限制缺陷型的感受态细胞中转化效率很高,每 μg DNA可得到 10^4 转化子,其中20%含有插入DNA,有的插入片段大于43kb,而且结构上稳定性很好。pHV1432在分离上较不稳定。

pHV1431和pHV1432用作克隆载体尚不够完善,这些质粒还比较大,还不能直接或通过标记钝化法间接选择克隆的转化子,也没有适当的多聚接头。此外,pHV1431在大肠杆菌中,在结构上是不稳定的,因此不能以大肠杆菌作为克隆的中间宿主。

其他类似的质粒还有链球菌质粒pSM19034(27kb)^[52]和pIP501,它们的复制区序列与pAM β 1非常相似^[54]。pSM19035内部带有很长的反向重复序列,其单体可以转化枯草芽孢杆菌感受态细胞^[53]。

以上这类不经过滚环复制的质粒,在枯草芽孢杆菌中的用途,目前尚未完全开发。但它们在质粒的稳定性和优良的克隆性质方面却是十分诱人的。

枯草芽孢杆菌分子克隆系统的另一个重要限制是感受态细胞的转化需要质粒的寡聚体^[1,18]。除了原生质体转化系统和标志获救系统^[18]可以绕过以上限制,直接用质粒单体进行转化外,最近发展的电穿孔法^[22]可能也是突破这一限制的简便而有效的手段。最近研究表明^[8],有些枯草芽孢杆菌菌株,特别是溶菌敏感的菌株,在高电压下,细胞的生存力低,不适作电转化的受体菌,而*Bsu*M限制缺陷型菌株的电转化效率为每 μg DNA达 10^4 转化子。

参 考 文 献

1. 陈乃用;遗传,6(3):43-47,1984.

2. 陈乃用;微生物学通报,18(2):97-103,1991.

3. Alonso J et al; MGG **208**: 349-352, 1987.
4. Ballester S et al.; *J. Bacteriol.*, **171**: 2271, 1989.
5. Bass P D & H S Jansz; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **136**: 31-70, 1988.
6. Bernhard K et al.; *J. Bacteriol.*, **133**: 897-903, 1978.
7. Boe L et al.; *J. Bacteriol.*, **171**: 3366-3372, 1989.
8. Bron S.; In *Molecular Biology Methods For Bacillus*. (Harwood C R & S M Cutting eds) pp. 75-138, John Wiley & Sons Ltd, 1990.
9. Bron S & E Luxen; *Plasmid*, **14**: 235-244, 1985.
10. Bron S et al.; *Plasmid*, **18**: 8-15, 1987.
11. Bron S et al.; In *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, Vol 2 (Ganesan A T & J A Hoch eds.) pp. 305-309, Academic Press, 1988.
12. Bron S et al.; *Plasmid*, **19**: 231-241, 1988.
13. Bron S et al.; In *Genetic Transformation and Expression*. (Butler L O et al. eds) pp. 205-219, Intercept Ltd., 1989.
14. Bruand C et al.; In *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, vol 3 (Zukowski M M et al. eds) pp. 123-130, Academic Press, 1990.
15. Chang S et al.; *J. Bacteriol.*, **169**: 3952-3962, 1987.
16. Chen J D & D A Morrison; *Gene*, **64**: 155-164, 1988.
17. Devine K M et al.; *J. Bacteriol.*, **171**: 1166-1172, 1989.
18. Dubnau D.; In *Experimental Manipulation of Gene Expression*. (Inouye M ed.) pp. 33-51. Academic Press Inc., 1985.
19. Ehrlich S D.; *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 1680, 1977.
20. Ehrlich S D et al.; In *Genetic Engineering*, vol 8 (Setlow J K & A Hollaender eds) pp. 71-83. Plenum Publishing Corp., 1986.
21. Ehrlich S D.; In *Mobile DNA* (Berg D & M Howe eds) pp. 797-829. American Soc. for Microbiology, 1989.
22. Gennaro M L & R P Novick; *J. Bacteriol.*, **168**: 160-166, 1986.
23. Gennaro M L & R P Novick; *J. Bacteriol.*, **170**: 5709-5717, 1988.
24. Gros M F et al.; *EMBO J.*, **6**: 3863, 1987.
25. Gruss A & S D Ehrlich; *J Bacteriol.*, **170**: 1183-1190, 1988.
26. Gruss A & S D Ehrlich; *Microbiol. Rev.*, **53**: 231-241, 1989.
27. Gruss A D et al.; *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 2165-2169, 1987.

28. Gryczan T J; In *The Molecular Biology of The Bacilli* (Dubnau D ed.) pp. 307—329, Academic Press Inc., 1982.
29. Haima P et al.; *MGG*, **209**; 335—342, 1987.
30. Highlander S K & R P Novick; *Plasmid*, **17**; 210—221, 1987.
31. Imanake T et al.; *J. Gen. Microbiol.* **130**; 1399—1408, 1984.
32. Janni re L et al.; *Gene* **87**; 53—61, 1990.
33. Jentsch S.; *J. Bacteriol.*, **156**; 800—808, 1983.
34. Koehler T M & C B Thorne; *J. Bacteriol.*, **169**; 5271—5278, 1987.
35. Koepsel R R & S A Khan; *Nucl Acids Res.*, **15**; 4085—4097, 1987.
36. Koepsel R R et al.; *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**; 6845—6849, 1985.
37. Leblanc D J & L N Lee; *J. Bacteriol.*, **157**; 445—453, 1984.
38. Linda O et al.; *FEMS Microbiol Lett.*, **93**; 203—208, 1992.
39. Lopez P et al.; *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**; 5189—5193, 1984.
40. Maciag I E et al.; *MGG*, **212**; 232—240, 1988.
41. Manch—Citron J N et al.; *Plasmid*, **16**; 108—115, 1986.
42. Michel B & S D Ehrlich; *EMBO J.*, **5**; 3691—3696, 1986.
43. Murray R W et al.; *J Biol Chem.*, **264**; 1051—1057, 1989.
44. Novick R P.; *Microbiol. Rev.*, **51**; 381—391, 1987.
45. Novick R P et al.; In *Antibiotic Resistance Gene: Ecology, Transfer and Expression*. Banbury Report **24**, pp. 225—245 CSH, 1986.
46. Peeter B P H et al.; *MGG*, **212**; 450—458, 1988.
47. Peijnenburg A A C M et al.; *Plasmid*, **17**; 167—170, 1987.
48. Peijnenburg A A C M et al.; *Plasmid*, **20**; 23—32, 1988.
49. Peijnenburg A A C M et al.; *Plasmid*, **21**; 205—215, 1989.
50. Peijnenburg A A C M et al.; In *Genetic Transformation and EXpression* pp. 221—229 (Butler L O et al. eds) Intercept Ltd, 1989.
51. Priebe S D & S A Lacks; *J Bacteriol.*, **171**; 4778—4784, 1989.
52. Rabinovich P M et al.; In *Plasmids in Bacteria* (Helinski D R et al. eds.) Plenum Press, pp. 635—656, 1985.
53. Soutschek-Bauer E et al.; *MGG*, **209**; **575—579**, 1987.
54. Swinfield T J et al.; *Gene*, **87**; 79—90, 1990.
55. Te Riele H et al.; *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**; 2541—2545, 1986.
56. Te Riele H et al.; *EMBO J.*, **5**; 631—637 1986.
57. Van der Lelie D et al.; *Nucl Acids Res.*, **17**; 7283—7294, 1989.
58. Van der Lelie D et al.; *J Bacteriol.*, **172**; 47—52, 1990.
59. Viret J F & J C Alonoso; *Nucl Acids Res.*, **15**; 6349—6367, 1987.

(1992-07-16 收稿)