

链霉菌高拷贝质粒 pIJ101 的分子生物学

莫宏波 刘 誉* 马 民 吴颜晖 陈万群

(暨南大学医学院 广州 510632)

摘要: pIJ101 是一个 8.9 kb 的高拷贝链霉菌质粒,在载体的构建和应用方面得到了广泛的应用。pIJ101 具有质粒大小适中,在接合时能够自我转移和诱动染色体的能力强,具有清晰的“麻点”形成特征,并在接合时的供受体双方均携带有 pIJ101 时没有“进入不利”的属性。通过缺失分析,已确定了与接合转移、麻点形成、复制功能及质粒稳定性等功能区。本文对 pIJ101 分子生物学研究和应用的进展进行系统综述。

关键词: 链霉菌, pIJ101, 麻点形成, 接合转移

中图分类号: Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0099-05

pIJ101 是从变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) ISP5434 中分离得到的一个为 8,830 bp 的具有广泛宿主的多拷贝链霉菌质粒 (40 ~ 300 拷贝数/染色体),能够在天蓝链霉菌 (pIJ101⁻) 和变铅青链霉菌 (pIJ101⁺) 的菌坪上形成较大的“麻点”,是一个很好的致育因子 (fertility factor)。

通过缺失和插入分析,已经确定了 pIJ101 参与接合转移、麻点形成及质粒稳定性等功能区,是目前研究比较清楚的链霉菌质粒之一。

1 pIJ101 的基本特征

1.1 质粒的基本结构 以 *Bam*HI 为起始点,按顺时针方向计算碱基数, pIJ101 全长 8,830 个碱基, G + C% 为 72.98%, 是典型的链霉菌 DNA。pIJ101 共有 11 个阅读框和 3 个功能位点即 *clt*, *kilA* 和 *ori* 位点,其中 7 个阅读框 (*tra*, *korA/B*, *spdA/B*, *kilB*, *rep*) 编码的蛋白功能和引起的相应表型已经确定,4 个比较短的阅读框 (*orf56*, *orf66*, *orf85*, *orf79*) 的功能不明确 (图 1)。pIJ101 DNA 的 G + C 含量很高,编码蛋白的阅读框三联体密码子具有很强的偏好性:第 1 位为 G + C 的机率为 72.25%,第 2 位为 G + C 的机率为 53.88%,第 3 位为 G + C 的机率为 92.38%。

1.2 pIJ101 的复制 pIJ101 是一个松弛型滚环复制的质粒。Kieser 等^[1]认为 2.1 kb 的 *Sac*II 片段上包括了所有的复制功能。Kendall 等^[2]对 pIJ101 进行了全序列测定,通过序列推断,2.1 kb *Sac*II 片段编码两个蛋白: Rep 和 Orf56,前者是质粒复制所必需的;orf56 编码一个 56 个氨基酸残基的蛋白,它的三联体密码子的第 2 和第 3 个碱基 G + C% 与 pIJ101 其它 ORFs 的 G + C% 有较大的差异,分别为 52% (平均值为 53.88%) 和 85% (平均值为 92.38%),在所有编码蛋白的三联体密码子中 G + C% 最低的,目前对该阅读框编码的蛋白功能不知。在 *rep* 和 orf56 之间有一个滚环复制起始位点 (*ori*)。

1.3 pIJ101 介导的接合转移、麻点的形成 pIJ101 及其一些衍生质粒可以自我转移,

* 通讯作者 Tel: 020-85220256, Fax: 020-38699770, E-mail: xyuliu@sohu.com

收稿日期: 2004-05-08, 修回日期: 2004-07-05

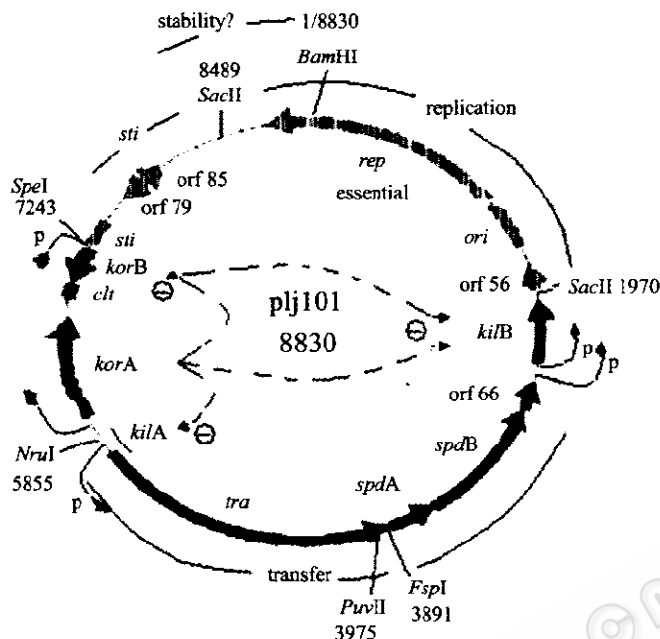


图 1 pIJ101 结构图

pIJ101 能以很高的频率自我转移至 pIJ101⁻ 的合适受体菌中, 同时也能够引起宿主染色体以 10^{-3} 频率发生转移^[2]。伴随着质粒的转移, pIJ101 会象大肠杆菌的 f 因子一样导致受体菌致死接合的发生, 只不过 f 因子能导致受体菌的真正死亡, 而 pIJ101 只引起受体菌菌株发育受阻, 特别是影响基生菌丝向气生菌丝的转变过程以及孢子形成。接合反应的表型特征是 pIJ101⁺ 的菌株在 pIJ101⁻ 菌株的菌坪上形成‘麻点’ (pock formation)。麻点是肉眼可见的明显的环形区域, 直径约为 1 mm ~ 8 mm, 由一系列抑制和生长的同心环带组成。麻点的形成分为两步: 第一步为质粒从供体菌菌丝向受体菌菌丝的转移; 第二步为质粒在受体菌菌丝内的扩散^[1]。

1.4 pIJ101 的致育性 致育性定义为染色体诱动能力 (chromosome-mobilizing ability, Cma), 也可看作诱导宿主染色体基因转移至受体菌以及发生重组的能力。pIJ101 能够导致了天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌所有的致育性^[3]。pIJ101 介导链霉菌接合转移和致育性与肠杆菌质粒引起的接合转移不同。参与肠杆菌接合性质粒转移所需很多蛋白由质粒自身编码。以 f 因子为例, 自身编码 20 ~ 30 个蛋白参与接合转移, 介导接合转移时需要 120 kD 的引物合成酶、性纤毛蛋白和 DNA 结合蛋白 (或多肽) 等^[4]; pIJ101 转移功能部分简单, 只有转移基因和相应的调节子, 就能以很高的频率促使质粒从变铅青链霉菌中自我转移至合适的受体菌 (如变铅青链霉菌和天蓝链霉菌) 中, 同时也能引起染色体基因以较高频率 ($\approx 1\%$) 转移至合适的受体菌^[1,2]。参与转移功能的基因或位点定位在 3899 ~ 6756 区间, 占整个质粒总碱基的 23% (f 因子转移区占总质粒 DNA 的 34%)。利用 in-frame 插入突变技术和序列分析推测接合转移功能相关的 6 个基因: *tra*、*korA*、*korB*、*kilB*、*spdA*、*spdB* 和两个顺式作用元件 *chl*、*kilA* (图 1)。*tra* 编码 621 个氨基酸残基, 大小为 70 kD 膜蛋白, 含有 NTP 结合结构域-沃尔克 A 保守序列 (Walker type A motif) 和沃尔克 B 保守序列 (Walker type B motif)^[2] (见图 2)。

与 pIJ101 Tra 功能相同的另一链霉菌质粒 pSN22 TraB 类似结构域的改变, 证明了

Tra A 结构域 (walker A)	283	G-R-R-M-L-I-A-G-T-S-G-S-G-K-S-W-S
共有序列		G-----G----G-S-G-K-S---T
		T T S
Tra B 结构域 (walker B)	308	S-E-W-A-D-H-R-L-V-V-V-D-P
共有序列		R-----G-----H-H-H-H-D-D
		E

图2 Tra 蛋白上的两个 NTP 接合部位

该区是引起质粒转移的主要元件。NTP 结合结构域也存在于枯草芽孢杆菌的 ComG1 蛋白和农杆菌 Ti 质粒编码蛋白 VirB11，这些蛋白都参与 DNA 的横向传递。Kataoka 等^[5]认为 pSN22 引起的质粒转移可能伴随着菌丝间的“融合”进行的。pIJ101 编码的 Tra 蛋白 BLAST 分析表明，在 285 到 485 之间的氨基酸残基比较保守，保守序列与 ATPase 及其它革兰氏阳性菌质粒的转移蛋白等存在较大的同源性，其中与之同源性最大的蛋白为 SpoIIIE 和 Ftsk，这些蛋白都与双链 DNA 分配事件有关。Spo III E 是革兰氏阳性细菌孢子萌芽阶段，菌丝已经或接近分隔，染色体在细胞间分配或转移所必需的；而 Ftsk 是细菌增殖时染色体正确分配到姊妹细胞中所必需的。因此 pIJ101 引起的染色体转移也可能是以双链形式进行，而不是象大肠杆菌 F 因子那样先形成缺口，在很多蛋白的帮助下，单链转移至受体菌，然后合成互补链。这样是否解释 pIJ101 引起的质粒和染色体转移不需要很多质粒编码的蛋白帮助，甚至单个基因 *tra* 就能够实现。

Pettis 等^[6]利用插入对 pIJ101 Tra 蛋白不同部位进行突变，研究了不同部位在介导 DNA 在链霉菌菌丝之间转移所起的功能。研究表明，在保守区（非核苷酸结合部位）某些部位的插入，质粒显著甚至完全丧失转移和致育性，表明在保守区除 Walker A/B motif 外存在额外功能区。N-端的插入致使质粒显著甚至完全丧失致育性，仍然能够引起质粒以较高频率转移，表明 N-端的一些结构域是 Tra 引起质粒致育性的关键部位。

1.5 pIJ101 介导的质粒转移需要一个顺式作用元件 Pettis 等^[7]认为 pIJ101 质粒在 *S. lividans* 中的接合转移需要一个顺式作用元件（cis-acting locus of plasmid transfer, *clt*），但对致育性是非必需的。*clt* 位于质粒 6,800 ~ 6,954 bp（图 3），与 *korB* 基因末端有 44 bp 重叠。该位点（*clt*）突变，质粒 pIJ101 的转移率降低了 10³，而染色体转移没有受到影响。当一个拷贝的 *tra* 基因存在于 *S. lividans* 染色体上，能够引起染色体的转移，同时也能够引起含有 *clt* 位点的 pIJ101 衍生质粒（不含 *tra*）以较高频率转移，不含 *clt* 位点的衍生质粒（不含 *tra*）也可以以较低频率发生转移。*tra* 基因在不同部分插入也显示出对质粒和染色体的转移影响是不同的^[6]。可能的原因是 Tra 蛋白介导的致育性与质粒转移在链霉菌中存在不同机制。

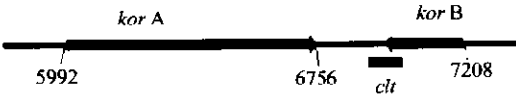


图3 *clt* 在 pIJ101 上的位置（与 *korB* 基因末端有 44 bp 重叠）

5992 等为 ORF 的起止碱基，Position of *clt* in pIJ101

1.6 tra 介导的质粒转移和致育与细菌生活史有着紧密的关系 *tra* 介导的质粒转移和致育与细菌生活史有着紧密的关系。Pettis 等^[8]研究表明：质粒转移、致育与 *tra* 的表

达在宿主菌生活史中是受到一定时序调控的;质粒转移,致育与 *tra* 表达量成正相关。*tra* 表达在基生菌丝形成时(孢子涂板培养 12 h)最高,随着生活周期的延长,表达逐渐减弱,培养 24 h 后显著降低(约为 12 h 表达量的一半),当细胞出现形态分化和产生次生代谢产物时(约 95 h)表达量很少或不表达。因此认为质粒转移和致育发生在基生菌丝形成阶段,细胞分化的开始也就是接合过程的终止。

1.7 *kil-kor* 调控系统 在 pIJ101 引起的质粒转移和 Cma 中存在很精细的调控系统,即 *kil-kor* 调控系统。*korA* 和 *korB* 编码阻遏蛋白,为亲水性蛋白,具有强的扩散性,反式调控 *korA*、*korB*、*kilB* 和 *tra* 基因的起始转录(图 1)。研究表明,*kilB* 编码的产物扩散至受体菌中,或先转移至受体菌的质粒,在受体菌中表达的相应产物(KilB),在受体菌中起作用,延滞受体菌的发育,导致受体菌的生长周期往后延长,特别是基生菌丝形成阶段;而质粒转移只发生在基生菌丝形成阶段,这样也就能有更多的质粒转移至受体菌中,导致更多受体菌的发育延滞,反映在受体菌菌坪上的“麻点现象”(如麻点的大小,形状等)。*korA* 调控 *kilA* 和 *kilB*,而 *kilA* 与 *tra* 部分重叠,因此间接调控 *tra*; *korA* 也调控 *korB*。*korA* 的突变能够导致 *tra* 基因的大量表达,质粒大量转移至新的宿主,从而导致受体菌产生致死效应^[9,10]。*korB* 编码的蛋白调控 *kilB* 和自身的启动子转录,该位点的突变对“麻点”形成大小有关。

另外与转移相关的基因 *spdA/B*,编码分子量较小的亲水性蛋白,定位于膜上。该位点的破坏对“麻点”的形成影响较大,它们的突变降低了 pIJ101 在受体菌菌丝中的转移能力,从而导致 pIJ101⁺ 菌在 pIJ101⁻ 的菌坪上形成的麻点很小,甚至不能形成麻点。

1.8 pIJ101 的稳定性及宿主范围 质粒的稳定性相关的部分位于 *rep* 与 *sti* (strong incompatibility) 之间,大小约为 0.5 kb,确保质粒能够在宿主细胞中稳定遗传。pIJ101 在宿主中拷贝数为 40~300/染色体,但随着宿主细胞的生长和生理阶段不同可能会发生变化。

pIJ101 及其衍生质粒宿主范围非常广泛,通过转化和种间接合转移可以在 *Streptomyces acrimycini*、*Streptomyces albus*、*Streptomyces azureus*、*Streptomyces fradiae*、*S. coelicolor*、*Streptomyces glaucescens*、*Streptomyces griseus*、*S. lividans*、*Streptomyces parvulus*、*Streptomyces stinaespiralis*、*Streptomyces rimosus* 等链霉菌中存在。Kieser 等^[2] 转化 18 株不同的链霉菌或它们的突变株,发现 pIJ101 及其衍生质粒可以顺利通过转化和接合至其中的 13 株链霉菌,而且能够在其中的一些菌中很稳定的遗传。

2 pIJ101 与其它质粒的相互关系

SCP2⁺ 和 pIJ101 分属不同的不相容群,Xiao 等^[11] 发现非转移型的 pIJ101 衍生物如果含有一定长度的和接合型 SCP2⁺ 的衍生物同源的片段,能够以 100% 的高频率被诱动转移,而当无同源片段存在时,非转移型的 pIJ101 衍生物不能被诱动。同源片段的的存在使得两个质粒之间在供体菌中形成共整合体,共整合体形成后马上转移到受体菌中,因此接合和重组是偶联的,也说明重组过程的底物不是营养复制的 SCP2⁺,而是用于转移的 SCP2⁺。三亲接合实验表明,pIJ101 及其衍生物并不能有效诱动转移功能缺失的 SCP2⁺ 衍生物。共整合体的形成可以适当提高 SCP2⁺ 衍生物的拷贝数从而提高基因的表达水平。

3 基于 pIJ101 的载体发展及其应用

在链霉菌质粒研究中, Bibb 等^[12] 从天蓝链霉菌中先后分离到了 SLP1 及 pIJ101 质粒, 把它们改建成各种具有选择标记的, 合适的基因克隆载体, 并利用建成的载体及原生质体转化技术克隆了一些抗生素合成途径中多种酶编码基因, 为链霉菌的遗传分析打下了基础。pIJ101 作为高拷贝质粒载体的优越性在于高效表达基因产物。另外, pIJ101 衍生质粒的稳定性和很大的承载能力, 也是克隆完整抗生素生物合成基因簇的理想选择之一。伴随着 pIJ101 生物学特性的阐明, 一些功能不同的载体相继得到发展。Kieser 等^[12] 在分析 pIJ101 功能区的过程中, 构建了一系列的载体, 如含硫链丝菌素抗性基因 (*tsr*) 的 pIJ302 和 pIJ330, 含紫霉素抗性基因 (*vph*) 的 pIJ356, 以及含新霉素 (neomycin) 抗性基因 (*aph*) 的 pIJ218 等。通过对 pIJ101 基本复制区的分析, 等构建了不同拷贝数从 70 ~ 250 不等的质粒 pIJ303、pIJ350 和 pIJ336 等。为了基因调节分析上的便利, 以 pIJ101 为材料构建了正选择载体 pIJ699。另外, 有的衍生质粒含有 COS 位点可用来构建基因文库, 如 pHZ1358 等, 还有的质粒携带有 RK2 的 *oriT*, 有利于质粒的诱动接合转移。基于载体 pIJ101 和淡青链霉菌 (*S. glaucescens*) 的无启动子酪氨酸酶操纵子 (*melC*), 组建了多拷贝的、整合性的链霉菌启动子探针载体 pMT3010, 作为染色体转录的报导者。当然, 利用 pIJ101 的一些特殊性质衍生来的载体进行放线菌基因克隆、表达及其 DNA 大片段转移的研究正在各个实验室广泛开展。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所杨克迁研究员、中国医学科学院王以光研究员等所进行的细心修改及提出宝贵的意见。

参 考 文 献

- [1] Kieser T, Hopwood D, Helen M, *et al.* Mol Gen Genet, 1982, **185**: 223 ~ 238.
- [2] Kendall K J, Cohen S N. J Bacteriol, 1988, **170**: 4634 ~ 4651.
- [3] Bibb M J, Schottel J, Cohen S N. Nature, 1978, **274**: 398 ~ 400.
- [4] 郑 雷, 颜望明, 刘振盈. 微生物学通报, 1994, **24** (4): 244 ~ 246.
- [5] Kataoka M, Kiyose Y M, Michisuji Y, *et al.* Plasmid, 1994, **32**: 55 ~ 69.
- [6] Pettis G S, Cohen S N. J Bacteriol, 2000, **182**: 4500 ~ 4504.
- [7] Pettis G S, Cohen S N. Mol Microbiol, 1994, **13**: 955 ~ 964.
- [8] Pettis G S, Cohen S N. Mol Microbiol, 1996, **19**: 1127 ~ 1135.
- [9] Kendall K J, Cohen S N. J Bacteriol, 1987, **169**: 4177 ~ 4183.
- [10] Stein D S, Cohen N. Mol Gen Genet, 1990, **222**: 337 ~ 344.
- [11] Xiao J, Melton R E, Kieser T. J Mol Microbiol, 1994, **14**: 547 ~ 581.
- [12] Bibb M J, Charter K F, *et al.* J Mol Microbiol, 1983, **12**: 74 ~ 80.