

放线菌质体遗传和基因工程

——抗菌素产生菌育种的一个新方向

中国科学院微生物研究所二室放线菌遗传育种组

前言

由于放线菌是抗菌素产生菌的主要来源,放线菌中质体的发现引起了国内外普遍重视。这方面正在开展的研究,不仅对遗传学的新领域——质体遗传学的研究有着重要意义,而且,由于证明了控制某些抗菌素生物合成的基因与质体有关,从而引起了人们很大兴趣。因此,就产生了如何引起质体的相应变异来提高育种效率——“质体选择性突变”的设想。并且试图利用质体突变体来研究抗菌素生物合成的途径,以便从抗菌素的合成代谢方面来控制育种。

同时,已经证明放线菌质体能进行种间转移和作为外来基因的载体。如能进一步将不同来源的基因进行体外重组,以质体为载体导入合适的受体,而且在受体中重新组合并进行复制、转录和转译,使它能按照人们的意愿来产生各种类型的抗菌素,这就是放线菌基因工程的前景之一。它将有可能是抗菌素产生菌的育种工作中开辟新的途径,并在生产实践中产生深远的影响。

质体的概念

一、什么是质体

五十年代初,在大肠杆菌中发现了染色体外的、与大肠杆菌的性分化有关的遗传结构 F 因子。1955 年又发现痢疾杆菌的药物抗性因子 (R 因子)。后来又陆续发现大肠杆菌素因子等染色体外遗传因子。人们把这些因子称作质体 (Plasmid)。质体在细菌中广泛存在。六十年代在放线菌中也发现了质体,特别是发现有的质体和抗菌素的生物合成有关,这就引起了人们对放线菌质体的注意。

质体是染色体外的遗传物质,可以独立地复制,稳定遗传,但它的存在与否对细菌细胞的生存没有决定性影响。它和染色体一样由 DNA 组成,但分子量要小得多。一般说,质体 DNA 的分子量约为染色体

DNA 的 0.5—3.0%。例如天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 的染色体 DNA 估计为 5.2×10^9 道尔顿*,而从天蓝色链霉菌的 IF 和 UF 菌株内分离出来的质体,其分子量分别为 21.4×10^6 道尔顿和 20×10^6 道尔顿,一个细胞内质体的数目有的是 1—2 个,有的可能有许多个。质体也能插入染色体中,和染色体一起复制,所以这类质体又称附加体 (episome),如 F 因子,λ 噬菌体 (phage lambda)。一个质体可以有几个基因,不同质体的基因之间可以重组,质体基因也可以和染色体基因发生重组。质体能够通过转化、转导、接合而转移;也能携带染色体 DNA 的片段一起转移,例如大肠杆菌的 F 质体和天蓝色链霉菌的 SCP1' 质体。

二、质体的特征

质体通常具有以下一些特征^[1,2]:

1. 到目前为止,已证实的细菌质体都是由共价闭环螺旋的 DNA 分子构成,分子量是 $2-100 \times 10^6$ 道尔顿。已经分离提纯的放线菌质体有的是共价闭合超螺旋状结构,有的是开环的^[2]。

2. 至今已检查过的细菌中,它们的同一类群质体都有不相容性 (incompatibility specificity), 根据不相容性,可以把同一种微生物的各种质体区分为若干类群,属于同一不相容性类群的不同质体,不能在同一菌株内稳定地共存;属于不同的不相容性的类群的质体,则可以稳定地共存于同一菌株内。

3. 典型的质体包含必要区和非必要区两部分。前者具有和质体 DNA 复制、不相容性等有关的基因,它们对质体存活以及复制等功能极为重要。在非必要区里,有直接影响细胞表现,如接合转移、对毒物的抗性、等性状的基因存在。此外,大多数质体 DNA 分子,有相当数量的片段尚不知其功能。通常,必要区和非必要区是不互相混杂的。

4. 质体是专一地存在于细胞内的,但如果把噬菌

* 道尔顿 (dalton): 质量的单位等于一个碳原子质量的 1/12, 近似于 1.65×10^{-24} 克。

体也看成是质体,则噬菌体是例外,噬菌体可以在细胞外存在并保持它的感染性。

5. 没有质体的菌,能通过结合、转化或转导等从具有质体的菌中获得质体,但不能自发地产生质体。

6. 在细胞结合时,游离状态的质体可以不依赖染色体独立地进行转移。质体能够自发地消失或是通过以重金属、吡啶类染料、溴化胺苯菲啉(E. B.)、利福平、硫酸十二烷基钠、美蓝等化学药剂或高温等手段处理细胞,使其消除或被抑制。

三、质体制型的类型

质体在细胞内的复制是受到一定控制的,按其受控制的程度可分为两类^[11]:

1. 严紧型:

每个基因组只有1—2个拷贝。就是说,每个细胞内只有1—2个同样的质体,质体在一定的细胞周期内复制,染色体不复制时质体也不复制,染色体与质体之比是1:1或1:2。大多数质体是严紧型的。

2. 松弛型:

一个细胞里可以有許多拷贝,染色体和质体之比可以是1:20甚至1:60,在整个细胞生长周期中质体可以随时复制,在细胞生长静止期染色体复制已经停止,质体仍能继续复制。

质体制型控制的类型,有时是和它所存在的细胞有关的。如某些R质体在大肠杆菌细胞内复制的控制是严紧型,而在变形杆菌内则是松弛型。

四、放线菌质体

六十年代初期开始了放线菌质体的研究,特别是在春日链霉菌(*S. kasugaensis*)和天蓝色链霉菌等菌株上证实了质体和抗菌素产生的相关性以后,更加引起人们的重视,推动了放线菌质体研究的深入发展。

目前已经知道的放线菌质体,除和抗菌素的生物合成有关外,主要和以下的一些性状有关:

1. 黑色素的产生(包括酪氨酸酶的形成): Okanishi^[12]用高温和吡啶黄处理马铃薯疣病链霉菌(*S. scabies*)和委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*)初步证明了黑色素的形成和质体有关。酪氨酸酶是催化黑色素形成的一种酶,它的形成也是受质体控制的。Gregory等在1961年^[13]报道了马铃薯疣病链霉菌的酪氨酸酶的形成和质体有关,1964年又进一步报道了这方面的研究^[9]。

2. 气生菌丝和基质菌丝的产生: Okanishi^[12]用提高温度和吡啶黄处理委内瑞拉链霉菌和春日链霉菌,初步证明了气生菌丝的产生和质体的关系。Kirby等^[14]证明了天蓝色链霉菌的质体能控制该菌的气生菌丝和基质菌丝的形成。

3. 致育性: 这是在天蓝色链霉菌A3(2)重组的研

究工作中发现的,菌株间的某些组合比其他组合更容易致育,杂交中重组率可以从0.001%(或更低)到100%。近几年确定了三种不同的致育类型: 正常致育型(NF型)、原始致育型(1F型)和超致育型(UF型)^[12],最近还发现了其他的致育类型^[15, 24]。所有这些致育类型的行为都是受质体控制的^[12],最初假定并命名这个质体叫SCP1,这个质体有性因子的作用。

4. 对自身所产生的抗菌素的抗性: Wright和Hopwood^[26]证明了天蓝色链霉菌A3(2)中质体SCP1所带基因还决定抗菌素次甲霉素A(methylenomycin A)的生物合成,并和对它自身所产生的抗菌素的抗性有关。

放线菌质体与抗菌素产生菌的选育

一、抗菌素是次生代谢产物

抗菌素是微生物的次生代谢产物中的一大类。因此,搞清楚次生代谢产物究竟是什么,以及它和初级代谢产物有什么关系,将给抗菌素产生菌的育种所采用的途径提供更多的依据。

1. 次生代谢产物

微生物的初级代谢产物是指微生物生长和繁殖所必需的物质,如糖类、脂肪和蛋白质等。而微生物的次生代谢产物是指由微生物产生,与微生物的生长、繁殖无关的一类物质,如抗菌素、色素、大肠杆菌素等。它的生物合成,至少有一部分是取决于与初级代谢产物无关的遗传物质,并由这类遗传物质的信息形成的酶所催化的代谢途径有关;它的产生多数是为菌株所特异的。例如,一种抗菌素并不是在分类学上属于某一菌种的全部菌株都能产生的,而是属于某一菌种的特定菌株才能产生,并且同一种抗菌素常常也可由属于另一类菌种的特定菌株产生。

2. 次生代谢产物和初级代谢产物的关系

从代谢方面来说,小嶋、道男^[17]曾归纳过次生代谢产物与初级代谢产物生物合成途径的关系(图1)。

根据化学性质,可以把抗菌素这类次生代谢产物分为: 糖衍生物(链霉素、卡那霉素等氨基糖苷类抗菌素),莽草酸类代谢产物(氯霉素)、肽类(粘菌素和杆菌肽类抗菌素),多缩酮(四环素类及大环内酯类抗菌素)。从代谢途径来看,次生代谢产物是以初级代谢产物作为前体衍生出来的。

至于从遗传控制来说,二者都受DNA调节控制,染色体DNA与质体的DNA都与次生代谢产物形成有关。

梅沢滨夫^[30]用示意图(图2)说明了染色体及质体控制次生代谢产物和初级代谢产物合成的关系。

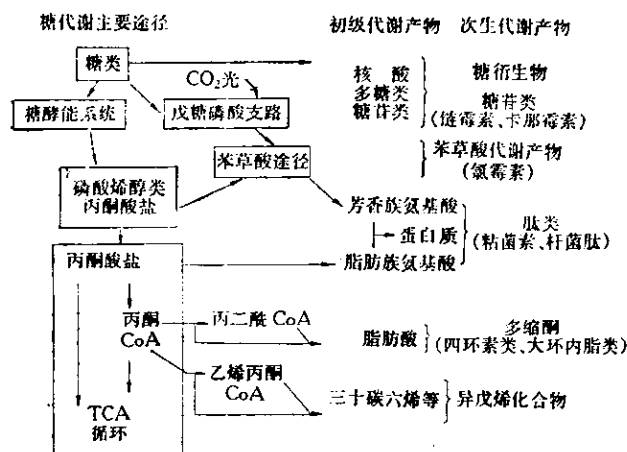


图1 初级代谢系统与次生代谢系统的关系

在图2中可看到，有一部分代谢产物是通过取决于质体信息形成的酶所催化的代谢途径合成的，这类物质称为质体产物。由于这类物质直接间接受质体遗传物质所控制，因而形成了质体遗传的观点。

二、抗菌素生物合成和放线菌质体的关系

前已谈到，所谓质体产物，就是“通过取决于质体代谢途径而形成的产物”。而在代谢过程中，如果染色体发生变异，有可能是致死性的；如果单是质体发生变异，则不是致死性的。因此由于质体的变异，经常会导致产生许多新的次生代谢产物。在自然界中能产生多种多样的质体，由此就会产生形形色色的代谢产物。

次生代谢产物受各自菌株的质体控制的例子，除前面提到的黑色素以外，还有不少例证说明放线菌质体和抗菌素生物合成直接有关，现分述如下：

1. Раутенштейн, Я. И. 等^[28]曾报道放线菌 *Actinomyces levoris* 2638 的溶原性噬菌体与抗菌素的产生有关，当溶原性噬菌体从细胞中消除后，抗菌素的产生也同时消失，但当细胞再次溶原化后，又恢复了抗菌素的产生能力。后来又有人认为，如果从染色体外遗传物质这个角度来说，溶原性噬菌体也可以认为是一种质体，但也有不同的看法。

2. 1970年，梅沢滨夫等^[19]发现，把春日链霉菌菌株于 35℃ 预培养，或先加入吡啶黄再于 27℃ 预培养，所产生的孢子会部分失去合成春日霉素和金丝菌素的能力。因此，认为该菌生物合成抗菌素的特性，可能取决于质体的遗传信息。1975年冈西正刚^[29]又通过吡啶黄处理或高温培养，获得了春日霉素生产菌的变异菌株。当从生产菌株和变异菌株中分别提取 DNA 后，发现有着对应于形成春日霉素和金丝菌素的不同大小的质体。

3. 1972年 Boronin 等^[3]报道吡啶黄能消除产生土霉素的龟裂链霉菌 (*S. rimosus*) 对土霉素的抗性。1974年 Boronin 等^[3]又报道，通过杂交证明该菌的染色体外基因中包括了决定抗菌素生物合成的基因，所用三株菌均能通过吡啶黄处理，成为不产生抗菌素的菌株。这究竟是由于阻断了抗菌素的生物合成，还是影响抗菌素不能分泌到培养基中，尚待阐明。

4. 1974年 Noack 等^[17]报道，用吡啶黄处理产生 Turimycin 的吸水链霉菌 (*S. hygroscopicus*)，可消除质体和形成不产生抗菌素的菌株。

5. Kirby 和 Hopwood 等^[16]1975年报道，在天蓝色链霉菌中，质体决定抗菌素的生物合成和对这一抗菌素的抗性。1976年 Wright 和 Hopwood^[16]报道了天蓝色链霉菌 A3(2) 中几株不同的质体突变体能够协同合成抗菌素，证明质体 SCP1 所带基因决定了次甲霉素 A 生物合成的全部过程。同时，将 SCP1 质体转移到变青链霉菌 (*S. lividans*) 和小小链霉菌 (*S. parvulus*) 中后，使后两种菌也具有了产生次甲霉素 A 的能力。因此，更直接地证明了质体 SCP1 全部地控制了次甲霉素 A 的生物合成。

6. 1975年 Akazawa 和 Umezawa (梅沢滨夫) 等曾发现，委内瑞拉链霉菌 (*S. venezuelae*) ISP 5230 在用吡啶黄处理后，也会丧失合成氯霉素的能力。他们在 1975年^[1]进一步报道了利用委内瑞拉链霉菌环状染色体上 8 个选择性标记，以及用吡啶黄处理后得到的不产氯霉素和黑色素两个非选择性标记，进行了四点

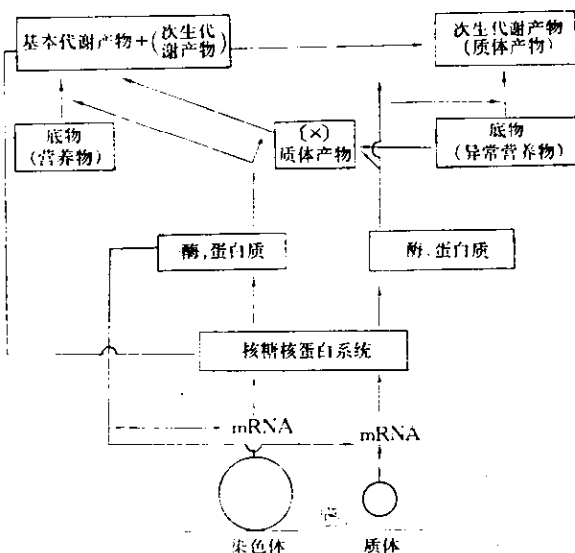


图2 次生代谢产物生物合成与初级代谢产物的关系

杂交重组,分析重组频率,证实了和氯霉素的生物合成有关的基因不在染色体上。

三、放线菌质体的种内和种间转移

放线菌质体的种内转移,首先是从天蓝色链霉菌 A3(2) 的三种主要致育性类型相互转移的现象中发现的^[13]。

由于 SCP1 质体分布状况的改变,引起了杂交后致育性的转变。带有 IF 致育因子(即 SCP1)的原始致育型天蓝色链霉菌能把它的质体转移给其他菌株,它是天蓝色链霉菌野生型的致育类型。当野生型失去 SCP1 的时候,它就变成超致育型(UF),它起受体的作用,它的自发突变频率是 0.03—0.3%,但紫外线和 X

射线的诱变使其突变频率变得更高,当 SCP1 与染色体结合成稳定状态时,它就成为正常致育型(NF),它能起给体的作用,把染色体片段给予 IF 和 UF。当 NF × UF 杂交时,重组频率可达 100%,当 NF × IF 杂交时,重组频率可达 10%,当 NF × NF 杂交时,重组频率是 1%,IF × UF 杂交时,SCP1 转移频率很高,而染色体基因转移频率很低。染色体基因的转移也可以在没有 SCP1 的 UF 之间发生,频率虽然不高(0.001%),但可以把较大群的连锁标记转移过去,说明可能另外还有一种体系控制接合。1977 年 Freeman 和 Hopwood 等^[14]发现,在 SCP1⁻(UF)菌株中存在另一种性因子 SCP2,可增进 SCP1⁻菌株的致育能力,但它是否与所有 SCP1⁻的菌株间的重组都有关,还待证实。

表 1 天蓝色链霉菌三种主要致育性类型的特性

特 性	致育性类型和质体 SCP1 所处状态		
	IF 型	NF 型	UF 型
SCP1 质体所处状态	独立,自主	在染色体九点钟区域插入	没有
不完全接合子 的结构组成 { IF NF UF	“随机”	NF 提供的片段集中在染色体九点钟区域, NF 和 IF 的九点钟区域分离到单倍体子代中去 “随机”	可能是异原 NF 提供的片段集中在染色体九点钟区域,所有单倍体子代遗传了 NF 的九点钟区域
重组体的平均 百分比 { IF NF UF	0.01%	10% 1%	0.01% 100% 0.001%
重组体的致育 类型 { IF NF UF	IF	IF 和 NF NF	IF* NF UF

* 所有子代由于质体转移均成 IF 型。

放线菌质体的种间转移是由 Hopwood 等首次证实的^[15]。他们利用具有 SCP1 质体的天蓝色链霉菌分泌的一种扩散性物质能抑制 UF 菌株产生菌丝的特点,利用平皿杂交法对其他放线菌作了种间转移试验。方法是,分别将天蓝色链霉菌的 IF 和 UF 菌株作为指示菌,把它们的孢子分别涂布在两组平皿上,然后以被测定的其他放线菌的孢子液以 1.5 厘米的直径接种在已涂布以上两种指示菌孢子的完全培养基上,培养后,如在涂布了 UF 指示菌孢子的平皿上,UF 菌株的气生菌丝的生长被测定菌株所抑制,而涂布 IF 指示菌孢子的平皿上,气生菌丝能继续生长,说明被测定菌株是 IF 型。反之,如被测定菌株的孢子涂布接种在完全培养基上作为指示菌,把天蓝色链霉菌的 IF 和 UF 菌株的孢子分别涂布接种在这种平皿上,经培养后,如 IF 菌株能抑制它的周围产生气生菌丝,那么被测定菌丝是

UF 型。试验结果发现,在 32 株不同的放线菌中,有 19 株气生菌丝能被 IF 所抑制^[14],但这还不能说明这 19 株野生型全部是缺乏质体的 UF 株,也可能它们有质体,但不能产生抗 SCP1 的物质。另外,也可能有其他野生型菌株是属于 UF 型的,由于它的染色体能产生抗 SCP1 的物质,因而不能表现出 UF 型的性状来。

将用上述方法测出的认为是 UF 型的几株野生型菌株和天蓝色链霉菌 IF 型菌株混合培养,以观察天蓝色链霉菌的 SCP1 是否能转移到野生型的 UF 株中去,结果发现其中有一变株青链霉菌的 UF 型能够接受 SCP1 转变成 IF 型,频率达 0.6—3.0%。这一事实说明放线菌质体不仅能在种内转移,而且能在种间转移。

四、放线菌质体能作为外来基因的载体

Vivian 等^[16]发现天蓝色链霉菌中除前述三类主

要致育类型外,还有另一种类型。这一类型的菌株含有一个衍生的质体,即某一片段的染色体已插入质体之中,使得这个质体携带了染色体的 DNA 片段,当插入染色体的质体与 UF 菌株的染色体杂交时,能作为给体进行交换,他们认为这种菌株相当于大肠杆菌的 F' 菌株,称它为 SCP1' 菌株。

同年,他们又报道^[14,15],用天蓝色链霉菌 A3(2) 的 IF 株和变青链霉菌 1326(UF) 菌株做试验材料,用亚硝基胍(MNNG)和紫外线诱发营养缺陷型,用平皿杂交法测定菌株致育性能,根据是否产生扩散性物质抑制 UF 菌株产生气生菌丝的性质来识别菌株是否带有 SCP1 质体。经紫外线多次处理天蓝色链霉菌 A3(2) 的 IF 型菌株和变青链霉菌 1326(UF) 菌株,分别得到 12pheA (IF) 和 A₄₅₀CYSB₆(UF) 两株菌,把二者进行杂交,如给体 IF 的 SCP1 带有 CYSB⁺,则可通过研究 CYSB 任何一边的连锁标记来测定染色体插入范围,以及在此范围内其他标记的情况。他们从 53000 个杂交菌落中,得到 310 株菌具有比 IF 亲本更高的提供 CYSB⁺ 的频率,其中 1873 号菌株能提供 CYSB⁺ 的频率特别高,而提供与 CYSB 紧密连锁的野生型等位基因的频率却低得很多,因而证明,1873 号菌株带有包括 CYSB 的一段染色体,它还具有抑制 UF 菌株产生气生菌丝的能力和抵抗扩散性物质的能力。可见从 IF 型而来的 1873 菌株没有失去质体 SCP1。将菌株 1873 与突变体 A₄₅₀ (hisA1) (UF) 混合培养时,1873 的 SCP1 很易转给 A₄₅₀ (hisA1) (UF) 它们的子代提供标记的方式和稳定性与菌株 1873 一样,说明 1873 菌株不是染色体基因的变化,而是质体变化的结果。这种带有新质体的菌株称为 SCP1' 菌株,它与大肠杆菌 F' 菌株相似,这一质体称为 SCP1-CYSB。CYSB 基因的转移和 SCP1 质体的转移具有同样高的频率。

SCP1' 菌株不仅能在种内,也能在种间进行质体转移,这为导入有用基因到生产菌株中去创造了条件。它们不需要与受体染色体交换而结合成整体,就可以在受体内表现出外来基因的性状,这样就能使质体作为染色体基因的载体而进入受体,使受体菌株增加基因的数量和种类。

五、放线菌质体遗传的研究为抗菌素产生菌的育种开辟了新途径

1. 质体选择性突变法:

前已谈到,在放线菌中,抗菌素的生物合成至少部分是受质体控制的,而质体又可以通过接合、转化、转导而进行种内种间转移。它还可以成为外来基因的载体,也可以和染色体相互插入,共同复制,而且质体本身也会产生各种各样的突变。如果说以往对抗菌素的育种工作的着眼点主要是使染色体发生变异引起遗传代谢途径的改变,而导致代谢产物的差异的话,那么,近年

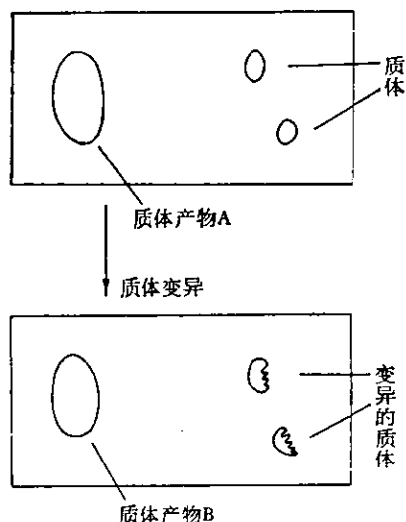


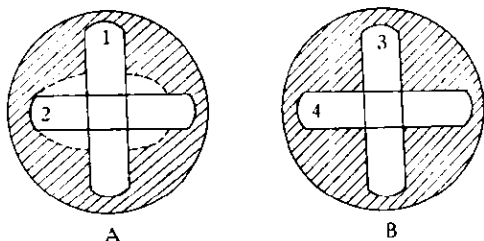
图3 质体变异对质体代谢产物影响的示意图

来放线菌质体的发现和研究所提供的资料,促使我们进一步考虑如何引起质体的相应变异来提高育种的效率。

如果选择性地使质体产生变异,例如使某个特定基因产生突变而大大提高抗菌素生物合成的产量或改进抗菌素的质量甚至产生新品种的话,将为抗菌素的育种开辟新的途径。梅沢滨夫^[10]称这种方法为“质体选择性突变法”,可用图3表示质体变异对质体产物的影响,质体产物A由于质体变异而转变成质体产物B。

2. 关于质体控制的代谢途径的知识在育种中的应用:

在放线菌的质体发生突变后,往往会阻碍抗菌素的生物合成,通过互补和共同合成试验,可以测定质体突变体中抗菌素生物合成障碍的突变类型,以及它们之间的相互关系,突变基因是否等位,有无互补作用。同时,还可以鉴别突变株是分泌者还是转换者。无疑这是测定质体控制抗菌素生物合成的代谢途径的有效方法。研究天蓝色链霉菌 A3(2) 质体 SCP1 所控制的次甲霉素 A 的生物合成时,通过质体突变株之间的互补和共同合成试验,可以将七个突变株分成四个共同合成类型,表明至少有四个质体基因参加了次甲霉素 A 的生物合成^[16](见图4)。因此,在生产实际中可以在利用这些突变类型测定其生物合成的代谢途径后,利用与染色体代谢控制同样的原理进行与质体有关的抗菌素生物合成的代谢控制,以达到积累或共同合成特定的代谢产物的目的。通过质体产量基因突变、重组,使特定基因发生变化,改变代谢系统中某一环节,有可能改进抗菌素的质量,提高抗菌素的产量和产生新的抗菌素品种。



- 1,3 SCP1⁺ 分泌无活性物质的变种 R40 (分泌者);
 2 SCP1⁺ 可将无活性物质转换成具有活性的抗菌素的变种 R39 (转换器);
 4 SCP1⁺ 分泌无活性物质的变种 R53;
 A、B 两平皿中均先涂布 SCP⁻ 指示菌(不产抗菌素,也无抗性);
 A 中 R40 和 R39 能共同合成抗菌素,出现抑制圈;
 B 中 R40 和 R53 不能共同合成抗菌素,无抑制圈。

图 4 无抗菌素活性天蓝色链霉菌突变株共同合成抗菌素试验

放线菌的基因工程

一、基因工程的概况

1. 什么叫基因工程:

基因工程就是把我们所需的染色体上的基因切下来(或选择性地合成带一定遗传信息的 DNA 片段),把它和作为载体的其他的基因再连接起来,并使这种 DNA 片段组入到完全不同的生物体内,以实现生物遗传特性的转移和重新组合,从而改变生物的遗传特性,这项技术就是所谓基因工程。

通过基因工程的研究,使人们能够定向地控制和改变生物体的遗传,有可能创造出前所未有的生物新类型。但目前还只是在用低等生物(病毒、噬菌体、细菌等)和离体培养的哺乳动物细胞的水平上(包括人体细胞在内)来实现这一过程。放线菌的基因工程,由于生产上的需要,国外也在着手考虑进行。基因工程对于育种、遗传病治疗、发酵工业、肿瘤防治、环境保护、国防等方面都有直接关系,而且对于分析了解遗传物质的基因结构和功能,生物体的分化、发育以及生命起源等基本理论问题也有重大意义。

2. 基因工程的主要步骤:

(1) 切下基因

基因工程的第一步,是将所需的基因从 DNA 链上切下来,造成粘接末端,再将它和载体基因相连接,一般用以下两种方法:

酶切粘接末端:七十年代初期,人们就鉴别出几种能识别出特定的碱基序列,并能切断 DNA 的内切酶,一般称为限制性内切酶,即能在自己的特定 DNA 分子的特定的位点上切断 DNA 分子中的磷酸二酯键的一

种酶。这种酶可以区别自己的 DNA 和其他 DNA,它只切断从外部进入的 DNA,是个具有保卫自己的染色体特性的酶。人们还发现,这种酶对 DNA 的切断点均在旋转对称位置上或其附近,形成一种迴文式的序列^[3]。限制性内切酶一般在切开 DNA 的同时,能形成粘着末端——3'OH, 5'P 末端;酶很稳定,容易提取。常用限制性内切酶的性质见表 2。

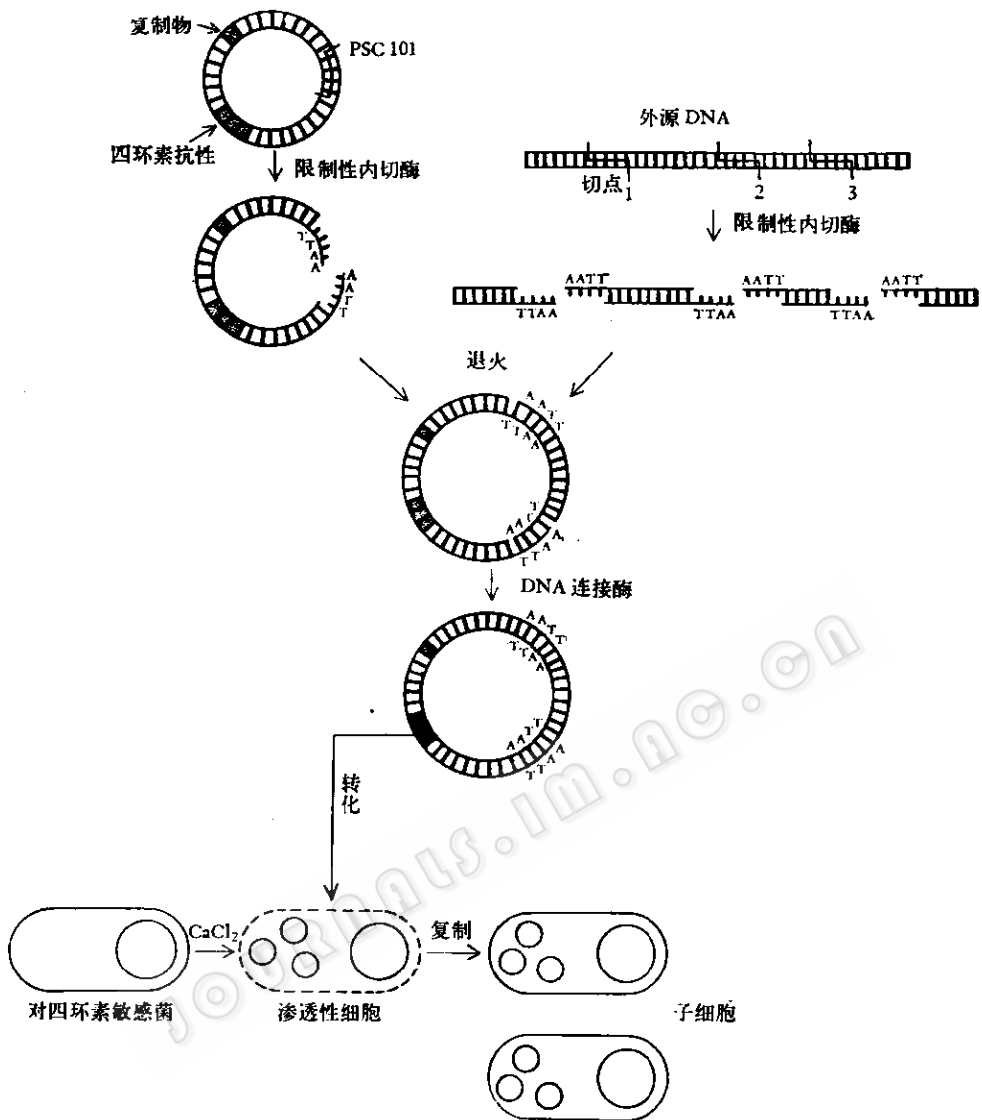
表 2 常用限制性内切酶的性质

酶	碱基序列和切断点	来源
HpaII	$\begin{array}{c} \text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{G}-\text{G}-\text{N} \\ \quad \\ \text{N}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{C}-\text{N} \end{array}$	副流行性感菌
EcoRI	$\begin{array}{c} \text{N}-\text{G}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{N} \\ \quad \\ \text{N}-\text{C}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{A}-\text{G}-\text{N} \end{array}$	带有 R 质体的大肠杆菌
HindIII	$\begin{array}{c} \text{N}-\text{A}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{T}-\text{T}-\text{N} \\ \quad \\ \text{N}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{G}-\text{A}-\text{A}-\text{N} \end{array}$	流行性感菌
EcoRII	$\begin{array}{c} \text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{N} \\ \quad \\ \text{N}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{C}-\text{C}-\text{N} \end{array}$	带有 R 质体的大肠杆菌

限制性内切酶可以使两条链断裂点的间隔产生具有互补核苷酸序列的 DNA 末端——“粘接末端”,在较低温度下,它可以重新建立氢键连接(其 T_m 为 5—6℃)——即“退火”。最后用连接酶(其功能是通过合成邻近二核苷酸之间的磷酸二酯键来修复“缺口”或单链 DNA 的裂口)进一步再作共价键的连接,见图 5^[4]。

在不干扰质体(PSC101)的复制和四环素抗性基因位点的情况下,可用限制性内切酶 EcoRI 切开质体。EcoRI 酶能识别的核苷酸序列在其他 DNA 中也存在,因此和内切核酸酶接触的外源 DNA 大约每隔 4,000—16,000 对核苷酸单位就被随机地切割一次,切开的外源 DNA 片段通过互补碱基对的氢键“退火”连接在质体 DNA 上,而且新的组合分子由 DNA 连接酶封闭。由完整的质体和外源 DNA 片段结合成的 DNA 嵌合物通过转化进入细菌,而且外源 DNA 可借助质体复制功能而复制。

人工切割和粘接末端:任意的 DNA 双链片段(如果是一个闭环的 DNA,首先就要用裂解酶切开 DNA,使其成为线状分子),先用 λ 外切酶处理,此酶能切掉 DNA 链 5' 端上的核苷酸,产生不对称末端,再用末端转移酶将特异核苷酸加到 3' 端(此端 3 位碳原子上有一个 OH 基)。如在一条 DNA 双链片段的末端加上数个脱氧腺苷酸(dA_n),而另一条 DNA 片段上用同法在 3' 末端加上数个脱氧胸腺核苷酸(dT_n),两者末端通过 dA_n 和 dT_n 之间的氢键粘接,再加入 DNA 聚合酶 II 和外切酶 IV 以补足或切去不合适的末端,最后用连接酶完成共价键的连接(见图 6^[4])。这种方法显然比



外源 DNA 被接在 PSC101 质体上,并随质体引入到大肠杆菌内。

图 5 酶切粘接末端示意图

酶切粘接末端复杂得多。

(2) 基因的运载和复制

由于大部分 DNA 片段本来没有自我复制的能力,为了在生物系统中繁殖自己,就必须使这种 DNA 分子片段连接到能复制自己的 DNA 分子的特殊系统中。甚至在原细胞内能复制的 DNA 片段也不一定具有在不同环境下复制所需要的特异遗传信息的能力,如果要使外来的 DNA 在细胞中复制,就需要一个合适的媒介物或运载体,这个运载体必须是能自我复制的。由载体和所希望的外源 DNA 片段组成组合分子,再引入到受体中去进行繁殖。

已知细菌,甚至高等生物细胞,可由于外源 DNA

的进入而改变遗传特性,这称为转化作用。但在转化中,特定基因难于定向地取出和进入。在基因工程中,利用工具酶和基因运载体,可以将特定基因切下,运载并组入受体中进行重组,其复制可不受或少受染色体的控制。基因的运载主要靠质体和 λ 噬菌体。

质体: 由于质体既能复制自身的 DNA,也能同时复制与它相连接的外来 DNA 片段进行共同增殖,还可以独立于染色体而转移,因此,质体可以成为基因工程中基因的运载体。

Cohen^[4] 等以及许多人发现,用钙盐处理大肠杆菌,可以增加细菌细胞膜的通透性,利于细菌吸收外来的 DNA (参看图 5)。这一发现,大大有利于质体作为

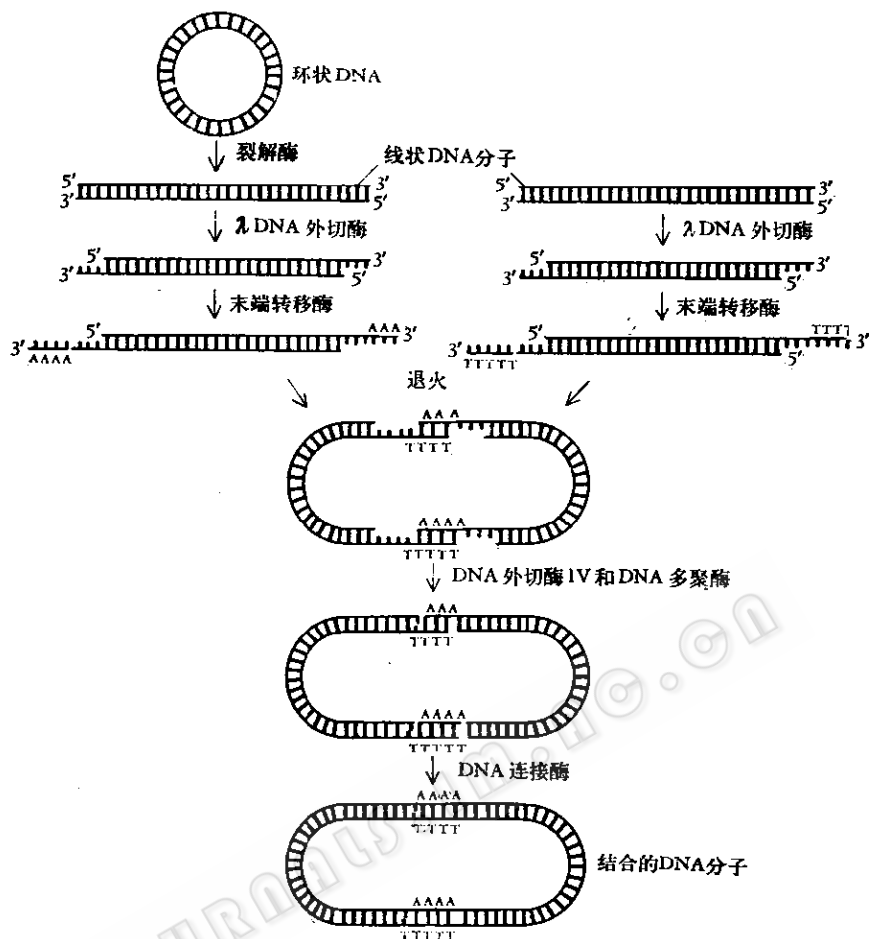


图6 人工粘接末端示意图

基因的运载工具，越过生物间细胞壁的特异性而进入到新的生物体内。

质体可以通过密度梯度离心法分离获得。如许多质体DNA就是通过染料（EtBr——溴化胺乙苯吡啶）浮力密度离心法提纯的^[1]。

λ噬菌体：利用某一溶源性细菌菌株释放出温和噬菌体，使其感染另一敏感菌株，从而使后者的某些性状按前一菌株的性状发生改变，这就是我们早已熟知的转导作用。在这里，噬菌体是转导作用的媒介，它从给体细菌转移部分基因给受体细菌。

Davis^[2]注意到，当λ噬菌体失去某一部分DNA时（总量可达20%），仍不失活，失去的太多则失活，这一部分DNA的空间正好可作为运载其他DNA使用。用λ噬菌体作为载体也有许多成功的例子。

(3) 筛选

由于目前分离纯的基因功能单位还比较困难，由重组组入的新基因能否繁殖也需要检查。因此，基因工程的第三步，就是要对试验菌进行筛选。上面已谈

到可利用抗药性的粗筛法进行筛选，另外还可以利用某种酶的缺乏菌株，或利用某种基因蛋白产物的抗原性的专一性等来筛选。

Clowes等介绍了一种分子杂交筛选法^[4]，其原理是，由一个DNA模板上转录的RNA只同双螺旋DNA的一条链互补，可形成DNA-RNA双螺旋。同样，如果一外源RNA分子的碱基序列相当于一个DNA链的序列，则也能形成杂交DNA-RNA双螺旋，借助这一原理，可用某种硝酸纤维素滤膜来做定性或定量测定。这种纤维滤膜能保留DNA-RNA杂种分子，而不保留游离的DNA分子，假如RNA带上放射性标记，就可测量被滤纸保留下的放射性。在基因工程最后的筛选步骤中，可将细菌在琼脂平板上培养，用硝酸纤维微孔膜复印后，处理膜上的细菌，使其就地溶破放出DNA，用此膜过滤P³²mRNA，此时P³²mRNA只杂交结合在专一菌落的DNA上，形成DNA-P³²mRNA留在膜上，通过放射自显影，可检出此菌，并可由琼脂平板上分离出来，进行大量培养。

二、放线菌基因工程的设想和展望

前面已经提到春日霉素、金丝霉素、土霉素、Tetramycin、次甲霉素A、氯霉素等的生物合成至少部分受质体控制。现在已知放线菌的质体可以进行种间转移,并且质体可以作为染色体的载体,这就使人们对放线菌育种产生了一种新设想——放线菌的基因工程。即按照人的意愿,定向地改变放线菌的遗传特性,为抗菌素产生菌的育种开创一条新路。为了进行放线菌的基因工程,除对质体一般特性进行研究外,还需对质体的复制类型进行研究(松弛型或严紧型),以便选择合适的基因载体。此外,对基因的定位、分离、表现,以及转移方式等也要进行研究。

1. 放线菌基因工程在育种中应用的一些设想:

(1) 获得抗菌素的高产菌株

可以把不同类型的带有产量基因的质体,或把质体和染色体互相重组,形成多基因嵌合体,再组入受体;或者将产量基因与松弛复制型质体相连接,使产量基因能随着松弛基因的不断扩增而相应的增加,从而增加了产量。

(2) 把决定抗菌素合成的基因转移到容易培养和繁殖快的菌种中去

由于生产抗菌素的菌株一般要求比较严格的培养条件,因此,对生产设备、原料、操作过程都要求极高。如果我们把生产抗菌素的基因转移到容易培养和繁殖快的菌株(如大肠杆菌或枯草杆菌)中去,一旦成功,将能简化工艺,缩短周期,为普及生产各种抗菌素打开方便之门。美国有人正在研究把产生链霉素的遗传物质转移到大肠杆菌中去。

(3) 获得能同时高产几种抗菌素的菌种

将几种决定抗菌素合成的基因用基因工程的手段结合在一个受体上,即把几种菌株所具有的产生不同抗菌素的遗传特性融合在一起,并在一种受体菌株中表现出来。这样,一次发酵就可得到几种抗菌素,在生产上有一定的现实意义。印度有人正研究把产生抗菌素的遗传物质转到另一个抗菌素的生产菌上,希望培养出同时能生产两种抗菌素的新菌种。

(4) 获得合成新抗菌素的菌株

先得到质体基因突变和质体与染色体之间相互插入的变异株,再将变异后的基因经载体转移进入合适的受体,从中可以筛选出合成新抗菌素的菌株。另外,也可以利用菌体内不同质体间的共同合成作用,使原来没有活性的抗菌物质转变为具有活性的抗菌素,从中有可能筛选出新抗菌素。

2. 放线菌基因工程的展望:

利用基因工程进行放线菌的定向育种,今天已经提到日程上来了。细菌的基因工程研究已为开展放线菌基因工程研究提供了一定的经验。放线菌是抗菌素

产生菌的主要来源,而抗菌素的生产在医药卫生和国民经济上意义很大,但当前还远远不能满足需要,这对放线菌育种新途径——基因工程的研究将是一股巨大的推动力量。某些抗菌素,如青霉素、链霉素的生物合成途径已基本清楚,这对搞清控制抗菌素产量和质量的基因位点是个有利条件。此外,抗菌素产生菌代谢控制的精确性,抗菌素结构与功能关系的敏感性等特点,对放线菌基因工程的研究也有它有利的一方面。

但在另一方面,也尚有许多基础工作有待进行,例如抗菌素是次生代谢产物,它的产生大多是受多基因控制的,控制次生代谢产物的基因比控制初级代谢产物的基因多得多。影响初级代谢产物和次生代谢产物的基因都有可能控制部分抗菌素的产量和质量。因此,研究抗菌素的生物合成过程和定向选育菌种是比较复杂的,尤其是选育高产菌株更是比较困难。这是因为产量性状没有选择性标记,已有的理论研究所采用的遗传标记都不是决定产量性状的;而产量性状的变异不仅受多基因控制,而且严格受外界条件变化的影响,代谢调节十分敏感。例如酶的诱导,反馈调节和分解阻遏对产量都会有很大影响。此外,放线菌的基础遗传学研究比起细菌来要晚一些。就以染色体基因定位的工作来说,除对天蓝色链霉菌研究得比较详细以外,其他如龟裂链霉菌、淡青链霉菌(*S. glaucescens*)、委内瑞拉链霉菌、比基尼链霉菌(*S. bikiniensis*)、橄榄色链霉菌(*S. olivaceus*)等,虽然也进行了一些研究,但尚不够完善。尽管这样,目前育种的主要依据仍是染色体基因图和生物合成代谢途径。例如利用初级代谢产物的生物合成与其他选择性性状间的相关性。如营养缺陷、对自身代谢产物的抗性、对温度的敏感性等等。绘制染色体图以后,就能了解有关产量基因与相应的选择性基因之间的关系,设法以比较邻近的基因作为诱变和杂交育种时的筛选对象来进行相对定向育种。目前受质体控制的基因的研究还很少,基本上是空白,这是一个非常薄弱的环节。另一根本问题是,微生物为什么要产生它自身不需要的抗菌素,这一重大生物学问题迄今尚未得到满意的阐明。因此,难于掌握有效地控制它的生物合成的关键,这对放线菌基因工程的研究设计也带来了复杂性。因此,放线菌基因工程的研究比起细菌来就更为艰巨、复杂。但是,正如革命导师恩格斯所指出:“社会方面一旦发生了技术上的需要,则这种需要就会比十数个大学更加把科学推向前进。”放线菌基因工程的研究,将为抗菌素产生菌育种工作提供一个定向的手段。在毛主席革命路线的指引下,它一定会在我国迅速地开展起来,在抗菌素产生菌的育种上发挥积极作用。

参 考 资 料

- [1] Akazawa, H. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 90:

- 336, 1975.
- [2] Boronin, A. M. et al.: *Genetika*, 8: 174, 1972.
- [3] Boronin, A. M. et al.: In Abstracts of the Second International Symposium on the Genetic of Industrial Microorganisms, p. 103 (Academic press, New York and London), 1974.
- [4] Clowes, R. C.: Experiments in Microbial Genetics, Experiment 10 (DNA-RNA hybridization), 1975.
- [5] Clowes, R. C.: *Scientific American*, 228 (4): 18, 1973.
- [6] Cohen, S. N.: *Scientific American*, 233 (1): 24, 1975.
- [7] Davis, R. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 71 (11): 4579, 1974.
- [8] Gregory, K. F. et al.: *Nature*, 191: 465, 1961.
- [9] Gregory, K. F. et al.: *J. Bacteriol*, 87: 1281, 1964.
- [10] Belinski, D. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 71 (9): 3455, 1974.
- [11] Schrempf, H. et al.: *J. Bacteriol*, 121: 416, 1975.
- [12] Hopwood D. A.: *Bacterial. Rev*, 31: 373, 1967.
- [13] Hopwood, D. A. et al.: *Genetics*, 62 (3): 461, 1969.
- [14] Hopwood, D. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 77: 187, 1973.
- [15] Hopwood, D. A. and Wright, H. M.: *J. Gen. Microbiol*, 79: 331, 1973.
- [16] Kirby, R. et al.: *Nature*, 254: 265, 1975.
- [17] Noack, D.: Abstracts of the Second International Symposium on the Genetic of Industrial Microorganisms, p. 104 (Academic Press, New York and London), 1974.
- [18] Novick, R. P.: In Handbook of Microbiology IV. Microbial Metabolism, Genetics and Immunology, p. 537, 1974.
- [19] Okanishi, M. J.: *Antibiot*, 23: 45, 1970.
- [20] Patrice Driakell-Zamerhof: *The Bacteria*, V. Heredity, p. 155, 1964.
- [21] Schrempf, H. et al.: *J. Bacteriol*, 121 (2): 416, 1975.
- [22] Vivian, A. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 64: 101, 1970.
- [23] Vivian, A.: *J. Gen. Microbiol.*, 69: 353, 1971.
- [24] Vivian, A. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 76: 142, 1973.
- [25] Weisblum, B. et al.: *Biochemistry*, 14: 2064, 1975.
- [26] Wright, L. F. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 95: 96, 1976.
- [27] Freeman, R. F. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 98: 453, 1977.
- [28] Раутенштейн, Я. И., Мурадов, М.: *Изв. Акад. Наук СССР. Серия. Биол.*, 4: 575, 1968.
- [29] 冈西正则: 发酵学会(大阪), 昭和50年11月1日报告, 1975。
- [30] 梅沢滨夫: 科学, 46: 129, 1976。
- [31] 梅沢滨夫: 现代化学, 6 (51): 33, 1975。
- [32] 小嶋, 道男: 化学と生物, 12 (2): 139, 1974。