

荚膜红假单胞菌的基因转移子

吴永强 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所)

紫色非硫细菌 (*Athiorhodaceae*) 可以在光照条件下厌氧生长,也可以在暗处好氧生长或厌氧生长。在光照条件下,它们可以行光合自养生长,也可以行光合异养生长。大多数光合细菌还能固氮,利用大气中的氮为生长的唯一氮源,同时能由固氮酶催化放氢。因此这类微生物在光合作用、固氮作用和生物力能学等研究中受到普遍的重视。

长期以来,人们用生物化学和生物物理学方法对光合细菌进行了许多研究,在光合膜的合成及其调节、光化学、电子传递、磷酸化和中间代谢等方面的研究有了不少进展。但是光合细菌的分子生物学和遗传学研究却发展得比较晚。近年来 Marrs 等人首先发现光合细菌中荚膜红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas capsulata*) 具有遗传重组过程^[1]。这种菌的一些菌株可向培养基释放携带细菌基因组遗传信息的颗粒,即“基因转移子”(Gene transfer agent 简称 GTA)。受体菌可以吸收 GTA,并将经过 GTA 获得的遗传标记稳定地整合到基因组中,代替原有的相应的标记加以表达,从而获得新的遗传特征。这种以 GTA 为媒介的遗传交换,既不像普通的转导和转化,也不像菌体间的接合作用,因此这种现象本身具有一定的魅力。由于这种基因转移过程的发现,大大地开阔了人们的眼界,解决了一些用经典方式很难解决的问题,为光合细菌的研究提供了一种新的有力的手段。

一、荚膜红假单胞菌的遗传重组

荚膜红假单胞菌的遗传交换过程是 Marrs 于 1974 年发现的。他的经典试验是:对光合细菌在蛋白胨-酵母膏培养基中进行光照厌氧培养,当生长达到稳定期的前期时,用细菌滤膜过滤培养物。取无细胞滤液与受体菌混合,在好氧条件下混合培养,然后将混合物适当稀释,与软琼脂混匀倒平皿,在 30℃ 保温 6 至 12 小时进行表型表达。而后在筛选培养基中检测受体菌的表型。例如, Marrs 用抗利福平菌株 H₂ 作供体菌,用抗链霉素菌株 B₁₀ 作受体菌,按上述方法测定,结果见表 1。实验证明,这种光合细菌遗传信息的传递不需要细菌与细菌的接触,而是以无细胞滤液中可过滤因子为媒介的。Marrs 还证明,这种可过滤因子对脱氧核糖核酸酶有抗性,而且沉降系数只有 70S。它不仅

表 1 荚膜红假单胞菌基因转移活性*

分析的混合物		新表型效价 rif ^r str ^r 菌落形成 单位/0.01ml
H ₂ (rif ^r)	B ₁₀ (str ^r)	
全培养物	无	4
无	全培养物	18
全培养物	全培养物	847
无细胞滤液	无	0
无细胞滤液	全培养物	847

* 遗传标记 rif^r, str^r 分别为抗利福平和抗链霉素

能转移对利福平和链霉素的抗性,还能转移辅酶 I 脱氢酶缺陷基因的等位基因。尽管当时 Marrs 对它的本质还不够清楚,但他认为这种转移机制似乎与以往发现的不相同,它是经过一种新的遗传媒介物,并将其取名为基因转移子 (GTA)。接着 Wall (1975) 证明了 GTA 过程在荚膜红假单胞菌中具有普遍性^[2]。在 33 株受试的荚膜红假单胞菌中,至少有一半以上的菌株既能做 GTA 供体又能做 GTA 受体,具有双向的转移活性,有 2 个菌株只能产生 GTA,有 8 个菌株只能接收 GTA,只有 6 个菌株既不能产生也不能接收 GTA。产生 GTA 的菌株可以从世界各地分离,因此估计自然界荚膜红假单胞菌大多具有产生 GTA 的能力。为了确定是否存在以 GTA 居间的种间遗传交换,Wall 也筛选了红螺菌科其它种的大量菌株,结果仅发现在荚膜红假单胞菌间出现交换,它们与球形红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas spheroides*) 或其它种都不出现基因转移,因此 GTA 具有种的专一性。Wall 还将 GTA 与荚膜红假单胞菌的噬菌体及细菌素作了比较,证明了 GTA 与它们无关。

二、GTA 的形态及其理化特性

用电子显微镜观察表明 GTA 颗粒的形态与极小的细菌病毒相类似^[3]。头部是 12 面体,直径 300 Å,具短尾,尾部直径 50—60 Å,长度 300—500 Å。它的体积比已知最小的噬菌体 ϕ 29 还小, ϕ 29 头部体积约比 GTA 大两倍。在一定孔径的玻璃珠上作排阻层析表明,GTA 颗粒大小约在 500—1500 Å,与电镜观察结果相近。用氯化铯密度梯度沉降法分析时,GTA 分布在 1.37g/cm³ 处。用蔗糖密度梯度和用氟标记鸟嘌呤吟

的 DNA 酶解研究测定^[4],从 GTA 分离的 DNA 呈双链线性分子,分子量为 3.6×10^6 。GTA DNA 的沉降系数 $S_{20,w}$ 在 14S 与 15S 之间。鸟嘌呤和胞嘧啶克分子含量占碱基的 65.3%,与荚膜红假单胞菌 DNA 的碱基比相同。 S_1 -核酸酶不能分解用苯酚抽提的 GTA 中的 DNA 或荚膜红假单胞菌的 DNA,但是,当这两种 DNA 经热变性并迅速冷却后,核酸呈单链形式,则可被 S_1 -核酸酶降解 93—97%。在氯化铯中,GTA DNA 的浮力密度为 1.718 g/cm^3 ^[5]。GTA 制剂中,除了 DNA 以外还有蛋白质。在纯 GTA 中,DNA 与蛋白质含量之比约为 1:2.5,经过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,纯 GTA 的蛋白质有如下分子量的多肽(Mr): 27,402,19,14,22.6,39.4,15 和 13.6 (按染色强度降低的顺序排列)^[4]。

三、GTA 转移的生理过程及遗传特征

目前关于 GTA 的产生过程尚不十分清楚,可能是供体菌的双链 DNA 片段被类似于噬菌体的外壳包裹,形成 GTA 颗粒并释放至周围培养基中。生长条件对 GTA 的产生影响很大,能够支持 GTA 产生的培养基很少,即使用蛋白胨-酵母膏培养基,由于酵母膏抽提液的质量不同,GTA 的产量也有很大变化。光照生长的培养物产生的 GTA 比暗处好氧培养物产生的高达 100 倍左右。有时菌体生长快 GTA 效价也高。

供体菌产生 GTA 的时间也随培养基的成份而变化,但是,一般地说在接近对数生长期的末期突然出现一个或几个 GTA 释放峰,此时培养物的混浊度并不降低,是否由于供体菌分解才产生 GTA,有待进一步研究^[6]。

当 GTA 在缓冲液中与受体菌混合时,游离的 GTA 很快消失。在照光时生长的菌体是比较有效的受体菌,而好氧生长的则很少有效。基因的转移意外地受许多化合物抑制,例如 10% (V/V) 甘油;磷酸钠 (10 mM, pH7.8); NH_4Cl (100 mM); NaCl (50 mM) 以及产生 GTA 的蛋白胨-酵母膏培养基,它们的抑制作用都大于 75%。 NaCl 和蛋白胨-酵母膏抽提物的抑制作用出现在 GTA 吸附完成之后。基因转移对氰化钾和缺氧很敏感,说明此过程需要能量代谢。

任何一个 GTA 颗粒仅仅携带 5 至 6 个基因,约占供体菌基因组的 0.1%。一个受体菌可摄取几个 GTA 颗粒,它们的 DNA 可以代替受体菌相应的 DNA 残基,但不一定都取代成功。在生物分析中,将获得某种新遗传标记的受体菌称做转移子。在一般情况下,转移子的多少直接与加入的 GTA 数目成正比,而对受体菌的数目不敏感^[7]。对某种遗传标记来说,GTA 的效价可达 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。当 GTA 过量时,每个受体菌通过 GTA 获得某种遗传标记的最大频率可达 4×10^{-4} 。看来 GTA 携带的 DNA 在受体菌内不能自主复制和生存,

因此现在还不能得到部分区段是双倍体的菌株,顺反子的遗传互补试验至今不能用。

尽管 GTA 的形态与具尾的噬菌体有些类似,但以 GTA 为媒介的基因交换系统与一般的转导系统明显不同。① GTA 基因转移过程中没有细菌病毒形成噬菌斑的活性。Wall 从荚膜红假单胞菌中分离到 16 种烈性噬菌体,它们没有转导活性,与 GTA 明显无关。 B_{10} 菌株产生 GTA,同时它有潜伏的噬菌体,能在两个指示菌株上形成噬菌斑,但经过分离, B_{10} 不再产生可检测的噬菌斑形成单位,而 GTA 方面却没有变化;反过来经过诱变,从 B_{10} 形成一些不能产生 GTA 的菌株,但是仍旧产生噬菌体。用纯化的 GTA 处理受体菌,没有观察到裂解或杀死受体菌的现象。② 对于不能自发产生 GTA 的菌株,人们还不能用 GTA 进行感染,以便通过遗传转移使其形成产生 GTA 的能力。即使它从 GTA 接收其它的遗传信息,也不能获得产生 GTA 的能力。③ 免疫学研究表明,从 Y_{102} 菌株的 GTA 制备的抗体,能与世界各地的荚膜红假单胞菌 GTA 相互作用,显示很高的交叉免疫反应,但是这种抗体不能与荚膜红假单胞菌携带的噬菌体相互作用。④ 培养物释放 GTA 的动力学与溶源菌株释放噬菌体的动力学不相同^[8]。⑤ 最近 Marrs 等用限制性内切酶消化 GTA DNA,然后进行琼脂糖凝胶电泳分析,此外他还用 CoT 法进行 GTA DNA 复活动力学的分析,这两种方法的分析结果表明^[9],GTA DNA 中没有可检测的噬菌体 DNA,95% 以上的 DNA 来自细菌基因组,也就是说,GTA 不携带专一于噬菌体的 DNA。仅含有供体菌的 DNA。⑥ GTA 的沉降系数比已知所有的转导噬菌体都小^[10]。从以上几个特征可以看出,参予基因交换的 GTA 与转导系统的噬菌体明显不同,它似乎是一种细胞器,在进化上可把它看作细菌病毒的前身,Marrs 认为 GTA 可能代表细菌系统的前噬菌体 (Prephage)。

四、GTA 系统的一些用途

对于组建具有新的遗传特征的菌株,GTA 系统是一个极好的工具。这种技术在育种上有几个优点:① 在同一亲本菌株衍生的各种无性繁殖系之间,不会因为免疫作用给基因转移带来麻烦。因而,作为受体的菌株可以反复使用,新菌株可以逐步的构成,不会产生免疫性。② 许多菌株既能作供体也能作受体,它们是自体能育的,也就是说他们能从自己的 GTA 接受和利用遗传信息。③ GTA 能转移许多遗传标记。当受体菌被供体菌 GTA 饱和时,任何一个简单标记的重组体可达 0.1%,这样的重组频率是相当高的,如能采用适当的筛选技术,用不着进行其它选择,便可获得新构成的菌株,而且经过 GTA 转移的遗传标记是稳定的。

GTA 携带供体菌基因组的 DNA 片段比较短,大约隔开 4 个基因的遗传标记,联合转移频率只有 10% 左

右, 隔开 6 个基因以上的标记, 联合转移的频率趋近于零。所以 GTA 系统还适合解决那些包含多点突变的突变株表型问题。使用 GTA 作这类分析时, 方法比较简单。一般用野生型 GTA 与突变株杂交, 然后检查杂交后代, 仔细检查重组体的表型, 看能否鉴别出中间类型的突变株。

对荚膜红假单胞菌呼吸缺陷型的研究表明, *M*₁ 菌株呼吸突变种在呼吸电子传递系统含有两种缺损。*M*₁ 菌株是细胞色素氧化酶缺陷型, Marrs 和 Gest 曾推论, 它含有两个缺损^[9]。使用 GTA 系统作分析, 完全证实了这种论断。用野生型 *H*₁ 菌株的 GTA 与受体菌 *M*₁ 进行杂交试验, 让重组体在好氧条件生长起来, 然后用 Nadi 反应分析重组体是否含有细胞色素 C 氧化酶。结果表明, *M*₁ 的确含有两个独立的缺损, 存在分支的好氧电子传递系统。如果 *M*₁ 呼吸系统损伤仅是一个遗传缺损引起的, 那么在重组体中应当仅产生一类能在好氧条件下生长的细胞, 事实上, 重新获得好氧能力的重组体有两类, 一类重新获得细胞色素 C 氧化酶活性, 即 Nadi 反应阳性, 而另一类恢复好氧生长的重组体是 Nadi 反应阴性。经过化学鉴定这种末端氧化酶是抗氧化物的 b 型细胞色素氧化酶。引起呼吸缺陷必需同时有两种氧化酶的缺失, 因此荚膜红假单胞菌存在分支的呼吸电子传递系统。

Wall 等^[10]用 GTA 研究了固氮基因突变株的类型。用亚硝酸盐处理 *B*₁₀ 菌株, 分离获得 *W*₁₂, *W*₁₃, *W*₁₄ 等几株不固氮的突变株, 但与 *B*₁₀ 相同都能利用硫酸胺、尿素、谷氨酸等作为生长氮源。如果将这些不固氮的 *nif*⁻ 突变株与亲本 *B*₁₀ 的 GTA 混合, 则 *nif*⁻ 突变株可以变成有固氮力的 *nif*⁺ 突变株。将这三个菌株的过滤液分别与这三个菌株重组, 证明了这三个菌株的突变位置各不相同。经 GTA 将固氮基因转移至荚膜红假单胞菌 *nif*⁻ 突变株后, 受体菌同时获得了固氮和放氢的能力^[10], 这个发现支持了这种假说: 紫色非硫细菌的固氮酶和放氢的氢酶的活性是被同一个酶的复合物催化的。而且, 这种放氢的氢酶与催化利用氢气(作光合自养生长的电子供体)的氢酶是明显不同的。

因为联合转移仅限于连接很紧密的遗传标记, 所以 GTA 系统非常适合绘制操纵子或比较小区段的遗

传图谱。Yen 和 Mans 用荚膜红假单胞菌的 GTA 成功地显示一个染色体的小区段, 它携带 5 个类胡萝卜素合成基因和两个细菌叶绿素合成基因(见图 1)^[11]。*CrtB* 和 *CrtE* 是类胡萝卜素生物合成前期所必需的基因, 因此随便哪一个基因突变都能产生蓝绿表型, *CrtC* 和 *CrtD* 的突变产生绿色表型, *CrtA* 位点突变产生黄色表型。*BchA* 和 *BchB* 位点参与细菌叶绿素的合成。在七个突变群中, 有五个影响类胡萝卜素生物合成, 两个影响细菌叶绿素生物合成。每个突变群代表一个基因。估计图谱片段的长度小于细菌基因组的 1%。

合成光合色素的基因图谱表明, 叶绿素合成基因与类胡萝卜素合成基因在染色体上是紧密相联的, 这些化合物在合成途径的某些步骤上可能受到转录水平的同步调节。这个观察结果是令人兴奋的, 如果的确是如此, 那么染色体的光合色素片段应当代表一种特殊的细菌操纵子——超级操纵子(Superoperon)它包含的基因组可以编码两类生化上不同组功能上有关的化合物的合成, 而且这种合成可能是协调的。

五、对光合细菌遗传交换系统的展望

用基因转移的生物学分析法测定 GTA 效价表明, 当培养物进入半稳期时, 每毫升含 10⁵ 基因转移单位, 这种活性对遗传分析是可行的, 但在这种浓度下用物理化学方法实际上很难检测出 GTA 颗粒。用这样稀的培养物来纯化 GTA 也是很费劲的。为了获得 GTA 的高产菌株, Yen 等(1979)筛选了一个突变株 *Y*₂₄₂, 它产生的 GTA 比野生型约高三个数量级。筛选原理是: 在下层琼脂中培养能进行光合生长的菌株作 GTA 的供体菌, 在上层琼脂中接种原来不能在光照条件下生长的突变株, 由于经过 GTA 的基因转移作用, 在 GTA 高产供体菌的上层会出现大量的能光合生长的微菌落。经免疫学、遗传学和沉降分析证明, *Y*₂₄₂ 菌株产生的 GTA 与野生型 GTA 相同。Yen 还表明, GTA 能含有供体菌全部已知复制单位的基因组, 包括同源的和异源的。这些发现无疑将对这种遗传转移的研究带来积极的影响。

至今在红假单胞菌中还没发现除荚膜红假单胞菌以外的其它种存在这种基因转移系统。因此这种特殊

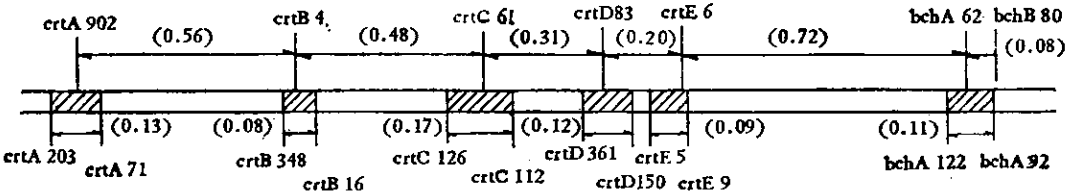


图 1 荚膜红假单胞菌合成类胡萝卜素和细菌叶绿素基因组片段的遗传图谱

图谱的上方的数字代表各基因某标记间的距离(图谱单位)。图谱下方的数字代表各基因两端标记间的距离, 可估计基因的最小长度。

系统的发现有力地推动了光合细菌分子生物学和遗传学的发展,同时也激励人们加强对其它遗传手段的研究。现已从沼泽红假单胞菌, 浑球红假单胞菌和荚膜红假单胞菌分离到烈性噬菌体, 并已从浑球红假单胞菌分离到温和性噬菌体。但这类噬菌体转导传递遗传标记的频率很低, 还不能使其成为有用的试验系统。例如浑球红假单胞菌温和性噬菌体 RS-2, 在形态上与大肠杆菌 T₁ 相似, 但转导活性很低, 对单个遗传标记最高的转导频率是每 10⁸ 受体菌只产生 6 个转导子。至今还没有发现可用于光合细菌遗传分析的天然出现的转导系统, 接合系统或转化系统。最近 Kaplan 等成功的将大肠杆菌噬菌体 P₁ 引入浑球红假单胞菌, 同时已成功地将各种假单胞菌的质粒转入浑球红假单胞菌^[12]。Pemberton 也将 Rp₄::Mct5 62 质粒引入浑球红假单胞菌^[13], Wall 完成了将假单胞菌质粒引入荚膜红假单胞菌的工作。初步结果表明, 浑球红假单胞菌和荚膜红假单胞菌的染色体基因可被这些质粒带动^[14]。质粒和噬菌体引入光合细菌, 扩大了经 GTA 为中介的遗传重组研究, 它有可能提供转移较大的 DNA 片段的方法。目前这方面还有一些问题, 一旦新的基因转移系统建立起来, 必将大大加速光合细菌研究的步伐。

参 考 文 献

[1] Marrs, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:

- 971—973, 1974.
 [2] Wall, J. D. et al.: Arch. Microbiol., 105: 217—224, 1975.
 [3] Marrs, B.: The Photosynthetic Bacteria, (ed. by Clayton, R. K. et al.) Plenum Press, New York, 1978, pp. 875—883.
 [4] Yen, H. C. et al.: J. Mol. Biol., 131: 157—168, 1979.
 [5] Solioz, M. and B. Marrs: Arch. Biochem. Biophys., 181: 300—307, 1977.
 [6] Solioz, M., et al.: J. Bacteriol., 123: 651—657, 1975.
 [7] Marrs, B. L. et al.: Abs. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 1975, p. 109.
 [8] Solioz, M. and B. Marrs: Abs. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 1975, p. 110.
 [9] Marrs, B. and H. J. Gest: Bacteriol., 114: 1045—1051, 1973.
 [10] Wall, J. D. et al.: Nature, 258: 603—631, 1975.
 [11] Yen, H. C. and B. J. Marrs: Bacteriol., 126: 619—629, 1976.
 [12] Marrs, B. et al.: Trends in Biochemical Science, 2: 105—108, 1977.
 [13] Tucher, W. F. and J. M. Pemberton: FEMS Microbiology Letters, 5: 215—217, 1979.
 [14] Marrs, B. L.: Abs. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 1980, p. 171.