

## 降解质粒研究进展和应用前景

蔡宝立 高才昌

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

质粒是染色体以外具有一定遗传功能的小环状 DNA 分子。50 年代, 发现了决定细菌致育性的 F 因子和产生大肠杆菌素的 Col 因子。60 年代, 在日本发现了决定细菌抗药性的 R 因子。70 年代初, Chakrabarty<sup>[1]</sup> 率先证明恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) R1 菌株中降解水杨酸的酶系由质粒基因编码, 开创了降解质粒研究的新领域。最近十年来, 由于分子生物学实验方法的迅速发展, 特别是 DNA 序列分析和重组 DNA 技术的日臻完善, 极大地促进了降解质粒的研究。一方面, 不断发现并鉴定了一些新的降解质粒; 另一方面, 对某些有代表性的降解质粒进行了深入研究, 尤其在质粒的分离方法、基因的组织 and 基因调控方面不断取得新的进展。降解质粒的研究为构建用于发酵生产和环境污染物降解的高效菌株奠定了理论和技术基础。

## 一、降解质粒的种类和性质

到目前为止, 已经发现的降解质粒有几十种, 择其主要的列于表 1。这些质粒的分子量大多在 30—120kb 之间, 含有几十个乃至上百个基因, 分别决定自主复制、接合转移、不相容性和物质降解等功能。所谓接合转移, 就是不同菌株之间通过细胞接触使质粒从一个细胞传递到另外一个细胞中去。在自然界, 这种转移作用不仅可以使降解基因在细菌群体中广泛扩散, 促进有机废物的循环, 而且有可能使降解基因通过体内重组和突变得以进化, 从而获得新的降解能力。从世界的不同地方以及同一区域不同种的菌株中可以分离到结构相似和功能相同的降解质粒, 说明质粒的扩散和进化是一个普遍现象。

表 1 中的降解质粒主要来自假单胞菌, 质粒所决定的降解物大半是有毒的环境污染物,

表 1 降解质粒的种类

序号	降解物	质粒	分子量	细菌	参考文献
1	水杨酸	SAL	51Md	<i>P. putida</i> R1	[1]
2	樟脑	CAM	156Md	<i>P. putida</i> PpG1	[2]
3	辛烷	OCT	28Md	<i>P. oleovorans</i> PpG6	[3]
4	萘	NAH7	52Md	<i>P. putida</i> PpG7	[4]
5	甲苯	TOL	78Md	<i>P. putida</i> mt-2	[5]
6	非、联苯	pKG2	20.8Md	<i>Beijerinckia</i> sp.	[6]
7	3-氯苯甲酸	pAC25	68Md	<i>P. putida</i>	[7]
8	2,4-D	pJP4	80kb	<i>A. eutrophus</i> JMP 134	[8]
9	对-氯联苯	pAC21	65Md	<i>K. pneumoniae</i> AC901	[9]
10	氟乙酸	pUO1		<i>Moraxella</i> sp.	[10]
11	3,5-二甲苯酚	pRA500	500kb	<i>P. putida</i> NCIB9869	[11]
12	烟碱	NIC		<i>P. convexa</i> PC1	[12]
13	芳基苯磺酸	ASL	61Md	<i>P. testosteroni</i>	[13]
14	硫蒽	DBT	55Md	<i>Pseudomonas</i> sp.	[14]
15	苯胺	pCIT1	100kb	<i>Pseudomonas</i> sp.	[15]
16	苯乙烯	pEG	37kb	<i>P. fluorescens</i> ST	[16]
17	对硫磷	pCS1	60kb	<i>P. diminuta</i>	[17]
18	尼龙寡聚体	pOAD2	28.8Md	<i>Flavobacterium</i> sp. K172	[18]
19	六六六	pWE1		<i>Aeromonas</i> sp. II5-A	[19]

例如芳香烃、卤代烃、农药和合成洗涤剂等。所以假单胞菌不仅在分解有机废物并使之重新循环方面起着重要作用,而且在构建具有特殊降解功能的新菌株方面也具有很大的潜力。假单胞菌基因工程受体和载体系统的研究已越来越引起人们的重视。

## 二、质粒分离方法的研究

在降解质粒研究的初期,一般是通过遗传学方法(例如质粒消除和质粒转移)证明质粒的存在,用普通的分离质粒 DNA 的方法分离假单胞菌降解质粒的尝试未能取得成功。1976 年 Palchaudhuri 和 Chakrabarty<sup>[20]</sup> 设计了一种分离 CAM、SAL 和 OCT 质粒的方法,制备出了纯化的共价闭合环状 DNA。但是,这个方法非常繁琐,它包括细胞裂解、裂解物剪切、碱变性、中和、硝酸纤维素吸附变性 DNA、三次 CsCl 密度梯度离心等十余步操作。后来 Hansen<sup>[21]</sup> 采用 PEG6000 沉淀和 CsCl 密度梯度离心法分离并纯化细菌大质粒,收到了较为理想的效果。此外, Kado<sup>[22]</sup> 报导了一种对大质粒和小质粒都适用的快速检测和分离方法。我们在分离质粒的实验过程中,对上述方法进行了比较,认为 Hansen 法的操作步骤仍较繁琐,而且在总 DNA 中染色体 DNA 的含量过高。Kado 法用于质粒检测效果较好,而用于制备欠佳,这是由于该法在碱性条件下 55—60℃ 加热裂解细胞,分子量大的降解质粒容易变性。

我们在工作实践中发展了一种简便快速,既可用于检测又可用于制备的假单胞菌大质粒分离方法<sup>[23]</sup>, 只需几个小时即可完成 DNA 样品的制备,而且不需进一步纯化就可进行限制性核酸内切酶分析。该方法的程序是:使细菌生长到  $OD_{600} = 2$ , 取 1 体积菌液室温离心,细胞悬浮于 1/4 体积 TE (50mM Tris, 20mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH8.0) 中;加 1/2 体积裂解液 (3% 十二烷基硫酸钠, 0.2N NaOH), 室温裂解 5—10 分钟;加 1/4 体积 TS (1M Tris, 4M NaCl, pH7.0), 冰浴 1 小时;室温离心,倒出上清液,加 1 体积乙醇,冰浴 30 分钟;室温离心,沉淀用 1/40 体积 TES (50mM Tris, 5mM Na<sub>2</sub> EDTA,

50mM NaCl, pH8.0) 溶解,通过琼脂糖凝胶电泳检查质粒 DNA 的存在。若用于内切酶分析, DNA 样品再用氯仿抽提一次蛋白,经乙醇沉淀后,重新溶解于 TES 中。我们用这种方法分离了多种假单胞菌大质粒,都得到了满意的结果,所得样品中绝大多数是质粒 DNA。染色体 DNA 含量极少,在琼脂糖凝胶电泳中只显示出一条很浅的带,甚至不显带。此外,这种方法对大肠杆菌、产碱杆菌和土壤杆菌质粒的分离效果也很好。我们对该法稍加修改,成功地分离了灭蚊球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) Ts-1 的 114Md 大质粒 pNT-1, 并拍下了清晰的质粒分子电镜照片。而用文献中常被引用的几种分离方法,均未从 Ts-1 菌株中分离出这种大质粒。降解质粒分离方法的改进和发展,无疑将会促进这类质粒的分子和遗传结构的研究。

## 三、质粒的分子和遗传结构

由于质粒是共价闭合环状 DNA 分子,所以很容易对其进行各种遗传操作,包括质粒转化、接合转移和 DNA 重组等。此外,与降解功能有关的基因在质粒中大多成簇存在,并与调节基因一起组成操纵子单位。由于这些特点,降解质粒已成为研究细菌基因表达和调控的良好模型。

通过转座子插入突变以及基因的克隆和表达分析,几种降解质粒的物理和遗传图已经建立,并对一些调控基因的作用机制和核苷酸顺序进行了研究。TOL 质粒 (pWWO) 中与甲苯降解有关的基因组成两个操纵子,一个是 xyl ABC 操纵子,负责把甲苯氧化成苯甲酸;另一个是 xyl DLEGFJIH 操纵子,负责把苯甲酸氧化成丙酮酸和乙醛。前者受调节基因 xylR 的控制,后者受调节基因 xylR 和 xylS 的双重控制。上述两个操纵子的调节基因和结构基因在质粒图谱中的位置都已确定 (图 1)<sup>[24]</sup>。Nakai 测出了 xylE 基因的全核苷酸序列。Inouye 确定了 xyl ABC 操纵子的转录起始位点,并测定了这一位点附近的 340 个核苷酸的 DNA 序列。在这个序列中没有发现与大肠杆菌的启动

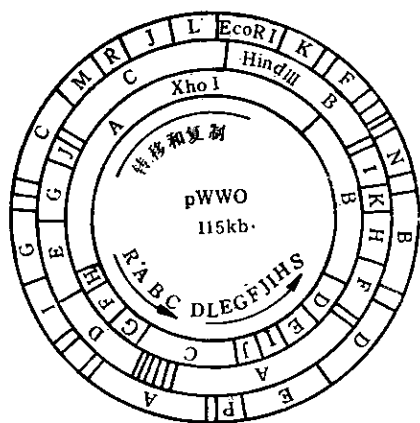


图1 甲苯质粒 pWWO 的物理和遗传图

子区类同的 DNA 序列,但是在 *xylA* 基因起始密码子的前面找到了与大肠杆菌类似的核糖体结合位点顺序。用这些结果可以解释为什么 TOL 基因在大肠杆菌中表达效率不如在假单胞菌中高。此外, Spooner 等分析了调节基因 *xylR* 和 *xylS* 的核苷酸顺序<sup>[27]</sup>。

萘质粒 NAH7 中与萘降解有关的 11 个结构基因组成两个操纵子。nah 操纵子由 6 个结构基因组成,负责把萘降解成水杨酸; sal 操纵子由 5 个结构基因组成;负责水杨酸的间位裂解。两个操纵子的转录受位于其间的调节基因 *nahR* 的正控制。*nahR* 基因存在于一个 1.6kb 的 DNA 片段中,在水杨酸存在的条件下,该基因连续地产生一种其亚单位为 36kDa 的蛋白质,作为 *nah* 和 *sal* 操纵子的转录激活剂<sup>[24]</sup>。最近, You 和 Gunsalus 根据基因克隆和 DNA 序列分析实验提出, *nah* 和 *sal* 操纵子的调控机构包括四种成分: 一个正调节因子, 一个蛋白质激活剂, 一个阻遏物和两个阻遏物结合位点。

从铜绿色假单胞菌 (*P. aeruginosa*) AS1.860 菌株中分离出一种分子大小为 58kb 的萘降解质粒 ND1.860, 该质粒的宿主来源、分子大小和限制酶消化图谱与国外报导的萘质粒明显不同<sup>[27]</sup>。最近, 我们使 ND1.860 质粒的 *Hind*III 完全消化产物和部分消化产物与大肠杆菌质粒 pBR322 连接, 并转化大肠杆菌 HB101, 通过对重组质粒中 *Hind*III 片段的重叠关系的分析,

以及对重组质粒所进行的限制酶分析, 建立了 ND1.860 质粒的 *Hind*III、*Eco*RI 和 *Xba*I 三种内切酶 26 个切点的限制图谱。此外, 我们还用 NAH7 质粒的 *Eco*KIA 片段 (24kb, 含萘降解基因 A → I) 作探针, 与 ND1.860 质粒的 *Hind*III 片段杂交, 发现 ND1.860 的 H3、H5 和 H6 片段与 NAH7 的 *Eco*KIA 片段有同源性 (未发表资料)。这些为 ND1.860 质粒的分子和遗传结构研究以及新菌株的构建打下了基础。

此外, 对 CAM、pJP4 和 pOAD2<sup>[28]</sup> 等多种降解质粒的酶切图谱, 降解基因的克隆、表达和定位等方面都进行了不同水平的研究。

降解质粒还是研究基因进化的好材料。Pemberton 等在研究 2,4-D 降解质粒时曾提出 2,4-D 降解基因的进化假设。他认为, 能降解苯氧乙酸的质粒上的一个基因 (PAA) 首先发生重复, 然后其中的一个 PAA 基因发生突变, 转变成能降解 2,4-D 的基因。这个假设在尼龙寡聚体质粒 pOAD2 中得到证明。pOAD2 含有 EI 和 EII 两种水解酶的基因 (*nylA* 和 *nylB*), EI 酶把 6-氨基己酸环二聚体降解成 6-氨基己酸线状寡聚体, EII 酶再使之进一步降解成 6-氨基己酸。Negoro 等<sup>[28]</sup>通过 DNA 杂

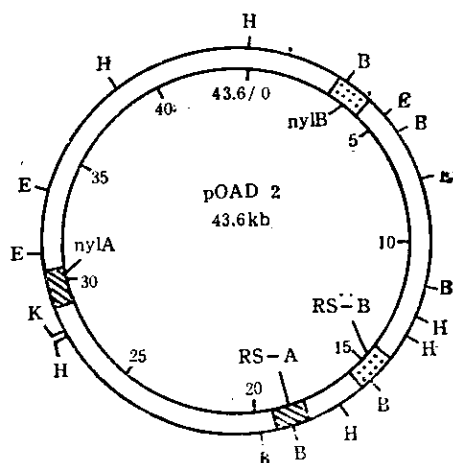


图2 尼龙寡聚体质粒 pOAD2 的物理和遗传图  
B: *Bgl* II; E: *Eco*RI; H: *Hind* III; *nylA*: EI 酶基因; *nylB*: EII 酶基因; RS-A: *nylA* 的同源序列; RS-B: *nylB* 的同源序列

交和序列分析证明,在 pOAD2 中除了存在 nylA 和 nylB 的 DNA 序列外,还存在与它们同源的两段 DNA 序列(图2)。图中 RS-A 与 nylA 同源,RS-B 与 nylB 同源。这个结果表明,EI 和 EII 酶是通过基因重复和突变进化而来。

#### 四、降解质粒的应用前景

降解质粒研究对环保、化工和农作物品种改良等方面都具有实际应用价值。质粒基因编码的酶能降解许多有毒的环境污染物,例如用于防腐涂料和电力工业的多氯联苯(PCB),用作除草剂的2,4-D和2,4,5-T,用作杀虫剂的烟碱(尼古丁)、六六六、DDT和对硫磷等。此外,某些工业和生活废水中的污染物的降解也与质粒基因有关,例如一些芳香烃、卤代烃、合成洗涤剂 and 尼龙寡聚体的降解都受质粒控制。通过对质粒遗传结构和环境污染物降解途径的研究,可以使我们了解什么样的化合物容易被微生物降解,用以指导农药和其它化工产品的合成,使之有利于微生物的降解,减少对环境的污染。此外,通过质粒转移和 DNA 重组技术构建用于废水处理的工程菌株,也是人们加紧研究的课题。含有 pWR1 质粒的假单胞菌 B13 菌株只能利用3-氯苯甲酸,把 TOL 质粒引入 B13 菌株后,使 B13 增加了利用4-氯苯甲酸和3,5-二氯苯甲酸的能力,这是由于 TOL 质粒的甲苯氧化酶使4-氯苯甲酸和3,5-二氯苯甲酸转化成相应的氯代儿茶酚,然后再被 B13 中的 pWR1 质粒编码的酶降解。Lehrbach 把来自 NAH7 质粒的编码水杨酸水解酶的 nahG 基因引入到 B13 菌株中,使 B13 增加了利用水杨酸和氯代水杨酸的能力<sup>[29]</sup>。类异戊二烯质粒 pRQ50 用于废水处理已有专利报导。目前,人们正研究把多种降解途径的基因重组到一个菌株中,构建能高效降解多种环境污染物新菌株。

某些农药不仅能防治农作物病虫害和杂草,对作物亦有一定毒害。可考虑用遗传工程方法把降解农药的基因引入作物,使之对农药具有抗性。1985 年科学家已能使苏云金芽孢

杆菌的毒蛋白基因在烟草植物中表达,使烟草产生了抗虫能力。

通过质粒基因的人工重组,构建用于化工生产的菌株取得了可喜的进展。1983 年,Schell 和 Grund 分别使 NAH7 质粒中的萘降解基因在大肠杆菌和假单胞菌中表达。1984 年,专利文献报导了使萘降解基因形成部分缺失的 DNA 片段在大肠杆菌 HB101 中表达,产生出有重要医用价值的产物。此外,Ensley<sup>[30]</sup> 构建了一株能利用普通碳源合成靛蓝染料的大肠杆菌。该菌株的重组质粒中含有人工拼接的靛蓝操纵子。操纵子由两部分组成,一部分来自 NAH7 质粒萘双加氧酶的结构基因,另一部分是大肠杆菌的色氨酸酶基因和乳糖启动子。大肠杆菌本身能合成色氨酸,操纵子中的色氨酸酶基因把色氨酸转变成吲哚,然后萘双加氧酶基因使吲哚转变成靛蓝。靛蓝是一种用途广泛的染料,现在用化学合成法生产。用微生物发酵法生产靛蓝,可能为靛蓝的工业化生产以及降低成本、减少污染开辟新的途径。

#### 参 考 文 献

- [1] Chakrabarty, A. M.: *J. Bacteriol.*, 112: 815—823, 1972.
- [2] Rheinwald, J. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 885—889, 1973.
- [3] Chakrabarty, A. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1137—1140, 1973.
- [4] Dunn, N. W. and I. C. Gunsalus: *J. Bacteriol.*, 114: 974—979, 1973.
- [5] Worsey, M. J. and P. A. Williams: *J. Bacteriol.*, 124: 7—13, 1975.
- [6] Kiyohara, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111: 939—945, 1983.
- [7] Chatterjee, D. K. et al.: *J. Bacteriol.*, 146: 639—646, 1981.
- [8] Don, R. H. and J. M. Pemberton: *J. Bacteriol.*, 145: 681—686, 1981.
- [9] Kamp, P. F. and A. M. Chakrabarty: In K. N. Timmis and A. Puhler (ed.), *Plasmids of Medical, Commercial and Environmental Importance*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979, P. 275—285.
- [10] Kawasaki, H. et al.: *Agric. Biol. Chem. Jpn.*, 45: 29—34, 1981.
- [11] Jain, R. K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 3019—3028, 1984.
- [12] Thacker, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 135: 289—290, 1978.

- [13] Sagoo, G. S. and R. B. Cain: *Soc. Gen. Microbiol. Quart.*, 6: 17, 1978.
- [14] Monticello, D. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 756—760, 1985.
- [15] Anson, J. G. and G. Mackinnon: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 868—869, 1984.
- [16] Bestetti, G. et al.: *Plasmid*, 12: 181—188, 1984.
- [17] Wild, J. R. and G. A. O'Donovan: *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 85 Meet., 134, 1985.
- [18] Negoro, S. et al.: *J. Bacteriol.*, 143: 238—245, 1980.
- [19] 王春生等: *环境科学学报* 4(4): 325—331, 1984。
- [20] Palchaudhuri, S. and A. M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.*, 126: 410—416, 1976.
- [21] Hansen, J. B. and R. H. Olsen: *J. Bacteriol.*, 135: 227—238, 1978.
- [22] Kado, C. I. and S. -T. Liu: *J. Bacteriol.*, 145: 1365—1373, 1981.
- [23] 蔡宝立等: *环境科学学报*, 4(3): 291—295, 1984。
- [24] Harayama, S. et al.: *J. Bacteriol.*, 160: 251—255, 1984.
- [25] Spooner, R. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 132: 1347—1358, 1986.
- [26] Schell, M. A. and P. E. Wender: *J. Bacteriol.*, 166: 9—14, 1986.
- [27] 高才昌等: *遗传学报*, 11(4): 260—264, 1984。
- [28] Negoro, S. et al.: *J. Bacteriol.*, 158: 419—424, 1984.
- [29] Lehrbach, P. R. et al.: *J. Bacteriol.*, 158: 1025—1032, 1984.
- [30] Ensley, B. D.: *Word Biotech Rep.* 2: USA, 441—450, 1984.