

链霉菌的可转座因子

曾洪梅^{1, 2*} 谭华荣² 李季伦¹

(¹ 中国农业大学生物学院 北京 100094) (² 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

TRANSPOSABLE ELEMENTS IN *STREPTOMYCES* SPP.

Zeng Hongmei^{1, 2} Tan Huarong² Li Jilun¹

(¹ College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

关键词 链霉菌, 可转座因子, 插入序列

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)03-0334-37

可转座因子是细菌遗传分析和分子操作十分有用的工具,它包括插入序列、转座子和转座噬菌体。细菌的可转座因子多数来自于革兰氏阴性菌,少数来自于革兰氏阳性菌。链霉菌是一类重要的革兰氏阳性菌,近年来,已发现了几种链霉菌的可转座因子,并对部分可转座因子的转座特征作了详细的研究。

最早发现的链霉菌可转座因子是天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) A3(2) 中 1.6kb 的插入片断 IS110^[1], 后来在白色链霉菌(*S. albus*) 中发现了 IS112^[2], 在带棒链霉菌(*S. clavuligerus*) 中发现了 IS116^[3], 在变铅青链霉菌(*S. lividans*) 66 中发现了 Tn481^[4] 等, 然而, 它们都没有充分发展成为有用的遗传工具。1987 年 Chung 偶然从新霉素产生菌弗氏链霉菌(*S. fradiae*) 中发现了转座子 Tn4556^[5], 1989 年 Solenberg 等从变铅青链霉菌中发现了插入序列 IS493^[6], 并对其进行了改造, 由此而发展了链霉菌的转座系统。目前, 较为系统研究的链霉菌可转座因子有天蓝色链霉菌 A3(2) 中的 IS117^[7]、Tn4556 及其衍生物、IS493 及其衍生物, 现将该方面的研究进展综述如下。

1 IS117 及其转座特点

IS117 是天蓝色链霉菌 A3(2) 中发现的 2527bp 长的可转座因子^[7-9], 开始时称之为 2.6kb 的小环 DNA。它整合在天蓝色链霉菌染色体上两个相距较远的位点, 同时也以低拷贝的共价闭环形式存在^[10]。IS117 的 DNA 序列含有三个编码阅读框架: ORF1、ORF2 和 ORF3, 推测 ORF1 编码转座酶, ORF2 和 ORF3 与转座整合频率有关^[11]。IS117 能整合到许多种不含 IS117 的链霉菌中, 当整合到变铅青链霉菌 66 时, 整合到染色体上的一个优先位点, 当优先位点人工缺失后, IS117 整合到许多次级位点^[12, 13], 导致染色体 DNA 缺失。整合到同一染色体两个不同次级位点上的 IS117 之间的同源重组可能是缺失的原因。IS117 整合到优先位点或次级位点均未发现靶点序列倍增。

2 Tn4556 及其衍生物

2.1 Tn4556 的发现及其结构

Chung 于 1987 年在新霉素产生菌弗氏链霉菌中发现了一个 6.8kb 的转座子 Tn4556。该转座子首先是从含有硫链丝菌素抗性基因(1kb)和噬菌体 SF1 的复制起点的两个 30.3kb 质粒 pUC1123 和

* 现在中国农业科学院植物保护研究所工作

作者简介: 曾红梅(1966-), 女, 四川内江人, 中国农业科学院植物保护研究所, 博士, 主要从事农用抗生素的研制工作

收稿日期: 1999-06-09, 修回日期: 1999-07-26

pUC1124 中观察到的。Tn4556 全长 6625bp, 总 G + C 含量 68%, 末端有 38bp 的反向重复序列^[14]。该序列和以 Tn3 为代表的 II 类转座子的倒转重复序列同源性很高, 尤其和 Tn3 的同源性最高, 38bp 中有 26bp 相同, 同源性为 70%。Tn4556 含有 9 个开放阅读框架^[15], 其中 ORF1、2 和 7 三个开放阅读框架在靠近其推测的翻译起始位点附近有核糖体结合位点(RBS), 这些 RBS 与大肠杆菌和枯草杆菌的 RBS 序列有一致性。ORF1 编码 892 氨基酸的蛋白, 推测其氨基酸序列与 Tn3 的 *tnpA* 基因编码的转座酶有 61% 的同源性。另外三个开放阅读框架 ORF2、3、5 编码的产物与 Tn3 的 *tnpR* 基因编码的拆分酶的大小相似, 然而, 从这些开放阅读框架推测的蛋白产物没有一个和其它拆分酶蛋白有广泛的氨基酸序列同源性。

Tn4556 来源于弗氏链霉菌染色体, 并可在质粒与染色体间相互转座, 也可在其它链霉菌中转座, 它插入到链霉菌质粒中导致靶点 5bp 的重复^[14]。每个质粒只含有一个插入的 Tn4556, 即含 Tn4556 的质粒可能对后来的 Tn4556 插入不相容^[15]。

2.2 Tn4556 的改造及其衍生物的构建

Tn4556 不含有已知的对抗生素及重金属的抗性标记。在 Tn4556 转座非必须区中靠近 *KpnI* 的 *BglII* 位点处插入紫霉素抗性基因(*vph*), 组成复合体 Tn4556:: *vph*(Tn4560/Tn4563), 并导入温敏质粒 pMT660 构建携带 Tn4556 紫霉素抗性衍生物的温敏杂交质粒 pUC1169(pMT660:: Tn4556:: *vph*), 当含有杂交质粒的变铅青链霉菌在 39°C 培养时, Tn4556:: *vph*(Tn4560) 转座到宿主染色体上的任意位点。

引入荧光素酶基因时 Tn4556 进行了改造, 构建了 Tn5351 和 Tn5353^[16]。Tn5351 和 Tn5353 能随机转座到链霉菌的染色体上, 且 Tn5353 含有新霉素抗性基因(*neo*) 故比其它 Tn4556 衍生物更加实用。因为新霉素更易获得, 且在大肠杆菌和链霉菌中均能作为抗性选择。另外, 荧光素酶基因的引入使少量的光都可被精确地测量, 测量方法简单可行。

2.3 Tn4556 及其衍生物的应用

Engel 等用转座子 Tn4560 处理尼可霉素产生菌唐德链霉菌, 以 1×10^{-3} 的转座频率获得了 6 株营养缺陷型突变株和 3 株尼可霉素阻断突变株^[17-18], 转座子在这些突变株中均是随机插入到不同的基因上。Ikeda 等^[19]用 Tn4560 诱变阿维菌素和寡霉素的产生菌阿维链霉菌, 并以 10^{-3} 的转座频率获得 8 株营养缺陷型、10 株阿维菌素阻断突变株和 5 株寡霉素阻断突变株, 不同的突变株转座子插入到染色体上的位置不同。野生型的阿维菌素产生菌不仅产生阿维菌素, 也产生有毒的寡霉素。获得的 5 株寡霉素阻断突变株均产生阿维菌素, 利用这种菌株产生的阿维菌素进行精制时可省掉除去寡霉素的操作。另外, 邓子新等用 Tn4560 诱变吸水链霉菌, 得到了 5102-III 抗生素的生物合成阻断突变株^[20], 中国科学院微生物所谭华荣实验室也用 Tn4560 诱变圈卷产色链霉菌(尼可霉素产生菌) 并得到了尼可霉素生物合成阻断突变株(未发表)。利用转座突变得到的变株有利于研究有关代谢途径、鉴定和克隆次级代谢生物合成基因及全局调控基因, 并提高次级代谢产物的产量, 同时也可阻断不需要的次级代谢产物的产生, 以利于更多有用次级代谢产物的有效产生。

转座突变也用来得到链霉菌的发育突变株。Schauer 等^[21]用 Tn4563、Sohaskey 等^[16]用 Tn5353 诱变天蓝色链霉菌, 得到了大量的光秃型和白化型突变株, 这些突变株可用于染色体作图及发现染色体上控制形态发生和抗生素产生的位点。

在转座突变中, 野生型基因受到破坏, 克隆转座子侧翼 DNA 可以提供对该野生型基因特异的探针。但是整合到基因组的转座子一端的缺失也可能导致邻近转座子的基因组的部分缺失, 这样, 邻近转座子缺失端的侧翼 DNA 可能就不是一个可靠的探针^[22]。因此, 当使用转座子插入后转座子两侧 DNA 作为野生型基因文库的探针时, 最好先进行 PCR 分析以确定转座子末端确实存在。

3 IS493 及其衍生物

3.1 IS493 的分离和特性

用插入阻遏物基因使其失活的方法, 1989 年 Sokanich 和 Chung 从变铅青链霉菌 C162 中分离了一

一个新的 1.6kb 的插入序列 IS493。IS493 具有插入序列典型的特征,1641bp 的序列中含有 23bp 的末端反向重复序列,除其一端和 IS110 的一端表现一些相似性外,和其它已知的插入序列的反向重复序列不表现相似性。转座时,IS493 导致靶点宿主 DNA 6bp 的倍增。IS493 每条链上含有两个串联的编码阅读框架,均大于 500bp,其一条链上的 ORF-A 和 ORF-B,分别编码 177 氨基酸和 253 氨基酸的蛋白;另一条相反的链上含有 ORF-C 和 ORF-D,它们和 ORF-A 及 ORF-B 在同一框架内,相互交叠。在变铅青链霉菌中,IS493 有三个拷贝,目前还未在其它链霉菌发现有 IS493。

3.2 IS493 衍生物的构建及 IS493 功能分析

为把 IS493 改造成一个有用的转座因子,将大肠杆菌的 apramycin 抗性基因 Am^R 插入到 ORF-A 和 ORF-B 间唯一的 Sty I 位点,构建了 Tn5096 和 Tn5097^[23]。这两个转座子在相反方向含有 Am^R 基因,且均能转座到灰褐链霉菌(*S. griseofuscus*)中。Tn5096 在温敏质粒 pCZA168 中转座,相对随机地转座到灰褐链霉菌染色体许多不同的位点和两个线性质粒上,导致靶点 3bp 序列的倍增。在 Tn5096 Am^R 基因旁插入 tylosin 编码基因 $tylE$ 和 $tylJ$ 构建成了 Tn5098, Tn5098 同样能在灰褐链霉菌中转座,这暗示 Tn5096 可用作载体将异源的次级代谢物基因插入灰褐链霉菌及其它可能的链霉菌中。另外,将无启动子的编码儿茶酚双加氧酶的基因 $xyIE$ 和 hygromycin 抗性基因插入 IS493 左端,构建成了链霉菌的启动子探针转座子 Tn5099^[24~25]。Tn5099 可以在灰褐链霉菌和弗氏链霉菌中转座,在一些转座突变株中 $xyIE$ 报告基因可以表达。这些结果指出 Tn5099 可用于确定营养调节启动子和其它启动子。Tn5099 也含有链霉菌基因组中很少见到的 *Ase* I、*Dra* I 和 *Ssp* I 酶切位点,因此, Tn5099 在染色体和质粒绘图研究方向也有用。

从 Tn5096 和 Tn5099 可以看出, DNA 至少可以在 IS493 上的两个位点(ORF-A 和 ORF-B 之间或在 IS493 的左端)插入而不使其丧失转座功能。在 ORF-A 内插入或缺失而形成的因子能够转座, ORF-B 基因破坏后转座能力丧失,说明 ORF-B(编码转座酶)是必需的,而 ORF-A 不是转座必需的,但其基因产物可能在转座中起调节作用。

3.3 Tn5096 的宿主特异性及其对弗氏链霉菌 tylosin 产量的影响

McHenney 将 Tn5096 插入含有噬菌体 FP43 *pac* 位点的温敏质粒 pMT660 衍生物中,构建了质粒 pRHB126^[26]。该质粒兼具亲本质粒和亲本噬菌体的特点,具有广泛的寄主特异性。试验表明 pRHB126 通过 FP43 的转导作用能导入 8 种链霉菌中,其中,在产二素链霉菌(*S. ambofaciens*)、肉桂地链霉菌(*S. cinnamomensis*)、天蓝色链霉菌、弗氏链霉菌、灰褐链霉菌和耐温链霉菌(*S. thermotolerans*)中, Tn5096 能从 pRHB126 转座到这 6 种链霉菌基因组的的不同位点。这个转导系统的使用表明, Tn5096 在链霉菌中具有广泛的寄主特异性。这些广泛寄主因子的组合使得转座突变迅速应用到链霉菌的其它种中成为可能。

将 pCZA168 导入一株商业上用于 tylosin 生产的弗氏链霉菌 C373.17 菌株^[27]分离出 32 株独立的 Tn5096 转座突变株,分析表明,每个突变株中 Tn5096 插入都是位点特异的,大约一半的变株 tylosin 产量与对照相同,而一半产量减少。这个试验指出, Tn5096 本身并不引起 tylosin 产量减少。因此 Tn5096 或许是将新基因插入高度发育的产生菌和其它发育程度更低的菌株的有用工具,同时不破坏次级代谢物产生。

4 结语

在大肠杆菌等细菌中发现的转座子中,其内部存在有抗生素抗性基因和耐重金属基因,这些就可以作为重要的选择标记使用,但是,从链霉菌中分离出的转座子中没有发现可以作为标记的基因,因此,这些转座子需要与外来的抗生素抗性基因连接。

链霉菌的抗生素生物合成基因、抗性基因及调控基因大都成簇存在,在对目标基因进行克隆时,很难把形成多顺反子的基因簇全部分离出来,并得到所需的基因。在这种情况下,往往较难用常规方法进

行克隆,但可从由转座子得到的突变株中发生突变的基因部位克隆。当然,转座子在链霉菌中的一系列应用有多个方面,可包括:标记需要克隆的次级代谢物基因、孢子形成基因、调节基因和其它基因;将标记基因用于绘制遗传和物理图谱。将克隆的基因稳定地插入染色体,通过启动子插入激活隐性次级代谢基因;通过启动子插入上调次级代谢物产生中的前体或辅因子的生物合成基因;提供不同种、属间重组的方便的同源区域;提供用于克隆和遗传作图方便的限制位点。可以相信,链霉菌可转座因子的发展将促进次级代谢物产生菌的遗传分析和开发利用。

参 考 文 献

- [1] Chater K F, Bruton C J, Foster S G, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1985, **200** :235~239.
- [2] Rodicio M R, Alvarez M A, Chater K F. *Mol Gen Genet*, 1991, **225** :142~147.
- [3] Leskiw B K, Mevarech M, Barritt L S, *et al.* *J Gen Microbiol*, 1990, **136** :1251~1258.
- [4] Chen C W, Yu T, Chung H, *et al.* *J Bacteriol*, 1992, **174** :7762~7769.
- [5] Chung S-T. *J Bacteriol*, 1987, **169** :4436~4441.
- [6] Solenberg P J, Burgett S G. *J Bacteriol*, 1989, **171** :4807~4813.
- [7] Lydiat D J, Ikeda H, Hopwood D A. *Mol Gen Genet*, 1986, **203** :79~88.
- [8] Lydiat D J, Ashby A M, Henderson D J, *et al.* *J Gen Microbiol*, 1989, **135** :941~955.
- [9] Kieser H M, Kieser T, Hopwood D A. *J Bacteriol*, 1992, **174** :5496~5507.
- [10] Henderson D J, Lydiat D J, Hopwood D A. *Mol Microbiol*, 1989, **3** :1307~1318.
- [11] Smokvina T, Henderson D J, Melton R E, *et al.* *Mol Microbiol*, 1994, **12** (3) :459~468.
- [12] Henderson D J, Brolle D-F, Kieser T, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1990, **224** :65~71.
- [13] Smokvina T, Hopwood D A. *Mol Gen Genet*, 1993, **239** :90~96.
- [14] Olson E R, Chung S-T. *J Bacteriol*, 1988, **170** :1955~1957.
- [15] Siemieniak D R, Slightom J L, Chung S-T. *Gene*, 1990, **86** :1~9.
- [16] Sohaskey C D, IM H, Schauer A T. *J Bacteriol*, 1992, **174** :367~376.
- [17] Engel P, Wright M S. *Lett Appl Microbiol*, 1991, **13** :51~54.
- [18] Engel P, Wright M S. *FEMS Microbiol lett*, 1993, **109** :257~262.
- [19] Ikeda H, Takada Y, Pang C, *et al.* *J Bacteriol*, 1993, **175** :2077~2082.
- [20] 邓子新,周秀芬. *微生物学报*, 1994, **34** :428~433.
- [21] Schauer A T, Nelson A D, Daniel J B. *J Bacteriol*, 1991, **173** :5060~5067.
- [22] Engel P, Lax A R. *Lett Appl Microbiol*, 1997, **25** :225~228.
- [23] Solenberg P J, Baltz R H. *J Bacteriol*, 1991, **173** :1096~1104.
- [24] Hahn D R, Solenberg P J, Baltz R H. *J Bacteriol*, 1991, **173** :5573~5577.
- [25] Hahn D R, Solenberg P J, McHenry M A, *et al.* *J Ind Microbiol*, 1991, **7** :229~234.
- [26] McHenry M A, Baltz R H. *J Bacteriol*, 1991, **173** :5578~5581.
- [27] Baltz R H, Hahn D R, McHenry M A, *et al.* *Gene*, 1992, **115** :61~65.