

微生物线形质粒的研究进展

陈 艳 赵文明

(西安交通大学生命科学与技术学院 西安 710049)

Progress in the Study of Microbial Linear Plasmids

Chen Yan Zhao Wenming

(School of Life Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

关键词 线形质粒, 遗传因子, 共价结合蛋白, 水平转移

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)06-0768-05

质粒指染色体外能独立进行复制和遗传的辅助性遗传单位。习惯上,专指细菌等微生物中能进行自主复制的共价闭环环状 DNA 分子。然而,近 20 年来在越来越多原核生物的细胞质或真核生物的线粒体中却发现了线形 DNA 分子,一般具有共价闭合的末端或于 5' 端结合蛋白质。因此,称这类质粒为线形质粒(linear plasmid)。线形质粒最初在玉米(*Zea mays*)中发现^[1],迄今只有 20 多年的历史。已报道发现线形质粒的物种有近百个,如引起人类回归热的达氏疏螺旋体(*Borrelia duttonii*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)、紫癭麦角菌(*Claviceps purpurea*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)等^[2,3]。由于大多数线形质粒的 5' 端带有共价结合蛋白,使其在分离过程中随着脱蛋白反应而被去除,只是近十年来由于脉冲场凝胶电泳技术的成熟才检测出许多大型的线形质粒^[2]。

通常,丝状真菌的线形质粒只分布于线粒体中,细菌和酵母的线形质粒位于细胞质中,但也有少数例外,如在克鲁弗利氏毕赤氏酵母(*Pichia kluyveri*)中发现的 pPK1 和 pPK2 及黑迪氏毕赤氏酵母(*Pichia heeidi*)中发现的 pPH1 都位于线粒体中^[4]。细菌中的线形质粒还使其寄主具有一些利于生存的表现型特点,如细菌抗生素的合成、对生物异源体的降解、重金属的抗性等。多数真菌的线形质粒没有明显的表现型,只有少数例外,如乳酸克鲁维酵母的嗜杀表现型与线形质粒有关^[5,6]。粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)和四孢柄孢壳(*Podospora anserina*)中的线形质粒分别使寄主具有衰老和长寿的特点^[7,8]。线形质粒除具有特殊的线形结构外,与环形质粒一样,也具有自主复制的生物学特性。同时还发现,线形质粒作为一类新型的基因工程载体,在克隆带回文结构的 DNA 片段时比环形质粒具有更多的优点^[9]。本文试图就线形质粒的生物学特性和线形质粒载体在基因工程技术中的应用前景做一简要介绍,以利于促进我国在这方面的研究与开发。

1 线形质粒的结构和复制

线形质粒以线状双链 DNA 形式存在。根据其末端结构可分为发卡型和 5' 端共价结合蛋白型两种。如图 1 所示,发卡型线形质粒的两端为短的共价闭合环,非常类似一些病毒或噬菌体的结构,普遍存在于回归热疏螺旋体(*Borrelia*)的细胞质中。

多数已发现的线形质粒都属 5'端共价结合蛋白型(如图 2-A、B、C、D)。此共价结合的蛋白即称为末端蛋白(Terminal Protein),简称 TP,可以阻止 5'端被核酸外切酶消化。TP 的来源还不十分清楚,推测编码 TP 的序列是编码线形质粒 DNA 聚合酶的一部分。对娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) pSLA2 末端蛋白的研究发现^[10],TP 对线形质粒的复制和线状形式的稳定有重要作用。

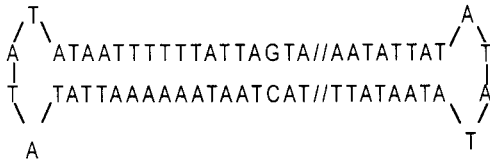


图 1 发卡型线形质粒的末端结构^[11]

除具有典型的发卡环或 5'端携带 TP 的特点外,还发现不同类型的线形质粒均具有末端反向重复序列(terminal inverted repeat),简称 TIR。不同线形质粒的 TIR 长度不同,如变青链霉菌(*Streptomyces lividans*)的 pSLP2 的 TIR 只有 44 个 bp,而龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)的 pPZG101 的 TIR 却达到 95kb。因此,TIR 往往成为鉴别不同线形质粒的特征之一。

线形质粒与环状质粒复制的相同点在于,它们都具有自己的复制起始区,能够自主复制。有些小质粒是使用核基因编码的酶来复制,而大型质粒本身就带有复制酶基因,依靠自己的复制酶来复制。然而,不同的是线形质粒在复制期间要求一种特殊的机制来补偿链的不断缩短。如,发卡型线形质粒 N15 的复制从靠近质粒 DNA 左末端的一个内部起始位点开始运行,双向复制。左端复制后,由质粒自身编码产物原端粒酶切断这个序列,形成左端发卡环。右端复制后,原端粒酶也切断这段序列,从而产生 2 个线形质粒。在原端粒酶作用形成的发卡末端之前,N15 也有可能在全复制后形成一个头对头的环状二聚体^[9]。

5'端共价结合蛋白的线形质粒由于类似于病毒和噬菌体基因组,均具有 TIR 和 TP,因此提出类似腺病毒和噬菌体 PRD1 的链替代复制模型。复制开始一个脱氧核苷酸-1 磷酸共价连接到一个自由的末端蛋白质分子上,随后末端蛋白与 DNA 聚合酶形成一个复合物,DNA 合成才能开始。从 5'到 3'单向延伸导致一条亲本链被代替,这样产生一个完全新的双链质粒 DNA 和一个被替代的单链 DNA。由于存在末端反向重复(TIR),被替代链形成一个锅柄型的结构,作为一个新的复制循环的开始^[2,12]。而且,利用同位素对粪盘菌属的 *Ascobolus immersus* 的线形质粒 pAI2 的复制研究发现,放射性标记完全整合到预测的位置,从而证实了链替代复制模型的假设^[3]。

2 线形质粒的功能

虽然线形质粒发现得较晚,但也和环状质粒一样,具有一定的表型和生理功能,根据其所带基因以及赋予宿主细胞的特点可将线形质粒分为以下几种。

2.1 合合作用

在放线菌中存在一些大型的线形质粒,长度大于 50kb,有的甚至达到几百 kb。研究发现,这些线形质粒与抗菌素的产生有关。例如,在天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中发现的 SCP1 是一个 350kb 的线形质粒,含有亚甲霉素的合成基因。拉沙菌素由拉沙里链霉菌(*S. lasaliensis*)的一个 520kb 的线形质粒 nKSI.

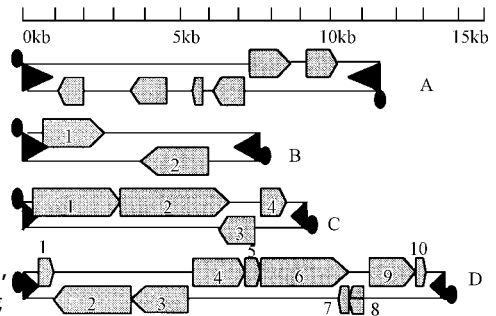


图 2 不同微生物 5'端共价结合蛋白型线形质粒简图^[2]
箭头代表 ORF;黑色三角代表 TIR;黑色圆圈代表 TP。
A pSLC1(带棒链霉菌);B pCIK1(紫瘢麦角菌);1-RNA-聚合酶 2-DNA-聚合酶;C pGKL1(乳酸克鲁维酵母);1-末端蛋白和 DNA-聚合酶;2-毒素 $\alpha + \beta$ 3-免疫;4-毒素 γ ;D pGKL1(乳酸克鲁维酵母);2-末端蛋白和 DNA-聚合酶;3-鸟苷酸转移酶和 mRNA-三磷酸酶;4-解旋酶;5-单链 DNA 结合蛋白;6-RNA-聚合酶;7-RNA 聚合酶亚基;10-TRF;1 8 9-未知)。

合成放线菌素 D、四环素、氯霉素和兰卡沙菌素等抗生素的产生也与相应的线形质粒有关^[10,13]。

2.2 降解作用

对一些特殊物质的降解利用是某些细菌的重要特性,如对苯酚、杀虫剂、丙烯酰胺、苯胺、卤化烷等物质的降解。研究发现,分解这些化合物的酶系常和线形质粒有关,如来自自养黄色杆菌(*Xanthobacter autotrophicus*)Py2 的一个 320kb 的大型线形质粒就携带丙烯氧化和环氧化物羧化的关键酶类^[14]。红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)BD2 能利用异丙基苯作为唯一的碳源和能源也与一个 210kb 的线形质粒有关,如果此线形质粒丢失,对异丙基苯和三氯乙烯的降解作用将丧失^[15]。降解过程一般是在线形质粒编码产物与染色体基因编码产物共同作用下才完成的。

2.3 自养作用

目前还发现,线形质粒赋予某些放线菌自养生长的能力。如,混浊红球菌(*Rhodococcus opacus*)能在氢作为唯一能量来源的条件下自养生长,并能转化成非自养菌株和其它各种异养型。这种能力与两个 270kb 左右的线形质粒 pHG201 和 pHG205 有关^[16,17]。

2.4 编码主要表面蛋白

疏螺旋体(*Borrelia*)是引起人类回归热的重要病原菌。研究发现,位于布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)一个线形质粒上的一对基因 ospA 和 ospB 编码细菌主要表面蛋白^[18];位于赫氏疏螺旋体(*Borrelia hermsii*)线形质粒上的 vmp 是一个基因家族,编码不同的细菌表面蛋白,这些基因的复制由另一个质粒编码的表达信号控制。对细菌非常有利的是,如果不同线形质粒上的 vmp 基因产物相互结合,便可以引起抗原变异,使其逃避寄主的免疫反应^[19]。这些发现改变了重要基因不在质粒中出现的认识。

2.5 嗜杀作用

1963 年,Bevan 和 Makower 发现某些酿酒酵母中可以产生毒素杀死其它酵母(称为嗜杀毒素)。敏感株与嗜杀毒素相接触,其 DNA、RNA、蛋白质及多糖类的合成能力降低。目前,已分离出很多与嗜杀性状有关的突变株,发现嗜杀表型的确定与许多染色体基因和线形质粒基因有关。乳酸克鲁维酵母的线形质粒 pGKL1 和 pGKL2 便是 2 个比较典型的嗜杀质粒。pGKL1 是一个 8kb 的线形质粒,携带编码异源三聚体嗜杀毒素 α 、 β 和 γ 亚基的基因。其中 α 亚基只表现出几丁质酶的活性,在体内通过抑制阿洛氨菌素彻底破坏全毒素的活性; β 亚基由于其疏水性,被认为在结合 γ 亚基中起到一定作用,唯独 γ 亚基有毒性(如图 2C)。但由于 pGKL1 没有携带 RNA 合成酶基因,所以其存在必须依赖 pGKL2 的转录系统。pGKL1 和 pGKL2 就象一对姐妹,相依相存。pGKL2 是一个 13.5kb 的线形质粒,含有 11 个功能基因(如图 2D)^[20]。近年来,随着对它们功能的了解,酵母线形质粒将可能作为载体成为酵母转化系统中的一个有用的工具。

2.6 衰老和长寿作用

目前还发现,存在于脉孢菌中的线形质粒 Maranhar 和 Kalilo 可以控制寄主的衰老过程。原因是线形质粒整合到线粒体 DNA(mtDNA)中,使缺失的 mtDNA 分子积累所致;相反,在四孢柄孢壳中发现的另一种线形质粒,却赋予寄主长寿的表型。长寿是线形质粒穿越细胞核,整合到寄主染色体的特定区域中形成的^[3]。

除上面谈到的六种功能外,还发现一些线形质粒没有任何表型效应,称此现象为隐蔽性。多数丝状真菌的线形质粒都是隐蔽的。隐蔽性线形质粒是否却无任何功能,目前还不清楚。

3 线形质粒的水平转移

大多数细菌可以通过接合将遗传信息从供体单项转移到受体。研究发现,细菌的接合作用大多由质粒决定。接合转移赋予细菌基因水平转移的能力,转移的范围只限于一个种或几个近缘种中。然而,在放线菌的链霉菌属中发现的一些线形质粒,其接合转移突破了种的界限。例如, pSLP2 是一个 42kb 的接合质粒,能从变青链霉菌转移到天蓝色链霉菌和小小链霉菌(*S. narvalis*)中;变青链霉菌在和斑堡链

霉菌 (*S. bambergensis*) 的接合中也可以观察到 DNA 的转移,前者含有的 pSLP2,便来自后者的一个 640kb 的大型线形质粒 pSB1;在天蓝色链霉菌中还存在着一种称为 SCP1 的线形质粒。SCP1 具有转移性,而且,它除了能够自身转移外,还能带动染色体进行转移。这些线形质粒的末端反向重复序列几乎相同,也许和它们能够进行接合转移有关^[2]。另外,接合转移使放线菌之间可以分享有用的遗传物质,例如对重金属抗性、抗生素的合成、对生物异源物质的降解等^[21]。

丝状真菌线形质粒的转移可通过两种方式进行。一种是垂直转移,通过有性杂交完成,一般和线粒体 mtDNA 一起转移。母体的线形质粒被转移到后代中,父体一般不转移线形质粒。另一种方式是通过体细胞菌丝进行的水平转移。实验证明,线形质粒的水平转移可以发生在种内或种间。如 Kahllo 和 Mananhar 可以通过异核体从粗糙脉孢菌的一个株系转到另一个株系,也能侵染无线形质粒的种,而且,如果两个菌株混合可以产生部分或过渡性异核体^[7];又如,麦角菌的线形质粒通过原生质混融可以从一个株系转到另一个株系^[3]。有些丝状真菌的水平转移甚至通过了属的界限,如粪盘菌属的 *Ascobolus immersus* 的线形质粒能通过胞质接触转移到四孢柄壳中^[3]。然而,在新的寄主中,质粒不能稳定存在,逐渐消失。

4 在基因工程中的应用

一些线形质粒具有作为基因工程优良载体的特点,如,嗜杀线形质粒 pGKL1 和 pGKL2,位于细胞质中,具独立的复制、转录系统;广泛的寄主范围;稳定、高拷贝等。通过对 pGKL1 和 pGKL2 基因功能的分析还发现,在每个质粒上至少有一个非关键位点对质粒的保留是不必要的,例如, pGKL1 (8.9kb) 的嗜杀毒性位点 ORF2 和 pGKL2 (13.4kb) 的 ORF1 位点,都可以作为外来 DNA 整合的潜在靶点。实验证明,基于 pGKL1 构建的携带木糖异构酶 (*xylA*) 基因的线形杂合质粒 pRSC126 和携带 UDP-葡糖-脱氢酶 (*hasB*) 基因的线形杂合质粒 pRSC128,在乳酸克鲁维酵母中能够很好表达^[22]。

pN15L 是一个 13.8kb 的发卡型线形质粒,由大肠杆菌原噬菌体质粒 N15 优化而来。在 50mg/mL 卡那霉素选择条件下, pN15L 在 N15 溶源性细菌中有很高的拷贝数。研究还发现,线形质粒 pN15L 作为载体有效地克服了环形质粒克隆回文序列的困难,可能因为回文序列在超螺旋的环形 DNA 质粒中易形成发卡型结构。在滞后链复制的过程中,这些发卡结构也许被 SbcCD 核酸酶切掉,导致序列的丢失。而线形质粒 pN15L 不同于常用 pUC 类环形载体,首先在于它是线状的而不是超螺旋的;其次, pN15L 有一套独特的基因负责 DNA 复制。这两个因素可能对回文结构的复制起到关键作用^[23]。

5 结束语

目前,在越来越多的微生物中发现线形质粒,其不同于环形质粒的结构特点及特殊的复制方式展示了丰富的生物多样性;而且,从结构和生物学特性分析,有些线形质粒载体具有环形质粒不可替代的优点。从基因功能分析,有些大型线形质粒还携带微生物的致病基因或抗生素基因,这些基因有可能成为基因工程研究与开发的重要基因来源。经过优化的线形质粒还非常有希望成为基因工程中有用的载体。

感谢:本文在写作过程中得到中国科学院微生物研究所田颖川教授的悉心指导,特此表示感谢。

参 考 文 献

[1] Pring D R, Levings C S, Timothy D H, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**: 2904 ~ 2908.

[2] Meinhardt F, Schaffrath R, Larsen M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**: 329 ~ 336.

[3] Griffith A J F. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 673 ~ 685.

[4] Blaisonneau J, Nosek J, Fukuhara H. *Yeast*, 1999, **15**(9): 781 ~ 791.

- [5] Gunge N ,Sakaguchi K. *J Bacteriol* ,1981 ,**147** :155 ~ 160.
- [6] Larsen M ,Meinhardt F. *Curr Genet* ,2000 ,**38** (5) :271 ~ 275.
- [7] Court D A ,Griffiths A J ,Kraus S R ,et al. *Curr Genet* ,1991 ,**19** :129 ~ 137.
- [8] Hermanns J ,Osiewicz H D. *Curr Genet* ,1996 ,**29** :250 ~ 256.
- [9] Ravin N V ,Ravin V K. *Nucleic Acids Research* ,1999 ,**27** (17) :e13.
- [10] Polo S ,Guerini O M ,Sosio M , et al. *Microbiology* ,1998 ,**144** :2819 ~ 2825.
- [11] Hinnebusch J ,Barbour A G. *J Bacteriol* ,1991 ,**173** :7233 ~ 7239.
- [12] Bao K ,Cohen S N. *Genes Dev* ,2001 ,**15** (12) :1518 ~ 1527.
- [13] Kinashi H ,Shimaji M ,Skai A. *Nature* ,1987 ,**328** :454 ~ 456.
- [14] Krum J G ,Ensign S A. *J Bacteriol* ,2001 ,**183** (7) :2172 ~ 2177.
- [15] Kessler M ,Dabbs E R ,Averhoff B ,et al. *Microbiology* ,1996 ,**142** :3241 ~ 3251.
- [16] Shimizu S ,Kobayashi H ,Masai E ,et al. *Appl Environ Microbiol* ,2001 ,**67** (5) :2021 ~ 2028.
- [17] Kalkus J ,Reh M ,Schlegel H G. *J Gen Microbiol* ,1990 ,**136** :1145 ~ 1151.
- [18] Feng S L ,Das S ,Barthold S W , et al. *Biochimica et Biophysica Acta* ,1996 ,**1307** (3) :270 ~ 272.
- [19] Plasterk R H ,Simon M I ,Barbour A G. *Nature* ,1985 ,**318** :257 ~ 263.
- [20] Tiggemann M ,Jeske S ,Larsen M ,et al. *Yeast* ,2001 ,**18** (9) :815 ~ 825.
- [21] Le Dantec C ,Winter N ,Gicquel B , et al. *J Bacteriol* ,2001 ,**183** (7) :2157 ~ 2164.
- [22] Schründer J ,Gunge N ,Meinhardt F. *Curr Microbiol* ,1996 ,**33** :323 ~ 330.
- [23] Ravin N K ,Strakhova T S ,Kuprianov V V. *J Mol* ,2001 ,**31** (5) :899 ~ 906.

张树政院士八十寿辰庆典在北京举行

中国科学院微生物研究所于 2002 年 10 月 22 日上午在中国科学院青年公寓隆重举行了“张树政院士八十寿辰庆典”活动。科技部徐冠华部长、中国科学院路甬祥院长、中国科学院生物局康乐局长等送来了贺信。邹承鲁、杨福愉、王志珍、李季伦、张广学、周同惠、田波、郑儒永等院士以及许许多多的张树政院士的同事、朋友、学生等近 200 人出席了庆典活动。

张树政院士是我国著名生物化学家。在近 50 年的科研工作中，为推动我国酶科学的发展和糖生物学的研究作出了突出贡献，首先建立了国内等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳等新技术，首次发现了多种糖基酶的作用和工业化前景，领导和组建了国内第一个糖工程实验室，是中国糖生物工程学和糖工程前沿计划的倡导者，为我国生物化学、酶学、糖生物学、糖生物工程学等前沿领域的建立和发展作出了重要贡献，成就卓著。在孜孜不倦探索生命科学的同时，张先生始终满腔热情地投入到人才的培养工作中，培养出许多今天已成为我国生命科学领域的将帅人才和科研骨干。

张树政院士严谨的学风、创新的学术思想、正直的人格和高尚的科学道德，教育了一代又一代人。她唯真求实、严谨治学、不懈拼搏的科学态度和甘为人梯、诲人不倦的高尚情操，为广大科学工作者所称颂和敬仰。

衷心祝愿张树政院士健康长寿，为我国的科学事业再立新功。