

转座子 Tn4560 在吸水链霉菌应城变种中的转座^{*}

邓子新 周秀芬

(华中农业大学微生物科学与技术系 武汉 430070)

摘 要 Tn4556 是在弗氏链霉菌 UC8592 中发现的一个类似于 Tn3 的转座子, 在它转座的非必需区中间插入紫霉素抗性基因 *vph* 所组成的复合体 (Tn4556:: *vph*), 称为 Tn4560。把 Tn4560 克隆到一个温敏性质粒 pMT660 (由 PIJ702 衍生而来) 构建的重组质粒 (pMT660:: Tn4560) 称为 pUC1169。pUC1169 不能直接转化吸水链霉菌应城变种 10-22, 但可以以一定的频率转化其衍生菌株 Q105 (至少丧失了一个内源质粒的受体菌株。) 从转化子中检测 DNA, 可以观察到完整的 pUC1169 的存在 (仍为高拷贝)。将携带了 pUC1169 的 Q105 菌株的孢子悬液以一定的稀释度涂布到无抗生素的平板上获得单个分散的菌株, 把平板放在 39°C 下培养, 待菌落长出丰满的孢子后, 再分别影印到含有紫霉素和硫链丝菌素的培养基平板上, 分离紫霉素抗性 (*vio*⁺) 和硫链丝菌素敏感 (*thio*⁺) 的菌落, 即为 pMT660 “自杀”, 而 Tn4560 在细胞中发生了转座的个体。从 18 个这类菌落中提取总 DNA, 经 Pvu II 酶解后, 在琼脂糖凝胶上电泳, 把电泳后的 DNA 转移到硝酸纤维素膜上, 与非放射性方法标记的 pUC1169 探针杂交揭示, 每一个衍生菌株都丢失了对应于载体 pMT660 的区域, 却在染色体或内源质粒的不同位点上保留了 Tn4560。从 *vio*⁺ *thio*⁺ 的突变体中已获得了 5102-III 抗生素生物合成的阻断突变株。

关键词 链霉菌, 转座

产生三种重要的农用抗生素是我们对吸水链霉菌应城变种 10-22 的主要兴趣之一。为此, 近年来发展了许多技术和方法来尝试从分子水平上研究这些抗生素的生物合成及其遗传调控, 取得了不少进展^[1], 一系列适合于该菌种的基因克隆载体陆续得到了发展^[1-5], 对外源 DNA 具有很强限制性的原始菌株得到了改良^[6], 原生质体的制备、再生和转化已成为常规的操作^[2-7], 并已利用现行的基因克隆系统获得了多种抗生素均超量产生的基因工程菌株^[7]。

为了从分子水平上深入了解抗生素的生物合成, 阻断突变株是最基本的需要。在链霉菌中, 这类阻断突变株的获得长期以来都是通过经典的物化诱变方法获得的。转座子的发现, 为各种突变体的筛选开拓了广阔和更为理想的途径, 但在链霉菌中, 这种技术则迟迟没有得到应有的发展。直到 1987 年, 美国 UPJohn 公司才打破这种“沉默”, 首次从弗氏链霉菌 UC8592 中发现了一个 6.8kb 的转座因子, 并阐明了它在变铅青链霉菌中转座的随机性^[8]。自此, 陆续出现了不少链霉菌转座子的报道, 其中 IS493^[9]和 IS 117^[10]也已发展成为链霉菌基因诱变、分析和操作的有用工具, 与 Tn4556 一起在链霉菌分子生

• 本项目得到国家教委和国家自然科学基金委员会资助。

本文于 1993 年 6 月 24 日收到。

物学的研究中发挥着应有的作用。

本文报道由 Tn4556 所衍生的转座子 Tn4560 在吸水链霉菌应城变种中的转座及其在初筛抗生素生物合成阻断突变株方面的应用。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和转座子

吸水链霉菌应城变种 10-22^[11]和 Q105^[5]系我室保藏菌种。携带转座子 Tn4560 的质粒 pUC1169 由美国 UpJohn 公司提供,其特征和酶切图谱见文献 [7]。pIJ4705 的特征见文献 [6]。测定 5102-I、5102-II 和 5102-III 各种抗生素生物合成能力的指示菌分别为 *Pellicularia sasakii*、*Cochliobolus heterotrophus* 和 *Fusarium oxysporum*。

1.2 通用技术

链霉菌的液体培养基为 YEME (只加 10%蔗糖)或 TSB (补加 0.5%甘氨酸),成份见文献 [12]。固体产孢培养基为 CM^[13],产素固体培养基为 PDA (即将 200g 马铃薯切成小块,加水煮沸 15—30 分钟,过滤加水定容至 1000ml,然后加入葡萄糖和琼脂各 10g,灭菌即成)。也可采用 Antibiotic Assay Medium 2 (Difco)。原生质体再生培养基、转化方法及 DNA 操作技术见文献 [12]。质粒的分离见文献 [14]。硫链丝菌素由美国 Squibb & Sons 公司提供,紫霉素由英国 John Innes 研究所提供。前者的使用浓度为 10 μ g/ml,后者的使用浓度为 30 μ g/ml。

1.3 非放射性标记和 Southern 杂交技术

参照 Borienger 公司 “DIG labelling & detection kit” 所描述的方法进行。

1.4 转座子诱变方法

用从 Q105 中分离的 pUC1169 转化 Q105,将整个平板的转化子混合起来制成孢子悬液,然后以一定的稀释度涂布到含有紫霉素的基本培养基平板上获得单菌落,先在 30℃培养过夜,然后把平板转到 39℃条件下(质粒复制子不能复制的温度)培养 4—7 天,待菌落成熟后,再分别影印到含有紫霉素(viomycin)或硫链丝菌素(thiostrepton)的基本培养基平板上,得到的 'vio' thio' 的菌落即为 Tn4560 的细胞中发生了转座的个体。

1.5 5102 抗生素生物合成阻断突变株的筛选

将发生转座后的个体分格培养在产素培养基平板上,30℃培养 72—96 小时后,打成圆形菌块,与指示菌菌块相间排列(对 5102-I 和 5102-III 抗生素而言)或规则地摆在混有指示菌孢子的培养基平板上(对 5102-II 抗生素而言),30℃培养 2 天后连续观察抑菌圈的有无和大小。

2 试验结果

2.1 携带 Tn4560 的质粒 pUC1169 对吸水链霉菌 10-22 及其衍生菌株 Q105 的转化

Tn4560 是一个类似于 Tn3 的转座子,是将没有自身启动子的紫霉素抗性基因 *vph* 人为地插入到 Tn4556 的转座非必需区所形成的复合体。将这个复合体克隆到一个由 pIJ702 所衍生的温敏性质粒 pMT660 上,就产生了携带 Tn4560 的杂合质粒 pUC1169^[8]。

我们试图将 pUC1169 引入到吸水链霉菌应城变种 10-22 中, 以便筛选获得 Tn4560 在染色体或某个内源质粒上的插入(已发现 10-22 有 5 个内源质粒存在)。pUC1169 是从变铅青链霉菌 1326 中提取而来的, 尽管转化时使用了相当多的质粒 DNA ($>1\mu\text{g}$), 但仍未获得 pUC1169 的 10-22 转化子, 这项结果与当时任何其它来源的质粒(如 pIJ61, pIJ922)转化 10-22 不能得到转化子的情形完全一致。覃重军等利用弗氏链霉菌的修饰系统克服吸水链霉菌的限制性障碍, 发展了 pIJ702 转化 10-22 的系统, 并衍生出至少消除了一个内源质粒的菌株 Q105^[5]。当我们用来自变铅青链霉菌 1326 的 pUC1169 来转化 Q105 时, 转化频率可以达到 10^3 转化子/ μg DNA。虽然 pUC1169 在 Q105 中的遗传并不稳定(经过一轮松弛选择压力的生长, 90% 以上的菌株均丧失这个质粒), 但它所携带的 *tsr* 和 *vph* 基因的表达是正常的(硫链丝菌素的选择浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$, 紫霉素为 $30\mu\text{g}/\text{ml}$), 另外, 可从 Q105 中提出与已知 pUC1169 大小相同的质粒, 暗示质粒的结构也是稳定的。

2.2 Tn4560 在 Q105 中的转座

pUC1169 在吸水链霉菌 Q105 中的遗传不稳定性使得转座子诱变后期消除这个质粒的工作变得更加容易, 甚至可能不需要经过 39°C 的恒温培养过程来加速 pUC1169 的“自杀”过程。因为发现在不加抗生素选择的培养基平板上, 经过一轮无选择性压力的培养, 约 50% 原本为 *thio*⁻ *vio*⁺ 的菌落都变成 *vio*⁻ *thio*⁺, 再经过一轮非选择性压力的培养, *thio*⁻ *vio*⁺ 的菌落数不再超过原始菌落数的 5%。尽管如此, 在利用 Tn4560 进行诱变的试验中, 我们仍按材料和方法一栏所述的方法, 采用高温处理 (39°C) 来加速 pUC1169 在细胞中的丢失和增加 *vio*⁻ *thio*⁺ 菌株形成的比例, 因为这种方法至少可以缩短细胞培养时间。用这种方法, 最终获得 *vio*⁻ *thio*⁺ 菌株(即可能发生了转座的个体)的比例可达 10^{-3} 。

2.3 转座位点分布的随机性分析

转座位点的随机性状况反映了获得各种基因突变的机率。因此, 我们随机挑取了 18 个经 Tn4560 诱变后筛选获得的 *vio*⁻ *thio*⁺ 的单菌落, 从中提取总 DNA, 经 Pvu II 酶解后, 在琼脂糖凝胶上电泳, 把电泳后的 DNA 转移到硝酸纤维素膜上(图版 I 上), 与用非放射性方法标记的 pIJ4705(将 pUC1169 克隆在一个大肠杆菌质粒 pIJ4642 中以利于 DNA 的提取, 并不污染链霉 DNA)杂交(图版 I 下), 图版 1-A 和 X 栏为电泳时分子量大小的对照, B 栏为 pUC1169 经 Pvu II 酶解后的 DNA 片段, 作为杂交的阳性对照, 其中 2642、2166 和 572bp 的三个片段对应于 Tn4560 区域 Pvu II 酶解后中间三个恒定不变的片段, 而其它 DNA 片段则与 pUC1169 上的 pMT660 区域相对应。从图版 1 下可以看出, 作为阴性对照的 Q105 DNA (C、V 和 W 栏) 均与 pIJ4705 没有杂交, 而来自 18 个 *vio*⁻ *thio*⁺ 单菌落的总 DNA (从 d 到 u 栏) 均与 pIJ4705 有十分明显的杂交。除了对应于 Tn4560 中间三个恒定不变的 Pvu II 片段(其中对应于 572bp 的阳性杂交较弱, 但明显可见)以外, 邻近于插入位点的染色体(或内源质粒)上的 Pvu II 位点与 Tn4560 末端的 Pvu II 位点所构成的 Pvu II 片段在不同的菌落个体中大小明显不同。在发生转座的群体中, 这类片段大小的变异就反映了转座位点的随机性。很明显, 从 18 个发生转座的个体来看, 好几个个体具有类似的阳性杂交谱带, 我们不能排除它们是同一个转座事件的可能性, 因为我们的诱变程序不能排除分离到同胞繁衍后代的可能性。尽管如此, 我们从图版 1 中

至少可以分辨出 6 种不同的阳性杂交谱带,暗示至少发生了相同数目的独立转座事件。当然,这些大小相近的杂交片段,也许并不一定完全相同,因为尽管它们杂交后的转座发生在不同位点上碰巧产生大小相同片段的可能性也是存在的。

2.4 Tn4560 诱变获得 5102-III 抗生素生物合成的阻断突变株

应该说,可从转座子诱变后的群体中筛选各种突变体(如营养缺陷型菌株,抗性突变等),而我们首选抗生素生物合成的阻断突变为筛选对象。从理论上讲,如果假设 10-22 的基因组为 $6 \times 10^3 - 9 \times 10^3 \text{ kb}$, 抗生素生物合成基因簇的大小为 30kb 以及在基因簇任何部位的插入都会引起抗生素生物合成能力丧失的话,那么至少需要筛选 200—300 个发生了转座的菌落才能获得一个抗生素生物合成的阻断突变株。然而,出人意料的是,我们仅筛选了 48 个稳定的 *vio'* *thio'* 的菌落就获得了 8 个 5102-III 抗生素生物合成的阻断突变株,占 Tn4560 诱变菌株的 1/6。同时,我们还发现,所有阻断突变株均丧失了产生一种黄色色素的能力,而出发菌株 Q105 (以及 10-22) 则明显可以产生一种可溶性黄色色素。

从这些经转座子诱变后的个体中,没有获得 5102-I 和 5102-II 两种抗生素生物合成的阻断突变株。

3 讨论

与经典的理化诱变方法相比,转座子诱变具有突变频率高、突变位点专一、可为菌株加上新的选择标记以便于菌种构建和基因操作等优点。为了充分发掘这些优点并把它施用到链霉菌中与抗生素生物合成有关基因的遗传操作方面,我们以三种重要农用抗生素的共同产生菌——吸水链霉菌应城变种 10-22 为对象,以转座子 Tn4560 为工具,发展了 Tn4560 在这个有用菌种中的转座系统。

Tn4560 在吸水链霉菌应城变种 Q105 中的转座也是以一个温敏性质粒(pMT660)为中介的,这个质粒复制子在 Q105 中的遗传很不稳定,携带这个质粒的菌株经过一轮松弛选择压力的培养以后,90%以上均自然消除。然而,这个特征对获得转座以后质粒消除的菌落则是十分有利的。的确,我们的试验证明,当把携带质粒 pUC1169 (pMT660::Tn4560) 的 Q105 的硫链丝菌素抗性转化子群体培养在不含抗生素的平板上,待产孢以后再影印到含有紫霉素或硫链丝菌素的平板上,90%以上的紫霉素抗性(*vio'*)菌落都丧失了硫链丝菌素抗性(*thio'*),说明 pMT660 已不在细胞中。

随机挑取 18 株 Tn4560 诱变以后的个体,以携带 Tn4560 的质粒 pIJ4705 为探针进行 Southern 印迹杂交揭示出 Tn4560 的转座具有随机性,与它在变铅青链霉菌中的转座行为相吻合^[8]。这也正是我们充分发掘转座子的用途所需要的。

利用 Tn4560 诱变技术初筛三种农用抗生素生物合成的阻断突变株就揭示了令人惊奇的特征。仅从 48 株 *vio'* *thio'* 的个体中即筛选获得了 8 个 5102-III 抗生素的合成发生了阻断的突变。这种阻断的频率之高是出发菌株的单菌落或原生质体的多次理化诱变都未曾观察到的。因此,它可能反映了一种特定的突变。10-22 中有 5 个内源质粒存在, Q105 与 10-22 相比,虽然至少丧失了两个内源质粒,但仍有另外质粒的存在^[6],这种突变是因为诱变过程中的热培养(39℃),使其中一个(或多个)质粒丧失,而这个(些)质粒与

5102- \blacksquare 抗生素的生物活性有关, 还是由于 Tn4560 在染色体上的插入所引起, 目前尚不能定论。如果 Tn4560 在染色体上的插入具有“热点”或“超热点”的话, 这种情形也许可以解释, 但从 Tn4560 转座的随机性以及参与 Southern 印迹杂交的其中两个阻断突变株 (I 和 P) 的杂交带谱来看, 已经排除了这种可能性。目前, 我们正从多个方面设计可行试验以阐明这种突变的分子机理, 揭示它们是与质粒丢失有关还是与 Tn4560 的转座有关。

与 Q105 和 10-22 相比, 高频 5102- \blacksquare 抗生素生物合成阻断突变株的另一个共同特点是丧失了一种可溶性的黄色细胞色素的合成能力, 然而, 这种色素是否与 5102- \blacksquare 抗生素的合成有关, 目前也不清楚。

致谢 美国 UpJohn 公司惠赠转座子 Tn4560, 美国 ER Squibb 和 Sons 公司惠赠硫链丝菌素, 英国 John Innes 研究所 D. A. Hopwood 教授和 T. Kieser 博士对此课题给予多方面的支持, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 邓子新. 生物工程进展, 1992, **12** (2): 24—30.
- [2] 邓子新, 周秀芬. 生物工程学报, 1990, **6** (3): 188—194.
- [3] 邓子新, 周秀芬. 中国农业生物技术, 1989, 142—151.
- [4] 邓子新, 周秀芬. 中国科学 B 辑, 1992, (6): 595—601.
- [5] 覃重军, 邓子新, 周 启, 等. 遗传学报, 1993, **20** (2): 180—184.
- [6] Qin Z, Peng K, Zhou X *et al.* *J Bacteriol*, 1993, **176** (7): 2090—2095.
- [7] 覃重军, 邓子新, 周 启, 等. 第七次全国抗生素学术会议论文汇编, 北京: 中国药学会抗生素学会和中国抗生素杂志社, 1993, 98.
- [8] Chung S T. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 4436—4441.
- [9] Solenberg P J, Burgett S G. *J. Bacteriol*, 1989, **171**: 4807—4813.
- [10] Henderson D L, Brolle D F, Kieser T *et al.* *MGG*, 1990, **224**: 65—71.
- [11] 华中农学院微生物教研组. 微生物学报, 1978, **18** (1): 23—26.
- [12] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces-A Laboratory Manual*, John Innes Foundation, Norwich. 1985.
- [13] 袁丽蓉. 抗生素, 1983, **8** (6): 380—387.
- [14] Kieser T. *Plasmid*, 1984, **12**: 151—160.

TRANSPOSITION OF Tn4560 IN *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* VAR. *YINGCHENGENSIS*

Deng Zixin Zhou Xiufen

(Department of Microbial Sciences & Technology, Huazhong
Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Tn4556, a transposon of the Tn3 family, was discovered in *Streptomyces fradiae* UC8592. Incorporation of a viomycin resistant gene (vph) into Tn4556 gave Tn4560 (Tn4556::vph). The Tn4560 was cloned into pMT660, a temperature sensitive derivative of the wide host range plasmid pIJ702, to give pUC1169 (pMT660::Tn4560). pUC1169 can not be introduced by transforming directly into *S. hygroscopicus* 10-22, but can be transformed into one of its derivatives, Q105 (at least one of the five indigenous plasmid present in 10-22 was cured). Intact pUC1169 can be visualized at high copy number in Q105. Spores of Q105 carrying pUC1169 were harvested and plated on antibiotic-free medium for single colonies. The plates were incubated at 30°C and then shifted up to 39°C. After sporulation, the colonies are replica plated to agar containing viomycin or thiostrepton. Viomycin resistant (vio^r) and thiostrepton sensitive (thio^s) colonies must have lost pUC1169 but retained Tn4560 by transposition to the chromosome (or other replicons). The total DNA of 18 vio^r thio^s colonies were digested with Pvu I respectively. fractionated on agarose gel and transferred to nitrocellulose filter. After hybridization with nonradioactively (DIG) labelled pUC1169, all the colonies were found to have lost the region corresponding to pMT660, but retained Tn4560 at chromosome or plasmids. Blocked mutants for 5102-III antibiotics biosynthesis have been obtained among vio^r thio^s mutants.

Key words *Streptomyces*, Transposition