

五个链霉菌线型质粒端粒的克隆和分析

杨勇, 代玉梅, 陈振华, 覃重军*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室, 上海 200032)

摘要:本室从西藏采集的土壤样品中分离到了一批链霉菌,利用脉冲电泳确定了其中5株链霉菌含有较小的线型质粒。【目的】克隆、测序和分析5个线型质粒的端粒。【方法】采用改良的“在凝胶中进行DNA碱处理和限制性内切酶酶切”的方法来克隆线型质粒的端粒DNA。【结果】克隆和测序了5个线型质粒的端粒DNA。通过与链霉菌典型端粒进行比较,发现这5个新的线型质粒的端粒序列同样含有多个回文序列。但是有的端粒保守的回文序列I不一定能够“折返”与内部序列配对形成“超级发卡”结构,回文序列的“突出环”不一定都为3 nt。【结论】采用改良的方法克隆和鉴定了5个线型质粒新的端粒序列,这些新端粒的特征暗示:回文序列I的“折返”和3 nt的回文序列的“突出环”不是端粒复制必需的。

关键词:链霉菌;线型质粒;端粒;复制

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-06-1008

同大多数细菌不一样,链霉菌染色体DNA的结构是线型的,而且链霉菌中还常常含有大小不等的线型质粒^[1-2]。这些链霉菌线型复制子(线型染色体和线型质粒)具有相似的基本结构,即含有末端反向重复序列以及DNA末端共价结合的末端蛋白^[3-4]。链霉菌线型复制子起始于中部的双向复制会遇到一个经典的问题,即复制到末端DNA时,后随链中最后一个冈崎片段上RNA引物被去除后留下的3'端单链区如何补平的问题^[5]。随着更多的链霉菌线型复制子端粒的克隆,Huang等人发现这些末端DNA都含有保守的回文序列,而且能够折返形成复杂的二级结构^[6]。Qin和Cohen分析线型质粒pSLA2维持线型复制必需的端粒DNA序列的实验支持了端粒DNA复制的折返模型,即最末端的一个回文序列(回文序列I)和3'单链区内部DNA序列之间配对,形成的二级结构为末端蛋白引发的端粒DNA的合成提供了信号,而且后续还有一个内切

与加工的过程^[7]。

然而并不是所有链霉菌线型复制子的端粒DNA都具有这种保守的回文序列和二级结构,如灰色链霉菌的染色体^[8]、线型质粒SCPI^[9]以及线型质粒pRL1和pRL2^[10]。这些线型复制子的端粒DNA在序列上与其它大多数典型的端粒不同,而且多数不能形成折返的二级结构。由于端粒DNA及其共价结合的末端蛋白是相互适应、共同进化的,非典型的端粒DNA序列往往对应着新型的末端蛋白,SCPI末端蛋白的分离^[11]以及灰色链霉菌染色体的末端蛋白的预测^[12]证明了这一点。综上所述,链霉菌线型复制子的端粒系统(端粒DNA和末端蛋白)存在着多样性。随着越来越多的链霉菌线型复制子的端粒DNA的克隆,可能会发现更多非典型的端粒DNA,这对于分离新型的末端蛋白和揭示链霉菌线型复制子末端DNA的复制机理会有很大帮助。

本室从西藏采集的土壤样品中分离到了较多的

基金项目:国家自然科学基金(30870067, 30770045, 30325003);国家“863计划”(2007AA021503);中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-YW-G-014)

*通信作者。Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

作者简介:杨勇(1978-),男,湖北红安人,博士研究生,主要从事链霉菌分子遗传学研究。E-mail: yyang@sibs.ac.cn

收稿日期:2010-01-09; **修回日期:**2010-03-18

链霉菌(未发表),利用脉冲电泳确定了其中5株链霉菌含有较小的线型质粒。本实验发展了一种新的端粒克隆方法,克隆和测序了5个线型质粒的新的端粒,根据所获得端粒序列的信息对端粒DNA的复制提出新的观点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本实验所用的菌种与质粒见表1。

表1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Genotype	Source or reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^- \delta m_k^+ \delta$), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Stratagen
LRS1366	<i>Streptomyces</i> sp. harbors linear plasmid pLRS1366S	This work
LRS1373	<i>Streptomyces</i> sp. harbors linear plasmid pLRS1373S	This work
LRS1319	<i>Streptomyces</i> sp. harbors linear plasmid pLRS1319S	This work
LRS1323	<i>Streptomyces</i> sp. harbors linear plasmid pLRS1323S	This work
LRS1318	<i>Streptomyces</i> sp. harbors linear plasmid pLRS1318S	This work
Plasmids		
pBluescript II SK	Amp ^r , <i>lacZ</i>	Stratagen
pYY88	pBluescript II SK contains the left 6 kb telomere DNA of pLRS1366S	This work
pYY89	pBluescript II SK contains the right 13 kb telomere DNA of pLRS1366S	This work
pYY98	pBluescript II SK contains the left 5.8 kb telomere DNA of pLRS1319S	This work
pYY99	pBluescript II SK contains the right 3.3 kb telomere DNA of pLRS1319S	This work
pYY102	pBluescript II SK contains the 2.3 kb telomere DNA of pLRS1373S	This work
pYY223	pBluescript II SK contains the right 3 kb telomere DNA of pLRS1323S	This work
pYY224	pBluescript II SK contains the left 2.5 kb telomere DNA of pLRS1323S	This work
pYY218	pBluescript II SK contains the 1 kb telomere DNA of pLRS1318S	This work

1.1.2 主要试剂:生化试剂、常规抗生素和高保真 pfu DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术服务有限公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 MBI 公司。脉冲电泳分子标样(Lambda Ladder PFGE Marker)购于 New England BioLabs 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司。

1.2 培养和基本的分子生物学操作

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 的培养、转化和质粒提取等基本操作见文献^[13]。链霉菌的培养和脉冲电泳等操作见文献^[14]。16S rDNA 基因的引物为 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R (5'-TCAGGCTACCTGTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3 线型质粒端粒 DNA 的克隆

估算目标 DNA 条带在特定 PFGE 条件下电泳所到达的位置,割去适量的凝胶,注入 1% 低熔点琼脂糖凝胶(0.5% TBE 配制),待胶凝固后用相同条件脉冲电泳。电泳完毕后,进行溴化乙锭染色,切割低熔点琼脂糖中目标 DNA 胶条于离心管中。加 H₂O 至适当体积,加入 0.2 mol/L NaOH,37 $^{\circ}$ C 水浴 1-2 h。加入 0.2 mol/L HCl、0.1 mol/L Tris-HCl

(pH 8.0)和 2 \times SSC^[13],37 $^{\circ}$ C 水浴至少 3 h。去掉液体,用酶切缓冲液浸泡胶条至少 3 次,每次至少 30 min。加入适量酶切缓冲液和限制性内切酶对凝胶中的 DNA 进行酶切。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,与载体连接后转化大肠杆菌。

1.4 DNA 序列的测定和分析

测序由上海桑尼生物科技有限公司和上海博尚生物技术有限公司完成。DNA 序列比对及分析软件为(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、Vector NTI Suite 9、BioEdit 和 Clone Manager Suite v7.1。DNA 二级结构的预测采用软件“DNA mfold”^[15] (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>)。所有端粒 DNA 的核苷酸序列已提交 GenBank 公共数据库,编号为 GU080326-GU080331。

2 结果和分析

2.1 利用脉冲电泳技术检测西藏土壤链霉菌中的线型质粒

本实验室从西藏来源的土壤中分离到一批放线菌,其中 5 株编号为 LRS1366、LRS1319、LRS1373、LRS1323 和 LRS1318,经 16S rDNA 保守区序列的克

隆和测序,与链霉菌有 >99% 的相似性,因此初步归属于链霉菌属。将这 5 株链霉菌的菌丝用琼脂糖凝胶包埋、原位溶菌后进行脉冲电泳。结果显示 5 个菌株的基因组中均含有 1-3 个线型质粒 DNA(图 1),将这 5 个菌株中最小的线型质粒分别命名为 pLRS1366S(约 20 kb)、pLRS1319S(约 25 kb)、pLRS1373S(约 30 kb)、pLRS1323S(约 45 kb)和 pLRS1318S(约 50 kb)。

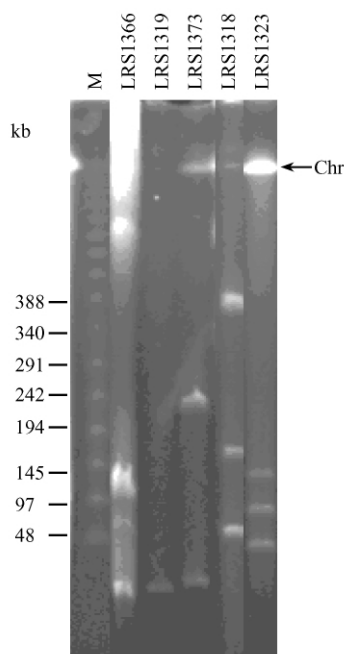


图 1 脉冲电泳检测 5 株链霉菌的线型质粒

Fig. 1 Detection of linear plasmids of five *Streptomyces* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). M: Lambda ladder PFGE marker; Chr: Chromosome. The PFGE condition is 1% agarose gel, 6V/cm, 14°C for 24 h, switch time ramped from 1 to 25 s.

2.2 五个线型质粒端粒 DNA 的克隆、测序和分析

2.2.1 五个线型质粒端粒的克隆和测序:我们采用“在琼脂糖凝胶中进行碱变性处理”除去与端粒 DNA 共价结合的末端蛋白,以及“在琼脂糖凝胶中进行限制性内切酶消化”的方法来获得线型质粒的端粒。

以 pLRS1366S 端粒的克隆为例,将 LRS1366 菌体做成胶块后进行脉冲电泳,用胶回收柱回收约 20 kb 的 DNA 条带。用多种限制型内切酶对回收的 DNA 进行酶切,发现 *Hind*III 能将 pLRS1366S 酶切成 13 kb 和 6 kb 的两个 DNA 条带。将低熔点琼脂糖中的 pLRS1366S DNA 进行碱变性、复性以及 *Hind*III 酶切(见“材料和方法”),然后连接到大肠杆菌质粒 pBluescript II SK 的 *Eco*RV-*Hind*III 位点得

到重组质粒 pYY88 和 pYY89。以 pBluescript II SK 上 T3 启动子序列为引物进行测序,与 *Eco*RV 位点相连的序列即是 pLRS1366S 端粒的序列。类似地,我们选择 *Bam*HI 对 pLRS1366S、pLRS1319S 和 pLRS1373S 这 3 个小的线型质粒的端粒 DNA 进行了克隆和测序。

对于 pLRS1323S 和 pLRS1318S 两个大的线型质粒,我们无法用常规胶回收试剂盒对 DNA 进行回收从而获得其酶谱。根据链霉菌基因组 G+C 含量相对较高的特点,我们选择了识别高 G+C 序列的限制性内切酶(如 *Bam*HI)进行端粒 DNA 克隆的尝试。在实验过程中,发现某些限制性内切酶(如 *Bam*HI)也能够作用于一般的琼脂糖凝胶内的 DNA,通过加大酶量和延长酶切时间克服了酶切效率低的问题,从而省去操作低熔点琼脂糖带来的一系列的不方便。我们选择 *Bam*HI 作为克隆位点,在普通琼脂糖凝胶中对 DNA 进行碱处理和酶切,对 pLRS1323S 和 pLRS1318S 这两个大的线型质粒的端粒 DNA 进行了克隆和测序鉴定。该改良的方法已成功的应用于本实验室多个大型线型质粒的端粒 DNA 的克隆,最大克隆到了约 280 kb 的线型质粒的端粒 DNA(未发表),证明了该方法的可靠性。

2.2.2 五个线型质粒端粒的分析:重组质粒 pYY88 和 pYY89 包含了线型质粒 pLRS1366S 的两端的端粒片段,测序结果显示该线型 DNA 末端反向重复序列的长度为 107 bp(图 2)。将 pLRS1366S 的端粒序列与 GenBank 数据库进行 Blast 比对,发现与链霉菌线型质粒 pRL2 的端粒的有很高的相似性(一致性为 82%,期望值为 6×10^{-70})。

重组质粒 pYY98 和 pYY99 包含了线型质粒 pLRS1319S 的两端的端粒片段,由于测序的原因,pYY98 测序只读到 187 bp,pYY99 测到约 1 kb。在 187 bp 范围内左右端粒的序列完全相同。将这 187 bp 通过 Blast 分析发现它与变铅青链霉菌线型质粒 SLP2 的左端粒以及链霉菌线型质粒 pSCL 的端粒(均为典型的链霉菌端粒)的序列都有高的相似性,特别是同 SLP2 的左端粒一致性为 77%(114/147),期望值为 4×10^{-21} 。

重组质粒 pYY102 含有一个大小约 2.3 kb 的 pLRS1373S 端粒 DNA 片段,重组质粒 pYY224 和 pYY223 含有 pLRS1323S 两个端粒 DNA 片段,重组质粒 pYY218 含有一个大小约 1 kb 的 pLRS1318S 端粒 DNA 片段。将这些端粒 DNA 分别测序后进行 Blast 分析,发现它们与任何已知的典型的端粒 DNA 序列

没有高的同源性,但是它们的末端 13 nt 与链霉菌保守的端粒末端(5'-cccgcggagcggg-3')相同(图 2)。

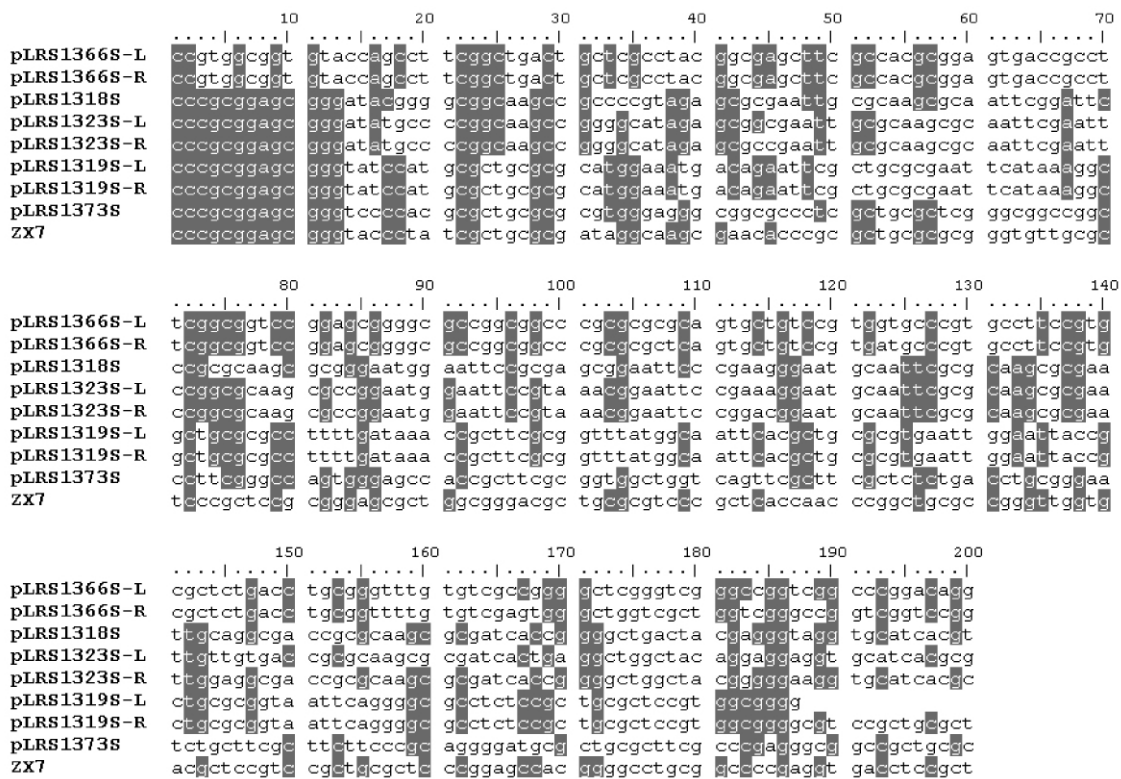


图 2 五个线型质粒和变铅青链霉菌 ZX7 染色体端粒序列的比较

Fig. 2 Comparison of the telomeres of five linear plasmids with that of *Streptomyces lividans* ZX7 chromosome. Identical nucleotides are shadowed.

2.3 五个端粒 DNA 的一级和二级结构的比较分析

目前已发表的链霉菌线型质粒的端粒序列,不论是保守的还是新型的,均含有多个回文序列 (palindromes)。虽然没有保守的端粒末端 13 个核苷酸序列(回文序列 I), pLRS1366S 的端粒 DNA 也由多

个回文序列组成(图 3)。pLRS1366S 端粒的回文序列 I 为 5'-CCGTGGCGG-3',虽然在序列上与典型的链霉菌端粒末端 5'-CCC GCCGAGCGGG-3'没有相似性,但是 pLRS1366S 端粒的回文序列 I 也能够象典型的端粒那样“折返”,与回文序列 IV 之间配对,形成一个超级发卡结构(super-hairpin)(图 4-A)。

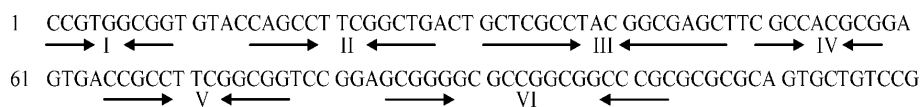


图 3 线型质粒 pLRS1366S 的 120 个核苷酸的端粒序列及其特征

The 120 nt telomere sequence of linear plasmid pLRS1366S and its characters. Small palindromes (I-VI) are indicated by paired arrowheads.

pLRS1319S 的端粒同线型质粒 SLP2 的端粒有很高的同源性,而且回文序列也在相应的位置。但是它的二级结构却与 SLP2 的不同,即它的回文序列 I 和回文序列 III 或 IV 不能“折返”配对形成超级发卡结构。

之间配对,形成一个超级发卡结构(图 4-C)。链霉菌典型的端粒的回文序列均含有 3 nt 的“突出环”(loop),与之不同的是, pLRS1373S 端粒的回文序列 III 和 IV 均由 4 nt 组成(图 4-C)。

Blast 分析发现 pLRS1373S 的端粒序列和典型的链霉菌端粒末端序列前 13 nt 是相同的,但是之后的序列则有较大不同。pLRS1373S 的端粒序列含有多个回文序列,各个回文序列可以“折叠”(图 4-B),其中回文序列 I 还能够“折返”,与回文序列 IV

pLRS1323S 和 pLRS1318S 的端粒序列也由多个紧凑的回文序列组成,但是回文序列 I 并不能同其内部的 DNA 序列配对形成稳定的折返的结构。此外,与典型链霉菌端粒不同的是它们的二级结构中还含有 4 nt 的“突出环”。

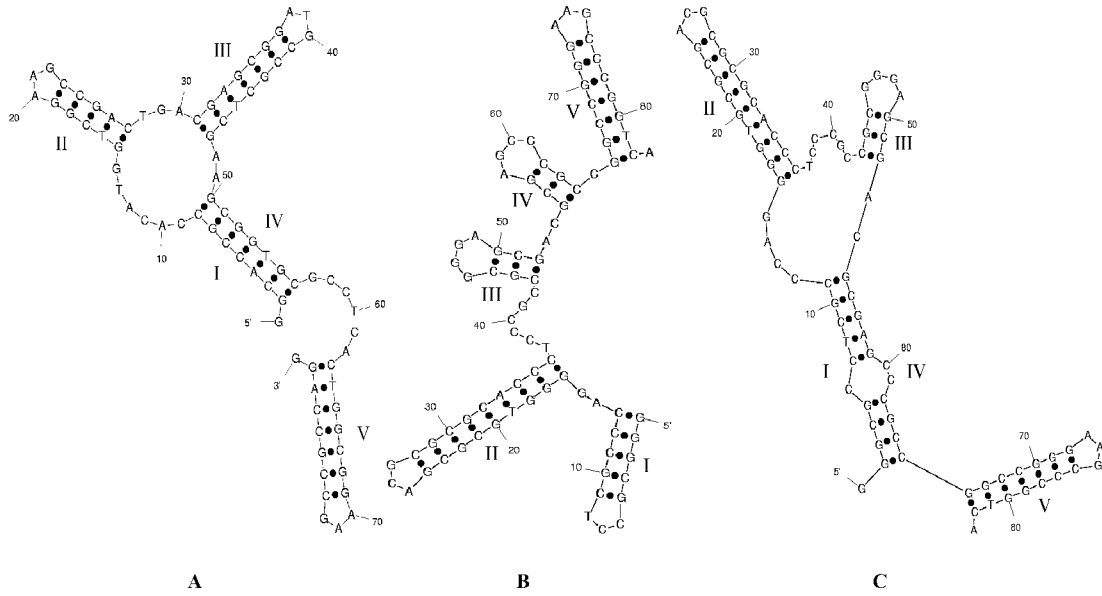


图 4 线型质粒 pLRS1366S 和 pLRS1377S 端粒可能的二级结构

Fig. 4 The predicted secondary structure formed by 3' single strand of the terminal 80 nt of linear plasmid pLRS1366S (A) and the terminal 83 nt of pLRS1377S (B and C). The palindromes are numbered as I-V. The base pairings within the palindromes are indicated by black dots.

3 讨论

已发表的许多链霉菌线型复制子的端粒序列具有保守的特点,如富含回文序列,具有相同的端粒末端 13 nt 的回文序列 5'-CCCGCGGAGCGGG-3',回文序列 I 常常可以“折返”与回文序列 IV 配对形成“超级发卡结构”,回文序列均含有 3 nt 的“突出环”等^[6]。非典型的链霉菌线型复制子的端粒序列仅见于灰色链霉菌的染色体、线型质粒 SCP1、pRL1 和 pRL2^[8-10]。这些新型的端粒也富含回文序列,pRL2

的回文序列 I 也可以“折返”与其它回文序列配对形成“超级发卡结构”等。通过与链霉菌典型端粒序列的一级和二级结构进行比较,我们克隆和测序的 5 个新的线型质粒的端粒序列具有共同的特征是均含有多个回文序列。此外还具有一些新的特征(表 2),如具有保守的 13 nt 的回文序列 I 不一定能够“折返”与其他回文序列配对,回文序列的“突出环”不一定均为 3 nt。这些暗示,回文序列 I 的“折返”和 3 nt 的回文序列的“突出环”不是端粒复制必需的。

表 2 五个线型质粒端粒的比较

Table 2 Comparison of telomeres of the five linear plasmids

Linear plasmids	Plasmids cloned	Contains terminal conserved 13 nt?	Contains terminal “folding-back”?	Length of the loops in palindromes (nt)
pLRS1366S	pYY88	No	Yes	3
pLRS1318S	pYY218	Yes	No	3/4
pLRS1323S	pYY223	Yes	No	3/4
pLRS1319S	pYY98	Yes	No	3
pLRS1373S	pYY102	Yes	Yes	3/4

由于链霉菌线型复制子端粒 DNA 及其共价结合的末端蛋白是相互适应、共同进化的,因此的更多新的端粒 DNA 的克隆对于分离新型的末端蛋白和揭示端粒 DNA 的复制有重要意义。常规的线型质粒端粒克隆的步骤包括在溶液中对线型质粒 DNA 进行碱变性以除掉共价结合的末端蛋白,加酸中和后,再加入高浓度盐并于 65℃ 复性^[2]。经此步骤,去除蛋白的端粒双链 DNA 损失很大,增加了克隆的难度。本实验建立了一种新的端粒克隆的方法,即

在琼脂糖(低熔点或普通琼脂糖)凝胶中对线型 DNA 分子进行碱变性、复性以及选择合适的限制性内切酶消化。该方法尤其适用于无法有效回收的大型线型质粒端粒 DNA 的克隆,提高了克隆的效率。

参考文献

[1] Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology*, 1993, 10: 923-933.

- [2] Hirochika H, Sakaguchi K. Analysis of linear plasmids isolated from *Streptomyces*: association of protein with the ends of the plasmid DNA. *Plasmid*, 1982, 7: 59-65.
- [3] Bao K, Cohen SN. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes and Development*, 2001, 15: 1518-1527.
- [4] Bao K, Cohen SN. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes and Development*, 2003, 17: 774-785.
- [5] Chang PC, Kim ES, Cohen SN. *Streptomyces* linear plasmids that contain a phage-like, centrally located, replication origin. *Molecular Microbiology*, 1996, 22: 789-800.
- [6] Huang CH, Lin YS, Yang YL, Huang SW, Chen CW. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular Microbiology*, 1998, 28: 905-926.
- [7] Qin Z, Cohen SN. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid pSLA2. *Molecular Microbiology*, 1998, 28: 893-903.
- [8] Goshi K, Uchida T, Lezhava A, Yamasaki M, Hiratsu K, Shinkawa H, Kinashi H. Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 84: 3411-3415.
- [9] Kinashi H, Shimaji-Murayama M, Hanafusa T. Nucleotide sequence analysis of the unusually long terminal inverted repeats of a giant linear plasmid, SCP1. *Plasmid*, 1991, 26: 123-130.
- [10] Zhang R, Yang Y, Fang P, Jiang C, Xu L, Zhu Y, Shen M, Xia H, Zhao J, Chen T, Qin Z. Diversity of telomere palindromic sequences and replication genes among *Streptomyces* linear plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 5728-5733.
- [11] Huang CH, Tsai HH, Tsay YG, Chien YN, Wang SL, Cheng MY, Ke CH, Chen CW. The telomere system of the *Streptomyces* linear plasmid SCP1 represents a novel class. *Molecular Microbiology*, 2007, 63 (6): 1710-1718.
- [12] Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. The genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190: 4050-4060.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [15] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3406-3415.

Cloning and analysis of the telomeres of five *Streptomyces* linear plasmids

Yong Yang, Yumei Dai, Zhenhua Chen, Zhongjun Qin *

(Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: [**Objective**] *Streptomyces* strains were isolated from soil samples of Tibet, five small linear plasmids were detected by pulsed-field gel electrophoresis. [**Objective**] Cloning, sequencing and analysis of telomeres of these plasmids. [**Methods**] The telomeres were cloned by a modified procedure — “alkaline treatment and enzyme digestion in gels”. [**Results**] Telomeres of five linear plasmids were cloned and sequenced. Compared with the typical *Streptomyces* telomeres, the newly identified telomeres contained multiple palindromes, but some could not “fold-back” of their first conserved palindrome I with the internal palindromes to form a “super-hairpin”, and palindromes of some telomeres did not contain the 3-nt “loop”. [**Conclusion**] New telomere sequences were cloned by a modified procedure. Both folding-back of the telomere palindromes and 3-nt loop of palindromes varied among telomeres.

Keywords: *Streptomyces*; linear plasmid; telomere; replication

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870067, 30770045, 30325003), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021503) and the Chinese Academy of Sciences project (KSCX2-YW-G-014)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

Received: 9 January 2010/ Revised: 18 March 2010