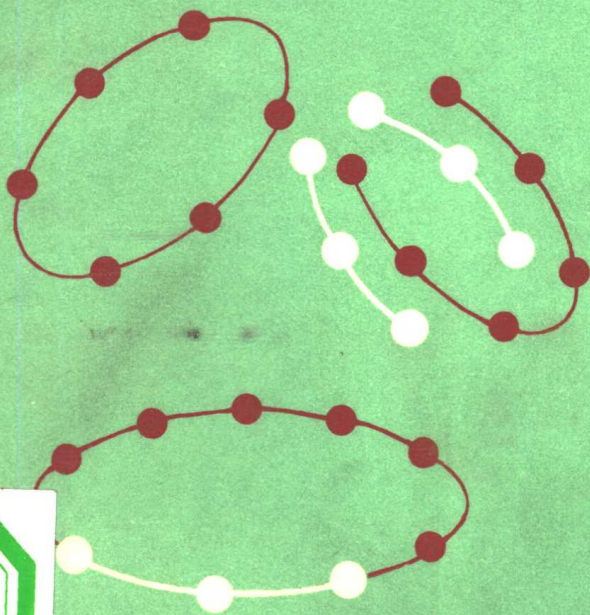


质粒

〔日〕松原谦一 著



科学出版社

质 粒

〔日〕松原谦一 著

程光胜 王清海 译

范云六 校

科 学 出 版 社

1 9 7 9

内 容 简 介

质粒是遗传工程中一个重要的分子载体。本书介绍了有关质粒的基础知识,着重总结了1970—1976年上半年这方面的研究成果,可以作为关于质粒的一本入门读物。

松原謙一 著

プラスミド

講談社 1976

质 粒

〔日〕松原謙一 著

程光胜·王清海 译

范云六 校

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1979年10月第 一 版 开本:787×1092 1/32

1979年10月第一次印刷 印张:7

印数:0001—8,120 字数:156,000

统一书号:13031·1083

本社书号:1517·13-10

定价: 0.87 元

译 者 的 话

人们对质粒研究感到兴趣,是从细菌抗药性问题变得严重时开始的。由于质粒所具有的独特性质,随着分子生物学的迅速发展,它成了分子生物学领域内异常活跃的研究对象。近年来,质粒又是基因工程研究工作中一个重要的分子载体,因而质粒研究更加受到人们关注。

本书介绍了有关质粒的基础知识、着重总结了 1970—1976 年上半年这方面的研究成果,是一本较全面和较浅近的著作。由于基因工程研究工作近来发展很快,这本书可以作为关于质粒的一本入门读物。

译者对书中的个别内容以加注的方式作了必要的简单补充。限于译者的水平,译文中错误与不当之处,希读者指正。

译 者

1978 年 7 月

序

所谓质粒,是指在细胞内寄生和复制的因子。直到最近,关于质粒的研究工作才在现代生物学中占据重要地位,然而,可以毫不夸张地说,它已和细菌病毒的研究并驾齐驱。

在此之前,有一个开展这项研究的奠基和准备时期。这一方面是由于对抗菌素有抗药性的细菌的出现和蔓延,根据社会上的需要,在临床、流行病学等领域开展了大规模的研究。从这些研究中,抗药性因子显露了它的庐山真面目。在这一研究领域中日本的研究工作者曾作出过重大贡献。现在,质粒已成为人们全力以赴地研究的对象,在全世界范围内汇集了大量的资料,就是在今天,这方面的知识仍在不断增进,其势未曾稍减。另一方面,则是完全从理论生物学的兴趣出发,对决定细菌性别的因子和病毒等的性质进行了研究。由于已经得知,抗药因子、决定性别的因子和病毒是非常相似的东西,上述两方面发生汇合和协作交流,就在所必然了。其结果便是运用分子生物学的技术和知识,而使质粒研究得到了飞速的发展,在质和量上都很出色的论文源源不断地出现。

曾经进行过的细菌病毒的研究工作,成了开展质粒研究的样板。然而在今天,就是在质粒本身的工作中,也正在不断获得线索,使我们得以澄清一些生物学上的重大问题,例如重组现象,复制功能单位的基本特征,以及寄生因子与寄主的相互关系等等。

亡故在职守上的渡边力氏,曾对这一研究领域的发展作出过重大贡献,他的《附加体》(岩波书店,1971)一书,是世

界上少见的关于质粒的专著,该书几乎完全概括了1970年前的文献。

本书从分子生物学的观点出发,整理了其后迅速复杂化和扩大化的质粒研究进展,并试图着眼于当前来加以总结。所引用的文献,想尽可能只限于必要时便于查找的那些线索,而不是全部搜罗。可是,由于作者的能力有限,而且有种种限制,恐怕有许多章节未加详述而使内容单薄。错误之处,愿乞教正。

从分子生物学的观点来看,还有另一个广大的领域和质粒研究有关,这就是抗药因子的流行病学和抗药性机制等。这些内容,请参考其它著作。

松原谦一

1976年8月

目 录

第1章	质粒概述	1
1.1	细菌的染色体	1
1.2	复制子	2
1.3	细胞质复制因子——病毒	3
1.4	质粒	5
1.5	质粒研究简史	8
1.6	质粒性质概述	10
1.7	质粒的分布及其性质	13
1.8	质粒的检测和保存	20
1.9	性因子和附加体	22
第2章	质粒 DNA 分子	29
2.1	质粒 DNA 有别于寄主染色体	29
2.2	质粒 DNA 是环状分子	32
2.3	环状 DNA 分子的特性	32
2.4	质粒 DNA 的检测	36
2.5	质粒 DNA 的分子量和拷贝数的测定	40
2.6	质粒 DNA 的制备	42
第3章	质粒的遗传结构	45
3.1	前言	45
3.2	从微细胞中所能合成的蛋白质推测基因数目	46
3.3	质粒变异菌株	47
3.4	F 因子的基因图谱	49
3.5	用异源双链法分析复制子的结构	53
3.6	F 因子的基因无性繁殖	62
3.7	部分变性图谱	63

• v •

第 4 章 遗传重组	68
4.1 Hfr 和 F ⁺ 因子的形成	68
4.2 IS 的发现——极性效应	73
4.3 已插入质粒的 IS	75
4.4 F 因子整合染色体与 IS	76
4.5 R 因子中的倒装重复结构	80
4.6 易位单位	82
第 5 章 质粒的复制	86
5.1 严紧型和松弛型复制控制方式	86
5.2 质粒和细胞复制的协调	87
5.3 随机选择模型	88
5.4 质粒的消除	90
5.5 与质粒复制有关的突变体	92
5.6 对蛋白质合成的抑制作用	97
5.7 在抑制蛋白质合成时发生的 Col E1 因子的复制	97
5.8 不相容性	98
5.9 复合复制子	104
5.10 λ 噬菌体中所见之两个阻遏系统	108
5.11 整合抑制作用	111
5.12 天然复合复制子	112
5.13 质粒的解离	116
5.14 转换	116
第 6 章 从分子水平研究质粒复制机制	126
6.1 复制子中的驱动单位	126
6.2 λ dV 质粒中所见之自身控制系统	127
6.3 复制中间体——复制起源点和复制的进行	131
6.4 连环分子	135
6.5 复制起源点的活化与 DNA 合成	135
6.6 松弛复合体——DNA 和蛋白质的复合体	136
6.7 Col E1 在试管内的复制	140

第7章 质粒的传递机制	144
7.1 遗传物质在细胞间的传递	144
7.2 借助质粒 DNA 进行的转化	144
7.3 利用噬菌体导入质粒	145
7.4 接合传递	147
7.5 接合对的形成	149
7.6 性纤毛	151
7.7 感染带有传递质粒菌的噬菌体	154
7.8 F 因子的 tra 操纵子	156
7.9 在 λ 噬菌体中见到的两个促进转录的系统	157
7.10 传递频率的控制	158
7.11 性纤毛形成的抑制型调节	161
7.12 fi^+ 或 Fin 与性纤毛的相关性	166
7.13 接合过程中 DNA 的传递	166
7.14 特殊的传递	169
7.15 传递的抑制——表面排斥	171
7.16 限制与修饰	173
第8章 质粒和噬菌体的基因操作	180
8.1 前言	180
8.2 已能无性繁殖的基因	181
8.3 限制性内切酶	184
8.4 复制子 DNA 的切割图谱	186
8.5 载体	188
8.6 将 DNA 片段组入载体的操作	192
8.7 重组体的选择	194
8.8 重组 DNA 分子性质的探讨	197
8.9 基因扩增	199
8.10 重组体的管理	200
第9章 质粒的进化	206
9.1 细菌基因体系的变化	206

9.2	从系统发育看复制子的结构	207
9.3	有关复制单位的交换	208
9.4	关于复制控制系统	210
9.5	控制系统的进化	212

第1章 质粒概述

1.1 细菌的染色体

原核细胞,即通常称作细菌的一类单细胞生物,用显微镜观察它们时,可见到类似于核的物质,但它们没有真核细胞(一般叫做高等生物)那种把核和细胞质清楚地分开的核膜。此外,真核细胞在分裂时,出现DNA(基因群)聚集而成的特殊棒状结构(称作染色体),在原核细胞中则不能见到该种结构。然而,已经查明,迄今所研究过的原核细胞的基因,都是依次连锁地排列着,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等细菌中,只存在一个环形的连锁。据认为细菌类似核的物质主要是DNA,由它与RNA或蛋白质进行着相互作用;近年来,由于核酸提取技术的发展,已表明这种DNA是一种环状分子,并已经有可能把基因的排列与DNA分子的结构相对应起来加以考虑。在真核细胞中,在形态上进行过研究的染色体的纵向结构,已发现存在着与基因排列相对应的关系。染色体一词,已用来表示基因具有连锁而排列起来的结构体,同样,习惯上也把机能上表现着连锁的细菌基因结构称作细菌的染色体。

如上所述,由于在连锁着的基因群和DNA分子间有着1对1的对应关系,最近不断有人把细心破碎细菌获得的DNA为主体的类似核的物质,也叫做细菌染色体。确定这一术语的渊源和实体尽管互不相同,但是,“染色体”一词,在真核细

胞和原核细胞中,抽象地说,作为分别表示基因群连锁的结构体而言,是有共同性的。

对细胞生长繁殖不可缺少的一套基因,叫做基因组 (genome),在大肠杆菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌中,如前所述,它由唯一的染色体构成,与此相反,多数真核细胞中则由许多套染色体构成。基因组一词,本来是用于表示特定的生物细胞中能够见到的一套基本的染色体,现在将这个定义加以扩大,使它有了新的内容,即:“自主复制”着的单位所应具有的必不可少的一套基因,因而也可以有“病毒基因组”或“质粒基因组”这样的叫法,这和“病毒或质粒的染色体”一词表示相同的内容。

细菌中没有明确的核结构,形态学上也不存在所谓细胞质实体,但是,在细菌噬菌体(细菌病毒)或质粒的研究中,因为把它们作为“染色体外”独立地行使机能的遗传单位,所以往往把它叫做“细胞质性”因子。这样引伸术语,并造成了混乱,显然是不恰当的,但是,把已有的概念直接套用到新的事物上,多少有点习以为常,这是一种极方便的做法,所以至今许多人仍然爱用。

1.2 复制子

按 Jacob^[1] 的意见,将空间结构上独立的复制单位称作复制子 (replicon),意指复制单位。就迄今所研究过的而言,细菌的染色体尽管由有约 3—4 百万核苷酸对的 DNA 分子组成,在通常生长条件下,它只在一个复制控制系统支配下,作为具有 1 个复制起始点的独立单位进行复制,因此它是 1 个复制子。与此相反,从酵母起,真核细胞的染色体中各有若干个复制起始点,可以认为是多个复制子的复合体。

复制子一词之所以被广泛使用，是因为它恰当地从宏观上表达了细胞内发生的复制系统的相互作用。例如在大肠杆菌中， λ 噬菌体或 F 因子（见后述）等复制时，在某种条件下，它们在空间结构上独立于寄主染色体而进行复制，处于只有某一部分被动地复制的状态。在前一种情况下， λ 噬菌体或 F 因子表现为与染色体无关的复制子的一部分。作为独立的复制子时， λ 噬菌体或 F 因子各自独具的复制控制系统处于活动状态；否则，它们就处于“休眠”状态，只有寄主染色体的复制控制系统活动着。这种变化可以顺利地表现出来。

今天有了复制子这一术语，一个方便之处是自然地导出了这样一个概念：自主复制单位可以区分为两部份，即与复制控制直接有关的结构和无关的结构。换言之，前一部份的“活化”是复制的开始。这就是说，它是整个复制子复制的控制者。因此，只要涉及增殖问题，就应把注意力集中到前一部份。除它之外的部份，尽管占着基因组的大部份，却仅仅与复制有关，只不过是被动地进行活动的附属性 DNA。还因为如此，当发生重组、插入、变异、生理活性基因表达等变化时，尽管它们发生在复制子中，但如果局限于与复制无关的区段，则复制子能承受这些变化，而复制能力不受影响。就这样，复制子始终维持着足够的应变性。

Jacob 等提出复制子这一概念时，还附带提出了他曾研究过的复制控制机制模型（或者说是它的微观解释），由于后来研究工作的进展，这个模型已经过时，失去了现实意义。

1.3 细胞质复制因子——病毒

细菌细胞，除了是染色体的复制场所外，也是各类复制子的复制场所，这些复制子首先是细菌噬菌体，其次是质粒。它

们都是细胞内寄生性复制因子。为了强调它们是独立于寄主染色体的复制单位,把它们叫做核外或染色体外因子 (extra-chromosomal element), 细胞质因子 (cytoplasmic element) 等。叫它做有别于寄主染色体的复制子, 恐怕是最正确的表达。尽管其复制总是或多或少依赖于寄主的机能, 为了强调它是能够在染色体外独立复制的复制子, 习惯上说它处于自主的或独立的(复制)状态 (autonomous state 或 autonomously replicating state)。这种概念模糊的表达方法, 今天依然采用, 是为了强调这些因子具备某种控制自主复制的机制, 并作为一种空间结构上独立的单位活动着。

细菌噬菌体的基因组虽然是由双链或单链的 DNA 或 RNA 等各类物质组成的, 但都有一个比寄主染色体分裂复制更迅速的复制时期, 这叫做营养生长过程。病毒的特征, 便是具有通过营养复制, 使感染单位释放到细胞外, 从而“水平感染”群落中其它细胞的时相。在大肠杆菌培养液中加入 T₄ 或 T₇ 噬菌体, ϕ x 174 噬菌体, Q β 噬菌体等烈性噬菌体时, 假如这种营养复制 $\rightarrow$ 释放 $\rightarrow$ 感染的周期周而复始地进行并释放出噬菌体, 则将一直进行到寄主细菌最终耗尽、以至于连病毒也不能复制时为止。与此相反, λ 噬菌体、P22 噬菌体或 P1 噬菌体等溶原性噬菌体 (或称为温和噬菌体), 虽然有时也会和烈性噬菌体一样复制, 有时却会由于菌的生理状况不同或噬菌体基因组作用改变, 改变了基因表达的平衡, 从而形成了使其自主复制速度与菌的复制速度相一致的机制, 于是溶原状态的 λ 或 P22 噬菌体, 将其自己的基因组整合到寄主染色体中而不再成为独立的复制子, 并建立起连续产生阻遏物的体系, 有选择地抑制自身基因群的转录, 并维持着这种重组状态。若因某种原因破坏了这种抑制机制, 它们便进入与发生感染时同样的营养复制周期; 否则, 它们便只能永久地

作为寄主染色体复制子的一部份而被动地复制。处于特殊状态下的 λ 和 P1 噬菌体, 不整合到寄主染色体中, 而建立起一直保持作为复制子的独立性的溶原状态(见后述)。这也可说成是细胞质复制因子的溶原化。这种状况, 可以理解成是这样一种过程, 即噬菌体基因组与寄主染色体同步复制, 并且形成着在细胞分裂时恰好向 2 个子细胞中分配的机制。但其详细情况还不清楚。

1.4 质粒

第二类细胞质复制因子是质粒。该种因子在空间结构上与寄主染色体不在一起, 是一种进行独立复制的复制子。然而, 它与处于营养复制周期的病毒基因组不同, 常常在寄主细胞内相安无扰地存在着, 遇到细胞分裂时, 就将它的拷贝数准确地分配给每个子细胞。总之, 尽管它每次复制是与染色体分开进行的, 但它们总是同步的, 并且具备着一套保持拷贝数恒定的机制。

现在认为恰当的关于质粒的定义是: “在细菌细胞内作为与寄主染色体有别的复制子进行复制, 并且在细胞分裂时保持恒定地传递给子代细胞的遗传因子”。已知的质粒都是寄生因子, 对于细胞的生存而言, 即使没有它, 细胞基本上也还是可以生存的。因此有时将这一点补充到定义中去。根据这一点, 经常可以借助质粒使带进细胞的基因群表达其遗传信息, 改变或修饰寄主菌原有的代谢产物(基本代谢产物), 或产生新的物质(次级代谢产物), 于是使菌变成有益或有害的东西^[2]。带有抗药性质粒的细菌可以在有抗菌素存在时生存, 除这种情况外, 还有质粒襄助寄主菌生长繁殖的种种事实, 但是, 即使没有这些质粒的细菌, 仍然足以构成一个物种。

质粒的定义正是建立在这种复制特性之上,前述“在细胞质中溶原化”了的噬菌体基因组也是质粒的成员之一。

质粒中,对于其遗传结构、行为、分子性状等研究得最早且详细的,是大肠杆菌的性因子(F因子)。具有这种质粒的菌,形成特殊的表面物质,借它之助,与其它菌接触并发生接合(接合),此时便将质粒基因组(DNA)传递给对方。在F因子的基因组中,具有一些易与它种DNA发生重组的特殊结构部份,也常和寄主染色体发生重组,在接合传递时,把一部份染色体一同转入对方菌体内。

第二个研究历史较长的质粒是大肠杆菌素因子。此因子有好多种,但都寄生在大肠杆菌中,并且形成蛋白质性的抗菌物质。这些抗菌物质有的由单一的蛋白质组成,有的由于因子种类不同而形成复杂粒子,好象缺陷噬菌体,这表示该类因子和噬菌体有关系。在大肠杆菌素产生因子中,ColB, ColV, ColIb等可与F因子一样进行接合传递;而ColE1, ColE2, ColE3等的基因组则小得多,缺少进行自身传递感染的遗传结构。已知还有各种不以大肠杆菌为寄主的产细菌素因子。

抗药性因子也是一种质粒,它具有为某些酶编码的基因,这些酶是对链霉素、氯霉素、磺胺药物进行生物化学修饰而使之钝化的。此外,还存在对青霉素、四环素、卡那霉素等几乎所有市售抗菌素,以及含 Hg^{2+} 等元素的杀菌剂起钝化作用的机制。关于钝化作用,已经发现有乙酰化、腺苷化、磷酸化和水解等作用,其详情请见参考文献。任何一种质粒,都载有一种至多种(四、五种或十种)抗药性标记的基因群。具有多重抗药性标记的因子特称为多重抗药性因子。可以毫不过分地说,抗药性因子复制子的结构和行为,与F因子,或大肠杆菌素因子几乎相同。它们中有的可以进行接合传递,另一些是一些小型因子,象ColE因子那样缺失自身传递的能力。多重

抗药性质粒可由于不断进行接合传递而在细菌群落中传布，是流行病学上一个影响深远的问题。直到最近，由于相当详细地阐明了抗药性标记由一个复制子转移到另一复制子中去的机制，已经可以有意识地将一两种抗药性标记插进大肠菌素产生因子中去。根据 drug resistance (药物抗性)一词的意思，可以把抗药性因子叫做 R, R 因子、抗性因子等等，R 质粒这一称呼。正在普遍地采用。不过本书仍沿用了一种旧称呼。最初在大肠杆菌中发现的抗药性质粒，后在已研究过的几乎所有细菌中都发现了，这可看成是一个指征，表明质粒广泛地分布于自然界。包括以大肠杆菌为主的肠道细菌，以绿脓杆菌为代表的假单胞菌属，和以金黄色葡萄球菌为代表的葡萄球菌属等各种细菌中，都有着业已详细研究过的各种特殊质粒。前二类细菌中，已发现各种传递性质粒，而葡萄球菌中的质粒不能进行自身传递。但这些质粒都容易通过噬菌体转导而在细菌间进行感染。

除此以外，还有携带着各种遗传物质的质粒，可见下列表 1 所示。根据以复制子为中心的观点来看，F 因子，Col 因子，抗药性因子，噬菌体均酷似复制子。虽然它们存在着差异，但恐怕还有目前不曾进行分析的东西。

如果传递性质粒由一个细菌转移到另一细菌，就进行了传布感染，但它以细胞间的接合为必要条件。换言之，在它的生活史中，不象病毒那样，有一个作为粒子存在于细胞外的时期。质粒和病毒虽然都是在细胞内进行寄生复制的复制子，但是人们可以看到，与细胞互不干扰地共存是前者的特征，它们由亲代传向子代时是稳定地“垂直传布”，并且不存在游离于细胞外的情况；相反，病毒的主要特征是通过所谓细胞外粒子的状态，在同一世代的细胞间进行“水平传布”。不过，已经知道有的病毒基因组也会进行“垂直传布”，如象 P1 和 λ 噬菌