

- [28] Terranova, V. P. et al., 1982, *Cancer Res.* 44:2265—2269.
- [29] Malinoff, H. et al., 1982, *J. Cell Biol.* 95:126 a.
- [30] Liotta, L. A. et al., 1983, *J. Cell Biol.* 97(2) Part 2:97 a.
- [31] Kulesh, D. A. & Greene, J. J., 1983, *J. Cell Biol.* 97:449 a.
- [32] McCarthy, J. B. & Furcht, L. T., 1984, *J. Cell Biol.* 98:1474.
- [33] Manthorpe, M. et al., 1983, *J. Cell Biol.* 97:1882—1890.
- [34] Todd, H. S. et al., 1980, *J. Natl. Cancer Inst.* 65:901—904.
- [35] Saba, T. M. et al., 1980, *Br. J. Cancer* 41:956—965.
- [36] Stathakis, N. E. et al., 1981, *J. Clin. Pathol.* 34:504—508.
- [37] Kuusela, P. et al., 1978, *J. Lab. Clin. Med.* 92:595—601.
- [38] Webb, K. S. & Lin, G. J., 1980, *Invest. Urol.* 17:401—404.
- [39] Risteli, J. et al., 1980, *Fresenius Z. Anal. Chem. Band* 301:122.

根瘤菌共生固氮的遗传学研究(二)

马庆生

广西农学院分子遗传学研究室

2. 在根瘤菌研究中成功地运用了转座子诱变技术。

转座子(Transposon)是一种特殊的DNA短片段,它带有抗药性基因,并具有在DNA复制子之间转座插入的能力,转座的发生并不需要 *recA* 基因产物,一些转座子象 Tn 5 的转座插入位点的分布是相当随机的,但另一些象 Tn 10, 它的转座插入似乎具有“热点”(Hot spot), 转座子插入到一个新位点时,被插入位点原基因的连续性受到阻断,因而该基因的功能一般就完全中断,由于转座子本身带有抗药性基因,所以转座子诱变不但产生突变的表型,而且同时带入了抗药性,这二个性状是紧密连锁的,转座子还具有极性,它中断了插入位点的基因正常功能,同时也影响到处于同一操纵子内而位于该中断基因下(downstream)的那些基因的作用,因而转座子也可以用来研究转录作用的情况。

根瘤菌的二个主要性状(结瘤能力和固氮能力)都是不太容易筛选的表型,需要接种上植株才能观察,而用转座子诱变就十分方便,因为用转座子诱变得到的根瘤菌突变体的结瘤、固氮能力缺陷性状,可以十分容易地用抗药

性标记来监察。为了进行转座子诱变,1978年 Beringer^[16]提出了一个把转座子 Tn 5 导入革兰氏阴性菌的方法,他把一条 P 1 群的广谱寄主质粒与噬菌体 Mu 以及 Tn 5 连接在一起,当这样一条复合质粒从大肠杆菌导入受体根瘤菌时,因为具有 Mu 序列的质粒不能在根瘤菌中复制,这样就可以直接筛选 Tn 5 的转座事件,这种质粒也由此被称作为“自杀质粒”(Suicide plasmid),用这种办法 Beringer 得到了许多由于转座子 Tn 5 插入而产生的根瘤菌共生固氮能力的突变体,自那以后很多实验室都广泛应用这种“自杀质粒”的办法来获得根瘤菌共生固氮能力缺陷突变体^[12],但有时在 Tn 5 转位时会一块带入部分 Mu 的 DNA,这对制作 Tn 5 插入位点周围 DNA 遗传图增加了不少困难。

转座子 Tn 5 也可以直接导入根瘤菌染色体,马庆生等^[17]把可自身转移的带有共生固氮基因的豌豆根瘤菌质粒 P^{RLM} 转移到一个在染色体上带有转座子 Tn 5 的菌株,利用 P^{RLM} 自身转移能力成功地筛选到一些不结瘤(Nod⁻)和不固氮(Fix⁻)的突变体,由于转座子 Tn 5 不具有限制性内切酶 EcoR 1 位点,那些邻近转座子 Tn 5 插入位点的根瘤菌 DNA 的 EcoR 1

片段就很容易被克隆到大肠杆菌载体上,然后就可以制作含有这些突变位点的区域内切酶遗传图。

3. 在不同的固氮微生物中决定固氮酶结构基因的 DNA 序列是高度保守的,这有助于在根瘤菌的整个遗传组中发现 *nif* 基因和有关的共生固氮区域。

1979年 Nuti 等^[18]首先报道肺炎克氏杆菌中决定固氮酶结构基因的 DNA 可以跟根瘤菌 DNA 发生同源性分子杂交,第二年 Ruvkun 和 Ausubel^[19]进一步证实了这种保守性,他们检查了许多不同的固氮微生物,其中包括革兰氏阳性和阴性菌、蓝绿藻和弗兰克氏菌(*Frankia*),它们都显示与肺炎克氏杆菌中的 *nif* KDH 基因呈同源性分子杂交,而所有经检查的非固氮微生物则都不呈这种同源性,他们进一步发现在 *nif* KDH 基因中只有 *nif* HD 基因呈高度保守性,而 *nif* K 基因并没有种间同源性。

nif H 基因编码固氮酶的铁(还)蛋白。肺炎

克氏杆菌、苜蓿根瘤菌和鱼腥藻(*Anabaena* 7120)中的 *nif* H 基因 DNA 碱基顺序已被完全测定出来,把得出的 DNA 碱基顺序按遗传密码译为氨基酸排列顺序,发现这些顺序与从巴氏梭菌(*Clostridium Pasteurianum*)和维氏固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)分离提取到的铁(还)蛋白氨基酸排列顺序十分相象,而且相对于 DNA 排列顺序,氨基酸排列顺序更为保守,这可能跟酶的功能有关。

固氮酶结构基因的保守性对检出固氮微生物的 *nif* 基因是十分有用的,肺炎克氏杆菌的 *nif* KDH 基因已被克隆到质粒 P^{SA30}^[20]上,只要用同位素标记 P^{SA30},利用分子原位杂交就很容易检查出某一固氮微生物中与 *nif* KDH 基因同源 DNA 的位置(图1),或者从一个基因文库中(Gene Library)找出含有 *nif* KDH 同源序列的克隆,一旦得到了这种克隆,这个克隆中的有关 DNA 就可以进一步在离体条件下进行各种分析以确定其在共生固氮中的功能,许多实验室就是用这种方法找到了根瘤菌中有关共生固氮的基因群^[21]。

4. 广谱寄主的基因克隆(clone)载体的应用,在大肠杆菌系统中所用的大部分基因克隆载体并不能在根瘤菌中应用,而有的质粒象 RP 4 可以转移到根瘤菌中,但 RP 4 有 50 kb,所以并不适用于基因克隆,Ditta 等^[22]从 RP 4 制作了一个衍生质粒 P^{RK290},它只有 20 kb,但仍然保留了被转移到革兰氏阴性菌去的特性。

广谱寄主的基因克隆载体的优点首先在于它能应用于大多数革兰氏阴性菌,对于某些遗传体系还不健全的革兰氏阴性菌,基因重组的实验可以先在遗传体系比较健全的大肠杆菌中进行,而后通过广谱寄主载体再导入所选择的寄主菌中,更常见的是用广谱寄主载体来制作基因文库,质粒 P^{RK290} 曾被用来制作苜蓿根瘤菌的基因文库^[22],从这个文库中筛选到一个与肺炎克氏杆菌 *nif* KDH 基因有同源 DNA 序列的克隆,这个克隆被用来研究苜蓿根瘤菌的共



图1 检出含有 *nif* KDH 基因的质粒

二个豌豆根瘤菌菌株的质粒 DNA 与用 P³² 标记的质粒 P^{SA30}(含肺炎克氏杆菌 *nif* KDH 基因)进行分子原位杂交,在放射自显影后各有一条质粒带显放射性,这表明该质粒上含有 *nif* KDH 基因,(1)、(2)系豌豆根瘤菌菌株 1 MA 17 和 1 MA 57;(3)、(4)分别为(1)、(2)的放射自显影图谱

生固氮基因。

Friedman 等^[23]在 PRK²⁹⁰ 质粒载体上并入了一个噬菌体 λ 的 cos 位点, 从而组建了一个 cosmid 载体 P^{LAFR1}, 它仍然是广谱寄主载体, 可以导入根瘤菌, 用这样的载体可以克隆比较大片段的正常根瘤菌 DNA (~25 kb), 而且可以被转移到合适根瘤菌受体中以研究所克隆的 DNA 功能。

Long 等^[24]用载体 P^{LAFR1} 制作了苜蓿根瘤菌的基因文库, 并将这基因文库中的克隆都转移到一个不结瘤(Nod⁻)突变的苜蓿根瘤菌受体菌株中去, 从中筛选到能恢复正常结瘤能力的克隆, 从这个克隆中他们定位了结瘤基因, 用同样方法 Downie 和 马庆生等^[25]在豌豆根瘤菌中的质粒 P^{RL111} 上将决定寄主专一性的基因定位在一段只有 10 kb 的 DNA 范围内。

不相容 Q 群(IncQ)的广谱寄主载体 P^{KT230} 也是在根瘤菌研究中常用载体之一。它的大小为 11.9 kb, 带有抗卡那霉素和链霉素基因。

用广谱寄主载体 PRK²⁹⁰, Ruvkun 和 Ausubel^[26] 首创了一个在细菌中定位诱变(site-directed mutagenesis)的方法, 他们在苜蓿根瘤菌中先克隆到与肺炎克氏杆菌 nif KDH 基因同源的 DNA 片段, 在大肠杆菌中进行转座子 Tn 5 诱变, 然后将插入有 Tn 5 的片段连接到质粒 PRK²⁹⁰ 上, 这新形成的“杂种”质粒被转移到原来的苜蓿根瘤菌中, 与此同时他们又转移一个与 PRK²⁹⁰ 不相容的质粒进入同一苜蓿根瘤菌受体, 然后给以一定的选择条件来筛选那些含有 Tn 5 DNA 片段, 并且已被交换到受体遗传组的重组子, 这样就选到了在已知位点插入了转座子 Tn 5 的突变, 一旦找到了一个突变, 整个实验过程还可以重复, 这对于研究相对于一个已知位点的邻近 DNA 片段的功能是十分有价值的, 在根瘤菌研究中这个办法常用来研究邻近 nif KDH 基因的 DNA 功能。

根瘤菌中的共生固氮基因群

通常人们用结瘤基因(Nod)和固氮基因(Fix)来代表根瘤菌的二个主要性状, 然而这二

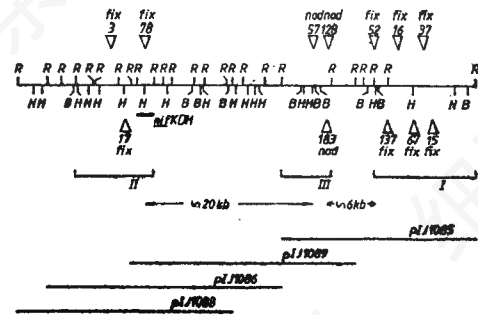


图 2 豌豆根瘤菌质粒 P^{RL111} 中的共生固氮区域遗传图

R, EcoRI; B, BamHI, H, Hind III (内切酶位点) nod, 不结瘤突变; fix, 不固氮突变, nif KDH, 固氮酶结构基因。

个基因命名是相当笼统的, 这只是在对结瘤基因和固氮基因缺少深入了解时的统称, 经过这几年的研究, 在识别根瘤菌有关结瘤基因和固氮基因的工作中已取得很大进展。

在豌豆根瘤菌中, 马庆生等^[17, 25, 27]在用转座子 Tn 5 诱变中, 筛选到质粒 P^{RL111} 上的插入突变体(3 个为 Nod⁻, 9 个为 Fix⁻)后, 经过基因克隆和制作含质粒 P^{RL111} 的根瘤菌基因文库, 成功地从基因文库中筛选到一系列含有这些插入突变位点 DNA 的克隆, 通过限制性内切酶分析和 DNA 分子原位杂交, 这些突变位点被定位在一段长 45 kb 的区域内(图 2), 三个不结瘤突变位点相距不到 1.5 kb, 九个不固氮突变位点被分成了二组, 三个位于不结瘤突变位点左边, 而另外六个位于右边, 有关结瘤的基因离开固氮酶结构基因 nif KDH 约 20 kb, 而离另一固氮基因群约 6 kb。

三个不结瘤突变位点都在同一个 EcoR I 片段内, 这个 EcoR I 片段被克隆到相应载体上, 并进行 Tn 5 饱和插入诱变, 结果发现能引起 Nod⁻ 表型的范围不超过 2 kb, 如果平均 1 kb DNA 代表一个基因的话, 2 kb 最多也只能是 2 个基因, 这和传统的对一个复杂的结瘤过程所期望的基因数有较大的不同, 现在 Johnston 等已完成了这一段 DNA 的碱基顺序测定(Johnston, 私人通讯), 不久就应该有比较明确的结果。

在苜蓿根瘤菌中,1982年 Ruvkun 等克隆了邻近 *nif* KDH 基因的一段长 18 kb 的 DNA 片段,经过转座子 Tn 5 饱和诱变,他们发现与固氮有关的 DNA 分布在二个区域,一个长 6.3 kb,另一个长 5.0 kb,中间隔有一段 1.6 kb 的“空白区域”,转座子插入到这 1.6 kb 区域并不产生突变表型,同年 Long 等^[24]用广谱寄主质粒载体直接互补的办法定位了苜蓿根瘤菌的结瘤基因,该结瘤基因相距 Ruvkun 等定位的 *nif* KDH 基因约 30 kb,随后 Long 等也用转座子 Tn 5 在邻近结瘤基因的 DNA 片段进行饱和诱变,发现与结瘤有关的 DNA 片段也只局限在长约 4 kb 的范围内(Long, 私人通讯)。

在三叶草根瘤菌中, Schofield 等^[28]用转座子 Tn 5 诱变技术得到了不结瘤突变菌株 ANU 851,他们先用分子原位杂交发现在菌株 ANU 851 中, Tn 5 插入在一条长为 180 kb 的质粒上,而后通过制作含有该质粒的基因文库,用类似方法制作了有关共生固氮区域遗传图,根据他们的结果,结瘤基因相距 *nif* HD 基因约为 16 kb,但结瘤基因的范围尚未准确定出。

从这三种根瘤菌的共生固氮基因群遗传图上,可以看出有关结瘤基因、固氮基因都分布在一个并不很长的区域内,它们的位置与自然条件下结瘤、固氮功能表达的先后并不成直线对应关系,因而在基因调控上也提出了十分有趣的问题,在豌豆和苜蓿根瘤菌中已发现一些可能是根瘤菌固氮调节基因的 DNA 序列^[29],对这些可能的调节基因的真实功能正在进行深入研究。

纵观这几年在根瘤菌共生固氮遗传上的进展,有关共生固氮基因群的定位和克隆无疑是一个重大成就,但这些基因除少数外尚未一一得到确认,有关固氮调节基因的研究也才开始,随着分子遗传学技术的发展,这些问题一定会得到进一步了解。

参 考 文 献

- [1] Trinick, M. J., 1980, *New Phytol.* 85:37—45.
- [2] Keyser, H. H., Bohlool, B. B., Hu, T. S., Weber, D. F., 1982, *Science*. 215:1631—1632.
- [3] Kurz, W. G. W. and Larue, T. A., 1975, *Nature*, (London). 256:407—409.
- [4] Kijne, J. W., Van Der Schaal, I. A. M., De Vries, G. E., 1980, *Plant. Sci. Lett.* 18:65—74.
- [5] Haas, D. and Holloway, B. W., 1976, *Mol. Gen. Genet* 144:234—251.
- [6] Johnston, A. W. B. and Beringer, J. E., 1977, *Nature* (London) 267:611—613.
- [7] Buchanan-Wollaston, A. V., 1979, *J. Gen Microbiol* 112:135—142.
- [8] Clewell, D. B. and Helinski, D. R., 1969, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62:1159—1166.
- [9] Nuti, M. P., Ledeboer, A. M., Lepidi, A. A. Schilperoort, R. A. 1977, *J. Gen Microbiol* 100:241—248.
- [10] Higashi, S., 1967, *J. Gen Appl Microbiol* 13:391—403.
- [11] Johnston, A. W. B., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V. Setchell, S. M., Hirsch, P. R., Beringer, J. E. 1978, *Nature*, (London). 276:634—636.
- [12] Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I., Kondorosi, A., 1981, *Mol. Gen. Genet.* 184:318—325.
- [13] Cannon, F. C., Reidel, G. E. and Ausubel, F. M., 1977, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:2963—2967.
- [14] Hombrecher, G., Brewin, N. J., Johnston, A. W. B., 1981, *Mol. Gen. Genet.* 128:133—136.
- [15] Krol, A. J. M., Hontelez, J. G. J., Kammen, A. V., 1982, *J. Gen. Microbiol.* 128:1839—1847.
- [16] Beringer, J. E., Beynon, J. L. Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston A. W. B., 1978, *Nature*. (London). 276:633—634.
- [17] Ma, Q. S., Johnston, A. W. B., Hombrecher, G and Downie, J. A., 1982, *Mol Gen Genet* 187:166—171.
- [18] Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Prakash, R. K., Schilperoort, R. A. Cannon, F. C., 1979, *Nature*, (London). 282:533—535.
- [19] Ruvkun, G. B., and Ausubel, F. M., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:191—195.
- [20] Cannon, F. C., Reidel, G. E., Ausubel, F. M., 1979, *Mol. Gen. Genet.* 174:59—66.
- [21] Corbin, D., Ditta, G., Helinski, D. R., 1982, *J. Bacteriol.* 149:221—228.

- [22] Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D. R., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347—7351.
- [23] Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, W. J., Ausubel, F. M., 1982, *Gene* 18:289—296.
- [24] Long, S. R., Buikema, W. J., Ausubel, F. M., 1982, *Nature*, (London). 298:485—488.
- [25] Downie, J. A., Ma, Q. S., Knight, C. D., Hombrecher, G., Johnston, A. W. B., 1983, *The EMBO Journal*. 2:947—952.
- [26] Ruvkun, G. B. and Ausubel, F. M., 1981, *Nature*, (London) 289:85—88.
- [27] Downie, J. A., Hombrecher, G., Ma, Q. S., Knight, C. D., Wells, B., Johnston, A. W. B., 1983, *Mol. Gen. Genet.* 190:359—365.
- [28] Schofield, P. R., Djordjevic, M. A., Folfe, B. G., Shine, J., Watson, J. M., 1983, *Mol. Gen. Genet* 192:459—465.
- [29] Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow., D. W., Ausubel, F. M., 1983., *Nature* (London) 301:728—732.

钙调蛋白的分布

祖父江宪治

钙调蛋白(Calmodulin, 简写 CaM), 自从作为磷酸二酯酶的 Ca^{2+} 依赖性激活蛋白, 被发现以来, 现在已清楚 CaM 还是各种 Ca^{2+} 依赖性酶系的激活因子。据报道, 在哺乳动物的各种组织以及蛙卵、章鱼、海胆卵、蚯蚓、扇贝、海葵、海藻、藻类、霉菌、粘菌、四膜虫、大麦、人参、大豆、菠菜中都分离到了 CaM 或类 CaM 蛋白。显然 CaM 的广泛分布和作用是其特有的多功能性分不开的。然而各种 CaM 的氨基酸组成很相似, 氨基酸顺序也只是在种属上有点差异。大多数 CaM 有一个三甲赖氨酸残基, 没有胱氨酸残基, 这些正是同肌钙蛋白 C 的区别之一。本文想通过分析 CaM 的存在方式来综述 CaM 的分布, 特别是细胞内分布。

研究 CaM 分布必须解决如何定量的问题。现在一般采用二种方法, 即酶学方法(以激活磷酸二酯酶等 CaM 依赖性酶的能力进行定量的方法)和用 CaM 抗体的免疫学方法。我们建立的酶学定量法能对上清液和沉淀中 CaM 进行定量(以往的酶法只能测定上清液部分), 对象是组织中完整的 CaM。免疫学方法最近也被用来定量, 但还不能进行系统的组织分布测定。因此, 以下阐述组织分布以酶学方法为主, 细胞内分布以免疫学方法为主。

哺乳动物 CaM 的组织分布特点是脑、肾上腺和脑下垂体等分泌性组织中较多。CaM 在脑部的分布是大脑和小脑皮质以及下丘脑多, 在白质中少。有报道说, 这些分泌性组织的分泌机理中有肌动蛋白和微管蛋白等细胞骨架蛋白参与, CaM 是通过其结合蛋白来调节细胞骨架的机能。这有助于理解 CaM 在上述组织

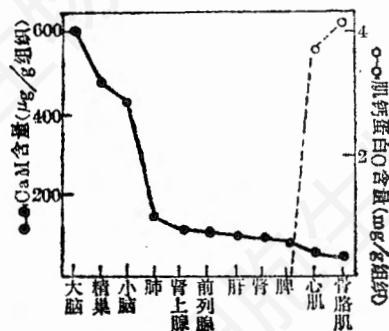


图 1 CaM 和肌钙蛋白 C 的组织分布比较

中的功能。精巢中的 CaM 含量同脑中的含量相近, 但 CaM 依赖性酶只有磷酸二酯酶一种, 量也很少。因此, 精巢中 CaM 量为什么这样多还是个谜。骨骼肌的 CaM 含量最少。

组织分布中引人注目的是 CaM 和肌钙蛋白 C 的分布不同(图 1), 脑和精巢 CaM 含量最高, 心肌和骨骼肌最低。肌钙蛋白 C 集中在 CaM 含量最少的心肌和骨骼肌中, 其他组织中尚无报道。在非肌肉组织的复杂的 Ca^{2+} 调节机制中, 多功能的 CaM 起主要作用, 但到了肌肉中功能则局限于收缩蛋白的 Ca^{2+} 调节和能量产生系统, 在收缩系统中 CaM 更为专一化, 变成只有单一功能的肌钙蛋白 C, 在能量产生系统中 CaM 参与 Ca^{2+} 调节, 从某种意义上说, 这是一种合乎组织要求的进化。

现在知道将动物组织放在含螯合剂的缓冲液中匀浆, 然后以 $105,000 \times g$ 离心 1 小时, CaM 会分布于