

的 Ti 质粒(一)

白永廷 唐 惕 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所 细胞生理室)

植物肿瘤与 Ti 质粒

许多双子叶植物常发生一种叫冠瘿的肿瘤病,这一名称的由来是因肿瘤着生在近地面的根茎交界处,形似一顶帽子。冠瘿病曾在法国、东欧和澳大利亚的葡萄和其他果树上大面积发生,造成了很大的危害。Smith & Townsent 在 1907 年已发现冠瘿是根癌农杆菌引起的^[1]。该菌生活在土壤中,是革兰氏阴性杆菌,有一个或多个周生鞭毛,分类学上属于根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)。发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)和悬钩子农杆菌(*A. rubi*)也属于这一科。发根农杆菌使植物发生发状根病,在很小的肿瘤表面密布发状的根,悬钩子农杆菌使植物产生藤条状瘿。这些细菌从植物中分离出来后,在实验室里可诱导许多双子叶植物发生肿瘤。常用于接瘤试验的植物有烟草、番茄、马铃薯、向日葵、豌豆、胡萝卜和落地生根等。诱发肿瘤的方法如下:用针或解剖刀在健康的植株茎部划一个或数个切口,将新培养的细菌接种到伤口上,二周到一个月后在切口部位出现肿瘤组织。

四十年代 Braun 等人首先研究了冠瘿与农杆菌的关系,他们发现不同菌株的农杆菌具有不同的肿瘤发生能力,有的菌株不能诱发肿瘤。由于离体培养肿瘤组织时,培养基内不需添加植物激素,因而人们对细菌诱发肿瘤的说法产生了怀疑。Braun 提出了肿瘤诱导因子(TIP—tumor-inducing principle),对这一因子的本质不清楚,但推测是一种染色体外的因子^[2]。有人提出该因子是噬菌体或农杆菌的组分。六十年代,法国的 Morel 等人发现植物肿瘤组织中含有高浓度的特殊氨基酸^[3],常见的是章鱼肉

碱(octopine)和胭脂碱(nopaline),它们总称为冠瘿碱(opines)^[4]。正常的植物组织不含有冠瘿碱。Petit 等人证明肿瘤组织合成的冠瘿碱种类取决于菌的类型,而与宿主植物无关。此外,诱导肿瘤组织合成章鱼肉碱的菌株能利用章鱼肉碱做唯一碳源和氮源而生存,但不能利用胭脂碱,相反,诱导合成胭脂碱的菌株仅能利用胭脂碱。由于肿瘤发生和冠瘿碱合成之间有如此紧密的联系,所以作者推测,细菌携带的遗传物质进入了植物细胞,这种遗传物质既诱发肿瘤,又可决定肿瘤的形态和冠瘿碱的合成。Kerr 发现农杆菌的致瘤能力可以在菌株间进行转移,他将无致瘤能力的菌株和致瘤菌株同时接种到植株上,数星期后再将它们分别分离出来,结果原来不能诱发肿瘤的菌株获得了致瘤能力,因而推论致瘤能力一定与某种感染性实体有关系^[5]。Zaenen 等人^[6]从致瘤农杆菌中分离到一类巨大质粒,称为致瘤质粒(Tumor-inducing plasmid),简称为 Ti 质粒(pTi)。凡有致瘤能力的农杆菌都带有 Ti 质粒,丢失 Ti 质粒后致瘤能力则完全丧失,从而证明, Ti 质粒就是 Braun 假设的肿瘤诱导因子。以后一系列的结果进一步证明了冠瘿碱合成和其他一些功能都是 Ti 质粒携带的遗传信息决定的。Chilton 等人^[7]利用分子杂交技术证明了植物肿瘤细胞中存在有一段外来 DNA,它和 Ti 质粒的一段 DNA 有同源性,是整合进植物染色体的农杆菌质粒 DNA 的片段,称转移 DNA(transferred DNA),简称 T-DNA。已知 T-DNA 内有致瘤和冠瘿碱合成酶等基因。由于根癌农杆菌不仅使植物细胞转化为肿瘤状态,而且肿瘤细胞可大量合成冠瘿碱,后者释放到土壤中,又有利于农杆菌的繁殖和 Ti 质粒的

转移,故有人将这一过程称为分子内共生或遗传殖民地化^[8]。这是自然界中存在的天然基因工程,农杆菌通过 Ti 质粒使植物细胞发生转

化。因此 Ti 质粒引起了人们极大的兴趣,目前国际上已有较多的实验室从事 Ti 质粒的结构和功能的研究,几年来已确定了 Ti 质粒上

表 1 部分根癌农杆菌和发根农杆菌菌株的特性

菌 株	起 源	致瘤	Octopine 利用能力	Nopaline 利用能力	质 粒	
					名 称	分子量 $\times 10^6$
1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> B 6	苹果瘤	+	+	-	pTi-B 6, pAt-B 6	120 $\pm$ 7; 131 $\pm$ 7
209	番茄瘤	+	+	-	pTi 15955	
A 6	蔗莓瘤	+	+	-	pTiA 6	115 $\pm$ 7
NCPPB 1001	葡萄瘤	+	+	-	pTi 1001	
C 58	樱桃瘤	+	-	+	pTi-C 58, pAt-C 58	132 $\pm$ 5; 300
27917	生长病桃 树的土壤	+	-	+	pTi-1 D 135	
T 37	核桃瘤	+	-	+	pTi-T 37, pAt-T 37	
H 100	蛇麻草瘤	+	-	+	pTi-H 100, pAt-H 100	
27	白杨瘤	+	+	+	pTi-27, pAt-27	153 $\pm$ 10; 127 $\pm$ 5
223	/	+	+	+	pTi-223, pAt-223	125 $\pm$ 2; 133 $\pm$ 2
84	生长病桃 树的土壤	-	+	+	pAt-84 a, pAt-84 b	30 $\pm$ 2; 124 $\pm$ 4
EU 6	卫矛瘤	+	-	+	pTi-EU 6, pAt-EU 6	
AT 181	白杨瘤	+	-	+	pTi-AT 181 pAt-AT 181	
B ₀ 524	大丽花瘤	+	-	-	pTi-542 pAt-542 a pAt-542 b pAt-542 c	152 24 24 47
AG 19	葡萄瘤	-	+	-	pAt-AG 19 a pAt-AG 19 b	65 $\pm$ 2 95 $\pm$ 1
T 10/73 A	玫瑰瘤	+	+	+	pTi-T 10/73 A pAt-T 10/73 A	98 $\pm$ 6 98 $\pm$ 6
2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 8196	/	+	利用 mannopine	/	pRi 8196	137 $\pm$ 2
A 4	/	+	利用 Agropine	/	pArA 4 a pArA 4 b = pRi A 4 pArA 4 c	/

各种基因的位置和它们在植物细胞中的表达, Ti 质粒作为基因载体将外来基因引入植物细胞已有实现的可能性^[9-11]。

Ti 质粒的性质

根癌农杆菌的 Ti 质粒是环状 DNA, 分子量为 $90-150 \times 10^6$ 道尔顿, 最近有人发现存在有较小分子量的 Ti 质粒。根癌农杆菌中还有称为隐秘质粒(pAt)的其他质粒, 如 C 58 菌内还有一个大质粒(300×10^6 道尔顿), 隐秘质粒的功能还不清楚, 有的可能是缺陷的 Ti 质粒。表 1 内列举了部分菌株的特性。

最近发现发根农杆菌含有诱导长根的质粒, 简称 Ri 质粒(pRi)^[12]。

由于 Ti 质粒的分子量大, 拷贝数少, 不易分离。目前常用下述方法分离: 先用 SDS (硫酸十二酯钠) 溶解细胞, 切断染色体 DNA,

并使后者在碱性介质中变性, 再用酚处理除去单链的 DNA, 然后用氯化铯—溴化乙锭平衡密度梯度离心, 最后纯化并浓缩 Ti 质粒^[13]。有些作者对溶菌条件和排除染色体 DNA 的步骤作了若干改进和简化, 便于小剂量操作和快速鉴定。

致瘤的根癌农杆菌中都有 Ti 质粒, 但有些菌株经 37°C 高温处理后会丢失 Ti 质粒, 因而丧失致瘤能力, 这类菌株可称为治愈菌株。它们可以通过接合转移重新获得 Ti 质粒, 并恢复致瘤能力。Ti 质粒的转移现象最初是在植物体内发现的, 后来证明在体外也能进行。通常 Ti 质粒的转移是受阻遏的, 经过冠瘿碱的诱导或广泛宿主域的质粒(如 RP 4)的动员, Ti 质粒才能转移。可以筛选获得 Ti 转移受阻遏的突变 Ti 质粒, 不需诱导或动员即可进行接合转移, 因而极大地方便了 Ti 质粒的改建

表 2 冠瘿碱的化学结构

章鱼肉碱族	胭脂碱族	农杆菌族
1. 章鱼肉碱 $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{CNH}(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \diagdown \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCOOH} \end{array}$	1. 胭脂碱 $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{CNH}(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \diagdown \\ \text{NH} \\ \\ \text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH} \end{array}$	1. 农杆菌 $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH} \quad \text{NH} \\ \quad \diagup \\ \text{O} \quad \text{CH}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \quad \text{CO} \end{array}$
2. 赖氨酸 $\begin{array}{c} \text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCOOH} \end{array}$	2. 胭脂碱酸 $\begin{array}{c} \text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH} \end{array}$	2. 甘露碱 $\begin{array}{c} \text{HOH}_2\text{C}(\text{CHOH})_2\text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{HOOCCH}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2 \end{array}$
3. 章鱼肉碱酸 $\begin{array}{c} \text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCOOH} \end{array}$	3. 甘露碱酸 $\begin{array}{c} \text{HOH}_2\text{C}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{HOOCCH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH} \end{array}$	
4. 组氨酸 $\begin{array}{c} \text{HC}-\text{CCH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \quad \\ \text{HN} \quad \text{NH} \quad \text{NH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_3\text{CHCOOH} \end{array}$	4. 农杆菌酸 $\begin{array}{c} \text{HOH}_2\text{C}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2 \\ \\ \text{N}-\text{CO} \\ \quad \\ \text{HOOCCH} \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	

工作^[14]。用分离纯化的 Ti 质粒可以转化不致瘤的农杆菌菌株,使之获得诱导肿瘤的能力,这是 Ti 质粒决定肿瘤发生的直接证据^[15]。

冠瘿碱的合成能力也是由 Ti 质粒所决定,迄今植物肿瘤中发现的冠瘿碱种类与 Ti 质粒的类型有关系。研究较多的有三种冠瘿碱:胭脂碱、章鱼肉碱和农杆菌碱(agropine)。属章鱼肉碱的还有章鱼肉酸(octopinic acid)、赖氨酸碱(lysopine)、组氨酸碱(histopine)。胭脂碱类还有胭脂酸(nopalinic acid)和鸟氨酸碱(ornaline)等。根据肿瘤合成的冠瘿碱类型,Ti 质粒也分为章鱼肉碱型、胭脂碱型和农杆菌碱型,后者最初称为零型,因当时农杆菌碱尚未发现(详见表 2)。

最近发现了第四种冠瘿碱——农杆菌素碱(agrocinopine),是一类磷酸化的糖,化学结构式尚不清楚^[16]。前三种类型的 Ti 质粒的限制性内切核酸酶的图谱有差异。DNA 复性动力学的结果证明,不同类型的 Ti 质粒有一定程度的同源性,T-DNA 区中有一段同源区,是属于最保守的部分。章鱼肉碱和胭脂碱二类型的 Ti 质粒通过 Southern 分子杂交方法可分辨出几个广泛的同源区;电镜异源杂双链分析结果证实,四个大段同源顺序约为总同源区的 30%,其中 a 和 d 二段的相对次序相同,而 b 和 c 二段的次序则相反(图 1)。此外,在整个同源区内散布有一些不同源的片段^[17]。

Ti 质粒也具有分解代谢功能,它们编码分解代谢冠瘿碱的酶系,使根癌农杆菌具有一种独特的能力,能利用肿瘤组织产生的冠瘿碱做唯一的碳源和氮源而赖以生存。

Ti 质粒的基因图

Chilton 等人^[18]利用内切酶 SmaI 和 HpaI 分解章鱼肉碱型的 Ti 质粒 B 6-806,然后将酶切片段进行杂交分析,排列成完整的物理图。以后利用分子克隆方法制做了章鱼肉碱型的 Ti 质粒 B 6 和 Ach 5,胭脂碱型的 Ti 质粒 C 58 和 T 37 的物理图^[19,20]。制图时先用 Hind III 分解 Ti 质粒,获得的大片段克隆进 pBR 322 质粒,

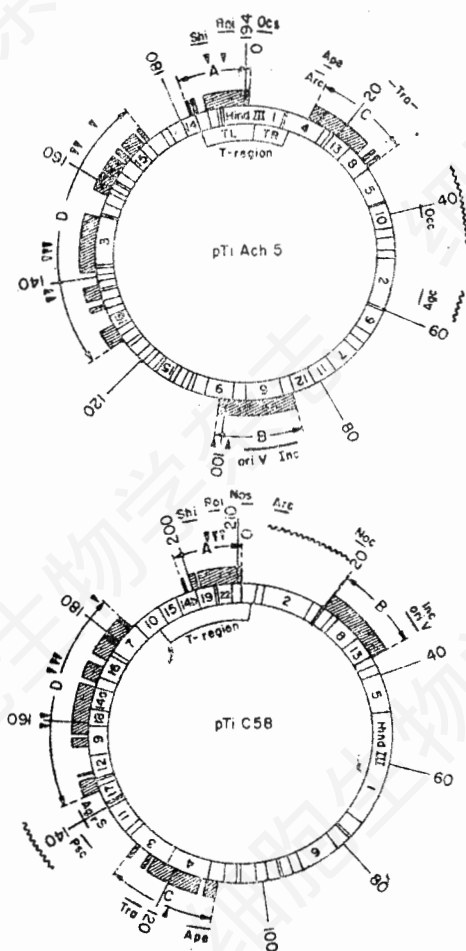


图 1 Ti 质粒的基因图(根据 Engler)^[17]

pTiAch 5—章鱼肉碱型 Ti 质粒

pTiC 58—胭脂碱型 Ti 质粒

——同源区

~~~~~分解代谢功能区

↓——影响致瘤能力的嵌入位点

基因缩写见表 3

不同的克隆再经各种内切酶分解,进行分子杂交,最后组成 Hind III、HpaI、KpnI、EcoRI、XbaI 和 BamHI 的 Ti 物理图(图 2 和 3),这些图为制作 Ti 质粒的功能图奠定了基础。

鉴别 Ti 质粒上编码的基因时广泛利用细菌的转座子(transposon),使 Ti 质粒发生嵌入突变和缺失突变。细菌转座子带有各种抗菌素抗性的基因,在转座过程中它们可嵌入 Ti 质粒,使根癌农杆菌带有相应的抗菌素抗性,因

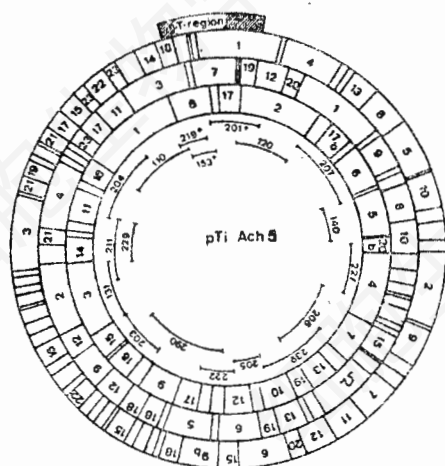


图2 章鱼肉碱型 Ti 质粒的物理图<sup>[19]</sup>

外圈——Hind III 酶切图；  
中圈——EcoRI 酶切图；  
内圈——BamHI 酶切图

而可方便地筛选出转座子嵌入的突变体。由于在转座子嵌入处的编码基因发生失活，因而可通过分析 Ti 质粒限制酶片段的变化，如某些

片段消失或电泳迁移率改变，确定这些基因在图上的位置。目前已鉴定了十多个 Ti 质粒的基因(见表3和图1)。

1. 致癌基因(Roi, Shi, Vir等), 分布在 Ti 质粒图上若干处, 有多个基因参与下列过程: 细菌吸附到植物细胞上、Ti 质粒进入细胞、T-DNA 整合进植物细胞核 DNA 以及肿瘤表型的表达等。

2. 冠瘿碱生物合成基因(Ocs 或 Nos), 位于 T-DNA 区内, 它们编码相应的冠瘿碱合成酶。

3. 冠瘿碱分解代谢基因(Occ 或 Noc), 具有复杂的操纵子结构。有透性酶、脱氢酶和正负控制基因。含有冠瘿碱分解代谢的基因的 Ti 质粒片段已分离出来并做成克隆, 研究了它们在大肠杆菌和根癌农杆菌中的表达。章鱼肉碱和胭脂碱的分解代谢基因的位置不同, 它们之间的同源性很小。

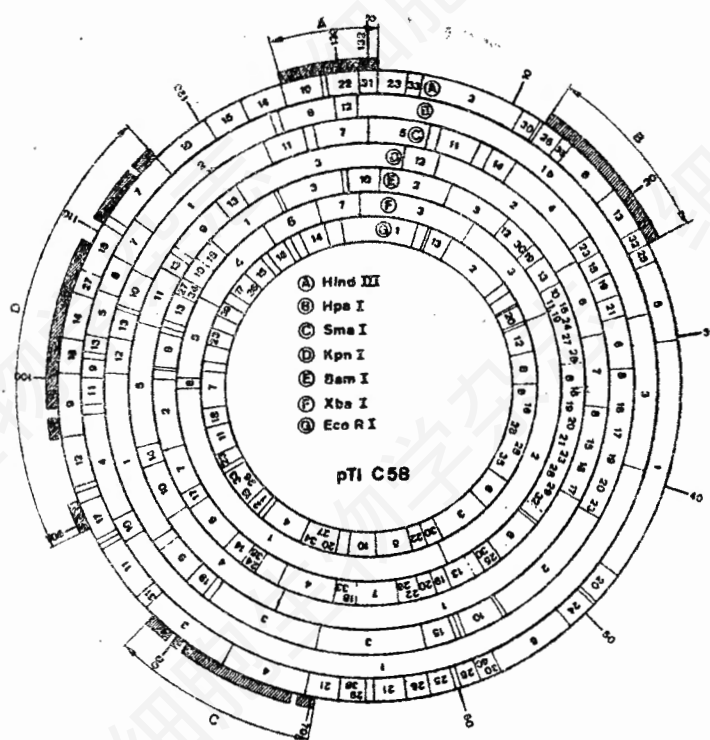


图3 胭脂碱型 Ti 质粒的物理图<sup>[20]</sup>  
和 pTiAch 5 的同源区

表 3 Ti质粒上编码的基因

| 基因缩写             | 表 型                    | 在基因图上的近似位置(kb)  |                  |
|------------------|------------------------|-----------------|------------------|
|                  |                        | pTiC 58(211 kb) | pTiAch 5(195 kb) |
| Ape              | 排斥噬菌体 API              | 111—113         | 10—12            |
| Agr <sup>s</sup> | 对 PAT-K 84 质粒编码的农杆菌素敏感 | 138—141         | —                |
| Arc              | 分解精氨酸                  | 4—5             | 9—10             |
| Agc              | 分解农杆菌碱                 | —               | 54—57            |
| Noc              | 分解胭脂碱                  | 18—20           | —                |
| Nos              | 合成胭脂碱                  | 0—1             | —                |
| Occ              | 分解章鱼肉碱                 | —               | 39—41            |
| Ocs              | 合成章鱼肉碱                 | —               | 0—1              |
| Ori              | 复制起点                   | 33—35           | 90—95            |
| Psc              | 分解磷酸化的糖                | 136—138         | —                |
| Roi              | 抑制长根                   | 206—207         | 190—192          |
| Shi              | 抑制长芽                   | 202—203         | 187—188          |
| Tra              | Ti 质粒转移                | 121—123         | 21—30            |
| Inc              | 质粒不相容性                 | 33—35           | 90—95            |

4. 接合转移基因(Tra), 控制 Ti 质粒在农杆菌菌株之间的转移。冠瘿碱能激活 Tra 基因, 诱导 Ti 质粒转移, 并可分离到组成型突变体(Tra<sup>c</sup>), 即转移基因除阻遏的突变体, 在没有冠瘿碱诱导的条件下 Ti 质粒就能自动地在农杆菌菌株间进行转移。

5. 农杆菌素(agrocin)敏感基因(Agr<sup>s</sup>)。有些根癌农杆菌菌株, 如 K 84 和 396 能产生毒素——农杆菌素, 它是一种核苷酸类似物。对该毒素的敏感性是由胭脂碱型的 Ti 质粒决定的。

6. 噬菌体排斥基因(Ape), 噬菌体 Ap-1 感染带有胭脂碱型或章鱼肉碱型的 Ti 质粒的细菌后仅能杀死细菌, 但不能繁殖形成子代噬菌体, 不能完成生长周期, 这现象称为噬菌体排斥, 如果 Ti 质粒发生突变或缺失, 此现象则消失。

7. 其他基因, 如精氨酸分解代谢基因(Arc)、DNA 复制基因(Dna)、DNA 内切酶 A 基因、宿主特异性基因(Hsp)等。

(未完待续)

## 中国细胞生物学学会征求会徽启事

我会决定征求会徽图案, 要求如下:

1. 图案简单美观, 适用于信纸、信封、会议通知及其他有关材料中。
2. 中国细胞生物学学会的英文译名为 The Chinese Society for Cell Biology, 缩写为 CBCS。

3. 图案含义尽可能与细胞生物学内容有联系。

欢迎踊跃投稿。来稿不论采用与否均增阅本刊一年。画稿如录用, 将另致稿酬。

来稿请寄: 上海岳阳路 320 号上海细胞生物研究所内, 中国细胞生物学学会秘书处收。

截至日期: 1985 年 1 月底。