

环形 DNA 分子的寡聚物

黄熙泰 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所生物化学及分子生物学研究室)

六十年代初,人们已经证明许多 DNA 分子具有环形结构。细菌染色体、质粒以及某些噬菌体和病毒的 DNA,真核生物的线粒体 DNA 及叶绿体 DNA 等都是由双链 DNA 组成的环形分子。之后,在 1967 年, Vinograd 及 Hudson^[1] 等人利用溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心法及电镜法在 HeLa 细胞中发现了一类连环式的线粒体 DNA 寡聚物(称之为“Catenane”或“Interlocked DNA”)。图 1a(见封三)是作者实验室拍摄的质粒 pBR322 DNA 连环二聚物的电镜照片。这类寡聚物内的 DNA 分子环环相套,依次相连犹如一条锁链。与此同时, Clayton 和 Vinograd^[2] 等人从慢性粒细胞白血病人白细胞中也发现线粒体 DNA 的连环寡聚物和由同一个线粒体 DNA 分子多次同向重复串联成大环的环状寡聚物(称之为 Multimer 或 Circular oligomer DNA)。后一种聚合物的周长是单个线粒体 DNA 分子长度的整倍数(见封三图 1b)。

Vinograd 和 Helinski^[3] 等人为环形 DNA 分子的寡聚物研究奠定了基础。此后,许多科学家陆续发现许多环形 DNA 可组成这两类寡聚物。例如噬菌体 DNA,哺乳动物病毒 DNA,细菌质粒 DNA 以及线粒体 DNA 等寡聚物。并且还发现锥形虫尾基粒 DNA (Kinetoplast DNA k-DNA) 的连环多聚现象^[4]。它是由许多线粒体 DNA 形成的巨大的 DNA 网状结构。图 2(见封三)是由 DNA 拓扑异构酶在体外合成的多聚环形 DNA 网状结构的电镜照片^[5]。

由于这两类环形 DNA 分子寡聚物的形成

必然伴随着 DNA 链的断裂和重新连接,在 Vinograd 和 Hudson^[1] 发现线粒体 DNA 的寡聚结构后提出了由 DNA 的复制或遗传重组产生这些环形 DNA 分子的寡聚物的设想。因为复制的误差可能产生这两类结构,或者它们本身就是复制的中间体。而遗传重组的模型涉及 DNA 链的切断和重排,可以合理描述连环寡聚物的形式。尽管当时人们对 DNA 的复制和遗传重组机制还了解得不多。

一、早期环形 DNA 分子寡聚物的研究

由于对环形 DNA 分子寡聚物的了解可能有助于了解 DNA 的复制和基因重组等一些重要的生物学过程,因此多年来寡聚物的形成原因引起了人们的广泛兴趣。虽然人们各自研究的材料不同,但对寡聚物形成原因的推论,不外乎 Vinograd 当初提出的两种。

1968 年 Goebel 和 Helinski^[6] 用各种方法纯化大肠杆菌质粒 ColE1 DNA。他们发现,当细胞内蛋白质的合成受到氯霉素或氨基酸饥饿的抑制时,细胞内质粒寡聚物的含量大为增加。他们还用放射性脉冲标记的方法观察环状寡聚物产生期间的情况说明 ColE1 DNA 的环状寡聚物不是简单、随机地由预先存在的单体 ColE1 DNA 重组而成,因为在形成寡聚物时仍有同位素掺入。这和重组产生环状寡聚物的推测不一致,因而他们倾向于认为环状寡聚物是 ColE1 DNA 复制误差的产物,或者是复制的中间体。

同一年, Rush 和 Warner^[7] 研究了大肠杆

噬菌体 S13 复制型 DNA 的环状寡聚物。他们使用两株不同的噬菌体 S13 的温度敏感突变株在氯霉素存在下混合感染大肠杆菌。接着,他们从被感染的细胞中纯化噬菌体的复制型 DNA,并把环状二聚物 DNA 和单体 DNA 分开。他们把环状二聚的噬菌体 DNA 感染大肠杆菌的原生质球,检查原生质球溶解物,发现释放出的噬菌体有 0.45% 是野生型的。相反,当原生质球用单体 DNA 感染时仅有 0.03% 的释放病毒是野生型的。于是他们推论,环形二聚的 S13 DNA 可能是噬菌体遗传重组的中间体。这个中间体中的等位基因发生互换,重新切割和连接而产生野生型噬菌体。他们的实验支持了重组形成环状二聚体 DNA 的说法。

1973 年 Margit 和 Nass^[8] 用一株温度敏感的 *Schmidt-Ruppin* 鸡肉瘤病毒突变株感染成纤维细胞。发现被感染细胞线粒体 DNA 连环二聚物和寡聚物的水平具有温度依赖性,并和被病毒转化的细胞的表现型相关。在允许温度时(36°),转化被表达,转化细胞(癌变细胞)中的连环寡聚物水平是正常细胞的 2—3 倍。但是在非允许温度(41°),细胞表现正常时线粒体 DNA 寡聚物的水平是非感染细胞的特征。温度从 41° 变到 36° 时相应地导致细胞表型的逆转,也导致线粒体 DNA 寡聚物水平的逆转。当正常细胞用环己亚胺处理时,线粒体 DNA 寡聚物的水平增加 5 倍。但用 9- β -D 阿刺伯糖酐腺嘌呤的处理却无影响。作者推论,可能是与线粒体 DNA 复制有关的酶(如 DNA nickase 等)来自细胞浆,由于癌变细胞改变了线粒体膜而影响酶的运输致使与 DNA 复制有关的酶(如把连环二聚物变成单体 DNA 的酶)缺乏而使寡聚物积累。环己亚胺因抑制了胞浆中蛋白质合成,因而也影响线粒体 DNA 连环寡聚物的水平。所以,他们认为连环寡聚体是环形 DNA 复制的中间体。

Jaenisch 和 Levene^[9] 对感染细胞的 SV40 DNA 二聚体及其他寡聚体进行研究时发现二聚体被 ³H-胸腺核苷标记的时间长达 70—90 小时,连环二聚体为 10%,环状二聚物为

90%。当进行短脉冲标记时(45 分钟到 4 小时)可有 25—48% 的连环二聚物。这些实验证明,连环二聚物高频率地被合成,然后被环状二聚物或单体所代替。这些事实似乎说明连环二聚物是 SV40 DNA 的复制中间产物。

早期关于环形 DNA 分子寡聚物的文章不少,可参考生化年鉴^[10,11] 及微生物学年鉴的有关评述文章^[12]。对环状 DNA 寡聚物形成原因的探讨在 1974 年以前采用的手段一般是同位素示踪,等密度梯度超离心及电子显微镜观测等方法。这些方法所得到的结论使我们对环形 DNA 分子的寡聚物的成因有所了解。

二、DNA 环状寡聚物的研究近况

由于遗传工程等技术的发展,近年来关于环形 DNA 分子寡聚物成因的研究取得显著的进展。现在已经可以证明,周长是单体分子整数倍的 DNA 环状寡聚物的形成与这类 DNA 分子所寄生的宿主的重组基因有关。因此认为 DNA 的环状寡聚物是体内遗传重组的产物。

1977 年美国哈佛大学的 Potter 和 Dressler^[13] 证明,从野生型 *E. coli* 菌株中得到的 Col E1 质粒 DNA 是含有单体、二聚体、三聚体、……等一套 Col E1 DNA 单体及其环形寡聚物的混和物。当把单体 DNA 转化 *recA* 基因缺陷(*recA*⁻)的大肠杆菌菌株时,寄主细胞不产生环状寡聚物 DNA。同样,纯化的二聚,三聚,四聚的环状 Col E1 DNA 转化 *recA*⁻ 的细胞时,这些 DNA 能够被复制,但仅限于转化 DNA 本身的构型。即二聚体转化子只产生二聚体,单体只产生单体,……。只有把这些纯化了的 DNA 各自转化 *recA*⁺ 的细胞时,它们才重新产生全谱的单体及其寡聚体。他们还在电镜下找到两个单体 DNA 重组开始发生“联会”时的 8 字型重组中间体。从而认为多倍长度的 DNA 环状寡聚物是质粒之间按 Holliday 模型重组时重组中间体成熟的必然产物。

关于大肠杆菌 *recA* 基因及其产物的作用,近年来正在广泛地研究^[14-20]。它在大肠杆菌体内有许多重要的生物学功能。在普通遗传重组

中 *recA* 蛋白使 DNA 分子之间同源顺序联会, 并引起 DNA 链的交叉互换。它参加细菌中接合介导的重组过程, 参与 DNA 损伤的复制后修复(或称可诱导修复, SOS 修复), 还参加 λ 原噬菌体的诱导等等。大肠杆菌 *recA* 基因及 *recA* 蛋白是目前分子遗传学及生物化学中令人感兴趣的领域, 国际上一些重要刊物如“*PNAS*”(美国国家科学院学报), “*Nature*”及“*Cell*”等常有这方面的研究报道。

1980 年哈佛医学院的 Kolodner^[21] 用体外合成的质粒 pMB9 环状四聚体来研究这个合成质粒在大肠杆菌细胞中的分子内重组。当他把这个合成质粒转化入野生型的 *E. coli* 菌株时, 这个四聚体一部分被转变成环状二聚体和小部分三聚体和单体。这种转变在 *recA*⁻ 菌株或 *recB*⁻ *recC*⁻ *recF*⁻ 株中被阻碍。由此进一步证明, 环形 DNA 分子在细胞中要从单体变成环状寡聚体需要 *recA* 基因的参与, 从环状寡聚物变成单体也需要 *recA* 基因的参与。环状寡聚物可以通过分子内重组生成小的寡聚物和单体。

由于以上几个研究者的工作使得环状 DNA 寡聚物是由普通重组途径在细菌体内形成的看法得到证实。由于质粒在细菌体内的重组有一些显而易见的便于研究的特点, 人们已开始用重组质粒 DNA 的方法研究生物体内普通遗传重组的分子机制^[15-18, 22]。

最近 Fishel, James 和 Kolodner^[22] 证明, *recA*⁻ 的大肠杆菌菌株只要同时也具有 *recB*⁻ *recC*⁻ *sbcA*⁻ 的基因缺陷(*sbcA*⁻, 一个间接抑制 *recB*⁻ *recC*⁻ 的基因突变), 这样的菌株能引起十倍于野生型菌株产生 pVH51 (一个 ColE1 衍生质粒) 的环状寡聚物, 即重组的频率增加十倍。说明大肠杆菌体内还有另一条区别于 *recA* 的重组途径。作者^[23]也证实一株 *recA*⁻ 的大肠菌也能把单体的 pBR322 DNA 转变产生大量环状寡聚物。环形 DNA 分子的环状寡聚物在体内的产生机制, 生物体内重组过程和这类寡聚物的产生之间的关系细节仍然需要进一步研究。

三、DNA 连环寡聚物的研究近况

近年来由于对 DNA 拓扑异构酶研究的进展使环形 DNA 分子连环寡聚物的研究取得关键性突破。体外实验证明, DNA 连环寡聚物或多聚物的聚合和解聚都可以由 DNA 拓扑异构酶直接完成。

DNA 拓扑异构酶是一些能改变 DNA 分子的拓扑学形式的酶, 可为两大类: I 型 DNA 拓扑异构酶和 II 型 DNA 拓扑异构酶。I 型 DNA 拓扑异构酶靠“切开—重接”机制催化超螺旋 DNA 成松弛状态; 它催化具有互补顺序的两个单链 DNA 环形成双链 DNA 环; 它能使单链 DNA 环发生分子内打结; 它能使环形 DNA 分子发生连环过程形成连环寡聚物或多聚体, 但要求两个被连环的 DNA 分子中的一个必须是松弛型的(即起码有一条链有一个切口)。I 型 DNA 拓扑异构酶不需要 ATP 等辅助能量因子, II 型 DNA 拓扑异构酶则需要。它们能够使双链环形 DNA 分子发生三种主要过程: (1)超螺旋和超螺旋的松弛作用; (2)打结和解结, (3)连环和解连环。(见图 3)。这类酶能暂时切开 DNA 链产生一个通道, 使另一部分 DNA 链通过后重新连接这个切口, 因而产生 DNA 的拓扑学异构体。

由于实际上天然的双链 DNA 都以负超螺旋的形式存在, 所以 DNA 超螺旋及其拓扑学形态的问题是 DNA 分子复制、转录和重组等

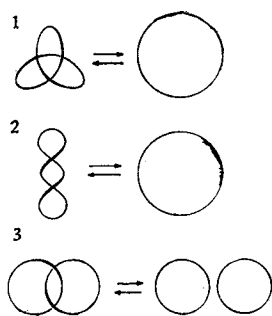


图 3 II 型 DNA 拓扑异构酶催化的三种过程

1. 打结—解结作用;
2. 超螺旋—松弛作用;
3. 连环—解连环作用。

一系列过程的重要问题。到目前为止,遗传学和生物化学的资料证明,许多生物学过程如 DNA 复制的起始,转录的调控,染色体 DNA 的折迭、浓缩,病毒 DNA 的包装,以及重组过程都与 DNA 拓扑异构酶的存在有直接联系。关于 DNA 拓扑异构酶的分类,结构,作用方式及其生物学功能见 Wang^[24], Cozzarelli^[25,26] 和 Gellert^[27] 的评述。

已发表的资料表明两类 DNA 拓扑异构酶—I 型 DNA 拓扑异构酶和 II 型 DNA 拓扑异构酶都能使环形 DNA 分子变成连环聚合物。

1980 年哈佛大学的 Tse 和 Wang^[28] 发现从大肠杆菌和奇异变形杆菌 (*M. luteus*) 制备的 I 型 DNA 拓扑异构酶能在体外引起双链环形 DNA 的连环。在低 DNA 浓度时二聚的连环体是主要产物。在高浓度 DNA 和精脒的存在下则形成多聚的连环聚合物。两个被连环的 DNA 分子不需要广泛的同源序列(即可以不是同一种 DNA),但是被连环的两个 DNA 分子中必须有一个存在着单链切口(即有一个应是松弛型 DNA 分子)。这和 II 型 DNA 拓扑异构酶不同。II 型 DNA 拓扑异构酶可以连环两个双链闭合环形 DNA 分子(即两个都是超螺旋型的 DNA 分子)。

斯坦福大学的 Hsieh 和 Brutlag^[29] 证明果蝇胚的抽提物中含有把环形 DNA 以需要 ATP 的形式变成巨大的环环相套的网状结构的酶活性。在纯化过程中这种使 DNA 连环的酶活性被分成两个蛋白质成分。其中一个成分是需要 ATP 去松弛超螺旋 DNA 的 DNA 拓扑异构酶。他们证明这种需要 ATP 的拓扑异构酶使一个环形 DNA 分子链的一部分通过 DNA 分子另一边环上的一个临时切口,同时这个酶“抓住”切口两边 DNA 的两个链端使 DNA 不作任何相对旋转。这种机制能改变负超螺旋成正超螺旋或者相反,达到超螺旋作用和松弛作用的平衡状态为止。连环的形成是经过一个双分子历程。它能在非同源的环形 DNA 分子间进行。在不同条件下这种连环反应完全可逆。在

第二个蛋白质成分存在时,依赖 ATP 的 DNA 拓扑异构酶释放连环 DNA 多聚物成单体。果蝇依赖 ATP 的拓扑酶和 *E. coli* 的 DNA 旋转酶 (gyrase) 一样,使用同样的机制改变 DNA 的拓扑学形态,都需要 ATP,并受新生霉素抑制。它们属于 II 型拓扑异构酶。Hsieh 和 Brutlag 认为,这些酶的存在不但可以松弛 DNA 的拓扑学张力而且可折迭和解开真核染色体。于此同时 Baldi 和 Benedett 等人也从非洲爪蟾的胚泡抽提物中发现把环形 DNA 形成连环的 DNA 拓扑异构酶活性。近年来还有其他的一些学者研究了 DNA 连环寡聚物的生成机制。

关于 DNA 连环二聚物在生物体内的生成原因,现有的资料倾向于认为它是环形 DNA 复制的中间体。

Sundin 和 Varshavsky^[30] 分离到一组拓扑形态各异的 SV40 病毒 DNA 连环二聚物。这组连环二聚物的两个环之间通过互相缠绕进行拓扑学连系。缠绕次数从 1 到 10 不等。这些连环二聚体的两个环有三种情况:即都是松弛型的;一个松弛一个超螺旋;两个都是超螺旋型的。根据这三种情况可把这组连环子分成三类。Sundin 和 Varshavsky 能用电泳法把占全部复制型 SV40 DNA 10—20% 的连环二聚物分离成至少 20 条带。用 ³H-胸腺嘧啶对 SV40 感染的细胞进行短时间的脉冲标记,在很短时间内,放射性标记在这些连环 SV40 DNA 中消失,说明这些连环二聚物只是短寿命的复制中间体。他们认为连环二聚物的产生是由于环形 DNA 按照 Cairns 模型进行复制的最后阶段,小片断未复制 DNA 的位置不足以容下整个复制装置,因而最后这段 DNA 没有解螺旋就被复制而使新生的 SV40 DNA 处于连环状态。细胞中的解连环活性的酶将使它们分开。

我们使用大肠杆菌质粒 pBR322 的研究表明连环 pBR322 DNA 二聚体或多聚体可以是体内 DNA 拓扑异构酶活性的作用产物而不是复制的中间体。因为在从体内得到的质粒 DNA 中可以看到环状二聚的 pBR322 DNA 和 pBR322 单体 DNA 相连环的情况。这种情况

是用复制中间体的假说难以解释的。

四、环形 DNA 分子寡聚物研究的展望

从以上事实可以看到人们对环形 DNA 分子寡聚物的研究已经大大深入了。这些方面的研究使我们对 DNA 重组、复制及 DNA 可能的拓扑异构情况, DNA 拓扑异构酶的催化特性及可能的生物学作用有了更多的了解。由于细菌质粒、病毒及线粒体 DNA 这些环形 DNA 分子的分子量较小, 对基因组的结构和功能又了解得比较清楚, 因而为我们的研究提供了极方便的条件。这类 DNA 分子的遗传重组研究将为整个遗传重组的分子机制及生化过程提供一个理想的研究模型。对环形 DNA 分子的各种拓扑异构形态的研究及 DNA 拓扑异构酶的研究必将深化对 DNA 复制、基因的调控, 染色体的形态及其活动的调节以及遗传重组的过程的认识。连环寡聚物和多聚物的研究已成为了解这些问题的一把钥匙。环形 DNA 分子寡聚物的研究所产生的知识将丰富基因工程理论基础并指导它的实践, 给整个分子生物学的研究以重大影响。

参 考 文 献

- [1] Hudson, B. et al.: *Nature*, **216**, 647, 1967.
- [2] Clayton, D. A. et al.: *Nature*, **216**, 652, 1967.
- [3] Roth, T. F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 650, 1967.
- [4] Hoeijmakers, J. H. J. et al.: *Plasmid*, **4**, 97, 1980.

- [5] Baldi, M. I. et al.: *Cell*, **20**, 461, 1980.
- [6] Goebel, W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 1406, 1968.
- [7] Rush, M. G. et al.: *J. Bio. Chem.*, **243**, 4821, 1968.
- [8] Margit, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 3739, 1973.
- [9] Jaenisch, R. et al.: *J. Mol. Biol.*, **73**, 199, 1973.
- [10] Helinski, D. R. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 899, 1971.
- [11] Kasamatsu, H. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 695, 1974.
- [12] Helinski, D. R. et al.: *Ann. Rev. Microbiology*, **27**, 450, 1973.
- [13] Potter, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4168, 1977.
- [14] Benbow, R. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 235, 1975.
- [15] DasGupta, C. et al.: *Cell*, **25**, 507, 1981.
- [16] Hudik-Plevnik, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 131, 1980.
- [17] Wake, C. T. et al.: *Cell*, **21**, 141, 1980.
- [18] Cassuto, E. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 2962, 1980.
- [19] Howard-Flanders, P.: *Scientific American*, **245**, No. 5, 56, 1981.
- [20] Cohen, S. et al.: *Nature*, **294**, 182, 1981.
- [21] Kolodner, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 4847, 1980.
- [22] Fishel, R. A. et al.: *Nature*, **294**, 182, 1981.
- [23] 黄熙泰等《第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》, 1981年85页.
- [24] Wang, J. C. et al.: in *Molecular Genetics Part III* (Edited by Taylor, J. H.), Academic Press, 1979, p. 65.
- [25] Cozzarelli, N. R.: *Cell*, **22**, No2 part 2, 327, 1980.
- [26] Cozzarelli, N. R.: *Science*, **20**, 953, 1980.
- [27] Gellert, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 879, 1981.
- [28] Tse, Y. C. et al.: *Cell*, **22**, 269, 1980.
- [29] Hsieh, T. et al.: *Cell*, **21**, 115, 1980.
- [30] Sundin, O. et al.: *Cell*, **21**, 103, 1980.

[本文于1982年6月25日收到]

(上接第 49 页)

胞内遗传的基础物质 DNA。我们用羟基脲抑制正常的有丝分裂的半保留复制合成, 测定内切酶切除 DNA 损伤片段后, 用未损伤链作模板再合成相应 DNA 片段, 此过程称为修复复制或切除修复。可用同位素标记核苷酸 (^3H -TdR) 再掺入到细胞核的 DNA 上, 以便观察 DNA 片段修复复制。

培养哺乳动物细胞的致突变短期试验, 在潜在致癌试验的组合里是必不可少的。采用新鲜的人全血淋巴细胞, 有以下优点: ①在评价

化学物质对人类危害性时, 可减少因种族差异而导致推论的错误。②新鲜的人全血淋巴细胞富有可诱导药物代谢的酶, 有利于需要代谢活化的一些前致癌物的检测。③直接采用新鲜的人全血, 比国外用分离淋巴细胞方法简便。

我们用上述方法测试致癌化合物 2, 7-氨基芴、甲基甲烷磺酸酯及 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍等呈阳性结果, 而对非致癌物偏重亚硫酸钠、叠氮钠等, 则为阴性结果。同时检测未知化合物杀螟松、抗矽-14 等为阴性, 与 Ames 等

(下转第 73 页)

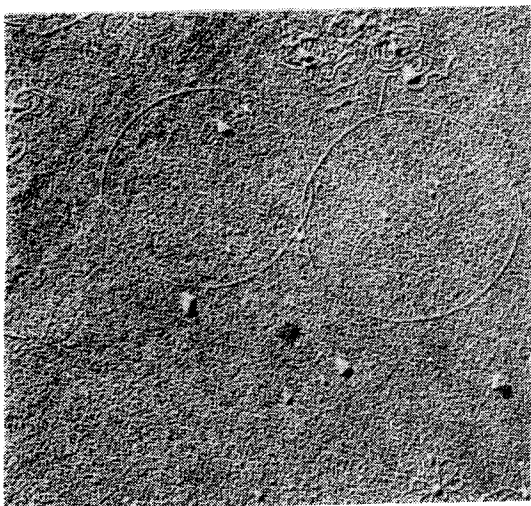


图 1a 一个质粒 DNA 连环二聚；

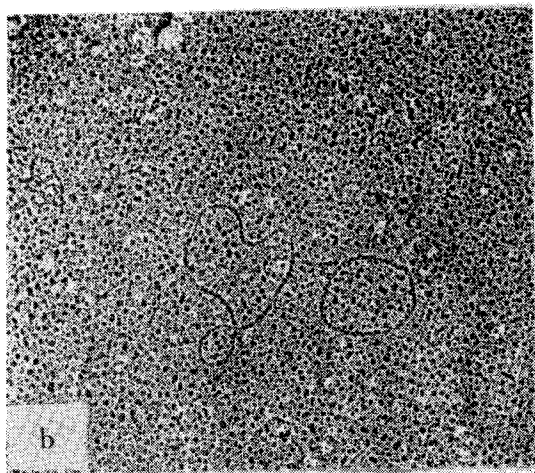


图 1b 一个质粒 DNA 分子和它的环状二聚物

(图片由本文作者实验室拍摄)

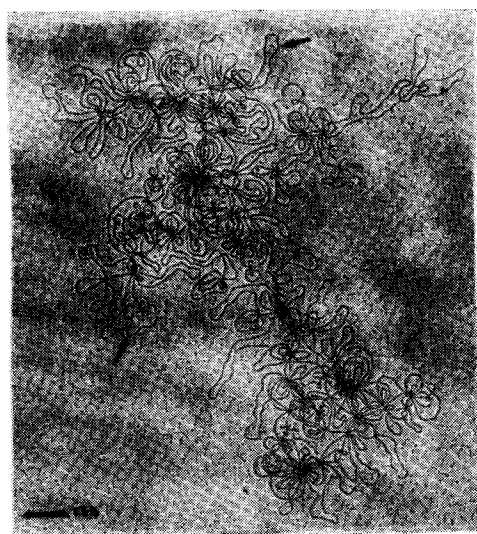


图 2 由 DNA 拓扑异构酶在体外合成的多聚环形 DNA 网状结构

(引自“Cell”, 20 卷, 461 页, 由 Baldi, M. I. 拍摄)

我国生物膜的研究取得明显进展

——第二届生物膜学术讨论会在京举行

由中国生物物理学会, 中国生物化学学会和中国细胞生物学会联合召开的第二届生物膜学术讨论会于 1982 年 10 月 26—30 日在北京举行。出席的有来自全国 61 个单位的 136 名代表, 加上旁听的同志, 到会的共约 200 人左右。此外, 美国加利福尼亚州立大学蒲慕明教授也应邀专程前来参加了会议。目前正在动物所工作的美国微克博士也参加了交流活动。

这次会议共收到论文或报告 130 多篇, 从量上看, 与 1979 年第一届生物膜讨论会(只收到 46 篇论文)相

比较, 表明三年多来我国生物膜的研究有了较明显的进展。从内容来看, 无论在生物膜结构, 能量转换, 细胞表面还是在生物膜与农业, 生物膜与医学等方面都开展了不少工作, 取得了一定成绩。这是全国参加生物膜研究的同志们在物质条件比较困难的情况下努力所取得的硕果。近二、三年内各单位派往美国、日本、西德、瑞士、瑞典等国家进修、工作已回来的同志, 在会上也介绍了在国外的工作结果与收获体会。这两方面

(下转第 80 页)