

大肠杆菌 DNA 复制起始点 (oric) 与 12KD 膜蛋白的结合特性

陈永青

(复旦大学生物系, 上海)

oric 是大肠杆菌 DNA 复制的起始点, 位在基因图谱中 dnaA-ilv 区段的 83.5 分钟处^[1]。根据 Jacob 等提出的复制子模型^[2], 认为细菌染色体 DNA 是附着在细胞膜上, 这种接触对于子染色体的分离以及控制 DNA 复制是重要的。

在研究 DNA 复制与膜蛋白关系中, 我们已经从大肠杆菌的细胞膜中分离并纯化了一个 12KD 的膜蛋白, 它对 oric 有特异的亲和力^[3]。

本文进一步叙述 oric 与 12KD 蛋白结合的特性并对结合位点作初步的分析。

材料与方法

1. 质粒 DNA 的制备 pBR322 和 pOC42 (由 pBR322 与 pCM959 中的 pstI-oric⁺ 克隆而成的 oric 质粒) 是从 *E. coli* PA3092 中经氯霉素扩增后, 按 Birnboim 和 Doly 的碱性抽提法制备^[4]。

[³H]pOC42 的制备是以 4 μ ci/ μ g/ml 的 [³H] 胸苷, 在 63 号基本培养基^[5]上培养的细菌进行体内标记, 同上法抽出质粒 DNA。

pOC42(M⁻) 是 oric 区段中腺嘌呤均为非甲基化的 pOC42, 由 M. Kohiyama 赠送。

2. 限制性内切酶和试剂 HinfI, AvalII (New England); pstI, HindIII, BglII, XhoI (Jacques Monod 研究所产品)。

5' [α -³²P]TTP (Buckinghamshire England) 3000ci/mmol; dATP, dGTP, dCTP 由 M. Kohiyama 赠送。

DNA 聚合酶 I Klenow 片段 (Boehringer)。

3. oric 与 12KD 蛋白特异性结合试验

按陈永青等方法^[3]。

4. 不同长度 [α -³²P]oric DNA 片段的制备 用限制性内切酶 pstI 完全消化 pOC42 DNA, 经 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出 pstI-oric⁺ 片段 (pstI₂₅₆₆-pstI₄₃₈)。上述制备的 7 微克样品, 再经 HinfI 和 HindIII 双酶切割后, 用 92p moles [α -³²P]TTP, 14n moles 非标记的 dATP, dGTP, dCTP 在 12 个单位的 Klenow 片段作用下标记成 [α -³²P] 的 DNA 片段。将上述样品分成三份, 分别再用 XhoI, BglII 和 AvalII 酶切, 经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 洗脱后制备出 57bp, 71bp, 173bp 和 206bp 的 [α -³²P] oric 片段。

5. 痕迹试验 参照 Galas^[6] 等方法修改如下: 蛋白与 [α -³²P]DNA 片段结合反应在 0°C, 15 分钟后置于 20°C 水浴中平衡 1 分钟, 加 DNaseI (终浓度为 0.3 μ g/ml), 酶切 30 秒后, 用 0.2M EDTA/0.15mg/ml 的小牛胸腺 DNA 终止反应。经酚抽提和酒精沉淀后得到的样品, 溶解在 3 微升的 FS 液中 (FS 液含有 80% 去离子甲酰胺, 10mMNaOH, 1mMEDTA, 0.1% 溴酚兰, 0.1% 二甲苯)。经 90°C 处理 2 分钟后, 在 15% 聚丙烯酰胺 (8.3M 尿素) 凝胶中电泳分离。

结果与讨论

1. 12KD 膜蛋白既能与单链 oric⁺-DNA 又能与双链 oric⁺-DNA 特异性结合。 为了证实复制子理论中关于 *E. coli* (oric) 复制起始点与膜接触的可能性, 我们选择一条直接从细

胞中分离蛋白的途径,所分离到的 12KD 膜蛋白对 oric 有特异亲和力。Annick. J 等^[7]报道过的 B' 膜蛋白与 oric 的结合只仅仅限于单链的 oric⁺-DNA。我们对 12KD 膜蛋白的结合试验表明,它不限于 ss oric⁺-DNA, 与 DS oric⁺-DNA 同样有特异性结合(图 1、2)。

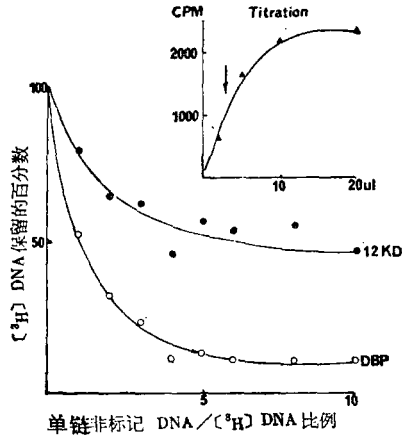


图 1 12KD 蛋白与单链 pOC42(Oric⁺-DNA) 的特异性结合

从滴定曲线中箭头所指的 12KD 蛋白量加到一个含有 [³H]pOC42 和非标记的 pBR322(作为竞争剂)的反应液中,用 DBP(SSB 蛋白)作为对照进行相同的结合试验,步骤和条件见文献[3]。

竞争性试验的结果可以看到: pOC42DNA(oric⁺-DNA) 与 12KD 蛋白的结合力大大超过 pBR322(oric⁻-DNA) 对 12KD 的亲合。将 pOC42 DNA 用 pstI 酶切,可制备得到 pstI-oric⁺, 再用 HinfI 酶切后,制备出带有 oric⁺ 的 523bp 片段(HinfI₃₉₇—pstI₄₈₈)和不带有 oric⁺ 的 149bp 片段(HinfI₃₈₂—HinfI₃₉₇),分别与 12KD 蛋白作结合性试验,同样证实 DS523bp 的 oric⁺ 片段与 12KD 蛋白的特异性结合特性。

2. 12KD 膜蛋白不能识别 oric 序列中

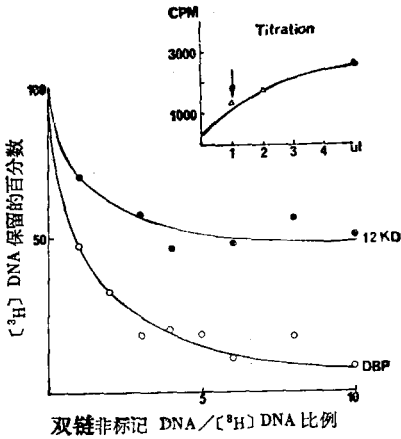


图 2 12KD 蛋白与双链 pOC42(Oric⁺-DNA) 的特异性结合
试验条件按图 1 说明

腺嘌呤的非甲基化。在 oric 结构与功能的研究中,一个有趣的问题是在带有 oric⁺ 功能最小长度为 245bp 的区段中,却有 11 个 **GATC** 的重复顺序(图 3),而其中的腺嘌呤(A)均是甲基化的^[8]。

M. Kohiyama 等认为 oric 中这种特殊构型可能有助于 DNA 二级结构的形成,或可能作为某些复制起始调节因子的识别位点(内部通讯,未发表)。12KD 膜蛋白既然与 oricDNA 序列有亲和力,是否对其中的 **GATC** 重复顺序有特别的识别能力呢?为此,分别试验了 12KD 蛋白与甲基化的 pOC42(简称为 pOC42(M⁺))和非甲基化 pOC42(即 pOC42(M⁻))的结合能力。pOC42(M⁺)与 pOC42(M⁻)的区分是用三种限制性内切酶(MboI, Sau3A 和 DpnI)的不同反应决定的^[9,10]。试验结果(图 4)表明:12KD 蛋白对 pOC42(M⁺)和 pOC42(M⁻)的结合是等效的,oric 中 **GATC** 重复顺序中的腺

```

GGATCCTGGGTATTAAAAAGAGATCATTTATTTAGAGATCTGATCTATTGTGATCTCTTATTAGGATCGCACTGCCCTGTGGATAACAAGGATCGGC
100
TTTAAAGATCAACAACCTGGAAGGATCATTAACCTGTGAATGATCGGTGATCCTGGACCGTATAAGCTGGGATCAGAATGAGGGGTATACACAACCTCAA
200
AAACTGAACAACAGTGTCTTTGGATAACTACCGGTTGATCCAAGCTTCCTGACAGAGTTATCCACAGTATCGCACCATCTGTATAC

```

图 3 大肠杆菌 245bp 的复制起始点 (oric) 含有 11 个 GATC, 其中 A 为甲基化

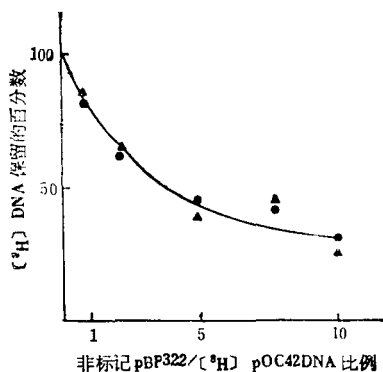


图4 12KD 蛋白对 pOC42(M⁺)(●)与 pOC42(M⁻)(▲) 结合的比较
试验条件同图1说明

嘌呤非甲基化不被 12KD 蛋白所识别。

1973 年 Marinus 等^[11]曾设想,如果 *oric* 区段中丰富的 **GATC** 重复顺序中腺嘌呤的甲基化对于 *oric* 功能是重要的话,那么一旦发生非甲基化突变 (*dam*⁻) 应该是致死的。但是,所分离到的 *dam*⁻ 突变株却与野生型一样,可以正常生长,而只有在发生 *dam*⁻*polA*⁻ 双重突变或 *dam*⁻ 与 *rec* (A. B. C) 一起时才致死^[12]。按照 Jacob 等复制子模型中复制子与膜接触的观点来解释 *dam*⁻ 突变株,由于它的细胞生长和分裂均正常。这意味着非甲基化的 *oric* 并没有影响与膜的结合。我们对 12KD 膜蛋白作试验也证实了这一点。运用 Kornberg 实验室^[13]建立的体外复制系统对 pOC42(M⁺) 和 pOC42(M⁻)

作体外复制试验的比较,结果表明: 在温度为 37°C pH7.0, KCl 浓度为 100mM 条件下 pOC42(M⁺) 和 pOC42(M⁻) 体外复制的速率完全相同(由 Fatima. Z. S 提供,文献未列)。这样就留下二个問題需要深入研究,一是 *oric* 顺序中 **GATC** 的腺嘌呤甲基化究竟有何作用? 12KD 蛋白的特异性结合位点在何处?

3. 用痕迹试验对12KD蛋白在 *oric* 中的结合位点作初步分析。 从 *oric* DNA 中制备出不同长度的 [α -³²P] 片段,即 57bp (Hinf I₃₉₇₇—BglII₂₂), 206bp (BglII₃₈—HindIII₂₄₄) 和 173bp (HindIII₂₄₄—XhoI₄₁₇),它们在 *oric* 序列中的物理位置见图 5。在 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中的分离见图 6 (在封三)。在 12KD 蛋白分别与上述片段结合后,再经核酸酶 I 的作用。在 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳带的变化中可以看到 (图 7, 在封三): 当不加 12KD 蛋白时,核酸酶 I 降解 [α -³²P] 片段成图 7 中用 (一) 表示的电泳图谱,若 12KD 蛋白与某一个片段 DNA 有特异性结合时,免受核酸酶 I 的作用,将有保护的足迹出现。从我们初步的试验看到,在 57bp 和 173bp 片段有保护足迹出现。Annick. J 等曾报道的 B' 蛋白识别位点在 *oric* (35—270bp) 和 XhoI₄₁₇—pstI₄₈₈ 二个位点,我们的结果表明: 12KD 蛋白的识别位点在 *oric* 的二侧。精确地定出它的识别位点,需要作深入的分析。12KD

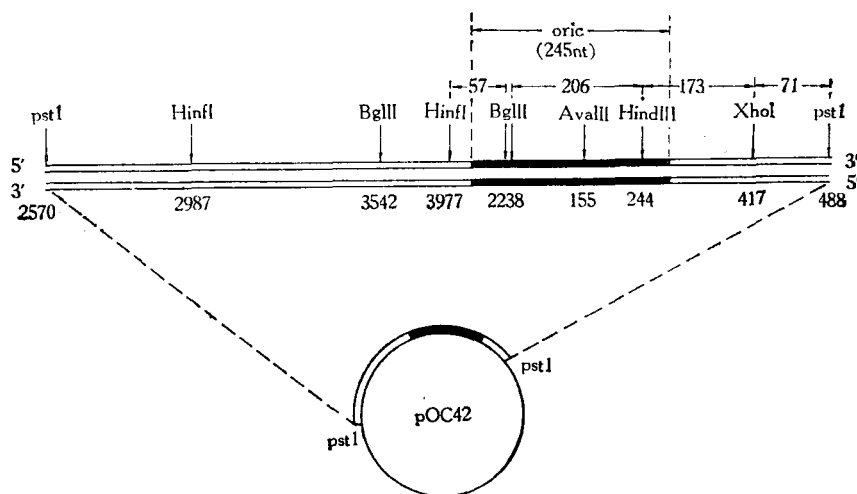


图5 pOC42(*oric*⁺-DNA) 上不同的酶切点

单体变构酶的协同效应及其计算机摹拟*

关 连

(河南医学院生化教研室, 郑州)

自 Rabin^[1] 及 Richard^[2] 相继提出单体变构酶动力学模型, 已引起广泛的注意。这与寡聚体变构酶相比较, 如 MWC 模型和 KNF 模型, 尽管差别很大, 却在不同程度上都认为变构酶至少有两个可以互变的构象, 一种是无活性的, 另一种是有活性的。底物可以使无活性的向有活性的构象转变。

寡聚体变构酶各亚基之间通过次级键而缔合, 并能产生协同效应。寡聚体酶还可以解离成它的单体, 在一定条件下相平衡。诸如代谢物、辅因子、无机离子以及稀释等因素, 都可以影响其平衡^[3]。由此可以认为寡聚酶溶液中亦有单体存在。寡聚体酶不是不变的聚合体。Kurganov^[4] 对此种平衡的慢效应作过理论上的探讨。还有, 许多单体蛋白质也可以缔合而成寡聚体。特别是由配基引起酶的单体缔合成二

聚体的动力学研究及其依据均有报道^[5,6]。Richard^[2] 在研究单体酶动力学时也涉及单体酶两种构象之间的协同作用。因此认为, 单体变构酶可以缔合而产生协同效应是合理的。

可以设想, 单体变构酶在游离时可以有两种构象: 活性型 a 与无活性型 b, 二者保持平衡。此时二者浓度以 a_0, b_0 表示。 $\frac{b_0}{a_0} = K$ 是为变构常数。 $b_0 \gg a_0$ 。a 型少而极易与底物 s 相结合。a 型酶与底物结合后, 酶构象有进一步变化 a^* , 可将底物转变为产物, 同时借与无活性型 b 缔合机会, 影响 b 的构象, 解离成两个 a 型酶, 由此而起正协同效应。这种效应只有 a 型酶与底物起作用后的瞬间所具有。底物浓度高

* 摘要载于《第五次全国生物化学学术会议文摘汇编》(上), p102, 1984, 北京。

蛋白在 DNA 复制起始中的作用有待研究。

本工作得到法国 Jacques Monod 研究所 M. Kohiyama 的指导和帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Tomizawa, J. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 999—1034, 1979.
- [2] Jacob, F. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 329—348, 1963.
- [3] Chen Yongqing, Annick Jacqand Masamichi Kohiyama, *Biochemistry International* **9**, No. 1, 105—113, 1984.
- [4] Birnboim, H. C. Coly, J.: *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1513—1523, 1979.
- [5] Jeffrey, H. Miller: *Experiments in Molecular Genetics*, 1972.

- [6] Galas, D., and Schmitz, A.: *Nucl. Acids Res.*, **5**, 3157—3170, 1978.
- [7] Jacq, A. et al.: in *ICNUCLA Symposium on molecular and cellular Biology* (Alberts, B. and Fox, C. F. eds.), Vol. **19**, p. 189, Academic Press, New York, 1980.
- [8] Zyskind, J. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 2460—2464, 1980.
- [9] Lack, S., et al.: *J. Mol. Biol.*, **114**, 153—169, 1977.
- [10] Geier, G. E., et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1408—1413, 1979.
- [11] Marinus, M. G., Morris, N. R.: *J. Bact.*, **114**, 1143—1150, 1973.
- [12] ———: *J. Mol. Biol.*, **85**, 309—322, 1974.
- [13] Fuller, R. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 7370—7374, 1981.

[本文于 1985 年 6 月 20 日收到]

《大肠杆菌 DNA 复制起点 (oric) 与 12KD 膜蛋白
的结合特性》一文的图 6、7

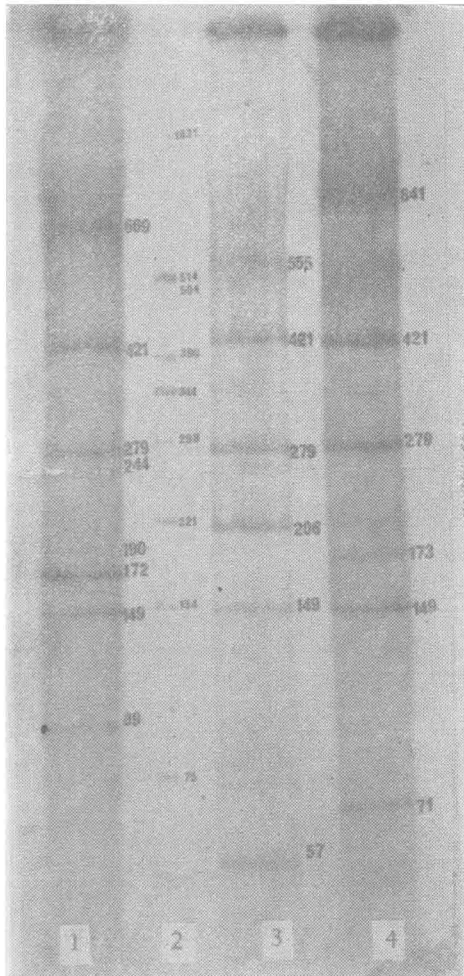


图 6 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨 poc 42 中
pstI-oric⁺ 的酶切图谱

- 1——pst 片段用 HinfI、HindIII、AvaIII 酶切
- 2——pBR322 用 HinfI 切作为标记
- 3——pstI 用 HinfI、HindIII、BglIII 酶切
- 4——pstI 用 HinfI、HindIII、XhoI 酶切

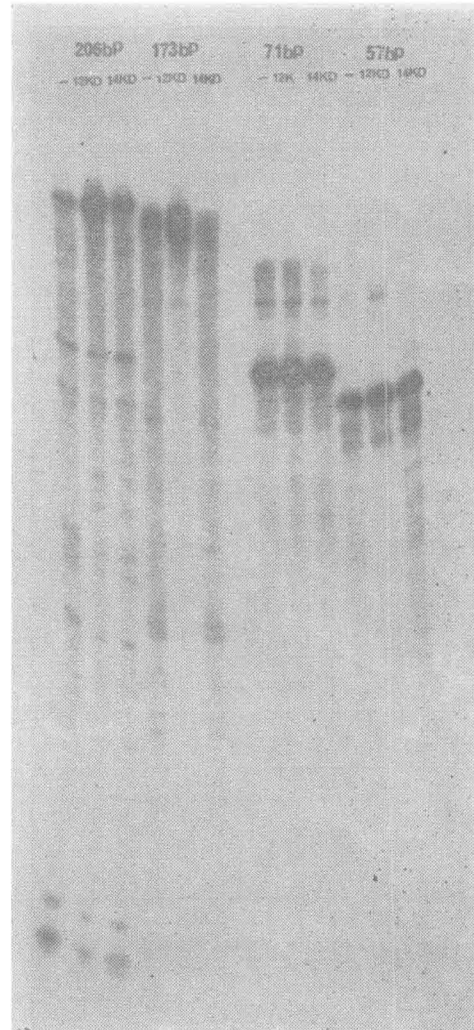


图 7 12KD 蛋白结合在 oric DNA 片段的
核酸酶 I 痕迹

- 一,表示不加蛋白, 作对照。
- 14KD, 为另一膜蛋白组分。
- 5.7bp, 71bp, 173bp 和 206bp 在 Oric
中的物理位置见图 5