

极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌 DNA连接酶的生化性质*

赖小勤 黄力**

(中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌 DNA 连接酶 (*Ssh* 连接酶) 的最适辅因子为 ATP, 在 dATP 存在时, 该酶也能表现出较弱的连接活性. ATP 或 dATP 都能够使该酶发生腺苷化, 腺苷化的 *Ssh* 连接酶能够将腺苷基团转移至含切刻的 DNA 上. 电泳迁移率改变实验表明, *Ssh* 连接酶能够结合双链 DNA, 且与含切刻及不含切刻的 DNA 结合的亲和力相同, 但不结合单链 DNA. 酵母双杂交实验显示, 硫磺矿硫化叶菌 (与芝田硫化叶菌亲缘关系很近) 的 DNA 连接酶, 与该菌所含的 3 个增殖细胞核抗原 (PCNA) 同源蛋白中的一个 (PCNA-1) 有相互作用, 而与另外 2 个同源蛋白 (PCNA-like 和 PCNA-2) 则无相互作用. 在古菌中高度保守的 Sac10b 蛋白家族成员 *Ssh10b* 能够激活 *Ssh* 连接酶的活性, 而硫化叶菌中的主要染色体蛋白——7 ku DNA 结合蛋白 (*Ssh7*) 则对该酶活性没有影响.

关键词 古菌, 硫化叶菌, DNA 连接酶, DNA 结合, Sac10b 家族蛋白, PCNA

学科分类号 Q78

DNA 连接酶催化 DNA 链的相邻 3'-羟基和 5'-磷酸基团发生缩合反应, 形成磷酸二酯键^[1]. 这类酶在 DNA 复制、重组和修复等遗传过程中起着十分重要的作用^[2]. 根据辅基特异性, DNA 连接酶分为两大类: ATP 依赖型 (EC 6.5.1.1) 和 NAD⁺ 依赖型 (EC 6.5.1.2). ATP 依赖型 DNA 连接酶广泛存在于病毒、古菌、真核生物和个别细菌^[3], 而 NAD⁺ 依赖型 DNA 连接酶只发现于细菌中^[4]. 两类连接酶在氨基酸序列上没有相似性, 但位于活性中心的 KXDG 序列是高度保守的^[5]. DNA 连接酶催化的连接反应包括以下 3 步: a. ATP 或 NAD⁺ 将其腺苷基团转移到 DNA 连接酶活性中心位点的赖氨酸残基的 ϵ -氨基上, 同时释放出焦磷酸或烟酰胺单核苷酸; b. 腺苷基团从酶-腺苷酸中间体转移到 DNA 的 5' 端磷酸基团, 形成一个焦磷酸衍生物; c. 被激活的 5' 磷酸基团与受体链 3' 端羟基反应, 生成磷酸二酯键, 从而封闭切口, 同时释放出 AMP^[6].

关于细菌、真核生物和病毒 DNA 连接酶的研究已有很多, 但对古菌 DNA 连接酶的关注只是近几年的事情. Kletzin^[7] 从极端嗜热古菌 *Desulfurolobus ambivalens* 中鉴定出了第一个古菌 DNA 连接酶的基因序列, 并发现其氨基酸序列类似真核生物的 ATP 依赖型 DNA 连接酶. 迄今, 已有关于 5 个古菌 DNA 连接酶生化性质的研究报道, 这些古菌包括 *Methanobacterium thermoautotrophicum*^[8]、*Thermococcus kodakaraensis*^[9]、

Sulfolobus shibatae^[10]、*Aeropyrum pernix*^[11] 和 *Thermococcus fumicolans*^[12]. 这些 DNA 连接酶都属于 ATP 依赖型, 能够在与宿主生活环境类似的高温条件下封闭 DNA 切刻. 此外, 这些古菌 DNA 连接酶具有一些独特的性质. 例如, *A. pernix* DNA 连接酶能够利用 ADP, *T. kodakaraensis* 和 *T. fumicolans* 的 DNA 连接酶, 在不同程度上利用 NAD⁺ 进行 DNA 连接反应. 研究古菌 DNA 连接酶将有助于了解细菌、古菌和真核生物中连接酶、乃至遗传机制的系统发育学关系. 另外, 极端嗜热 DNA 连接酶可用于连接酶链反应 (LCR). 基于 LCR 的突变检测方法, 在诊断某些遗传疾病以及淋球菌和沙眼衣原体感染等方面, 可能具有一定的价值.

在先前的研究中, 我们从极端嗜热古菌芝田硫化叶菌中获得了一个编码 ATP 依赖型 DNA 连接酶 (*Ssh* 连接酶) 的基因, 并对重组蛋白的性质进行了初步研究^[10]. 序列分析的结果显示, 该酶含有在 ATP 依赖型 DNA 连接酶中高度保守的 6 个模体 (motif), 其活性中心的赖氨酸残基位于氨基酸序列的第 260 位. *Ssh* 连接酶在 ATP 及 Mn²⁺、Mg²⁺ 和

*国家自然科学基金项目资助(39925001, 30030010)和中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-SW-112).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62624971, Fax: 010-62653468, E-mail: huangl@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2004-08-10, 接受日期: 2004-09-10

Ca²⁺ 等二价阳离子存在的条件下, 能够封闭 DNA 链上的切刻, 其最适反应温度为 60~80°C. 本文对该酶的反应机制、底物结合性质、以及与 DNA 复制蛋白和染色体蛋白的相互作用进行了初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

芝田硫化叶菌和硫磺矿硫化叶菌菌株购自 American Type Culture Collection (ATCC). NTP、dNTP、NAD⁺ 和限制性酶购自 Roche 公司和 Promega 公司. MATCHMAKER 双杂交系统 3 购自 Clontech 公司. [γ -³²P]ATP、[α -³²P]ATP 和 [α -³²P]dATP 购自北京市福瑞生物工程公司. 小牛胸腺 DNA 购自 Sigma 公司. MicroSpin G-25 柱购自 Amersham Pharmacia 公司. 其他试剂均为分析纯.

1.2 蛋白质的纯化

Ssh 连接酶、*Ssh7* 和 *Ssh10b* 的表达和纯化参见文献[10,13,14].

1.3 连接酶底物的制备

36 bp 的供体链 (5' CTCTAGAGTCGACCTG CAGGCATGCAAGCTTGGCGT 3') 和 30 bp 的受体链 (5' CAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG ATC 3') 与单链 M13mp19 退火得到完全配对的连接酶底物. 供体链 5' 端用 [γ -³²P]ATP 标记后经 MicroSpin G-25 柱纯化. ³²P 标记的 36mer、30mer 和 M13mp19 ssDNA 的退火比例为 1:3:2. 退火混合物中加入 NaCl 至 0.1 mol/L, 95°C 加热 10 min, 缓慢自然冷却至室温.

1.4 连接反应

标准反应体系为 20 μ l. 在反应缓冲液 (50 mmol/L Bis-Tris-HCl, pH 6.5 在 22°C 配制, 1 mmol/L ATP, 5 mmol/L DTT, 5 mmol/L MnCl₂, 50 mg/L BSA) 中加入 30 ng 重组 *Ssh* 连接酶和 1 pmol ³²P 标记的底物, 65°C 反应 10 min. 加入 20 μ l 加样缓冲液 (98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.01% 溴酚兰) 终止反应. 95°C 变性 5 min. 在含 7 mol/L 尿素的 8% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 缓冲液为 1 \times TBE. 干胶, 对 X 光胶片曝光或用 Phosphoimager 进行定量.

1.5 连接酶的腺苷化和去腺苷化

反应体系为 10 μ l, 包括 50 mmol/L Bis-Tris-HCl, pH 6.5 22°C, 5 mmol/L DTT, 5 mmol/L MnCl₂, 50 mg/L BSA, 1 μ mol/L [α -³²P]ATP 或 [α -³²P]dATP 和 2.5 μ g Mono Q 组分或纯化

的 *Ssh* 连接酶. 65°C 保温 10 min. 加入 10 μ l SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的加样缓冲液终止反应, 并立即煮沸 5 min. 10% (SDS-PAGE) 分离. 干胶, 放射自显影. 在去腺苷化反应中, 加入 SDS 加样缓冲液之前, 先加入 2 μ g DNase I 活化的小牛胸腺 DNA, 65°C 继续保温 10 min. 其他操作步骤同上.

1.6 电泳迁移率改变实验 (EMSA)

36 bp 的寡核苷酸和 76 bp 的模板链 (5' TTTTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG ACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAA TTCCTGTTTTT 3') 以摩尔比 1:1 进行退火, 制备不含切刻的双链 DNA 底物. 36 bp、76 bp 和 30 bp 的寡核苷酸以摩尔比 1:1:2 进行退火, 制备含切刻的双链 DNA 底物. 这样, 两种底物都含有 ³²P 标记的、未退火的单链 36 bp 寡核苷酸. 36 bp、30 bp 的寡核苷酸序列和退火条件同 1.2 所述. 反应体系为 20 μ l, 包括 50 mmol/L Bis-Tris-HCl (pH 6.5), 5 mmol/L DTT, 5% 甘油, 1 pmol 底物和不同量的 *Ssh* 连接酶. 65°C 保温 10 min. 0.1 \times TBE, 5% PAGE 分离. 干胶, 放射自显影.

1.7 酵母双杂交检测

将硫磺矿硫化叶菌中 21 个推测编码 DNA 复制蛋白的基因, 分别克隆到载体 pGBKT7 和 pGADT7 中. 酵母菌株 AH109 感受态的制备和质粒的共转化参照手册说明. 对照质粒为 pGADT7-T、pGBKT7-53 和 pGBKT7-Lam. 融合蛋白在酵母体内的表达通过蛋白质印迹验证. 转化子在 SD-Leu/Trp (不含亮氨酸和色氨酸) 平板上划线, 30°C 继续培养 1 天. 将菌体用无菌水重悬至 A₆₀₀ \approx 0.2, 分别取 5 μ l, 点样在 SD-Leu/Trp 和 SD-His/Leu/Trp 平板上. 30°C 培养 3 天, 照相. 对于每一组合至少检测 5 个菌落, 在结果中提供了 2 个代表性的点.

2 结 果

2.1 *Ssh* 连接酶的辅因子特异性

在标准连接反应条件下, 采用不同的 NTP、dNTP 及 NAD⁺ 作为能量供体, 定量检测了 *Ssh* 连接酶的辅因子特异性. 所用底物为, 由 2 个寡聚核苷酸 (30mer 和标记的 36mer) 与单链 M13 DNA 退火形成的含单切刻 (nick) 的部分双链 DNA (图 1c), 连接产物为标记的 66mer. 结果表明, ATP 是 *Ssh* 连接酶的最适辅因子, dATP 也具有辅因子活性, 但 *Ssh* 连接酶以 dATP 作为辅因子时的连接效率,

仅约以 ATP 为辅因子时的 8% (图 1a). 因此, *Ssh* 连接酶具有较为严格的辅因子特异性, 与所有已经进行生化分析的古菌连接酶一样, 属于 ATP 依赖型连接酶. 当 ATP 浓度低于 2 mmol/L 时, *Ssh* 连接

酶催化的连接反应初速度随着 ATP 浓度的增加而加快. 高浓度的 ATP 对连接酶活性具有明显的抑制作用, 当 ATP 浓度为 10 mmol/L 时, 酶活性的抑制达到 95% (图 1b).

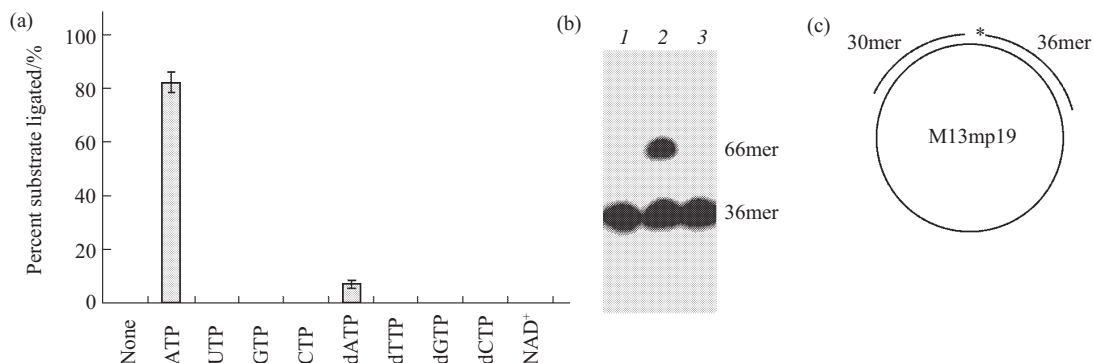


Fig.1 Cofactor requirement of *Ssh* ligase

(a) Cofactor specificity of *Ssh* ligase. Ligation reactions were carried out at 65°C for 10 min in the presence or absence of a cofactor (1 mmol/L) as indicated. (b) Effect of ATP concentrations on the activity of *Ssh* ligase. Ligation reactions were carried out at 65°C for 10 min in presence of ATP at various concentrations (0, 1 and 10 mmol/L) in the presence of the ³²P-labeled substrate (1 pmol). 1: 0 mmol/L; 2: 1 mmol/L; 3: 10 mmol/L. (c) A schematic diagram of the ligase substrate. The radiolabel is shown by an asterisk.

2.2 *Ssh* 连接酶的腺苷化及腺苷基团的转移

DNA 连接反应的第一步是连接酶的腺苷化, 即位于连接酶活性中心的赖氨酸残基上的 ε-氨基, 与辅因子的腺苷基团形成共价连接, 形成酶-AMP 中间体. 为了检测 *Ssh* 连接酶的腺苷化, 将连接酶与标记的 ATP 或 dATP 保温, 然后通过 SDS-PAGE 分离酶-AMP 或酶-dAMP 中间体. 在图 2 a 和图 2 b 所示实验中, 采用的 *Ssh* 连接酶为该酶纯化过程中 Mono Q 柱层析的组分^[10]. 该组分

含全长的重组 *Ssh* 连接酶 (601 个氨基酸残基) 和缺失了 N 端 109 个氨基酸残基的多肽, 后者可能是 *Ssh* 连接酶在纯化过程中产生的蛋白酶解产物^[10]. 在 [³²P]dATP 存在情况下, 全长 *Ssh* 连接酶及其截短产物都具有腺苷化活性 (图 2b). 序列分析表明, N 端缺失的蛋白质仍保留了 DNA 连接酶中保守的 6 个模体 (motif)^[10]. 已经知道, 古菌 DNA 连接酶在结构上类似于真核生物 DNA 连接酶 I^[8]. 真核生物 DNA 连接酶 I 与 PCNA 发生相互作用, 作用位点

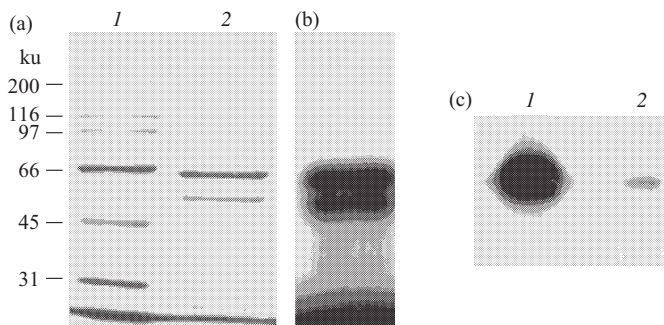


Fig.2 Adenylation and deadenylation of *Ssh* ligase

(a) SDS-PAGE analysis of the MonoQ fraction containing *Ssh* ligase (lane 2). Molecular mass standards (lane 1) and their sizes (in ku) are indicated. (b) Adenylation of *Ssh* ligase with dATP. The MonoQ fraction was incubated with [³²P]dATP and then subjected to SDS-PAGE and autoradiography. (c) Transfer of the adenylation moiety from ATP to *Ssh* ligase and from the enzyme to nicked DNA. *Ssh* ligase was incubated first with [³²P]ATP (adenylation) at 65°C for 10 min and subsequently with nicked DNA (deadenylation) at 65°C for another 10 min. Samples taken at both stages were electrophoresed. The gel was exposed to X-ray film. 1: adenylation; 2: deadenylation.

位于连接酶的 N 端^[15]. 因此, 我们推测, *Ssh* 连接酶的 N 端序列对于连接活性是非必需的, 很可能与连接酶与其他蛋白质(如 PCNA)的相互作用有关, 起调控作用. 将纯化的全长 *Ssh* 连接酶与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 保温后, 也检测到了酶 -AMP 中间体的形成(图 2c). 在腺苷化反应完成后, 加入 DNase I 活化的小牛胸腺 DNA, 继续反应 10 min. 经 SDS-PAGE 及放射自显影分析发现, 原先腺苷化的连接酶发生了去腺苷化(连接反应的第二步), 腺苷基团应该已经转移到了小牛胸腺 DNA 的切刻上.

2.3 *Ssh* 连接酶与底物的结合

将寡聚核苷酸链按一定比例退火后, 得到了含切刻及不含切刻的 2 种 DNA 双链模板与未退火的、标记的单链 DNA 的混合物. 电泳迁移率改变实验(EMSA)表明, *Ssh* 连接酶与含切刻及不含切刻的双链 DNA 模板均能结合, 而且结合亲和力没有可检测的区别. 另外, 一个双链 DNA 分子可以同时结合多个酶分子. 但是, 该酶不结合单链 DNA(图 3).

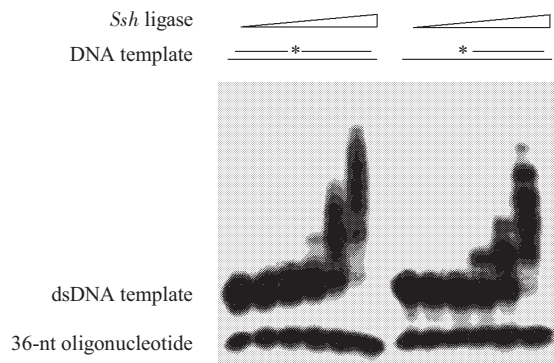


Fig.3 Binding of DNA by *Ssh* ligase

A mixture of radiolabeled duplex DNA with (left) or without (right) a nick and single-stranded DNA was incubated with *Ssh* ligase (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 nmol/L). Samples were electrophoresed in a polyacrylamide gel. The gel was exposed to X-ray film. The position of radiolabel in the duplex template is indicated by an asterisk.

2.4 硫化叶菌 DNA 连接酶与 DNA 复制蛋白的相互作用

DNA 连接酶在 DNA 复制过程中起重要作用. 古菌 DNA 连接酶与真核生物 DNA 连接酶 I 同源, 后者参与冈崎片段的连接^[16]. 本研究以硫磺硫化叶菌为材料, 采用酵母双杂交方法分析了硫化叶菌 DNA 连接酶与其他复制蛋白之间的相互作用. 芝田硫化叶菌与同属的硫磺硫化叶菌的亲缘关系非常接

近, 两者的 DNA 连接酶在氨基酸水平上的同源性为 96%^[10], 而硫磺硫化叶菌的基因组序列已经测定完成^[17]. 已知硫磺硫化叶菌含有 20 个可能编码 DNA 复制蛋白的开放阅读框(open reading frame), 分别编码 DNA 连接酶(*Sso* 连接酶)、引发酶、MCM、PCNA-like、PCNA-1、PCNA-2、CDC6-1、CDC6-2、CDC6-3、DPO1、DPO3、DPO4、FEN-1、RFC_S、RFC_L、TOP_A、TOP_{R-2}、TOP_{6A}、TOP_{6B} 和 SSB. 在本实验中, 首先构建了这些复制蛋白(包括 DNA 连接酶)与 Gal4 激活域和 DNA 结合域的融合蛋白. 再通过酵母双杂交方法, 检测 DNA 连接酶/激活域及连接酶/结合域融合蛋白, 与其余 19 个复制蛋白的相应融合蛋白之间的相互作用. 结果显示, 硫磺硫化叶菌 DNA 连接酶仅与 PCNA 的一个同源蛋白(注释为 PCNA-1)发生相互作用. 有趣的是, 该菌编码的另外 2 个 PCNA 类似物(PCNA-like、PCNA-2)与连接酶之间没有检测到有相互作用(图 4). 与此结果相一致, Dionne 等^[18]通过免疫共沉淀试验发现, 硫磺硫化叶菌 DNA 连接酶与 PCNA-1 之间存在相互作用, 而且 PCNA 三聚体对连接酶活性有激活作用. 关于 PCNA 对 *Ssh* 连接酶是否有激活作用, 尚有待于进一步研究.

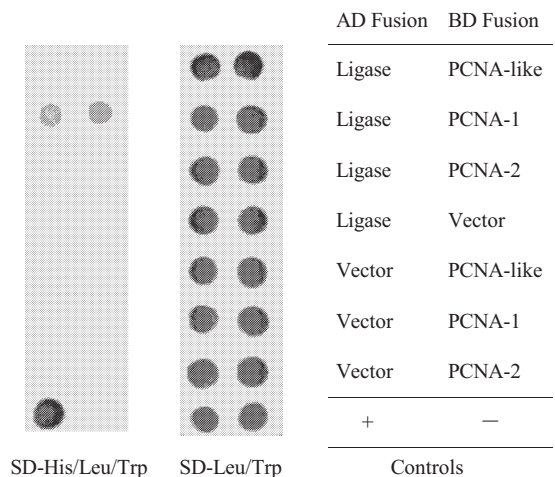


Fig.4 Interaction between *Sulfolobus* DNA ligase and PCNA homologues

For each combination, at least five colonies were tested and two representative spots are shown.

2.5 DNA 结合蛋白对 *Ssh* 连接酶活性的调控作用

硫化叶菌属合成大量低分子质量 DNA 结合蛋白, 根据分子质量分为 7、8 和 10 ku 蛋白三大类^[19]. 其中, 7 和 10 ku 蛋白含量最为丰富. 芝田硫

化叶菌中的 7 ku 蛋白(Ssh7)和 10 ku 蛋白(Ssh10b)的胞内含量分别达到 4.8%和 4%，均足以覆盖整个基因组 DNA^[13,14]。据推测，Ssh7 和 Ssh10b 参与了染色体的组织包装，并且对染色体的热稳定性有重要贡献。为了了解这些 DNA 结合蛋白对 Ssh 连接酶活性的可能影响，我们在 Ssh7 或 Ssh10b 存在的条件下进行了连接反应。结果显示，在生理浓度 (2 $\mu\text{mol/L}$ 或 4 $\mu\text{mol/L}$)下，Ssh10b 对连接活性具有明显的增强作用，而 Ssh7 则无此作用(图 5)。

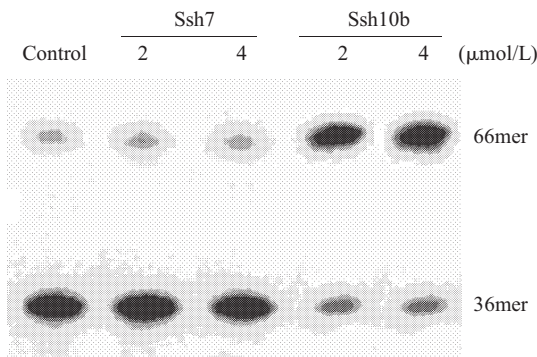


Fig.5 Effects of *Sulfolobus* chromatin proteins on Ssh ligase activity

Ligation reactions were carried out at 65°C for 2 min in the presence of Ssh7 or Ssh10b (2 or 4 $\mu\text{mol/L}$). No chromatin proteins were added in the control lane.

3 讨 论

关于嗜热古菌 DNA 连接酶的生化研究最近刚刚开始。在为数尚不多的研究中已经发现，古菌 DNA 连接酶具有一些独特的性质。例如：尽管古菌 DNA 连接酶均为 ATP 依赖型连接酶，但它们在辅因子选择的严谨程度上表现出罕见的多样性。广古菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 的 DNA 连接酶除了能够利用 ATP 作为能量供体，在 NAD^+ 存在时也能表现出部分活性^[9]。最近有人报道，*Thermococcus fumicolans* 的 DNA 连接酶以 ATP 和 NAD^+ 为辅因子时均能够表现出很强的连接活性，并据此提出了修改 DNA 连接酶传统分类方法的建议^[22]。泉古菌 *Aeropyrum pernix* K1 的 DNA 连接酶依赖于 ATP，但有意思的是，ADP 也能使其具有很强的连接活性^[11]。中度嗜热的甲烷杆菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA 连接酶的最适能量供体为 ATP，但在 dATP 存在时也具有部分活性^[8]。本研究结果表明，芝田硫化叶菌 DNA 连接酶与 *Methanobacterium*

thermoautotrophicum 的 DNA 连接酶一样，最适辅因子为 ATP，利用 dATP 时也有较弱的活性。嗜热古菌 DNA 连接酶辅因子选择性的差异，可能反映了这些重要的 DNA 修饰酶的系统发育学关系以及环境适应性。

尽管 Ssh 连接酶活性依赖于 ATP，但当 ATP 浓度达到 10 mmol/L 时，连接酶活性受到明显抑制。与此相似，T3 噬菌体 DNA 连接酶也受到 ATP 的抑制，当 ATP 浓度为 2 mmol/L 时，酶活性抑制达到 50%^[20]。可能的解释是，在较高浓度的 ATP 存在时，连接酶有可能在一个连接反应循环尚未完成时又被腺苷化，腺苷化的连接酶不能催化最后的连接反应步骤^[21]。

与 *Neisseria meningitidis* 的 ATP 依赖型 DNA 连接酶一样，Ssh 连接酶不能结合单链 DNA，对含与不含切刻的双链 DNA 具有同样的亲和力^[22]。我们先前发现，Ssh 连接酶不能催化单链 DNA 的连接。这一结果与该酶的 DNA 结合特性是一致的。由于 Ssh 连接酶对于含切刻的双链 DNA 未表现出特别的偏好，我们推测，在细胞内连接酶对切刻的识别与结合可能依赖于其他蛋白质因子的帮助。在本研究中，我们采用酵母双杂交方法发现，Sso 连接酶与注释为 PCNA-1 的推测蛋白质之间存在相互作用，而与另外两个推测的 PCNA(即 PCNA-like 和 PCNA-2)则无相互作用。在真核生物 DNA 复制过程中，DNA 连接酶 I 在 FEN-1 和 RNase H 的协助下，参与完成冈崎片段的连接。真核生物 DNA 连接酶 I 通过其 N 端的一小段保守序列(与 PCNA 发生相互作用的蛋白质多数含有这一保守序列)与 PCNA 结合^[23]。由于 PCNA 存在于正在复制中的 DNA 滞后链上待修复位点，PCNA 通过蛋白质与蛋白质之间的相互作用可以将连接酶募集至其作用位点。真核生物 DNA 连接酶 I 与 PCNA 的相互作用受磷酸化水平的调控^[15]。在 G1 期，DNA 连接酶 I 处于去磷酸化状态，而在 S 期磷酸化水平逐渐升高，在 G2/M 期达到峰值，连接酶 I 与 PCNA 的相互作用只在 G1 和 S 期发生，而在 G2/M 期则无相互作用。古菌 DNA 连接酶与 PCNA 的相互作用是否具有类似的调控机制还有待进一步研究。

越来越多的证据表明，染色体结构蛋白影响与 DNA 发生相互作用的酶活性。在硫化叶菌中存在两种主要的、含量极为丰富的小分子碱性蛋白质，即 Ssh7 和 Ssh10b。很多人认为，这两种蛋白质参与染色体的组织和包装。先前的结果显示，在生理浓度

条件下, Ssh7 对 DNA 聚合酶的活性具有调控作用, 而 Ssh10b 则没有这一作用^[24]. 本工作表明, Ssh10b 对 Ssh 连接酶的活性具有增强作用, 而 Ssh7 则无此作用. 以上研究结果提示, 染色体蛋白对于参与 DNA 代谢的酶具有调控作用, 而且, 不同的染色体蛋白在功能上存在着明确分工. 因此, 研究染色体蛋白在 DNA 代谢中的作用, 对于揭示极端嗜热古菌遗传信息传递过程的特点, 以及对热适应性的分子基础具有重要意义.

参 考 文 献

- Lehman I R. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*, 1974, **186** (4166): 790~797
- Lindahl T, Barnes D E. Mammalian DNA ligases. *Annu Rev Biochem*, 1992, **61**: 251~281
- Doherty A J, Wigley D B. Functional domains of an ATP-dependent DNA ligase. *J Mol Biol*, 1999, **285** (1): 63~71
- Timson D J, Wigley D B. Functional domains of an NAD⁺-dependent DNA ligase. *J Mol Biol*, 1999, **285** (1): 73~83
- Luo J, Barany F. Identification of essential residues in *Thermus thermophilus* DNA ligase. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (15): 3079~3085
- Engler M J, Richardson C C. DNA ligases. In: Boyer PD ed. *The Enzymes*. New York: Academic Press, 1982, **15**: 3~29
- Kletzin A. Molecular characterisation of a DNA ligase gene of the extremely thermophilic archaeon *Desulfurolobus ambivalens* shows close phylogenetic relationship to eukaryotic ligases. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (20): 5389~5396
- Sriskanda V, Kelman Z, Hurqitz J, *et al.* Characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the thermophilic archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (11): 2221~2228
- Nakatani M, Ezaki S, Atomi H, *et al.* A DNA ligase from a hyperthermophilic archaeon with unique cofactor specificity. *J Bacteriol*, 2000, **182** (22): 6424~6433
- Lai X, Shao H, Hao F, *et al.* Biochemical characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus shibatae*. *Extremophiles*, 2002, **6** (6): 469~477
- Jeon S J, Ishikawa K. A novel ADP-dependent DNA ligase from *Aeropyrum pernix* K1. *FEBS Letters*, 2003, **550** (1~3): 69~73
- Rolland J L, Gueguen Y, Persillon C, *et al.* Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon *Thermococcus fumicolans*. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **236** (2): 267~273
- Mai V, Chen X, Hong R, *et al.* Small abundant DNA binding proteins from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* contain negative DNA supercoils. *J Bacteriol*, 1998, **180** (9): 2560~2563
- Xue H, Guo R, Wen Y, *et al.* An abundant DNA binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* affects DNA supercoiling in a temperature-dependent fashion. *J Bacteriol*, 2000, **182** (14): 3929~3933
- Rossi R, Villa A, Negri C, *et al.* The replication factory targeting sequence/PCNA-binding site is required in G₁ to control the phosphorylation status of DNA ligase I. *EMBO J*, 1999, **18** (20): 5745~5754
- Waga S, Bauer G, Stillman B. Reconstitution of complete SV40 DNA-replication with purified replication factors. *J Biol Chem*, 1994, **269** (14): 10923~10934
- She Q, Singh R K, Confalonieri F, *et al.* The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (14): 7835~7840
- Dionne I, Nookala R, Jackson S P, *et al.* A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Cell*, 2003, **11** (1): 275~282
- Grote M, Dijk J, Reinhardt R. Ribosomal and DNA binding proteins of the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochem Biophys Acta*, 1986, **873** (3): 405~413
- Cai L, Hu C, Shen S, *et al.* Characterization of bacteriophage T3 DNA ligase. *J Biochem (Tokyo)*, 2004, **135** (3): 397~403
- Kornberg A, Baker T A. *DNA Replication*. New York: Freeman, 1992. 311~314
- Magnet S, Blanchard J S. Mechanistic and kinetic study of the ATP-dependent DNA ligase of *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry*, 2004, **43** (3): 710~717
- Levin D S, Bai W, Yao N, *et al.* An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (24): 12863~12868
- Lou H, Duan Z, Huo X, *et al.* Modulation of hyperthermophilic DNA polymerase activity by archaeal chromatin proteins. *J Biol Chem*, 2004, **279** (1): 127~132

Biochemical Properties of DNA Ligase From The Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus shibatae**

LAI Xiao-Qin, HUANG Li**

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract DNA ligase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus shibatae* (*Ssh* ligase) was optimally active in the presence of ATP and partially active in the presence of dATP. The enzyme was adenylated by both ATP and dATP, and the adenylate moiety covalently linked to the active site of the ligase was transferable to nicked DNA. Electrophoretic gel mobility shift assays revealed that the enzyme bound a duplex DNA fragment with a nick and that without a nick with similar affinity, but displayed little affinity for single-stranded DNA. *Sso* ligase, a closely related homologue of *Ssh* ligase from *Sulfolobus solfataricus*, interacted with PCNA-1, one of the three PCNA homologues found in the organism, as detected by yeast two-hybrid assays. No interaction of the enzyme with the other two PCNA homologues (PCNA-like and PCNA-2) was detected. *Ssh10b*, a member of the highly conserved Sac10b protein family of Archaea, stimulated DNA ligation by *Ssh* ligase, whereas *Ssh7*, a major *Sulfolobus* chromatin protein showed no effect on the activity of the ligase.

Key words Archaea, *Sulfolobus solfataricus*, DNA ligase, DNA binding, Sac10b family protein, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (39925001, 30030010) and The Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-112).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62624971, Fax: 86-10-62653468, E-mail: huangl@sun.im.ac.cn

Received: August 10, 2004 Accepted: September 10, 2004