

大肠杆菌 *topA*⁻菌株中 质粒 pBR322 的超凝集结构*

张臻峰 于佳 曹扣 黄熙泰**

(南开大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 天津 300071)

摘要 超凝集 DNA 是质粒 DNA 的一种特殊拓扑结构形式, 最初在大肠杆菌 SD108 (*topA*⁺ *gyrB225*) 细胞中被发现. 现在大肠杆菌 DM800(*topA*⁻ *gyrB225*) 细胞中也发现了这种结构, 这说明超凝集 DNA 的形成与细胞内旋转酶活性降低有直接关系, 而与拓扑异构酶 I 的存在与否无关. 体外实验的结果显示, 具有很强的正超螺旋松弛活性的拓扑异构酶 IV 可以将超凝集 DNA 完全松弛, 这也证明质粒 DNA 的超凝集结构与超螺旋结构在细胞内是可以互变的. 使用原子力显微镜对分离到的 pBR322 DNA 超凝集结构进行分析, 并与普通超螺旋进行比较, 结果表明, 超凝集 DNA 分子的结构发生了巨大的变化, 其分子长度比正常超螺旋分子缩短了约 30%, 宽度和高度则增加了 60%, 结构更接近于 A 型 DNA. 另外, 原子力显微镜研究结果表明, 氯喹的嵌入并非改变了超凝集 DNA 的超螺旋状态, 而是使其打结并最终压缩成一团.

关键词 超凝集 DNA, 大肠杆菌 DM800, 原子力显微镜, 拓扑异构酶 IV

学科分类号 Q71

DNA 是细胞内最主要的遗传物质, 其三维结构对细胞内 DNA 复制和 RNA 转录等生理活动有非常大的影响. 因此, 研究 DNA 的拓扑结构形式及其包装方式具有非常重要的意义. 1966 年 Vinograd 等^[1]论述了双链 DNA 有 4 种不同的结构形式: 超螺旋 DNA(Form I)、开环 DNA(Form II)、线性 DNA(Form III) 以及碱变性的超螺旋 DNA(Form IV). 后来, 瑞士科学家发现并证实了一种由互补的单链环形 DNA 在体外退火形成的双链 DNA (Form V)^[2]. 其中, 质粒 DNA Form I、Form II 以及 Form III 的具体结构已经被透射电镜和原子力显微镜的研究结果所证实^[3~5], Form IV 和 Form V 的结构也已经有了确实的证据^[6,7].

1990 年, Huang 等^[8,9]发现, 从 II 型拓扑异构酶缺陷的大肠杆菌 SD108 细胞制备的质粒 pBR322 DNA 样品中, 含有一种区别于已知 5 种结构类型的 DNA 成分. 由于它的高密度和在电泳中的高迁移率, 该成分被称为超凝集 DNA (super condensed DNA). 在此后的研究中, 黄熙泰等^[10]又从大肠杆菌拓扑异构酶基因野生型的菌株 HB101 中分离出超凝集结构的 pUC18 DNA.

质粒超凝集 DNA 的发现开辟了 DNA 结构研

究的新领域, 为了解 DNA 在原核与真核细胞染色体内的高程度集缩, 以及在病毒衣壳内的包装提供了重要线索. 然而由于缺乏对超凝集 DNA 结构特征的直接描述, 质粒 DNA 的超凝集结构一直没有引起广泛注意. 在本研究中, 我们将质粒 pBR322 转化到 I 型拓扑异构酶缺陷的大肠杆菌 DM800 细胞中, 利用温和的方法制备质粒 DNA, 发现并分离了其中的超凝集成分. 在体外试验中证实该结构可以被大肠杆菌拓扑异构酶 IV 完全松弛. 同时, 为避免透射电镜在样品制备中可能对 DNA 样品的结构造成影响, 我们利用原子力显微镜技术展示并分析了超凝集 pBR322 DNA 的结构特征以及嵌入试剂对其结构的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒. 大肠杆菌 DM4100(*Escherichia*

*国家自然科学基金资助项目(39970014).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 022-23508874, E-mail: xitaihuang@hotmail.com

收稿日期: 2006-07-31, 接受日期: 2006-08-29

coli, *topA*⁺, *gyr*⁺)、SD108(*Escherichia coli*, *topA*⁺, *gyrB225*) 以及 DM800 (*Escherichia coli*, *topA*⁻, *gyrB225*) 由纽约公共卫生研究所 Dr. Drlica 提供. 质粒 pBR322 购自晶美公司, 质粒对细胞的转化采用 CaCl₂ 法, 按照 Cohen 等^[11]的方法进行.

1.1.2 酶及各种试剂. 大肠杆菌拓扑异构酶 I 购自晶美公司; 旋转酶和拓扑异构酶 IV 购自 TopoGen 公司; 氯喹、EtBr、NaOH 以及琼脂糖购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 样品的制备. 使用 Guerry 等^[12]的方法略加改进. 具体步骤如下: 常规培养的菌液 1 000 ml, 在 4℃ 5 000 g 离心 10 min; 菌体沉淀加 10 mg 溶菌酶干粉, 用玻璃棒把残留液、菌体和溶菌酶调成糊状; 再加入 25%蔗糖 -50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0) -1 mmol/L EDTA, 30 ml, 混匀后室温放置 5 min; 再加入 0.25 mol/L EDTA (pH 8.0) 2 ml 和 10% SDS 4 ml, 摇匀后室温放置 5 min; 接着加入 5 mol/L NaCl 溶液使细菌裂解液中的 NaCl 浓度为 1 mol/L, 并于 4℃ 放置 4 h 或者过夜. 菌溶液在 4℃ 3 000 r/min 离心 30 min; 上清液加等体积蒸馏水和 60 μl 10 mg/L 的 RNase A, 37℃ 保温 1 h, 最后用等体积 Tris 饱和酚震荡抽提 2 次; 用 2 倍体积的无水乙醇沉淀质粒 DNA; TE 回溶.

1.2.2 DNA 样品的拓扑异构酶处理. 从菌株 DM800 以及 SD108 中抽提的质粒 DNA 样品, 分别使用拓扑异构酶 I、旋转酶以及拓扑异构酶 IV 进行处理, 采用该酶推荐的缓冲体系, 其中旋转酶分为添加 ATP 和不添加 ATP 的 2 种缓冲液.

1.2.3 质粒 DNA 样品的琼脂糖凝胶电泳分析. 1-D 电泳按 Sambrook 等^[13]的方法进行: 使用 1%琼脂糖和 TAE 缓冲液, 缓冲液中添加不同浓度的氯喹 (2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L). 2-D 电泳按 Huang 等^[9]的方法进行: 第一向缓冲液中添加 3 mg/L 的氯喹, 3 V/cm 电泳 12 h; 第二向缓冲液中添加 15 mg/L 的氯喹, 2.5 V/cm 电泳 8 h.

1.2.4 原子力显微镜成像.

将质粒 DNA 样品稀释到 3 mg/L, 向其中加入 MgCl₂ 使终浓度为 1 mmol/L. 取加入 Mg²⁺ 的 DNA 样品 15 μl, 滴加到新鲜剥开的云母片上, 室温静置 5 min. 100 μl 去离子水润洗 3 遍, 然后用氮气吹干 5 min. 使用 Nanoscope III a Multimode-AFM instrument (Digital Instruments) 在轻敲模式下进行扫描. 针尖使用共振频率 106 kHz 的 super-sharp

silicon tips (Silicon-MDT Ltd.). 扫描速度为 1~2 Hz.

DNA 分子长度的测量使用软件 ImageJ Ver1.33u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA); 宽度以及高度的测量则使用原子力显微镜自带的软件.

2 结果与讨论

2.1 超凝集 pBR322 DNA 与细胞内拓扑异构酶有关

为了排除碱法抽提对质粒构象造成的影响, 本文采用改进的 Guerry 法抽提大肠杆菌 DM4100、DM800 以及 SD108 携带的质粒 pBR322. 1-D 琼脂糖凝胶电泳的结果显示, 缺陷株 DM800 以及 SD108 中均有超凝集 pBR322 DNA 的存在(图 1-1、2), 而野生株 DM4100 中则不含有超凝集 pBR322 DNA (图 1-3). 由此可见: a. pBR322 在野生株中不能形成超凝集结构; b. 由于 DM800 以及 SD108 分别为拓扑异构酶 I 缺陷型和野生型, 所以超凝集 pBR322 DNA 的形成应该与拓扑异构酶 I 无关; c. DM800 以及 SD108 都带有 *gyrB225* 突变, 因此超凝集 pBR322 DNA 的形成应该与旋转酶的突变有关. 菌株 DM800 以及 SD108 中的 *gyrB225* 突变使细胞内的旋转酶活力下降, 即消除正超螺旋引入负超螺旋的能力下降, 这可能是超凝集 DNA 形成的主要原因.

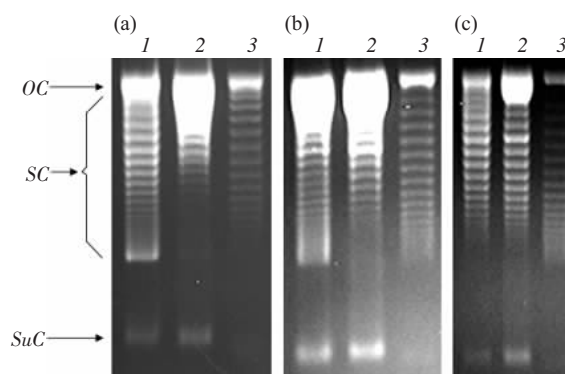


Fig. 1 Chloroquine agarose gel electrophoresis of pBR322 DNA samples

Chloroquine was added in the buffer to the concentration of 2 mg/L (a), 5 mg/L (b), 10 mg/L (c). 1: Plasmid DNA isolated from DM800; 2: Plasmid DNA isolated from SD108; 3: Plasmid DNA isolated from DM4100. OC: Open circular DNA; SC: Supercoiled DNA; SuC: Supercondensed DNA.

2.2 大肠杆菌拓扑异构酶对超凝集 pBR322 DNA 的作用

本试验对从菌株 DM800 以及 SD108 中抽提的

质粒 DNA 样品分别使用拓扑异构酶 I、旋转酶以及拓扑异构酶 IV 进行处理, 并采用 2-D 氯喹琼脂糖凝胶电泳检测处理结果(图 2). 电泳结果显示: 从 DM800 以及 SD108 中抽提的质粒 DNA 对 3 种拓扑异构酶的反应是相同的, 拓扑异构酶 I (图 2-2, 7)可以松弛普通超螺旋 DNA 但对超凝集结构没有作用. 在含有 ATP 的体系中(图 2-3, 8), 旋转酶可以稍微增加普通超螺旋 DNA 的负超螺旋程度, 但对超凝集结构没有作用; 在不含 ATP 的体系中(图 2-4, 9), 旋转酶可以稍微降低普通超螺旋

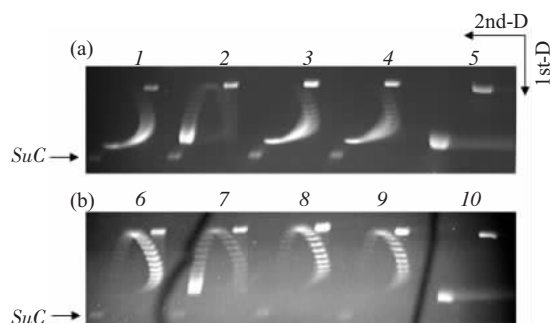


Fig. 2 2-D agarose gel electrophoresis of the effect of *E. coli* topoisomerases on the supercondensed pBR322 DNA. The plasmid DNA samples isolated from DM800 (a) and SD108 (b) were treated with topoisomerase I, gyrase and topoisomerase IV respectively. 1, 6: Control; 2, 7: Topoisomerase I; 3, 8: Gyrase (with ATP); 4, 9: Gyrase (without ATP); 5, 10: Topoisomerase IV. SuC: Supercondensed DNA.

DNA 的负超螺旋程度但同样对超凝集结构没有作用. 然而, 拓扑异构酶 IV 不仅可以将普通超螺旋 DNA 完全松弛, 而且也将超凝集 DNA 完全松弛. 这一结果说明, 超凝集 DNA 与普通超螺旋 DNA 在细胞内是可以互变的, 这一点对于理解 DNA 超凝集结构的生物学意义是非常重要的.

拓扑异构酶 IV 同时具有松弛正超螺旋和负超螺旋的能力, 而且其松弛正超螺旋的能力远高于松弛负超螺旋的能力^[4], 体外实验结果证实, 拓扑异构酶 IV 可以将超凝集 DNA 完全松弛. 这一点也验证了上文中旋转酶消除正超螺旋的能力下降可能是超凝集 DNA 形成的主要原因的观点. 虽然在体外实验中旋转酶不能消除质粒 DNA 样品中的超凝集 DNA, 但是有可能是由于超凝集 DNA 相对于普通超螺旋 DNA 发生了结构上的较大变化, 使得旋转酶无法将其作为底物.

2.3 超凝集 pBR322 DNA 的结构特征及其对嵌入试剂氯喹的特殊反应

原子力显微术在样品的制备过程中对 DNA 样品的损伤非常小, 可以很好地说明超凝集 pBR322 DNA 的结构特征及其对嵌入试剂氯喹的特殊反应.

普通超螺旋 DNA 和超凝集 DNA 在外形上表现出了明显的不同: 普通超螺旋 DNA 在原子力显微镜下表现为相似的结构(图 3a), 所有 DNA 分子都表现含有不同程度的超螺旋部分; 超凝集 DNA

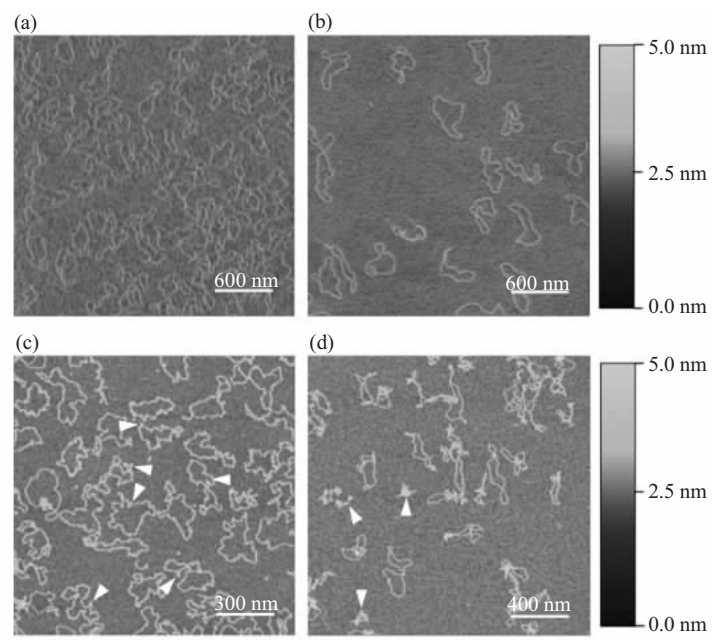


Fig. 3 AFM images of supercoiled pBR322 DNA and supercondensed pBR322 DNA. (a) Normal supercoiled DNA. (b) Normal supercoiled DNA with chloroquine. (c) Supercondensed DNA. (d) Supercondensed DNA with chloroquine.

的结构在原子力显微镜下也比较均一(图 3c), 绝大多数 DNA 分子都呈松弛的环状不含有超螺旋结构, 但 DNA 双链不平滑, 在分子内多处形成纽结(图 3c 中箭头), 这种分子内纽结的形成有可能消解了分子内的扭力. 同时, 2 种分子在长度、宽度以及双链高度等参数上都有明显的区别(表 1). 超凝集 DNA 分子的长度为(963 ± 20) nm(图 4d), 比

普通超螺旋 DNA 分子的长度($1\,361 \pm 20$) nm(图 4a) 缩短了将近 30%, 这可能是它在电泳中泳动速度快的主要原因; 超凝集 DNA 分子的宽度和高度为(11.80 ± 0.48) nm(图 4e)和(1.20 ± 0.19) nm(图 4f), 都比普通超螺旋 DNA 分子(7.03 ± 0.50) nm(图 4b), (0.74 ± 0.08) nm(图 4c)有了明显的增加(约 60%), 表明超凝集 DNA 分子的双链直径增大. 这些数据

Table 1 Comparison of structure parameters between normal supercoiled DNA and supercondensed DNA molecules

DNA samples	Molecules	Length/nm	Width/nm	Height/nm
Normal supercoiled DNA	45	1361 ± 20	7.03 ± 0.50	0.74 ± 0.08
Supercondensed DNA	45	963 ± 20	11.80 ± 0.48	1.20 ± 0.19

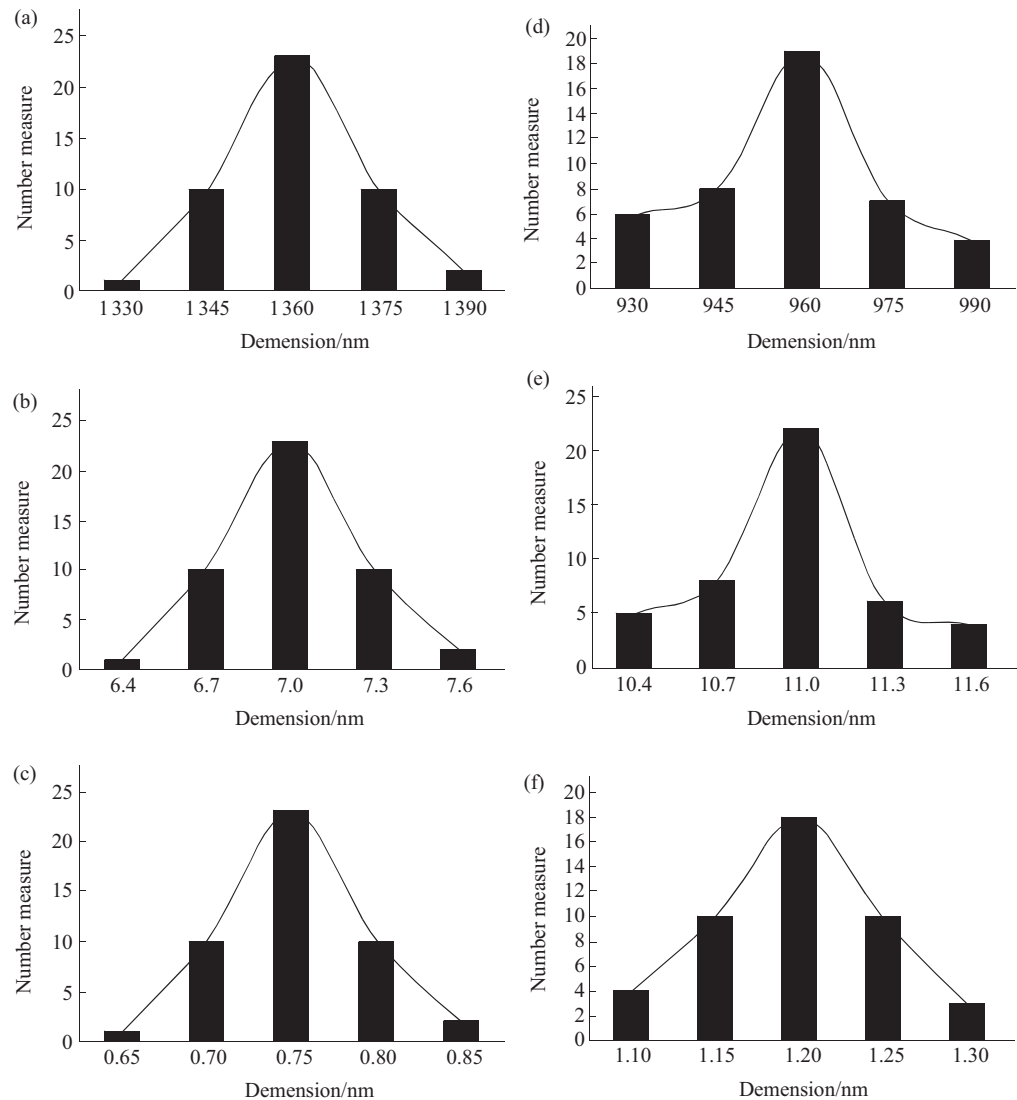


Fig. 4 The histograms of AFM measurements of the dimensions of monomolecular DNA seen in Fig. 3
(a) The average length of supercoiled DNA. (b) The average width of supercoiled DNA. (c) The average height of supercoiled DNA.
(d) The average length of supercondensed DNA. (e) The average width of supercondensed DNA. (f) The average height of supercondensed DNA.

已经明显与 B 型 DNA 的结构参数不符, 反而与 A 型 DNA 的结构参数接近, 说明了超凝集 DNA 分子双链有可能破坏了 B 型 DNA 的结构而形成类似于 A 型 DNA 的结构。

共价闭合环状 DNA(cccDNA)对嵌入试剂的反应, 随溶液中嵌入试剂浓度的增加有一个从负超螺旋 - 松弛 - 正超螺旋转变的过程^[15]。然而, 1-D 氯喹电泳的结果表明, 超凝集 pBR322DNA 对嵌入试剂氯喹的反应与普通超螺旋 pBR322DNA 不同, 氯喹浓度的提高只能提高超凝集 pBR322DNA 的迁移率(图 1)。我们利用原子力显微镜观察氯喹对超凝集 pBR322DNA 分子结构的影响。图 3b 显示, 溶液中含有 10 mg/L 氯喹的普通超螺旋 DNA 分子的结构, 由于反应时间较短氯喹不能充分嵌入到 DNA 分子中, 大部分 DNA 呈松弛环形, 而另外一部分分子则表现为不同程度的正超螺旋(与图 1 中结果相符)。而溶液中含有相同浓度氯喹的超凝集 pBR322DNA 分子对氯喹的反应则相当特殊(图 3d), 所有的分子都在分子内形成了结, 而且缠绕得相当紧密, 有些分子甚至压缩成一团(图 3d 中箭头所示)。这一点可以解释氯喹的嵌入能提高超凝集 pBR322DNA 电泳迁移率的原因。至于图 3d 中分子的不均一性, 是由于反应时间较短, 氯喹不能充分嵌入到 DNA 分子中造成的。

以上的实验结果可以引出以下几点结论: a. 超凝集 pBR322 DNA 的形成与细胞内旋转酶活力降低有直接关系; b. 超凝集 pBR322 DNA 可以被拓扑异构酶 IV 完全松弛, 证明质粒的超凝集结构与超螺旋结构在体内是可以互变的; c. 超凝集 pBR322 DNA 分子的双链结构更近似于 A 型 DNA 而不是 B 型 DNA; d. 氯喹的嵌入可以使超凝集 pBR322 DNA 分子内打结并进一步压缩。这些结论将有助于我们更好地理解超凝集 DNA 分子的结构, 为以后研究超凝集 DNA 在细胞内的生物学意义打下了坚实的基础。

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所李辉博士协助完成原子力显微镜的操作。

参 考 文 献

- 1 Vinograd J, Lebowitz J. Physical and topological properties of circular DNA. *J Gen Physiol*, **49** (6): 103~125
- 2 Stettler U H, Weber H, Koller T, *et al.* Preparation and characterization of form V DNA, the duplex DNA resulting from association of complementary, circular single-stranded DNA. *J Mol Biol*, 1979, **131**(1):21~40
- 3 Zhang P, Bai C, Huang X, *et al.* Study on the topological structure of pBR322 DNA by AFM. *Sci China C Life Sci*, 1996, **39** (1): 1~7
- 4 Martin-Parras L, Lucas I, Martinez-Robles M L, *et al.* Topological complexity of different population of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (14): 3424~3432
- 5 Adamečik J, Vlglasky V, Valle F, *et al.* Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability. *Electrophoresis*, 2002, **23** (19): 3300~3307
- 6 Jansz H S, Baas P D. Structure of the replicative form of bacteriophage ϕ X174 V. *J Mol Biol*, 1968, **32** (2): 159~168
- 7 Stettler U H, Weber H, Koller T, *et al.* Preparation and characterization of form V DNA, the duplex DNA resulting from association of complementary, circular single-stranded DNA. *J Mol Biol*, 1979, **131** (1): 21~40
- 8 Huang X T, Fan T. Supercondenced DNA: A peculiar topological structure of DNA. *Chinese Scientific Bulletin*, 1989, **34** (18): 1679~1685
- 9 Huang X T, Chen X. Supercondenced structure of plasmid pBR322 DNA in an *E. coli* DNA topoisomerase II mutant. *J Mol Biol*, 1990, **216** (2): 195~199
- 10 黄熙泰, 吴永文, 王照清, 等. 质粒 pUC18 DNA 的超凝集结构. *科学通报*, 1993, **30** (19): 1799~1803
Huang X T, Wu Y W, Wang X Q, *et al.* *Chin Sci Bull*, 1993, **30** (19): 1799~1803
- 11 Cohen S N, Chang A C Y, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69** (8): 2110~2114
- 12 Guerry P, LeBlanc D J, Falkow S. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, 1973, **116**(2): 1064~1066
- 13 Sambrook J, Russell D W, *et al.* *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 6.1~6.48
- 14 Crisone N J, Strick T R, Bensimon D, *et al.* Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & Development*, 2000, **14** (22): 2881~2892
- 15 Waring M J. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation. *J Mol Biol*, 1979, **54** (2): 247~277

Studies on The Supercondensed pBR322 DNA Isolated From *Escherichia coli topA*⁻ Mutant*

ZHANG Zhen-Feng, YU Jia, CAO Kou, HUANG Xi-Tai**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The supercondensed DNA, a special kind of topological structure of plasmid DNA, was firstly found in *E. coli* SD108(*topA*⁺ *gyrB*225). Now, this structure is also found in *E. coli* DM800(*topA*⁻ *gyrB*225). The result indicates that the formation of supercondensed DNA is related with decrease of the activity of gyrase *in vivo*. Topoisomerase IV was proved to relax the supercondensed DNA completely *in vitro*, which suggested that the supercondensed DNA and the supercoiled DNA could transform to each other in cells. The supercondensed DNA samples were analyzed by atomic force microscopy and compared to supercoiled DNA. The results showed that the length of supercondensed DNA decreased about 30% and the width and height of double-strand increased about 60%, which indicates that the structure of double-strand of supercondensed DNA is much more similar to A-DNA than B-DNA. The results also showed that chloroquine intercalation did not change the supercoiling level of supercondensed DNA, but made it knot and compact.

Key words supercondensed DNA, *E. coli* DM800, atomic force microscope, topoisomerase IV

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (39970014).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-22-23508874, E-mail: xitaihuang@hotmail.com

Received: July 31, 2006 Accepted: August 29, 2006