

大肠杆菌 $topA^-$ 细胞中 $tetA-cfaABCE$ 的高效转录促进 DNA 凝集*

赵舒怡¹, 张臻峰², 黄熙泰³

- (1. 国家电网技术学院泰山校区, 山东 泰安 271000;
2. 中国科学院微生物研究所微生物前期开发国家重点实验室, 北京 100101;
3. 南开大学生命科学院, 天津 300071)

摘要: 为深入了解大肠杆菌 $topA^-$ 突变体中转录对 DNA 结构的影响, 以编码一个 $tetA-cfaABCE$ 共转录单元的质粒 pJGX15A 为研究对象, 利用氯喹-琼脂糖凝胶电泳比较了大肠杆菌 HB101 ($topA^+$, $gyrB^+$) 与 DM800 ($topA^-$, $gyrB225$) 细胞中 pJGX15A 质粒的拓扑结构状态, 发现 DM800 细胞中 pJGX15A 存在一种特殊的凝集结构。这种结构在氯喹-琼脂糖凝胶电泳中具有较高的迁移率, 而且呈现“弥散”状态而不是清晰的拓扑条带。进一步的研究表明培养基中的四环素质量浓度以及细胞生长时相均会影响 pJGX15A 在 DM800 细胞中的结构, 而凝集结构只出现在四环素质量浓度低于 $6 \mu\text{g/mL}$ 时的对数期 DM800 细胞中。原子力显微镜照片显示这种结构并非典型的互缠式超螺旋结构, 而是含有不同程度的分子内凝集, 部分 DNA 分子高度凝集为一团。

关键词: DNA 凝集; 转录; 原子力显微镜; 大肠杆菌; $topA^-$ 突变株

中图分类号: Q523 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2015) 06-0019-08

DNA Condensation Induced by Transcription of $tetA-cfaABCE$ in *Escherichia coli topA* Mutant

ZHAO Shuyi¹, ZHANG Zhenfeng², HUANG Xitai³

- (1. Technology College of State Grid, Taishan District, Taian 271000, China;
2. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: To learn more about the effects of transcription on DNA structure in *E. coli topA^-* mutant, the plasmid pJGX15A, carrying a tandem transcription unit of $tetA-cfaABCE$, was used as the reporter plasmid. The topology of pJGX15A from HB101 ($topA^+$, $gyrB^+$) and DM800 ($topA^-$, $gyrB225$) cells was then analyzed by chloroquine agarose gel electrophoresis. And, a type of irregular condensed structures of pJGX15A was found in DM800 cells. The condensed plasmid DNA had a high mobility rate and appeared to be smear bands in agarose gel electrophoresis. The topology of pJGX15A was also greatly affected by both cell growth phase and concentration of tetracycline in medium. The condensed structures were only formed in DM800 cells of exponential phase cultured in the medium with the concentration of tetracycline below $6 \mu\text{g/mL}$. AFM images showed that these plasmid DNA molecules contained intra-molecular condensation to different levels instead of normal supercoils. Some of the molecules were even

* 收稿日期: 2015-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30900023, 31270124)

作者简介: 赵舒怡 (1983 年生), 女; 研究方向: 微生物与新能源; 通讯作者: 张臻峰; E-mail: zhangzf@im.ac.cn

completely condensed to a coil.

Key words: DNA condensation; transcription; atomic force microscopy; *Escherichia coli*; *topA*⁻ mutant

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。DNA 超螺旋对于细胞活性来说是必需的, 因此在细胞内是受到严密调控的^[1]。胞内超螺旋程度受特定酶 (DNA 拓扑异构酶和旋转酶) 的控制, 它们可以在 DNA 分子上引入或者去除超螺旋^[2-5]。

基因的转录也对 DNA 的超螺旋状态也有很大的影响。在转录过程中, 在转录复合体前方和后方 DNA 分别生成数量相当的正超螺旋和负超螺旋。而这些超螺旋可以通过多种途径进行消除, 包括 DNA 拓扑异构酶的作用, DNA 双螺旋与转录复合物的相互旋转使正超螺旋和负超螺旋互补消除等^[6]。转录的过程中, 在特定的拓扑异构酶失活的情况下, 如果 DNA 双螺旋链与转录复合物的相互旋转同时也被阻止或者被限制, 那么就会积累相应的超螺旋。因此, 在拓扑异构酶 I 缺失的菌株中, *tetA* 的共转译系统使其产物的氨基端的膜插入区结合到细胞质膜上, 或者其他某些 DNA 结合蛋白 (如 Lac I) 结合到 DNA 双链上^[7], 均可阻止 DNA 链和转录复合物的相互旋转, 在旋转酶 (gyrase) 的作用下, 引入负超螺旋, 最终导致高度负超螺旋的产生^[8-9]。通过对 pBR322 质粒 DNA 详细的研究, Liu 和 Wang^[10] 认为这种负超螺旋增加是由于 DNA 模板在转录过程中的分子操作造成的, 进而提出了“孪生超螺旋结构域”模型。而且孪生结构域导致的高度负超螺旋的形成依赖于膜结合蛋白如 *tetA* 蛋白, 同时也依赖于转录复合物的数量以及转录的相对方向^[8, 10]。另外, Drolet 和 Liu 等^[11] 又提出了 R-loop 模型, 即在转录延伸过程中形成的新生 RNA 链在转录复合物后方与其模板链形成 RNA-DNA 杂交双螺旋结构, 该结构的形成导致了后续的超螺旋的产生, 而高浓度的 RNase H (特异性的降解 RNA-DNA 杂交链中的 RNA) 可以消除转录延伸过程中产生的负超螺旋^[12-13]。在该假说中, DNA 负超螺旋的形成依赖于转录的延伸, 并且 DNA 拓扑异构酶在稳定该种结构方面起着重要的作用。R-loop 可以稳定负超螺旋, 同时高度的负超螺旋又促进 R-loop 的形成。

近十几年来, 多个课题组利用体外^[7, 14] 或体内^[15-18] 的转录体系证明, 在体系中存在旋转酶

(Gyrase) 而缺失拓扑异构酶 I (Topoisomerase I) 时高效的转录可以促进质粒 DNA 负超螺旋的积累并形成高度负超螺旋结构 (Hypernegatively supercoiled DNA)。然而, 需要指出的是这些研究中使用的均为单一的、相对较短的转录单元。而在细菌染色体上存在很多大的基因或基因簇, 它们的转录单位通常都很大, 这种长距离的转录可能会对 DNA 结构产生更大的影响。为了研究这种影响, 我们使用 pJGX15A 作为报告质粒。该质粒的构建是直接含有结构基因簇 *cfAABCE* 的 DNA 片段直接插入到 *tetA* 基因的下游^[19]。由于插入片段上不带有启动子, 该基因簇与 *tetA* 基因共转录并形成一个长的转录单位。此前的研究已证明在两种菌株中 CFA/I 均可以很好的表达并组装形成菌毛^[19]。本课题的研究结果表明, 在大肠杆菌 *topA*⁻ 细胞中, *tetA* - *cfAABCE* 的高效转录可以促使 pJGX15A 形成一种部分高度凝集的结构。该结构在氯喹 - 琼脂糖凝胶电泳具有较高的迁移率并表现为“弥散”状态。原子力显微镜的观察结构表明这种质粒 DNA 分子中含有不同程度的凝集结构且其结构参数明显有别于超螺旋质粒 DNA。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 溶菌酶、SDS、PEG6000、溴化乙锭 (EB)、氯喹等购自 Sigma 公司。胰蛋白胨、酵母提取物以及琼脂糖购自 Oxoid 公司。Tris、EDTA、NaOH、NaCl、MgCl₂ 等常规化学试剂均为国产分析纯试剂。Taq 酶、PCR 产物回收试剂盒购自上海生工, PCR 引物由上海生工合成。

1.1.2 质粒与菌株 大肠杆菌 HB101 (*topA*⁺, *gyrB*⁺) 与 DM800 (*topA*⁻, *gyrB225*) 均由纽约公共卫生研究所 Dr. Drlica 提供, 质粒 pJGX15A (图 1) 则由 中国医学科学院徐建国教授提供^[19]。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养及质粒提取 挑取大肠杆菌单菌落至 5 mL LB 试管中, 37 °C, 200 r/min 摇床震荡培养过夜。然后将菌液接种到 200 mL 新鲜的 LB 培养基中, 在 37 °C 下继续培养, 并监测菌液在 600 nm 处的光吸收值。本研究中所有培养基中均添加了 100 μg/mL 氨苄青霉素; 并根据需要分别添加 0、6、12 μg/mL 的四环素。当培养至所需的

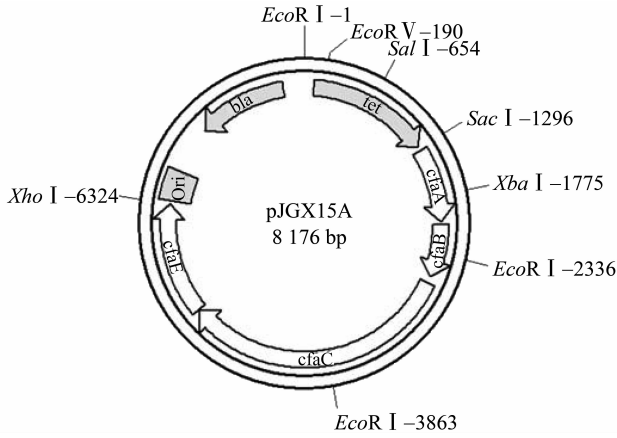


图 1 质粒 pJGX15A 的限制图谱

Fig. 1 Restriction map of recombinant plasmid pJGX15A

细胞生长时期后, 离心 (6 000 r/min, 5 min) 收集菌体, 并提取质粒 DNA。为避免菌体裂解过程中碱性试剂对质粒结构的损伤, 采用温和的清亮裂解方法提取质粒 DNA^[20]。

1.2.2 氯喹-琼脂糖凝胶电泳 鉴于 pJGX15A 质粒较大, 因此采用 $w = 0.6\%$ 的琼脂糖凝胶电泳分析其 DNA 超螺旋状态。制备凝胶前, $1 \times$ TAE 缓冲液中加入适量的氯喹母液 (10 mg/mL) 使其达到实验要求的浓度, 再加入琼脂糖, 加热制胶。电泳缓冲液中氯喹浓度应与琼脂糖凝胶中一致。电泳电压为 75 V, 时间为 12 h。电泳结束后, 在 10 mmol/L MgCl₂ 中脱色 30 min, 在 0.5 μ g/mL EB 溶液中染色 1 h, 再脱色 30 min 后, 紫外灯下观察结果, 拍照。在所有实验中, 上样孔中均无残留 DNA。

1.2.3 原子力显微镜成像 本实验利用二价离子将 DNA 桥联吸附在带负电的云母表面。将 DNA 样品稀释到 1 μ g/mL, 向其中加入 MgCl₂ 至终浓度为 1 mmol/L。取 15 μ L 样品滴加到新剥离的云母片上, 室温吸附 5 min。100 μ L 去离子水润洗 3 遍, 去除未吸附的 DNA, 然后用氮气吹干 5 min。使用 Nanoscope III a Multimode-AFM instrument (Digital Instruments) 在室温下利用轻敲模式 (Tapping mode) 下进行扫描。探针使用共振频率为 106 kHz 的 Super-sharp silicon tips (Silicon-MDT Ltd.), 扫描速度为 1~2 Hz。开始扫描后调整设定的参数值以确保将干扰降至最低并保持图像清晰。

DNA 分子的长度利用软件 ImageJ Ver1.33u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) 进行测量; 高度与宽度则使用原子力显微镜自带的软件进行测量。

2 结果

2.1 pJGX15A 在两种宿主中的超螺旋水平

在添加了 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 12 μ g/mL 四环素的 LB 培养基中, 将含有 pJGX15A 的大肠杆菌 HB101 与 DM800 菌株分别培养到对数前期 (A_{600} 约为 0.4) 和中期 (A_{600} 约为 0.8), 提取质粒 DNA, 并对其进行氯喹-琼脂糖凝胶电泳分析其拓扑结构。图 2 中 A、B、C 分别表示电泳体系中氯喹浓度逐渐增加时质粒 pJGX15A 的电泳情况。随着氯喹浓度的增加, 质粒 DNA 的负超螺旋水平由于氯喹嵌入的逐渐增加而逐渐降低, 产生从负超螺旋—松弛—正超螺旋的转变。

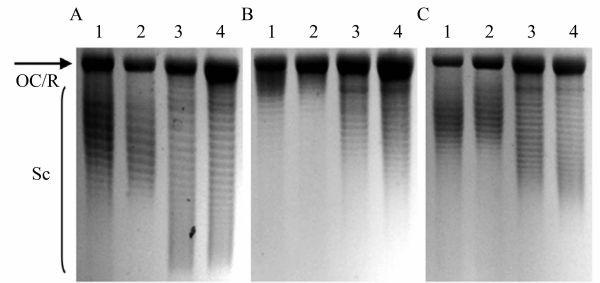


图 2 质粒 pJGX15A 在 HB101 与 DM800 细胞中的超螺旋水平

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pJGX15A DNA in the presence of 5 μ g/mL (A), 20 μ g/mL (B) or 35 μ g/mL (C) chloroquine

The plasmid DNA samples were isolated from cells cultured in LB mediums containing 12 μ g/mL tetracycline to the early- or mid-exponential phase.

Lane 1: pJGX15A from HB101 cells in the early-exponential phase; lane 2: pJGX15A from HB101 cells in the mid-exponential phase; lane 3: pJGX15A from DM800 cells in the early-exponential phase; lane 4: pJGX15A from DM800 cells in the mid-exponential phase.

OC/R: open circular or relaxed plasmid DNA;

Sc: supercoiled plasmid DNA

结果显示, 宿主 DM800 中的 pJGX15A 拓扑异构体分布范围较广, 而宿主 HB101 中的 pJGX15A 的拓扑异构体则比较集中。这是由于 DM800 存在 *topA* 缺失以及 *gyrB225* 的补偿突变, 使得其对胞内 DNA 超螺旋水平的控制能力较差所造成的。图 2A 中结果显示, 低质量浓度氯喹 (5 μ g/mL) 中 HB101 和 DM800 中的 pJGX15A 均为负超螺旋状态, 且 DM800 中的 pJGX15A 泳动速度较快。图 3B 中结果显示, 提高氯喹质量浓度至 20 μ g/mL 时,

HB101 中 pJGX15A 大部分拓扑异构体由于氯喹的嵌入使其 DNA 结构接近于松弛环形 DNA；而 DM800 中 pJGX15A 则仍有部分拓扑异构体保持较高的负超螺旋水平，因而泳动速度较快。图 3C 中结果显示，提高氯喹质量浓度至 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，两种宿主中 pJGX15A 大拓扑异构体由于氯喹的嵌入均变为正超螺旋，而 DM800 中 pJGX15A 部分拓扑异构体则形成高程度的正超螺旋，泳动速度较快。但需要注意的是，每个 DNA 样品中各拓扑异构体 DNA 的含量呈正态分布，因此比较种宿主质粒 DNA 拓扑异构体主体的超螺旋状态可以发现 pJGX15A 在二者中的平均超螺旋状态基本一致。综合以上结果，pJGX15A 在宿主 DM800 中既含有高度负超螺旋的结构同时也含有低负超螺旋的结构，但其平均超螺旋水平与 HB101 中的质粒 DNA 相当。

2.2 DM800 菌株中 pJGX15A 的特殊结构形式

早先的研究已经发现携带四环素抗性基因 *tetA* 的质粒 pBR322 在大肠杆菌 *topA*⁻ 菌株 DM800 中具有高度的负超螺旋水平^[8]，这一点与我们上述的结果并不完全吻合。在实验过程中我们发现培养基中添加高浓度四环素后携带 pJGX15A 质粒的两种宿主菌均生长变缓，而携带 pBR322 质粒的宿主菌的生长则没有明显变化（数据未给出），推测这一点可能是导致两种质粒 DNA 在 DM800 中的超螺旋水平有区别的原因，因此我们尝试降低培养基中的四环素质量浓度并重复以上实验。图 3 中的结果显示，当四环素质量浓度降低到 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，pJGX15A 在 DM800 菌株中的超螺旋水平明显高于 HB101 菌株；而当培养基中不添加四环素时，pJGX15A 在 DM800 菌株中的超螺旋水平不仅明显高于 HB101 菌株，而且对数前期 DM800 细胞中提取的 pJGX15A 在电泳中表现出典型的“负超螺旋—高度负超螺旋”模式（图 3：3 泳道）。仔细分析图 3 中 pJGX15A 的拓扑异构体在电泳中的分布模式可以发现，DM800 细胞中的 pJGX15A 在电泳中不能被分离为清晰的拓扑条带，而是表现为泳动速度较快的“弥散”条带。这一点与高质量浓度四环素培养时的结果形成了鲜明的对比。这些结果表明，在四环素质量浓度较低时对数期 DM800 细胞中的 pJGX15A 形成了特殊的结构，这一结构有别于通常意义的超螺旋结构，可能是一种新的拓扑结构形式。

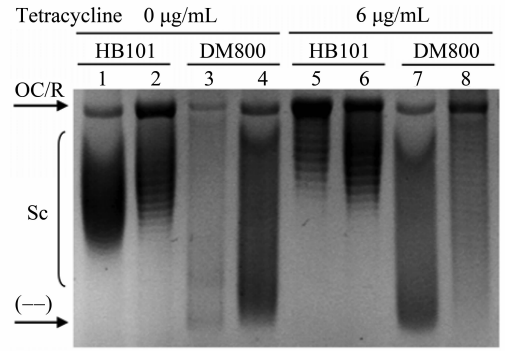


图 3 DM800 细胞中质粒 pJGX15A 形成特殊的拓扑结构形式

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of pJGX15A DNA in the presence of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloroquine

The plasmid DNA samples were isolated from cells in the early- (lanes 1, 3, 5 and 7) or mid-exponential phase (lanes 2, 4, 6 and 8). OC/R, open circular or relaxed plasmid DNA; Sc, supercoiled plasmid DNA; (- -), hypernegatively supercoiled plasmid DNA

2.3 四环素质量浓度与细胞生长时期对 pJGX15A 特殊结构的影响

进一步对比图 3 中的结果发现，对数前期与中期的 HB101 细胞中的 pJGX15A 的结构基本一致，然而 DM800 细胞中提取的 pJGX15A 的结构在两个时期则有明显的不同——对数前期的 pJGX15A 超螺旋水平更高，也更易于形成“弥散”条带。这一点也促使我们进一步探讨细胞生长时期对 pJGX15A 拓扑结构的影响。在不同四环素质量浓度下培养 HB101 与 DM800，分别收集对数期以及静止期的细胞并提取质粒 DNA，然后利用氯喹—琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的拓扑结构（如图 4 所示）。结果显示，四环素质量浓度与生长时期对 pJGX15A 在 DM800 中的拓扑结构均具有显著的影响。

当培养基中不添加四环素时，从 DM800 对数生长期细胞和静止期细胞中提取的质粒 DNA 样品之间有很大的区别（图 4：泳道 3、4）。首先，从 DM800 对数生长期细胞中提取的质粒 DNA 的超螺旋程度很高，其中大部分都表现为类似高度负超螺旋的状态。其次，从 DM800 对数生长期细胞中提取的质粒 DNA 样品中的拓扑异构体不能被电泳分离，但静止期细胞中提取的质粒 DNA 样品那样。在 *topA* 突变体中 *tetA* 基因的转录已经被证实可以形成高度负超螺旋^[9]，然而，这种不规则凝集结构的形成说明串联基因 *tetA - cfaABCE* 长距离的转

录能够促使 DNA 产生更加复杂的结构。不规则凝集结构的形成同样受到培养基中四环素质量浓度的影响。结果显示: 当提高培养基中的四环素质量浓度时, 质粒 DNA 的超螺旋程度随之下降; 并且当

四环素质量浓度达到 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 不规则凝集结构不能形成。由于四环素是一种转录抑制剂, 因此可能是由于转录速度下降导致不规则凝集结构不能形成。

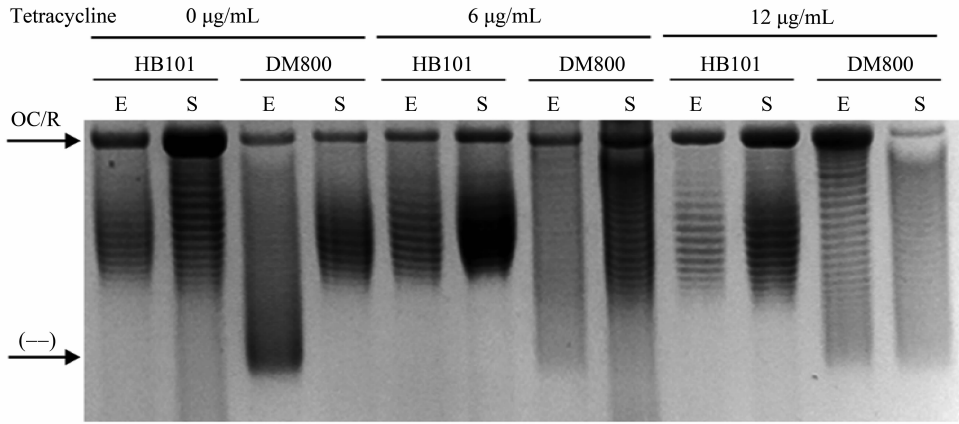


图 4 四环素质量浓度与细胞生长时期对 pJGX15A 结构的影响

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of pJGX15A in the presence of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloroquine

The plasmid DNA samples were then isolated from cells in the exponential (E) or stationary (S) phase. OC/R, open circular or relaxed plasmid DNA; Sc, supercoiled plasmid DNA; (--), hypernegatively supercoiled plasmid DNA.

2.4 AFM 观察 pJGX15A 的特殊结构

为深入了解 pJGX15A 在 DM800 细胞中形成的特殊结构的结构特征及其与超螺旋 DNA 的区别, 我们选择不添加四环素的培养基中培养至对数期及静止期的 DM800 细胞中的质粒 DNA 样品, 利用原子力显微镜技术对其结构进行观察与分析。其中使用的 Mg^{2+} 浓度 (1 mmol/L) 在细胞内 Mg^{2+} 浓度的范围内, 正如之前讨论过的一样, 在这种 Mg^{2+} 浓度下 AFM 可以给出可信的图片^[21]。如图 5 所示, 两种样品中几乎所有的 DNA 分子均为闭合环状分子, 表明样品制备并未破坏 DNA 的结构。图

5A 中显示了 DM800 静止期细胞中提取的 pJGX15A, DNA 的结构非常均一, 不含有复杂结构; 大部分 DNA 分子呈现松弛或者 1~2 次互缠式结构, 这可能是由于其超螺旋水平较低的缘故。而与此相反, DM800 对数期细胞中提取的 pJGX15A 则表现出非常高的结构多样性 (图 5B)。几乎所有 DNA 分子均表现出不同程度的凝集, 大部分分子含有多个扭结 (图 5B 中箭头), 甚至有些 DNA 分子完全压缩成了一团 (图 5B 中白色三角)。这种形态的多样性可能正是导致这些拓扑异构体不能被氯喹琼脂糖凝胶电泳分离形成梯状条带的原因。

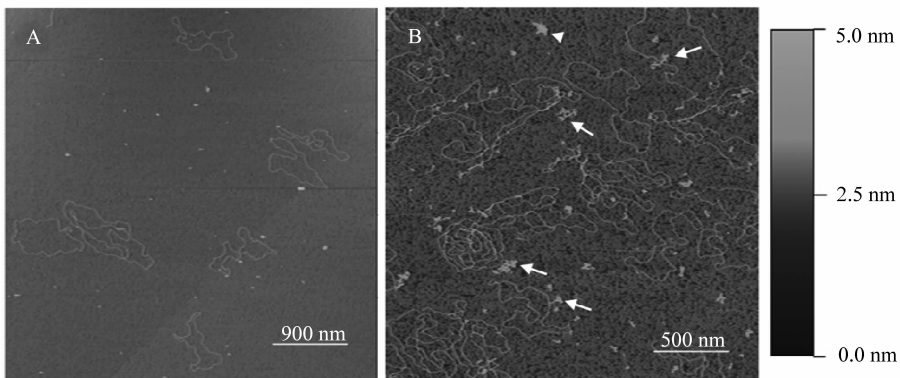


图 5 AFM 观察超螺旋与凝集 pJGX15A 的结构

Fig. 5 AFM images of supercoiled (A) and condensed (B) pJGX15A from DM800 cells Grayscale represents 5 nm

图 6B-E 中展示了几个凝集程度不同的 pJGX15A 分子, 与图 6A 中的超螺旋 DNA 分子的结构相比较可以发现, 这些发生凝集的 DNA 分子尺寸小于超螺旋 DNA 分子。图 6A 中超螺旋 DNA 分子的长度为 2 756 nm, 与其理论计算长度 2 779 nm 非常接近。而图 6B-D 中所示 DNA 分子的展开部分的链的长度则分别为 2 710、2 640 以及 1 394 nm; 图 6E 中的结构不含有展开的 DNA 链且被完全压缩成了一团。这些数据表明, 质粒 DNA 分子中的部分 DNA 双链确实在不同程度上被压缩成凝

集结构, 而且凝集程度越高, DNA 分子的表现长度则越小。进一步对这些分子的高度进行了测量, 结果显示所有 DNA 分子中展开的双链 DNA 的高度基本一致, 约为 1.1 ~ 1.3 nm, 然而凝集部分的高度则有很大区别。图 6E 中的结构的平均高度约为 3.8 nm, 与图 6D 中 DNA 分子的凝集部分的高度 (约为 3.9 nm) 相似, 但是却大于图 6C 中 DNA 分子的凝集部分的高度 (约为 2.1 nm) 同时远远大于图 6A 中 DNA 链的高度 (约为 1.2 nm)。

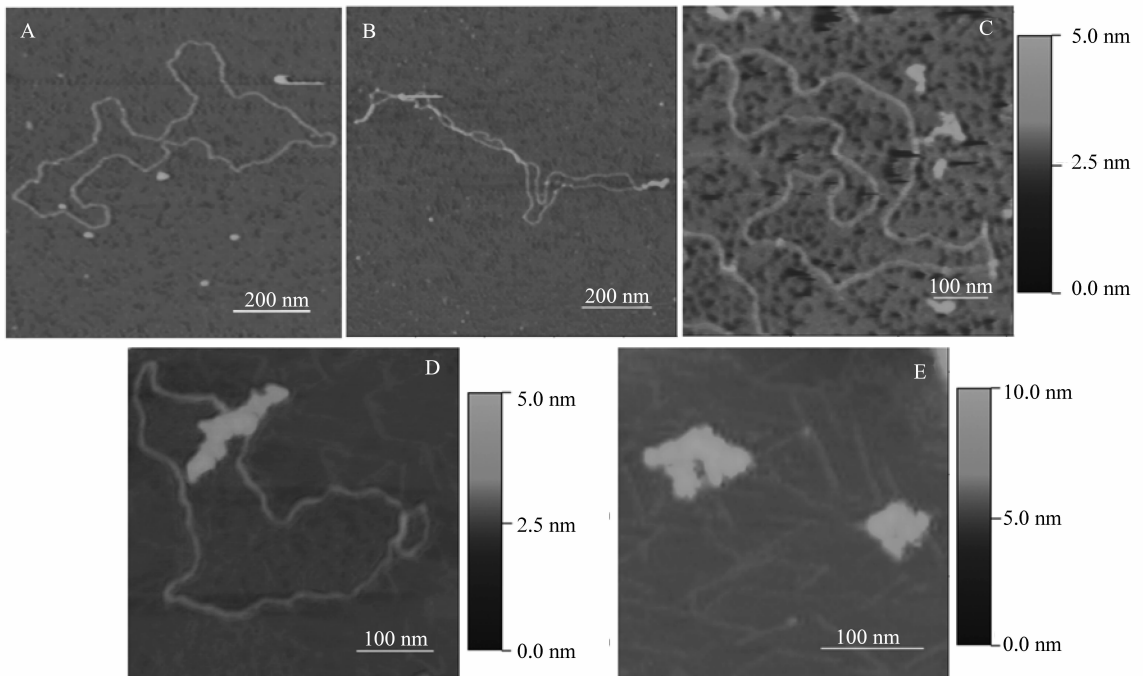


图 6 几种典型的 pJGX15A 分子的结构

Fig. 6 AFM images of representative supercoiled (A) or condensed (B-E) structures of plasmid pJGX15A from DM800 Grayscale represents 5 nm

3 讨论

转录对 DNA 结构的影响已经研究了很长时间了。Liu 和 Wang^[8, 10] 提出了转录的孪生结构域模型, 而 Drolet 等^[11-12] 则提出 DNA 模板的高度负超螺旋结构的形成是与 R-loop (s) 的形成紧密联系在一起。这些假说解释了转录是如何刺激 DNA 模板的高度负超螺旋结构的积累的, 同时阐述了 DNA 拓扑异构酶 I 以及旋转酶在转录过程中的作用。然而, *tetA* 基因的转录单位只有 1 190 bp, 不足以促使 DNA 形成更加复杂的结构。在本实验中, 我们使用大质粒 pJGX15A 来研究长距离转录对 DNA 结构的影响。该质粒包含一个 *tetA-cfaABCE*

共转录单位, 这个共转录单位由 *tetA* 启动, 并且新生的 *tetA* 多肽同样可以锚定在细胞膜上, 这一点已经被证实对转录所引起的结构变化是非常重要的^[22]。本实验发现质粒 pJGX15A 在大肠杆菌 *topA*⁻ 菌株 DM800 中形成一种特殊的凝集结构。这种凝集结构在氯喹-琼脂糖凝胶电泳中有着很高的迁移率而且表现为类似“弥散”的条带, 这一点与正常超螺旋结构有很大的区别。AFM 照片也显示这种不规则凝集结构不包含超螺旋。相反, 它们包含分枝状的、高度凝集的结构 (图 5B 中箭号所示), 部分分子甚至完全凝集为一团 (图 5B 中三角所示)。这也许是这种不规则凝集结构有着很高的电泳迁移率并且拓扑异构体不能被电泳分离的

原因。与此前发现的质粒 pBR322 所形成高负超螺旋结构相比, pJGX15A 在 DM800 细胞中形成的凝集结构更加的复杂, 说明长转录单元对 DNA 结构产生了巨大的影响。

本实验中这种凝集结构在大肠杆菌 HB101 细胞中并没有发现, 说明 pJGX15A 凝集结构的产生是依赖于拓扑异构酶 I 的缺陷的。同时, 这种凝集结构的形成在很大程度上受到细胞生长状态和培养基中四环素质量浓度的影响: ① 该凝集结构仅在 DM800 对数生长期细胞中形成, 而当细胞进入静止期时, pJGX15A 表现为超螺旋结构; ② pJGX15A 的凝集结构仅在低四环素质量浓度 (小于 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养的 DM800 细胞中产生, 高四环素质量浓度培养时, 对数期与静止期 DM800 细胞中的 pJGX15A 均表现为超螺旋结构。由于进入静止期和增加培养基中的四环素质量浓度都会降低转录的效率, 因此推测这种不规则凝集结构的生成依赖于高效的转录。

此前有实验室从大肠杆菌 HB101 (*topA*⁺, *gyrB*⁺) 细胞中发现了某种可变的不规则结构^[23], 具有这种结构的 DNA 同样不能被电泳分开成梯状拓扑异构体条带。AFM 的结果显示该结构中也含有凝集的结构, 与本实验中发现的凝集结构有相似之处。但进一步比较二者的结构参数可以发现这种不规则结构与本研究中发现的凝集结构相比, 其凝集程度明显较低。这一点也与其超螺旋水平明显低于本研究中发现的凝集结构这一结果相符合。这些结果说明 DNA 凝集结构可以在大肠杆菌野生株中产生, 而拓扑异构酶 I 的缺失可能促进了 DNA 凝集的累积。

本实验的结果表明, 当大肠杆菌细胞中拓扑异构酶 I 缺失时, 长转录单元的高效转录可能促使质粒 DNA 形成高度凝集的结构 (highly condensed structure) 而非高度负超螺旋结构 (hypernegative supercoiled structure)。鉴于细菌染色体上存在很多大的基因或基因簇, 这种结构的形成有可能参与细菌染色体 DNA 的组织包装。

参考文献:

- [1] TSE-DINH Y C, QI H, MENZEL R. DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance[J]. Trends in Microbiology, 1997, 5: 323 - 326.
- [2] CHRISTIANSEN K, WESTERJAARD O. Characterization of intra-and intermolecular DNA ligation mediated by eukaryotic topoisomerase I [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269: 721 - 729.
- [3] FROELICH-AMMON S J, GALE K C, OSHEROFF N, et al. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269: 7719 - 7727.
- [4] GLLERT M, MIZUUCHI K, O' DEA M H, et al. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1976, 73: 3872 - 3876.
- [5] PRUSS G J. DNA topoisomerase I mutants: increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling [J]. Journal of Molecular Biology, 1985, 185: 51 - 63.
- [6] THOMAS B, NIELSEN P E. *In vitro* transcription of a torsionally constrained template [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 803 - 809.
- [7] LENG Fenfei, MCMACKEN R. Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2002, 99: 9139 - 9144.
- [8] LODGE J K, KAZIC T, BERG D E. Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322 [J]. The Journal of Bacteriology, 1989, 171: 2181 - 2187.
- [9] PHOENIX P, RAYMOND M A, MASSE E, et al. Roles of DNA Topoisomerases in the Regulation of R-loop formation *in vitro* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272: 1473 - 1479.
- [10] LIU L F, WANG J C. Supercoiling of the DNA template during transcription [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1987, 84: 7024 - 7027.
- [11] MASSÉ E, DROLET M. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294: 321 - 332.
- [12] USONGO V, NOLENT F, SANSCARTIER P, et al. Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation [J]. Molecular Microbiology, 2008, 69: 968 - 981.
- [13] BAAKLINI I, USONGO V, NOLENT F, et al. Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation [J]. The Journal of Bacteriology, 2008, 190: 7346 - 56.
- [14] LENG Fenfei, AMADO L, MCMACKEN R. Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279:

- 47564 - 47571.
- [15] BROCCOLI S, RALLU F, SANSCARTIER P, et al. Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 52: 1769 - 1779.
- [16] SAMUL R, LENG Fenfei. Transcription-coupled hypernegative supercoiling of plasmid DNA by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli* topoisomerase I-deficient strains[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374 (4): 925 - 935.
- [17] ZHI Xiaoduo, LENG Fenfei. Dependence of transcription-coupled DNA supercoiling on promoter strength in *Escherichia coli* topoisomerase I deficient strains [J]. *Gene*, 2013, 514: 82 - 90.
- [18] DING Yue, MANZO C, FULCRAND G, et al. DNA supercoiling: a regulatory signal for the λ repressor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2014, 111: 15402 - 15407.
- [19] 张臻峰, 于春风, 万庆, 等. 产毒性大肠杆菌 CFA/I 基因表达与 DNA 超螺旋状态的关系[J]. *南开大学学报:自然科学版*, 2004, 37: 7 - 12.
- [20] HUANG Xitai, CHEN Xin. Supercondensed structure of plasmid pBR322 DNA in an *Escherichia coli* DNA topoisomerase II mutant [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 216: 195 - 199.
- [21] ZHANG Pingcheng, BAI Chunli, CHENG Yingjun, et al. Study on the topological structure of pBR322 DNA by AFM [J]. *Science in China (Series C: Life Sciences)*, 1996, 39: 1 - 7.
- [22] LYNCH A S, WANG J C. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptide encoding membrane protein or proteins for export-a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I [J]. *The Journal of Bacteriology*, 1993, 175: 1645 - 1655.
- [23] ADAMČÍK J, VÍGLASKÝ V, VALLE F, et al. Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3300 - 3309.

· 简 讯 ·

本刊再次入选中国百种杰出学术期刊

据科技部中国科技信息研究所 2015 年 10 月 21 日在北京举办的中国科技论文统计结果发布会信息, 中山大学学报自然科学版再次被评选为中国百种杰出学术期刊。这是自 2002 年公布第一届中国百种杰出学术期刊名单以来, 本刊第 8 次获此殊荣。

中国百种杰出学术期刊是科技部直属单位中国科技信息研究所根据科技期刊综合评价的多项科学计量指标, 组织不同学科、不同层面的专家制订期刊指标体系, 确定重要指标的权重, 并根据我国学术期刊的变化趋势和实际状况, 分学科对每种期刊进行综合评定而推出的研究结果。

近年来, 本刊不断改革创新, 办刊指标稳步提升, 稳居全国高校学报的前列。2015 年核心总被引频次为 1202, 核心影响因子为 0.489, 在综合大学学报类 62 种期刊中综合评价总分排名第 5 位, 学科扩散指标 8.55, 排名第 1 位, 学科影响指标 0.48, 排在第 3 位。

本刊此次入选中国百种杰出学术期刊, 为今年中山大学学报自然版创刊 60 周年献上了一份厚礼。

(本刊通讯员)