芝田硫化叶菌 SSV1 病毒 DNA 复制的诱导

刘丹旭 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. * 联系人, E-mail: huangl@sun.im.ac.cn)

摘要 芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)是一种极端嗜热古菌,其所携带的温和病毒 SSV1 是研究古菌 DNA 复制的一个非常合适的系统. 杂交分析表明,静置培养时,芝田硫化叶菌细胞内几乎检测不到游离 SSV1 DNA,病毒 DNA 主要以整合状态存在. 经紫外或丝裂霉素诱导后,细胞内游离 SSV1 DNA 含量明显增加,但整合 SSV1 DNA 拷贝数不变. 丝裂霉素诱导作用的重复性明显高于紫外诱导. 另外,当细胞由静置培养改为摇床培养时,SSV1 DNA 也被诱导复制. 据此,建立了 SSV1 DNA 复制的丝裂霉素诱导方法. 采用此法,芝田硫化叶菌细胞内游离 SSV1 DNA 含量在诱导后 10 h 开始明显增加,并在 12~15 h 达到最大值. 诱导后细胞内游离病毒 DNA 的拷贝数可达到 50. 上述诱导方法的建立以及对诱导后 SSV1 DNA 复制行为的描述为确定 SSV1 病毒 DNA 的复制原点、分析其复制模式奠定了基础.

关键词 极端嗜热古菌 *Sulfolobus shibatae* SSV1 病毒 DNA 复制的诱导

按照 Woese 等人^[1,2]的观点,生物界中除了细菌和真核生物以外,还存在着第 3 种生命形式,即古菌(Archaea). 随着比较生物化学和比较基因组学研究的深入,古菌独特的分类学地位在很大程度上得到了确认^[3,4]. 古菌独特性的重要证据之一是,尽管在形态、结构上与细菌相似,但在遗传信息的传递(如 DNA 复制、转录、翻译、重组等)方面却更接近于真核生物^[3,5]. 因此,古菌可能是比细菌更为合适的、研究真核生物遗传机制的原核模型. 本实验室从事极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)DNA 复制机理的研究. 我们之所以选择芝田硫化叶菌作为研究对象,主要是因为其细胞内含有一个已经研究得较多的病毒——SSV1^[6,7]. SSV1 为一 15.5 kb,双链 DNA 温和病毒,在细胞内,既可以闭环形式游离存在,也可通过位点专一性重组整合到宿主基因组内. 病毒复制通常依赖于宿主的复制机器,因此,SSV1 病毒提供了一个可用来了解芝田硫化叶菌 DNA 复制的窗口. 在研究一个复制子的复制方式时,通常需要对复制中间体进行分析. 由于芝田硫化叶菌细胞通常仅含少量游离 SSV1 DNA 分子^[6],因此难以直接对其复制中间体进行分析. 先前的研究发现,SSV1 病毒的复制受紫外诱导^[6],可是,紫外诱导作用的重复性较差,而且这种诱导方法不宜用来处理大量样品. 为了解决 SSV1 病毒复制研究中的这些难点问题,本文建立了一个具有较高重复性的、基于丝裂霉素处理的 SSV1 DNA 复制的诱导方法,并对诱导动力学和诱导水平进行了研究. 这一方法

的建立为研究 SSV1 DNA 的复制(如复制原点的数目位置和复制终点等)奠定了基础.

1 材料与方法

(i) 芝田硫化叶菌的培养. 芝田硫化叶菌 ATCC 51178 购自 American Type Culture Collection. 采用 Brock 等人^[8]的基础培养基,添加 0.2% 的胰胨和 0.1% 的酵母提取物,250 mL 血清瓶,80℃ 静置或摇床培养. 除特别指出外,每个血清瓶中含 30~50 mL 菌液.

(ii) SSV1 DNA 复制的诱导. 静置培养芝田硫化叶菌至 $A_{600\text{ nm}} \approx 0.7$ 后诱导. (1) 紫外诱导. 将菌液倒入培养皿内形成 1~2 mm 的薄层,在距 15 W 紫外灯(Philip)23 cm 处照射指定时间; (2) 在菌液中加入丝裂霉素(mitomycin C)至指定终浓度,遮光室温放置 30 min. 诱导后,菌液置 80℃ 静置或摇床(150 r/min)培养.

(iii) 芝田硫化叶菌 DNA 的提取. 取芝田硫化叶菌培养液,4℃,4000 r/min 离心 10 min. 菌体重悬于 TE(10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中,加入 SDS 和蛋白酶 K 分别至 1% 和 1 mg/mL,50℃ 温育 3 h. 用等体积苯酚,苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次. DNA 经乙醇沉淀后溶于 TE(含 20 μg/mL RNase).

(iv) 细胞内 SSV1 DNA 的检测. 取芝田硫化叶菌总 DNA,经 *Eco*R I 完全酶切后,琼脂糖电泳分离酶切产物. 参照文献[9]的方法进行转膜、预杂交和杂

交. 杂交时采用 SSV1 DNA 特异的 P_{SSV1} 探针, 在部分实验中同时加入宿主基因组特异的 P_{Ssh7} 探针.

P_{SSV1}: 5'-ATTCGTATCCGCTTCGATTGATCAGCTC-AATGATCAGCTT-3'^[10];

P_{Ssh7}: 5'-GTAAGCGAGAAAGACGCTCCAAAAGA-3'.

P_{Ssh7} 的序列取自芝田硫化叶菌 DNA 结合蛋白 Ssh7 的编码基因 *ssh7a* 和 *ssh7b*(GenBank 登录号分别为 ABO13922 和 ABO13923)的保守区域. 该探针用来给出宿主基因组拷贝数对照. 上述两个探针均由上海生工生物工程公司合成, 采用 Digoxigenin 标记试剂盒(Roche)进行 3'末端标记. 按照厂商说明进行杂交信号的荧光检测, 采用岛津 CS-930 薄层扫描仪, 对所得 X 射线光片杂交信号进行定量.

(v) 细胞内游离 SSV1 DNA 的分离. 芝田硫化叶菌总 DNA 经 *Xba* I + *Kas* I + *Avr* II 三酶酶切后, 低熔点琼脂糖电泳分离. 长波紫外灯下切出含 SSV1 DNA 的胶块, 按文献[9]方法从胶块中回收 SSV1 DNA.

(vi) 细胞外 SSV1 DNA 的提取. 取芝田硫化叶菌培养液, 5000 r/min 离心 10 min. 取上清液, 用分子截流为 30 ku 的 Macrosep 浓缩离心管(Pall)浓缩收集 SSV1 病毒. 加入 SDS 和蛋白酶 K 分别至 1%和 1 mg/mL, 50℃温育 2 h. 用等体积苯酚、酚/氯仿和氯仿各抽提一次. DNA 经乙醇沉淀后重溶于 TE.

2 结果

2.1 SSV1 DNA 复制的紫外及丝裂霉素诱导

为了能够采用 Southern 杂交方法检测诱导前后芝田硫化叶菌细胞中病毒 SSV1 DNA 含量的变化, 我们设计了特异探针 P_{SSV1}. 为该探针所识别的游离和整合 SSV1 DNA 的 *Eco*R I 酶切片段长度分别为 7.9 和 12 kb^[6,10]. 在诱导实验中, 我们首先将芝田硫化叶菌静置培养至对数生长晚期, 再对其分别进行紫外照射和丝裂霉素处理. 图 1(a)显示, 在未诱导的静置培养细胞中只能检测到整合在宿主基因组中的 SSV1 DNA, 而几乎检测不到游离的 SSV1 DNA. 经紫外诱导后, 游离 SSV1 DNA 大量增加. Zillig 实验室^[6]先前已经报道, 紫外照射可诱导芝田硫化叶菌细胞中 SSV1 DNA 的复制, 而且, 在一定范围内照射剂量对诱导效果无明显影响. 与紫外诱导的情形相似, 丝裂霉素处理也导致 SSV1 DNA 的大量复制(图 1(a)). 比较经两种诱导处理后细胞内游离 SSV1 与整合 SSV1 拷贝数的比值, 丝裂霉素的诱导效果似乎略好于紫外照射. 此外, 在所用的浓度范围(5 ~ 15 μg/mL)里, 丝裂霉素的诱导效果无明显差异. 为了了解诱导前后细胞内整合 SSV1 DNA 含量是否改变, 我们在部分杂交实验中同时使用了两种探针, 即 P_{SSV1} 和 P_{Ssh7}. P_{Ssh7} 检测的是芝田硫化叶菌 DNA 结合蛋白 Ssh7 的

图 1 SSV1 DNA 复制的紫外和丝裂霉素诱导

(a) 紫外和丝裂霉素的诱导作用. 1 示 1 kb 分子量标准, 2 示未诱导对照, 3 和 4 示紫外诱导: 紫外照射时间分别为 40 和 60 s, 5 ~ 7 示丝裂霉素诱导: 丝裂霉素浓度分别为 5, 10 和 15 μg/mL. 诱导后静置培养, 每个泳道上样 2 μg 细胞总 DNA, 杂交探针为 P_{SSV1}. (b) 以 *ssh7a* 和 *ssh7b* 为内对照的诱导实验. 1 示未诱导对照, 2 示 15 μg/mL 丝裂霉素诱导, 诱导后静置培养, 每个泳道上样 4 μg 细胞总 DNA, 杂交探针为 P_{SSV1} 和 P_{Ssh7}. I 示整合 SSV1 DNA 片段(I), II 示游离 SSV1 DNA 片段(F), III 示含 *ssh7b* 基因的 DNA 片段, IV 示含 *ssh7a* 基因的 DNA 片段. SSV1 DNA (F)/SSV1

DNA (I)示游离 SSV1 DNA 与整合 SSV1 DNA 拷贝数之比
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-5-361>

两个异构体的编码基因 *ssh7a* 和 *ssh7b*. *ssh7a* 和 *ssh7b* 均为单拷贝基因, 因此可以用来反映基因组的拷贝数. 图 1(b)表明, 整合 SSV1 DNA 与 *ssh7b* 扫描信号之比在诱导前后无明显变化(分别为 0.84 和 0.73). 这个结果的一种可能的解释是, 菌液经诱导处理后, 一部分细胞中 SSV1 DNA 大量复制并最终导致宿主基因组降解, 而其余细胞中 SSV1 DNA 未被诱导复制, 宿主基因组也就未被破坏, 本实验测得的整合于宿主基因组的 SSV1 以及 *ssh7b* 信号反映了未被诱导的那部分细胞的情况. 但是, 先前的研究表明, 芝田硫化叶菌细胞在被诱导后不仅能够存活而且能够再次被诱导^[11]. 在本研究中也未见被诱导细胞基因组 DNA 发生降解. 所以, 上述解释难以成立. 我们由此得出结论: 诱导不影响整合于宿主基因组内的 SSV1 DNA 的量. 这一结果还表明, 游离 SSV1 DNA 与整合 SSV1 DNA 拷贝数之比可以直接用来定量描述丝裂霉素和紫外照射的诱导作用. 值得注意的是, 在本研究中我们发现, 丝裂霉素和紫外照射的诱导效果在重复性方面存在着明显差异: 在先后进行的 12 次紫外诱导实验中, 未获得游离 SSV1 DNA(即: 游离与整合 SSV1 DNA 之比 < 0.1)的占 5 次; 而在 13 次丝裂霉素诱导实验中均得到了诱导产物. 因此, 丝裂霉素诱导作用的可重复性优于紫外照射. 目前尚不清楚造成这种差异的原因.

2.2 影响丝裂霉素对 SSV1 DNA 复制诱导作用的一些因素

考虑到丝裂霉素对 SSV1 病毒 DNA 复制诱导作用的重复性较好, 且易于用来处理大体积样品, 我们对影响这种诱导作用的因素做了进一步的探讨. 我们发现, 如果在培养液中加入丝裂霉素后对细胞进行摇床培养, 诱导效果明显好于静置培养的对照(图 2(a)). 进一步研究后发现, 将静置培养的、未经诱导的细胞转移至摇床中继续培养, 也会导致细胞内病毒 DNA 的大量复制, 而且, 丝裂霉素的诱导作用似乎可以与摇床培养的作用相叠加. 那么, 为什么改变培养方式会影响病毒的复制呢? 为了尝试回答这一问题, 我们首先将细胞静置培养至对数生长晚期($A_{600\text{ nm}} \approx 0.7$), 再分装于 250 mL 血清瓶中至下列最终体积: 50, 100 和 200 mL, 然后在相同条件下进行摇床培养. 经 19 h 培养后, 尽管菌液细胞浓度相近($A_{600\text{ nm}} \approx 1.0$), 但 50, 100 和 200 mL 菌液瓶中细胞内游离 SSV1 DNA 与整合 SSV1 DNA 拷贝数之比则有较大差异, 分别为 8.1, 2.5(图 2(b)内未显示)和 1.6(图 2(b)). 由此我们推测, 摇床培养对病毒 DNA 复制的作用可能与培养液中通气量的改变有关. 另外, 为了研究丝裂霉素对处于不同生理状态的细胞中的 SSV1 DNA 复制的诱导效果, 我们将芝田硫化叶菌分别静置培养至对数生长晚期($A_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)、静止期($A_{600\text{ nm}}$

图 2 培养条件对丝裂霉素诱导作用的影响
(a) 摇床培养的影响. 1 示 1 kb 分子量标准; 2 示静置培养对照, 未诱导; 3 示 5 μg/mL 丝裂霉素诱导后摇床培养; 4 示 5 μg/mL 丝裂霉素诱导后静置培养; 5 示摇床培养对照, 未诱导; (b) 菌液通气量的影响. 静置培养至对数生长晚期后分装, 1 示 50 mL 菌液/250 mL 血清瓶, 2 示 200 mL 菌液/250 mL 血清瓶, 摇床培养 19 h. I ~ IV 见图 1 注

≈ 1.0, 最大值)和衰亡期($A_{600\text{ nm}}$ 降至 0.8)后进行诱导. 结果表明, SSV1 DNA 在所有这些测试菌细胞中均可大量复制. 因此, SSV1 病毒 DNA 的复制能否被诱导与宿主基因组是否处于活跃的复制状态似乎没有直接关系. 根据上述结果, 我们建立了 SSV1 DNA 复制的诱导方法, 即: 首先静置培养芝田硫化叶菌, 待进入对数生长晚期以后, 加入丝裂霉素, 然后进行摇床培养.

2.3 SSV1 DNA 复制诱导的时间曲线

对芝田硫化叶菌进行丝裂霉素诱导后, 并不能立即检测到细胞内游离 SSV1 DNA 含量的增加. 细胞内 SSV1 DNA 的水平在诱导后 10 h 才明显上升, 至 12 ~ 15 h 左右达到最大值, 此后缓慢降低(图 3(a)). 对照实验表明, 当芝田硫化叶菌由静置培养改为摇床培养时, 能有相似之处. 先前的研究显示, 芝田硫化叶菌能够在不裂解细胞的情况下释放新产生的

SSV1 病毒^[11]. 我们在本研究中也发现, 经诱导处理后, 芝田硫化叶菌培养液的上清液中出现 SSV1 DNA, 而且胞外 SSV1 DNA 的增加与胞内 SSV1 DNA 含量的增加基本同步(图 3(b)). 由于在诱导后的这一段培养时间内, 上清液中检测不到可作为宿主基因组标记的整合 SSV1 DNA, 因此, 这些胞外 SSV1 DNA 很可能来自宿主在不裂解细胞情况下释放出的新生病毒颗粒.

2.4 诱导后细胞内 SSV1 DNA 的拷贝数

为了能够比较准确地估计诱导后芝田硫化叶菌细胞内 SSV1 DNA 的拷贝数, 我们根据 SSV1 DNA 的序列, 选择了 3 种限制性内切酶(*Xba* I, *Kas* I 和 *Avr* II)对从诱导后的细胞中提取的总 DNA 进行三酶切. 这 3 种内切酶在 SSV1 DNA 上无识别位点, 但可以有效地将宿主基因组 DNA 降解为较短的片段. 电泳分离细胞总 DNA 的酶切产物后, 即可得到纯化的游离病毒 DNA. 取不同量的纯化 SSV1 DNA 的 *Eco*R I 酶切产物以及从诱导后摇床培养 15 h 的细胞中提取的总 DNA 的 *Eco*R I 酶切产物, 在同一块琼脂糖胶上进行电泳. 转膜、杂交和曝光后, 通过扫描, 测定每个样品中 7.9 kb 条带的曝光强度(图 4). 比较待测样品和纯化 SSV1 DNA 样品中 7.9 kb 条带的曝光强度后发现, 诱导后, 经过 15 h 摇床培养, 芝田硫化叶菌细胞中 SSV1 DNA 的含量约占 DNA 总量的 10%. 根据该菌基因组 DNA 与病毒 DNA 大小之比, 游离 SSV1 拷贝数与整合 SSV1 拷贝数之比约为 20. 这与通过比较细胞总 DNA 中整合 SSV1 DNA 与游离 SSV1 DNA 杂交信号得到的结果是一致的(图 2(a)). 通过确定芝田硫化叶菌培养液的 A_{600} 值与细胞浓度之间的关系, 我们进一步测得, 诱导后细胞中游离

图 3 丝裂霉素诱导后细胞内 SSV1 DNA 复制及病毒释放的时间曲线
(a) 细胞内 SSV1 DNA 的浓度, (b) 上清液中 SSV1 DNA 的浓度. ● 示 SSV1 DNA 浓度, ◆ 示 $A_{600\text{ nm}}$ 值

图 4 丝裂霉素诱导后细胞内游离 SSV1 DNA 的杂交定量
样品总 DNA 从丝裂霉素诱导后摇床培养 15 h 的细胞中提取得到. 纯化 SSV1 DNA 由诱导细胞总 DNA 经 *Xba* I, *Kas* I 和 *Avr* II 酶切后分离得到. II 见图 1 注

SSV1 DNA 的拷贝数约为 50. 考虑到进入静止生长期后芝田硫化叶菌染色体拷贝数为 2^[12], 上述两个测定结果基本吻合.

3 讨论

SSV1 是极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌所携带的一种温和病毒. 本文描述了 DNA 合成抑制剂——丝裂霉素对该病毒 DNA 复制的诱导作用. 先前的研究表明, SSV1 病毒 DNA 同时以游离状态和插入宿主基因组后的整合状态存在于宿主细胞中^[6]. 我们发现, 静置培养时, 未经诱导处理的细胞中几乎检测不到游离 SSV1 DNA, 提示病毒 SSV1 DNA 主要以整合状态存在. 有意思的是, 诱导后, 游离病毒 DNA 含量激增, 而整合在宿主基因组中的 SSV1 DNA 的拷贝数没有改变. SSV1 DNA 的整合与一些细菌温和噬菌体(如λ噬菌体)的相应过程有相似之处: 均插入特异的宿主 tRNA 基因, 所依赖的病毒编码的整合酶具有结构同源性等^[10,13]. 但是, λ溶源菌一经诱导, 以原噬菌体状态存在的λDNA 即切出并开始复制, 最终导致宿主细胞裂解及子代噬菌体的释放^[14]. 显然, 在诱导对整合病毒 DNA 的影响方面, SSV1 和λ噬菌体存在着重要区别. 为什么整合的 SSV1 病毒 DNA 的拷贝数在诱导后不发生变化呢? 可能的解释是, 与体外实验结果的提示相一致, SSV1 DNA 的整合与切出之间存在着动态平衡, 而整合的效率高于切出^[15], 诱导仅仅引起游离病毒 DNA 的大量复制, 因此这一过程不会改变整合在宿主基因组中的 SSV1 DNA 的量. 本研究还表明, 与λ噬菌体 DNA 复制的诱导不同, SSV1 DNA 复制的诱导是一个缓慢的过程, 整合病毒 DNA 的切出可能是一个限速步骤.

在本研究中我们还发现, 当芝田硫化叶菌由静置培养改为摇床培养后, 细胞内游离 SSV1 DNA 的含量大幅度提高. 这种培养方式的改变对 SSV1 病毒 DNA 复制的诱导作用机制还不清楚. 我们的初步实验提示, 静置改摇床培养的诱导效果与培养液通气量相关. 尽管为好氧菌, 芝田硫化叶菌的生长对氧气的需求较低^[16]. 因此, 静置改摇床培养引起的 SSV1 病毒自发诱导频率的提高可能是细胞对氧供应增加所作的生理反应的一部分.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 3970009)、国家杰出青年基金(批准号: 39925001)和中国科学院知识创新工程(批准号: KXCXZ-3-01-02)资助项目.

参 考 文 献

1 Woese C R, Fox G E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5088~5090

2 Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 4576~4579

3 Zillig W. Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Curr Opin Genet Dev*, 1991, 1: 544~551

4 Bult C J, White O, Olsen G J, et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1996, 273: 1058~1073

5 Edgell D R, Doolittle W F. Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell*, 1997, 89: 995~998

6 Yeats S, McWilliam P, Zillig W. A plasmid in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *EMBO J*, 1982, 1: 1035~1038

7 Prangishvili D, Stedman K, Zillig W. Viruses of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Trends Microbiol*, 2001, 9: 39~43

8 Brock T D, Brock K M, Belly R T, et al. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol*, 1972, 84: 54~68

9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

10 Palm P, Schleper C, Grampp B, et al. Complete nucleotide sequence of the virus SSV1 of the archaeobacterium *Sulfolobus shibatae*. *Virology*, 1991, 185: 242~260

11 Martin A, Yeats S, Janekovic D, et al. SAV1, a temperate UV-inducible DNA virus-like particle from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. *EMBO J*, 1984, 3: 2145~2168

12 Bernander R. Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in Archaea. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 278~283

13 Reiter W D, Palm P, Yeats S. Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 1909~1914

14 Hendrix R W, Roberts J W, Stahl F W, et al. *Lambda II*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983

15 Muskhelishvili G. The archaeal SSV integrase promotes intermolecular excisive recombination *in vitro*. *System Appl Microbiol*, 1994, 16: 605~608

16 Grogan D W. Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol*, 1989, 171: 6710~6719