

Ssh10b2 与其同源蛋白 Ssh10b 在细胞含量及固定 DNA 超螺旋的能力上存在明显差异

郭 荣¹ 薛 宏¹ 霍笑风¹ 徐冬一² 胡晋川²

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)基因组含一对亲缘关系较远的同源基因, *ssh10b* 和 *ssh10b2*。这对同源基因编码的蛋白(Ssh10b 和 Ssh10b2)属于古菌 Sac10b DNA 结合蛋白家族。关于 Ssh10b 以及与其极为相似的硫矿硫化叶菌(*S. solfataricus*)Sso10b、嗜酸热硫化叶菌(*S. acidocaldarius*)Sac10b 蛋白已有较多研究, 推测这些蛋白可能在染色体组织和包装、DNA 重组、基因表达调控等方面起作用。克隆并在大肠杆菌中表达了 *ssh10b2* 基因, 纯化了重组 Ssh10b2 蛋白。免疫印迹定量分析表明, *ssh10b2* 在芝田硫化叶菌中有表达, 但其细胞含量仅相当于 Ssh10b 的约十分之一。重组 Ssh10b2 对双链 DNA 的亲合力低于 Ssh10b。此外, Ssh10b2 和 Ssh10b 在与双链 DNA 结合时表现出相似的凝胶阻滞模式。有意思的是, Ssh10b2 固定 DNA 负超螺旋的能力明显低于 Ssh10b。这些结果提示, Ssh10b 和 Ssh10b2 可能具有不同的生理作用。

关键词: 极端嗜热古菌; 芝田硫化叶菌; Sac10b 家族; Ssh10b2; DNA 超螺旋

中图分类号: Q933 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2006)02-0323-05

所有完成了基因组序列测定的嗜热古菌都至少编码一个 Sac10b 蛋白家族的成员^[1,2]。尽管目前对于 Sac10b 家族蛋白的功能还一无所知, 但这些蛋白在古菌中的广泛存在表明它们可能发挥着非常重要的生理作用。目前对于 Sac10b 蛋白家族的了解主要来自对嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)的 Sac10b、芝田硫化叶菌的 Ssh10b 蛋白的研究工作^[2-6]。已有的研究表明, Sac10b 和 Ssh10b 在细胞中的含量极为丰富。硫化叶菌 Sac10b 家族蛋白能够在体外与双链 DNA 结合, 这种结合不表现明显的序列特异性。早期的电镜观察显示, 在不同浓度下, Sac10b 与 DNA 形成结构不同的复合物^[4,6]。例如, 在较低浓度下, Sac10b 能够包裹两条双链 DNA 形成螺旋状结构。在先前的研究中, 本实验室发现, Ssh10b(最初称为 Ssh12^[3])具有固定 DNA 负超螺旋的能力, 而且这种能力受温度的影响^[2]。最近, 由于认识到 Sac10b 家族成员在嗜热古菌中普遍存在, 关于这些蛋白的研究迅速升温。2002 年, Bell 等发现, Sso10b(他们称为 Alba)在细胞内以乙酰化形式存在, 他们进而从硫矿硫化叶菌细胞提取液中分离得到了与 Sso10b 形成复合物的 Sir2 蛋白的类似物^[7]。Sir2 是一种在古菌、细菌及真核生物中都存在的、依赖于 NAD⁺ 的蛋白去乙酰酶^[8]。在体外实验中, Sso10b 经 Sir2 去乙酰化后表现出更强的 DNA 结合能力及转录抑制^[7]。近来, 先后有 4 个 Sac10b 家族成员的晶体结构得到了解析^[9-12]。对这些结构的分析显示, Sac10b 家族蛋白在

结构上与 DNaseI 的 N 末端 DNA 结合域和大肠杆菌翻译因子 IF3 的 C 末端相似。基于上述研究结果, Sac10b 蛋白家族被认为可能参与古菌染色体的组织、基因表达的调控或者 DNA 的重组和修复。

芝田硫化叶菌除了编码 Ssh10b, 还编码与其同源的旁支类似物(Paralogue)Ssh10b2^[1]。Ssh10b2 基因的 3'末端与编码反向旋转酶的 topR 基因的 3'末端部分呈反向重叠。在近来完成基因组序列测定的硫矿硫化叶菌和头薹珉硫化叶菌(*Sulfolobus tokodaii*)基因组中也发现了具有类似定位的 *ssh10b2* 的同源基因 *sso10b2* (GenBank 登录号: AE-006716) 和 *sto10b2* (GenBank 登录号: NC-003106)。这些基因的产物与包括 Ssh10b 在内的其它 Sac10b 家族成员在序列上有明显的差异^[1,2]。例如, Ssh10b2 在氨基酸序列水平上与 Ssh10b 仅有 32% 的同源性, 而后者与 Sac10b 家族中非硫化叶菌属成员之间的同源性却达到了 41% ~ 54%。在先前的研究中, 我们对芝田硫化叶菌中主要的、序列非特异性 DNA 结合蛋白进行了仔细的搜寻, 但却没有发现 Ssh10b2^[2,13]。所以, *ssh10b2* 在细胞中是否有效表达以及 Ssh10b2 在与 DNA 相互作用方面是否与 Ssh10b 相同都是尚待解决的问题。

在本研究中, 我们克隆并在大肠杆菌中表达了 *ssh10b2*。对重组蛋白进行纯化后, 制备了抗 Ssh10b2 的特异性抗体。采用免疫印迹方法, 检测了 Ssh10b2 在芝田硫化叶菌细胞中的表达情况, 发现 Ssh10b2 在细胞中的含量

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719603) 国家自然科学基金(39925001, 30030010)

* 通讯作者 黄 力¹ Tel: 86-10-62624971 Fax: 86-10-62653468; E-mail: huangli@sun.im.ac.cn

作者简介 郭 荣(1976 -)女, 山西人, 博士, 从事古菌遗传机制的研究。E-mail: rongerguo@yahoo.com

收稿日期 2005-08-05 接受日期 2005-09-01 修回日期 2005-12-27

(0.17%)仅为 Ssh10b 的约 10%。Ssh10b2 对双链 DNA 的亲合力低于 Ssh10b,且两者在固定 DNA 负超螺旋的能力上存在明显差异。因此,我们推测,Ssh10b2 和 Ssh10b 可能在细胞中起不同的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 芝田硫化叶菌 ATCC51178 购自 American Type Culture Collection;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21(DE3)来自本实验室保存;pET11a 质粒来自 Stratagene 公司。

1.1.2 试剂 :Taq DNA 聚合酶,T4 多聚核苷酸激酶,T4 DNA 连接酶,碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体,限制性内切酶为 Promega 产品,NBT/BCIP 为 Roche 产品,所有层析柱均购自 Pharmacia;PVDF 膜购自 BioRad;Ultrafree-4 离心超滤管购自 Millipore;[γ -³²P]ATP 为中国亚辉生物工程公司产品,经 PAGE 纯化的短寡核苷酸由上海生工和博亚生物工程有限公司合成。

1.2 芝田硫化叶菌的培养

采用 Brock 的基础培养基^[14],添加胰脲(0.2%)及蔗糖(0.1%),80℃培养。

1.3 基因克隆和表达

采用 PCR 方法从芝田硫化叶菌基因组中扩增 ssh10b2 基因,所用引物为:5'-CCGGAATTCATATGACAGAAAAATTAAATG-3' 5'-CGCGGATCCTTTTAGTAAACCCCTTAAG-3'(下划线处为 *Nde*I 和 *Bam*H I 位点)。PCR 产物经 *Nde*I 和 *Bam*H I 酶切后连接至 pET11a 质粒。将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中。对插入片段序列进行测序验证后,将质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中。诱导 ssh10b2 基因的表达时,将含重组质粒的大肠杆菌转化子接种至含氨苄青霉素(60 μ g/mL)的 LB 培养基中,37℃摇动培养至 OD₆₀₀ \approx 0.8。添加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 后,继续培养 3h。

1.4 蛋白质的纯化

收获诱导后的大肠杆菌,并将其悬浮于 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA 中。添加溶菌酶至 0.2mg/mL、KCl 至 2mol/L。经两轮冻融裂解细胞。裂解液置于 4℃、127000 \times g 离心 1h。取上清,75℃处理 15min。4℃、127000 \times g 离心 30min。样品对缓冲液 A(30mmol/L 磷酸钾, pH6.6, 0.1mmol/L EDTA, 0.1mmol/L DTT)透析后,上样于经缓冲液 A 平衡的 Mono S 柱(1mL)。用含 0~1mol/L KCl 梯度的缓冲液 A 洗脱。合并含有 Ssh10b2 的组分,采用截留分子量为 5000 的 Ultrafree-4 离心超滤管浓缩后,上样于 Superdex 200 柱(25mL)。合并含有 Ssh10b2 的组分,对 20mmol/L Tris, pH7.6, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 10% 甘油透析后, -20℃保存。采用 Lowry 法^[15]测定蛋白浓度。

1.5 抗体制备与免疫印迹

利用重组 Ssh10b2 制备兔抗血清。参照文献^[16],从抗血清中纯化抗 Ssh10b2 的特异抗体。蛋白样品经 SDS-PAGE (15%)分离后,电转移至 PVDF 膜上。以纯化的 Ssh10b2 抗体为第一抗体、与碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体为第二

抗体,获得免疫印迹。条带染色强度采用 Shimadzu CS-930 双波长光度计扫描定量。

1.6 电泳迁移率改变试验(EMSA)

取 0~20 μ mol/L Ssh10b2b 或 Ssh10b,与 5'末端标记的 60bp 双链 DNA 片段(其中一条链的序列为:5'-GATCCCCCAATGCTTCGTTTCGTATCACACACCCCAAGCCTTCTGCTTTG AATGCTGCC-3')在 20mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 10mmol/L MgCl₂, 1mmol/L DTT 和 100 μ g/mL BSA 溶液(总体积 20 μ mol/L)中混匀,22℃保温 10min。采用 T4 多聚核苷酸激酶及 [γ -³²P]ATP 对 DNA 片段的 5'末端进行标记。在预电泳至恒定电流的聚丙烯酰胺胶(8%)中对样品进行非变性电泳。电泳缓冲液为 0.1 \times TBE^[16]。电泳后,干胶、对 X 光片曝光。

1.7 缺刻闭合分析

参照文献^[13]进行。

2 结果和讨论

2.1 Ssh10b2 的基因克隆、表达和纯化

先前,我们在芝田硫化叶菌细胞裂解液中寻找主要的序列非特异 DNA 结合蛋白时,没有发现 Ssh10b2 蛋白^[2,13]。为了研究这个蛋白,我们将 ssh10b2 基因克隆至表达载体 pET11a 上。经 IPTG 诱导,含重组质粒的大肠杆菌细胞合成了一个大小符合 Ssh10b2 预期分子量的多肽。经过热处理和两步柱层析,将该多肽纯化至电泳纯(图 1-A)。基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法(MALDI-TOF)测定结果显示,纯化蛋白质的分子量与去掉 N 末端甲硫氨酸残基的 Ssh10b2 的预期分子量相同。根据这一结果以及下述免疫印迹和生化数据可以确认,纯化的蛋白为 Ssh10b2。采用本研究中的诱导和纯化方法,从 1L 诱导后的细胞中可以获得 7~8mg 纯化的 Ssh10b2 蛋白。

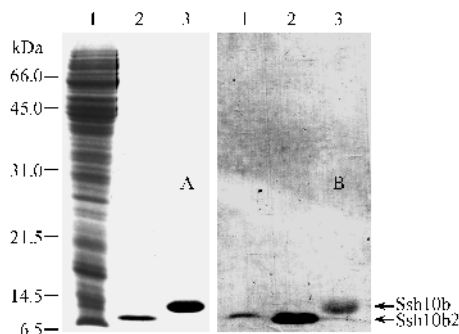


图 1 ssh10b2 基因在芝田硫化叶菌细胞中的表达分析

Fig. 1 Expression of the *ssh10b2* gene in *S. shibatae*. Samples were subjected to SDS-PAGE(15% polyacrylamide), and the gel was stained with Coomassie brilliant blue (A) or processed for immunoblotting (B). Lanes 1 and 4, *S. shibatae* lysate; lanes 2 and 5, purified recombinant Ssh10b2 (0.5 μ g); lanes 3 and 6, purified recombinant Ssh10b (2 μ g). Positions of molecular mass standards (in kilodaltons) are indicated.

2.2 芝田硫化叶菌细胞中 Ssh10b2 的含量

序列分析显示,在 *ssh10b2* 基因两侧存在着较为典型的古菌启动子和终止子等调控元件(图 2)^[18,19]。为了了解

ssh10b2 基因是否在芝田硫化叶菌细胞中表达,我们制备了重组 *Ssh10b2* 蛋白的特异抗体。利用这种抗体进行免疫印迹实验,发现芝田硫化叶菌细胞裂解液中存在一条与 *Ssh10b2* 蛋白电泳迁移率相似的蛋白条带(图 1-B)。因此,我们推测,芝田硫化叶菌合成 *Ssh10b2*。由于 *Ssh10b* 和 *Ssh10b2* 之间的序列相似性较低,抗 *Ssh10b2* 的抗体只能与 *Ssh10b* 蛋白发生微弱的相互作用。为了测定 *Ssh10b2* 蛋白在细胞中的含量,我们制备了芝田硫化叶菌细胞裂解液,并用 Lowry 法^[15]测定了其蛋白浓度。将已知蛋白浓度的细胞裂解液和纯化 *Ssh10b2* 蛋白样品分别稀释后进行 SDS-PAGE 分析,再通过免疫印迹检测 *Ssh10b2* 条带。采用 Shimadzu CS-930 双波长光度计对条带作扫描定量。根据纯化 *Ssh10b2* 蛋白染色强度与蛋白浓度之间的关系,我们发现,芝田硫化叶菌合成的 *Ssh10b2* 大约占细胞蛋白总量的 0.17%。我们还采用同样的方法(只是用抗 *Ssh10b* 抗体代替了抗 *Ssh10b2* 抗体)测定了 *Ssh10b* 蛋白在细胞中的含量。结果显示,*Ssh10b* 大约占细胞蛋白总量的 1.6%。这一数值低于我们先前通过对芝田硫化叶菌裂解液和纯化 *Ssh10b* 蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析,然后比较 *Ssh10b* 条带位置考马斯亮蓝 R-250 染色强度获得的值(约 4%)^[21]。我们认为,由于染色后相邻条带信号的干扰以及可能存在迁移率与 *Ssh10b* 相近的蛋白,裂解液样品中 *Ssh10b* 条带处的扫描信号可能不只是来自于 *Ssh10b* 蛋白,因此,测定的 *Ssh10b* 细胞含量可能偏高。根据本研究的结果,芝田硫化叶菌细胞中 *Ssh10b2* 的含量大约仅为 *Ssh10b* 的十分之一。这也解释了为什么在以前的研究中我们没有能够发现 *Ssh10b2*。

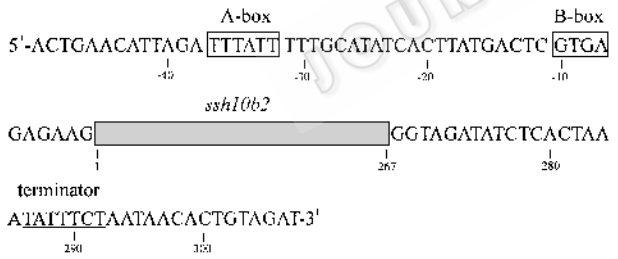


图 2 *ssh10b2* 基因的旁侧调控区域
Fig. 2 Regulatory regions flanking the *ssh10b2* gene.

2.3 Ssh10b2 与 DNA 的结合

尽管同属于 *Sac10b* 蛋白家族,但系统发育学分析表明, *Ssh10b2* 等硫化叶菌属 10b2 蛋白构成了独立于以 *Ssh10b* 为代表的古菌 10b 蛋白的分支^[1],提示硫化叶菌编码 10b2 和 10b 基因的分歧发生在硫化叶菌种间分化之前。那么,10b2 蛋白与 DNA 的相互作用是否与 10b 一样呢?我们首先采用电泳迁移率改变试验(EMSA)比较了 *Ssh10b2* 和 *Ssh10b* 与双链 DNA 短片段的结合。随着结合反应体系中重组 *Ssh10b2*、重组 *Ssh10b* 或天然 *Ssh10b* 浓度的增加,³²P 标记的 60bp DNA 片段被阻滞而依次形成四条清晰的阻滞条带(图 3)。当蛋白浓度超过一定的临界值($\sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L)后,在第四条阻滞带以上的弥散信号变得明显起来,显示形成了分子量较大的蛋白-DNA 复合物。继续增加蛋白浓度时,出现了迁移率

更低的蛋白-DNA 复合物。因此, *Ssh10b2* 的 EMSA 表现与 *Ssh10b* 一样,呈现出依赖于蛋白浓度的、从低结合密度模式向高结合密度模式的转变^[21]。另外,重组 *Ssh10b2*、重组 *Ssh10b* 和天然 *Ssh10b* 与 60bp 片段以低密度方式结合时产生相同数目的阻滞条带表明,这 3 个蛋白与 DNA 的结合位点大小一致。根据阻滞 50% 标记 DNA 片段所需蛋白量判断,重组 *Ssh10b2* 表观 K_d 为 $0.6 \sim 1.3 \times 10^{-6}$ mol/L 对双链 DNA 亲和力略低于天然 *Ssh10b*(表观 K_d 为 $0.8 \sim 1.6 \times 10^{-7}$ mol/L)和重组 *Ssh10b*(表观 K_d 为 $1.6 \sim 3.1 \times 10^{-7}$ mol/L)。

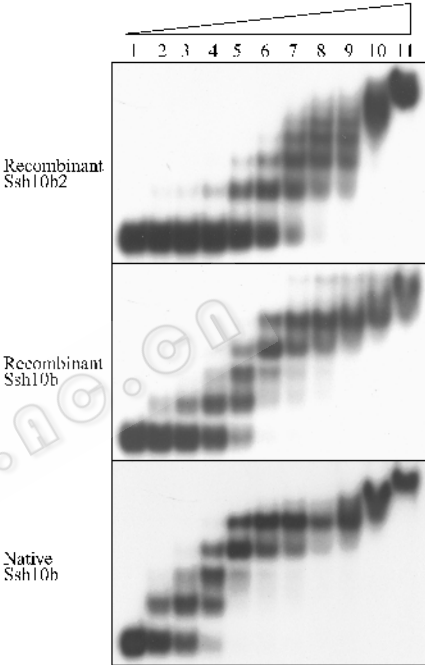


图 3 *Ssh10b2*、*Ssh10b* 与 60bp 双链 DNA 片段的结合
Fig.3 Binding of *Ssh10b2* and *Ssh10b* to a 60-bp double-stranded DNA fragment. Lanes 1 ~ 11, protein concentrations were 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μ mol/L, respectively.

2.4 Ssh10b2 对 DNA 拓扑学性质的影响

无论在真核生物、细菌还是古菌中,绝大多数参与染色体组装的 DNA 结合蛋白都具有固定 DNA 超螺旋的能力^[2,13,20-23]。我们先前发现, *Ssh10b* 具有固定 DNA 负超螺旋的能力,而且这种能力在温度升高时得到增强^[2,31]。在本研究中,我们用缺刻闭合的方法研究了 *Ssh10b2* 在不同实验温度(25℃, 45℃, 60℃和 80℃)下对 DNA 高级结构的影响(图 4)。该方法包括以下主要步骤:首先,取待测试蛋白质与单切刻质粒 DNA 结合;然后,加入 DNA 连接酶封闭 DNA 切口;再加入蛋白酶 K 和 SDS 去除结合在 DNA 上的蛋白质;最后,测定闭环 DNA 的超螺旋程度。DNA 的超螺旋程度反映了蛋白质对 DNA 拓扑学性质的影响。该实验的结果表明,重组和天然 *Ssh10b* 在不同实验温度下固定 DNA 负超螺旋的能力非常相似。45℃、蛋白/DNA 质量比为 1 时,两者只有较弱的固定负超螺旋的能力,随着实验温度的提高,这种能力逐步增强,当温度达到 80℃(即芝田硫化叶菌的最适生长温度)蛋白/DNA 比值为 0.5 时,两种蛋白表现出很强的固定

负超螺旋的能力。与 Ssh10b 不同,重组 Ssh10b2 在 60℃、蛋白/DNA 比为 1 时,才表现出微弱的 DNA 负超螺旋固定能力,80℃时,这种能力稍强。这些结果显示,Ssh10b2 固定 DNA 负超螺旋的能力弱于 Ssh10b。

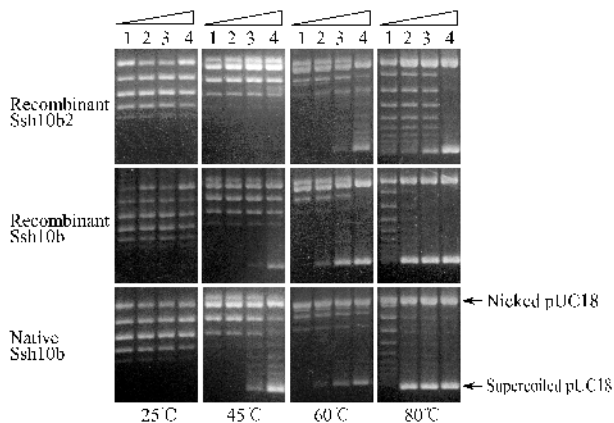


图 4 Ssh10b2、Ssh10b 对 DNA 拓扑学性质的影响

Fig. 4 Effect of Ssh10b2 and Ssh10b binding on DNA geometry. Plasmid pUC18 (1 μ g) containing a single nick per molecule was mixed with Ssh10b2 or Ssh10b at various protein/DNA mass ratios and, after incubation at 25, 45, 60 or 80°C, treated with T4 DNA ligase (for samples incubated at 25 and 45°C) or Pfu DNA ligase (for samples incubated at 60 and 80°C). The samples were subjected to agarose gel electrophoresis. Lane 1 ~ 4, protein/DNA mass ratios were 0, 0.5, 1 and 2, respectively. Positions of nicked and negatively supercoiled plasmid were indicated.

生化研究的结果表明,广古菌和泉古菌(如硫化叶菌)可能采用了不同的染色体组装机制^[24],但是,嗜热古菌(包括广古菌和泉古菌的成员)普遍含有 Sac10b 家族蛋白的事实提示,古菌中这两个不同的进化分支可能在染色体组装的某些方面采用了类似的策略以适应高温生长条件。我们先前发现,Ssh10b 在细胞内含量极为丰富,而且在生理温度下具有很强的固定 DNA 负超螺旋的能力。Sac10b 家族蛋白的这些特点与推测的它们在染色体组织中的作用相符^[25]。Ssh10b2 等硫化叶菌 10b2 蛋白是硫化叶菌 10b 蛋白的远缘旁支类似物(Paralogues),在先前的蛋白组分分离实验中尚未找到过这类蛋白。因此,硫化叶菌是否合成这类蛋白、这类蛋白的性质如何一直是未解决的问题。本研究结果表明,ssh10b2 基因在芝田硫化叶菌细胞中是表达的,但 Ssh10b2 的细胞含量较低,仅为 Ssh10b 的十分之一;更重要的是,尽管 Ssh10b2 也能结合 DNA,但其固定 DNA 负超螺旋的能力较低。我们推测,ssh10b2 和 ssh10b 在进化过程中发生了分化,尽管两个基因编码的蛋白可能都参与了染色体的组织,但它们在生理功能上可能存在差别。目前,我们正在尝试采用遗传学方法分析这种差别。

参 考 文 献

[1] Fosterer P, Confalonieri F, Knapp S. Identification of the gene encoding archaeal-specific DNA-binding proteins of the Sac10b family. *Mol Microbiol*, 1999, **32**: 669 – 670.

[2] 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**: 3929 – 3933.

[3] Lou H, Huang L, Mai V. Effect of DNA binding protein Ssh12 from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* on DNA supercoiling. *Science in China (Series C)*, 1999, **42**: 401 – 408.

[4] Dick J, Reinhardt R. The Structure of DNA-binding Proteins from eu- and Archaeobacteria. In: Gualerzi CO, Pon CL. eds. *Bacterial Chromatin*. New York: Springer-Verlag, 1986.

[5] Grote M, Dijk J, Reinhardt R. Ribosomal and DNA binding proteins of the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **873**: 405 – 413.

[6] Lurz R, Grote M, Dijk J, *et al.* Electron microscopic study of DNA complexes with proteins from Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *EMBO J*, 1986, **5**: 3715 – 3721.

[7] Bell SD, Botting CH, Wardleworth BN, *et al.* The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science*, 2002, **296**: 148 – 151.

[8] Smith JS, Brachmann CB, Celic I, *et al.* A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6658 – 6663.

[9] Wardleworth BN, Russell RJ, Bell SD, *et al.* Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. *EMBO J*, 2002, **21**: 4654 – 4662.

[10] Chou CC, Lin TW, Chen CY, *et al.* Crystal structure of the hyperthermophilic archaeal DNA-binding protein Sso10b2 at a resolution of 1.85 Angstroms. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 4066 – 4073.

[11] Zhao K, Chai X, Marmorstein R. Structure of a Sir2 substrate, Alba, reveals a mechanism for deacetylation – induced enhancement of DNA binding. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 26071 – 26077.

[12] Wang G, Guo R, Bartlam M, *et al.* Crystal structure of a DNA binding protein from the hyperthermophilic euryarchaeon *Methanococcus jannaschii*. *Protein Sci*, 2003, **12**: 2815 – 2822.

[13] Mai VQ, Chen X, Hong R, *et al.* Small abundant DNA binding proteins from the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* constrains negative DNA supercoils. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 2560 – 2563.

[14] Brock TD, Brock KM, Belly RT, *et al.* *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol*, 1972, **84**: 54 – 68.

[15] Lowry OH, Rosebrogh NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 – 275.

[16] Olmsted JB. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J Biol Chem*, 1981, **256**: 11955 – 11957.

[17] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

- [18] Brown JW , Daniels CJ , Reeve JN. Gene structure , organization , and expression in archaeobacteria. *Crit Rev Microbiol* , 1989 , **16** : 287 – 338.
- [19] Zillig W , Palm P , Reiter WD , *et al.* Comparative evaluation of gene expression in archaeobacteria. *Eur J Biochem* , 1988 , **173** : 473 – 482.
- [20] Drlica K , Rouviere-Yaniv J. Histonelike proteins of bacteria. *Microbiol Rev* , 1987 , **51** : 301 – 319.
- [21] Lopez-Garcia P , Knapp S , Ladenstein R , *et al.* *In vitro* DNA binding of the archaeal protein Sso7d induces negative supercoiling at temperatures typical for thermophilic growth. *Nucl Acids Res* , 1998 , **26** : 2322 – 2328.
- [22] Musgrave D , Forterre P , Slesarev A. Negative constrained DNA supercoiling in archaeal nucleosomes. *Mol Microbiol* , 2000 , **35** : 341 – 349.
- [23] Toulme F , Le Cam E , Teyssier C , *et al.* Conformational changes of DNA minicircles upon the binding of the archaeobacterial histone-like protein MC1. *J Biol Chem* , 1995 , **270** : 6286 – 6291.
- [24] Sandman K , Pereira SL , Reeve JN. Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell Mol Life Sci* , 1998 , **54** : 1350 – 1364.

Ssh10b2 differs from its paralogue Ssh10b in cellular abundance and the ability to constrain DNA supercoils

GUO Rong¹ , XUE Hong¹ , HUO Xiao-feng¹ , XU Dong-yi² , HU Jin-chuan²

(¹ Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² College of Life Science , Peking University , Beijing 100871 , China)

Abstract : The ssh10b and ssh10b2 genes , a pair of distantly related paralogues in *Sulfolobus shibatae* , encode members of the Sac10b DNA binding protein family in thermophilic archaea. It has been shown previously that Ssh10b exists in abundance in *S. shibatae* and is capable of constraining negative DNA supercoils , properties that are consistent with a speculated architectural role for the protein in chromosomal organization. In this study , the ssh10b2 gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* , and the recombinant Ssh10b2 protein was purified to apparent homogeneity. Immunoblotting analysis using a specific anti – Ssh10b2 antibody showed that ssh10b2 was expressed in *S. shibatae* , but the cellular level of Ssh10b2 was only ~ 10% of that of Ssh10b. Recombinant Ssh10b2 was capable of interacting with both double-stranded and single-stranded DNA. The affinity of the protein for double-stranded DNA was higher than that reported for Ssh10b. The Ssh10b2 and Ssh10b proteins appeared to generate similar gel shift patterns on duplex DNA fragments. However , unlike Ssh10b , Ssh10b2 was unable to constrain DNA supercoils. These data suggest that Ssh10b2 does not serve as a general architectural factor in DNA compaction and organization in *S. shibatae*.

Keywords : Ssh10b2 ; Sac10b family ; *Sulfolobus shibatae* ; Cellular abundance ; DNA binding ; DNA supercoiling

Foundation item : The Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719603) ; The National Natural Science Foundation of China (39925001 , 30030010)

* Corresponding author : HUANG Li* . Tel : 86-10-62624971 ; Fax : 86-10-62653468 ; E-mail : huangli@sun.im.ac.cn

Received : 5 August 2005 / Accepted : 1 September 2005 / Revised : 27 December 2005