

# 应用分子梳技术对 DNA 与组蛋白相互作用的研究\*

刘玉颖 窦硕星 王鹏业† 谢 平 王渭池

(中国科学院物理研究所软物质物理实验室, 北京 100080)

(2004 年 5 月 9 日收到 2004 年 6 月 18 日收到修改稿)

利用分子梳技术对  $\lambda$ -DNA 和组蛋白的相互作用进行了研究. 通过这种简单有效的方法, 我们将  $\lambda$ -DNA 分子拉伸到 26—28  $\mu\text{m}$ , 相当于其原长(约 16.2  $\mu\text{m}$ )的 1.6—1.7 倍. 当组蛋白与 DNA 结合后, DNA 分子发生凝聚现象, 复合体的拉伸长度明显变短, 其峰值分布在 10—14  $\mu\text{m}$  之间. DNA-组蛋白复合体的拉伸长度与组蛋白的浓度、与碱基对和荧光染料的比例有显著的关系.

关键词: 分子梳, 组蛋白, DNA, 荧光显微

PACC: 3620, 8715, 8715K

## 1. 引 言

近年来, 拉伸 DNA 已成为人们研究 DNA 的一种重要手段, 而荧光显微技术极大地方便了对单分子 DNA<sup>[1, 2]</sup>的观察. 许多物理手段被用于拉伸 DNA 分子, 例如磁镊<sup>[3-5]</sup>、光镊<sup>[6-9]</sup>、微吸管<sup>[10]</sup>等. 另外, 人们还发展了许多种利用流体的流动使 DNA 分子得以固定且被拉伸的方法: 空气与水界面的退却<sup>[11-13]</sup>、气流推动液滴的流动<sup>[14]</sup>、玻片边沿的滑动<sup>[15]</sup>、液体的对流<sup>[16]</sup>、旋转离心法<sup>[17]</sup>、准确控制液面的移动<sup>[18]</sup>等. 但目前以上流动流体这些方法只应用于拉伸 DNA 分子, 还没有应用于拉伸 DNA 与组蛋白的复合体. 组蛋白是一种很重要的蛋白质, 对 DNA 分子的压缩起着重要的作用, 在一定范围内, 它可以使 DNA 分子折叠成更加有序的高级结构. 活细胞或噬菌体中的 DNA 分子都以紧密堆积的形式存在, 其体积仅仅是自由分散状态的  $10^{-4}$ — $10^{-6}$ , 这种结构不仅具有所占空间较小的特点, 而且与基因表达的自我调控密切相关, 因而具有重要的生物学意义. 真核生物中, 形成染色质时组蛋白与 DNA 紧密结合. 我们已对 DNA 与组蛋白的相互作用进行了布朗动力学模拟<sup>[19, 20]</sup>, 初步显示了核小体组装、解离的动力学过程以及在拉伸力下的行为. 最近, 我们还利用分子梳技术结合荧光显微技术直接观察

到了 DNA 单分子在拉伸力作用下的熔化现象<sup>[21]</sup>. 本文报道 DNA 与组蛋白相互作用的实验结果. 我们利用分子梳技术, 将 DNA 分子拉伸并且平铺在疏水表面上, 然后用倒置荧光显微镜观察单个 DNA 分子及其与组蛋白的复合体, 通过观察 DNA-组蛋白复合体的拉伸长度, 可以得知缓冲液对 DNA 与组蛋白相互作用的影响, 这将有助于在单分子水平上研究 DNA 与组蛋白的相互作用<sup>[22]</sup>. 另外, 由于 DNA 与组蛋白两者均为生物大分子, 它们之间的相互作用非常复杂, 影响的因素也很多. 本实验提供了一个研究这些相互作用的出发点. 将有助于弄清通常很长的 DNA 分子(例如, 人的 DNA 分子展开后的长度近两米)是通过哪些机制被折叠的. 目前, 从物理学的观点上对这一问题的理解仍具有挑战性, 是一个值得从理论和实验两方面深入探讨的悬而未决的科学问题.

## 2. 材料与方 法

### 2.1. 实验材料和仪器

$\lambda$ -DNA (0.569  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 购自华美生物工程公司(中国); 荧光染料 YOYO-1 购自 Molecular Probes 公司(美国); 组蛋白和 Bis-Tris 购自 Sigma 公司(美国); 高纯水由 Millipore S. A. 系统(法国)获得; 倒置荧

\* 国家自然科学基金(批准号: 60025516 和 10334100)资助的课题.

† E-mail: pywang@aphy.iphy.ac.cn

光显微镜型号为 IX-70 ,Olympus( 日本 );CCD 照相机为 CoolSnap-fx( 美国 )。

## 2.2. 疏水表面的制备

将石英片( 21 mm × 42 mm )浸泡在热的 NaOH 溶液( 0.5 M )中 10min ,然后用高纯水充分冲洗 ,石英片干燥后对其表面进行疏水处理 :将 0.2—0.3 ml PMMA 溶液( 溶剂为氯仿 ,质量百分比为 10% )滴在石英玻璃表面的中心位置 ,然后以 5000r/min 的转速旋转 1min . 旋涂完毕将石英片放在烘箱中 ,在 165℃ 烘烤 20min ,然后在室温下放在无尘环境中保存以备<sup>[23]</sup> . 石英表面的清洁度以及 PMMA 溶液的均匀性对膜的性质有重要的影响。

## 2.3. DNA 和 DNA-组蛋白复合体溶液的制备

$\lambda$ -DNA( 48 kbp ,原长约 16.2  $\mu\text{m}$  )与新鲜制备的 0.1  $\mu\text{M}$  荧光染料 YOYO-1 溶液( 缓冲液为 10 mM Tris/1 mM EDTA ,pH 8.0 )在黑暗中和室温下共同保

温 30min ,碱基对与染料分子之比为 10 : 1 ,然后用 Bis-Tris 缓冲液( 50 mM ,pH ~ 5.6 )将标记好荧光分子的 DNA 溶液稀释至 6.5 pM .

用 bis-Tris 缓冲液( 50 mM ,pH ~ 6.6 )稀释组蛋白溶液 ,稀释后的组蛋白溶液与标记好荧光分子的 DNA 溶液按不同的摩尔比在 37℃ 共同保温 1h .

## 2.4. 用分子梳方法拉伸 DNA 及其 DNA-组蛋白复合体

将 DNA 溶液或 DNA-组蛋白复合体溶液( 1—2  $\mu\text{l}$  )滴在 PMMA 疏水薄膜上 . 最初 ,液滴的边界线几乎不动 ,5—10min 后 ,由于液滴的明显蒸发 ,空气与水边界线开始回缩 ,其末端与疏水表面结合的 DNA 分子被拉伸 ,很多数目的 DNA 分子呈放射状地分布在疏水表面上 ,类似于太阳光线的形状。

## 2.5. 对 DNA 分子成像及其图像分析

与 DNA 结合的 YOYO-1 分子的最大吸收波长

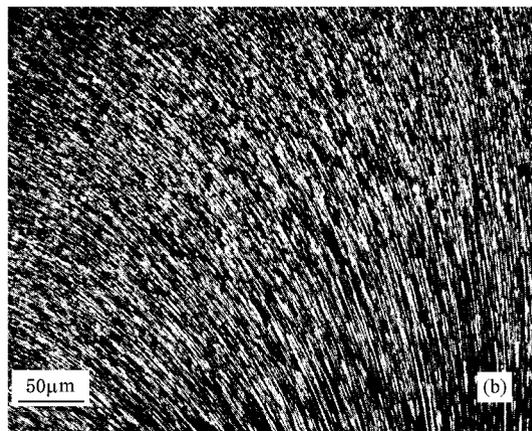
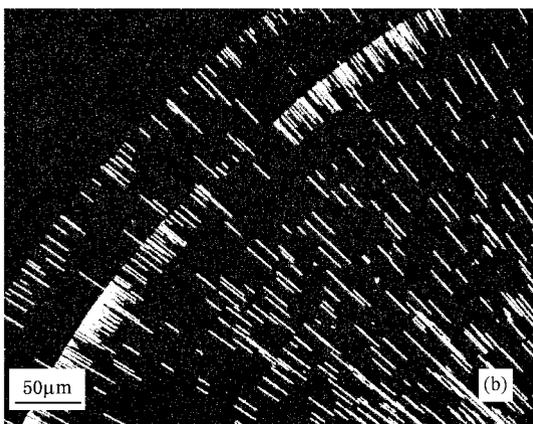
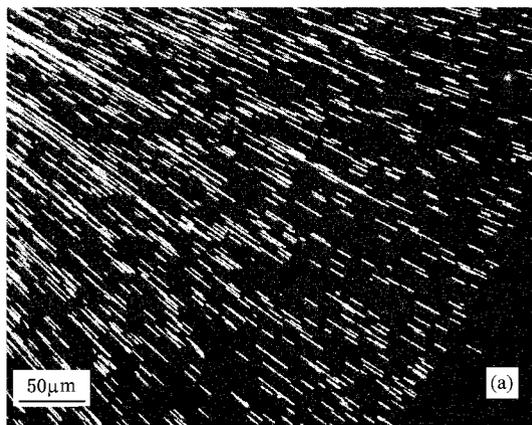
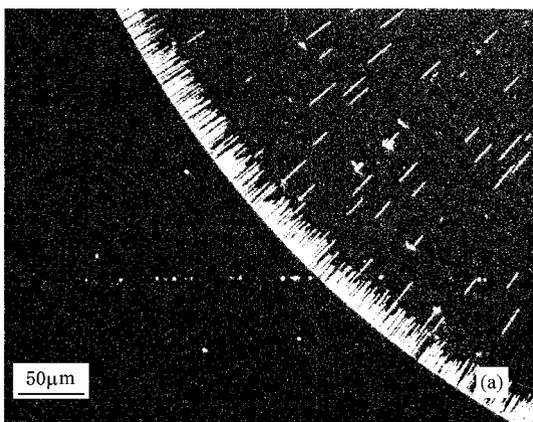


图 1 分子梳拉伸的 DNA 分子及其与组蛋白复合体的分布 (a) DNA (6.5 pM ,未加组蛋白) , (b) 组蛋白浓度为 DNA 的 30 倍

图 2 分子梳拉伸的 DNA 分子及其与组蛋白复合体的分布 (a) 组蛋白浓度为 DNA 的 50 倍 , (b) 组蛋白浓度为 DNA 的 100 倍

为 491 nm, 发射谱峰波长为 509 nm, 即在蓝光激发下可以发出绿色的荧光. 从而通过观察 YOYO-1 发出的荧光可以观察到 DNA 分子. 实验中激发光来自一个功率为 100W 的汞灯, 用倒置荧光显微镜和 CCD 照相机对 DNA 进行观察并且采集照片, CCD 照相机的曝光时间为 3s. Scion image 软件用于测量被拉伸 DNA 的长度.

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 组蛋白浓度的影响

在碱基对与 YOYO-1 分子之比为 10:1 的情况下, 将不同浓度的组蛋白与 DNA (6.5 pM) 共同保温

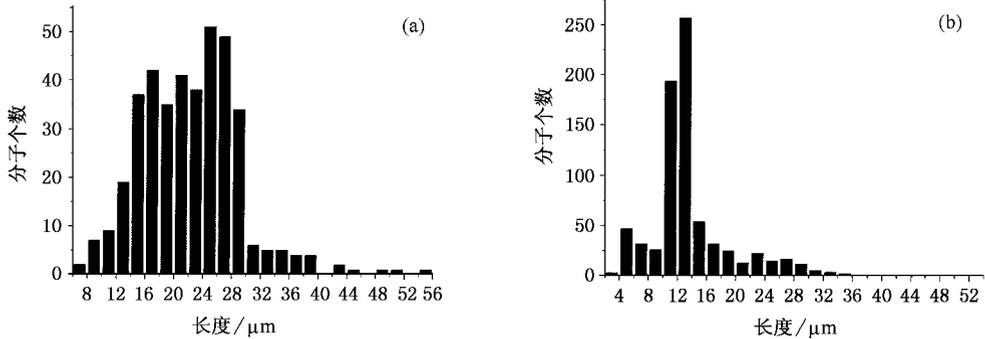


图 3 DNA 分子及其 DNA-组蛋白复合物长度分布图 (a) DNA (6.5 pM, 未加组蛋白). 峰值在 24—28 $\mu\text{m}$  之间, (b) 组蛋白浓度为 DNA 的 50 倍. 峰值在 10—14 $\mu\text{m}$  之间

点, 我们对大量的 DNA-组蛋白复合物进行了长度测量 (图 3). 当组蛋白浓度是 DNA 的 50 倍时, 其峰值分布在 10—14  $\mu\text{m}$  之间, 较没结合组蛋白的 DNA 分子拉伸长度缩短了 14—16  $\mu\text{m}$  (相当于未拉伸 DNA 长度缩短 8.8—10  $\mu\text{m}$ ). 人们已知<sup>[24]</sup>, 一个组蛋白与 DNA 分子结合, DNA 在组蛋白上面缠绕 1.75 周, 需要大约 146 bp, 相当于未拉伸 DNA 长度减小 0.05  $\mu\text{m}$ . 由此可估算组蛋白浓度为 DNA 的 50 倍时, 与 DNA 结合的组蛋白数目大约为 175—200 个. 我们推断 DNA 与组蛋白的结合方式具有以下特点: 有的 DNA 分子与组蛋白结合, 有的 DNA 分子不与组蛋白结合; 与组蛋白结合的 DNA 分子数目随着组蛋白浓度的增大而增多, 结合到每个 DNA 分子上的组蛋白数目随着组蛋白浓度的增大而增多, 通过峰值的分布判断, 形成分子梳后, 与 DNA 分子结合的组蛋白数目一般在 125—190 之间. 如果结合的组蛋白数目过多, 例如组蛋白与 DNA 浓度比为 100, 碱基对与

1h 然后将 DNA 与组蛋白复合物进行拉伸. 实验发现, 在缓冲液中加入组蛋白后, DNA 分子的拉伸长度与未加组蛋白 (对照组) 相比明显变短 (图 1, 2), 这表明组蛋白已经与 DNA 结合, 组蛋白导致 DNA 分子发生凝聚现象. 为了进一步检验二者结合的适当条件, 我们试验了组蛋白与 DNA 的不同摩尔比, 例如 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100. 结果发现随着组蛋白浓度的增大, DNA 分子的拉伸长度变短, 与疏水表面结合的分子数逐渐增多 (图 1, 2). 后者说明组蛋白能大大增强 DNA 与疏水表面的结合. 当组蛋白与 DNA 摩尔比为 50, 100 时分子分布非常密集 (图 2), 特别是在 100 时, 很多 DNA 分子没有被拉开, 说明二者结合聚集程度很高 (图 2).

为了进一步研究 DNA 与组蛋白相互作用的特

染料分子比为 10 时, DNA 与组蛋白紧密结合, 应用液滴蒸发法不能将复合物完全拉开 (图 2(b)).

在组蛋白与 DNA 不同摩尔比的情况下, 我们对复合体的拉伸长度进行了平均值和峰值统计, 结果

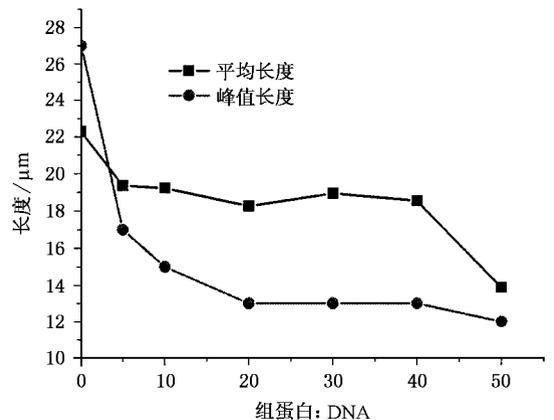


图 4 复合物拉伸长度与二者摩尔比的关系曲线

表明：长度平均值和峰值都随组蛋白浓度增大而减小(图 4).

### 3.2. 染料分子的影响

为了研究影响 DNA 与组蛋白结合的因素,我们将碱基对与染料分子的比例改为 5:1. 结果发现 相对于比例为 10:1 的情况,分子分布较稀疏(图 5 与

图 1 2),并且峰值长度较长(图 6 与图 3 4).

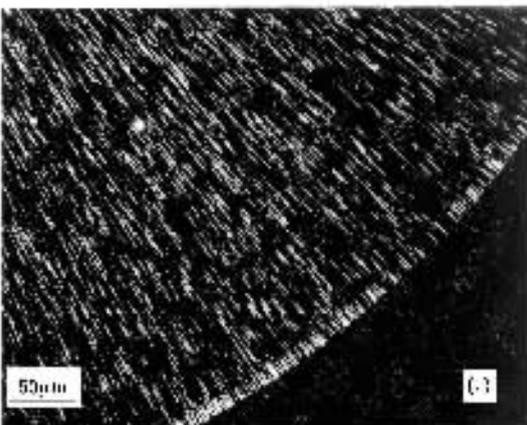
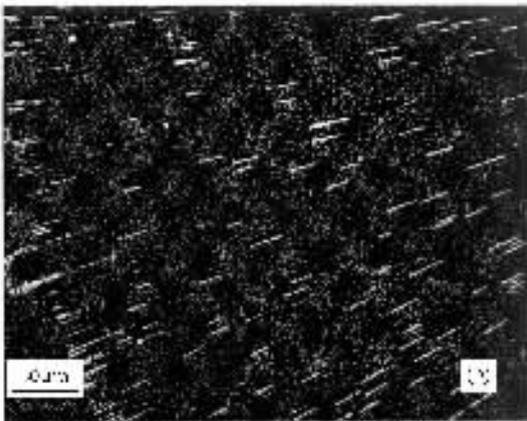
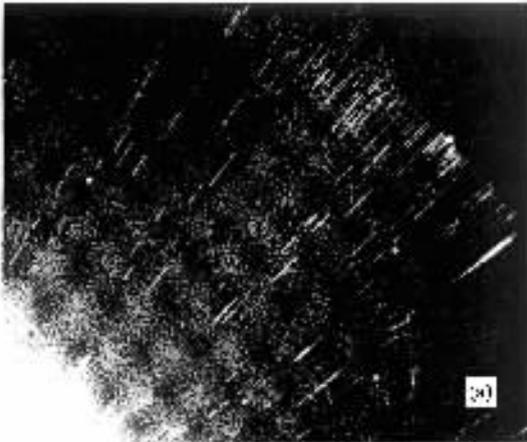


图 5 分子梳拉伸的 DNA 分子及其 DNA-组蛋白复合体的分布 (a) DNA(6.5 pM,未加组蛋白),(b)组蛋白浓度为 DNA 的 50 倍,(c)组蛋白浓度为 DNA 的 100 倍

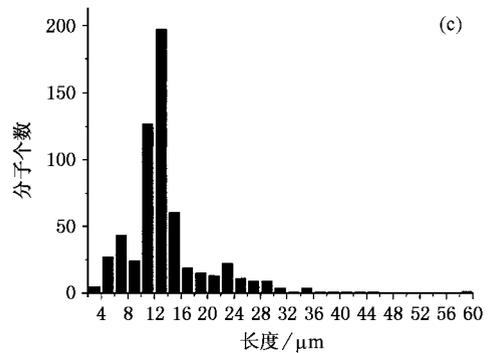
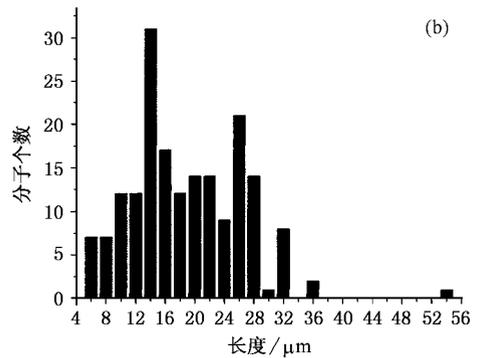
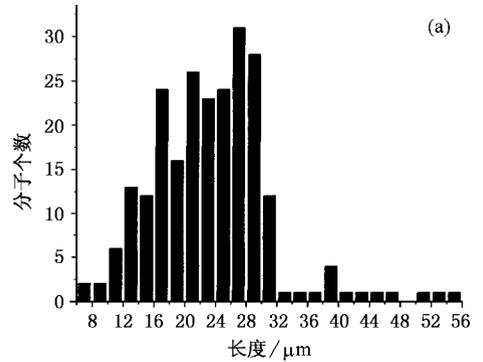


图 6 DNA 分子及其 DNA-组蛋白复合体长度分布图 (a) DNA (6.5 pM,未加组蛋白). 峰值在 26—30 μm,(b)组蛋白浓度为 DNA 的 50 倍. 峰值在 13—15 μm 之间,(c)组蛋白浓度为 DNA 的 100 倍. 峰值在 10—14 μm 之间

碱基对与染料分子之比为 5:1 时,DNA 分子长度分布的峰值在 26—30 μm 之间(图 6(a)),加入组蛋白后,随着组蛋白浓度增加,长度分布的峰值逐渐向较小值移动. 组蛋白与 DNA 质量比为 5 时,长度较小的分子数增多,峰值变化不大(在 24—26 μm 之间),说明有一部分 DNA 分子与组蛋白结合;当二者的浓度比为 50 时,峰值在 13—15 μm 之间(图 6(b));二者浓度比为 100 时分子梳分布非常密集,峰值在 10—14 μm 之间(图 6c). 与前面碱基对与染料分子之比为 10:1 时的情况比较,可以看出,在现在

YOYO-1 分子增加一倍的情况下,与 DNA 结合的组蛋白数目减少.这说明带正电的 YOYO-1 分子结合到 DNA 分子上后,部分抵消了 DNA 的负电性,从而在一定程度上抑制了 DNA 与组蛋白的结合.

## 4. 结 论

我们直接用荧光显微镜观察到了由分子梳拉伸的组蛋白与 DNA 结合形成的复合体,并且推断了在溶液中 DNA 与组蛋白结合的一些特点.组蛋白结合到 DNA 上使 DNA 长度明显缩短,使 DNA 分子发生

凝聚现象;另外,组蛋白能显著增加 DNA 与疏水表面的结合能力,DNA 与疏水表面结合力可能部分来源于静电相互作用.较多的 YOYO-1 分子结合到 DNA 分子上减弱了组蛋白结合到 DNA 上的能力,但是如果组蛋白达到一定浓度,组蛋白与 DNA 二者也能很好地结合.组蛋白与 DNA 结合速度较快,30min 即可很好地结合,且结合后比较稳定.我们确定的 DNA 与组蛋白结合的适当条件是二者的摩尔比为 5—100,温度为 37°C,碱基对与染料分子的比为 10, pH 值小于 7.从分子梳拉伸分子分布的疏密变化和长度变化可以分析二者的结合情况.

- 
- [ 1 ] Weiss S 1999 *Science* **283** 1676
- [ 2 ] Ha T 2001 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** 287
- [ 3 ] Smith S B, Finzi L and Bustamante C 1992 *Science* **258** 1122
- [ 4 ] Strick T R *et al* 1996 *Science* **271** 1835
- [ 5 ] Allemand J F *et al* 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 14152
- [ 6 ] Perkins T T, Smith D E and Chu S 1994 *Science* **264** 819
- [ 7 ] Perkins T T *et al* 1994 *Science* **264** 822
- [ 8 ] Smith S B, Cui Y J and Bustamante C 1996 *Science* **271** 795
- [ 9 ] Bennink M L *et al* 1999 *Cytometry* **36** 200
- [ 10 ] Cluzel P *et al* 1996 *Science* **271** 792
- [ 11 ] Bensimon A *et al* 1994 *Science* **265** 2096
- [ 12 ] Bensimon D *et al* 1995 *Phys. Rev. Lett.* **74** 4754
- [ 13 ] Michalet X *et al* 1997 *Science* **277** 1518
- [ 14 ] Li J W *et al* 1998 *Nucleic Acids Res.* **26** 4785
- [ 15 ] Yokota H *et al* 1997 *Nucleic Acids Res.* **25** 1064
- [ 16 ] Wang W, Lin J and Schwartz D C 1998 *Biophys. J.* **75** 513
- [ 17 ] Yokota H *et al* 1999 *Anal. Chem.* **71** 4418
- [ 18 ] Otobe K and Ohtani T 2001 *Nucleic Acids Res.* **29** e109
- [ 19 ] Li W *et al* 2003 *Chin. Phys.* **12** 226
- [ 20 ] Li W *et al* 2004 *J. Theor. Biol.* **230** 375
- [ 21 ] Liu Y Y *et al* 2004 *J. Chem. Phys.* **121** 4302
- [ 22 ] Sasaki S and Karube I 2001 *Anal. Sci.* **17** 1213
- [ 23 ] Gueroui Z *et al* 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** 6005
- [ 24 ] Wolffe A 1998 *Chromatin structure and function* ( San Diego : Academic press , 3rd edition. )

# Study of interactions between DNA and histone with molecular combing method<sup>\*</sup>

Liu Yu-Ying Dou Shuo-Xing Wang Peng-Ye<sup>†</sup> Xie Ping Wang Wei-Chi

(*Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

(Received 9 May 2004; revised manuscript received 18 June 2004)

## Abstract

The interactions between DNA and histone are studied by using the molecular combing method. With this simple but effective method,  $\lambda$ -DNA molecules are stretched to a length of 26—28  $\mu\text{m}$ , 1.6—1.7 times of their contour length ( $\sim 16.2 \mu\text{m}$ ). After DNA binding of histones, DNA molecules are condensed and the lengths of the stretched complexes become significantly shorter, with length distribution peak lying between 10—14  $\mu\text{m}$ . The lengths of the stretched DNA-histone complexes are closely related to the histone concentration and the mixing ratio of DNA base pair and dye molecule.

**Keywords** : molecular combing, histone, DNA, fluorescence microscopy

**PACC** : 3620, 8715, 8715K

<sup>\*</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 60025516 and 10334100).

<sup>†</sup> E-mail : pywang@aphy.iphy.ac.cn