

抗生物素蛋白与DNA相互作用的单分子研究

曹博智 林瑜 王艳伟 杨光参

Single molecular study on interactions between avidin and DNA

Cao Bo-Zhi Lin Yu Wang Yan-Wei Yang Guang-Can

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 140701 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.140701

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.140701>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I14>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

原子力显微镜探针悬臂几何结构变化对高次谐波信息增强的研究

[Investigation of enhancing higher harmonics by changing the shape of atomic force microscope cantilever](#)

物理学报.2013, 62(20): 200703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.200703>

铁磁共振磁交换力显微镜

[Magnetic exchange force microscopy using ferromagnetic resonance](#)

物理学报.2013, 62(18): 180704 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.180704>

原子力显微镜高次谐波幅度对样品弹性性质表征的研究

[Characterization of elastic properties of a sample by atomic force microscope higher harmonic amplitude](#)

物理学报.2013, 62(14): 140704 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.140704>

抗生物素蛋白与DNA相互作用的单分子研究*

曹博智 林瑜 王艳伟 杨光参†

(温州大学物理与电子信息工程学院, 温州 325035)

(2016年2月23日收到; 2016年4月3日收到修改稿)

抗生物素蛋白(avidin)在生物单分子实验中被广泛用于DNA与修饰表面的连接,同时avidin也可作为一种DNA载体用于基因治疗中.本文利用原子力显微镜(AFM)、动态光散射(DLS)、单分子磁镊(MT)技术系统地研究了avidin与DNA之间的相互作用,以及avidin引起DNA凝聚的机理.首先通过AFM对avidin-DNA复合体形貌进行观察,发现不但有avidin导致DNA凝聚的环状形貌,同时也存在avidin自身聚集引起的DNA凝聚现象,通过定量分析,发现其凝聚尺寸越来越小,而当avidin浓度大于 $2\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,其凝聚尺寸又突然变大. DLS实验结果也显示了同样的规律,伴随着avidin浓度的升高, DNA的粒径大小从大约170 nm减小到125 nm左右,其电泳迁移率由 $-2.76(10^{-4}\text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$ 变化到 $-0.1(10^{-4}\text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$.此外,通过MT技术的力谱曲线变化,发现avidin导致的DNA凝聚与其他多价离子相比,长度的变化曲线几乎呈线性变化,偶尔存在少而小的阶跃,这种变化趋势与组蛋白的变化曲线更相似.因此可以判断,avidin导致DNA凝聚是由avidin与DNA的静电吸引和avidin自身聚集两种相互作用引起的.

关键词: DNA凝聚, 抗生物素蛋白, 磁镊, 原子力显微镜

PACS: 07.79.Lh

DOI: 10.7498/aps.65.140701

1 引言

DNA是存储生物体遗传信息的高分子聚合物,在活体细胞中是高度压缩的,其明显的构象变化在DNA转录和复制中是至关重要的过程^[1].多价离子^[2]、酒精、蛋白质、阳离子脂质体和一些抗癌药物等也能够使DNA凝聚成不同的形态^[3,4],这种现象引起了不同领域的关注和研究^[5],旨在从理论和实验上了解并解释DNA凝聚过程中的力学及静电学性质.一般来说, DNA凝聚与其在溶液中的带电状态有关,因此可以通过求解泊松-玻尔兹曼方程^[6]来了解聚电解质周围的离子分布情况,也可以用蒙特卡罗模拟^[7]来计算DNA的凝聚过程.在平均场理论中, Manning-Oosawa凝聚理论^[8],在DNA可以近似为均匀带电线条件下,给出了DNA的电荷补偿比与离子价态的解释公式.

但是,这个理论无法解释DNA的电荷过度补偿现象,也就是电荷逆转^[9].基于实验观察, Grosberg等^[10]提出了一种新的静电关联理论,平衡离子在DNA表面形成了一种类似Wigner晶体的强关联流体结构,平衡离子的释放导致熵增加,可以解释同性电荷的相互吸引及DNA电荷反转现象.实验方面, Besteman等^[11]用动态光散射(DLS)和磁镊(MT)技术研究了多价平衡离子导致的DNA凝聚和电荷逆转^[12]. Murayama等^[13]则用光镊(OT)研究了多价平衡离子对单根DNA分子的作用,展示DNA在凝聚过程中的收缩机理.在国内,张兴华等^[14]和侯锡苗等^[15]用单分子MT和原子力显微镜(AFM)研究抗癌药物顺铂对DNA凝聚的影响,并且用变软(softening)-成环(looping)-缩短(shortening)-凝聚(condensing)模型(SLSC模型)来解释顺铂导致的DNA凝聚.我们也研究了不同凝聚剂对DNA凝聚的影响.一方面我们研究乙醇

* 国家自然科学基金(批准号: 11274245, 11574232)、国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 11304232)、浙江省自然科学基金面上项目(批准号: LY14F050008)和温州大学创新基金(批准号: 3162014036)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yanggc@wzu.edu.cn

对DNA凝聚的影响,首次证明凝聚过程的中间亚稳态的存在^[16].此外还研究了两种或两种以上凝聚剂之间的离子竞争关系,在四价离子引起DNA凝聚的过程中加入三价及以上价态离子对凝聚过程起到促进作用,而一价二价离子则会抑制这一凝聚过程^[17].

抗生物素蛋白(avidin)是一种基础的糖蛋白,在生理环境下是带正电的,它的分子量约为68000,天然的avidin是一种从鸡蛋白中分离得到的四聚体糖蛋白,因为与生物素结合的高亲和性被大家熟知.这个属性为avidin作为分子工具的开发提供了依据.avidin在生物单分子实验中被广泛用于DNA与修饰表面的连接,同时avidin也可作为一种DNA载体用于基因治疗中.早期工作中就有证据表明鸡蛋白中存在avidin-核酸复合体^[18],很多研究者^[19-22]基于avidin-DNA相互作用构造avidin-核酸纳米自组装体(ANANAS)作为生物分子探测器、信号增强剂、疾病诊断载体等应用于生物学治疗中.对avidin导致DNA凝聚的研究也有很多,Morpurgo等^[23]运用动态光散射和电镜检测avidin与DNA之间的相互作用,发现avidin-DNA纳米聚集体的尺寸是50—100 nm,最终凝聚形态为棒状和环状结构,Pastré等^[24]通过原子力显微镜观察avidin与DNA的作用,发现avidin能够促进DNA吸附在云母片上.Wang等^[25]也做了蛋白与DNA的相互作用,证明内切酶蛋白与DNA的特异性和非特异性结合,同时观察到蛋白间的聚集.

本文利用单分子技术研究了DNA-avidin复合物的性质,以及它们之间的相互作用,以解析其作用机理.我们发现avidin能够引起DNA凝聚,并发现avidin结合DNA的过程中既存在静电相互作用,又存在蛋白质的聚集.

2 实验过程

2.1 材料

实验选用的噬菌体 λ -DNA(48502 bp)(原始浓度是500 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)购买于New England Biolabs公司,其中磁镊使用的 λ -DNA末端修饰了12 bp化学标记的单链寡聚核苷酸.磷酸盐($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$), NaCl 、牛血清蛋白(BSA), avidin和Tris(三羟甲基氨基甲烷)购买于Sigma公司.去离子水(18.2 M $\Omega\cdot\text{cm}$)是经

Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA)超纯化系统去离子与净化处理.所有实验至少重复三次,以确保一致的结果.

2.2 原子力显微镜的样品制备与扫描

实验仪器选用日本岛津的SPM-9600原子力显微镜,工作模式为轻敲模式.采用3 Hz的扫描速度采集图像,图像采集像素是512 \times 512.通过SPM-9600操作系统的off-line软件分析DNA图像的尺寸(高度、宽度等)信息.实验前将云母片切成1 cm \times 1 cm,新解离即用.实验用缓冲液为Tris溶液(10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 8.0),用其配制不同浓度的avidin与DNA的混合溶液,DNA的最终浓度为1 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$.混合液在室温条件下培育30 min后,用移液器取20 μL 的混合液滴在新解离的云母表面,静置3 min.此后,用去离子水冲洗10—15次去除云母表面未吸附的DNA分子和杂质,用氮气吹干,放于干燥箱1—2 h后扫描.

2.3 动态光散射实验

动态光散射仪器采用Malvern公司的Zetasizer Nano ZS设备,光源是氦氖气体激光(波长 $\lambda = 633$ nm),探测角为90°.实验中所需的缓冲液为Tris溶液(10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, pH = 8.0),用Tris配制不同浓度的平衡离子与DNA混合液,DNA的最终浓度为1 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$.混合液在室温条件下培育30 min,而后取100 μL 的混合液注入比色皿中,置于动态光散射中测量DNA的流体力学半径;另取1 mL的混合液注入Zeta电位毛细管样品池测量DNA的迁移率.

溶液中粒子的流体力学半径可由Stokes-Einstein方程计算得到:

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}, \quad (1)$$

上式中, k_B 是玻尔兹曼常数, $d(H)$ 是流体动力学直径(表征颗粒在流体内的扩散),是关于 D (平移扩散系数), T (绝对温度), η (液体黏度系数)的函数.另外,通过测量散射光的光强自相关函数,同样可以得到溶液环境的改变而导致的粒子聚集的定性信息.

根据盐溶液静电学,DNA的电泳迁移率 μ 可通过Hückel公式计算得到(考虑Stokes公式),

$$\mu = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(kr), \quad (2)$$

其中 ζ 为 Zeta 电势, ε 为溶剂的介电常数, η 为溶剂的黏度系数, $f(kr)$ 为 Henry 函数.

2.4 磁镊实验

将磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.5, 140 mM NaCl) 和抗地高辛按 100 : 1 的比例混合后导入玻璃微槽中, 竖直向上放在冰箱中静置 5—6 h, 使抗地高辛均匀地沉积在玻璃微槽的侧壁. 而后, 将 150 μL 的牛血清蛋白 (BSA) 溶液冲入微槽中, 放在冰箱中再静置 30 min. 将事先混合好的 DNA 磁球混合液 (30 μL PBS, 0.5 μL 磁球, 0.5 μL 修饰的 λ -DNA), 用 PBS 稀释到 150 μL 后冲入玻璃微槽中, 放置 30 min 后拿到显微镜上面观察. 此时, 玻璃微槽中 DNA 如图 1 所示, 磁球与侧壁之间的距离为 DNA 的长度. 将不同浓度的 avidin 溶液注入已确定好的单根 DNA 分子连接的微槽中, 培育 30 min 后, 通过改变磁力来观察 DNA 的长度变化.

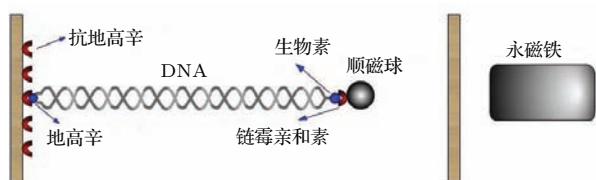


图 1 单分子磁镊实验中侧壁-DNA-磁球体系结构图
Fig. 1. The sidewall-DNA-sphere system in single molecule MT experiment.

实验中采用 CCD 来观察和记录磁球的运动, 通过实时分析软件来分析数据. 磁球在溶液中做布朗运动, 其横向位移 Δx 与磁力 F 的关系为

$$F = k_B T \langle L \rangle / \langle (\delta x)^2 \rangle, \quad (3)$$

k_B 为玻尔兹曼常数, T 为开氏温度, $\langle L \rangle$ 为 DNA 分子的平均长度, $\langle (\delta x)^2 \rangle$ 为磁球 x 方向的位移方差.

3 结果与讨论

3.1 Avidin 影响 DNA 构象变化研究

Avidin 影响 DNA 凝聚的构象变化可以通过 AFM 进行研究. 图 2 为不同浓度 avidin 引起 DNA 凝聚的构象变化图. 图 2(a) 中, avidin 的浓度为 0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 此时 avidin 均匀分布在云母片上, 大小均匀, DNA 处于松散状态, DNA 上面结合了很少的蛋白. 图 2(b) 中我们加入 0.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ avidin, 此时能够明显看到 DNA 与 avidin 结合数量的增

加, 且大小不均匀, 说明有蛋白本身的聚集, 且开始出现环状凝聚形态. 当 avidin 的浓度增加到 1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时 (如图 2(c)), DNA 与 avidin 的结合部分出现大量环状凝聚结构. 随着 avidin 浓度进一步增大, AFM 图像中出现大量球状结构, 如图 2(d) 所示, 这也是由于 avidin 自身的聚集所致.

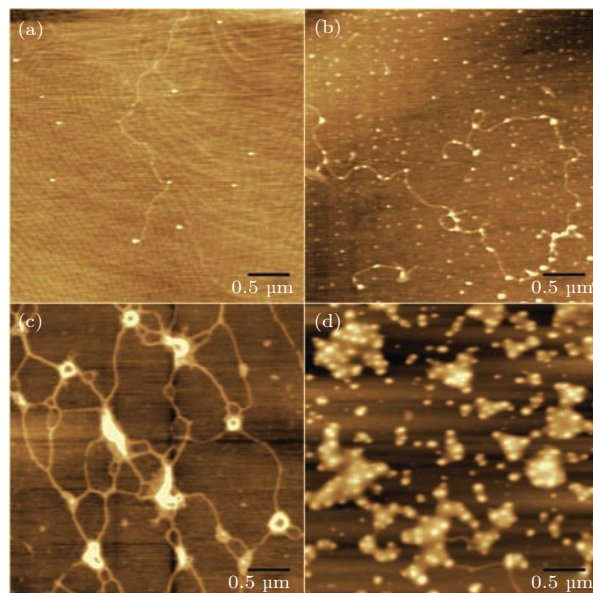


图 2 原子力显微镜下 DNA-avidin 复合体构象图

Fig. 2. The conformation of DNA-avidin complex for AFM.

表 1 不同浓度 avidin 引起 DNA 构象变化的尺寸参数比较
Table 1. The size parameters of DNA conformation changes by different density of avidin.

avidin 浓度 $c/\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	直径 d/nm
0.1	160.58±18.82
0.5	147.57±17.13
1.0	137.27±11.29
2.0	252.98±23.11

为了更好地探究 DNA 凝聚过程的尺寸和形态变化, 我们对 DNA 凝聚的 AFM 图像进行分析. 图 3(a) 所示是 avidin(1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 与 DNA 作用后的典型构象图. 通过 AFM 离线分析软件测量得到的结果如图 3(b) 所示, 环形 DNA 的直径大约为 147.48 nm、外径为 233.24 nm、内径为 87.36 nm. 通过这样的方法, 我们选取 20 个左右的环状结构得到图 2 中各个浓度下 DNA 的尺寸数据 (见表 1). 通过图表, 我们可以看到随着 avidin 浓度的增大, DNA 的直径从 160.58 nm 缩小到 137.27 nm 左右, 说明 DNA 发生凝聚; 当 avidin 的浓度增大到 2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, DNA 的直径突然增大到 252.98 nm 左右, 这主

要是avidin自身的聚集引起的凝聚现象. 图4是 $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ avidin下DNA的凝聚尺寸统计分析图, 其峰值在138 nm左右.

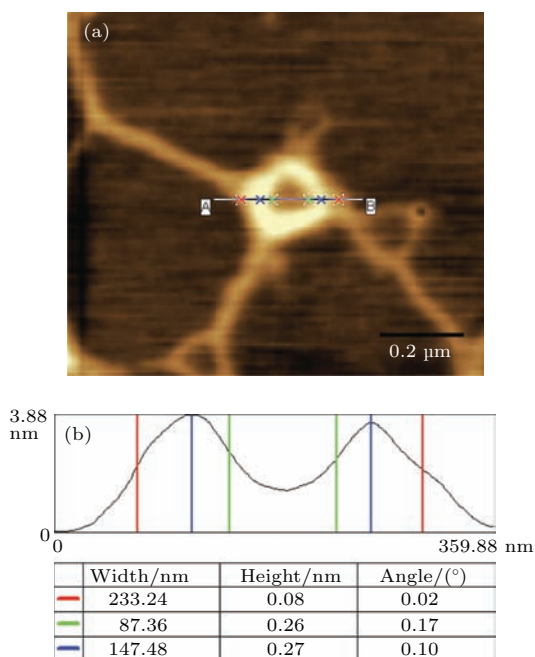


图3 (网刊彩色) AFM下环形DNA构象的横断面图
Fig. 3. (color online) Cross-sectional profile of toroid DNA conformation for AFM.

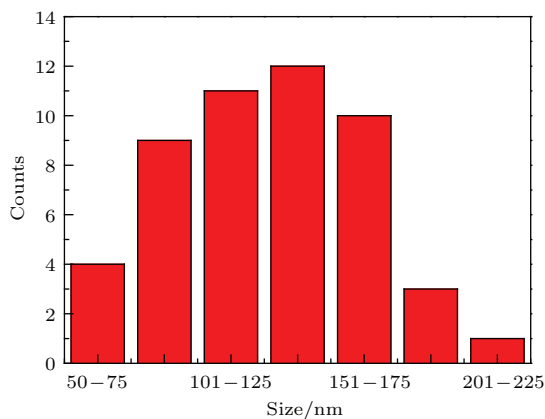


图4 环形DNA的尺寸分布图
Fig. 4. The size distribution of toroids DNA.

3.2 DNA流体力学半径及电泳迁移率测量

通过原子力显微镜对DNA尺寸的统计, 我们发现DNA直径随着avidin浓度的增大而减小, 而当avidin浓度继续增大, DNA的直径会明显变大. 接着我们利用DLS技术测量在不同avidin浓度下DNA分子的流体力学半径和电泳迁移率的变化

趋势, 完成定性研究. 实验结果如图5所示, 在缓冲液中DNA分子呈自由舒展的状态, 其流体力学半径约为170 nm左右, 随着avidin浓度的增大, DNA的流体力学半径逐渐减小. 当avidin的浓度 $c \geq 3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, DNA的流体力学半径趋近于一个稳定值, 约为125 nm. 这个结果与已有的文献结果相一致 [23], 表明了avidin使DNA发生凝聚, 导致DNA的尺寸减小. 而当浓度继续加大时, 发现DNA的流体力学半径突然增大至几百个纳米甚至上千纳米, 这与AFM中DNA尺寸变化的结果相一致, 主要原因是在高浓度下avidin发生聚集导致DNA粒径变大.

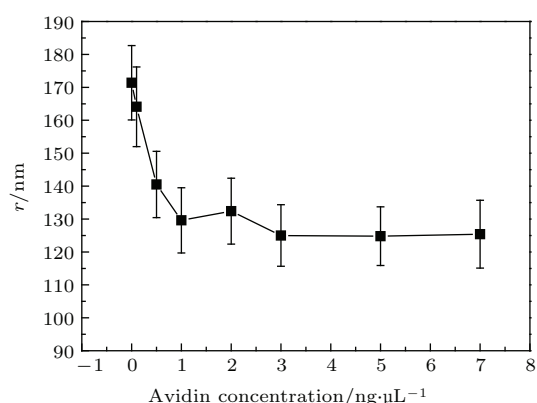


图5 DNA的流体力学半径随avidin浓度的变化
Fig. 5. The hydrodynamic radius of DNA as a function of concentration of avidin.

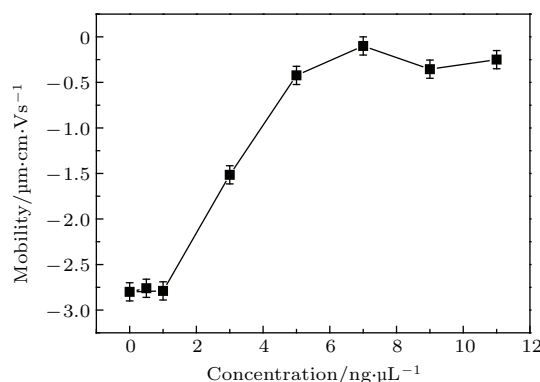


图6 DNA的迁移率随avidin浓度的变化
Fig. 6. Mobility of DNA as a function of concentration of avidin.

图6是DNA电泳迁移率的变化. 加入avidin DNA的电泳迁移率自 $-2.76 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 明显减小并趋近于0; 当avidin浓度达到 $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 后, 电泳迁移率的变化趋于平稳. 由于avidin带有很高的正电荷, avidin与DNA分子结合使得DNA

分子上的磷酸根基团所带的负电荷被中和, 从而导致DNA的电泳迁移率减小. 而DNA上的负电荷被中和后使得磷酸根基团之间的静电排斥力减小, 使DNA分子由原先的自由舒展状态转变为紧凑的结构, 所以使得DNA的流体力学半径减少. 两种实验技术的结果都可以说明avidin能与DNA发生作用.

3.3 DNA凝聚力和长度测量

为了研究avidin是如何使DNA发生凝聚的, 了解具体的凝聚机理, 我们利用单分子MT研究了avidin与DNA之间的相互作用. 在显微镜中找到已经连好的单根DNA分子, 然后把不同浓度的avidin溶液导入玻璃微槽中, 通过一个永久磁铁的伸缩来改变磁力大小, 从而起到拉伸DNA的作用. DNA拉伸的力谱曲线如图7所示, avidin的浓度为 $3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, DNA拉伸曲线几乎呈线性变化, 但偶尔出现跳跃. 图8则显示了avidin的浓度为 $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时的DNA拉伸曲线, 拉伸曲线与图7基本一致, 这在其他大小的磁力和avidin浓度下也同样可以观察到. 从图9中DNA的收缩曲线可以看出, avidin-DNA混合物的缩短曲线和组蛋白-DNA混合物的缩短曲线类似, 也存在着几个缩短速率不同状态. 与多价离子相比较^[26], avidin导致的DNA凝聚的力谱曲线的跳跃步距少且小得多, 它的力谱曲线与组蛋白导致的DNA凝聚^[27]的力谱曲线相类似^[28].

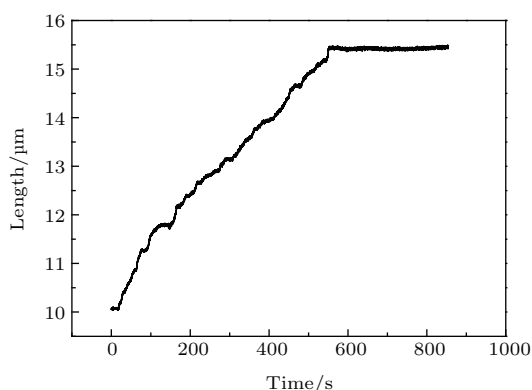


图7 DNA的凝聚形态拉伸曲线, avidin的浓度为 $0.3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
Fig. 7. DNA condensation form tensile curve, the concentration of avidin is $0.3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

通过单分子磁镊技术, 发现avidin与其他多价离子相比, 长度的变化曲线几乎呈线性变化, 偶尔存在少而小的阶跃, 这种变化趋势与组蛋白的变

化曲线更相似. 因此, 可以推测, avidin导致DNA凝聚的过程中存在多种结构, 最终结构主要是环状结构及avidin聚集引起的球状结构, 这和先前的AFM构象图相符合, 球状结构的拉开可能主要对应着MT拉伸曲线的连续变化, 环状结构的拉开对应着MT曲线中的跳跃变化. 而凝聚构象的形成主要包括avidin与DNA的静电吸引和avidin自身聚集的过程. 此外在不同浓度的avidin存在下, 对DNA拉开同样长度所需要的时间不同, 图7中的DNA拉伸 $5 \mu\text{m}$ 所用时间约为600 s, 而图8约为1300 s, 这说明avidin浓度越大DNA凝聚越强, 拉开DNA所用的时间越长. 为了进一步定量研究avidin导致DNA凝聚的结构特性, 我们对拉伸曲线的跳跃步距进行统计, 如图10所示, 发现统计数

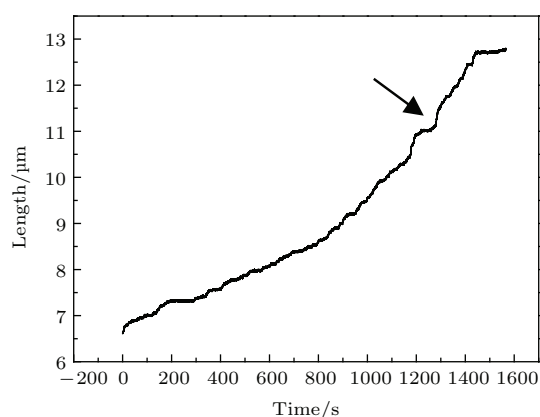


图8 DNA的凝聚形态拉伸曲线, avidin的浓度为 $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
Fig. 8. DNA condensation form tensile curve, the concentration of avidin is $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

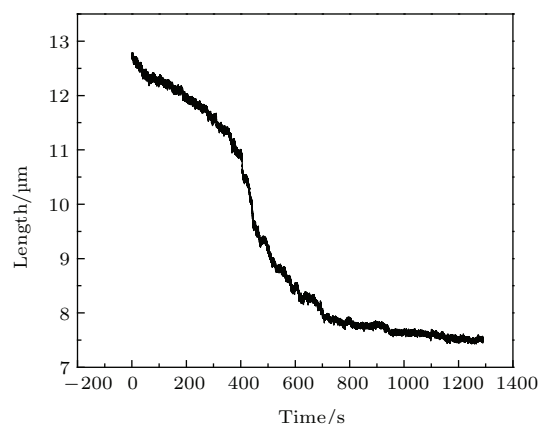


图9 DNA的长度随时间的变化, 此时avidin的浓度为 $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
Fig. 9. The length of DNA as a function of time, the concentration of avidin is $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

据的峰值在 160 nm 左右, 这与典型的环状数据基本一致. 统计中也有小的步距, 可能是环状结构没有完全拉开导致, 而较大的步距主要因为几个环一起拉开所致.

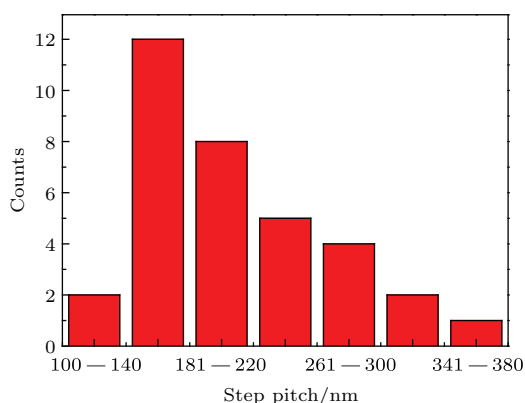


图 10 DNA 拉伸曲线步距分布图

Fig. 10. The step pitch distribution of DNA stretching curves.

4 avidin 导致的 DNA 凝聚模型

结合 AFM 成像和单分子技术两方面的实验结果, 我们提出一个球状-环状凝聚模型 (Globule-Toroid, GT 模型) 来解释 avidin 引起 DNA 凝聚的现象, 如图 11 所示. 由于 DNA 的刚性, avidin 依靠静电相互作用能够与 DNA 结合形成环状结构, 如图 11 (b) 所示, 而 avidin 的浓度很高时, avidin 自身聚集会导致大的球状结构, 如图 11 (c) 所示. 在 AFM 图像 (图 2 (c)) 中, 我们可以明显看到这种球状和环状的混合结构. 在磁镊力谱曲线中, 长度的连续变化对应于球状凝聚的形成或解开, 而长度曲线的阶跃对应于环状结构的形成或解开.

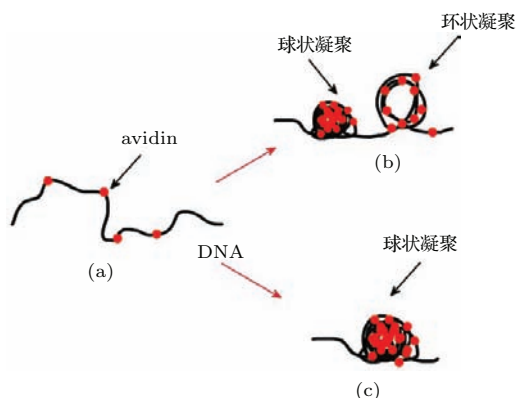


图 11 (网刊彩色) DNA 凝聚的 GT 模型

Fig. 11. (color online) The GT model of DNA condensation.

5 结 论

本文系统研究了 avidin 与 DNA 间的相互作用. 通过原子力显微镜观察 avidin 引起 DNA 构象的变化. 发现 avidin 引起 DNA 凝聚结构主要有环状结构及聚集导致的球状结构. 动态光散射的实验结果也表明 avidin 浓度的增大使 DNA 的流体力学半径及电泳迁移率逐渐减小并趋近于一个稳定值. 主要原因是 avidin 的静电作用使 DNA 双螺旋结构上的磷酸根基团的电荷被中和, 从而导致 DNA 发生凝聚. 通过单分子磁镊技术探究 avidin 导致 DNA 凝聚的具体机理, 发现其长度变化曲线包括线性的变化和很少的跳跃变化, 表明 avidin 导致 DNA 凝聚的最终结构主要由静电相互作用及蛋白质的自身聚集所引起.

参考文献

- [1] Schiessel H 2003 *J. Phys.: Condens. Matter* **15** R699
- [2] Kubíčková A, Kř'ížek T, Coufal P, Vazdar M, Wernersson E, Heyda J, Jungwirth P 2012 *Phys. Rev. Lett.* **108** 186101
- [3] Cortini R, Caré B R, Victor J M, Barbi M 2015 *J. Chem. Phys.* **142** 105102
- [4] Yoo J, Aksimentiev A 2016 *Nucleic Acids Res.* **44** 2036
- [5] Bloomfield V A 1997 *Biopolymers* **44** 269
- [6] Mohanty U, Ninham B W, Oppenheim I 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** 4342
- [7] Akinchina A, Linse P 2002 *Macromolecules* **35** 5183
- [8] Manning G S 1978 *Q. Rev. Biophys.* **11** 179
- [9] Besteman K, Van E K, Lemay S 2007 *Nat. Phys.* **3** 641
- [10] Grosberg A Y, Nguyen T T, Shklovskii B I 2002 *Rev. Mod. Phys.* **74** 329
- [11] Besteman K, Hage S, Dekker N H, Lemay S G 2007 *Phys. Rev. Lett.* **98** 058103
- [12] Lin Y, Yang G C, Wang Y W 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 118702 (in Chinese) [林瑜, 杨光参, 王艳伟 2013 物理学报 **62** 118702]
- [13] Murayama Y, Wada H, Sano M 2007 *Europhys. Lett.* **79** 58001
- [14] Zhang X H, Xiao B, Hou X M, Xu C H, Wang P Y, Li M 2009 *Acta Phys. Sin.* **58** 4301 (in Chinese) [张兴华, 肖彬, 侯锡苗, 徐春华, 王鹏业, 李明 2009 物理学报 **58** 4301]
- [15] Hou X M, Zhang X H, Wei K J, Ji C, Dou S X, Wang W C, Li M, Wang P Y 2010 *Physics* **39** 108 (in Chinese) [侯锡苗, 张兴华, 魏孔吉, 季超, 窦硕星, 王渭池, 李明, 王鹏业 2010 物理 **39** 108]
- [16] Wang Y W, Ran S Y, Man B Y, Yang G C 2011 *Soft Matte* **7** 4425
- [17] Qiu S X, Wang Y W, Cao B Z, Guo Z L, Chen Y, Yang G C 2015 *Soft Matter* **11** 4099

- [18] Fraenkel-Conrat H, Snell N S, Ducau E D 1952 *Arch. Biochem. Biophys.* **39** 80
- [19] Pignatto M, Realdon N, Morpurgo M 2010 *Bioconjugate Chem.* **21** 1254
- [20] Morpurgo M, Facchin S, Pignatto M, Silvestri D, Casarin E, Realdon N 2012 *Anal. Chem.* **84** 3433
- [21] Bigini P, Previdi S, Casarin E, Silvestri D, Violatto M B, Facchin S, Sitia L, Rosato A, Zuccolotto G, Realdon N, Fiordaliso F, Salmona M, Morpurgo M 2013 *ACS Nano.* **8** 175
- [22] Buda A, Facchin S, Dassie E, Casarin E, Jepson M A, Neumann H, Hatem G, Realdon S, D'Inca R, Sturniolo G C, Morpurgo M 2015 *Int. J. Nanomed.* **10** 399
- [23] Morpurgo M, Radu A, Bayer E A, Wilchek M 2004 *J. Mol. Recognit.* **17** 558
- [24] Pastré D, Hamon L, Sorel I, Cam L E, Curmi P A, Piétrement O 2010 *Langmuir* **26** 2618
- [25] Wang Y W, Ran S Y, Yang G C 2014 *Sci. Rep.* **4** 15040
- [26] Fu W B, Wang X L, Zhang X H, Ran S Y, Yan J, Li M 2006 *J. Am. Chem. Soc.* **128** 15040
- [27] Liu Y Y, Dou S X, Wang P Y, Xie P, Wang W C 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 622 (in Chinese) [刘玉颖, 窦硕星, 王鹏业, 谢平, 王渭池 2005 物理学报 **54** 622]
- [28] Ran S Y, Wang X L, Fu W B, Lai Z H, Wang W C, Liu X Q, Mai Z H, Li M 2006 *Chin. Phys. Lett.* **23** 504

Single molecular study on interactions between avidin and DNA*

Cao Bo-Zhi Lin Yu Wang Yan-Wei Yang Guang-Can[†]

(School of Physics and Electronic Information, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

(Received 23 February 2016; revised manuscript received 3 April 2016)

Abstract

Avidin is a common basic protein, widely used for connecting DNA and modified surface in single-molecule techniques of biophysics, and it can also be used as a DNA vector in gene therapy. Avidin is highly positively charged and can condense DNA in solution. Understanding the physical mechanism of its condensing DNA is a key factor to promote avidin-DNA complex to be used for many purposes, such as a probe of biomacromolecules, signal enhancer or carrier of disease diagnosis.

In the present study, we use atomic force microscope (AFM), dynamic light scattering (DLS), and single molecular magnetic tweezers (MT) to systematically investigate the interaction between DNA and avidin and the underlying mechanism of DNA condensation by avidin. The conformation of DNA-avidin complex is observed and measured by AFM and we find that the condensation includes two types: one is toroidal condensation of DNA induced by avidin, the other is the condensing structure by avidin compaction. Quantitative analysis shows that the size of avidin-DNA complex decreases monotonically with the concentration of avidin increasing. However, when the concentration of avidin reaches up to a critical value of $2 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, the size of complex begins to increase suddenly with avidin concentration increasing. The phenomenon is also confirmed by the corresponding DLS measurements. For example, when the concentration of avidin increases from 0 to $2 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, the size of condensed avidin-DNA complex reduces from 170 nm to about 125 nm. In the mean while, its electrophoretic mobility changes from $-2.76 (10^{-4} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$ to $-0.1 (10^{-4} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$. The negative charge of DNA is mostly neutralized by avidin. From their force spectroscopy measured by MT, it is found that the extension of DNA varies almost linearly and a few stairlike jumps appear occasionally. For example, its characteristic trend is quite similar to the one by histones. The condensing force of DNA by avidin grows up with the concentration of avidin increasing. The statistics of force-extension curves by MT shows that the peak of unraveling steps of avidin-DNA complex is around 160 nm, which corresponds to the typical toroidal structure of DNA.

In DNA condensation by avidin, electrostatic interaction plays a key role due to the neutralization of negatively charged phosphate groups of DNA by cationic avidin. From the comprehensive data by AFM, DLS and MT, we conclude that the process of DNA condensation induced by avidin consists of two mechanisms: the predominant DNA-avidin electrostatic attraction and the ancillary avidin aggregation.

Keywords: DNA condensation, avidin, magnetic tweezers, atomic force microscope

PACS: 07.79.Lh

DOI: 10.7498/aps.65.140701

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11274245, 11574232), the Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11304232), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (Grant No. LY14F050008), and the Innovation Fund of Wenzhou University, China (Grant No. 3162014036).

[†] Corresponding author. E-mail: yanggc@wzu.edu.cn