

磁镊结合 DNA 发夹的方法在 RecA 蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用

张宇微 颜燕 农大官 徐春华 李明

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination

Zhang Yu-Wei Yan Yan Nong Da-Guan Xu Chun-Hua Li Ming

引用信息 Citation: [Acta Physica Sinica](#), 65, 218702 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.218702

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.218702>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I21>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

软物质实验方法前沿: 单分子操控技术

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation

物理学报.2016, 65(18): 188706 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188706>

全内反射瞬逝场照明高精度磁镊及其在 DNA 解旋酶研究中的应用

A pair of high resolution magnetic tweezers with illumination of total reflection evanescent field and its application in the study of DNA helicases

物理学报.2013, 62(16): 168703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.168703>

抗生物素蛋白与 DNA 相互作用的单分子研究

Single molecular study on interactions between avidin and DNA

物理学报.2016, 65(14): 140701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.140701>

全内反射瞬逝场照明高精度磁镊及其在 DNA 解旋酶研究中的应用

A pair of high resolution magnetic tweezers with illumination of total reflection evanescent field and its application in the study of DNA helicases

物理学报.2013, 62(16): 168703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.168703>

谐振势阱中的布朗运动 -----磁镊实验与模拟

Brownian motion in a harmonic trap: magnetic tweezers experiment and its simulation

物理学报.2012, 61(17): 170503 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.61.170503>

磁镊结合DNA发夹的方法在RecA蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用*

张宇微¹⁾ 颜燕¹⁾²⁾ 农大官¹⁾ 徐春华¹⁾ 李明^{1)†}

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家实验室, 软物质物理重点实验室, 北京 100090)

2) (Department of Physics, Emory University, Atlanta GA 30322, USA)

(2016年7月22日收到; 2016年8月12日收到修改稿)

同源序列识别与链交换过程是同源重组领域的重要研究方向. RecA蛋白作为重组酶家族的重要成员而一直被广泛研究. 利用smFRET以及传统磁镊、光镊等技术, 人们对同源重组过程的分子机制有了较深入的了解, 然而, 这些技术无法同时兼顾大量程与高精度的需求. 本文提出一种传统磁镊结合DNA发夹结构的研究方案, 并以大肠杆菌中的RecA介导的同源重组过程为例来阐述该方法的优点. 使用本实验方案, 我们实时观察到以下过程: 1) RecA介导的链交换平均速度与已有结果一致, 但并非匀速, 而是以台阶式的跳变进行; 2) 直接观察到RecA第二结合位点与被置换链的动态相互作用过程, 测量到第二结合位点与被置换链之间的结合力为3.0 pN, 与光镊结合磁镊测量出的结果相符; 3) 能够区分链交换的方向性并观察到按照不同方向进行链交换的反应细节. 本文提供了一个可以兼顾精度和测量范围的实验方法, 并以RecA蛋白为例设计实验验证了其可靠性. 磁镊结合DNA发夹结构的方法具备用于研究RecA或其他同源重组蛋白工作机理的潜质. 因此, 本文的工作有望成为单分子生物学领域研究同源重组过程的一个重要方法.

关键词: 同源重组, RecA, 磁镊, DNA发夹

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs, 87.50.wf, 87.15.H-

DOI: 10.7498/aps.65.218702

1 引言

同源重组过程在DNA损伤修复及产生遗传多样性等方面具有重要意义, 是生命得以进化的一个重要生理条件. 受化学刺激或紫外照射等影响, 生物体细胞内DNA断裂损伤的情况时有发生, 最严重情况下会发生DNA双链断裂, 这不仅会导致遗传信息缺失, 也会直接导致细胞凋亡. 对DNA损伤进行修复的重要途径之一就是同源重组^[1]. 以大肠杆菌中的重组酶RecA介导的同源重组为例, 在双链断裂后, RecBCD会在双链断裂的缺口处解开一段序列产生3'端突出的单链末端, 单链结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)紧

接着缠绕到单链区域对单链DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 进行保护^[2,3]. 在同源重组发生前, RecA蛋白会替换掉SSB, 以每个蛋白结合3个核苷酸的形式结合在ssDNA上形成核蛋白丝^[4-6]; 接着, 核蛋白丝会在目标双链DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 上寻找同源序列, 在同源双链区通过碱基交换来进行同源链之间的交换, 并形成一段三链复合体^[7,8]; 最后, 随着链交换的完成, 由RuvABC剪开三链的交叉, 完成对DNA的修复^[2]. 除了修复DNA损伤, 同源重组还是产生遗传多样性的重要途径, 其发生的频率要远高于基因突变. 因为突变对生命体产生的影响在多数情况下是不利的, 如果只有突变没有重组, 将很难实现对有利遗传信息的积累. 在进化史上, 生命与所处环境的

* 国家自然科学基金 (批准号: 11574381, 11574382) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: mingli@iphy.ac.cn

相互作用一直在促使双方产生变化, 同源重组过程产生的遗传多样性使生命体得以不断适应多变的环境, 在生物进化上具有深远意义.

RecA 作为同源重组过程的关键蛋白, 一直是单分子生物学领域的一个研究热点^[9–12]. van der Heijden 等^[13]利用旋转磁镊方法, 将 DNA 双链扭转成超螺旋状态后加入核蛋白丝的方法研究同源交换链的扩展过程, 测量到在不同温度范围下, 核蛋白丝在 DNA 双链上链交换的速率为 2–6 nt/s. de Vlaminck 等^[14]利用光镊与磁镊结合的方法, 测量到 RecA 第二个结合位点 (second DNA-binding site, SBS) 与单链之间的结合力约为 2.9 pN; Ragunathan 等^[7]用 smFRET 技术, 通过在双链及核蛋白丝上标记荧光分子, 发现了核蛋白丝与目标 DNA 初始结合进行同源比对时, 要求存在一个 < 14 bp 的同源序列. Lee 等^[9]利用分子梳技术, 通过研究核蛋白丝与互补链之间的解离时间常数发现同源重组在扩展过程中存在一个最小的能量单元, 核蛋白丝与互补链每结合 3 nt 降低的自由能 $\sim 0.28k_B T$. 基于以上方法, 对同源重组的动力学过程的认识更加深入. 然而, smFRET 技术只能有效测量 3–8 nm 范围的变化^[15], 而传统磁镊及旋转磁镊的方法又不能满足同源重组过程纳米级的分辨率需求. 在细胞内, 同源重组过程需要识别的序列长度常常达到数百个碱基对, 因此, 对同源重组进行深入研究, 进一步在分子生物学层面观测其反应过程的细节需要新的研究方法来同时满足大测量范围及高分辨率的要求.

近年来, 越来越多国内学者关注单分子生物技术领域, 相关方法和技术也不断地被创新应用于研究各种生化过程. Xu 等^[16]利用磁镊技术研究 DNA 的性质发现了 pH 值和拉力同时对 i-motif DNA 结构的稳定性产生影响, 该实验结果为研究基于 i-motif DNA 的纳米器件的设计提供了重要依据; Zhu 和 Li^[17]利用光镊实现对 DNA 分子的操作, 提出一种新的方法, 可以直观、简便地测量光镊的势阱深度, 并且获得了纳米级的分辨率, 其 DNA 拉伸试验结果与理论值符合得很好; 王爽等^[18]将磁镊与全内反射瞬逝场照明技术结合, 通过将磁球、手柄、荧光球、待测生物分子按顺序连接来提高测量精度; 实验使用荧光球作为定位探针, 将待测分子和探针置于瞬逝场中, 通过记录荧光球在瞬逝场中的亮度变化来测量待测分子的形变, 大幅度降

低了布朗运动噪音, 将传统磁镊在较小拉力条件下的分辨率提高到了 3.2 nm 的水平. 本文利用传统磁镊结合 DNA 发夹结构的方法, 将 ATP γ S, RecA 与一段 90 nt 的单链 DNA 在 37 °C 下孵育得到核蛋白丝, 核蛋白丝作为入侵链会与发夹结构岔口处长 90 bp 的同源区域发生同源重组链交换反应. 而后, 被置换链结合在 RecA 的第二结合位点, 形成三链结构, 施加一定的拉力可以将被置换链从该位点上拉开, 引起 DNA 轮廓长度的变化. 按照 ssDNA 自由连接链模型 (free join chain, FJC)^[19], 在 7 pN 拉力下, 核蛋白丝与同源双链每进行 1 nt 链交换反应产生可观测的长度变化约为 0.82 nm. 对同一反应过程, 传统磁镊研究方法所产生的 DNA 轮廓长度变化仅为 0.17 nm, 不足本方法的 1/4. 因此, 本方法可以在兼顾大测量范围的基础上获得更高的碱基分辨率. 该方法对链交换速率、SBS 和 ssDNA 之间结合力的测定结果均与文献^[13, 14]结果相符, 证明了该方法的可靠性. 此外, 还可以根据反应曲线判断链交换的方向性并实时观测不同反应方向的链交换模式, 为全面研究同源重组的分子机制提供了一个潜在的优选方案.

2 实验原理与方法

2.1 实验原理

RecA 是大肠杆菌同源重组过程的一个核心蛋白, 分子量为 38 kD. 同源重组过程中, RecA 蛋白结合在 ssDNA 上形成右手螺旋结构的核蛋白丝, 螺距为 9.6 nm, 每个螺旋内包含约 6 个 RecA 蛋白单体^[4–6,20]. 然而, 自然状态下, dsDNA 双螺旋的螺距为 3.4 nm. 因此, 核蛋白丝与目标 dsDNA 进行序列比对前, 需要将 dsDNA 拉长至自身的 1.5 倍才能进行相应位置的序列比对^[6]. 通过 dsDNA 反应前后的长度变化可以研究同源重组的动力学过程. 被拉长后, 1 bp 的 dsDNA 长度变化量平均为 $0.34 \times (1.5 - 1) = 0.17$ nm, 传统磁镊直接测量 dsDNA 长度变化受分辨率限制, 无法观察到如此微小的变化. 为了更好地观测反应细节, 我们设计了一种磁镊结合 DNA 发夹结构的实验方案. 如图 1(a) 所示, 通过手柄将带有 270 bp 发夹结构的 DNA 分子连接在样品池表面与一个直径 2.8 μ m 的超顺磁小球之间, 通过调节磁铁与样品池的距离可以改变施加在磁球上的拉力. 核蛋白丝与 dsDNA

结合前, 决定发夹结构从折叠态转变成去折叠态的临界力为双链碱基之间氢键的结合力, 一般为 10—15 pN^[21,22]. 以图 1(a) 所示的 5' 到 3' 换链方向为例, 加入 90 nt 的核蛋白丝 (蓝色) 后, 核蛋白丝通过同源识别与双链上的同源区的互补链 (紫色) 配对, 而原本与互补链配对的被置换链 (绿色) 则结合在 RecA 蛋白的 SBS 上, 在拉力的作用下被置换链会被从 SBS 上拉开. 随着反应的进行, DNA 轮廓长度表现为逐渐伸长, 形成上端为单链 DNA、下端为与 RecA 蛋白结合的双链 DNA 两部分. 根据图 1(b) 中的 ssDNA 拉伸曲线, 每个核苷酸在 7 pN 拉力下的平均长度为 0.31 nm, 而在核蛋白丝中的

平均长度则为 0.51 nm. 因此, 链交换引起 1 bp 的 dsDNA 长度变化平均为 $0.31 + 0.51 = 0.82$ nm. 同样的反应过程可观测的长度变化量为传统磁镊的近 5 倍, 大大提高了对反应细节的实时获取能力. 根据 van der Heijden 研究组^[13]利用旋转磁镊结合 10 kb 长 DNA 的研究方法给出的结果, 核蛋白丝与 dsDNA 相结合后, 链交换反应按一定速率匀速进行, 在不同反应温度下其反应速率为 2—6 bp/s. 因此, 在以 100 Hz 进行采样时, 我们预期会看到如图 1(c) 所示的反应曲线, 核蛋白丝与同源双链完全反应后, DNA 分子轮廓长度变化的理论值为 73.8 nm.

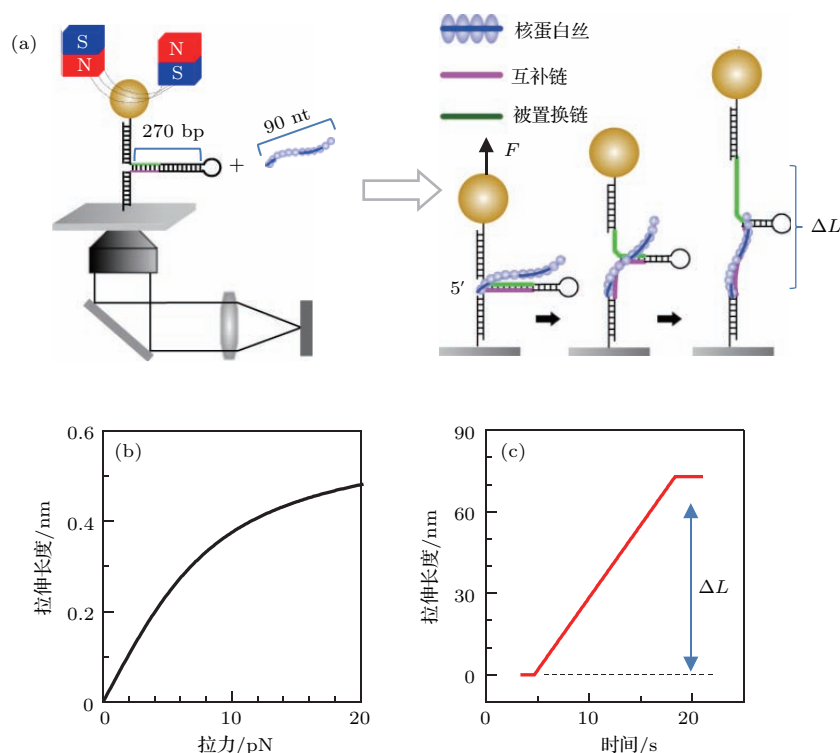


图1 (网刊彩色) (a) 实验设计示意图; (b) ssDNA 理论拉伸曲线 (FJC); (c) 90 nt 核蛋白丝以 6 nt/s 的链交换速度进行反应的理论曲线

Fig. 1. (color online) Experimental approach: (a) Scheme of the experimental approach; (b) theoretical force-extension curve of ssDNA (FJC); (c) anticipated time-extension curve of strand-exchange proceeding at 6 nt/s.

2.2 实验方法

2.2.1 带发夹结构DNA分子的制备与连接

DNA分子的制备: 实验所用带 270 bp 发夹结构的 DNA 分子是用购自生工生物工程 (上海) 的 ssDNA 自己合成, 各寡聚核苷酸的序列均列于表 1 中. 首先将 H1, H2, Stem1 和 Stem2 等比例混合, 于 95 °C 孵育 10 min, 缓慢退火至室温形成三

叉结构. 随后发夹部分由一段长 190 bp 的 dsDNA 进行延长, 并由 Seal1 和 Seal2 两条链进行封口, 用 T4 DNA 连接酶进行各部分连接形成长 270 bp 的 DNA 发夹结构. 手柄部分由长 750 bp 的 dsDNA 通过 T4 DNA 连接酶连结所得^[18].

DNA 分子的连接: 2 μ L DNA 分子 (50 pM) 与 10 μ L 直径为 2.8 μ m 的磁球 (10 mg/mL) 缓慢混合 10 min, DNA 分子手柄一端标记的生物素 (bi-

otin), 通过 biotin-streptavidin 相互作用与磁球相连. 随后, 在磁球和 DNA 中加入 60 μL 的 PBS 缓冲液进行稀释, 使用流体泵将稀释后的混合液抽入样品池, DNA 分子另一端标记地高辛 (digoxigenin,

DIG), 通过 DIG-antiDIG 相互作用与样品池表面相连. 连接结束后, 用 PBS 缓冲液将未连接的磁球和 DNA 分子冲洗干净, 通过用磁镊打开发夹结构来检验 DNA 分子的连接效果.

表 1 构建带 270 bp 发夹结构的 DNA 分子所需要的各寡聚核苷酸的序列
Table 1. The sequences of oligonucleotides for the construction of DNA molecule with a 270-bp hairpin.

名称	DNA 序列 (5' $\rightarrow$ 3')
H1	PHO/ CTA GCG GTG TGC AGA CAC AAC AGG CAG TCG TGG GGT AGA GTT TCA CCA A
H2	PHO/ GTG CTT GGT GAA ACT CTA CCC CAC GAC TGC CTG TTC AGC CAG CGT AGC CGT AC
Stem1	TGT GTC TGC ACA CCG CTA GAG CC
Stem2	PHO/ TCG GGT ACG GCT ACG CTG GCT GA
Seal1	PHO/ GGG AGC ACT ACG TTC GGA CTA GTG TAC TCT GAC TTG AGA CTT TTG TCT CAA GTC
Seal2	PHO/ AGA GTA CAC TAG TCC GAA CGT AGT GCT CCC GGC ACT GCA

2.2.2 制备核蛋白丝

150 nM RecA 蛋白 (New England Biolabs), 5 nM 90 nt 单链 DNA 和 1 mM ATP γ S (Roche Diagnostics) 于 RecA 反应缓冲液中 (70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol (DTT)) 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min. 将制备好的核蛋白丝稀释至 2.5 nM 后, 灌入样品池观察反应.

开, 长度为 238.6 nm, 如图 2(a), 与按照 FJC 模型计算得出的结果一致. 加入核蛋白丝后, 核蛋白丝与 DNA 发夹结构上的同源区发生链交换反应, 导致 DNA 分子长度随着反应进行而增加, 如图 2(b), 增加长度为 74.1 nm, 反应所用时间为 8.4 s. 通过对其他链交换曲线的分析, 得出链交换反应的平均速度约为 7.6 nt/s ($n = 5$), 与文献 [13] 报道的速度无明显差异, 证明了本设计的可行性. 然而, 与图 1(c) 中预期的匀速换链模式不同, 高分辨率的测量结果发现换链过程是分步式跳变来进行的, 如图 2(b), 跳变的步长范围为 6—30 bp. 我们认为产生这一不同的原因是, 在 van der Heijden 等 [13] 的实验中, 使用的是 10 kb 的长 DNA 分子, 系统的测量噪音近 500 nm, 足以覆盖跳变信号, 因而只能观察到匀速换链的现象.

3 结果与讨论

3.1 实时观测 RecA 介导的同源重组链交换过程

为验证目标 DNA 分子的连接效果, 我们将施加在磁球上的拉力从 7 pN 增加到 14 pN, 在拉力为 14 pN 左右时, 270 bp 的 DNA 发夹结构被完全拉

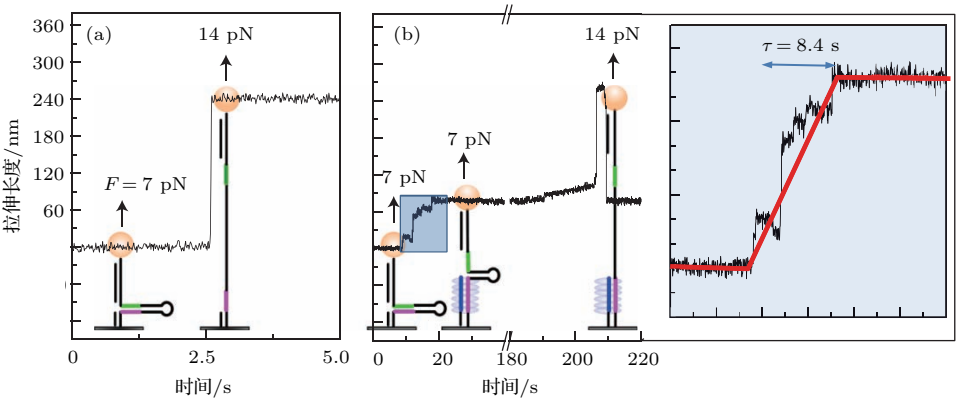


图 2 (网刊彩色) (a) 270 bp 的发夹结构在 14 pN 拉力下被打开; (b) 链交换反应的典型曲线

Fig. 2. (color online) (a) 270 bp hairpin is pulled open by a force of 14 pN; (b) a typical MT trace of strand-exchange.

为了进一步确认反应信号是同源重组链交换产生的, 我们随后将磁力增大, 如图 2(b) 所示, 在 14 pN 左右, DNA 分子轮廓长度发生跳变, 长度为 158.8 nm, 即剩余 180 bp 发夹结构打开所产生的长度变化, 与根据 FJC 模型计算得出的理论长度值 157.2 nm 相符. 通过对反应前后对比分析可知, 加入核蛋白丝后发生的 DNA 分子长度改变是由同源重组链交换引起的. 本实验方案与 van der Heijden 等 [13] 使用的磁镊方法相比具有更高的空间分辨率, 发现了在匀速扩展的趋势下更多的反应细节.

3.2 观察被置换链与 RecA 蛋白第二结合位点的动态相互作用

RecA 蛋白有两个结合位点, 均可以结合 ssDNA [14]. 同源重组过程中, RecA 的第一结合位点 (primary DNA-binding site, PBS) 与 ssDNA 结合形成螺旋结构的核蛋白丝 [23]. 在本实验中, 用 ATP 的类似物 ATP γ S 作为辅助因子来制备核蛋白丝. 由于 ATP γ S 极难水解, 因而当链交换反应发生

后, 从图 3(a) 可以看出, 被置换链不会因为 RecA 蛋白的解离而被释放, 而是结合在 RecA 的第二结合位点上 [14]. 如图 3(b) 所示, 对磁球施加合适的拉力可以观察到被置换链与 RecA 第二结合位点分离再结合的动态过程, 此时的磁力大小正好同被置换链与 SBS 之间的结合力平衡.

为了测量被置换链与第二结合位点的结合力, 需要利用磁球的 x 方向布朗运动强度. 本实验系统中, 连接在样品池表面的 dsDNA 分子与磁球可以看成是在磁力与热涨落共同作用下运动的单摆 [24]:

$$F = \frac{k_B T (L + R)}{\langle \delta x^2 \rangle}, \quad (1)$$

式中, F 为小球受到的磁力大小, $(L + R)$ 为摆长, L 为 dsDNA 实际长度, R 为磁球半径, $\langle \delta x^2 \rangle$ 为磁球在 x 方向布朗运动强度的均方差.

dsDNA 的力拉伸曲线使用自由蠕虫链模型 (worm like chain, WLC) [25]:

$$\frac{Fb}{k_B T} = \frac{L}{L_0} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4(1 - L/L_0)^2}, \quad (2)$$

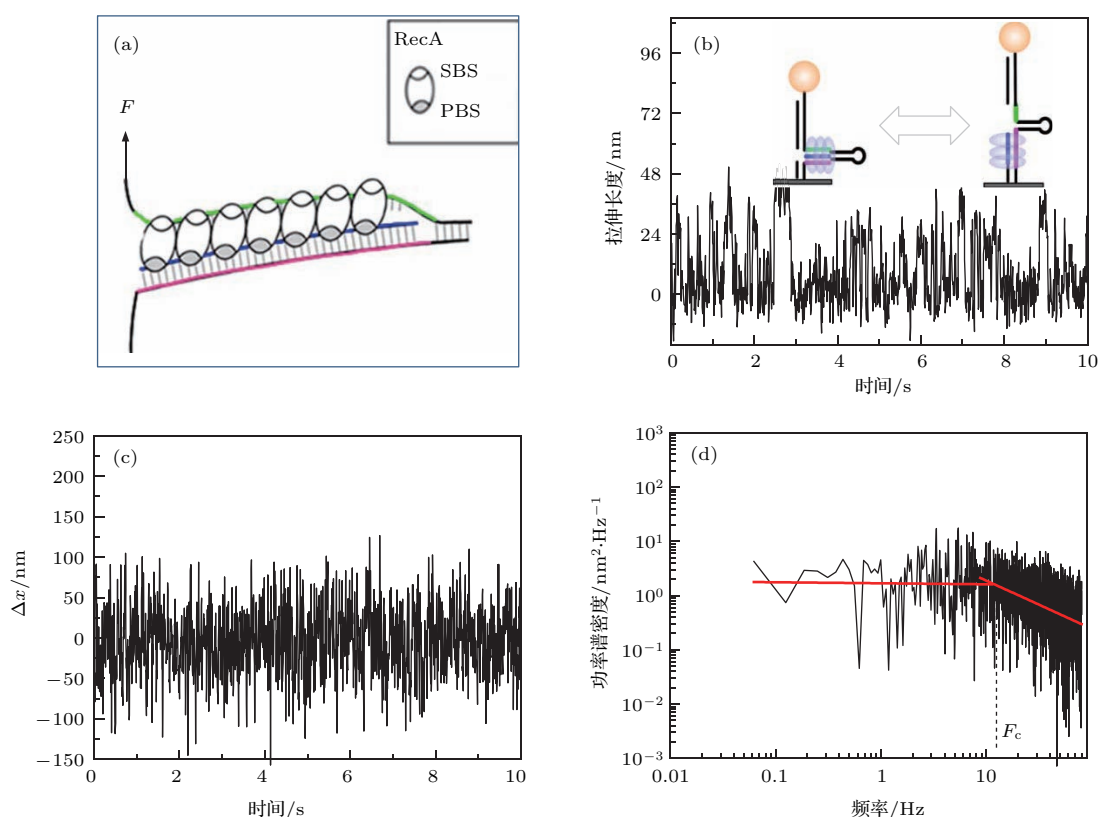


图3 (网刊彩色) (a) 被置换链 (绿色) 与 SBS 结合的示意图; (b) 被置换链与 SBS 间的动态相互作用; (c) 磁球在 x 方向上的布朗运动曲线; (d) 磁球在 x 方向上布朗运动的功率谱

Fig. 3. (color online) (a) Sketch of the displaced strand (green) bound to the SBS; (b) dynamic interaction between the displaced strand and the SBS; (c) the bead excursion in the x dimension in time; (d) the spectra of the x -dimensional fluctuations.

式中, F 为 dsDNA 所受拉力, b 为 dsDNA 的库恩长度约为 50 nm, L 为当前力下 dsDNA 的实际长度, L_0 为 dsDNA 的轮廓长度.

结合上述两个式子, 通过对 $\langle \delta x^2 \rangle$ 的实时测量可以在程序中实现对力的实时测量. 根据采样定理, 对力的测量要求系统的采样率大于系统的固有频率 F_c [24,26], 实验证明在较小的拉力下, 本实验系统的 F_c 约为 20 Hz, 如图 3(d). 本实验使用的图像处理电荷耦合器件为 AVT GE680, 理论全幅采样率可达 200 Hz, 为了降低背景噪音, 我们使用 100 Hz 进行测量, 远大于 smFRET 的采样率 (约 30 Hz), 在提高了时间分辨率的同时, 也保证了对力测量的准确性.

实验测得被置换链与 SBS 之间的结合力均值为 3.0 pN ($n = 5$), 与 de Vlaminck 等 [14] 使用磁镊结合光镊的方法测量的结果一致, 进一步证明了本实验方案的可靠性. 值得注意的是, 本实验方法实现了对 RecA 第二结合位点与被置换链相互作用动态过程的实时观测, 且实验操作也更为简单方便, 为研究 RecA 蛋白第二结合位点的结合特异性及动

力学过程提供了一个简便可行的方案.

3.3 区分同源重组链交换的方向性

用 ATP γ S 作为辅助因子制备的核蛋白丝进行链交换的方向可以按照核蛋白丝中 ssDNA 的 3' 到 5' 方向或者 5' 到 3' 方向来进行 [27–30]. 如图 4(a) 中示意图所示, 当链交换由 5' 向 3' 进行时, 即反应从 DNA 分子的岔口处开始, DNA 分子的长度会随着链交换的进行而逐步增加. 但是, 如果反应从 3' 向 5' 方向进行, 如图 4(b), 核蛋白丝由发夹结构中部入侵, 随着反应进行会形成一个 D-loop 结构, 直到 90 nt 的核蛋白丝全部完成链交换后, DNA 分子长度才会呈现一个 73 nm 左右的跳变式增加. 由这两种不同的反应现象便可以确定链交换的方向性.

按照上述区分方法, 在链交换方向由 3' 端开始的情况下, 换链的具体细节无法观察. 而这一问题可以通过以发夹结构中同源双链的下链, 即图 4(a) 中绿色链为模板设计核蛋白丝中的 ssDNA 序列来解决. 当使用下链作为同源模板时, 链交换方向

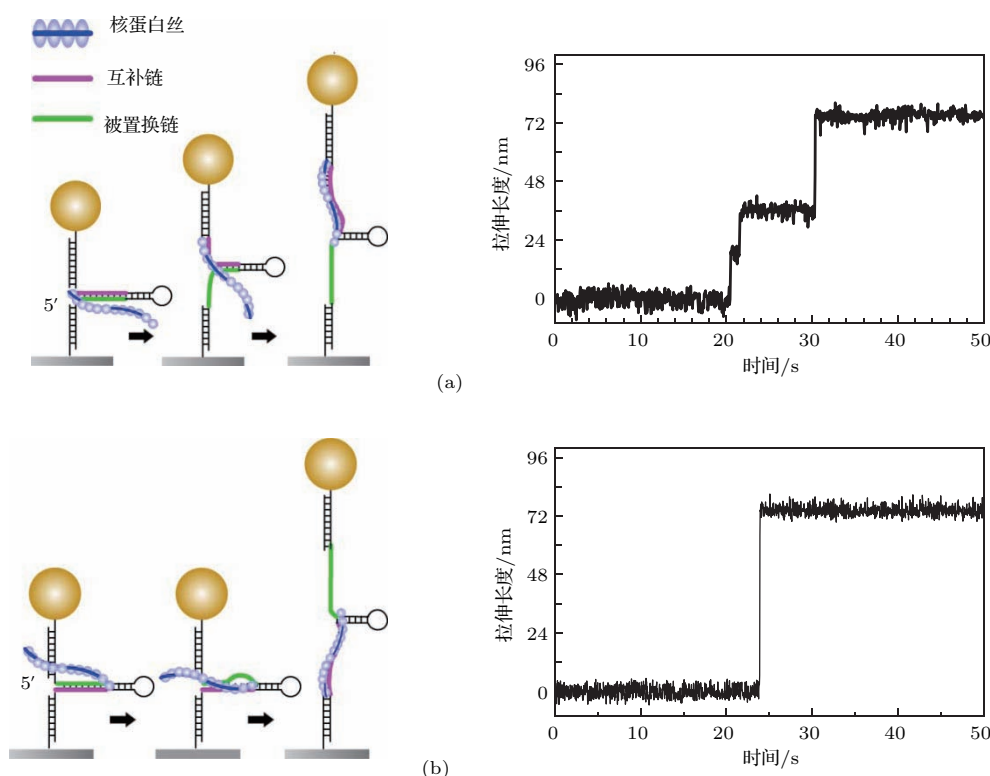


图4 (网刊彩色) 链交换由 3' 向 5' 进行所涉及的两种反应模式 (a) 核蛋白丝由 DNA 分子岔口处插入; (b) 核蛋白丝由 dsDNA 发夹结构中部插入

Fig. 4. (color online) Two different docking modes of strand-exchange proceeding from 3' to 5': (a) Insertion of the filament starts from the junction of the DNA molecule; (b) insertion of the filament starts from the middle of the dsDNA hairpin.

从3'端开始的情况下,反应就可以从发夹结构岔口进行,因此,能够实现实时观察DNA分子轮廓长度随着链交换过程发生变化的目的.相对传统实验方法,本方案通过使用dsDNA同源区的两条链分别作为模板就可以实现对链交换方向性的鉴别以及不同方向的链交换过程反应细节的研究,为与链交换方向性相关的实验提供了一个灵活简易的潜在研究手段.

4 结 论

本文介绍了一种用于研究同源重组过程的改进方案,利用传统磁镊结合DNA发夹结构的方法就可以观测同源重组所涉及的多个过程,不但能完整、实时地记录链交换过程本身,还可观察到被置换链与RecA蛋白第二结合位点的动态相互作用.此外,在满足大观测范围的同时,以较好的空间分辨率(<5 nm)来观察各反应细节.研究表明,链交换的平均速度与文献[13]结果相符,但并非匀速进行,而是以台阶式跳变完成的.随后,我们观察到了RecA蛋白第二结合位点与被置换链的动态相互作用,并准确测量出两者之间的结合力约为3.0 pN.最后,我们通过实验阐明了本方法在研究涉及反应方向性的问题上所具有的优势.

综上,磁镊与DNA发夹结构相结合的方法在兼顾大测量范围的同时保证了较高的精度,为深入研究RecA和其他重组酶所介导的DNA重组机制提供了一个潜在的优选方案.

参考文献

- [1] Lieber M R 2010 *Annu. Rev. Biochem.* **79** 181
- [2] Kowalczykowski S C, Dixon D A, Eggleston A K, Lauder S D, Rehauer W M 1994 *Microbiol. Rev.* **58** 401
- [3] Kowalczykowski S C 2008 *Nature* **453** 463
- [4] Di Capua E, Engel A, Stasiak A, Koller T 1982 *J. Mol. Biol.* **157** 87
- [5] Dombroski D, Scraba D, Bradley R, Morgan A 1983 *Nucleic Acids Res.* **11** 7487
- [6] Chen Z, Yang H, Pavletich N P 2008 *Nature* **453** 489
- [7] Ragunathan K, Joo C, Ha T 2011 *Structure* **19** 1064
- [8] Cox M M 2007 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** 127
- [9] Lee J Y, Terakawa T, Qi Z, Steinfeld J B, Redding S, Kwon Y, Gaines W A, Zhao W, Sung P, Greene E C 2015 *Science* **349** 977
- [10] Danilowicz C, Yang D, Kelley C, Prevost C, Prentiss M 2015 *Nucleic Acids Res.* **43** 6473
- [11] Qi Z, Redding S, Lee J Y, Gibb B, Kwon Y, Niu H, Gaines W A, Sung P, Greene E C 2015 *Cell* **160** 856
- [12] Ragunathan K, Liu C, Ha T 2012 *Elife* **1** e00067
- [13] van der Heijden T, Modesti M, Hage S, Kanaar R, Wyman C, Dekker C 2008 *Mol. Cell* **30** 530
- [14] de Vlaminck I, van Loenhout M T, Zweifel L, den Blanken J, Hooning K, Hage S, Kerssemakers J, Dekker C 2012 *Mol. Cell* **46** 616
- [15] Roy R, Hohng S, Ha T 2008 *Nat. Meth.* **5** 507
- [16] Xu Y, Chen H, Qu Y J, Efremov A K, Li M, Ouyang Z C, Liu D S, Yan J 2014 *Chin. Phys. B* **23** 068702
- [17] Zhu C L, Li J 2015 *Chin. Phys. Lett.* **32** 108702
- [18] Wang S, Zheng H Z, Zhao Z Y, Lu Y, Xu C H 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 168703 (in Chinese) [王爽, 郑海子, 赵振业, 陆越, 徐春华 2013 物理学报 **62** 168703]
- [19] Smith S B, Cui Y, Bustamante C 1996 *Science* **271** 795
- [20] Lantsov V 2006 *Mol. Biol.* **41** 467
- [21] Essevaz-Roulet B, Bockelmann U, Heslot F 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 11935
- [22] Mossa A, Manosas M, Fornis N, Huguette J M, Ritort F 2009 *J. Stat. Mech. Theory E* **2009** 2060
- [23] Mazin A V, Kowalczykowski S C 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** 10673
- [24] Gosse C, Croquette V 2002 *Biophys. J.* **82** 3314
- [25] Bustamante C, Smith S B, Liphardt J, Smith D 2000 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** 279
- [26] Zheng H Z, Nong D G, Li M 2013 *Chin. Phys. Lett.* **30** 118702
- [27] Cox M M, Lehman I 1981 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78** 6018
- [28] Kim J I, Cox M, Inman R 1992 *J. Biol. Chem.* **267** 16438
- [29] Gupta R C, Golub E I, Wold M S, Radding C M 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** 9843
- [30] Lee J, Lee S, Ragunathan K, Joo C, Ha T, Hohng S 2010 *Angew. Chem.* **122** 10118

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination*

Zhang Yu-Wei¹⁾ Yan Yan¹⁾²⁾ Nong Da-Guan¹⁾ Xu Chun-Hua¹⁾ Li Ming^{1)†}

1) (Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

2) (Department of Physics, Emory University, Atlanta GA 30322, USA)

(Received 22 July 2016; revised manuscript received 12 August 2016)

Abstract

Homologous recombination (HR) is essential for maintaining the genome fidelity and generating genetic diversity. As a prototypical member of the recombinases, RecA from *Escherichia coli* has been extensively studied by using single-molecule FRET (smFRET), magnetic tweezers, optical tweezers, etc. However, these methods cannot meet the needs of wide-ranged observations nor high spatial resolution at the same time. For sequence comparison, the average base-to-base distance of the homologous dsDNA will be stretched from 0.34 nm to 0.51 nm. The increment for per base pair is 0.17 nm, which is far beyond the spatial resolution of magnetic tweezers so that it cannot be directly measured. As a high-resolution technique, the smFRET enables us to observe more details of reactions. However, its valid measuring distance is 3–8 nm, which limits the observation range. Here, we propose an approach by combining magnetic tweezers with DNA hairpin, which may solve the problem effectively in the study of HR. In this paper, one end of the DNA molecule with a 270 bp hairpin is immobilized onto the surface of the flow cell, while a magnetic bead is attached to the other end. An external magnetic force is applied to the magnetic bead by placing a permanent magnet above the flow cell. The first 90 bp (from the junction of the hairpin) of the hairpin is homologous to the ssDNA within the ssDNA-RecA filament. Thus, the filament searches for homology along the hairpin, and incorporates into the homologous segment for strand exchange. After that, the displaced strand can be opened by pulling at a force of ~ 7 pN, and each opened base pair results in a 0.82 nm increase in DNA extension. By using this approach, we show that 1) RecA-mediated strand exchange proceeds in a stepwise manner and the average speed is ~ 7.6 nt/s, which is in accordance with previous result; 2) the dynamic interaction between the second DNA-binding site (SBS) and the displaced strand can be observed in real-time, and the binding force is calculated accurately through the x -dimensional fluctuations; 3) the processes of strand-exchange in different directions can be observed, and the directions are distinguishable through the reaction patterns. The results suggest that the combination of magnetic tweezers with DNA hairpin is a potential approach to the study of RecA or other recombinases. Therefore, our design can be an important single-molecule approach to the research of HR mechanism.

Keywords: homologous recombination, RecA, magnetic tweezers, DNA hairpin

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs, 87.50.wf, 87.15.H–

DOI: 10.7498/aps.65.218702

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11574381, 11574382).

† Corresponding author. E-mail: mingli@iphy.ac.cn