

## 荧光标记对 RecA 介导的同源重组链交换的影响\*

王利邦<sup>1)2)</sup> 王浩<sup>1)2)</sup> 李明<sup>1)2)</sup> 陆颖<sup>1)2)</sup> 徐春华<sup>1)†</sup>

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家研究中心, 北京 100190)

2) (中国科学院大学, 北京 100049)

(2025 年 4 月 15 日收到; 2025 年 5 月 22 日收到修改稿)

同源重组是维持基因组稳定和生物多样性的核心机制. RecA 作为最早被发现的同源重组酶, 在同源重组链交换过程中起着关键作用. 关于同源重组机制的研究已持续数十年, 近年来使用单分子技术使得该领域研究取得了不少重大突破. 其中单分子 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 技术的应用最为广泛, 然而 FRET 实验所必需的荧光标记可能会对 RecA 介导的链交换过程产生影响, 且往往会被研究人员所忽视. 本文通过对不同标记位置和标记方式进行梳理, 将荧光标记对同源重组链交换的影响总结为链特异性和构象敏感性, 并给出了影响最小的标记方案. 该结果加深了对荧光标记影响的理解, 研究人员可以快速优化荧光标记位置和方式, 降低其对链交换过程带来的负面影响, 也对其他荧光标记实验有一定的启发意义.

**关键词:** 同源重组, RecA, 单分子 FRET, 荧光标记**PACS:** 87.80.Nj, 87.50.uj, 87.15.kj, 87.14.G–**DOI:** 10.7498/aps.74.20250484**CSTR:** 32037.14.aps.74.20250484

## 1 引言

同源重组 (homologous recombination, HR) 作为遗传信息精确修复与维持生物多样性的核心机制<sup>[1]</sup>, 一直备受关注. RecA 作为最早被发现的同源重组酶, 在原核生物的同源重组过程中起着至关重要的作用. 其分子量只有 38 kDa, 由 383 个氨基酸构成, 在 ATP 或 ATP 类似物环境下会结合 ssDNA (single-stranded DNA). 每个 RecA 会结合 3 个核苷酸形成三联体 (triplet)<sup>[2]</sup>, 并以首尾相连的方式沿 ssDNA 延伸聚合, 形成右手螺旋结构的核蛋白丝<sup>[3-5]</sup>, 并将 ssDNA 拉伸到 B-DNA 长度的 1.5 倍左右, 其中每圈螺旋约 6 个 RecA 单体. ATP 的结合会促进核蛋白丝的形成, 而 ATP 水解之后产生的 ADP 会促进 RecA 的解聚. 为了维持

核蛋白丝的稳定, 方便实验观察, 研究者普遍会选择使用非水解性 ATP 类似物 (如本实验中使用的 ATP $\gamma$ S), 以避免 ADP 的产生<sup>[6]</sup>.

近些年来, 随着结构生物学的发展, RecA 的核蛋白丝静态结构已经取得了大量突破<sup>[5,7-9]</sup>, 但是针对其介导的同源重组链交换的动力学过程研究始终面临着巨大挑战. 一方面是链交换过程涉及纳米级和毫秒级结构变化, 对观测技术的时空分辨率提出双重挑战; 另一方面, 多个重组酶协同作用, 增加了链交换过程的复杂性. 单分子 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 技术兼具高时空分辨率, 与 RecA 链交换过程的动力学研究高度适配<sup>[10,11]</sup>, 这也是近十几年来很多研究者选用单分子 FRET 研究 RecA 蛋白的原因<sup>[12-16]</sup>. 然而, 绝大多数文献都没有关注过荧光标记对链交换过程的影响或者规避了将荧光标记在链中间的问题. 但是

\* 国家自然科学基金 (批准号: 32171228, T2221001, 12434008)、国家重点研发计划 (批准号: 2019YFA0709304)、中国科学院战略性先导科技专项 (批准号: XDB0480000) 和中国科学院稳定支持基础研究领域青年团队项目 (批准号: YSBR-104) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: xch@iphy.ac.cn

对于链交换过程细节的观察必须将荧光标记在链中间, 链末端的标记可能会漏掉某些中间过程. 通过一系列对比实验, 本文不仅发现荧光标记对链交换是有影响的, 还发现这种影响主要体现为两种特点: 链特异性和构象敏感性.

RecA 介导的链交换过程涉及一条 ssDNA 和一条 dsDNA (double-stranded DNA), 共 3 条链, 分别是 I 链 (入侵链)、C 链 (互补链) 和 O 链 (被置换链), 其中 I 链会先与 RecA 结合形成核蛋白丝, 随后核蛋白丝会结合同源模板链 (OC 双链) 进行同源搜索和识别, 最终使 C 链与 I 链配对, O 链被置换 (其过程如图 1(f) 所示). 每条链的功能都不一样, 所以不同链上的荧光标记可能会带来不同的影响. I 链会形成核蛋白丝, 那么 I 链上的标记就有可能影响核蛋白丝的形成, 也可能影响 C 链与之同源识别; 同时, 链交换的过程中, C 链会从与 O 链配对变为与 I 链配对, C 链上的标记可能会影响同源识别; 除此之外, 研究表明 O 链将会与 RecA 的第二结合位点相结合<sup>[2]</sup>, 这使得 O 链上的标记也有可能影响 RecA 核蛋白丝的同源搜索过程. 不同链上的荧光标记带来的不同影响, 本文称之为链特异性.

其次, 链交换过程可能会对荧光标记有构象敏感性. RecA 将 I 链拉伸到 B-DNA 的 1.5 倍长度并不是均匀拉伸的, 而是主要拉伸各 triplet 之间的距离, triplet 内部的 3 个碱基则维持与 B-DNA 类似的长度. 因此, 标记 triplet 边缘的两个碱基与标记 triplet 中间的碱基可能会带来不同影响. 同时,

荧光标记的化学拓扑效应也可能改变 DNA 局部构象, 例如标记在碱基上虽保留配对能力, 但会扭曲双螺旋的扭转角和螺距<sup>[17]</sup>; 标记在磷酸骨架上可以维持 B-DNA 的构象, 但会引入 0.3 pN 左右的局部张力<sup>[18]</sup>. 从根本上来说, 标记方式的不同带来的影响也属于构象敏感性的一部分.

本文发现荧光分子的各种标记位置和标记方法会对 RecA 介导的同源重组带来不同的影响, 通过一系列的实验对比, 巧妙地安排荧光标记的位置和标记方式, 尽量将荧光标记的影响降到最低, 进而剥离出真实的链交换信号来进行分析. 如何才能减小荧光标记带来的影响, 这是单分子 FRET 技术应用于同源重组链交换研究无法回避的问题, 同时也对其他荧光标记实验具有重要启发意义.

## 2 实验材料及设计

### 2.1 实验材料

实验中核蛋白丝的形成过程和链交换过程使用的 RecA buffer 成分为: 70 mmol/L 的 Tris-Ac, pH = 7.4, 100 mmol/L NaAc, 10 mmol/L 的 Mg(Ac)<sub>2</sub>. 实验过程选用的 RecA 蛋白购于 New England Biolabs (NEB) 公司. 葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶购于 Sigma 公司. 葡萄糖以及所有后续实验涉及到的 DNA 均购买自生工生物工程 (上海) 股份有限公司. 以下为 DNA 序列, 所有序列均为从 5' 端到 3' 端.

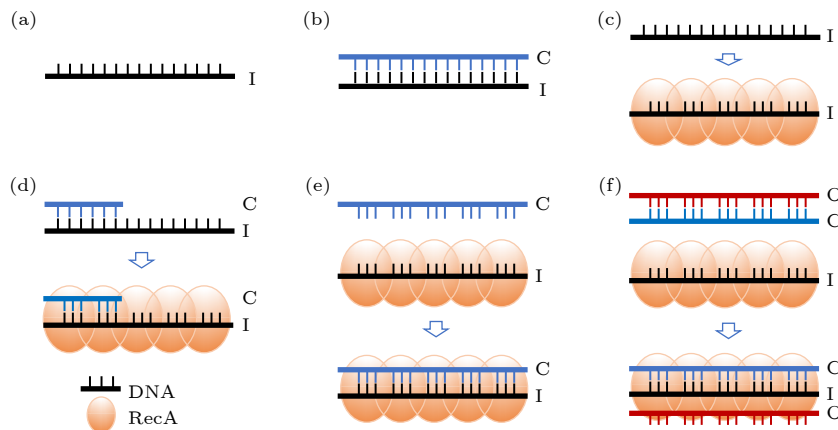


图 1 实验过程示意图 (a) ssDNA; (b) dsDNA; (c) 单链缠绕实验; (d) 双链缠绕实验; (e) 单链入侵实验; (f) 链交换实验; 其中黑色链为 I 链、蓝色链为 C 链、深红色链为 O 链、橙色椭圆为 RecA 蛋白

Fig. 1. Schematic diagram of the experimental process: (a) ssDNA; (b) dsDNA; (c) single strand binding experiment; (d) double strand binding experiment; (e) single strand invasion experiment; (f) strand exchange experiment. The black strand is the I-strand, the blue strand is the C-strand, the red strand is the O-strand, the orange ellipse is the RecA protein.

IC 链标记 I 链序列:

CCTATGCAGGAGGAAGTTGAGTTAGTGT  
CATGGAGTTGGTCG.

IC 链标记 C 链序列:

GGATACGTCCTCCTTCAACTCAATCAC.

CI 链标记 I 链序列:

TGTTACCACTTACCAACTTTCAACTCAAT  
CACACTCCTATGT.

CI 链标记 C 链序列:

ACAATGGTGAATGGTTGAAAGTTGAGT.

CO 链标记 I 链序列 (该实验 C 链与该序列互  
补, O 链与该序列相同):

AAGAATCTCACTCAGTCTCTAGTACAATT  
ACCACTTACCAACTCCTTCAACTCAATCA  
CACTCCTATGTCCAAAGCTGCAGAATCTC  
GTTACTTACAATGGTCAACTC.

OC 链标记 I 链序列 (该实验 C 链与该序列互  
补, O 链与该序列相同):

AAGAATCTCACTCAGTCTCTAGTACAAT  
ACCACTTTCCAACTCCTTCAACTCAATCA  
CACTCCTATGTCCAAAGCTGCAGAATCTC  
GTTACTTACAATGGTCAACTC.

C 链双标记 I 链序列 (该实验 C 链与该序列互  
补, O 链与该序列相同):

AAGAATCTCACTCAGTCTCTAGTACAAT  
ACCACATACCAACTCCTTCAACTCAATCA  
CACTCCTATGTCCAAAGCTGCAGAATCTC  
GTTACTTACAATGGTCAACTC.

在本文后续的所有标记示意图中, 黑色链为 I 链、蓝色链为 C 链、红色链为 O 链, 绿色点为 Cy3 荧光标记, 红色点为 Cy5 荧光标记. 由于本文中所有实验中的 DNA 都是匹配序列, 所以后文中所提到的标记位置为该标记对应到 I 链 3' 端起始第  $N$  个碱基处, 如 C 链 72<sup>nd</sup> 碱基标记代表 C 链上与 I 链 3' 端开始第 72 个碱基互补配对的碱基位置 (若 C 链与 I 链长度相同时, 则等同于 C 链 5' 端起始的第 72 个碱基).

## 2.2 单分子 FRET 玻片预处理

单分子实验要在进行实验之前, 提前修饰盖玻片, 以提供一个可以观察单分子级的 DNA-蛋白质相互作用的环境. 将玻片通过丙酮、甲醇超声清洗后, 用 KOH 溶液完成羟基化, 再用 APTES 硅烷

化修饰, 最后按照 mPEG:biotin-PEG = 1:100 混合后孵育 2 h 完成修饰, 详细步骤见参考文献 [19].

对载玻片进行打孔, 配合打孔胶带与盖玻片黏合形成样品槽, 并将盖玻片的修饰面封在槽内. 在其中一个孔内用移液吸头添加样品, 并在另一端接入针管进行抽取来将样品引入槽内 [20].

## 2.3 单分子 FRET 实验

在测量 ssDNA/dsDNA 的 FRET 值时, 通过链霉亲和素 (streptavidin) 将带有 biotin 的 ssDNA/dsDNA 锚定在玻片表面, 并在除氧环境 (100 nmol/L 葡萄糖氧化酶, 1.5 mmol/L 过氧化氢酶, 56 mmol/L 葡萄糖, 1 mg/mL Trolox, pH = 7.4) 中测量其初始 FRET 值, 过程如图 1(a), (b) 所示.

单链缠绕/双链缠绕实验 (其中单链缠绕是指 RecA 直接结合单链 DNA 形成单链核蛋白丝; 双链缠绕是指 RecA 结合黏性末端后延伸至双链 DNA 部分形成双链核蛋白丝): 测量 ssDNA/dsDNA 结合 RecA 形成核蛋白丝后的 FRET 值. 先通过链霉亲和素将 ssDNA/dsDNA 锚定在玻片表面后, 加入 RecA buffer +2  $\mu$ mol/L RecA +5 mmol/L ATP $\gamma$ S, 室温孵育 15 min, 形成核蛋白丝, 加入除氧系统再观察 FRET 值, 过程如图 1(c), (d) 所示.

单链入侵实验 (在本文中特指单链核蛋白丝直接结合互补链单链): 测量 ssDNA 形成的核蛋白丝与互补链完成匹配后的 FRET 值. 在 I 链结合 RecA 形成核蛋白丝后加入互补链, 完成孵育后再加入除氧系统观察 FRET 值, 如图 1(e) 所示.

链交换实验: 测量 ssDNA 形成的核蛋白丝与模板链完成链交换过程中的 FRET 变化, 即在 I 链形成核蛋白丝之后, 再加入 OC 双链和除氧系统并观察 FRET 变化, 如图 1(f) 所示.

以上所有实验在核蛋白丝形成之后的步骤中都会添加 5 mmol/L ATP $\gamma$ S 以防止 RecA 解离.

## 3 结果与讨论

### 3.1 荧光标记的链特异性

在 RecA 介导的同源重组链交换过程中涉及到的 I 链、C 链、O 链在核蛋白丝中分别对应着独特的构象和变化: I 链始终结合在 RecA 的第 1 位点, 链交换前后结构保持不变; O 链会结合在 RecA 的第 2 位点, 在结合 RecA 后会被拉伸, 纵向长度

变成 B-DNA 的 1.5 倍, 螺旋半径变大, 当 ATP $\gamma$ S 存在时, 链交换完成后 O 链不释放, 但与第 2 位点的结合可能会变弱<sup>[21]</sup>; 而 C 链虽然不与 RecA 直接结合, 但当 O 链被拉伸时, 它也被拉伸, 并从与 O 链互补配对变为与 I 链互补配对, 其相位和半径都会有连续的变化<sup>[22]</sup>. 链交换的过程中只有 C 链有着丰富的动态变化<sup>[21]</sup>, 所以用单分子 FRET 技术观察 RecA 介导的链交换过程时至少要有一个荧光分子标记在 C 链上, 但另一个链的选择不同会带来不同的影响.

在 I 链和 C 链标记中, 本文首先做的是双链缠绕的实验来确定这两条链上荧光标记所带来的位阻, 因为链交换的终态其实就是 I 链和 C 链被 RecA 缠绕并配对, 所以直接用 RecA 去缠绕 IC 双链是模拟链交换的终态, 实验过程如图 1(d) 所示. 对于双链缠绕实验来说, 平末端的 dsDNA 是不易形成核蛋白丝的, 因此, 本文使用了 IC 链配对后有一段相对较长的 I 链黏性末端 (15 nt), 以黏性末端单链为 RecA 缠绕的成核基础. 选择黏性末端除了可以有助于形成核蛋白丝; 还能限定黏性末端所在的链为 I 链, 另一条互补链是 C 链. 因为 RecA 只能在单链部分成核, 形成核蛋白丝, 然后延伸到双链, 所以同时也限定了缠绕的方向. RecA 只能从 I 链的 3' 端开始缠绕, 向 5' 端延伸, 所以会有如图 2(a), (b) 所示的缠绕方向. 双链的缠绕会先经过靠近 I 链 3' 端的荧光标记, 然后顺势延伸到另一个荧光标记的位置.

本文设计了两种标记: 一个是 C 链标记在前端 (根据缠绕方向) 的 CI 链标记, 如图 2(a) 所示; 另一个是 I 链标记在前端的 IC 链标记, 如图 2(b) 所示, 其标记方式均为碱基标记<sup>[23]</sup>. 其终态 FRET 值的分布主要体现前端标记的影响, 而双链缠绕是否跨过后端荧光标记则不会体现在 FRET 值的变化上. 这是由于 FRET 只能观察到两个荧光分子之间的距离信息, 所以后端荧光标记是否阻碍了后面的双链部分继续形成核蛋白丝是无法体现在 FRET 值的变化上的. 当 DNA 被 RecA 缠绕或发生链交换后, 会变成 B-DNA 长度的 1.5 倍, 因此两个荧光分子之间的距离会变大, 体现为 FRET 值的峰会左移. 从实验数据上来看, IC 链标记完成核蛋白丝缠绕的比例明显优于 CI 链标记, 即 I 链的标记的影响小于 C 链标记. 从功能上说, 在细胞内 RecA 会结合 RecBCD 等蛋白处理过的黏性末

端, 并以这条 DNA 作为 I 链形成核蛋白丝, 而 RecA 的主要功能是介导完成链交换, 所以对 I 链上的碱基序列没有要求, 而 C 链作为互补链, RecA 介导链交换的过程中需要确认其同源性, 使得其对匹配程度敏感, 而荧光标记可能在一定程度上影响碱基匹配; 从结构上说, I 链与 RecA 的结合依靠的是较强的静电力, 而 C 链结合 RecA 则依靠的是更弱的范德瓦耳斯力, 这使得其更容易受到荧光标记的影响<sup>[24]</sup>. 综上, 本文推测 C 链标记的影响大于 I 链标记.

但是由于 I 链在整个链交换的过程中结构一直保持不变, 加之其在链交换前后, 即序列比对态和终态这两个状态时与 C 链的距离都等于双链 DNA 内两条单链之间的间距<sup>[21]</sup>. 因此, 从理论上讲, I 链和 C 链的标记可能无法区分链交换的每个过程, 所以如果以解析链交换过程为目的是不宜选用 I 链标记的. 但 I 链标记影响更小的结论对本文还是很有意义的, 因为在双链缠绕、链交换等实验的终态的研究中并不强调过程, 刚好可以用作参照点来研究其他链荧光标记的影响.

O 链和 C 链作为同源重组链交换过程中的模板链, 在链交换过程中位置变化较大, 有利于单分子 FRET 实验的观察, 是研究者重点关注的位置. 因此, 本文设计了相关的实验, 在 O 链和 C 链的碱基上分别标记一个荧光分子, O 链标记在前的称为 OC 链标记, 反之则称为 CO 链标记, 标记位置如图 2(c) 所示. 首先, 从图 2(d) 所示的链交换反应曲线中可以看到一个总光强明显升高的台阶, 这里代表着双链 DNA 和核蛋白丝距离拉近了之后发生了 PIFE (protein induced fluorescence enhancement) 效应, 这使得荧光光强成倍上升, 但是 FRET 值 (0.8) 并没有明显变化, 对应绿色背景区. 由于 PIFE 要接近蛋白才会出现, 所以本文推测这是荧光分子刚进入核蛋白丝的时刻. 然后, FRET 值进入到了一个相对低值 (0.45), 这代表着双链被拉伸, 也是同源比对的过程, 对应蓝色背景区. 最后, 绝大多数的反应曲线进入到了不断上下跳动的非稳定状态, 即 OC 链标记的链交换终态就是非稳定状态, 对应橙色背景区. 非稳定状态可能来自于经过了序列比对态之后, C 链的碱基从与 O 链互补配对转变为与 I 链互补配对, 失去配对的 O 链不再能维持基于 RecA 第 2 结合位点的稳定构象, 所以体现在 FRET 上呈非稳定状态. 有趣的是, 本文发

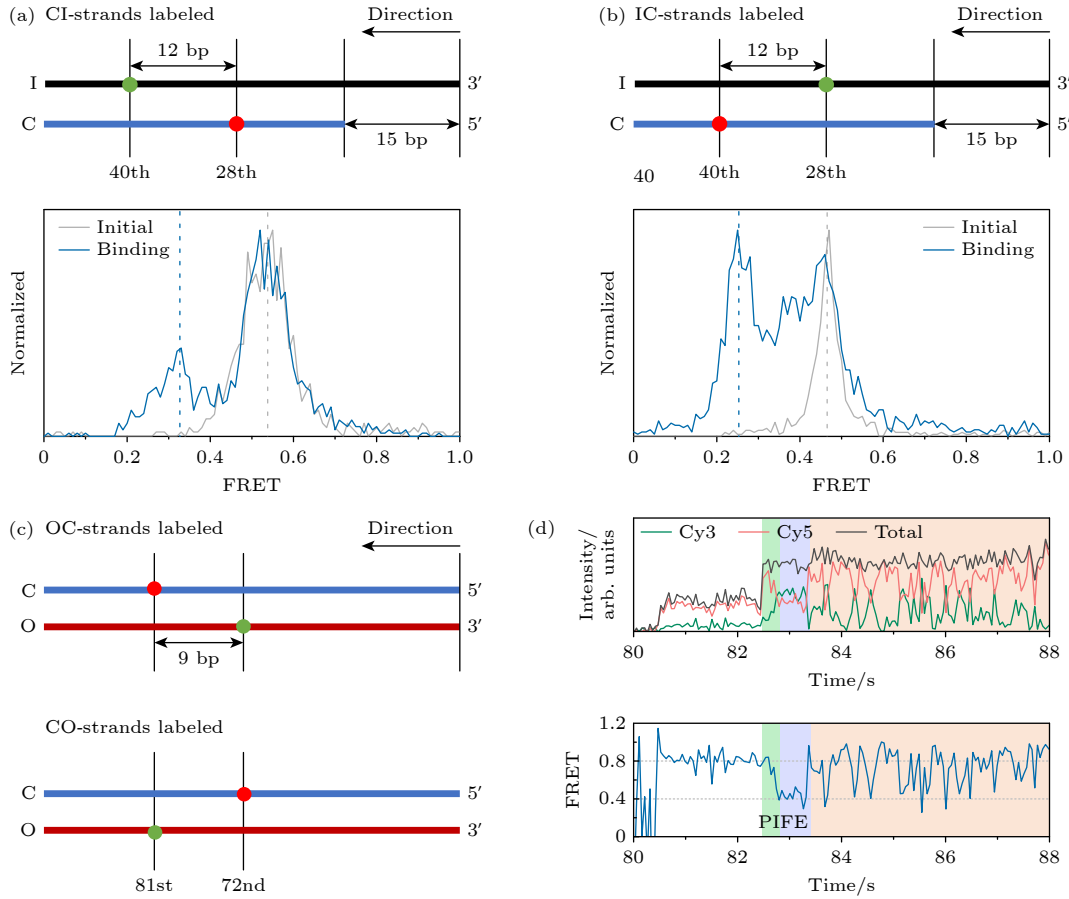


图 2 链特异性实验 (a) 上方为 CI 链标记位置示意图 (其中绿色点为 Cy3, 红色点为 Cy5, 标记序号为对应 I 链 3' 端起始的碱基位置), 下方为 CI 链标记的初态 FRET 值统计图 (灰色,  $N_{\text{curve}} = 724$ ) 和双链缠绕 FRET 值统计图 (蓝色,  $N_{\text{curve}} = 1360$ ), 箭头表示双链缠绕的方向; (b) 上方为 IC 链标记位置示意图, 下方为 IC 链标记的初态 FRET 值统计图 (灰色,  $N_{\text{curve}} = 516$ ) 和双链缠绕 FRET 值统计图 (蓝色,  $N_{\text{curve}} = 2546$ ); (c) OC 链标记 (上) 和 CO 链标记 (下) 示意图, 箭头表示链交换的方向; (d) OC 链标记的典型链交换反应曲线, 其中红色线为 Cy5 光强, 绿色线为 Cy3 光强, 黑色线为总光强, 蓝色线为 FRET 值

Fig. 2. Strand specificity experiment. (a) Schematic diagram of CI labeling positions at the top (where the green dot is Cy3 and the red dot is Cy5, and the labeled sequence number is the base position corresponding to the 3' end of the I-strand), and the statistical diagram of initial state FRET value of CI-strands labeling (gray,  $N_{\text{curve}} = 724$ ) and statistical diagram of double strand binding FRET value (blue,  $N_{\text{curve}} = 1360$ ) at the bottom, the arrow indicating double strand binding direction. (b) Schematic diagram of IC-strands labeling position at the top, and the statistical diagram of initial state FRET value of IC-strands labeling (gray,  $N_{\text{curve}} = 516$ ) and statistical diagram of double strand binding FRET value (blue,  $N_{\text{curve}} = 2546$ ) at the bottom. (c) Schematic diagram of OC-strands labeling (top) and CO-strands labeling (bottom), where the arrow shows the strand exchange direction. (d) A typical strand-exchange reaction trace labeled with OC strands, where the red line represents the light intensity of Cy5, the green line represents the light intensity of Cy3, the black line represents the total light intensity, and the blue line represents the FRET value.

现在 CO 链标记的链交换实验中, 绝大多数的反应曲线也都会最终进入非稳定状态. 这说明 O 链和 C 链的标记, 在完成链交换之后都会进入非稳定的状态, 这将非常不利于动力学过程的解析, 因此如果想研究 RecA 介导的链交换过程, 应当舍弃在 O 链上进行标记的方案.

由图 2(a), (b) 中 IC 标记比 CI 标记的更高的双链缠绕比例可知 I 链的影响小于 C 链; 同时, 由图 2(d) 的反应曲线可知引入 O 链的标记会令链交换的终态变为非稳态, 不利于观察. 综上所述, 用

FRET 研究 RecA 介导的链交换时, O 链的标记会导致非稳定状态, 影响最大, 其次是 C 链, 影响最小的是 I 链. 但 I 链的标记在链交换过程中难以区分中间态的变化, 所以本文推荐在 C 链上进行标记.

### 3.2 标记的构象敏感性

除了标记链带来的差异之外, 本文还考察了标记带来影响的另一个维度: 构象敏感性. 已知 RecA 会结合 3 个碱基形成一个 triplet, 虽然整个核蛋白丝被拉伸到了 B-DNA 的 1.5 倍, 但是拉伸

的位置主要集中在 triplets 之间, 而 triplet 内部的 3 个碱基之间仍然保持着类似 B-DNA 的间隔<sup>[24]</sup>. 这样的结构可以帮助 RecA 的核蛋白丝进行序列比对和完成链交换, 但同时也使得 triplet 中的碱基的构象有所差异, 整个核蛋白丝以 3 bp 为一个重复单元, 碱基在 triplet 内部和 triplet 边缘时有着不同的构象.

为了探究不同标记位置带来的影响, 本文选择了在 triplet 内部和在 triplet 边缘/triplet 之间进行标记, 标记位置如图 3 所示, 其中橙色椭圆为 RecA 蛋白结合 3 个碱基形成 triplet 的位置. 当前主流的标记策略可分为碱基标记 (base labeling)<sup>[23]</sup> 和骨架标记 (backbone labeling)<sup>[25]</sup> 两类 (图 3(b)). 本实验对两种位置和两种标记方式都做了测试. 选用

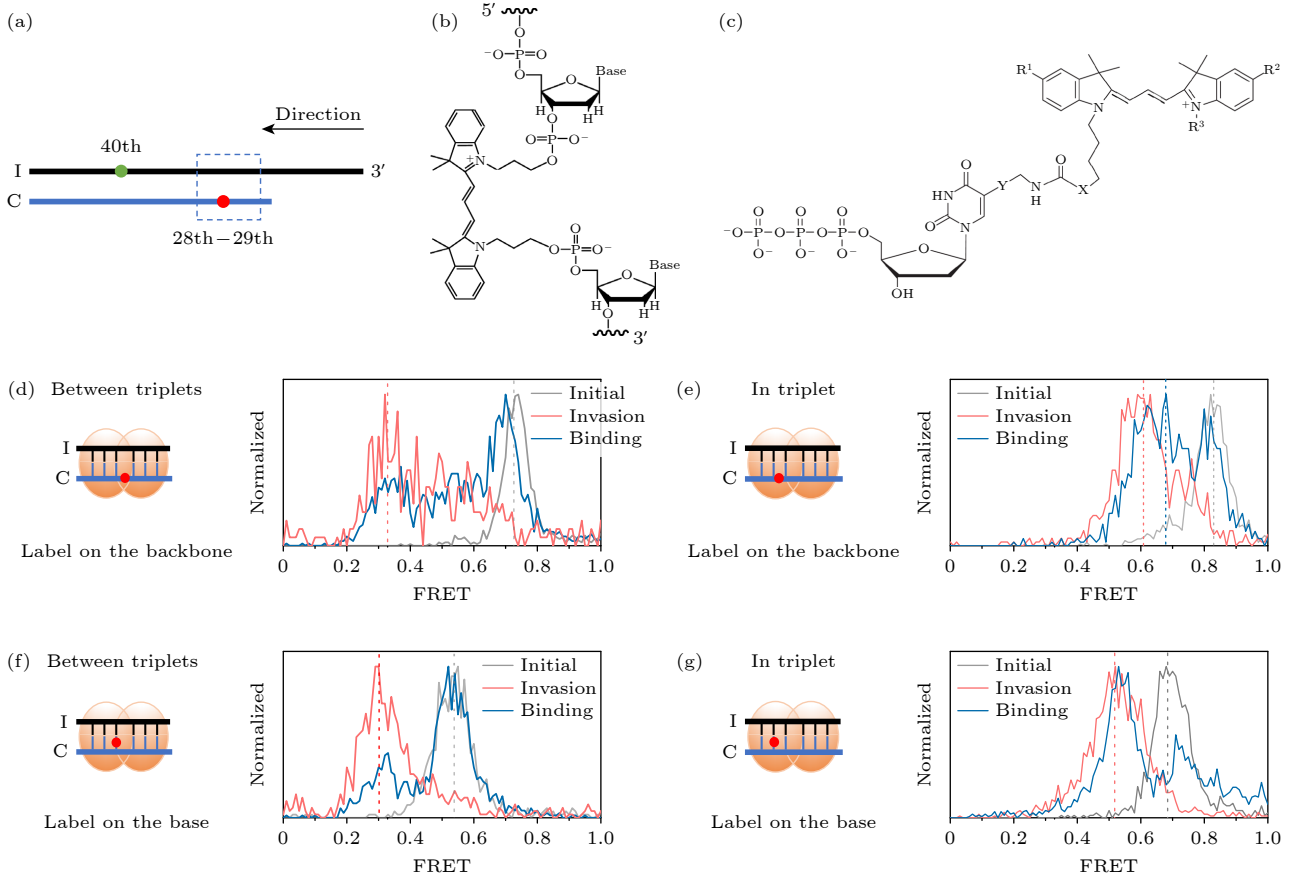


图 3 标记位置与标记方式对比实验 (a) CI 链标记位置示意图 (其中绿色点为 Cy3, 红色点为 Cy5, 标记序列号为对应 I 链 3' 端起始的碱基位置); (b) 碱基标记 Cy3 分子结构式<sup>[23]</sup>; (c) 骨架标记 Cy3 分子结构式<sup>[25]</sup>; (d) triplets 之间骨架标记, 以及其 B-DNA (灰色,  $N_{\text{curve}} = 895$ )、单链入侵 (红色,  $N_{\text{curve}} = 1017$ )、双链缠绕 (浅蓝,  $N_{\text{curve}} = 2392$ ) 实验终态 FRET 值统计图; (e) triplet 内部骨架标记, 以及其 B-DNA (灰色,  $N_{\text{curve}} = 694$ )、单链入侵 (红色,  $N_{\text{curve}} = 2238$ )、双链缠绕 (浅蓝,  $N_{\text{curve}} = 3543$ ) 实验终态 FRET 值统计图; (f) triplets 边缘碱基标记, 以及其 B-DNA (灰色,  $N_{\text{curve}} = 895$ )、单链入侵 (红色,  $N_{\text{curve}} = 2797$ )、双链缠绕 (浅蓝,  $N_{\text{curve}} = 2339$ ) 实验终态 FRET 值统计图; (g) triplet 中间碱基标记的 B-DNA (灰色,  $N_{\text{curve}} = 935$ )、单链入侵 (红色,  $N_{\text{curve}} = 2341$ )、双链缠绕 (浅蓝,  $N_{\text{curve}} = 2346$ ) FRET 值统计图, (d), (e), (f), (g) 左侧示意图为 (a) 方框处的局部放大图

Fig. 3. Comparison experiments of labeling positions and labeling methods: (a) Schematic diagram of CI-strand labeling positions (where the green dot is Cy3 and the red dot is Cy5, and the labeled sequence number is the base position corresponding to the 3' end of the I-strand); (b) molecular structural formula of base labeled Cy3<sup>[23]</sup>; (c) molecular structural formula of backbone labeled Cy3<sup>[25]</sup>; (d) statistical diagram of initial state FRET value of the B-DNA with backbone labeling between triplets (gray,  $N_{\text{curve}} = 895$ ), final state FRET value of single strand invasion (red,  $N_{\text{curve}} = 1017$ ) and double strand binding (light blue,  $N_{\text{curve}} = 2392$ ); (e) statistical diagram of initial state FRET value of the B-DNA with backbone labeling in triplets (gray,  $N_{\text{curve}} = 694$ ), final state FRET value of single strand invasion (red,  $N_{\text{curve}} = 2238$ ) and double strand binding (light blue,  $N_{\text{curve}} = 3543$ ); (f) statistical diagram of initial state FRET value of the B-DNA with base labeling between triplets (gray,  $N_{\text{curve}} = 895$ ), final state FRET value of single strand invasion (red,  $N_{\text{curve}} = 2797$ ) and double strand binding (light blue,  $N_{\text{curve}} = 2339$ ); (g) statistical diagram of initial state FRET value of the B-DNA with base labeling in triplets (gray,  $N_{\text{curve}} = 935$ ), final state FRET value of single strand invasion (red,  $N_{\text{curve}} = 2341$ ) and double strand binding (light blue,  $N_{\text{curve}} = 2346$ ); the left-side diagrams of (d), (e), (f), and (g) are enlarged views of the area marked in the box in (a).

的标记链是 CI 链标记, 如图 3(a) 所示, 这是由于前文提到过的标记链的选择只能是 C 链, 而同时 I 链是影响最小的参照。

实验中测量 B-DNA 的 FRET 值作为初始值; 由于核蛋白丝直接结合匹配序列的 ssDNA 位阻极低, 所以通过测量单链入侵的 FRET 值也可作为链交换终态的参照, 实验过程如图 1(e); 最后再测量双链缠绕的结果作为衡量该荧光标记下核蛋白丝是否可以正常组装的标准。

对比图 3(d), (e) 以及图 3(f), (g) 可以得出, 不论是碱基标记还是骨架标记, 在 triplet 内部进行标记双链缠绕的峰值左移的比例更高, 说明有着更高的双链缠绕完成率; 相反在 triplet 边缘进行标记的双链缠绕完成率都明显偏低. 说明在 triplet

内部进行荧光标记带来的影响是最小的, 这很可能和 RecA 与 DNA 的结合方式有关。

骨架标记和碱基标记在分子拓扑学层面存在显著差异. 具体而言, 碱基标记通过修饰碱基, 可能改变碱基的平面取向和堆积角<sup>[17]</sup>; 而骨架标记则在 DNA 骨架之间插入荧光分子, 可能引起主链的局部应力改变或长度扰动<sup>[18]</sup>. 在 triplet 内部的骨架和碱基标记实验中, 如图 3(e), (g) 所示, 可以看到骨架标记 (图 3(e)) 的单链入侵和双链缠绕的终态 FRET 值有着更宽的分布, 相反碱基标记组 (图 3(g)) 的终态 FRET 值有着更加集中的分布. 对于在 triplets 边缘标记的两组 (图 3(d), (f)) 也能得到类似的结论, 但骨架和碱基标记之间的差异并不显著, 不能直接得出结论, 仍需进一步的讨论。

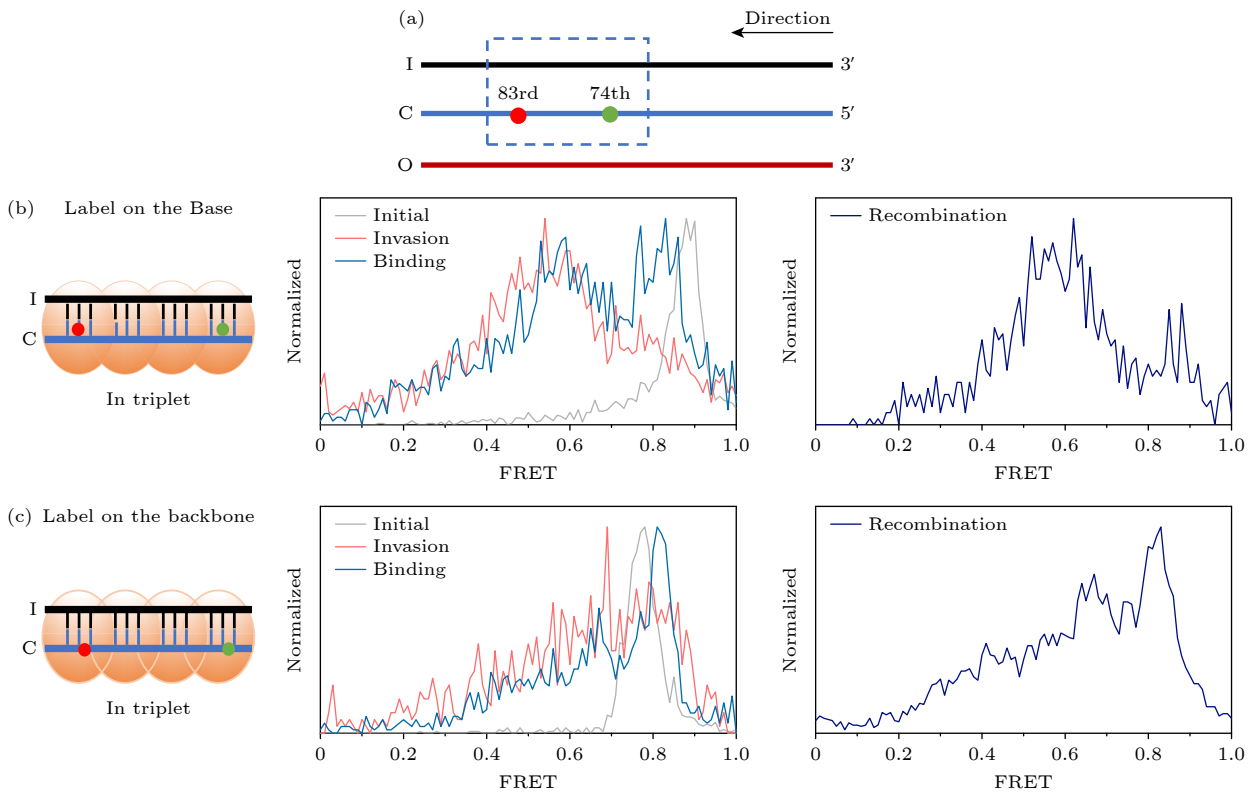


图 4 C 链双标记实验 (a) 标记位置示意图 (其中绿色点为 Cy3, 红色点为 Cy5, 标记序列号为对应 I 链 3' 端起始的碱基位置); (b) C 链骨架双标记放大图 (左), 其 B-DNA (灰色,  $N_{\text{curve}} = 674$ )、单链入侵 (红色,  $N_{\text{curve}} = 987$ )、双链缠绕 (浅蓝色,  $N_{\text{curve}} = 3606$ ) FRET 值统计图 (中) 和链交换 (深蓝色,  $N_{\text{curve}} = 684$ ) FRET 值统计图 (右); (c) C 链碱基双标记放大图 (左), 其 B-DNA (灰色,  $N_{\text{curve}} = 974$ )、单链入侵 (红色,  $N_{\text{curve}} = 1495$ )、双链缠绕 (浅蓝色,  $N_{\text{curve}} = 1618$ ) FRET 值统计图 (中) 链交换 (深蓝色,  $N_{\text{curve}} = 597$ ) FRET 值统计图 (右)

Fig. 4. C-strand double labeling experiment. (a) Schematic diagram of labeling position (where the green dot is Cy3 and the red dot is Cy5, and the labeled sequence number is the base position corresponding to the 3' end of the I-strand). (b) Enlarged view of the C-strand backbone double labeling (left). Statistical diagram of its initial state FRET value of the B-DNA (gray,  $N_{\text{curve}} = 674$ ), final state FRET value of single strand invasion (red,  $N_{\text{curve}} = 987$ ), and double strand binding (light blue,  $N_{\text{curve}} = 3606$ ) (middle). Strand exchange (deep blue,  $N_{\text{curve}} = 684$ ) FRET (right). (c) Enlarged view of the double C-strand base labeling (left). Statistical diagram of its initial state FRET value of the B-DNA (gray,  $N_{\text{curve}} = 974$ ), final state FRET value of single strand invasion (red,  $N_{\text{curve}} = 1495$ ), double strand binding (light blue,  $N_{\text{curve}} = 1618$ ) (middle). And strand exchange (deep blue,  $N_{\text{curve}} = 597$ ) FRET (right).

综上所述, 考虑到荧光标记的构象敏感性, 用 FRET 研究 RecA 介导的链交换时, 应该尽量把荧光标记放在 triplet 内部的位置.

### 3.3 较理想的标记方式

在分析了 I, C, O 链的情况后, 我们认为只有 C 链适合进行标记, 同时标记位置应当尽量选择 triplet 内部. 为了尽可能降低荧光标记的影响, 最后的可供选择的方案只有两种, 分别是 C 链碱基双标记和 C 链骨架双标记, 且都标记在 triplet 内部.

如图 4 所示, 通过双链缠绕、单链入侵以及链交换的实验结果可以发现, 不论是核蛋白丝的形成率还是链交换的成功率, C 链碱基双标记的结果都是明显高于 C 链骨架双标记的. 这可能是由于两个荧光分子标记在同一条链的骨架上的时候, 其带来的应力都施加在同一条链上, 带来了额外的势垒, 影响到了 C 链在链交换过程中的动力学过程; 此时反而碱基上的两个标记之间相互独立, 对构象的影响只局限在标记位置的碱基上, 成了更加理想的标记方式.

## 4 结 论

RecA 介导的同源重组链交换过程一直备受关注, 单分子 FRET 技术是最有希望观察到这一过程细节的技术, 但它还面对一个亟待解决的问题, 那就是荧光标记对链交换过程带来的影响. 有不少研究比较了荧光标记对 DNA 的影响, 但大多专注于研究荧光标记对 DNA 标记处局部结构的影响<sup>[17,18,26,27]</sup>, 以及荧光标记可能引起的电荷屏蔽和空间位阻对蛋白质结合 DNA 的影响<sup>[28,29]</sup>. 本文主要从 DNA 的荧光标记对蛋白质功能的影响出发, 分别从荧光标记的链特异性、构象敏感性两个角度理解了其对链交换的影响. 尤其是当荧光标记带来的位阻会明显降低 RecA 介导的链交换过程的完成概率时, 研究如何避免荧光标记对该过程的影响就显得尤为重要.

在标记链的选择中, I 链的影响最小, C 链其次, O 链的影响最大. 但是由于 I 链在链交换过程中保持不动, 且在序列比对态和终态时 I 链都与 C 链保持同样的距离, 其 FRET 值没有区别, 所以 IC 链标记无法体现链交换的完整过程; 此外, O 链的标记影响较大, 且 O 链的参与会引入非稳

定状态, 不利于观察, 所以研究者若想用单分子 FRET 技术研究链交换就应该选用 C 链双标记尽量降低影响.

在标记位置的选择中, RecA 会结合 3 个碱基形成 triplet, 整个核蛋白丝的构象都是以 3 bp 为一个周期, 因此主要需要区分的就是 triplet 内部和 triplet 之间的标记位置, 根据本文结果可知 triplet 内部标记明显优于 triplet 之间标记.

再通过 C 链 triplet 内部骨架双标记和碱基双标记的对比, 可知基于用单分子 FRET 研究 RecA 介导的链交换的目的下, 较理想的设计是使用 C 链 triplet 内部碱基双标记方案进行研究. 当然这样的弊端就在于标记位置的间隔都只能是 3 bp 的整数倍. 同时, 基于 Cy3-Cy5 这组 FRET 对的最佳观察距离为 5.8 nm, 在实际实验中其间隔为 9 bp 时, 被标记的 DNA 的初态距离约为 3.1 nm, 链交换中间态的距离根据模型推算约为 5.5 nm 和 4.8 nm, 其终态距离为 5.2 nm, FRET 值变化在线性区间内. 且态与态之间的最小 FRET 值变化为 0.1, 相比其他间隔的标记方案 (如 12 bp 间隔标记时, 初态距离约为 3.9 nm, 链交换中间态的距离据模型推算约为 7.3 nm 和 6.3 nm, 其终态距离为 6.4 nm, 态与态之间的最小 FRET 值变化为 0.02) 各态间的分辨率最高. 所以 9 bp 间隔 C 链 triplet 内部碱基双标记是研究链交换过程的最好选择. 这种标记方式不仅将完成了链交换的反应曲线比例提高了将近 50% (如图 4(b) 中链交换实验的终态稳态占比为 62.1%, 图 4(c) 中链交换实验的终态稳态占比为 43.3%), 而且还保留了较高的信噪比及各态间的明显区分, 可以显著提高研究效率.

综上, 在用单分子 FRET 技术研究 RecA 介导的同源重组过程时, 需要在实验前设计好荧光标记位置和标记方式, 将标记带来的影响降到最低, 有效地捕获真实信号. 本研究通过对比实验改善了 FRET 观察同源重组链交换过程的研究框架, 也为其他荧光标记实验提供了优化思路.

## 参考文献

- [1] Kowalczykowski S C, Dixon D A, Eggleston A K, Lauder S D, Rehrauer W M 1994 *Microbiol. Rev.* **58** 401
- [2] Prentiss M, Prévost C, Daniłowicz C 2015 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50** 453
- [3] Roca A I, Cox M M 1990 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25** 415

- [4] West S C, Howard-Flanders P 1984 *Cell* **37** 683
- [5] Yang H, Zhou C, Dhar A, Pavletich N P 2020 *Nature* **586** 801
- [6] Danilowicz C, Feinstein E, Conover A, Coljee V W, Vlassakis J, Chan Y L, Bishop D K, Prentiss M 2012 *Nucleic Acids Res.* **40** 1717
- [7] Mäeots M E, Lee B, Nans A, Jeong S G, Esfahani M M N, Ding S, Smith D J, Lee C S, Lee S S, Peter M, Enchev R I 2020 *Nat. Commun.* **11** 3465
- [8] Hertzog M, Perry T N, Dupaigne P, Serres S, Morales V, Soulet A L, Bell J C, Margeat E, Kowalczykowski S C, Le Cam E, Fronzes R, Polard P 2023 *Nucleic Acids Res.* **51** 2800
- [9] Chen J, Tang Q N, Guo S W, Lu C, Le S M, Yan J 2017 *Nucleic Acids Res.* **45** 10032
- [10] Axelrod D 1984 *J. Lumin.* **31-32** 881
- [11] Groves D, Hepp C, Kapanidis A N, Robb N C 2023 *Quart. Rev. Biophys.* **56** e3
- [12] Kim S H, Ragunathan K, Park J, Joo C, Kim D, Ha T 2014 *J. Am. Chem. Soc.* **136** 14796
- [13] Ragunathan K, Liu C, Ha T 2012 *eLife* **1** e00067
- [14] Yu F Z, Zhang D B, Zhao C P, Zhao Q, Jiang G B, Wang H L 2023 *Nucleic Acids Res.* **51** 2270
- [15] Kim S H, Joo C, Ha T, Kim D 2013 *Nucleic Acids Res.* **41** 7738
- [16] Joo C, McKinney S A, Nakamura M, Rasnik I, Myong S, Ha T 2006 *Cell* **126** 515
- [17] Garavís M, Escaja N, Gabelica V, Villasante A, González C 2015 *Chem. Eur. J.* **21** 9816
- [18] Cox J M, Tsodikov O V, Cox M M 2005 *PLoS Biol.* **3** e52
- [19] Huang X Y, Sui M Y, Hou W Q, Li M, Lu Y, Xu C H, 2020 *Acta Phys. Sin.* **69** 208706 (in Chinese) [黄星樾, 隋明宇, 侯文清, 李明, 陆颖, 徐春华 2020 *物理学报* **69** 208706]
- [20] Roy R, Hohng S, Ha T 2008 *Nat. Methods* **5** 507
- [21] Peacock-Villada A, Yang D, Danilowicz C, Feinstein E, Pollock N, McShan S, Coljee V, Prentiss M 2012 *Nucleic Acids Res.* **40** 10441
- [22] Huang X Y, Lu Y, Wang S, Sui M Y, Li J H, Ma J B, Ma D F, Jia Q, Hu S X, Xu C H, Li M 2020 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117** 20549
- [23] Zasedateleva O A, Vasiliskov V A, Surzhikov S A, Kuznetsova V E, Shershov V E, Guseinov T O, Smirnov I P, Yurasov R A, Spitsyn M A, Chudinov A V 2018 *Nucleic Acids Res.* **46** e73
- [24] Chen Z, Yang H, Pavletich N P 2008 *Nature* **453** 489
- [25] Heussman D, Kittell J, Von Hippel P H, Marcus A H 2022 *J. Chem. Phys.* **156** 045101
- [26] Jahnke K, Grubmüller H, Igaev M, Göpfrich K 2021 *Nucleic Acids Res.* **49** 4186
- [27] Cutler J I, Zhang K, Zheng D, Auyeung E, Prigodich A E, Mirkin C A 2011 *J. Am. Chem. Soc.* **133** 9254
- [28] Cavaco M, Pérez-Peinado C, Valle J, Silva R D M, Correia J D G, Andreu D, Castanho M A R B, Neves V 2020 *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8** 552035
- [29] Yin L L, Wang W, Wang S P, Zhang F N, Zhang S T, Tao N J 2015 *Biosens. Bioelectron.* **66** 412

# Effect of fluorescent labeling on RecA-mediated homologous recombination strand exchange\*

WANG Libang<sup>1)2)</sup> WANG Hao<sup>1)2)</sup> LI Ming<sup>1)2)</sup> LU Ying<sup>1)2)</sup> XU Chunhua<sup>1)†</sup>

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

2) (*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

( Received 15 April 2025; revised manuscript received 22 May 2025 )

## Abstract

Homologous recombination is a central mechanism for maintaining genome stability and biodiversity. RecA, as the first discovered homologous recombinase, plays a crucial role in homologous recombination strand exchange. In recent years, with the development of structural biology, significant breakthroughs have been made in understanding the static structure of the RecA nucleoprotein filament. However, research on the kinetic process of homologous recombination strand exchange mediated by RecA continues to encounter significant challenges. Research into the dynamic process has been ongoing for decades. In recent years, the use of single-molecule techniques has resulted in significant breakthroughs in this field. Among these techniques, single-molecule fluorescence resonance energy transfer (FRET) technology is widely used due to its ultra-high temporal and spatial resolution, making it well suitable for studying RecA-mediated homologous recombination strand exchange. However, the fluorescent labels required for FRET experiments may affect the RecA-mediated strand exchange process, which is often overlooked by researchers. Most of related articles focus on the effect of fluorescent labels on local structure. This paper primarily examines the effect of DNA fluorescent labeling on protein function, focusing on its effects on strand exchange from two perspectives: strand specificity and conformational sensitivity of the fluorescent labeling. Using experiments such as double-strand binding, single-strand invasion, and strand exchange, we develop a labeling scheme with the minimal effect—9 bp spaced C-strand double-base labeling in triplet—that can effectively improve the efficiency of studying the homologous recombination process. This result enhances the understanding of the effect of fluorescent labeling, allowing researchers to rapidly optimize the position and method of fluorescent labeling, and reduce its negative effects on the strand exchange process. Moreover, it provides some inspirations for other fluorescent labeling experiments.

**Keywords:** homologous recombination, RecA, single-molecule FRET, fluorescent labeling

**PACS:** 87.80.Nj, 87.50.uj, 87.15.kj, 87.14.G–

**DOI:** [10.7498/aps.74.20250484](https://doi.org/10.7498/aps.74.20250484)

**CSTR:** [32037.14.aps.74.20250484](https://cstr.cn/32037.14.aps.74.20250484)

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 32171228, T2221001, 12434008), the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2019YFA0709304), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No. XDB0480000), and the Chinese Academy of Sciences Project for Young Scientists in Basic Research (Grant No. YSBR-104).

† Corresponding author. E-mail: [xch@iphy.ac.cn](mailto:xch@iphy.ac.cn)

## 荧光标记对RecA介导的同源重组链交换的影响

王利邦 王浩 李明 陆颖 徐春华

### Effect of fluorescent labeling on RecA-mediated homologous recombination strand exchange

WANG Libang WANG Hao LI Ming LU Ying XU Chunhua

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 74, 158703 (2025) DOI: 10.7498/aps.74.20250484

CSTR: 32037.14.aps.74.20250484

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.74.20250484>

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

---

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 基于热还原氧化石墨烯的单分子表面诱导荧光衰减技术

Single-molecule surface-induced fluorescence attenuation based on thermal reduced graphene oxide

物理学报. 2023, 72(14): 147801 <https://doi.org/10.7498/aps.72.20230450>

#### 局域照明增强的活细胞单分子荧光-单通道膜片钳耦联技术

Local illumination-enhanced live-cell single-molecule fluorescence and single-channel patch-clamp coupling technology

物理学报. 2025, 74(13): 138702 <https://doi.org/10.7498/aps.74.20250471>

#### 单分子器件电输运中基于量子干涉效应的调控策略

Regulation strategies based on quantum interference in electrical transport of single-molecule devices

物理学报. 2022, 71(6): 067303 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211819>

#### 单分子瞬时带电态中电子-振动耦合特性的亚纳米荧光成像研究

Probing vibronic coupling of a transiently charged state of a single molecule through subnanometer resolved electroluminescence imaging

物理学报. 2022, 71(6): 063301 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20212003>

#### 单分子磁镊旋转操控和基因转录调控动力学

Rotation manipulation of single-molecule magnetic trapping and gene transcription regulation dynamics

物理学报. 2023, 72(21): 218701 <https://doi.org/10.7498/aps.72.20231089>

#### 单分子表面增强拉曼散射的光谱特性及分析方法

Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy (SM-SERS): characteristics and analysis

物理学报. 2021, 70(13): 137401 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201447>