

RecA蛋白介导同源重组的步进式链交换

黄星椽 隋明宇 侯文清 李明 陆颖 徐春华

Stepwise strand exchange during RecA-induced homologous recombination

Huang Xing-Yuan Sui Ming-Yu Hou Wen-Qing Li Ming Lu Ying Xu Chun-Hua

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 69, 208706 (2020) DOI: 10.7498/aps.69.20200959

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200959>

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

单分子荧光共振能量转移数据处理的优化算法

An optimization algorithm for single-molecule fluorescence resonance (smFRET) data processing

物理学报. 2017, 66(11): 118701 <https://doi.org/10.7498/aps.66.118701>

用单分子技术研究Sso7d与DNA的相互作用

Interaction between Sso7d and DNA studied by single-molecule technique

物理学报. 2018, 67(14): 148201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180630>

单分子动力学研究大肠杆菌单链结合蛋白与单链DNA的结合过程

Binding process between E.coli SSB and ssDNA by single-molecule dynamics

物理学报. 2018, 67(8): 088201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180109>

单分子尺度的光量子态调控与单分子电致发光研究

Single-molecule electroluminescence and its relevant latest progress

物理学报. 2018, 67(22): 223301 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20181718>

外电场操控单分子的偶极取向极化特性研究

Dipole orientation polarization property of single-molecule manipulated by external electric field

物理学报. 2019, 68(12): 128201 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190361>

单分子光学探针揭示易混聚合物受限纳米区域的动力学

Single-molecule probes revealed dynamics of confined nano-regions in miscible polymer blends

物理学报. 2019, 68(14): 148201 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190423>

RecA 蛋白介导同源重组的步进式链交换

黄星栋¹⁾²⁾ 隋明宇¹⁾³⁾ 侯文清¹⁾²⁾ 李明¹⁾ 陆颖¹⁾ 徐春华^{1)†}

1) (中国科学院物理研究所, 北京 100190)

2) (中国科学院大学, 北京 100049)

3) (兰州大学物理科学与技术学院, 兰州 730000)

(2020 年 6 月 22 日收到; 2020 年 6 月 29 日收到修改稿)

同源重组过程由重组酶介导, 对维持细胞的遗传稳定性有极大的作用. 链交换是同源重组的关键过程, 研究链交换发生的基本步长对理解整个反应机制有着重要的作用. RecA 作为原核生物重组酶的重要成员, 近年来持续受到广泛关注, 但 RecA 介导的同源重组链交换的步长目前还有争议. 现在主流的观点认为链交换步长为 3 bp, 而我们的前期工作测得步长的最可几值为 9 bp. 为了进一步验证我们的结论, 进而为更深层次的机理研究提供基础, 本文采用酶切保护实验和单分子磁镊, 配合使用不同的错配碱基序列从侧面验证了链交换步长不为 3 bp, 而更倾向于 9 bp, 并分析了一个步长内的错配碱基数目和分布对链交换进程的影响. 该结论为进一步探索重组酶工作的分子机理提供了基础和新的思路.

关键词: RecA, 单分子生物物理, 同源重组, 错配碱基**PACS:** 87.80.Nj, 87.50.uj, 87.15.kj, 87.14.G-**DOI:** 10.7498/aps.69.20200959

1 引言

DNA 是生命体中重要的遗传物质, DNA 的正常复制、转录和翻译是细胞得以稳定繁殖的基础. 当 DNA 受到细胞内部或外部因素的威胁时, 会产生诸如 DNA 断裂等结构性损伤, 损伤严重时可导致癌变或细胞凋亡^[1]. 细胞有一系列机制能够修复这类损伤^[2], 其中有一种以同源 DNA 为模板, 进行严格而精确修复的方式, 称之为同源重组. 同源重组由重组酶介导发生, 原核生物中的 RecA 和真核生物中的 Rad51, DMC1 是重组酶的代表, 它们在其他蛋白共同作用和促进下开展同源重组过程. 下面以本文的研究对象 RecA 重组酶为例对同源重组的过程进行简单说明: 当 DNA 的磷酸骨架断裂, 首先 RecBCD 会处理断链末端, 沿一定方向剪切 DNA 断链位置, 暴露出一段有 3'末端的单链.

在腺苷三磷酸 (ATP) 存在时, RecA 与单链 DNA 形成核蛋白丝结构 (nucleoprotein filament), 搜寻游离双链 DNA 上的同源序列并进行同源匹配, 匹配成功后核蛋白丝入侵双链 DNA 并进行链交换形成三链复合体. 最后由 RuvABC 处理三链复合体, 完成同源重组. 除了修复 DNA 的损伤, 保证遗传信息的稳定性, 同源重组也能促使同源染色体上的同源碱基互换, 引入基因多样性促进生物更快适应环境的变化.

RecA 蛋白是大肠杆菌中 *recA* 基因的表达产物, 分子量 38 kD, 共含有 383 个氨基酸残基. RecA 蛋白的中心区域是包含 240 个氨基酸残基的 ATP 水解酶核心, 除此之外, 还有带 30 个残基的 N 端和 82 个残基的 C 端, N 端和 C 端均带有正电, 它们可以与 DNA 骨架发生相互作用. RecA 蛋白上这两处带有大量正电的区域, 称为第一结合位点和第二结合位点. 单链 DNA 与多个 RecA 单体的第一

† 通信作者. E-mail: xch@iphy.ac.cn

结合位点结合, 形成具有周期螺旋结构的核蛋白丝. 核蛋白丝中, 每个 RecA 单体能够结合三个碱基形成基本结构单元, 这三个碱基称作一个 triplet. 根据 Chen^[3] 等的 X 射线晶体结构结果, 一个 triplet 内部的碱基间距为 0.34 nm, 与 B-DNA 结构中的碱基距离相同, 但两个 triplet 的间距为 0.78 nm, 核蛋白丝包裹的单链呈现拉伸状态, 平均的碱基间距为 0.51 nm. 核蛋白丝的一个周期包含 6.2 个 RecA 单体和 18.5 个碱基, 呈右手螺旋结构. 在同源重组产生的三链结构中, 我们称核蛋白丝包裹的单链为入侵链 (incoming strand), 同源双链中与入侵链配对的链为互补链 (complementary strand), 与入侵链序列相同的链为被置换链 (outgoing strand).

同源重组过程中的序列识别和链交换的分子机制近年来一直是研究热点^[4–6], 而链交换的步长是链交换过程中的一个重要表象, 它可能会是链交换分子机制的一种体现. 因对链交换步长的测定是研究 RecA 分子机制的重要一环. Ragnathan 等^[7] 使用荧光共振能量转移 (FRET) 方法, 通过统计不同长度同源 DNA 链交换反应完成的时间, 推算出链交换是以每步 3 bp 进行的. Lee 等^[8] 使用 DNA 帘 (DNA curtain) 方法, 通过统计标记荧光的 DNA 双链在同源或错配序列上的驻留时间, 计算出无论是 RecA, Rad51 还是 DMC1 体系, 换链步长均是 3 bp. 以 3 bp 为步长的说法很容易被人们接受, 因为一个 RecA 蛋白单体正好结合 3 bp DNA, 但也有研究人员对步长提出其他看法. Prentiss 课题组^[9–12] 参考核蛋白丝的晶体结构, 对链交换过程进行了数学建模, 发现在链交换发生前的同源序列匹配过程中, 互补链处在能同时与入侵链和被置换链配对的位置, 当配对长度为 9 bp 时体系处于最稳定状态, 配对成功后发生换链, 同源序列识别和链交换均是以 9 bp 进行的. 我们前期工作首次使用单分子磁镊, 结合 DNA 发卡结构 (DNA hairpin) 的底物设计, 将反应信号放大^[13], 直观测量了链交换的反应步长. 经统计发现每一步链交换的步长均为 3 bp 的整数倍, 其中最概然长度约为 9 bp, 与 Prentiss 等的理论结果相同, 但与 3 bp 的结论矛盾. 磁镊实验可以得到最直观的实验结果, 但 9 bp 的步长也可能是由 3 个 3 bp 构成的, 只是受到仪器的时间分辨率和空间分辨率的限制而没有观察到. 因此, 目前同源重组的链交换步长

依然没有定论. 我们认为掌握了链交换的步长, 对于发掘同源识别和链交换的机制有着重要的意义, 可以进一步完善对同源重组过程的理解. 因此, 本文用一系列实验来探索 RecA 介导的同源重组链交换步长, 以期从多方面、多角度验证 9 bp 为链交换的最概然长度, 而非 3 bp. 首先运用酶切保护实验, 证明了链交换的步长不是 3 bp, 再使用单分子磁镊测量了一定错配程度序列下的换链总长度, 侧面证实了链交换的步长为 9 bp. 最后通过局域连续错配序列, 再次证明链交换步长不是 3 bp, 同时也分析了这 9 bp 内错配碱基的分布是如何对链交换造成影响的. 本文是使用单分子实验对同源重组过程探究的新的尝试, 运用错配碱基和酶切保护等手法, 为研究提供了新思路.

2 实验材料、设计与操作

2.1 RecA、内切酶及反应溶液

RecA 蛋白购自 New England Biolabs (NEB) 公司. 在磁镊和荧光实验中, 核蛋白丝的链交换反应在 RecA reaction buffer 中进行, 具体成分为 70 mM Tris-Ac (1 M=1 mol/L), 10 mM Mg(Ac)₂, 100 mM NaAc, pH=7.4. 为了保持核蛋白丝的稳定, 每次进液时需要额外补充 5 mM 的 ATP γ S. 酶切时使用了 NEB 公司的 DNaseI 内切酶, 酶切环境为 DNaseI reaction buffer.

2.2 DNA 的制备

磁镊实验中所使用的所有 DNA 序列均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 核苷酸链均稀释在 TE buffer 中. Hairpin DNA 的制备过程参考我们之前的工作^[13].

2.3 磁镊方法的原理和操作

磁镊是一种单分子力谱方法, 可以通过追踪磁球的高度直接观测蛋白质或 DNA 分子的结构变化^[13–17], 实验中使用磁镊结合 DNA hairpin 结构, 对链交换长度进行直接测量. DNA hairpin 是两条具有回文序列的单链, 在小力下能够自然退火形成 B-DNA 双链. 用来代表同源重组过程中的互补链和被置换链. 链交换的发生导致互补链和被置换链打开, 根据打开的长度计算可计算链交换碱基数.

首先将盖玻片用丙酮/甲醇超声清洗 30 min, 再浸泡在浓硫酸:双氧水体积比为 7:3 配制的食人鱼洗液中, 于 95 °C 水浴 2 h, 接着放置在 1% 的 APTES 溶液中修饰 2 h, 具体步骤可参考 [18]. 冲净 APTES 后, 在 1% 的戊二醛溶液中修饰 8 h, 取出冲洗晾干后密封保存. 在实验前取出玻片, 用双面胶和麦拉膜制成封闭的反应池, 反应池下表面用地高辛抗体修饰. 玻片的表面处理和钝化可见参考文献 [19].

DNA 连接完毕后, 将核蛋白丝加入到体系中使反应进行, 通过软件记录磁球位置和时间关系, 绘制反应曲线, 使用数据处理软件收集换链长度等信息.

2.4 酶切保护实验的原理和操作

酶切保护实验涉及单分子荧光成像和酶切. 为了避免激光将反应池内所有荧光激发, 增加实验的背景噪声, 使用 TIRF 场仅激发玻片几百纳米范围内的荧光分子 [4], 通过软件处理实验图像统计酶切前后荧光分子的数量.

实验所用盖玻片的清洗方法直到修饰 APTES 均与磁镊相同, 在 APTES 处理后加入 PEG 钝化玻片表面, 其中掺入 1% 的 biotin-PEG 用来与链亲和素修饰的 DNA 进行特异性链接. 玻片修饰完毕后制成反应池, 连接单链 DNA, 加入 RecA 单体和 ATP γ S 共同孵育 15 min 制备核蛋白丝 [20]. 随后在体系中加入末端标记 Cy3 荧光的双链 DNA. 在打开激光录像时加入抗淬灭体系延长荧光持续时间 [20].

双链首先与核蛋白丝反应 15 min, 15 min 内大部分核蛋白丝都已参与反应. 随后在反应体系中加入 DNaseI 内切酶进行酶切处理. 虽然 ATP γ S 环境下链交换结束后核蛋白丝不易水解, 但为了保证核蛋白丝稳定性, 酶切时间不宜过长, 我们发现 30 min 的酶切已能产生明显的对比效果, 因此酶切时间选定为 30 min. 使用软件对剩余荧光点数进行计数. 对比酶切前后的荧光点数, 可计算出发生完全链交换反应的比例.

2.5 核蛋白丝的制备

磁镊实验中加入的核蛋白丝在反应池外完成制备. 在 RecA 反应 buffer 中将 RecA 蛋白:核苷酸以摩尔比 1:3 的比例混合均匀, 随后补充 5 mM

ATP γ S, 在 37 °C 下孵育 5 min, 取出混合液后即可放入反应池中进行实验. 在荧光实验中, 核蛋白丝在反应池中合成, 取 RecA 原液 2 μ L, 与 100 μ L 的 RecA 反应 buffer 充分混合, 补充 5 mM ATP γ S 后加入到反应池中, RecA 与反应池中的单链 DNA 会自组装形成核蛋白丝结构.

3 实验结果与分析

3.1 验证链交换反应是否以 3 bp 发生

首先要验证的是链交换是否以 3 bp 进行. Lee 等 [8,21] 的 DNA curtain 实验表明, 在 ATP γ S 条件下链交换可以跨过 1 个错配碱基, 但会被两个连续错配碱基阻挡. 如果 3 bp 是换链的基本长度, 既然可以跨过一个错配碱基, 那么如果每一个 triplet 内都含有一个错配碱基时, 也应该可以成功换链. 以此思路我们设计了带有部分错配碱基的 DNA 序列, 序列全长 69 个碱基, 前 45 个碱基为同源序列, 后 24 个碱基为 33% 错配的序列, 错配碱基均匀分布在每个 triplet 中, 即每个 triplet 包含一个错配碱基, 如图 1(a) 所示, 观察链交换反应是否可以跨过所有错配. 同源序列长度大于 18 bp, 满足同源重组链交换反应发生的条件 [22]. 同源碱基提供 DNA 与核蛋白丝的初始反应位点并促使换链反应进行, 形成三链结构.

荧光分子标记在双链中的互补链上, 位于错配一端的末尾位置. 根据原子力显微镜结果 [23], 在同源重组过程中, 如果链交换过程遇到阻碍, 剩余的双链会以接近垂直的角度从核蛋白丝上脱离, 尾部暴露在外部环境中, 可以被内切酶处理. 荧光分子随着被水解的核苷酸链脱离三链结构, 荧光点数减少. 如果链交换反应完全发生, 互补链与入侵链形成的杂合 DNA 被核蛋白丝包裹, 可以保护末尾的核苷酸不被水解, 荧光点数不变. 根据该原理设计了酶切保护实验, 观察核蛋白丝的链交换反应能否容忍错配碱基, 完成整条链的交换. 为了验证核蛋白丝对酶切保护的效果, 使用了完全匹配的序列作为对照组, 示意图如图 1(b) 所示. 酶切实验整体分为全匹配对照组和 33% 周期性错配实验组.

酶切保护实验结果如图 1(c) 所示, 在全匹配对照组实验中, 酶切后荧光点数为酶切前的 96%, 基本没有发生变化. 而 33% 错配的实验中, Cy3 荧光点数在酶切后降为酶切前的 19%, 说明链交换反

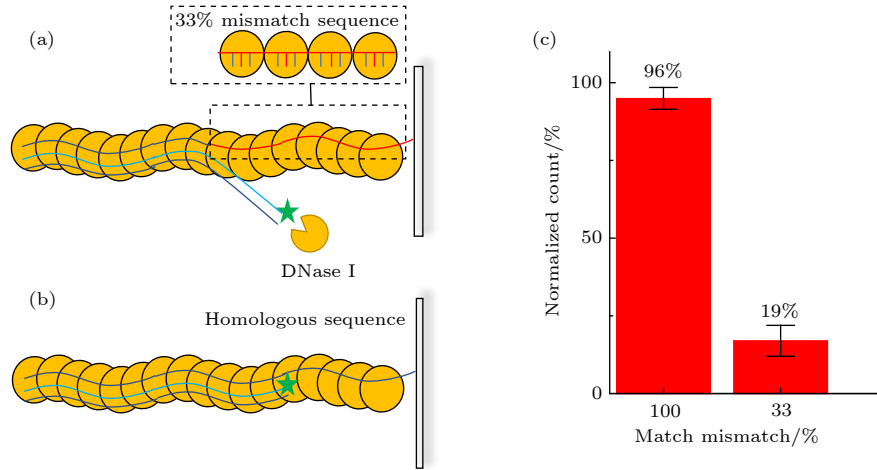


图1 全匹配酶切保护实验的示意图及酶切结果 (a) 包含错配序列的酶切保护实验示意图, 蓝色部分代表同源序列, 红色部分代表错配序列; (b) 在全匹配序列的情况下酶切保护实验示意图; (c) 酶切实验结果, 分别为全匹配序列和 33% 错配序列的酶切情况 (误差线代表统计误差), 酶切时间为 30 min

Fig. 1. The enzyme protection assay: (a) The diagram of the enzyme protection assay with mismatch sequence, blue strands represent homologous sequence and red strand represents mismatched sequence; (b) same as (a) when using completely homologous sequence; (c) the results of enzyme protection assay.

应在中途停止, 互补链和被置换链以 B-DNA 的形式脱离核蛋白丝, 暴露在溶液中的 DNA 末端被 DNase I 切除, Cy3 分子脱离三链结构扩散到了溶液中, 导致荧光点数减少. 与对照组对比, 33% 错配与全匹配的反应现象完全不同, 错配序列没能像全匹配实验一样彻底完成链交换. 结果说明, 当每个 triplet 内平均分布一个错配碱基时, 链交换过程无法克服错配碱基带来的阻碍而中止, 得到链交换可能不是以 3 bp 为步长发生的初步结论.

3.2 使用单分子磁镊观察不同错配程度下的链交换长度

由于酶切保护方法只能验证换链反应是否完全进行, 无法得到链交换终点的准确位置, 观测的现象有一定局限性. 我们使用磁镊方法来定量测量 33% 错配序列下的链交换停止的位置时^[13], 意外得到了步长的信息. 磁镊实验的设计如图 2(a) 所示. 为了保证信号的信噪比, 同时防止较大的力对 DNA hairpin 的稳定性造成影响, 实验中选择了 7 pN 的拉力. 在使用错配序列进行实验前, 先用全匹配序列验证 DNA 长度变化与换链碱基数的对应关系. 全匹配序列长度为 69 个碱基, 根据 FJC 模型^[24,25] 计算在 7 pN 下单链 DNA 的平均碱基间距为 0.31 nm, 即 hairpin 岔口位置每有一个碱基完成链交换, 磁球升高 $0.51+0.31=0.82$ nm. 全匹配序列的实验结果如图 2(b) 所示, 磁球的高

度升高 57 nm, 根据换算对应约 69 bp 的换链, 同源序列对照实验说明长度与碱基的换算关系正确, 接下来的磁镊实验同样使用此对应关系进行换算.

33% 错配实验所用的 DNA 序列与酶切保护实验的序列相同, 前 45 个碱基为同源序列, 后 24 个碱基为错配碱基均匀分布的 33% 错配序列, 定义第 45 个碱基位置为界面, 作为同源序列与错配序列的分界线. 在 ATP γ S 条件下, 假如换链沿着入侵链的 3' 到 5' 方向进行, 即从 DNA hairpin 岔口位置开始向另一侧换链, 将得到如图 2(c) 所示的实验曲线. 对链交换信号处理后, 获得了换链总长度的统计图, 如图 2(d) 所示. 从散点图 (图 2(d)) 可以看出, 换链总长度集中分布于界面位置, 少部分分布于界面之前 9 bp (-9) 的位置, 说明在 33% 错配程度的情况下, 链交换反应无法跨过错配碱基, 导致链交换中止. 磁镊方法定量的给出了换链总长度, 使我们发现了链交换完全无法跨过 33% 周期错配序列这一新的现象. 如换链以 3 bp 为单位进行, 结合链交换可以跨过 1 个错配碱基的结论, 应有部分反应可以跨过界面, 但实验结果显示几乎所有换链均停止在界面之前, 这与酶切保护实验的结果是一致的, 说明链交换可能不是以 3 bp 为步长发生的. 而另一个链交换终点的峰值位于界面之前 9 bp (-9), 说明这部分链交换被阻挡在了界面之前 9 bp, 而 -9 到界面之间并没有明显的峰, 这很可能说明链交换的步长即为 9 bp, 终点在 -9 位

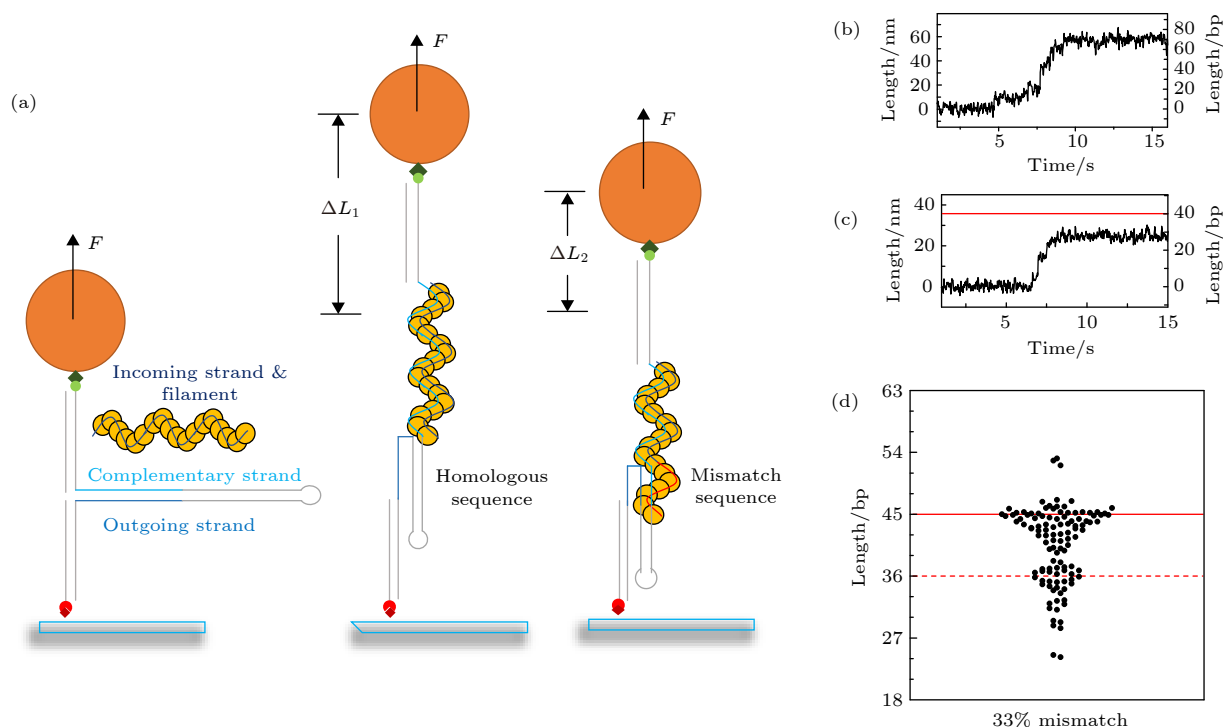


图 2 用磁镊定量测量不同匹配程度序列下的换链长度 (a) 磁镊实验的示意图, 红色链代表错配序列, 蓝色链代表同源序列, 从左到右分别对应链交换反应发生之前, 全匹配序列的链交换反应, 和链交换被错配序列阻挡三种现象; (b) 全匹配序列下的换链曲线, 换链可以进行到末尾; (c) 后 24 个碱基为部分错配时的换链曲线, 红色为界面位置; (d) 33% 错配时的换链长度, 红色实线代表界面位置, 红色虚线为界面前 9 bp 的位置

Fig. 2. Using magnetic tweezers to measure the strand exchange length under different periodic mismatch sequence: (a) From left to right are diagrams of experiments when strand exchange is not happened, strand exchange process under homologous sequence and periodic mismatch sequence, respectively. Red strands represent mismatch sequence and blue strands represent homologous sequence; (b) trace of fully homologous sequence; (c) trace of periodic mismatch sequence; (d) strand exchange length distributions of 33% periodic mismatch sequence, red line marks the interface and red-dashed line marks the position which is 9 bp before the interface.

置的换链正好比终点在界面位置的换链少了一步。

上述现象说明核蛋白丝链交换的步长倾向于以 9 bp 发生而不是 3 bp, 与 Zhang 等^[13]的实验结果相符合. 结合同源比对过程是以 9 bp 进行的理论结果, 推测在同源比对完成后, 紧接着发生了同样长度的链交换. 至于界面到-9 bp 之间的序列, 完全匹配但是为什么仍然不进行链交换, 还需更多的实验来探究, 这可能涉及到同源识别和链交换更深层次的分子机理.

3.3 连续错配碱基对换链的影响

前面的错配实验提示链交换步长倾向为 9 bp 而不是 3 bp, 将错配碱基由周期性均匀分布调整为局域连续分布. 实验使用全长 69 个碱基的同源序列, 从第 40 号碱基开始, 插入 3 个连续错配碱基, 通过磁镊方法判断链交换能否跨过不同长度的连续错配碱基.

实验模型图如图 3(a) 所示, 蓝色部分为同源

序列, 红色部分为连续错配碱基序列, 通过测量磁球高度的变化, 观察链交换反应能否跨过不同长度的局域错配碱基. 为了更直观地表现错配碱基对链交换的影响, 使用柱状图统计了不同错配碱基数时链交换能够跨过界面位置的比例, 结果如图 3(b) 所示, 同样的反应条件和浓度下, 假设全匹配的链交换事件发生的概率是 100%, 所有的链交换行为可跨过 2 个连续错配, 完全发生链交换反应; 7 成的链交换行为可以跨过连续 3 个错配碱基; 83% 的链交换会被 4 个连续碱基阻挡, 停在界面之前. 当连续错配碱基数目为 5 个时, 链交换反应则完全无法跨过错配碱基.

连续 3 个错配碱基的链交换结果进一步说明了链交换的步长并非 3 bp, 如果链交换的步长是 3 bp, 是没有理由跨过 100% 错配的 triplet 的. 同时, 如图 3(c) 所示, 当链交换步长为 9 bp 时, 3 个错配碱基的均匀分布和连续分布在 9 bp 内的错配程度同样为 33%, 却表现了不一样的结果. 对比二者的错

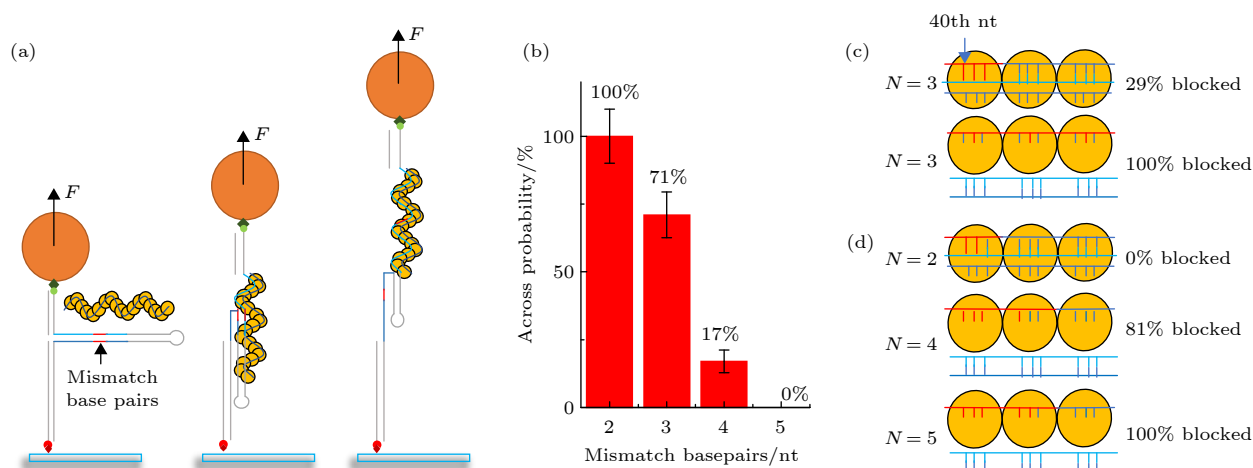


图3 使用磁镊方法探究换链是否能够跨过连续错配碱基 (a) 磁镊实验的示意图, 红色线段位置为错配碱基序列, 蓝色线段为同源碱基序列, 从左到右分别是链交换反应之前, 链交换被错配碱基阻碍和链交换跨过错配序列三种现象; (b) 不同连续错配碱基数目时, 越过错配碱基事件数量的百分比 (误差线代表统计误差); (c) 33% 错配序列和连续 3 bp 错配序列的碱基位置分布, N 为错配碱基数目, 红色代表错配碱基, 蓝色代表同源碱基; (d) 同 (c) 一样, 用来表示 $N = 2, 4$ 和 5 时的错配碱基分布

Fig. 3. Using magnetic tweezers to investigate if strand exchange could stride across continuous mismatch base pairs: (a) From left to right are diagrams of experiments when strand exchange is not happened, strand exchange process blocked by continuous mismatch base pairs and strand exchange process stride across continuous mismatch base pairs, respectively. Red segments represent mismatch base pairs and blue segments represent homologous base pairs; (b) across probability when facing different continuous sequence; (c) the mismatch base pairs distribution of 33% periodic mismatch sequence and 3 bp continuous mismatch sequence, N represents the number of mismatch base pairs; (d) same as (c) when $N = 2, 4$ and 5.

配碱基分布, 33% 错配序列中每 3 个碱基中有一个错配碱基, 界面后的每个 triplet 均受到影响, 而 3 个错配碱基影响的 triplet 数量有限, 所影响的 triplet 数量对链交换有着重要影响.

如图 3(d) 所示, 随着连续错配碱基数量的增加, 9 bp 范围内序列的同源度逐渐降低, 跨过错配碱基的链交换事件减少, 较低的同源度给同源重组过程增加了阻力. 除此之外, 较多的连续错配碱基也使受错配碱基影响的 triplet 数量增加, 在低同源度和受影响 triplet 数量的共同作用下, 5 个连续错配碱基彻底使同源重组反应中止. 实验说明序列同源度和受影响 triplet 数量均会对链交换产生影响, 但它们影响的具体机制和各自的影响效果还需要实验进一步探索.

4 讨论

本文结合了磁镊和酶切保护的方法, 通过不同错配序列的链交换实验, 验证了链交换的步长为 9 bp 的结论. 结合理论与实验结果, 我们认为在同源序列比对过程中, 同时检测 9 bp 序列同源度时的自由能最低^[26], 与链交换步长倾向于以 9 bp 发生存在关联. DNA 在与核蛋白丝进行同源比对时,

被置换链与第二结合位点结合, 第二结合位点提供的结合能, 使被置换链与互补链均能被剧烈拉伸, 但该体系并非处在一个稳定的状态, 趋向于发生链交换形成自由能更低的状态. 因此同源比对成功后会紧接着发生链交换反应, 链交换的长度与同源比对长度相等, 均为 9 bp. 同时, 通过这些实验还发现了均匀分布的错配序列把链交换的终点挡在了界面之前 9 bp, 这个现象可能与链交换的同源识别机制密切相关, 但还需进一步的实验来探索. 我们还发现错配碱基的数量和分布都会对链交换产生影响, 简单来说就是错配程度越高, 错配涉及的 triplet 数目越多, 越难发生链交换. 我们推测, 错配碱基数的增加使发生同源序列比对的 9 bp 内碱基的同源度不断降低, 互补链与入侵链形成杂合双链所降低的自由能无法弥补因含有错配碱基的两条链形成杂合双链产生的不稳定性, 使链交换无法自发进行. 相比于换链步长为 3 bp 的理论, 换链步长为 9 bp 的同源检测机制可以容纳更多的错配碱基, 也能蕴含更多的调控手段, 使同源重组过程具有更灵活的可控性, 从而使其对生物生存的有利程度最大化. 至于同源比对是如何整体考虑 9 bp 内的错配数量和分布, 从而决定是否换链, 其更深层次和更细致的机理, 可能会十分复杂, 还需设计

更多的实验来得到确切的结论. 至于其他人 3 bp 链交换步长的研究结果, 也不能说是完全错误的. 我们认为 3 bp 应该是基本的结构单位, 而 9 bp 是主要的功能单位, 亦或是有更深层的分子机制可以将 3 bp 与 9 bp 的结果统一起来, 这些都需要进一步的实验去证实.

在实验中使用酶切保护实验验证链交换反应是否完全进行, 使用了磁镊观测链交换碱基数的方法, 并通过改变碱基序列进一步发掘了同源重组的链交换机制. 酶切保护实验看到的现象有限, 但是实验数据量多, 适合对猜想进行提前验证; 磁镊实验数据量少但观测的现象丰富, 可以作为实验的主要研究方法. 两种手段相辅相成, 二者亦可结合起来, 拓宽实验设计的范围, 得到新的信息, 进一步推动同源重组过程的研究.

5 结 论

本文使用酶切保护实验证明了同源重组链交换的步长可能不为 3 bp, 用单分子磁镊方法, 通过周期性错配序列, 验证了同源重组的链交换步长倾向为 9 bp. 通过连续错配序列, 也倾向于否定步长为 3 bp 的说法, 同时还发现了 9 bp 内序列的同源度和错配碱基的分布共同对链交换造成影响. 得到以上结论的同时, 我们也得到很多启示, 提示同源重组分子机理的复杂性. 这些尚不能解释的现象促使我们设计更多的实验来一步步深入探索, 逐步解开同源重组分子机制这一大难题.

参考文献

- [1] Blaikley E J, Tinline-Purvis H, Kasperek T R, Marguerat S, Sarkar S, Hulme L, Hussey S, Wee B Y, Deegan R S, Walker C A, Pai C C, Bahler J, Nakagawa T, Humphrey T C 2014 *Nucleic Acids Res.* **42** 5644
- [2] Sakofsky C J, Malkova A 2017 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52** 395
- [3] Chen Z, Yang H, Pavletich N P 2008 *Nature* **453** 489
- [4] Kim S H 2018 *Methods Enzymol.* **600** 233
- [5] Lu C H, Li H W 2017 *ChemPhysChem* **18** 584
- [6] Danilowicz C, Hermans L, Coljee V, Prevost C, Prentiss M 2017 *Nucleic Acids Res.* **45** 8448
- [7] Ragunathan K, Joo C, Ha T 2011 *Structure* **19** 1064
- [8] 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
- [9] Peacock V A, Yang D, Danilowicz C, Feinstein E, Pollock N, McShan S, Coljee V, Prentiss M 2012 *Nucleic Acids Res.* **40** 10441
- [10] 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
- [11] Jiang L L, Prentiss M 2014 *Phys. Rev. E* **90** 022704
- [12] Prentiss M, Prevost C, Danilowicz C 2015 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50** 453
- [13] Zhang Y W, Yan Y, Nong D G, Xu C H, Li M 2016 *Acta Phys. Sin.* **65** 218702 (in Chinese) [张宇微, 颜燕, 农大官, 徐春华, 李明 2016 *物理学报* **65** 218702]
- [14] Danilowicz C B, Coljee V, Bouzig C, Conroy R S, Lubensky D, Sarkar A, Nelson D R, Prentiss M 2003 *Biophys. J.* **84** 301a
- [15] Winkleman A, Gudiksen K L, Ryan D, Whitesides G M, Greenfield D, Prentiss M 2004 *Appl. Phys. Lett.* **85** 2411
- [16] Lipfert J, Hao X M, Dekker N H 2009 *Biophys. J.* **96** 5040
- [17] Ma J B, Zhai Y L, Nong D G, Li J H, Fu H, Zhang X H, Li M, Lu Y, Xu C H 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 148702 (in Chinese) [马建兵, 翟永亮, 农大官, 李菁华, 付航, 张兴华, 李明, 陆颖, 徐春华 2018 *物理学报* **67** 148702]
- [18] Le S M, Yao M X, Chen J, Efremov A K, Azimi S, Yan J 2015 *Nucleic Acids Res.* **43** e113
- [19] Wang Y Z, Hou X M, Ju H P, Xiao X, Xi X G, Dou S X, Wang P Y, Li W 2018 *Chin. Phys. B* **27** 068701
- [20] Zhao Z Y, Xu C H, Li J H, Huang X Y, Ma J B, Lu Y 2017 *Acta Phys. Sin.* **66** 188701 (in Chinese) [赵振业, 徐春华, 李菁华, 黄星楦, 马建兵, 陆颖 2017 *物理学报* **66** 188701]
- [21] Lee J Y, Steinfeld J B, Qi Z, Kwon Y, Sung P, Greene E C 2017 *J. Biol. Chem.* **292** 11125
- [22] 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
- [23] Ristic D, Kanaar R, Wyman C 2011 *Nucleic Acids Res.* **39** 155
- [24] Smith S B, Cui Y, Bustamante C 1996 *Science* **271** 795
- [25] Bustamante C, Marko J F, Siggia E D, Smith S 1994 *Science* **265** 1599
- [26] Vlassakis J, Feinstein E, Yang D, Tilloy A, Weiller D, Kates H J, Coljee V, Prentiss M 2013 *Phys. Rev. E* **87** 012702

Stepwise strand exchange during RecA-induced homologous recombination

Huang Xing-Yuan¹⁾²⁾ Sui Ming-Yu¹⁾³⁾ Hou Wen-Qing¹⁾²⁾
Li Ming¹⁾ Lu Ying¹⁾ Xu Chun-Hua^{1)†}

¹⁾ (*Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

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

³⁾ (*School of Physical Science and Technology, University of Lanzhou, Lanzhou 730000, China*)

(Received 22 June 2020; revised manuscript received 29 June 2020)

Abstract

Homologous recombination (HR) which is important for maintaining the genetic stability of the cell is mainly mediated by recombinase. As a critical recombinase exists in prokaryotic organism, RecA has been widely studied. RecA could bind single strand DNA to form a filament structure to perform strand invasion and exchange with homologous DNA. The basic strand exchange step is a pathway to investigating the mechanism of strand exchange process. However, the specific step length is still controversial. The mainstream view is to regard the basic step as 3 bp, which sounds reasonable because the basic unit of RecA filament is a RecA monomer which binds 3 base pairs, but our previous study found that the most probable basic strand exchange step is 9 bp. In this research, we set up a series of experiments to demonstrate that the basic strand exchange step is 9 bp and how the mismatch base pairs in 9 bp affect the strand exchange process. We use digestion protection to confirm whether the strand exchange process is completed and we employ a magnetic tweezer to measure how many base pairs are exchanged by strand exchange process. The digestion protection experiments show the strand exchange cannot overcome 33% mismatch sequence, but according to the result that strand exchange could overcome a single mismatch base pair, so that the step is not 3 bp. According to strand exchange length of 33% mismatch sequence, we find a 9 bp interval between the main peaks, which implies that the strand exchange step should be 9 bp rather than 3 bp. We also use continuous mismatch base pairs instead of periodic mismatch sequence to see whether the strand exchange process can be overcome. We find that the more the mismatch base pairs, the harder the strand exchange process passes across. Homology degree and its distribution both affect the strand exchange process. In general, the results suggest that the strand exchange step mediated by RecA is 9 bp, and the number of mismatched base pairs and their distribution influence the strand exchange process. The combination of digestion protection assay and magnetic tweezers can further take advantage of single molecule techniques to investigate mechanism of HR.

Keywords: RecA, single-molecule biophysics, homologous recombination, mismatch base pair

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

DOI: 10.7498/aps.69.20200959

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