

纯化组蛋白引起的 DNA 凝聚

冉诗勇 王晓玲 付文博 王渭池 李明*

(中国科学院物理研究所凝聚态物理国家实验室, 北京 100080. *联系人, E-mail: mingli@aphy.iphy.ac.cn)

摘要 利用磁镊装置研究了纯化组蛋白对单根DNA的凝聚. 当组蛋白浓度从 0.002 mmol/L提高到 0.2 mmol/L时, DNA的凝聚速率迅速提高, 大于0.2 mmol/L时, 基本达到饱和. 组蛋白在低浓度时, DNA的凝聚曲线呈指数下降形状, 而在高浓度时, 则转化为 S 形状. 组蛋白在结合 DNA 过程中的协同被用来解释这种转变. 低浓度时组蛋白在 DNA 上随机结合, 而在高浓度时, 由于已结合上的蛋白对 DNA 产生的形变会帮助蛋白结合, 这种协同作用导致了 S 形状的产生. 在较大的力的作用下, DNA/组蛋白复合体的解离曲线呈阶跃形, 台阶的高度约 60 nm. 同时 DNA/组蛋白复合体的拉伸曲线相变平台较 DNA 的相变平台低, 说明组蛋白并不能从 DNA 上完全解离.

关键词 DNA 组蛋白 单分子 磁镊

组蛋白与DNA结合并压缩DNA形成染色质的基本结构——核小体^[1], 这一过程对许多生化过程如基因转录、复制和重组都有重要的影响^[2,3]. 各种不同的方法如电泳和电子显微镜都已经用于研究染色质组装动力学. 这样的研究方法能够得到统计学上的信息, 然而并不能同步研究整个组装过程^[4-6]. 因此研究单根DNA与组蛋白结合并压缩的过程对于研究染色质组装动力学十分重要.

已有一系列的在单分子水平上并加入DNA凝聚因子对染色质组装的研究, 这些研究都是通过记录DNA长度随时间的变化曲线而得到动力学信息的. Ladoux 等人^[7]应用荧光成像方法研究了染色质组装, 提出了一种核小体形成的 3 步模型: () H3-H4 四聚体随机的结合在DNA上形成H3-H4/DNA复合体; () H2A-H2B二聚体与H3-H4/DNA复合体上的两个结合位点结合; () DNA继续在复合体上缠绕形成核小体结构. Leuba 等人^[8]研究了在有组装因子NAP-1 情况下染色质的组装和去组装过程, 发现组装速度与所施加的磁力密切相关, 并且DNA长度间歇性伸长, 表明组装过程是核小体组装/去组装的动态平衡. Wagner 等人^[9]研究了在有组装因子NAP-1 或带负电分子存在的情况下组蛋白对DNA的凝聚, 发现根据所用反应环境的不同和组蛋白末端是否进行了修饰, 凝聚速率能有量级为 1000 的差异. Yan 等人^[10]在非洲爪蟾提取液环境中研究了染色质的组装, 发现ATP水解在核小体重组和解离中起着重要的作用.

上述研究深化了我们对染色质组装的认识, 但是要完整地理解染色质组装的动力学, 是不够的. 例如DNA的缩短曲线形状在不同的研究中呈现不同的形状, 所作的解释也不尽相同^[7-10]. 而且染色质的结构和功能受许多因素影响, 如离子强度、组蛋白修饰和组装因子等因素^[11,12]. 这些因素使得染色质组装动力学变得十分复杂. 我们相信, 要理解染色质组装动力学, 第一步就要理解从纯的组蛋白在没有任何其他因素情况下与DNA的相互作用, 这样就可以避开各种不同因素的影响. 一旦理解了DNA与组蛋白的相互作用, 那么其他因素所起的作用就可以通过一个一个地加入而研究. 普遍认为在低离子环境中, 组蛋白与DNA在没有其他因子的参与下会形成不是核小体结构的聚集体^[13], 但是一篇很早的论文工作表明DNA与组蛋白能够形成核小体结构, 尽管这些核小体并不是均匀分布在DNA上^[14]. 本文所进行的单分子研究证实了这一结论. 实验中观察到组蛋白与DNA的动态结合, 并且在不同的组蛋白浓度作用下, DNA的缩短曲线显示了不同的形状. 这些形状反映了不同的DNA凝聚机制. 我们提出了一种简单地考虑了协同作用的模型来解释观察到的不同形状, 模型与实验曲线拟合得很好.

1 材料与方法

1.1 材料

所用 λ -DNA分子两个黏性末端通过Smith等人^[15]

的方法连上了两个标记过的 12 bp 碱基片段(3'生物素-CCCGCCGCTGGA和 3'地高辛-TCCAGCGG-CGGG)。然后DNA与 2.8 μm 修饰有链亲和素的顺磁球(M-280, Dynal Biotech), 3 μm 修饰有反地高辛的聚苯乙烯小球混合, 因为生物素与链亲和素能够形成共价键, 地高辛与反地高辛形成共价键, 这样就得到了小球-DNA-小球结构的样品溶液。修饰有反地高辛的聚苯乙烯小球是通过在修饰有氨基的聚苯乙烯小球 (Polysciences, Warrington, PA) 铺上反地高辛 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) 得到的。组蛋白 (Sigma, 包含H2A, H2B, H3, H4) 溶液用 5 mmol/L Tris+EDTA 稀释。

1.2 磁镊

整个装置安装在一个倒置显微镜的样品台上(图1)。样品池容积约 1 mL, 通过将 3 个弧形玻璃黏在玻璃衬底上形成, 上面盖上一钻有小孔的玻璃片以防止空气流动的影响, 蛋白从玻璃片的小孔中加入。一根安装在手动操纵仪(KITE3301, World Precision Instruments)上直径约 1 mm 的磁针伸入溶液中对磁球施加磁力。一根玻璃微针安装在三维操纵仪(MP-285, Sutter Instruments, Novato, CA)上以吸取小球。另外一个玻璃微针安装在样品台上, 它们的前端开口直径约 2 μm, 是用微针拉制器(P-97, Sutter Instruments, Novato, CA)拉制的。两根玻璃微针都与一端连有注射器的塑料管相连, 注射器盛有去离子水, 并且塑料管和玻璃微针都充满了去离子水, 这样通过调整注射器的高度, 可以产生正的水压或者负的水压, 从而吸取或放掉需要操纵的小球。

施加在磁球上的力与磁针与磁球距离相关。磁力方向与显微镜焦平面平行, 这样就可以通过 40 ×

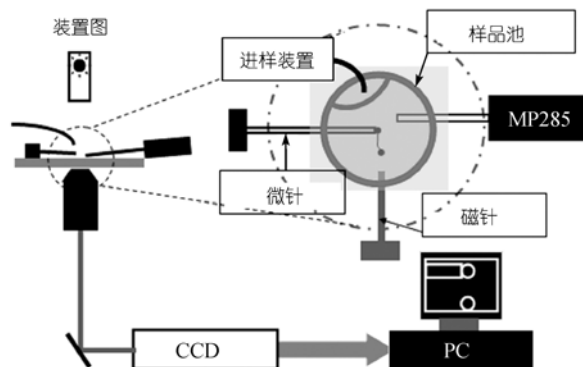


图1 装置图

的物镜成像小球-DNA-小球结构。图像再经两倍放大后通过CCD装置记录, 每秒 25 帧。磁球运动可以通过对图像作傅里叶分析得到^[16]。分析可以得到DNA的长度和磁球的横向位移随时间的变化。磁球的横向位移 ΔX 与力 F 的关系可以通过 $F = K_B T \langle L \rangle / \langle \delta x^2 \rangle$ 得到, 这里 $\langle L \rangle$ 是DNA的末端长度^[17]。力的测量误差约为 10%。必须指出磁针的位置在DNA缩短时是固定的, 根据我们的测量, 在此缩短长度内磁力可近似看作恒定。

2 结果

2.1 凝聚动力学与力相关

当一根 DNA 如图 1 所示悬浮于溶液中后, 20 μL 组蛋白溶液从上方小孔加入。最后样品池组蛋白的浓度约为 0.8 mmol/L。经过约 15 min 后, DNA 开始逐渐缩短。图 2(a)是 DNA 在 1 pN 作用下的凝聚曲线。平均凝聚速率可以通过从曲线中间画一切线得到(见图 2(a)插图)。凝聚速率与施加的外力大致呈指数下降关系(图3)。这可以理解为施加的外力增加了结合

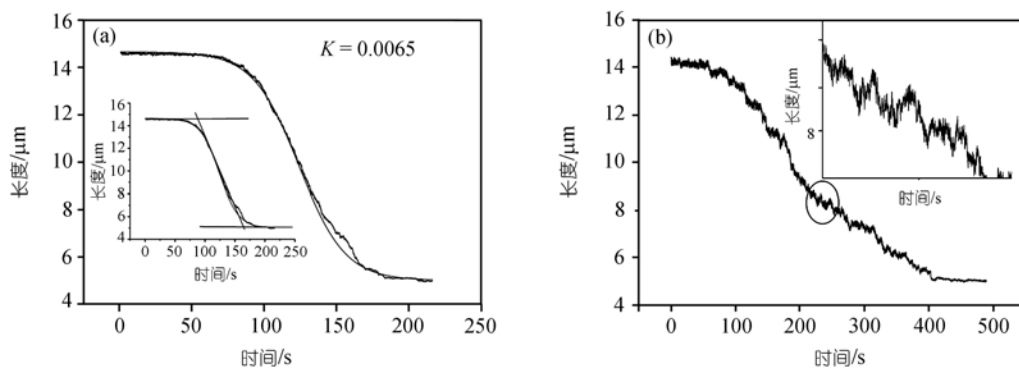


图2 $F = 1$ pN(a)和 $F = 1.3$ pN(b)的磁力作用下的凝聚曲线

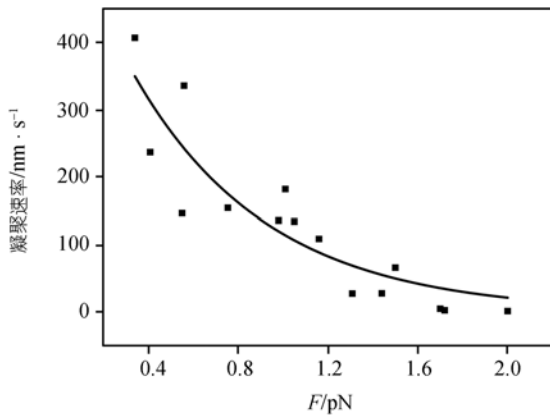


图 3 凝聚速率与磁力呈指数下降关系

过程的能垒. 当力增加到约 2 pN 时, DNA 基本不再缩短. 在小于 1 pN 力的作用下 DNA 的凝聚曲线十分平滑, 与之对比的是当力增加到 1.3 pN 以上后, 曲线呈现锯齿形状(图 2(b)). 这种 DNA 长度的间歇性伸长可以解释为组蛋白从 DNA 上的解离, 表明存在结合/解离动态平衡. 这种锯齿高度高于 50 nm, 超过了整个组蛋白八聚体上缠绕的 DNA 长度. 尽管如此, 这种解离只能是部分的, 这是因为整个八聚体从 DNA 上解离的能垒相当高. 因此可能出现的情况是多个组蛋白/DNA 结构同时解离.

2.2 组蛋白与 DNA 的强结合

已经知道在生理浓度下, 当施加在 DNA 上的外力增加到约 65 pN, DNA 会发生 B-S 相变^[18,19]. 为了研究组蛋白会对 DNA 的力学性质有何影响, 我们将结合组蛋白后的 DNA 进行了拉伸. 实验步骤如下: 一根 DNA 两端所连小球通过两根微针吸住, 一根微针固定在样品台上, 用作测力探针; 另一根安装在操纵仪上. 移动第二根微针将 DNA 拉伸到 B-S 相变平台. 然后 DNA 被移回 6 μm 处, 加入组蛋白. 当过 15 min 反应完全后重新拉伸. 图 4 比较了结合组蛋白后的 DNA 的拉伸曲线与单根 DNA 的拉伸曲线. 微针的弹性系数为 72 pN/μm. 在 15 pN 以上的力的作用下, 复合体拉伸曲线出现锯齿状, 与 Bennink 等人^[20]的结果相似. 这种锯齿状曲线可以理解为组蛋白/DNA 复合体的逐步解离. 锯齿的向上部分显示复合体正在解离, 而接下来的下降表明复合体的重新组织. 但是曲线并没有呈现出明显的周期状. 这可以归因于两个因素. 首先装置的低精度限制了更多细节的展示, 而且组蛋白在 DNA 上的结合由于没有组装因子的参与, 是随机分布的, 在 15 pN 以上力的作用下组蛋白-组蛋白吸附仍

然存在, 能允许更多弛豫. 当 DNA 继续被拉伸时, 更多复合体结构被破坏, 直至相变平台出现. 有趣的是, 平台与未加入蛋白前 DNA 的相比, 不仅提前出现, 而且平台也下降了. 组蛋白缓冲液的因素可以排除, 因为缓冲液环境与样品池内一样. 显然结合上的组蛋白改变了 DNA 的力学性质, 组蛋白在 65 pN 以上的力的作用下仍能结合 DNA, 强的拉伸力并不能完全将组蛋白从 DNA 上完全解离.

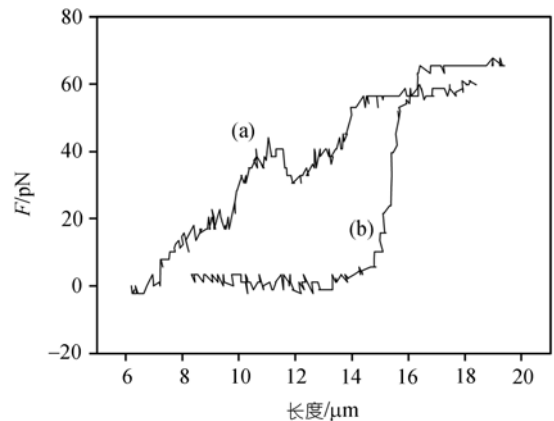


图 4 结合组蛋白后的 DNA 的拉伸曲线(a)与单根 DNA 的拉伸曲线(b)的比较

2.3 DNA-histone 复合体被逐步解离

当一较大的力作用于凝聚后的 DNA 上, 复合体结构可以被破坏. 长度-时间曲线呈现阶跃状(图 5), 表明复合体结构被一个个破坏. 目前阶段我们不能确定复合体的确切结构. 但是观察到的约 60 nm 阶距(见图 5 插图)与在染色质拉伸实验中观察到的阶距十分吻合^[21], 表明复合体结构可能存在核小体典型结构.

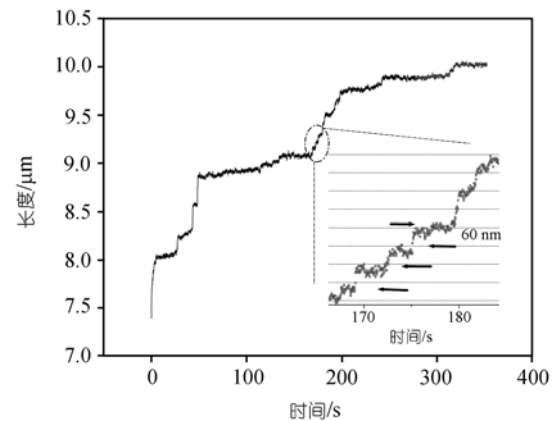


图 5 在 $F = 30$ pN 下复合体随时间变化的解离曲线 插图可以看出圆形区域内离散的阶距

2.4 低组蛋白浓度下凝聚曲线呈指数下降形状, 而高浓度下呈 S 形状

我们研究了不同组蛋白浓度下DNA的凝聚过程. 当组蛋白浓度高于 2 nmol/L时, DNA开始凝聚. 图 6 是组蛋白浓度为 10 nmol/L时的DNA凝聚曲线. 在如此低的蛋白浓度下, DNA只能缩短约 2 μm, 而且曲线呈指数下降形状. 这种指数下降形状表明组蛋白在DNA上的结合是随机独立的. 也就是说, 一个组蛋白在DNA上的结合并不影响其他蛋白在DNA上的结合. 一根DNA可以看作一根半柔性链, 被半径为 r 的蛋白质氛围包围(图 7), 在此范围内的蛋白能与DNA有效地结合. 在此范围内的蛋白数正比于 $C_p(L(t) - L_f)$, 这里 C_p 是蛋白浓度, $L(t)$ 是时间 t 时DNA的长度, L_f 是DNA最后达到的长度. 假设凝聚速率正比于蛋白数目, 可得

$$V = -\frac{dL}{dt} = kC_p(L(t) - L_f), \quad (1)$$

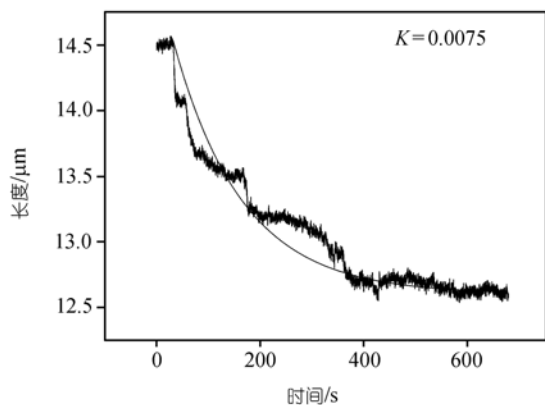


图 6 组蛋白浓度为 10 nmol/L 时 DNA 的凝聚曲线

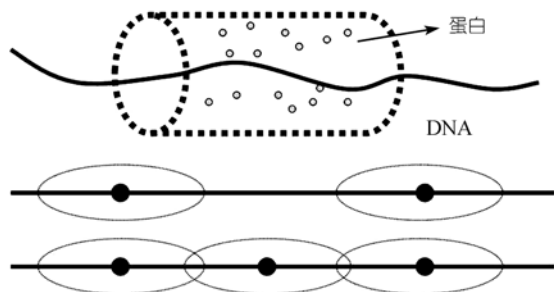


图 7 在外力作用下的一根 DNA 可以被看作一根半柔性链, 被圆柱状氛围的蛋白包围. 当一个蛋白结合上 DNA 后, 由于其对 DNA 造成的形变会存在一个协同范围. 协同范围的重合就导致了组蛋白结合的协同

解(1)式得

$$L(t) = L_f + (L_0 - L_f)e^{-K(t-t_0)}, \quad (2)$$

这里 $K = kC_p$, L_0 是DNA的初始长度. (2)式很好地解释了低浓度下的曲线形状(见图 6).

当浓度从 2 nmol/L 提高到 200 nmol/L 时, 凝聚速率迅速增加. 当浓度增加到 200 nmol/L 时, 速率接近饱和, 在此情况下曲线形状呈 S 形状(图 8), 表明存在另一与低浓度情况下不同的结合模式. 根据 Rudnick 和 Bruinsma^[22]的分析, 当一个蛋白结合到DNA上, 存在一个与力相关的协同范围, 在此范围内能够促进其他蛋白的结合(图 7). 可以合理地推断协同程度与已结合上的蛋白数目成正比. 结合上的蛋白数目 $N_b = k_0(L_0 - L(t))$, 这里 k_0 是能引起单位DNA长度缩短的蛋白数目, $L_0 - L(t)$ 是时间为 t 时DNA所缩短的长度, 可得

$$V = -\frac{dL}{dt} = kC_p(L(t) - L_f)k_0(L_0 - L(t)), \quad (3)$$

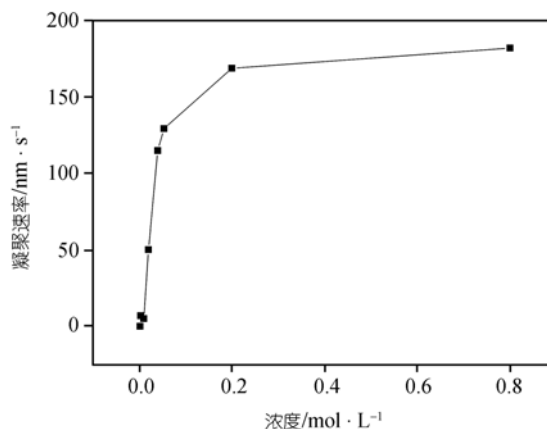


图 8 随着组蛋白浓度的增加, 凝聚速率逐渐增加

一方面, DNA 长度的缩短减少了有效反应体积, 倾向于降低凝聚速率. 另一方面, 结合上的蛋白会促进其他蛋白的结合, 倾向于增加凝聚速率. 解(3)式得

$$L(t) = \frac{L_0 + L_f \left(\frac{L_0 - L_h}{L_h - L_f} \right) e^{(L_0 - L_f) \cdot K \cdot (t - t_h)}}{1 + \left(\frac{L_0 - L_h}{L_h - L_f} \right) e^{(L_0 - L_f) \cdot K \cdot (t - t_h)}}, \quad (4)$$

这里 $K = kC_p k_0$. 必须指出这里的 K 不同于(2)式中的 K . 在时间 t_h 时DNA的长度和最后长度 L_f 可以从曲线中得到. (4)式与实验曲线符合得非常好(见图 2(a)).

2.5 讨论

单分子技术已经被广泛用于研究生化过程中的动力学。在本文中我们研究了单分子水平上的由组蛋白引起的 DNA 凝聚的动力学。研究发现凝聚曲线形状与组蛋白的浓度相关。我们提出了一个考虑了组蛋白之间协同作用的模型来解释观察到的 S 形凝聚曲线。必须指出该模型是较粗糙的,只是用来描述凝聚速率。我们忽略了组蛋白的不同成分逐步结合上去的机理,尽管经过了简化,该模型还是很好地符合了实验数据。

必须指出在本文中我们只研究了组蛋白/DNA 复合体的形成,不同于染色质的核小体结构。尽管如此,将本文实验结果与已发表的关于染色质组装结果比较是相当有意义的。在染色质组装实验中,染色质是在组蛋白与组装因子如 NAP-1 的共存下形成的。根据 Bennink 等人^[20]和 Leuba 等人^[8]的实验结果, DNA 在有组装因子的情况下能够克服约 10 pN 的力形成核小体结构,不同于本文观察到的约 2 pN 的数值。两者的不同可以推断出组装因子的存在能够帮助组蛋白克服能垒与 DNA 结合。由于组蛋白引起的 DNA 的 B-S 相变平台降低和提前(图 4)表明将组蛋白从 DNA 完全解离十分困难。Bennink 等人拉伸单根染色质到了相变平台,但是并没有发现平台的变化。与本文结果比较可能归因于组装因子的存在会帮助组蛋白从 DNA 上解离。

3 结论

我们研究了组蛋白与 DNA 在单分子水平上的相互作用,通过 DNA 的凝聚曲线和拉伸曲线得到了两者的相互作用信息。同时发现组蛋白/DNA 复合体的力-长度曲线与 DNA 的曲线不同,表明组蛋白与 DNA 存在强结合。凝聚曲线能够很好地符合一个考虑了协同作用的模型,表明两者的结合过程是协同的。

参 考 文 献

- 1 van Holde K E. Chromatin. New York: Springer Press, 1988
- 2 Anderson J D, Widom J. Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA targets. *J Mol Biol*, 2000, 296: 979—987[DOI]
- 3 Fyodorov D V, Kadonaga J T. The many faces of chromatin remodeling: Switching beyond transcription. *Cell*, 2001, 106: 523—525[DOI]
- 4 Widom J. Physicochemical studies of the folding of the 100 Å nucleosome filament into the 300 Å filament. *J Mol Biol*, 1986, 190: 411—424[DOI]
- 5 Leuba S H, Yang G, Robert C, et al. Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11621—11625[DOI]
- 6 Zlatanova J, Leuba S H, van Holde K. Chromatin fiber structure: Morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J*, 1998, 74: 2554—2566
- 7 Ladoux B, Quivy J P, Doyle P, et al. Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14251—14256[DOI]
- 8 Leuba S H, Karymov M A, Tomschik M, et al. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: Magnetic tweezers study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 495—500[DOI]
- 9 Wagner G, Bancaud A, Quivy J P, et al. Viopy compaction kinetics on single DNAs: Purified nucleosome reconstitution systems versus crude extract. *Biophys J*, 2005, 89(5): 3647—3659[DOI]
- 10 Yan J, Maresca T J, Skoko D, et al. Micromanipulation studies of chromatin fibers in *Xenopus* egg extracts reveal ATP-dependent chromatin assembly dynamics. *Mol Biol Cell*, 2006, 18(2): 464—474[DOI]
- 11 Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403: 41—45[DOI]
- 12 Haushalter K A, Kadonaga J T. Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 615—620
- 13 Lusser A, Kadonaga J T. Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Meth*, 2004, 1 (1): 19—26[DOI]
- 14 Ruiz-Carrillo A, Jorcano J L, Eder G, et al. In vitro core particle and nucleosome assembly at physiological ionic strength. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 3284—3288
- 15 Smith S B, Finzi L, Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 1992, 258: 1122—1126[DOI]
- 16 Strick T R, Allemand J F, Bensimon D, et al. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys J*, 1998, 74: 2016—2028
- 17 Strick T R, Allemand J F, Bensimon D, et al. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 2001, 271: 1835—1837
- 18 Cluzel P, Lebrun A, Heller C, et al. DNA: An extensible molecule. *Science*, 1996, 271: 792—794[DOI]
- 19 Smith S B, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single stranded DNA molecules. *Science*, 1996, 271: 795—799[DOI]
- 20 Bennink M, Leuba S, Leno G, et al. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Biol*, 2000, 8: 606—610
- 21 Brower-Toland B D, Smith C L, Yeh R C, et al. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1960—1965[DOI]
- 22 Rudnick J, Bruinsma R. DNA-protein cooperative binding through variable-range elastic coupling. *Biophys J*, 1999, 76: 1725—1733