

## 一种单分子操纵 DNA-组蛋白复合物的新方法

焦卓锋, 马秋梅, 王艳伟, 冉诗勇, 杨光参\*

(温州大学 物理与电子信息工程学院, 浙江 温州 325035)

**摘要:**介绍了在云母表面一种拉直  $\lambda$ -DNA-组蛋白复合物的新方法. 借助原子力显微成像表明, 该方法不但对裸  $\lambda$ -DNA 的拉直效果较好, 而且可以拉直不同浓度的 DNA-组蛋白的复合物. 利用此方法可以在单分子水平上研究 DNA 的复制、转录过程以及 DNA-蛋白质相互作用.

**关键词:**  $\lambda$ -DNA; 组蛋白; 原子力显微术; 拉直

中图分类号: Q 633

文献标志码: A

文章编号: 1008-9497(2011)01-038-03

JIAO Zhuo-feng, MA Qiu-mei, WANG Yan-wei, RAN Shi-yong, YANG Guang-can\* (*College of Physics and Electronic Information Engineering, Wenzhou University, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China*)

**A new method of aligning  $\lambda$ -DNA-histone complexes at the single molecule level.** Journal of Zhejiang University(Science Edition), 2011, 38(1):038-040

**Abstract:** This paper described a new method of straightening  $\lambda$ -DNA-histone complexes on mica surface. The atomic force microscopy imaging of the samples indicated that we can not only straighten bare  $\lambda$ -DNA effectively and well, but also  $\lambda$ -DNA-histone complexes, of which the concentration of histone varied by using this method. This method can be employed in transcription process of DNA and DNA-protein interactions at the single molecule level.

**Key Words:**  $\lambda$ -DNA; histone; atomic force microscopy; aligning

近年来, 拉伸 DNA 已成为研究 DNA 的一个重要手段, 而原子力显微术 (AFM) 则极大地方便了对单分子 DNA 的观察. 人们已发明许多方法来拉伸 DNA 分子: 原子力显微镜微悬臂法<sup>[1]</sup>、光镊<sup>[2,3]</sup>、磁镊<sup>[4,5]</sup>、旋转法<sup>[6]</sup>、液流法<sup>[7]</sup>、吹气法<sup>[8]</sup> 和分子梳技术<sup>[9]</sup> 等. 但目前以上方法只应用于拉伸 DNA 分子, 极少应用于拉伸 DNA 与组蛋白的复合体. 组蛋白是一种很重要的蛋白质, 对 DNA 分子的压缩起着重要的作用, 在一定范围内它可以使 DNA 分子折叠成更加有序的高级结构. 活细胞或噬菌体中的 DNA 分子都以紧密堆积的形式存在, 其体积仅仅是自由分散状态的  $10^{-4} \sim 10^{-6}$ , 这种结构不仅具有所占空间较小的特点, 而且与基因表达的自我调控密切相关, 因而具有重要的生物学意义. 真核生物中,

形成染色质时组蛋白与 DNA 紧密结合. 作者借助于原子力显微镜对 DNA 与组蛋白的结合能力进行了初步研究, 实验中, 对 DNA-组蛋白复合物进行了拉直操作, 并对其他浓度组蛋白的 DNA 溶液进行了研究. 通过研究被拉直的 DNA 分子吸附的组蛋白数量, 可以得知组蛋白浓度变化对二者相互作用的影响, 这有助于在单分子水平上研究 DNA-组蛋白的相互作用. 另外, 由于 DNA 与组蛋白两者均为生物大分子, 它们之间的相互作用非常复杂, 影响因素也很多. 本实验提供了一个研究这些相互作用的出发点, 将有助于弄清通常很长的 DNA 分子 (例如, 人的 DNA 分子展开后的长度近两米) 是通过哪些机制被折叠的. 目前, 从物理学的观点上对这一问题的理解仍具有挑战性, 是一个值得从理论和实验

收稿日期: 2010-01-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10974146); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y6090222).

作者简介: 焦卓锋 (1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物物理研究.

\* 通信作者, E-mail: yanggc@wzu.edu.cn

两方面深入探讨的悬而未决的科学问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

实验过程中超纯水电阻率  $> 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。 $\lambda$ -DNA(48,502 bp)购于 NEB 公司,3-Aminopropyltriethoxysilane(APTES)和组蛋白购于 Sigma 公司。

在实验时,采用 TE( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0, and  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA)作为缓冲液来稀释  $\lambda$ -DNA。本文实验中 DNA 质量浓度均为  $1.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , DNA-组蛋白混合液先配制好,室温下培育 24 h 以上待用,组蛋白浓度则根据需要调节。

### 1.2 云母表面处理

实验中,采用 APTES 处理的云母来成像复合物<sup>[10-11]</sup>。APTES 处理云母过程如下:首先取质量分数为 1% 的 APTES 水溶液约  $30 \mu\text{L}$  滴在新解理的云母表面,放置约 15 min,用超纯水冲洗约 5 min,氮气吹干,然后  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  高温加热 30 min,冷却后干燥器中待用。

### 1.3 拉直处理

第一步:将约  $20 \mu\text{L}$  DNA-组蛋白复合物滴在 APTES 处理过的云母片上(由于疏水缘故,小液滴呈现小珠状),样品沉积在云母表面约 5 min,用镊子夹着云母片与桌面成  $45^\circ$  角,氮气朝液滴上方与云母成较小角度吹液滴,液滴便会沿着表面慢慢向下移动,最终吹离表面。

第二步:接着用移液器滴约  $20 \mu\text{L}$  纯水在云母上,用移液器枪嘴稍微接触液滴的边缘,按照第一步中液滴移动的方向慢慢吸走样品,如此重复 20 次左右,氮气吹干,干燥。对于裸 DNA 的拉直也按此操作。

### 1.4 仪器表征

原子力显微镜<sup>[12]</sup>为 SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japan),针尖购买自 Nanoworld,力常数为  $42 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ ,样品在室温下以 Tapping mode 在空气中成像,相对湿度为 30%~40%。所有图像采集的扫描速度为 2~3 Hz,像素为  $512 \times 512$ ,所有图片只经过平滑与去噪声处理。

## 2 结果和讨论

因为云母具有原子级平整度的表面,而被广泛用来作为原子力显微术样品的基底。生物样品如 DNA、蛋白质等,都可被吸附在云母表面较好成像。

作者利用 APTES 处理过的云母片,根据材料和方法中的操作方法,首先对裸  $\lambda$ -DNA 进行了拉直操作。图 1 为  $\lambda$ -DNA 在云母表面的拉直形貌。 $\lambda$ -DNA 浓度均为  $1.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,图 1A 为放大的拉直的单根  $\lambda$ -DNA,图 1B 为范围较大的拉直的多根  $\lambda$ -DNA。图 1B 中多根 DNA 分子链被并列地排列,表面较干净清晰,成像效果较好。如果在对样品拉直时,只做第一步,那么成像图像表面非常粗糙以致难以较好观察到 DNA 分子。第二步用纯水洗涤,可以洗掉云母表面所形成的盐和未吸附牢的样品<sup>[10]</sup>。所以在实验时,两步骤都不可避免,这样才能清晰成像拉直的 DNA。

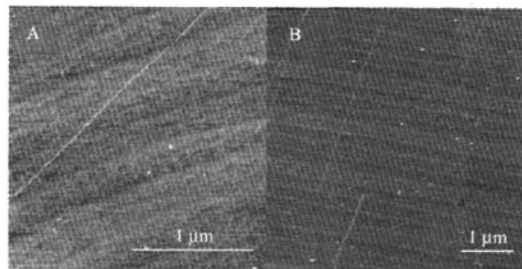


图 1 AFM 在 APTES 修饰的云母表面成像裸的拉直的  $\lambda$ -DNA

Fig. 1 AFM imaging of bare and straightened  $\lambda$ -DNA on APTES modified mica

对于裸 DNA 的拉直已有较深入的研究,而对结合有组蛋白的 DNA 拉直却鲜有介绍。基于此,作者对  $\lambda$ -DNA-组蛋白复合物在云母表面的拉直进行了尝试。在这里  $\lambda$ -DNA 质量浓度为  $1.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,组蛋白浓度为  $34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。图 2 中笔直的线条为拉直的  $\lambda$ -DNA 分子,线条上白色的圆点为 DNA-组蛋白复合物。通过拉直,可以方便做很多工作,如测量 DNA 长度,找到 DNA-组蛋白结合位置,统计两者的结合数量等。

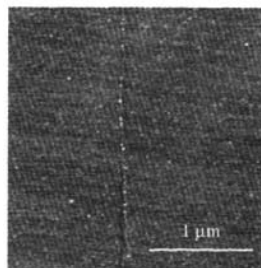


图 2 云母表面为 APTES 处理,组蛋白浓度为  $34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,AFM 成像拉直的吸附有组蛋白的  $\lambda$ -DNA

Fig. 2 AFM imaging of extended  $\lambda$ -DNA attached histones on APTES modified mica. The histone concentration is  $34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

文献<sup>[13]</sup>曾报道,通过荧光显微镜观察到当组

蛋白浓度很大时,分子梳技术很难把 DNA-组蛋白复合物进行完全拉直.用笔者的方法也对高浓度组蛋白情况下的 DNA 进行了研究.如图 3 所示,DNA 被较好地拉直在云母表面.其中 DNA 质量浓度为  $1.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,组蛋白浓度为  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .笔者试着做更高浓度的组蛋白与 DNA 复合体研究,然而组蛋白浓度太大而导致云母无法吸附 DNA.图中白点表示 DNA 与组蛋白形成的复合体,与图 2 相比,图 3 中复合体密度要大得多.实验结果也表明,组蛋白与 DNA 的结合数量会随着组蛋白浓度增加而增加.组蛋白的参与会引起 DNA 发生一定程度凝聚<sup>[14]</sup>,要对 DNA 进行拉直必须克服这种凝聚力.虽然未能在更高浓度组蛋白存在的情况下对 DNA 进行拉直,但是,当组蛋白浓度在一定范围内时,此方法对 DNA 的拉直效果还比较好.

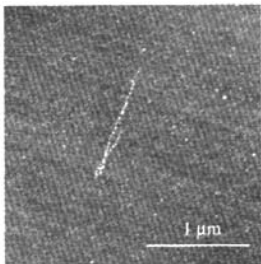


图 3 云母表面为 APTES 处理,组蛋白浓度为  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,AFM 成像拉直的吸附有组蛋白的  $\lambda$ -DNA  
Fig. 3 AFM imaging of extended  $\lambda$ -DNA attached histones on APTES modified mica. The histone concentration is  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

因为 DNA 分子链越长越倾向于缠绕在一起,对 DNA 分子链的部分拉直相对容易,然而要想把整个长的 DNA 拉直却是一个挑战.因为在对 DNA 分子链拉直时,DNA 所受到的外力要刚好适宜.太小的力不能较好拉直 DNA 分子,而太大的力很容易使 DNA 断裂.这里笔者对附着有组蛋白的  $\lambda$ -DNA 链进行了一些尝试(见图 4).图 4 由两张图片合成,显示同一根  $\lambda$ -DNA 被较好地拉直在经 APTES 处理过的云母表面,DNA 链上附着的白点为  $\lambda$ -DNA-组蛋白复合物.通过测量知 DNA 长约  $9 \mu\text{m}$ ,而  $\lambda$ -DNA 原长约为  $16.4 \mu\text{m}$ .文献<sup>[13]</sup>指出,组蛋白的结合会使  $\lambda$ -DNA 表现长度减小,结合的蛋白数目越多,DNA 长度也会缩短得越多.这里一方面由于组蛋白引起 DNA 长度缩短,另一方面也不排除  $\lambda$ -DNA 链被部分拉断,图中所观察到的只是整个 DNA 链的一部分.因此从不严格意义上说,此方法基本能拉直整个  $\lambda$ -DNA 分子.

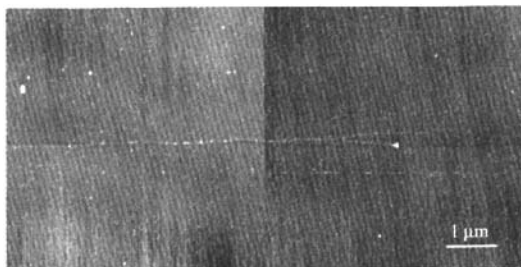


图 4 组蛋白浓度为  $34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,AFM 成像单根的整体分子被拉直的  $\lambda$ -DNA

Fig. 4 AFM imaging of the whole length of sole and straightened  $\lambda$ -DNA, the histone concentration is  $34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

### 3 结 论

此方法操作简单,重复性较好,结合了文献<sup>[8]</sup>与<sup>[15]</sup>的优点,是两种方法的有效结合.利用此方法首先对裸  $\lambda$ -DNA 在 APTES 处理的云母表面较好成像,接着也成功拉直了  $\lambda$ -DNA-组蛋白复合物.结果表明只要组蛋白浓度在一定范围内时, $\lambda$ -DNA 就能较好被拉直,且成像清晰.此方法是对 DNA 拉直技术的丰富与发展,利用此方法可以在单分子水平上研究 DNA 的复制、转录过程以及 DNA-蛋白质相互作用.

### 参考文献 (References):

- [1] ENGEL A, GAUB H, MÜLLER D. Atomic force microscopy: a forceful way with single molecules[J]. *Current Biology*, 1999, 9: 133-136.
- [2] BAUMANN C, BLOOMFIELD V, SMITH S, et al. Stretching of single collapsed DNA molecules[J]. *Biophysical J*, 2000, 78(4): 1965-1978.
- [3] STRICK T, ALLEMAND J, BENSIMON D, et al. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule[J]. *Science*, 1996, 271(5257): 1835-1837.
- [4] SMITH S, FINZI L, BUSTAMANTE C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads[J]. *Science*, 1992, 258(5085): 1122-1126.
- [5] ARAI Y, YASUDA R, AKASHI K, et al. Tying a molecular knot with optical tweezers[J]. *Nature*, 1999, 399(6735): 446-448.
- [6] YOKOTA H, SUNWOO J, SARIKAYA M, et al. Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy[J]. *Anal Chem*, 1999, 71(19): 4418-4422.

(下转第 45 页)

- Machines for Pattern Recognition: A Survey. Pattern Recognition with Support Vector Machines**[M]. Berlin: Springer, 2002; 571—591.
- [6] MATOS F M D S, BATISTA L V, POEL J V D. Face recognition using DCT coefficients selection [C]//**ACM Symposium on Applied Computing**. Fortaleza, Ceara, Brazil; ACM, 2008; 1753—1757.
- [7] HONG X, YAO H, WAN Y, et al. A PCA based visual DCT feature extraction method for lip-reading [C]//**International Conference on Intelligent Information Hiding and Multimedia**. Los Alamitos, CA; IEEE Computer Society, 2006; 321—326.
- [8] GUYON I, ELISSEEFF A. An introduction to variable and feature selection [J]. **J Machine Learning Research**, 2003, 3(4): 1157—1182.
- [9] GOLDBERG D. **Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning**[M]. Reading, MA: Addison Wesley, 1989.
- [10] CHANG C-C, LIN C-J. 2001. LIBSVM: a library for support vector machines [CP/OL][2010-3-7]. <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>.  
(责任编辑 涂 红)

(上接第 40 页)

- [7] LEDUC P, HABER C, BAO G, et al. Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow[J]. **Nature**, 1999, 399(6736): 564—566.
- [8] LI J, BAI C, WANG C, et al. A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy[J]. **Nucleic Acids Research**, 1998, 26(20): 4785—4786.
- [9] BENSIMON A, SIMON A, CHIFFAUDEL A, et al. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface[J]. **Science**, 1994, 265(5181): 2096—2098.
- [10] LYUBCHENKO Y, GALL A, SHLYAKHTENKO L, et al. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA[J]. **J of Biomolecular Structure & Dynamics**, 1992, 10(3): 589—606.
- [11] LYUBCHENKO Y, BLANKENSHIP R, GALL A, et al. Atomic force microscopy of DNA, nucleoproteins and cellular complexes; the use of functionalized substrates [J]. **Scanning Microscopy Supplement**, 1996, 10: 97—107.
- [12] BINNIG G, QUATE C, GERBER C. Atomic force microscope[J]. **Physical Review Letters**, 1986, 56(9): 930—933.
- [13] 刘玉颖, 窦硕星, 王鹏业, 等. 应用分子梳技术对 DNA 与组蛋白相互作用的研究[J]. **物理学报**, 2005, 54(2): 622—627.  
LIU Yu-ying, DOU Shuo-xing, WANG Peng-ye, et al. Study of interactions between DNA and histone with molecular combing method[J]. **Acta Physica Sinica**, 2005, 54(2): 622—627.
- [14] ENDLICH N, GREULICH K. Observation and manipulation of different structural variants of individual cation-DNA complexes in the light microscope[J]. **J of Biotechnology**, 1995, 41(2—3): 149—153.
- [15] LIU Z, LI Z, ZHOU H, et al. Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid[J]. **Microscopy Research and Technique**, 2005, 66(4): 179—185.  
(责任编辑 涂 红)

作者: 焦卓锋, 马秋梅, 王艳伟, 冉诗勇, 杨光参, JIAO Zhuo-feng, MA Qiu-mei, WANG Yan-wei, RAN Shi-yong, YANG Guang-can  
作者单位: 温州大学, 物理与电子信息工程学院, 浙江, 温州, 325035  
刊名: 浙江大学学报(理学版)   
英文刊名: JOURNAL OF ZHEJIANG UNIVERSITY (SCIENCE EDITION)  
年, 卷(期): 2011, 38(1)

## 参考文献(30条)

1. LEDUC P; HABER C; BAO G [Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow](#) 1999(6736)
2. ENGEL A; GAUB H; MLLER D [Atomic force microscopy: a forceful way with single molecules](#) 1999
3. YOKOTA H; SUNWOO J; SARIKAYA M [Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy](#) 1999(19)
4. BAUMANN C; BLOOMFIELD V; SMITH S [Stretching of single collapsed DNA molecules](#) 2000(4)
5. ARAI Y; YASUDA R; AKASHI K [Tying a molecular knot with optical tweezers](#)[外文期刊] 1999(6735)
6. STRICK T; ALLEMAND J; BENSIMON D [The elasticity of a single supercoiled DNA molecule](#) 1996(5257)
7. BAUMANN C; BLOOMFIELD V; SMITH S [Stretching of single collapsed DNA molecules](#)[外文期刊] 2000(04)
8. SMITH S; FINZI L; BUSTAMANTE C [Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads](#) 1992(5085)
9. ENGEL A; GAUB H; MLLER D [Atomic force microscopy: a forceful way with single molecules](#)[外文期刊] 1999(4)
10. ARAI Y; YASUDA R; AKASHI K [Tying a molecular knot with optical tweezers](#) 1999(6735)
11. BENSIMON A; SIMON A; CHIFFAUDEL A [Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface](#)[外文期刊] 1994(5181)
12. YOKOTA H; SUNWOO J; SARIKAYA M [Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy](#) 1999(19)
13. LI J; BAI C; WANG C [A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy](#)[外文期刊] 1998(20)
14. LEDUC P; HABER C; BAO G [Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow](#) 1999(6736)
15. LIU Z; LI Z; ZHOU H [Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid](#) 2005(04)
16. LI J; BAI C; WANG C [A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy](#) 1998(20)
17. ENDLICH N; GREULICH K [Observation and manipulation of different structural variants of individual cation-DNA complexes in the light microscope](#) 1995(2-3)
18. BENSIMON A; SIMON A; CHIFFAUDEL A [Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface](#) 1994(5181)
19. 刘玉颖; 窦硕星; 王鹏业 [应用分子梳技术对DNA与组蛋白相互作用的研究](#)[期刊论文]-[物理学报](#) 2005(02)
20. LYUBCHENKO Y; GALL A; SHLYAKHTENKO L [Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA](#) 1992(3)

21. [BINNIG G;QUATE C;GERBER C Atomic force microscope 1986\(09\)](#)
22. [LYUBCHENKO Y.BLANKENSHIP R,GALL A Atomic force microscopy of DNA,nucleoproteins and cellular complexes:the use of functionalized substrates 1996](#)
23. [LYUBCHENKO Y;BLANKENSHIP R;GALL A Atomic force microscopy of DNA,nucleoproteins and cellular complexes:the use of functionalized substrates 1996](#)
24. [BINNIG G,QUATE C.GERBER C Atomic force microscope 1986\(9\)](#)
25. [LYUBCHENKO Y;GALL A;SHLYAKHTENKO L Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA 1992\(03\)](#)
26. [刘玉颖. 窦硕星. 王鹏业. 谢平. 王渭池 应用分子梳技术对DNA与组蛋白相互作用的研究 2005\(2\)](#)
27. [SMITH S;FINZI L;BUSTAMANTE C Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads\[外文期刊\] 1992\(5085\)](#)
28. [ENDLICH N.GREULICH K Observation and manipulation of different structural variants of individual cation-DNA complexes in the light microscope 1995\(2-3\)](#)
29. [STRICK T;ALLEMAND J;BENSIMON D The elasticity of a single supercoiled DNA molecule\[外文期刊\] 1996\(5257\)](#)
30. [LIU Z,LI Z,ZHOU H Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid 2005\(4\)](#)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zjdxxb201101010.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zjdxxb201101010.aspx)