

亚精胺诱导 λ -DNA 凝聚现象的 AFM 研究*

林 章 王 琛 苏 明 田 芳 马 金 白春礼 **

(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

摘要 生物体内 DNA 的紧密堆积存在方式与基因表达的自我调控机制有关, 因此研究体内凝聚诱导物对 DNA 凝聚所起的作用具有重要意义。采用原子力显微镜 (AFM) 研究了这一体系。研究表明: 亚精胺可直接诱导 λ -DNA 形成一种特殊的结构——环形凝聚体; 环形凝聚体的形成受动力学因素(时间, 浓度)影响较大; 环形凝聚体由纳米级小颗粒紧密排列而成; 凝聚机制可能是以这些颗粒为组成单元的螺旋盘绕过程。所得结论对生物体内 DNA 凝聚过程的理论研究具有重要意义。

关键词 环形凝聚体 亚精胺 原子力显微镜 颗粒堆积与螺旋盘绕过程

在生物的活细胞和细菌体内, DNA 以紧密堆积方式 (packaged state) 存在, 深入理解 DNA 的凝聚行为对于理解基因表达的自我调控和自我转换机制有重要意义。生物体内 DNA 紧密堆积主要借助于多价阳离子 (通常是聚胺)、蛋白质来完成^[1]。在体外实验中, Gosule 等^[2]通过电子显微镜首次观察到在缺少 ATP 和蛋白质的存在下, 正三价的亚精胺可直接诱导 DNA 凝缩成为环状、棒状的结构。由于这一结构的特殊性以及亚精胺与基因表达的许多过程的重要关联, 研究者们认为环形凝聚态可能是最接近于 DNA 在生物体内有序存储的一种状态^[3]。因此 70 年代至今, 这一领域一直在进行着许多实验和理论研究。例如圆二色谱表明在该凝聚中 DNA 仅有部分构象变化^[4,5]; Baeza 等^[6]研究发现环形凝聚态有抗限制性内切酶的作用。Wilson 等^[7]通过光散射手段研究了不同价态的阳离子如 Na^+ , Mg^{2+} 、正三价的亚精胺和正四价的精胺对凝聚的影响, 认为不同的离子对 DNA 的磷酸根上的负电荷的中和能力不同, 凝聚仅发生在 DNA 的负电荷被中和到 89% 以上。另外, 研究还认为环形凝聚体的尺寸在 100 nm 左右, 并与 DNA 片段的长短无关, 一经形成后其大小随时间变化不大^[8]。

目前基本认为环状凝聚体的结构单元是 DNA 链, 即如顺序盘绕模型或固有直径环绕模型均提出的环形凝聚体可能是由高度有序排列的 DNA 链不断地盘绕而成^[9]。然而由于电子显微镜对环形凝聚体的观测缺少细节形态信息, 而光散射等实验手段仅提供平均信息, 导致关于凝聚行为物理机制这一重要研究在较大程度上有一定的不确定性。

1997-07-23 收稿, 1997-11-24 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 29525304)

** 联系人

本文采用 AFM 观察亚精胺诱导 DNA 凝聚体系。所得到的凝聚体在结构和尺寸上均和电子显微镜的结果相符,证实了环形凝聚态这种特殊结构的确是由亚精胺诱导所致。利用 AFM 更高的分辨率还发现环形凝聚体由小颗粒密排列而成;实验观察到在较短的反应时间下,环形凝聚态与其他类环形过渡态(未完全闭合的环,U型结构)并存的现象,表明凝聚过程不可能简单地是 DNA 的有序平行盘绕。此外,研究还发现凝聚体的形成受动力学因素(时间,浓度)影响较大。这些结果为提出环形凝聚体的形成的新模型提供了实验背景,有利于进一步研究凝聚机理从而理解生物体内 DNA 的存在方式。

1 材料与方法

1.1 样品来源

λ -DNA 购自 Promega(USA)公司,储存条件为:100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA。亚精胺($C_7H_{19}N_3 \cdot 3HCl$, Mr 254.6)华美生物工程公司生产,分析纯。

1.2 样品制备方法及 AFM 成象

DNA 凝聚体的制备过程:用 3 次蒸馏水将 λ -DNA($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)稀释使其最终浓度为 $2.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。亚精胺用三次蒸馏水配成浓度为 $200 \mu\text{mol}/\text{L}$ ^[4]的溶液。分别取上述两溶液各 $2 \mu\text{L}$ 于无菌管中混合,静置 10 min。

AFM 样品制备:从无菌管底部吸取 $2 \mu\text{L}$ 上述混合溶液,滴加到新鲜解离的云母表面,红外灯下快速烤干后,用 AFM 观察云母表面 DNA 凝聚体的结构。

原子力显微镜(Nanoscope III, Digital Instruments)。微悬臂长度为 $200 \mu\text{m}$, 力常数为 0.12 N/m , 成像模式为接触式(contact mode), 图象采集为 Height 方式。

2 结果与讨论

由于用 AFM 对凝聚体进行观测时,制样过程快速、简单,仅涉及到 DNA 快速吸附到云母基底的过程,它的观测结果与以往电子显微镜的结果相符合,可证明环状凝聚态这一特殊结构并非由于电子显微镜观测时使用的染色剂以及复杂的制样过程所致。此外,AFM 所具有的高分辨能力,有利于进一步研究凝聚体的精细结构和凝聚机制。

图 1 所示是未加亚精胺的 λ -DNA 的典型 AFM 图象,如图所示,由溶液的自由状态直接吸附到云母基底的 DNA 分子呈线性舒展或局部缠绕状态。图 2 所示是相同条件下 λ -DNA 经亚精胺诱导反应 10 min 后的 AFM 图象。由图 1 和图 2 的形貌及高度对比我们可以知道加入亚精胺前后 DNA 的状态有明显不同。加入亚精胺后 DNA 由图 1 的自由链形式变为一些独立凝缩且高度相当高的凝聚体,这表明凝聚由亚精胺直接诱导产生。由图 2(a)我们可以看到:凝聚体的形态主要为环状或弯曲棒状,统计结果表明环形凝聚体外圈直径为 $(114.4 \pm 18.96) \text{ nm}$, 高度为 $(16.76 \pm 1.82) \text{ nm}$ 。弯曲棒状凝聚体在高度和周长上和环形凝聚体相似。图 2(b)是一种较为常见的环状凝聚体,高度约 20 nm 。值得注意的是它实际上是由许多小颗粒密堆积而成,小颗粒的直径约为 $10 \sim 28 \text{ nm}$ 。从高度测量可知,环的中心部分与环外云母基底高度一致,表明该环形凝聚体中心为空心结构而并非球形的局部塌陷(图 2(c))。此外,该凝聚体具有一个较为明显的线状缺口。

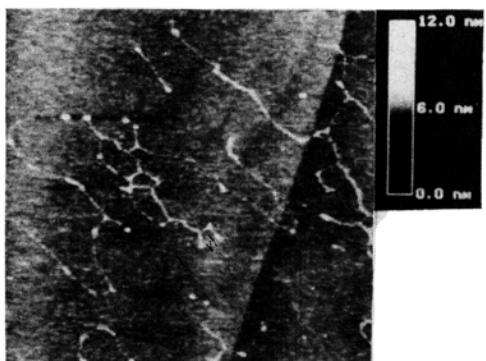


图 1 没有加亚精胺的 λ -DNA 的 AFM 图象
 λ -DNA 浓度为 $1\sim1.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, DNA 表现为线性舒展并

局部缠绕状态, 扫描范围为 $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$

中和去 $89\%\sim90\%$, 与 Wilson 等对不同离子环境下的研究结果有一定的对应^[7].

在以往的电子显微镜的多次观察中, 也得到了环形凝聚体的结构和尺寸。通常的环形凝聚体为较标准的圆形, DNA 在不同的凝聚诱导物如精胺、亚精胺的作用下所得到的凝聚体大小有一定变化, 外圈直径约 $40\sim180 \text{ nm}$, 内圈直径约 $15\sim80 \text{ nm}$ ^[10], 这一点和我们的实验结果基本相符合。较多文献认为这种环形凝聚体是热力学稳定状态, 凝聚驱动力来源于静电相互作用: 正电性的聚胺部分中和了 DNA 骨架上磷酸根基团的负电性, 从而导致 DNA 链的凝聚^[11, 12]。根据 Manning^[13]提出的极限理论, 认为在无限稀溶液条件下, DNA 发生凝聚时它的磷酸根基团的负电性可

中和去 $89\%\sim90\%$, 与 Wilson 等对不同离子环境下的研究结果有一定的对应^[7].

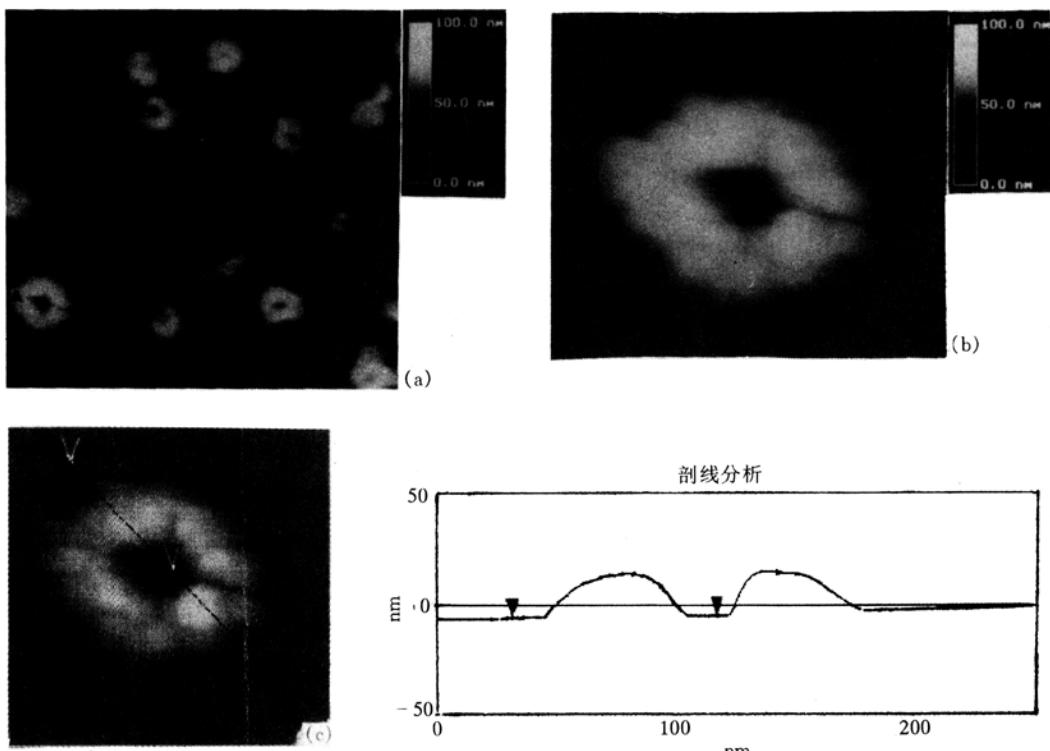


图 2 亚精胺诱导 反应 10 min 后的 λ -DNA 所形成凝聚体的 AFM 图象

DNA 最终浓度为 $1\sim1.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 亚精胺最终浓度为 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。 (a) 图象中同时存在环形和“U”型凝聚体, 环形凝聚体外圈直径为 $(114.4 \pm 18.96) \text{ nm}$, 高度 $(16.76 \pm 1.82) \text{ nm}$, 扫描范围为 $850 \text{ nm} \times 850 \text{ nm}$ 。 (b) 单个环形凝聚体(在图 2(a)中以“A”标识)由一些小颗粒堆积而成, 小颗粒的直径约为 $10\sim28 \text{ nm}$ 。 环形凝聚体具有线状缺口, 扫描范围为 $200 \text{ nm} \times 200 \text{ nm}$ 。 (c) 单个环形凝聚体(在图 2(a)中以“A”标识)的 AFM 高度分析, 表明该环形凝聚体中心为空心结构

虽然许多研究认为环形凝聚体的尺寸在 100 nm 左右, 并与 DNA 片段的长短无关, 一经形成后其大小随时间变化不大^[8], 在重复实验中, 我们却发现制样条件的不同, 如反应物混合时间、DNA 和亚精胺的浓度变化等, 均能对最终所得到的凝聚体的大小(从几十纳米到几百纳米不等)、高度、形态(圆形、椭圆形等)产生影响。表明作为热力学稳定状态的环形凝聚体, 其形成过程和结果受动力学因素影响较大。图 3 所示是在其他条件和图 2 类似, 而 DNA 浓度加倍, 反应 35 min 后所得到的凝聚体。这些凝聚体不管在尺寸还是在形态上均与已报道的结果有所不同。和图 2 一致的是在精细结构上它们也表现为颗粒堆积及盘绕模式。我们认为颗粒堆积及盘绕这一模式不管在大的环形凝聚体还是在小的环形凝聚体中均存在, 说明它可能是环形凝聚体的形成方式。有关这方面的研究正在深入进行中。另外, 值得一提的是, 经过对该体系相关文献的分析比较, 我们发现: 在我们所选用的 DNA 及亚精胺浓度范围内, 亚精胺能诱导 DNA 凝聚但其作用又不足以对 DNA 的构型产生太大的影响, DNA 仍然基本保持 B 构型^[2~5]。我们认为亚精胺对 DNA 的这种特殊作用(即诱导 DNA 以特定方式凝聚又不破坏螺旋结构), 和生物体内 DNA 能立即从紧密存储态被释放并能保持生物活性的现象有密切关系。

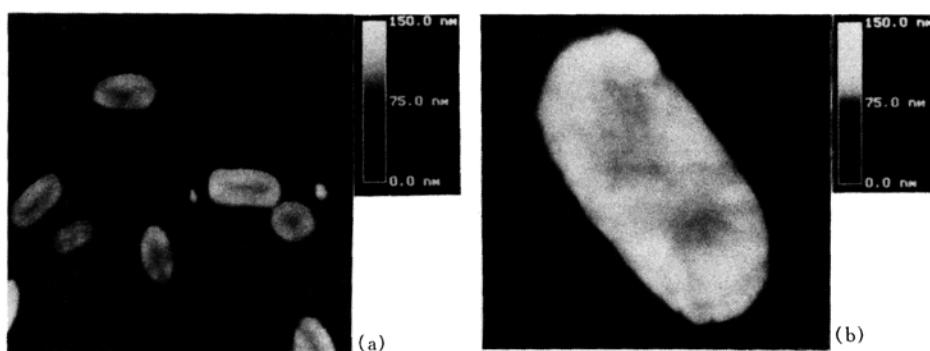


图 3 亚精胺诱导反应 35 min 后的 λ -DNA 所形成凝聚体的 AFM 图象

DNA 最终浓度为 2~3 ng/ μ L, 亚精胺最终浓度为 100 μ mol/L。(a) 图象中存在圆形及椭圆形的环状体, 凝聚体尺寸在 600 nm 以上, 可以观察到它们有些有局部分层现象并由一些颗粒堆积而成, 扫描范围为 7 μ m \times 7 μ m。(b) 螺旋盘绕方式形成的椭圆形凝聚体, 其组成单元为颗粒, 扫描范围为 1.7 μ m \times 1.7 μ m

目前关于 DNA 环状凝聚体的凝聚机制有多种猜想。Noguchi 等^[14]认为凝聚过程是一种相变, 环形凝聚体形成过程为: 在链的末端先产生一个环结构, DNA 剩下的部分则沿着环不断盘绕最终形成环状凝聚体。Bloomfield 等则认为凝聚过程是 DNA 的自组装过程, 环形凝聚体大多由 DNA 不断有序盘绕而成, 少量由棒状凝聚体末端连接而成^[4,8]。从我们的实验观察看来, 环状体是由许多小颗粒堆积而成, 其基本结构单元是颗粒而不是线性 DNA 链。此外, 和文献报道不同, 我们在其他条件相似, 反应时间较短(10 min)时所得到的类环形凝聚体(即 U 型凝聚体以及带缺口的环形凝聚体)的含量大大超过文献上半小时以上的反应结果, 标准环形凝聚体的数量则相对较少, 而两者体积又相似, 这表明标准环形凝聚体可能是由类环形凝聚体进一步发展而来, 即弯曲的棒形凝聚体可首尾连接形成环形凝聚体。从这些结果的分析均可排除环形凝聚体是由 DNA 简单地有序盘绕而成的观点。根据以上现象, 我们认为, DNA 的凝聚过程可能类似于晶体生长的螺旋盘绕过程。小颗粒类似于晶核, 具有一定的取向性; 颗粒与

颗粒之间按一定的方向排列,造成一种长程有序的作用,最终能够形成环状结构。按这种趋势,从热力学角度来说,我们将观察到螺旋盘绕状环形凝聚体或塔形凝聚体,虽然图 2 的实验产物大部分仅终止在单层环绕,但在一定条件下,我们确已观察到螺旋盘绕状环形凝聚体(如图 3),这也反映了动力学因素对凝聚体的形成有较大影响。有关小颗粒的本质、亚精胺在凝聚中的作用以及其他相关研究还有待于继续深入。

3 结论

本文采用 AFM 观测了由亚精胺诱导的 DNA 凝聚体,得到了一些较为明确的结果。实验表明:(1) 亚精胺是体外诱导 DNA 凝聚形成环形凝聚态的直接原因;(2) 凝聚体的尺寸和形态受动力学因素影响较大;(3) 标准环状体为中空结构,由小“晶核”排列而成,DNA 的凝聚过程可能类似于晶体生长的螺旋盘绕过程。这些结果为从理论上研究 DNA 凝聚机制提供了基础。进一步的工作将研究关于离子环境、时间、pH 值等因素对凝聚行为的影响以及用 AFM 尝试观测凝聚的动态过程。

参 考 文 献

- 1 Flink I, Pettijohn D E. Polyamines stabilize DNA folds. *Nature*, 1975, 253: 62~63
- 2 Gosule L C, Schellman J A. Compact form of DNA induced by spermidine. *Nature*, 1976, 259: 333~335
- 3 Chatteraj D K, Gosule L C, Schellman J A. DNA condensation with polyamines II. Electron microscopic studies. *J Mol Biol*, 1978, 121: 327~337
- 4 Arscott A G, Li A-Z, Bloomfield V A. Condensation of DNA by trivalent cations. 1. Effect of DNA length and topology on the size and shape of condensed particles. *Biopolymer*, 1990, 30: 619~630
- 5 Becker M, Misselwitz R, Damaschun H, et al. Spermidine-DNA complexes build up metastable structures. Small-angle X-ray scattering and circular dichroism studies. *Nucleic Acids Research*, 1979, 5: 1 297~1 309
- 6 Baeza I, Gariglio P, Rangel L M, et al. Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA. *Biochemistry*, 1987, 26: 6 387~6 392
- 7 Wilson R W, Bloomfield V A. Counterion-induced condensation of DNA. A light-scattering study. *Biochemistry*, 1979, 18: 2 192~2 196
- 8 Bloomfield V A. Condensation of DNA by multivalent Cations: Considerations on mechanism. *Biopolymer*, 1991, 31: 1 471~1 481
- 9 Hud N V, Downing K H, Balhorn R. A constant radius of curvature for the organization of DNA in the toroidal condensates. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 3 581~3 585
- 10 Plum G E, Arscott P G, Bloomfield V A. Condensation of DNA by trivalent cations. 2. Effects of cation structure. *Biopolymers*, 1990, 30: 631~643
- 11 Rouzina I, Bloomfield V A. Macroion attraction due to electrostatic correlation between screen counterions. 1. Mobile surface-adsorbed ions and diffuse ion cloud. *J Phys Chem*, 1996, 100: 9 977~9 989
- 12 Yoshikawa K, Takahashi M, Vasilevskaya V V, et al. Large discrete transition in a single DNA molecule appear continuous in the ensemble. *Phys Rev Lett*, 1996 76: 3 029
- 13 Manning G S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. IV. The approach to the limit and the extraordinary stability of the charge fraction. *Biophysical Chemistry*, 1977, 7: 95~102
- 14 Noguchi H, Kidoaki S, Yoshikawa K. Self-organized nanostructures constructed with a single polymer chain. *Chemical Physics Letter*, 1996, 261: 527~533