

·成果简介·

# 阳离子诱导 DNA 有序凝聚体的精细结构的研究

白春礼\* 王琛 林璋

(中国科学院化学研究所,北京 100080)

[关键词] 核酸存储结构,有序凝聚体,多胺,原子力显微镜

脱氧核糖核酸(DNA)虽然有特定的空间结构,但在一定范围内,它的空间结构是可变的。核酸分子的这种运动性不仅表现在其分子结构受碱基组成、排列顺序、修饰基团等的影响,而且还会因一些环境因素,诸如相对湿度、平衡离子、多胺类化合物、特色结合蛋白等的存在而发生改变,使之折叠成更加有序的高级结构。然而,值得注意的是,在活细胞和细菌体内,除复制及转录过程以外,DNA更经常是以紧密堆积的方式存储,其体积仅是自由分散状态的 $10^{-4} - 10^{-6}$ [1]。DNA的生物学功能决定其存储态必须是一种高度有序且与自由松散态可进行可逆转变的结构。研究DNA凝聚态对于进一步深入探讨生物体内基因复制及基因表达等重大问题具有深远意义。

DNA凝聚态的高度有序性是由化学和生物机制共同决定的。体内DNA这种可控制的堆积和盘绕过程通常要求某些酶、多价阳离子(尤其是多胺)及ATP的参与[2]。体外实验则表明,钠、镁等盐离子也是重要的调控因素[3]。

精胺、亚精胺等多价阳离子是生物体内存在的物质[4]。有证据表明,体内许多生命现象如复制和转录等过程都需要精胺、亚精胺等多价阳离子的参与[5]。而1976年有人用电镜研究发现在体外,一定浓度的亚精胺、精胺(以下统称多胺)可直接诱导DNA凝缩成环状、棒状的规则结构[6]。

## 1 凝聚体的微结构和形成机制

虽然早在70年代,多胺诱导形成的有序凝聚体的形态经电镜观察已被确认为圈状及棒状[6,7]。而由这一观察引发的有关凝聚体凝聚机制以及它与体

内DNA存储态的关系的思考还远未得到答案。这是因为,作为解决这些问题的关键的有关凝聚体的微结构的研究由于长期以来实验手段的限制没有取得大的进展。然而,在近一两年来,随着原子力显微镜(AFM)[8,9]及高分辨的电镜[10]等相关技术的发展,凝聚体的微结构的研究得到了深入并取得了一些很有意义的结果。

目前的研究表明凝聚环主要有2类微结构。1998年,Bottcher等在J. Mol. Biol.上报道了用低温透射电镜观测所得到的凝聚环的微结构[10]。观察表明环是由DNA链不断由内向外有序盘绕而成。该结构被称为纺锤模型(spool-model)。另一类凝聚环的微结构的研究来自于我们对DNA由多胺直接诱导所形成的产物的观测[8]。图1是我们用AFM观察到的一类凝聚环的普遍形态。我们发现经多胺诱导后自由舒展的DNA链可形成圈状或弯曲棒状的凝聚体。AFM高的分辨率提供了凝聚体的精细结构,观测表明不管是圈状体还是棒状体均由颗粒串接而成,不同于以往认为环是由DNA链盘绕形成的推测。尤其是某些环上带有缺口。表明了颗粒串接的圈可由颗粒串接的棒弯折形成。此外,还有一些观察表明DNA的凝聚过程可能类似以颗粒为组成单元的螺旋盘绕过程。以上AFM观测结果为进一步理解该类凝聚环的形成机制提供了线索。

与凝聚体微结构的实验研究相并行的是有关DNA凝聚环的形成机制的探讨。纺锤模型(spool-model)认为环是由DNA不断有序由里及外盘绕而成[11];固有直径环绕模型(constant loop model)认为环是由DNA链以一致的直径环绕并错落叠加形成[12]。另外还有人认为凝聚过程是一种相变,在环

\* 中国科学院院士。  
国家自然科学基金资助项目,批准号 29525304。  
本文于 1999 年 3 月 26 日收到。

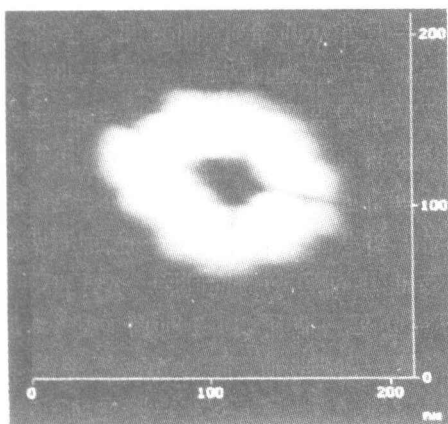


图1 亚精胺诱导 DNA 形成的环形凝聚体的 AFM 图象

形凝聚体形成过程中有局部打结现象<sup>[13]</sup>。以上3种观点都在不同的实验中得到了一定程度的证实。例如, Botcher 等用低温透射电镜观测所得到的凝聚环的微结构证实了纺锤模型的合理性<sup>[10]</sup>。Hud 等通过对大量环的直径统计发现:环的直径的分布服从闭环环绕模型,从而证明该类凝聚环是由具有特定刚性的链段环绕而成。拟合结果表明:组成环的链段的刚性长度约为 50 nm。由于这个数值接近于 DNA 在正常生理条件下的刚性长度,因此可以认为这一具有特定刚性的链段应该是 DNA 链,从而提出了固有直径环绕模型<sup>[12,14,15]</sup>。这和我们具有颗粒串接微结构的环形凝聚体的研究相对应<sup>[16]</sup>。

许多实验证实了多胺诱导 DNA 所产生凝聚产物具有局部有序性的特点。Pelta 通过偏光显微镜发现高浓度的 DNA 在多胺的诱导下,可以形成液晶态<sup>[17,18]</sup>; Schellman 等通过 X-射线衍射数据分析认为:多价阳离子诱导 DNA 形成的凝聚物是一种晶态或液晶态<sup>[19]</sup>。此外,和高浓度 DNA 的体系的有序性研究具有一定关联的是,在较稀溶液中观测到的环形凝聚体在精细结构上也表现着局部有序性的特征<sup>[8,10]</sup>。

高度的有序性是生物体内 DNA 存储的另一特点。在 DNA 的这一有序折叠过程中,组蛋白(对真核生物来说)或性质类似于组蛋白的碱性蛋白质(对病毒或细菌来说)起了主要作用。

和多胺诱导 DNA 凝聚成有序结构的体外实验相并行的是,研究发现组蛋白 H1 同样具有诱导 DNA 凝聚成环的效果,而作为核小体核心的组蛋白 H2a、H2b、H3、H4 却不具备这种功能<sup>[20]</sup>。我们认为,组蛋白 H1 以及多胺的这种特殊作用效果是与它们在生物体内的特定功能相联系的。体外实验表

明,当组蛋白 H1 诱导 DNA 形成环状有序结构时,它与 DNA 的比例高于它在生物体内的实际比例,这也说明了为什么在体内螺线管形成时除了需要 H1 以外,还需要其它离子的共同存在。我们将体内提取出来的组蛋白溶液(含 H1、H2a、H2b、H3、H4 等 5 种成份)按生物体内的比例与小牛胸腺 DNA 复合,用 AFM 观测发现, DNA 上因大量包附了组蛋白形成形如串珠的结构,而此时以标准比例存在的 H1 对串珠结构进一步诱导凝聚的效果并不明显。如果此时引入一定量的多胺并立即观察反应产物,可以发现大量(包括环状体在内)的凝聚结构出现。

## 2 溶液条件与 DNA 凝聚态的关系

高度致密并且有序的 DNA 凝聚体的形成受动力学因素影响很大。DNA 的浓度、多胺的浓度、二者的混合方式、反应时间甚至温度等等均可造成反应产物的变化。研究溶液条件与 DNA 凝聚态的关系主要从 DNA 的浓度变化、多胺的影响、缓冲液条件的影响等几个方面考虑。

### 2.1 DNA 浓度的影响:

有些研究表明根据体系中 DNA 浓度的不同,多胺可诱导 DNA 形成 3 种类型的结构<sup>[17,21]</sup>如:(1)在极稀溶液中(DNA 浓度低于  $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ ),长的 DNA 分子形成单分子凝聚物;(2)在较稀溶液中(DNA 浓度介于  $1\text{ ng}/\mu\text{L}$  和  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$  之间),体系中存在多分子凝聚的悬浮体(一些实验数据表明环形凝聚体在这一阶段中存在)<sup>[6,22]</sup>;(3)在稀溶液中(DNA 浓度在  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  左右),大量的 DNA 分子共同凝聚并极易沉淀。此外,其它研究还发现在较高的 DNA 浓度下,亚精胺诱导 DNA 凝聚的产物中有局部有序性,也即存在晶态或液晶态<sup>[17-19]</sup>。我们通过控制 DNA 浓度和反应时间,发现 DNA 浓度的不同可以造成凝聚环在结构和形态上的变化。在低的 DNA 浓度下,多胺可诱导  $\lambda$ -DNA 形成如文献<sup>[23]</sup>所报道的单分子凝聚环;在 DNA 浓度约  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$  时,凝聚产物是大尺寸的以颗粒堆积盘绕为特征的类环多分子凝聚体。经分析表明多分子凝聚环可能是由单分子凝聚体进一步发生自组装形成的高级结构<sup>[8]</sup>。

### 2.2 多价离子的作用机制及其影响:

相当多的实验及理论工作致力于理解 DNA 凝聚转变的物理机制。理论上,我们知道,不管 DNA 以何种方式折叠堆积,链间排斥力必须克服。这种情况只能在 DNA 的磷酸根基团上的负电荷被大量中和才能达到。在 DNA 有序存储过程中,作为体内

凝聚参与物之一的多胺,与屏蔽带负电的 DNA 链紧密堆积所引起的静电力有关。Manning 通过定量分析表明,静电能是 DNA 凝聚的主要驱动力,当 DNA 链上的线性电荷密度减少到原来的 89%—90% 时,凝聚开始发生;而高价态的多胺具有较强的屏蔽负电荷的能力<sup>[24-26]</sup>。Wilson 等通过光散射手段研究了不同价态的阳离子如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、正三价的亚精胺和正四价的精胺对 DNA 凝聚的影响,证实了不同的离子对 DNA 的磷酸根上的负电荷的中和能力不同,高价态的阳离子容易诱使凝聚发生<sup>[27]</sup>。

目前,有关多胺的浓度与凝聚态 DNA 的关系的探讨还主要集中在理论研究领域,实验方面的数据较少。在实验上,现有研究表明:凝聚环形成时体系中的多胺必须达到的一定浓度<sup>[6,27]</sup>。我们认为,凝聚环的稳定形成意味着自由能的吸引项和排斥项之间达到了平衡,若在实验中进一步通过改变环境来调整平衡将引起相关的自由能项的变化,从而可能引起凝聚体的结构的变化。因此,这方面的观察对于理解凝聚过程及检验多年来提出的许多理论无疑将具有重要意义。我们利用 AFM 研究了亚精胺诱导产生的凝聚环在慢挥发过程中形态的变化。观察表明凝聚体的尺寸与体系中亚精胺浓度有直接的对应关系。这些结果暗示了当平衡体系中多胺的浓度上升时,环状结构可能变大<sup>[28]</sup>。这一观察结果可以用抗离子浓度变化影响溶液介电常数的观点得到较好的解释。

### 2.3 其他阳离子对凝聚的影响

多价阳离子(尤其是多胺)对体内 DNA 的有序存储的重要性是确定无疑的。然而一些实验则表明钠、镁等其它盐离子也是影响凝聚的主要因素之一。尽管它们在介质中含量较低,但对 DNA 分子的柔性和高级结构的形成,却至关重要,它可通过以下 3 种作用来影响 DNA 的构型:(1)与 DNA 特异结合;(2)消除或减弱磷酸骨架之间的排斥作用;(3)通过水合作用降低水分子的活性。这些作用可以补偿 DNA 分子折叠成高级结构所引起的熵减和刚性分子弯曲所要克服的弹性势能。例如,研究发现  $\text{Mg}^{2+}$  可通过消除或减弱磷酸骨架之间的排斥作用来辅助核小体进一步的凝聚<sup>[3]</sup>。 $\text{Pt}^{2+}$  可通过对 DNA 碱基的特异性结合来影响 DNA 分子的超螺旋。 $\text{Cu}^{2+}$  能诱导 DNA 分子在有序性较高的结构(如螺旋结构)和无序结构(如无规卷曲)间的转化<sup>[29]</sup>。通过结合金属或释放金属时, DNA 的螺旋结构和无规卷曲无序结构之间可以进行可逆的转变。我们对 DNA 储存

液(相当于 DNA 的一种凝聚态)分别经三蒸水或缓冲液逐渐稀释后凝聚态变化的动态过程进行了 AFM 观察。研究发现介质中盐浓度是影响 DNA 凝聚的主要因素。随着体系中盐离子浓度的降低, DNA 分子上结合的阳离子减少,磷酸骨架间的相互排斥力增加,聚集的分子逐渐解离而伸展为松弛状态的分子。此外,我们用 CD 谱也证实了 DNA 样品的超螺旋密度与体系中盐离子浓度密切相关。与上述研究相一致的是, Wilson 等的光散射结果也表明钠、镁等盐离子对 DNA 凝集的影响存在一个临界致凝浓度<sup>[27]</sup>。

### 3 结论与展望

生物体内 DNA 存储态的高度紧密化和高度有序性的两大结构特征是体内多种因素协同作用的结果。其中,阳离子是除酶以外的重要影响因素。溶液中离子环境的改变,将导致 DNA 的表面电荷密度或溶液的介电常数的变化。不同的阳离子通过对以上两个方面产生不同程度的影响,来产生静电屏蔽效应,从而减少 DNA 分子中各部分之间的排斥力,使凝聚易于发生。其中,体内凝聚参与物多胺可诱导 DNA 形成特殊的有序凝聚体,这种结构的形成在体内可能具有重要意义,它能使空间上不相邻的序列彼此靠近来执行特定的生物功能。通过对这种超螺旋的观察,将有助于我们对其结构的了解和功能的探索,从而进一步直接从分子水平上认识核酸的凝聚机制。值得注意的是,许多事实已经昭示着 AFM 作为 90 年代发展起来的具有高的分辨率以及特殊适用性的纳米分析技术,将在这一研究领域中担当重要角色<sup>[8,9,16]</sup>。它不仅是进一步从动力学角度对凝聚体形成过程影响因素进行系统研究的理想工具,其高的分辨率将有利于对形成体精细结构的分析以及对平衡态的能量因素进行研究,从而为进一步探索核酸的工作语言提供实验基础。

### 参 考 文 献

- [1] Murray A W. How to compact DNA. *Science*, 1998, **282**:425—427.
- [2] Flink I, Pettijohn D E. Polyamines stabilize DNA folds. *Nature*, 1975, **253**:62—63.
- [3] Thoma F, Koller T H, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell. Biol.*, 1979, **83**:403—427.
- [4] Cohen S S. *Introduction to the Polyamines*. Benjamin Hill, Englewood Cliffs, N. J. 1971.
- [5] Moussatche N. *Biochim. Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **826**:113—

- 120.
- [6] Gosule C, Schellman J A. Compact form of DNA induced by spermidine. *Nature*, 1976, **259**:333—335.
- [7] Chatteraj K, Gosule L C, Schellman J A. DNA condensation with polyamines: II. Electron Microscopic studies. *J Mol. Biol.*, 1978, **121**:327—337.
- [8] Lin Z, Wang C, Feng X Z et al. The observation of the local ordering characteristics of spermidine condensed DNA: atomic force microscopy and polarizing microscopy studies. *Nucleic Acids Research* 1998, **26**: 3228—3234.
- [9] Dunlap D D, Maggi A, Soria M R et al. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Research* 1997, **25**:3095—3101.
- [10] Bottecher C, Endiskh C, Fuhrop J -H et al. High-yield preparation of oligomeric C-type DNA toroids and their characterization by cryoelectron microscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**:12—17.
- [11] Marx K A, Ruben G C. Evidence for hydrated spermidine-calf thymus DNA toruses organized by circumferential DNA wrapping. *Nucleic Acids Research*, 1983, **11**:1839—1854.
- [12] Hud N V, Downing K H, Balhorn R. A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, **92**:3581—3585.
- [13] Kuznetsov Y A, Timoshenko E G, Dawson K A. Equilibrium and kinetic phenomena in a stiff homopolymer and possible applications to DNA. *J. Chem. Phys.*, 1996, **105**:7116—7134.
- [14] Shore D, Langowski J, Baldwin R L. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, **78**:4833—4837.
- [15] Vasilevskaya V V, Khokhlov A R, Kidoaki S. Structure of collapsed persistent macromolecule: toroid vs. spherical globule. *Biopolymer*, 1997, **41**:51—60.
- [16] Lin Z, Wang C, Li J et al. Multi-stiffness mechanism for cationic condensation of DNA molecules. *Macromolecules* (submitted)
- [17] Sikorav J -L, Pelta J, Livolant F. A liquid crystalline phase in spermidine-condensed DNA. *Biophysical Journal*, 1994, **67**:1387—1392.
- [18] Pelta J, Livolant F, Sikorav J -L. DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**:5656—5662.
- [19] Schellman J A, Parthasarathy N. X-ray diffraction studies on cation-collapsed DNA. *J. Mol. Biol.*, 1984, **175**:313—329.
- [20] Hsiang M W, Cole R D. Structure of histone H1-DNA complex: effect of histone H1 on DNA condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, **74**:4852—4856.
- [21] Bloomfield V A. Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers*, 1991, **31**:1471—1481
- [22] Widom J, Baldwin R L. Cation-induced toroidal condensation of DNA: studies with  $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$ . *J. Mol. Biol.*, 1980, **144**:431—453
- [23] Widom J, Baldwin R L. Monomolecular condensation of  $\lambda$ -DNA induced by cobalt hexammine. *Biopolymers*, 1983, **22**:1595—1620.
- [24] 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.
- [25] Manning G S. Thermodynamic stability theory for DNA doughnut shapes induced by charge neutralization. *Biopolymers*, 1980, **19**:37—59.
- [26] Manning G S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. III. An analysis based on the Mayer ionic solution theory. *The Journal of Chemical Physics*, 1969, **51**:3249—3252.
- [27] Wilson W, Bloomfield V A. Counterion-induced condensation of DNA. A light-scattering study. *Biochemistry*, 1979, **18**:2192—2196.
- [28] Lin Z, Wang C, Li J et al. Cationic concentration induced dimensional variation of DNA condensates. *Nucleic Acids Research* (submitted)
- [29] 王夔, 邵子厚, 徐辉碧. *生物无机化学*. 北京: 清华大学出版社, 1988. 23—25; 228—236.

## THE INVESTIGATIONS OF THE CATION-INDUCED DAN CONDENSATES

Bai Chunli      Wang Chen      Lin Zhang

(*Institute of Chemistry The Chinese Academy of Sciences Beijing 100080*)

**Key words** the packaging state of DNA local-ordered condensates polyamine atomic force microscope