

AFM 观察小鼠心肌核 DNA 片段的基因组合形成“基因系”的系统性和垃圾 DNA 的相互作用

AFM Observation of Mouse Cardiac Nuclear Gene Combination Forming Gene Lineage's Systematicness and Junk DNA's Interaction

袁明秀/YUAN Ming-xiu¹, 张志宏/ZHANG Zhi-hong¹, 李健伟/LI Jian-wei²

1. 北京大学生命科学学院, 北京 100871

2. 中国科学院化学研究所, 北京 100080

1. College of Biological Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

2. Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

[摘要] 用原子力显微镜(AFM)直接观察、小白鼠心肌等组织的核 DNA 片段的基因体外转录等多种实验技术组合,通过 AFM 观察到心肌核 DNA 片段上的基因,处于垃圾 DNA 的“转录平台”上,在体外转录过程中,由 n ($n=3, 4$ 等)个活性基因节,对应的 $n-1$ 个“基因间隔”,依特定的排列组合分别形成 n ($n=3, 4$ 等)种大小不同的“基因系”,各“基因系”中的基因节同时转录,分别形成对应 n RNA ($n=9, 12$ 等)链状复合体, n RNA 链状复合体分别与对应基因系的单链 DNA 两边的“接口”相联。核内对应 n mRNA 数量减少,形成负反馈效应后,使 n RNA 从对应“基因系”上迅速分离下来,核内经“转录后修饰”形成对应 n mRNA 链状复合体。该复合体主要在核内,处于垃圾 DNA 的“翻译平台”上进行蛋白质翻译,并在核内加工修饰形成有活性蛋白质。本工作展示了未来运用 AFM 观察生物学反应、研究核基因转录与调控的分子机理、基因组合形成基因系的系统性和垃圾 DNA 的相互作用的前景。

[关键词] 垃圾 DNA; 专一性蛋白质通路; 正负反馈调控; 基因组合系统性; $DNAn \dots \dots RNA_n$ 链状复合体

[中图分类号] Q751, Q752

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)10-0016-05

Abstract: Direct atomic force microscopy (AFM) observation and in vitro transcription techniques were used to investigate that mouse cardiac nuclear genes occur on transcription platform of junk DNA. During in vitro transcription, n ($n=3$ or 4) active gene knots and $n-1$ gene intervals are put in special permutation and combination to form n ($n=3$ or 4) different sizes of gene lineage. Different gene knots simultaneously transcribe n mRNA ($n=9$ or 12) chain complexes, n mRNA ($n=9$ or 12) chain complexes are respectively linked with two ends of adaptors of related single chain DNAs. If the number of n mRNA ($n=9$ or 12) decreased, n mRNA ($n=9$ or 12) may be dissociated from gene lineages and form n mRNA ($n=9$ or 12) chain complexes through post-transcription modification. These complexes mainly occur in nuclei and are translated into proteins on translation platform, then these proteins are modified to form active proteins. This work shows that direct AFM observation can be used to investigate gene transcription and regulation, formation of gene lineage and junk DNA interaction.

Key Words: junk DNA; specific protein pathway; positive and negative feedback; gene combination and systematicness; $DNAn \dots \dots RNA_n$ chain complexes

CLC Numbers: Q751, Q752

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)10-0016-05

1 引言

原子力显微镜(AFM)自 1981 年由 Binnig Rohrer 发明以来,在有机材料及生物材料等微观结构和特性研究方面得到广泛的应用,特别是运用 AFM 能在自然状态下(空气或溶液中)观察样品,使 AFM 在生物大分子的结构和功能的研究中显示独特的优越性^[1-2]。迄今,国内外生物学界用 AFM 观察 DNA 片段和蛋白质等生物大分子的结构等。

1996 年,我们用 3 种方法证明了基因转录的分子开关主要

是自己编码的蛋白质和某一特定辅助信息小分子所形成的复合体^[3-5](以下简称开关蛋白质复合体),如 $LDH_{(1-5)} \dots \dots nNAD^+$ 。其核 DNA 片段的基因两端的调控序列以非共价(范德华力和氢键等)结合可完全解离开关蛋白质复合体^[6-7],同时共价结合不可解离的支架蛋白质,这种核基因我们称“基因节”^[8]。当由分子开关形成负反馈效应时,启动自己的编码基因转录,当形成正反馈效应时,关闭对应的基因转录;对应 mRNA 类似,分子开关形成的负反馈效应,启动自己的编码蛋白质翻译,正反馈效应关闭对应 mRNA 蛋

收稿日期: 2006-08-15

作者简介: 袁明秀,女,北京大学朗润园 8 号楼 205 室,副教授,研究方向为生物化学、分子生物学; E-mail: xiang@pku.edu.cn

白质翻译^[9],如 LDH₍₁₋₅₎。当核基因转录完成后,“基因系”与对应 nRNA(n=9、12等)链状复合体处于结合态时,其“基因系”中的基因节^[3]无转录活性,当核内 n mRNA 链状复合体^[9]数量等减少形成负反馈效应时,对应 nRNA 的链状复合体从对应的基因系上迅速解离下来,在核内经“转录后修饰”形成对应特定 n mRNA 链状复合体^[9]。各种“基因系”是转录调控单位之一,其核基因系转录的同时还分别受到基因节的分子开关、对应结合态的 nRNA 链状复合体、对应核内 n mRNA(n=9、12等)链状复合体的数量等的调控^[3,6,7]。

核 DNA 片段的基因在转录过程中,其核基因两端的开关蛋白质及中间的编码序列所结合的蛋白质均分别处于垃圾 DNA 的特定蛋白质通路中,核基因转录完成后,其两端的开关蛋白质等仍分别处于垃圾 DNA 特定的蛋白质通路中,但中间的编码序列未结合蛋白质,其垃圾 DNA 的蛋白质通路同时关闭;垃圾 DNA 专一性的蛋白质通路,对应于核 DNA 片段的基因转录相关蛋白质,进行定时、定点和定量的正负反馈调控。

2 材料和方法

2.1 材料

健康的 6-8 周龄 Balb/c 雌性小白鼠,由中科院遗传所动物饲养中心提供。

2.2 仪器

原子力显微镜 Nanoscope 型,由中科院化学所白春礼实验室提供。

2.3 心肌核 DNA 片段(编号 D₁)的制备

心肌核 DNA 片段(编号 D₁)的制备按文献[3]进行。

2.4 心肌和肝脏 mRNA 样品制备

心肌和肝脏 mRNA 样品制备按文献[5]进行。

2.5 心肌核 DNA 片段的活性基因体外转录

心肌核 DNA 片段的活性基因体外转录按文献[3]进行。

2.6 AFM 观察

2.6.1 样品制备和成像

取样约 1 ng/ μ l 滴于新鲜解理云母表面,用压缩氮气吹干,然后用 AFM 成像,成像在空气中进行,成像方式为轻敲式(Tapping mode)^[4]。

2.6.2 AFM 观察

用 AFM 观察上述 2.5 项心肌核 DNA 片段的体外转录样品。

用 AFM 观察分析上述 2.4 项心肌和肝 mRNA 样品。

3 结果

AFM 观察心肌核 DNA 片段上的“基因节”组合形成“基因系”的多样性和垃圾 DNA 的相互作用。

3.1 心肌核 DNA 片段的“基因节”组合形成“基因系”的系统性的 AFM 观察

心肌的核 DNA 片段(D₁)样品的观察:体外转录体系中转录 16 h,其产物用 AFM 观察,图 1 左(横 1.5 μ m,纵 2.55 μ m),右(2.7 μ m,1.4 μ m),可见核 DNA 片段上 4 个基因节、3 个“基因节间隔”和“基因系”接口^[13],依次按特定的组合形成“基因系 1”。

“基因系 1”的头向左移动一个“基因节”,同时“基因系 1”尾向后移动一个“基因节”,由 6 个“基因节”组合形成新的“基因系 2”;“基因系 2”组合与“基因系 1”不同。与对应基因系 1 相连的 nRNA[n=12, n 表示链中 RNA(即核酸)的个数],与对应基因系 2 相连的 nRNA(n=18)链状复合体,其形状大小等均不相同。

3.1.1 心肌的核 DNA 片段局部放大 AFM 观察

用 AFM 观察上述图 1,其局部放大大小片段形成图 2。图 2 可见“基因系接口”(横 0.72 μ m,0.50 μ m),“基因节间隔”(横 0.72 μ m,0.50 μ m)-(横 0.75 μ m,1.13 μ m)基因节(横 0.75 μ m,

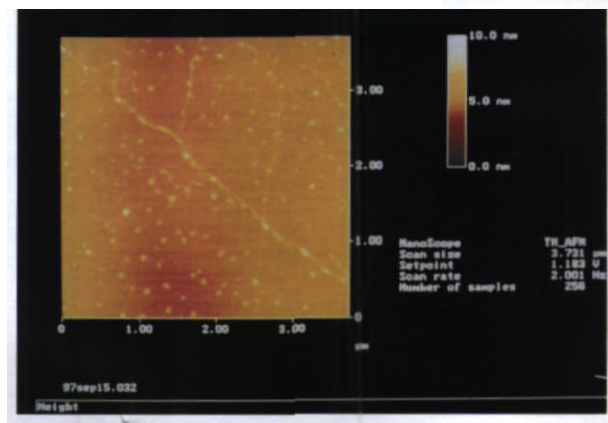


图 1 基因系 1 和基因系 2 等分别与对应 nRNA1 和 nRNA2 相连的 AFM 图像

注:心肌核 DNA 片段的基因处于垃圾 DNA 的“转录平台”上,已完成转录,形成基因系 1(n=4 等)和基因系 2(n=6 等),并分别与对应 nRNA1(n=12)和 nRNA2(n=18)相连的 AFM 图像。

Fig. 1 AFM image of gene lineage1 and gene lineage2 are respectively linked with nRNA1 and nRNA₂

Note: Cardiac nuclear genes are on junk DNA's transcription platform, transcription completed, gene lineage 1 (D=4) and gene lineage 2 (D=6) formed, and respectively linking with DRNA₁ (D=12) and DRNA₂ (D=18).

1.13 μ m)-(0.75 μ m,1.36 μ m)^[3]。其核基因两端的蛋白质复合体(即开关蛋白质^[7])处于垃圾 DNA 的 2 个相邻的特定的蛋白质通路中,核基因的中间的编码序列未结合蛋白质,则垃圾 DNA 的蛋白质通路随之关闭。

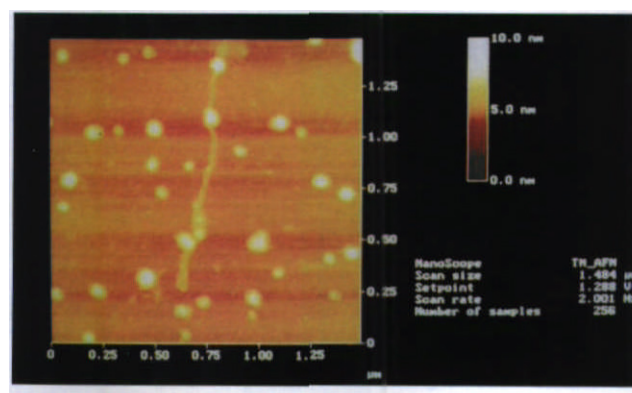


图 2 图 1 局部放大 AFM 图像

注:将图 1 局部放大,由上至下其“基因节”、“基因节间隔”和“基因系接口”,核 DNA 片段的基因,两端结合蛋白质,并分别处于垃圾 DNA 的特定的蛋白质通路中,其中间的编码序列未结合蛋白质,对应垃圾 DNA 的蛋白质通路随之关闭。

Fig. 2 AFM image of partly enlarged Fig. 1

Note: Fig.1 was partly enlarged, from up to down, gene knots, gene intervals and gene lineage's adaptors, only two ends of nuclear genes bind proteins and respectively occur in specific protein pathway of junk DNA, middle encoding sequences do not bind proteins; related protein pathways were closed.

3.1.2 心肌的核 DNA 片段局部缩小 AFM 观察

将图 1 缩小处理形成图 3,图 3 可见核 DNA 片段上的基因转录完成的状态,其核 DNA 片段上有多种分别与对应基因系两边的“接口”相连的 nRNA(n=9、12 等)链状复合体,其中有 3 条

形状较规则清晰的 nRNA(n=9、12 等) 链状复合体; 其他为形状不规则的 n_x RNA(n_x 待测)。

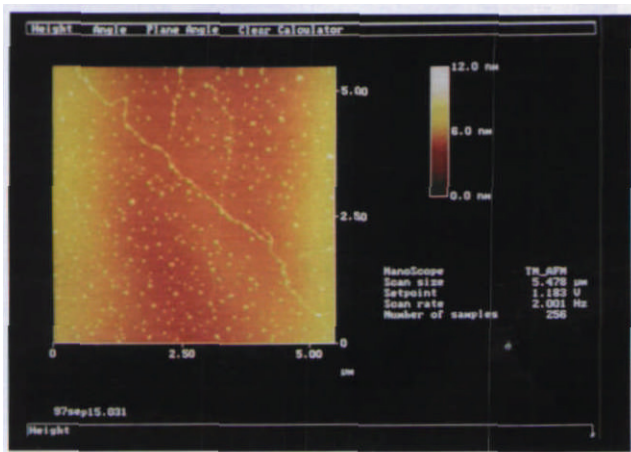


图 3 图 1 局部缩小 AFM 图像

注: 将图 1 局部缩小心肌核 DNA 片段上有 3 条较规则的 nRNA (n=9、12 等), 其余为 n_x RNA(不规则) 链状复合体

Fig. 3 AFM image of partly smaller Fig.1

Note: Partly smaller Fig. 1, there are three regular DRNA (D=9 or 12) on cardiac nuclear DNA fragments, others are DXRNA (not regular) chain complexes.

据文献[4]报道, 心肌等组织的核 DNA 片段(D_1) 的样品, 仅表达蛋白质的底物(如 20 种氨基酸和 4 种核苷酸等), 未加任何与表达相关的酶类、能体外表达出 LDH 等的蛋白质。结果暗示, 核 DNA 片段上的各种形状不规则的 n_x RNA 可能是与 n mRNA (n=9、12 等) 翻译蛋白质相关的 n_x RNA 链状复合体。结果还暗示, 基因节组合形成基因系的系统性和可变性(下面将进一步证明)。

心肌核 DNA(阴性对照 1) 片段上的基因转录完成后, 其开关蛋白质等^[9]分别由垃圾 DNA 的蛋白质通路定时、定点和定量供给, 促使核基因两端的调控序列与自己的开关蛋白质结合而关闭, 开关蛋白质仍处于垃圾 DNA 的特定蛋白质通路中, 基因中间的编码序列结合态蛋白质已全部解离, 其解离的各种蛋白质转录活性因子分别由垃圾 DNA 的特定蛋白质通路定时、定点和定量调控出局, 并且垃圾 DNA 与转录活性因子相关蛋白质通路全无(见图 4)。

3.1.3 (阴性对照 2) 心肌核 DNA 片段(D_1) 的样品 AFM 观察

(阴性对照 2) 心肌核 DNA 片段(D_1) 的样品, 用氯仿近似完全除去其可解离蛋白质后, 进行体外转录 16 h, 用 AFM 观察(见图 5)。图 5 可见核 DNA 片段上的基因两端的“开关蛋白质”等已解离, 各种基因两端仅结合不可解离的“支架蛋白质”^[17]; 垃圾 DNA 随之失去特定立体结构和部分蛋白质通路。

3.2 心肌核 DNA 片段上某些特定结合态 nRNA 与核内非结合态 n mRNA 的对应性 AFM 观察

各 mRNA 的两端结合有核糖体的观察: 图 6 可见 1 个 mRNA 的两端分别结合有核糖体^[9]。图 7、图 8 可见核内 n mRNA 链状复合体中各种 mRNA 两端分别结合核糖体, 可确定为 mRNA, 由 1 个 mRNA 两端分别结合的核糖体, 可计算出对应基因系相连的 nRNA(n=12) 链状复合体中 n 的个数, 其中 n=12, 可初步确定与上述 $1A_{1-2}$ 中对应基因系处于结合态的 nRNA (n=9、12 等) 链状复合体中的 n(n=9、12 等) 相吻合。由图 1、6、7 和图 8 可以间接证明, nRNA 可分别从对应基因系上解离下来, 并可能分别与对应基因系形成解离动态平衡; 当核内 n mRNA(n=9、12

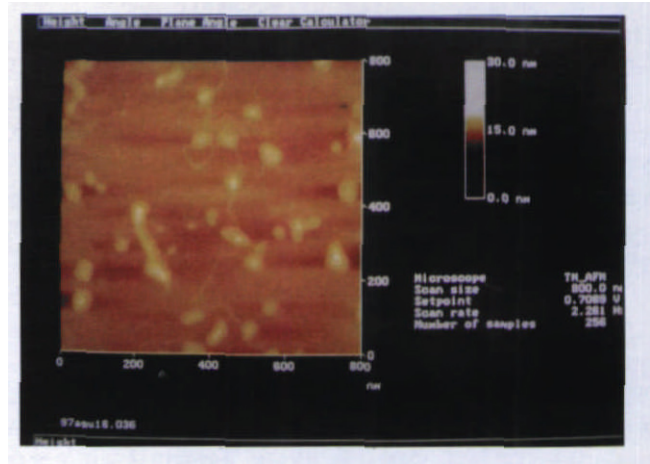


图 4 (阴性对照 1) 心肌核 DNA 片段上的基因转录完成 AFM 图像

注: 核基因两端的调控序列与自己的开关蛋白质结合而关闭, 开关蛋白质仍处于垃圾 DNA 的特定蛋白质通路中, 基因中间的编码序列结合态蛋白质已全部解离, 其解离的各种蛋白质转录活性因子分别由垃圾 DNA 的特定蛋白质通路定时、定点和定量调控出局, 并且垃圾 DNA 与转录活性因子相关蛋白质通路全无。

Fig. 4 (Negative control 1) AFM image of nuclear genes completed transcription

Note: It will be closed because regulative sequences bind their own switch proteins; switch proteins are on specific protein pathways, binding-state proteins are dissociated from middle encoding sequences; these dissociated proteins ruled out in special time, place and amount from specific protein pathways; junk DNA and transcription factor-associated protein pathways disappeared.

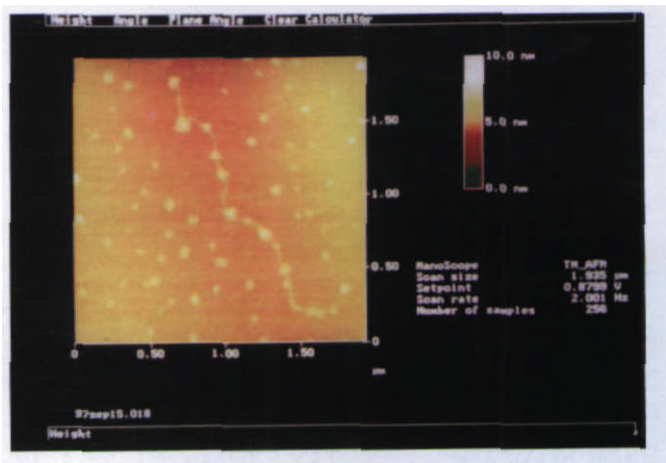


图 5 (阴性对照 2) 用氯仿脱去核 DNA 片段的基因的结合态蛋白质, 垃圾 DNA 的立体结构和对应蛋白质通路均消失的 AFM 图像

Fig. 5 (Negative control) AFM image of binding-state proteins are dissociated with chloroform from nuclear genes

等) 减少的负反馈效应, 核 DNA 片段上对应 nRNA(n=9、12 等) 迅速解离下来, 在核内“经转录后修饰”, 形成对应 n mRNA(n=9、12 等)^[3,9]链状复合体, 其 n mRNA(n=9、12 等) 均处于核内垃圾 DNA 的翻译“平台上”, 并分别翻译出自己编码的蛋白质^[3,9]。

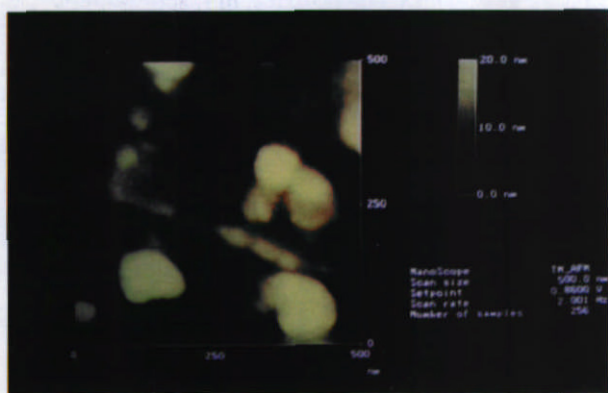


图6 (阳性对照)心肌两端结合核糖体单个 mRNA 的 AFM 的图像

Fig. 6 (Positive control) AFM image of two ends bind single mRNA on ribosome

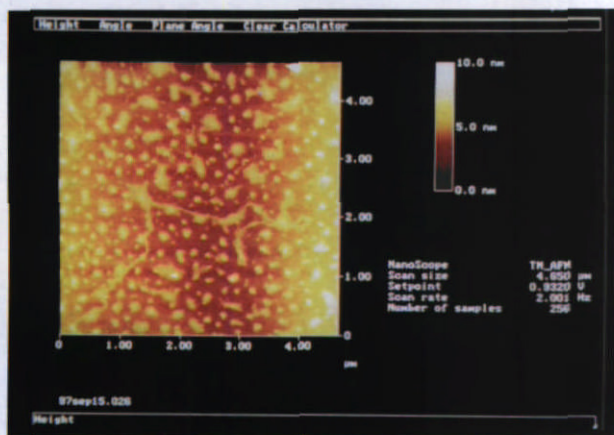


图7 心肌核内处于非翻译状态的 n mRNA ($n=12$) 链状复合体的 AFM 的图像

Fig. 7 AFM image of non-translation state' n mRNA ($n=12$) chain complexes in cardiac nuclei.

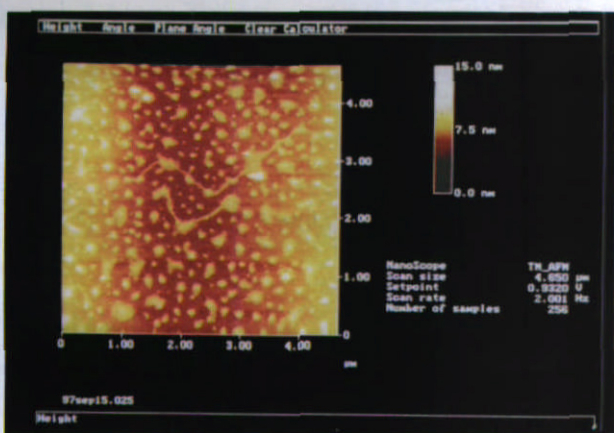


图8 心肌核内处于非翻译状态的 n mRNA ($n=9$) 链状复合体的 AFM 的图像

Fig. 8 AFM image of non-translation state' n mRNA ($n=9$) chain complexes in cardiac nuclei

图9(阴性对照)显示,用氯仿脱去心肌 n mRNA 链状复合体中大部分可解离蛋白质后^[3,6], n mRNA 线性链状复合体解离成单个或几种 mRNA 分别与支架蛋白质(不可解离^[5,7])结合所形成的聚合物的混合体,其混合体中如 LDH mRNA 等均失去体外翻译出 LDH 同工酶等蛋白质的活性^[5,6]。

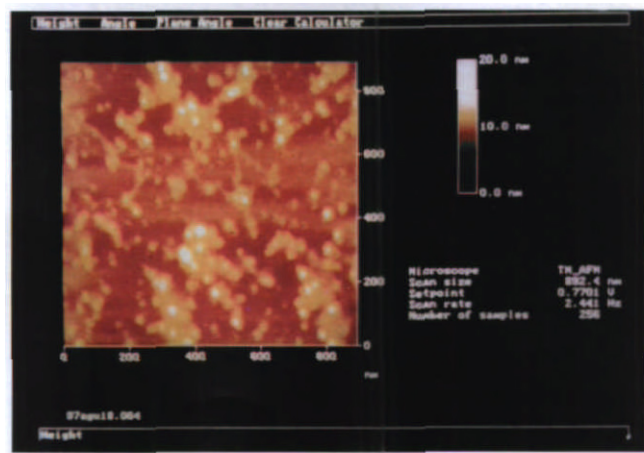


图9 (阴性对照)心肌核内单个 mRNA 和 n 种 mRNA 聚合物的混合体的 AFM 的图像

Fig. 9 (Negative control) AFM image of mixture of single mRNA and n mRNA polymer in cardiac nuclei

3.3 多种 mRNA 组合形成链状复合体的多样性和组织特异性 AFM 观察

3.3.1 肝脏 mRNA 样品 AFM 观察

肝脏 mRNA 样品,用 AFM 观察(见图 10)。图 10 可见肝多种 mRNA 链状复合体与上述图 7、图 8 心肌 n mRNA 链状复合体不同,由此可合理反推心肌核 DNA 片段上的基因组合形成的基因系与肝 n mRNA 对应的基因系组合不同。结果表明:基因系组合显示组织的特异性和基因组合的可变性。

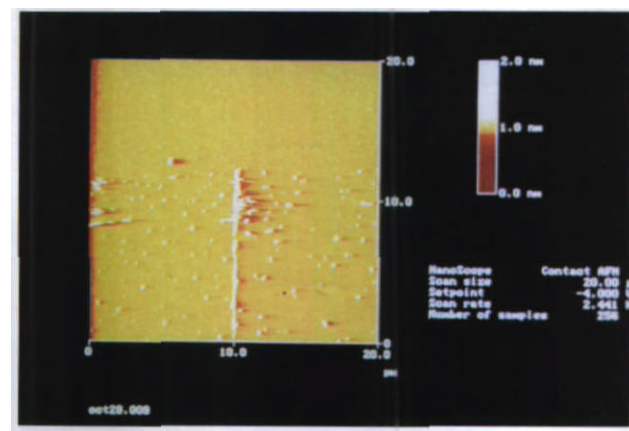


图10 肝脏处于非翻译状态的 n mRNA (粗测为 $n=9$) 链状复合体的 AFM 的图像

Fig. 10 AFM image of n mRNA (approximately $n=9$) chain complexes of liver's non-translation state

3.3.2 氯仿脱去肝脏多种 mRNA 链状复合体中大部分可解离蛋白质后(阴性对照)的 AFM 观察

用氯仿脱去肝脏多种 mRNA 链状复合体中大部分可解离蛋白质后^[5,7](阴性对照)用 AFM 观察(见图 11)。图 11 可见用氯仿脱去肝脏多种 mRNA 链状复合体中大部分可解离蛋白质后,多种

mRNA 线性链状复合体解离成单个或几种 mRNA, 分别与支架蛋白质(不可解离^[7])结合形成聚合物的混合体, 其混合体中如 LDH mRNA 等均失去体外翻译出 LDH 同工酶等蛋白质的活性^[5,7]。

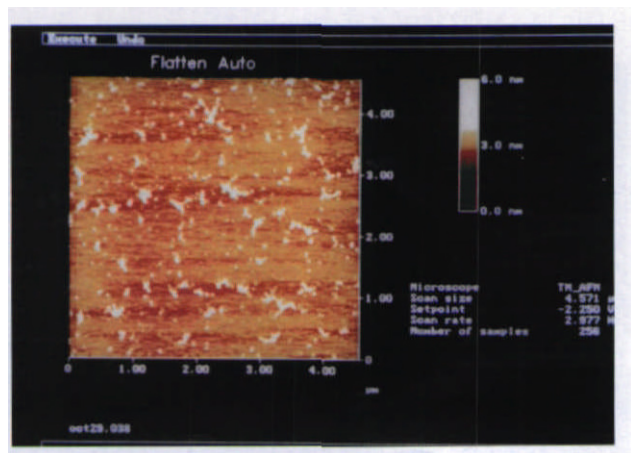


图 11 肝脏单个 mRNA 和几种 mRNA 聚合物的混合体的 AFM 的图像

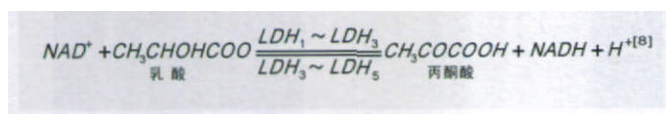
Fig. 11 AFM image of mixture of single mRNA and several mRNA polymers

4 结论和讨论

4.1 心肌核 DNA 片段上的基因转录的“群体效应”

心肌核 DNA 片段上的基因转录的“群体效应”^[9], 均源于核 DNA 片段的基因组合形成基因系的多样性和系统性(即核 DNA 片段上的基因转录匹配协同连锁制约性), 其核基因系转录形成某些特定 nRNA(n=9、12 等), 在核内经转录后修饰, 形成对应 n mRNA(n=9、12 等), 其 n mRNA 同样具有组合的多样性和系统性; 分别对应的蛋白质组合同样显示多样性和系统性; 同时垃圾 DNA 的蛋白质通路将核内对应基因转录和核内对应 mRNA 翻译全部相关蛋白质(即其核基因表达相关的蛋白质)进行定时、定点和定量正负反馈调控, 垃圾 DNA 中分别与表达对应的专一性蛋白质通路组合, 伴随显示多样性和系统性。

肌体内各组织中的 LDH 同工酶催化的反应如下式:



LDH₍₁₋₅₎ 其 5 种 LDH 同工酶对乳酸和丙酮酸的催化作用不相同, 5 种同工酶在心、肝、脑、肾、肺等组织分布不相同, 显示出组织功能的特异性, 并促使肌体的重要组织形成反 Cori 循环^[9]。反 Cori 循环简化示意图如图 12。

同一组织内, 因细胞的密堆积作用, 细胞核质内外、开关蛋白质等网络信息相互联通, 故显示组织功能的特异性; 同时通过血液循环, 将不同组织的开关蛋白质的网络信息传遍肌体各种组织, 形成肌体不同组织的功能匹配协同连锁制约性和自然性。

4.2 对果蝇受精卵发育过程中出现的某些生理现象的解释

据文献报道, 果蝇受精卵在发育过程中, 在某些特定时期出现物质浓度梯度振荡(文章曾获诺贝尔医学奖)。本研究^[5,7]可解释其生理意义: 是促使细胞质内开关蛋白质复合体^[5,7]等进入核孔内, 与其编码自己的核基因特异结合^[9], 并形成正负反馈调控态势。当核 DNA 片段上某些特定基因分别处于与自己编码蛋白质

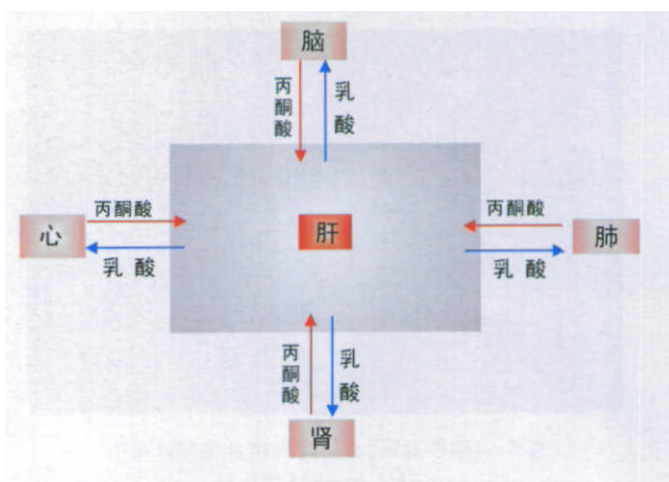


图 12 反 Cori 循环简化示意图

Fig. 12 The sketch of reverse- Cori- Cyc

复合体^[9]等的有效作用位置时, 形成正反馈效应, 促使对应核基因的两端的调控序列与自己编码蛋白质复合体(即开关蛋白质)特异结合^[9], 形成活性基因节^[9], 并有参与组合形成基因系的可能性。受精卵中各种蛋白质复合体(即开关蛋白质)的数量与分别被激活的对应核基因数量呈正相关性; 受精卵的胞质中特定蛋白质复合体可以分别进入特定核孔内, 其种类与被激活的对应基因种类相同^[5,7]。同一种群的哺乳动物的受精卵, 其核 DNA 片段上被激活的活性核基因的种类可能具有相似性, 故同一种群有相似性; 不同个体的人类, 其受精卵大小不同, 受精卵胞质中开关蛋白质复合体^[9]等因数量不同、被激活的核基因等数量不同、核基因等所处的内外环境不同(即时空不同), 形成了个体差异, 由此可部分解释同一种群的个体差异。

本文是阶段性的结果, 结果显示出明显的规律性。基因系中某些特定基因节测序、对应 RNA 和对应蛋白质等定性研究有待深入进行。

(致谢: 真诚感谢白春礼院士及实验室的有关同事出色的技术支持、无偿提供 AFM 测试仪器, 感谢李健伟博士(现在美国哈佛大学做研究)的技术支持。)

参考文献 (References)

- [1] 佟向军, 翟中和, 等. 应用扫描隧道显微镜对几种动物金属硫蛋白的比较研究[J]. 电子显微学报, 1995(1): 2.
- [2] 李建伟, 田芳, 等. λDNA Hind Ⅲ 经酸变性-复性形成变异形态[J]. 生物物理学报, 1997, 13(3): 351-358.
- [3] 黄杰峰, 郑飞, 张志宏, 等. 应用 AFM 观察分析小白鼠心肌核 DNA 片段的基因体外转录[J]. 高技术通讯, 2001, 11(10): 1-6.
- [4] 袁明秀, 张志宏, 等. 应用 AFM 观察分析小白鼠心肌核 DNA 片段体外表达[J]. 高技术通讯, 2000, 10(12): 1-4.
- [5] 袁明秀, 侯仲刚, 等. 小白鼠心肌核 DNA 片段中的基因表达的分子开关的研究[J]. 高技术通讯, 2001, 11(1): 7-13.
- [6] 袁明秀, 张志宏, 等. 用 AFM 观察分析小白鼠心肌核 DNA 片段的基因体外表达和垃圾 DNA 的相互作用[J]. 科技导报, 2005(12): 20-24.
- [7] 袁明秀, 任重, 郑飞, 等. AFM 观察小鼠心肌核 DNA 转录调控和蛋白质相互作用[J]. 高技术通讯, 2003, 13(4): 34-38.
- [8] 袁明秀, 邵宏兵, 耿震等. 缺氧处理小白鼠乳酸脱氢酶同工酶的辅酶化和去辅酶化调控作用[J]. 中国医学科学院学报, 1998(12): 449.
- [9] STRRYEL. 生物化学[M]. //唐有琪, 张惠珠, 吴相钰, 等译. 北京大学出版社, 1995.

(责任编辑 王 芷)