

用 AFM 观察小白鼠心肌核 DNA 片段的基因体外转录和垃圾 DNA 的相互作用

AFM was Used to Observe Interaction between Mouse Cardiac Nuclear DNA Fragment in vitro Transcription and Junk DNA

袁明秀/YUAN Ming-xiu¹, 张志宏/ZHANG Zhi-hong¹, 李建伟/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. School of Biological Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

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

[摘要] 用 AFM 直接观察、体外转录等实验技术组合,发现小白鼠(Balb/C)心肌体外转录状态的核 DNA 片段上的各种基因,处于垃圾 DNA 的特定的“转录平台”上。“转录平台”上的各种核活性基因的两端的调控序列,分别与特定开关蛋白质复合体结合(即可解离的开关蛋白质),中间的编码序列分别以非共价键特异结合可完全解离的转录活性因子等多种蛋白质;这些与核基因转录相关的蛋白质均由垃圾 DNA 的专一性蛋白质通路分别进行特异性正负反馈调控。

[关键词] 垃圾 DNA; 专一性; 蛋白质通路; 正负反馈调控; 转录平台

[中图分类号] Q751,Q752

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)09-0046-05

Abstract: Direct observation and in vitro transcription were used to study mouse (Balb/C) cardiac muscle genes which exist on transcription platform. Regulatory elements of two ends of active genes non-covalently bind proteins that were encoded by these genes, and these proteins bind small informative molecules to form dissolvable transcription factors (dissolvable switch proteins). These transcription-related proteins are positively and negatively regulated by junk DNA-specific protein pathways.

Key Words: junk DNA; specificity; protein pathway; positive and negative feedback regulation; platform

CLC Numbers: Q751,Q752

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)09-0046-05

1 引言

原子力显微镜 (AFM) 自 1981 年由 Binnig 和 Rohrer 发明 (由此获诺贝尔奖) 以来,在有机材料及生物材料等微观结构和特性的研究方面得到了广泛的应用。特别是 AFM 能在自然状态下 (空气或水溶液中) 观察样品,使 AFM 在生物大分子的结构和功能的研究中显示出独特的优越性^[1-2]。迄今,国内外生物学界多用 AFM 来观察核 DNA 片段、核酸和蛋白质等大分子生物学结构^[1-2]。

1995 年,在研究真核基因表达与调控机制过程中,我们成功地进行了独特的核 DNA 片段上的基因体外表达^[3]和体外转录^[4]等实验,为在国内外首次用 AFM 观察分子生物学反应奠定了成功的基础。1997 年,用 AFM 观察到小白鼠心肌核 DNA 片段的基因在体外转录中,分别由核“基因系”为转录单位^[4],n 个核“基因节”(n=3,4 等)按特定的组合形成 n 个基因系(n=3,4 等),各种基因系转录形成对应 mRNA 链状复合体(n=12 等)^[4],并与对应“基因系”两边的“接口”相连。近期,意外发现在核基因转录和对应

mRNA 翻译的相关蛋白质活性因子,均由垃圾 DNA 的蛋白质通路定时、定点和定量特异性正负反馈调控^[5]。可以说垃圾 DNA 是生命活动的基石之一。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验动物

健康的 6~8 周龄 Balb/c 雌性小白鼠,由中国科学院遗传与发育研究所动物饲养中心提供。

2.1.2 仪器

原子力显微镜 Nanoscope III 型 (USA),中国科学院化学研究所提供。

2.2 方法

2.2.1 鼠心肌核 DNA 片段和心肌胞质 mRNA 样品的制备

用心肌细胞核匀浆液 PAGE 等电泳法制取心肌核 DNA 片段 (未除去结合在基因上面的蛋白质,样品编号为心肌 D₁)。

收稿日期: 2006-05-29

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

将心肌 D_1 样品用 pH7.9, 0.001 mol/L 磷酸缓冲液稀释约 1/8 倍, 其样品编号为心肌 D_2 ; 心肌 mRNAs (未除去结合在 mRNA 上面的蛋白质) 的制备, 用心肌胞质匀浆液 PAGE 等电泳法进行分离制备 (样品编号为 Ms), 阴性对照组将心肌核 DNA 片段用氯仿脱去结合在核基因上面的可解离蛋白质 (含心肌核 DNA 片段样品为阴性对照心肌 D_3)。

注: 2.2.1 项, 制备 Ms 样品 (Ms 浓度约为 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 这是为了防止 D_1 转录形成的 mRNA 解离 (D_1 、 D_2 、 D_3 浓度约为 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。2.2.2 核 DNA 片段上的活性基因体外转录

将上述 2.2.1 项制成的 D_1 、 D_2 、 D_3 和 Ms 样品, 按下列条件进行转录。

1) D_1 20 μl + 110 μl 蒸馏水 + 各 30 μl 0.5mmol/L 4 种核苷酸 (A, U, C, G)

2) D_1 20 μl + Ms 110 μl + 各 30 μl 0.5mmol/L 4 种核苷酸 (A, U, C, G) + 10 μl 10 ng/ml ATP + 10 μl 0.5mmol/L NAD⁺ (室温 18~20°C, 反应 8 h)

3) D_2 20 μl + 110 μl 蒸馏水 + 各 30 μl 0.5mmol/L 4 种核苷酸 (A, U, C, G) + 10 μl 10 ng/ml ATP + 10 μl 0.5 mmol/L NAD⁺

4) D_1 20 μl + 110 μl 蒸馏水 + 各 30 μl 0.5 mmol/L 4 种核苷酸 (A, U, C, G) + 10 μl 10 ng/ml ATP + 10 μl 0.5mmol/L NAD⁺ (阴性对照 1)

5) D_3 20 μl + 110 μl 蒸馏水 + 各 30 μl 0.5 mmol/L 4 种核苷酸 (A, U, C, G) + 10 μl 10 ng/ml ATP + 10 μl 0.5mmol/L NAD⁺ (阴性对照 2)

2~5 号样品在 18~20°C 条件下反应 12 h, 各管在 37°C 水浴锅内保温 4 h 后停止反应, 在室温下反应 8 h 再进行 AFM 观察。

2.2.3 AFM 观察^[2]

1) 样品制备和成像: 取样约 1ng/1 μl 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)。

2) AFM 观察上述 2.2.2 项 (1)、(2)、(3) 和 (4) 经体外转录后的样品。

3) AFM 观察上述 2.2.1 项 D_1 样品 (即不同批、同一方法制备的样品)

3 结果

3.1 用 AFM 观察到心肌垃圾 DNA 在核内特定的立体结构及专一性蛋白质通路

心肌核 DNA 片段样品 (D_1), 用 AFM 观察, 图 1A 可见巨型垃圾 DNA 片段所形成的特定立体结构 (显黄色细丝状), 并同时形成极多的大小不同专一性蛋白质通路 (通路中蛋白质显白色)。

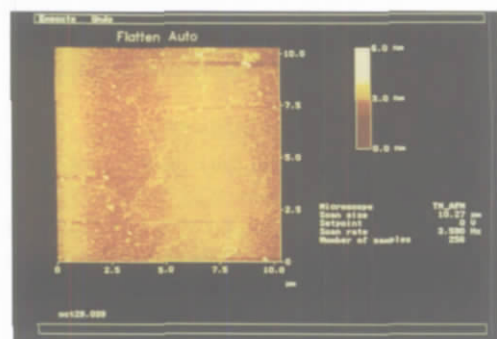


图 1A 心肌核内垃圾 DNA 的特有立体结构及某些蛋白质通路 (通路中蛋白质显白色) 的 AFM 图像

Fig. 1A AFM image of cardiac muscle junk DNA's unique stereotyped structure and some protein pathways (proteins show white color in pathways).

由图 1B 可进一步观察到心肌 (D_1) 样品垃圾 DNA 的专一性蛋白质通路, 并有分别被特定蛋白质激活其基因的核 DNA 片段 2 条, 如左 (横 0.78 μm , 3.64 μm) - (1.22 μm , 4.21 μm)、右 (横 3.50 μm , 2.59 μm) - (4.36 μm , 2.79 μm) (显白色)。

由图 1C 可进一步观察到垃圾 DNA 的蛋白质通路的专一性。凡是有蛋白质的位置, 就有垃圾 DNA 的蛋白质通路, 蛋白质大, 其对应的蛋白质通路就变大, 通路中有 2 种状态的蛋白质, 即自由态蛋白质, 另一种与心肌 (D_1) 样品的核 DNA 片段上的活性基因处于结合态。

(阴性对照 1) 将心肌核 DNA 片段 (D_1), 用氯仿近似完全除去核 DNA 片段上可解离蛋白质 (D_3), 用 AFM 观察, 由图 1D 可见核 DNA 片段上的基因两端的“开关蛋白质”及中间的编码序列的结合态蛋白质等已解离, 各种基因两端仅结合不可解离的“支架蛋白质”^[4]; 垃圾 DNA 专一性蛋白质通路及其对应蛋白质均消失。

(阴性对照 2) 将图 1B 局部放大, 由图 1E 可见其中一条核 DNA 片段的基因分别被特定蛋白质激活 (显白色), 其上端是一条未被激活的核 DNA 片段 (显黄色), 其核 DNA 的片段的直径明显大于垃圾 DNA。

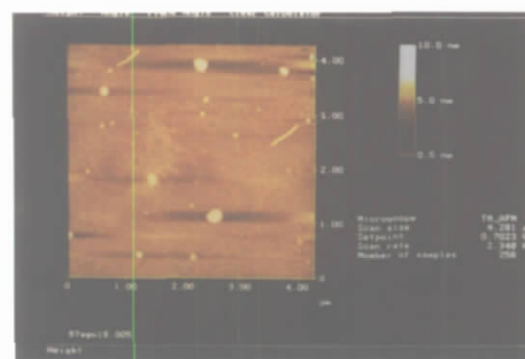


图 1B 心肌的核内垃圾 DNA 的某些蛋白质通路及 2 条其基因被激活的核 DNA 片段的 AFM 图像

Fig. 1B AFM image of some protein pathways in cardiac muscle junk DNA and two DNA fragments which have been activated.

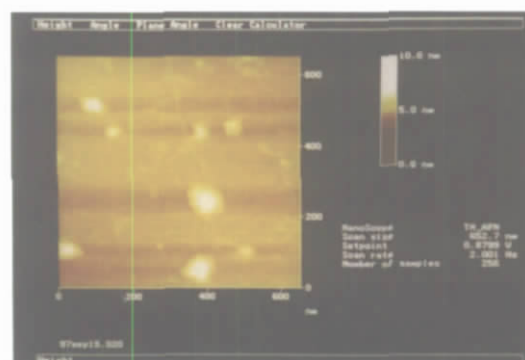


图 1C 心肌的核内垃圾 DNA 5 条清晰的横向蛋白质通路及通路中自由态或结合态蛋白质 (近似白色球形) 的 AFM 图像

Fig. 1C AFM image of five clear horizontal protein pathways and free-state and binding-state protein pathways (similar to white globe).

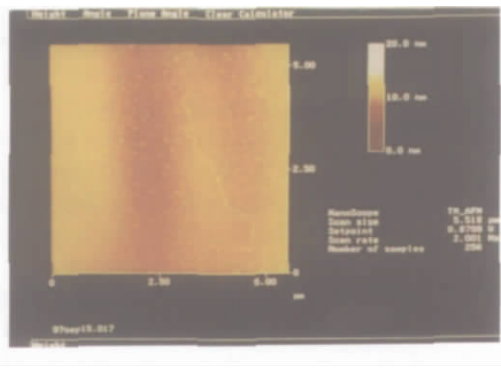


图 1D 心肌核内垃圾 DNA 片段的基因开关蛋白质等用氯仿脱去,垃圾 DNA 的特定立体结构及对应的专一性蛋白质通路随之消失(阴性对照 1)

Fig. 1D Cardiac muscle switch proteins were dissociated by using chloroform. Unique junk DNA's stereotyped structures and their specific protein pathways got disappeared (negative contro 1).

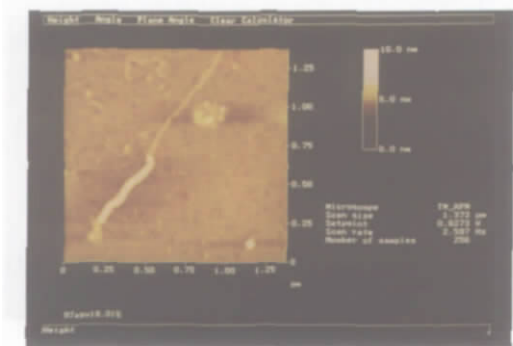


图 1E 心肌核 DNA 片段的基因分别被特定蛋白质激活(呈白色,阴性对照 2)的 AFM 图像

注: 其上端是一条位被激活的核 DNA 片段(呈黄色), 其核 DNA 片段的直径明显大于垃圾 DNA

Fig. 1E Cardiac muscle nuclear genes are respectively activated by specific proteins (white color, negative contro 2)
Note: Its upstream is an activated nuclear DNA fragment (yellow color), and the diameter of nuclear DNA fragments is larger than junk DNA's.

3.2 用 AFM 观察心肌核 DNA 片段的基因在体外转录中与垃圾 DNA 的相互作用及基因转录的“群体效应”

3.2.1 垃圾 DNA 的“转录平台”作用

心肌核 DNA 片段的基因(D_1), 体外转录 8 h, 用 AFM 观察。图 2A 可见转录状态的核 DNA 片段的基因处于垃圾 DNA 的特定“转录平台”上, 各种核活性基因两端分别与特定开关蛋白质复合体结合^[6-7], 并分别处于垃圾 DNA 的不同的特定蛋白质通路中, 中间的编码序列特异结合多种转录活性因子^[6-7], 均依次分别处于不同垃圾 DNA 的特定蛋白质通路中。

3.2.2 心肌核 DNA 片段上的活性基因(D_1+M_8)的体外转录

心肌核 DNA 片段上的活性基因(D_1+M_8) 体外转录 16 h, 用 AFM 观察。图 2B 可见心肌核 DNA 片段上的基因处于垃圾 DNA 特定的“转录平台”上, 已完成了正常转录, 可能由 4 个基因节组合形成对应的基因系^[4], 基因系转录形成对应 n RNA($n=12$ 等) 链状复合体, 并与对应基因系两边的“接口”相连^[4]; 转录系统, 仅加心肌核 DNA 片段, 4 种核苷酸 (A、U、C、G), ATP 和 NAD⁺ 生物活性物

质, 未加任何与转录有关的酶类等转录活性因子, 其核基因能正常转录, 显示出基因转录的“群体效应”(进一步结果将另文阐明)。

3.2.3 用 AFM 观察图 2B 局部放大小片段

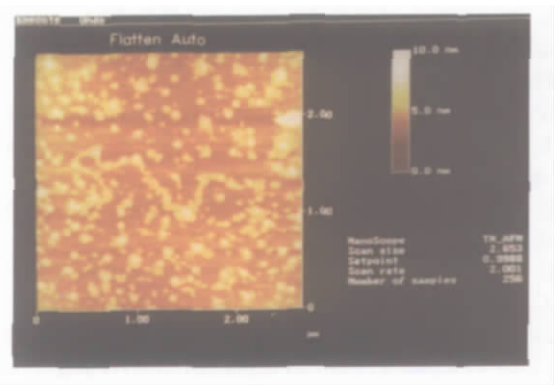


图 2A 心肌转录状态的核 DNA 片段的基因处于垃圾 DNA 的“转录平台”上, 与核基因结合的蛋白质分别处于垃圾 DNA 的特定蛋白质通路中的 AFM 图像

Fig. 2A AFM of cardiac muscle transcription state's genes and nuclear genes exist on junk DNA's transcription platform, and nuclear gene-bound proteins respectively exist in junk DNA's specific protein pathways.

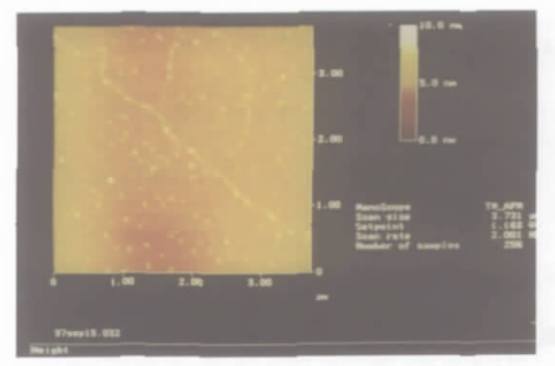


图 2B 心肌核 DNA 片段的基因正常转录完成, 其 nRNA 链状复合体与对应“基因系”两边“接口”相连的 AFM 图像

Fig. 2B AFM of cardiac muscle junk DNA gene transcription have been normally completed, and nRNA chain complexes are linked with two ends' adaptors of its genes.

用 AFM 观察上述图 2B 其局部放大小片段, 由图 2C 可见“基因系接口”(横 $0.72 \mu\text{m}$, $0.50 \mu\text{m}$)、基因节间隔(横 $0.72 \mu\text{m}$, $0.50 \mu\text{m}$)、横 $0.75 \mu\text{m}$, $1.13 \mu\text{m}$)、基因节(横 $0.75 \mu\text{m}$, $1.13 \mu\text{m}$)、横 $0.75 \mu\text{m}$, $1.36 \mu\text{m}$)^[4], 其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, 核基因的中间编码序列未结合蛋白质, 则垃圾 DNA 的蛋白质通路随之关闭。

3.2.4 心肌 D_2 样品体外转录

心肌 D_2 样品体外转录 16 h, 用 AFM 观察, 由图 2D 可见心肌核 DNA 片段上的全部基因, 其两端的调控序列结合的蛋白质活性因子等, 对应核基因新转录的 RNA^[4,6], 它们相互识别, 并以非共价键相互作用, 在核 DNA 片段双链间形成网络结构。同时, 垃圾 DNA 的特定的立体结构和对应的某些蛋白质通路失去了特定的作用。

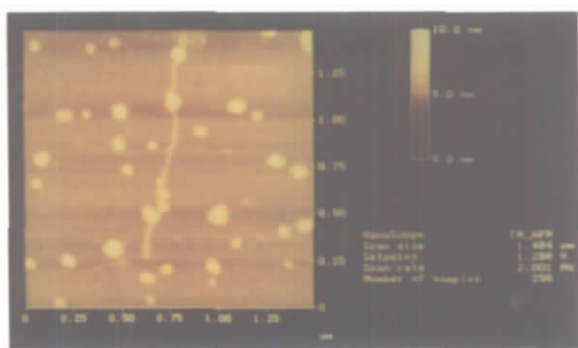


图 2C 图 2B 局部放大的 AFM 观察图

注: 将图 2B 局部放大, 由上至下其‘基因节’、‘基因节间隔’和‘基因接口’核 DNA 片段的基因, 仅两端结合蛋白质, 并分别处于垃圾 DNA 的特定的蛋白质通路中, 其中间的编排序列未结合蛋白质, 对应垃圾 DNA 的蛋白质通路随之关闭。

Fig. 2C AFM image of partly enlarged figure 2B

Note: Figure 2B was partly enlarged; from upside down, only two ends of nuclear genes of gene knots, gene knot interval and gene lineage adaptors bind proteins, and these proteins respectively exist in specific protein pathways, middle encoding sequences and its protein pathways are gradually closed.

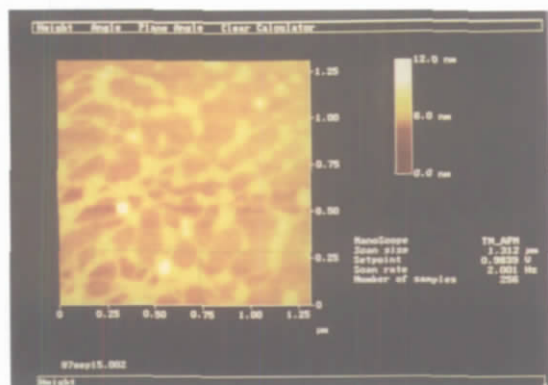


图 2D 心肌核 DNA 片段的基因非正常转录形成‘网络结构’, 对应垃圾 DNA 的蛋白质通路失去了特定作用的 AFM 图像

Fig. 2D Abnormal transcription of cardiac muscle formed the networked structure, and its junk DNA protein pathway lost specific role.

3.2.5 心肌 D₁ 样品体外转录 AFM 观察

(阴性对照 1) 心肌 D₁ 样品, 体外转录 16 h, 用 AFM 观察, 由图 2E 可见心肌核 DNA 片段上的活性基因正常转录完成后, 其 nRNA 链状复合体已解离, 其‘基因节’两端特异结合自己编码蛋白质复合体^[6], 均分别处于垃圾 DNA 的特定蛋白质通路中, 中间的编码序列未结合蛋白质^[4,6]。其垃圾 DNA 的蛋白质通路随之关闭。

3.2.6 心肌 D₃ 样品体外转录 AFM 观察

(阴性对照 2) 心肌核 DNA 片段(D₃) 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。由图 2F 可见核 DNA 片段上的基因两端的‘开关蛋白质’等已解离, 各基因两端仅结合不可解离的‘支架蛋白质’^[7], 垃圾 DNA 随之失去特定的立体结构和大部分蛋白质通路(见图 2F)。

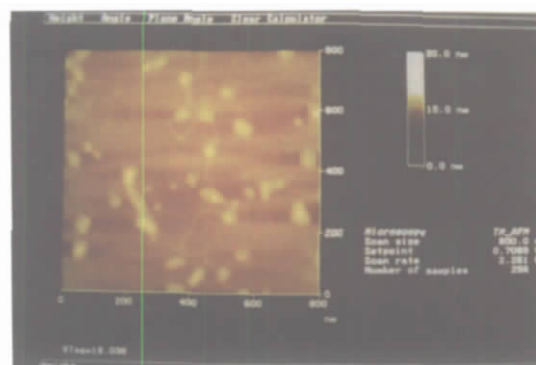


图 2E 心肌 D₁ 样品体外转录 AFM 图像

注: 心肌核 DNA 片段的基因完成了正常转录, 核基因节两端均结合开关蛋白质等, 并分别处于垃圾 DNA 的蛋白质通路中, 中间的编码序列未结合蛋白质, 其对应垃圾 DNA 的蛋白质通路随之关闭(阴性对照 1)。

Fig. 2E AFM image of cardiac muscle D₁ sample in vitro transcription

Note: Cardiac muscle nuclear genes completed normal transcription. Nuclear gene's two ends bind switch proteins and respectively exist in protein pathways. Middle encoding sequences do not bind proteins, then its junk DNA's protein pathway is closed (negative control 1).

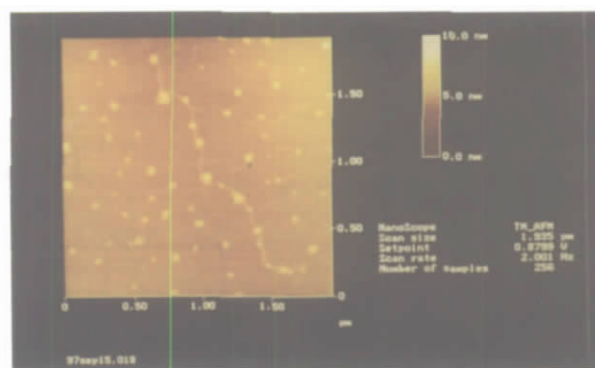


图 2F (阴性对照 2) 用氯仿脱去核 DNA 片段的基因的结合态蛋白质, 垃圾 DNA 的立体结构和大部分对应的蛋白质通路均消失的 AFM 图(阴性对照 2)

Fig. 2F (negative control 2) binding-state proteins are dissociated with chloroform from nuclear DNA fragments, and junk DNA's stereotype and most associated protein pathways disappeared.

4 讨论和结论

4.1 垃圾 DNA 是人类生命活动的‘基石’之一

核 DNA 片段的基因处于垃圾 DNA 片段的‘转录平台’上, 通过图 2A、2B、2D 和 2E 比较, 可证明垃圾 DNA 的蛋白质通路对核 DNA 片段上的基因转录作用的相关蛋白质进行定时、定点和定量正负反馈调控, 失去垃圾 DNA 的蛋白质通路的作用, 核 DNA 片段上的基因不能正常转录(如图 2D)。

4.2 核 DNA 片段的基因转录调控与垃圾 DNA 的相互作用

笔者曾用 3 种方法证明核基因转录的分子开关主要是自己的编码蛋白质与某一种信息小分子特异结合所形成的复合体, 如 LDH_{(1-5)}}……nNAD⁺^[7]。

当心肌胞质中乳酸脱氢酶同功酶(LDH_{(1-5)}}……nNAD⁺) 减少产生负反馈效应时, 核内垃圾 DNA 片段相对应的某一特定蛋白

质通路中的 $LDH_{(1-5)} \cdots nNAD^+$ 则通过特定的核孔进入胞质,促使 $LDH_{(1-5)} \cdots nNAD^+$ 浓度增加,以达到核孔内外蛋白质浓度的动态平衡。同时,垃圾 DNA 片段对应的某一特定蛋白质通路中对应的开关蛋白质(如 $LDH_{(1-5)} \cdots nNAD^+$)减少,形成负反馈效应,促进特定蛋白质通路中对应核基因上结合态 $LDH_{(1-5)} \cdots nNAD^+$ 迅速解离。同时启动该核基因开始转录,基因转录和对应核内 mRNA 翻译^[5]各具有时空特异性,分子开关均主要为自己编码蛋白质,故二者有匹配协同连锁制约性^[5,7];对应 n mRNA 链状复合体中 mRNA 翻译蛋白质^[5];当基因新表达的蛋白质浓度达到某一特定浓度时,形成正反馈效应,新表达的蛋白质与对应核基因两端的调控序列及对应 mRNA 两端结合,并关闭对应核基因转录和对应核内 mRNA 翻译(有关 mRNA 在核内翻译蛋白质,因篇幅原因,另文阐明^[5])。

4.3 核 DNA 片段上的基因转录过程与垃圾 DNA 的相互作用

由图 2A 可以证明:转录状态的核基因中间的编码序列均结合特定的转录活性因子^[4,6],图 2B 和 2E 表明,转录完成的核基因中间的编码序列未结合转录活性因子^[4,6],其转录过程调控机制可能与其核基因两端的分子开关相类似,先是由于正反馈效应,中间的编码序列分别特异结合(结合时,垃圾 DNA 的对应蛋白质通路打开)转录活性因子,并促使核基因完成转录的全过程。转录完成后,负反馈效应的作用,使其转录活性因子等全部解离(解离后,垃圾 DNA 的对应蛋白质通路关闭)下来^[6],并使其核基因停止转录。综上所述,垃圾 DNA 的专一性蛋白质通路,可以定时、定量和定点正负反馈调控其核 DNA 片段上每种基因(如 LDH/DNA(基因))转录所需的分子开关和转录活性因子等,极大地加快了

基因的转录速度。由此推测,上述 Balb/c 的真核基因转录与调控与垃圾 DNA 的相互作用的规律可能是哺乳动物核基因转录与调控的共同规律之一,这一规律也可能适用于人类。

本文是阶段性的结果,某些特定的基因节、RNA、蛋白质等定性结论有待进一步深入研究方能得出,初步结果显示出一定规律性。

(真诚感谢白春礼院士及中国科学院化学研究所有关实验室无偿提供 AFM 测试仪器,感谢李建伟博士(现在美国哈佛大学从事研究工作)的技术支持。)

参考文献(References)

- [1] 佟向军,翟中和,等. 电子显微学报[J]. 1995(1):2.
- [2] 李建伟,田芳,等. λ DNA 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] 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.
- [4] 黄杰峰,郑飞,张志宏,等. 应用 AFM 观察小白鼠心肌核 DNA 片段的基因体外转录[J]. 高技术通讯,2001, 11(10):1-6.
- [5] 袁明秀,张志宏,李建伟. 用 AFM 观察小白鼠心肌核 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.
- [6] 袁明秀,任重,郑飞等. AFM 观察小白鼠心肌核 DNA 片段的基因转录调控和蛋白质的机互作用[J]. 高技术通讯,2003,13(4):34-38.
- [7] 袁明秀,侯仲刚等. 小白鼠心肌核 DNA 片段的基因表达的分子开关研究[J]. 高技术通讯,2001,11(1):7-13.

(责任编辑 王 芷)

·科技智力游戏·

九 宫 填 数

为了让读者阅读科技论文后放松、休闲,本刊特在“科技智力游戏”栏目增加“轻松一刻——九宫填数”游戏,欢迎广大读者参与、娱乐。该游戏的填数规则为:①在 9×9 的大九宫格内,出题者已给出若干数字,其它宫位的数字空留,需要读者根据逻辑推理填写剩下空格里的数字;②填满数字的大九宫里,数字之间的关系必须满足:每一行与每一列都有 1 到 9 的数字,每个实线所标 3×3 的小九宫格里也有 1 到 9 的数字,且每个数字在每行、每列及每个小九宫格里只能出现一次,即既不能重复也不能缺少。答案请见下期。

九宫 1 难度系数 ◆◆◆◆◆

3			6	7				
		5	7			2		
	1			5	4		8	
	2	1		9		4		
			8		3			
7			5	1			2	
				8			6	
	6	4	9			3	5	
		8		3		1	4	

上期答案

九宫 1

6	8	5	7	2	4	1	3	9
2	1	3	6	9	5	8	4	7
4	7	9	8	1	3	6	5	2
1	6	7	5	3	2	9	8	4
3	5	8	4	7	9	2	1	6
9	2	4	1	6	8	5	7	3
5	9	2	3	4	1	7	6	8
8	4	6	2	5	7	3	9	1
7	3	1	9	8	6	4	2	5

九宫 2

1	2	4	3	6	7	9	8	5
5	9	6	8	4	1	2	7	3
8	3	7	2	9	5	1	6	4
9	4	3	1	7	8	6	5	2
7	8	2	6	5	9	3	4	1
6	1	5	4	3	2	7	9	8
3	6	1	9	8	4	5	2	7
2	5	8	7	1	6	4	3	9
4	7	9	5	2	3	8	1	6

(供稿 李建才 责任编辑 李向荣)