

AFM 观察小白鼠心肌和肝核 DNA 片段的基因移位

Gene Translocation of Mouse Cardiac Muscle and Liver Nuclear DNA by AFM Observation

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. School 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(简称 AFM)直接观察、体外表达和体外转录等实验技术组合,观察到了心肌和肝的核 DNA 片段的基因;用磷酸缓冲液稀释,并用开关蛋白质等活性因子使其部分解离,促使核基因在核 DNA 片段内或核 DNA 片段间静态或动态移位,得到了对应核 DNA 片段中的相关基因,如 LDH/DNA 体外表达活性变化的 LDH 同工酶谱图。基因静态或动态移位均表达活性降低,且基因移位程度与其对应基因活性降低程度呈正相关性。展示了未来运用 AFM 和体外表达等实验技术组合研究核 DNA 片段的基因移位和对应基因突变机制的前景。

[关键词] 垃圾 DNA;蛋白质通路;基因;开关蛋白质解离;移位;突变;DNA;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)04-0051-05

Abstract: Combining direct observation by Atomic Force Microscopy (AFM), *in vitro* expression and transcription, mouse cardiac muscle and liver genomic genes were observed. Some active factors, such as switch proteins, were partially dissolved, causing nuclear genes move between nuclear DNA fragments or inside nuclear DNA fragments in static or metastatic ways. Some gene expression profiles like LDH gene were analyzed. Static or metastatic gene translocation shows decreased expression. Moreover, gene translocation is proportional to decreased activity. This work shows future prospect that combining AFM direct observation and *in vitro* expression may help study gene translocation and gene mutation.

Key Words: junk DNA;protein pathway;gene;switch protein dissociation;translocation;mutation;DNA;chain complex

CLC Numbers: Q751,Q752

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)04-0051-05

1 引言

早在 20 世纪 50 年代,美国麦克林托克(Bartbara McClintock, 诺贝尔医学奖获得者)观察到基因从染色体内的一个位置跳到另一个位置,甚至从一条染色体跳到另一条染色体,并创立了“移动的控制基因学说”^[1]。

原子力显微镜 (AFM) 自 1981 年由 Binnig 和 Rohrer 发明(由此曾获诺贝尔物理学奖)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,因而在 AFM 用于生物大分子的结构和功能的研究中显示出独特的优越性^[2]。目前国内外生物学界已广泛应用 AFM 来观察 DNA 片段、核酸和蛋白质等大分子生物学结构^[2],进行相关方面的研究。

1995 年,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,1997 年在国内外生物学界首次用 AFM 观察生物学反应取得了成功。我们观察到,核 DNA 片段上的活性基因处于关闭状态(即静态)时,其两头的调控序列以共价

结合支架蛋白(不可解离),同时以非共价(范德华力和氢键等)结合自己的编码蛋白与一种特定辅助信息分子形成复合体^[5-6](即开关蛋白质,以下简称开关蛋白质复合体)等,并与自己编码基因处于结合与解离的可逆动态平衡之中^[5]。当某一特定非结合态的开关蛋白质复合体等活性因子出现非自然减少的负反馈效应,其可逆动态平衡移动,自己编码的开关蛋白质复合体等活性因子迅速从编码自己的基因上非自然解离下来^[6],由此可能促使核 DNA 片段中的某些相关基因在核 DNA 片段内或片段间静态移位,并且核基因移位程度与自己编码的开关蛋白质复合体等活性因子解离下来的数量呈正相关性。

1997 年,用 AFM 观察到小白鼠心肌核 DNA 片段的基因在体外正常转录中形成 nRNA 链状复合体(n=9、12 等)^[4],并与对应“基因系”单链 DNA 两边的“接口”相连,该 nRNA 链状复合体在核内经“转录后修饰”,形成对应 n mRNA(n=9、12 等)线型链状复合体^[5-7]。

如果核 DNA 片段的基因两头的调控序列特异结合自己的编

收稿日期: 2006-02-15

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: zsykyc@fjzs.edu.cn

码开关蛋白质复合体^[6]等活性因子,其部分非自然解离,在转录过程中,由基因两头的调控序列特异结合的自己编码的开关蛋白质复合体等活性因子^[5-6],与对应基因和新转录出的无活性 RNA 等^[4]相互识别,以非共价键相互作用,形成网络结构,并促使核 DNA 片段的活性基因于转录过程中在双链核 DNA 片段内动态移位。静态或动态移位的核基因,其表达活性均降低。基因位移垃圾 DNA 的立体结构和特定蛋白质通路同时受到损伤。

衰老、疾病和癌症等均与基因突变相关,本研究将对抗衰老研究、疾病发病机理及对应药物研究、长寿学研究等产生广泛而重要的影响。

2 材料和方法

2.1 材料

原子力显微镜 Nanoscope III(USA)由中科院化学所提供。健康 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 鼠心肌和肝核 DNA 片段和 mRNAs 样品的制备

1) 小白鼠心肌和肝核 DNA 片段(未除去结合在它们上面的蛋白质)及心肌和肝 mRNAs(未除去结合在它们上面的蛋白质)分离制备,用 PAGE 电泳按文献[3,5]进行,略有改进。其核 DNA 片段样品分别为心肌 D₁,肝 D₁;mRNAs 样品分别为心肌 m₈和肝 m₈。

2) 将上述心肌 D₁和肝 D₁,心肌 m₈和肝 m₈样品,用 pH 7.9、0.000 1 mol/L 磷酸缓冲液等体积稀释(促使结合态开关蛋白质等部分解离),所得样品分别为心肌 1 号和肝 1 号,心肌 M₁号和肝 M₁号。

3) 将上述心肌 D₁和肝 D₁,心肌 m₈和肝 m₈,用氯仿近似完全除去结合态开关蛋白质等,所得样品分别为心肌 2 号和肝 2 号,心肌 M₂和肝 M₂。

4) (阴性对照)分别为上述心肌 D₁(统编号为心肌 3 号),心肌 m₈,肝 m₈(统编号分别为心肌 M₃和肝 M₃)作阴性对照。

2.3 鼠心肌核 DNA 片段体外转录样品制备

将上述 2.2 项 1) 中心肌的 D₁号等样品,用 pH 7.9、0.000 1 mol/L 磷酸缓冲液稀释 1/8 体积(促使核基因上结合态开关蛋白质复合体等部分解离),制得样品统编号为心肌 4 号。

阴性对照为上述 2.2 项 1)中心肌 D₁号,统编号为心肌 5 号。心肌 4 号和 5 号体外转录按文献[4]进行。

将上述肝 1~3 号(核 DNA 片段)样品进行体外表达(按文献[3]进行)。

2.4 AFM 观察

1) 样品制备和成像,取样约 1 ng/ul 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 项心肌和肝 1~3 号样品。

3) AFM 观察上述 2.3 项心肌 4 号和 5 号样品。

4) AFM 观察上述心肌 M₁,M₂和 M₃号,肝 M₁,M₂和肝 M₃号样品。

3 结果

3.1 AFM 观察心肌和肝核 DNA 片段中的某些活性基因的静态移位

1) 心肌 1 号样品(D₁等体积稀释),用 AFM 观察,图 1 可见心肌核 DNA 片段中某些基因随机形成闭环结构,并形成某些对应基因在核 DNA 片段内的静态移位。

2) 心肌 2 号样品(用氯仿近似完全脱去基因上可解离蛋白质^[5-6]后),用 AFM 观察,图 2 可见 2 条核 DNA 片(一长一短)相交。

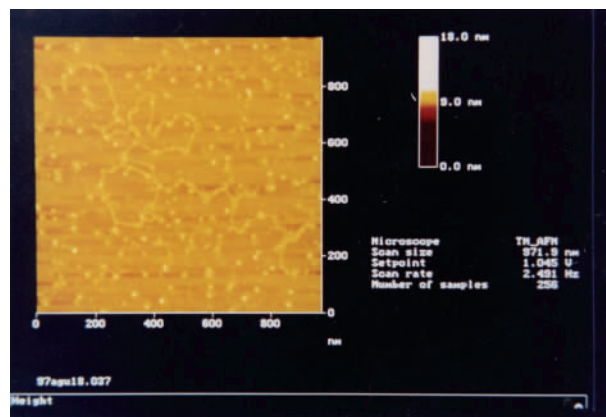


图 1 心肌核 DNA 片段的某些基因随机形成闭环结构
Fig. 1 Some cardiac muscle nuclear genes form randomly the circular structures

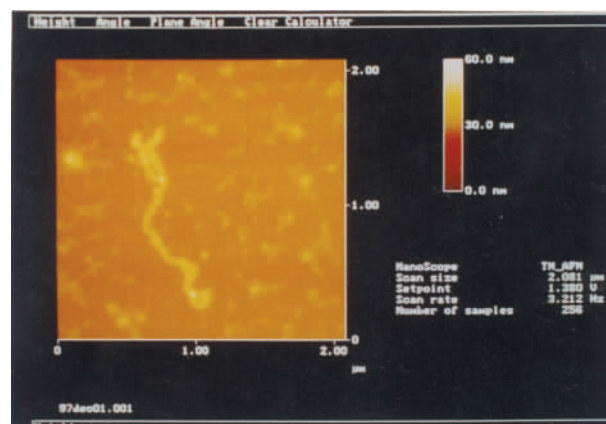


图 2 心肌核 DNA 片段的基因的开关蛋白质等用氯仿脱去,两条核 DNA 片段相交
Fig. 2 Switch proteins of cardiac muscle nuclear genes are dissociated with chloroform; two nuclear DNA fragments are intersected

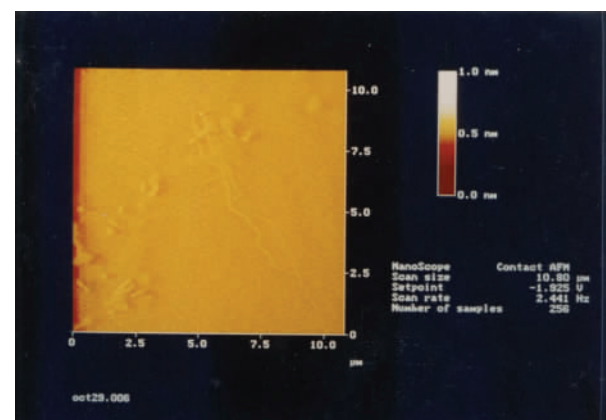


图 3 肝核 DNA 片段的某些基因随机成环
Fig. 3 Some liver nuclear genes form random circles

3) 肝 1 号样品(D₁等体积稀释),用 AFM 观察,图 3 可见肝核 DNA 片段中的某些核基因随机形成闭环结构,并形成相关的某些核基因在核 DNA 片段内的静态移位。

4) 肝 2 号样品 (D₁ 用氯仿近似完全除去基因上可解离蛋白质复合体等活性因子^[6]), 用 AFM 观察, 图 4 可见 2 条肝核 DNA 片段相交。

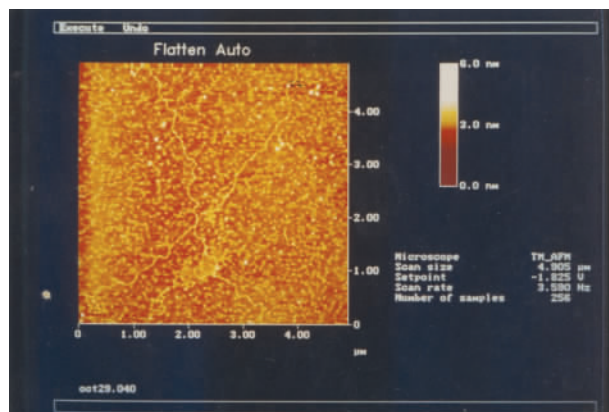


图 4 肝核 DNA 片段的基因的开关蛋白质等用氯仿脱去, 两条核 DNA 片段相交

Fig.4 Switch proteins of liver nuclear genes are dissociated with chloroform; two nuclear DNA fragments are intersected

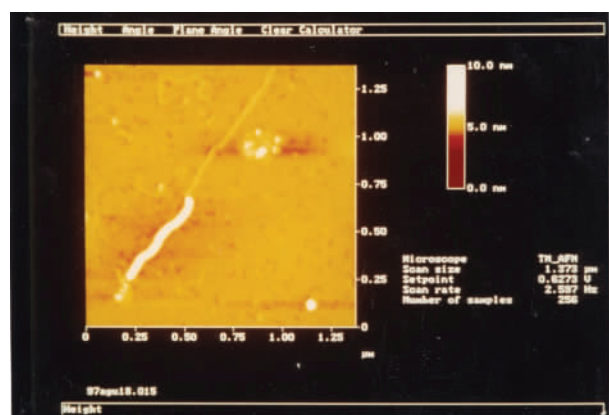


图 5 (阴性对照) 心肌 3 号核 DNA 片段的基因分别被特定蛋白质激活 (显白色), 另一部分为垃圾 DNA (显黄色) 片段的 AFM 图像

Fig. 5 (Negative control) Number 3 cardiac muscle nuclear genes are respectively activated by specific proteins (white color); another part is AFM image for junk DNA (yellow colored)

5) 心肌 3 号样品 (阴性对照), 用 AFM 观察, 图 5 可见心肌核 DNA 片段的活性基因两头与某些特定开关蛋白质复合体等活性因子结合^[6], 因蛋白质复合体体积较大, 将脱氧核苷酸序列掩盖故显示白色; 非活性核 DNA 片段未结合蛋白质等, 故显黄色 (可能为垃圾 DNA 片段)^[7]。

肝核 DNA 片段的基因极不稳定, 没有得到像上述心肌核 DNA 片段的基因 (阴性对照) 的结果, 可参考心肌核 DNA 片段的阴性对照。

3.2 AFM 观察心肌核 DNA 片段上的基因在体外转录过程中形成“网络结构”

1) 心肌 4 号样品体外转录 16 h, 用 AFM 观察, 图 6 可见心肌核 DNA 片段上的全部基因、其两头的调控序列结合的活性因子等、对应基因和新转录的 RNA^[5]等, 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 的特定立体结构和对应的某些蛋白质通路失去了特定的作用。核基因在转录过程中的移位我们称之为动态移位。

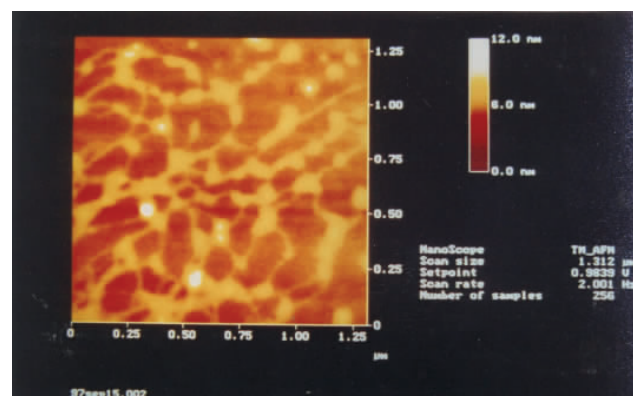


图 6 心肌核 DNA 片段的基因体外转录所形成的“网络结构”的 AFM 图像

Fig. 6 AFM image of circuited structure from *in vitro* transcription of cardiac muscle nuclear DNA fragments

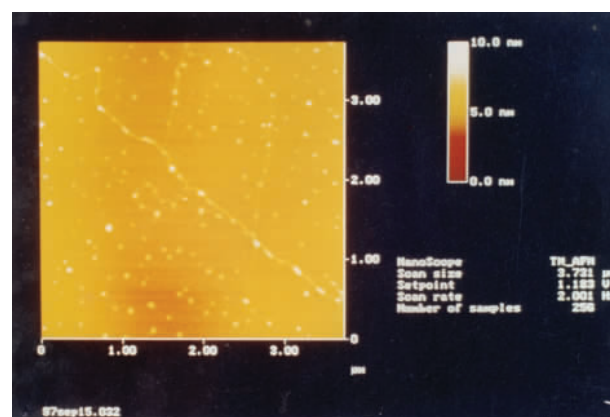


图 7 心肌核 DNA 片段的基因正常转录, 其 nRNA 链状复合体与对应基因系两边接口相连 (阳性对照) 的 AFM 图像

Fig. 7 Cardiac muscle nuclear DNA *in vivo* transcription; AFM image shows that mRNA chain complexes are linked with ends of corresponding gene lineage (positive control)

2) 心肌 5 号样品 (阳性对照 1) 体外转录 16 h, 用 AFM 观察。图 7 可见心肌核 DNA 片段中的各种“基因节”, 处于垃圾 DNA 的“转录平台”上^[7], 并转录形成对应的 nRNA (n=9、12 等) 链状复合体^[4], 其 nRNA 与对应基因系的单链 DNA 两边的接口相连, 形成心肌核 DNA 片段上的“活性基因节”的正常转录^[4]。

3) 心肌 5 号样品 (阳性对照 2), 用 AFM 观察。图 9 可见正常垃圾 DNA 的立体结构和某些蛋白质通路。

3.3 AFM 观察心肌和肝的 n mRNA 链状复合体中 mRNA 移位

1) 心肌 M₁ 号样品, 用 AFM 观察, 图 9 可见心肌 n mRNA^[6-7] (n=9、12 等) 线型链状复合体右边尾部成环, 形成 mRNA 在线型链状复合体内移位。

2) 心肌 M₂ 样品 (将心肌 m_s 样品用氯仿近似完全除去 n mRNA 链状复合体内可解离的蛋白质^[6-7]等活性因子), 用 AFM 观察。图 10 可见心肌 n mRNA 链状复合体解体, 形成单个 mRNA

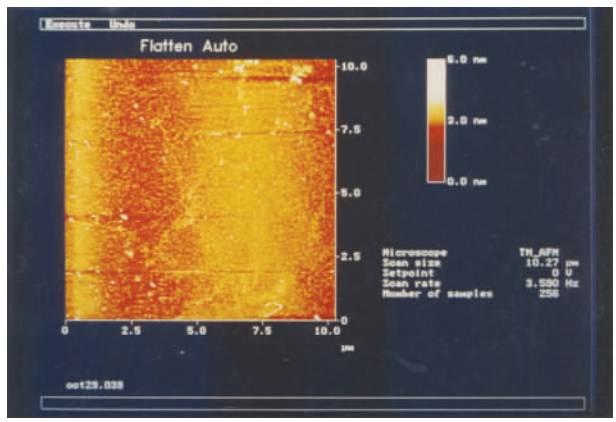


图 8 垃圾 DNA 的立体结构及某些蛋白质通路
(通路中蛋白质显白色)的 AFM 图像
Fig. 8 AFM images for stereotyped structure of junk DNA
and some protein pathways (proteins show white color)

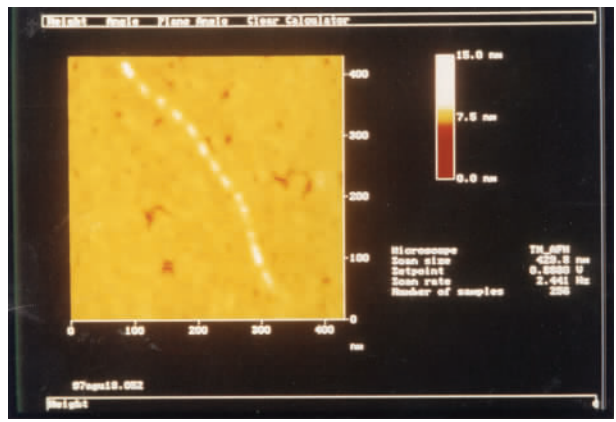


图 11 (阴性对照)正常 n mRNA 链状复合体
Fig.11 (Negative control) normal nmRNA chain complexes

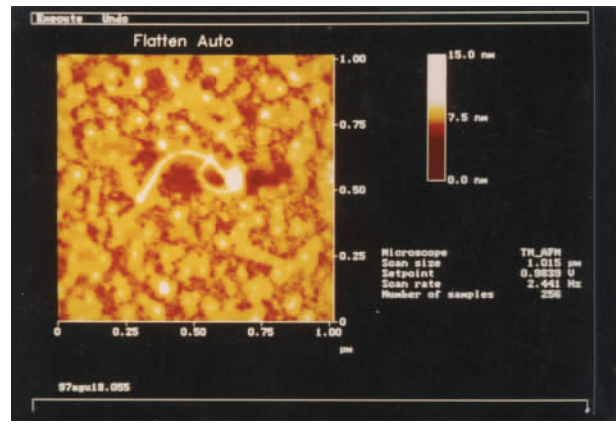


图 9 心肌 n mRNA 链状复合体右端尾部成环
Fig. 9 Cardiac muscle n mRNAs, right tails of chain
complexes form circles

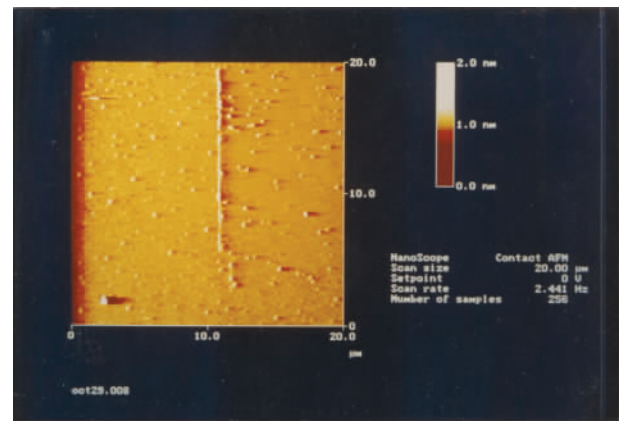


图 12 nmRNA 链状复合体一端的一个 mRNA
断开的 AFM 图像
Fig.12 AFM images for nmRNA chain complexes
(one end is open)

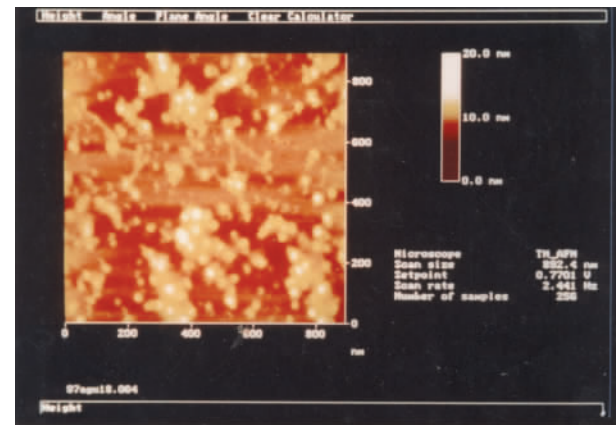


图 10 心肌单个 mRNA 和几种 mRNA 聚合物的
混合体的 AFM 图像
Fig. 10 AFM images for cardiac mRNAs
(single or mixture)

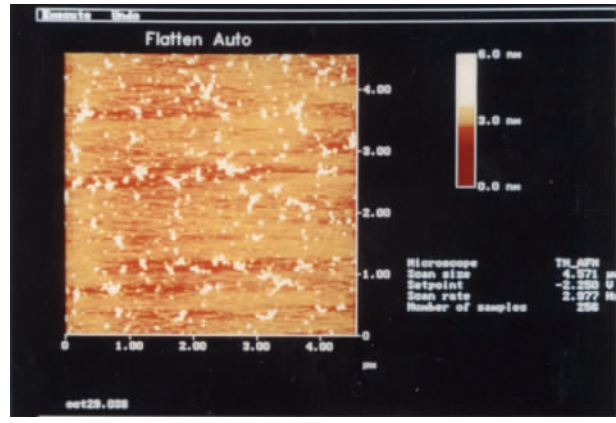


图 13 肝单个 mRNA 和几种 mRNA 聚合物的
混合体的 AFM 的图像
Fig. 13 AFM images for liver mRNAs (single or mixture)

或几种 mRNA 聚合物的混合体。

3) 心肌 M₃ 号样品 (阴性对照), 用 AFM 观察。图 11 可见心肌正常 n mRNA (n=12 等) 线型链状复合体^[4-7]。

4) 肝 M₁ 号样品, 用 AFM 观察。图 12 可见肝 n mRNA 线型

链状复合体右端断开一 (个) mRNA。

5) 肝 M₂ 号样品, (将肝 ms 样品, 用氯仿近似完全除去 n mRNA 上可解离蛋白质^[4-7]等活性因子), 用 AFM 观察。图 13 可见肝 n mRNA 链状复合体解体, 形成单个 mRNA 或几种 mRNA

