利用分子梳技术研究金属离子对 DNA 与组蛋白结合的影响

刘玉颖 王鹏业* 窦硕星 谢平 王渭池 尹华伟

(中国科学院物理研究所, 北京 100080. * 联系人, E-mail: pywang@aphy.iphy.ac.cn)

摘要 利用分子梳技术研究了一价(Na^+ , K^+)、二价(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})金属离子对 DNA 与组蛋白结合的影响. 我们将 λ -DNA 分子、 λ -DNA-组蛋白复合体在疏水表面上进行了拉伸, 用荧光显微镜直接观察加入金属离子后分子梳的变化. 结果表明: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 导致 DNA 分子上的荧光有不同程度的衰减; Na^+ , K^+ 在一定程度上抑制 DNA 与组蛋白的结合; Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 增强 DNA 与组蛋白的结合, 并能明显增加 DNA 与疏水表面的吸附; Mn^{2+} 容易导致 DNA-组蛋白复合体聚集.

关键词 DNA 组蛋白 分子梳 金属离子 荧光显微

近年来, 拉伸DNA已成为人们研究DNA的一种重要手段, 而荧光显微技术极大地方便了人们对单分子DNA^[1,2]的观察. 许多物理手段被用于拉伸DNA分子, 例如磁镊^[3-5]、光镊^[6-9]、微吸管^[10]、分子梳技术^[11-13]等. 最近, 我们利用分子梳技术结合荧光显微技术直接观察到了DNA单分子在拉伸力作用下的熔化现象^[14]. 我们还报道了DNA与组蛋白相互作用的实验结果^[15]. 组蛋白是一种基本蛋白质, 对DNA分子的压缩起着重要的作用, 在一定范围内, 它可以使DNA分子折叠成更加有序的高级结构. 真核生物中, 形成染色质时组蛋白与DNA紧密结合. 我们已对DNA与组蛋白的相互作用进行了布朗动力学模拟^[16,17], 初步显示了核小体组装、解离的动力学过程以及在拉伸力下的行为. 另外, 由于DNA与组蛋白两者均为生物大分子, 它们之间的相互作用非常复杂, 影响的因素也很多, 其中金属离子对DNA的结构^[18]、DNA的凝聚^[19]等都有重要的影响, 已经有很多种方法研究金属离子对DNA结构的影响, 例如紫外-可见分光光度测定法、圆二色谱、核磁共振谱、沉降平衡测量法等^[20]. 本文报道利用分子梳技术研究几种金属离子(Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})对DNA与组蛋白结合的影响. 将DNA分子拉伸并且平铺在疏水表面上, 然后用倒置荧光显微镜观察单个DNA分子及其与组蛋白的复合体, 通过直接观察DNA-组蛋白复合体的拉伸长度及形成的分子梳疏密的变化, 可以得知缓冲液中金属离子对DNA与组蛋白相互作用的影响, 这将有助于在单分子水平上研究DNA与组蛋白的相互作用^[21]. 目前, 从物理学的观点上对这

一问题的理解仍具有挑战性, 是一个值得从理论和实验两方面深入探讨的悬而未决的科学问题.

1 材料与方法

() 实验材料和仪器. λ -DNA($0.45 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)购自华美生物工程公司(中国); 荧光染料 YOYO-1 购自 Molecular Probes 公司(美国); 组蛋白和 Bis-Tris 购自 Sigma 公司(美国); NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 和 MnCl_2 都购自 Sigma 公司(美国); 高纯度水由 Millipore S.A. 系统(法国)获得; 倒置荧光显微镜型号为 IX-70, Olympus(日本); CCD 照相机为 CoolSNAP-HQ(美国). MetaMorph 软件(Universal Imaging 公司, 美国)用于系统的控制、数据采集及数据处理.

() 疏水表面的制备. 将石英片($21\text{mm} \times 42\text{mm}$)浸泡在热的 NaOH 溶液(0.5 mol/L)中 10 min, 然后用高纯水充分冲洗. 待石英片干燥后对其表面进行疏水处理: 将 $0.2\sim 0.3 \text{ mL}$ PMMA 溶液(溶剂为氯仿, 质量百分比为 10%)滴在石英玻璃表面的中心位置, 然后以 5500 转/min 的转速旋转 1 min. 旋涂完毕后将石英片放在烘箱中, 在 145°C 温度下烘烤 30 min, 然后在室温下放在无尘环境中保存以备. 石英表面的清洁度以及 PMMA 溶液的均匀性对膜的性质有重要的影响.

() DNA 溶液的制备. λ -DNA(48 kbp , 原长 $\sim 16.2 \mu\text{m}$)与新鲜制备的 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 荧光染料 YOYO-1 溶液(缓冲液为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0)在黑暗中和室温下共同保温 30 min, 碱基对与染料分子之比为 10:1, 然后用

Bis-Tris 缓冲液(50 mmol/L, pH~ 6.6)将标记好荧光分子的 DNA 溶液稀释至 6.5 pmol/L.

() DNA-金属离子复合体的制备. DNA- Na^+ 的制备步骤是在标记好 YOYO-1 的 DNA(6.5 pmol/L) 溶液中加入 NaCl, 在 37℃ 保温 30 min. NaCl 的浓度分别为 30, 50, 100, 150 mmol/L. DNA- K^+ 的制备与 DNA- Na^+ 的制备步骤相同 (KCl 代替 NaCl). DNA- Mg^{2+} 的制备步骤为在 DNA(6.5 pmol/L) 溶液中加入 MgCl_2 , MgCl_2 的浓度分别为 1, 2, 3, 5 mmol/L, 37℃ 保温 30 min. DNA- Ca^{2+} 和 DNA- Mn^{2+} 的制备与 DNA- Mg^{2+} 的制备步骤相同. CaCl_2 、 MnCl_2 的浓度分别为 1, 2, 3, 5 mmol/L.

() DNA-金属离子-组蛋白复合体溶液的制备.

(1) DNA- Na^+ -组蛋白复合体溶液. 用 Bis-Tris 缓冲液(50 mmol/L, pH~6.6)稀释组蛋白溶液, DNA 与组蛋白二者共同保温的一组作为对照组(DNA 与组蛋白摩尔比为 1 : 100). 制备 DNA- Na^+ -组蛋白复合体溶液时, 将 DNA, NaCl, 组蛋白三者共同保温(37℃) 30 min, NaCl 的浓度分别为 30, 50, 100, 150 mmol/L. 最后将反应液(1~ 2 μL)滴于疏水表面上, 成梳观察. 制备 DNA- K^+ -组蛋白复合体溶液的步骤与以上相同.

(2) DNA- Mg^{2+} -组蛋白复合体溶液. 在同一组实验中, DNA 与组蛋白二者共同保温作为对照组(DNA 与组蛋白摩尔比为 1 : 100); DNA, MgCl_2 , 组蛋白三者共同保温(37℃) 30 min. MgCl_2 的浓度分别为 1, 2, 3, 5 mmol/L. DNA- Ca^{2+} -组蛋白复合体溶液(DNA 与组蛋白摩尔比为 1 : 50)和 DNA- Mn^{2+} -组蛋白复合体溶液(DNA 与组蛋白摩尔比为 1 : 300)的制备, 实验步骤与 DNA- Mg^{2+} -组蛋白复合体的制备过程相同. CaCl_2 , MnCl_2 的浓度分别为 1, 2, 3, 5 mmol/L.

() 对 DNA 分子的荧光显微成像及其图像采集. 与 DNA 结合的 YOYO-1 分子的吸收谱峰值波长为 491 nm, 荧光发射谱峰值波长为 509 nm, 即在蓝光激发下可以发出绿色的荧光, 从而通过观察 YOYO-1 发出的荧光可以观察到 DNA 分子. 实验中激发光来自一个功率为 100 W 的汞灯, 用倒置荧光显微镜和 CCD 照相机对 DNA 进行观察并且采集照片, CCD 曝光时间为 3 秒.

2 结果

2.1 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 显著增加 DNA 与 PMMA 疏水表面的结合能力

在以前的实验中^[14], 对于没有组蛋白的情况, 我们观察到了 Mg^{2+} 能明显增加 DNA 与 PMMA 表面的吸附, 且随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 形成的分子梳密度逐渐增加. 这里我们又进一步研究了 Ca^{2+} , Mn^{2+} 对 DNA 分子梳的影响, 将不加离子的 DNA 单分子形成的分子梳作为对照组, 观察 DNA 溶液中加入不同浓度的 CaCl_2 或者 MnCl_2 (1, 2, 3, 5 mmol/L) 后, 形成分子梳的情况. 实验结果表明, 不管加入 CaCl_2 还是 MnCl_2 , 形成的分子梳密度均明显增加(相对于对照组)(见图 1, 2), 显示出 Ca^{2+} , Mn^{2+} 都能显著增加 DNA 与 PMMA 表面的结合能力. 这表明 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 这三种离子与 DNA 分子的结合方式可能具有类似的特点. 这些二价金属离子都能增加 DNA 与 PMMA 疏水表面的结合能力可能是由于通过增加水摩尔表面张力从而增加 DNA 与 PMMA 表面的疏水相互作用.

2.2 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 导致 DNA 分子的荧光有不同程度的衰减

我们的实验表明, 加入不同的金属离子后, 荧光

图 1 CaCl_2 对 DNA 分子梳的影响
[DNA] = 6.5 pmol/L. (a) [CaCl_2] = 0 (对照), (b) [CaCl_2] = 3 mmol/L

图2 MnCl_2 对 DNA 分子梳的影响[DNA] = 6.5 pmol/L. (a) $[\text{MnCl}_2] = 0$ (对照), (b) $[\text{MnCl}_2] = 3 \text{ mmol/L}$

都有不同程度的衰减. Na^+ , K^+ 对荧光的衰减作用最弱, 当它们的浓度为 30 mmol/L 时荧光强度与对照组(不加离子)无明显区别, 只有当它们的浓度大于 100 mmol/L 时, 荧光才有明显的衰减. Mg^{2+} , Ca^{2+} 对荧光的衰减作用明显强于一价离子, 浓度为 5 mmol/L 时荧光已经很弱. 所以在实验中二价离子的浓度限制在 5 mmol/L 以下. 加入 Mn^{2+} 后荧光衰减最为明显, Mn^{2+} 浓度仅仅为 1 mmol/L, 荧光已经衰减得很弱.

我们用 MetaMorph 软件定量地测量了不同情况下 DNA 分子的平均荧光强度. 结果表明: 当 Na^+ 的浓度为 150 mmol/L 时, DNA- Na^+ 复合体分子的平均荧光强度相当于其对照组的 0.79 倍, K^+ 浓度为 150 mmol/L 时, DNA- K^+ 复合体分子的平均荧光强度为其对照组的 0.84 倍; 在 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 的浓度均为 3 mmol/L 的情况下, DNA- Mg^{2+} , DNA- Ca^{2+} , DNA- Mn^{2+} 复合体分子的平均荧光强度分别为其对照组的 0.71, 0.63, 0.45 倍(见图 3). 另外, 对于同一种金属离子, 随着离子浓度的增加, 荧光衰减变得越显著.

由以上实验现象我们可以推断出, YOYO-1 与 DNA 的结合方式可能主要以插入到碱基对之间的内部结合为主, 同时也有少量的外部结合. 有研究表明, 一价离子与 DNA 结合的位点主要在 DNA 的大沟小沟处^[22]. 当 Na^+ , K^+ 与 DNA 结合时, 这些金属离子占据了一些位点, 它们与 YOYO-1 分子相互竞争, 导致与 DNA 分子外部结合的 YOYO-1 分子数量减少, 但碱基对内部仍有一定数量的 YOYO-1 存在, 所以 DNA 上的荧光虽然变暗, 但衰减程度较小, 仍然可以看到发出较亮荧光的 DNA 分子.

Raman 光谱表明过渡金属离子(Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) $\text{K}^+ \sim \text{Na}^+$ (见图 3).

图3 DNA-金属离子复合体的相对荧光强度分布图

 Na^+ , K^+ 的浓度为 150 mmol/L; Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 的浓度为 3 mmol/L

导致DNA结构发生大的变化, 过渡金属离子对长的DNA分子结构破坏能力较强; 这些金属离子主要与碱基对作用, 与磷酸骨架作用较弱^[20]. 在加入 Mn^{2+} 的情况下, Mn^{2+} 主要与碱基对结合, 破坏了YOYO-1与碱基对的结合, 加入 Mn^{2+} 后荧光显著变暗, 直接验证了 Mn^{2+} 主要与碱基对相互作用这一规律. 有研究表明碱土金属离子(Mg^{2+} , Ca^{2+})与磷酸根有较强的亲和能力. 与碱基对作用的强弱情况是: $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ ^[20]. 实验中我们发现 Mg^{2+} , Ca^{2+} 对DNA荧光的衰减程度相差不多, 明显高于一价离子, 但弱于 Mn^{2+} . 这也再一次证明了 Mn^{2+} 与碱基对作用强于 Ca^{2+} , Mg^{2+} . 总之, 这些金属离子的加入导致YOYO-1与DNA结合效率的降低, 其作用效果依次为 $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \sim \text{Mg}^{2+} >$

另外,有研究表明,当加入二价金属离子时,量子产率高低顺序依次为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$,它表明荧光的变化不仅因为与DNA结合的荧光染料配体数量减少,还与能量转换效率的高低有关^[23].并且,与碱基对作用越强的金属离子,其能量转换效率越低^[23].

由以上结果我们可以推断出,一价离子、二价离子与DNA结合方式存在着明显的差异.对于二价离子(Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}),它们与DNA的相互作用有相类似的特点,例如增加DNA与PMMA表面的结合.但它们与DNA结合的位点也存在着一定的差异,导致它们对DNA分子荧光衰减程度不同.应用分子梳以及荧光显微技术,我们对大量的DNA分子同时进行观测,在一定程度上验证了金属离子与DNA结合的特点.

2.3 Na^+ , K^+ 在一定程度上抑制DNA与组蛋白的结合

对于不外加离子的情况,我们以前的实验表明^[15],DNA与组蛋白形成的分子梳(图4(b))与没有

组蛋白时(图4(a))相比,变得非常密集,表明有大量的组蛋白与DNA结合.并且与DNA结合的组蛋白数目越多,形成的分子梳越密集,分子被拉伸的长度越短,有时还会出现分子不能完全被拉伸开,分子凝聚成团的现象.当DNA, NaCl和组蛋白三者共同保温一段时间后,成梳观察,发现被拉伸的复合体分子分布(图4(c))反而变得较稀疏(相对于对照组图4(b)),且对于不同的 Na^+ 浓度都有类似的现象.此结果表明加入 Na^+ 后,与DNA结合的组蛋白数目减少,可能是由于 Na^+ 与DNA结合时占据了组蛋白在DNA上的一些结合位点,在一定程度上抑制DNA与组蛋白结合.

对于 K^+ ,在同样的实验条件下,我们观察了 K^+ 对DNA与组蛋白结合的影响.从分子梳的分布可知, K^+ 与 Na^+ 具有类似的效果(图4(d)).我们分析 K^+ 与 Na^+ 这两种离子与DNA、组蛋白作用可能具有相类似的特点,它们都能在一定程度上抑制DNA与组蛋白的结合.

图4 加入一价金属离子(Na^+ , K^+)后, DNA-离子-组蛋白复合体的分子梳分布

[DNA] = 6.5 pmol/L. (a) [Histone] = 0; (b) [Histone] = 650 pmol/L(对照); (c) [Histone] = 650 pmol/L, [NaCl] = 30 mmol/L; (d) [Histone] = 650 pmol/L, [KCl] = 50 mmol/L.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2005-50-9-854>

2.4 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 都能显著增加 DNA 与组蛋白的结合

将不加离子的 DNA 与组蛋白分子梳作为对照组, 通过控制组蛋白与 DNA 的浓度比, 使对照组的分子梳(图 5b)较没有组蛋白时的 DNA 分子梳(图 5(a))密集程度有所增加, 然后观察加入 MgCl_2 对 DNA 与组蛋白结合的影响. 实验结果表明: 与对照组相比, DNA、 MgCl_2 、组蛋白三者共同保温形成的分子梳密集程度显著增加, 同时 DNA- Mg^{2+} -组蛋白复合体被拉伸的长度明显减小, 甚至还出现许多小亮团分布; 说明加入 Mg^{2+} 后, DNA 与组蛋白之间结合得更加紧密, 以至于不能完全被拉伸开(图 5(c)、(d)), 另外 DNA- Mg^{2+} -组蛋白复合体与 PMMA 表面的结合能力增加. 在实验中同时观察了 MgCl_2 浓度分别为 1, 2, 3, 5 mmol/L 时分子梳的形成情况, 发现在各种浓度下均有类似的现象, 且随着 MgCl_2 浓度的增加, DNA- Mg^{2+} -组蛋白复合体凝聚现象更明显.

CaCl_2 也能显著增加 DNA 与组蛋白的结合, 增加

DNA-组蛋白复合体与 PMMA 表面的结合能力, 使 DNA-组蛋白复合体凝聚现象加剧(图 6).

MnCl_2 导致 DNA-组蛋白复合体更加不易被拉伸开, 说明在 Mn^{2+} 存在的情况下, DNA 与组蛋白结合得更加紧密. 另外, 加入 Mn^{2+} 后, DNA-组蛋白复合体呈现许多亮点分布在 PMMA 表面上(图 7), 表明很多 DNA-组蛋白复合体分子已经聚集成团, 已经不能被拉伸开. 由以上实验现象可以得知: 三种二价离子均能增加 DNA-组蛋白复合体的凝聚程度, 其中 Mn^{2+} 作用效果更显著.

原子力显微镜观察到金属离子(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+})可以诱导 DNA 分子发生凝聚现象^[23]. 利用分子梳技术我们验证了组蛋白也使 DNA 分子发生凝聚现象. 金属离子、组蛋白与 DNA 共同保温后, 复合体分子梳密度显著增加, 同时单个复合体分子的凝聚现象加剧, 表明相对于金属离子、组蛋白分别单独与 DNA 作用时, 有更多的组蛋白、金属离子结合到 DNA 分子上. 也就是说, 二价金属离子、组蛋白同时存在时,

图 5 加入二价金属离子 Mg^{2+} 后, DNA- Mg^{2+} -组蛋白复合体的分子梳分布

[DNA] = 6.5 pmol/L. (a) [Histone] = 0; (b) [Histone] = 650 pmol/L(对照); (c) [Histone] = 650 pmol/L, $[\text{MgCl}_2]$ = 1 mmol/L; (d) [Histone] = 650 pmol/L, $[\text{MgCl}_2]$ = 2 mmol/L

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2005-50-9-854>

图 6 加入二价金属离子 Ca^{2+} 后, DNA- Ca^{2+} -组蛋白复合体的分子梳分布
[DNA] = 6.5 pmol/L, [Histone] = 325 pmol/L. (a) [CaCl_2] = 0(对照), (b) [CaCl_2] = 3 mmol/L

图 7 加入二价金属离子 Mn^{2+} 后, DNA- Mn^{2+} -组蛋白复合体的分子梳分布
[DNA] = 6.5 pmol/L, [Histone] = 1.95 nmol/L. (a) [MnCl_2] = 0(对照), (b) [MnCl_2] = 0.5 mmol/L

它们与DNA结合时起着协同的作用。二价金属离子与DNA结合过程中,可能使DNA的构型发生了一些变化,这种构型上的变化更有利于DNA与组蛋白的结合。前人用IR-光谱研究了 Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} 等离子对DNA结构的影响,这些离子与碱基和磷酸基团都有作用, DNA与金属离子复合体的二级结构形成时有更多的水分子与DNA结合^[24],水合作用力可以驱动DNA分子凝聚成核状^[23],以上这些作用机制可能是二价金属离子促进DNA与组蛋白结合的原因。但是离子与DNA作用机制还与离子的种类、结合的位点有关,此三种金属离子与DNA结合位点不同,例如 Mg^{2+} , Ca^{2+} 主要与磷酸骨架结合,能够中和一部分戊糖磷酸骨架上的负电荷; Mn^{2+} 主要与碱基对作用,导致三种离子作用效果强弱不同。

另外,有人通过对DNA分子的电场致双折射研究推断出:在 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 存在的情况下, DNA 组织成一种特殊的形式:压缩的、刚性的结构。 Mg^{2+} 存在时,

DNA形成非特异性的卷曲结构。对于染色质, Mg^{2+} , Mn^{2+} 存在时,构型也发生显著的变化,可能是核小体长链排列成超螺旋高度压缩的形式^[25]。我们用分子梳及荧光显微技术直接观察到了加入金属离子后, DNA以及DNA-组蛋白复合体分子梳的分布情况,在一定程度上直接验证了前人的实验结果。

有研究表明^[20],与碱基对有较高亲和力的金属离子容易引起DNA聚集。 Mn^{2+} 能使超螺旋DNA凝缩成圆环状, Mn^{2+} 导致DNA凝缩不仅仅是因为静电力的作用^[26]。在体外实验中多价离子使DNA浓缩,人们普遍认为多价离子能大部分中和DNA上的负电荷,大大减弱双螺旋间的静电斥力,从而引起DNA浓缩,在文献 26 中还计算出DNA发生凝聚时大约需要89%~90%的电荷被中和。但是,导致浓缩的配体还可能通过连接相邻的双螺旋,破坏水合结构及DNA双螺旋结构等而起作用^[26]。我们用荧光显微镜直接观察到了 Mn^{2+} 确实容易引起很多个DNA-组蛋白复合

体分子聚集在一起(图 7(b)), 并且DNA与DNA分子间结合力很强, DNA-组蛋白复合体与疏水表面的作用力也很强。目前, Mn^{2+} 导致DNA凝缩的机制仍然没有完全明确, 还需进一步研究。

3 结论

我们利用分子梳技术研究了一价(Na^+ , K^+)、二价(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})金属离子对DNA与组蛋白结合的影响, 得出如下结论:

(1) 一价离子与组蛋白共同存在时, 它们与DNA的结合存在着相互竞争, 一价离子在一定程度上抑制DNA与组蛋白的结合。

(2) 二价离子与组蛋白共同存在时, 它们对DNA与组蛋白结合起着促进作用, 表现为分子梳密度大大增加, 同时有DNA-组蛋白复合体凝聚成团的现象。有可能二价离子与DNA结合过程中, 使DNA的构型发生了一些变化, 这种变化有利于DNA与组蛋白的结合。

(3) 一价离子、二价离子与DNA结合方式可能不同。

与生化实验方法相比, 分子梳技术具有操作简便、实验现象直观明显、样品用量少等优点。从本工作可以看出, 分子梳技术可以很好地用于定性或半定量研究DNA与蛋白质分子的相互作用及其随金属离子浓度或其它溶液条件的变化情况。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 60025516 和 10334100)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Taekjip H. Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11: 287~292[DOI]
- 2 Bianco P R, Brewer L R, Corzett M, et al. Processive translocation and DNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules. *Nature*, 2001, 409: 374~378[DOI]
- 3 Smith S B, Finzi L, Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 1992, 258: 1122~1126
- 4 Strick T R, Allemand J F, Bensimon D, et al. The elasticity of a single supercoiled DNA molecules. *Science*, 1996, 271: 1835~1837
- 5 Allemand J F, Bensimon D, Lavery R, et al. Stretched and overwound DNA forms a pauling-like structure with exposed bases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14152~14157 [DOI]
- 6 Perkins T T, Smith D E, Chu S. Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain. *Science*, 1994, 264: 819~822
- 7 Perkins T T, Quake S R, Smith D E, et al. Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*, 1994, 264: 822~826
- 8 Smith S B, Cui Y J, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 1996, 271: 795~799
- 9 Bennink M L, Schärer O D, Kanaar R, et al. Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using optical tweezers: Interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1. *Cytometry*, 1999, 36: 200~208 [DOI]
- 10 Cluzel P, Lebrun A, Heller C, et al. DNA: An extensible molecule. *Science*, 1996, 271: 792~794
- 11 Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, et al. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 1994, 265: 2096~2098
- 12 Bensimon D, Simon A J, Croquette V, et al. Stretching DNA with a receding meniscus: experiments and models. *Phys Rev Lett*, 1995, 74: 4754~4757 [DOI]
- 13 Michalet X, Ekong R, Fougereousse F, et al. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, 1997, 277: 1518~1523[DOI]
- 14 Liu Y Y, Wang P Y, Dou S X, et al. Ionic effect on combing of single DNA molecules and observation of their force-induced melting by fluorescence microscopy. *J Chem Phys*, 2004, 121: 4302~4309 [DOI]
- 15 刘玉颖, 窦硕星, 王鹏业, 等. 应用分子梳技术对DNA与组蛋白相互作用的研究. *物理学报*, 2005, 54(2): 622~627
- 16 Li W, Wang P Y, Dou S X, et al. Interactions between DNA and histones-a dynamic process of nucleosome formation. *Chin Phys*, 2003, 12: 226~230[DOI]
- 17 Li W, Dou S X, Wang P Y. Brownian dynamics simulation of nucleosome formation and disruption under stretching. *J Theor Biol*, 2004, 230: 375~383 [DOI]
- 18 Chiu T K, Dickerson R E. 1 Å crystal structures of B-DNA reveal sequence-specific binding and groove-specific bending of DNA by magnesium and calcium. *J Mol Biol*, 2000, 301: 915~945[DOI]
- 19 Wissenburg P, Odijk T. Multimolecular aggregation in concentrated isotropic solutions of mononucleosomal DNA in 1M sodium chloride. *Macromolecules*, 1994, 27: 306~308[DOI]
- 20 Duguid J, Bloomfield V A, Benevides J, et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. 1. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophys J*, 1993, 65: 1916~1928
- 21 Wolffe A. *Chromatin structure and function*. 3rd edition. San Diego: Academic Press, 1998
- 22 Howerton S B, Sines C C, VanDerveer D, et al. Locating monovalent cations in the grooves of B-DNA. *Biochemistry*, 2001, 40: 10023~10031 [DOI]
- 23 Sun X G, Cao E H, Zhang X Y, et al. The divalent cation-induced DNA condensation studied by atomic force microscopy and spectra analysis. *Inorg Chem Commun*, 2002, 5: 181~186 [DOI]
- 24 Andrushchenko V V, Kornilova S V, Kapinos L E, et al. IR-spectroscopic studies of divalent metal ion effects on DNA hydration. *J Mol Struct*, 1997, 408: 225~228[DOI]
- 25 Emonds A X, Houssier C, Fredericq E. Electric birefringence of DNA and chromatin. Influence of divalent cations. *Biophys Chem*, 1979, 10: 27~39
- 26 Ma C, Bloomfield V A. Condensation of supercoiled DNA induced by $MnCl_2$. *Biophys J*, 1994, 67: 1678~1681

(2004-12-29 收稿, 2005-04-04 收修改稿)