

单分子水平上研究DNA损伤修复机制和非同源末端连接

DNA损伤修复应用案例

2017

单分子水平上研究蛋白质的折叠与展开动力学

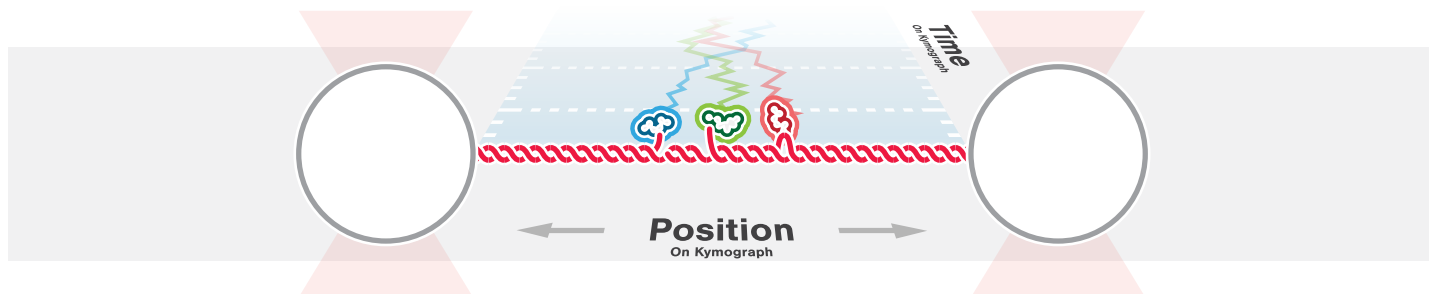


图1 四光镊集成系统研究单个DNA分子与修复蛋白间相互作用的示意图

DNA修复中的分子机制研究

DNA修复是高级调控机制的集合，通过这种调控细胞识别和修复DNA损伤，目前仍然是人生命活动中最基本的过程之一。没有DNA修复机制，细胞丧失了转录基因组重要区域的能力，导致了有害的突变，最终可能会危及细胞的生命。

DNA损伤的来源包括双链断裂以及DNA内部或者链间发生交联，如不进行修复，最终会发展成为恶性肿瘤，导致癌症的发生。在研究DNA损伤修复的过程中，单分子层面的研究大大提高了对其机制的理解。然而，已有的单分子技术手段需要具备两个方面的特征：首先要具备模拟体内生理学过程的能力，建立体外实验和体内生物学过程的联系；其次要具备检测到单分子行为

的能力，即系统要有较高的灵敏度和分辨率。LUMICKS公司的集成系统C-Trap®通过力学操控在单分子水平上模拟DNA损伤生理过程，并且实时监测修复过程中DNA和DNA修复蛋白相互作用动力学过程；并且在保证高度模拟体内生理环境下，具备超高的探测灵敏度和时间-空间灵敏度。

图1的示意图模拟了两个光镊控制的微球拴系单个DNA分子，缓冲体系中的多个DNA修复蛋白与DNA分子发生相互作用。多色共聚焦系统对荧光标记的蛋白实时成像，因此能够轻易获得修复蛋白在DNA分子上的位置、扩散速度以及蛋白与DNA分子的结合或解离事件、持续时间等相互作用过程；同步进行“力-延

伸距离”的实时测量建立了蛋白活性与结合动力学的关系，反应了DNA-蛋白复合物的力学特性。

相关文献

1. Newton, M. et al. DNA stretching induces Cas9 off-target activity. *Nature Structural & Molecular Biology* 2019, 26(3): 185-192.
2. Wasserman, M. et al. Replication Fork Activation Is Enabled by a Single-Stranded DNA Gate in CMG Helicase. *Cell* 2019, 178(3): 600-611.e616
3. Qin, Z. et al. Human RPA activates BLM's bidirectional DNA unwinding from a nick. *eLife* 2020;9:e54098
4. Sánchez, H. et al. DNA replication origins retain mobile licensing proteins. *Nature Communications*, 2021, 12 (190)

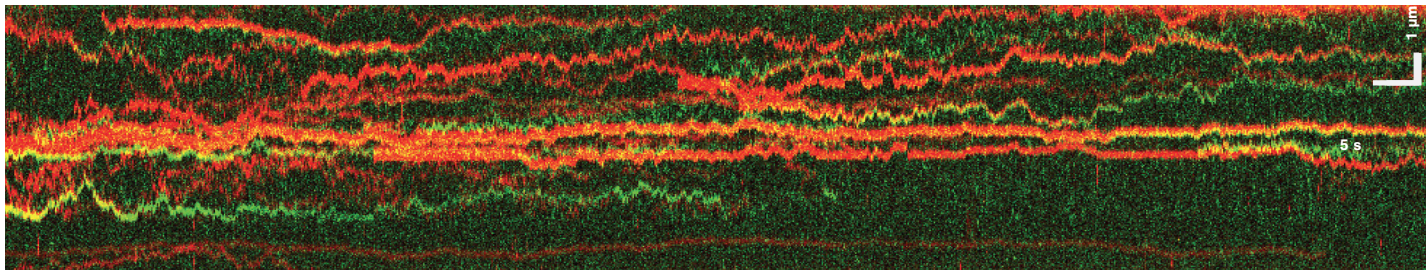


图2 光镊-共聚焦系统实验数据-波动曲线图：X轴为时间，Y轴为荧光标记的蛋白在DNA上的定位，图像显示了DNA损伤修复过程中DNA与修复蛋白的实时相互作用。

DNA损伤修复过程中通过对DNA-修复蛋白相互作用的高时空分辨的实时成像，DNA-蛋白质复合物的活性与动力学参数也能够通过计算简单得到。在使用C-Trap®的过程中，DNA分子必须拴系在光镊捕获的微球间，而缓冲溶液中荧光标记的多种修复蛋白与DNA直接相互作用。多色共聚焦成像系统的实时记录修复蛋白在DNA分子上的定位，修复蛋白在DNA分子链上的扩散、在DNA分子链上的移动，蛋白与DNA分子的结合或者解离时间，以及结合或解离持续的时间等等作用过程。

图2中的数据-波动曲线图定位了DNA修复蛋白XRCC4（绿色，占全部事件的9%）和XLF（红色，占全部事件的62%）与DNA分子结合时的位置，两种DNA修复蛋白同时参与到非同源末端连接修复通路，形成

了XRCC4-XLF复合物（黄色，占全部事件的29%）。

XRCC4和XLF在DNA桥联过程中也起到重要作用。此实验过程可以通过四光镊集成系统（Q-Trap®）轻易实现。如图3所示，四个光镊捕获的微球分别拉伸两个DNA分子，当在含有200nM的XLF和200nM的XRCC4缓冲体系孵育时，共聚焦荧光成像实时呈现了两个DNA分子的交互形变以及桥联结构的形成。实验证实，我们确实观测到了蛋白质串联两个DNA分子形成的DNA桥联的形成。进一步的力学操控实验证实了桥联系统的稳定性，也观察到了DNA修复蛋白在施加拉伸力情况下的生物学特性。对右下和右上的微球施加高强度的力学（>100pN）操控时，当力传输到拴系在微球上的两个不同DNA分子时，XLF-XRCC4形成的DNA修复复合物维持左边微

球之间的桥连状态，启动非同源末端连接修复模式；继续增加拉伸力到大于250pN时，桥连才会出现明显的断裂，反映出这种DNA-DNA复合物具备超高的稳定性和韧性。这篇文章是四光镊集成系统结合双DNA分子的模型首次应用到DNA损伤修复相关领域当中。

另外，DNA损伤修复过程通常发生于蛋白高度聚集的环境中，STED纳米级显微成像是区分单个标记蛋白位置的有力武器。C-Trap®可以升级为745nm的一维STED超分辨显微成像系统。更多有关STED超分辨显微成像的信息，请查阅LUMICKS网站。

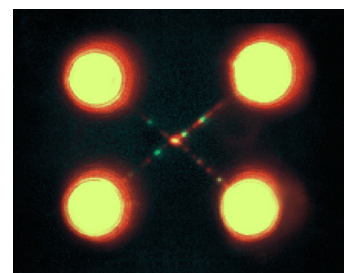


图3 双色共聚焦显微图像表明XRCC4和XLF的共同作用使两个DNA分子桥联形成交叉构象

有关本案例的更多信息，请参考文献：Brouwer et al, Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA, Nature, 2016, 535: 566-569

本案例中的数据有荷兰阿姆斯特丹自由大学的Gijs Wuite教授和Erwin Peterman教授提供

info@lumicks.com

www.lumicks.com

Or find us on:



LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41
1059 CH Amsterdam, The Netherlands
+31 (0)20 220 0817



LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100
Waltham, MA 02453, USA
+1 781 366 0380



LUMICKS 亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成
中心A座 577房间
电话: +86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)!. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available "as is" and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.

LUMICKS