

30 nm 染色质的体外组装和电镜分析 *

孙大鹏^{1, 2)} 宋 峰^{1, 2)} 黄 丽¹⁾ 张 阔^{1, 2)} 季 刚³⁾ 陈 萍^{1)**} 朱 平^{1)**}

⁽¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; ⁽²⁾ 中国科学院大学, 北京 100039;

⁽³⁾ 中国科学院生物物理研究所生物成像中心, 北京 100101)

摘要 真核生物的基因组以染色质的形式存在, 染色质在真核生物的基因表达调控及胚胎发育过程中起重要作用, 为表观遗传提供一个重要的信息整合平台. 染色质的高级结构, 特别是 30 nm 染色质的动态变化在基因转录沉默和激活过程中起着重要的调控功能. 但是目前对 30 nm 染色质纤维的组装及其精细结构的认识还十分有限. 本文通过体外表达系统, 表达未经修饰的组蛋白, 并利用克隆构建的 601DNA 均一重复序列, 通过逐步降低盐离子浓度并加入组蛋白 H1 或镁离子的方法, 体外重组均一的 30 nm 染色质纤维. 并利用镀金属、负染色制样和冷冻电镜制样等手段通过透射式电子显微镜(TEM)对 30 nm 纤维结构的形成原因、组蛋白 H1 的作用和核小体重复单位(nucleosome repeat lengths, NRLs)长度对 30 nm 染色质纤维的影响进行研究. 研究结果显示在组蛋白 H1 或二价镁离子存在的情况下, 均可形成 30 nm 染色质纤维. 其形成的染色质拓扑结构有所不同. 统计分析表明, 不同长度核小体重复单位(NRLs)形成的染色质纤维直径有所不同($P < 0.05$). 同时, 我们得到了较为均一的冷冻电镜样品, 为进一步研究 30 nm 染色质纤维的高级结构及理解体内染色质存在的形式及动态过程打下了较好的基础.

关键词 30 nm 染色质纤维, 透射电子显微镜, 染色质高级结构, 体外重组

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00539

众所周知, 真核基因并非以裸露的 DNA 分子或者仅仅与转录因子结合的 DNA 分子的形式自然存在, 而是与其他蛋白质, 尤其是组蛋白, 形成复合体, 这种复合体被称为染色质^[1]. 为了将线性长度长达 2 m 的 DNA 分子装入直径仅约 10 μm 的细胞核内, 基因经过了多层压缩折叠, 形成染色质高级结构^[2]. 染色质(而非裸露的 DNA 分子)作为转录、复制、重组、修复等一系列细胞生命活动过程的底物, 其在生命活动中不同阶段的压缩程度(extent of compaction)影响着转录因子、聚合酶、DNA 修复酶和重组机器对底物的接近程度^[3]. 染色质的这种多级折叠压缩机制不仅能将基因进行有效压缩, 以使 DNA 分子装入有限的细胞核空间里, 而且这种高级结构本身蕴涵着巨大的表观遗传学的信息^[4]. 染色质层级折叠的第一个层次涉及到核小体的结构. 即: 约 147 bp 的 DNA 分子以左手螺旋的形式缠绕在组蛋白八聚体构成的核心(H2A、H2B、H3 和 H4 各两分子)结构外面, 形成了一个核小体^[5]. 核小体之间由长度为 10~70 bp 的连接

DNA (linker DNA) 连接, 形成串珠状结构(beads-on-a-string)^[6]. 染色质折叠的第二个层次是串珠状的核小体在组蛋白 H1 或二价盐离子的作用下进一步压缩成直径约为 30 nm 的纤维状高级结构^[7-8].

目前对染色质折叠的第一级结构——核小体颗粒的研究已经达到原子分辨率水平^[9]. 然而对于折叠的二级结构——30 nm 染色质纤维的高级结构, 虽然已经进行了 30 多年的研究, 却仍然存在着争议. 尽管没有得到确定无疑的结果, 但人们在此研究过程中通过运用多种研究手段, 如利用小角散射^[8-9]、中子散射^[10-11]等等, 积累了大量的生物物理

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB825503, 2010CB912404), 国家自然科学基金(90919041, 31000566)和教育部留学回国人员科研启动基金(to CP)资助项目.

** 通讯联系人.

朱 平. Tel: 010-64888799, E-mail: zhup@ibp.ac.cn

陈 萍. Tel: 010-64856269, E-mail: chenping@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-11-01, 接受日期: 2012-12-27

学和生物化学数据,并提出了不同的 30 nm 染色质结构的模型.其中具代表性的有两类模型:一种是所谓的 One-start helices 模型^[12];另一种是 Two-start helices 模型^[13].两种模型的主要区别是:One-start helices 模型或螺线管模型中,相邻核小体之间的相互作用是稳定染色质结构的主要因素,每个核小体(记为 n)和它相邻的两个核小体 $n-1$ 及 $n+1$ 相毗邻,中间的连接 DNA(linker DNA)在螺线管内部弯曲,螺旋的直径不受连接 DNA 长度变化的影响;而在 Two-start helices 模型中两排核小体之间由拉直的连接 DNA 相互连接,核小体 n 和 $n-2$ 及 $n+2$ 的相隔核小体毗邻,螺旋的直径受连接 DNA 长度的影响^[14].在形成各种 30 nm 染色质纤维结构的过程中,人们发现组蛋白 H1 起着重要的作用^[10,12,15].目前的研究表明:组蛋白 H1 在体内是高度动态的,并且在不同染色质片段间不断地进行交换^[16-17].但 H1 是如何起的这种作用,以及 H1 在高级结构中的细节并没有研究清楚.在本研究中,我们利用体外原核表达、纯化组蛋白系统,以此消除了体内组蛋白的各种修饰影响,并利用人工构建的不同长度的均一 601DNA 重复序列(12 个重复单元和 50 个重复单元),在体外利用盐透析方法^[18]逐步降低盐离子浓度,加入组蛋白 H1 或镁离子组装成均一性较高的 30 nm 染色质纤维结构.然后利用负染色方法和冷冻电镜等技术,对镁离子和组蛋白 H1 对形成染色质高级结构的影响进行系统研究,并最终获得了较高浓度的冷冻样品,为后续对 30 nm 精细结构的进一步研究打下了较好的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

组蛋白质粒 pET-histone 及 601DNA 质粒 pWM530-177_12 和 pWM530-200_50 (177 代表 NRLs=177 bp, 12 代表 12 个重复单元 repeats)为李国红课题组保存质粒; BL21(DE3)pLysS 感受态细胞购自 TransGen 公司; QUANTIFOIL 铜网购自 WEST CHESTER PA USA 公司;所用 *EcoR* V 限制性内切酶购自 TAKARA 公司;云母片购自北京中镜科仪技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯.

1.2 组蛋白表达纯化

pET-histone 质粒转化 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞,氨苄\氯霉素抗性. 37℃ 培养过夜接种单克隆进 5 ml 含氨苄\氯霉素抗性的 LB 培养基, 37℃

摇床培养 7 h 后转接入 1 L 含抗生素的 LB 培养基扩大培养(37℃, 220 r/min). 直到 A_{600} 达到 0.5~0.7 时,用终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达, 2.5 h 后收集菌体(4 000 g, 4℃, 30 min). 再用 PBS 缓冲液充分重悬菌体后离心沉淀(4 000 g, 4℃, 30 min). 收集菌体用洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Na-EDTA, 1 mmol/L 胍)重悬, 超声充分破碎细菌. 菌体破碎后离心(23 000 g, 4℃, 20 min). 取沉淀用洗涤缓冲液加 1% Triton-X 100 重悬. 离心(23 000 g, 4℃, 10 min), 去上清. 重复此步骤 3 次. 将包涵体沉淀用 30 ml 变性缓冲液(7 mol/L 盐酸胍, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L DTT)充分溶解. 离心(23 000 g, 20℃, 20 min), 上清-80℃ 保存. 用以上方法得到 4 种组蛋白.

1.3 组蛋白八聚体组装

取等摩尔比例 4 种组蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4), 混合置于透析袋中, 于 4℃ 置于 2 L 复性缓冲液(2 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 1 mmol/L Na-EDTA, 5 mmol/L 2-巯基乙醇)中透析 3 次, 每次 6 h 以上. 透析后取出样品离心(23 000 g, 4℃, 20 min). 取上清用浓缩管浓缩样品至 500 μ l, 利用分子筛(HiLoad Superdex 200, Pharmacia 公司)进行纯化, 电泳检测. 收集对应峰处的组蛋白八聚体测浓度($A_{276} = 0.45$ 为 1 g/L)存于 4℃ 备用.

1.4 601 质粒 DNA 的大量提取纯化

用 pWM530-177_12 及 pWM530-200_50 质粒转化 Top10 感受态细胞, 氨苄抗性. 接种单克隆逐步扩大培养至 8 瓶(750 ml)菌液, 37℃、220 r/min 培养 12 h 后至 A_{600} 达到 1.5 左右收菌, 4 000 g 离心, 去上清, 将沉淀-80℃ 保存. 加入 240 ml GTE 缓冲液(葡萄糖 4.8 g/L、Tris-base 0.25 mol/L、Na-EDTA 10 mmol/L, 4℃ 保存)充分重悬菌体, 冰上放置 10 min. 加 480 ml 溶液 2(NaCl 0.1 mol/L、SDS 1%), 轻柔混合, 直至溶液清亮, 冰上放置 15 min 后, 加溶液 3(KAc 5 mol/L、冰乙酸 11.5%) 12 000 r/min、4℃ 离心 30 min; 留上清, 弃沉淀, 12 000 r/min、4℃ 离心 20 min; 留上清, 弃沉淀, 加 540 ml 异丙醇, 室温放置 10 min. 10 000 r/min、15℃ 离心 20 min, 弃上清. 加 160 ml 无水乙醇, 12 000 r/min、4℃ 离心 10 min, 去上清. 室温放置干燥沉淀. 加 24 ml TE 缓冲液(Tris-base 10 mmol/L、

Na-EDTA 1 mol/L pH 8.0)充分溶解 DNA 沉淀. 加 26.4 g CsCl 到 DNA 溶液中, 充分摇晃, 使 CsCl 完全溶解. 加 2.4 ml EB(10 g/L)到 DNA 溶液中, 混合后转移至超速离心管, 并用 CsCl/TE/EB 溶液 (CsCl 1 g/ml, EB 1 g/L, TE 缓冲液)加满试管, 热击封管. 72 000 r/min, 20℃ 离心 20 h. 离心结束后, 取出质粒条带, 加 10 ml NaCl/ 水饱和的正丁醇 (0.2 mol/L NaCl 混合等体积的正丁醇), 充分混匀静置, 待分层后除上清. 重复此步, 直至溶液无色. 加 6 ml 无菌水, 20 ml 无水乙醇, 4℃ 放置 15 min. 离心(12 000 r/min, 4℃, 10 min), 弃上清. 加 20 ml 70%乙醇, 重悬沉淀, 室温敞放直至乙醇挥发. 用 2 ml TE 缓冲液重悬沉淀, -20℃ 保存.

1.5 601DNA 片段的酶切纯化

酶切: 取 1 ml DNA 溶液根据其浓度取过量的 *EcoRV* 大量酶切. 将大量酶切后的 DNA 跑胶, 切下目的条带所在位置的胶条放入透析袋, 用 TBE 缓冲液浸泡. 将透析袋放入电泳槽中, 在 TBE 缓冲液中电泳, 150 V, 2 h. 反向跑 1 min, 取出透析袋中溶液离心(4 000 g, 10 min). 收集上清浓缩至 500 μ l. 酚-氯仿-异戊醇抽提, 13 000 r/min 离心 3 min, 取上清, 继续抽提, 直至 DNA 溶液无色. 加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液, 混匀, 低温放置 30 min. 13 000 r/min, 4℃ 离心 15 min. 弃上清, 加入 1 ml 冷却的 70%乙醇. 13 000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 弃上清, 室温倒置, 挥发掉乙醇. 加入 TE 缓冲液充分溶解 DNA, -20℃ 保存.

1.6 重构串珠状染色质及样品的喷金属电镜样品制备

将组蛋白八聚体和 601DNA 片段按一定的比例混合(表 1), 装于透析管中, 使之从 TE 缓冲液/2 mol/L NaCl 透析液中逐渐降低盐离子浓度直至 TE 缓冲液/0.6 mol/L NaCl 缓冲液中, 再在 HE 缓冲液中透析 3 h. 各取样品 30 μ l, 13 000 r/min 离心. 将上清和沉淀分别加入含 SDS 的上样电泳缓冲液使 SDS 的终浓度为 1%, 行琼脂糖凝胶检测.

根据电泳结果, 取合适的比例, 制镀金属电镜样品, 对组蛋白八聚体和 601DNA 片段的组装比例进行优化. 电镜制样方法为: 取样品 2 μ l 用 HE 缓冲液稀释至 20 μ l, 加入 4%戊二醛 3 μ l 固定 30 min, 加 1.2 μ l 20 $\times$ 精氨溶液, 将样品溶液滴到铜网上, 静置 2 min, 经过水、25%乙醇溶液、50%乙醇溶液、75%乙醇溶液、100%乙醇, 依次浸

泡 4 min 为样品脱水, 晾干. 镀金属, 电镜检测.

1.7 重组 30 nm 染色质纤维

将上步合适比例的八聚体和 601DNA 混合后, 透析(TE 缓冲液/2 mol/L NaCl 逐渐降低盐离子浓度至 TE 缓冲液/0.6 mol/L NaCl 缓冲液)加入组蛋白 H1, 继续透析 3 h, 然后在 HE 缓冲液中透析 3 h. 得到样品为含有组蛋白 H1 的 30 nm 染色质纤维. 或透析至 TE 缓冲液/0.6 mol/L NaCl 缓冲液后在含 1.0 mmol/L $MgCl_2$ 的 HE 缓冲液中透析 3 h, 得到样品为不含组蛋白 H1 的 30 nm 染色质纤维. 对样品进行负染样电镜检测. 负染电镜制样方法: 将喷好碳膜的铜网做亲水化处理, 用镊子夹住铜网的边缘, 将 2.5 μ l 左右的样品加到铜网上孵育 1 min, 用滤纸吸去样品溶液, 立即在铜网上滴加 5 μ l 2%乙酸双氧铀(uranyl acetate, UA)染液, 马上吸去染液, 再次加入 5 μ l 的染液, 再次用滤纸吸除. 最后再在铜网上加 5 μ l 染液孵育 2 min, 吸干后风干保存.

1.8 染色质直径测量及统计学处理

直径测量方法: 在 EMAN2 软件包输入相应的 pixel size 及电压信息, 利用 FEI company TEM imaging Analysis offline 软件进行染色质直径测量. 统计处理采用 IBM SPSS statistics 19 软件对样本作 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为有意义.

1.9 样品电镜数据收集

负染样品成像为 FEI 公司的 Tecnai 200 透射电子显微镜及 Tecnai 公司的 Spirit 120 透射电子显微镜. 冷冻数据的收集为 FEI 公司的 Titan Krios 300 透射电子显微镜. 采用低剂量模式成像, search 模式、focus 模式和 exposure 模式的放大倍数分别为 7 500 倍、50 000 倍和 59 000 倍. exposure 模式下拍照. 电子剂量约用 20 $e/\text{\AA}^2$. 球差系数 2.7 mm, 操作电压为 300 kV 加速电压.

2 结 果

2.1 体外组蛋白八聚体的组装

真核生物体内的组蛋白有各种修饰, 如甲基化、乙酰化、磷酸化等, 影响染色质高级结构的动态变化^[4]. 为了去除体内系统的修饰, 得到均一的染色质以利于结构研究, 我们用原核系统表达, 并利用包涵体复性的方法得到了未经体内修饰的 4 种核心组蛋白, 并在体外成功组装成了高纯度组蛋白八聚体(图 1). 收集图 1 中的 F10 和 F11 组分用于下一步研究.

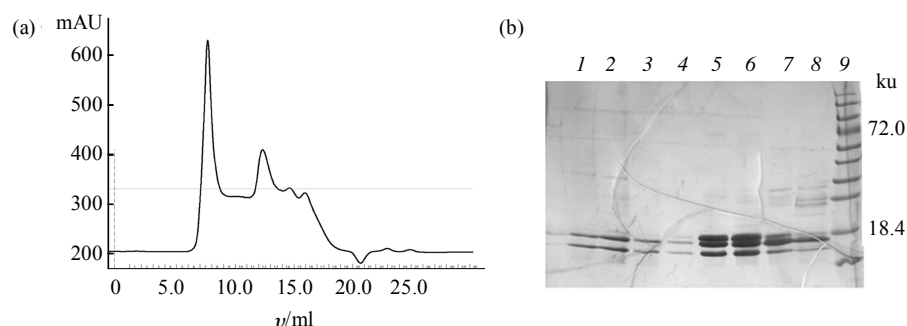


Fig. 1 Expression and purification of recombinant histone octamer

(a) Separation of recombinant histone octamer on HPLC by size exclusion chromatography. Superdex 200 columns was used. (b) SDS-PAGE analysis of the collected fractions in (a). 1: Fraction 6; 2: Fraction 7; 3: Fraction 8; 4: Fraction 9; 5: Fraction 10; 6: Fraction 11; 7: Fraction 12; 8: Fraction 13; 9: Protein molecular mass marker.

2.2 体外串珠状染色质的重组

组装出均一的 30 nm 染色质纤维的关键就是得到 DNA 与八聚体组装的精确比例, 如果八聚体不足则形成的串珠状染色质不饱和, 不能用于进行下一步得到 30 nm 染色质纤维的研究. 如果八聚体过量, 则会导致串珠状染色质的沉淀, 得不到可溶的染色质. 我们利用加入竞争 DNA(crDNA)的方法控制沉淀. 具体原理为: 由于 601DNA 序列具有强的核小体定位性^[9], 将优先与组蛋白八聚体组装形成核小体, 当 601DNA 序列结合组蛋白八聚体接

近饱和以后, 过量的组蛋白八聚体可以与竞争 DNA(crDNA)结合, 以防止过量的八聚体导致的沉淀, 即竞争 DNA 起到一种缓冲作用. 当竞争 DNA (crDNA)消耗光后, 组蛋白八聚体与 DNA 的进一步结合会导致沉淀. 组装时固定 DNA 的量, 依次增加八聚体的量(表 1 所示). 然后将组装好的样品离心, 利用琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 2). 开始时八聚体少, 601DNA 与竞争 DNA 均过量, 上清中两者均能检测到. 随着八聚体的增加, 601DNA 被优先组装形成核小体, 上清中 601DNA 减少,

Table 1 Histone octamer titration

	Sample								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Histone octamer	7.0	7.3	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1
DNA	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
5 mol/L NaCl	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0
TE buffer	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5

Histone octamer concentration: 5 g/L; 601DNA Concentration: 1 g/L; TE buffer: 10 mmol/L; Tris-Cl pH 7.5; 1 mmol/L Na-EDTA; volumes expressed in μ l.

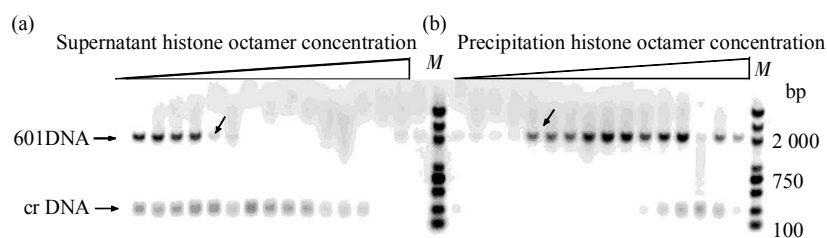


Fig. 2 Histone octamer titration analysed by a native gel electrophoresis

0.8% Agarose, post-stained with ethidium bromide. M: 1 kb DNA marker. (a) 1 ~ 16: 177bp_12 DNA array supernatant. (b) 1 ~ 16: Precipitation. Arrows indicate the optimized ratio in which the 601 DNA array is saturated but the crDNA is not. After this point, the histone octamer will start to bind the crDNA forming additional nucleosome cores.

直至消失, 如图 2a 泳道 5、6 左右(箭头所示). 与此同时, 沉淀中开始检测到 601DNA, 如图 2b 箭头所示. 此处即为组装的临界点也就是所需的合适比例. 通过蔗糖梯度离心的方法将 601DNA 序列

形成的染色质与 crDNA 结合的染色质进行分离. 利用镀金属制样, 并用透射电镜进行检测, 可见形成了饱和的串珠状结构(图 3).

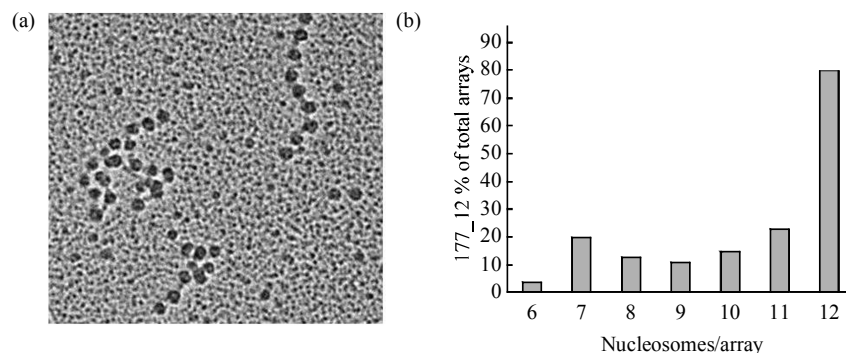


Fig. 3 12_177 nucleosome array reconstitution

(a) Electron micrograph (glutaraldehyde crosslinked samples rotary shadowed with carbon-platinum) of 177_12 arrays, TEM 120kV, 49k $\times$ magnification. (b) Histograms showing distribution of nucleosome arrays containing a certain number of nucleosomes per array calculated from several EM fields of 177_12 arrays.

2.3 30 nm 染色质形成的影响因素

体内染色质的结构是以高度动态的形式存在的^[2], 并受到各种因素的综合影响^[4]. 为了独立研究各个影响因素, 我们分别进行了有 Mg^{2+} (没有组蛋白 H1) 和没有 Mg^{2+} (仅仅有组蛋白 H1) 情况下的染色质纤维组装, 并对 Mg^{2+} 和 H1 对染色质高级结构形成的影响进行了研究. 研究结果显示: 利用体外透析方法得到染色质的一级串珠状(图 3)结构, 将其在含有 1.0 mmol/L $MgCl_2$ 的透析液中透析之后, 负染制样并电镜检测, 可见均匀的染色质高级结构形成(图 4a). 说明在没有组蛋白 H1 存在的情况下, 染色质也可以形成高级结构. 为了进一步研究 H1 在染色质高级结构形成中的作用, 我们将重构好的串珠状结构透析至 $MgCl_2$ 盐浓度为 0.6 mol/L 时加入组蛋白 H1, 最后透析于 HE 缓冲液之中(不含 $MgCl_2$), 电镜制样, 可见在没有二价镁离子而有组蛋白 H1 存在的情况下, 染色质也可以形成紧密的高级结构(图 4b).

2.4 组蛋白 H1 对 30 nm 高级结构的影响

由于细胞核内的真实环境是既有 Mg^{2+} 存在又有 H1 存在, 这两种因素及其他因素(如组蛋白变体、染色质重塑机制、DNA 甲基化等^[4])共同改变着染色质的高级结构. 为了研究这两种因素所形成

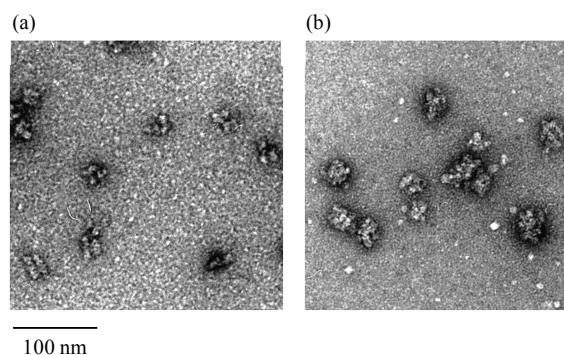


Fig. 4 Negative staining of 30 nm chromatin fiber

Electron micrograph: TEM 200 kV, 29k $\times$ magnification, 2% uranyl acetate stained, Scale bar: 100 nm. (a) Effect of $MgCl_2$ (1.0 mmol/L) on the folding of 30 nm chromatin fibers. (b) Effect of histone H1 on the folding of 30 nm chromatin fibers.

的染色质高级结构是否相同, 我们对两种因素形成的 30 nm 染色质结构进行了比较(图 5). 由电镜结果可见 Mg^{2+} 导致形成的结构和在组蛋白 H1 存在下形成的染色质结构有所不同. Mg^{2+} 可以促使双股平行结构的形成(图 5a, c); 而组蛋白 H1 可以引起平行结构的破坏, 导致双股结构的扭曲(图 5b, d).

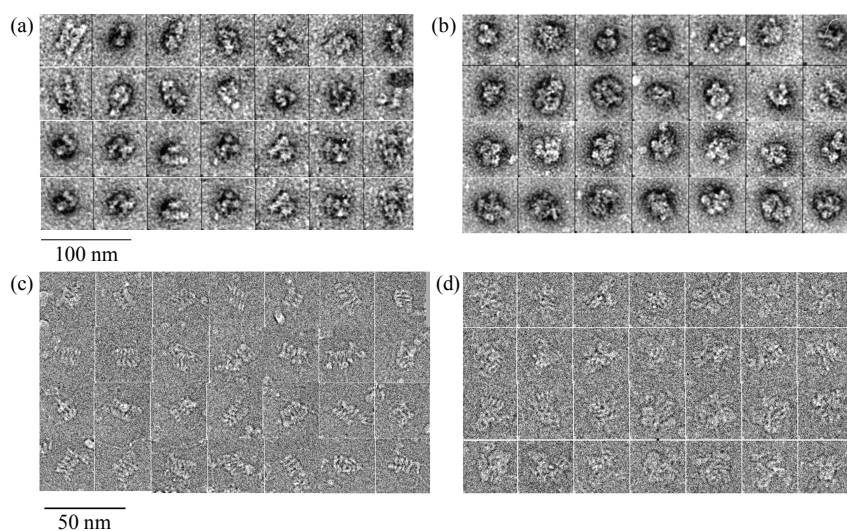


Fig. 5 Gallery of individual 30 nm chromatin fibers

(a, b) Negative staining of 30 nm chromatin; TEM 200 kV, 29k $\times$ magnification, 2% uranyl acetate stained, Scale bar: 100 nm. (c, d) Cryo EM of 30 nm chromatin; TEM 300 kV, 59k $\times$ magnification, total dose of 20 e/ $\text{\AA}^2$. (a, c) folded in MgCl_2 (1.0 mmol/L) without H1. (b, d) folded with histone H1 without MgCl_2 . Negative staining or Cryo EM investigation of the compact nucleosomal arrays has revealed that the 30 nm chromatin fibers folding in MgCl_2 (1.0 mmol/L) without H1 consist of two rows of nucleosomes running parallel to each other. The histone H1 disturbed the parallel structure.

2.5 DNA 重复序列的长度对 30 nm 染色质直径的影响

在不同物种或不同组织中, linker DNA 的长度是不同的(10~70 bp), 由此导致重复序列的不同长度蕴含着基因不同的转录活性^[6]. 为了研究不同的 linker DNA 的长度对染色质高级结构的影响, 及更

好地消除由于重复序列长度过短导致的末端影响(end effects)^[20], 我们成功构建了含有 50 个重复单元的 200 bp 601DNA 质粒 pWM530-200_50, 并利用和前述同样的方法得到了均一的含有组蛋白 H1 的 30 nm 染色质纤维, 如图 6 所示. 由于分辨率的限制, 我们还不能看到 DNA 在 30 nm 染色质纤维

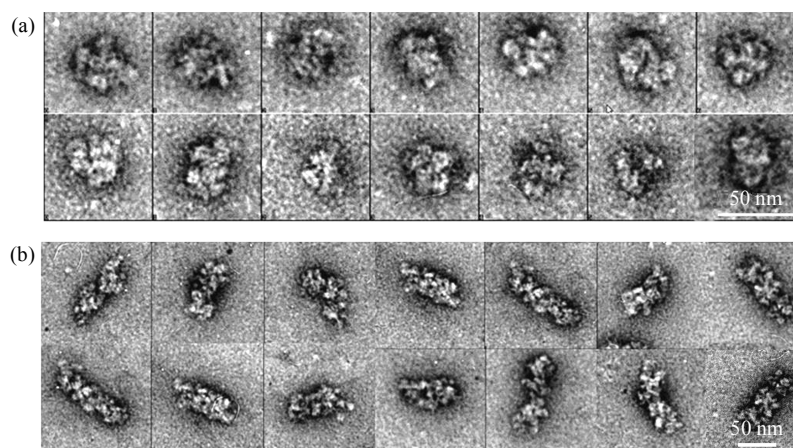


Fig. 6 Gallery of individual 30 nm chromatin fibers

(a) 177_12 chromatin fibers, TEM 200 kV, 29k $\times$ magnification, 2% uranyl acetate stained, Scale bar: 50 nm. (b) 200_50 chromatin fibers, TEM 120 kV, 68k $\times$ magnification, 2% uranyl acetate stained, Scale bar: 50 nm.

的明确走向, 但我们挑选了 NRLs 为 177 bp 及 200 bp 的染色质纤维各 100 个, 利用 1.8 中所述输入成像照片的 pixel size 及电压等, 测量其直径. 数据显示: 177 bp 的染色质直径在 (27.8 ± 4.0) nm 左右, 而 200 bp 染色质的直径为 (32.8 ± 3.9) nm 左右, 直径有明显不同 ($P < 0.05$).

2.6 30 nm 染色质纤维冷冻样品的获得

利用冷冻电镜方法解析染色质纤维的精细结构, 关键在于得到均一性较好、浓度适中的冷冻样品. 我们利用 Vitrobot™ Mark IV 全自动冷冻装置制样得到了均一性较好的冷冻样品(图 7b). 为解析 30 nm 染色质纤维的精细结构打下了较好的基础.

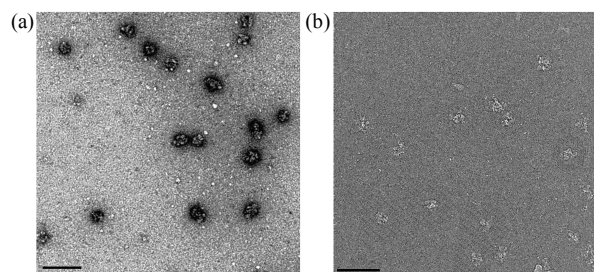


Fig. 7 Electron micrograph of 177 bp chromatin fibers

(a) TEM 200 kV, 29k $\times$ magnification, 2% uranyl acetate stained. (b) TEM 300 kV, 59k $\times$ magnification, total dose of 20 e/ $\text{\AA}^2$. The original EM picture was negated for comparing purpose. Scale bar: 100 nm.

3 讨 论

真核细胞中基因以染色质的形式存在. 在 DNA 复制和基因转录阶段, DNA 需要被各种复合物和因子接触才能行使相应的功能. 这种接触机制可以通过对染色质压缩的不同程度——即染色质高级结构的动态性调节来得以实现. 染色质高级结构受到 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质结合蛋白(如组蛋白 H1)等多种因素的调控^[21]. Mg^{2+} 及组蛋白 H1 对染色质的高级结构有重要影响^[22-24]. 对 30 nm 染色质纤维结构及其影响因素的研究可以大大加深对这些机制的了解. 除了以上调控机制外, 核小体重复序列的长度(nucleosome repeat lengths, NRLs)也影响着基因的活性. 目前已发现最短的 NRL 为裂殖酵母中的约为 155 bp^[25], 最长的 NRL 为棘皮类动物精子中的约为 240 bp. 同时, 研究表明基因的活性与 linker DNA 的长度有关. 由于与

组蛋白核心八聚体结合的 DNA 长度是一定的, 所以 linker DNA 的长度直接影响着 NRLs 的长度. NRLs 长度为 160~189 bp 的基因转录比较活跃, 而与转录不活跃基因相比, 有更长的 NRLs 约为 190~240 bp^[24]. 本研究中, 我们利用体外重组八聚体核心组蛋白及人工构建的不同长度的 DNA 重复序列, 通过透析的方法成功得到了均一的 30 nm 染色质纤维. 我们的研究结果显示: Mg^{2+} 及组蛋白 H1 均可以导致 30 nm 染色质纤维的形成, Mg^{2+} 条件下形成的染色质倾向于形成双股平行结构, 而组蛋白 H1 通过与核小体及 linker DNA 的作用改变这种拓扑结构. 而“表观遗传学”狭义上就可以被定义为: 通过调整染色质状态(而非 DNA 序列的改变)来实现基因转录调控^[26]. 考虑到体内这两种因素的作用, 染色质的结构可能在这两种构象中进行转变, 以实现不同的表观遗传学功能. 通过对 177 bp 重复序列重组的染色质与 200 bp 重复序列重组的染色质的直径对比分析, 证明染色质纤维的直径有所增加 ($P < 0.05$), 显示其可能不符合 one-start helices 模型的预期^[14]. 并且我们得到了均一的冷冻样品, 为解析 30 nm 染色质纤维的精细高级结构打下了较好的基础.

致谢 本文所有电镜相关工作在中国科学院生物物理研究所生物成像中心完成. 感谢孙书峰、孙磊、贾艳霞、陈永圣老师在电镜使用和样品制备等方面的大力帮助.

参 考 文 献

- [1] Weaver R. Molecular Biology. Chromatin Structure and Its Effects on Transcription. New York, McGraw-Hill Companies, 2011: 381-477
- [2] Woodcock C L, Ghosh R P. Chromatin higher-order structure and dynamics. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(5): a000596
- [3] Scheffer M P, Eltsov M, Frangakis A S. Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(41): 16992-16997
- [4] Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(2): 175-186
- [5] Richmond T J, Davey C A. The structure of DNA in the nucleosome core. Nature, 2003, 423(6936): 145-150
- [6] Correll S J, Schubert M H, Grigoryev S A. Short nucleosome repeats impose rotational modulations on chromatin fibre folding. EMBO J, 2012, 31(10): 2416-2426
- [7] Tremethick D J. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. Cell, 2007, 128(4): 651-654
- [8] Pardon J F, Wilkins M H. A super-coil model for nucleohistone.

- J Mol Biol, 1972, **68**(1): 115–124
- [9] Langmore J P, Schutt C. The higher order structure of chicken erythrocyte chromosomes *in vivo*. Nature, 1980, **288**(5791): 620–622
- [10] Zhou Y B, Gerchman S E, Ramakrishnan V, *et al.* Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. Nature, 1998, **395**(6700): 402–425
- [11] Suau P, Bradbury E M, Baldwin J P. Higher-order structures of chromatin in solution. Eur J Biochem, 1979, **97**(7): 593–602
- [12] Finch J T, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, **73**(6): 1897–1901
- [13] Woodcock C L, Frado L L, Rattner J B. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. J Cell Biol, 1984, **99**(1 Pt1): 42–52
- [14] van Holde K, Zlatanova J. Chromatin fiber structure: Where is the problem now?. Semin Cell Dev Biol, 2007, **18**(5): 651–658
- [15] Thoma F, Koller T, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. J Cell Biol, 1979, **83**(2 Pt1): 403–427
- [16] Pearson E C, Bates D L, Prospero T D, *et al.* Neuronal nuclei and glial nuclei from mammalian cerebral cortex. Nucleosome repeat lengths, DNA contents and H1 contents. Eur J Biochem, 1984, **144**(4): 353–360
- [17] Misteli T, Gunjan A, Hock R, *et al.* Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. Nature, 2000, **408**(6814): 877–881
- [18] Li Q, Wrangé O. Assays for transcription factors access to nucleosomal DNA. Methods, 1997, **12**(1): 96–104
- [19] Lowary P T, Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. J Mol Biol, 1998, **276**(1): 19–42
- [20] Robinson P J, Fairall L, Huynh V A, *et al.* EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, **103**(17): 6506–6511
- [21] Chen P, Li G. Dynamics of the higher-order structure of chromatin. Protein Cell, 2010, **1**(11): 967–971
- [22] Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun J M, *et al.* Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. Science, 2006, **311**(5762): 844–847
- [23] Catez F, Ueda T, Bustin M. Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells. Nat Struct Mol Biol, 2006, **13**(4): 305–310
- [24] Zlatanova J, Caiafa P, Van Holde K. Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. FASEB J, 2000, **14**(12): 1697–1704
- [25] Lantermann A B, Straub T, Stralfors A, *et al.* Schizosaccharomyces pombe genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of Saccharomyces cerevisiae. Nat Struct Mol Biol, 2010, **17**(2): 251–257
- [26] Allis C D, Jenuwein T, Reinberg D. Epigenetics, Overview and Concepts. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. 23–40

In vitro* Assembly and Electron Microscopic Analysis of 30 nm Chromatin Fibers

SUN Da-Peng^{1,2)}, SONG Feng^{1,2)}, HUANG Li¹⁾, ZHANG Kuo¹⁾, JI Gang³⁾, CHEN Ping^{1)**}, ZHU Ping^{1)**}

⁽¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

⁽³⁾ Center of Biological Imaging, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Genomic DNA in the eukaryotic nucleus is hierarchically packaged by histones into chromatin. The plasticity and dynamics of higher-order chromatin fiber have been widely thought as the key regulators of transcription and other biological processes inherent to DNA. Elucidating how nucleosomal arrays can be folded into higher-order chromatin fibers is essential to understand the dynamics of chromatin structure. Although the structure of nucleosomes, the fundamental repeating unit of chromatin, which comprises 147 base pairs of DNA wrapped in 1.7 superhelical turns around an octamer of histones, has been solved at the atomic resolution, there is still much controversy over the chromatin structure at the higher-order level. Here, we built an *in vitro* chromatin reconstitution system which adopts histone octamers and arrays of 177 bp and 200 bp repeat of the Widom 601 DNA sequence. Taking advantage of this system, we have obtained highly regular spaced and soluble nucleosome arrays, and folded the arrays into 30 nm chromatin fibers with the existence of linker histone H1 or MgCl₂ respectively. Several electron microscopic techniques, including metal shadowing, negative staining and Cryo-EM, have been used to investigate the morphology of the reconstituted 30 nm chromatin fibers. Our results suggest that both histone H1 and divalent Mg²⁺ can help the formation of 30 nm chromatin fibers, but the resulted chromatin fibers display different topologically architectures. To investigate how the length of linker histone may affect the architecture of chromatin, we measured the diameters of the reconstituted 30 nm chromatin fibers with different nucleosome repeat lengths (NRLs) of 177 and 200 bp and found that these two classes of chromatin fibers present different diameters ($P < 0.05$).

Key words 30 nm chromatin fiber, transmission electron microscopy, higher-order chromatin structure, *in vitro* reconstitution

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00539

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2009CB825503, 2010CB912404), The National Natural Science Foundation of China (90919041, 31000566) and Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

**Corresponding author.

ZHU Ping. Tel: 86-10-64888799, E-mail: zhup@ibp.ac.cn

CHEN Ping. Tel: 86-10-64856269, E-mail: chenping@moon.ibp.ac.cn

Received: November 1, 2012 Accepted: December 27, 2012