

# 大分子拥挤对 DNA 结构的影响

钟文涛 洪美亚 龚兴国\*

(浙江大学生命科学学院生物大分子与酶工程研究所, 杭州 310027)

**摘要** 大分子拥挤(macromolecular crowding effect)代表了细胞内高度拥挤状态, 其源于非特异性容积排斥效应, 是细胞内与 pH、离子强度等同等重要的生理因素。生物大分子介导的拥挤环境对于 DNA-DNA、DNA-蛋白质的相互作用以及 DNA 高级结构、细胞核或核区结构的稳定具有重要作用。在拥挤环境中, 大分子总浓度的增加将增强溶质的浓缩倾向, 从而降低溶液的自由能。拥挤效应是胞内大分子环境的总体反映, 具有高度的缓冲性, 保证了胞内反应的稳定进行及细胞功能的正常行使。

**关键词** 大分子拥挤; 拥挤试剂; DNA 结构; 浓缩; 缓冲性

长期以来, 对 DNA 结构及反应的研究多在稀溶液等简单体系中进行。但对于复杂的细胞体系, 由于多糖、蛋白质、核酸等生物大分子占据了胞内体积的 20%~30%<sup>[1]</sup>, 以及各类细胞器的充斥, 胞内空间显得异常拥挤, 故简单的稀溶液体系并不能真实反映胞内的 DNA 反应。

大分子拥挤(macromolecular crowding effect)代表了胞内的高度拥挤状态, 其源于非特异性容积排斥效应(volume excluded effect), 生物大分子的高浓度使其占据了胞内体积的很大部分, 同时排斥其他分子进入此空间。Minton 等<sup>[2]</sup>于 1981 年首先提出了“容积排斥效应”理论, 表现为胞内蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA 相互作用的加强, 以及 DNA 等长链分子紧密构型的诱导形成<sup>[3]</sup>。另外, 拥挤效应通过改变溶质分子的扩散速度, 影响了大分子反应的速率<sup>[4]</sup>。值得注意的是, 拥挤效应具有明显的可缓冲性<sup>[5]</sup>, 此特性在非最适条件下尤为明显。

Ellis<sup>[1]</sup>认为, 大分子拥挤在胞内无处不在, 与 pH、离子强度等生理因素同等重要。对拥挤效应在细胞生理生化反应中作用机制的研究, 有助于更好的了解生命系统内各种生物大分子的相互作用。

## 1 对 DNA-DNA 作用的影响

Zimmerman 等<sup>[6]</sup>发现, 加入拥挤试剂(crowding agent)能加快某些反应的速率, 促进平衡朝结合方向移动。所谓拥挤试剂, 是指反应惰性的生物大分子聚合物(inert polymeric cosolutes), 它们在反应体系中

充当了背景分子(background macromolecule)。这些大分子的存在, 能增加目标分子 DNA 与环境的排斥作用, 使 DNA 聚集<sup>[7]</sup>或提高处于解链状态的 DNA 重新形成双螺旋结构的反应速率, 这与高浓度 DNA 溶液中的自组装现象一致。而且, 惰性高聚体有助于增加 DNA 分子的热稳定性<sup>[5]</sup>。Goobes 等<sup>[5]</sup>在双链、三链 DNA 溶液中分别加入拥挤试剂聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG), 发现两种 DNA 的特征结合常数都明显增大。他们认为, 拥挤效应弱化了 DNA 与其水化层、溶液离子的静电作用, 从而稳定了 DNA 的紧密构象<sup>[8]</sup>。

长度小于 150 bp 的 DNA 片段不可能在稀溶液 ( $K^+ : Mg^{2+} : \text{精胺} = 140 : 1 : 1$ ) 中形成高度有序的稳定构象, 而 Goobes 等<sup>[9]</sup>和 Miyoshi 等<sup>[10]</sup>分别在三链、四链的短链 DNA 溶液中加入 PEG, 都得到了大范围螺旋状的紧密构象, 说明拥挤效应在 DNA 聚合反应中发挥了重要作用。

但拥挤效应对 DNA 结构的稳定作用只是相对的, 并不能阻止错配 DNA 的修复。拥挤效应同幅度地提高了错配双链 DNA 及相应天然结构的解链温度, 即同时增强了错配结构(mismatched structure)和天然结构的稳定性, 并没有改变两者生成能的绝对差, 即能隙(energy gap)。而且, 拥挤效应虽然弱化了 DNA 分子的外部水化层, 但对 DNA 螺旋的



内部水化层的影响却极小,因此并不能改变正确/错误配对的碱基对及后者的重新配对<sup>[5]</sup>。

拥挤试剂对DNA高级结构的稳定性也具有重要作用。对于T4 DNA等巨型分子,PEG在增加DNA结构紧密性的同时,也提高了DNA的分子间作用<sup>[11]</sup>。研究表明,不管T4 DNA是否处于紧密状态,拥挤效应都能使DNA双链的生成能达到最低值<sup>[12]</sup>。

DNA自身也可以构成拥挤环境,尤其在DNA浓度比较大时<sup>[13]</sup>,或超长DNA分子内部各螺旋段之间<sup>[14]</sup>。在 $\lambda$ DNA连接反应中,最终体系一般包括环型和线型两种连接产物。如果 $\lambda$ DNA分子浓度较低, $\lambda$ DNA分子接触自身尾端的几率要比接触其他分子的几率高,容易自连成环状;若增加 $\lambda$ DNA的绝对浓度,或加入PEG,通过拥挤效应来提高 $\lambda$ DNA的相对浓度,都将使 $\lambda$ DNA分子间作用几率增大,导致线性产物占绝对优势<sup>[13]</sup>。

## 2 对DNA-蛋白质作用的影响

拥挤效应不仅在DNA-DNA体系中发挥作用,也影响了DNA-蛋白质体系的反应进程。调控蛋白TyrR在大肠杆菌中对芳香族氨基酸的合成代谢进行全局性调控,其中涉及苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸合成与运输的8个转录单元的转录<sup>[15]</sup>。Poon等<sup>[12]</sup>在抽提液中不断增加蔗糖和PEG的浓度,发现TyrR与其特异DNA序列(TyrR box)的结合常数线性上升,表明拥挤环境在DNA-蛋白质反应体系中是不可或缺的。

胞内DNA的功能行使与各种DNA结合蛋白密切相关。细胞抽提液除了提供足量的DNA结合蛋白外,在一定程度上还形成了大分子拥挤环境,从而增加蛋白质-DNA相互作用的几率,有助于DNA的浓缩。PEG、小牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)等拥挤试剂的加入,降低了基因组DNA与各种结合蛋白反应时对结合自由能的要求,使拥挤效应得到更明显地增强<sup>[13]</sup>。

在类杆状烟草花叶病毒(TMV)溶液中分别加入BSA和聚乙烯氧化酶(polyethylene oxide, PEO),发现背景大分子的存在增加了TMV的区域浓度<sup>[16]</sup>。BSA和PEO形成拥挤环境,压缩了TMV的有效分布空间,并在TMV单体上形成覆盖膜,导致TMV在某些区域出现浓缩,及单体间静电作用增强,形成等方体、薄层状、晶体状等各种相,出现了相分离(phase separation)。

## 3 对细胞核或核区结构的影响

大分子拥挤是影响细胞核或核区结构形成的基本因素之一<sup>[17]</sup>。DNA在体外稀溶液体系中的合成速率远低于胞内,相信是细胞核内的拥挤效应促使处于转染、复制或其他状态下的各种DNA复合体发生聚集、稳定化,从而促进了细胞核或核区各种功能的发挥。

与小分子量的多聚物相比较,具有高分子量的高聚物在相同浓度下能更有效地引起核质收缩。拥挤效应从两个明显不同的方面促进基因组DNA的压缩<sup>[18]</sup>:一方面通过纯粹的胞内容积排斥,效应导致DNA的区域性浓缩;另外,拥挤效应增强了DNA与各种结合蛋白的结合效率及稳定性<sup>[17]</sup>,导致结合蛋白在数量上相对过剩<sup>[19]</sup>。研究还发现,在拥挤环境中,只需达到胞内类组蛋白总量的1/10~1/5,就足以促使DNA达到有效压缩<sup>[19]</sup>。对大分子拥挤在DNA压缩过程中作用机制的研究,有助于揭示DNA压缩的本质及生理意义<sup>[18]</sup>。

除了核基质及各种结合蛋白外,拥挤效应也被认为参与了细胞核分室过程(compartmentation),从而形成了不同的核功能空间<sup>[17,20]</sup>。有人认为,胞内比例超过20%的生物大分子的存在有助于促使DNA、RNA、蛋白质等生物大分子的浓缩,促进各组分形成稳定结构并行使正常功能<sup>[21]</sup>。

## 4 理论分析

在胞内或由反应惰性高聚物大量充斥的溶液中,大分子总浓度的增加将减小各组分的构象熵,增强大分子所固有的聚集化倾向,导致各组分间的结合常数出现呈指数形式增长,促使结合产物达到最小体积,从而降低了溶液的自由能<sup>[4]</sup>。理论上,容积排斥效应及其派生的拥挤效应适用于所有具有体积变化的溶液反应,如蛋白质或DNA等生物大分子的浓缩、新生肽链的疏水折叠等。

在拥挤环境中,由于背景大分子对物理空间的限制,各组分的实际充斥空间非常有限,因此明显增加了各组分的有效浓度或热力学活度。由此可见,目标分子的有效浓度决定于拥挤试剂的特征,尤其是拥挤试剂的分子量、体积与胞内的天然生物大分子接近时。研究证明,PEG、BSA、聚蔗糖(Ficoll)、葡聚糖(dextran)等反应惰性高聚物都能有效代替胞内的天然大分子,用以在体外溶液中模拟细胞生理生化反应<sup>[4,16,22]</sup>。其中,PEG分子具有球



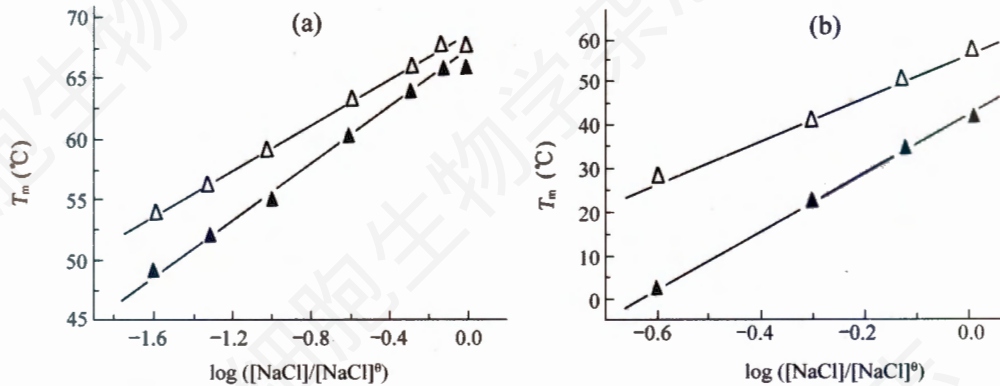


Fig.1  $T_m$  determination data of (a) the duplex and (b) of the triplex motifs, the concentration of which is 1.6 mmol/L respectively, on the logarithm of salt concentration on the presence of ( $\Delta$ ) and on the absence ( $\blacktriangle$ ) of 15% PEG<sup>[8]</sup>

形构象,能更有效地促进组分的富集化,增加大分子间的相互作用<sup>[23]</sup>,是模拟胞内拥挤环境的合适背景分子。

对于目标分子的聚集化(如蛋白质的二聚化和DNA双链的复性),拥挤效应一般促进反应向溶质总体积减小的方向,即朝结合方向移动。如 $\lambda$ DNA在胞内拥挤环境下的环化速率远大于在体外稀溶液中<sup>[13]</sup>;聚精氨酸(poly-arginine)或PEG的加入都能使巨型DNA分子的自由能明显减少,增加DNA分子的稳定性<sup>[15]</sup>。有人给出了拥挤环境中DNA解链温度 $T_m$ 的计算体系<sup>[24]</sup>:

其中, $T_m^0$ 是稀溶液中DNA解链温度, $\Delta V_{ex}$ 是每碱基对在两种溶液中占据物理空间的差值, $\Delta H$

$$T_m = T_m^0 + \frac{RT_m^{\theta 2}}{\Delta H} (\Delta V_{ex}) C_p$$

是DNA解链焓, $C_p$ 是溶液中高聚物分子的摩尔浓度, $R$ 是气体常数。而 $\Delta V_{ex}$ 可通过以下公式得到<sup>[24]</sup>:

$$\Delta V_{ex} = \Pi N_A L (R_{DNA} + R_{pol})^2$$

其中,假设DNA螺旋为一圆柱体, $R_{DNA}$ 为DNA螺旋的近似半径, $R_{pol}$ 为高聚物分子的近似半径, $L$ 为DNA螺旋的长度, $N_A$ 为阿弗加德罗常数。

但也有研究认为,拥挤效应因为有效地降低了所有组分的扩散速度,一旦体系中拥挤试剂的浓度过高,将严重降低目标分子单体间的接触几率及热运动速率,使之成为整个反应的限速步骤,从而导致反应的方向及速率难以预测<sup>[1]</sup>。

## 5 代谢缓冲

拥挤效应在胞内无处不在。研究表明,虽然

在pH、离子浓度等胞内生理因素都处于最佳值时,拥挤效应对DNA分子的稳定性并不突出;但在非最适条件下,拥挤效应却异常明显,其产生的拥挤漂移(crowding-mediated shift)能诱导结合反应往平衡态回归<sup>[5]</sup>。当溶液中NaCl浓度不断下降时(图1),PEG的加入明显地提高双链、三链DNA的解链温度,缓解温度提高时对DNA结构的破坏<sup>[8]</sup>。由此可见,拥挤效应对胞内的生理生化反应提供了高度的缓冲能力,避免胞内环境大幅波动,保证了胞内反应的稳定进行及细胞功能的正常行使。酶复合体、类组蛋白、多胺大分子及拥挤效应等都有助于DNA的压缩<sup>[25]</sup>。其中,酶复合体、类组蛋白、多胺大分子介导的压缩反应都依赖于DNA与其他组分的结合,并对pH值、离子浓度等环境因素的变化相当敏感。相反的,拥挤效应是胞内大分子数量及体积的总体反映,具有高度的缓冲性<sup>[23]</sup>。但需要指出的是,即使胞内普遍存在拥挤效应,也不可能使胞内各组分完全聚集、固定化,否则,细胞的正常生理活动也将完全停止。

## 6 小结

由于细胞生理生化反应体系过于复杂,在体外模拟时往往需要对体系进行简化,因此包括拥挤效应在内的众多因素一直被忽略。但大分子拥挤效应作为重要的胞内生理因素,其意义日渐被重视。为了更好的探讨DNA及其他大分子反应的机制及本质,在体系中加入合适的拥挤试剂,最真实地模拟胞内环境,是需要充分考虑到。

## 参考文献 (References)

- [1] Ellis RJ. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11**: 114  
[2] Minton AP *et al. Biochemistry*, 1981, **20**: 4821  
[3] Lavery PE *et al. J Biol Chem*, 1992, **267**: 9307  
[4] Minton AP. *Methods Enzymol*, 1998, **295**: 127  
[5] Goobes R *et al. Biochemistry*, 2003, **42**: 2431  
[6] Zimmerman SB *et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1993, **22**: 27  
[7] Minsky A *et al. J theor Biol*, 1997, **188**: 379  
[8] Bloomfield VA. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, **6**: 334  
[9] Goobes R, *et al. Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 2154  
[10] Miyoshi D *et al. Biochemistry*, 2002, **41**: 15017  
[11] Kidoaki S *et al. Biophys Chem*, 1999, **76**: 133  
[12] Poon J *et al. Biophys J*, 1997, **73**: 3257  
[13] Murphy LD *et al. Biophys Chem*, 1995, **57**: 71  
[14] Kafri Y *et al. Eur Phys J B*, 2002, **27**: 135  
[15] Zhao S *et al. J Bacteriol*, 2000, **182**: 1053  
[16] Adams R *et al. Biophys J*, 1998, **74**: 669  
[17] Zimmerman SB *et al. FEBS Lett*, 1996, **390**: 245  
[18] Murphy LD *et al. Biochim Biophys Acta*, 1994, **1219**: 277  
[19] Hancock R. *Chromosoma*, 2000, **109**: 219  
[20] Johansson HO *et al. Int Rev Cytol*, 2000, **192**: 155  
[21] Minton AP. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 10577  
[22] Record MT Jr *et al. Trends Biochem Sci*, 1998, **23**: 190  
[23] Zimmerman SB *et al. Biochim Biophys Acta*, 1988, **949**: 297  
[24] Spink CH *et al. Biochemistry*, 1999, **38**: 496  
[25] Rosania GR *et al. Exp Cell Res*, 1995, **218**: 114

## The Impact of Macromolecular Crowding Effect on the Formation of DNA Structure

Wen-Tao Zhong, Mei-Ya Hong, Xing-Guo Gong\*

(Institute of Bio-macromolecule and Enzyme Engineering, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract** Macromolecular crowding effect, which developed from the theory of volume excluded effect, represents a ubiquitous highly crowded condition in living cells and plays an equally important role in cellular physiology with pH value, ionic strength, etc. Crowding agents, such as polyethylene glycol (PEG), significantly functions in the interactions of DNA-DNA or DNA-protein, and stabilizes the formation of higher-order structure of DNA and nucleolus or nuclear area. Macromolecules in crowded environment have an intrinsic tendency of association and aggregation, which arises with the concentration of the macromolecules and reduces the free energy of the solvent by leading solutes to smaller volume. The buffering capacity of macromolecular crowding exceedingly maintains the intracellular physiological condition, ensuring the normal function of living cells.

**Key words** macromolecular crowding effect; crowding agent; DNA structure; association and aggregation; buffering capacity

Received: March 8, 2004 Accepted: June 18, 2004

\*Corresponding author. Tel: 86-571-87953002, E-mail: gongxg@cls.zju.edu.cn