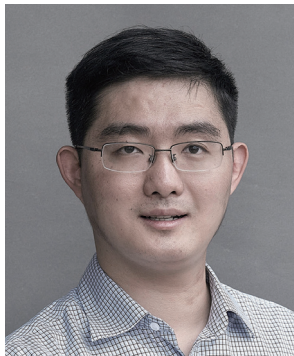


实验室介绍



刘珈泉, 研究员, 2019年9月起, 任中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所课题组长、博士生导师。该实验室主要通过发展和应用单分子荧光成像等跨学科研究手段, 解析抗病毒天然免疫应答过程中蛋白质机器的动态组装及其功能, 现阶段尤其关注双链RNA感受器的一维运动行为及其生物学意义。

https://cemcs.cas.cn/sourcedb/zw/pi/202008/t20200823_5670077.html

核酸结合蛋白的一维运动及其生物学功能

杨晓文 刘珈泉*

(核糖核酸功能与应用重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要 许多动力学研究已经观察到核酸结合蛋白在大分子核酸上的一维运动。尽管这些运动通常并不依赖特定的核酸序列, 但它们在各种生命活动中具有重要作用。例如, 转录因子通过一维运动靶向启动子或增强子区域并调控基因表达、DNA修复蛋白通过一维运动检测DNA损伤和传递修复信号、染色体结构维持蛋白通过一维运动调控染色体的结构等。当前, 揭示核酸结合蛋白一维运动的生理功能和意义仍然是核酸生物学研究的一大挑战。该文将介绍核酸结合蛋白一维运动的模式, 探讨单分子技术在实时观测核酸结合蛋白一维运动中的应用及其优势, 并总结最近发现的核酸结合蛋白一维运动的生物学功能。

关键词 核酸结合蛋白; 一维运动; 单分子技术

One-Dimensional Movements of Nucleic Acid-Binding Proteins
and Their Biological Functions

YANG Xiaowen, LIU Jiaquan*

(Key Laboratory of RNA Innovation, Science and Engineering,
Chinese Academy of Sciences Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai 200031, China)

Abstract Numerous kinetic studies have documented the 1D (one-dimensional) movements of nucleic acid-binding proteins along macromolecular nucleic acid. These movements, although generally independent of specific nucleic acid sequences, play critical roles in various biological processes. For example, transcription factors locate promoter or enhancer regions through 1D movements to regulate gene expression; DNA repair proteins

收稿日期: 2024-06-25

接受日期: 2024-10-10

*通信作者。Tel: 021-54921649, E-mail: liujiaquan@sibcb.ac.cn

Received: June 25, 2024

Accepted: October 10, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921649, E-mail: liujiaquan@sibcb.ac.cn

detect DNA damage and initiate repair signals by 1D movements; SMCs (structural maintenance of chromosomes) also employ 1D movements to regulate chromosome structure, etc. However, evaluating the physiological significance of these motions in relation to the nucleic acid-binding protein's functions remains a major challenge. This paper will introduce the modes of 1D movements of the nucleic acid-binding proteins, discuss the applications and advantages of single-molecule techniques for real-time observation of 1D movement, and summarize recent discoveries regarding their biological functions.

Keywords nucleic acid-binding proteins; one-dimensional movement; single-molecule techniques

核酸结合蛋白和核酸的相互作用在DNA复制、DNA修复、DNA同源重组、基因表达调控以及抗病毒天然免疫应答等关键生命活动中发挥着重要作用。例如,转录因子能够特异性地与DNA序列,如启动子、增强子或其他调控区域进行结合,调节基因的转录活性^[1];当DNA受到损伤时,修复蛋白可以识别损伤位点,招募下游因子并对DNA进行修复^[2];此外,在细胞受到病原微生物入侵时,核酸感受器能够探测外源核酸分子以启动天然免疫应答^[3]。

在生物化学和生物物理学研究中,通常用三维扩散(three-dimensional diffusion, 3D diffusion)和随机碰撞(random collision)理论来描述和预测两个生物大分子发生相互作用的动力学过程。由于基因组的规模庞大,核酸结合蛋白在三维空间中通过随机碰撞靶向目标序列的效率较低,因此很难解释它们结合靶标的高效性。早在1968年,ADAM和DELBRÜCK等^[4]曾经提出降低生物系统中基于扩散反应的维度,可以大大提高生物分子相互作用的效率。两年后,RIGGS等^[5]发现乳糖抑制子(*lac repressor*, LacI)结合目标DNA序列的速度比随机碰撞的理论速度快了两个数量级,说明LacI还利用了三维扩散以外的方式靶向目标序列,这一发现引发了一系列关于DNA结合蛋白在DNA上移动的机制研究。1981年,BERG等^[6]首次用数学模型描述了DNA结合蛋白识别DNA的动力学过程,并提出了四种不同的运动模型,为核酸结合蛋白的一维运动(one-dimensional, 1D)研究奠定了理论基础。随后大量研究表明,核酸结合蛋白与核酸的相互作用是高度动态的,其中许多DNA结合蛋白和RNA结合蛋白能够在长链核酸上进行一维运动^[6-9]。

核酸结合蛋白1D运动的原理与其结合模式紧密相关。人们往往采用蠕虫链模型(Worm-like chain, WLC)来描述双链核酸的物理性质^[10-11]。出于熵的原因,WLC模型下的核酸分子维持紧凑的松弛

状态比伸展状态更容易,因此在溶液中几乎普遍以纠结的松弛形式存在。但无论是在松弛还是伸展状态的大分子核酸上,核酸结合蛋白都可以利用NTP水解能量驱动的构象变化、非特异性静电相互作用以及特殊构象的形成等几种不同的物理化学原理来实现1D运动^[6,12-16]。近年来的研究表明,这些1D运动可能参与了复合物组装、信号传递和级联放大等复杂生命活动过程^[15,17-20]。然而,对其生理相关性的理解大多仍停留在生物物理层面。本文总结了近年来关于核酸结合蛋白1D运动的研究结果,并从以下三个方面:蛋白1D运动的模式、研究方法和生物学功能,加以介绍。

1 核酸结合蛋白1D运动的模式

早期的核酸结合蛋白1D运动研究主要聚焦在DNA聚合酶、RNA聚合酶和解旋酶,这些蛋白能够沿着核酸的磷酸骨架逐个碱基移动^[21-22],具有明显的进行性(processivity)特征。后续的研究发现,许多能够识别特定序列的DNA结合蛋白,如限制性内切酶和转录因子,可以通过沿着DNA磷酸骨架进行自由扩散(diffusion)^[23-25]。因此,核酸结合蛋白1D运动主要分为主动和被动两大类,以运动过程中是否消耗NTP水解的能量为区分方式。

1.1 易位或转位(translocation)

绝大部分的DNA聚合酶、RNA聚合酶和解旋酶通过水解核苷三磷酸(nucleoside triphosphate, NTP)沿着磷酸骨架进行定向运动,同时伴随着核苷酸的掺入或碱基配对的破坏^[26-27]。这些蛋白往往会识别单链-双链核酸交界处(如ssDNA-dsDNA junction),通过NTP结合和水解改变自身构象并沿着碱基逐步移动。此外,有一些被称为分子马达(molecular motor)的核酸结合蛋白通过水解NTP在核酸上进行定向运动,该过程并没有发生核苷酸掺入或双链解旋^[14,28-29],但也伴随着蛋白质构象变化以产生逐步

移动。这些定向的运动被统称为易位或转位,是唯一已知的主动运动模式,在一定的时间和空间范围内具有明显的极性和方向性,且高度依赖NTP水解提供能量(图1)。值得注意的是,虽然蛋白易位或转位运动依赖NTP水解,但是具有NTP水解活性的蛋白不一定在核酸上进行易位或转位运动,而可以采取其他运动方式。

1.2 促进扩散(facilitated diffusion)

研究表明许多核酸结合蛋白并没有采用主动的易位或转位运动模式,而是被动地在核酸上进行1D运动,该过程主要通过蛋白质中带正电的氨基酸残基与核酸中带负电的磷酸骨架之间的静电相互作用来实现,往往不具有序列依赖性。例如, LacI能够通过静电相互作用结合DNA,并沿着DNA磷酸骨架进行1D自由扩散运动,这样的方式比3D扩散更容易找到靶标序列^[30]。类似地,AGO(Argonaute)蛋白能够沿着mRNA或ssDNA序列自由扩散,帮助它结合的向导RNA(guide RNA)与目标序列产生互补配对^[31-32]。这种沿着核酸自由扩散的1D运动没有明显的极性和方向性,完全依赖分子的布朗运动,不需要额外能量就可以增加对靶标的搜索效率,因此被称为“促进扩散”运动(图1)。研究表明,许多限制性内切酶和其他转录因子也利用促进扩散机制快速靶向目标序列^[24-25],而离子强度的提高可以减弱静电相互作用,降低“促进扩散”运动的效率以抑制核酸-蛋白质互作。

1.3 滑动(sliding)

通常的观点认为,在促进扩散过程中,核酸结合蛋白与核酸磷酸骨架需要发生持续的静电相互作用以保证运动的连续性。然而,一些蛋白通过形成特殊的构象,如包裹DNA或RNA的环状结构(ring-like clamp),在进行1D运动的过程中并不发生

持续的静电相互作用,这种运动模式被认为是滑动(图1)。大肠杆菌DNA聚合酶III的 β 亚基 β -clamp,及其真核同源蛋白增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是人们最早发现的、能够在DNA上滑动的环状蛋白。它们在溶液中以闭合环状结构存在,需要通过夹钳装载复合物(clamp-loading complex)打开其环状构象并将其装载到DNA上^[33-34]。随后夹钳装载复合物从DNA上解离,而 β -clamp和PCNA恢复环状构象并将DNA包裹在中部的空腔内。因此, β -clamp和PCNA可以在DNA上进行长时间滑动^[35]。无独有偶,DNA错配修复蛋白MutS和MutL及其同源蛋白在修复错配碱基过程中也会形成包裹DNA的环状结构(MutS sliding clamp and MutL sliding clamp)。与 β -clamp和PCNA稍有不同的是,MutS sliding clamp和MutL sliding clamp通过结合和水解ATP改变自身构象而形成,被认为是一类ATP依赖的分子开关^[13,17,36-37]。最近,ALCÓN等^[18,38]通过结构解析和单分子示踪实验,发现范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)蛋白FANCD2-FANCI二聚体在修复DNA交联过程中形成包裹双链DNA的闭合环状结构,该过程依赖于FANCD2亚基泛素化引起的构象变化。FANCD2-FANCI sliding clamp随后在DNA上滑动,直到识别并结合双链-单链DNA交叉。

1.4 跳跃(hopping or jumping)

跳跃是也是一种间歇式接触的1D运动模式。与形成环状结构进行滑动的蛋白不同,在核酸上跳跃的蛋白并没有在空间上受到物理限制,而在跳跃的过程中蛋白会短暂地与核酸发生解离。跳跃运动本质上是核酸结合蛋白在核酸上发生多次解离和重新结合事件^[6](图1),由于静电相互作用和离子屏蔽效应,当核酸结合蛋白从大分子核酸上解离时,它重

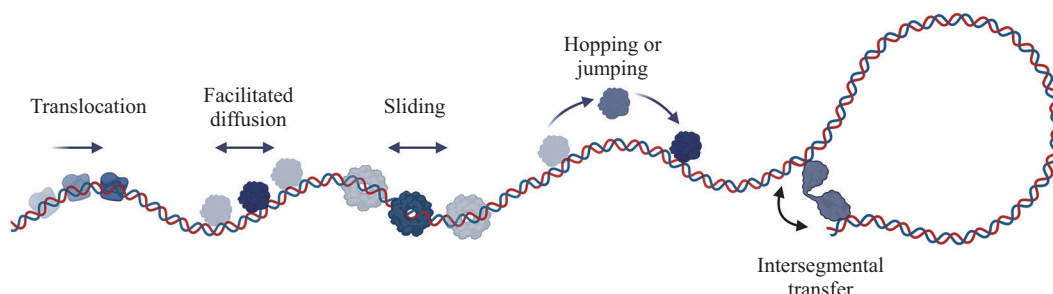


图1 蛋白一维运动的模式

Fig.1 Modes of protein one-dimensional movements

新结合到同一分子的几率远高于结合到其他分子。由于分子热运动的速率极高,蛋白有时会跳跃到距离初始位置几十到几千个碱基对的位点^[6,39]。2008年,BONNET等^[23]在荧光显微镜下观测到EcoR V在40 ms内跳跃超过1 μm 的距离来促进靶向目的序列的过程,且它在DNA上跳跃的距离对盐浓度敏感。当蛋白与核酸发生持续的静电相互作用时,蛋白的扩散系数不受离子强度变化的影响,这说明EcoR V的跳跃是一种间歇式接触的运动模式。通过计算Mlh1-Pms1在25~200 mmol/L NaCl条件下的扩散系数,GORMAN等^[40]发现Mlh1-Pms1的扩散系数随着离子强度的增加而增加,提出Mlh1-Pms1在DNA上进行跳跃。与促进扩散相比,蛋白在核酸上进行跳跃运动的速度更快,并且能够绕过核酸上的障碍物和高级结构。因此,有观点认为跳跃的蛋白可以更高效地搜索目标序列^[41]。

1.5 节间转移(intersegmental transfer)

在某些情况下,长链大分子核酸可以形成瞬时的环状结构(如DNA环)。一些核酸结合蛋白能够在DNA loop的两个邻近位点之间发生转移,这种运动被称为节间转移(图1)。在节间转移的过程中,蛋白首先结合到其中一个DNA结合位点,随后捕捉到另一个DNA结合位点并产生互作,同时释放第一个位点以发生转移。因此,发生节间转移的蛋白通常有两个或更多的核酸结合位点,拥挤的环境可以促进节间转移的发生^[6,42]。限制性内切酶SfiI^[43]、转录因子Oct-1^[44]和酵母DNA单链结合蛋白RPA^[45]等核酸结合蛋白都被发现能通过与DNA的多价相互作用进行节间转移。节间转移可能是一种高效靶向目标序列的方式^[43-44],然而其在细胞内的生理相关性仍然不清楚。

2 核酸结合蛋白1D运动的研究方法

早期的1D运动研究主要通过生化实验来测量蛋白在核酸上的结合动力学或运动速率,但这种传统实验方法得到的是系统平均效应,仅能为1D运动提供间接的证据。随着实验技术的发展,单分子水平的研究能够排除系统平均效应,分析复杂环境中同种分子的不同行为,从而获取传统实验中无法得到的信息,解决领域内一些备受关注的问题。例如,通过单分子示踪(single-molecule tracking)可以获取单个蛋白分子在核酸上的运动轨迹,揭示核酸结合

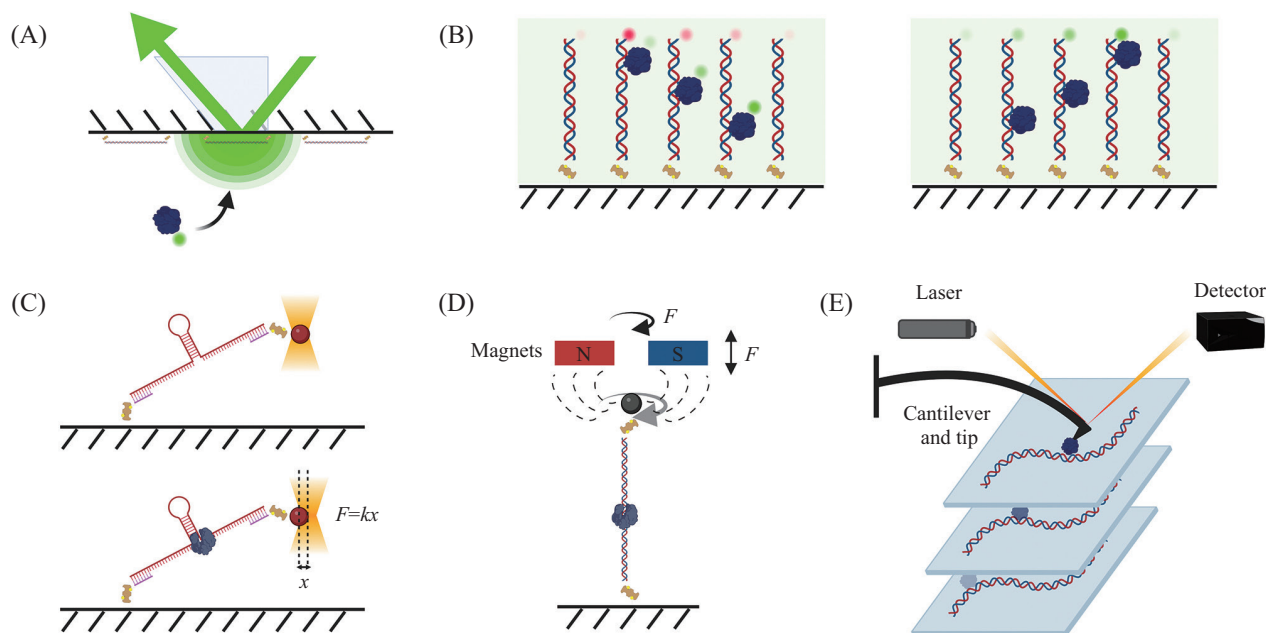
蛋白的1D运动模式;在单分子水平体外重构生物化学反应,可以深入探究蛋白1D运动在信号传递过程中的功能;其他单分子技术如单分子荧光共振能量转移(single-molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET)、蛋白诱导荧光增强(protein induced fluorescence enhancement, PIFE)和单分子力谱(single-molecule force spectroscopy)技术,也被应用于研究核酸结合蛋白的1D运动。

2.1 生物化学实验

当用于检测聚合酶或解旋酶的进行性和催化效率,传统生化实验是一种非常有效的方法。例如,通过测量磷酸盐产物,HARMON等^[46]发现*E. coli* RecQ解旋酶在ssDNA上以16 nt/s的速度进行转位或易位;通过电泳迁移率分析实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)、RAU和SIDOROVA^[24]不仅测定了EcoR I在DNA上的运动速率,还根据EcoR I在含有一个结合位点的DNA和两个结合位点的DNA上解离的速率比,提出EcoR I沿着DNA骨架进行旋转耦合扩散运动的观点;另外,GRADIA等^[13,36]通过EMSA等一系列生化实验发现了MutS结合ATP后发生构象变化形成MutS sliding clamp,该构象可以在双链DNA上进行不依赖于ATP水解的滑动。虽然生化研究极大地促进了我们对核酸结合蛋白1D运动机制的理解,但是大多数研究只能解析蛋白在核酸上进行易位和促进扩散的动力学,且实验结果无法避免平均效应和难以呈现动态变化过程。更重要的是,除了主动运动模式外,传统生化实验很难证明蛋白1D运动在生物学过程中的功能及其必要性。随着研究的深入,人们希望获得更直接的证据来观测核酸结合蛋白的1D运动,并同时揭示其生理意义。

2.2 单分子示踪

单分子成像技术的发展和运用,使得人们能够观测单个蛋白分子的行为。例如,利用全内反射荧光(total internal fluorescence reflection, TIRF)成像,单分子示踪技术可以获取单个荧光蛋白在核酸上随着时间变化的运动轨迹(图2A),是研究蛋白1D运动的常用技术工具。单分子示踪实验通常使用棱镜型或物镜型的TIRF显微镜,其原理为激光发生全内反射后,在介质的另一侧产生幅值随垂直距离增加呈指数下降的消逝波,只激发样本极薄区域(100~300 nm)内的荧光基团,从而可以降低背景信号提高信噪比^[47]。实验过程中使用的样品池通常由



A: 单分子示踪技术的原理示意图。将长链核酸拉伸并固定在玻片表面, 实时荧光成像观测核酸结合蛋白的运动轨迹。由于全内反射成像, 仅有结合到核酸分子上的荧光蛋白能被检测到。B: FRET技术的原理示意图(左), 当供体和受体荧光基团之间的距离在1~10 nm范围内时, 供体激发态的能量非辐射地转移到受体, 导致受体发出荧光; PIFE技术的原理示意图(右), 当蛋白质靠近荧光基团时, 荧光基团附近局部环境改变, 导致荧光信号增强。C: 光镊技术的原理示意图。通过聚焦激光束捕捉和操纵介电质颗粒, 检测蛋白结合核酸引起力和位移的变化。D: 磁镊技术的原理示意图: 通过磁场来操纵磁性颗粒, 检测蛋白结合核酸引起力和位移的变化。E: 原子力显微镜技术的原理示意图。通过探针尖端与样品表面之间的原子间作用力, 获取不同时间的蛋白结合核酸的三维表面信息。

A: schematic diagram of the principle of single-molecule tracking technology. Long-stranded nucleic acids are stretched and immobilized on the slide surface, and the movement trajectory of nucleic acid-binding proteins is observed with real-time fluorescence imaging. Due to total internal reflection imaging, only fluorescent proteins bound to nucleic acid molecules can be detected. B: schematic diagram of the principle of FRET technology (left), when the distance between the donor and acceptor fluorophores is within 1-10 nm, the excited energy from the donor is non-radiatively transferred to the acceptor, causing the acceptor to emit fluorescence; schematic diagram of the principle of PIFE technology (right), when a protein approaches the fluorophore, the local environment around the fluorophore changes, leading to an enhancement in the fluorescence signal. C: schematic diagram of the principle of optical tweezers technology. A focused laser beam captures and manipulates dielectric particles, detecting force and displacement changes caused by protein binding to nucleic acids. D: schematic diagram of the principle of magnetic tweezers technology. Magnetic particles are manipulated through a magnetic field to detect changes in force and displacement caused by protein binding to nucleic acids. E: schematic diagram of the principle of atomic force microscopy. The interaction force between the tip of the probe and the surface of the sample is used to obtain three-dimensional surface information of protein-nucleic acid binding over time.

图2 研究蛋白一维运动的单分子技术

Fig.2 Single-molecule techniques for measuring protein one-dimensional movements

石英玻片、双面胶带和盖玻片组成。石英玻片表面经过硅烷化试剂钝化处理后, 被聚乙二醇/生物素-聚乙二醇(PEG/biotin-PEG)修饰。在经典的单分子示踪实验中, 核酸分子通过生物素-链霉亲和素-生物素或者地高辛-抗体互作固定在石英玻片表面。为了控制缓冲液进入样品池的速度, 通常使用电动注射泵来调节流速^[48]。利用系统流速可以将单端固定的长链核酸分子拉伸, 或者将双端固定的核酸分子拉伸到合适的长度(图2A)。AXELROD^[49]对TIRF显微镜的成像原理和应用、光学配置以及一般实验流程进行了详细的描述; HA实验室对样品池的制备进行了详细的描述^[48]。

常见的固定方法还有DNA幕帘(DNA curtain), 它通过纳米孔/钉和磷脂双分子层进行排列, 可以同时观测大量的DNA分子^[50], 提高实验效率。此外, DNA天桥(DNA skybridge)也是近年来发展出的一种新型研究手段, 通过增加核酸与玻片表面的距离, 可以降低背景信号的干扰, 减少蛋白非特异性吸附在玻片表面对实验结果造成的不良影响^[51]。目前也有商品化的成像仪器用于单分子示踪实验, 例如结合共聚焦荧光显微镜和光镊系统的C-trap可以通过光镊捕获核酸分子, 同时观测核酸结合蛋白的1D运动和记录DNA的长度变化^[52]。为了实时跟踪核酸结合蛋白的行为, 需要对目的蛋白进行体外纯化和位点

特异性荧光标记。Cyanine(Cy3/Cy5)和Alexa Fluor染料具有高量子产率和高光稳定性,是单分子示踪实验中常用的荧光探针。相比之下,荧光蛋白的体积较大容易产生空间位阻,且荧光寿命较短光稳定性差^[53],不适合用于体外单分子示踪实验。为了最大程度上保持目的蛋白的活性,一般只在目的蛋白上引入较小的标签用于标记反应,常用的标记方法有Cys-maleimide化学法^[47]和sortase转肽酶催化法^[54]等。

除了能对核酸结合蛋白1D运动进行直接观测以提供直接证据外,单分子示踪也可以定量分析1D运动的速率和事件发生的频率。例如,通过实时动态的成像,分析单个蛋白分子在不同时间的位置,可以计算出易位或转位的速度,以及其他运动方式的扩散系数(diffusion coefficient)^[17,55]。此外,该方法的另一个优势是可以在单分子水平重构生物化学反应,揭示蛋白1D运动的生理意义及其存在的必要性。许多核酸相关的蛋白质复合物组装、信号传递和级联放大等生命活动过程的中间体(intermediates)往往无法通过传统实验技术进行观测,通过使用不同发光波长的荧光基团标记重组蛋白,并在生物化学水平重构这些生命活动过程,可以实时检测中间体的产生及揭示新规律。例如,传统观点认为在DNA复制的过程中,先导链和后随链的聚合酶是协同工作的,这样能保证亲本双链的同步复制。然而,通过体外重构多蛋白组分的复制体,以及利用滚环复制实验(rolling-circle replication assay)实时观测复制体的1D移动,GRAHAM等^[56]发现先导链和后随链的聚合酶是独立工作的。

虽然单分子示踪技术在研究蛋白1D运动方面有很大的优势,可以直接观测蛋白在核酸上的运动情况,但由于难以模拟体内复杂的反应环境,体外实验结果通常需要结合体内遗传学证据进一步分析。通过基因工程将荧光蛋白和目的蛋白融合,能够在活细胞内实时追踪目的蛋白的运动。特别是CRISPR-Cas基因编辑技术和光激活荧光蛋白(photoactivatable fluorescent proteins, PAFPs)的应用,极大地降低了细胞内同时发出荧光的蛋白分子数,使得核酸结合蛋白的体内单分子成像和分析得到了广泛应用,例如RNA聚合酶、转录因子、端粒酶等^[57-59]。然而,细胞内核酸结合蛋白1D运动的单分子示踪的问题主要在于无法提供足够的时空分

辨率。由于大分子核酸的WLC松弛状态,核酸结合蛋白的1D运动在空间分辨率不足时看起来更像是静止的。此外,细胞内区分正在执行功能的和游离的核酸结合蛋白相对较难。这些都给核酸结合蛋白1D运动在细胞内的检测带来了较大的局限,克服这些问题亟需活细胞成像技术的发展。

2.3 单分子荧光共振能量转移(smFRET)和蛋白诱导荧光增强(PIFE)

单分子荧光共振能量转移通过一对荧光基团(供体和受体)的能量转移效率来测量它们之间的距离变化(图2B,左),是一种常见的单分子实验方法,可以通过共聚焦显微镜、TIRF显微镜或荧光寿命成像显微镜进行观测。HA实验室^[47]对smFRET的实验原理和一般实验流程进行了详细的描述。根据能量转移效率计算公式 $E_{\text{FRET}}=1/[1+(r/R_0)^6]$ (r 代表两个荧光基团之间的实际距离, R_0 代表能量转移效率为50%时两个荧光基团之间的理论距离),可以通过 E_{FRET} 值的变化得到两个荧光基团之间距离的变化。smFRET的距离测量范围在1~10 nm之间^[47],这个范围对于观测长距离核酸结合蛋白的1D运动而言似乎太窄。然而,通过合理的实验设计,仍可以使用FRET来检测蛋白在核酸上的运动。例如,通过smFRET测量Cy3标记的错配修复蛋白MutS与Cy5标记的双链DNA的结合动力学,可以判断MutS在DNA上的运动状态。这是因为MutS在DNA上运动时产生的FRET效率与其稳定结合错配位点时产生的FRET效率有显著区别^[16]。另外,ROY等^[60]和ZHOU等^[61]通过smFRET观测到单链DNA结合蛋白(single-strand DNA-binding protein, SSB)在单链DNA上的运动。由于SSB四聚体沿着单链DNA运动并将其缠绕,单链DNA上供体和受体荧光基团距离发生变化,导致FRET效率的波动。

蛋白诱导荧光增强是一种与smFRET类似的测量核酸-蛋白互作的单分子研究方法。当核酸结合蛋白在空间上非常靠近核酸上的荧光基团时,荧光基团的局部环境发生变化导致荧光强度增强(图2B,右)。MYONG实验室^[62]对PIFE的实验原理和一般实验流程进行了详细的描述。与smFRET相比,PIFE的优势在于不需要对核酸结合蛋白进行荧光标记,但其测量范围较小(0~3 nm)^[62]。例如,MYONG等^[63]观测到RIG-I蛋白与DY547标记的双链RNA在ATP存在下发生相互作用,DY547荧光信号出现周期性的

波动, 推测RIG-I在双链RNA上发生了易位运动。虽然通过合理且精密的实验设计, smFRET和PIFE可以实时检测蛋白的1D运动, 但由于许多复杂生命活动过程本身相对复杂, 这些技术在生物化学重构实验中的应用具有一定的局限性, 往往需要先通过其他实验手段获取部分中间状态信息。

2.4 单分子力谱

单分子力谱技术, 包括光镊(optical tweezers)、磁镊(magnetic tweezers)和原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)等具有较长的历史发展, 它们可以通过检测生物大分子间的力和距离变化来描述蛋白在核酸上的1D运动。详尽的单分子力谱技术实验原理和方法可以参考早期的一篇综述^[64], 本文仅简单对其进行介绍。

光镊, 也被称为光学陷阱, 是最常见的单分子操纵技术之一, 它具有亚纳米级的分辨率^[65]。在经典的光镊装置中, 高度聚焦的激光束将介电质颗粒捕获到光束中心, 长链核酸分子通过一个或两个介电质颗粒进行固定和拉伸^[66-67](图2C)。根据WLC, 双链DNA在用较小的力(约2 pN)进行拉伸时, 延伸长度比单链DNA长得多, 因此可以实时检测双链DNA的解旋过程^[55,68]。例如, 通过光镊系统检测RecQ家族解旋酶BLM解旋双链DNA的过程, WANG等^[69]发现高浓度BLM与双链DNA解旋后产生的单链DNA形成可抵抗一定阻力的凝聚体, 且能移除与单链DNA结合的RPA或RAD51蛋白来压缩单链DNA。与其他的力谱技术相比, 光镊具有更高的空间分辨率, 但是每次只能测量一个分子。

磁镊的原理与光镊类似, 在通常的磁镊装置中, 长链核酸的一端固定在磁珠上, 另一端固定在玻片表面^[70](图2D)。外部磁场能够对DNA施加扭力和张力, 因此磁镊非常适合用于研究易位酶和拓扑异构酶的1D运动^[71-72]。结合磁力和层流产生的阻力来固定磁珠并拉伸DNA, 可以检测DNA复制、解旋和剪切过程^[73-75]。相比于光镊, 由于磁场的体积较大, 磁镊可以同时检测几百个核酸分子, 但是它的空间分辨率较低。

原子力显微镜通过检测样品表面和力敏感元件之间的极弱原子间相互作用力, 来研究样品的表面结构和性质。在实验中, 力敏感的悬臂一端固定, 另一端带有尖针并在样品表面扫描。当尖针与样品接触时, 悬臂会发生偏转, 通过检测尖针上方反射到

探测器的激光可以实时测量悬臂的挠度^[76](图2E)。有研究使用了高速原子力显微镜(high-speed atomic force microscopy, HS-AFM)实时观测蛋白在核酸上的运动^[77]。然而, 原子力显微镜容易受到蛋白非特异性吸附在表面的影响, 且更适用于固体或刚性样品的研究, 如短链DNA。

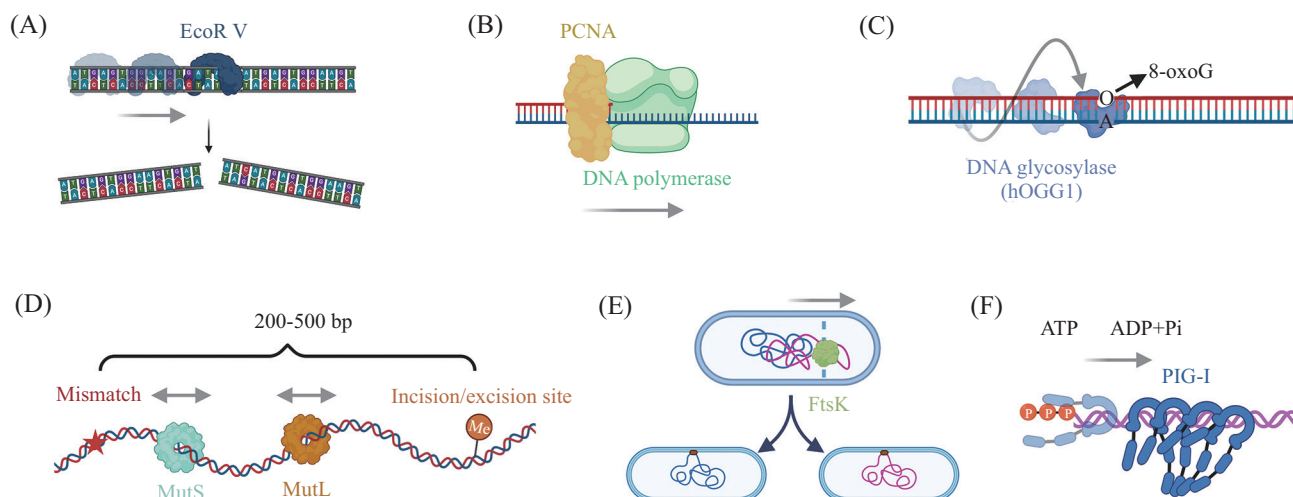
虽然单分子力谱在研究核酸结合蛋白的1D运动方面有独特的优势, 但是也具有一定的局限性。首先, 单分子力谱通过测量力和位移的变化来表征蛋白的运动, 而不是直接观测荧光标记蛋白的运动轨迹或荧光强度变化, 不如单分子示踪等技术直观; 其次, 单分子力谱较难检测瞬时的以及没有引起明显力和位移变化的1D运动, 如促进扩散、滑动和跳跃等; 此外, 单分子力谱通常需要对蛋白或核酸施加力来探测蛋白1D运动, 但外力可能会影响蛋白与核酸的相互作用, 并改变蛋白1D运动的特性。这些局限性在具体实验过程中需要通过合理的设计加以克服。

3 核酸结合蛋白1D运动的生物学功能

单分子技术的发展和應用大大推动了核酸结合蛋白1D运动的观测, 但目前对这些行为的功能诠释和理解仍显得相对不足, 下文对其部分已知的生物学功能进行介绍。

3.1 促进靶标序列搜索

核酸结合蛋白1D运动促进靶标序列的搜索是较早被提出并得以证明的一种理论。对于识别特定核酸序列的蛋白, 如转录因子、核酸内切酶而言, 靶标序列往往仅占细胞内总核酸的极小一部分, 因此它们定位这些序列的过程需要精准且高效。有研究表明, 许多核酸结合蛋白通过大范围1D运动来寻找其靶标。尽管介导促进扩散、跳跃和节间转移运动的非特异性结合常数通常比特定定位点的结合常数低几个数量级, 但细胞内绝大多数核酸结合事件实际上都是非特异的。例如, 乳糖抑制子LacI^[78]、肿瘤抑制蛋白p53^[25,79]、核酸内切酶EcoRV和BclI^[23,80-81]等蛋白都通过沿着双链DNA的扩散运动来促进靶标序列的结合(图3A)。随后的研究表明, 联合促进扩散和跳跃两种运动, 可以平衡靶标搜索过程的速度和准确性^[23,82-86]。此外, 真核生物的染色体具有高度凝聚的结构, 其上面结合了许多DNA结合蛋白如核小体, 这可能会阻碍促进扩散运动, 跳跃和节间转



A: 限制性内切酶EcoR V沿着DNA扩散, 促进靶标序列搜索。B: PCNA沿着DNA滑动, 提高DNA聚合酶的进行性。C: DNA糖基化酶hOGG1沿着DNA扩散, 检测DNA损伤并结合8-羟基鸟嘌呤。D: MutS sliding clamp和MutL sliding clamp在DNA上滑动, 实现错配信号的远距离传递。E: FtsK在DNA上易位, 将复制的染色体输送到前孢子, 分离染色体二聚体。F: RIG-I识别病毒双链RNA后, 在双链RNA上易位, 促进自身寡聚化。

A: the restriction endonuclease EcoR V diffuses along DNA, facilitating the search for target sequences. B: PCNA slides along DNA, enhancing the processivity of DNA polymerase. C: the DNA glycosylase hOGG1 diffuses along DNA, detecting DNA damage and binding to 8-oxoguanine. D: the MutS and MutL sliding clamps slide along DNA, enabling the long-distance transmission of mismatch signals. E: FtsK translocates on DNA, delivering replicated chromosomes to the forespore and resolving chromosome dimers. F: upon recognizing viral double-stranded RNA, RIG-I translocates along the RNA, promoting its oligomerization.

图3 蛋白一维运动的生物学功能

Fig.3 The biological functions of protein one-dimensional movements

移运动被认为可以绕过这些障碍。

有研究报道, 蛋白-核酸复合物, 如RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)、CRISPR/Cas系统以及同源重组中间体等同样也可以通过1D运动来锁定靶标。通过smFRET实验, CUI等^[87]观测到RISC组分AGO蛋白结合的、Cy5标记的向导RNA和Cy3标记的RNA底物的FRET效率发生变化, 提出AGO蛋白通过沿着RNA底物横向扩散, 加速向导RNA与mRNA上互补序列的配对, 并通过节间转移绕过障碍物; 利用smFRET, GLOBYTE等^[88]检测Cas9蛋白结合的、Cy3标记的crRNA(CRISPR RNA)与1~5个PAM(protospacer adjacent motif)序列串联的、Cy5标记的DNA底物的结合动力学, 发现FRET值的正态分布区间随着PAM序列数量增加而变大, 且多个PAM序列会导致FRET值的扰动, 说明Cas9蛋白通过在DNA上进行1D运动, 靶向PAM序列后促进crRNAs与DNA上互补序列的配对; JEON等^[89]则通过长链DNA单分子示踪实验, 直接观测到Cas12a-crRNA在DNA底物上随机扩散后稳定结合含PAM序列的靶位点, 并切割DNA底物; 在同源重组的过程中, 断裂的DNA末端先通过链切

除产生3' ssDNA overhangs并结合RecA/Rad51形成纤丝(filaments)^[90]。RAGUNATHAN等^[91]通过检测不同长度的、Cy5标记的RecA-ssDNA纤丝与相同长度的、Cy3标记的非同源双链DNA底物的动力学过程, 发现FRET值波动的时间随着纤丝长度增加而增加, 说明纤丝沿着DNA底物进行1D运动, 促进同源序列的搜索过程。此外, 同源重组关键蛋白Rad54通过ATP水解驱动的易位运动来提高同源性搜索的效率^[92]。这些研究都证明了核酸结合蛋白1D运动在促进靶标结合过程中扮演了重要角色。

3.2 调控酶的进行性

对大多数聚合酶和解旋酶而言, 转位和易位运动大大提高了它们在核酸上的进行性, 避免了酶在催化核苷酸掺入或破坏碱基配对后从底物上快速解离。对聚合酶和解旋酶易位运动的控制, 也就成为控制双链DNA合成或解旋的一种方式。例如, PCNA形成环状结构后, 可以长时间在DNA链上滑动, 这为DNA聚合酶提供了稳定的结合位点, 从而将聚合酶的进行性提高了100倍以上^[93-95](图3B)。除了增加酶的进行性外, 蛋白1D运动还可以降低酶的进行性。研究发现在解旋酶解旋双链DNA的过程中,

其易位活性被抑制或易位过程发生链交换 (strand switching) 能引起双链复性^[68,96-97], 这一过程可以由 SSB 等蛋白调控^[75], 进而避免在基因组上发生长距离解旋破坏双链完整性^[75]。

3.3 检测碱基配对的完整性

细胞内正常的代谢活动 and 环境因素都会导致 DNA 损伤, 每个细胞每天可能发生 10^4 到 10^6 次 DNA 损伤。为了维持基因组的稳定性, DNA 修复蛋白必须高效地识别这些损伤。有研究表明, 许多 DNA 修复蛋白沿着 DNA 进行 1D 运动的同时可以探测损伤位点, 包括碱基切除修复蛋白糖基化酶 (DNA glycosylases)^[98-101] (图 3C)、错配修复蛋白 MutS 同源物^[16,102]、核苷酸切除修复蛋白 XPA 和 UvrB、UvrC 等^[103-104]。这是因为部分损伤会造成双螺旋结构扭曲或 DNA 链弯曲, 这些修复蛋白通过沿着 DNA 磷酸骨架进行旋转耦合的扩散运动探测双链 DNA 结构变化, 从而识别损伤^[101-102]。例如, 通过长链 DNA 单分子示踪实验, BLAINEY 等^[101]观测到人源 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖基化酶 1 (human oxoguanine DNA glycosylase 1, hOgg1) 沿着 DNA 骨架进行 1D 运动, 该过程促进了 hOgg1 识别 DNA 双螺旋结构中突出的 8-羟基鸟嘌呤残基 (oxoG)^[105]。

3.4 远距离传递信号

在一些 DNA 修复途径中, 修复蛋白之间需要通过远距离互作来传递信号。例如, DNA 错配修复 (DNA mismatch repair, MMR) 途径通过多种蛋白的协作完成对错配链的切除和再合成, 从而纠正错误掺入的核苷酸或插入/删除环 (insertion/deletion loops, IDLs)^[106]。研究表明, 错配位点和链切除起始位点之间存在一定的距离 (200~500 bp), 两个位点之间如何有效地进行信号传递是 MMR 机制研究的关键^[107]。其中, 错配修复蛋白的 1D 运动在该过程中扮演了重要角色。在 *E. coli* MMR 途径中, 错配修复蛋白 MutS 在 DNA 双链上搜寻碱基错配; 一旦识别错配碱基, MutS 结合 ATP 并发生构象变化, 在 DNA 上形成 MutS sliding clamp 环状结构并沿着 DNA 进行滑动 (图 4A)^[16-17]; 随后, MutS sliding clamp 将 MutL 招募到 DNA 上形成 MutS-MutL 复合物, 促进另一个环状分子——MutL sliding clamp 的形成 (图 4B)^[15]; MutL sliding clamp 也在 DNA 上进行滑动, 先招募 MutH 内切酶在新合成的 DNA 链上引入多个缺口, 随后招募 UvrD 解旋酶将含有碱基错配的片段移除^[17,75] (图 3D)。当

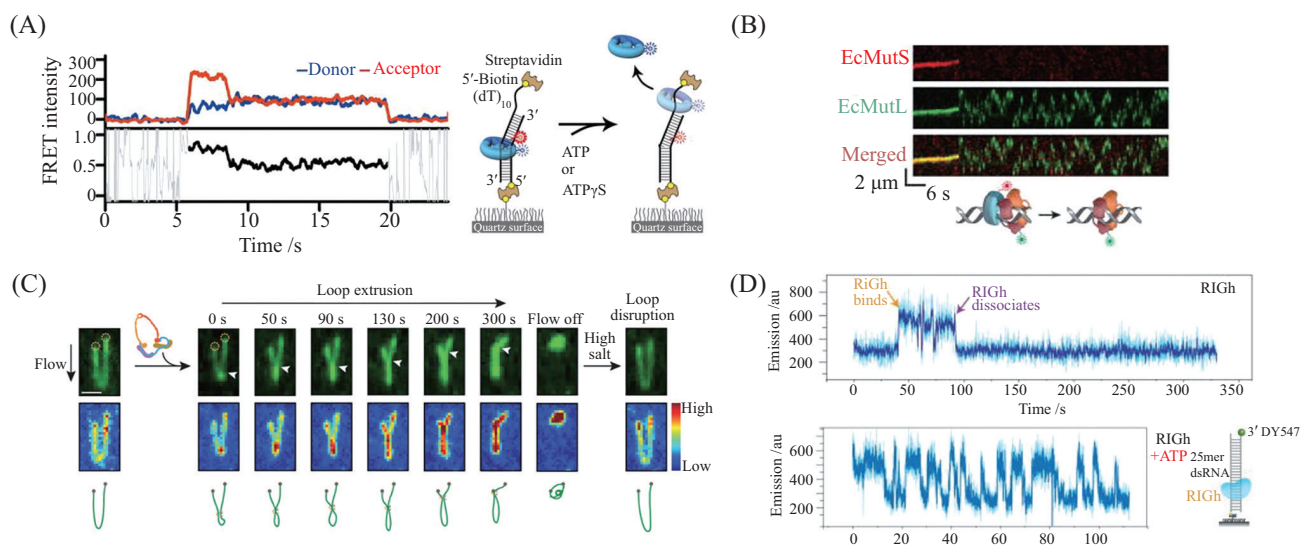
MutL 的 DNA 结合活性缺陷时, MutL sliding clamp 无法形成, MutL 不能在 DNA 上滑动, 导致 MMR 通路失活^[15]。在 MMR 过程中, 除了最开始 MutS 识别碱基错配时处于静止状态, 其余状态下的 MutS、MutL、MutH 及 UvrD 一直在 DNA 上进行 1D 运动, 它们利用了促进扩散、滑动、易位等多种运动模式来实现远距离错配信号的传递。

3.5 基因组结构维持

核酸结合蛋白的 1D 运动在染色质结构维持中也具有重要的功能。随着真核生物细胞周期的改变, 染色质的空间组织也会发生变化。大型染色质形成的染色质环在基因复制和表达等过程中有重要的调控作用, 它是通过一种被称为“环挤出 (loop extrusion)”的过程形成的。其中, 染色体结构维持蛋白 SMC (structural maintenance of chromosomes) 复合物, 如凝聚蛋白 (condensin) 和黏结蛋白 (cohesin), 结合染色质并将其挤出形成环^[108]。近年来, GANJI 等^[19]、KONG 等^[20]和 KIM 等^[109]相继通过单分子示踪实验观测到 condensin 和 cohesin 在 DNA 上进行依赖于 ATP 水解的易位运动, 正是这样的运动将 DNA 挤出形成环, 促进 DNA 的压缩。此外, 细菌染色体的分离过程中也需要 1D 运动的参与。与真核生物相比, 细菌没有严格的分裂周期和检查点 (checkpoint) 机制。在大部分细菌中, FtsK-SpoIIIE 家族蛋白偶联了染色体分离和细胞分裂的过程, 它们是一种 ATP 水解驱动的分分子马达, 以约 5 Kb/s 的速度在 DNA 上进行易位^[110]。研究表明, *E. coli* 的 FtsK 和 *Bacillus subtilis* 的 SpoIII E 通过定位在分裂隔膜上, 以固定的方向将复制后的染色体从母细胞 (mother cell) 泵入前孢子 (forespore), 实现染色体二聚体 (chromosome dimer) 的分离^[14,29] (图 3E)。

3.6 识别“自我”和“非我”

病毒的基因组和复制中间产物常常包含较长的双链 RNA, 这些双链 RNA 是一类重要的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 能被天然免疫系统的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 所识别, 激活抗病毒天然免疫应答。其中 RIG-I 样受体是一类重要的 PRR, 具有较为保守的解旋酶结构域。通过 PIFE 实验, MYONG 等^[63]发现 RIG-I 样受体家族成员 RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) 在识别病毒的双链 RNA 后, 在双链 RNA 上进行易位运动, 此过程需



A: 通过smFRET实验检测Cy3-MutS在Cy5-DNA上的运动过程。当Cy3-MutS结合Cy5荧光基团附近的错配时, FRET值较高。加入ATP/ATPγS后, Cy3-MutS发生构象变化形成MutS sliding clamp并离开错配, FRET值降低^[16]。B: MutS-MutL复合物沿着DNA骨架进行旋转耦合扩散运动, 促进MutL sliding clamp形成并在DNA上快速滑动的代表性kymographs和示意图^[17]。C: 在YOYO-1染色的“U”型DNA上, cohesin-NIPBL^C进行快速易位并将DNA挤出形成环, 直到环的底部到达DNA末端^[20]。D: 通过PIFE实验检测RIG-I在dsRNA上的运动过程。当RIG-I结合dsRNA末端时, dsRNA末端标记的DY547荧光基团信号增强。当RIG-I离开dsRNA末端时, DY547荧光基团信号减弱。在ATP存在的条件下, RIG-I与dsRNA末端发生多次结合和解离, 诱导荧光信号发生周期性波动^[63]。

A: the movement of Cy3-MutS on Cy5-DNA detected by smFRET. When Cy3-MutS binds to the mismatch near the Cy5 fluorophore, a high FRET value is observed. Upon adding ATP/ATPγS, Cy3-MutS undergoes conformational changes, forming the MutS sliding clamp and moving away from the mismatch, leading to a decrease in the FRET value. B: representative kymographs and schematic of the MutS-MutL complex undergoing rotation-coupled diffusion along the DNA backbone, facilitating the formation and rapid diffusion of the MutL sliding clamp on the DNA. C: on the YOYO-1-stained “U”-shaped DNA, cohesin-NIPBL^C undergoes rapid translocation and extrudes the DNA to form a loop until the bottom of the loop reaches the end of DNA. D: the movement of RIG-I on dsRNA detected by PIFE. When RIG-I attaches to the dsRNA end, the DY547 fluorophore signal at the labeled end increases. Upon RIG-I’s detachment, the signal decreases. With ATP present, RIG-I repeatedly binds and detaches from the dsRNA end, causing periodic fluctuations in the fluorescence signal.

图4 单分子检测核酸结合蛋白的一维运动

Fig.4 Single-molecule detection of one-dimensional movements of nucleic acid-binding proteins

要ATP水解提供能量(图4D)。进一步的研究表明, RIG-I可能通过易位运动促进自身在双链RNA上寡聚, 激活下游信号通路^[111](图3F)。RIG-I在双链RNA上的易位运动, 可能是它识别“自我”和“非我”RNA的关键。

4 总结和展望

随着实验技术的不断发展, 尤其是单分子技术的广泛应用, 科学家们得以在纳米尺度观察核酸结合蛋白的1D运动, 并精确地量化蛋白在核酸上的滑动、跳跃等行为特性。然而, 目前研究的重点和难点并非对这些1D运动现象的观察和描述, 而是深入探讨其分子基础以及背后蕴含的生命现象的本质, 并将在体外观测到的核酸结合蛋白1D运动与细胞环境中的生理功能联系起来。核酸结合蛋白的1D运动不仅限于特定序列的搜索, 还可能涉及多种生物

学功能, 如在DNA修复和重组、基因表达调控、信号传递等过程中发挥关键作用。为了全面理解这些1D运动的生物学功能, 需要建立更加复杂的生物化学和生物物理研究体系, 包括在单分子水平重构复合物组装、信号传递和级联放大过程。尽管已经取得显著进展, 但研究人员需要进一步揭示蛋白如何利用1D运动来增加生物反应的效率和特异性。例如, 某些蛋白是否通过形成特定的结构(如sliding clamp)来稳定其在核酸上的定位, 并通过快速滑动从而有效地执行其功能。

然而, 体外研究蛋白质1D运动存在一定的局限性, 主要表现为实验环境的简化。例如, 单分子示踪实验通常使用纯化的DNA和蛋白质, 无法完全模拟核小体包装、染色质状态和蛋白质翻译后修饰等生理条件。蛋白在裸露的DNA上运动的模式可能与在核小体包装的DNA上的运动模式不相同, 许多沿

着DNA骨架扩散以及在DNA上滑动的蛋白无法跨越结合DNA的蛋白障碍物。在细胞内环境中,核酸结合蛋白更可能利用跳跃和节间转移的运动模式,来促进自身在DNA上的扩散。此外,体外实验通常使用稀释的溶液,而细胞内存在大量分子拥挤现象。分子拥挤会显著影响蛋白的扩散行为,导致实验结果在两种环境下存在较大差异。因此,尽管体外实验能够揭示核酸结合蛋白1D运动的基本机制,但这些结果必须结合细胞内研究加以验证,以确保实验结论在生理环境下的适用性。另外,虽然关于DNA结合蛋白1D运动的研究已经取得了显著进展,但对RNA结合蛋白的研究相对较少。RNA结合蛋白在多种生物过程中起着关键作用,尤其是在抗病毒天然免疫应答中,双链RNA受体的功能至关重要。这些蛋白在RNA上的1D运动可能直接影响其生物功能,因此深入研究RNA结合蛋白的1D运动不仅能揭示其在免疫中的作用,还可能为新型抗病毒疗法的开发提供新思路。

总的来说,核酸结合蛋白1D运动的研究为理解核酸生物学中部分分子机制提供了宝贵的见解。新技术的发展和研究的不断深入,有望揭示更多关于蛋白-核酸相互作用的独特机制,并将这些发现应用于基础科学研究和医学应用研究领域。

参考文献 (References)

- [1] SPITZ F, FURLONG E E. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control [J]. *Nat Rev Gene*, 2012, 13(9): 613-26.
- [2] CHATTERJEE N, WALKER G C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58(5): 235-63.
- [3] SCHLEE M, HARTMANN G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(9): 566-80.
- [4] ADAM G, DELBRÜCK M J. BIOLOGY M. Reduction of dimensionality in biological diffusion processes [J]. *Physica A* 1968, 198: 198-215.
- [5] RIGGS A D, BOURGEOIS S, COHN M. The lac repressor-operator interaction. 3. Kinetic studies [J]. *J Mol Biol*, 1970, 53(3): 401-17.
- [6] BERG O G, WINTER R B, VON HIPPEL P H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(24): 6929-48.
- [7] KHOURY A M, LEE H J, LILLIS M, et al. Lac repressor-operator interaction: DNA length dependence [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1087(1): 55-60.
- [8] PARK C S, WU F Y, WU C W. Molecular mechanism of promoter selection in gene transcription. II. Kinetic evidence for promoter search by a one-dimensional diffusion of RNA polymerase molecule along the DNA template [J]. *J Biol Chem*, 1982, 257(12): 6950-6.
- [9] RICCHETTI M, METZGER W, HEUMANN H. One-dimensional diffusion of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase: a mechanism to facilitate promoter location [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(13): 4610-4.
- [10] ABELS J A, MORENO-HERRERO F, VAN DER HEIJDEN T, et al. Single-molecule measurements of the persistence length of double-stranded RNA [J]. *Biophys J*, 2005, 88(4): 2737-44.
- [11] SMITH S B, CUI Y, BUSTAMANTE C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules [J]. *Science*, 1996, 271(5250): 795-9.
- [12] BLAINEY P C, LUO G, KOU S C, et al. Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(12): 1224-9.
- [13] GRADIA S, SUBRAMANIAN D, WILSON T, et al. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA [J]. *Mol Cell*, 1999, 3(2): 255-61.
- [14] AUSSEL L, BARRE F X, AROYO M, et al. FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases [J]. *Cell*, 2002, 108(2): 195-205.
- [15] YANG X W, HAN X P, HAN C, et al. MutS functions as a clamp loader by positioning MutL on the DNA during mismatch repair [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5808.
- [16] JEONG C, CHO W K, SONG K M, et al. MutS switches between two fundamentally distinct clamps during mismatch repair [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(3): 379-85.
- [17] LIU J, HANNE J, BRITTON B M, et al. Cascading MutS and MutL sliding clamps control DNA diffusion to activate mismatch repair [J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 583-7.
- [18] ALCÓN P, KACZMARCZYK A P, RAY K K, et al. FANCD2-FANCI surveys DNA and recognizes double- to single-stranded junctions [J]. *Nature*, 2024, 632(8027): 1165-73.
- [19] GANJI M, SHALTIEL I A, BISHT S, et al. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin [J]. *Science*, 2018, 360(6384): 102-5.
- [20] KIM Y, SHI Z, ZHANG H, et al. Human cohesin compacts DNA by loop extrusion [J]. *Science*, 2019, 366(6471): 1345-9.
- [21] KABATA H, KUROSAWA O, ARAI I, et al. Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA [J]. *Science*, 1993, 262(5139): 1561-3.
- [22] EGGLESTON A K, RAHIM N A, KOWALCZYKOWSKI S C. A helicase assay based on the displacement of fluorescent, nucleic acid-binding ligands [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(7): 1179-86.
- [23] BONNET I, BIEBRICHER A, PORTE P L, et al. Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(12): 4118-27.
- [24] RAU D C, SIDOROVA N Y. Diffusion of the restriction nuclease EcoRI along DNA [J]. *J Mol Biol*, 2010, 395(2): 408-16.
- [25] TAFVIZI A, HUANG F, LEITH J S, et al. Tumor suppressor p53 slides on DNA with low friction and high stability [J]. *Biophys J*, 2008, 95(1): L01-3.
- [26] GELLES J, LANDICK R. RNA polymerase as a molecular mo-

- tor [J]. *Cell*, 1998, 93(1): 13-6.
- [27] MOORE K J, LOHMAN T M. Helicase-catalyzed DNA unwinding: energy coupling by DNA motor proteins [J]. *Biophys J*, 1995, 68(4 Suppl): 180S-4S,5S.
- [28] TERAOKAWA T, BISHT S, EEFTENS J M, et al. The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA [J]. *Science*, 2017, 358(6363): 672-6.
- [29] BATH J, WU L J, ERRINGTON J, et al. Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum [J]. *Science*, 2000, 290(5493): 995-7.
- [30] HAMMAR P, LEROY P, MAHMUTOVIC A, et al. The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells [J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1595-8.
- [31] CUI T J, JOO C. Facilitated diffusion of Argonaute-mediated target search [J]. *RNA Biol*, 2019, 16(9): 1093-107.
- [32] SONG G, CHEN H, SHENG G, et al. Argonaute facilitates the lateral diffusion of the guide along its target and prevents the guide from being pushed away by the ribosome [J]. *Biochemistry*, 2018, 57(15): 2179-83.
- [33] KONG X P, ONRUST R, O'DONNELL M, et al. Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp [J]. *Cell*, 1992, 69(3): 425-37.
- [34] HINGORANI M M, O'DONNELL M. ATP binding to the *Escherichia coli* clamp loader powers opening of the ring-shaped clamp of DNA polymerase III holoenzyme [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(38): 24550-63.
- [35] YAO N, TURNER J, KELMAN Z, et al. Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, beta and gp45 sliding clamps of human, *E. coli* and T4 replicases [J]. *Genes Cells*, 1996, 1(1): 101-13.
- [36] GRADIA S, ACHARYA S, FISHEL R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch [J]. *Cell*, 1997, 91(7): 995-1005.
- [37] LONDON J, MARTIN-LOPEZ J, YANG I, et al. Linker domain function predicts pathogenic MLH1 missense variants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(9): e2019215118.
- [38] ALCÓN P, SHAKEEL S, CHEN Z A, et al. FANCD2-FANCI is a clamp stabilized on DNA by monoubiquitination of FANCD2 during DNA repair [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(3): 240-8.
- [39] HALFORD S E. Hopping, jumping and looping by restriction enzymes [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 4): 363-74.
- [40] GORMAN J, PLYS A J, VISNAPUU M L, et al. Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(8): 932-8.
- [41] HALFORD S E, MARKO J F. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets [J]? *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(10): 3040-52.
- [42] KREPEL D, LEVY Y. Intersegmental transfer of proteins between DNA regions in the presence of crowding [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19(45): 30562-9.
- [43] SUZUKI Y, GILMORE J L, YOSHIMURA S H, et al. Visual analysis of concerted cleavage by type IIF restriction enzyme SfiI in subsecond time region [J]. *Biophys J*, 2011, 101(12): 2992-8.
- [44] DOUCLEFF M, CLORE G M. Global jumping and domain-specific intersegment transfer between DNA cognate sites of the multidomain transcription factor Oct-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 13871-6.
- [45] PANGENI S, BISWAS G, KAUSHIK V, et al. Rapid long-distance migration of RPA on single stranded dna occurs through intersegmental transfer utilizing multivalent interactions [J]. *J Mol Biol*, 2024, 436(6): 168491.
- [46] HARMON F G, KOWALCZYKOWSKI S C. Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the *Escherichia coli* RecQ helicase [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 232-43.
- [47] ROY R, HOHNG S, HA T. A practical guide to single-molecule FRET [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 507-16.
- [48] JOO C, HA T. Preparing sample chambers for single-molecule FRET [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, 2012(10): 1104-8.
- [49] AXELROD D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology [J]. *Traffic*, 2001, 2(11): 764-74.
- [50] COLLINS B E, YE L F, DUZDEVICH D, et al. DNA curtains: novel tools for imaging protein-nucleic acid interactions at the single-molecule level [J]. *Methods Cell Biol*, 2014, 123: 217-34.
- [51] KIM D, RASHID F, CHO Y, et al. DNA skybridge: 3D structure producing a light sheet for high-throughput single-molecule imaging [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(18): e107.
- [52] QIN Z, BI L, HOU X M, et al. Human RPA activates BLM's bidirectional DNA unwinding from a nick [J]. *eLife*, 2020, 9: e54098.
- [53] SEEFELDT B, KASPER R, SEIDEL T, et al. Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications [J]. *J Biophotonics*, 2008, 1(1): 74-82.
- [54] THEILE C S, WITTE M D, BLOM A E, et al. Site-specific N-terminal labeling of proteins using sortase-mediated reactions [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(9): 1800-7.
- [55] LEE K S, BALCI H, JIA H, et al. Direct imaging of single UvrD helicase dynamics on long single-stranded DNA [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1878.
- [56] GRAHAM J E, MARIANS K J, KOWALCZYKOWSKI S C. Independent and stochastic action of DNA polymerases in the replisome [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1201-13, e17.
- [57] CHO W K, SPILLE J H, HECHT M, et al. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates [J]. *Science*, 2018, 361(6400): 412-5.
- [58] LAPRADE H, QUERIDO E, SMITH M J, et al. Single-molecule imaging of telomerase RNA reveals a recruitment-retention model for telomere elongation [J]. *Mol Cell*, 2020, 79(1): 115-26, e6.
- [59] CHONG S, DUGAST-DARZACQ C, LIU Z, et al. Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription [J]. *Science*, 2018, 361(6400): eaar2555.
- [60] ROY R, KOZLOV A G, LOHMAN T M, et al. SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation [J]. *Nature*, 2009, 461(7267): 1092-7.
- [61] ZHOU R, KOZLOV A G, ROY R, et al. SSB functions as a sliding platform that migrates on DNA via reptation [J]. *Cell*, 2011, 146(2): 222-32.
- [62] HWANG H, MYONG S. Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein-nucleic acid interactions [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(4): 1221-9.
- [63] MYONG S, CUI S, CORNISH P V, et al. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA [J]. *Science*, 2009, 323(5917): 1070-4.

- [64] NEUMAN K C, NAGY A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 491-505.
- [65] MOFFITT J R, CHEMLA Y R, IZHAKY D, et al. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(24): 9006-11.
- [66] LEE K S, MARCIEL A B, KOZLOV A G, et al. Ultrafast redistribution of *E. coli* SSB along long single-stranded DNA via intersegment transfer [J]. *J Mol Biol*, 2014, 426(13): 2413-21.
- [67] LANDRY M P, ZOU X, WANG L, et al. DNA target sequence identification mechanism for dimer-active protein complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(4): 2416-27.
- [68] COMSTOCK M J, WHITLEY K D, JIA H, et al. Protein structure. Direct observation of structure-function relationship in a nucleic acid-processing enzyme [J]. *Science*, 2015, 348(6232): 352-4.
- [69] WANG T, HU J, LI Y, et al. Bloom syndrome helicase compresses single-stranded DNA into phase-separated condensates [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2022, 61(39): e202209463.
- [70] SALEH O A, PÉRALIS C, BARRE F X, et al. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment [J]. *EMBO J*, 2004, 23(12): 2430-9.
- [71] STRICK T R, CROQUETTE V, BENSIMON D. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase [J]. *Nature*, 2000, 404(6780): 901-4.
- [72] HARADA Y, OHARA O, TAKATSUKI A, et al. Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase [J]. *Nature*, 2001, 409(6816): 113-5.
- [73] LEE J B, HITE R K, HAMDAN S M, et al. DNA primase acts as a molecular brake in DNA replication [J]. *Nature*, 2006, 439(7076): 621-4.
- [74] JEON Y, KIM D, MARTÍN-LÓPEZ J V, et al. Dynamic control of strand excision during human DNA mismatch repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): 3281-6.
- [75] LIU J, LEE R, BRITTON B M, et al. MutL sliding clamps coordinate exonuclease-independent *Escherichia coli* mismatch repair [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5294.
- [76] GREENLEAF W J, WOODSIDE M T, BLOCK S M. High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007, 36: 171-90.
- [77] SHIBATA M, NISHIMASU H, KODERA N, et al. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1430.
- [78] WANG Y M, AUSTIN R H, COX E C. Single molecule measurements of repressor protein 1D diffusion on DNA [J]. *Phys Rev Lett*, 2006, 97(4): 048302.
- [79] TAFVIZI A, HUANG F, FERSHT A R, et al. A single-molecule characterization of p53 search on DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(2): 563-8.
- [80] BIEBRICHER A, WENDE W, ESCUDÉ C, et al. Tracking of single quantum dot labeled EcoRV sliding along DNA manipulated by double optical tweezers [J]. *Biophys J*, 2009, 96(8): L50-2.
- [81] KOSTIUK G, DIKIC J, SCHWARZ F W, et al. The dynamics of the monomeric restriction endonuclease BcnI during its interaction with DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(10): 5968-79.
- [82] AHMADI A, ROSNES I, BLICHER P, et al. Breaking the speed limit with multimode fast scanning of DNA by endonuclease V [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5381.
- [83] TERAOKA T, KENZAKI H, TAKADA S. p53 searches on DNA by rotation-uncoupled sliding at C-terminal tails and restricted hopping of core domains [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(35): 14555-62.
- [84] MARKLUND E, VAN OOSTEN B, MAO G, et al. DNA surface exploration and operator bypassing during target search [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 858-61.
- [85] SUBEKTI D R G, MURATA A, ITOH Y, et al. Transient binding and jumping dynamics of p53 along DNA revealed by sub-millisecond resolved single-molecule fluorescence tracking [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13697.
- [86] CUCULIS L, ABIL Z, ZHAO H, et al. TALE proteins search DNA using a rotationally decoupled mechanism [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(10): 831-7.
- [87] CUI T J, KLEIN M, HEGGE J W, et al. Argonaute bypasses cellular obstacles without hindrance during target search [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4390.
- [88] GLOBYTE V, LEE S H, BAE T, et al. CRISPR/Cas9 searches for a protospacer adjacent motif by lateral diffusion [J]. *EMBO J*, 2019, 38(4): e99466.
- [89] JEON Y, CHOI Y H, JANG Y, et al. Direct observation of DNA target searching and cleavage by CRISPR-Cas12a [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2777.
- [90] RADDING C M. Helical RecA nucleoprotein filaments mediate homologous pairing and strand exchange [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1008(2): 131-45.
- [91] RAGUNATHAN K, LIU C, HA T. RecA filament sliding on DNA facilitates homology search [J]. *eLife*, 2012, 1: e00067.
- [92] CRICKARD J B, MOEVUS C J, KWON Y, et al. Rad54 drives ATP hydrolysis-dependent DNA sequence alignment during homologous recombination [J]. *Cell*, 2020, 181(6): 1380-94.e18.
- [93] MIZRAHI V, HENRIE R N, MARLIER J F, et al. Rate-limiting steps in the DNA polymerase I reaction pathway [J]. *Biochemistry*, 1985, 24(15): 4010-8.
- [94] LEU F P, O'DONNELL M. Interplay of clamp loader subunits in opening the beta sliding clamp of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50): 47185-94.
- [95] KELCH B A, MAKINO D L, O'DONNELL M, et al. Clamp loader ATPases and the evolution of DNA replication machinery [J]. *BMC Biol*, 2012, 10: 34.
- [96] DESSINGES M N, LIONNET T, XI X G, et al. Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17): 6439-44.
- [97] LIONNET T, SPIERING M M, BENKOVIC S J, et al. Real-time observation of bacteriophage T4 gp41 helicase reveals an unwinding mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(50): 19790-5.
- [98] NELSON S R, DUNN A R, KATHE S D, et al. Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20): E2091-9.
- [99] ROWLAND M M, SCHONHOFT J D, MCKIBBIN P L, et al. Microscopic mechanism of DNA damage searching by hOGG1

- [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(14): 9295-303.
- [100] PENG S, WANG X, ZHANG L, et al. Target search and recognition mechanisms of glycosylase AlkD revealed by scanning FRET-FCS and Markov state models [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(36): 21889-95.
- [101] BLAINEY P C, VAN OIJEN A M, BANERJEE A, et al. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(15): 5752-7.
- [102] GORMAN J, CHOWDHURY A, SURTEES J A, et al. Dynamic basis for one-dimensional DNA scanning by the mismatch repair complex Msh2-Msh6 [J]. *Mol Cell*, 2007, 28(3): 359-70.
- [103] SPRINGALL L, HUGHES C D, SIMONS M, et al. Recruitment of UvrBC complexes to UV-induced damage in the absence of UvrA increases cell survival [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(3): 1256-65.
- [104] BECKWITT E C, JANG S, CARNAVAL DETWEILER I, et al. Single molecule analysis reveals monomeric XPA bends DNA and undergoes episodic linear diffusion during damage search [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1356.
- [105] BRUNER S D, NORMAN D P, VERDINE G L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 859-66.
- [106] FISHEL R. Mismatch repair [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(44): 26395-403.
- [107] MODRICH P. Mechanisms in *E. coli* and human mismatch repair [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(30): 8490-501.
- [108] HASSLER M, SHALTIEL I A, HAERING C H. Towards a unified model of SMC complex function [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(21): R1266-r81.
- [109] KONG M, CUTTS E E, PAN D, et al. Human condensin I and II drive extensive ATP-dependent compaction of nucleosome-bound DNA [J]. *Mol Cell*, 2020, 79(1): 99-114,e9.
- [110] CROZAT E, GRAINGE I. FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going [J]. *Chembiochem*, 2010, 11(16): 2232-43.
- [111] DEVARKAR S C, SCHWEIBENZ B, WANG C, et al. RIG-I Uses an ATPase-powered translocation-throttling mechanism for kinetic proofreading of rnas and oligomerization [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(2): 355-68,e4.