

DNA修复机制和非同源末端连接（NHEJ）单分子可视化

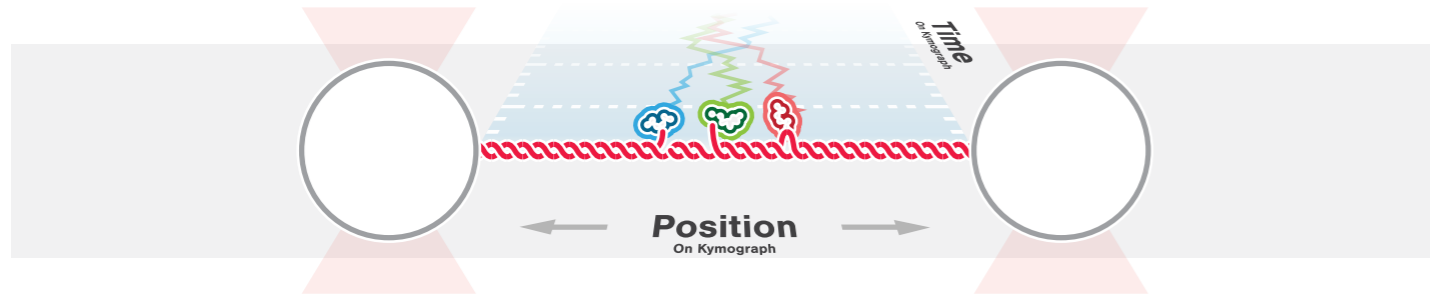
DNA 修复 应用案例

本手册应用案例由LUMICKS
公司开发，欢迎引用。

www.lumicks.com
info@lumicks.com
+31 (0) 20 598 79 84

De Boelelaan 1085
1081 HV, Amsterdam, The Netherlands

DNA 修复 应用案例



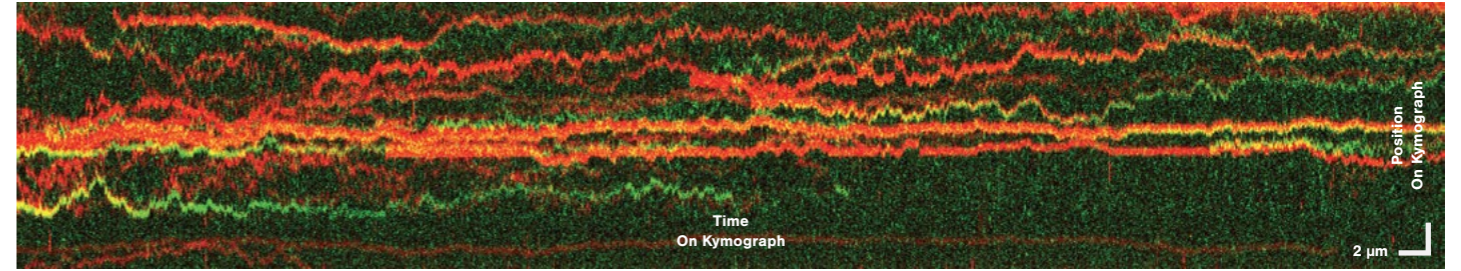
1 同时利用4个光阱模拟DNA-蛋白质相互作用的示意图。

分子水平研究DNA修复机制

DNA修复是人生命活动中最基本的过程，识别和修复DNA损伤的机制复杂而精细。没有DNA修复机制，细胞就丧失了转录其基因组重要区域的能力，从而导致有害突变的累积，最终使细胞受到损伤。

DNA损伤的来源主要包括双链断裂和DNA内部发生交联，如不及时修复，最终会发展为恶性肿瘤。深入的研究DNA的修复，单分子水平的技术手段必不可少。然而，既要在体外模拟体内的生物学行为，还要达到足够的灵敏度和分辨率，在原来是几乎不可能的。LUMICKS公司采用最新技术——C-Trap™可以满足实时可视化单分子水平观测DNA修复过程中DNA与DNA修复相关蛋白的相互作用。在保证高度模拟体内环境的前提下，大大提高了灵敏度和分辨率。尤其是当C-Trap配置了STED（超分辨显微镜，SuperC-trap™）之后，直接观察单个蛋白分子的动态变化成为了可能。

上图表示：一个DNA分子被两个由光镊控制的微球拉直，多种DNA修复相关蛋白与DNA相互作用。通过共聚焦显微镜可以实时定位荧光标记蛋白的位置，因此可以用来研究蛋白的结合位点、扩散、折叠/去折叠等一系列蛋白与DNA互作过程。同步进行的“力-距离”信号检测能够将蛋白的活性和酶动力学结合起来，反映DNA-蛋白复合物的力学特性。

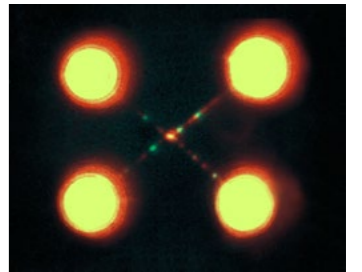


2 X轴为时间，Y轴为沿着DNA的结合蛋白的定位。图像显示实时监测DNA修复过程中DNA与蛋白的相互作用。

C-Trap™可以实时观测DNA与蛋白质的相互作用，包括DNA的修复、复制、转录和发卡结构的形成。

DNA双链由两个光镊控制的微球拉直。通过荧光显微镜可以精确定位荧光标记的蛋白，实时观测与DNA修复相关的蛋白所参与的生物学反应。

Figure 2 显示DNA修复相关蛋白XRCC4（绿色，占总量的9%）和XLF（红色，占总量的62%），这两种DNA修复相关蛋白参与到非同源末端连接（NHEJ）修复过程中并形成XRCC4-XLF复合物（黄色，占总量的29%）。XRCC4和XLF还参与DNA桥联过程，此实验需要通过额外添加两个光阱。利用四个捕获微球可拉伸两条双链DNA，通过光镊施力模拟细胞内非同源DNA与DNA末端相互连接的过程。然后与DNA修复相关蛋白共孵育，检测出何种蛋白参与DNA的修复。



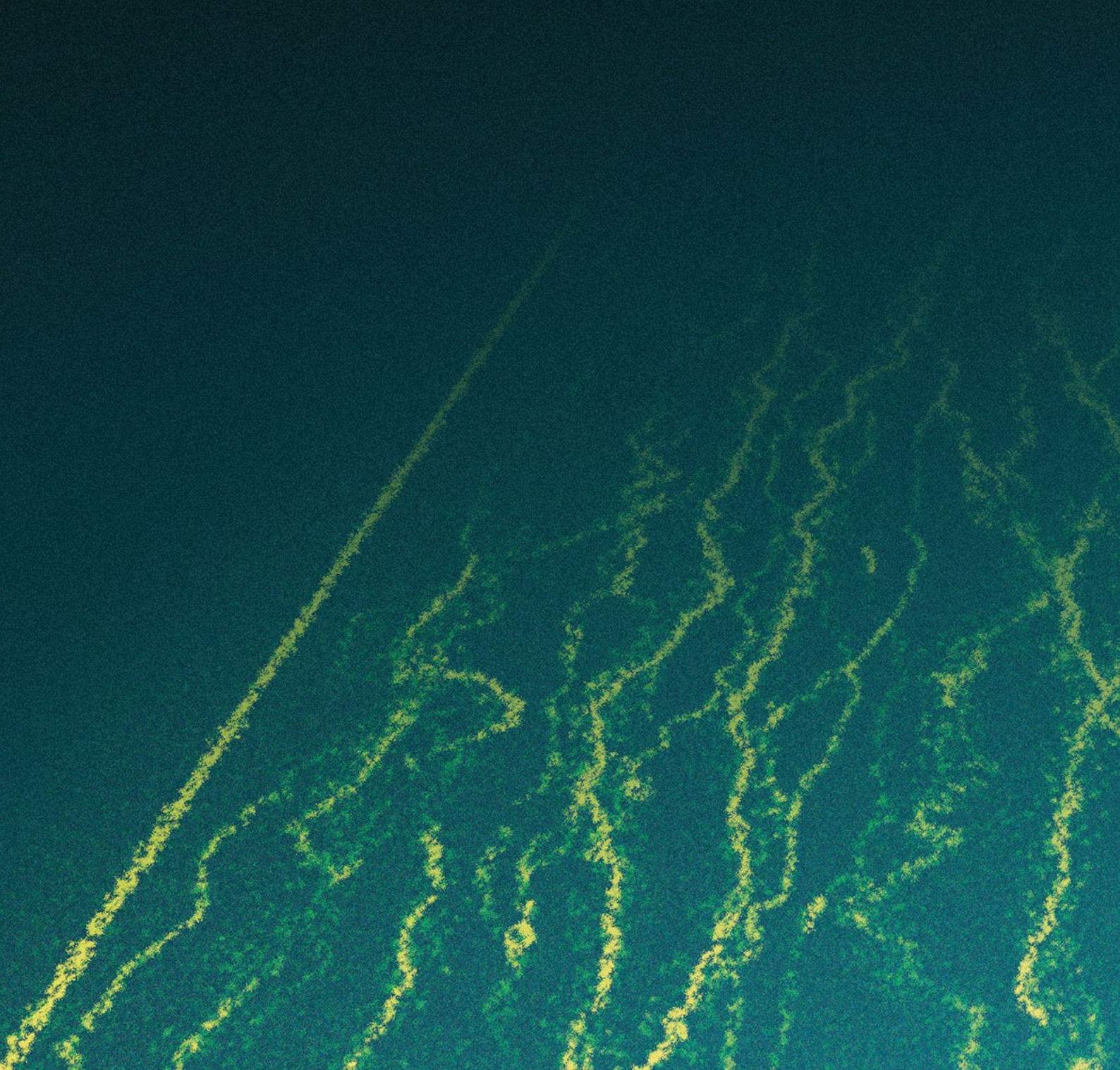
3 DNA修复相关蛋白 XLF (红色)、XRCC4 (绿色) 和复合物(黄色)在DNA上的精确位置。

Figure 3 显示2个DNA双链与200 nM XLF和200 nM XRCC4共孵育，过段时间后DNA形成了桥联结构。可以发现2个DNA双链形成四聚体的桥接结构的确需要这两种蛋白介导。然后通过对微球施力可进一步证实桥联的稳定性，研究应力状态下DNA修复蛋白的生物学特性。比如：当向右上和右下微球施加高强度的力(>100pN)时，XLF-XRCC4 DNA 修复蛋白复合体将会结合到左侧的DNA上，启动非同源末端连接（NHEJ）修复模式。继续增加施力，当施力大于250pN时，桥联出现明显的断裂，反映出这种修复方式的桥接具有高度的稳定性和韧性。这种4微球双DNA模型技术是首次应用到DNA修复领域相关实验中。

此外，由于DNA修复过程经常发生于蛋白高度密集的微环境中，因此结合STED超分辨显微镜也是一种区分标记蛋白和损伤DNA分子的技术手段。如需了解更多STED相关信息，请浏览我们LUMICKS的官网。

如需进一步了解，可参阅发表文献：Brouwer et al. "Sliding sleeves ofXRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA" Nature (2016)

Data courtesy of Vrije Universiteit Amsterdam.



LUMICKS - 专注分子互作研究

De Boelelaan 1085, 1081HV Amsterdam
The Netherlands

www.lumicks.com
info@lumicks.com
+31 (0) 20 598 79 84

申明：本手册版权归 LUMICKS B.V 公司所有，未经授权，不得转载。手册所述内容如有变化，恕不另行通知。如需最新产品资料，请致信垂询。

C-Trap, AFS, u-Flux, LUMICKS 和 LUMICKS 为 LUMICKS B.V 专用商标。

LUMICKS B.V. Amsterdam, The Netherlands.