

# 利用纳米孔研究 DNA<sup>\*</sup>

王凯歌 窦硕星 王鹏业<sup>†</sup>

(中国科学院物理研究所软物质物理实验室 北京 100080)

金爱子 顾长志

(中国科学院物理研究所微加工实验室 北京 100080)

**摘要** 脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白质是构成生命体最为重要的两类生物大分子. 随着科学技术的快速发展, 越来越多的纳米技术被用来研究这些生物大分子. 文章详细介绍了近来利用纳米孔技术研究DNA的一些进展. 结合作者近期利用聚焦离子束(FIB)制作纳米孔的工作, 提出了利用纳米孔解离核小体的设想. 如果能够利用纳米孔将双螺旋DNA从组蛋白八聚体上剥离下来, 并探测这一过程, 将揭示核小体中包含的许多生物化学、物理信息. 文章对此进行了较为详细的分析. 处于电场中的核小体在电场的作用下, DNA分子穿越纳米孔, 同时由于纳米孔的阻挡力, 使组蛋白不能穿越, 从而诱使DNA从组蛋白八聚体上分离下来. 通过准确检测DNA分子穿孔过程中引起的电流阻塞效应, 可将DNA与组蛋白的相互作用的一些性质反映出来.

**关键词** 纳米孔, DNA, 组蛋白, 核小体, 电流阻塞

## Study DNA with a nanopore

WANG Kai-Ge DOU Shuo-Xing WANG Peng-Ye<sup>†</sup>

(Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

JIN Ai-Zi GU Chang-Zhi

(Laboratory of Microfabrication, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** Deoxyribonucleic acid (DNA) and protein are two kinds of very important bio-macromolecules. With the rapid development of science and technology, more and more aspects of nano-technology have been used for studying these molecules. We review recent progress in the research of DNA molecules with nanopores. Related to our recent work on the fabrication of nanopores with focused ion beam technology, we introduce the basic concept and technology which may be used to study the disassembling dynamics of nucleosomes: the double-strand DNA of the nucleosome passes through the nanopore in an electric field, whereas the histone octamer is blocked by the nanopore. We expect to detect this peeling process by measuring the current blockade from which we may obtain the interaction information between DNA and histones.

**Key words** nanopore, DNA, histone, nucleosome, current blockade

## 1 引言

人类对于生命奥秘的不懈探究, 尤其是2003年4月“人类基因组计划”工程的完成, 开创了一个新纪元<sup>[1-4]</sup>. 准确、清晰、完整的人类基因组图谱的绘制, 明确了基因的数量和位置, 为人类彻底全面了解自身开启了智慧之门. 众所周知, 包括人类在内的所

有真核生物基因的载体是脱氧核糖核酸(DNA), 其中95%以上的DNA被包裹在细胞核内, 在核内, DNA与组蛋白结合构成了染色质的基本结构单元

<sup>\*</sup> 中国科学院王宽诚博士后工作奖励基金(批准号:40)、国家自然科学基金(批准号:60025516, 10334100)和中国科学院知识创新工程资助项目

2003-11-27 收到初稿, 2004-03-05 修回

<sup>†</sup> 通讯联系人. E-mail: pywang@aphy.iphy.ac.cn

——核小体(nucleosome)。DNA要真正发挥作用,必须首先从组蛋白八聚体上分离下来<sup>[5,6]</sup>,然后含有确定基因片段的DNA,在核内转录成为信使mRNA。mRNA经过加工,剪去其中并不编码蛋白质的许多序列(内含子),将编码部分(外显子)正确地连接起来,通过细胞核孔输送到细胞质中的核糖体中,作为生产蛋白质的图纸,再进行系列的后续生命活动。

染色质结构是一系列生物化学活动的中心,对于DNA的转录、复制、修复以及控制基因表达等都具有至关重要的作用。日益增多的实验表明<sup>[7]</sup>,染色质和核小体的构型不是固定不变、静止不动的,而是处于不停的动态变换之中。因此,搞清楚DNA与组蛋白的相互作用,以及染色质、核小体的动态结构等是进一步认识、理解生命活动的关键。在过去的几十年里,这一领域一直是生命科技工作者研究的热点。由于在研究中发现不同细胞核的染色质结构存在比较大的差异性和不均匀性,于是,大家的工作焦点就集中于染色质的基本结构单元——核小体的生物结构、生物化学和生物物理特性的研究。

核小体的结构最先是由Kornberg<sup>[8]</sup>在1974年利用X射线晶体衍射成像确认的。此后,各种技术的进一步发展与应用,使我们对于核小体的结构与性能有了更加清楚的认识<sup>[9,10]</sup>,尤其是最近十多年发展起来的单分子操纵技术<sup>[11-14]</sup>,如流场、分子梳、光镊、磁镊、微吸管技术和原子力显微镜技术等等,帮助人们直接操纵单个生物大分子,观察它们的运动和相互之间的作用。随着新技术的不断发明和使用,以及研究的深入,许多有关核小体内部动力学新现象的发现<sup>[15]</sup>,给已有的方法、技术又带来新的挑战。

利用纳米孔(nanopore)研究DNA等生物分子是一种崭新的生物技术<sup>[16-18]</sup>,是在生物活性环境下,对样品的空间结构、动态变化、生化特性等进行直接研究,不需要对生物样品进行化学修饰、表面吸附、标定物插入等有可能影响样品环境的前期处理,具有多方面的优越性。目前,国际上主要开展利用纳米孔技术对DNA分子的超快速测序<sup>[19]</sup>,寄希望于利用此技术与其他技术相结合,在很短的时间内,完全准确地测定任意一个人的基因排序。其主要思想是基于组成DNA的四种碱基腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)的分子结构不同、体积大小不同,当单个核苷酸分子在电场驱使下,穿越孔径适宜的微小孔洞时,引起缓冲液离子流的阻

塞,通过探测阻塞效应带来的监测电流振幅涨落、时间迟滞等特征信息,测定不同片段单链DNA(ssDNA)的碱基对序列,最终确认其基因排序,为疾病预防、临床医学、药学等服务。

与“ssDNA穿越纳米孔”、“离子流阻塞效应”、“电流特征检测”同样的原理,不同样品、不同片段的DNA(dsDNA),其碱基排列顺序不同,与组蛋白结合形成的核小体动力学特性也将有所不同。处于电场驱动下的核小体或染色质溶液,当电场强度合适时,在电场拖拽力的作用下,DNA穿越纳米孔,同时由于纳米孔的阻挡力,使组蛋白不能穿越,从而诱使DNA从组蛋白八聚体上分离下来。在dsDNA穿孔过程中,引起的普通缓冲液离子流阻塞效应,将导致测试电流振幅起伏等一系列鲜明的特征信息变换。这些特征信号,携带着核小体实时空间动态结构、DNA-组蛋白相互作用、染色质动态结构等很多的生命信息。分析、解读这些电流信息,将帮助我们更好地理解染色质、核小体的动态结构和功能,更好地理解生命的活动规律。

## 2 核小体

真核生物的绝大多数DNA被包裹在细胞核内的染色质中。虽然科技工作者们很早就开展了对染色质结构的研究,但直到20世纪70年代才有了突破性发现,Kornberg最早确认了所有真核细胞的染色质是由基本结构相同的核小体构成的,开启了染色质结构的现代认识大门<sup>[20]</sup>。到1997年,Richmond研究小组获得了如图1所示的分辨率为2.8Å的更为详细的核小体核心颗粒的X射线晶体衍射成像结构图<sup>[21]</sup>,从原子水平上精确地表明了组蛋白八聚体的组装形式以及DNA组织成双螺旋链并缠绕八聚体的详细空间结构,使人们能够清晰地辨别组成核小体的约80%的组蛋白原子以及所有的DNA分子。并在随后一系列研究成果的基础上,最近又得到了分辨率为1.9Å的核小体核心颗粒精细结构图<sup>[22]</sup>。

核小体由DNA和组蛋白共同组成,包括核心颗粒、连结DNA和连结组蛋白H1。如图1所示(核小体核心颗粒结构的一半),核心颗粒包括两组4种组蛋白H2A、H2B、H3和H4组成的八聚体以及缠绕它的DNA。其中H2A和H2B、H3和H4分别组成两个二聚体,两个二聚体H3-H4又组成一个四聚体,四聚体结合两个二聚体H2A-H2B最后组成一

色质的生物、化学、物理等方面的性质。

### 3 纳米孔

纳米孔( nanopore ),可以简单地定义为内径为 1—100nm 的微小洞孔,一般孔径应大于洞孔深度,或者处于同一量级.如果孔的深度远大于孔径,就称之为纳米孔道。

纳米孔有天然存在的生物纳米孔<sup>[27]</sup>,也有人工加工的纳米孔<sup>[28—30]</sup>.它们都可以用来进行生命科学的相关研究,但是,理想的生物化学或生物物理研究应采用孔径稳定、坚固耐用、物化性能良好的固体纳米孔,这样的纳米孔应该由质地坚硬的固体薄膜材料加工制作.在众多的先进材料中, $\text{Si}_3\text{N}_4$ (氮化硅)晶体薄膜是最具潜力用来加工生物物理研究用纳米孔的材料。

在固体薄膜上研制纳米孔的技术,虽然近几年刚刚起步,但已经有了很好的进展,实验有比较好结果的技术有聚焦离子束( focused ion beam, FIB )技术<sup>[28,29]</sup>、显微镜电子束技术<sup>[30]</sup>、同步辐射源技术以及其他方法<sup>[31,32]</sup>。

聚焦离子束技术是 1990 年代发展起来的新型刻蚀工具<sup>[33]</sup>,是第一种专门设计用来为光刻掩模版修补和集成电路修饰的精细加工工具. FIB 研制纳米孔的基本机理是利用离子束与晶体表面的作用刻蚀出离子束聚焦位置的晶体原子或分子,形成纳米洞孔.当一束具有几千电子伏特的离子束轰击材料的表面时,将有两种截然不同的效应.一种是原子尺寸的冲蚀过程,即溅射,离子束将材料表面最外层的原子和分子刻蚀掉,导致一个小洞/小孔的产生,通过该途径产生的纳米孔技术叫溅射刻蚀( sputter erosion ).另一种效应是离子束能够激励材料表面原子或分子的横向迁移( lateral transport ),沿表面移动的原子或分子进入事先已形成的小孔洞内,缩小甚至封闭住该小孔洞,该途径也可以被用来产生纳米孔。

为了制作纳米孔,我们首先在  $\text{Si}(100)$  基底上利用低压化学气相沉积( LPCVD )方法沉积大约 600nm 厚的  $\text{Si}_3\text{N}_4$  晶体薄膜,并利用化学定向腐蚀法在一个小区域内腐蚀掉硅衬底,形成自支撑的  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜片,然后直接利用 FIB 刻蚀  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜,制作纳米孔.我们先后利用 30pA、1pA 的离子束流条件分阶段刻蚀出孔径约为 30nm 的小孔,图 2 所示的是在  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜上刻蚀出的纳米孔洞的扫描电镜照片。

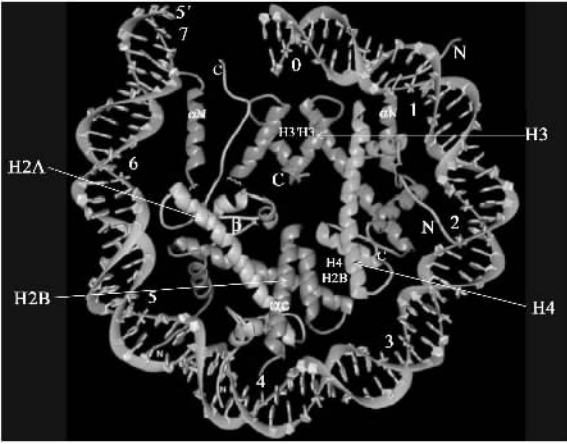


图1 核小体核心颗粒 X 射线晶体衍射精细结构

个八聚体,该八聚体外围被 145—147 bp 的 DNA 缠绕 1.65—1.75 圈.组蛋白是一类小的、很保守的蛋白质,其成分中有高比例的带正电荷的氨基酸.研究表明<sup>[23]</sup>,组蛋白重组复合物以及组蛋白尾部修饰(甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等)将改变核小体的结构,而且,修饰的不同化合物表示不同的染色质组织,可导致基因表达、基因抑制、染色体压缩的改变。

核小体的物理性质决定于溶液的离子力、二价离子的浓度、组蛋白的修饰状态等.一般情况下, DNA 的排列顺序将决定单个核小体核心颗粒的特性,但是,核小体一旦形成却并不是在一个状态下完全固定不变的.通常,当发生以下 3 种情况时,核小体、染色质的结构就会发生改变<sup>[7]</sup>(1)核小体在特异复合物的诱导下重建,该过程需要 ATP 水解以提供能量(2)核小体内发生组蛋白的共价修饰(3)一种或多种核心组蛋白被变异的组蛋白替代。

核小体作为 DNA 在细胞核中最初级的包装单位,对基因的转录表达等起着最初的调控作用,是 DNA 可达性最基本的决定因素.结构分析表明<sup>[24]</sup>,核小体从两种层次上塑造 DNA 分子.一是在原子水平上,通过 DNA 的弯曲与组蛋白的结合;二是在更大范围的基因水平上,通过核小体的压缩折叠形成更高级螺旋结构。

核小体不是孤立地处于静止状态,也不仅仅是 DNA 弯曲的诱导剂,而是具有生物化学活性的复杂物体,染色质结构也是在不同状态之间不停地变换<sup>[25,26]</sup>.不管染色质是处于单个核小体结构、绳珠模型一级结构、松散的结构域、30nm 纤维、或是更高级结构,都与 DNA 转录等过程有亲密关系,要理解真核细胞转录过程,必须研究更多的有关核小体、染

我们期望利用该孔径尺寸的纳米孔,来探测电场驱动核小体、DNA 团簇穿孔等过程,也可以研究其他 DNA 蛋白质复合物,例如染色质的 30nm 纤维等。这方面的研究工作还在进行中。我们期望将来能够进一步缩小孔径,在  $\text{Si}_3\text{N}_4$  晶体薄膜上制作出直径在 2—10nm 左右的、形状规则的单个纳米孔,找出控制孔径的简单有效方法。另外需要指出的是,用于探测生物大分子的纳米孔对于制作纳米孔的薄膜材料的电阻率有很高的要求。这是因为探测是通过测量流过纳米孔的微小电流实现的,这一电流的大小一般为纳安(nA)量级,因此要求漏电电流远小于这个值。几种常见材料的电阻率量级为:薄片云母  $\sim 100\Omega \cdot \text{cm}$ ,金刚石  $\sim 10^6\text{—}10^8\Omega \cdot \text{cm}$ ,二氧化硅  $\sim 10^7\text{—}10^8\Omega \cdot \text{cm}$ ,氮化铝  $\sim 10^{13}\Omega \cdot \text{cm}$ , $\text{Si}_3\text{N}_4\text{—}10^{15}\Omega \cdot \text{cm}$ 。从这些数据可以看出, $\text{Si}_3\text{N}_4$  晶体薄膜的电阻率在这几种材料当中是最高的。

电子显微镜(TEM)上的电子束在  $\text{SiO}_2$  薄膜上刻蚀出孔径为 3nm 左右的小孔。但由于  $\text{SiO}_2$  薄膜电阻率远低于  $\text{Si}_3\text{N}_4$  晶体薄膜,目前无法依靠微电流法来探测生物大分子。

#### 4 利用生物纳米孔研究 DNA

另外一种纳米孔技术是直接利用生物界本身具有纳米孔。这也是一条获得纳米孔的重要途径,在这里我们也做一简单介绍。众所周知,生物膜上具有各种各样的通道,基本上都是由纳米尺度的孔道组成(如离子通道,水通道等)。目前利用生物纳米孔技术研究 DNA 排列次序等特性所采用的主要是葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -hemolysin)纳米孔<sup>[34—40]</sup>。该纳米孔是众多生物纳米孔中结构组成相对简单、并且研究比较详细的一种<sup>[27, 39, 40]</sup>。 $\alpha$ -溶血素是从葡萄球菌中分离出来的一种多肽毒素,能够自组装进植烷醇卵磷脂类脂双分子层膜中,并在其中形成孔道总长为 10 nm,孔径从 1.5nm 到 3.6nm 不等的几部分组成的纳米孔道,空间结构如图 3 所示<sup>[27]</sup>。

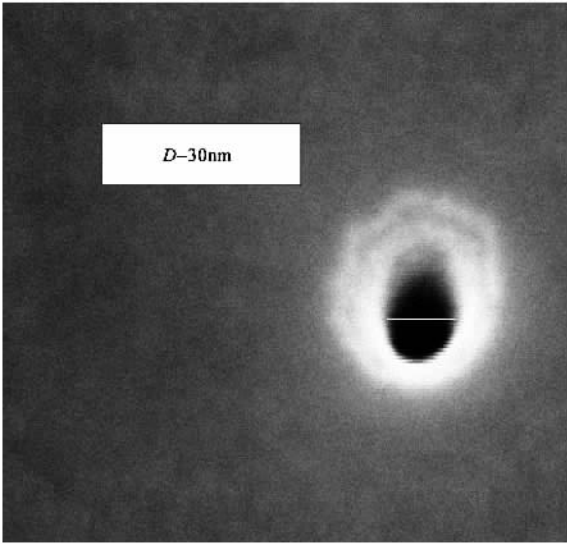


图 2  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜上 FIB 直接刻蚀出的孔径为 30nm 的纳米孔(观察倾角  $15^\circ$ )

创建一个分子级大小的小孔,要求精确保证刻蚀的时间。因此,实际中还需要与 FIB 相配套的离子束刻蚀控制反馈系统等辅助设备,用以调控刻蚀时间、样品温度、瞬时离子束流大小等,这些参量对小孔的最后定型有很大的影响。FIB 技术与其他技术相结合,可以得到孔径更小的纳米孔。据 Li 等人报道<sup>[28]</sup>,他们用聚焦离子束刻蚀  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜,形成 60nm 孔径的小孔,然后再用  $\text{Ar}^+$  离子作用于小孔表面,利用样品表面分子的横向迁移产生了孔径为 1.8nm 的小孔。Storm 等人最近也报道<sup>[30]</sup>,他们根据与 FIB 刻蚀纳米孔基本相同的原理,主要利用透射

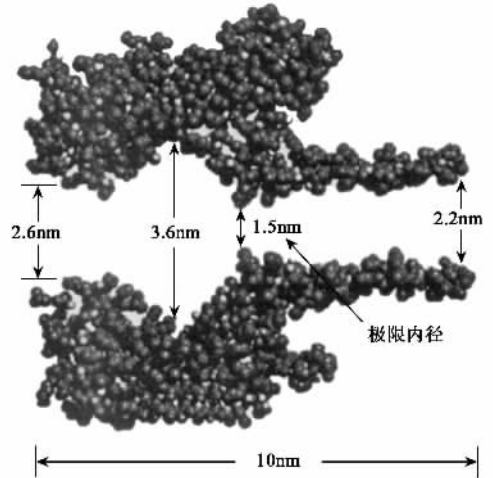


图 3  $\alpha$ -溶血素晶体结构

科学家们研究生物体内存在的各种纳米孔已经有很长时间,并利用其作为工具,进行了许多有意义的生命科学与应用研究,利用  $\alpha$ -HL 纳米孔进行区别核苷酸和寡聚核苷酸特性的研究是其中卓有成效的工作之一。这一方面的工作以 D. Branton 和 A. Meller 等科学家为代表,他们利用“ssDNA 穿越纳米孔”、“离子流阻塞效应”、“电流特征检测”、“DNA 特征信息”原理为根据,以  $\alpha$ -HL 生物膜纳米孔作为工具,致力于 DNA 的超快速测序探索。现在,实验上已经能够通过其穿越  $\alpha$ -HL 纳米孔道时所检测

到的阻塞电流振幅起伏、时间滞留等图案的不同,区分不同 DNA/RNA 均聚物 PolyA、PolyC、PolyU、PolydC 以及 PolyT 等,聚合物 Poly A<sub>30</sub>C<sub>70</sub> 结构组成中的两段嘌呤和嘧啶,也能够被成功鉴别<sup>[34-38]</sup>。

经过 10 多年的努力,人们已经完成了一系列有关 DNA 特性的实验,取得了许多有意义的结果,得到了一些结论,例如:

- (1) 聚合物分子通过一个  $\alpha$ -HL 纳米孔道时,是按一定的单体次序;
- (2) 可将缓冲液中每一个大分子的穿越行为转换为电流信号;
- (3) 能够检测和统计单个生物大分子;
- (4) 能够测量生物大分子长度、空间结构;
- (5) 可揭示聚合物在有限空间里迁移时的动力学知识;
- (6) 可实时区分不同的聚核苷酸分子;
- (7) 具有鉴别单核苷酸溶液的潜能。

利用  $\alpha$ -HL 纳米孔技术能够准确探测、辨别寡聚核苷酸。但是,对单个嘧啶、嘌呤的准确监测与辨认,以及对自然 ssDNA 片段、基因片段进行辨别,还有许多具体、繁复、极富挑战性的工作需要首先完成。 $\alpha$ -HL 纳米孔存在的主要缺点是内部最小极限孔径只有 1.5nm,这样的纳米孔,仅能容许单链 DNA、RNA、聚核苷酸穿越,限制双链 DNA、RNA 的穿越,因此,并不能用它来研究双链 DNA、RNA 或聚核苷酸等的结构性质,不可能利用它直接研究 DNA-组蛋白的动力学结构。

纳米孔生物技术探测 DNA 序列的基本思想,最早可以追溯到 1953 年就开始实现的粒子数统计和粒子大小测量 Coulter 计数器上成功应用的毛细管脉冲电阻原理<sup>[41]</sup>:如果一绝缘大粒子悬浮在导电溶液中,并随之进入一个孔径很小的毛细管内( $\mu\text{m}$  量级),与先前毛细管仅充满导电介质时相比,这一过程将降低毛细管的导电率。在确定几何形状的毛细管内,电流的减低量反映粒子的体积大小,而电流变化的次数则反映粒子的数目。

## 5 利用纳米孔研究 DNA 与组蛋白的相互作用分析

核小体核心颗粒的大小尺寸如图 4 所示。可见,按照核小体结构的尺寸,对于孔径  $< 10\text{nm}$  的孔道,核小体就不能穿越,孔径  $< 6\text{nm}$  组蛋白八聚体不能

穿过,当孔径  $< 2\text{nm}$  时,双链 DNA 不能穿越这样的孔道,当孔径再小至  $< 1.3\text{nm}$  时,单链 DNA 也将不能穿越。由此可见,研究核小体的纳米孔技术是名副其实的纳米(single-nanometer)技术。

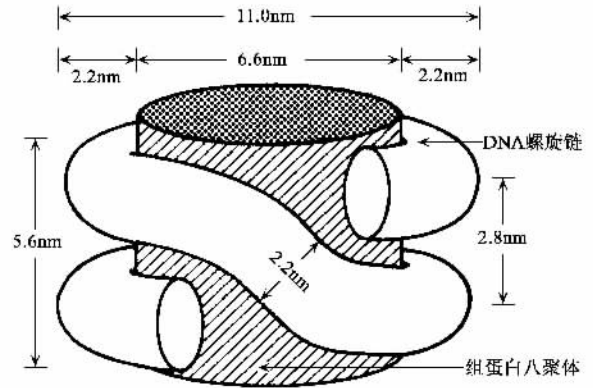


图 4 核小体核心颗粒组成亚单元大小尺度

一般认为,DNA 与组蛋白八聚体的结合,主要原因是组蛋白为碱性蛋白质,其碱性氨基酸带正电荷,可中和 DNA 分子中磷酸根的负电荷,消除静电斥力,使 DNA 紧密缠绕。那么,在合适外力(几十 pN)作用下,DNA 与组蛋白八聚体的结合将被撕裂、分开、分离,如果对这一过程中所施加外力的大小等情况进行实时、详细的监测、分析,就能够评估 DNA-组蛋白八聚体的结合情况。事实上,光镊(optical tweezer)、原子力显微镜(AFM)、微吸管(micropipette)等技术就是依据这样的原理来研究核小体的动力学结构<sup>[42-46]</sup>。最近,我们利用布朗动力学方法对于核小体的组装和解离进行了初步的理论分析<sup>[47]</sup>。

利用纳米孔研究核小体的动力学结构,其基本原理与利用纳米孔进行 DNA 的超快速测序技术原理基本相同:依据构成核小体基本成分的不同个性,利用双链 DNA 穿越纳米孔这一物理过程,将需要探测的样品的生物化学结构、生物物理性质等,转换为可以直接测量的物理参量性质,然后对物理参量特性进行定量分析。如图 5 所示,用绝缘介质上的单个纳米孔将两个充满生物缓冲液的样品池连接起来,当在样品池之间加上直流电压后,只有缓冲液中的小离子,如  $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  等均匀地穿过纳米孔,形成均匀的离子流,检测仪器能够容易地、准确地测量出样品池之间的电流大小,而当缓冲液中掺杂了生物大分子后,如果大分子的尺寸和孔洞的尺寸相差无几(纳米孔的孔径须大于生物大分子尺寸),当它穿越纳米孔时,就会阻塞孔道(阻塞效应),导致单位时

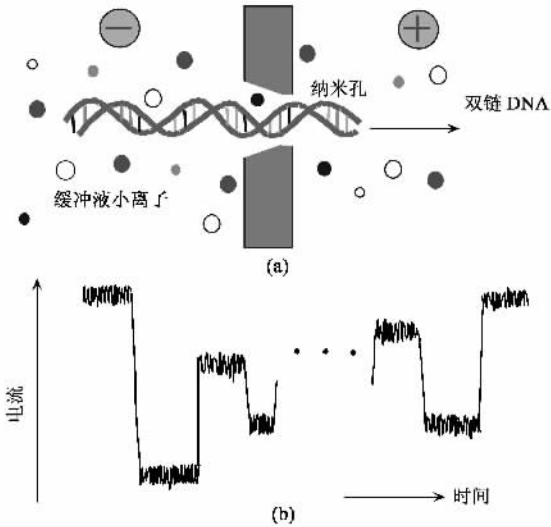


图5 DNA 穿越纳米孔示意图 (a)充满缓冲液的两个样品池,用纳米孔连接起来,当在样品池之间施加电压后,不同的带电离子将沿相反方向穿越孔洞 (b)在电场作用下, DNA 从组蛋白八聚体上剥离下来,并穿越纳米孔道.依据 DNA 与蛋白质结合位点、结合力的不同将决定穿越孔道时引起检测电流阻塞振幅、时间、形状等的变化

间内缓冲液中通过纳米孔的小离子数减少,从而导致监测电流的减小.

相对于形状、孔径一定的纳米孔,生物大分子的大小、形状将决定监测电流振幅的起伏,缓冲液中不同形状、尺寸的生物大分子,在穿越孔洞时,除引起电流的改变外,其滞留在孔洞内的时间也将不同,引起检测电流振幅改变持续的时间也不同.因此,通过分析阻塞电流的振幅涨落、时间迟滞等监测电流图案的变化,能够推测生物大分子的化学组成、空间结构等特性.

DNA 双螺旋是由两股 DNA 单链逆向绕制形成的.具有不同碱基数目、排列次序的 dsDNA 片段,与组蛋白结合成核小体,其相互作用力、空间结构、构象等不相同,当其被剥离并穿越纳米孔时,引起电流阻塞振幅、阻塞时间等也不同.双链 DNA 与组蛋白八聚体结合在不同的位点上,这些结合位点具有不同的结构,在电场力作用下, dsDNA 从八聚体上被剥离下来的过程以及 dsDNA 拉伸的扭曲等将导致其他结构的转变等<sup>[48]</sup>. 这些信息都将通过检测电流阻塞的振幅起伏、时间迟滞等特征图案反映出来.因此,不同真核生物样品的细胞、不同染色质内的核小体,处于不同动态结构(不同温度、不同 pH 值等)的核小体, DNA 与组蛋白结合的不同位点等等,这些核小体、染色质的时空动态结构都将通过监测电流的振幅涨落、时间滞留等特性得到部分或全部反映.

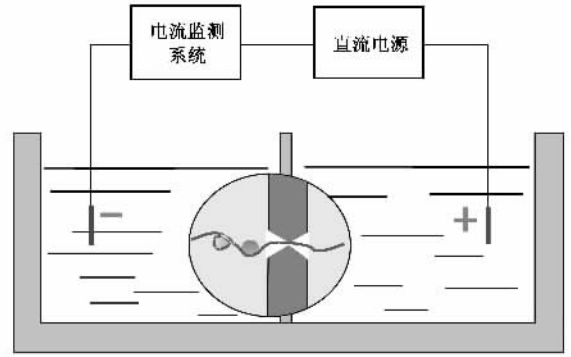


图6 实验装置

利用纳米孔技术探测 DNA 与组蛋白相互作用的实验装置如图 6 所示.利用形状、孔径确定的  $Si_3N_4$  纳米孔将两个充满缓冲液的样品池连接起来,电极选用 Ag-AgCl 参比电极,核小体样品溶液浸放在有负电极一边的样品池内.直流电源提供电场力将 dsDNA 从组蛋白八聚体上剥离下来,并驱使带负电荷的 dsDNA 穿越纳米孔.当 dsDNA 穿过纳米孔时,将实时地监测电流系统的检测电流振幅涨落、时间迟滞等.实验中,纳米孔两边的缓冲液样品池之间所加驱动电场电压应在  $\sim 100\text{mV}$  左右,此时电流为 pA 量级(随纳米孔孔径大小决定).最近报道的实验表明,对于单独的 dsDNA 片段,在电场力驱使下穿越孔径为 3nm 的  $Si_3N_4$  纳米孔时,可以很清楚地观察到样品池之间的电流起伏<sup>[49]</sup>.

## 6 总结与展望

利用纳米孔作为探测器研究 DNA 方兴未艾,要达到实用阶段还有很长的路要走,需要科学家进一步的努力.我们基于微加工技术工作基础上提出的利用纳米孔研究 DNA 与组蛋白的相互作用设想,其最终目的是结合已成熟的和正在快速发展的其他生物、生化以及生物物理方法和技术,在前人已有的理论与实验研究成果基础上,探索、揭示核小体的最初形成机制以及 DNA-组蛋白结合的动力学结构,揭示染色质最初的折叠机理,组蛋白在核小体折叠过程中的作用,核小体构象与 DNA 序列的关系,外力对核小体、染色质结构的影响以及电屏蔽的作用等等,揭示更多的生命活动规律.对于这一研究课题,目前还有许多挑战性问题需要进一步探索.

总之,纳米孔技术用于研究 DNA 及核小体的动力学结构,与其他技术相比,具有其自身独特的优点,如:

(1) 详细鲜明的电流特征信号能够直接、实时地区别不同类型的片段 DNA、RNA 等空间化学结构, 完全不需要化学修正、表面吸附、探测物或插入物。

(2) 与其他单分子操纵技术相比较, dsDNA 从组蛋白八聚体上的剥离、dsDNA 螺旋的拉伸以及所导致的核小体空间结构的改变等其他详细情况能够从监测电流阻塞特征上直接判断, 而不需要预先进行标定或共价修正, 也不需要单个分子进行显微观察。

(3) 非常容易改变 DNA 所处的环境(离子力、pH 值、温度、电压)和更换实验样品。

(4) 对其他与 DNA 结合的蛋白质也能够用此方法开展动力学研究。如双链 dsDNA 与转录因子的连接、解旋酶沿 DNA 的运动等。

(5) 性能稳定的固体纳米孔, 能够适应不同 pH 值的溶液、样品温度改变, 以及其他生化环境的改变。

利用纳米孔技术研究 DNA 与组蛋白相互作用是在生理环境下, 对生物样品的结构动态变换进行直接观察, 在更少干扰的状态下, 对样品的生物物理性能、生物化学特性、空间构象等的探测和反映。相信该技术将提供更多的有关核小体结构、染色质及其高级结构等方面更丰富的信息, 提供更详细的功能基因、基因遗传等方面的信息, 帮助我们解决一些深层次的生物学疑难问题。

致谢 感谢薛其坤, 欧阳颀, 汤超的有益讨论。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Butler D. *Nature*, 2001, 409 : 747
- [ 2 ] Venter J C, Adams M D, Eugene W *et al.* *Science*, 2001, 291 : 1304
- [ 3 ] Lander E S, Linton L M, Birren B *et al.* *Nature*, 2001, 409 : 860
- [ 4 ] Pennisi E. *Science*, 2003, 300 : 409
- [ 5 ] Vale RD, Milligan R A. *Science*, 2000, 288 : 88
- [ 6 ] Koch S J, Sundrovsky A, Benjamin C *et al.* *Biophys. J.*, 2002, 83 : 1098
- [ 7 ] Felsenfeld G, Groudine M. *Nature*, 2003, 421 : 448
- [ 8 ] Kornberg R D. *Annu. Rev. Biochem.* 1977, 46 : 931
- [ 9 ] Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R *et al.* *Cell*, 2000, 102 : 615
- [ 10 ] Sluder G, Miller F J, Rieder C L. *J. Cell. Bio.*, 1986, 103 : 1873
- [ 11 ] Willemsen O H, Snel M M E, Cambi A *et al.* *Biophys. J.*, 2000, 79 : 3267
- [ 12 ] Adelman K, Porta A L, Santangelo T J *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99 : 13538
- [ 13 ] Karrer E E, Lincoln J E, Hogenhout S *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92 : 3814
- [ 14 ] Allemand J F, Bensimon D, Lavery R *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 : 14152
- [ 15 ] Misteli T. *Science*, 2001, 291 : 843
- [ 16 ] Sung W, Park P J. *Phys. Rev. Lett.*, 1996, 77 : 783
- [ 17 ] Lubensky D K, Nelson D R. *Biophys. J.*, 1999, 77 : 1824
- [ 18 ] Muthukumar M. *Phys. Rev. Lett.*, 2001, 86 : 3188
- [ 19 ] Meller A, Branton D. *Electrophoresis*, 2002, 23 : 2583
- [ 20 ] Rhodes D. *Nature*, 1997, 389 : 231
- [ 21 ] Luger K, Mader A W, Richmond R K *et al.* *Nature*, 1997, 389 : 251
- [ 22 ] Davey C A, Sargent D F, Luger K *et al.* *J. Mol. Biol.*, 2003, 319 : 1097
- [ 23 ] Meller A, Nivon L, Branton D. *Phys. Rev. Lett.*, 2001, 86 : 3435
- [ 24 ] Widom J. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 1999, 18 : 365
- [ 25 ] Holde K V, Zlatanova J. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 : 8373
- [ 26 ] Bednar J, Horowitz R A, Sergej A *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 : 14173
- [ 27 ] Song L, Hobaugh M R, Shustak C *et al.* *Science*, 1996, 274 : 1859
- [ 28 ] Jiali Li, Stein D, McMullan C *et al.* *Nature*, 2001, 412 : 166
- [ 29 ] Stein D, Jiali Li, Golovchenko J A. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 89 : 276106-1-4
- [ 30 ] Storm A J, Chen J H, Ling X S *et al.* *Nature Materials*, 2003, 2 : 537
- [ 31 ] Siwy Z, Fulinski A. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 89 : 198103-1-4
- [ 32 ] Ralls K S, Buhman R A, Tiberio R C. *Appl. Phys. Lett.*, 1989, 55 : 2459
- [ 33 ] Rai-Choudhury P ed. *Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication*. Bellingham : SPIE-The International Society for Optical Engineering, 1997. 153—195
- [ 34 ] Deamer D W, Branton D. *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35 : 817
- [ 35 ] Kasianowicz J J, Brandin E, Branton D *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 : 13770
- [ 36 ] Akesson M, Branton D, Kasianowicz J J *et al.* *Biophys. J.*, 1999, 77 : 3227
- [ 37 ] Brandin E, Kasianowicz J J. *Phys. Rev. Lett.*, 1990, 70 : 2352
- [ 38 ] Henrichson S E, Misakian M, Robertson B *et al.* *Phys. Rev. Lett.*, 2000, 85 : 3057
- [ 39 ] Gouaux J E, Braha O, Hobaugh M R *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91 : 12828
- [ 40 ] Walker B, Krishnasastri M. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 10902
- [ 41 ] Coulter W H. 1953 US Patent 2, 656, 508
- [ 42 ] Brower-Toland B D, Simth C L, Yeh R C *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99 : 1960
- [ 43 ] Cui Yujia, Bustamante C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97 : 127

- [ 44 ] Koch S J , Shundrovshy A , Benjamin C *et al.* Biophys. J. , 2002 , 83 : 1098
- [ 45 ] Rief M , Gautel M , Oesterhelt F *et al.* Science , 1997 , 276 : 1109
- [ 46 ] Poirier M G , Marko J F. J. Muscle Research and Cell Motility , 2002 , 23 : 409
- [ 47 ] Li Wei , Wang P Y , Dou S X *et al.* Chin. Phys. , 2003 , 12 : 226
- [ 48 ] Strick T R , Bensimon J F , Bensimon D *et al.* Biophys. J. , 1998 , 74 : 2016
- [ 49 ] Jiali Li , Gershow M , Stein D *et al.* Nature Materials , 2003 , 2 : 611



· 物理新闻和动态 ·

## 碳纳米管金属态和半导体态之间的磁通调制

从石墨片(正六边形单胞联成的一张网)剪出一个矩形,便可卷成一根碳纳米管.但是,碳管的电输运性质却与“矩形的边相对于晶轴的取向”有关.如果单胞六边形有两条边与碳管的轴线平行,在管子的截面上就会呈现锯齿状,这类碳管被称为 Zigzag 管;如果单胞六边形有两条边与碳管的轴线垂直,则管截面变得象座椅的扶手,它们被称为 armchair 管;如果单胞六边形没有任何边与管轴平行或垂直,则碳管看上去就象是理发馆的“旋转招牌”,它们被称为手征(chiral)管.

碳纳米管的电输运性质还可因施加共轴磁通而改变,称为 Aharonov-Bohm 效应(参见《物理》1999(11):702).电阻随磁能增加而振荡的周期可表现为  $\Phi_0/1 = h/2e$ (当管长小即 AAS 振荡,也可表现为  $\Phi_0/1 = h/e$ (当管子较长),于本征退相干长度),即 AB 振荡.最近,美国伊利诺斯大学的 Coskun U C 等对二根短多壁碳管(其一为金属管,其二为半导体管)完成了电输运研究.结果表明,随着共轴磁能的增加,导电能隙呈现调制变化,调制周期为  $\Phi_0/1 = h/e$ .对于金属管,磁能等于整数倍  $\Phi_0$  能隙极大,对于半导体管,能隙极大和极小所对应的磁通量恰好与金属管颠倒.研究者还对相应的模型管(一根 armchair)金属管和一根 Zigzag 半导体管)进行了紧束缚近似能谱计算,结果与实验相符很好.

(中国科学院理化技术研究所 戴闻 编译自 Science 2004 304 :1132)



· 书评和书讯 ·

## 科学出版社物理类新书推荐

书 名	作(译)者	定价	出版日期	发行号
物理学家用微分几何	侯伯元, 侯伯宇	待定	2004年7月	O-1976
金属陶瓷薄膜及其在光电子技术中的应用	孙大明, 孙兆奇	¥56.00	2004年7月	O-1942
火灾风险评估方法学	范维澄, 孙金华, 陆守香等	¥80.00	2004年6月	X-114
井孔中的声场和波	张海澜, 王秀明, 张碧星	¥42.00	2004年6月	O-1334
岩石力学	谢和平, 陈忠辉	¥54.00	2004年5月	O-1944
圆柱壳冲击动力学及耐撞性设计	杜星文, 宋宏伟	¥42.00	2004年5月	O-1931
现代声学理论基础	马大猷	¥48.00	2004年3月	O-1830
计算电磁学要论	盛新庆	¥32.00	2004年3月	O-1900
医用加速器	顾本广	¥110.00	2003年10月	R-1192
软 X 射线与极紫外辐射的原理和应用	张 杰	¥59.00	2003年9月	O-1682
应用力学对偶体系	钟万勰	¥42.00	2003年3月	O-1542
广义相对论和引力场理论	胡 宁	¥15.00	2003年3月	O-1157
激光的衍射及热作用计算	李俊昌	¥34.00	2003年3月	O-1553
高激发原子	詹明生	¥35.00	2003年2月	O-1683
粉末衍射法测定晶体结构	梁敬魁	¥68.00	2003年4月	O-1697

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书. 如果您有出版意向, 请和我们联系. 凡购书者均免邮费, 请按以下方式和我们联系:  
 电 话: 010-64017957 64033515      电子邮件: mlhukai@yahoo.com.cn 或 dpyan@cspg.net  
 通讯地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社      邮政编码: 100717      联系人: 胡凯 鄢德平  
 欢迎访问科学出版社网址 <http://www.sciencep.com>