

刘媛,张凤慧,赵宏宇,等. 组蛋白八聚体的装配及荧光标记检测体外组装核小体的效率[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):12-16.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.004

组蛋白八聚体的装配及荧光标记 检测体外组装核小体的效率

刘媛,张凤慧,赵宏宇,蔡禄

(内蒙古科技大学生命科学与技术学院,内蒙古包头 014010)

摘要:基于影响核小体定位的 DNA 序列 TA 10-bp 周期性和 R5Y5 序列模体,设计 6 条对组蛋白亲和性不同的 DNA 序列,将其克隆到重组质粒中,分别命名为 CS1~CS6。通过 PCR 扩增的方法,在引物上标记 Cy3 荧光信号分子,获得大量标有 Cy3 的目的序列;同时,从大肠杆菌中表达纯化出 H₂A、H₂B、H₃、H₄ 共 4 种组蛋白,经复性装配成组蛋白八聚体,利用盐透析法将目的 DNA 序列与组蛋白八聚体组装成核小体结构;经荧光信号检测,分析 6 条目的序列形成核小体的能力。结果发现,CS2、CS3 形成核小体的能力较强,该结果与 Trifonov EN 提出的核小体在该模体上的精确定位基本吻合,该试验方法的建立对核小体结构及相关表观遗传学领域的研究具有一定的意义。

关键词:核小体;组蛋白;荧光标记;序列模体;体外组装;定位

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0012-05

表观遗传是后基因组时代的研究热点,其中核小体定位是重要的研究领域之一。它在真核生物细胞转录调控、DNA 复制和修复等过程中扮演着至关重要的角色^[1]。科学家们经过大量的试验研究发现,在所有对核小体定位有影响的因素中,DNA 序列扮演着关键的角色^[2]。近年来,有大量关于核小体定位的理论分析和预测,但大多没有进行直接的试验验证。体内试验易受到很多因素的干扰,因而体外重组核小体试验技术是研究核小体定位的有效手段之一。

影响核小体定位的 DNA 序列因素有 TA 10-bp 周期性、polyA、各种序列模体等^[3]。其中以以色列科学家 Trifonov 建立了多个理论模型,分析了线虫、人类等模式生物核小体定位特

征,提出 RRRRRYYYYY 模体可能是一种具有强核小体定位信号的序列,其中 R 是嘌呤,Y 是嘧啶^[4-5]。本试验主要考虑了 TA 10-bp 周期性和 R5Y5 序列模体,构造了 6 条对蛋白亲和力和不同的 DNA 序列,标记为 CS1~CS6,构建重组质粒,经过 PCR 扩增得到大量 CS 序列。同时,试验从含有组蛋白重组基因质粒的大肠杆菌中表达纯化出 4 种组蛋白,装配形成组蛋白八聚体。在体外将 DNA 序列与组蛋白八聚体在一定条件下进行组装形成核小体结构,建立了一种基于荧光标记检测核小体体外组装的试验方法,为后续研究奠定了基础。

之前试验采用 Biotin 标记方法检测核小体组装效率较为繁琐,6 条序列组装后还须经过核小体电泳、转膜条件、紫外交联、封闭、加抗体、洗膜、加抗体、暗室曝片等步骤^[6]。由于检测的信号需要多步转换,才能间接地反映核小体组装效率,而且难以量化,以至于结果存在较大误差。本研究在此基础上对核小体检测方法做了改进,试验的 DNA 直接进行荧光标记,组装后进行聚丙烯酰胺电泳检测,放入荧光化学凝胶成像系统中成像,根据荧光的强弱即可直观地判断大概结果,后期

收稿日期:2016-03-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:61072129、11547150);内蒙古自然科学基金(编号:2013MS0514)。

作者简介:刘媛(1988—),女,内蒙古包头人,硕士,主要从事表观遗传学研究。E-mail:736745380@qq.com。

通信作者:蔡禄,博士,教授,主要从事分子生物学和生物信息学研究。E-mail:nmcailu@163.com。

[16] Sewalt V J H, Ni W, Blount J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of *L*-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(1): 41-50.

[17] Saslowsky D E, Warek U, Winkel B S. Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(25): 23735-23740.

[18] Williams P A, Cosme J, Sridhar V, et al. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(1): 121-131.

[19] Baek M H, Chung B Y, Kim J H, et al. cDNA cloning and expression pattern of cinnamate-4-hydroxylase in the Korean

black raspberry [J]. *BMB Reports*, 2008, 41(7): 529-536.

[20] Tuan P A, Park N I, Li X, et al. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 10911-10917.

[21] Ryan K G, Swinny E E, Markham K R, et al. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(1): 23-32.

[22] Liu W, Zhu D, Liu D, et al. Comparative metabolic activity related to flavonoid synthesis in leaves and flowers of *Chrysanthemum morifolium* in response to K deficiency [J]. *Plant and Soil*, 2010, 335(1/2): 325-337.

用专业软件读取数据就可计算得出组装率,从而使核小体定位的研究结果更加直观、简便、并且更精确可测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒 试验所用菌株为 *Escherichia coli* DH5 α ; 质粒采用含有 CS1 ~ CS6 的 pUC 19 重组质粒。

1.1.2 主要仪器与试剂 仪器: PCR 仪(2720 Thermal Cycler)、电泳仪(Bio - Rad)、台式多功能高速离心机(Eppendorf 5804R)、冷冻离心机(Eppendorf 5810R)、凝胶成像系统(Gene Genius)、紫外分光光度计(NanoDrop 1000)、层析柜(Thermo Revco)、荧光化学发光成像系统(Amersham Imager 600)。

试剂:酵母提取物、胰化蛋白胨购自英国 OXOID 公司,琼脂糖购自法国 BIOWEST 公司,NaCl、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自美国 Amresco 公司,胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,DNA 分子 maker、限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶购自日本 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的序列信息 试验所用的 6 条目的序列中 R 表示腺嘌呤(A)或者鸟嘌呤(G),Y 表示胸腺嘧啶(T)或者胞嘧啶(C)。在 6 条序列中,CS1 只具有 R5Y5 序列模体特征;CS4 ~ CS6 只具有 TA 10 - bp 周期性规律;而 CS2 ~ CS3 同时具备 R5Y5 模体和 TA 10 - bp 周期规律。目的序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,直接连接到 pUC19 多克隆位点中的 *Hind* III 和 *Eco*R I 之间。

具体碱基信息如下:

CS1:序列 1(RRRRR YYYYY)

CGGGAATTTCTCGGAGATTCTCGGAGGTTCTCTGAGAGGTCTTCGAAGGCTTTCAGGGATCCTTCAGAGGCTTCCAGAGGCTCTTGAGGGACCTTTGGGAATTTCCGAAGGTCCTTCA;

CS2:序列 2(RRRRR YYYYY)

TAGGAATTTCTTAGAGATTCTTAGAGGTTCTTAAGAGGTCTTTAAAGGCTTTTAGGGATCCTTTAGAGGCTTCTAGAGGCTCTTAAGGGACCTTTAGGAATTTCTAAAGGTCCTTTA;

CS3:序列 3(RRRRR YYYYY)

TAAGGATCCCTTAGAAATCCCTAGGAGTTCTTAGAGAGTTCCTAAAAGCTCTTAGAGATTCTCTAAGGGCTTTTAGGGACTTCTAGAAGACTTCTAAGAATTCCTTAAGAGTTCTTTA;

CS4:序列 4(RRYRR YYRYY)

TAGCAATTGCTTACTGATTGTTAGCGGTTGCTAATAGGTCGTTAACGGCTATTAGTGATCATTTAGTGCGCTAGCGGCTATTAATGGACCATTAGCAATTGCTAATGGTCATTTA;

CS5:序列 5(RRYR YYRYY)

TAGCTATTGATTAGTCATTGATAGCTGTTGATAATCGGTGATAACTGCTAGTAGTCATCAGTTAGTCGCTGATAGCTGCTAGTAATCGACCTAGCTATTGATAATCGTCAGTTA;

CS6:序列 6(RYRYY YYRYY)

TACGTATATATTATACATGCATATATGTCATACGCGGTGTATACATGCATGTACGCATGCGTTATACGCATATACATGCACTACGCGACATGTACGTATATATACACGTGCGTTA。

1.2.2 目的序列扩增纯化 根据重组质粒的碱基序列,在 CS 序列 2 端设计引物,对 CS1 ~ CS6 进行序列片段的扩增。

PCR 扩增反应体系:5.0 μ L 10 \times buffer,4.0 μ L dNTP,2.0 μ L 荧光引物,2.0 μ L CS - R,3.0 μ L Mg²⁺,0.3 μ L DNA,r*Taq* 0.3 μ L,ddH₂O 33.4 μ L。

PCR 扩增反应程序:94 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C,20 s,64 $^{\circ}$ C,20 s,72 $^{\circ}$ C,30 s,32 次循环;72 $^{\circ}$ C,10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增引物为上游引物:5' - ACGGCCAGTGAATT CGAGG - 3';下游引物:5' - GCCAAGCTTCTGAGATCGGAT - 3',其中,上游引物 5'端标记 Cy3 荧光分子。

配制 1.2% 琼脂糖凝胶分别对 CS1 ~ CS6 扩增的目的序列进行电泳检测,然后进行胶回收获取序列片段,胶回收采用生工生物工程(上海)股份有限公司的胶回收试剂盒。

1.2.3 组蛋白的表达纯化 分别将含有组蛋白 H₂A、H₂B、H₃、H₄ 基因重组质粒的单菌落接种于含有氨苄的 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 *D*_{600 nm} 值为 0.4 ~ 0.6 时加入 IPTG 进行诱导表达^[7]。收集诱导表达后的菌体,用 wash buffer 重悬,再超声破碎细菌至菌体完全破裂,离心获取沉淀。加入 wash buffer + Triton - X100 重悬沉淀,离心去上清后,利用 unfolding buffer 充分溶解,离心获取沉淀,测定沉淀浓度。其中 1 \times wash buffer 的成分为 50 mmol/L Tris - bash 6.057 00 g,100 mmol/L NaCl 5.840 00 g,1 mmol/L EDTA - Na₂ 0.372 00 g,1 mmol/L 苯甲胍(benzamidine)0.156 61 g;unfolding buffer 的成分为 7 mol/L 盐酸胍(guanidine hydrochloride)668.780 00 g,20 mmol/L Tris - base 2.422 80 g,10 mmol/L DTT 1.542 40 g。

1.2.4 组蛋白复性及八聚体装配 取 5 mg H₂A、H₂B、H₃、H₄ 加入透析袋中,置于 refolding buffer 中透析,4 $^{\circ}$ C 搅拌 12 h 后,再换 1 次透析液,4 $^{\circ}$ C 透析 24 h,将透析液取出,4 $^{\circ}$ C、1 300 r/min 离心 5 min,收集上清,再将样品浓缩至 500 μ L,过分子柱,收集片段。其中 refolding buffer 成分为 2 mol/L NaCl 233.760 0 g,10 mmol/L Tris - base 2.422 8 g,1 mmol/L EDTA - Na₂ 0.744 5 g,5 mmol/L β - 巯基乙醇 0.685 0 mL。

1.2.5 核小体组装及其检测 将纯化的组蛋白八聚体与目的序列以一定的比例加入到含有 2 mol/L 氯化钠的 TE 缓冲液中混匀,总体积 30 μ L,加入透析管中,放入含 2 mol/L 氯化钠的 TE 透析液中透 16 h,在此过程中用恒流泵将 TE 缓冲液匀速滴入透析液中,使其中氯化钠的浓度降到 0.6 mol/L;之后将透析管转入到不含氯化钠的 TE 缓冲液中透析 3 ~ 6 h。

组装核小体的试验体系见表 1,分别在组蛋白与 DNA 比例为 0.6、0.8、1.0 这 3 种条件下进行组装。组装后将样品的体积调整一致,分别用 EB 染色、考马斯亮蓝染色、Cy3 荧光信号检测的方法分析组装效率及检测手段的灵敏度。

表 1 为核小体组装成分及组装比例

DNA 比例	DNA 添加量 (μ L)	八聚体添加量 (μ L)	5 mol/L NaCl 添加量 (μ L)	TE 添加量 (μ L)
0.6	5.91	2.73	12.00	9.36
0.8	5.91	3.64	12.00	8.45
1.0	5.91	4.55	12.00	7.54

采用 GE 公司的 Amersham Imager 600 荧光凝胶成像仪检测拍照分析 EB 染色、考马斯亮蓝染色、Cy3 荧光信号结果。

核小体组装过程的吉布斯自由能变化采用文献[3]中的方法计算。

2 结果与分析

2.1 DNA 序列扩增及纯化

目的序列克隆到载体上后,为大量获得组装核小体的 DNA 序列,采用 PCR 的方法对目的序列进行扩增。扩增后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色结果见图 1。图 1 中 M 为 DL1000 DNA Ladder marker, CS1 ~ CS6 序列条带位置为 100 ~ 200 bp 之间,即得到电泳条带大小约为 150 bp,这与目的序列的长度 152 bp 基本一致,说明条带位置正确(图 1)。

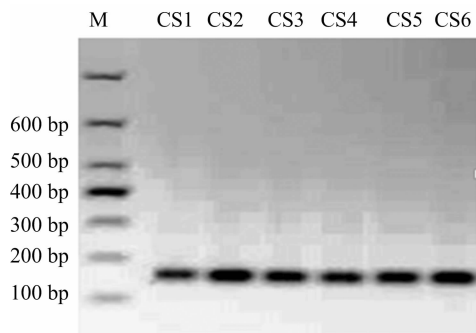


图1 目的 DNA 序列的 PCR 扩增检测

对 PCR 扩增产物进行胶回收,回收后的样品采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。由于 PCR 引物上标记有 Cy3 荧光分子,目的序列经扩增后在尾部同样带有荧光标记分子。用荧光化学发光凝胶成像系统拍像,结果如图 2 所示。图中 CS1 ~ CS6 为纯化后的序列,电泳条带与理论值基本一致,且没有任何的污染,纯度较高。

2.2 组蛋白的表达纯化

从大肠杆菌中表达 4 种重组组蛋白,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的结果见图 3。 H_2A 、 H_2B 的分子量约为 15 ku, H_3 的分子量约为 17 ku, H_4 的分子量约为 14 ku。纯化的组蛋白 H_2A 、 H_2B 、 H_3 、 H_4 条带位置正确,基本没有其他蛋白的

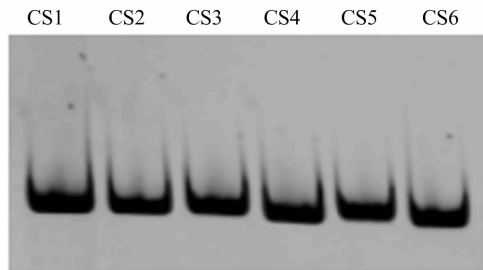


图2 荧光标记 DNA 序列的检测

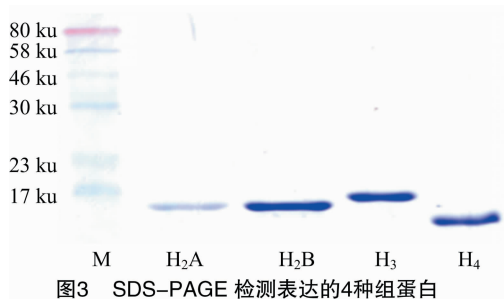


图3 SDS-PAGE 检测表达的4种组蛋白

条带存在,可用于后续试验。

2.3 组蛋白复性及八聚体装配

将 4 种组蛋白以等摩尔比例进行复性透析,装配成八聚体分子结构。在复性过程中,分子间可能会发生团聚,也可能形成四聚体结构。为进一步纯化试验需要的组蛋白八聚体分子,采用凝胶层析的方法对样品进行纯化,洗脱曲线如图 4 所示。出现 4 个洗脱峰,其中第 1 个洗脱峰为大的团聚物,中间峰为组蛋白八聚体,最后 1 个峰为四聚体。将中间洗脱峰对应的样品用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果见图 5。从图 5 中可以看出,每个泳道中均呈现出 3 条条带,其中最上的条带为 H_3 分子,中间为 H_2A 和 H_2B 的混合物,最下的条带为 H_4 分子,条带的亮度与位置均符合理论预期结果。每个样品中都没有检测到杂蛋白的污染,纯度较高,可用于后续核小体体外组装试验。

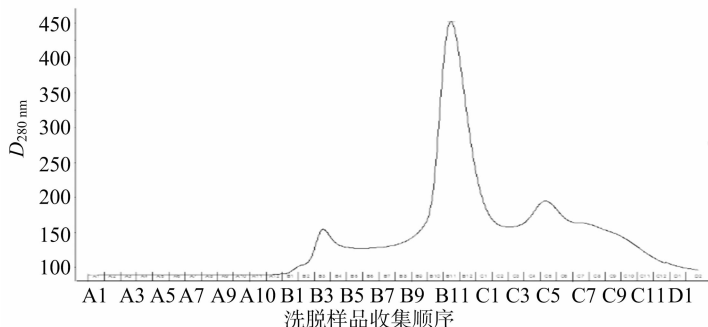


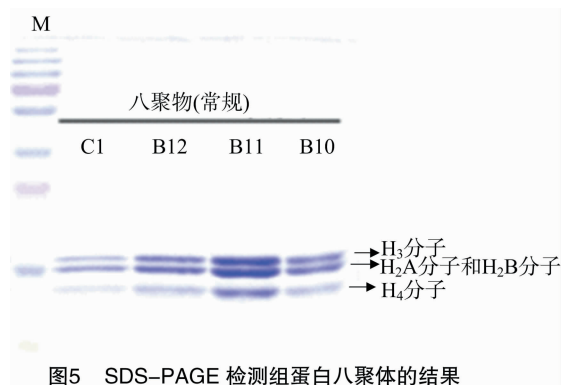
图4 凝胶层析纯化组蛋白八聚体装配的结果

2.4 核小体组装及检测

为摸索组蛋白与目的 DNA 在不同比例条件下形成核小体的能力,分别采用 0.6、0.8、1.0 这 3 个不同的组蛋白与 DNA 序列的质量比进行组装核小体。

组装核小体后,首先采用 EB 染色和 Cy3 荧光标记检测手段分析样品。图 6 - A 是检测荧光信号的结果,3 个不同比例下,电泳中均呈现 2 条条带,其中下面的条带是没有形成核

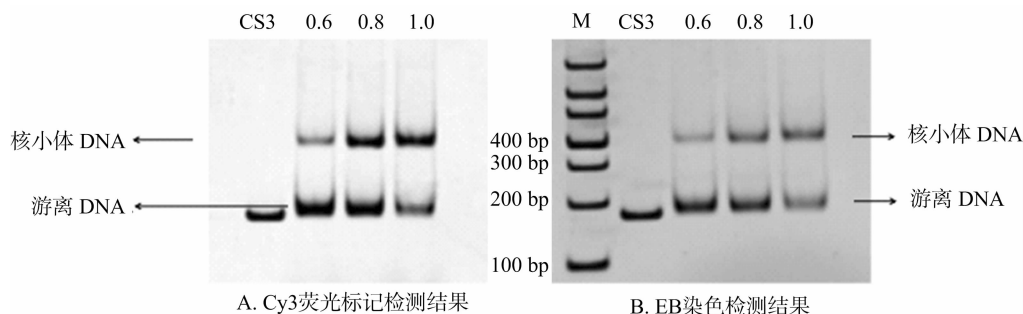
小体的游离 DNA,上面的条带是形成核小体的 DNA。将同一个凝胶电泳用 EB 染色检测的结果见图 6 - B,与荧光检测结果对应的位置都检测到了条带,但是 EB 染色的条带没有荧光信号检测的条带亮度高,说明 EB 染色的方法没有 Cy3 荧光标记检测手段灵敏。同时,从 EB 染色结果可以看出条带的大致位置,游离 DNA 的条带在 100 ~ 200 bp 之间,而核小体 DNA 由于组蛋白的存在,位于 400 bp 左右。3 个不同比例



下形成核小体的效率有所差异,随着组蛋白比例越大,形成的核小体条带越深。游离的 DNA 条带越浅,说明组装的核小体越多。用荧光标记检测出来的结果条带清晰、灵敏,用 EB 染色后图片中显示出来的并不灵敏,组蛋白的结合在一定程度上影响了 EB 的染色效果,所以一般采用荧光标记来检测。

为进一步从组蛋白的角度检测组装的核小体,分别采用荧光标记检测和考马斯亮蓝染色检测体外组装核小体的结果,图 7-A 所示是 Cy3 荧光标记检测的结果,对凝胶进行考马斯亮蓝染色后,在核小体对应条带位置也呈现出蛋白条带(图 7-B),说明组蛋白与 DNA 有效地装配成了核小体。

试验以 CS3 序列为组装核小体的试验 DNA 模板,进行 3



M—DL1000 DNA maker; CS3—没有组装核小体的试验对照序列。图 7、图 8 同

图 6 体外组装核小体样品的检测结果

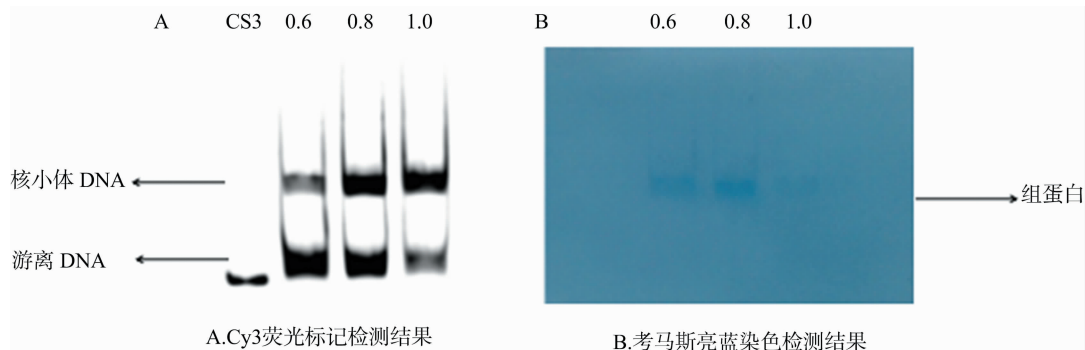


图 7 荧光标记与考马斯亮蓝检测体外组装核小体样品

个不同比例的组装条件摸索,均有效地形成了核小体结构。在后续对多条序列同时进行组装核小体时,考虑到多条 DNA 序列对组蛋白亲和性的差异,选择在组蛋白与 DNA 比例为 0.8 的条件下进行组装试验,使得形成的核小体既不过饱和,同时又能体现出各条序列组装核小体的差异。

2.5 6 条 CS 序列组装核小体效率的对比

为进一步对比 6 条 CS 序列组装核小体效率的差异,在同样的试验条件下,同时组装核小体结构,Cy3 荧光信号检测结果见图 8。从图 8 中可以看出,6 条序列的泳道中均出现 2 条条带,分别是核小体 DNA 和游离 DNA,表明均能有效地形成核小体。但是每一条序列的核小体 DNA 和游离 DNA 相对亮度不同,例如,CS2、CS3 泳道中核小体 DNA 条带相对较亮,而 CS1、CS6 泳道中核小体 DNA 条带相对较弱,说明它们形成核小体的能力存在差异。

利用凝胶成像定量分析软件 Image Quant TL,将泳道中的条带分别量化处理,读取相对数值,计算 6 条序列组装核小体过程中吉布斯自由能的变化,进而评价各条序列对组蛋

白的亲和性。定义未形成核小体的自由 DNA 为 V_d ,形成核小体的 DNA 为 V_n ,则反应过程的表现平衡常数 $K_{eq} = V_n/V_d$,吉布斯自由能变化 $\Delta G^0 = -RT \ln(K_{eq})$,以 CS1 为对照序列,相对吉布斯自由能变化 $\Delta \Delta G^0 = \Delta G_{\text{样本}}^0 - \Delta G_{\text{对照}}^0$ [8-9]。

组装核小体过程的吉布斯自由能计算结果见表 2。CS2 和 CS3 的相对吉布斯自由能最小,说明这 2 条序列对组蛋白的亲和性最大,在同等条件下,越易形成核小体 [8-9]。

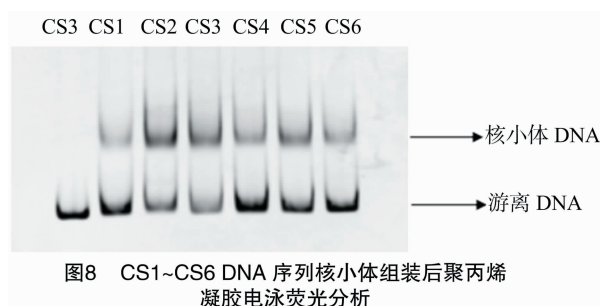


表 2 组装核小体过程的吉布斯自由能

序列	V_N	V_D	V_N/V_D	ΔG^0	$\Delta\Delta G^0$
CS1	196.49	902.25	0.217 778	3 510.384	0.000 0
CS2	891.36	571.41	1.559 931	-1 024.000	-4 534.380 0
CS3	679.20	499.64	1.359 379	-707.078	-4 217.460 0
CS4	255.44	1 087.20	0.234 952	3 335.572	-174.812 0
CS5	440.97	726.06	0.607 347	1 148.393	-2 361.990 0
CS6	166.83	863.54	0.193 193	3 786.245	275.861 3

3 结论与讨论

体外组装核小体是研究核小体定位及染色质结构相关领域常用的一种技术手段。目前主要通过 2 种策略有效地组装核小体,一种是利用如 NAP 或 ACF 等染色质重塑因子的作用,使 DNA 序列缠绕到组蛋白上,该过程需要消耗能量^[10]。另一种是本试验中使用的,由于组装过程中不需要其他蛋白因子的参与,仅依赖盐浓度的变化驱动核小体的装配,所以组装核小体的效率只与 DNA 序列的特征有关,在研究 DNA 序列影响核小体定位时,该方法具有较大的优势^[11]。

体外组装核小体结构后,如何灵敏地检测核小体形成效率是一个关键问题。其中最为便利的检测手段是 EB 染色方法,但是 EB 染色的灵敏度较低,对于核小体组装能力差的 DNA 序列,会导致较大的误差。同位素标记是灵敏度非常高的一种检测手段,但是在组装核小体的试验中,由于需要大量的摸索条件,需要一次性制备大量的 DNA 序列,从摸索组装核小体的比例等条件到多条序列组装核小体能力的相互对比,往往试验周期较长,而同位素的半衰期又较短,这就限制了试验的进度,且同位素标记试验需要在专业的实验室才能完成^[12]。另一种检测手段是笔者所在课题组前期使用的生物素标记方法,将组装核小体的 DNA 序列标记生物素分子后,检测时需要转膜、抗体识别、底物反应、曝光胶片等步骤,较为繁琐的试验步骤容易放大误差^[6]。本试验采用荧光分子 Cy3 标记在 PCR 引物的 5'端,在序列准备时,非常方便地获得大量标记 Cy3 的目的 DNA 序列,组装核小体的样品经电泳后,直接在荧光凝胶成像仪中激发荧光信号成像,既灵敏又简洁方便,同时克服了上面几种方法的缺点。

试验中设计的 6 条序列,CS2、CS3 同时具有 TA 10 - bp 周期和 R5Y5 模体规律,而 CS1 没有 TA 10 bp 规律,CS4 ~ CS6 没有 R5Y5 模体规律,理论上讲,CS2、CS3 对组蛋白的亲性和性最高,同样条件下组装核小体的效率最大。经过组装核小体的试验结果分析,电泳的结果显示 CS2、CS3 形成核小体相对较多。吉布斯自由能的结果发现,CS2 和 CS3 序列形成核小体过程中吉布斯自由能最小,说明这 2 条序列更加倾向于核小体的形成,验证了笔者设计序列的理论基本是正确的。

总之,本研究利用盐透析方法,建立了 1 套体外组装核小

体的试验体系,发展了一种荧光标记检测核小体组装效率的手段。该方法可灵敏、便利且量化地分析不同 DNA 序列核小体的效率。该方法的建立对核小体定位及染色质结构相关领域的研究具有重要的意义。

参考文献:

[1]刘 辉,壮子恒,关估红,等. 核小体定位的转录调控功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2012,39(9):843 - 852.

[2]蔡 禄,赵秀娟. 核小体定位研究进展[J]. 生物物理学报,2009,25(6):385 - 395.

[3]王成爱,赵宏宇,邢永强,等. 酿酒酵母核小体定位理论模型的体外实验验证[J]. 生命科学研究,2014,18(1):21 - 27.

[4]Trifonov E N. Base pair stacking in nucleosome DNA and bendability sequence pattern[J]. Journal of Theoretical Biology,2010,263(3):337 - 339.

[5]Trifonov E N,Nibhani R. Review fifteen years of search for strong nucleosomes[J]. Biopolymers,2015,103(8):432 - 437.

[6]赵宏宇,柴 荣,王成爱,等. 盐透析体外组装核小体及检测方法[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2014,42(1):133 - 136.

[7]柴 荣,赵宏宇,蔡 禄. 与人遗传病相关的 DNA 重复序列的体外核小体定位特性[J]. 基础医学与临床,2013,33(3):314 - 319.

[8]Volle C B,Delaney S. CAG/CTG repeats alter the affinity for the histone core and the positioning of DNA in the nucleosome[J]. Biochemistry,2012,51(49):9814 - 9825.

[9]Travers A,Hiriart E,Churcher M,et al. The DNA sequence - dependence of nucleosome positioning *in vivo* and *in vitro*[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics,2010,27(6):713 - 724.

[10]Gemmen G J,Sim R,Hausalter K A,et al. Forced unraveling of nucleosomes assembled on heterogeneous DNA using core histones, NAP - 1, and ACF[J]. Journal of Molecular Biology,2005,351(1):89 - 99.

[11]Korber P. Active nucleosome positioning beyond intrinsic biophysics is revealed by *in vitro* reconstitution[J]. Biochemical Society Transactions,2012,40(2):377 - 382.

[12]蔡 禄,赵秀娟,刘国庆,等. 表观遗传学前沿[M]. 北京:清华大学出版社,2012:191 - 192.