

· 论著 ·

内毒素诱导性基因启动子结合蛋白的 筛选新方法及其应用

王娟 刘志锋 徐佳 杨莉 李志杰 邓鹏 姜勇

【摘要】 目的 建立研究 DNA-蛋白质相互作用的新方法。方法 选择 6 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,模型组经尾静脉注射脂多糖(LPS)25 mg/kg,使平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)造成内毒素休克,然后迅速处死,正常对照组同期处死,取肝脏组织。利用生物素-链亲和素系统结合磁珠分离技术筛选内毒素诱导基因(LIG)启动子的结合蛋白。用聚合酶链反应(PCR)扩增末端带生物素标记的 LIG 启动子探针,提取动物肝脏组织核蛋白,与制备的 LIG 启动子探针进行孵育,再以标记有链亲和素的磁珠分离 LIG 启动子-蛋白反应复合物,使用不同浓度 NaCl 洗脱结合的蛋白,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离样品蛋白,并对凝胶进行银染显色,比较模型组与正常对照组的差异条带。结果 两组细胞核蛋白中共观察到 15 条差异条带。分析差异条带显示,与正常对照组比较,在低亲和力和作用水平,LPS 作用后有 4 个蛋白开始与 LIG 启动子作用力增强,而有 1 个蛋白则同启动子的相互作用减弱;在 DNA-蛋白质高亲和力和作用水平,则有 9 个蛋白因 LPS 刺激而同 DNA 的结合力增强,有 1 个蛋白同启动子的相互作用消失。结论 成功建立了生物素-链亲和素结合磁珠分离技术的新方法,为研究 DNA-蛋白质相互作用开拓了新思路,并从“转录调控组学”角度深入理解基因表达调控机制奠定了基础。

【关键词】 DNA-蛋白质相互作用; 启动子; 生物素-链亲和素; 基因表达调控

A new method for screening binding proteins that interact with the promoter of lipopolysaccharide inducible genes and its application WANG Juan, LIU Zhi-feng, XU Jia, YANG Li, LI Zhi-jie, DENG Peng, JIANG Yong. Department of Pathophysiology and Key Laboratory of Functional Proteomics of Guangdong, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China
Corresponding author: JIANG Yong (Email: yjiang@fimmu.com)

【Abstract】 Objective To establish a new method for the study of DNA-protein interaction. **Methods** Six SPF BALB/c mice were divided into two groups, the lipopolysaccharide (LPS)-treated group ($n=3$) and the normal control group ($n=3$). The LPS-treated mice were subjected to tail vein-injection of LPS (25 mg/kg) to reproduce an endotoxemic shock model. The biotin-labeled DNA probe for the LPS inducible gene (LIG) promoter was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The cell nuclear extracts from liver of mice were prepared and mixed together. DNA pull-down assays were performed by using magnetic beads conjugated with streptavidin. Proteins binding on the beads were eluted by salts with different concentrations. The samples were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and displayed by silver-stain to compare differential bands between two groups. **Results** Fifteen proteins in the nuclear extracts were found to be different between the mice of two groups. Analysis of the differential bands of SDS-PAGE displayed that, compared with normal control group, there were four proteins increased and one protein declined in the mice treated with LPS when eluted with low salt. While under the condition of high affinity elution, there were nine proteins increased and one disappeared after LPS treatment. **Conclusion** In this study, a novel method was set up by combining the biotin-streptavidin system and magnetic beads isolation technique, providing a new way to study DNA-protein interaction. This strategy is helpful for further understanding the regulation of gene expression with a view of "omics".

【Key words】 DNA-protein interaction; promoter; biotin-streptavidin; gene expression regulation

随着人类基因组测序工作的基本完成,功能基

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)基金资助项目(2002CB513005);国家自然科学基金资助项目(30670828,30572151);广东省科技计划基金资助项目(A1090202)

作者单位:510515 广州,南方医科大学病理生理学教研室,广东省蛋白质组学重点实验室

通讯作者:姜勇,Email:yjiang@fimmu.com

作者简介:王娟(1982-),女(汉族),山西人,硕士研究生。

因组学研究更显重要,而基因表达调控是功能基因组学的一个重要研究领域^[1]。事实上,基因表达调控是细胞对外部或内部刺激发生应答的方式,涉及基因组 DNA 和一系列结合蛋白的相互作用。不同生理条件下特异性的基因转录调控依赖于不同的反式作用因子与顺式作用原件的特异性结合。因此,深入研究基因表达调控的分子机制,必须要研究 DNA-

蛋白质的相互作用,即需要明确哪些转录因子与哪些基因的转录调控区域发生了特异性结合^[2-3],建立有效的研究方法可以大大促进该领域的研究。本研究建立了生物素-链亲和素系统结合生物质谱技术,进行启动子结合蛋白的筛选鉴定,取得了满意的效果。本研究拟以内毒素诱导基因(LIG)启动子结合蛋白的研究来阐明此方法,并对其优势进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料:含有 LIG 启动子序列的质粒由本实验室保存;SPF 级 BALB/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心;Blend Taq DNA 多聚酶购自日本 TOYOBO 公司;鲑鱼精 DNA 和琼脂糖均购自美国 Sigma 公司;引物由日本 TaKaRa 公司合成;质粒 DNA 提取纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自安徽 U-gene 公司;考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒购自德国 Merck 公司;Dynabeads Kilobase Bindertm 试剂盒购自挪威 Dynal 公司。

1.2 内毒素休克模型的制备:用乌拉坦(6 ml/kg)腹腔注射麻醉 6 只小鼠后,固定并分离右侧颈总动脉。经右侧颈总动脉插入直径 60 mm 的 PE50 聚乙烯管,并与压力传感器和 4 道生理记录仪连接,稳定 30 min 后记录小鼠正常平均动脉压(MAP),并经尾静脉注射脂多糖(LPS)25 mg/kg,监测血压降至约 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)时迅速处死大鼠;正常对照组小鼠尾静脉注射等量磷酸盐缓冲液(PBS),与模型组同时时间点放血处死。处死后迅速取出肝脏组织,用冰 PBS 漂洗,置液氮中保存备用。

1.3 肝组织胞核蛋白提取及蛋白定量:将组织块称重后置液氮中研磨、匀浆、离心,取上清液即为胞浆蛋白;将胞核沉淀用匀浆缓冲液洗涤、离心,收集沉淀。将沉淀用核提取缓冲液涡旋振荡重悬沉淀,冰上摇动,离心取上清液即为核提取物。再用 PBS 透析过夜,4℃ 高速离心,-80℃ 保存备用。取上清液用考马斯亮蓝法定量蛋白浓度。分别取蛋白标准品(2 g/L)200、150、100、50 和 25 μl,依次用 200、250、300、350 和 375 μl 的 1×PBS 稀释至终体积 400 μl。各取 10 μl 加到 96 孔板的标准品中,取 10 μl 1×PBS 作为空白对照,加 200 μl 考马斯亮蓝蛋白定量试剂,混匀后室温放置 5 min。用 HTSE7000 多孔阅读器测定 595 nm 波长下的吸光度(A)值。每组设 2 个复孔,最后取平均值,各值减去空白对照值后制作标准曲线,同时给出直线线性回归方程式,按标准曲线公式计算出样品中的蛋白浓度。

1.4 末端带生物素标记 LIG 启动子探针的扩增及

制备:分别设计 LIG 启动子上下游引物,并在其 5' 末端标记生物素。聚合酶链反应(PCR)反应条件为:94℃、30 s,57℃、30 s,72℃、2 min,35 个循环。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,按 U-Gene 凝胶回收试剂盒操作要求回收目的条带,用 DNA 定量仪对产物进行定量,-20℃ 保存备用。每组取 20 μl Dynal 磁珠置于 50 μl 结合缓冲液中(按试剂盒说明书操作)洗涤 2 次后,重悬于 50 μl 结合缓冲液,加 10 pmol 带生物素的 LIG 启动子片段,室温下轻柔摇动 3 h,用 50 μl 洗涤缓冲液洗磁珠 2 次,重悬于 PBS 中备用。用 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.2)及体积分数为 95% 的甲酰胺,在 90℃ 条件下孵育 2 min,洗脱磁珠上结合的探针,用质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测磁珠结合的探针量。

1.5 DNA 下拉分析(DNA pull-down)实验:取每组鼠透析后的胞核蛋白提取物 0.5 mg,分别加入 5 μl 鲑鱼精 DNA(10 g/L),室温下轻摇 15 min,在转子中加入上述磁珠-探针混合物,置于室温转动 30 min,去上清液;用 50 μl 1×PBS 洗磁珠 2 次,再分别用 20 μl 0.25 mol/L NaCl 和 1 mol/L NaCl 洗脱磁珠上结合的蛋白,洗脱液用质量分数 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.6 SDS-PAGE 的银染:将凝胶按 EMBL 标准方法进行银染,用 Na₂S₂O₃ 溶液致敏,ddH₂O 洗涤,AgNO₃ 溶液室温孵育,再用 ddH₂O 洗涤,加甲醛、Na₂CO₃ 溶液显色,乙酸溶液终止反应并保存凝胶。观察正常对照组与模型组间的差异条带。

2 结果

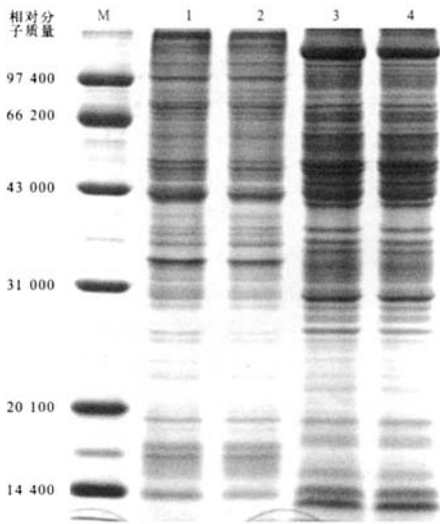
2.1 肝组织的核质分离(图 1):提取模型小鼠和正常对照小鼠肝脏组织胞质和胞核提取物,经 1×PBS 透析浓缩后行 SDS-PAGE,可见胞质与胞核的带型明显不同。

2.2 蛋白定量(图 2):用蛋白标准品按考马斯亮蓝法制备蛋白定量标准曲线,得方程 $Y=0.3212X+0.075$ 。定量各组蛋白浓度约为 3.0 g/L。

2.3 末端带生物素标记 LIG 启动子探针的扩增(图 3):1% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,可见一约 2 000 bp 大小的特异性条带,与预期大小一致。

2.4 DNA pull-down 结果

2.4.1 磁珠结合探针量的琼脂糖凝胶电泳检测(图 4):在磁珠洗脱液中 2 000 bp 左右处可见一明亮条带,并且根据结合前后反应液中的探针量发现,磁珠结合的探针量已达到饱和,而 95% 甲酰胺溶液可将结合在磁珠上的探针几乎完全洗脱。



M: 蛋白质 Marker; 1、3: 正常对照组肝细胞核、细胞质提取物; 2、4: 模型组肝细胞核、细胞质提取物

图 1 各组小鼠肝脏组织核质分离的 SDS-PAGE

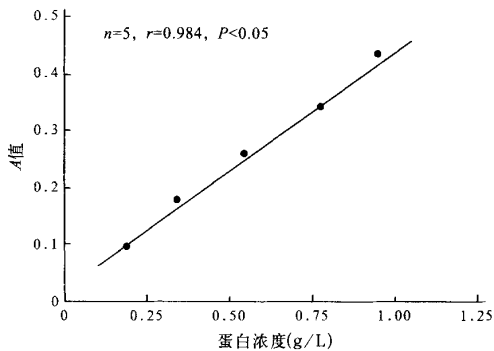
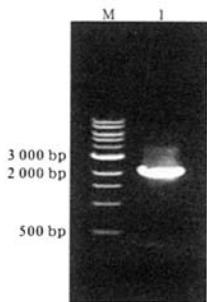


图 2 考马斯亮蓝法测定小鼠肝组织蛋白定量标准曲线

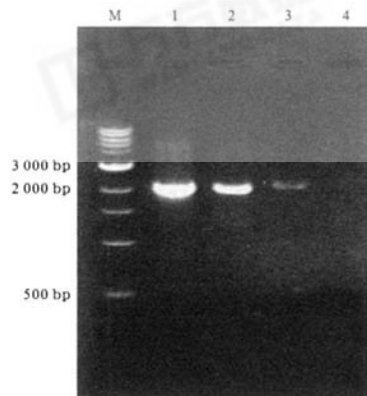


M: 1 kb DNA Marker; 1: LIG 启动子

图 3 末端生物素标记的 LIG 启动子全长探针的 PCR 扩增

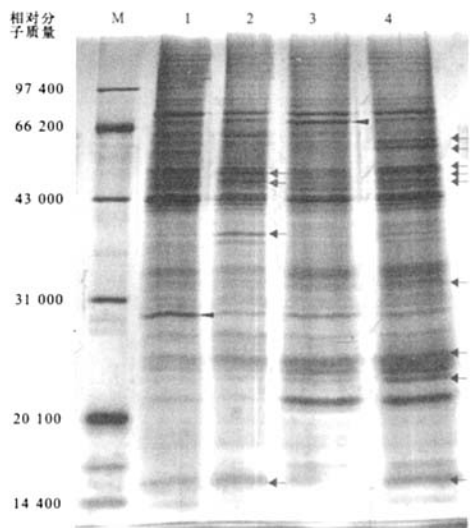
2.4.2 胞核蛋白和 LIG 启动子结合蛋白的 SDS-PAGE 分析(图 5):分析差异条带结果可见,低浓度 NaCl 洗脱时,可洗脱出同 DNA 亲和力弱的蛋白,在模型组和正常对照组共可见 5 条差异条带;高浓度

NaCl 洗脱高亲和力蛋白时可见 10 条差异条带。与正常对照组比较,在低亲和力作用水平,LPS 作用后有 4 个蛋白开始与 LIG 启动子作用力增强,而有 1 个蛋白则同启动子的相互作用减弱;在 DNA-蛋白高亲和力作用水平,则有 9 个蛋白因 LPS 刺激而同 DNA 的结合力增强,有 1 个蛋白同启动子的相互作用减弱。



M: 1 kb DNA Marker; 1: 从磁珠上洗脱的 LIG 启动子探针; 2: 结合反应前的 LIG 启动子探针; 3: 结合反应后的 LIG 启动子探针; 4: 洗脱后的磁珠

图 4 磁珠结合探针量的检测



M: 蛋白质 Marker; 1: 用 0.25 mol/L NaCl 洗脱的正常肝细胞核中与 LIG 启动子相结合的蛋白; 2: 用 0.25 mol/L NaCl 洗脱的 LPS 刺激肝细胞核中与 LIG 启动子相结合的蛋白; 3: 用 1 mol/L NaCl 洗脱的正常肝细胞核中与 LIG 启动子相结合的蛋白; 4: 用 1 mol/L NaCl 洗脱的 LPS 刺激肝细胞核中与 LIG 启动子相结合的蛋白; 箭表示 LPS 刺激后同 LIG 启动子结合增加的条带,箭头表示 LPS 刺激后减弱或消失的条带

图 5 胞核蛋白与 LIG 启动子结合蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 讨论

目前对启动子 DNA 结合蛋白的研究方法可分为两大类。第一类是细胞内方法,以已知的启动子 DNA 序列筛选与其相结合的蛋白编码基因,通过生物信息学分析来确定该蛋白质的名称。由于是细胞内筛选,因此这类方法更符合生理状态,且操作简便,适合高通量筛选用于寻找未知基因及蛋白质。但此类方法也存在两种缺陷:一是只能筛选可与启动子 DNA 特异性结合的蛋白,但不能检查出精确的蛋白质结合位点;二是特异性需要进一步验证。这类方法包括酵母单杂交技术、噬菌体表面展示技术等。第二类是细胞外法,即在体外用重组的已知蛋白质与启动子 DNA 结合。该法特异性好,并且能够在启动子 DNA 序列上找到精确的蛋白质结合位点。这类方法包括凝胶阻滞实验、DNase 足迹试验等^[4-5]。但这种方法效率低、操作复杂,一般不用于寻找未知基因及蛋白质。我们在现有方法的基础上,将两种方法结合应用,以期达到既能找到未知调控蛋白、又能够找到该蛋白精确结合位点,以及证实二者结合特异性的目的。为此我们将生物素-链亲和素系统和磁珠分离技术和生物质谱技术引入到启动子结合蛋白的筛选鉴定研究中。

生物素-链亲和素系统是近几年来应用广泛的一门生物学技术,二者以超强的非共价键特异性结合,且这种结合高度稳定;二者都可以耦联蛋白质、核酸、糖和酶等生物活性物质,一个蛋白质(或核酸等)分子上可结合多个生物素分子,而一个亲和素又可结合 4 个生物素,因而两者的结合具有多级放大作用^[6]。磁珠分离技术具有重复性好、结合效率高、操作方便等优点,这些特性使得这一系统在鉴定 DNA-蛋白质相互作用方面表现出特有的优势。同时,生物质谱技术的应用及其与生化手段的有效结合,为鉴定参与 DNA-蛋白质相互作用提供了无可比拟的强大手段^[7-8]。

这种策略较传统的研究方法具有很多的优点:

①对拟研究的传导对象不作任何假设,可以同时鉴定同一因子引发多种细胞内事件中与基因启动子产生相互作用的蛋白质。因此,这种研究方法不存在偏倚,有利于我们发现可能参与基因转录调控的新蛋白或者新的调控关系。②应用 DNA-蛋白质相互作用技术缩小了研究范围,锁定被研究组织中与基因启动子结合的蛋白群,再用质谱鉴定,大大提高了研究效率。③实验操作简便,传统方法对上述转录调节

分子的鉴定通常需要不同实验室历经十余年的时间方能鉴定出来。

目前关于基因表达调控的研究大都是在特定类型的动物细胞或细胞株的水平来开展的,不能准确反映机体各组织器官整体水平的表现,基于上述这些因素,我们结合生物素-链亲和素系统和磁珠分离技术,在内毒素休克小鼠的肝组织中,根据 DNA-蛋白质相互作用的原理,成功筛选到了 LIG 启动子区的结合蛋白^[9]。结果显示低浓度 NaCl 洗脱时可洗脱出同 DNA 亲和力弱的蛋白,在模型组和正常对照组共可见 5 条差异条带;高浓度 NaCl 洗脱时,高亲和力蛋白可见 10 条差异条带,而且多次重复实验均能得到相同的结果。质谱鉴定出各作用蛋白后,进一步研究鉴定的转录调控蛋白对启动子的调节作用、二者的作用位点及其相关的信号转导通路^[10],形成由下至上的研究模式,为从“转录调控组学”的角度分析基因表达的信号调控过程及其机制奠定了基础^[11]。

参考文献

- [1] 郭晓强,郭争亮. 真核生物转录机理的结构基础[J]. 生物学通报, 2006, 41(11): 60-61.
- [2] 徐佳,刘志锋,姜勇. 高迁移率族蛋白与真核基因表达调控[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(5): 397-402.
- [3] Brivanlou A H, Darnell J E Jr. Signal transduction and the control of gene expression[J]. Science, 2002, 295(5556): 813-818.
- [4] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1322-1341.
- [5] Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(2): e3.
- [6] 张晓春,陆燕蓉. 生物素-亲和素技术的研究进展[J]. 现代预防医学, 2001, 28(4): 485-486, 494.
- [7] Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry[J]. Nature, 2002, 415(6868): 180-183.
- [8] Nordhoff E, Kroqsdam A M, Jorgensen H F, et al. Rapid identification of DNA-binding proteins by mass spectrometry[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(9): 884-888.
- [9] 郭爱华,姜勇. 从全身炎症反应综合征到脓毒性休克[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8): 500-503.
- [10] 刘靖华,孙学刚,李志杰,等. 人 Toll 样受体 4 胞浆内段融合蛋白表达载体的构建与表达[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 163-166.
- [11] Bruce A, Dennis B, Julian L, et al. Molecular biology of the cell[M]. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing, 1994: 688-701.

(收稿日期: 2007-03-06 修回日期: 2007-10-28)

(本文编辑: 李银平)