

启动子DNA结合蛋白研究策略

巨立中, 成 军, 钟彦伟

巨立中, 成军, 钟彦伟, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

巨立中, 成军, 钟彦伟. 启动子DNA结合蛋白研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12(1):141-142

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/141.asp>

0 引言

新基因新蛋白质的发现和鉴定, 以及他们之间相互作用的研究, 赋予分子生物学以永不衰竭的生命力. 启动子DNA结合蛋白的研究是从转录水平上研究基因表达的调节, 以寻找新的蛋白质为手段, 以了解其对转录调节作用为目的. 为阐明某些疾病的发病机制及基因治疗打下基础^[1]. 现就启动子DNA结合蛋白研究策略综述如下.

1 启动子的结构及启动子DNA结合蛋白研究策略

启动子是一段位于结构基因5' - 端上游区的DNA序列, 能活化RNA聚合酶, 使之与模板DNA准确地结合, 并具有转录起始的特异性. 基因的特异性转录取决于酶与启动子能否有效地形成二元复合物. 启动子分三类: 启动子I、启动子II、启动子III. 只有启动子II指导mRNA的转录. 真核生物启动子II由两大部分组成: 上游元件(upstream element)和启动子核心(core promoter). 上游元件与转录的效率有关; 启动子核心包括3部分: TATA盒、起始子(initiator)及下游元件(downstream element). TATA盒为转录调控因子包括各种调节蛋白的结合区, 与转录起始位点的精确选择及转录有关, 起始子是转录起始所必须, 下游元件作用尚不清楚. 原核生物启动子区范围较小, 包括TATAAT区(Pribnow区)及其上游的TTGACA区^[2, 3].

基因转录实际上是RNA聚合酶, 转录调控因子和启动子区各种调控元件相互作用的结果. 启动子DNA结合蛋白作为转录调控因子通过与启动子DNA结合以调节基因转录. 犹如抗原-抗体特异性结合一样, 蛋白质与DNA的结合也是特异的, 这是研究启动子DNA结合蛋白的前提. 对启动子DNA结合蛋白的研究方法可分为2大类, 第1类是细胞内方法, 以已知启动子DNA序列筛选出与其相结合的蛋白编码基因, 通过生物信息分析来确定该蛋白质的名称, 由于是细胞内筛选, 因此更符合生理状态, 且操作简便, 适合高通量筛选, 用于寻找未知基因及蛋白质. 不足之处有二, 一是只能筛选可与启动子DNA特异性结合的蛋白质(如为筛选蛋白质这

已足够了), 但不能检查出精确的蛋白质结合位点. 二是特异性有时略差. 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, 且能够在启动子DNA序列上找到精确的蛋白质结合位点, 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, 这类方法包括凝胶阻滞试验(gel retardation assay), DNase I足迹试验(DNase I Foot-printing assay)等. 研究者可根据研究目的选用其中一种或二者结合, 以达到既找到未知基因及蛋白质, 又能够找到该蛋白质的精确的结合位点及证实二者结合的特异性.

2 研究方法

2.1 酵母单杂交技术 酵母单杂技术是1993年由Li et al^[4, 5]从酵母双杂交技术发展而来的, 其基本原理为: 真核生物基因的转录起始需转录因子参与, 转录因子通常由一个DNA特异性结合功能域和一个或多个其他调控蛋白相互作用的激活功能域组成, 即DNA结合结构域(DNA-binding domain, BD)和转录激活结构域(activation domain, AD). 用于酵母单杂交系统的酵母GAL4蛋白是一种典型的转录因子, GAL4的DNA结合结构域靠近羧基端, 含有几个锌指结构, 可激活酵母半乳糖苷酶的上游激活位点(UAS), 而转录激活结构域可与RNA聚合酶或转录因子TFIID相互作用, 提高RNA聚合酶的活性. 在这一过程中, DNA结合结构域和转录激活结构域可完全独立地发挥作用. 据此, 我们可将GAL4的DNA结合结构域置换为文库蛋白编码基因, 只要其表达的蛋白能与目的基因相互作用, 同样可通过转录激活结构域激活RNA聚合酶, 启动下游报告基因的转录. 其基本操作过程为: (1)设计含目的基因(称为诱饵)和下游报告基因的质粒并将其转入酵母中; (2)将文库蛋白的编码基因片段与GAL4转录激活域融合表达的cDNA文库质粒转化入同一酵母中; (3)若文库蛋白与目的基因相互作用, 可通过报告基因的表达将文库蛋白的编码基因筛选出来. 在这里作为诱饵的目的基因就是启动子DNA片段, 文库基因所编码的蛋白就是启动子基因结合蛋白. 酵母单杂交技术广泛用于DNA与蛋白相互作用的研究^[6, 7], 洪源 et al 应用该技术成功筛选出乙型肝炎病毒表面抗原启动子SP I的结合蛋白^[8].

2.2 噬菌体展示技术 噬菌体属于单链DNA病毒^[9], 其DNA长约7 000bp, 基因组编码11种蛋白质, 其中5种为结构蛋白, 与噬菌体展示技术相关的是结构蛋白p III和p VIII, p VIII前体由73个氨基酸残基组成, 其中信号肽为23个残基, 根据构成外壳的功能可分四个区, 6-24氨基酸残基区域占据噬菌体表面的大部, 25-35氨基酸残基区域具有高度疏水性, C端与DNA相结合, 构成完整的内壁, N端为可活动的、外露在噬菌体表面的肽段, 是插入外源基因的最佳位置. p III前体由424个氨

基酸残基组成,位于噬菌体的尾部,由四个功能区组成,即信号肽区、受体结合区、C端的疏水区及穿膜区,穿膜区是最外露的区域,是插入外源基因的最佳位置.噬菌体展示技术是一种基因表达产物和亲选择相结合的技术,基本原理及操作过程为:以改构的噬菌体为载体,把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白基因区,如在噬菌p III和p VIII衣壳蛋白基因区的N端插入外源基因,形成的融合蛋白表达在噬菌的表面,不影响噬菌体的生活周期及天然构型,且易被相应的抗体或受体分子识别,外源蛋白或多肽表达于噬菌体的表面,与固定或固相支持物结合,通过适当的淘洗,洗去非特异性结合的噬菌体(即亲和富集法),选出目的噬菌体,而编码基因作为病毒基因组的一部分可通过分泌型噬菌体的单链DNA测序得知.在这一过程中,外源基因是编码启动子DNA结合蛋白的文库基因,而固定或固相支持物分子则为启动子DNA片段.噬菌体展示技术是一种经济高效的研究生物大分子相互作用的技术,如构建噬菌体随机多肽文库可用于筛选包括抗体、小分子、细胞表面受体等多种分子^[10-14].Cicchini et al^[13]用噬菌体展示技术筛选出肝富有的转录因子HNF1a启动子结合蛋白.

2.3 DNA 迁移率变动试验 DNA 迁移率变动试验(DNA mobility shift assay),又叫凝胶阻滞试验,是一种体外研究DNA与蛋白质相互作用的特殊的凝胶电泳技术.基本原理为:在凝胶电泳中,由于电场的作用,小分子DNA片段比其结合了蛋白质的DNA片段向阳极移动的速度快,因此,可标记短的双链DNA片段,将其与蛋白质混合,对混合物进行凝胶电泳,若目的DNA与特异性蛋白质结合,其向阳极移动的速度受到阻滞,对凝胶进行放射性自显影,就可找到DNA结合蛋白^[15,16].将该实验改进,DNA与更多的蛋白结合,移动速度进一步减慢,这种方法又称超级迁移率变动试验(supershift assay).由于其特异性好,DNA迁移率变动试验常用来鉴定其他方法筛选出的结果^[17-18].显而易见,克隆启动子DNA片段并标记,用该实验就可找到相应的结合蛋白.Garuti et al^[19]用该试验证实肝细胞核因子3a(HNF3a)能与乙型肝炎病毒核心启动子特异性结合.

2.4 DNase I 足迹试验 足迹试验不仅能找到与特异性DNA结合的目标蛋白,而且能告知目标蛋白结合在哪些碱基部位,足迹试验的方法较多,常用的有DNase I 足迹试验、硫酸二甲酯足迹试验(dimethylsulfate, DMS),二者原理基本相同.DNase I 足迹试验的原理为:蛋白结合在DNA片段上,保护结合部位不被DNase破坏,这样,蛋白质在DNA片段上留下了“足迹”,在电泳凝胶的放射性自显影图片上,相应于蛋白质结合的部位没有放射性标记条带.技术流程为^[15]:(1)待检双链DNA分子用P32作末端标记,通常只标记一端;(2)蛋白质与DNA混合,等二者结合后,加入适量的DNase I,消化DNA分子,控制酶的用量,使之达到每个DNA分子只发生

一次磷酸二酯键断裂,同时设未加蛋白质的对照;(3)从DNA上除去蛋白质,将变性的DNA加样在测序凝胶中作电泳和放射性自显影,与对照组相比后解读出足迹部位的核苷酸序列.足迹试验特异性好,定位精确,使用广泛^[20,21].Raney et al应用DNase I 足迹试验确定转录因子Sp1在HBV表面抗原启动子的结合位点为-49~-29核苷酸序列之间^[11].

3 参考文献

- 1 成军,刘研,陆荫英,李克,王琳.生物信息技术与新基因的研究.世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 2 Weaver RF. Molecular biology. 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 279-290
- 3 朱玉贤,李毅.现代分子生物学.第2版.北京:高等教育出版社, 2002:64-77
- 4 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 5 Liu JD, Wilson TF, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 6 Ishida H, Ueda K, Ohkawa K, Kanazawa Y, Hosui A, Nakanishi F, Mita E, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. *J Virol* 2000;74:1241-1251
- 7 Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a hepatitis B virus X binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* 1998;72:1737-1743
- 8 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南.黄培堂译.第3版.北京:科学出版社, 2002:147-377
- 9 Blond-Elguindi S, Swirls SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ. Affinity panning of a library of peptides display on bacteriophages reveals the binding specificity of Bi P. *Cell* 1993;75:717-728
- 10 Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol* 1994;244: 361-369
- 11 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- 12 Isalan M, Klug A, Choo Y. A rapid, generally applicable method to engineer zinc fingers illustrate by targeting the HIV-1 promoter. *Nat Biotechnol* 2001;19:656-660
- 13 Cicchini C, Ansuini H, Amicone L, Alonzi T, Nicosia A, Cortese R, Tripodi M, Luzzagao A. Searching for DNA-protein interactions by lambda phage display. *J Mol Biol* 2002;322:697-706
- 14 Weaver RF. Molecular biology, 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 124-127
- 15 朱玉贤,李毅.现代分子生物学.第2版.北京:高等教育出版社, 2002:166-170
- 16 Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the Human P53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Bio Chem* 2003;384:203-212
- 17 Rho HR, Kwon JA. Hepatitis B viral core protein activities the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor κB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002;80: 445-455
- 18 Johnson JJ, Raney AK, Mclachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995;208:147-158
- 19 Garuti R, Croce MA, Piccinini L, Tiozzo R, Bertolini S, Calandra S. Functional analysis of the promoter of human sterol 27-hydroxylase gene in HepG2 cells. *Gene* 2002;283:133-143
- 20 Nakamura I, Koike K. Identification of binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus. *Virology* 1992; 191:533-540
- 21 Mclachlan A, Raney A. Characterization of the hepatitis B virus large surface antigen promoter Sp1 binding site. *Virology* 1995; 208:399-404