

# 介绍一种脱嘌呤干扰足纹法

温 进 坤

(河北医学院基础医学研究所生化室, 石家庄 050017)

## 提 要

报道了一种鉴定蛋白质与 DNA 的相互作用位点的新方法——脱嘌呤干扰足纹法,并用该方法鉴定大鼠脂酰-CoA 氧化酶基因的表达调控部位。此方法基于用甲酸使 DNA 脱嘌呤后,再与核蛋白相互作用,然后通过凝胶电泳迁移率的改变,将游离 DNA 和与蛋白质结合的 DNA 片段分开,再经六氢吡啶降解 DNA 中无嘌呤部位的磷酸酯键和进行电泳分析。此方法具有分辨率高、重复性好、干扰少等优点,适用于对结合位点中缺乏鸟苷酸的基因进行分析。

**关键词** 脂酰-CoA 氧化酶,甲基化干扰足纹法,脱嘌呤干扰足纹法

基因表达调控是通过细胞内特异结合蛋白与 DNA 的相互作用来实现的,因此,确定蛋白质在 DNA 分子上的特异结合位点是研究基因调控的关键步骤。目前常用于鉴定蛋白质与 DNA 的相互作用位点的方法有 DNase I 足纹法和甲基化干扰足纹法。在这两种方法中,甲基化干扰足纹法具有最适反应条件易于建立、特异性高、可检出与结合蛋白密切接触的核苷酸等优点,但由于该方法主要用于鉴定 DNA 结合位点中的鸟苷酸,在结合位点中缺乏鸟苷酸或其存在甚少时,便失去其应用价值。作者在研究降血脂药双-2-乙基己基酞酸酯(DEHP)诱导过氧化物酶体脂肪酸  $\beta$ -氧化酶系基因表达的作用机理过程中,建立了脱嘌呤干扰足纹法,此方法像甲基化干扰足纹法一样,具有分辨率高、重复性好、干扰少等优点,适用于对 DNA 结合位点中缺乏鸟苷酸、富含腺苷酸的基因进行分析。现将这一方法报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞核提取液的制备

细胞核提取液按 Gorski 等人的方法<sup>[1]</sup>分别从对照大鼠和用 DEHP 处理的大鼠肝脏提

取。对照大鼠的提取液蛋白浓度为 6.1mg/ml, DEHP 处理大鼠为 24mg/ml。

### 1.2 DNA 片段的制备

大鼠脂酰-CoA 氧化酶基因<sup>[2]</sup>上游 -597—471bp(Dde I-Ava I 酶切片段,长度为 126bp)的 DNA 片段作为蛋白质结合反应的底物(图 1)。按标准方法<sup>[3]</sup>用 DNA 聚合酶 Klenow 片段和 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 以及 T4 多核苷酸激酶和 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 标记 DNA 片段的 Ava I 末端后,再用 Dde I 酶解两端被标记的 DNA,经聚丙烯酰胺电泳分离得到编码链 3' 末端被标记、

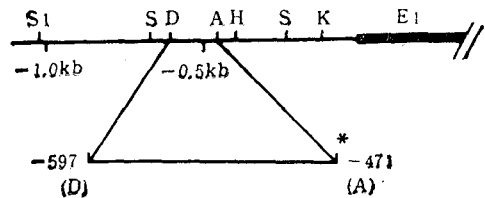


图 1 脂酰-CoA 氧化酶基因上游区域的酶切图谱与甲基化和脱嘌呤干扰足纹分析的探针

图中 S1, Sac I, S, Sau 3AI, D, Dde I, A, Ava I, H, Hinf I, K, Kpn I, E1,脂酰-CoA 氧化酶基因的第 1 外显子,\*表示编码链 3' 末端和非编码链 5' 末端被 <sup>32</sup>P 标记

非编码链 5' 末端被标记的 126 bp 的 DNA 片段。其比活性为  $1 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g DNA。

### 1.3 脱嘌呤干扰足纹分析

**1.3.1 DNA 片段的脱嘌呤** 取非编码链 5' 末端被标记的 DNA 片段 10ng ( $1 \times 10^3$  cpm), 小牛胸腺 DNA 1 $\mu$ g, 4% (V/V) 甲酸 5 $\mu$ l, 加水使总体积为 50 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后, 加入 200 $\mu$ l 反应终止液 (0.3mol/L 醋酸钠, 0.1mmol/L EDTA, 酵母 tRNA 25 $\mu$ g/ml), 用乙醇沉淀 DNA, 80% 乙醇洗二次, 干燥, 溶于 10 $\mu$ l TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH=7.5, 1mmol/L EDTA)。

**1.3.2 游离 DNA 片段和与蛋白质结合的 DNA 片段的分离** 取细胞核提取液 20 $\mu$ g, 加结合缓冲液 (20mmol/L Hepes-KOH, pH=7.9, 100mmol/L KCl, 20% 甘油, 0.5mmol/L DTT) 至 60 $\mu$ l 后, 加入 10mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10 $\mu$ l, 125mmol/L 亚精胺 10 $\mu$ l, poly (dl · dC) 5 $\mu$ g, 再加水使总体积为 100 $\mu$ l。室温静置 3min, 然后加上述脱嘌呤处理的 DNA 片段 5 $\mu$ l (约  $5 \times 10^4$  cpm)。30 $^{\circ}$ C 保温 30min, 加入 25 $\mu$ l 加样缓冲液 (5% 甘油, 50mmol/L EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯腈蓝) 后, 按 Hennighausen 等人的方法<sup>[4]</sup>在低离子强度条件下经 5% 聚丙烯酰胺电泳进行迁移率改变分析。电泳毕, 室温下进行放射自显影, 确定游离 DNA 片段和与蛋白质结合的 DNA 片段 (DNA-蛋白质复合物) 的位置。分别将游离 DNA 和 DNA-蛋白质复合物从凝胶上切下, 置于透析袋中, 加入适量 TBE 缓冲液, 封口, 放入电泳槽中, 经电泳使 DNA 片段从胶块中洗脱出。

**1.3.3 DNA 片段的化学降解和电泳分析** 从透析袋中回收缓冲液, 进行酚提取, 乙醇沉淀, 干燥后, 溶于 10% (V/V) 六氢吡啶 100 $\mu$ l。90 $^{\circ}$ C 加热 40min, 真空干燥除去六氢吡啶。然后再重新悬浮于 100 $\mu$ l 水中, 再次真空干燥。如此重复 2—3 次, 至六氢吡啶被完全除去为止。最后将沉淀溶于 10 $\mu$ l 电极缓冲液 (80% (W/V) 甲酰胺, 10mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA, 0.1% 溴酚蓝, 0.1% 二甲苯腈蓝), 用液闪方法

测定各样品的计数率。各样品取放射性强度相同的量, 90 $^{\circ}$ C 加热 3min 后, 上样于 8% 聚丙烯酰胺-7mol/L 尿素 DNA 序列测定凝胶中, 电泳, 干燥凝胶, 于 -70 $^{\circ}$ C 进行放射自显影。同时平行电泳同种 DNA 片段经 Maxam-Gilbert 化学测序法的 A + G 反应进行切割后的样品, 以确定结合位点的核苷酸顺序。

### 1.4 甲基化干扰足纹分析

编码链 3' 末端被标记的 DNA 片段按 Weinberger 等人的方法<sup>[5]</sup>进行甲基化干扰足纹分析。

## 2 结果与讨论

已经证明, 大鼠肝脏过氧化物酶体中的脂酰-CoA 氧化酶可被安妥明类降血脂药物显著诱导<sup>[6,7]</sup>。为了鉴定与诱导脂酰-CoA 氧化酶基因表达有关的核苷酸顺序, 作者将利用氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 分析方法在体外检出的该酶基因的转录调控区域 (另文发表) 制成 DNA 探针 (见图 1)。用 DNase I 足纹法以及甲基化和脱嘌呤干扰足纹法检查了这一 DNA 片段与核蛋白的相互作用位点。如图 2 所示, 经 DNase I 足纹分析, 转录起始点上游 -540—-515bp 的 26 个核苷酸区 (编码链) 和 -544—-519bp 的 26 个核苷酸区 (非编码链) 分别被核蛋白所保护。对编码链进行甲基化干扰足纹分析的结果表明, 与核蛋白密切结合的鸟苷酸位于 DNase I 足纹分析所鉴定的结合位点内; 用脱嘌呤干扰足纹法检查非编码链中与核蛋白结合的嘌呤核苷酸时, 在 DNase I 足纹分析所检出的结合位点中, 嘌呤核苷酸均与核蛋白密切接触。虽然对照和 DEHP 处理大鼠的结合位点相同, 但在后者的细胞核提取液中, 与 DNA 特异结合的核蛋白浓度显著增加。在所鉴定的结合位点中, -541—-531 之间的 TATTTGGTTAG 核苷酸区与人清蛋白基因增强子 (enhancer) 的核苷酸顺序<sup>[8]</sup>相同, 并且和与肝脏特异的转录因子 LF-B1<sup>[9]</sup> (也称 HNF-1<sup>[9]</sup> 或 HP1<sup>[10]</sup>) 相互作用的核苷酸顺序高度一致。因此, 我们推测, 这一核苷酸顺序与脂酰-CoA 氧化酶基因的表达调

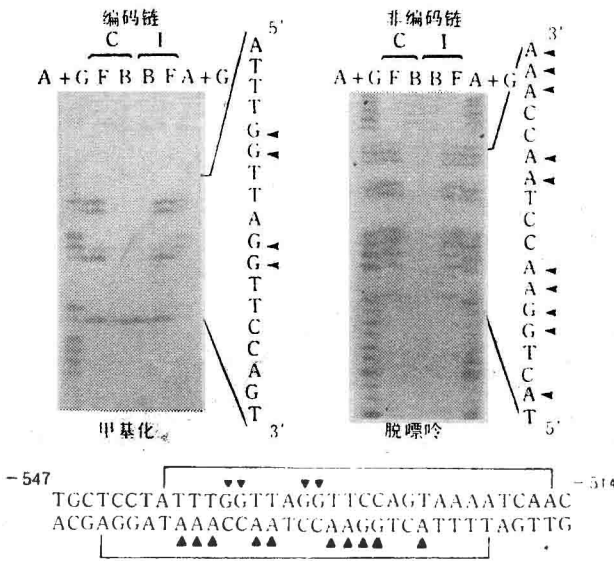


图2 脂酰-CoA 氧化酶基因调控区域的鉴定

C. 对照大鼠的细胞核提取液, I. DEHP 处理大鼠的细胞核提取液, F. 游离 DNA 片段, B. 与蛋白质结合的 DNA 片段, A + G. Maxam-Gilbert 化学测序法 A + G 切割后的碱基顺序。箭头表示甲基化和脱嘌呤后干扰蛋白质结合的碱基, 划线部分表示 DNase I 足纹分析所鉴定的结合位点

控及其被降血脂药物的诱导有关。为了证实脱嘌呤干扰足纹法的特异性, 我们还用这种方法检查了 DNase I 足纹分析所鉴定的该基因的另一个结合位点 CCAAT (位于转录起始点上游-328bp)。经对两条链进行分析, 两种方法所检出的结合位点完全一致。

脱嘌呤干扰足纹分析法的原理基于用甲酸处理 DNA, 使其发生部分脱嘌呤 (平均每个 DNA 分子中有一处脱嘌呤) 反应, 当位于蛋白质结合位点中的嘌呤碱基被脱去后, 蛋白质便失去与该部位的结合能力。借助凝胶电泳迁移率的改变, 将游离 DNA 片段和与蛋白质结合的 DNA 片段分开。可以预期, 与蛋白质结合的 DNA, 其结合位点中的嘌呤碱基没有被脱去。因此, 在六氢吡啶中加热处理, 引起  $\beta$ -消除反

应, 使无嘌呤部位的戊糖与磷酸之间的磷酸酯键断开时, 来自 DNA-蛋白质复合物中的 DNA 片段在结合位点内不发生断键反应, 因而可决定 DNA 分子上的蛋白质结合部位。

脱嘌呤干扰足纹法的优点在于在探针与蛋白质的相互作用过程中, 探针被蛋白质饱和与否不影响实验结果, 所以反应条件易于建立。DNase I 足纹法需使探针被蛋白质完全饱和, 两者之间的比例不易确定, 并且在 DNase I 消化过程中, 可因与 DNA 动态结合的蛋白质的解离造成结合位点内部被切断, 因而有时不能检出准确的结合位点。虽然甲基化干扰足纹法具有和脱嘌呤干扰足纹法同样的优点, 但该方法不适于对结合位点中缺乏鸟苷酸的基因进行分析。例如, 在本文鉴定的脂酰-CoA 氧化酶基因的结合位点内, 非编码链只存在两个鸟苷酸, 如用甲基化干扰足纹分析, 则难以确定结合位点的准确长度和位置。因此, 脱嘌呤干扰足纹法比 DNase I 足纹法具有较高的特异性, 比甲基化干扰足纹法具有较广的应用范围。

### 参 考 文 献

- 1 Gorski K, Carneiro M, Schibler U. *Cell*, 1986; 47: 767
- 2 Osumi T, Ishii N, Miyazawa S *et al. J Biol Chem*, 1987; 262: 8138
- 3 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 115-122
- 4 Hennighausen L, Lubon H. *Methods Enzymol*, 1987; 152: 721
- 5 Weinberger J. *Nature*, 1986; 322: 846
- 6 Hashimoto T. *Ann N Y Acad Sci*, 1982; 386: 5
- 7 Osumi T, Hashimoto T. *Trends Biochem Sci*, 1984; 9: 317
- 8 Frain M, Swart G, Monaci P *et al. Cell*, 1989; 59: 145
- 9 Courtois G, Morgan J G, Campbell L A *et al. Science*, 1987; 238: 688
- 10 Schorpp M, Kugler M, Wagner U *et al. J Mol Biol*, 1988; 202:307