

固相 DNase I 足迹法研究 DNA-蛋白质相互作用*

徐冬冬 刘德培** 吕 湘 徐海明 张 伸 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 传统的 DNase I 足迹法程序繁杂, 并且要求目的蛋白经过一定程度的纯化. 而固相 DNase I 足迹法通过结合有模板的磁珠, 先富集序列特异的 DNA 结合蛋白, 进行 DNase I 酶切, 然后用测序胶分离并分析结果. 此方法简便易行, 重复性好, 并减少了对操作者的放射性损害, 尤其适用于研究未经纯化的核蛋白粗提物内序列特异蛋白.

关键词 DNase I 足迹法, 磁珠, 化学裂解法

学科分类号 Q 522

体外足迹法是一种检测和鉴定转录因子对 DNA 的序列特异性结合能力的一种有效方法. 传统的足纹技术^[1]仍然是最常用的方法. 但在实际应用中, 核蛋白提取物应预先采用恰当的方法进行一定程度的纯化, 且样品制备过程中需要有机抽提和离心, 因此该方法显得程序繁杂. 本文介绍的固相 DNase I 足迹法^[2], 能在一定程度上解决这些问题. 该方法的原理 (图 1) 是: 当含有蛋白结合位点的 DNA 片段一端用生物素 (biotin) 标记后, biotin 和链霉抗生物素蛋白 (streptavidin) 高度特

异的结合能快速有效地分离 biotin 标记靶分子, 从而使靶分子固定在包被有 streptavidin 的磁珠上. 其后步骤的 DNA 与蛋白结合, DNase I 酶切均是在 DNA/磁珠复合物上进行. 由于 DNA/磁珠复合物可通过磁架固定在 eppendorf 管壁上, 因此称之为固相 DNase I 足迹法.

本文以 β -珠蛋白基因簇上游基因座控制区 (locus control region, LCR) 中高敏位点 2 (HS2) 上第一个 AT 富含区和 K562 细胞核粗提取物为例来介绍这一方法.

1 材料和方法

1.1 材料

K562 细胞系由本研究组保存; 含人 β -珠蛋白基因簇上游基因座控制区中 HS2 两个 AT 富含区的质粒 PBX3/4 和 PUC19 由本研究组提供; 旋转混合器购自宁波新芝科器研究所; 磁架购自 Promega 公司; 磁珠 (Dynabeads M280 streptavidin) 购自 Dynal 公司; DNase I、Hind III 为 Promega 产品; Klenow 片段为 Biolab 产品; 透析袋购自鼎国公司; 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺为 Sigma 产品; 放射性核素 [α -³²P] dATP 为北京亚辉生物公司产品, 活性为 $> 18.5 \times 10^7$ Bq; 其他试剂和药品均为国产分析纯产品.

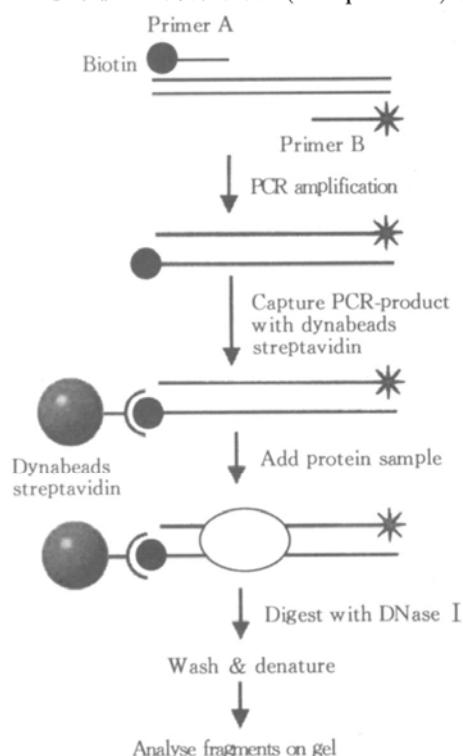


Fig. 1 Outline of solid-phase DNase I footprinting

* 国家自然科学基金 (39470390), 杰出青年科学基金 (39525006) 及自然科学基金重大项目 (39893320) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-65296415, E-mail: liudp@hotmail.com

收稿日期: 2000-08-21, 接受日期: 2000-09-28

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人源性红白血病细胞系 K562 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中 37 °C, 5% CO₂ 培养细胞生长至对数生长期.

1.2.2 K562 细胞核抽提物的制备: 按文献 [3] 方法制备.

1.2.3 感受态大肠杆菌细胞制备及转化: 按《分子克隆》方法进行^[4].

1.2.4 质粒 DNA 小量及大量制备: 按《分子克隆》方法进行^[4].

1.2.5 PCR 扩增获得模板片段: 末端标记有 biotin 的目的片段长度为 242 bp. 引物及反应条件如下: 上游引物为 5'-biotin-ATGCTTACAGG-GCAGATG-3', 下游引物为 5'-ACGCCAAGCTT-TGATTCACAATAA-3'. 取 30 ng PBX3/4 质粒作为模板, 95 °C 变性 30 s 后, 按 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s 进行 25 轮 PCR 扩增. 最后 72 °C 延伸 10 min. 等体积酚/氯仿抽提后, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 两倍体积无水乙醇沉淀过夜.

1.2.6 聚丙烯酰胺/琼脂糖凝胶电泳联合回收目的 DNA 片段: 在紫外灯下将含目的 DNA 片段 (242 bp) 的聚丙烯酰胺凝胶条切下, 包埋于 1.2% 琼脂糖凝胶中, 电泳, 待 DNA 迁移一段距离后, 在目的片段前方挖一小槽, 吸去过量的电泳缓冲液, 并加入 13% 的聚乙二醇 (PEG) 至液面刚与凝胶两端平齐, 继续电泳. 待 DNA 进入小槽后, 停止电泳. 将 PEG 吸出, 加等体积酚/氯仿抽提. 吸出上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和两倍体积无水乙醇过夜沉淀, 并用 70% 乙醇洗一次.

1.2.7 目的片段与磁珠结合: 取 100 µg 包被有 streptavidin 的磁珠, 在磁架上用 TGED200 溶液 (20 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; 200 mmol/L NaCl; 10% 甘油) 洗两次后, 用 TGED400 溶液 (20 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; 400 mmol/L NaCl; 10% 甘油) 悬起磁珠, 加入等体积含 50 pmol 目的片段的 TE 溶液. 于室温在旋转混合器上旋转 30 min 以上以使生物素和链亲和素结合. 连有目的片段的磁珠于 4 °C 保存.

1.2.8 固定在磁珠上的目的片段酶切及 3' 末端同位素标记: 磁珠/DNA 先用 100 µl 缓冲液 E 洗两次. 于 Eppendorf 管中依次加入 50 pmol 磁珠/

DNA, 20 µl 缓冲液 E, 10 单位 *Hind* III 酶, 补加水至 200 µl. 为防止磁珠沉淀聚集, 反应在杂交炉内于旋转混合器上进行. 37 °C, 酶切 2 h. 反应结束后, 用 TE 洗涤磁珠两遍, 磁珠/DNA 可于 4 °C 保存. 取 5 pmol 酶切后的磁珠/DNA, 用 1 × Klenow 缓冲液洗磁珠两遍, 依次加入 20 µl 10 × Klenow 缓冲液; 5 µl [α -³²P] dATP; 2 µl 5% NP40; 2 µl Klenow fragment (10 U/µl); 用水补足至 200 µl. 37 °C 反应 30 min. 反应结束后, 用 TE 溶液洗涤磁珠/DNA 两遍, 磁珠/DNA 悬于 100 µl TE, 取 0.5 µl 测液闪. 磁珠/DNA 于 4 °C 保存.

1.2.9 固相 DNase I 足迹法: 每个反应用 cpm 值为 15 000~20 000 的磁珠/DNA 复合物. 除去上清, 用 125 µl 核抽提混合物 (12 mmol/L HEPES; 12% 甘油; 60 mmol/L KCl; 5 mmol/L EDTA; 2 µg 鲑鱼精 DNA (SSD); 核蛋白粗提物 75 µg) 重悬磁珠. 30 °C 反应 20 min (为防止磁珠沉淀聚集, 反应在杂交炉内于旋转混合器上进行). 未加核抽提物的对照 DNA 处理在以下步骤与加入核抽提物的模板相同. 用 100 µl 洗涤缓冲液 (12 mmol/L HEPES; 12% 甘油; 60 mmol/L KCl; 1.7 mmol/L EDTA; 23 mg/L SSD; 0.3 mmol/L DTT; 0.3 mmol/L PMSF; 0.05% NP40) 洗两次后, 磁珠悬于 50 µl 洗涤缓冲液. 加入 50 µl Ca²⁺/Mg²⁺ 溶液 (5 mmol/L CaCl₂; 10 mmol/L MgCl₂), 0.3~1.2 U DNase I 室温酶切 1 min, 加入 90 µl DNase I 终止缓冲液 (0.2 mmol/L NaCl; 0.03 mmol/L EDTA; 1% SDS; 100 mg/L 酵母 tRNA). 用 TE 洗一次后, 用 4 µl 测序加样缓冲液悬起磁珠. 95 °C 加热 5 min, 进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 35 W 恒功率电泳 2.5 h. 干胶后, 于 -70 °C 放射自显影 2 d.

1.2.10 G>A 化学裂解: 按文献 [5] 介绍的方法进行.

1.2.11 磷屏扫描与结果处理^[6]: 测序电泳结束后, 将干燥过的凝胶对磷屏进行曝光, 并对各个区带进行扫描定量. 首先对各个电泳泳道的加样差异进行校正, 通常选择某一调控元件旁侧的几个已知的非保护条带, 将其磷屏扫描结果相加, 比较不同加样泳道的值, 按比例调整附近调控元件上的磷屏扫描结果. 然后比较加核抽提物泳道上某一调控元件的区带与未加核抽提物泳道 (对照) 上对应区带的强度, 来计算各个残基的被保护程度. 通常将对照的强度定为 100%, 如果同对照相比, 某个碱基

的强度减弱小于 10%，认为两者间没有差别。某个碱基的强度减弱大于 10%，认为有保护。

2 结果和讨论

DNase I 足迹法的基本原理与 DNA 化学测序法有些相似。首先将待测双链 DNA 片段中一条单链的一端选择性地末端标记，然后加入恰当浓度的 DNase I，使在 DNA 链上随机形成缺口，经变性后电泳分离，放射自显影，即可形成以相差一个核苷酸为梯度的 DNA 条带。但当 DNA 片段与相应的序列特异性 DNA 结合蛋白结合后，DNA 结合蛋白可保护相应的 DNA 序列不受 DNase I 的攻击，因而在放射自显影图谱上，DNA 梯度条带在相应于 DNA 结合蛋白的结合区域中断，从而形成一空白区域，恰似蛋白质在 DNA 上留下的足迹，因而被形象地称作足迹法。如果同时进行 DNA 化学测序，即可判断出结合区的精确顺序。该技术至今仍然是最常用的方法。但在实际应用中，首先应将序列特异蛋白进行一定程度的纯化，如硫酸铵分步沉淀法、离子交换层析、凝胶过滤层析等，否则很难得到满意的结果。在我们的研究中也发现，当采用传统 DNase I 足迹法^[7]来研究两个 AT 富含区的片段时，未得到阳性结果（结果未显示）。考虑其原因，可能是我们采用 K562 细胞核粗抽提物，其序列特异的反式作用因子含量极低，不能充分饱和探针。考虑到非特异蛋白的影响，核抽提物用量也不能无限地增多。因此，我们采用了固相 DNase I 足迹技术对这一段序列进行了研究。实验结果如图 2 所示。通过泳道 1 可以对 HS2 的两个 AT 富含区定位，比较泳道 3~6 和 7~9（加入核抽提物的样品），我们可以发现位于第一个 AT 富含区的 20 个碱基左右的保护区（即足纹），磷屏扫描结果也证实此段序列为足纹区。由于仍有部分探针游离（探针未能完全与特异核蛋白结合），足纹区并不显示为空白区，而是相应区域与对照比强度减弱。由于本实验所采用的原材料是未经纯化的核蛋白粗提物，序列特异结合蛋白含量极少，因此传统足纹技术满足不了要求。而在固相 DNase I 技术中，当形成稳定的蛋白质-DNA 复合物后，用含有非特异竞争 DNA 的洗涤缓冲液洗涤磁珠以除去非特异的蛋白质。而此特异蛋白质-DNA 复合物仍可以与核蛋白混合物结合，直至最终饱和探针，形成清晰可见的足纹区。在应用固相 DNase I 技术中，应注意以下几点：a. 实验成败的最关键因素是

DNase I 的质与量及作用时间。一般情况下，DNase I 终反应浓度为 0.1~1.0 mg/L，反应时间为 30 s 到 2 min。因此，正式试验前，均应进行预试验，摸索出最适宜的加入量及作用时间，最理想的结果是平均使每个 DNA 分子形成一个断裂点；b. DNA 探针一端生物素标记，另一端同位素标记。可以用生物素标记引物和同位素标记寡核苷酸进行 PCR 反应以得到探针（图 1）。也可以用末端补平的方法进行生物素和同位素标记（本文采用的方法）；c. DNA 探针长度一般不超过 200 个碱基对，蛋白质结合位点与标记末端距离不小于 25 个碱基对，这主要是考虑末端结合蛋白的影响；d. 由于存在放射性切割的问题，探针应在一周内使用，否则降解模板会影响足纹区的显示。

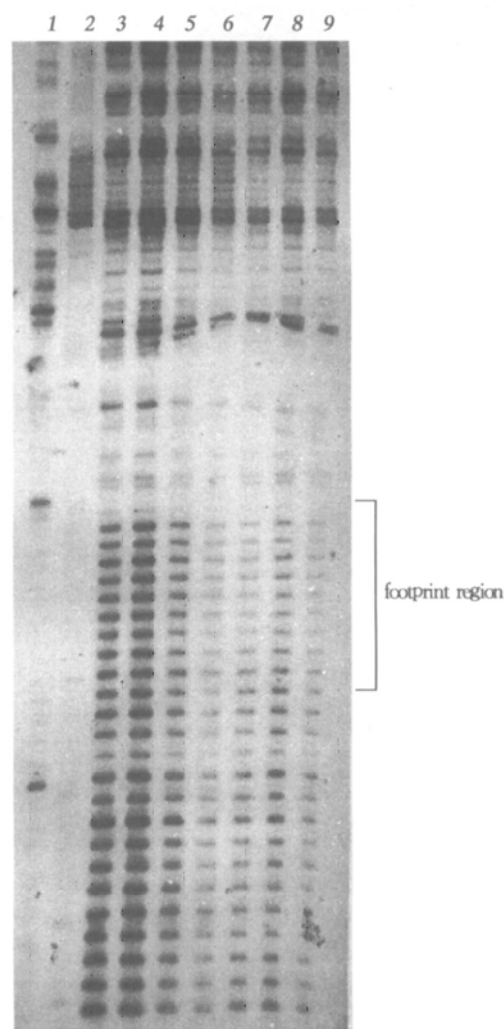


Fig. 2 The result of solid-phase DNase I footprinting

1: G > A chemical cleavage; 2: free probe; 3~6: digestion of the control DNA with different amounts of DNase I (3: 1.2 U DNase I; 4: 0.6 U DNase I; 5: 0.3 U DNase I; 6: 0.15 U DNase I); 7~9: digestion of protein-bound DNA with different amounts of DNase I (7: 1.2 U DNase I; 8: 0.6 U DNase I; 9: 0.3 U DNase I).

与传统的 DNase I 足纹法比较, 固相 DNase I 足纹法有以下优点: a. 靶片段末端标记以后, 没有掺入的放射性核苷酸能在清洗磁珠时被去除. 在以下的操作步骤中放射性大为减弱, 从而减少了对研究者的放射性损害. b. 由于省却了有机抽提和沉淀步骤, 可以在 30 min 内处理 10 个样品. 操作简便, 大大节省了时间. c. 由于影响单核苷酸分辨率的杂质被有效去除, 测序胶上 DNA 片段的分离能达到最佳. d. 由于有一个序列特异 DNA 结合蛋白的富集过程, 并且非特异结合的蛋白质能在洗涤过程中被竞争掉, 此方法能适应于研究未经纯化的核蛋白粗提物中序列特异 DNA 结合蛋白.

本方法都为常规操作, 操作简便且可减少对操作者的放射性损害. 尤其适宜于研究核蛋白粗提物内序列特异结合蛋白.

参 考 文 献

- 1 Galas D, Schmitz A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, 1978, **5** (9): 3157~ 3170
- 2 Sandaltzopoulos R, Becker P B. Solid phase DNase I footprinting: quick and versatile. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (8): 1511~ 1512
- 3 Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11** (5): 1475~ 1489
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 1. 60~ 1. 61; 1. 80~ 1. 81; 1. 25~ 1. 38.
- 5 Allan M. Maxam. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74** (2): 560~ 564
- 6 Somerest W J, Ausubel F. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York. John Wiley & Sons, Inc. 1997. 12. 4. 6~ 12. 4. 9
- 7 Ausubel F. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1997. 12. 4. 1~ 12. 4. 16

A Method for the Study of DNA-Protein Interaction: Solid-Phase DNase I Footprinting*

XU Dong-Dong, LIU De-Pei**, Lü Xiang, XU Hai-Ming, ZHANG Shen
LIANG Zhi-Quan (LIANG Chih-Chuan)

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union of Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

Abstract DNase I footprinting is labor intensive, time consuming and the target protein should be purified to some extent. Solid-phase DNase I footprinting can enrich a sequence specific protein by target DNA immobilized onto paramagnetic beads. After DNase I digestion, separate the products by sequencing PAGE. This new method is quick, simple and repeatable, which can minimize the exposure of the researcher to radiation. The solid-phase approach may also facilitate the analysis of factors using crude protein mixtures.

Key words DNase I footprinting, magnetic beads, chemical cleavage

* This work was supported by grants from National Natural Sciences Foundation of China (39470390), Outstanding Youth Science Foundation (39525006), Key Programme of NNSF of China (39893320).

** Corresponding author. Tel: 86-10-65296415, E-mail: liudp@hotmail.com

Received: August 21, 2000 Accepted: September 28, 2000