

连接介导 PCR 及其在体内足迹研究中的应用*

纪新军 刘德培 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)
(中国协和医科大学基础医学院)

摘要 连接介导聚合酶链反应是以连接反应为基础的单侧 PCR 技术, 首先在 DNA 片段的一端连接上一个公共连接子, 而后在这个连接子与另一个 DNA 序列特异的引物间扩增. Vent 聚合酶的使用, 延伸产物捕获及连接子标记选择策略的采用, 大大提高了连接介导聚合酶链反应的敏感性. 这一技术的发明大大促进了体内足迹等研究的进行.

关键词 连接介导 PCR, 连接子, 体内足迹法

常规的用来研究蛋白质-核酸相互作用的方法, 如 DNase I 足迹法, 凝胶电泳阻抑法, 甲基化干涉实验等, 是体外方法, 对于研究蛋白质-DNA 间相互作用具有很大的作用, 然而体内结果常同体外情况不同, 有时体外蛋白质-DNA 相互作用实验检测到有蛋白质-DNA 间相互作用, 但体内无蛋白因子结合, 反之亦然. 所以体外研究方法研究基因表达调控并不总能真实反映体内的情况^[1,2].

体内足迹法 (*in vivo* footprinting) 是一种研究体内蛋白质-DNA 相互作用的方法, 它能真实反映体内蛋白质-DNA 相互作用的情况, 而且可以检测体内的 DNA 构象的变化, 是研究基因表达调控的有力手段. 但这种实验要求有大量的细胞, 而且特异性也不很好, 限制了它的使用^[3].

连接介导的聚合酶链反应 (ligation-mediated polymerase chain reaction, LM-PCR) 的发明, 有力地促进了体内足迹技术在真核基因表达调控研究方面的应用^[4]. 现就 LM-PCR 的原理及其在体内足迹方面的应用综述如下:

1 LM-PCR 原理

1.1 基本原理

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 由重复的模板变性, 引物退火, DNA 聚合酶延伸等过程组成, 使 DNA 模板在限定

的两个引物间得到指数性扩增, 每个循环模板增加 2 倍, 经过 25~30 个循环后, 单拷贝基因可扩增到 10^6 倍, 经典 PCR 不适用于立即进行体内足迹研究, 因为它要求有两个限定端, DNA 序列或足迹包括一组相关的核苷酸片段, 这些片段的一端被一个引物或酶切位点固定. 所以对所有片段都是相同的. 另一端则由于不同的化学裂解或链终止而对所有片段都不相同, 为了能够运用 PCR 进行体内足迹研究, 就要首先通过连接上一个连接子使所有片段的另一端也相同. 然后在两个限定端间进行 PCR 扩增, 即是所谓的连接介导的聚合酶链反应 (LM-PCR)^[4].

LM-PCR 是一种以连接反应为基础的单侧 PCR 策略, 它的敏感性较高, 从 1 μ g 的细胞基因组 DNA, 哺乳类基因组的单拷贝基因经过一夜就可获得实验结果. 这使得用少量细胞或特定的切割组织进行体内足迹研究成为可能^[4]. LM-PCR 的原理见图 1^[4~6].

a. 起始原料是化学法裂解的基因组 DNA, 裂解后产生 3' 和 5' 磷酸基团.

b. 用基因特异的引物 P1 与变性的基因组 DNA 退火, 延伸, 产生平末端 DNA, 同时也限定了模板的一个末端.

* 国家自然科学基金资助项目 (39470390).

收稿日期: 1996-06-04, 修回日期: 1996-09-09

- c. 上述的一端固定的一组 DNA 双链片段成为 T4 连接酶的底物, 用于与连接子连接起来, 基因组 DNA 提供 T4 连接酶连接时的 5' 磷酸端, 这时模板 DNA 的另一末端也被固定.
- d. 经过连接的 DNA 变性后与基因特异的第二引物 (P2) 退火, 延伸, 这时的模板具备了两个限定端.
- e. 两端被固定的模板用 P2 和长接头寡核苷酸引物指导进行 PCR 扩增, 经过 15~ 18 个循环后, 可扩增为原来的 10^4 倍.
- f. LM-PCR 的结果显示有以下两种方法: 第一, 运用一个末端标记的第三引物 (P3) 延伸模板片段, 然后进行测序分析; 第二, LM-PCR 后进行测序分析, 再运用电印迹转移到尼龙膜上去, 用一个基因特异的标记探针进行杂交, 显示最后的结果. 由于第一种方法比较方便, 被较多地采用.

物的 3' 端, 第三引物同第二引物的关系也如此, 这样设计大大加强了反应的特异性^[4].

LM-PCR 中使用的接头应不含有 5' 磷酸基团, 去除在连接反应中的自连接现象和保证了连接的方向性. 双链接头应该在连接反应中保持稳定, 在 PCR 时不稳定. 接头中的长寡核苷酸片段与 P2 引物应具有可匹配的 T_m 值^[4].

在进行 LM-PCR 时, 起始分子数的数目可由统计学计算来得出: 序列分析中所需的 DNA 分子的最低数目为每个分子对应着测序结果中的一条区带, 如果要求最适分子使用效率, 则基因组 DNA 还应该在特定长度上被均匀切割, 如 200 bp 有一个切割点, 为了避免区带的强度变化超过 10%, 大约 100 个原始分子对应每一条区带是必需的. 如果连接和第一引物延伸的效率是 10%, 则 2×10^5 ($200 \times 100 \times 10$) 个原始分子数才能给出一个均一的特异的结果^[7]. 这一过程对所有碱基都适用, 敏感性增加, 背景降低, 但有时也存在问题. 有些区带的强度不均一, 可能原因有: 单个碱基的化学反应性不同, DNA 序列对于 PCR 扩增效率的影响, 连接之前的引物延伸反应可能未产生足够的平末端^[7].

1.2 LM-PCR 技术改进

LM-PCR 技术自发明以来, 已经在几个方面进行了改进. Vent DNA 聚合酶具有不可检测得到的末端转移酶活性, 它的使用有利于第一引物产生正确的平末端和 P3 引物延伸后的正确长度^[5]. 为了避免在标记反应中 P3 与 P2 的竞争, Quivy 设计了连接子标记选择策略 (linker tag selection, LTS). LTS 不仅可定量地改善标记反应, 而且使一些常规 PCR 不能应用的 P3 引物引入到 LM-PCR 中来. LTS 显著地增加了 LM-PCR 的敏感性, 忠实性, 并且可以使 LM-PCR 引物设计具有随机性^[8]. 为了增加 LM-PCR 的特异性, Tormanen 在 LM-PCR 前, 使得基因特异的片段通过延伸产物捕获 (extension product capture, EPC) 方法得以富集. 这一程序可大大降低非特异的背

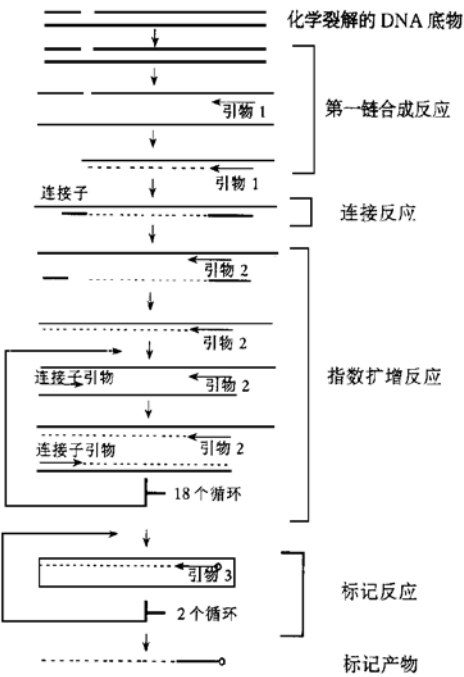


图 1 LM-PCR 原理

LM-PCR 一般采取三个引物的方法, 这三者之间的关系是第二引物的延伸端位于第一引

景, 使得结果格外清晰^[9].

2 LM-PCR 在体内足迹研究中的应用

体内足迹可以用来研究不同细胞类型中生理状态下的蛋白质-DNA 相互作用. 功能上重要的蛋白质-DNA 相互作用可以被体内足迹揭示出来. 每种细胞类型必然拥有一簇反式作用因子来控制行使多功能的多个基因的表达, 体内足迹的研究可以指出某特定的反式作用因子与其结合基序的结合状态同某特定基因行使功能的相关性. 体内足迹类型的改变也可以提供对细胞分化非常重要的顺式作用元件和反式作用因子的重要信息^[2]. 它是研究真核基因调控机理的方法中, 唯一能揭示体内真实存在的蛋白质-DNA 相互作用的方法. 并且可以监测活性染色质结构^[1,4].

体内足迹法通过比较先用烷基化试剂 (或核酸酶) 处理活细胞再提取 DNA 样品和先提取 DNA 样品再用烷基化试剂处理的 DNA 样品的结果来揭示体内蛋白质-DNA 的相互作用. 硫酸二甲酯 (dimethyl sulfate, DMS) 是最常用的烷基化试剂, 因为它可以自由出入细胞膜, 进到细胞核中, 使基因组 DNA 甲基化, 蛋白质结合在 DNA 上以后, 常改变 DMS 对于 G 和 A 残基的接触, 纯化了 DNA 后, 体内、体外用 DMS 处理的 DNA 样品, 用吡啶在甲基化的 G 或 A 残基上断裂, 然后进行 LM-PCR 分析^[10].

体内足迹研究中最常用的是分析 G 残基的 N-7 位置的反应性, 因为 G 残基位于 DNA 的大沟中, 而且是多数情况下的蛋白结合位点, 如果细胞核中的 DNA 对于 DMS 具有相同的反应性, 则所有反应性残基将被修饰到同一程度, 而蛋白因子对于某位点的结合将改变 G 残基的反应性. 在大沟中的蛋白质-DNA 相互作用将保护 G 残基的 N-7 位置不被甲基化而使反应性降低.

甲基化反应后, 基因组 DNA 被纯化出来, 用吡啶裂解甲基化的 G 残基 (和 A 残基), 用 LM-PCR 扩增特定的 DNA 片段, 然

后再在测序胶上分离 DNA 片段. 每条带的强度反应了活细胞中相应 G 残基对于甲基化的反应性, 通过比较对照 DNA 中 G 残基的反应性, 则可知体内蛋白质-DNA 相互作用的部位^[3] (图 2).

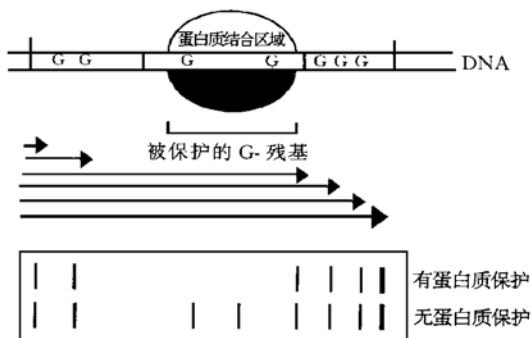


图 2 体内足迹研究原理图

DMS 对于双链 DNA 上的 G 残基的反应性由于蛋白质的结合而去除, 经吡啶处理, LM-PCR 后在电泳结果中, 被保护的区域形成足迹.

LM-PCR 在体内足迹研究中的应用, 使体内足迹法的敏感性大大提高, 所需细胞数目大大降低, 推动了体内足迹研究的进行. 在体内足迹研究与 LM-PCR 的选择性和特异性有关的因素有两个: a. 细胞数目; b. 细胞纯度. 如果 PCR 扩增前的细胞数目小于一定的量值, 则可导致扩增后的带的强度不一致甚至缺少某些带. 实际中为了防止这种情况出现, 每个反应所用的细胞数目不应少于 3×10^5 个. 体内足迹影响 LM-PCR 结果的第二个因素是细胞的纯度, 体内足迹研究要求细胞具有均一性, 即细胞处于同一表达状态, 如果所研究的细胞具有基因表达水平、分化阶段或细胞类型的异质性, 则不会得到均一的蛋白质-DNA 的相互作用. 从而使体内足迹研究结果背景不清, 模糊一片^[4].

3 LM-PCR 在其他方面的应用

自 LM-PCR 发明以来, 除在体内足迹研究方面发挥了重要的作用, 还极大地促进了另外一些研究的进行. 由于 LM-PCR 的高灵敏

度,使得它在染色质损伤研究^[6],序列测定^[7],甲基化类型研究^[7,11],复制元结构研究及染色质结构与细胞记忆关系的研究^[13~15]中也发挥了巨大威力,相信随着这一方法的健全和完善会在更多的研究领域发挥它的作用。

参 考 文 献

- 1 Strauss E C, Andrews N C, Higgs D R *et al.* *in vivo* footprinting of the human α globin locus upstream regulatory element by guanine and adenine ligation-mediated polymerase chain reaction. *Mol Cell Biol*, 1992, **12** (5): 2135~ 2142
- 2 Ikuta T, Kan Y W. *in vivo* protein-DNA interactions at the B-globin gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 10188~ 10192
- 3 Becker P B, Schutz G. *Genetic engineering*. New York: Plenum Press, 1988. 1~ 19
- 4 Mueller P R, Wold B J. *in vivo* footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science*, 1989, **246**: 780~ 786
- 5 Garrity D A, Wold B J. Effects of different DNA polymerases in ligation-mediated PCR: enhanced genomic sequencing and *in vivo* footprinting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 1021~ 1025
- 6 Rodriguez H, Drouin R, Holmquist G P *et al.* Mapping of copper/hydrogen peroxide-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Cell*, 1995, **270** (29): 17633 ~ 17640
- 7 Pfeifer G P, Steigerwald S D, Mueller P R *et al.* Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science*, 1989, **246**: 810~ 813
- 8 Quivy J P, Becker P B. An improved protocol for genomic sequencing and footprinting by ligation-mediated PCR. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (11): 2779~ 2781
- 9 Tormanen V T, Swidershi P M, Kaplan B E *et al.* Extension product capture improves genomic sequencing and DNase I footprinting by ligation-mediated PCR. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (20): 5487~ 5488
- 10 Brunvand M W, Krumm A, Groudine M. *in vivo* footprinting of the human IL-2 gene reveals a nuclear factor bound to the transcription start site in T cells. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (20): 4824~ 4829
- 11 Reddy P M S, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T *et al.* Genomic footprinting and sequencing of human B-globin locus. *J Biol Cell*, 1994, **269** (11): 8287~ 8295
- 12 Dimitrova D S, Giacca M, Demarchi F *et al.* *in vivo* protein-DNA interactions at a human DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 1498~ 1503
- 13 Hershkowitz M, Riggs A D. Metaphase chromosome analysis by ligation-mediated PCR: heritable chromatin structure and a comparison of active and inactive X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 2379~ 2383
- 14 Pfeifer G P, Tanguay R L, Steigerwald S D *et al.* *in vivo* footprinting and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Gene Dev*, 1990, **4** (8): 1277~ 1287
- 15 Pfeifer G P, Riggs A D. Chromatin differences between active and inactive X chromosomes reveals by genomic footprinting of permeabilized ligation-mediated PCR. *Gene Dev*, 1991, **5** (6): 1102~ 1113

The Principle of Ligation-Mediated PCR and Its Application in *in vivo* Footprinting Study. JI Xinjun, LIU Depei, LIANG Zhiquan (*State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medical Sciences, PeKIng Union Medical College, Beijing 100005, China*).

Abstract Ligation-mediated PCR is a strategy of single-sided PCR based on ligation. First, a common linker is linked to one end of DNA fragments, then DNA sequence is amplified between the common linker and a sequence-specific primer. The application of vent DNA polymerase and strategies of extension products capture and linker tag selection greatly improves the sensitivity of ligation-mediated PCR. The invention of this technique has facilitated the execution of *in vivo* footprinting study.

Key words ligation-mediated PCR, linker, *in vivo* footprinting