

新技术讲座

生物分子相互作用分析技术应用实例 (二) ——多聚物和转录蛋白的研究

沈 平

(发玛西亚生物技术(中国)有限公司北京代表处, 北京 100086)

摘要 BIA 技术 (biomolecular interaction analysis) 即生物分子相互作用分析技术的应用范围相当广泛. 这里介绍利用 BIAcore 研究信号传导中各蛋白质之间的相互作用及多聚物的形成及机理以及转录调节蛋白与启动子 (DNA) 的研究.

关键词 信号传导, 聚合物, 磷酸化, 调节蛋白, 启动子

1 信号传导机理研究

利用 BIA 技术, Schuster 教授和他的研究组得以详细研究细菌的趋化性信号传导机理——参与信号传导的各种蛋白质如何相互作用, 蛋白质的磷酸化在信号传导中的作用. 在 *E. coli* 中, 趋化蛋白 A (chemotaxis A, CheA) 可以磷酸化 CheY (决定细菌鞭毛的转动方向) 和 CheB (受体调节蛋白), 而受体 (Tar) 对 CheA 的调节需通过联结蛋白 CheW^[1] (图 1).

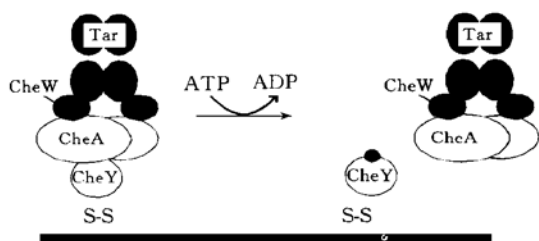


图 1 在传感片上信号传导四聚物形成示意图
将 CheA 偶联于传感片上, CheY、CheA、CheW 和相应的受体 Tar 形成四聚物.

图 2 和图 3 为部分实验结果图谱. 利用 BIA 技术充分证明了以前未能观察到的 CheY

和其他有关蛋白之间的相互作用 (图 1). BIA 技术可以实时追踪每个生物分子相互作用的反应^[2], 结果表明当 CheA、CheW 和 Tar 先在溶液中混合后才能与 CheY 形成信号传导四聚体. 并揭示了蛋白磷酸化在信号传导中的作用是将结合的多聚物从 CheY 上解离下来, 从而

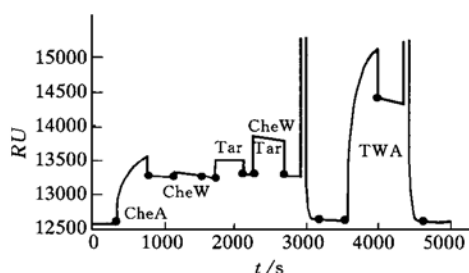


图 2 有关蛋白分别或混合后与偶联于传感片上的 CheY 结合

传感图显示了 CheA 激酶能单独和传感片上的 CheY 结合. 然而这一结合改变了激酶的构象使它不再能和受体 Tar 或 CheW 结合. 只有在上样前先混合, CheA 才能与 CheW、Tar 结合, 而这一复合物能和传感片上的 CheA 形成稳定的四聚体. 这实验的最显著优点在于能追踪每次上样的全过程而不仅仅是终点测定.

收稿日期: 1996-12-25, 修回日期: 1997-03-17

起到调节作用. 这与已知的信号传导机理相符.

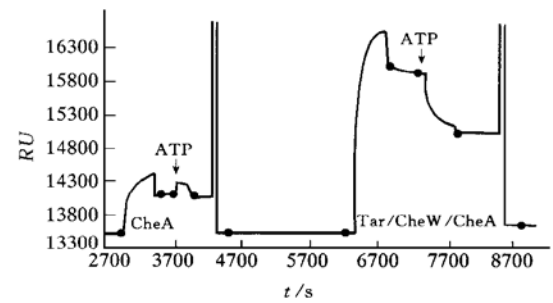


图 3 ATP 的作用

CheY 和 CheA 之间的相互作用并不受 ATP 加入的影响, 然而 ATP 的加入能使四聚体迅速解离. 从这一实验和其他的对照实验可总结出: CheY 被 CheA 磷酸化后能促进整个复合物的释放. CheA 只有和 CheW/ Tar 结合后才能磷酸化 CheY.

信号传导中有关蛋白的相互作用对于增加底物的特异性和防止其与其他系统有交叉反应具有重要意义.

Schuster 教授等用的这一技术的基本原理提示了 BIA 技术可以用于其他的由受体引导的信号传导系统的研究. 在传导片表面形成有生物活性的信号传导复合物为详细研究调节细胞内外通信的特异相互作用提供了新的方法.

2 癌基因 ETS1 表达蛋白和特异的 DNA 调控区结合

ETS1 癌基因蛋白能和一些基因的 DNA

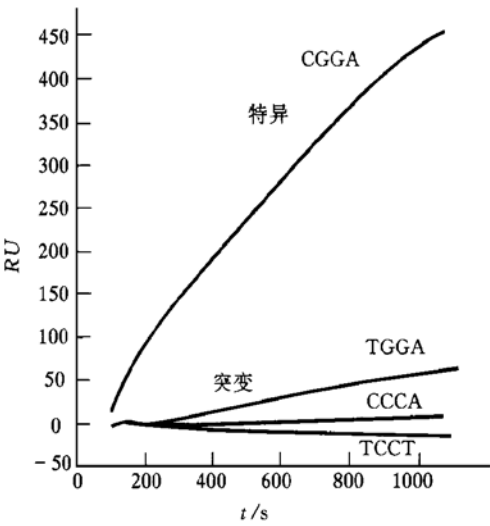


图 4 ETS1 与特异和突变的 DNA 片段结合

含生物素的 ETS 1 特异结合的 DNA 和突变的 DNA 片段以捕获的方式偶联于传感片上. 经纯化及复性后的 ETS 1 只与特异 DNA 片段 (含 CCGGAAGT) 结合而不和突变的 DNA 片段结合. 结合后的 ETS1 可用 0.05% SDS 洗脱, 含 DNA 的传感片可重复使用几百次.

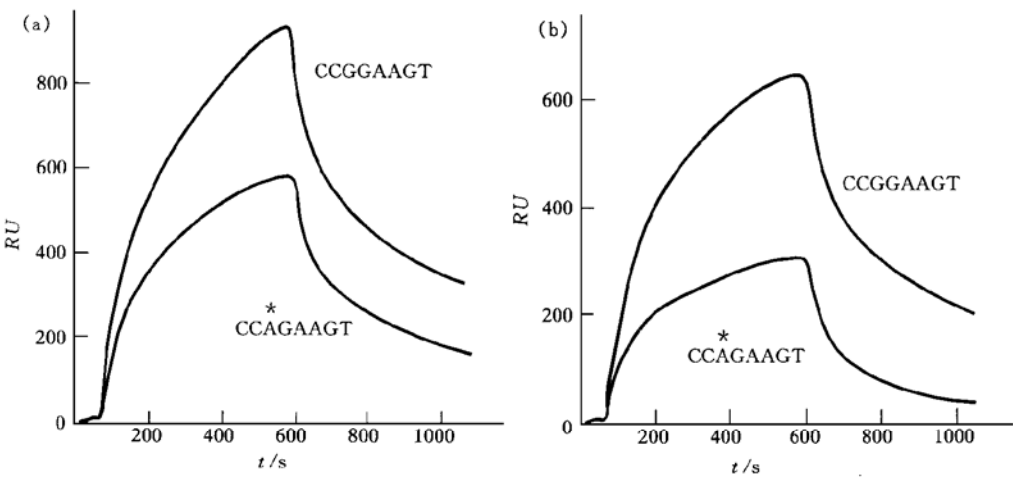


图 5 来源于 ETS1 的合成多肽³⁶⁴K37N⁴⁰⁰与特异和突变 DNA 片段的结合

(a) 将浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 K37N 多肽加入含双链 DNA 片段的传感片上, 它和特异 DNA 的结合量是突变 DNA 的两倍. (b) 在多肽溶液中加入 200 $\mu\text{g/L}$ 多聚脱氧肌苷酸-脱氧胞苷酸 (Df-DC) 寡核苷酸以降低非特异结合, 从而 K37N 多肽与特异 DNA 的结合大大高于点突变的 DNA. 实验证明此 37 氨基酸多肽为 ETS1 蛋白与 DNA 结合的功能基团.

调控区结合从而调节此基因的表达^[3,4]。以前的研究已确定能和 ETS1 结合的 DNA 序列。这里利用 BIAcore, Fisher 博士等^[5]揭示了 ETS1 蛋白和偶联在传感片上含 ETS1 结合序列 DNA 的结合,并用合成的含 37 氨基酸的多肽(从蛋白质序列 364~ 400 共 37 个氨基酸)证明了 ETS1 蛋白的结合区域(图 4, 5)。

参 考 文 献

- 1 Bourret R B, Borkovich K A, Simon M A. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, 1991, **60**: 401~ 441
- 2 Schuster S C, Swanson R V, Alex L A *et al.* Formation of a quaternary signal transduction complex. *Nature*, 1993, **365**: 343~ 346
- 3 Gunther C V, Nye J A, Bryner R S *et al.* Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ETS-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev*, 1990, **4**: 667~ 679

- 4 Ho I C, Bhat N K, Gottschalk L R *et al.* Sequence-specific binding of human ETS-1 to the T-cell receptor alpha gene enhancer. *Science*, 1990, **250**: 814~ 818
- 5 Fisher R J, Baxevasis A D, Mavrothalassitis G *et al.* The interaction between the nuclear oncoprotein ETS1 derived peptide with specific and mutant DNA studied with BIA. *BIA symposium*, 1992, **2**: 44~ 46

Research Application Using Biomolecular Interaction Analysis Technology: Study of Multiple Complex Formation and Transcription Factor. SHEN Ping (*Pharmacia Biotech (China) Ltd. Beijing 100080, China*).

Abstract BIA Technology has been used to study the mechanism of signal transduction in *E. coli* and the formation of transduction complex. BIA also been used widely in molecular biology research to study the interaction between transcription factor and its operon (DNA).

Key words signal transduction, multicomplex, phosphorylation, transcription factor, operon

(上接第 285 页, Continued from page 285)

- 7 Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1143**: 113~ 134
- 8 Sayre R T, Andersson B, Bogorad L. The topology of a membrane protein: the orientation of the 32 kD Q₁₀-binding chloroplast thylakoid membrane protein. *Cell*, 1986, **47**: 601~ 608
- 9 杜林方, 唐晓松, 梁厚果. 具放氧功能的 PS II 反应中心复合物的分离及其特性. *植物生理学报*, 1992, **18**: 17~ 23
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18. 3~ 18. 86
- 11 Wang J, Zhang L-X, Liu Z-L *et al.* A possible calcium binding site in D1 protein: a fluorescence and FTIR study of the interaction between lanthanides and a synthetic peptide. *Photosyn Res*, 1995, **44**: 297~ 302
- 12 Renger G, Fromme R, Hagemann R. The modification of atrazine binding by redox state of the endogenous high-spin iron binding specific proteolytic enzymes in photosystem II membrane fragments and intact thylakoid. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **935**: 173~ 183
- 13 Besford R T, Thomas B, Huskisson N S *et al.* Characterization of conformers of D1 of photosystem II using site-directed antibodies. *Z Naturforsch*, 1990, **45c**: 621~ 626

Preparation and Identification of Antidodecapeptide of Polypeptide D1 of Photosystem II Reaction Center. LI Xiaopeng, DU Linfang,

LIANG Houguo, WU Wansun (*Department of Biology, Sichuan Union University, Chengdu 610064, China*).

Abstract The dodecapeptide which is located in the hydrophilic loop connecting helix IV and V of polypeptide D1 of spinach, was synthesized and covalently linked to BSA. Then the complex was injected into a rabbit. Nine weeks later, the specific antiserum was obtained, which showed high titer (1: 256) in immunodiffusion. Western blotting showed that there was an immunoaffinity reaction between the antibody and D1 band of PS II reaction center D1-D2-Cyt b559 complex from spinach chloroplasts. Therefore, this antibody can be used as a probe to detect D1 protein and its degraded fragment during photoinhibition.

Key words dodecapeptide (229 ~ 240) of polypeptide D1, photosystem II reaction center, polyclonal antibody for D1, Western blotting