

研究核酸-蛋白质系统的一种凝胶电泳方法

姜 淮 春

(武汉大学生物系, 武昌)

提 要

核酸蛋白质相互作用是生命科学研究的中心课题之一, 凝胶电泳是研究核酸和蛋白质的常用技术。本文试图介绍一种研究核酸-蛋白质系统的凝胶电泳方法, 以及该法在研究基因表达、调控和鉴定、分离 DNA 结合蛋白中的应用。

核酸及其复合物的结构和相互作用很受人们重视, 已有不少关于研究核酸的多型性 (Polymorphism) 及核酸-蛋白质相互作用的方法^[1,2]。1981 年 Garner、Revzin 和 Fried 等分别报道了用凝胶电泳研究大肠杆菌 Lac 操纵子系统中蛋白质对特定 DNA 区间的定量结合, 以及 Lac 阻遏物-操纵基因相互作用的平衡和动力学^[2,3], 此后凝胶电泳被广泛用于研究核酸-蛋白质相互作用和核酸的多型性, 并发展成为鉴定、分离 DNA 结合蛋白的有效方法^[4-6]。

这种凝胶电泳法, 有人称为凝胶阻滞法, 也有人称为凝胶电泳 DNA 结合法。其原理是: 核酸-蛋白质复合物在非变性电泳条件下的凝胶中稳定地保持其生物活性, 复合物与相应的自由核酸分子 (没有结合配体的核酸分子) 在电泳过程中彼此分开, 从而可鉴定迁移率减慢的复合物带。DNA 在凝胶中的迁移率决定于 DNA 分子末端到末端距离的均方, DNA 片段的长短、蛋白质的大小、蛋白质对 DNA 分子不同位置的结合及亲和力的大小影响复合物的迁移率和带的强度^[7,8], 原则上也可用于 RNA-蛋白质系统的研究^[9]; 对复合物系统中的多种成分可以同时研究, 因而较传统的硝酸纤维素滤膜检测法优越^[10]。

凝胶阻滞法的具体使用方法

1. 凝胶的制备

按 DNA 片段的大小和实验要求配制相应浓度的凝胶, 已报道的聚丙烯酰胺凝胶浓度一般为 2.5%—7.5%, 通常是 4% 或 5%, 也有用 11%。电泳缓冲液一般为低离子强度的 TE (Tris-EDTA) 或者 TBE (Tris-Borate-EDTA) 缓冲液, 依反应条件可在凝胶中加入其它成分或使电极缓冲液循环, 有时需要进行预电泳。

2. 样品的制备

将已制备好的含有特定位点的 DNA 片段进行同位素标记后, 同相应的蛋白质在含有必须离子或辅因子的适当溶液中混合、保温, 使其形成复合物, 按实验需要可加入不含专一性结合位点的竞争 DNA 片段。

3. 加样、电泳及分析

结合反应完毕后, 样品立刻加到已制备好的凝胶上, 在不解离的温度条件下进行最短时间的电泳, 可得出理想的分离结果。电泳后, 用溴化乙锭染色后进行荧光密度扫描, 或对电泳后的胶片进行放射自显影。凝胶片上将出现减弱的自由 DNA 带或自由 DNA 带消失, 而出现迁移率较自由 DNA 带小的核酸-蛋白质复合物带。可以将复合物带切下, 进一步研究其组成和性质。

需要强调的是, 从加样到自由 DNA 进入凝胶的这段时间应尽可能短, 以避免复合物在这段时间内分解, 进入凝胶的自由 DNA 量应准确反映出加到凝胶样品池上的自由 DNA

量,因为此法是通过测量自由 DNA 的量来度量形成的复合物量,电泳中因复合物的解离而出现的误差是可以避免的。

核酸-蛋白质复合物带是否能观察到,由以下诸因素决定:复合物自身的内在稳定性;凝胶内盐的浓度和温度;电泳时间等。电泳过程中由复合物解离的 DNA 将位于复合物带与自由 DNA 带之间,形成一片“污迹”,这种现象可以提供二者之间亲和力大小的信息。总之,复合物带是否出现还受电泳条件的影响,如 DNA 促旋酶 (DNA gyrase) 同 DNA 形成的复合物,必须在凝胶缓冲液中存在 5mmole/L Mg^{2+} 时它才是稳定的^[12],而牛痘病毒粒子早期启动子与其专一性结合因子的复合物有 Mg^{2+} 存在时很不稳定^[13]。因此,没有哪种条件能适应所有系统,对每种特殊的系统均应配制最适当的凝胶和样品缓冲液。

在研究工作中的应用

凝胶阻滞法的优点是具有较高的分辨力和对微量物质的分离能力,不仅可以测定 DNA 分子的不同形状及核酸-蛋白质复合物的亲和性,进行热力学和动力学分析,而且能够鉴定、分离与特定 DNA 片段结合的蛋白因子;同足纹(迹)法等相结合,可以分析蛋白质在 DNA 分子上的结合位点和复合物的成分及性质。但是,因缺乏完整的分析迁移率的定量理论,一直阻碍着这种方法的发展。

1. 用于研究蛋白质-DNA 复合物

1980 年有人报道用凝胶电泳研究高迁移率蛋白 HMG14 和 HMG17 同核小体 DNA 的相互作用时发现,在高离子强度和低离子强度的电泳条件下出现不同的凝胶带,这证明低离子强度下的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中,紧密结合的核酸-蛋白质复合物是稳定的^[14]。Revzin 和 Garner 等研究了大肠杆菌 Lac 操纵子调节系统中 Lac 启动子转录调控所涉及的几种因子: cAMP 存在时,代谢降解物基因活化蛋白 (CAP)-野生型启动子复合物出现一个明显比自由 DNA 迁移率小的带,用 L_{S} 启动

子或人工合成的多聚 d(I-C)·多聚 d(I-C) DNA 片段与 CAP 保温,则没有复合物带出现; cAMP、CAP 能刺激 RNA 多聚酶-Lac UV5 启动子复合物带的出现; CAP、启动子片段和 $[^3\text{H}]$ cAMP 复合物凝胶带在 260 nm 处扫描,同含标准量 DNA 相应的峰面积比较,或闪烁法测定 $[^3\text{H}]$ cAMP 在复合物中的含量,结合平衡透析实验,展示了三元复合物中各成分 1:1:1 的化学计量关系^[4]。

分别在凝胶中和溶液中所作的比较实验很有说服力,Revzin 等发展了 Beckman 等用凝胶电泳后原位测定 DNA 和 RNA 多聚酶活性的方法^[8],使 Lac UV5 启动子和此 DNA-RNA 多聚酶复合物在电泳凝胶中适当迁移后,加入核苷三磷酸混合物(其中一种为同位素标记),核苷酸混合物带赶上和超过复合物带,出现了两个较核苷酸移动慢的带,放射自显影定位后,切下各带提取 RNA。分析结果表明,在溶液中所作的平行实验的转录产物同凝胶中的转录产物是一样的。用不同浓度和不同长度的启动子片段,以不同的加样时间进行电泳来测定 CAP-启动子复合物的解离速率,同溶液中的平行实验相比,结果也一致,从而提出这一系统的凝胶阻滞电泳并不存在笼效应(cage effect)^[5,7]。

用电泳法与用硝酸纤维素滤膜法测量大肠杆菌 RNA 多聚酶同 λ PR 启动子的解离速率,其结果一致^[4]; RNA 多聚酶同 Lac UV5 和 Gal PL 启动子的结合研究中,发现一种异常的双相动力学行为,与通过滤膜法所作平行实验的结果十分相符,这说明凝胶电泳法研究这类问题是可行的^[15]。

2. 用于研究蛋白质对 DNA 的作用和探测 DNA 结构的多型性

DNA 分子是柔变的,不同条件下存在各种不同的空间构象变化,甚至可以从经典的 B-DNA 形成左旋的 Z-DNA。凝胶电泳的结果说明 DNA 是弯曲的而不是刚直的,按 Lerman 的观点,弯螺旋比直螺旋的迁移率小^[5]。寄生锥虫动核体提取的 DNA (K-DNA) 片段提供

了一个探索弯曲模型的好材料, K-DNA 在凝胶中表现出异常缓慢的迁移率。当用限制酶切割所获大小相似而序列不同的 K-DNA 片段再进行凝胶电泳时, 发现切点位于弯曲位置中心时迁移率最大, 而弯曲位置处于序列中心则迁移率最小; 以相对迁移率对切点的位置作图, 采用外推法测定 DNA 的弯曲中心。质粒 pJW 37 酶切后的相同长度、不同序列的 DNA 片段也出现明显不同的迁移率, 这说明 DNA 分子中存在自身的弯曲。研究 CAP 与 Lac 启动子相互作用时发现当 CAP 结合到 DNA 中部时, 迁移率最小, 用 Lac 阻遏物代替 CAP 的对照实验表明, 无论阻遏物结合到什么部位都不能出现不同迁移率的带, 因此, CAP-DNA 复合物不同迁移率是由于蛋白质诱导产生的, 同时说明, 基因活化蛋白能诱导 DNA 弯曲, 阻遏蛋白却不能^[5]。

野生型 Lac 启动子和合成的对称性突变体与 CAP 形成的复合物中, 前者的迁移率明显低, 说明野生型在复合物中的弯曲程度大, 但当蛋白质结合位点靠近突变体 DNA 末端时, 迁移率甚至小于相应野生型, Lui-Johnson 等讨论了这种现象, 指出诱导弯曲角度在 90° 至 180° 之间, 因为弯曲角度在这个区间时, 突变体弯曲程度低, 但蛋白质和一边伸出的 DNA 的有效宽度增加, 增大了摩擦阻力, 使迁移率降低^[6]。

用野生型与突变的 $\gamma\delta$ 解体酶 ($\gamma\delta$ resolvase) 分别与 res DNA 保温, 发现野生的能增强足迹(纹)试剂 MPE · Fe(II) 在 res 上的嵌合, 当解体酶结合到 res 中部时, 迁移率最小, 解体酶诱导 DNA 的这种结构变化, 在重组中具有重要意义^[7]。

Stenzel 等作的环化实验十分巧妙, 构建长度相同但结合位点距末端距离不同的 DNA 片段, 5' 末端用 ³²P 标记, 分别在加或不加大肠杆菌寄主整合因子 (IHF) 的条件下环化, 电泳后经放射自显影, 分别测定线性 DNA 的量, 结果加了 IHF 且结合位点位于中部的环化程度是未加 IHF 的两倍, 结合位点位于末端的

与没有加入 IHF 的环化程度一致。这说明 DNA 片段本身就有些弯曲, IHF 增强了弯曲的程度; DNase I 足迹(纹)法得出 IHF 在起点区间保护了 49 个碱基, 甲基保护实验说明 IHF 同 DNA 大沟和小沟中的嘌呤残基结合^[18]。

3. 用于鉴定、分离混合物中 DNA 专一性结合蛋白

用凝胶电泳分离核酸-蛋白质复合物始于 Chelms, 目前凝胶阻滞法得到了充分的发展, 广泛用于鉴定、分离专一性结合因子^[9]将同位素标记的含有专一性位点的 DNA 探针, 与细胞提取液一起保温, 再加入非标记的不含专一性结合位点的 DNA 片段以结合非专一性结合蛋白。电泳、自显影后, 对复合物带进行分析。此法已用于真核生物蛋白因子的鉴定和分离。

Strauss 等曾用 ³²P 标记的卫星 DNA 为探针, 以大肠杆菌 DNA 为竞争物, 利用凝胶阻滞法从非洲绿猴 CV-1 细胞粗提物中鉴定、分离了一种含量丰富的、类似 HMG 蛋白的卫星 DNA 专一性结合因子^[10]。用人工合成的含有结合位点的小 DNA 片段 (40bp) 为探针, 已成功地从猪肝细胞核粗提物中鉴定、分离了核因子 I; 同时检测了酿酒酵母提取物中类似核因子 I 的活性。使用短的探针片段的优点是可以避免非专一性因子的结合, 因为结合了较多非专一性结合蛋白的长片段复合物, 常常被阻滞在凝胶之外^[11]。

Wijnen 等用凝胶阻滞法从人体 HeLa S3 细胞核提取物中部分纯化了一种核蛋白, 这种核蛋白对细胞周期依赖的人体 H₄ 组蛋白基因 5' 侧上游区间具有亲和力。同时发现了一种相似的、也许是相同的核蛋白因子, 该因子专一性结合到 H₃ 组蛋白基因的 5' 侧调控区间, 这类蛋白的研究对于了解组蛋白基因表达的转录调控机理是至关重要的^[6]。

多年沿用硝酸纤维素滤膜分析方法研究核酸-蛋白质相互作用, 由于滤膜法是根据蛋白质和蛋白质-DNA 复合物保留在滤膜上, 对复合物含量直接测定, 所以, 不适于研究多种成分的

乙酰胆碱酯酶与拟胆碱酯酶

董 之 海

(防化研究院,北京)

提 要

胆碱酯酶分为乙酰胆碱酯酶和拟胆碱酯酶两类,这两类酶的分子类型十分相似。许多学者在催化性质、热稳定性及免疫学性质等方面对它们进行了大量的平行性研究,进而对二者的相互关系及拟胆碱酯酶的生理学作用从分子生物学的角度进行了有益的探讨。本文着重叙述了近年来这几个方面主要的研究进展。

胆碱酯酶 (ChE) 分为两类: 一类是真性胆碱酯酶,即乙酰胆碱酯酶 (AChE, EC 3.1.1.7.); 另一类是拟胆碱酯酶 (ϕ ChE), 主要指丁酰胆碱酯酶 (BuchE, EC 3.1.1.8.)。

一、胆碱酯酶的分子类型

按照目前公认的说法,不论是 AChE 还是 BuchE, 都是以六种不同大小的异构体而存在的^[1-4]。每种酶既有不同数量的球型催化亚基组成的分子类型,又有与胶原样尾 (Collagen-

like tail) 结合而构成的不对称形的分子形态,即 ChE 分子类型。一般认为分子类型应是分子大小、形状及表面电荷不同的稳定实体^[1,3]。由于 ChE 分子类型是以相同类型的四级结构为基础对其大分子特征进行比较的,因此, Bon, S. 等^[5]提出,球型的用 “G” (Globular forms) 表示,又可分为 G_1, G_2, G_4 , 尾型的用: “A” (Asymmetric forms) 表示,又可分为 A_4, A_8, A_{12} 。下角的数字表示催化亚基的数目,例如球型单体是 G_1 , 四聚体是 G_4 , 而尾型的三个四聚

复合物,特别是当蛋白质结合到滤膜上后,还可能影响 DNA-蛋白质的相互作用。凝胶阻滞法的应用,消除了这些缺点。然而, Crothers 等的一些实验指出,低离子强度的天然凝胶中,凝胶基质保护了复合物,使复合物增加了稳定性,影响动力学分析结果。所以,这种笼效应是否存在,是否存在复合物同凝胶基质之间的相互作用,还需要进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 林克椿等:《生物物理学报》, 1987, 3(4), 429.
- [2] Garner, M. M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9 (13), 3047.
- [3] Fried, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9(23), 6505.
- [4] Garner, M. M. et al.: *Trends in Biochem. Sci.*, 1986, 11(10), 395.

- [5] Crothers, D. M.: *Nature*, 1987, 325(29), 464.
- [6] Wijnen, A. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15 (4), 1679.
- [7] Revzin, A. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 153 (1), 172.
- [8] Beckman, L. D. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1976, 3 (7), 1727.
- [9] Stark, M. J. R. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1984, 178(2), 303.
- [10] Jones, O. W. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1966, 22(1), 199.
- [11] Schneider, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14(3), 1303.
- [12] Maxwell, A. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259 (23), 14472.
- [13] Yuen, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84(17), 6069.
- [14] Sandeen, G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1980, 8(17), 3757.
- [15] Fried, M. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1984, 172(3), 263.
- [16] Liu-Johnson, H-N. et al.: *Cell*, 1986, 47(6), 995.
- [17] Hatfull, G. F. et al.: *Cell*, 1987, 49(1), 103.
- [18] Stenzel, T. T. et al.: *Cell*, 1987, 49(5), 709.

[本文于 1988 年 2 月 4 日收到]