

技术与方法

DNA 足纹步移作图法*

谭文斌 朱 敏 聂怡玲 罗赛群 成光杰 胡维新 彭兴华**

(湖南医科大学分子生物学研究中心, 长沙 410078)

摘要 一种以 PCR 介导的、可对任意长度靶 DNA 片段上的核蛋白结合位点进行 DNA 足纹作图分析的新方法。原理是: 采用被随机降解靶 DNA 分子作为模板, 用标记的跨越整个模板的足够多条特异性引物进行单链扩增。首先, 利用某种化学试剂或酶如 DNase I 对已与蛋白质结合或未结合的双链靶 DNA 进行随机降解, 在一定条件下使每一个 DNA 分子恰好只有一个位点被切割。然后, 这些被随机降解 DNA 分子即可作为模板, 用同位素标记的跨越整个模板的足够多条特异性引物 (正向或反向) 进行单链扩增。最后, 扩增的单链产物通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影形成 DNA 片段梯队, 而被蛋白质保护的位点则在 DNA 片段梯队中形成位置缺口, 从而确定 DNA 与蛋白质相结合的精确位点。该方法被应用对人干细胞因子基因 5' 旁侧 - 1190 ~ - 273 区域的 DNA 足纹部分作图。

关键词 DNA 足纹分析, 聚合酶链式反应, 人干细胞因子基因

学科分类号 Q78

DNA 足纹法是研究 DNA 与蛋白质相结合的精确定位点的方法。基本原理是利用某种化学试剂或酶如 DNase I 对同位素标记的双链靶 DNA 进行随机降解, 在一定条件下使每一个 DNA 分子恰好只有一个位点被切割。当靶 DNA 与蛋白质相结合后, 其结合位点因被蛋白质保护而不会被降解, 这些被降解的 DNA 片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影形成 DNA 片段梯队, 而被蛋白质保护的位点则在 DNA 片段梯队中形成位置缺口, 从而确定 DNA 与蛋白质相结合的精确位点^[1]。这种方法存在一些局限性。本文将介绍一种以 PCR 介导的、可一次性对任意长度靶 DNA 片段上的核蛋白结合位点进行 DNA 足纹作图分析的新方法 (图 1)。用此方法对人干细胞因子基因 5' 旁侧 - 1190 ~ - 273 区域进行了 DNA 足纹部分作图。

1 材料与方法

1.1 材料

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNase I、HeLa 细胞核抽提物、测序试剂盒及各种限制性核酸内切酶均为 Promega 公司产品; DNA 足纹引物: T7 引物 (5' TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3') 及 SP6 引物 (5' ATTTAGGTGACACTATAGAATAC 3') 为上海生工公司合成。Glassmax-Matrix DNA 回收试剂盒为 Gibco 公司产品; [γ -³²P] ATP 为北京亚辉

公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190 ~ - 273 区域的克隆: 含人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190 ~ + 181 片段的重组质粒 pGEMSCF5' 经 *Pst* I 消化, 自身环化获得含人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190 ~ - 273 区域的重组克隆 pGEMSCF918。用 pGEM 载体上多克隆位点两侧的 T7 及 SP6 引物扩增出含人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190 ~ - 273 区域的片段, PCR 产物经 Glassmax-Matrix DNA 回收试剂盒回收纯化此 918 bp (- 1190 ~ - 273)。

1.2.2 DNA 足纹实验: a. 采用 T7 引物对人 SCF 基因 5' 调控序列自 - 1190 往下游 - 853 区域进行 DNA 足纹步移作图分析: 100 μ l 反应体系中含 100 ng 918 bp 片段, 30 或 80 μ g HeLa 细胞核抽提物, 1 $\times$ 结合缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L KCl, 12.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 20% 甘油, 1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 1 μ g poly [d (IC)], 1 μ g poly L-lysine); 对照组不加 HeLa 细胞核抽提物。b. 采用 SP6 引物对人 SCF 基

* 国家自然科学基金 (39700050 及 39900159) 项目。本项技术已申请国家专利, 注册登记号为: 00113519.8。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805449, E-mail: mbre@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2000-08-24, 接受日期: 2000-09-28

因 5' 调控序列自 -273 往上游 -339 区域进行 DNA 足纹步移作图分析: 100 μ l 反应体系中含 100 ng 918 bp 片段, 60 或 100 μ g HeLa 细胞核抽提物, 1 $\times$ 结合缓冲液 (20 mmol/L Hepes, pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mmol/L EDTA, 1% Tween 20, 1 mmol/L DTT, 1 μ g poly [d (IC)], 1 μ g poly L-lysine); 对照组不加 HeLa 细胞核抽提物. 以上两组结合反应均在室温下孵育 30 min 后加入 100 μ l 钙/镁缓冲液 (5 mmol/L CaCl_2 , 10 mmol/L MgCl_2), 室温下 1 min, 加入 1 U DNase I, 室温下 1 min, 加入 37 $^\circ\text{C}$ 的 200 μ l

终止缓冲液 (200 mmol/L NaCl, 30 mmol/L EDTA, 1% SDS, 100 mg/L yeast RNA). 乙醇沉淀 DNA 片段, DNA 溶于 10 μ l 无菌水中.

1.2.3 PCR 单链扩增 DNase I 降解模板: 取以上被 DNase I 降解的 DNA 溶液 1 μ l 为模板, 用 [γ - ^{32}P]ATP 标记的 T7 或 SP6 引物单链扩增, 同时以 pGEMSCF918 为模板进行 A+G 测序反应. PCR 单链扩增条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 2 min 变性后, 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 50 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min. 以上扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺测序凝胶电泳 (29:1), -70 $^\circ\text{C}$ 放射自显影.

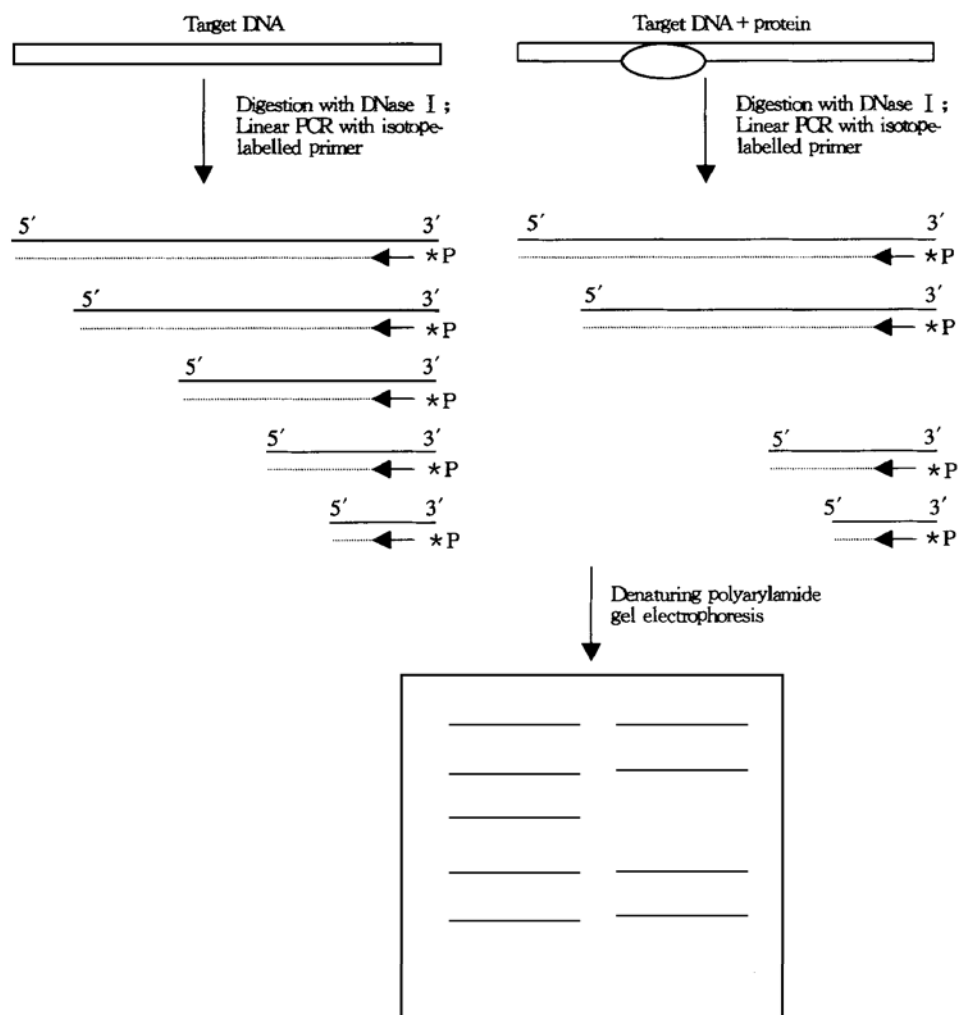


Fig. 1 Principle of DNA footprinting walking map

Using DNase I or some other chemical reagent to partly digest the target dsDNA fragment combined with or without proteins, controlled that one site was cut off. Subsequently, these randomly digested smaller DNA were used as templates in linear PCR with a isotope-labelled primer, which was on one of the two ends of target DNA. A specific anti-sense primer was displayed here for an example. Then the linear PCR products of labelled ssDNA were separated by denaturing polyarylamide gel electrophoresis. At last, the result of autoradiography analysis demonstrated the combining sites in the target DNA by appearance of a "gap" in the sequence ladder of protein-bound DNA compared to the pattern of unbound or unprotected DNA.

2 结 果

已有的研究表明, 人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190~ - 853 和 - 273~ - 339 为两个新的调控元件, 在 HeLa 和 MCF 细胞中对 SV40 和自身启动子均分别发挥增强子或抑制子的功能. EMSA 结果证实这两区域均存在多个核蛋白结合位点^[2,3]. 于是我们用引物 T7 从人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190 往下游

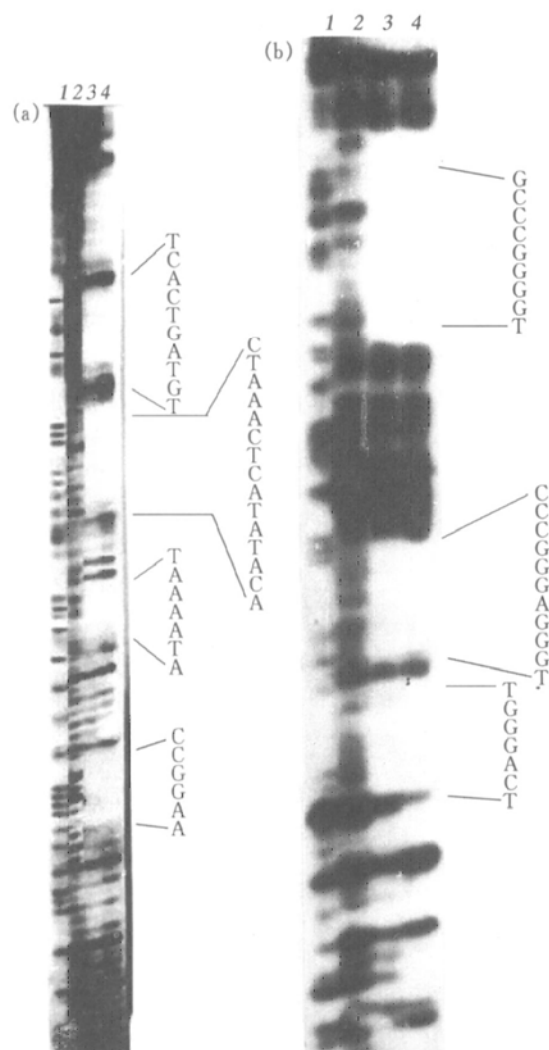


Fig. 2 Part of DNA footprinting walking map of the region - 1190~ - 270 of 5'-flanking hSCF gene

(a) analysis of DNA footprinting walking map from - 1190 of 5'-flanking hSCF by T7 primer. 1: reaction of A+ G; 2: control of loong DNA probe of 918 bp fragment, no proteins; 3: test of 100 ng DNA probe of 918 bp fragment with 30 µg HeLa nuclear extract; 4: test of 100 ng DNA probe of 918 bp fragment with 80 µg HeLa nuclear extract. (b) analysis of DNA footprinting walking map from - 273 of 5'-flanking hSCF by SP6 primer. 1: reaction of A+ G; 2: control of loong DNA probe of 918 bp fragment, no proteins; 3: test of 100 ng DNA probe of 918 bp fragment with 30 µg HeLa nuclear extract; 4: test of 100 ng DNA probe of 918 bp fragment with 80 µg HeLa nuclear extract. the DNA binding sites were displayed on the figure.

- 853 区域进行了 DNA 足纹步移作图分析, 在已作图范围内初步得到四个可能的结合位点: - 1183~ - 1178, “CCGGAA”; - 1142~ - 1136, “TAAAATA”; - 1127~ - 1113, “CTAAACTCATATACA”; - 1095~ - 1086, “TCACTGATGT”. 从而进一步揭示了该区域调控功能的基础.

若采用相同的结合条件用引物 SP6 从人 SCF 基因 5' 旁侧 - 273 往上游 - 339 区域进行了 DNA 足纹步移作图分析: 当 HeLa 细胞核抽提物为 30 µg 时未发现明显的蛋白质保护区; 当 HeLa 细胞核抽提物为 80 µg 时, - 273 位点上游蛋白质保护区较弥漫且广泛, 较难得到准确的结果 (资料未显示). 于是我们改变了 DNA 与蛋白质结合的条件, 将结合缓冲液的离子浓度和种类进行了调整, 并加大核抽提物的用量, 再次对人 SCF 5' 旁侧区域 - 273~ - 339 内可能的蛋白质结合位点进行了作图, 结果显示存在三个足纹区: - 339~ - 330, “GCGGGGT”; - 309~ - 299, “CCGGGAGGGT”; - 294~ - 288, “TGGGACT” (图 2). 其中划横线区为 AP-2 结合位点. 从而进一步证实了人 SCF 基因 5' 旁侧 - 273~ - 339 为一个新的抑制子^[2,3].

3 讨 论

我们通过克隆人 SCF 基因从翻译起始位点 + 181 至 5' 旁侧 - 1190 共 1372 bp 片段, 用报告基因及电泳迁移率变动分析 (EMSA) 方法研究表明: 在人宫颈癌细胞株 HeLa 和人乳腺癌细胞 MCF-7 株中, 人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190~ - 853 片段为 AT 富集区, 对 *luc* 表达有明显的增强作用, 而 - 339~ - 273 片段则显示有抑制作用^[2~5]. 同时 CAT 报告基因进一步表明人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190~ - 853 区域转录调控活性具有组织细胞特异性, 在不同的细胞中可能发挥转录增强或抑制作用^[6]. 本文通过这一新的 DNA 足纹分析方法进一步证实了人 SCF 基因 5' 旁侧 - 1190~ - 853 和 - 339~ - 273 均存在多个与 HeLa 细胞核抽提物结合的模体, 为今后揭示其转录调控的本质奠定了良好的基础.

传统的 DNA 足纹分析法对分析的片段长度有一定限制, 一般以 400 bp 较理想, 当结合位点离标记末端 300 bp 或更远时, 需要更长的电泳时间而且 DNA 片段梯队带型将很不尖锐, 信号较弱. 因此进行长片段 DNA 足纹时需将 DNA 片段切割成小片段并进行多次标记, 结合和 DNase I 消化反

应, 步骤繁琐. 同时, 在进行 DNA 足纹法之前必须经过报告基因分析和 EMSA 试验证实某一段 DNA 具有转录活性和存在蛋白质的结合位点. 与传统的 DNA 足纹分析法相比, 本文所介绍的 DNA 足纹作图法具有如下优点: a. 突破了传统 DNA 足纹分析法对靶片段长度的限制. 由于采用被随机降解靶 DNA 分子作为模板, 用标记的特异性引物进行单链扩增, 对于任意长度的靶片段, 只需设计足够多条上下游特异性引物 (引物间跨度约 300 bp), 其扩增产物跨越整个模板, 从而实现了一次性从上下游双向同时对任意长度 DNA 片段上存在的蛋白质结合位点进行精确分析. 因此该方法被形象地称为 DNA 足纹作图. b. 由于该方法采用 PCR 介导, 因此既保证了整个目的 DNA 片段 (无论被蛋白质所保护的区域或未被结合区域) 均被扩增, 又使被 DNase I 降解的各种长度不一的片段获得大量扩增, 富集, 从而使放射性信号更为集中, 所获得的带型更加尖锐, 清晰. c. 传统 DNA 足纹分析法采取先将靶片段用同位素标记, 然后进行与核蛋白结合反应和 DNase I 消化反应, 再经酚、氯仿抽提, 沉淀, 电泳. 本文所介绍的方法先进行核蛋白结合反应和 DNase I 消化反应, 再用标记的特异性引物大量扩增被 DNase I 降解的各种长度不一的片段, 扩增产物直接电泳. 因此, 大大减少了同位素接触时间和污染机会. 同时也避免了放射性切割的问题. d. 对任意长度 DNA 片段, 该方法只需进行一次核蛋白结合和 DNase I 消化反应, 十分简单, 并且大大节省了核蛋白用量. 同时, 作为 PCR 模板的被 DNase I 降解的片段每次用量极少, 剩余的可供存于 -20℃ 或 -70℃ 作为下次备用, 十分方便. e. 长片段 DNA 足纹作图可了解在 DNA 链自然结构状态下与各种核蛋白结合的实际情况. 由于每一个 DNA 与蛋白质结合区域的功能均受临近甚至远端 DNA 区域的影响, 如共同竞争相同或相近的核蛋白或发生结构的改变等, 显然传统 DNA 足纹分析法由于受靶 DNA 片段长度的限制无法反映这种 DNA 模体间相互作用的关系和结果. 而 DNA 足纹

作图法克服了这一缺点, 它可以一次性对任意长度 DNA 片段上存在的蛋白质结合位点进行精确分析, 更能反映自然状态下 DNA 模体间相互作用的关系和结果. f. 现在人们进行基因转录调控研究时往往先进行报告基因分析和 EMSA 的初筛实验, 再进行 DNA 足纹分析. DNA 足纹作图法可以作为一种研究基因转录调控时的首选和初筛方法, 改变基因转录调控研究的策略. 利用它可以先直接对任意长度目的 DNA 片段进行蛋白质结合位点的作图, 再对具体的 DNA 与蛋白质结合区进行报告基因分析和 EMSA 以研究其功能, 这样目的性更强, 免去了中间繁琐的克隆环节, 也更为简便, 具有较好的实用性.

参 考 文 献

- 1 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 490~498
Lu S D. Current Protocols for Molecular Biology. Beijing: Publish House of Advanced Education, 1993. 490~498
- 2 谭文斌, 聂怡玲, 郭小珊, 等. 人干细胞因子基因 5' 旁侧序列的克隆和功能研究. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (4): 425~429
Tan W B, Nie Y L, Guo X S, *et al.* Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 16 (4): 425~429
- 3 成光杰, 徐海明, 谭文斌, 等. 人干细胞因子的 cDNA 克隆. 湖南医科大学学报, 1996, 21: 301~304
Cheng G J, Xu H M, Tan W B, *et al.* Bulletin of Hunan Medical University, 1996, 21: 301~304
- 4 谭文斌, 成光杰, 李卫民, 等. 重组人干细胞因子在大肠杆菌的表达及活性检测. 生命科学研究, 1999, 3 (1): 48~52
Tan W B, Cheng G J, Li W M, *et al.* Life Science Research, 1999, 3 (1): 48~52
- 5 谭文斌, 聂怡玲, 罗赛群, 等. 定量 RT-PCR 中人干细胞因子的 RNA 竞争性参照标准的构建. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (3): 315~318
Tan W B, Nie Y L, Luo S Q, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2000, 27 (3): 315~318
- 6 聂怡玲, 谭文斌, 朱 敏, 等. 人 SCF 基因 5' 旁侧 AT 富集区 -1190~-853 功能研究. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17 (3): 315~318
Nie Y L, Tan W B, Zhu M, *et al.* Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 17 (3): 315~318

A Method of DNA Footprinting Walking Map^{*}

TAN Wen-Bin, ZHU Min, NIE Yi-Ling, LUO Sai-Qun,

CHENG Guang-Jie, HU Wei-Xin, PENG Xing-Hua^{**}

(Molecular Biology Research Center, Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

Abstract A novel method was developed to prepare for PCR-mediated DNA footprinting walking map. This method is based on the amplification of the cleaved strands using multi-specific primers to walk along the whole DNA template. At first, long enough target DNA fragment without being labeled is incubated in the presence or absence of nuclear proteins and cleaved randomly on average once by either a chemical reagent or an enzyme such as DNase I. Then the labeled multi-specific primers (sense or antisense) are utilized to amplify the cleaved DNA template to produce labeled single strands which can walk along the whole template. At last, the single strand DNA is separated by electrophoresis in a denaturing polyacrylamide gel, followed by autoradiography analysis. The result is the appearance of a “gap” in the sequence ladder of protein-combined DNA compared to the pattern of unbound or unprotected DNA. This method can footprint walking along any length of DNA template in one time theoretically if enough specific primers are utilized. This method was applied to investigate the partial footprinting map of 5' flanking region from -1190 to -273 of human stem cell factor gene.

Key words DNA footprinting, PCR, human stem cell factor gene

^{*} This work was supported by a grant from National Nature Science Foundation of China (39700050 and 39900159).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-731-4805449, E-mail: mbrc@public.cs.hn.cn

Received: August 24, 2000 Accepted: September 28, 2000