

提高易自聚合蛋白质与核酸相互作用效率的一种简单方法*

王莹 孙达权 刘定干**

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 对蛋白质、DNA 和 RNA 的相互作用(结合)的研究是分子生物学的基本课题。多数 DNA 和 RNA 的结合蛋白都具有自聚合倾向, 在体外实验中会造成难以和 DNA 或 RNA 形成结合物而影响实验的结果。用荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记蛋白质能显著抑制这种自聚合倾向, 而大幅度提高其与核酸分子的结合效率。这一简单方法已用于在细胞角蛋白 18 与转录因子 C/EBP β 3' UTR RNA 结合研究中。

关键词 抑制自聚合, 核酸蛋白相互作用, 荧光素异硫氰酸酯(FITC)

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00358

蛋白质和 DNA、RNA 三者之间的相互作用是生物体最根本的生命活动, 也是分子生物学研究最基本的课题。由于这些相互作用最常在细胞内的各种生物大分子结合物或细胞器中进行, 有关的蛋白质和核酸分子相互间具有专一的物理接触, 这些蛋白质大多数都具有相互结合或自身聚合的倾向。因而, 当体外(*in vitro*)进行有关的机制研究时, 这种倾向就使提纯的这些蛋白质和核酸相互作用(结合)的效率大幅度降低, 甚至要得到纳克(ng)以上数量级的结合产物都很困难^[1]。这对于研究它们的功能是一个很大的挑战。因此, 研究工作者们也发明了各种增加蛋白质与其靶分子的体外相互作用效率的方法(例如文献[2])。这里我们介绍一种降低蛋白质自聚合倾向的简单方法。

我们此前已发现, 细胞角蛋白(CK)18 与转录因子 C/EBP β mRNA 的 3'非翻译区(UTR)有专一的相互作用^[3]。为了具体了解 CK18 分子上 C/EBP β 3' UTR 的结合位点, 阐明 C/EBP β 3' UTR 肿瘤抑制功能的分子机制^[4-6], 需先提纯这个结合位点的短肽段, 再进行蛋白质质谱分析, 这是最简便的方法。为此, 需要制备比较多量的(几微克至几十微克)纯结合位点肽。此前, 已经在细菌中表达和纯化了 CK18。但是, 作为一种细胞骨架的组分,

CK18 具有很强的自聚合、形成团聚物的倾向。这使得 CK18 蛋白只能被保存在含高浓度(8 mol/L)尿素的缓冲液中, 从而对它与 C/EBP β 3' UTR RNA 的结合造成了难题。

为了得到 CK18 蛋白与 C/EBP β 3' UTR RNA 的专一结合物, 我们设计了几种方法。这里仅介绍其中非常简单的一种, 即用荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记 CK18 的方法, 供同行参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

重组人 CK18 蛋白系我组在 *E. coli* 中表达和制备(人 CK18 全长 cDNA 为上海肿瘤研究所万大方惠赠)。转录因子 C/EBP β 3' UTR RNA, 从其全长 cDNA 克隆(购自 Invitrogen 公司)经亚克隆和体外转录(使用 Promega 公司的 RiboMax 大规模制备

* 国家自然科学基金资助项目(30670449, 30540079, 30970585), 国家科技重大专项“重大新药创制”(2009zx09301-001)和分子生物学国家重点实验室开放课题组运行费资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54921135, E-mail: dgliu@sibs.ac.cn

收稿日期: 2010-07-07, 接受日期: 2010-08-23

RNA 试剂盒)制备. FITC 为我所阮康成研究员惠赠, 或购自 Sigma-Aldrich 公司. Sephadex G-75 superfine 购自 Amersham-pharmacia 公司. TSK-GEL 5000PWxl 体积排斥型 HPLC 柱购自 TOSOH 公司.

1.2 方法

1.2.1 用 FITC 标记 CK18. 用 FITC 标记 CK18 的方法与常规标记抗体的方法基本相同. 由于标记反应不受尿素影响, 反应可在含 8 mol/L 尿素的缓冲液中进行. 1 mg CK18 (溶于含 8 mol/L 尿素的 PBS)加入 pH 9 的 0.1 mol/L Na_2CO_3 / NaHCO_3 缓冲液, 再加入 0.15 mg 溶于 DMSO 的 FITC, 反应总体积约 0.5 ml, 室温(20~27℃)避光反应 4~6 h. 如蛋白质对高 pH 和变性敏感, 反应可以在 pH8.5 0.1~0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液进行, 并用溶于 DMSO : H_2O = 1 : 6 (16.7%)的 FITC 饱和溶液, 以降低 DMSO 的变性作用. 同时反应温度可降低到 4℃, 反应时间 6 h, 过夜. 反应液过 3 ml 容积的 Sephadex G-75 superfine 柱, 收集第一峰, 用 Bradford 法测蛋白质浓度, 调整到 1 g/L. 避光保存于-20℃.

1.2.2 CK18 与 C/EBP β 3' UTR RNA 的结合和结合效率的鉴定. 体外结合加紫外光交联在 1 $\times$ 结合缓冲液^[4](不加肝素、tRNA 和蛋白酶抑制剂)中进行. 10~50 μg CK18 与大约等量的 C/EBP β 3' UTR RNA 混合, 0℃下在通量约 1.7 mW/cm² 的 254 nm 紫外光(利用紫外光凝胶观察灯)下照射 30 min. 照射后, CK18 与 C/EBP β 3' UTR RNA 的结合效率用体积排斥型 HPLC、琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳 3 种分析方法鉴定. HPLC 在伍丰 P100 型高效液相层析仪(上海伍丰公司)上进行.

2 结 果

2.1 FITC 标记前后 CK18 的自聚合性质

CK18 原来自聚合倾向很强, 用透析或凝胶过滤层析除去尿素后, 都会变成固态物, 而且基本不溶于不含变性剂的缓冲液. 经过 FITC 标记后, 用普通的蛋白质缓冲液(如 PBS)即容易溶解为澄清溶液, 不留沉淀, 经-20℃保存数月后仍保持这种性质.

2.2 FITC 标记前后 CK18 与 C/EBP β 3' UTR RNA 的结合性质和效率

我们用常规^[3]结合反应加紫外光交联反应^[4], 使 CK18 与 C/EBP β 3' UTR RNA 的结合物形成稳

定的共价结合, 然后用各种分离分析方法对反应液中这种结合物的量做了定性和半定量分析(图 1, 2). 在 FITC 标记之前, 结合反应液中上述结合物的量极少, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中甚至用银染色都不能检出(图 1a, 图 1b). 而在 FITC 标记之后, 一半以上的 C/EBP β 3' UTR RNA 已与 CK18 形成结合物, 可以用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 2a)、1%琼脂糖凝胶电泳(图 2b)清楚地看到, 在 HPLC 谱图(图 2c)中可见结合物的大峰, 在未结合的 CK18 和 C/EBP β 3' UTR RNA 之前出现. 综上所述, 经过 FITC 标记后, CK18 的自聚合倾向得到了很大的抑制, 其与 C/EBP β 3' UTR RNA 的结合产率也有了很大的提高, 完全可以满足制备用于蛋白质质谱测定的结合位点肽的要求. 实际上,

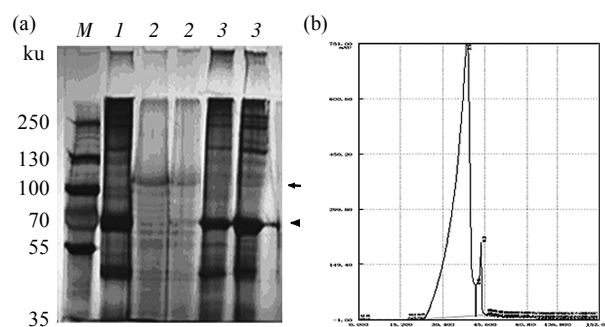


Fig. 1 CK18 and C/EBP β 3' UTR RNA before FITC labeling

(a) 10% PAGE, silver staining. M: Molecular mass markers; 1: CK18 protein expressed in *E. coli*; 2: C/EBP β 3' UTR RNA; 3: Mixture of CK18 and C/EBP β 3' UTR RNA irradiated with UV, no complex formed. Thin arrow shows C/EBP β 3' UTR RNA in the mixture; triangle shows CK18. (b) Size-exclusion HPLC of the mixture: no complex peak was formed. The RNA peak appeared at about 37 min. The CK18 was removed by filtration before loading on column(samples for HPLC must be filtrated before loading, lest damage the column).

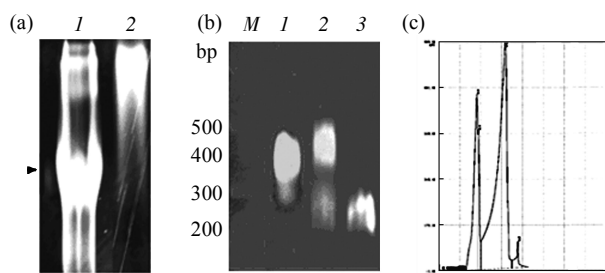


Fig. 2 CK18 after FITC labeling and C/EBP β 3' UTR RNA

(a) 10% PAGE, under UV. (b) 1% agarose, under UV. (c) Size-exclusion HPLC, a complex peak is seen before the peak of non-reacted substances (compared with Figure 1b).

我们已经用此法制备了结合位点肽, 并已用于对该肽系列的质谱测定, 初步得到了较好的结果(未示出).

3 讨 论

众所周知, 标记了荧光染料的抗体蛋白仍然保留专一结合抗原的特性. 因此, FITC 标记基本上不会破坏蛋白质与功能有关的高级结构. 设想, 如果把 CK18 与荧光染料结合, 它是否也能保留与作为靶的 RNA 分子专一结合的性质呢? 为此, 在尿素存在下, 对 CK18 进行了 FITC 标记, 发现标记了 FITC 的 CK18 自聚合倾向大大降低, 可以在不含尿素的缓冲液中保存而不形成团聚体. 但仍保留了与 C/EBP β 3' UTR RNA 专一结合的性质. 由于可溶在无尿素的缓冲液中, CK18 容易与 C/EBP β 3' UTR RNA 结合, 得到微克以上的结合产物. 这就为制备结合位点肽铺平了道路.

CK18 是线型分子, 分子中部有一长的杆状区^[7], 分子间可以杆状区平行排列的方式形成聚合物. 因此可以设想, 如果在杆状区内有氨基酸侧链被 FITC 所标记, 则聚合物的形成将被抑制. 只要 FITC 在标记反应液中的浓度适当(这是常规标记方法所规定的), 蛋白质分子中被 FITC 修饰的基团不多, FITC 标记就不至于影响蛋白质与生物活性有关的结构. 而在做蛋白质质谱分析时, FITC 残基将被从肽链上分离, 因此不会影响分析结果.

这一方法是否适用于其他蛋白质? 首先, 这些蛋白质必须能耐受 FITC 标记的反应. 虽然一般的 FITC 标记反应在 pH9 下进行, 但我们用过 pH8.5 的磷酸钠缓冲液, 而且标记反应可在 4℃ 下进行(6h 至过夜). 同时, 也用溶于 16.7% DMSO 水溶液的 FITC 饱和溶液, 以此标记蛋白质, 可以降低 DMSO 使蛋白质变性的作用. 在这样的条件下, 我们做了对限制酶 *EcoR* I 和 *BamH* I 的 FITC 标记反应, 结果是 *EcoR* I 完全失活, 但 *BamH* I 却保

留了部分活性(图未示出). 考虑到限制酶蛋白比较易于失活的特点, 及常用 FITC 标记抗体蛋白的实践, 我们认为 FITC 标记尚属比较温和, 而且反应条件按蛋白质的性质可以有一定程度的调整, 因此可以做到对于蛋白质天然状态的损害较小. 总之, 当研究遇到蛋白质具有自聚合倾向、因而妨碍工作进展的问题时, 我们的方法至少对于象细胞骨架蛋白这样的、对高 pH 比较不敏感而又有高度自聚合倾向的蛋白质, 有其应用的价值.

致谢 上海肿瘤研究所万大方研究员赠送人全长细胞角蛋白 18 cDNA, 本所阮康成研究员赠送 FITC, 特此致谢.

参 考 文 献

- [1] Kühn-Hölsken E, Dybkov O, Sander B, *et al.* Improved identification of enriched peptide-RNA cross-links from ribonucleoprotein particles (RNPs) by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(15): e95
- [2] Yeh L C C, Lee J C. An *in vitro* system for studying RNA-protein interaction: Application to a study of yeast ribosomal protein L1 binding to 5S rRNA. *Biochimie*, 1995, **77**(3): 67-73
- [3] Liu D G, Sun L. Direct isolation of specific RNA-interacting proteins using A novel affinity medium. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(15): e132
- [4] 刘定干, 野田亮, 王 达, 等. 具有抗癌基因活性的一个 cDNA 克隆. *中国科学 B 辑*, 1991, **7**: 730-737
Liu D G, Ye T L, Wang D, *et al.* *Sci Chin Ser B*, 1991, **7**: 730-737
- [5] 刘定干, 审良静男, 岸本忠三, 等. 回复系 RR 中一种与回复相关的蛋白表达增强. *中国科学 B 辑*, 1995, **25**(4): 372-378
Liu D G, Akira S, Kishimoto T, *et al.* *Sci Chin Ser B*, 1995, **25**(4): 372-378
- [6] Liu D G, Jiang Q H, Fu B B, *et al.* Gene expression profile favoring phenotypic reversion: a clue for mechanism of tumor suppression by NF-IL6 3'UTR. *Cell Research*, 2003, **13**(6): 509-514
- [7] Ku N O, Strnad P, Zhong B H, *et al.* Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology*, 2007, **46**(5): 1639-1649

A Simple Method to Raise Efficiency of Interaction With Nucleic Acids of Self Polymerization-prone Proteins*

WANG Ying, SUN Da-Quan, LIU Ding-Gan**

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract A basic research subject is the study on interactions between proteins, DNA and RNA. Majority of DNA and RNA-binding proteins are self polymerization-prone and may form aggregates that are difficult to bind DNA or RNA, thus hampering experiments. Labeling the proteins with fluorescein isothiocyanate significantly inhibits this tendency and markedly increases the binding efficiency of these proteins to bind nucleic acid molecules. This simple method has been utilized in the investigation on binding of C/EBP β 3' UTR RNA by cytokeratin 18.

Key words self polymerization inhibition, interactions between nucleic acids and proteins, fluorescein isothiocyanate

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00358

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30670449, 30540079, 30970585), National Science and Technology Major Project "Key New Drug Creation and Manufacturing Program", China (2009zx09301-001) and The State Key Laboratory of Molecular Biology.

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54921135, E-mail: dgliu@sibs.ac.cn

Received: July 7, 2010 Accepted: August 23, 2010