

交联法在分子生物学研究中的应用

贺 福 初

(军事医学科学院放射医学研究所,北京)

提 要

本文概要介绍了交联法用于阐明染色质、核小体、病毒粒子、核糖体结构、观察 HS70 基因-组蛋白等七种核酸-蛋白质复合物中大分子相互作用的实例;列举了它在 DNA 构象、RNA 立体结构及 mRNA、tRNA、snRNA、hnRNA、rRNA 间相互作用等研究中的应用。从文中可以看出,交联法的应用范围遍及遗传信息储存的高级结构、转录体系及调控、翻译系统及调控等分子生物学研究的几个主要侧面。

随着分子生物学的不断深入,人们逐渐认识到大部分重要生命活动并不是归结于单一生物大分子的功能,而是依赖于两种或两种以上生物大分子的严格时空控制的相互作用。生物大分子的相互作用在分子生物学研究中占居愈来愈重要的位置。过去,X线衍射、圆二色光谱、电镜等物理方法在阐明生物大分子相互作用的工作中作出了很重要贡献。但由于这些方法只限于体外观察,要求复杂、冗长的分离纯化过程,许多结果很难说代表生命活动的真实情况。有些对象(如某些生物大分子复合物实体中心的分子相互作用或瞬间存在的结构等)更是上述方法难以检测的。交联法可通过固定活体内的分子间相互关系,然后进行离体操作分析。在一般情况下,离体的实验条件和过程不会破坏这种被交联固定的空间关系。因而结果的真实性和准确性与以往方法相比,无疑有所改善,所测相互作用距离也短得多,更为可取的是在有些方法失效的情况下也可使用。

交联(Crosslink)是一种共价结合,它既可出现在生物大分子间,也可产生于分子内。交联法利用生物大分子在一定条件下某个(些)功能团能发生化学反应、形成共价结合这一性质,以连接空间上毗邻的两个大分子或同一分子的

两不同组分、从而固定体内、分子间的空间排列关系或其瞬间相互作用方式。形成交联的方法有物理法(主要是 UV 照射)和化学法(双功能试剂处理和核苷酸活泼类似物参入)。其原理均是通过交联因素活化相邻的两功能基团以发生化学反应而形成共价结合。下面会涉及众多交联剂,但由于研究对象迥然相异,所用交联因素及反应条件五花八门,在此难以统一介绍。本文仅就交联法在遗传物质的高级结构、DNA 构象、RNA 立体结构、基因表达的调控、蛋白质合成等研究中的应用作一简述。

一、在研究 DNA-蛋白质 复合物中的应用

DNA 的各级结构以及与其它生物大分子的相互作用直接关系到遗传信息的储存、传递、表达及其调控。

1. 细胞内染色质结构

Solomon 等^[1]利用甲醛介导的 DNA-蛋白质交联研究了体内外 SV₄₀ 的染色质结构,并通过比较体外 lac 阻遏蛋白与 lac 启动子、 α 蛋白与相应的 DNA、血清白蛋白与普通 DNA 三种复合物的实验结果,证明甲醛介导的 DNA-蛋白质交联可作为立体结构探针用于染

色体结构的研究。结果还指出, 交联可作为衡量染色质区域的基因活性状态的指标。

2. 染色质的核小体排列

染色质的核小体排列与基因活性的调控紧密相关。愈来愈多的证据表明染色质不同区域的核小体在 DNA 上以不同方式排列。Lohr 等^[2]所做的交联实验表明, 这是由于组蛋白八聚体对 DNA 顺序的选择性或者说是因 DNA 上核小体排列的周期性所致。而且还表明, 核小体排列方式的不同主要在于核小体核心颗粒以外间隔区的长短不同。

3. 核小体的结构

70 年代以来, 分子生物学的重大进展之一就是初步搞清了核小体结构。其中, 交联法起了举足轻重的作用。根据交联后结果分析, 得出了组蛋白八聚体中各组分的空间排列、各组分单体与 DNA 的空间排列、H₁ 和八聚体与 DNA 的空间排列^[3], 而且还表明: (1) 组蛋白以相同方式与 DNA 双链结合; (2) DNA 与组蛋白交联的位点随组蛋白的间隙变化; (3) 在 DNA 3' 末端结合着 H₃^[4]。

对于 DNA 病毒, 虽不能形成象核小体那样复杂的结构, 但亦以 DNA、蛋白质复合体形式存在。

4. 病毒粒子的结构和 DNA 的装配机制

将腺病毒粒子用 ³²P-磷酸和 ³H-精氨酸同时或分别标记, 随即以 UV 照射, 使空间相邻的核苷酸、氨基酸形成交联。用化学法或酶法部分降解核酸与蛋白质, 然后分析有 ³²P 标记的氨基酸和有 ³H 标记的核苷酸, 发现蛋白 VII、V 在核心内与病毒 DNA 紧密接触, 蛋白 VII 与之结合的结构区域也可通过对交联位点的部分酶解图谱而予以确认。从图谱还可推测出病毒 DNA 的装配机制^[5]。

5. 特定基因-组蛋白复合物

Karpov 等^[6]通过组蛋白与 DNA 的交联发现, 随着热激蛋白 70 基因的转录增加, 编码区域的 H₁ 首先消失, 随后所有的组蛋白都消失。在 DNaseI 敏感区域的 5' 末端未发现任何组蛋白, 并证明这为基因激活所必需。

6. RNA 聚合酶-启动子复合物

RNA 聚合酶只有先识别启动子并与之结合, 才能开始转录。Chenckick 等^[7]通过交联实验确定: 在 lac UV5 启动子与细菌 RNA 多聚酶的作用部位中, α 亚基不与 DNA 结合, 而 β 、 β' 和 σ 亚基与从 +30 到 -47 核苷酸之间的启动子相互作用, 说明启动子的这一段与转录的启动有关。

此外, 交联的研究结果表明, 无论是组蛋白、还是 RNA 聚合酶都是通过赖氨酸盐桥与 DNA 以离子键结合^[4]。

上面, 我们仅列举交联在基因调控的结构基础研究中的两种应用。实际上, 无论是调节基因表达的其它蛋白(或寡肽)因子与 DNA 转录起始段的相互作用, 还是控制基因表达的 DNA 旁侧顺序所形成的迴文发夹结构与特定蛋白或酶的相互作用, 均可用交联法研究。

二、在研究 RNA-蛋白质复合体中的应用

1. RNA 病毒的立体结构

Sgro 等^[8]用异双功能剂(有两个不同的功能基团)处理 BMV 粒子, 使其中的蛋白质与 RNA 交联, 然后用无酚的改良 RDC 分离法提取, 并用反相 HPLC 分析胰酶消化后的交联肽段。结果表明: BMV 外壳蛋白的 188 个氨基酸中只有 N 末端的 80 个氨基酸残基与 RNA 交联。提示两个 α 螺旋(11—19, 20—80)在外壳蛋白-病毒 RNA 的相互作用中十分重要。

遗传信息的表达必须以 RNA 为中介。而 RNA 的中介作用又必须以它们与蛋白质或酶的相互作用为基础。以下几例是交联法在此方面的应用。

2. hnRNA-磷酸化蛋白

hnRNA 剪切机制是分子生物学的重要课题。Schweiger 等^[9]利用 UV 照射分离的肝细胞和脾结节淋巴细胞的胞核, 发现 Poly(A)⁺ hnRNA 与一种磷酸化蛋白交联。这种蛋白的分子量为 110kDa。如果用低浓度 α -鹅膏蕈碱抑制合成 hnRNA 的聚合酶, 这种交联蛋白的相

对量也降低,这两方面均说明此蛋白与 hnRNA 紧密相关。

3. mRNA-帽子识别多肽复合物

真核生物 mRNA 5' 端的帽子结构除使 mRNA 5' 端免受外切酶降解外,还参与 pre-mRNA 的加工。但哪些蛋白或多肽因子参与对帽子结构的识别,一直不清。只有当 Sonenberg 等^[10]引进交联法后,此方面才取得较大进展。他们通过将帽子结构已氧化的 mRNA 与结合于帽子结构中(或附近)的多肽共价交联,首先确定:在兔网织红细胞核小体的高盐洗脱液中,一种 24kDa 的多肽与帽子结构交联。另外,28、50、80kDa 多肽也能以依赖 ATP-Mg²⁺ 的方式与氧化的帽子结构交联。Lee 等和 Edery 等在此基础上用交联法进一步研究,提出了帽子识别因子促进 mRNA-核糖体相互作用的模型,并为 Pelletier 等^[11]的交联实验研究所证实。

4. mRNA-真核生物起始因子(eIF)

mRNA 与 40S 亚基的结合是早期 eIF 参与的重要步骤。eIF 特异结合于 mRNA 序列被认为在 mRNA 和 40S 亚基的识别过程中起重要作用。Setyono 等^[12]通过 250nmUV 照射 eIF-mRNA 非共价复合物,使两者交联。RNase 消化后的电泳实验表明,eIF-4A, 4B, 4C 以及 eIF-3 亚基都能与 SFV mRNA 交联,而不能与 rRNA 交联。说明 eIF 先与 mRNA 结合形成复合物然后与核糖体结合再完成起始过程。

5. tRNA-氨酰基 tRNA 合成酶

遗传密码的准确性决定于氨酰基-tRNA 合成酶对特定 tRNA 识别的准确性。Tukalo 等^[13]以铂化合物作为交联剂研究了 tRNA 与氨酰基-tRNA 合成酶的相互作用,阐明了合成酶对 tRNA、氨酰基的各自识别部位,初步解释了为何能通过此类合成酶准确地将记载在核酸序列上的遗传密码转变为蛋白质序列的信息。

6. tRNA-核糖体蛋白复合物

为确定氨酰-tRNA 与核糖体结合位点的核糖体组分,Riehl 等^[14]用化学法将 tRNA^{Phe}

分子中的胞嘧啶转化为 4-硫尿嘧啶(S⁴U)。修饰后的核苷在 335nm 光照下能与邻近的亲核基团形成交联。研究表明硫化的苯丙氨酰-tRNA^{Phe} 在 Poly(U) 存在的情况下与核糖体 P 位点结合。直接照射 (S⁴U)tRNA^{Phe}/Poly(U)/70S 核糖体复合物,发现交联仅在 30S 亚基中出现。产物分析表明苯丙氨酰-(S⁴U)tRNA^{Phe} 特异结合于 S10 核糖体蛋白质。

7. rRNA-核糖体蛋白复合物

Terao 等^[15]用 UV 照射大鼠 60S 亚基,发现 UV 导致 5S RNA-蛋白质交联。通过¹²⁵I 标记蛋白质、RNase 消化和双向电泳,证明与 5S rRNA 交联的蛋白是 L5。这说明它们在空间上紧密相邻。

三、在研究 DNA、RNA 空间结构和不同 RNA 间相互作用中的应用

以下各应用均是利用核酸间交联。

1. 通过分子内交联研究 DNA 构象

Sinden 等^[16]将能形成 Z 型的 DNA 序列 (GT)₂₁, (GT)₁₂ATGT, (CG)₆TA(CG)₆ 克隆,以交联剂 TMP (Trimethylpsoralen) 处理这些质粒。发现:如果这些序列以 B 型(松弛状态)存在, TMP 则可在其中形成较多交联;如果在超螺旋 DNA 中以 Z 型存在,交联数目则大大减少。这些序列的交联数目与 DNA 的超螺旋度相关。因此可用交联数量反过来检测 Z-DNA 的左螺旋度。这会使体内外的 DNA 构象测定大大简化。

2. 利用分子内交联研究 RNA 空间结构

RNA 分子往往局部配对形成突环,并以此形成特定的空间结构。Thompson 等^[17]以 TMP 介导,用长波长 UV 照射 *E. coli* 16S rRNA,在空间相邻部位引入交联,然后用 RNase T₁ 部分酶解,分离交联片段,去除交联,进行序列分析即可定出交联部位。此法的交联定位准确度达 ±15 核苷酸。严格控制 TMP 的反应,可获得更准确定位。根据交联部位和其已知的一级、二级结构,即可获得 RNA 分子的准确空间结构。

3. 在 RNA 分子间相互作用研究中的应用

RNA 间的相互作用在基因调控、表达、蛋白质合成中至为重要。

(1) mRNA 与 tRNA

Steiner 等^[18]发现,酵母 tRNA^{Phe} 中靠近反密码子 3' 端的核苷酸在与 *E. coli* 核糖体结合时能与 mRNA 交联。如果 mRNA 用 Poly(U) 或寡核苷酸代替,也能发生交联。交联产物用核酸酶 P₁ 消化,双向电泳分析,发现 tRNA 交联于对应密码 UUU 5' 位置上的 U。说明密码子的第一个碱基配对在识别 mRNA 上的密码时至关重要。

(2) sn RNA 间

snRNA 在 hnRNA 的加工过程中举足轻重。其中 U₄ 与 U₆ 在序列上有很大程度的互补且共存于一个 RNP 颗粒中。Rinke 等^[19]借助 TMP 交联研究了两者间的碱基配对情况 (snRNA 正是利用与 hnRNA 的碱基配对行使其功能)。将从 HeLa 细胞中提取的 U₄ 至 U₆ 六种 snRNA 混合,用 TMP 处理,只得到 U₄/U₆ 交联体,用 RNase T₁ 降解交联产物,并作双向对角电泳和序列分析,得知 U₄ 的两个重叠片段 (52—65) 与 U₆ 的一个片段 (51—59) 交联。结果还表明, U₄/U₆ 的配对毋需蛋白质起稳定作用。

(3) snRNA 与 hnRNA

大部分 hnRNA 或 Pre-mRNA 含有 snRNA 的互补序列。剪切过程中,预期会形成不稳定的 snRNA-hnRNA 杂交产物,但一直未能找到。Pogo 等^[20]在 TMP 存在下用 252nm UV 照射去除了 DNA 的核,终于找到了 snRNA-hnRNA 的交联产物,并证明在所有交联的 snRNA 中, U₁ 占多数。

(4) tRNA 与 rRNA

在蛋白质合成时, tRNA 是与核糖体的蛋白作用,还是与 rRNA 结合,一直不清。Chen 等^[21]将 *E. coli* tRNA^{Gly} 20 位的双氢尿嘧啶残基用光敏剂取代。光致敏交联后的分析表明, tRNA^{Gly} 与核糖体中的 Poly(G, U) 片段交联,三分之二的 tRNA 与 30S 亚基的 16S

rRNA 结合,且结合于 rRNA 的 5' 和 3' 两端。此外,还发现少量的 N-乙酰基丙氨酰基-tRNA^{Gly} 交联于 50S 亚基上的 rRNA,而不是在对嘌呤霉素敏感的区域。

综上所述,研究对象无论是在无细胞生物、原核生物中,还是在真核生物中;无论于离体、核外、分子间,还是于活体、核内、分子内;无论是静态实体,还是转瞬即逝的动态结构;无论是各类分子的空间排列关系,还是诸种功能载体的近程相互作用,均可用交联法探测、研究。它之能如此,乃交联之固定作用使然。而交联形成的前提是研究对象具有活泼的功能基团,交联法的使用条件则是能够和只能在考察部位引入交联,且交联反应不影响所研究的结构。这些直接关系到方法的真实性、准确性和有效性。使用者应对此加以注意。

夏寿萱教授审阅了此文,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Solomon, M. T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 6470.
- [2] Lohr, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 6326.
- [3] Karpov, V. L. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, 4321.
- [4] Mirzabekov, A. D. et al.: *Symposium on Quantitative Biology, CSH*, 1982, 503—10.
- [5] Chatterjee, P. K. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1986, 188, 23.
- [6] Karpov, V. L. et al.: *Cell*, 1984, 36, 423.
- [7] Chenchick, A. R. et al.: *Mol. Biol.*, 1982, 16, 34.
- [8] Sgro, T. Y. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1986, 154, 69.
- [9] Schweiger, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 825, 87.
- [10] Sonenberg, N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 4288.
- [11] Pelletier, J. et al.: *Cell*, 1985, 40, 515.
- [12] Setyono, B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 782, 242.
- [13] Tukalo, M. A. et al.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 1985, 280, 1484.
- [14] Riehl, N. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1982, 128, 427.
- [15] Terao, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 609, 306.
- [16] Sinden, R. S., et al.: *Biochem.*, 1987, 26, 1343.
- [17] Thompson, J. F. et al.: *Cell*, 1983, 32, 1355.
- [18] Steiner, G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 8181.
- [19] Rinke, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1985, 185, 721.

胶体金标记抗体技术

韩刚毅

(济南军区军事医学研究所, 济南)

提 要

胶体金标记抗体技术是近十多年来免疫组织(或细胞)化学迅速发展起来的一项免疫标记技术。在国外许多研究领域已经得到发展,并逐渐受到国内同行的重视。本文介绍了胶体金标记抗体技术的原理、方法及其发展概况。

1962年 Feldherr^[1]等报道了用胶体金标记细胞进行电子显微镜的研究。九年后, Faulk (1971)^[2]利用胶体金标记抗血清,开创了用于电镜研究的免疫金染色法,简称“胶金法”(IGS: Immuno-Gold Staining method)。随着免疫组织化学和免疫细胞化学的发展,在荧光物质、放射性同位素、铁蛋白等标记物被广泛应用的同时,胶体金标记物也因其具有种种优点而越来越受到重视。

一、胶体金标记技术原理^[3,4]

胶体金是指分散相粒子直径在1—100nm的金溶胶。处于这种状态下的溶胶粒子能透过滤纸,但不能透过半透膜,属于多相不均匀体系。

溶胶的制备通常采用分散法(将较大粒子进一步粉碎成直径为1—100nm范围内的小粒子)和凝聚法(使溶液中的溶质分子聚集成直径在1—100nm范围内的多分子聚集体)。制备金溶胶主要是采用凝聚法。其原理是利用某些还原剂对金离子的还原作用使氯金酸水溶液中的金离子还原成金原子,进而再凝集成所需直

径的多分子聚集体粒子。“胶体金”就是指这种处于溶胶状态的金颗粒。

胶体金的颗粒表面带有较多的电荷,能够对蛋白质等高分子物质进行吸附结合。利用这种表面吸附作用,使蛋白质吸附在金溶胶颗粒表面就得到胶体金“标记”的蛋白质(或简称“金标蛋白质”)。由于在免疫组化研究中常用胶体金来标记抗体或葡萄球菌A蛋白(SPA)等,因此也称为“胶体金标记抗体技术”(Colloidal gold labelled antibody technique)。

金标抗体用于免疫组化研究时,吸附在胶体金表面的抗体能够象“向导”一样将胶体金颗粒载运到组织或细胞中的相应抗原位置。在光学显微镜下胶体金呈现的颜色可以显示抗原抗体性质和进行组织学定位研究。同时胶体金在电子显微镜下能呈现很高的电子密度,因此利用金标抗体也能在电镜下进行组织或细胞的免疫学定位、定性和定量研究。

二、金溶胶的制备方法

制备金标抗体可分为:金溶胶的制备、胶体金标记抗体及金标抗体的纯化和鉴定等几个

[20] Pogo, A. S. et al.: *The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix*, Alan R. Liss, Inc., NY, 1982, 233—33.

[21] Chen, J. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 825, 161.

[本文于1987年10月23日收到]