

tion and DNA fragmentation. The GPx expressing cell clones could efficiently inhibit PCD induced by tbOOH, but not by paraquat. The results suggested that GPx selectively inhibits

cytotoxicity induced by ROS.

**Key words** glutathione peroxidase, gene transfection, paraquat, t-butylhydroperoxide (tbOOH), programmed cell death

# 三链 DNA 的形成抑制 DNA 结合蛋白与启动子的结合

刘定燮

(第一军医大学南方医院, 广州 510515)

王昌才

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

**摘要** 电泳迁移分析方法及 DNase I 足迹实验表明 21nt 脱氧寡核苷酸 G3TG2T GT2G5TG2TGT (CP1) 与乙肝病毒 (HBV) 核心启动子 (Cp) 片段之间三链 DNA 的形成有较高的特异性及稳定性. 凝胶滞留实验显示, 在大鼠肝细胞核提取物体外转录系统中, CP1 可特异地抑制 DNA 结合蛋白与 Cp 片段的结合, 而不能与 Cp 结合形成三链 DNA 的脱氧寡核苷酸 CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3) 对蛋白与 Cp 的结合并无抑制作用. 这些结果表明, 三链 DNA 的形成有可能抑制 HBV DNA 的转录.

**关键词** 三链 DNA, 反基因策略, 脱氧寡核苷酸, 乙肝病毒, DNA 结合蛋白

**学科分类号** Q71

建立在 DNA 三螺旋结构基础上的反基因策略 (antigene strategy) 是基因治疗的一个新方向, 它通过能形成三链 DNA 的寡核苷酸 (triplex-forming oligo-nucleotide, TFO) 与靶基因结合形成局部的三链结构来抑制基因的转录<sup>[1]</sup>. 已在体外或体内实验证实了 TFO 能有效地抑制人免疫缺陷病毒及 c-myc 等基因的转录<sup>[1]</sup>. 鉴于我国 HBV 感染率高而目前尚缺乏有效的治疗方法, 我们选择 HBV Cp 内一位点为靶序列, 研究了三链 DNA 的形成及其对细胞核内因子结合的抑制作用, 以为反基因策略应用于 HBV 感染的治疗提供理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 寡核苷酸的合成

脱氧寡核苷酸在 ABI381A DNA 合成仪上以亚磷酰胺三酯固相法合成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化.

### 1.2 核心启动子片段的分离及标记

含两个 HBV DNA (ayw 亚型) 串联拷贝的质粒 pCP10 由上海生物化学研究所惠赠. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化 pCP10 中含核心启动子 (Cp) 全部或部分序列的片段, 包括: Hinc II-Dra I (1687~1727nt, 以 EcoR I 切点为 +1, 以下均同)、Dra I-Rsa I (1727~1774nt)、Sty I-Rsa I (1645~1774nt) 及 Hinc II-Sty I (1687~1885nt) 片段. 前二者用于蛋白质-DNA 结合的竞争性抑制实验, 后者用大肠杆菌 Klenow 片段及 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (北京亚辉公司) 标记 Sty I 切点的 3' 凹端, 用于三链 DNA 形成的电泳迁移分析、足迹实验或凝胶滞留实验.

### 1.3 电泳迁移分析 (EMSA)

Hinc II-Sty I 片段 (约 10<sup>-10</sup> mmol/L) 与

寡核苷酸混合于总体积为 12  $\mu$ l 的三链 DNA 形成缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 10% 蔗糖、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 及 60 mmol/L KCl), 30 °C 静置 2 h. 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳缓冲液为 89 mmol/L Tris-硼酸, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. 三链 DNA 解离常数 ( $K_d$ ) 的计算参照文献 [2].

#### 1.4 DNase I 足迹实验

Hinc II-Sty I 片段 (约  $3 \times 10^{-10}$  mmol/L) 与寡核苷酸 ( $10^{-6}$  mmol/L) 混合于总体积为 12  $\mu$ l 的三链 DNA 形成缓冲液中, 30 °C 静置 2 h. 加入 DNase I 2 ng, 作用 9 min, 等体积终止缓冲液 (20 mmol/L EDTA, 0.2 g/L 小牛胸腺 DNA) 终止反应, 无水乙醇沉淀. 沉淀重悬于 3  $\mu$ l 甲酰胺, 90 °C 加热 2 min 后, 6% 测序胶电泳.

#### 1.5 大鼠肝细胞核提取物的制备

参照文献 [3, 4]. 所有的操作均在 0~4 °C 完成. 取约 15 g 大鼠肝组织剪碎, 用预冷的缓冲液 A (10 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (PH 6.8), 0.14 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 洗除红细胞后, 加入 30 ml 缓冲液 A, 组织匀浆器匀浆一次, 650 g 离心 10 min. 沉淀重新悬浮于 5 倍体积的缓冲液 B (10 mmol/L HEPES (PH 7.6), 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)), 静置 10 min. 650 g 离心 15 min, 收集细胞并重悬于 2 倍体积的缓冲液 C (含 0.2% NP40 及 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的缓冲液 B), 静置 15 min. 同样条件下离心, 去上清, 25 000 g 再离心 10 min. 沉淀按 1 ml/g 粗提核的比例重新悬浮于缓冲液 D (20 mmol/L HEPES (pH 7.6), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L EDTA, 0.2 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25% 甘油, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF), 轻搅 30 min, 25 000 g 离心 30 min. 上清在 50 倍体积的缓冲液 E (20 mmol/L HEPES (PH 7.6), 0.1 mol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA, 20% 甘油, 0.5 mmol/L

DTT, 0.5 mmol/L PMSF) 透析 3 h. 透析物 25 000 g 离心 30 min, 所得上清即为核提取物.

#### 1.6 凝胶滞留实验

结合反应在缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ g 小牛胸腺 DNA) 进行. 标记的 Sty I-Rsa I 片段 (约 1 ng) 与加入的大鼠肝细胞核提取物 (约含 5  $\mu$ g 蛋白) 在 4 °C 孵育 30 min, 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳缓冲液为 6.6 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 1 mmol/L EDTA, 3.3 mmol/L 乙酸钠. 在竞争性实验中, 核提取物先与竞争性抑制剂于 4 °C 温育 10 min 后再加入标记片段; 而在三链 DNA 的形成抑制蛋白结合的实验中, 在加入核提取物前, 先将标记片段与  $3 \times 10^{-6}$  mmol/L 寡核苷酸反应 2 h; 其余步骤均相同.

## 2 结果与讨论

C<sub>p</sub> 内 1734~1754nt 间序列近似于同聚嘌呤·同聚嘧啶序列, 它是肝细胞核因子 3 (HNF3) 和 SP1 的结合位点, 为 C<sub>p</sub> 的重要反式激活元件<sup>[5,6]</sup>. 我们以它为靶序列, 根据 R·RY 型的配对方式, 设计合成了 21nt 的寡核苷酸 (CP1) 作为 TFO, 同时也合成了碱基序列与 CP1 一致但排列方向相反的 21nt 寡核苷酸 CP3 作为对照 (图 1).

EMSA 可用于检测三链 DNA 是否形成的原理在于三链 DNA 的电泳迁移率低于相应的双链和单链 DNA<sup>[2]</sup>. 图 2 显示在三链 DNA 的反应体系中, 当 CP1 浓度达  $10^{-6}$  mmol/L 时, 所有标记的 198 bp 片段的迁移率明显变慢, 表明三链 DNA 的形成. CP1 浓度为  $3 \times 10^{-7}$  mol/L 时, 以游离形式存在的和与 CP1 结合的靶 DNA 量接近, 因而这一浓度可近似为反应的  $K_d$  值, 表明 CP1 与靶之间有较高的亲和力. CP3 浓度即使达  $10^{-5}$  mol/L 也未能与 C<sub>p</sub> 片段结合, 表明 R·RY 型结构中 TFO 与靶序列中嘌呤链间的排列关系为反平行.

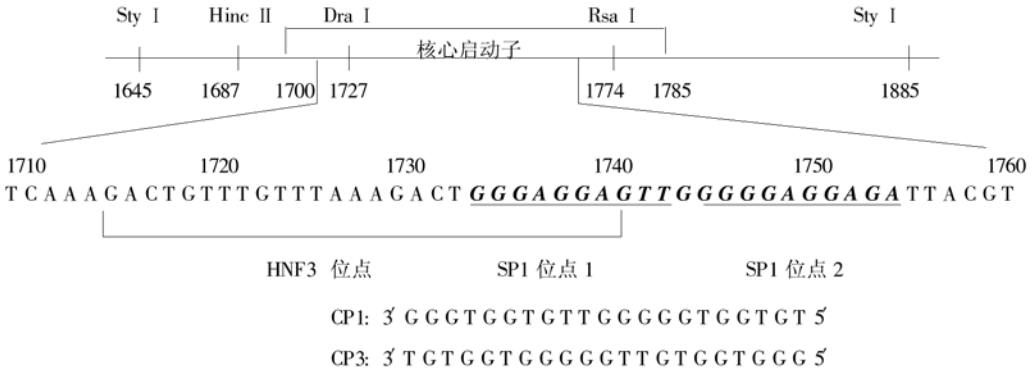


图1 三链 DNA 的靶位点及寡核苷酸的序列

以方框示 Cp, 靶序列以斜黑体表示, 下划线示 HNF3 及 SP1 的结合位点, 在靶位点下为寡核苷酸 CP1 及 CP3 的序列.

我们以前用 CP1 与 129 bp 的 Sty I -Rsa I (1645~ 1774nt) 片段作 EMSA 分析时发现三链 DNA 的形成中存在平台效应, 即 CP1 浓度达到一定值时三链 DNA 的形成量开始趋于稳定, 其后 CP1 浓度的再增高也不能使反应完全 (在 EMSA 表现为不能使所有标记片段迁移率减慢)<sup>[7]</sup>. 这一现象在图 2 却未出现, 提示平台效应的出现可能为 Sty I -Rsa I 片段内形成的空间结构阻止了 CP1 与靶位点的靠近, 而非我们当初认为的 CP1 形成了 G-四螺旋结构而降低了 CP1 的有效浓度<sup>[10]</sup>. 有关靶位点两端的序列影响三链 DNA 的形成也曾有文献报道过<sup>[8,9]</sup>.

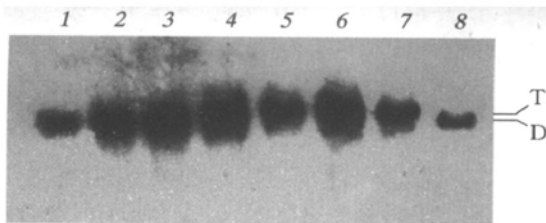


图2 EMSA 检测 CP1 与 Hinc II-Sty I 片段间三链 DNA 的形成

分别以“D”和“T”表示双链和三链 DNA. 1~ 7 中 CP1 的浓度 (mol/L) 分别为 0、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5}$ . 8 为  $1 \times 10^{-5}$  mol/L CP3.

基于 TFO 与靶位点结合后可保护结合位点免受核酸酶的切割, 可用 DNase I 足迹实验来检验三链 DNA 形成的特异性<sup>[2]</sup>. 图 3 显示, 在三链 DNA 的形成反应体系中, CP1 引起的足迹位于距 Hinc II-Sty I 片段 3' 端 (1885nt) 约 125~ 155nt 处, 这超出了 CP1 的结合位点 (131~ 151nt), 主要原因可能是三链结构的形成对靶 DNA 产生的僵直效应 (stiffening effect) 扩展到 TFO 结合位点的邻近区域<sup>[10]</sup>, 从而影响了 DNase I 与这些区域的结合. 对照 CP3 未引起足迹.

129 bp 的 Sty I -Rsa I 片段在与大鼠肝细胞核提取物温育后, 电泳出现四条蛋白质条带 (图 4). 中间的两条蛋白质带仅被特异的 DNA 片段所抑制, 表明此处与 Sty I -Rsa I 片段结合的蛋白质可能为有特定识别位点的转录因子, 它们的结合位点分别在 Hinc II-Dra I 及 Dra I -Rsa I 片段上. 图 5 显示 CP1 能有效地抑制识别位点在 Dra I -Rsa I 区域的 DNA 结合蛋白与 Cp 的结合, 这与 CP1 靶序列所在位置一致. 而不能与 Cp 结合的 CP3 并无抑制作用, 表明三链 DNA 的形成能阻碍 DNA-蛋白的结合.

已证实有多种转录因子与 Cp 结合并对其有反式激活作用, 其中在 Cp 内 Dra I 切点下

游有两个广谱转录因子 SP1 的结合位点<sup>[7]</sup> (图 1). CP1 的靶位点正好跨越 SP1 的两个结合位点, 理论上 CP1 与 Dra I - Rsa I 片段均能同时抑制 SP1 与 Sty I - Rsa I 片段的结合. 凝胶滞留实验显示二者确实引起了相同条带的消失, 表明 CP1 所抑制的核内因子可能是 SP1. 不过, 由于我们未以纯化的 SP1 作对照, 故不能排除其他转录因子的可能.

转录调控区内三链 DNA 的形成抑制转录的机理是, TFO 与 DNA 结合后可产生空阻效应, 并同时降低结合部位 DNA 的柔韧性而阻碍转录激活因子或 RNA 聚合酶与 DNA 的结合<sup>[1]</sup>. 我们以上的实验结果, 即 CP1 与 Cp 的结合有很好的特异性, 及相当高的亲和力以致能抑制细胞核内因子与 Cp 的特异性结合, 表明通过局部三链 DNA 的形成将可能抑制转录因子或 RNA 聚合酶与 HBV 转录调控区的结合, 从而阻断 HBV mRNA 的合成.

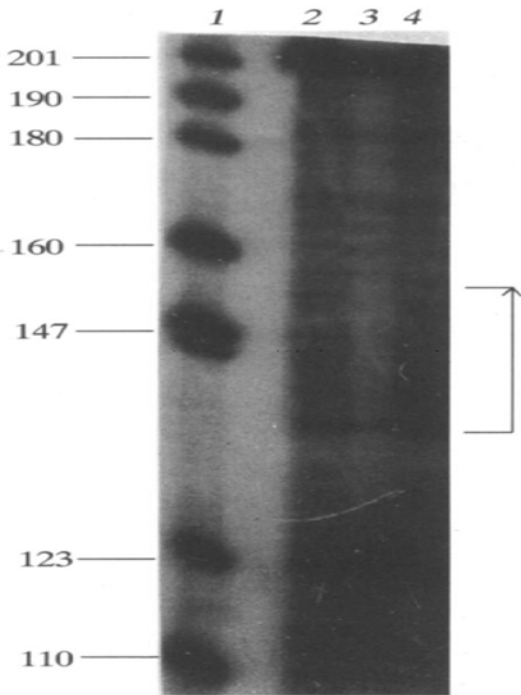


图 3 DNase I 足迹实验检测三链 DNA 的形成  
CP1 的结合位点以箭号表示, 箭头代表 CP1 的 3' 端.  
1: PBR322/MspI DNA 标准分子质量; 2: 无寡核苷酸; 3: CP1; 4: CP3.

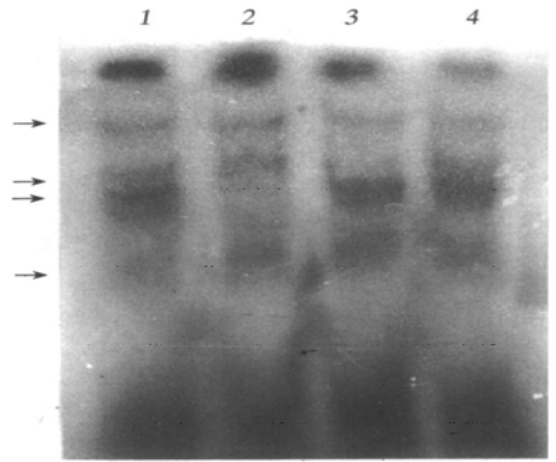


图 4 凝胶滞留实验检测与 Cp 特异结合的蛋白  
箭头指示蛋白-DNA 的结合. 1: 无竞争性抑制剂; 2 ~ 4: 竞争性抑制剂分别为 Hinc II-Dra I 片段 (摩尔比为 50: 1)、Dra I-Rsa I 片段 (50 倍摩尔比) 及 3 μg 小牛胸腺 DNA.

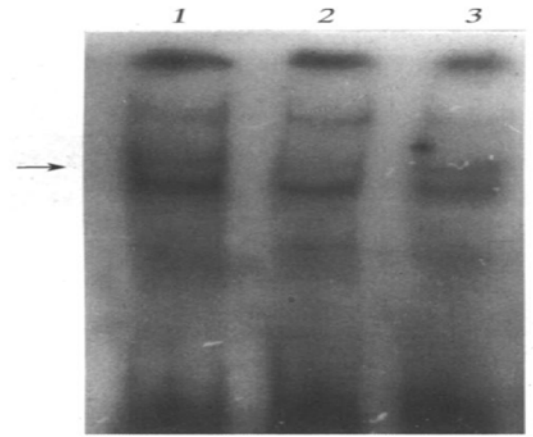


图 5 CP1 抑制 DNA 结合蛋白与 Cp 的结合  
箭头指示被 CP1 抑制的条带. 1: 无寡核苷酸; 2: CP1; 3: CP3.

参 考 文 献

- 1 刘定燮, 王昌才, 黄建生. 反基因策略及其靶序列的选择. 生命的化学, 1996, 16 (4): 6~ 8
- 2 Cooney M, Czernuszewicz G, Postel E H *et al.* Site specific oligonucleotide binding repress transcription of the human c-myc gene *in vitro*. Science, 1988, 241 (4864): 456~ 459
- 3 Nishizono A, Maeno M, Hiraga M *et al.* *In vitro* tran-

- scription of the hepatitis B virus gene by nuclear extracts of human hepatoma cells. *Virology*, 1992, **182** (2): 545~552
- 4 Zhang P, McLachlan A. Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology*, 1994, **202** (1): 430~440
  - 5 刘定燮, 王昌才. 肝细胞核因子 3 参与乙肝病毒基因的转录调控. *生命的化学*, 1996, **16** (6): 28~30
  - 6 Zhang P, Raney K, McLachlan A. Characterization of functional SP1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, 1993, **67** (3): 1472~1481
  - 7 刘定燮, 王昌才. 乙肝病毒核衣壳启动子内三链 DNA 的形成. *生物化学杂志*, 1997, **13** (6): 615~621
  - 8 Shea R G, Ng P, Bischofberger N. Thermal denaturation profiles and gel mobility shift analysis of oligonucleotide triplexes. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (16): 4859~4866
  - 9 Yoon K, Hobbs C A, Koch J *et al.* Elucidation of the sequence-specific third-strand recognition of four Watson-Crick base pairs in a pyrimidine triple-helix motif: T•AT, C•GC, T•CG, and G•TA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (10): 3840~3844
  - 10 Maher L J, Dervan P B, Wold B. Analysis of promoter-specific repression by triple-helical DNA complexes in a eukaryotic cell-free transcription system. *Biochemistry*, 1992, **31** (1): 70~81

### Inhibition of DNA Binding Protein Binding to the Core Promoter of Hepatitis B Virus by

**Triplex Formation.** LIU Ding-xie, WANG Chang-cai (*Institute of Molecular Biology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

**Abstract** The triplex formation between a 21nt oligodeoxyribonucleotide G<sub>3</sub>TG<sub>2</sub>TGT<sub>2</sub>G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TGT (CP1) and core promoter (Cp) fragment of hepatitis B virus (HBV) had a good specificity and stability, which was demonstrated by electrophoretic mobility shift analysis and DNase I footprinting experiment. Gel retardation assay showed CP1 could inhibit a specific cellular factor binding to Cp fragment in rat liver nuclear extracts. No inhibition of factor binding was observed by oligodeoxyribonucleotide CP3 (TGTG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub>T<sub>2</sub>GTG<sub>2</sub>TG<sub>3</sub>), which could not form triplex with Cp fragment. These results indicate that specific repression of gene transcription of HBV DNA may be possible by triplex-formation.

**Key words** triplex DNA, antigene strategy, oligodeoxyribonucleotide, hepatitis B virus, DNA binding protein

## 绿色荧光蛋白 cDNA 在腺病毒重组载体转染中的应用\*

张晓伟 王福山 童坦君<sup>1)</sup>

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

**摘要** 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因是目前发现的唯一能在细胞内表达, 且不需要其他外源底物参与的全新报告基因. 将 GFP cDNA 与腺病毒载体 pAdE1CMV 重组, 以 lipofectin 转染 293 细胞 (一种人胚肾细胞), 观察其在真核细胞内的表达情况, 为转基因技术提供了新的监测方法.

\* 国家自然科学基金资助项目 (39670806). <sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1997-04-09, 修回日期: 1997-07-21