

表 3 MIE 的操作稳定性

MIE 使用次数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MIE 活力/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	8 640	8 424	8 244	7 830	7 812	7 470	7 272	6 642	6 228	6 210
相对活力/%	100	97.5	95.4	90.6	90.4	86.5	84.2	76.9	72.1	71.9

参 考 文 献

- 1 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社 (Zhang S Z. Enzyme industry. Beijing: Science Press), 1984. 2~10
- 2 Chen Z, Kong W, Zhou H, *et al.* The study of immobilized glucoamylase to grafted starch carrier. Chinese Biochemical Journal, 1995, 11 (2): 150~154
- 3 郭 桥, 罗贵民, 孙启安, 等 (Guo Q, Luo G M, Sun Q A, *et al.*). α -淀粉酶与糖化酶的共固定化研究. 生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal), 1994, 10 (3): 260~263
- 4 邱广明 (Qiu G M). 水溶性磁流体的制备. 化学试剂 (Chemical Reagents), 1993, 15 (4): 234~237
- 5 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社 (Zhang L X. Biochemically experimental method and technology. Beijing: Advanced Education Press), 1981. 165~169
- 6 朱 俭. 生物化学试验. 上海: 上海科学技术出版社 (Zhu J, Biochemical experiment. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press), 1981. 64~66

Immobilization of a Glucoamylase onto a Magnetic Collidal Article by Adsorbing-crosslinking. QIU

Guang-Liang, Deligeer, LI Shu-Yuan, GAO Yan-Chun (Department of Biology, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China).

Abstract A magnetic immobilized glucoamylase has been prepared by adsorbing glucoamylase onto a magnetic collidal particle and cross-linking it with glutaraldehyde. The effects of different concentration of glutaraldehyde, pH of buffer, and the amount of glucoamylase on immobilization. The results showed that the activity of MIE was 17 095 U/g dry gel. The activity recovery was 63%. And some properties of magnetic immobilized and native glucoamylase such as optimum temperature, optimum pH and michaelis constant, stabilities to heat and operational stability were studied and compared.

Key words glucoamylase, magnetic polyethylene particle, glutaraldehyde, magnetic immobilized enzyme

发育阶段 M-CAT 结合因子的组织分布及表达动力学*

倪菊华 刘云浩 贾弘提¹⁾

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 采用胶阻滞和 DNA-蛋白质印迹技术分析了鸡胚和雏鸡发育不同阶段骨骼肌、心肌、胫、肝和脑组织核抽提物中 M-CAT 结合因子 (MCBF) 与含 CATTCCT、CATTGCT 核心序列的寡核苷酸的相互作用. 胶阻滞实验结果表明, 被检的五种组织均有 MCBF 结合活性存在, 但结合模样不完全相同; 两寡核苷酸探针与同一骨骼肌核抽提物结合模样也不相同. 采用两寡核苷酸为探针对五种组织核抽提物进行 DNA-蛋白质印迹分析均检出一分子质量约 30 ku 核因子, 提示 30 ku 核因子是存在于五种组织中的普遍因子, 该因子可直接或以同二/多聚体结合 CATTCCT、CATTGCT 序列, 属 MCBF 结合活性的基本组成成分. 除普遍因子外, 胶阻滞分析结果不排除各组织存在的特异因子通过蛋白质-蛋白质相互作用、与 30 ku 因子形成杂聚体结合 DNA 的可能性. 骨骼肌组织 30 ku 因子在胚胎发育 18 天前表达, 出生后消失.

关键词 M-CAT 盒, M-CAT 结合因子, DNA-蛋白质相互作用

学科分类号 Q7

* 国家自然科学基金资助项目 (39480017、39970422), 中国医学科学院医学分子生物学国家重点实验室外部课题. ¹⁾ 通讯联系人.
收稿日期: 1997-09-23, 修回日期: 1998-03-11

转录增强因子 (transcription enhancer factor 1, TEF-1) 由 Davidson 等^[1] 首先发现于 HeLa 细胞, 可特异识别 SV40 增强子的 GTTIC 和 Sph 元件, 激活 SV40 早期启动子转录. 除病毒基因, TEF-1 在禽类和鼠的同源物可激活心肌、骨骼肌特异基因的表达^[2,3], 在果蝇的同源物则参与神经系统的分化^[4]. Mar 等^[5] 报告, M-CAT 结合因子 (M-CAT binding factors, MCBFs) 可与心肌肌钙蛋白 T (cTNT) 启动子的 M-CAT (CATTCCT) 元件结合, 激活 cTNT 转录. 此外, 许多肌组织特异基因, 如兔肌球蛋白重链 β 启动子^[6]、鸡 AChR γ 启动子^[7] 和大鼠 AChR β 启动子^[8] 均有 M-CAT 元件存在. 鸡 AChR γ 基因 5' 上游序列删除突变结合转染实验证明: 仅保留近转录起始点两个 E 盒 (CANNTG), 缺失上游 M-CAT 元件的启动子丧失转录活性, 可见 M-CAT 对 γ 启动子活性必不可少^[7]. M-CAT 在转录激活中的作用在大鼠 AChR β 基因调控分析中也得到证实^[8].

为探索发育过程 MCBF 表达与 AChR γ 基因转录激活的关系, 本研究采用含 CATTCCT、CATTGCT 核心序列的合成寡核苷酸链与鸡发育过程骨骼肌等五种组织核抽提物相互作用, 分析 MCBF 表达动力学及组织分布.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

EcoRI、Klenow 酶为 Promega 产品; 非特异性竞争剂 poly (dI-dC)、蛋白酶抑制剂 PMSF、Pepstatin 等为 Sigma 产品; α -³²P-dATP 为北京亚辉公司产品. 鸡胚购自卫生部北京生物制品研究所. 合成的寡核苷酸双链正义链(反义链从略)如下:

序列 A 为 5'-TTGAATTCC**CATTCCT**GTA-3' (以下简称 A); 序列 B 为 5'-GATCTGC**CATTGCT**GAAATTCTT-3' (以下简称 B).

1.2 方法

1.2.1 核抽提物的制备: 分别取孵育第 9、11、13、15 和 18 天鸡胚及出生后 1 天、2 周雏鸡肢体骨骼肌, 孵育第 13 天鸡胚心肌、肝、脑和胫组织, 在预冷的 PBS 溶液中剪碎, 玻璃匀浆器匀浆后按文献 [7] 制备核抽提物, 考马斯亮蓝 G250 测定蛋白质含量, 分装, -70℃ 保存.

1.2.2 胶阻滞分析: 分别将 A、B 寡核苷酸正、

反义链退火、使成双链 DNA. 在 20 μ l 反应体系内 (pH 7.5, 6.7 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 33 mmol/L dCTP, dGTP 和 dTTP) 加入 0.2 μ g 退火的 A 或 B 双链 DNA, 1U Klenow 酶及 37×10^4 Bq α -³²P-dATP, 37℃ 反应 30 min, 进行末端标记. 然后按文献 [7] 进行胶阻滞分析: 20 μ l 反应体系内含 5 ng poly (dI-dC), ³²P 标记的 DNA 探针 (计数为 10^4 /min) 及适量核抽提物, 小心混匀, 室温反应 15 min 后 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离, 干胶后放射自显影.

1.2.3 DNA-蛋白质印迹分析: 核抽提物 (60 μ g) 经 12% SDS-PAGE 分离后, 电转移 (280 mA, 15 h) 至硝酸纤维素膜, 按本室方法^[9] 进行 DNA-蛋白质印迹分析, DNA 探针用量为每毫升杂交液计数为 5×10^6 /min.

2 结果

2.1 A、B 两序列与骨骼肌核抽提物相互作用

取不同浓度孵化 13 天的鸡胚肢体骨骼肌核抽提物与含 CATTCCT 或 CATTGCT 核心序列寡核苷酸 (A 或 B) 进行胶阻滞分析, 结果显示 (图 1a): 结合反应体系含 2 μ g 核抽提物时即可形成 DNA-蛋白质复合物阻滞条带; 随核抽提物用量增加阻滞条带明显增强. 两反应体系比较, A 寡核苷酸探针结合活性明显强于 B 探针; 此外, A 寡核苷酸与核抽提物相互作用后显示分离的两条阻滞条带, 而 B 寡核苷酸则显示三条分子质量较大的 DNA-蛋白质复合物条带. 结果提示胚胎发育第 13 天鸡肢体骨骼肌核抽提物内有 MCBFs 结合活性存在, 同时显示两序列与 MCBFs 结合活性强弱及模样并不完全相同, 原因见讨论.

为证明图 1a 中的 DNA-蛋白质复合物形成与 M-CAT 元件有关, 我们采用 A、B 两寡核苷酸序列及鸡 AChR γ 亚基因上游 -204/-50 片段 (含 CATTGCT 及另外两个 M-CAT 候选序列, 见图 2) 进行了竞争实验. 当反应体系内只含非特异竞争剂 poly (dI-dC) 时有明显 DNA-蛋白质复合物形成, 分别加入过量的 (100 倍摩尔) 三种竞争剂均可使阻滞条带减弱或消失 (图 1b、1c), 提示胶阻滞条带的形成确为核因子与 M-CAT 元件相互作用形成的复合物; 交叉竞争还提示, CATTCCT 与 CATTGCT、 γ 基因上游片段间存在共同结合因子.

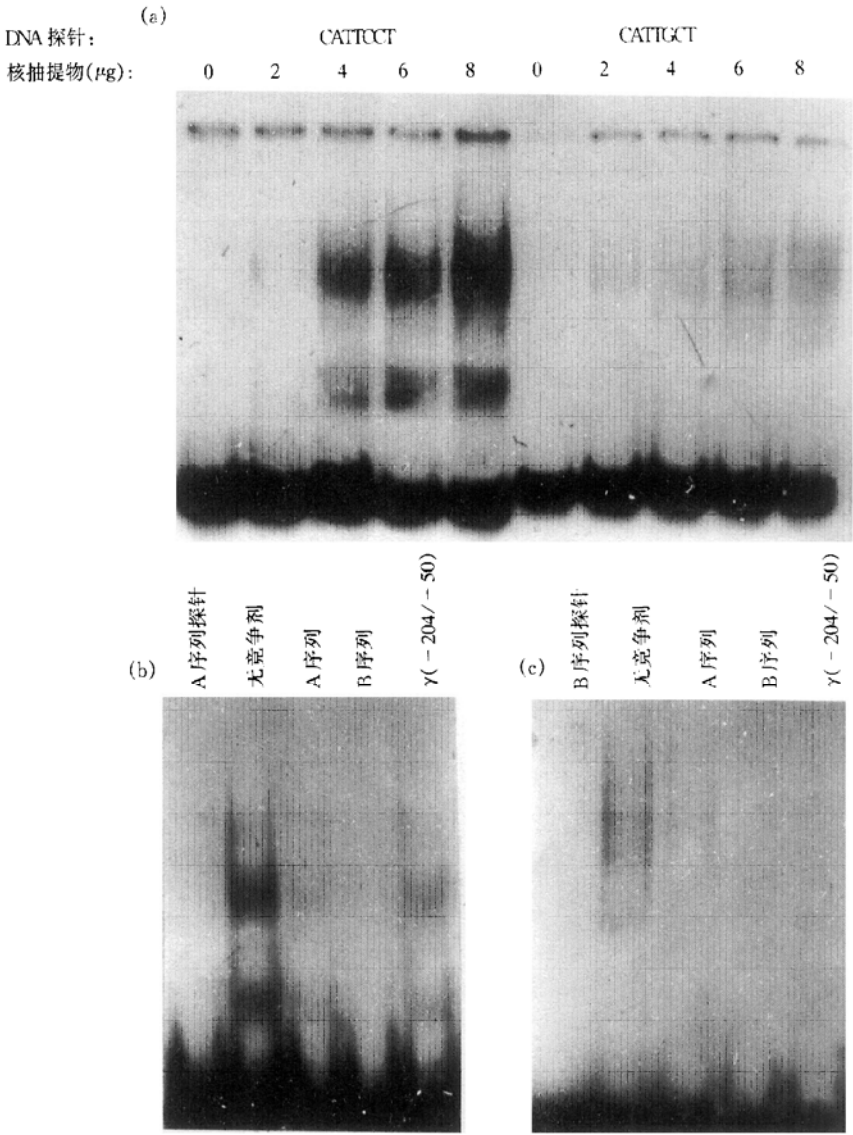


图 1 DNA-蛋白质相互作用的胶阻滞分析

(a) 不同用量核抽提物 (13 天鸡胚肢体骨骼肌) 与³²P 标记的序列 A、序列 B 结合反应 (见正文) 后, 5% PAGE; (b) 13 天鸡胚肢体骨骼肌核抽提物 (4 µg) 与³²P 标记的序列 A 相互作用的竞争分析. 竞争剂 (100×); (c) 13 天鸡胚肢体骨骼肌核抽提物 (6 µg) 与³²P 标记的序列 B 相互作用的竞争分析. 竞争剂 (100×).

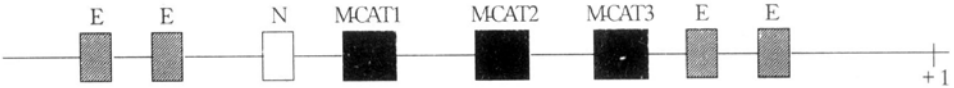


图 2 鸡 AChR_γ 基因 5' 上游调控序列示意图

E: CAGCTG; N: CTaGTG; M-CAT1: CATggCT; M-CAT2: CAgcTCCT; M-CAT3: CATTgCT.

2.2 MCBF 的组织分布

图 3 显示 A、B 两种寡核苷酸与 13 天鸡胚肢体骨骼肌、心肌、肝、脑和胫组织核抽提物胶阻滞分析结果. 五种组织均检出了 MCBFs 结合活性, 其强弱依次为脑> 骨骼肌、胫> 心肌> 肝; 除胫、心和肝核抽提物显示一条分子质量不尽相同的 DNA-蛋白质复合物条带外, 骨骼肌和脑核抽提物均显示两个以上的复合物阻滞条带.

为进一步检测不同组织 MCBFs 分布, 并确定结合因子的分子质量, 我们采用 13 天鸡胚五种组织核抽提物与 A、B 寡核苷酸进行 DNA-蛋白质印迹分析 (图 4), 均检出了分子质量约为 30 ku 的核因子, 提示 30 ku 核因子是存在于五种组织中的普遍因子, 该因子可直接结合 CATTCCT/CATTGCT 核心序列. 除 30 ku 核因子, DNA-蛋白质印迹分析未检出其他分子质量的核因子. 五种

组织核抽提物的 DNA-蛋白质印迹结果及胶阻滞行为为差异提示, 除普遍因子外各组织尚有不依赖 DNA 的辅助因子参与 DNA-蛋白质复合物的形成.

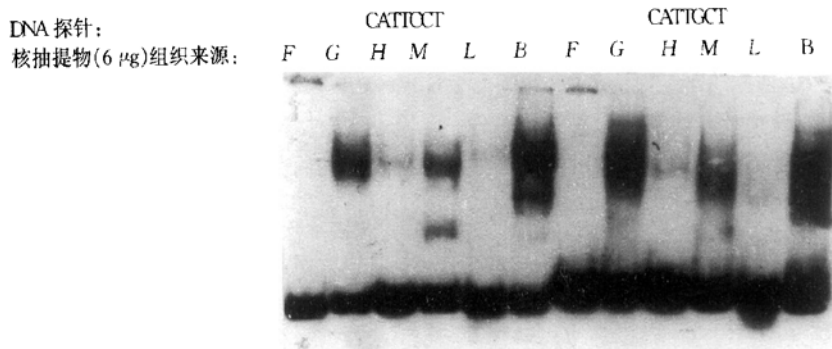


图 3 不同组织核抽提物与³²P 标记的序列 A 和序列 B 相互作用的胶阻滞分析

F: 游离探针; G: 鸡胗; H: 鸡心; M: 肢体骨骼肌; L: 肝; B: 脑.

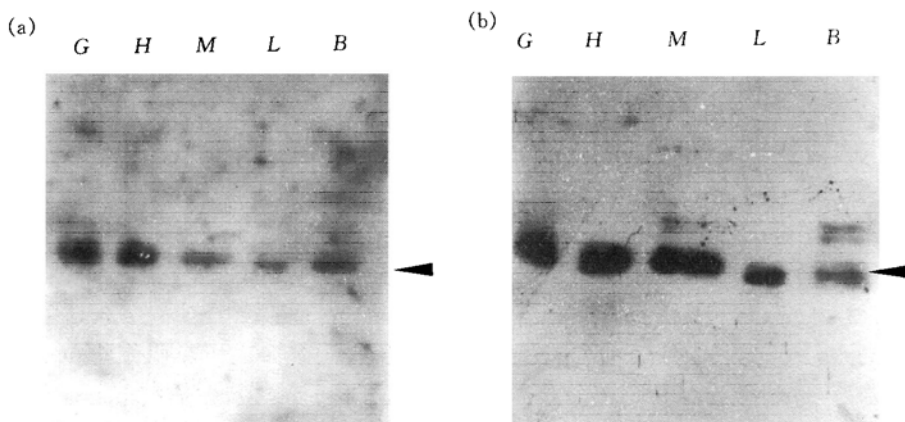


图 4 DNA-蛋白质印迹分析——鸡胚发育第 13 天 MCBF 的组织分布

(a) 以序列 A 为探针; (b) 以序列 B 为探针. 核抽提物组织来源同图 2.

2.3 发育阶段骨骼肌 MCBFs 的表达

为进一步探索鸡发育过程 MCBFs 表达, 本研究又采用 DNA-蛋白质印迹分析检测了不同发育时

期骨骼肌核抽提物内 CATTCCT/CATTGCT 结合蛋白. 图 5 是以 A、B 寡核苷酸为探针检测结果. A 探针测定显示: 鸡胚发育第 9 天肢体骨骼肌即有

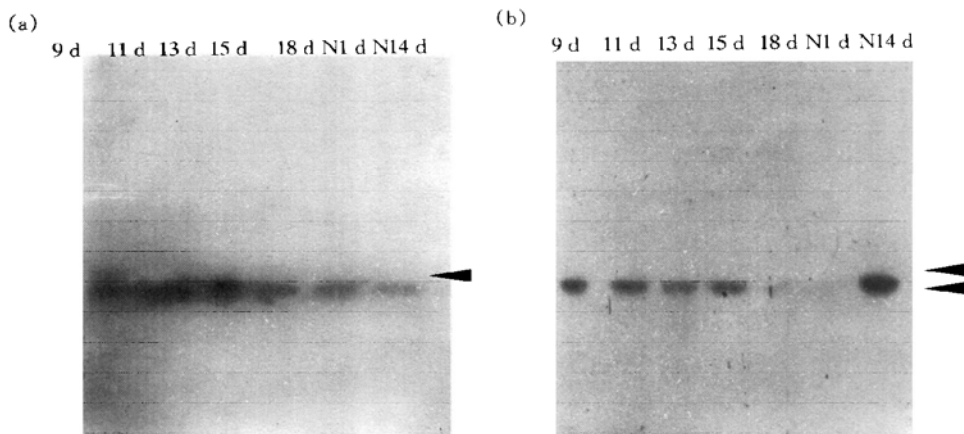


图 5 DNA 印迹分析——不同发育阶段鸡胚和雏鸡肢体骨骼肌 MCBF 的表达

(a) 以序列 A 为探针测定结果; (b) 以序列 B 为探针测定结果. 图上部指示发育天数 (d).

30 ku 因子产生, 13~15 天达高峰, 18 天后表达减弱, 出生后该因子消失. B 探针检测结果大致同 A, 只是在 2 周的雏鸡检出一分子质量略大的结合因子. 奇怪的是, A 探针并未检出该因子. 因此, 究竟是出生后特异识别 CATTGCT 的同工型因子的置换表达, 抑或偶然现象? 尚需对大于 2 周鸡骨骼肌进一步检测方可定论. 采用变性胶电泳分离核蛋白后, 以 A、B 探针进行 DNA-蛋白质印迹分析仍未检出分子质量差异的核因子 (见讨论).

3 讨 论

TEF-1/MCBF 与已知的几种 DNA 结合蛋白, 如锌指结构、HLH、HD (homeodomain) 及 bZIP 不同, 属 TEA/ATTs 家族^[10]. 最早 Davidson 等^[1]发现的人 TEF-1 分子质量为 53 ku. Shimizu 等^[6]发现, 小鼠肌细胞株 Sol. 8 含三种 MCBFs, 分子质量分别为 108、53 和 32 ku. Farrance 等^[2]采用抗 TEF-1 抗血清在 12 天鸡胚检出的 MCBF 与人 TEF-1 序列同源. 本研究采用 DNA-蛋白质印迹技术在 13 天鸡胚的五种组织均检出了 30 ku 的 MCBF, 提示 30 ku 核因子是存在于多种组织的通用因子. 最近, 我们采用含 CATTGCT 串联体的 DNA 亲和层析法从 13 天鸡胚骨骼肌核抽提物分离、纯化了两种核因子, 经变性胶电泳测定分子质量分别为 30 ku 和 32 ku; DNA-蛋白质印迹显示仅 30 ku 分子可被 A、B 探针识别, 但 32 ku 分子却不能, 提示 30 ku 核因子可直接结合 CATTCCT、CATTGCT 元件, 32 ku 分子可能与 30 ku 分子通过蛋白质-蛋白质相互作用被含 CATTGCT 核心序列的 DNA 亲和柱滞留 (中国生物化学与分子生物学报, 15 (2), 1999, 印刷中). DNA-蛋白质印迹实验检出的 30 ku 因子经转膜复性后可被 CATTCCT、CATTGCT 寡核苷酸探针识别, 提示 30 ku 核因子可能以单体、更可能以同二/多聚体与 DNA 相互作用. 因此, 胶阻滞实验呈现的不同阻滞条带可能是依赖 DNA 的 30 ku 核因子的单体-DNA 和/或同二聚体-DNA 及多聚体-DNA, 但不排除不同组织存在不依赖 DNA 的辅助因子的可能性. 辅助因子在有通用因子存在时结合 DNA、使蛋白质-DNA 复合物形式愈加多样化, 这可能是不同组织核抽提物胶阻滞差异原因之一. Amati 等^[11]报道, Myc 在生理水平很少二聚化, 也不直接结合 DNA, 其发挥转录调节作用需与 Max 形成杂二聚体结合 CACGTG 序列. 犹如 Myc 依赖

Max、TF II A/TF II B 等依赖 TF II D 一样, 我们推测辅助因子在缺失 30 ku 通用因子情况下不能直接结合 DNA, 因此核抽提物经变性胶分离后、采用 DNA-蛋白质印迹未能在不同组织核抽提物中检出 30 ku 以外的 DNA 结合蛋白. Larkin 等^[12]最近研究发现, M-CAT 元件的侧翼序列调节 M-CAT 元件结合的特异性. 本研究所采用的含 CATTCCT、CATTGCT 核心序列的寡核苷酸侧翼序列不同, 这可能是造成 A、B 序列胶阻滞实验差异的另一原因. 在体内, 核转录因子通常以同二/多聚体、或杂二/多聚体结合双链 DNA. 胶阻滞分析是采用富集了多种核因子的核抽提物与 DNA 进行结合分析, 可检出同或杂聚体-DNA 相互作用; 而 DNA-蛋白质印迹是经变性胶电泳分离核因子复性后、再与探针杂交, 因此不能检出杂聚体-DNA 相互作用, 也不能排除不依赖 DNA、但却可通过蛋白质-蛋白质相互作用结合 DNA 的因子存在. 鉴于上述分析, 我们设想 30 ku 因子是各组织存在的一种通用因子, 也是结合 M-CAT 元件的必需因子, 此外各组织还存在一些辅助因子, 它们与 DNA 的结合依赖 30 ku 通用因子的存在.

Molkentin 等^[13]研究发现, 在新生大鼠肌组织 (骨骼肌、心肌) 和非肌组织 (脑、肾、肝) 均存在 MCBFs. 本实验结果证实, 13 天鸡胚骨骼肌、心肌、肝、脑和胫组织均有 M-CAT 结合活性, 这与文献报道一致. Shimizu 等^[6]认为, 在小鼠体内至少存在两种形式的 MCBFs, 一种为广泛分布于各组织的 A2 因子, 另一种为肌组织特异存在的 A1 因子. 目前, 我们尚不能确定鸡 30 ku 分子就是小鼠 A2 的同源物.

鸡 AChR γ 基因 5' 上游序列含数个 M-CAT 候选序列, 其中 -253/-247 (CATggCT)、-153/-146 (CAgcTCCT) 和 -67/-61 (CATTgCT) (图 2) 与 M-CAT 共有序列 CATTCCT 仅相差 1~2 个碱基. 鸡 AChR γ 基因 5' 上游序列删除突变结合 CAT 分析证明, 仅保留近起始点两个 E 盒 (CAGCTG), 缺失上游 M-CAT 元件的启动子丧失转录活性, 提示 M-CAT 对 γ 启动子活性必不可少^[7]. M-CAT 功能在大鼠 AChR β 基因删除突变分析中也得到证实^[8]. 我们在最近研究中也证明 M-CAT 作为顺式正性调节元件可独立激活异源启动子活性^[14]. 哺乳类 AChR 分子有胚胎型 ($\alpha_2\beta\gamma\delta$, γ 型) 和成年型 ($\alpha_2\beta\epsilon\delta$, ϵ 型) 两种同工型^[15,16]. MCBF 与 E 盒结合因子 (MyoD 家族) 协同作用调

节 γ 型受体的表达. 当然, 鸡 AChR 基因表达是否象哺乳类一样也存在 γ/ϵ 亚基置换, 还需研究证实 (正在进行中).

参 考 文 献

- Davidson I, Xiao J H, Rosales R, *et al.* The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell*, 1988, **54** (7): 931~942
- Farrance I K G, Mar J H, Ordahl C P. M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor TEF-1. *J Biol Chem*, 1992, **267** (24): 17234~17240
- Yockey C E, Smith G, Izumo S, *et al.* cDNA cloning and characterization of murine transcriptional enhancer factor-1-related protein 1, a transcription factor that binds to the M-CAT motif. *J Biol Chem*, 1996, **271** (7): 3727~3736
- Campbell S, Inamadar M, Rodrigues V, *et al.* The scalloped gene encodes a novel evolutionary conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev*, 1992, **6** (3): 367~379
- Mar J H, Ordahl C P. M-CAT binding factor, a novel acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*, 1990, **10** (8): 4271~4283
- Shimizu N, Smith G, Izumo S. Both an ubiquitous factor mTEF-1 and a distinct muscle specific factor bind to the M-CAT motif of the myosin heavy chain β gene. *Nucl Acids Res*, 1993, **21** (17): 4103~4110
- Jia H T, Tsay H J, Schmidt J. Analysis of binding and activating functions of the chick muscle AChR γ subunit upstream sequence. *Cell Mol Neurobiol*, 1992, **12** (3): 241~257
- Berberich C, Durr I, Koenen M, *et al.* Two adjacent E box elements and a M-CAT box are involved in the muscle-specific regulation of the rat acetylcholine receptor beta subunit gene. *Eur J Biochem*, 1993, **216** (2): 395~404
- 王 均, 贾弘提 (Wang J, Jia H T). 胚胎发育过程生肌素基因的表达. *生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal)*, 1996, **12** (5): 507~510
- Burglin T R. The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell*, 1991, **66** (1): 11~12
- Amati B, Brooks M W, Levy N, *et al.* Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*, 1993, **72** (2): 233~245
- Larkin S B, Farrance I K G, Ordahl C P. Flanking sequences modulate the cell specificity of M-CAT elements. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (7): 3742~3755
- Molkentin J D, Markham B E. An M-CAT binding factor and an RSRF-related A-rich binding factor positively regulate expression of the α -cardiac myosin heavy-chain gene *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (8): 5056~5065
- 王 军, 贾弘提, Schmidt J, 等 (Wang J, Jia H T, Schmidt J, *et al.*). M-CAT 盒在鸡 AChR γ 亚基基因转录激活中的作用. *生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal)*, 1996, **12** (5): 540~543
- Mishina M, Takai T, Imoto K, *et al.* Molecular distinction

between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, 1986, **321** (6068): 406~411

- Witzemann V, Stein E, Barg B, *et al.* Primary structure and functional expression of the α -, β -, γ -, δ - and ϵ - subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle. *Eur J Biochem*, 1990, **194** (2): 437~448

Tissue Distribution and Expression Dynamics of M-CAT Binding Factor During Chicken Development.

NI Ju-Hua, LIU Yun-Hao, JIA Hong-Ti (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract The interactions between M-CAT binding factors (MCBFs) in nuclear extracts from developing chick tissues with oligonucleotides containing CATTCCT or CATTGCT core sequence were analyzed by gel retardation and Southwestern blot. Gel retardation assays showed that binding activities of MCBFs expressed in all tested organs, including skeletal muscle, cardiac muscle, gizzard, liver and brain, whereas the binding patterns were different between five tissues. Also, the binding patterns of CATTCCT and CATTGCT core sequence-containing oligonucleotides respectively with MCBFs in skeletal muscle extracts were different from each other. Southwestern blot analysis indicated that a 30 ku MCBF existed in the extracts from five tissues of chicken embryos by using oligonucleotides containing either CATTCCT or CATTGCT core sequence as a probe, suggesting that 30 ku molecule is an ubiquitous factor expressed in all tissues and this molecule can bind to both oligonucleotides in the manner of monomer or/and dimer and polymer. These imply that 30 ku molecule is essential for MCBF binding activities. Besides the ubiquitous factor, the possibility of specific factor (s) interacting with 30 ku molecule to form a heterodimer to bind to DNA can not be excluded. The ubiquitous factor of 30 ku expressed in skeletal muscle during embryonic development and disappeared after birth.

Key words M-CAT motif, M-CAT binding factor, DNA- protein interaction