

文章编号:1673-1689(2008)03-0109-05

应用 UV-X-IP 分析酿酒酵母 HSF 和靶 DNA 的相互作用

刘开辉¹, 丁小维¹, 邓百万¹, 陈文强¹, 张乐民²

(1. 陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001; 2. 云南大学 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 利用紫外激光交联和免疫沉淀技术 (UV laser crosslinking and immunoprecipitation, UV-X-IP) 分析原核表达的酿酒酵母热激因子 (heat shock factors, HSFs) 和片段化的基因组靶 DNA 的相互作用。分别在 ScSSA1、ScSSA4 启动子区和编码区设计引物对免疫沉淀的 DNA 进行 PCR 分析。结果发现, 紫外激光交联和免疫沉淀 DNA 库中富集了 ScSSA1、ScSSA4 启动子区 HSF 结合的 DNA 片段, 而没有编码区 DNA, 表明 HSF 特异结合了靶 DNA。从未经紫外激光交联样品的免疫沉淀 DNA 库中未获得相应 PCR 扩增产物, 说明紫外激光在酿酒酵母 HSF 与靶 DNA 之间形成共价结合中起重要作用。

关键词: 紫外激光交联; 免疫沉淀; 酿酒酵母; 热激因子; 靶 DNA

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

Analysis of Yeast Heat Shock Factor-Target DNA Interactions by UV-X-IP

LIU Kai-hui¹, DING Xiao-wei¹, DENG Bai-wan¹, CHEN Wen-qiang¹, ZHANG Le-min²

(1. Shanxi Key Laboratory of Bio-resources, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: In this manuscript, in vitro recombinant yeast heat shock factor-target DNA interactions were examined by using UV laser crosslinking and immunoprecipitation (UV-X-ChIP). PCR analysis was performed to detect specific enrichments of known HSF-targets in immunoprecipitated DNA with primers prospectively distributed in promoter and coding domains of ScSSA1 and ScSSA4. PCR results showed the DNA fragment libraries from samples UV-crosslinked and immunoselected with antibody against HSF specially contained upstream promoter domains of ScSSA1 and ScSSA4 rather than encoding domains DNA, and implied the binding of HSF to target DNA fragments. Moreover, there were no PCR products observed in the control DNA, of the control which lacked UV laser crosslinking, and revealed UV laser crosslinking playing a key role in forming covalent complexes of HSF-targets DNA.

Key words: UV laser crosslinking; immunoprecipitation; *Saccharomyces cerevisiae*; heat shock transcription factor; target DNA

收稿日期: 2007-04-24.

基金项目: 陕西省教育厅重点科研项目 (03JK027).

作者简介: 刘开辉 (1979-), 男, 陕西旬阳人, 理学硕士, 讲师, 主要从事微生物资源的保护、开发与利用方面的研究. Email: kaihui168@yahoo.com.cn

酿酒酵母热激因子(heat shock factors, HSFs)是酵母热激反应的转录调控因子。在热激、酸、碱、高渗透压、重金属离子等逆境条件下, HSF形成三聚体并与热激蛋白基因热激元件(heat shock element, HSE)结合, 诱导热激蛋白基因的表达^[1-2], 促进新生肽的转运、折叠、组装、定位以及变性蛋白质的复性和降解等, 从而提高生物的耐逆境能力^[3-5]。因此, 分析 HSF 与靶 DNA 的相互作用对揭示其转录调控机理具有重要意义。

目前, 研究蛋白质-DNA 相互作用的传统实验方法是 DNA 凝胶滞留分析(EMSA)和 Dnase I 足迹法(DNase I foot-printing)。这些方法均依赖于蛋白质与靶 DNA 片段的高亲和力。因此, 只能用于分析蛋白质与个别高亲和力 DNA 的相互作用, 不能用来研究弱亲和力蛋白质与 DNA 的相互作用^[6]。紫外激光(266 nm)被认为是零距离的交联剂, 紫外激光器发出的连续高能量光子能使蛋白质氨基酸残基和靶 DNA 碱基之间形成稳定的共价键, 而且交联效率高^[7]。紫外激光交联结合免疫沉淀技术在研究蛋白质与 DNA 的相互作用方面已取得了一些成果^[8-13], 但在酿酒酵母 HSF 与靶 DNA 的相互作用研究中报道甚少。作者以酿酒酵母 HSF 为模式蛋白, 研究 HSF 和 ScSSA1 和 ScSSA4 上游启动子区靶 DNA 的相互作用, 这为研究其它蛋白质与 DNA 相互作用及分离转录因子的基因组结合位点提供了一条新途径。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, strain Y190), 表达酿酒酵母 HSF 的宿主菌为 *Escherichia coli* TG1 (*E. coli* TG1) 和 HSF 的表达载体 pQE30/yHSF, 均由云南省资源生物保护与利用重点实验室提供。

1.2 主要药品

IPTG 和 Taq 酶购于 TaKaRa 公司(中国大连); 蛋白酶抑制剂为 Roche 公司产品; Ni-NTA-Agarose 购于 Qiagen 公司; Protein-A-Agarose 购于 Santa Cruz 公司; Poly(dIdC) 购于 Sigma 公司(USA)。

1.3 方法

1.3.1 酵母基因组 DNA 的提取 在 100 mL 酿酒酵母菌(OD₆₀₀ 2.0)的培养物中加入 1.5 mL 50 mmol/L 的 KH₂PO₄, 在液氮中反复碾磨细胞, 并转入灭菌离心管中, 再加入 225 U 的细胞裂解酶, 30

℃裂解 30 min。超声波破碎细胞并使染色质片段化为 100~500 bp, 离心收集上清液, 获得染色质粗提物。100 μL 染色质粗提物的 DNA 片断被纯化后溶于 20 μL TE 缓冲液中。用 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析 2 μL 上述 DNA 含量及片段的大小。

1.3.2 原核表达酿酒酵母 HSF 的 Ni 亲和柱纯化与 Western 分析 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF)用 LB 培养基培养至 OD₆₀₀ = 0.7 时, 加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 在 25 ℃继续诱导表达 4 h。用超声波破碎细胞, 上清液过 0.22 μm 孔径的滤膜, 滤液被转移至灭菌过的离心管中, 并加入 100 μL 50 ×蛋白酶抑制剂贮存液, 混匀。加 3 mL Ni-NTA-Agarose 于上述滤液中, 4 ℃培养 1 h。将 Ni-NTA-Agarose 充填于亲核层吸柱中, 先用 6~10 个柱体积的洗脱缓冲液洗 Ni-NTA-Agarose, 再用终浓度为 40 mmol/L 咪唑的洗脱液洗亲核柱。最后分别以 1 mL 咪唑终浓度为 100、200、300、400 mmol/L 的洗脱液洗亲核柱 4 次, 收集洗脱液。纯化的蛋白质经 10.0 g/dL 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。转移聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质于 PVDF 上, 进行 Western 印迹分析。

1.3.3 紫外激光交联和免疫沉淀 在 1.5 mL 离心管中依次加入 0.5 μg HSF、0.25 μg 酵母基因组 DNA、0.5 μg Poly(dIdC)和 2×结合缓冲液使终体积为 50 μL。混匀并离心片刻, 39 ℃热激 15 min 后, 混合物直接进行紫外激光交联和免疫沉淀富集 HSF-DNA 复合物^[13]。纯化的 DNA 被溶于 20 μL TE 缓冲液中用于 PCR 分析。

1.3.4 PCR 扩增 分别在 ScSSA1 和 ScSSA4 启动子区和编码区设计引物如下:

ScSSA1-307/314: 5'-TCAACTAAAATCTG-GAGAAAA-3', 5'-CGGAACGTTTAGAAGCTGT CATT-3'; ScSSA1+1893/1899: 5'-GGTGCTCCT CCAGCTCCA-3', 5'-TCAACGGTTGGACCTTC A-3'; ScSSA4-301/308: 5'-AACTCACCGGGCAA AAGA-3', 5'-AATGTAATAGGTTTCAAAG-3'; ScSSA4+1668/1672: 5'-TCTGTGAGCGAA AATA-ACTT-3', 5'-TCTTCAACCCACCTTCTCC-3'。

PCR 反应体系为 20 μL: 2 μL 10×PCR buffer; 2 μL 25 mmol/L MgCl₂; 1.6 μL 10 mmol/L dNTPs; 2 μL 引物 1(1 μmol/L); 2 μL 引物 2(1 μmol/L); 1 μL DNA, 0.2 μL Taq(5 U/μL); 加灭菌双蒸水至 20 μL。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 5 min, 然后 94 ℃变性 20 s, 49~56 ℃退火 20 s, 72 ℃延伸 20 s, 循环数为 35, 用 10 g/dL 的聚丙烯酰

胺凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 酵母基因组 DNA 的提取及片段化

用超声波破碎酿酒酵母细胞并使染色质片段化,纯化的 DNA 溶于 TE,取 2 μ L DNA 溶液,经 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析(见图 1)。图 1 中 M 为 DNA 标准分子量;1 为 4 μ g 纯化的酵母基因组 DNA,其片段长度在 100~500 bp 之间。从 100 mL 酵母细胞培养物中共提取了 20 μ g DNA。

M 表示 1 μ g DNA 相对分子质量标记(DGL2000 Marker, 100~2000 碱基对);1 表示大约 4 μ g 酵母基因组 DNA,片段长度为 100~500 bp。

图 1 酵母基因组 DNA 的提取

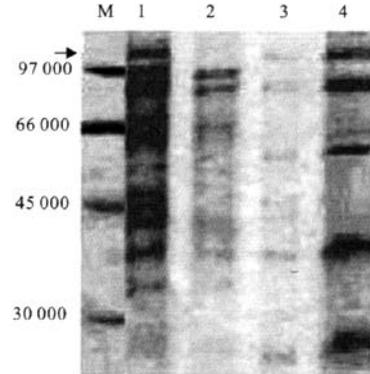
Fig. 1 Isolation of yeast genomic DNA

2.2 HSF 融合蛋白质的初步纯化

超声波破碎后的 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 细胞上清液经 Ni-NTA-Agarose 亲核柱纯化,取 20 μ L 初步纯化的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 分析(见图 2)。

图 2 中 M 为蛋白质相对分子质量标记,1 为正对照,即在变性状态下获得的 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 细胞粗提物,箭头显示 HSF 条带位置;2 为负对照,*E. coli* TG1(pQE30) 在变性状态下获得的粗提物,在 SDS-PAGE 上箭头所示的位置未观察到蛋白质条带,表明已诱导表达出酿酒酵母 HSF;3、4 分别为活性状态下初步亲核纯化的酿酒酵母 HSF。3 是采用 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱所得 HSF,同标准质量浓度的 BSA 比较发现,HSF 的质量浓度约为 0.005 μ g/ μ L,上样量为 0.1 μ g。4 是采用 100 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱的 HSF,质量浓度为

0.1 μ g/ μ L,上样量为 2.0 μ g。HSF 主要集中在 100 mmol/L 咪唑洗脱液中。从 400 mL 的 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 培养物中可获得 0.4 mg 酿酒酵母 HSF。



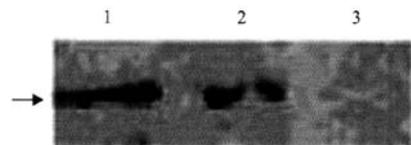
注:M 为蛋白质相对分子质量标记,1 表示经 IPTG 诱导的 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 细胞粗提物;2 表示经 IPTG 诱导 *E. coli* TG1(pQE30) 菌株的粗提物,为负对照;3 表示 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱的 HSF;4 表示 100 mmol/L 咪唑洗脱液中的 HSF。上样量为 20 μ L,箭头显示 HSF 条带位置。

图 2 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 的诱导表达与初步纯化

Fig. 2 Yeast HSF purified from *E. coli* TG1(pQE30/yHSF)

2.3 HSF 的 Western 分析

2.0 μ g 上述纯化的 HSF 样品经 10 g/dL SDS-PAGE 电泳后,凝胶上的蛋白质被立即转移到 PVDF 膜上,用 HSF 的单特异性抗体进行 Western blotting 分析,见图 3。



注:1 表示 20 μ L 经 IPTG 诱导 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 表达酵母 HSF 的细胞蛋白质粗提物印迹;2 表示 2 μ g 初步纯化的 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 表达的酵母 HSF 的印迹;3 表示负对照,20 μ L 经 IPTG 诱导 *E. coli* TG1(pQE30) 表达的蛋白质粗提物印迹,但没有任何印迹条带。箭头所示为印迹条带。

图 3 HSF 的 Western blotting 分析

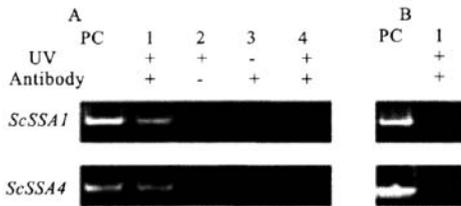
Fig. 3 Western blotting analysis

图 3 中 1、2 分别表示 IPTG 诱导的 *E. coli* TG1(pQE30/yHSF) 蛋白质粗提物和初步纯化的 HSF 显示出的印迹条带,如箭头所示;3 表示负对

照, *E. coli* TG1(pQE30)的蛋白质粗提物则无印迹条带。Western 分析结果进一步表明,上述纯化的蛋白质样品中确实含酿酒酵母 HSF。

2.4 PCR 分析 HSF 与 *ScSSA1* 和 *ScSSA4* 启动子区靶 DNA 的特异结合

分别在热激基因 *ScSSA1*、*ScSSA4* 的启动子区和编码区设计引物,用 PCR 方法分析紫外激光交联和免疫沉淀 DNA 片段库中是否特异富集 HSF 结合的 *ScSSA1* 和 *ScSSA4* 启动子区 DNA 片段。PCR 扩增产物经 10 g/dL 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,见图 4。



注:PC 表示正对照,以酵母基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物。

A: 1 表示 HSF-DNA 复合物经紫外激光交联和特异性抗体免疫沉淀 DNA 为模板的 PCR 扩增;2、3 分别表示试验中设计的负对照,2 表示 HSF-DNA 复合物经紫外激光交联但在免疫沉淀中不加抗体的免疫沉淀 DNA 的 PCR 扩增;3 表示 HSF-DNA 复合物不经紫外激光交联,特异性抗体免疫沉淀 DNA 的 PCR 扩增;4 表示以等量 BSA 和酵母 DNA 片段进行交联,特异性抗体免疫沉淀 DNA 的 PCR 扩增。进行 PCR 扩增引物为 *ScSSA1*、*ScSSA4* 的启动子区引物(*ScSSA1*-307/314, *ScSSA4*-301/308)。

B: 1 表示 HSF-DNA 复合物经紫外激光交联和以特异性抗体免疫沉淀的 DNA 为模板,用 *ScSSA1*、*ScSSA4* 的编码区引物(*ScSSA1* +1893/1899、*ScSSA4* +1668/1672)进行 PCR 扩增。

图 4 PCR 分析 HSF 与 *ScSSA1* 和 *ScSSA4* 上游启动子区的特异结合

Fig. 4 PCR determination of HSF-binding upstream promoters of *ScSSA1* and *ScSSA4*

图 4 中 PC 为正对照,即以酵母基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增。在图 4 A 中,1 表示用 1 μ L 紫外激光交联 HSF-DNA 复合物和用特异性抗体免疫沉淀的 DNA 为模板,用 *ScSSA1*、*ScSSA4* 的启动子区引物(*ScSSA1*-307/314, *ScSSA4*-301/308)进行 PCR 扩增,PCR 产物与正对照的位置相同。2、3 和 4 分别为试验中设计的 3 个负对照:2 为 HSF 和酵母基因组 DNA 片段经紫外激光交联但免疫沉淀中不加抗体的 DNA 的 PCR 扩增;3 为 HSF 和酵母基因组 DNA 片段不经紫外激光交联、

免疫沉淀 DNA 的 PCR 扩增;4 为以等量 BSA 和酵母 DNA 片段进行交联,特异性抗体免疫沉淀 DNA 的 PCR 扩增。在上述 3 个负对照中,和正对照相同的位置均未获得 PCR 扩增产物(见图 4)。在图 4 B 中,PC 为正对照;1 为 1 μ L 紫外激光交联 HSF-DNA 复合物和用特异性抗体免疫沉淀 DNA 为模板,分别用 *ScSSA1*、*ScSSA4* 编码区引物(*ScSSA1* +1893/1899; *ScSSA4* +1668/1672)进行 PCR 扩增,但未获得 PCR 扩增产物。结果表明,酿酒酵母 HSF 特异结合 *ScSSA1*、*ScSSA4* 的启动子区靶 DNA 片段。由于未经紫外激光交联的样品免疫沉淀不能富集 *ScSSA1*、*ScSSA4* 的启动子区 HSF 结合的 DNA,说明紫外激光在酿酒酵母 HSF 与靶 DNA 片段之间形成共价结合中起重要作用。

3 结 语

在逆境条件下,酿酒酵母 HSF 与热激基因启动子区 HSE 结合诱导该基因的时空表达,增强细胞对环境逆境的应答反应能力。紫外激光交联和免疫沉淀技术可以在极短的时间内凝固 HSF-DNA 结合的某一动态过程,也是研究其它转录调控蛋白质与 DNA 相互作用及鉴定蛋白质在基因组上的结合位点的一种实验手段。紫外激光交联和免疫沉淀技术已从最早用于体外研究不同蛋白质与 DNA 的相互作用到体内动态分析蛋白质与基因组 DNA 的结合模式及鉴定转录因子在基因组上的结合位点,而且研究对象已趋向真核生物。

紫外激光(266 nm)被认为是零距离的交联剂,克服了普通紫外光交联效率很低和甲醛交联剂易导致蛋白质-蛋白质、RNA-RNA 或 RNA-蛋白质的交联的缺点。紫外激光器发出的连续高能光子能使蛋白质氨基酸残基和靶 DNA 碱基之间形成稳定的共价键,但作为一种复杂的技术在研究不同的蛋白质与 DNA 的相互作用时需要探讨紫外激光交联参数^[10,14-15],如光波长、一个脉冲的能量及交联时间等,以获得最大的交联效率。同时,减少激光对 DNA 造成的损伤。作者应用紫外激光交联和免疫沉淀技术分析酿酒酵母 HSF 与 *ScSSA1* 和 *ScSSA4* 上游启动子区靶 DNA 的特异结合,也为研究其它转录因子与靶 DNA 的相互作用及分析蛋白质的基因组结合位点提供了一条新途径。

参考文献(References):

- [1] Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995(11):441-469.
- [2] Littlefield O, Nelson H C. A new use for the wing' of the winged' helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocrystal[J]. *Struct Bio*, 1999(6):464-470.
- [3] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines[J]. *Cell*, 1998,92:351-366.
- [4] Ellis R J, Hartl F U. Principles of protein folding in the cellular environment[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1999(9):102-110.
- [5] Fink A L. Chaperone-mediated protein folding[J]. *Physiol Rev*, 1999,79:425-449.
- [6] Caruccio L, Bae S, Liu A Y, et al. The heat-shock transcription factor HSF1 is rapidly activated by either hyper- or hypo-osmotic stress in mammalian cells[J]. *Biochem J*, 1997,327:341-347.
- [7] Hockensmith J W, Kubasek W L, Vorachek W R, et al. Laser cross-linking of protein-nucleic acid complexes[J]. *Methods Enzymol*, 1991,208:211-236.
- [8] Moss T, Dimitrov S I, Houde D. UV-laser crosslinking of proteins to DNA[J]. *Methods*, 1997(11):225-234.
- [9] Buckle M, Geiselmann J, Kolb A, et al. Protein-DNA cross-linking at the lac promoter[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991,19:833-840.
- [10] Russmann C, Truss M, Fix A, et al. Crosslinking of progesteron receptor to DNA using tuneable nanosecond, picosecond and femtosecond UV laser pulses[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997,25:2478-2484.
- [11] Angelov D, Dimitrov S I, Stefanovsky V Yu, et al. Protein-DNA crosslinking in reconstituted nucleohistone, nuclei and whole cells by picosecond UV laser irradiation[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988,16:4525-4538.
- [12] Lejnine S, Durfee G, Murnane M, et al. Crosslinking of proteins to DNA in human nuclei using a 60 femtosecond 266 nm laser[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999,27:3676-3684.
- [13] Zhang L, Eggers-Schumacher G, Schffl F P. Analysis of heat-shock transcription factor-DNA binding in *Arabidopsis* suspension cultures by UV laser crosslinking[J]. *Plant J*, 2001,28:217-223.
- [14] Meisenheimer K M, Koch T H. Photo-crosslinking of nucleic acids to associated proteins[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1997,32:101-140.
- [15] Russmann C H, Stollhof J, Weiss C, et al. Two wavelength femtosecond laser induced DNA-protein crosslinking[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998,26:3967-3970.

(责任编辑:李春丽)

《食品与生物技术学报》 广告费收费标准

彩色广告

封面	15000 元/期
封二	8000 元/期
封三	6000 元/期
封底	10000 元/期
内页	5000 元/期

黑白广告

整版内页	2000 元/期
补白	800 元/期

地址:江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号 江南
大学杂志社

邮编:214122

联系电话:0510-85913526

《食品与生物技术学报》广告部