

DOI: 10.13376/j.cblls/2018071

文章编号: 1004-0374(2018)05-0585-08

· 技术与应用 ·

DNA与蛋白质的相互作用及其生物学研究方法

孙宇航, 王宇祥*

(东北农业大学动物科学技术学院, 农业部鸡遗传育种重点实验室, 黑龙江省普通
高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: DNA和蛋白质是构成生物体最为重要的两类生物大分子, 两者特异性或非特异性识别及相互作用在整个基因组表达调控过程中发挥着重要的作用, 是了解生命活动基本过程的分子基础。为此, 从DNA与蛋白质相互作用的概述及其作用形式入手, 对目前应用较多的几种分子生物学检测方法, 如电泳迁移率变动分析(EMSA)、DNase I足迹法(DNase I footprinting)、酵母单杂交技术(Y1H)以及染色质免疫沉淀技术(ChIP)的原理、优缺点、优化方法及其最新应用等进行了综述。

关键词: DNA; 蛋白质; 相互作用

中图分类号: Q33 **文献标志码:** A

Interaction and biological research methods of DNA-protein

SUN Yu-Hang, WANG Yu-Xiang*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Education Department of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: DNA and protein are two kinds of most important macromolecules in organisms. Their specific or non-specific identification and interaction play important roles in the expression and regulation of whole genome, and help to understand the basic processes of life activities. Therefore, in this article, we summarize the concept and types of DNA-protein interaction, and review the principles, merits and demerits, optimization and application of several biological detection methods of DNA-protein interactions, such as electrophoretic mobility shift assay (EMSA), DNA footprinting (DNase I footprinting), yeast one-hybrid (Y1H) and chromatin immunoprecipitation (ChIP).

Key words: DNA; protein; interaction

DNA与蛋白质的相互作用是生命科学研究的主要课题之一, 涉及了多学科交叉的相关知识和技术方法, 其在基因的转录和调控、DNA的复制和修复、DNA的重组和包装, 以及染色质和核糖体的形成等方面都发挥着重要作用。真核生物的DNA常与蛋白质(组蛋白和非组蛋白)结合, 形成非常复杂的染色质结构, 其中染色质构象的变化、染色质中蛋白质的变化以及染色质对DNA酶敏感程度的变化都直接影响着真核基因的表达调控^[1]。基因的表达调控主要表现在转录水平、转录后水平、翻译水平和翻译后水平等几个层次; 其中, 转录水平的调

控是基因表达调控的关键, 尤其在原核生物中^[2], 这也充分体现了基因表达调控的经济控制原则。随着基因组学研究工作的深入发展, 科学家们发现DNA不仅可以编码蛋白质, 还可以和蛋白质结合, 调节基因活性, 同时通过转录RNA, 影响基因的表达; 此外, DNA还可作为各种化学修饰物的底物,

收稿日期: 2017-09-25; 修回日期: 2017-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201796); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20122325120008)

*通信作者: E-mail: wyx2000@neau.edu.cn

对基因的沉默发挥一定的作用。许多疾病的发生和发展都与 DNA 结合蛋白的异常相关。DNA 结合蛋白的研究也越来越受到人们的关注, 阐明蛋白质如何与成百上千的 DNA 相互作用非常重要。为此, 本文总结了检测 DNA- 蛋白质相互作用的常规生物学研究方法及其研究进展, 以期系统了解和认识该前沿领域, 促进其研究工作的进展。

1 DNA与蛋白质的相互作用

21 世纪之初, 经过各国科学家的共同努力, 人类基因组草图得以绘制成功^[3]。但是科学家们发现, 在人类基因组中编码蛋白质的基因数目只占整个人类基因组的不到 2%, 有超过 98% 的人类基因的作用尚未完全清楚^[4-5]。随着生命科学研究的不断发展, 人们逐渐意识到基因组信息并不能完全解释和预测各种生命过程及现象, 而蛋白质作为细胞活性和功能的执行者, 越来越受到人们的关注。蛋白质和其他生物分子的相互作用, 尤其是核酸分子, 是细胞生命活动的基础^[6-7]。在无脊椎动物的基因组中, 编码 DNA 结合蛋白的基因占到基因总数的 2%~3%; 在脊椎动物基因组中, 占到基因总数的 6%~7%^[8]。这些 DNA 结合蛋白在基因的复制、转录、翻译等生命活动中发挥着重要的基础作用^[9-11], 对于维持细胞正常遗传信息的复制与传递、细胞的新陈代谢、物质运输和信号转导具有重要的意义^[7,11-15]。

实际上, 生物体内这些生物分子之间的相互作用正是各种生命现象产生的基础。自然界中一切生命过程都是由生物分子之间或生物分子和其他物质分子之间进行接触, 进而发生物理和化学变化等所引起的^[16]。因此, 研究生物分子之间的相互作用可以阐明生物反应的机理, 揭示生命现象的本质; 而 DNA 与蛋白质是构成生物体最重要的两类生物大分子, 是许多生命活动的重要组成部分, 两者的特异性或非特异性识别和相互作用在整个基因组表达调控过程中发挥着重要作用。

DNA 通常都与蛋白质结合形成复合物, 以核蛋白 (nucleoprotein) 的形式存在于生物体内。细胞中的核蛋白主要存在于染色体和核糖体中, 其中 DNA- 核蛋白主要存在于细胞核内, 而 RNA- 核蛋白主要存在于核糖体中。

DNA 结合蛋白 (DNA-binding proteins, DBPs) 在基因的转录过程中占据着关键的位置^[17]。在基因转录过程中, 依赖于 DNA 分子的 RNA 聚合酶就是一种重要的 DNA 结合蛋白。RNA 聚合酶和一些通用

转录因子 (general transcription factors, GTFs) 结合在基因上游的启动子区域, 形成一个封闭状态的复合物, 也叫转录起始复合物 (preinitiation complex, PIC)。转录起始复合物结合在转录起始位点 (transcription start site, TSS) 上游附近的一段核心启动子区, 这段序列对转录起始过程至关重要^[18]。核心启动子区内含有多种序列元件, 如在真核生物中高度保守的 TATA 盒, 这段 DNA 序列的作用是介导转录起始复合物的组装。通用转录因子是一类涉及到转录起始并与 RNA 聚合酶 II 相关的蛋白, 包括 TFIID、TFIIA、TFIIB、TFIIF、TFIIE 和 TFIIH^[19]。这类蛋白一般都有 DNA 结合域, 可以结合在核心启动子区域并引导 RNA 聚合酶定位到转录起始位点上。转录因子结合位点大多位于启动子区域, 也有距离启动子区域较远的情况^[20]。对于某个特定的转录因子来说, 结合位点区域的 DNA 序列非常保守, 转录因子通过识别保守的 DNA 序列与调控元件结合, 激活或者抑制下游目标基因的转录活性。

生物的正常生长、发育和分化都是由基因调控而有序表达的结果。因此, 基因表达的定时和定位, 即时间和空间, 是转录过程中至关重要的因素。基因的时空特异性表达主要是由转录因子与其识别的 DNA 顺式元件以及与 RNA 聚合酶之间产生相互作用, 进而对内外环境的影响作出反应的结果。关于蛋白质与 DNA 的特定序列结合形成复合物的过程, 目前普遍接受的理论认为蛋白质分子在细胞内通过“三维促进扩散”的方式靠近 DNA 分子, 然后沿着 DNA 分子采用“一维滑行”的方式准确定位在结合位点上^[21-22]。Wunderlich 和 Mirny^[23]进一步发现, 根据蛋白质在细胞内距离其靶标 DNA 分子起始位置的不同, 整个识别过程又可以分为缓慢的整体搜索和快速的局部搜索两种方式。

2 DNA与蛋白质相互作用的研究方法

DNA 与蛋白质相互作用的研究方法主要是通过生物化学、物理化学以及生物信息学等手段来实现的, 如荧光能量共振转移技术 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)、扫描探针显微镜技术 (scanning probe microscope, SPM)、电泳迁移率实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)、染色质免疫沉淀技术 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 等。其中, 分子生物学研究方法一直是主流和重点研究方法。因此, 本文重点针对电泳迁移率变动分析、DNase I 足迹法、酵母单杂交技术以及染色质免疫沉淀技

术等分子生物学方法, 从原理、优化方法、优缺点及其最新应用等方面进行介绍。

2.1 电泳迁移率实验(EMSA)

电泳迁移率实验又称凝胶阻滞或电泳迁移率变动分析, 是用于转录因子与启动子相互作用的验证性实验, 可用于定性和定量分析。在进行 EMSA 时, 通常将纯化的蛋白和生物素标记的 DNA 探针共同孵育, 在非变性的聚丙烯凝胶电泳上, 分离复合物和非结合的探针, 其基本原理是: DNA 与蛋白质结合后, 将大大增加 DNA 的相对分子质量, 而凝胶电泳中 DNA 朝正电极移动的距离与其相对分子质量的对数成正比。因此, 与蛋白质结合的 DNA 片段由于分子量较大, 在进行聚丙烯酰胺凝胶电泳时迁移较慢, 而没有结合蛋白质的探针则迁移较快。经放射自显影后, 如果在目的探针条带后又出现一条带, 则说明有蛋白质与目的探针发生互作。

此外, EMSA 还被用于研究与蛋白质相结合的 DNA 序列特异性以及结合蛋白的特异性, 如在 DNA-蛋白质复合物中加入过量未标记的 DNA 分子, 如果它与标记的 DNA 分子结合同一种蛋白质, 由于未标记的 DNA 分子(也叫冷探针, 起竞争作用)远远多于标记的 DNA 分子, 则绝大部分蛋白质会优先与未标记的 DNA 分子结合, 使标记的 DNA 分子处于游离状态, 放射自显影图上的阻滞条带就会显著变浅甚至消失; 相反, 如果加入的冷探针不能与标记的探针 DNA 分子竞争结合同一蛋白质, 则标记的探针 DNA 仍然结合特定的蛋白质, 形成复合物, 放射自显影图片上仍有阻滞条带, 从而证明此 DNA 探针与该蛋白质结合的特异性。另外, 在 DNA-蛋白质复合物中加入结合蛋白的特异性抗体, 由于抗体、蛋白质、DNA 三者形成复合物的分子质量更大, 使得其探针 DNA 迁移率明显下降, 因此, 在原有结合条带的上方出现一条明显的阻滞条带, 进而证明结合蛋白的特异性。在此基础上, 可以合成一系列一个或数个突变碱基的标记探针, 运用 EMSA 法来确定该探针 DNA 分子中与蛋白质直接发生相互作用的关键性碱基, 确定其结合位点。

为提高探针的灵敏度, 人们从对 DNA 片段进行同位素标记^[24-25], 到用地高辛、生物素^[26-27]进行标记, 再到后来采用染料, 如吖啶菁标记寡核苷酸^[28]标记等。目前, Hsieh 等^[29]开始使用荧光染料来标记 DNA, 这种方法易于处理、节省时间, 且降低成本; 董先辉等^[30]也公开了一种用于 EMSA 探针的制作方法, 此法可由单链探针经 PCR 制得双链探针,

不会出现由于复性不彻底造成的假阴性, 还克服了单链游离探针带来的显影误差。

近些年来, 人们广泛运用 EMSA 研究转录因子与 DNA 体外结合的特异性及其结合的核心序列^[28,31-32]。因其简单、迅速、灵敏且直观, 目前已经成为研究转录因子与核酸体外相互作用的经典方法^[33]。贾琳娜等^[34]使用 EMSA 分析结果显示, *MAZ* 基因启动子区距转录起始点 -525~-504 nt 的核酸序列可与转录因子 Elk-1 在体外相结合, 其顺式作用元件为 CTTCCCCCA。Kang 等^[35]利用双荧光素酶报告基因和凝胶阻滞实验发现, C/EBP β 可增强 *FAM3A* 基因的启动子活性, 且在 *FAM3A* 基因的启动子上有两个 C/EBP β 的结合位点。Hu 等^[36]通过凝胶阻滞实验证明, 与未甲基化探针相比, 甲基化探针在相应的转录因子 NF-Y、GATA-1、GATA-2 的结合上具有较低的亲和力。Tokay 等^[37]通过凝胶阻滞实验表明 SP1 可以直接结合到 *URG4/URGCP* 基因的启动子区 -148/-128 位点上。Hu 和 Kockar^[39]利用 EMSA 法证实 ER α 通过直接结合 Sp1 蛋白间接调控 *MALAT-1* 基因的表达。

2.2 DNase I 足迹法(DNase I footprinting)

DNase I 足迹法由 Galas 和 Schmitz^[39]于 1978 年首次运用于 DNA 序列特异性结合蛋白的研究。DNase I 是直径约 40 Å 的蛋白, 结合于 DNA 小沟, 可独立地切割两条链的磷酸骨架^[40]。因其体积较大, 切割作用更容易受空间位阻作用的影响, 不能切割到有蛋白质覆盖区域的 DNA, 其原理是: 将含有特定顺式元件的双链 DNA 片段进行单链末端标记, 然后加入恰当浓度的 DNase I, 对 DNA-蛋白质复合物进行酶切, 形成不同长度的 DNA 片段(最好使其相邻的 DNA 片段只差一个核苷酸), 最后片段经变性 PAGE 电泳分离, 在放射自显影图谱上, 产生分裂梯“足迹”, 故也称足迹法^[41]。

DNase I 足迹法是一种测定结合蛋白在 DNA 上准确结合位点的技术。Carey 等^[42]在前人的基础上就 DNase I 分析方法的具体操作步骤作了详细描述。Sivapragasam 等^[43]进一步优化了 DNase I 方法中 DNA 片段分析工作流程, 以确保 DNA 片段在 DNase I 断裂模式变化中依然可以被有效识别。足迹法最简单的应用是可以判断一个感兴趣的蛋白是否与目标 DNA 片段结合^[44]。实际上, 这种方法可以精确地判断蛋白质与 DNA 片段的结合位点, 精确到单碱基水平。由于该技术在实际操作中涉及有机抽提、离心等蛋白质纯化步骤, 较为繁杂, 因此

在该方法的基础上又发展了固相 DNase I 足迹法^[45]。

DNase I 足迹法常与 EMSA 法结合共同用于体外 DNA-蛋白质相互作用的鉴定,但两者的侧重点不同。EMSA 主要用于与特异性 DNA 结合的目标蛋白的检测,而 DNase I 足迹法在此基础上进一步证明了 DNA 元件和目标蛋白的特异结合,并能比较结合蛋白与其多个结合片段的亲和力^[46]以及确定与该蛋白结合的 DNA 片段序列。Cui 等^[47]通过凝胶阻滞和 DNase I 足迹法证实组蛋白类核结构蛋白(H-NS)在 *evpC* 基因的上游具有多个结合位点,高亲和力基序为 9 个核苷酸序列 ATATAAAAT。邓志平^[48]通过凝胶阻滞和 DNase I 足迹法证明, *ArsZ* 的转录表达直接受激活蛋白 NtrC 和 σ 因子 RpoN 协同调控,预示其在氮代谢调控中可能发挥作用。

王超^[49]将传统的 DNase 足迹法与新一代高通量测序技术结合(DNase-seq),在全基因组水平研究米曲霉的蛋白质和 DNA 相互作用模式,解析了基因组上的不同类型转录因子结合位点及其调控机制。Pannuri 等^[50]通过 DNase I 足迹法证实了环磷酸腺苷受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP)特异性结合到 *csrC* 启动子区上游三个结合位点。Zhou 等^[51]通过凝胶阻滞和 DNase I 足迹法分析表明, SprA 结合 *sprA* 基因上游的两个特异性自调节元件,暗示其具有自我调节机制。

2.3 酵母单杂交技术(yeast one-hybrid system, Y1H)

酵母单杂交技术是 20 世纪 90 年代中期从酵母双杂交技术发展起来的新技术,可识别稳定结合于 DNA 上的蛋白质,可在酵母细胞内研究真核生物中 DNA-蛋白质间的相互作用,也可通过分析酵母细胞内报告基因表达状况来鉴定 DNA 顺式作用元件和转录因子的结合情况。此外,该技术也是分析鉴定细胞中转录调控因子与顺式作用元件相互作用的有效方法。首先,将已知的特定顺式作用元件构建到启动子的上游,把报告基因连接到启动子的下游;然后,将编码待测转录因子的 cDNA 插入到已知的酵母转录激活结构域表达载体中,并将其导入到酵母细胞,如果该基因表达的产物能够与顺式作用元件结合,就可以激活启动子,使报告基因得到表达,进而确定转录因子与顺式作用元件的相互作用。常用的酵母单杂交技术基本选用 *HIS3* 或 *lacZ* 作为报告基因,虽然有的系统将带有报告基因的载体直接整合于酵母染色体上,但在大部分实验中报告基因都位于质粒 DNA 上^[52]。

酵母单杂交技术在转录因子的研究中得到了很

好的应用。邱迎风等^[53]利用酵母单杂交实验证明, GhMYB9 转录因子能够特异结合 AC 顺式作用元件。张兵等^[54]利用酵母单杂交和染色质免疫共沉淀(ChIP)研究发现, 柞柳的 ThDof16 可识别 *ThbHLHI* 基因启动子中的 DOF 元件,说明 ThDof16 是调控 *ThbHLHI* 基因表达的上游调控因子。Yadav 等^[55]应用酵母单杂交实验证实 GhMYB1 结合到 *PGhGDSL* 基因启动子区,且结合序列为 AAACCA。Liao 等^[56]利用酵母单杂交实验表明 FaTHSFA2a 具有反式激活功能, FaTHSFB1a 具有反式抑制功能。

酵母单杂交系统相对直接、快捷、灵敏,无需复杂的蛋白质分离纯化操作^[57],筛选到的蛋白质是在体内相对天然条件下有结合功能的蛋白质,比其他体外技术获得的结果更能体现真核细胞内基因表达调控的实际情况,而且酵母是真核细胞,在酵母体内研究 DNA-蛋白质间的相互作用与真核基因表达调控的实际情况更为接近,天然构象的蛋白也避免了体外研究的不足^[41],因此该技术更易于理解真核生物基因的表达调控。Yan 和 Burgess^[58]开发了一种酵母逆单杂交系统,它可以快速地识别全基因组中转录因子的结合位点,但由于插入的靶元件与酵母内源转录激活因子可能发生相互作用,或插入的靶元件不需要转录激活因子就可以激活报告基因的转录以及细胞技术的先天局限性和所用报告基因 *HIS3* 或 *lacZ* 的自泄漏表达等缺陷,该技术在实际操作中常出现漏检和较高假阳性现象^[59]。

2.4 染色质免疫沉淀技术(ChIP)

ChIP 技术由 Orlando 等^[60]于 1997 年创立,是一项新发展的研究活体细胞内染色质 DNA 与蛋白质相互作用的技术,其基本原理为:首先,将处于适当生长时期的活细胞用甲醛交联后将细胞裂解,分离染色体并将其打碎为一定大小的片段;其次,通过抗原抗体的特异性识别,沉淀目标蛋白与 DNA 交联的复合物,从而富集特定靶蛋白与 DNA 片段;再次,采用低 pH 值条件反交联, DNA 与蛋白质之间的希弗(Schiff)键水解,释放 DNA 片段;最后,通过对目标片段的纯化及 PCR 检测,获得 DNA 与蛋白质相互作用的信息,包括具体的 DNA 序列特征、位置、结合时间、亲和程度以及对基因表达的影响等^[61]。

在上述 ChIP 实验过程中,甲醛能够进入细胞并使蛋白质与 DNA 或蛋白质与蛋白质之间通过 Schiff 键交联,形成稳定结合的复合物。如果交联效果不太好,可以先用交联剂 DMA(dimethyl adipimidate)^[62]

或 DSG(disuccinimidyl glutarate)^[63] 处理细胞, 以加强后续甲醛交联的效果。破碎 DNA 可采用超声物理破碎或特定酶切消化, 以获得所需长度的 DNA 片段。由于 DNA 片段长度将影响抗体免疫沉淀效率, 因此, 破碎 DNA 是 ChIP 实验成功与否的重要因素。超声效果与细胞裂解是否充分、细胞浓度及裂解液成分等因素有关。

ChIP 实验成功的关键是选择专一性及亲和力较高的抗体。非特异性抗体将增加大量非目标靶点 DNA 片段信息, 从而掩盖了真实的蛋白质结合位点信息; 而亲和力较差的抗体, 则无法获得高信噪比靶点 DNA 片段^[64]。此外, 在甲醛交联过程中可能会有一些蛋白质的表位被掩盖, 这会影响到一部分蛋白质和 DNA 复合体的免疫沉淀反应。因此, 用 Western 印迹或免疫组化等方法证明的能够免疫结合目标蛋白质的抗体, 并不一定能够成功地进行 ChIP 实验。例如, Weitsman 等^[65] 检验了不同的雌激素受体 β 抗体在 ChIP 中的免疫沉淀能力, 发现有的抗体虽然能够在标准免疫沉淀条件下与抗原结合, 但不适合 ChIP 条件下使用, 并且不同抗体的结合效率也有差异。对于某一目标蛋白, 采用多种抗体组合来进行 ChIP 实验是一种有效的方案。值得注意的是, 染色质免疫沉淀获得的 DNA 数量往往相对较多, 其中包含大量的非特异结合造成的背景噪音, 应采用严格的洗涤条件来降低背景。为此, Viens 等^[66] 将靶蛋白与生物素受体片段融合表达, 通过抗生物素磁珠进行免疫沉淀, 由于两者具有较强的结合力, 所以便于进行更为严格的洗涤, 进而达到降低背景的目的。

ChIP 技术能研究 DNA 甲基化、染色质结构、组蛋白修饰和转录因子的协同结合^[67], 或者从预测的靶基因中确定直接的靶位点^[68]。最初, ChIP 技术主要应用于哺乳动物、果蝇、酵母的染色质研究上, 近年来已广泛用于研究转录因子与靶基因上启动子特异性核苷酸序列的相互作用, 如 Luo 等^[69] 利用 ChIP 技术确定出 PPAR γ 1 通过结合 PPAR γ 2 启动子区 (-890/-878) 的功能性 PPRE 从而激活 PPAR γ 2, 证实 PPAR γ 2 是 PPAR γ 1 的靶基因; Lee 等^[70] 用 ChIP 技术证实锌指蛋白 Nrg11 与体内葡萄糖抑制基因的特定启动子区域相互作用; Ye 等^[71] 利用 ChIP 技术证实 OGG-1 与 *Atg7* 的启动子相互作用, 并调控该基因的表达; Forghanifard 等^[72] 利用 ChIP 技术和荧光素酶检测法证实 TWIST1 间接结合 *MAGEA4* 的启动子区, 并首次揭示 TWIST1 可上调

MAGEA4 基因。ChIP 技术也常与 EMSA 实验相结合, 从体内、体外两个方面来验证实验结果, 如 Juneja 等^[73] 利用 ChIP 技术和 EMSA 实验证实 AP-1、Sp1 和 C/EBP 可以结合到 *MACC1* 基因的核心启动子区。Saha 等^[74] 通过凝胶阻滞实验证实, 在人 *Hb- α* 基因启动子区 (-115/-106) 存在转录因子 NF- κ B 的结合位点, 并用 ChIP 实验进一步证实 NF- κ B 可以结合到 *Hb- α* 基因启动子区。

ChIP 技术也可以与新一代测序技术相结合 (ChIP-Seq) 用来分析全基因组范围内 DNA 结合蛋白的结合位点、组蛋白修饰以及 DNA 甲基化, 可以应用到任何基因组序列已知的物种, 并能确切得到每一个片段的序列信息。Yu 等^[75] 利用 ChIP-Seq 进行全基因组分阶段研究发现, Olig2 充当了一种预定位因子, 引导染色质重塑酶 Smarca4/Brg1 到达少突胶质细胞 (OLs) 活性靶点, 从而通过 Brg1 激活 OLs 特定基因表达。Darr 等^[76] 利用 ChIP-Seq 技术证实 Olig2 在成年小鼠脊髓组织中的结合位点与影响 OL 的分化及其髓鞘形成的基因相关, 表明在小鼠成年过程中, Olig2 在 OL 的分化和髓鞘的形成中持续发挥着重要的作用。

3 前景和展望

DNA 与蛋白质的相互作用可以从 DNA、蛋白质、DNA-蛋白质复合物三个层次上来研究。在 DNA 水平上, 可以研究 DNA 构象及与蛋白质相结合的确切碱基序列; 在蛋白质水平上, 可以根据结合特定的 DNA 序列进而确定结合蛋白的种类; 在 DNA-蛋白质复合物水平上, 由于氨基酸与 DNA 之间有着紧密的联系, 可以对 DNA 表面的蛋白进行识别; 此外, 也可对蛋白质的三级结构以及在复合物中的构象变化进行研究。最后, 可对 DNA-蛋白质复合物的整体特性 (如形成动力学、亲和力、形成或解离动力学、稳定性等) 有清楚的认识。

本文所列的分析方法是目前较有代表性的 DNA-蛋白质相互作用的生物学研究方法, 虽然它们在该领域的研究已取得一定的科研成果, 但仍有许多缺陷, 表 1 总结了上述技术的优缺点。由于每种技术的局限性, 且对 DNA-蛋白质相互作用研究的侧重点不同, 应采用不同的实验方法并给予交叉验证, 有利于得出更加准确的结论。随着分子生物学方法的快速发展以及物理学、化学和生物信息等学科的合作, 针对上述三个层次的研究将更加全面, 对 DNA 与蛋白质互作机制的探究将更加

表1 DNA-蛋白质相互作用的方法比较

方法	优点	缺点
电泳迁移率变动分析(EMSA)	<ol style="list-style-type: none"> 1.可用于研究与蛋白质相结合的DNA序列的特异性; 2.确定探针DNA分子中与蛋白质直接发生作用的关键性碱基; 3.灵敏度高,即使靶蛋白的浓度很低也有效; 4.能区分与同一DNA元件结合的不同大小和形状的蛋白质; 5.可定性和定量分析靶蛋白。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.需要核蛋白抽提和探针标记等步骤,过程较繁琐; 2.难以确定某复合体是否含有两种与相邻作用位点结合并协同作用的蛋白质; 3.低亲和力结合很难识别; 4.难以真实地反应体内结合情况。
DNase I 足迹法	<ol style="list-style-type: none"> 1.包含信息量较大; 2.显示每个靶蛋白结合位点的大致定位,并告知该位点的碱基序列; 3.显示出多种蛋白质结合位点在同一探针上的大致定位,对分析大的DNA片段尤为重要。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.蛋白质在高浓度存在时才有效,需纯化蛋白 2.DNase I活性所需的Mg²⁺和Ca²⁺会破坏特异性相互作用; 3.实验中底物需要量大,不能自动区别开DNA-蛋白质复合体上的多个组分。
酵母单杂交技术	<ol style="list-style-type: none"> 1.方法具有敏感性,可鉴定到以微弱亲和力相结合的蛋白质,常用于克隆细胞中含量极低且用生化手段难以纯化的转录调控因子; 2.操作简单,无需蛋白分离、纯化操作; 3.耗时短。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.DNA-蛋白质相互作用定位于核内,易产生假阳性和假阴性; 2.某些与靶基因相互作用的蛋白可能对酵母本身有毒性; 3.不能研究与内源性酵母激活蛋白相互作用的结合位点。
染色质免疫沉淀分析(ChIP)	<ol style="list-style-type: none"> 1.可直接显现DNA与蛋白质之间的体内动态结合; 2.检测灵敏,可用来研究组蛋白的各种共价修饰与基因表达的关系; 3.可与其他技术结合,高通量筛选已知蛋白因子的未知DNA靶点,研究反式作用因子在整个基因组上的分布情况。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.抗体及缓冲液等实验条件要求较高;甲醛的固定可能是暂时的,甚至是非特异性的,可能导致相邻蛋白形成假阳性信号; 2.难以同时得到多个因子对应同一序列结合的信息; 3.被研究的蛋白质因子可能间接地与染色质结合。

深入, DNA与蛋白质相互作用的研究手段将不断发展和完善,对生命现象本质的探索也将更加深入。

[参 考 文 献]

- [1] 赵亚华. 分子生物学教程第三版[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 297
- [2] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34: 628-45
- [3] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409: 860-921
- [4] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of human genome. *Science*, 2001, 291: 1304-51
- [5] Consortium TEP. The ENCODE(ENCyclopedia Of DNA Elements)project. *Science*, 2004, 306: 636-40
- [6] Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett*, 2008, 582: 1977-86
- [7] Aparicio LA, Abella V, Valladares M, et al. Posttranscriptional regulation by RNA-binding proteins during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 4463-77
- [8] Luscombe NM, Austin SE, Berman HM, et al. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol*, 2000, 1: S1
- [9] Van Assche E, Van Puyvelde S, Vanderleyden J, et al. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front Microbiol*, 2015, 6: 141
- [10] Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, et al. Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology*, 2013, 59: 524-33
- [11] Gorospe M. RNA-binding proteins: post-transcriptional control of aging traits: an introduction to a series of review articles. *Ageing Res Rev*, 2012, 11: 421-2
- [12] Wang W. Regulatory RNA-binding proteins in senescence. *Ageing Res Rev*, 2012, 11: 485-90
- [13] Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, et al. General RBP expression in human tissues as a function of age. *Ageing Res Rev*, 2012, 11: 423-31
- [14] Bebee TW, Cieply BW, Carstens RP. Genome-wide activities of RNA binding proteins that regulate cellular changes in the epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Adv Exp Med Biol*, 2014, 825: 267-302
- [15] Braeutigam C, Rago L, Rolke A, et al. The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven

- alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene*, 2014, 33: 1082-92
- [16] 杨帆, 杨秀荣. 表面等离子体共振技术在分子生物学中的应用. *生物工程学报*, 2001, 17: 375-9
- [17] Stormo GD. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics*, 2000, 16: 16-23
- [18] Lenhard B, Sandelin A, Carninci P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 233-45
- [19] Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 327-35
- [20] Hager GL, McNally JG, Misteli T. Transcription dynamics. *Mol Cell*, 2009, 35: 741-53
- [21] Riggs AD, Suzuki H, Bourgeois S. Lac repressor-operator interaction. I. Equilibrium studies. *J Mol Biol*, 1970, 48: 67-83
- [22] Givaty O, Levy Y. Protein sliding along DNA: dynamics and structural characterization. *J Mol Biol*, 2009, 385: 1087-97
- [23] Wunderlich Z, Mirny LA. Spatial effects on the speed and reliability of protein-DNA search. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 3570-8
- [24] Zhang L, Chen W, Li X. A novel anticancer effect of butein: inhibition of invasion through the ERK1/2 and NF- κ B signaling pathways in bladder cancer cells. *FEBS Lett*, 2008, 582: 1821-8
- [25] Xiao H, Lv F, Xu W, et al. Deprenyl prevents MPP⁺-induced oxidative damage in PC12 cells by the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression through the activation of PI3K/Akt and Erk. *Toxicology*, 2011, 290: 286-94
- [26] Wei Y, Weng D, Li F, et al. Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis*, 2008, 13: 1031-42
- [27] Lu J, Zhao J, Liu K, et al. MAPK/ERK1/2 signaling mediates endothelial-like differentiation of immature DCs in the microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67: 2091-106
- [28] Jochmann N, Kurze AK, Czaja LF, et al. Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays. *Microbiology*, 2009, 155: 1459-77
- [29] Hsieh YW, Alqadah A, Chuang CF. An optimized protocol for electrophoretic mobility shift assay using infrared fluorescent dye-labeled oligonucleotides. *J Vis Exp*, 2016, 117: e54863
- [30] 董先辉, 王晓香, 曾健, 等. 一种EMSA方法及其探针和该探针的制备方法. 广东, CN105506150A[P]. 2016-04-20
- [31] 刘晓兵, 南海洋, 袁晓辉, 等. 大豆*GmbZIP71*基因的克隆及EMSA分析. *大豆科学*, 2015, 34: 32-35, 41
- [32] 翟亚男, 许泉, 郭亚, 等. 原钙黏蛋白基因簇调控区域中成簇的CTCF结合位点分析. *遗传*, 2016, 38: 323-36
- [33] Choi H, Hong J, Ha J, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*, 2000, 275: 1723-30
- [34] 贾琳娜. *MAZ*基因启动子区顺式作用元件的EMSA分析[D]. 山西太原: 山西医科大学, 2016: 26-9
- [35] Kang T, Peng D, Bu G, et al. Transcriptional regulation analysis of *FAM3A* gene and its effect on adipocyte differentiation. *Gene*, 2016, 595: 92-8
- [36] Hu T, Zhu X, Pi W, et al. Hypermethylated LTR retrotransposon exhibits enhancer activity. *Epigenetics*, 2017, 12: 226-37
- [37] Tokay E, Kockar F. SP1 is a transcriptional regulator of URG-4/URGCP gene in hepatocytes. *Mol Cell Biochem*, 2016, 423: 75-83
- [38] Hu Q, Li S, Chen C, et al. 17 β -Estradiol treatment drives Sp1 to upregulate MALAT-1 expression and epigenetically affects physiological processes in U2OS cells. *Mol Med Rep*, 2017, 15: 1335-42
- [39] Galas DJ, Schmitz A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, 1978, 5: 3157-70
- [40] Suck D, Lahm A, Oefner C. Structure refined to 2Å of a nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. *Nature*, 1988, 332: 464-8
- [41] 王秋岩, 何淑雅, 马云, 等. 启动子分析方法的研究进展. *现代生物医学进展*, 2015, 15: 2794-800
- [42] Carey MF, Peterson CL, Smale ST. DNase I footprinting. *Cold Spring Harb Protoc*, 2013, 2013: 469-78
- [43] Sivapragasam S, Pande A, Grove A. A recommended workflow for DNase I footprinting using a capillary electrophoresis genetic analyzer. *Anal Biochem*, 2015, 481: 1-3
- [44] Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, et al. Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods*, 2007, 42: 128-40
- [45] Sandaltzopoulos R, Becker PB. Solid phase DNase I footprinting: quick and versatile. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 1511-2
- [46] Leblanc BP, Moss T. *In Vitro* DNase I footprinting. *Methods Mol Biol*, 2015, 1334: 17-27
- [47] Cui S, Xiao J, Wang Q, et al. H-NS binding to *evpB* and *evpC* and repressing T6SS expression in fish pathogen *Edwardsiella piscicida*. *Arch Microbiol*, 2016, 198: 653-61
- [48] 邓志平. 施氏假单胞菌铵响应sRNA(ArsZ)参与固氮调控的作用机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2016: 113
- [49] 王超. 米曲霉基因组水平的蛋白质和DNA相互作用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015: 105
- [50] Pannuri A, Vakulskas CA, Zere T, et al. Circuitry linking the catabolite repression and Csr global regulatory systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2016, 198: 3000-15
- [51] Zhou ZX, Xu QQ, Bu QT, et al. Transcriptome-guided identification of SprA as a pleiotropic regulator in *Streptomyces chattanoogensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 1287-98
- [52] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 219
- [53] 邱迎风, 倪志勇, 刘娜, 等. 陆地棉*GhMYB9*基因克隆及结合特性分析. *核农学报*, 2017, 31: 440-6

- [54] 张兵, 及晓宇, 聂显光, 等. 桤木*ThbHLHI*上游表达调控基因. 东北林业大学学报, 2016, 44: 13-17, 24
- [55] Yadav VK, Yadav VK, Pant P, et al. GhMYB1 regulates SCW stage-specific expression of the *GhGDSL* promoter in the fibers of *Gossypium hirsutum* L. Plant Biotechnol J, 2017, 15: 1163-74
- [56] Liao WY, Lin LF, Jheng JL, et al. Identification of heat shock transcription factor genes involved in thermotolerance of octoploid cultivated strawberry. Int J Mol Sci, 2016, 17: 2130
- [57] 蔡容华, 李强, 张建军, 等. DNA-蛋白质相互作用研究的方法及其新进展. 生物技术, 2009, 19: 93-8
- [58] Yan J, Burgess SM. Using a yeast inverse one-hybrid system to identify functional binding sites of transcription factors. Methods Mol Biol, 2012, 786: 275-90
- [59] Tang Z, Zhao Y, Mei F, et al. Molecular cloning and characterization of a human gene involved in transcriptional regulation of hTERT. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324: 1324-32
- [60] Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. Methods, 1997, 11: 205-14
- [61] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 225
- [62] Kurdستاني SK, Robyr D, Tavazoie S, et al. Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. Nat Genet, 2002, 31: 248-54
- [63] Tian B, Nowak DE, Jamaluddin M, et al. Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor- κ B transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. J Biol Chem, 2005, 280: 17435-48
- [64] Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. Nat Genet, 2008, 40: 897-903
- [65] Weitsman GE, Skliris G, Ung K, et al. Assessment of multiple different estrogen receptor- β antibodies for their ability to immunoprecipitate under chromatin immunoprecipitation conditions. Breast Cancer Res Treat, 2006, 100: 23-31
- [66] Viens A, Mechold U, Lehrmann H, et al. Use of protein biotinylation *in vivo* for chromatin immunoprecipitation. Anal Biochem, 2004, 325: 68-76
- [67] Massie CE, Mills IG. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology and readouts. Methods Mol Biol, 2009, 505: 123-37
- [68] Kel AE, Kel-Margoulis OV, Farnham PJ, et al. Computer-assisted identification of cell cycle-related genes: new targets for E2F transcription factors. J Mol Biol, 2001, 309: 99-120
- [69] Luo H, Zhou Y, Hu X, et al. Activation of *PPAR γ 2* by *PPAR γ 1* through a functional PPRE in transdifferentiation of myoblasts to adipocytes induced by EPA. Cell Cycle, 2015, 14: 1830-41
- [70] Lee SB, Kang HS, Kim T. Nrg1 functions as a global transcriptional repressor of glucose-repressed genes through its direct binding to the specific promoter regions. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439: 501-5
- [71] Ye Y, Lin P, Zhang W, et al. DNA repair interacts with autophagy to regulate inflammatory responses to pulmonary hyperoxia. J Immunol, 2017, 198: 2844-53
- [72] Forghanifard MM, Rad A, Farshchian M, et al. TWIST1 upregulates the MAGEA4 oncogene. Mol Carcinog, 2017, 56: 877-85
- [73] Juneja M, Ilm K, Schlag PM, et al. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene *MACC1* in colorectal cancer. Mol Oncol, 2013, 7: 929-43
- [74] Saha D, Koli S, Patgaonkar M, et al. Expression of hemoglobin- α and β subunits in human vaginal epithelial cells and their functional significance. PLoS One, 2017, 12: e171084
- [75] Yu Y, Chen Y, Kim B, et al. Olig2 targets chromatin remodelers to enhancers to initiate oligodendrocyte differentiation. Cell, 2013, 152: 248-61
- [76] Darr AJ, Danzi MC, Brady L, et al. Identification of genome-wide targets of Olig2 in the adult mouse spinal cord using ChIP-Seq. PLoS One, 2017, 12: e0186091