

用S₁核酸酶方法测定αAC-616晶体蛋白基因转录起始点

刘祥麟

童坦君

(浙江医科大学肿瘤基因组 杭州 310006) (北京医科大学生化与分子生物学系 100083)

邵伟 Gene Lavers 陈亨

(纽约大学 生化系 10010)

我们在一个克隆化的基因系统中研究了DNA超螺旋结构在αAC晶体蛋白基因表达中的调控作用；测定了调节基因区及其对转录过程的影响，结果显示αAC晶体蛋白基因可被RF-36蛋白因子特异性激活。足迹法分析表明其调控结合区为核苷酸“AGGGCTGGA-A”，能与特定的DNA配位体结合，例如抗Z-DNA单克隆抗体和Chiral金属复合物。此种结合表明αAC晶体蛋白基因富含“GC”盒，并具有类似“Z”型DNA构型。所获结果还提示，DNA结构的高度有序性在αAC晶体蛋白基因的表达调控过程中起重要作用^[1,2]。在此基础上我们用S₁核酸酶分析法对αAC晶体蛋白基因的转录起始点进行了测定。

-crystallin A₂ gene)简称PaAC，来自美国NIH的Dr.J.Piatigrosky实验室。本室所用为PaAC-1500(图1)，它的碱基对包括-826+673基因序列，是基因图中的第一外显子。用末端转移酶作³²P标记，然后用限制性内切酶EcoRI和BamHI进行酶切，得下游片段，为含有616个碱基对(+57+673)，简称为αAC-616晶体蛋白基因，对其作亚克隆扩增(图2)。

材料和方法

一、材料

1. 已克隆化的质粒晶体蛋白基因(plasmid Alpha)

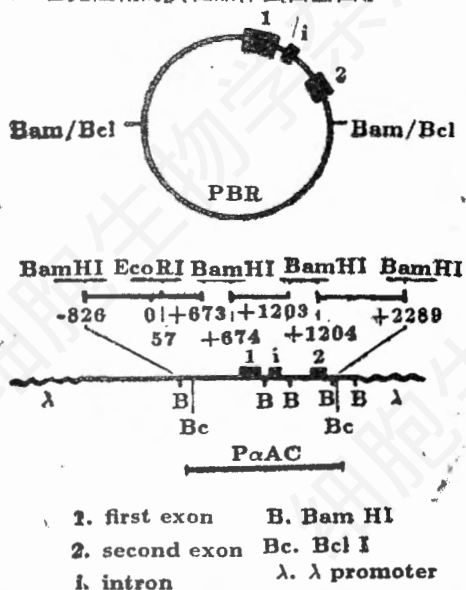


图1 αAC晶体蛋白基因克隆及其酶切图

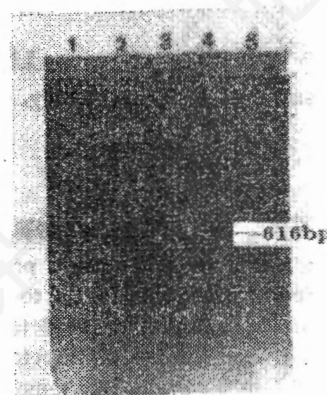
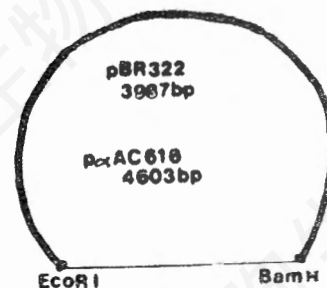


图2 PaAC-616基因和亚克隆

2. 真核转录系统。HeLa细胞裂解物(富含RNA聚合酶II和转录所必需的因子)和分子量标准对照物φx174 DNA/HaeIII片段，均购自BRL公司。

3. 四种核苷三磷酸。ATP、GTP、CTP、UTP以及磷酸肌酸，购自SIGMA公司。

4. 各种核酸酶。Nuclease S₁、DNaseI、RNaseA以及RNaseT₁从Boehringer Mannheim公司购得。

5. 限制性内切酶。EcoR I、BamHI、PstI 从 New England Bio Lab 购入。

6. 同位素： γ - ^{32}P -ATP(650 Ci/mmole, 0.015 $\mu\text{m}/\text{ml}$)购自 ICN 公司。

二、方法

1. 体外转录试验。有关转录试验包括转录产物的合成、分离、纯化, 根据 Manley^[3]的方法进行, 其中 ^{32}P 标记参照 Maniatis^[4]介绍的方法。

2. 杂交和 S_1 核酸酶图谱分析^[5]。当 αAC -616 晶体蛋白基因在 HeLa 细胞裂解物体系中发生 run-off 转录产生 mRNA 后, 即与 ^{32}P - αAC -616 基因探针进行分子杂交(65 $^\circ\text{C}$, 16 hr)后加入 S_1 核酸酶(37 $^\circ\text{C}$, 30') 消化去掉未配对的单链, 而保留杂交产生的 RNA-DNA 双链杂交体(Hybrid), 作含脲素(7 M)的聚丙烯酰胺凝胶(40%)电泳。用放射性 ^{32}P 标记的 $\phi\text{x}174$ Hea III DNA 作分子量标准参照物, 负压干燥后, 作 X 光胶片(XR-2 kodak)曝光(-70 $^\circ\text{C}$, 16 hr)。整个操作流程见图 3。

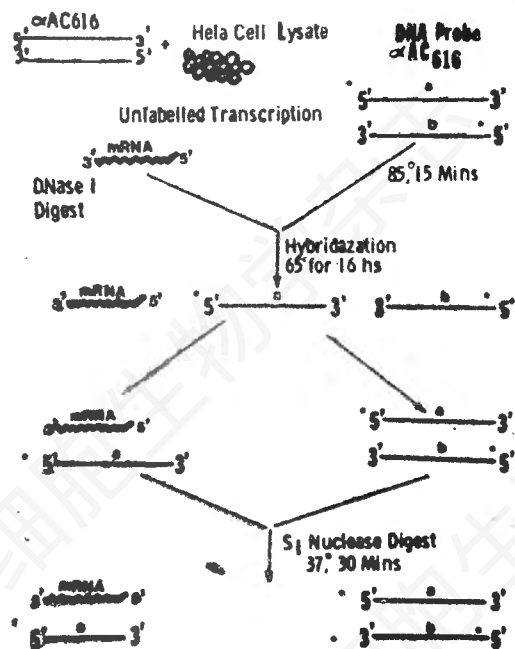


图 3 S_1 Mapping 法测定 αAC 基因转录起始点操作流程图

结 果

冲洗 X-底片, 获图 4 之结果, 在 276 碱基对(bp)处见一清晰条带, 这就是 αAC -616

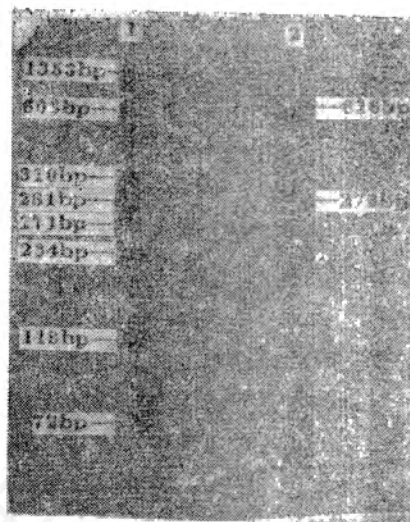


图 4 αAC 基因转录杂交后的聚丙烯酰胺电泳图

1. 分子量标准 $\phi\text{x}174/\text{Hea III}$
2. αAC 基因 S_1 Mapping 后出现 616 和 276 bp 两条带

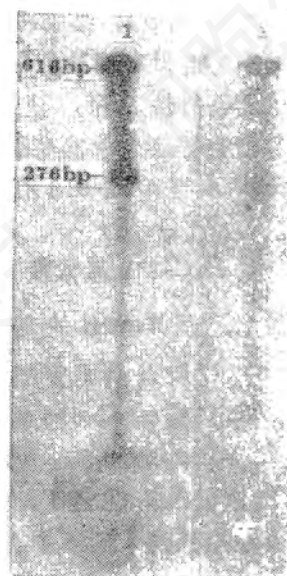


图 5 1. 牛晶体总 mRNA 的 S_1 Mapping
2. SV40 转录片段与 αAC 探针的 S_1 Mapping

晶体蛋白基因在 HeLa 细胞裂解物体系中发生转录产生的杂交体。为了证实该杂交体确是 αAC -616 晶体蛋白基因转录出来的 mRNA 与 αAC -616 DNA 编码单链杂交的产物。我们在 HeLa 转录体系中加入 RNase A 和 RNase T_1 , 使其专一性地水解 RNA 链中的嘧啶核苷酸键和鸟

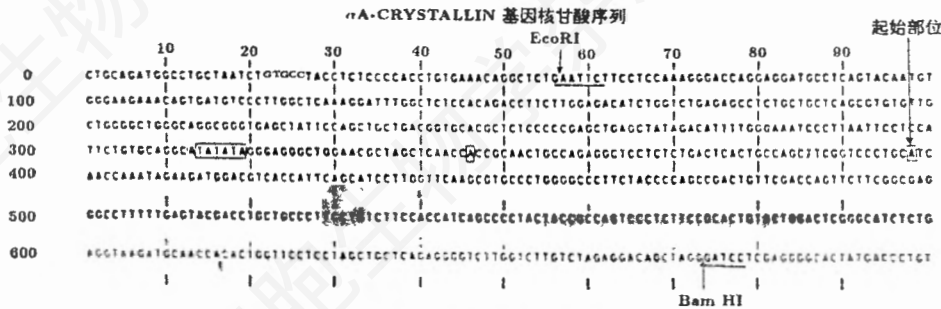


图 6 αAC-616 核苷酸顺序及所测定的转录起始点

苷酸。结果使该转录杂交体条带从电泳图谱中消失，而未加上述两种 RNase 酶的其转录出来的 mRNA 与 αAC-616 基因探针杂交产生的特异条带依然存在。当然，在上述转录体系中若不加 αAC-616 基因，结果也不出现条带。同时我们用牛晶体的总 RNA 与 αAC-616 基因探针进行杂交作阳性对照，用经限制性内切酶 Pst I 酶切的 SV₄₀ DNA 在 HeLa 转录体系中发生转录作阴性对照(图 5)，结果在前者的电泳图谱上看到在 276 bp 处有特异条带；而后者出现深浅各异的非特异性条带，进一步证实此 276 片段的放射自显影条带确是晶体蛋白基因转录出来的 mRNA 与 αAC-616 基因探针杂交产生的条带。

据此我们在 αAC-616 晶体蛋白基因的核苷酸顺序图谱上，从 BamHI 的酶切点-G⁶⁷³G⁶⁷⁴-ATCC-，第 673 G 位点开始逆向上推 276 个碱基对位置，即获得 αAC-616 晶体蛋白基因的转录起始点，Adenosine(A)，见图 6。其位于 αAC-616 晶体蛋白基因全图的第 398 个核苷酸位置上，距该基因 TATA 盒为 79 个核苷酸位置。

实验表明 HeLa 细胞裂解物是研究真核细胞基因转录调控的一个理想体系。

讨 论

迄今尚未见有关晶体蛋白基因转录起始点的报道。已知原核细胞基因的转录起始点距 TATA 盒仅 5—8 个核苷酸位置；而在真核细胞基因的转录起始点通常距 TATA 盒为 20—

30 个核苷酸位点。当时分离该 αAC 晶体蛋白基因的美国学者 Piatigrosky^[9]按常规推定 αAC 基因的转录起始点在该基因 TATA 盒后的第 27 个核苷酸位点 Adenosine(A)，而现在我们用 S₁Mapping 方法证实 αAC-616 晶体蛋白基因的转录起始点 (Initiation site) 位于 αAC 基因图谱顺序的第 398 核苷酸 Adenosine(A) 位置，距 TATA 盒为第 79 个核苷酸位置。该结果不仅表明真核细胞基因转录的复杂性而且也显示出晶体蛋白本身的特殊性。下一步我们拟对该转录产物 mRNA 作顺序分析，以验证本实验结果的真实性。

我们以前的工作证明在 αAC-616 基因图谱上在 +323—+332 核苷酸间存在一个 RF-36 蛋白因子调控结合区(Binding domain)，在 RF-36 结合的情况下可以促进转录活性提高 6—10 倍，我们还证明 αAC-616 晶体蛋白基因具有类似“Z”DNA 的构型，此构型的存在与否也将影响基因转录的起始和表达的调控，显示出真核细胞基因表达模式的复杂性和多样性。提示对晶体蛋白基因转录的起始，TATA 盒是一个必要条件，但不是充分条件，转录的发生还受其他因素的制约。

向 HeLa 转录体系中加入 RNaseA 和 RNase T₁ 都能使杂交体条带消失，这是因为该两 RNA 酶把转录出来的 mRNA 裂解掉了，无法形成杂交体。与此同时我们曾把对 RNA 聚合酶 II 特别敏感的 α-鹅膏蕈碱加到正在进行转录的 HeLa 转录体系中，结果也不见特异性杂交条带出现，其机理是 α-鹅膏蕈碱抑制了 RNA

聚合酶 II 的活性,使其无法起始进行转录。近有文献指出^[7], HeLa 细胞裂解物除含有进行转录所必须的 RNA 聚合酶外尚含有许多与转录有关的因子。今已从 HeLa 细胞裂解物中纯化出一种重要的基本转录因子: TF II H, 是一多亚基蛋白复合物,具有解链酶、依赖 DNA 的 ATP 酶及磷酸激酶活性,参与 mRNA 的转录起始以及与转录偶联的核苷酸切除修复过程。因此可以认为 HeLa 细胞裂解物可以作为研究真核细胞基因转录调控的理想体系。

摘 要

采用 BRL 提供的 HeLa 细胞裂解物,已知该裂解物中含有 RNA 聚合酶 II 和其他基因转录所必需的因子和成分。当 α AC-616 晶体蛋白基因在该体系中发生转录产生 mRNA 后,即与用 ³²P 标记的 α AC-616 晶体蛋白基因探针进行分子杂交,杂交后加入 S₁ 核酸酶消化去掉未配对的 α AC-616DNA 单链,保留杂交形成的 RNA-DNA 双链杂交体。作含脲素的聚丙烯酰胺凝胶电泳,用 ϕ_{x174} Hea III DNA 作分子标准参照物,结果表明转录出来的 mRNA 与 276 个脱氧核糖核苷酸形成互补杂交链,比

5'-末端标记的 ³²P-晶体蛋白基因探针为短。据此在已知的晶体蛋白基因顺序图谱上判定出 α AC-616 晶体蛋白基因的转录起始点位于该图谱的第 398 位核苷酸 Adenosine,距 TATA 盒下游第 79 位(A)。并对晶体蛋白基因转录的特性进行了讨论。

关键词: α AC-616 晶体蛋白基因 转录起始点 S₁ 核酸酶图谱分析

参 考 文 献

- [1] 刘祥麟等, 1989, 浙江医科大学学报, 18 (1): 1-6.
- [2] John, H. Chen et al., 1989, In "Advance in Applied Biotechnology series" Vol. 7 (Takis S. papas Ed.) pp. 107-211. Gulf Publishing Company.
- [3] Manley, J. L., et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 3855-3859.
- [4] Maniatis, T., et al., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. PP 457-473. CSH.
- [5] Berk, A. B., et al., 1977, *Cell*, 12: 721-732.
- [6] Charles R. K. & J. Piatigrosky, 1983, *Cell*, 32: 707-712.
- [7] Sancar, A. & D. Reinberg, 1994, *Nature*, 368: 769-772.

S₁ NUCLEASE MAPPING INITIATION SITE IN THE α A-CRYSTALLIN 616 GENE

LIU Xiang Lin et al.

(Cancer & Oncogene Res. Lab., Zhejiang Medical University, Hangzhou, 310006)

ABSTRACT

S₁ nuclease mapping technique is used to determine the possible initiation site for transcription in the HeLa Cell extract which containing RNA polymerase II and other necessary transcription components. The "Run off" experiments with S₁ mapping indicate that the RNA synthesized is 276 RNA-DNA Hybrids, which is shorter than that of 5'-termini ³²P-DNA probe.

The initiation site is at 398 position in the α A-Crystallin 616 gene in adenosine (A). This result is different from the previously proposed initiation site (Piatigrosky 1983).

This study also indicates that "TATA" box may be necessary but not sufficient for transcription. It shows that the α A-Crystallin 616 gene transcription in the HeLa cell lysate might be a ideal model to study the crystallin gene expression.

Key words, α A-Crystallin 616 gene S₁ mapping Transcription initiation site