人 δ 珠蛋白基因启动子区-64位 C $\rightarrow$ T 点突变对 DNA 结合蛋白的影响

寇海萍 陈松森* 陈卫东 张劲秋 狄旭 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005. * 联系人)

摘要 用凝胶迁移率改变实验(EMSA)研究了人 δ 珠蛋白基因启动子区-64C $\rightarrow$ T 点突变对 DNA 结合蛋白的影响. 人工合成两条 36 bp 该基因启动子区-83~-48 bp 之间的片段 WOG 和 MOG, WOG 含有野生型“CAAT 样盒”(CCAAC), MOG 含有变异型“CAAT 样盒”(CCAAT, -64C $\rightarrow$ T). 结果表明: (1) 在红系细胞 MEL, k562 以及经 Hemin 诱导的 k562 细胞中, MOG 对 CCAAT 结合蛋白(CFB)和 GATA-1 的亲合力显著增加; (2) 经 Hemin 诱导的 k562 细胞中除上述两种因子外, 还存在两种新的特异 DNA 结合蛋白 C 和 D, 前者与 WOG 和 MOG 结合, 可能与 k562 细胞受诱导后基因表达提高有关; 后者只与 MOG 结合, 可能与-64C $\rightarrow$ T 的点突变有关; (3) 人胚胎发育不同阶段胎肝细胞核抽提物 EMSA 结果提示人胚胎发育不同阶段 δ 基因表达被抑制的机制可能不同. 结果证明 δ 基因启动子缺陷的 CAAT 样盒是引起 δ 基因低水平表达的重要因素, 缺陷的顺式作用元件 CAAT 样盒通过影响反式因子 CBF 及 GATA-1 的结合影响基因的表达.

关键词 δ 珠蛋白基因 启动子 结合蛋白 凝胶迁移率改变实验

人 δ 和 β 珠蛋白结构基因具有高度同源性, 然而在红系细胞中 δ 基因的表达只有 β 基因表达量的 2%. 其机制尚未完全清楚. δ 珠蛋白基因启动子有 3 个保守序列: TATA 盒、CCAAT 类盒和 GATA-1 盒. 位于-64~-68 bp 的 CCAAT 类盒, 普遍存在于大多数真核基因启动子中, 能通过调节 TF $\cap$ D 复合体调节转录起始的频率, 提高转录效率. 但在 δ 基因中-64 位 T 被 C 取代, 变成有缺陷的 CCAAC 盒^[1]. 这是 δ 基因与其他 β 类基因的 5' 端启动子结构的一个显著差异(即其他 β 类基因启动子中 CAAT 盒的保守序列 CCAAT 在 δ 基因启动子中是 CCAAC). 位于-74~-78 bp 的反向排列的 GATA 盒, 是红系特异性因子 GATA-1 的结合基序. 我们以前的工作表明, δ^{CAAC} /Luciferase 报告基因在 HeLa 细胞中表达比 δ^{CAAT} /Luciferase 的表达低 4 倍, 证实了 δ 基因启动子结构的缺陷是该基因低水平表达的重要原因^[2]. 为了探讨 δ 基因启动子区-64 位单核苷酸替换(C $\rightarrow$ T)对 DNA 结合蛋白的影响, 本工作用凝胶迁移率改变实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)研究含野生型“CAAT 样盒”(CCAAC, 简称 WOG)和含突变型“CAAT 样盒”(CCAAT, 简称 MOG)的 DNA 片段与红系或非红系细胞核蛋白因子的相互作用, 比较一个核苷酸替换可能引起的对应反式作用因子类型及亲和力的变化, 并比较个体发育不同阶段造血细胞核蛋白因子的作用以及 K562 细胞受血红素(Hemin)诱导后这些因子的变化. 目的是为阐明人 δ 珠蛋白基因低水平表达的机制提供依据.

1 材料与方法

(1) 材料与试剂. 鼠红白血病细胞(MEL)、人红白血病细胞(K562), HeLa 细胞由本课题组保存. RPMI 1640, DMEM 为 GIBCO/BRL 公司产品. 过硫酸铵, DMSO, Spermine, Spermidine 为 Sigma 公司产品. TEMED 为 Merck 公司产品. 同位素[γ -³²P]ATP, [α -³²P]dATP, [α -³²P]dCTP 为北京市亚辉生物医学公司和美国杜邦公司产品. dNTP, SSD, PMSF, DNA

Polymerase iv (Klenow Fragment) 为 Promega 公司产品. 其余化学药品及试剂均为国产分析纯. DNA 片段 WOG 和 MOG 由中国医学科学院基础医学研究所仪器技术中心贝克曼生命科学技术实验室合成.

(2) 细胞培养. MEL, K562, HeLa 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养. K562 细胞在含 50 μ mol/L Hemin 的同种培养基中培养诱导.

(3) 探针的制备. 本实验设计合成 2 条人 δ 基因启动子区 - 83~ - 48 bp 之间的片段 WOG 和 MOG, 两者长度均为 36 bp, 除 - 64 位分别是 C 和 T 外, 其他序列相同, 两者都含有 CAAT 样盒和反向 GATA_1 盒. WOG 含有野生型“CAAT 样盒”(CCAAC), MOG 含有突变型 CAAT 样盒(CCAAT). WOG 和 MOG 的序列分别为:

WOG: - 83~ - 64 bp 5' CCTGCTTATCTTAAACCAACCTGCTCACTGGAGCAG_3' 36bp

MOG: - 83~ - 64 bp 5' CCTGCTTATCTTAAACCAATCTGCTCACTGGAGCAG_3' 36bp

人工合成 4 段寡核苷酸片段 C₁, C₂, C₃, C₄; 其中 C₁ 和 C₂, C₃ 和 C₄ 各有部分序列互补. 它们的序列分别是:

C₁: 5' CCTGCTTATCTTAAACCAACCTGCTCAC_3' > WOG

C₂: 5' CTGCTCCAGTGAGCAGGTTGGTTTAAAGA_3'

C₃: 5' CCTGCTTATCTTAAACCAATCTGCTCAC_3' > MOG

C₄: 5' CTGCTCCAGTGAGCAGATTGGTTTAAAGA_3'

分别取等摩尔数的 C₁ 和 C₂, C₃ 和 C₄, 分别复性. 用 DNA 聚合酶 iv Klenow 片段将 [α -³²P] dATP 和 [α -³²P] dCTP 标记到 2 条复性片段上, 得到标记的探针 WOG 和 MOG.

(4) 细胞核抽提物的制备. 从培养细胞中制备核抽提物基本按 Dignam 等人^[3]的方法进行, 细胞核抽提物分装后冻存于液氮中待用. 从肝组织中制备核抽提物首先按 Gorski 等人^[4]的方法分离细胞核, 然后按 Dignam 等人^[3]的方法制备细胞核抽提物. 所有操作均应在 0~4 °C 中进行.

(5) 凝胶迁移率改变分析法^[5]. 基本按文献[5]的方法进行.

2 结果与分析

(1) 探针 WOG 和 MOG 与 HeLa, MEL 细胞核抽提物(NE) 结合的初步分析(图 1).

在 MEL 细胞中, WOG, MOG 都有 2 条不同迁移率的滞后带 a 和 b, 它们与 WOG, MOG 的结合力有差异, 两者与 MOG 的结合力较强. 在 HeLa 细胞中, MOG 只有一条滞后带, 迁移率与 MEL 的滞后带 a 相同, WOG 则没有滞后带 a 和 b 存在. WOG 和 MOG 是 δ 珠蛋白基因启动子区 - 83~ - 64 bp 之间的片段, 包含有 CAAT 盒和 GATA_1 结合位点. HeLa 细胞是非红系细胞, 没有红系特异性因子 GATA_1, 因而有理由认为它与 MOG 结合形成的滞后带 a 是 CAAT 盒的结合蛋白 CBF, 滞后带 b 是 GATA_1 因子形成的滞后带. HeLa 细胞中的 CBF 不与探针 WOG 结合, 只与 MOG 结合, 并发现在 HeLa 中可能存在 2 个新的结合因子 E 和 F 与 WOG 结合, 它们的存在可能阻碍了 CBF 与 WOG 的结合. 这些结果尚待进一步的实验确证.

图 1 WOG, MOG 与 HeLa, MEL 核抽提物的 EMSA 分析
1, 7 —— 探针; 6, 12 —— 冷探针为 50× 的竞争反应

(2) 探针 WOG, MOG 与 MEL 细胞核抽提物的 EMSA 分析及 WOG, MOG 的相互竞争结合实验(图 2).

图 2 MEL 细胞核抽提物的 EMSA 分析及 WOG 与 MOG 相互竞争结合实验

WOG 和 MOG 都与 MEL 中的 CBF 及 GATA₁ 结合, 分别形成滞后带 a 和滞后带 b. 在相互竞争结合试验中, 当以 MOG 为竞争物对探针 WOG 进行竞争实验, 竞争物 MOG 与探针 WOG 的摩尔比为 50: 1 时, CBF 和 GATA₁ 就全部被 MOG 所竞争; 当以 WOG 为竞争物对探针 MOG 进行竞争实验, 竞争物 WOG 与探针 MOG 的摩尔比高达 250: 1 时, MOG 仍能与 CBF

和 GATA_1 结合,表明 MOG 对两者的亲和力均高于 WOG 对两者的亲和力. 说明 CBF 和 GATA_1 与 δ 基因启动子的结合作用是协同的. - 64 位 C 突变为 T 后,MOG 不仅对 CBF 的结合能力增强,而且对 GATA_1 的结合能力也增强了. WOG 与 MEL 细胞核抽提物形成一条新的滞后带 o,当特异性竞争物 WOG 或 MOG 的摩尔倍数加大到 250 倍时,滞后带 o 仍然存在,可以判断它是一非特异性因子.

(3) 诱导前和诱导后 K562 细胞核抽提物的 EMSA 分析(图 3).

图3 Hemin 诱导前和诱导后 K562 细胞核抽提物的 EMSA 分析

K562 和 MEL 细胞均能表达 δ 珠蛋白肽链, K562 细胞经 Hemin 诱导后, δ 链表达量提高^[6]. 在对诱导前和后的 K562 细胞的 EMSA 分析中, CBF 和 GATA_1 都与 WOG 和 MOG 结合, 非特异性竞争物 SSD 的量不同, CBF 和 GATA_1 表现出对 WOG 和 MOG 的不同的亲和力, 与在 MEL 细胞中观察到的现象类似, 即 MOG 对 CBF 和 GATA_1 的结合能力强于 WOG 对两者的结合能力. 综合以上结果, 在 MEL、诱导前和诱导后的 K562 细胞中, CBF 和 GATA_1 对突变型启动子片段 MOG 的结合能力高于对野生型 WOG 的结合能力, 表明野生型有缺陷的 CAAT 样盒(CCAAC)是影响 δ 基因低水平表达的一个重要因素.

此外, 在 Hemin 诱导后的 K562 细胞中有一未知的蛋白(或复合物)与 WOG 和 MOG 都结合. 它形成的滞后带 c 迁移率较慢. 这显然是 K562 细胞被 Hemin 诱导后才与 WOG 和 MOG 结合的. K562 细胞被 Hemin 诱导后, δ 珠蛋白肽链表达增强. 因此推测这一未知因子可能是一个正调控因子, 它的结合提高了 δ 珠蛋白基因的表达水平. 它的出现以及与启动子结合的机制尚不清楚, 可能在诱导前细胞中没有这种因子, Hemin 诱导后被表达, 并结合到启动子上; 也可能在诱导前被阻遏, 不能与启动子结合, Hemin 诱导解除了这种阻遏, 而与启动子结合.

在 K562 细胞中, 无论是诱导前还是诱导后, 都有一特异蛋白 D 与 MOG 结合形成一条迁移率较慢的滞后带 d, 它不与 WOG 结合. 在 MEL 细胞的 EMSA 中, 没有这样一条滞后带. 它的存在是由于突变型的“CAAT 样盒”(CCAAT)的存在引起的. 以上结果表明虽然 MEL 细

胞和 K562 细胞(诱导前和诱导后)都表达 δ 珠蛋白肽链, 但在这 3 种细胞中, 与启动子作用的反式因子不完全相同, δ 基因表达的调控机制可能有所不同, 因而表达的情况也不相同.

(4) 胚胎发育阶段 δ 珠蛋白基因表达调控的初步研究.

() 人胚胎发育 3 个月时期胎肝细胞核抽提物的 EMSA 分析(图 4).

图 4 3 个月胎儿肝细胞核抽提物的 EMSA 分析

人胚胎发育 3 个月阶段, 胎儿型珠蛋白基因表达最高, β 珠蛋白基因有少量表达, δ 珠蛋白基因不表达, 在这个时期的肝细胞核抽提物中除有 CBF 和 GATA_1 与 WOG 结合外, 还有一个新的未知因子 G 与之结合, 形成的滞后带 g 的迁移率比前 2 个因子形成的复合物的迁移率快. 虽然对基因表达必需的 CBF 与 δ 珠蛋白基因启动子结合, 但 δ 珠蛋白基因也不能表达. 这提示因子 G 可能是一个负调控因子, 它的结合可能阻遏了 RNA 聚合酶对基因的转录.

当用 MOG 作 EMSA 实验时, 发现 MOG 除了与 CBF, GATA_1 及调节因子 G 结合外, 还与另一调节因子 H 相结合, WOG 片段与调节因子 G 相互作用, 可能抑制了 δ 珠蛋白基因表达, 而 MOG 与调节因子 H 结合, 可能抵消因子 G 的抑制作用.

() 人胚胎发育 5~6 个月时期胎肝细胞核抽提物的 EMSA 分析(图未示).

这一时期的核抽提物中的 CBF 和 GATA_1 只与 MOG 结合, 不与 WOG 结合. 表明在胚胎发育 5~6 个月阶段, δ 珠蛋白基因不表达的原因之一可能是 CBF 和 GATA_1 不与 δ 珠蛋白基因启动子结合, 因而不能启动 δ 基因表达; 而 MOG 与这 2 种因子都结合. 这一结果提示 δ 珠蛋白基因启动子缺陷的 CAAT 样盒(CCAAC)可能也是 δ 珠蛋白基因在 5~6 月时期不表达的原因之一.

3 讨论

人 δ 和 β 珠蛋白结构基因具有高度同源性. δ 基因启动子与 β 类其他基因启动子之间有较大差异, 典型的 β 类基因启动子具有 3 个顺式调节元件: -30 bp 的 TATA 样盒, -70~-90 bp 的 CAAT 样盒, -95~-120 bp 的 CACCC motif. 对 β 类基因启动子功能的研究已经

证明,这3个元件对基因的表达非常重要,都是使启动子具有最大活性所必需的^[7]. δ 基因启动子的CAAT样盒有缺陷,在-64 bp由C取代了T,使CCAAT的保守序列突变为CCAAC,CAAT样盒与TATA样盒之间的距离缩短,-68~-108 bp之间缺乏保守序列,没有其他珠蛋白基因启动子都有的CACCC保守盒,因此它没有其他 β 类基因启动子的强启动功能. 本文用EMSA实验探讨了人 δ 珠蛋白基因启动区-64C $\rightarrow$ T点突变对DNA结合蛋白的影响,结果表明:()在红系细胞MEL, K562以及经Hemin诱导的K562细胞中,MOG对CCAAT结合蛋白(CBF)和GATA_1的亲合力显著增加;()经Hemin诱导的K562细胞中存在两种新的特异DNA结合蛋白C和D,前者与WOG和MOG片段结合,它可能与K562细胞受诱导后 δ 基因表达量提高有关. 后者只与MOG结合,它还存在于正常的K562细胞中,可能与-64 bp C $\rightarrow$ T的点突变有关;()MOG与非红系HeLa细胞核抽提物中的CBF结合,而WOG不与之结合. 结合作者以前的工作^[2],从顺式表达和反式结合蛋白两方面证明 δ 基因启动子缺陷的CAAT样盒是引起 δ 基因低表达的一个重要因素,缺陷的顺式作用元件CAAT样盒通过影响反式因子CBF及GATA-1的结合影响基因的表达. 有工作报告 δ 基因启动子的CACCC缺失,导致红系特异性因子EKLf不能与启动子结合也是影响 δ 基因低水平表达的重要因素¹⁾. 有报道位于 δ 基因启动子-78~-73 bp的GATA motif对 δ 基因的正确表达是必需的,当-77 bp突变后,失去了与红系因子GATA_1结合的能力,引起 δ 地中海贫血^[8]. 有实验表明位于 δ 基因3'端+69 bp的GATA_1对 δ 基因可能有负调节作用^[9]. 1991年,O'Neill^[10]发现一个在 δ 基因-960 bp的位置有一个PYBF因子的结合位点,可能在发育阶段的调控上有重要作用,对基因表达起负调控作用. δ 珠蛋白基因从胚胎发育30周起开始表达,随个体发育表达逐渐升高. 本工作对胚胎发育3个月和5~6个月阶段 δ 基因表达的调控进行了初步研究. 结果发现3个月人胎肝细胞核抽提物中除了CBF和GATA_1与WOG和MOG结合外,还检测到两种未知蛋白因子G和H,前者能与WOG和MOG结合,后者只与MOG结合;5~6个月人胎肝细胞中,CBF和GATA_1只与MOG结合,而不与WOG结合. 此结果提示人胚胎发育3个月和5个月阶段的 δ 珠蛋白基因的表达被抑制的机制可能不同,在胚胎发育3个月时期,有一个可能的负调控因子起作用;5~6个月时期,CBF不与CAAT样盒结合,可能是 δ 珠蛋白基因不能表达的原因之一.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39370397)和中国医学科学院基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Martin H S, Junius G A. Hemoglobin A₂: origin, evolution, and aftermath. *Blood*, 1991, 78(9): 2 165
- 2 张劲秋,寇海萍,狄旭,等. 人 δ 珠蛋白基因启动子区-64位C $\rightarrow$ T点突变对其启动子功能的影响. *中国医学科学院学报*, 1996, 18(6): 429
- 3 Dignam J D, Russell M L, Robert G R, et al. Accurate transcription initiation by RNA polymerase σ in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11(5): 1 475
- 4 Gorski K, Carneiro M, Schibler U. Tissue-specific *in vivo* transcription from the mouse albumin promoter. *Cell*, 1986, 47: 767

1) The Tenth Conference On Hemoglobin Switching, June, 1996, Osario, Orcas Island, Washington

- 5 Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Current Protocols in Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1992
- 6 Dean A, Ley T J, Humphries R K, et al. Inducible transcription of five globin genes in K562 human leukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 5 515
- 7 Cuunningham J M, Stephen M J. Hemoglobin switching and fetal hemoglobin reactivation. Seminars in Hematology, 1996, 33 (1): 9
- 8 Matsuda M, Sakamoto N, Fukumaki Y. δ -Thalassemia caused by disruption of the site for an erythroid-specific transcription factor, GATA-1, in the δ -globin gene promoter. Blood, 1992, 80(5): 1 347
- 9 Moi P, Loudianos G, Lavinha J, et al. δ -Thalassemia due to a mutation in an erythroid-specific binding protein sequence 3' to the δ -globin gene. Blood, 1992, 79(2): 512
- 10 O' Neill D, Bornschlegel K, Flamm M, et al. A DNA-binding factor in adult hematopoietic cells interacts with a pyrimidine-rich domain upstream from the human δ -globin gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8 953

(1997-07-22 收稿, 1997-09-30 收修稿稿)

对一个在水稻雄蕊中大量表达的 cDNA 的结构和表达分析

张毅 瞿礼嘉* 刘美华 秦晓莉 顾红雅* 陈章良

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871. * 联系人)

摘要 雄蕊的发育是植物有性生殖过程中的一个重要阶段, 研究雄蕊发育过程中大量表达乃至特异表达的基因对于了解雄蕊发育的分子机制具有重要的意义. 在水稻雄蕊中大量表达的一个类查尔酮合酶基因(D5)的结构进行了分析, 发现 D5 与欧洲油菜中另外 2 个花药特异性基因(A1 和 BA42)的同源性较高, Northern 分析表明它们的表达模式相似, 而且可能与花粉的早期发育过程相关, 这说明 D5, A1 和 BA42 代表了一类与雄蕊发育相关的、特化的类查尔酮合酶基因.

关键词 花粉发育 减数分裂时期 水稻花药 cDNA 查尔酮合酶

在高等植物中, 花的发育是一个复杂的过程, 涉及到由营养分生组织(或花序分生组织)向花分生组织的转变, 花的形态建成以及雌、雄配子体的发育和分化. 研究表明, 花的不同发育阶段与特定基因的程序性表达相关^[1], 对这些基因的研究将有助于了解植物花的整个发育过程.

在对花器官发育的研究中, 对雄蕊发育的研究由于与雄性不育密切相关而尤为引人注目. 雄配子体发育进程可人为地分为 2 个阶段^[2], 即小孢子发生以及紧接着的雄配子体分化. 当小孢子有丝分裂产生了生殖细胞和营养细胞后, 即完成了发育过程, 其他类型的雄蕊细胞(如绒毡层), 给发育中的小孢子提供营养及结构物质, 对小孢子发育是非常重要的. 在小孢子发育过程中至少有两组基因在不同时间被激活^[3], 早期基因在有丝分裂后立即活化, 在成熟花粉中它们的 mRNA 水平下降或检测不到, 晚期基因在小孢子有丝分裂后变得很活跃, 其 mRNA 量不断积累, 直至花粉成熟, 推测早期基因很可能涉及到花粉发育, 而晚期基因涉及到花粉成熟或花粉管生长. 这些基因大多数功能依然不清, 但显然在雄蕊的发育中起着重要作用.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-6-601>