

# Zif268 的锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中的功能性表达

赵志虎\* 胥全彬 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

**摘 要** 锌指蛋白是最大的蛋白家族,是识别核酸最常见的、最有效的结构元件。通过选择合适的表达载体及诱导表达条件,实现了小鼠转录因子 Zif268 的锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中的部分可溶性表达。凝胶迁移率移动试验证实纯化的可溶部分锌指 DNA 结合区可以特异性识别、结合其天然靶序列,提示锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中得到了功能性表达。锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中的功能性表达成功为锌指蛋白-DNA 相互作用的胞内遗传筛选模型的建立奠定了基础。

**关键词** 锌指蛋白,可溶性表达,凝胶迁移率移动试验

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0352-04

锌指结构是一种长约 30 个氨基酸的最常见的核酸识别基序,整个肽段通过锌离子与半胱氨酸和/或组氨酸的螯合配位形成一种稳定的“指头”样高级结构。自 1985 年在非洲爪蟾转录因子 TFI<sub>IIA</sub> 中发现第一个锌指以来<sup>[1]</sup>,目前已在 20500 多种蛋白中发现 67000 多种不同的锌指序列,成为所有 DNA 结合蛋白中最庞大的一个家族<sup>[2]</sup>,事实上也是最大的蛋白家族,这表明锌指结构在进化上是识别核酸最常见、最成功的一种结构模式,因此成为研究蛋白-核酸特别是蛋白-DNA 相互作用的理想材料<sup>[3]</sup>。锌指蛋白-DNA 相互作用的研究,对于蛋白-DNA 识别规律的揭示、序列特异性 DNA 结合蛋白的设计与筛选以及特定基因表达调控的人为干预等具有重要意义。

早期的经典方法如 Dnase I 足迹法、甲基化保护实验等,对于锌指-DNA 的相互作用的研究起到了重要作用<sup>[4-6]</sup>,但以上这些实验都是体外实验,很难真实地反应体内锌指-DNA 相互作用规律。鉴于此,我们拟以小鼠转录因子 Zif268<sup>[4]</sup>为材料,首先实现其锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中的克隆与功能性表达,进而建立一种研究锌指蛋白-DNA 相互作用的体内遗传筛选模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ MCR、JM109 质粒 pUC18、pGEX-2T 本室保存, pBKS-Zif268 来源于 ATCC。

**1.1.2 试剂** :EcoR I、BamH I、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、蛋白分子量标准、核酸分子量标准、IPTG、dNTP、X-gal、Bulk & RediPack GST Purification Modules 等为 Promage、Biolab、Pharmacia 等公司产品。

**1.1.3 培养基** 锌指蛋白表达需用专用培养基 LB-Zif,其组成为在 LB 的基础上添加 100mmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/mL L-酪氨酸, 20mmol/L 的 HEPES(用 NaOH 调 pH 7.0)以及不同浓度的 IPTG,氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL。

### 1.2 方法

**1.2.1 常规分子克隆技术** 根据文献[7]以及 New England Biolab、Promega 等公司产品说明书进行。

**1.2.2 锌指 DNA 结合区的 PCR 扩增** 根据锌指 DNA 结合区在整个 Zif268 蛋白中的位置及其序列<sup>[4]</sup>,设计如下两条的引物,两端分别添加 EcoR I、BamH I 酶切位点,3'-端引物的末尾添加终止密码

TGA、TAA。

P<sub>DN</sub>: 5'-AAGGATCCGAACGCCCATATGCTTG-3' 对应于 DNA 结合区的氨基端

P<sub>DC</sub>: 5'-ACGGAATTCCTTATCAGTCCTTCTGTCTTAAATGG-3' 对应于 DNA 结合区的羧基端

PCR 按照如下条件进行:在 100μL 反应体系中顺序加入去离子水、二甲亚砜 DMSO、聚合酶缓冲液、4 种脱氧核苷酸混合物 4 × dNTP、模板、引物、DNA 聚合酶,使引物终浓度为 1pmol/μL、dNTP 的终浓度为 0.2nmol/L,DMSO 浓度为 2% ~ 3%( V/V )。整个操作过程在冰浴条件下进行,并采用热启动 PCR 程序。

1.2.3 DNA 序列分析:由上海博亚生物公司完成。

1.2.4 菌体的诱导表达:挑选单克隆接种 5mL LB-Zif 培养基( Ap 100μg/mL ) 37℃ 振摇( 250 r/min )培养过夜,按 2% 的比例取过夜培养物接种于摇瓶,相同条件继续振摇培养 2 ~ 3h,培养物 OD<sub>600</sub> 值为 0.3 ~ 0.5 时,加入不同浓度的 IPTG 25 ~ 30℃ 振摇诱导培养( 250 r/min )4 ~ 6h,离心收获菌体。SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.5 蛋白的纯化:谷胱甘肽转移酶 GST 融合蛋白的纯化采用 Phamarcial 公司的 Bulk & RediPack GST Purification Modules 并参照其产品说明进行。主要分为谷胱甘肽 SepharoseCL 4B 的准备、样品的制备、结合与洗脱、酶切与分离等步骤。

1.2.6 凝胶迁移率移动试验:

( 1 )双链 DNA 探针的制备:采用 Klenow 大片段 DNA 聚合酶补平法。在 10μL 反应体系中,取 Zif268 的结合位点的两条互补链以及随机互补核苷酸片段各 10pmol,10 × 退火缓冲液 1μL,95℃ 煮沸 5min,缓慢降至 65℃ 维持 1h,再降至室温。向退火混合物中加入 2μL DTT( 20mmol/L ) 35μL dNTP、5μL 10 × 随机标记缓冲液( 100mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 900mmol/L HEPES, pH 6.6 ) 5μL α-<sup>32</sup>P dATP 以及 3u 的 Klenow 大片段聚合酶,室温反应 3 ~ 12h,得到标记好的探针,- 20℃ 保存备用。根据文献<sup>[4]</sup>,合成的含有 Zif268 保守结合位点的两条互补寡核苷酸链片段的序列如下,其中阴影部分为 Zif268 的结合位点。

ZB1: 5'-AATTC ATGCGTGGGCGG CTGCAGG-3'

ZB2: 3'---G TACGCACCCGCC GACGTCCATGC-5'

( 2 )结合反应:在结合缓冲液( 10mmol/L Tris-Cl pH 7.5, 100mmol/L KCl, 1mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mmol/L DTT, 0.1mmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 0.05% BSA, 4% Ficoll-400 )中加入 0.2nmol 标记好的双链探针,

5μg/μL 的鲑鱼精 DNA 以及不同浓度的蛋白,室温保持 15min,取 10μL 样品进行 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳( 150V × 1.5h ),电泳完毕,放射自显影。

2 结果

2.1 Zif268 锌指 DNA 结合区的 PCR 扩增及克隆

以质粒 pBKS-Zif268 为模板,以 P<sub>DN</sub>、P<sub>DC</sub>为引物,在 53℃ 下退火扩增得到含有 Zif268 锌指 DNA 结合区的片段 D( 图 1 )。

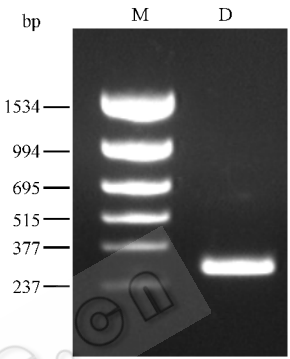


图 1 Zif268 锌指 DNA 结合区片段 D 的 PCR 扩增  
Fig. 1 The PCR of fragment D containing Zinc fingers DNA binding domain of Zif268

PCR 扩增产物经 Promega 公司 Wizard™ PCR Preps 试剂盒纯化、BamH I、EcoR I 酶切后,与用同样限制酶处理的 pUC-18 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5αMCR,挑取单克隆。经大小、酶切鉴定及序列测定,得到全序列正确的克隆 pUC-D。

2.2 Zif268 锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中的表达

用 BamH I、EcoR I 酶切质粒 pUC-D,回收目的片段,插入到 pGEX-2T,进行表达质粒的构建。表达质粒经大小、酶切鉴定,得到正确克隆 pGEX-D( 图 2 )。

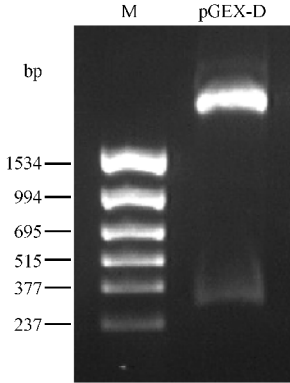


图 2 表达质粒的双酶切鉴定( EcoR I + BamH I )  
Fig. 2 The restriction analysis of expression plasmids( EcoR I + BamH I )

表达质粒 pGEX-D 转化大肠杆菌 JM109 挑取单克隆,过夜培养,2% 稀释接种,以 40μmol/L IPTG 诱导,诱导后在 25~30℃ 下继续培养 3~4h,进行蛋白的表达,结果(图 3)发现,锌指 DNA 结合区得到了表达,在大小为 34.0kD 的地方出现目的条带,此外,在超声破菌上清中含有明显的融合蛋白,这表明在所选择培养条件下,锌指蛋白 DNA 结合区在胞内得到了部分可溶性表达。

2.3 融合蛋白的纯化

离心收集培养菌体,超声破菌,离心分离含有目的蛋白的上清,与准备好的谷胱甘肽 Sepharose 4B 混合,使目的蛋白与之结合。结合混合物一部分用含有谷胱甘肽的洗脱液洗脱,得到融合蛋白,另一部分用凝血酶切割,再行洗脱分离,分别得到谷胱甘肽转移酶及锌指 DNA 结合区,纯化结果见图 3。从图中可以看到,利用亲和层析可以得到特异的融合蛋白 GST-D,而且融合蛋白在凝血酶的作用下,可在融合位点处特异地被切割,得到游离的目的蛋白 D。

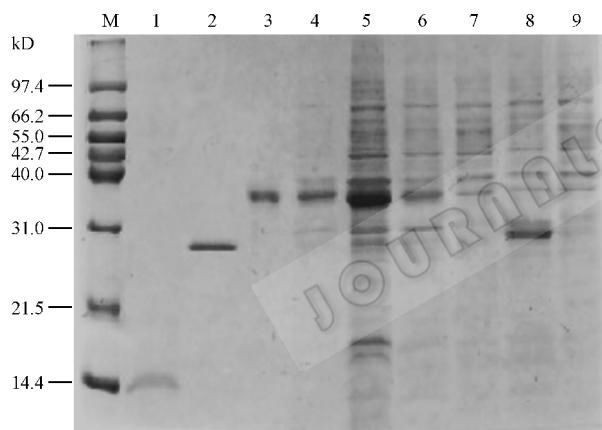


图 3 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified product

1~9 represent the purified D, GST, GST-D, the supernatant, pellet and total proteins of JM109(pGEX-D) lysate with IPTG induction, the total proteins of JM109(pGEX-D) without IPTG induction, the proteins of JM109(pGEX-2T) with and without IPTG induction, respectively.

2.4 Zif268 锌指 DNA 结合区的 DNA 结合活性分析

虽然 DNA 结合区与谷胱甘肽转移酶融合,在大肠杆菌中获得了稳定的、部分可溶性表达,但所得锌指融合蛋白是否仍保持其 DNA 结合活性?为此,本研究又通过 DNA 结合凝胶迁移率移动试验,对其体外的结合特性进行了分析。

结果(图 4)表明:无论是融合蛋白 GST-D,还是

单独的锌指 DNA 结合区 D,都保持了与特定靶位点 DNA 结合的特性,这与文献报道 GST 与真核转录因子融合表达,通常并不影响转录因子的 DNA 的结合活性相一致<sup>[8]</sup>。

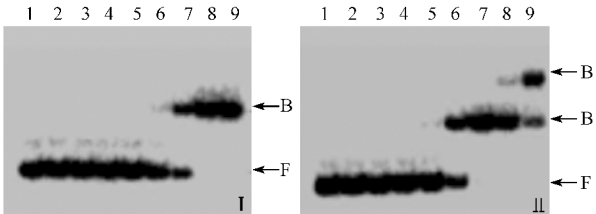


图 4 纯化蛋白的凝胶迁移率移动试验

Fig.4 The gel mobility shift assay for purified GST-D and D.

I, II illustrate the binding results of protein GST-D, D.

F, B indicate the free, bound probe.

1~9 present 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512nmol/L protein, respectively.

虽然体外结合活性不能完全反映体内情况,但是由于我们在融合蛋白的整个纯化制备过程中,始终保持着较为温和的条件,更为重要的是,我们并没有对目的蛋白进行复性等步骤,因此体外的凝胶迁移滞留实验,与其在胞内的 DNA 结合活性,应具有很好的相关性,而体内遗传模型的最终成功建立<sup>[9]</sup>,更直接验证在我们设定的培养条件下,锌指蛋白的 DNA 结合区确实在大肠杆菌中得到了功能性表达。

3 讨论

外源基因在大肠杆菌中的表达受多种因素影响<sup>[10]</sup>,而锌指蛋白在大肠杆菌中的严格可调控、稳定、功能性表达,对于体内遗传筛选模型的建立又非常重要。因此,在载体的选择及蛋白的表达上进行了一些尝试。本研究起初试图在大肠杆菌中实现游离锌指蛋白的表达,但未获成功,因此转而考虑融合表达系统。谷胱甘肽转移酶 GST 融合表达系统具有高效、易于纯化及调控严格等优点,非常适合外源蛋白尤其是真核转录因子的功能性表达<sup>[8]</sup>。此外,由于在本设计的最后遗传筛选试验中,需要将表达质粒、报导质粒转到同一大肠杆菌宿主中,因此还必须考虑两个质粒的相容性以及对宿主的要求,由于 GST 融合表达载体 pGEX-2T 本身含有 lacI<sup>r</sup> 基因,对宿主没有任何要求。基于 pGEX-2T 的以上优点,我们选择它来进行锌指蛋白在大肠杆菌中的功能性表达。

本实验中,通过特定培养基、培养条件(低温、低浓度 IPTG 的诱导),特定融合伴侣等的选择,实现了锌指蛋白 DNA 结合区在大肠杆菌中的部分可溶性

表达,而该蛋白未经复性条件下,在体外即可以与特定靶位点 DNA 特异性的结合,这初步表明,其在胞内很可能是具有功能性即保持 DNA 结合特性的。随后体内遗传筛选模型的建立以及识别天然靶序列锌指突变体的获得<sup>[9,11]</sup>,进一步表明在大肠杆菌中可溶表达的 Zif268 锌指 DNA 结合区确实保持了其特定的 DNA 识别、结合特性,具有特定的生物学活性。此外,研究结果还表明,在体外游离的锌指蛋白 DNA 结合区在随着高浓度而出现两条信号(图 5 II 的泳道 8、9),这表明高浓度的游离锌指蛋白 DNA 结合区可能相互作用形成了二聚体。最近,Yusufzai 等人在研究锌指蛋白 CTCF 时,发现其在体内也能形成二聚体甚至三聚体<sup>[12]</sup>。

最近,本研究小组还利用硫氧还蛋白的翻译耦联系统,实现了单独锌指 DNA 结合区在大肠杆菌中的完全可溶性表达<sup>[13]</sup>。单独或融合形式锌指结合区在大肠杆菌中的功能性表达,为锌指蛋白-DNA 相互作用的体内遗传筛选模型的建立,奠定了基础。最近发现,锌指蛋白除了可以识别 DNA、RNA、DNA/RNA 杂交双链并与之相互作用外,还可以介导蛋白-蛋白相互作用,因此本实验还将对锌指蛋白-核酸/蛋白相互作用的研究提供便利。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from xenopus oocytes. *EMBO J*, 1985, **4**(6): 1609-1614
- [2] <http://smart.embl-heidelberg.de/smart/search-keywords.cgi?key->

words = zinc + finger

- [3] Zhang SX(张书祥), Zhao ZH(赵志虎), Ma QJ(马清钧). The progress of study for the nucleic acids recognizing specificity of zinc finger. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 2001, **21**(2): 7-9
- [4] Christy B, Daniel Nathan. DNA binding site of growth factor inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(22): 8737-8741
- [5] Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex in 2.1 Å. *Science*, 1991, **252**(5007): 809-817
- [6] Choo Y, Klug A. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(23): 11168-11172
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Ford KG, Whitmarsh AJ, Hornby DQ. Overexpression and purification of eukaryotic transcription factors as glutathione-S-transferase fusions in *E. coli*. *Methods Mol Biol*, 1994, **30**: 185-197
- [9] Zhao ZH(赵志虎), Ma QJ(马清钧). Development and application of an in vivo genetic selection model: the permutation study for DNA recognizing specificity of zinc-finger protein. China Patent: CN 1438323A (中国专利)
- [10] Hockney RC. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1994, **12**(11): 456-463
- [11] Zhang SX(张书祥), Ma QJ(马清钧), Zhao ZH(赵志虎). Constructing and expression of three zinc-fingers peptide with specific DNA recognition property in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2001, **17**(4): 406-409
- [12] Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell*, 2004, **13**: 291-298
- [13] Zhao ZH(赵志虎), Zhang YS(张用书), Ma QJ(马清钧). The New Approaches for Soluble Expression of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 2000, **11**(3): 164

## Functional Expression of DNA Binding Domain of Zif268 in *Escherichia coli*

ZHAO Zhi-Hu\* XU Quan-Bin MA Qing-Jun  
(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

**Abstract** As the ubiquitous nucleic acids recognizing motif, Zinc finger protein play important role in regulation of gene expression. The study of recognition specific will greatly facilitate understanding the delicate interaction of Zinc finger protein and DNA. By the choice of expression vector, the induction and culture conditions, the DNA binding domain of Zif268 was expressed in *Escherichia coli* partly solubly. The gel mobility shift assay shows that purified DNA binding domain can bind its natural target sequence specifically, which indicates the DNA binding domain remains its DNA binding activity in *Escherichia coli*. The functional expression of DNA binding domain of Zif268 will greatly facilitate the development of in vivo genetic selection assay for the study of Zinc fingers-DNA interaction.

**Key words** Zinc-finger protein Soluble expression Gel mobility shift assay

Received: 09-10-2003

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 39970162), the National High-Tech Development Program (863) of China (No. 2002AA227022)

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66931809; Fax: 86-10-68215721; E-mail: zhaozh@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>