

核蛋白成分参与胚胎肝细胞 AFP 基因的活化

刘海湖 申庆祥

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 利用体外转录分析方法,在大鼠胚胎肝细胞核蛋白中,检测到促进 AFP 基因转录的蛋白因子,用同样的方法在成年大鼠肝细胞核蛋白中没有检测到促进 AFP 基因转录的任何成分。DNA 结合分析找到了可能为蛋白因子的核蛋白成分,它们的大小分别为 89、50、46 和 36kDa。

关键词 AFP 基因, 蛋白因子, 体外转录

甲胎蛋白 (AFP) 是胚胎时期的一种主要的血清蛋白。大量的研究表明, AFP 基因不同水平表达的调控发生在转录水平上^[1]。近年来,这方面的研究又有了很大的进展。Watanabe 等人^[2], Muglia 等人^[3]和 Godbout 等人^[4]分别在人、大鼠和小鼠 AFP 基因 5' 端上游调控区发现了促进 AFP 基因转录的增强子顺序。特别在小鼠,不仅找到了三段增强子顺序的位置 (-2.5、-5.0、-6.5kb),而且作了顺序分析。越来越多的研究事实表明,蛋白因子与基因启动区不同 DNA 顺序相互作用,共同协调来调节真核基因的转录^[5~7]。大鼠胚胎肝细胞有没有促进基因转录的蛋白因子? 至今未见报道。我们用 DE52 柱层析分离的核蛋白部分进行体外转录分析,检测出了能够促进转录的蛋白因子的存在。并用 DNA 与蛋白结合的方法,找到了可能是蛋白因子的核蛋白。

1 材料和方法

1.1 体外转录模板的制备

从 Sargent 等人惠赠的大鼠 AFP 基因克隆 λ^{AFP6} DNA 中,用限制酶切出含有基因 0.285kb 编码和 7.715kb 上游调控顺序的 DNA 片段,作为体外转录模板。

1.2 核蛋白部分的制备

以 18 d 左右大鼠胚胎肝为材料制备细胞核^[8]。用 DE52 柱层析方法^[9]核抽提物上柱,依次以 0.1mol/L, 0.25mmol/L 和 0.6mmol/L KCl 缓冲液洗脱,得到核蛋白部分 A、B 和 C。

1.3 体外转录分析

转录反应^[10]液 (50 μ l) 含有 25 mol/L Hepes (pH7.9), 70 mol/L KCl, 5mmol/L Mg-Cl₂, 未标记的 3 种三磷酸核苷酸各为 0.5mmol/L, 另一种未标记的三磷酸核苷酸为 0.05mmol/L, 同位素标记的为 200 μ Ci/ml (α -³²P) UTP, 3000Ci/mmol Amersham 或 (³⁵S) ATP, 600Ci/mmol, Amersham, 0.05mmol/L EDTA, 0.6mmol/L DTT, 12.5 μ g/ml 模板 DNA。30 $^{\circ}$ C 温浴 45min。8 μ l 反应液点到 DE 81 纸片上,用 0.5mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗纸片,测量同位素,并减去本底和阴性对照数。用酚和氯仿提取其余 42 μ l 反

应液，沉淀，电泳，并进行放射自显影。

1.4 DNA 片段与蛋白的结合实验

DNA 片段与核蛋白的结合是按 Matsuno 等人^[11]的方法进行的。约 50 μ g 核蛋白被电泳分离，转移到硝酸纤维膜上，与同位素标记的 DNA 片段结合，洗去未结合的同位素标记物，显示出放射条带。

2 结果与讨论

2.1 核蛋白的分离

大鼠胚胎肝细胞的 A、B 和 C 核蛋白部分在含 SDS 的 12%聚丙烯酰胺胶上分析。从图 1 可见，三个部分的蛋白组成及量都不相同，所含转录必须物必不相同，不能很好地进行转录。唯有合并物具备一切转录条件，能有效地进行转录。这样就可以利用体外转录系统检测各核蛋白部分是否含有促进转录的蛋白因子。

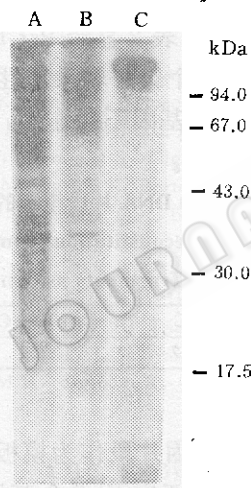


图 1 大鼠胚胎肝细胞核蛋白部分的 SDS-聚丙烯酰胺胶电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of the fractions A, B and C from rat fetal liver nuclei extract. An amount of each fraction was about 50 μ g.

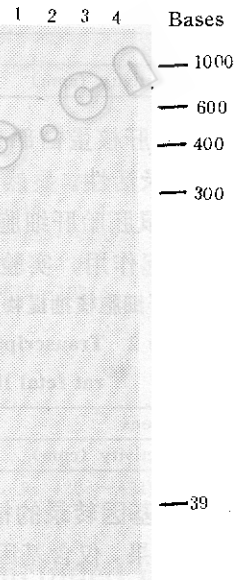


图 2 大鼠胚胎肝细胞核蛋白部分和它们合并物的体外转录物在 5%变性聚丙烯酰胺胶上电泳带的放射自显影图

Fig. 2 Analysis of the transcripts of fractions and their reconstitution from rat fetal liver nuclei extract on denatured 5% PAGE. The radiolabelled transcripts were identified by autoradiography. 1, 2, 3 and 4 were transcription products of A, B, C and "A+B+C".

2.2 检测促进 AFP 基因转录的核蛋白成分

从大鼠胚胎肝细胞核抽提物分离的三个

核蛋白部分单独以及三部分合并后对 AFP 基因模板体外转录影响的结果如图 2。图中可见，“A+B+C”有一明显的转录产物放射自显影带。带较宽，并且前后有扩散，其大小为 60bp 左右，远小于模板 285bp 的基因编码序列，可能是操作过程中转录产物降解所造成。但产物降解并不影响对结果的分析，主要看转录产物的多少。A、B 和 C 单独转录产

物相对太少,没有明显的放射自显影带存在。同位素测量结果与图示完全一致,都表明 A 和 C 中含有促进 AFP 基因转录的蛋白因子,在合并物中,促进了主要包含在 B 中的 RNA 聚合酶 I 的转录。为了证明体外转录是 AFP 基因的转录,以 +2 到 +285bp AFP 基因序列为探针,对转录产物进行 Northern blot 杂交分析,结果转录产物与基因 DNA 序列杂交(放射自显图未出示),说明转录产物是 AFP 基因的转录产物。没有模板的对照样品无任何杂交放射自显影条带出现,说明能与探针杂交的是基因模板的转录产物。

用成年大鼠肝细胞核抽提物分离的三个核蛋白部分作类似的实验,结果完全不同(表 1),三部分合并物的转录活性不高于单个组分转录活性的和,甚至低于单个组分转录活性的和或 B 部分。多次实验重复都是如此。表明成年大鼠肝细胞核蛋白部分不含促进 AFP 基因体外转录的核蛋白成分,相反地还含有抑制 AFP 基因体外转录的核蛋白成分。

表 1 成年大鼠肝细胞核抽提物分离的三个部分及合并物的体外转录活性

Table 1 Transcription activity of fractions and their reconstitution from adult rat liver nuclei extract in an *in vitro* system

Fractions	A'	B'	C'	A'+B'+C'
Transcription activity (cpm)	121	1493	379	901

用大鼠胚胎肝核蛋白部分依样检测非 AFP 基因模板。表 2 显示 Pst I 酶切的 SV40 DNA 模板的转录活性。显然,合并物的转录活性不高于单个组分转录活性的和,没有促进作用。表明大鼠胚胎肝细胞核蛋白中的蛋白因子对 SV40 基因不起作用,而是有选择的只对 AFP 基因起作用,实验也重复过多次,结果是一致的。

表 2 大鼠胚胎肝细胞核抽提物分离的核蛋白部分及合并物对 SV40 DNA 片段模板的体外转录活性

Table 2 Transcription activity of fractions and their reconstitution from rat fetal liver nuclei extract using SV40 DNA fragments as template

Fractions	A	B	C	A+B+C
Transcription activity (cpm)	830	1350	97	2247

2.3 促进 AFP 基因转录的核蛋白成分

根据实验结果,仅含基因起始点上游 255bp 的 AFP 基因片段作为模板时,大鼠肝癌细胞核蛋白成分仍然能够促进体外转录,Feuerman 等人证实^[12]仅含基因起始点上游 250bp 的基因,就能很好地进行转录,所以我们选用 +2 到 -255bp AFP 基因 DNA 片段作探针,作与大鼠胚胎肝细胞核蛋白的结合实验,结果找到 89、50、46 和 36kDa 结合蛋白(图 3)。在核蛋白部分中,除了 89kDa 蛋白外,其余的都存在(图 4),89kDa 蛋白与 DNA 片段的结合可能需要多种因子共同作用才能进行,当核蛋白分成核蛋白部分时,各因子分散在不同部分之中,单个核蛋白部分的因子不齐全,无法与 DNA 片段结合,因而也就不能显示出来,89kDa 蛋白在核蛋白部分中没有显现出来,可能就是这个问题。核蛋白部分与核蛋白的结果完全一致。成年大鼠核蛋白对照中,只有很弱的 36kDa 结合蛋白(图 3)。胚胎肝核蛋白的结合蛋白对 AFP 基因转录有何作用有待进一步研究,但从以上实验结果推测,大鼠胚胎肝细胞核蛋白抽提物中,必然存在促进基因转录的蛋白因子。

总之,大鼠胚胎肝细胞中存在着作用于 AFP 基因的蛋白因子。AFP 基因在大鼠胚胎肝细胞中表达的转录与蛋白因子有密切关系。

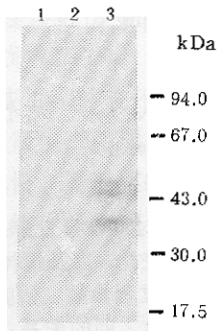


图 3 DNA 片段与核蛋白的结合分析

Fig. 3 DNA-protein binding assays

1. The group of proteins as negative control,
2. Adult rat liver, 3. Rat fetal liver

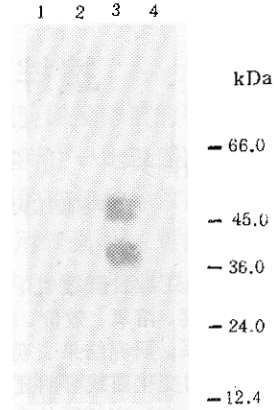


图 4 DNA 片段与核蛋白部分蛋白的结合分析
Fig. 4 DNA-nuclear fraction-proteins binding assays

- 1 was the group of proteins, as negative control. 2, 3 and 4 were A, B and C fractions of rat fetal liver extract.

参 考 文 献

- [1] Tilghman S M and Belayew A. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, **79**: 5254~5257.
- [2] Watanabe K, Saito A, Tamaoki T. J Biol Chem, 1987, **262**: 4812~4818.
- [3] Muglia L, Rothman-Denes L B. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83**: 7653~7657.
- [4] Godbout R, Ingram R S, Tilghman S M. Mol Cell Biol, 1988, **8**: 1169~1178.
- [5] Flores O, Maldonado E, Burton Z *et al.* J Biol Chem, 1988, **263**: 10812~10816.
- [6] Reinberg D, Roeder R G. J Biol Chem, 1987, **262**: 3310~3321.
- [7] Dynan W S, Tjian R. Cell, 1983, **35**: 79~87.
- [8] 刘海湖, 王建业, 李文裕等. 实验生物学报, 1986, **19**: 31~38.
- [9] Parker C S, Topol J. Cell, 1984, **36**: 357~369.
- [10] Heberlein U, England B, Tjian R. Cell, 1985, **41**: 965~977.
- [11] Matsuno K, Suzuki T, Takayas *et al.* J Biol Chem., 1989, **264**: 4599~4604.
- [12] Feuerman M H, Godbout R, Ingram R S *et al.* Mol Cell Biol., 1989, **9**: 4204~4212.

The Protein-factor (s) Were Included in Activation of AFP Gene in Fetal Liver Cells

Liu Haihu Shen Qingxiang

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract We have detected the presence of protein-factor (s) stimulating transcription of a-fetoprotein (AFP) gene in rat fetal liver cells using *in vitro* transcription assays. The nuclei of rat fetal liver were found to contain active proteins while the adult rat liver nuclei were devoid of any factor stimulating transcription of AFP gene. DNA-binding analysis showed the presence of protein-factors with the molecular weight 89, 50, 46 and 36 kDa.

Key words AFP gene, protein-factor, *in vitro* transcription