

转录调控研究的方法学进展

王俊阳¹, 王为善², 李肖², 赵华¹, 杨克迁²

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

王俊阳, 王为善, 李肖, 等. 转录调控研究的方法学进展. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1141-1150.

Wang JY, Wang WS, Li X, et al. Progress in transcriptional studies. Chin J Biotech, 2015, 31(8): 1141-1150.

摘要: 基因的表达在多个层次受到严格的控制, 其中转录水平的调控是控制基因表达的重要环节之一。近几年, 随着分子生物学研究方法的不断发展, 转录调控的研究方法学也出现了新的变化。本文综述了基于作者所在课题组对链霉菌次级代谢调控研究过程中优化和改进的转录调控研究方法, 如基于 SYBR Gold 的凝胶阻滞实验, 基于荧光标记和毛细管电泳检测的足迹法, 基于报告基因的直接调控关系分析等; 同时也对研究调控蛋白和靶启动子相互作用的新方法进行了阐述, 如表面等离子共振技术和等温滴定量热测定技术等。这些转录调控研究方法的优化和总结, 能够帮助研究者开展相关研究。

关键词: 转录调控, 启动子, 调控蛋白, 相互作用

Progress in transcriptional studies

Junyang Wang¹, Weishan Wang², Xiao Li², Hua Zhao¹, and Keqian Yang²

1 Institute of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Gene expression exhibits temporal and spatial patterns to response environmental changes and growth cycle. Gene expression is under strict control at different levels among which control at transcription level is the predominant mode, especially in prokaryotes. In this review, we summarized the new developments of methods used in transcriptional studies, including modifications and improvements of the classic methods, such as gel-shift assay, DNA foot printing, and

Received: October 15, 2014; **Accepted:** December 26, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31400034, 31130001), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB734001).

Corresponding authors: Keqian Yang. Tel/Fax: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

Hua Zhao. Tel/Fax: +86-22-60601396; E-mail: zhaohua@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31400034, 31130001), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB734001) 资助。

网络出版时间: 2015-02-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20150203.1625.004.html>

in vivo reporter system. In addition, we introduced examples to apply new methods, such as surface plasmon resonance (SPR) and isothermal titration calorimetry (ITC) to characterize protein-DNA, ligand-protein, and ligand-protein-DNA interactions. The collection of these methods and their application could guide and accelerate relevant studies.

Keywords: transcription regulation, promoter, regulatory proteins, interaction

基因表达调控是现代分子生物学研究的中心课题之一。要了解生物的生长、分化规律,形态结构特征及代谢功能,就必须对基因表达调控的“适时”、“适量”控制机制进行深入研究,掌握了基因调控机制,就等于掌握了一把揭示生物学奥秘的钥匙。基因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^[1],这也充分体现了基因表达调控的最经济控制原则。

反式作用因子和顺式作用元件的相互作用是转录水平基因表达调控的分子基础。反式作用因子主要指调控蛋白、sigma 因子等;顺式作用元件主要指转录因子结合位点 (TFBS)、核心启动子等^[2]。因此,转录水平调控的主要研究内容是发现目标启动子的反式作用因子、发现反式作用因子在目标启动子结合的顺式作用元件以及两者之间的相互作用。其主要步骤是:首先通过体内、体外实验确定直接调控关系;然后在分子层面上阐明相互作用的顺式元件在启动子上所处的位置^[3];最后分析反式作用因子及其顺式作用元件相互作用的动力学特征。本实验室一直从事链霉菌次级代谢调控的研究,深刻认识到研究方法的进步能够直接加速研究的进展。因此,本文将主要综述本实验室对传统的转录调控研究方法进行的优化和改进,以期帮助研究者采用新的方法更好地开展相关研究。

1 体外相互作用研究

研究一个调控蛋白的调控作用,一般首先对其进行敲除和过表达,观察哪些基因的表达可能受到该调控蛋白的影响;然后进一步分析这一影响是敲除和过表达的直接效应还是间接效应。主要研究策略是用体外试验证明调控蛋白和受调控基因启动子之间是否有直接相互作用。采取的研究方法为凝胶阻滞实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)^[4]、表面等离子共振实验 (Surface plasmon resonance, SPR)^[5]和等温滴定量热测定 (Isothermal titration calorimetry, ITC) 实验^[6]等证实二者可以在体外特异结合。下面将分别对这些方法进行阐述。

1.1 基于 SYBR Gold 的凝胶阻滞 (EMSA) 实验

凝胶阻滞分析是用来研究启动子区域与调控蛋白的相互作用的经典方法,通常首先将放射性 ³²P 标记的 DNA 探针与纯化蛋白,或提取物中的蛋白混合物一起孵育,然后在非变性凝胶中分析该结合反应产物。与游离 DNA 探针相比,蛋白-DNA 探针复合物的迁移率将降低,因此,将会在曝光后的电泳胶中观察到 DNA 条带的“阻滞”^[4,7]。但是,由于很多实验室不具备使用放射性同位素的条件,且同位素对实验人员也可能造成一定的伤害,因此该技术目前只能在国内条件比较成熟的实验室使用。为了避免同位素使用的这些不利因素,我们实验室开

发了基于 SYBR Gold (Life technologies) 染色的 EMSA 实验,并取得了良好的效果^[8]。即 DNA 探针扩增后无需标记,直接和蛋白进行相互作用,进行非变性凝胶电泳分析,然后再将胶置于 1/10 000 的 SYBR Gold 稀释液中染色,SYBR Gold 一旦与 DNA 探针结合,可以使荧光增强 1 000 倍以上,其量子产率为 0.6,最后用常规的 300 nm 的紫外成像仪,可清晰观察到金色条带(图 1A)。由于 EMSA 实验本身不需要昂贵的设备,我们又解决了它对同位素的依赖问题,目前该实验能够在常规实验室开展。

1.2 表面等离子共振 (SPR) 实验

表面等离子共振是利用入射光以临界角入射到两种不同折射率的介质界面(如玻璃表面的金属镀层)时产生渐次波,渐次波与金属的自由电子耦合则发生表面等离子共振,从而使反射光在一定角度内减弱甚至完全消失的物理现象(反射光完全消失时的入射光角度为共振角,也称 SPR 角)^[9]。因此可以通过获取生物反应过程中样品的共振角的动态变化,得到 DNA 探针和调控蛋白之间相互作用的特异性信号^[10],并且可以通过不同浓度的 DNA 探针和调控蛋白之间相互作用,得到它们相互结合的动力学参数。本实验室将委内瑞拉链霉菌 *jadJ* 启动子通过生物素固定在芯片上,用 Biacore 3000 分析了非典型应答调控蛋白 JadR1 对 *jadJ* 启动子的结合参数,并进一步分析了非典型应答调控蛋白的效应物杰多霉素 (Jadomycin) 对 JadR1 结合 *jadJ* 启动子的影响(图 1B)^[11]。同时,SPR 实验还能够方便地分析调控蛋白和小分子效应物的结合参数,我们用 Biacore 3000 分析了委内瑞拉链霉菌调控的蛋白 JadR*对不同杰多霉素及其生物

合成中间体的结合能力,最终发现中间体 DHR 是 JadR*的最佳效应物^[12]。SPR 技术具有取代 EMSA 的显著优势,如目前 GE 推出的 Biacore T200,具有 EMSA 无可比拟的检测灵敏度,能在极低样品量的情况下完成 DNA 探针和调控蛋白之间相互作用的动力学分析。

1.3 等温滴定量热测定 (ITC) 实验

当物质相互结合时,会产生热量或吸收热量。因此确定相互作用反应过程中热力学参数的变化可以对相互作用的动态过程进行定量的描述。等温滴定量热测定 (Isothermal titration calorimetry, ITC) 技术是一种监测由结合成分的添加而起始的化学反应的热力学技术,目前,该技术已经成为鉴定生物分子间相互作用的金标准。由于它通过高灵敏度、高自动化的微量热量仪连续、准确地监测和记录一个变化过程的量热曲线,所以可以得到结合常数 (K_a)、结合位点数 (n)、结合焓 (ΔH)、熵 (ΔS)、恒压热容 (ΔC_p) 等相关参数^[13]。这些信息为我们提供了生物分子相互作用的真实写照^[6]。本实验室用 NANO-ITC 2G (TA instruments) 对一些调控蛋白结合靶启动子的结合参数进行了详细的表征^[14];另外我们还用该设备对调控蛋白结合效应物小分子的相关参数进行了分析(图 1C),展示了外源抗生素 JdB 对天蓝色链霉菌 ScbR2 的结合情况,数据表明,它们近似 1:1 的结合^[14]。这充分表明 ITC 技术在相互作用相关参数的获取方面明显强于 SPR 和 EMSA。但是 ITC 和 SPR 实验都需要昂贵的相关设备和专业的技术人员,另外 ITC 实验还需较高浓度的目的蛋白来获得可检测的反应热,这些在一定程度上限制了它们在转录调控研究中的使用。

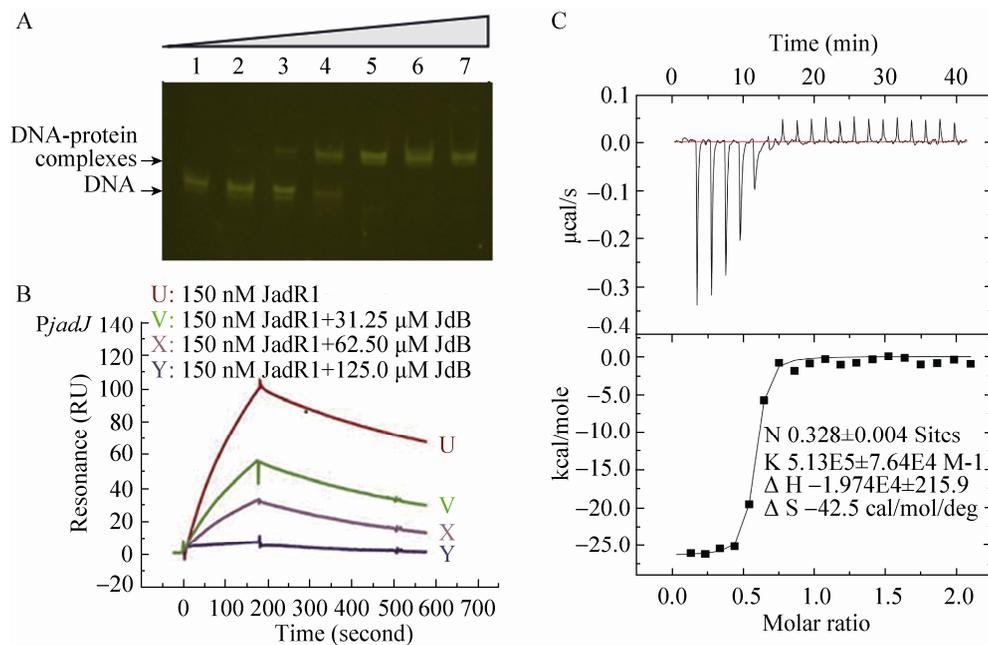


图 1 体外验证调控蛋白和 DNA 探针相互作用

Fig. 1 Regulatory proteins and DNA probe interaction *in vitro*. (A) The EMSA results stained by SYBR Gold. Each lane contained the same concentration of probe. 1–7: contain increasing concentrations of regulatory protein respectively. (B) Dose-response curves of the inhibition by JdB of the binding of JadR1 (150 nmol/L) to the promoter of *jadJ*^[11]. (C) ITC analysis of the binding of ScbR2 to JdB^[14].

2 体内调控关系研究

上述的体外研究方法，能够充分确定调控蛋白对靶启动子是直接调控还是间接调控。但是，展开以上体外实验的瓶颈是很多调控蛋白在大肠杆菌中不能以可溶的形式重组表达、纯化，或者表达量不足以开展体外实验。为了解决这一问题，我们建立了确定调控蛋白和靶启动子直接或者间接调控关系的体内研究方法。因为在体内环境中，细菌存在热激蛋白等能够保证重组蛋白的部分可溶性；同时，在异源宿主，还能够有效避免间接调控的影响。我们建立的在异源宿主体内探索调控蛋白和靶启动子调控关系的方法见图 2A^[15]，首先构建用靶启动子启动 *luxCDABE* 报告基因的质粒（图 2A 的

pOkasOlux），转入大肠杆菌后能够检测到发光（图 2B）；然后用另一个与之兼容的质粒表达调控蛋白转入大肠杆菌后（图 2A 的 pScbR2），如果调控关系是直接效应，便能够观察到发光受到明显的激活或者抑制（图 2B）。另外，如果该调控蛋白能够响应效应物，还可以进一步添加效应物，分析添加不同浓度的效应物后，调控蛋白对启动子产生的不同调控效应。本实验室用这一表征方法分析天蓝色链霉菌 ScbR2 蛋白和 JadR2 蛋白对 *kasO* 启动子的抑制情况（图 2B）^[15]，并且通过进一步添加效应物 JdB，分析了 JdB 诱导 ScbR2 在 *kasO* 启动子去除抑制的过程（图 2C）^[14]。通过这种在异源宿主体内研究调控蛋白对靶启动子活性的影响，可分析出调控蛋白对靶启动子的直接效应，充分排除了其他间接的扰动。

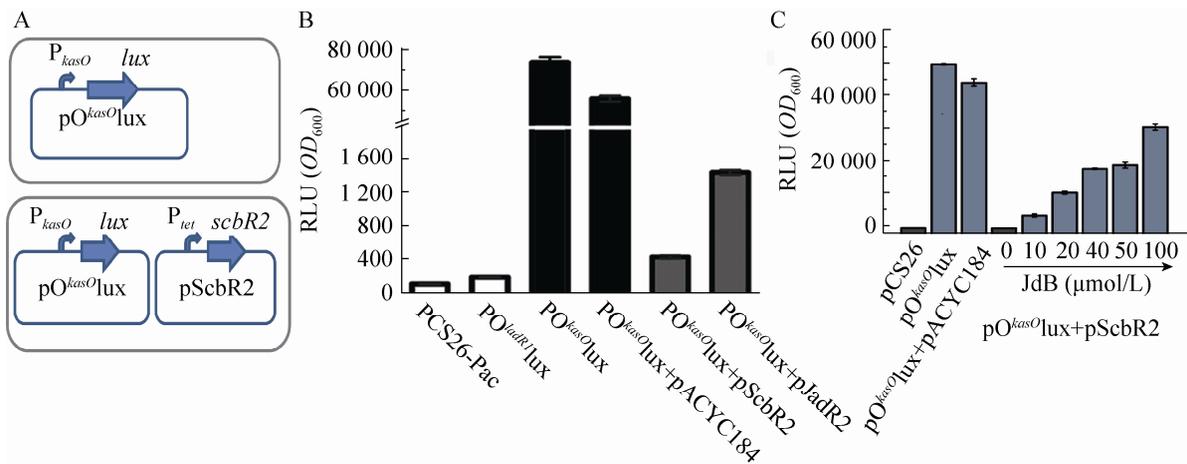


图 2 异源宿主体内调控蛋白和启动子之间的调控关系研究

Fig. 2 The regulation relations of regulatory proteins and the promoter in heterologous hosts. (A) A schematic representation of the two compatible plasmids. (B) The effects of ScbR2 and JadR2 on kasO promoter in *E. coli*^[15]. (C) Investigation of the interactions of JdB with ScbR2 using the Lux reporter system in *E. coli*^[14].

3 确定作用位点的研究

确定了调控蛋白和靶启动子的直接调控关系后，需要进一步在分子层面详细阐释调控蛋白在靶启动子上的结合序列和该序列在启动子上所处的具体位置。而研究结合序列在启动子上的位置的必要前提是确定该启动子的转录起始位点。其中确定调控蛋白在靶启动子上的结合序列的常规技术为足迹法 (Footprinting)^[4]；确定转录起始位点的常规技术为 S1 mapping 实验、引物延伸实验和 5'-RACE 实验^[4]。由于 5'-RACE 实验有常规的试剂盒，下面就本实验室改进的基于荧光标记和毛细管电泳分析的足迹法和 S1 mapping 进行阐述。

3.1 足迹法

Footprinting 是确定 DNA 结合蛋白在 DNA 分子上的结合序列的经典遗传学方法。其原理是：将调控蛋白结合的双链 DNA 探针片段进行单链单末端标记，与纯化的 DNA 结合蛋白在体外

进行结合，然后加入 DNase I 对 DNA-蛋白质复合物进行随机切割，产生一系列不同长度的 DNA 片段，其相邻片段只相差一个核苷酸 (图 3A)。其中被 DNA 结合蛋白特异结合的序列由于空间位阻等多种效应，不能被 DNase I 切割，因此在放射自显影图谱上，DNA 梯度条带在相应于 DNA 结合蛋白的结合区中断，从而形成一空白区，如果同时将 Sanger ddNTP 终止法测序反应产物进行 PAGE 和同位素曝光后，便可读出调控蛋白在 DNA 的结合序列^[4,16-17]。

传统的经典同位素 Footprinting 实验需要经历标记同位素、做 PAGE 胶、电泳、显影和曝光等流程，需要大约两周甚至更长的时间；不仅实验周期长，且同位素的放射性危害比较大，因此限制了此方法的应用。目前，我们在国内首先对基于毛细管的 Footprinting 技术进行了探索：其原理和步骤与传统方法大致相同，只是将 5'端 ³²P 同位素标记替换为 HEX、FAM 等荧光末端标记；酶切后，将 PAGE 胶分离替换为

毛细管分离；将显影曝光等步骤通过毛细管电泳的荧光检测器来实现。用 ABI 3730xl 毛细管电泳，只需要 2 h 就完成了结果的输出；另外由于 ABI 3730xl 是 96 通道批量模式，可以同时完成更多的结合条件的平行实验，增加了实验的成功率，同时也扩大了该方法的使用范围。

为了建立基于荧光标记和毛细管检测的 Footprinting 方法并验证该方法的可靠性，首先我们用该方法对已报道的 γ -丁酸内酯受体 ScbR 对 *scbA* 启动子的结合序列进行了分析。Takano 等通过传统的同位素标记的 Footprinting 实验证

实，ScbR 能够特异结合在 *scbR-scba* 启动子的 A 位 (Site A) 和 R 位 (Site R) (图 3B)^[18]。我们异源表达了 ScbR 蛋白，合成了末端 FAM 荧光标记的探针，通过 PCR 得到 321 bp 的 *scbR-scba* 启动子区域。然后进行结合、酶切等实验，通过 ABI3730xl 测序仪的毛细管电泳分离和荧光检测器监测分析，结果如图 3C 所示，可以清晰地看到 ScbR 在 *scbR-scba* 启动子区域有两个结合位点；我们进一步通过毛细管电泳用内标法和 ddNTP 终止法测序确定 ScbR 结合的具体序列，内标采用 ROX500 (ABI)，结果如图 4A 所示，可

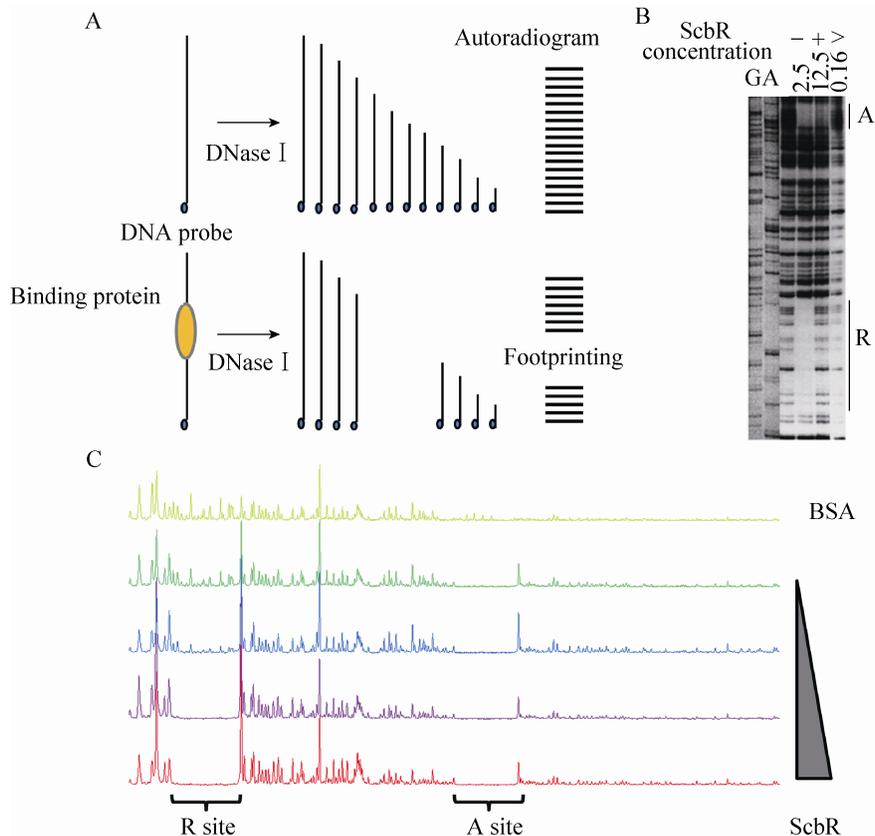


图 3 足迹法确定 DNA 的结合序列

Fig. 3 Footprinting to determine the DNA binding sequence. (A) A schematic representation of footprinting. (B) Footprinting results of ScbR binding the A site and R site of *scbR-scba* promoter using isotope labeled method^[18]. (C) Footprinting results of ScbR binding the A site and R site of ScbR-*scba* promoter using fluorescent FAM labeled probe and capillary electrophoresis detection.

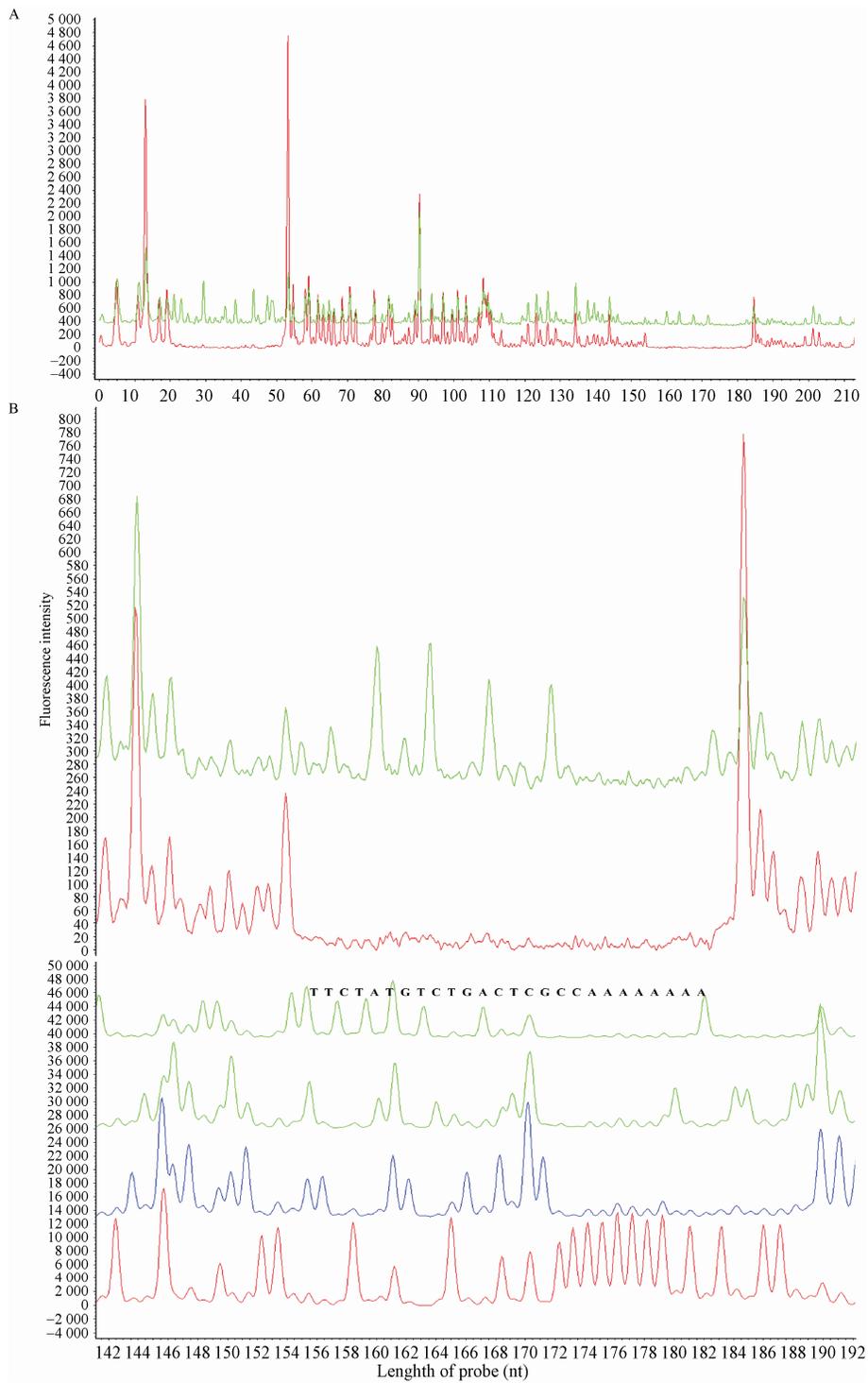


图 4 毛细管电泳确定结合序列的具体位置

Fig. 4 Determination of the specific binding site by capillary electrophoresis. (A) ROX 500 sequencing internal standard used to determine the binding sites of OA and OR. (B) ddNTP sequencing method used to determine the binding site of OA.

以看出 ScbR 的结合位置 R 位和 A 位分别应该在 22–52 bp 和 155–185 bp；图 4B 为 ddNTP 终止法对 A 位进行的末端定位，具体末端为 155–185 bp，和 ROX500 内标标记的一致。以上结果也和文献报道的一致，所以可以得出结论：基于荧光标记和毛细管电泳的 Footprinting 结果和使用同位素标记得到的结果具有一样的可靠性。近几年，我们用该技术对天蓝色链霉菌 ScbR2 蛋白和委内瑞拉链霉菌 JadR2 蛋白分别在相应靶启动子的结合位点进行了成功解析^[19]；同时也将该技术提供给国内同行使用，获得了较好的研究结果^[20-22]。

3.2 S1 mapping 技术

确定启动子转录起始位点 (TSS) 最精确的方法是 S1 mapping 和引物延伸 (Primer extension) 实验，这两种方法都用到 PAGE 胶分离和同位素显影曝光^[4,16]。同 Footprinting 实验一样，我们尝试了用毛细管的检测方法替换 PAGE 胶分离，用荧光标记替换同位素标记来改进 S1 mapping 实验，成功完成了对 *jadWI* 启动子的 S1 mapping 分析。首先制备 *jadWI* 启动子区域荧光探针，然后将其与委内瑞拉链霉菌总的 RNA 杂交、酶切后，用 ABI 3730xl 进行检测，毛细管电泳结果见图 5，可以确定 *jadWI* 启动子的转录起始位点为 *jadWI* 基因的翻译起始密码子 ATG 上游 114 bp 的 G^[19]；这一结果和我们用 5'-RACE 试剂盒确定的转录起始位点完全一致。用荧光标记和毛细管电泳的方法进行的 S1 mapping 试验周期和灵敏性都明显优于 5'-RACE。目前，Chen 等利用该技术完成了相关的工作^[22]。

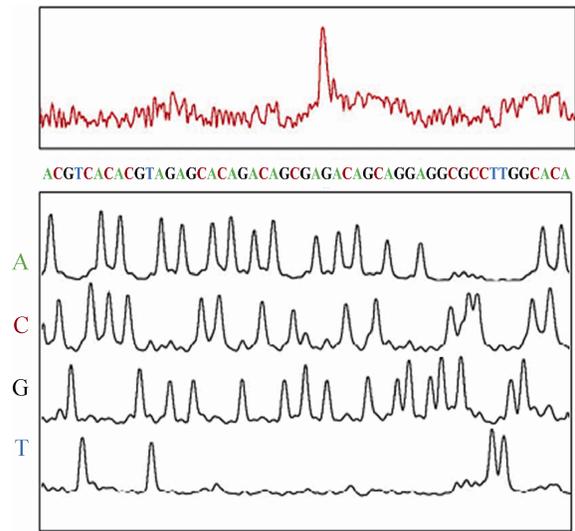


图 5 基于毛细管的 S1 mapping 分析 *jadWI* 启动子的转录起始位点^[19]

Fig. 5 The S1 mapping transcription start site of *jadWI* promoter by fluorescent FAM labeled probe and capillary electrophoresis analysis^[19].

4 展望

转录水平的基因调控是一个极为复杂的过程，但主要需要在两个方面进行深入研究。一方面是同一层次之间相互联系与作用，如调控蛋白与靶启动子之间的关系，主要研究手段也就是我们文中提到的一些技术，这些技术协同应用能够充分阐明调控蛋白的调控机理。相信本实验室对这些技术的改进能够加速研究者对调控机理的认识；另一方面不同层次之间相互联系和动态变化，即用动态的调控网络重新阐释生理现象，相关研究手段有 ChIP-chip/seq、genomic SELEX、细菌单杂交技术等^[23-25]。本文主要对第一方面的调控蛋白与靶启动子的调控机理解析展开了系统综述，以期在国内对相关研究有所帮助。第二方面主要是在系统的组学

水平对调控全局展开研究,目前我们也正在努力地开发方便高效的能够在实验水平上阐明调控网络的研究手段,即分别建立鉴定特定转录因子的全局调控靶点方法和发现调控特定启动子的所有转录因子的方法,以期促进在转录调控这一前沿领域开展系统研究工作。

REFERENCES

- [1] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(5): 628–645.
- [2] Rodionov DA. Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chem Rev*, 2007, 107(8): 3467–3497.
- [3] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(1): 112–143.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–85.
- [5] Jayarajah CN, Thompson M. Signaling of transcriptional chemistry in the on-line detection Format. *Biosens Bioelectron*, 2002, 17: 159–171.
- [6] Draczkowski P, Matosiuk D, Jozwiak K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87(18): 313–325.
- [7] Weinmann AS, Bartley SM, Zhang T, et al. Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(20): 6820–6832.
- [8] Wang J, Wang W, Wang L, et al. A novel role of ‘pseudo’ γ -butyrolactone receptors in controlling γ -butyrolactone biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol*, 2011, 82(1): 236–250.
- [9] Brockman JM, Nelson BP, Corn RM. Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films. *Annu Rev Phys Chem*, 2000, 51: 41–63.
- [10] Forcada-Nadal A, Forchhammer K, Rubio V. SPR analysis of promoter binding of *Synechocystis* PCC6803 transcription factors NtcA and CRP suggests cross-talk and sheds light on regulation by effector molecules. *FEBS Lett*, 2014, 588(14): 2270–2276.
- [11] Wang L, Tian X, Wang J, et al. Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(21): 8617–8622.
- [12] Zhang Y, Pan G, Zou Z, et al. JadR*-mediated feed-forward regulation of cofactor supply in jadomycin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 2013, 90(4): 884–897.
- [13] Shen JL. Application of differential scanning calorimetry for the studying of biological macromolecules. *J Baoding Teachers College*, 1999, 12(2): 34–42 (in Chinese).
沈菊林. 差示扫描量热技术在生物大分子体系研究中的应用. *保定师专学校*, 1999, 12(2): 34–42.
- [14] Wang W, Ji J, Li X, et al. Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(15): 5688–5693.
- [15] Xu G, Wang J, Wang L, et al. "Pseudo" γ -butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *J Biol Chem*, 2010, 285(35): 27440–27448.
- [16] Li R, Liu G, Xie Z, et al. PolyY, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of *polR* in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi*. *Mol Microbiol*, 2010, 75(2): 349–364.
- [17] Pan Y, Liu G, Yang H, et al. The pleiotropic regulator AdpA-L directly controls the pathway-specific activator of nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansiochromogenes*. *Mol Microbiol*, 2009, 72(3): 710–723.
- [18] Takano E, Chakraborty R, Nihira T, et al. A complex role for the γ -butyrolactone SCB1

- In regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 2001, 41(5): 1015–1028.
- [19] Wang J, Wang W, Wang L, et al. A novel role of pseudo- γ -butyrolactone receptors in controlling γ -butyrolactone biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol*, 2011, 82(1): 236–250.
- [20] Guo J, Zhang X, Chen Z, et al. Two adjacent and similar TetR family transcriptional regulator genes, SAV577 and SAV576, co-regulate avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e99224.
- [21] Luo S, Sun D, Zhu J, et al. An extracytoplasmic function sigma factor, sigma (25), differentially regulates avermectin and oligomycin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(16): 7097–7112.
- [22] Chen DW, Zhang Y, Jiang CY, et al. Benzoate metabolism intermediate benzoyl coenzyme A affects gentisate pathway regulation in *Comamonas testosteroni*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(13): 4051–4062.
- [23] Bouvet P. Determination of nucleic acid recognition sequences by SELEX. *Methods Mol Biol*, 2001, 148: 603–610.
- [24] Johannes F, Wardenaar R, Colome-Tatche M, et al. Comparing genome-wide chromatin profiles using ChIP-chip or ChIP-seq. *Bioinformatics*, 2010, 26(8): 1000–1006.
- [25] Meng X, Brodsky MH, Wolfe SA. A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(8): 988–994.

(本文责编 郝丽芳)