

高效亲和色谱研究含有特定结构域肽与 DNA 的结合

张若蘅** 杨 栩 李崇熙 徐筱杰

(北京大学化学系 北京 100871)

1 前言

在脱氧核糖核酸(DNA)结合蛋白质中,除了螺旋-转折-螺旋、锌指和亮氨酸拉链三种主要结构域之外^[1],近年来,一类含有 β -转折结构的S(T)PXX结构域引起了人们的注意^[2]。这类新型结构域的肽片段主要是与DNA小沟结合,它们在DNA结合特性方面与某些具有抑菌抗肿瘤活性的药物分子如纺锤菌素(Netropsin)、Hoechst33258等有相似之处。我们在童坦君等人改进方法^[3]基础上,自制了小牛胸腺DNA纤维素,应用亲和色谱研究了含有SPXXGXP结构域肽与DNA结合的作用。与低压亲和色谱相比,高效亲和色谱(HPAC)具有高精度、微量、快速和重复性好等优点,是研究蛋白质(多肽)与DNA结合作用的有效方法。

2 实验部分

2.1 材料与方法

微晶纤维素(柱色谱用),上海试剂二厂;小牛胸腺DNA(>95%),中科院东方仪器设备公司;二苯胺(重结晶, m. p. 52.5~53.5°C),北京化工厂。820工作站HPLC; Waters510泵, Waters490E紫外检测器。

2.2 DNA纤维素制备

DNA纤维素按文献方法制备^[3]。二苯胺法^[4]测得每克DNA纤维素所含的DNA量是0.012g。筛选30~70目DNA纤维素填充不锈钢柱(3.9mm i. d. × 2.0cm)。

2.3 多肽合成

我们选择酵母HO基因SWI5因子上的一段序列,设计了五个与这种特定结构域相关的肽:

S2; SerProArgLysSerProArgLysNH₂

P1; SerProArgLysArgGlyArgProArgLysNH₂

P2; AlaProArgLysArgGlyArgProArgLysNH₂

P3; SerProArgLysArgGlyArgAlaArgLysNH₂

P4; SerAlaArgLysArgGlyArgAlaArgLysNH₂

由本实验室固相法合成并通过纯度鉴定^[5]。

2.4 色谱测试条件

流动相A: 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), B: 2.0mol/L NaCl + 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 流速1.0mL/min; 检测波长214nm, 1.000AUFS。

3 结果与讨论

在DNA纤维素制备方法中, Gilham用碳化二亚胺试剂把聚核苷酸连接到纤维素上^[6], Alberts等把DNA吸附到纤维素上^[7], Litman用紫外线照射法使DNA与纤维素连接^[8,9]。我们用改进的紫外线照射法制备小牛胸腺DNA纤维素, 收率较高(75%)。经试验, 其稳定性能达到高效亲和色谱(HPAC)的要求。

以S2肽为例, 亲和色谱结果(图1)表明, S2肽能够与纤维素载体上的小牛胸腺DNA结合, 用10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液长时间洗脱, 这种结合作用是稳定的, 但随着洗脱液中NaCl浓度的线性增加, S2肽被一定浓度的NaCl溶液(0.37mol/L)从DNA纤维素柱上洗脱下来。其它四个肽的实验结果类似, 先后被不同浓度的NaCl溶液从DNA纤维素柱上洗脱下来, P1: 0.48mol/L, P2: 0.49mol/L, P3: 0.47mol/L, P4: 0.44mol/L, 呈现出P2~P1~P3>P4>S2规律性(图2)。

在同一色谱条件下, 纤维素柱(不含DNA)对比实验结果排除了纤维素与五个肽物理吸附的可能性。上述高效亲和色谱结果表明, 从NaCl浓度的高低即可看出肽与DNA结合的稳定性程度。考察这五个肽的结构, 我们发现, S¹P²X³X⁴X⁵G⁶X⁷P⁸结构域中Ser¹、Pro²和Pro⁸分别被Ala取代后, Pro²对肽的DNA结合性能影响较为显著。综合考虑五个肽的其它实验结果^[5], 高效亲和色谱直观地反映了含特定结构域肽与DNA非特异性结合作用的规律, 为我们研究选择性识别并结合DNA的蛋白质、多肽及药物的分子机制提供了可靠的依据。

* 国家“攀登”计划资助课题, ** 通讯联系人
本文收稿日期: 1993年9月5日, 修回日期: 1993年11月11日

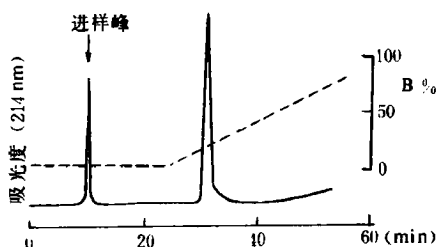


图1 S2肽的高效亲和色谱

关键词 亲和色谱,肽,脱氧核糖核酸(DNA)

参考文献

1 Steitz T A. Quarterly Reviews of Biophysics, 1990; 23 (3): 205
 2 Suzuki M. J Mol Biol, 1989; 207: 61
 3 杨世欣,董坦君. 生理科学进展, 1984; 15(1): 95

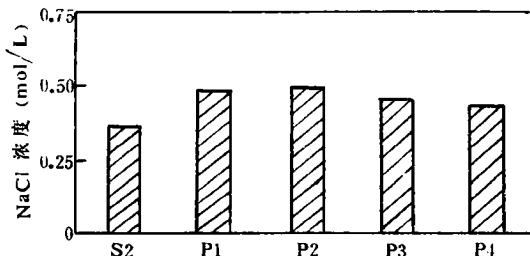


图2 高效亲和色谱结果比较

4 Ashwell G. Methods in Enzymology, 1957; 3: 73
 5 杨 栩,张若蓓,李崇熙等. 待发表
 6 Gilham P T. Methods in Enzymology, 1971; 21: 191
 7 Alberts B *et al.* Methods in Enzymology, 1971; 21: 198
 8 Litman R M. J Biol Chem, 1968; 243: 6222
 9 Weissbach A *et al.* Methods in Enzymology, 1974; 34: 463

A Study of the DNA-Binding Properties of Peptides Containing a Specified Motif by High Performance Affinity Chromatography (HPAC)

Zhang Ruoheng, Yang Xu, Li Chongxi and Xu Xiaojie

(Department of Chemistry, Peking University, Beijing, 100871)

In contrast to many sequence-specific DNA binding proteins, for which DNA binding motifs such as the helix-turn-helix, zinc-finger and leucine-zipper have been well understood, a quite new mode of DNA binding is identified as the S(T)PXX motif. After proposing the role of a SPXXXGXP motif of peptides in DNA binding process, we show here that the motif specified above prefers to recognize and bind to DNA with much lower sequence specificity, using DNA cellulose AC. The novel results show that HPAC method is valuable for producing accurate, highly reproducible features in elucidating the structural and molecular mechanisms of non-specific protein-DNA interaction.

Key words affinity chromatography, peptide, deoxyribonucleic acid (DNA)

● **新书讯** ● 《临床医药色谱分析》一书由袁倚盛主编,南京大学出版社出版。全书分上、下两篇,25万字左右。上篇介绍作者在实验室中分析40多种生物物质的色谱法,下篇介绍作者在实验室中分析80多种体内药物的色谱法。作者论述了这些生物物质和药物的理化性质,生物化学通道,药物代谢途径,生理活性作用和药理作用,临床测定意义以及有关疾病的相关性。作者回顾了国内外相应的测定方法,详细地介绍了作者实验室中建立的色谱法,并列出了正常参考值,引用了大量文献供读者参考。

本书可供中、高级色谱工作者和临床检验人员阅读。书价8.5元,邮费1.5元。欲购者与南京军区南京总医院(210002)袁倚盛联系。