

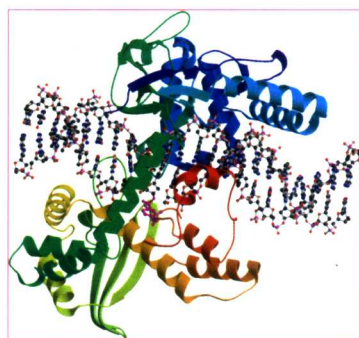
D.S.Latchman 等 编著

刘进元 赵广荣 等 译

转录因子实用技术

TRANSSCRIPTION FACTORS
A PRACTICAL APPROACH
SECOND EDITION

第**2**版



清华大学出版社

编著者 D.S.Latchman 等

译者 (排名不分先后)

刘进元 赵广荣 徐子剑

王晓明 张恒木

转录因子实用技术

*T*RANSSCRIPTION FACTORS
A PRACTICAL APPROACH
SECOND EDITION

第2版

清华大学出版社

北 京

David S. Latchman

Transcription Factors: A Practical Approach, Second edition

EISBN: 0-19-963696-6

© Oxford University Press 1999

All Rights reserved.

版权所有,盗印必究。

Transcription Factors: A Practical Approach was originally published in English in 1999. This translation is published by arrangement with Oxford University Press and is for sale in Mainland(part) of the People's Republic of China only.

英文版 **Transcription Factors: A Practical Approach** 1999 年首次出版。本书中文版由牛津大学出版社授权清华大学出版社在中国大陆独家发行。

北京市版权局著作权合同登记号 图字: 01-2001-4169

图书在版编目(CIP)数据

转录因子实用技术(第2版)/拉齐曼(D. S. Latchman)等编著;刘进元等译. —北京:清华大学出版社, 2004

书名原文: Transcription Factors: A Practical Approach

ISBN 7-302-07693-6

I. 转… II. ①拉… ②刘… III. 转录(分子生物学) IV. Q75

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 106080 号

出版者: 清华大学出版社

<http://www.tup.com.cn>

社总机: 010-62770175

地址: 北京清华大学学研大厦

邮编: 100084

客户服务: 010-62776969

责任编辑: 罗 健

封面设计: 吴朝洪

版式设计: 刘伟森

印刷者: 清华大学印刷厂

装订者: 三河市新茂装订有限公司

发行者: 新华书店总店北京发行所

开本: 185×230 印张: 18.5 字数: 369 千字

版次: 2004 年 5 月第 1 版 2004 年 5 月第 1 次印刷

书号: ISBN 7-302-07693-6/Q·36

印数: 1~3000

定价: 48.00 元

本书如存在文字不清、漏印以及缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话:(010)62770175-3103 或(010)62795704

随着众多生物基因组计划的完成及其蛋白质组学研究的不断深入,人类步入了系统生物学时代。基因组计划的完成提供了大量的 DNA 内在信息,解析出基因组中可能存在的全部基因的阅读框架,接下来研究基因的表达调控特别是转录调控就显得非常迫切。另一方面蛋白质组学研究的突飞猛进勾画出了细胞的蛋白质表达谱和网络图,接下来研究蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 的相互作用将成为当前乃至今后相当长时期内的研究主题。可以说 21 世纪对人类最具挑战性的生物学主题就是“基因的全基因组调控”和“细胞的全蛋白质的生理功能”这两大难题。研究转录因子就是研究转录调控的分子机制,研究一类特定的蛋白质分子与 DNA 的结合特性,研究与 DNA 结合的蛋白质分子是如何调控基因转录等问题。转录因子的研究实际上已构成上述两大生物学难题的一个交叉点,生物学各领域越来越多的科研人员已开始将自己的研究转向转录因子的研究。

研究转录调控机制虽然已成为当前生物学研究领域的热点,但对于初涉该领域的研究者来说,充分理解其研究策略和关键技术仍是十分必要的,而获得一本反映世界先进水平的实用可行的实验指导书更显得至关重要。在清华大学出版社的组织下,我们翻译了这本由国际著名学者所编写的《转录因子实用技术》,奉献给国内同仁,以期对我国转录因子研究的进一步深入做出贡献。

本书内容涵盖了真核生物转录调控的前沿理论和研究转录因子的关键实验技术。所编入的许多实验如转录因子基因及其靶基因的分子克隆、转录因子的纯化及其特征分析、DNA 迁移率变动分析、DNA-蛋白质复合体的足迹分析以及分析被修饰转录因子的技术等都是进行转录分析时常使用的技术。本书各章既对实验内容进行了充分解说,又给出了详细的实验步骤,并配有注意事项和完整的参考文献,便于读者寻根求源全面了解每一细节。相信该书中文版的问世一定会对我国这方面的研究有所启迪和帮助。

在翻译过程中,我们力求既忠实于原文又能符合汉语的正确表达。全书以科

学出版社出版的《英汉生物学词汇》(第二版)规范所有术语,并对原著的某些笔误及与目前进展不符的措辞做了一一更正。本书的主要译者大多是活跃在科研第一线的年轻学者。第2~4章由赵广荣翻译、第5~6章由徐子剑翻译、第7~8章由王晓明翻译、第9~11章由张恒木翻译。刘进元除对其余部分进行了翻译外,还对全书进行了最终校读,以统一所用术语。由于时间紧任务重,我们没有足够的时间对某些深奥的英文表达做仔细推敲,难免会有一些不确切的中文表达甚至译误,在此敬请广大读者指正,以期在再版时加以更正。

刘进元

2003年10月于清华园

转录过程既是 DNA 向蛋白质进行遗传信息转换的关键一步,也是调控基因表达的主要阶段。因此,当发生转录后调控的情况下,绝大多数均可应特定细胞类型或者应某一特定信号反应,通过激活(或抑制)转录而实现基因调控。一旦发生转录,涉及基因表达的其他过程(RNA 加工、翻译等)将接踵而来,会应特定细胞类型或以诱导方式产生相应蛋白。转录的基本过程本身及其调控均受基因启动子或增强子中特定短 DNA 序列的调控。这些序列与称为转录因子的特定蛋白结合,影响基因转录的效率。

因此转录因子的研究是基因调控研究的一个关键领域。总体上讲这些因子的特征鉴定涉及研究蛋白质本身和它们与 DNA 相互作用的一整套独特方法。这些方法也许在研究 DNA 和 RNA 的标准分子生物学实验技术中找不到,而本书的目标就是要提供这样一套方法。使读者可在已鉴定出目标基因特定调控区域的基础上,进一步鉴定出与这些序列结合的蛋白质。研究的初始阶段涉及用 DNA 迁移率变动分析来鉴定与调控区域内一段特定 DNA 序列结合的蛋白质(第 1 章),以及用 DNase I 指纹图谱和甲基化干涉技术详细鉴定 DNA 与蛋白质相互作用的特征(第 2 章)。接着是研究蛋白质的生化特征,包括蛋白质的大小、形成复合体的能力以及在体外对转录的促进(第 3 章)。虽然许多这样的分析强调了蛋白因子的转录促进功能,但不要忘记结合 DNA 的转录因子只是能结合 DNA 的蛋白质大家族中的一员。因此为研究这些蛋白所开发的许多方法也适用于研究转录因子。

蛋白因子的特征为它的最终纯化开辟了道路,而纯化出的蛋白又可以用于部分蛋白质序列的鉴定,进而用设计出的寡核苷酸探针筛选 DNA 文库分离出因子的 cDNA 克隆(第 4 章)。其他也有不少在某些情况下较易分离出蛋白因子 cDNA 克隆的方法,例如用与因子结合的 DNA 位点或者因子的抗体直接筛选 cDNA 表达文库(第 5 章),或采用同源序列克隆法克隆其他已知因子的同源因子(第 6 章)。

一旦 cDNA 克隆得到分离,所有分子生物学的标准技术均可被用来研究其基

因结构、表达特征以及转录因子的 DNA 序列。同样,对负责 DNA 结合或激活转录的蛋白质的各功能区域的鉴定也很重要。采用 cDNA 克隆片断就可容易地完成上述鉴定(第 7 章)。本书所述方法相互组合,最终将使实验者完成涉及某特定基因或调控转录的 DNA 序列特征的鉴定,弄清与该序列结合的蛋白质以及该蛋白质控制转录的方式。

最后非常感谢所有为开发本书所述方法做出努力的贡献者们,感谢牛津大学出版社同仁们的一贯支持与帮助。

D. S. L

自第一版问世 5 年来,由于表达序列标签以及基因组计划所测定出的大量序列中有许多序列都编码转录因子,那些原本研究单基因调控的研究者陆续转向研究调控这些基因的转录因子,因此研究转录因子的小组不断增加。同时,不管这些转录因子是从单基因调控研究中获得的,还是来自基因组筛选程序;目前开发出的许多新方法均适合用来研究这些转录因子,从而大大加速了转录因子的研究进程。

在此形势下,需要对初版的《转录因子实用技术》一书进行更新,以满足研究者对单个转录因子功能和活性进行精确鉴定的要求。借此良机,原版全书所有章节已由原作者进行总体更新或由新作者完全重写了。更重要的是增加了 4 章新内容,既拓宽了原版的内容范围,又加进了自初版以来刚发展起来的那些特别有用的新方法。

像第一版一样,全书以介绍鉴定与特定 DNA 序列结合的蛋白质的实验方法开头。紧接 DNA 迁移率变动分析(第 1 章)之后,增加了由新作者完成的介绍有关确定 DNA-蛋白质相互作用特征的详细方法(第 2 章)。而详细介绍转录因子蛋白特征鉴定的方法仍紧随其后(第 3 章)。

特定因子所具有的特征为分离编码该因子 DNA 的克隆开辟了道路,可以用由蛋白序列所设计的寡核苷酸探针(第 4 章),或者用其 DNA 结合位点序列筛选 cDNA 表达文库(第 5 章)来进行。而且借助于与已知转录因子的同源性,近来用实验筛选程序或用数据库检索鉴定出的因子数目大大增加(第 6 章)。在此情况下,有关这些转录因子的靶序列的信息相对较少,或根本找不到,为此新版专门增加了 1 章来介绍用以鉴定未界定因子的靶基因的方法(第 7 章)。

一旦一个转录因子被克隆,且靶基因也可被确定,就可以用一整套的方法来进行进一步分析它的功能。在第一版中,有专门用于功能分析的一些方法(第 8 章),而在新版中由于在相关章节中相关内容的添加使该章的内容得到了进一步补充。这些增加的章节包括用来自鼠脑组织的转录活性核抽提物在体外进行转录分析来分析

转录因子功能的实验(第 9 章)和分析这些因子对染色质结构影响的实验(第 10 章)。另外,由于在这些或者其他分析中许多转录因子的活性受到转录后修饰的影响,因而最后一章描述了对转录因子的磷酸化或糖基化状态进行分析的方法(第 11 章)。

通过对全书各章的总体更新和一些新章节的添加,可望新版在初版的基础上获得更大成功,继续为专注于应用合适方法研究关键因子的那些读者提供综合指导。像第一版一样,这里再次衷心感谢所有为开发这些方法做出努力的人们,感谢牛津大学出版社的编辑们所做出的更新原版的决定,以及在本书出版过程中他们所表现出的精湛技术。

D. S. L.

ALAN ASHWORTH

Chester Beatty Laboratories, The Institute of Cancer Research, Fulham Road,
London SW3 6JB UK.

JOAN BOYES

Chester Beatty Laboratories, The Institute of Cancer Research, Fulham Road,
London SW3 6JB UK.

AUSTIN J. COONEY

Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Hous-
ton, TX 77030 USA.

IAN G. COWELL

Department of Biochemistry and Genetics, The Medical School, Newcastle Uni-
versity, Newcastle Upon Tyne, NE2 4HH UK.

C. L. DENT

Glaxo Wellcome Research and Development, Medicines Research Centre, Gun-
nells Wood Road, Stevenage, Hertfordshire, SG1 2NY UK.

G. H. GOODWIN

Haddow Laboratories, Institute of Cancer Research, 15 Cotswold Road, Sutton,
Surrey, SM2 5NJ UK.

HELEN C. HURST

ICRF Molecular Oncology Unit, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 0NN UK.

G. HYNES

Chester Beatty Laboratories, Institute of Cancer Research, Fulham Road, London, SW3 6JB UK.

SATOSHI INOUE

Department of Biochemistry, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama Iruma-Gun, Saitama 350-04, JAPAN.

SHIGERU KONDO

Department of Biochemistry, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama Iruma-Gun, Saitama 350-04, JAPAN.

D. S. LATCHMAN

The Windeyer Institute for Medical Sciences, University College London Medical School, The Windeyer Building, 46 Cleveland Street, London W1P 6DB, UK.

CYNTHIA T. McMURRAY

Department of Pharmacology, Mayo Foundation, 200 1st Street, SW Rochester, MN 55905 USA.

MASAMI MURAMATSU

Department of Biochemistry, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama Iruma-Gun, Saitama 350-04, JAPAN.

R. H. NICOLAS

Imperial Cancer Research Fund, PO Box 123, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX UK.

MALCOLM G. PARKER

Molecular Endocrinology Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, PO Box123,
Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX UK.

W. W. SCHLAEPFER

Division of Neuropathology, 435 Johnson Pavillion, University of Pennsylvania Medical
School, Philadelphia, PA 19104-6079 USA.

M. L. SCHWARTZ

Division of Neuropathology, 435 Johnson Pavillion, University of Pennsylvania Medical
School, Philadelphia, PA 19104-6079 USA.

M. D. SMITH

The Windeyer Institute for Medical Sciences, University College London Medical
School, The Windeyer Building, 46 Cleveland Street, London W1P 6DB, UK.

CRAIG SPIRO

Department of Pharmacology, Mayo Foundation, 200 1st Street, SW Rochester, MN
55905 USA.

N. SHAUN B. THOMAS

Department of Haematology, University College London Medical School, 98 Chenies
Mews, London WC1E 6HX UK.

MING-JER TSAI

Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Houston, TX
77030 USA.

SOPHIA Y. TSAI

Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Houston, TX
77030 USA.

ROGER WHITE

Molecular Endocrinology Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, PO Box123,
Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX UK.

内 容 简 介

本书是英国牛津大学出版社出版的实验技术丛书中《Transcription Factors: A Practical Approach》第2版的中译本。全书共分为11章,详细介绍了研究真核生物转录因子的实用技术,内容包括用cDNA表达文库,序列相似性克隆转录因子,用基因位点克隆技术确定转录因子的靶基因,转录因子的纯化及特征分析,DNA迁移率变动分析,DNA-蛋白质复合体的体内外足迹分析以及转录因子的修饰分析等。

本书可供分子生物学、生物化学、生物技术、医药卫生以及农林等领域对转录调控感兴趣的师生及科研人员参考。

1 DNA 迁移率变动分析	1
1.1 概述	1
1.2 DNA 结合蛋白的检测	2
1.2.1 DNA 迁移率变动分析的应用	2
1.2.2 DNA 探针的选择	5
1.2.3 用于阻滞分析的标记寡聚核苷酸探针的制备	6
1.2.4 限制性片段探针的标记	7
1.2.5 蛋白提取物的制备	9
1.2.6 结合反应	11
1.2.7 少量提取物的制备	13
1.3 用于结合分析的蛋白质的其他来源	13
1.3.1 在细菌中表达 DNA 结合蛋白	14
1.3.2 用哺乳动物细胞表达蛋白	15
1.3.3 体外转录和翻译——体外表达	15
1.3.4 用杆状病毒系统表达转录因子	16
1.3.5 转录因子蛋白的纯化	16
1.4 DNA 结合特性的分析	16
1.5 DNA 结合蛋白的特性	18
1.5.1 抗体的添加	18
1.5.2 潜在配基的添加	19
1.5.3 酶解剪除后的带变动分析	20
1.6 蛋白-蛋白相互作用的分析	21
1.7 结论	22

2 DNA-蛋白质复合体外和体内足迹分析	24
2.1 概述	24
2.2 体外足迹分析	26
2.2.1 以结合位点碱基级分辨率对 ³² P 末端标记的片段进行分析	26
2.2.2 在闭合环状质粒上的结合分析	40
2.3 体内足迹分析	44
2.3.1 体内 DNA 修饰	49
2.3.2 基因特异性巢式引物	52
2.3.3 用于 LMPCR 的接头	52
2.3.4 LMPCR 核苷酸分辨率的可视化	53
3 体外转录和转录因子的特征	61
3.1 概述	61
3.2 体外转录分析	61
3.3 天然转录因子相对分子质量的测定	66
3.3.1 用凝胶过滤色谱测定相对分子质量	67
3.3.2 用甘油梯度离心测定相对分子质量	70
3.3.3 用非变性梯度凝胶电泳测定天然转录因子的分子质量	72
3.4 变性转录因子分子质量的测定	74
3.4.1 转录因子与 DNA 的紫外交联	75
3.4.2 与溴脱氧尿苷置换的 DNA 进行 UV 交联	75
3.4.3 转录因子与未置换探针的紫外交联	78
3.4.4 从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶复性转录因子	80
3.5 DNA 结合型转录因子的单体和二聚体的结构分析	81
3.5.1 通过 DNA 凝胶阻滞分析解析转录因子	82
3.5.2 通过化学交联分析转录因子亚基	83
3.5.3 与相邻应答元件结合的二聚体之间的协同结合分析	84
3.6 非 DNA 结合转录因子的鉴定及其初步特征	85
3.6.1 分析 DNA 结合和非 DNA 结合转录因子之间的直接结合	86
3.6.2 “超级阻滞”凝胶阻滞分析	87
3.6.3 在非 DNA 结合转录因子存在和缺乏时转录因子-DNA 复合体的解离分析	88
3.6.4 用免疫共沉淀分析转录因子间的直接相互作用	89

4 DNA 结合转录因子的纯化及克隆	93
4.1 概述	93
4.2 缓冲液与溶液	94
4.3 核提取物的制备	96
4.4 DNA-纤维素层析	99
4.5 DNA 亲和层析	100
4.6 反相层析	107
4.7 多肽的制备与分离	108
4.8 用于分离 cDNA 的寡核苷酸的设计	113
5 用 cDNA 表达文库克隆转录因子	119
5.1 概述	119
5.2 噬菌体表达文库的构建	120
5.2.1 文库的选择	120
5.2.2 文库的平板筛选	120
5.2.3 噬菌斑的纯化	122
5.3 筛选方法	122
5.3.1 简介	122
5.3.2 以 DNA 结合位点为探针的筛选法	123
5.3.3 免疫筛选	129
5.3.4 文库筛选的其他方法及其相对优点	132
5.4 因子的鉴定	133
6 由序列相似性克隆转录因子	138
6.1 简介	138
6.2 克隆转录因子的方法	138
6.2.1 低严紧杂交	138
6.2.2 聚合酶链式反应法	141
6.2.3 <i>In silico</i> 法鉴定新的转录因子	151
6.3 由同源性克隆转录因子的一些例子	153
7 采用结合位点克隆技术鉴定转录因子的靶基因	155
7.1 概述	155
7.2 利用核 DNA 结合位点(GBS)的克隆方法	155
7.2.1 转录因子蛋白的制备	156