

引言

基因表达调控

生物差异经常是由基因表达差异引起。尽管当前可使用多种高度先进的技术来研究基因表达，但是只有少数分子工具可以用来研究基因表达调控的过程和机制。转录因子代表了一类重要的基因表达调控因子。这些特殊蛋白质含有 DNA 结合域，可能也包括配体结合域和蛋白质结合域。转录因子通过与基因启动区的特异 DNA 序列结合调节基因表达。转录因子蛋白结合域与 RNA 聚合酶以及其它调控蛋白相互作用调节转录因子活性，最终可对基因表达进行控制。自动磷酸化或通过相邻结合蛋白的去磷酸化作用也可对转录调控因子活性发挥作用。这些结合活动可以在单个细胞中，通过上调或下调特定基因的转录过程，“打开”或“关闭”某些特定基因。特定 DNA 序列的转录因子亲和力和特异性可能受到配体与配体结合域相结合的影响。因此，多数在细胞中的转录因子都处于一个非活性状态，等待着配体和辅助激活因子蛋白的信号刺激以及外部因素刺激。这些外部刺激因素可能包括小分子、激素、多肽、维生素和/或脂肪酸。多种信号传导通道可能由一个或多个刺激因素激发，达到特定转录因子组的激活峰值。然后转录因子组调控基因表达，对刺激因素作出反应。因此，多种转录因子可以激活调节下游目的基因诱导表达。因为 2000 个以下的转录因子管理和控制着所有细胞生理机能，所以基因表达调控复杂、精彩、简洁。

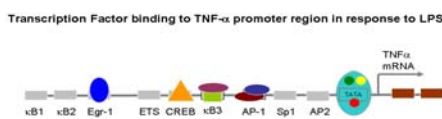


图 1: 位于邻近 TATA 框或基因启动序列的基因调控区(转录因子结合位点)的示意图。该图描述转录因子结合对基因表达的影响,在此例中, mRNA 的产生从 TNF- α 基因编码处开始转录。

分析转录因子对不同刺激因素的反应有助于分析众多信号传导通路,也因此对全局细胞过程有更深入的理解。当前,转录因子作为药物靶点的重要性越来越得到人们的认识,目前许多领先的制药公司已计划并积极开展发现新的转录因子药物靶点研究(例如Roche, Glaxo Smith Kline, Millenium)。同样,其它公司正在寻求将修饰型转录因子开发成治疗药物(例如Johnson and Johnson, Sangamo, Ariad)。一些包括aspirin, Accutane, Cyclosporin A, Lovastatin, Synthroid和Tamoxifen等重要药物就是通过与转录因子作用而发挥疗效的。

当前测量转录因子活性的方法不是很充足。测量转录因子活性的传统方法包括凝胶迁移检测(1)和报告基因检测(2)。然而,这些方法的一些严重缺点限制了其检测效率,特别是在高通量和多色成像应用中。

这些传统方法比较费力费时,其固有特性不能适应现代实验室的研究需求。开发能使用高通量和低通量两种模式来测量激活转录因子的新检测方法以便利用转录因子筛选技术的显著潜力是有必要的。

Alpha Innotech 公司已开发出新型微孔板检测技术,在许多不同范围的样品中提供包括表达蛋白以及培养细胞和组织等的快速转录因子活性测量技术。这种微孔板检测产品基于一项设计优美简洁的专利技术基础上。对于每次检测,建立转录因子探针。该探针含有一个双链蛋白质结合域,一个单链捕捉区和一个生物素标记。蛋白质结合区的序列已经采用公共和私有数据库来优化,以便提供高亲和力和特异性结合位点。在探针中加入一个核提取样品,转录因子能够结合到双链 DNA 区域,因此,使用一定量的核酸酶保护此区域以防降解。一旦结合发生,把专利核酸酶添加进来,仅消化没有受蛋白结合保护的探针双链区域。

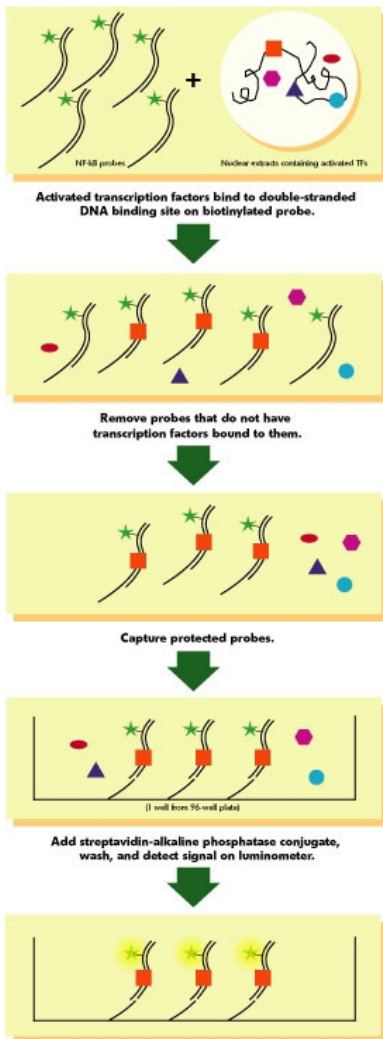


图 2：转录因子检测步骤图解

然后探针的捕捉区与固定在微量滴定板表面的互补寡核苷酸进行杂交。洗涤后，采用链霉亲和素碱性磷酸酶耦合物和化学发光底物来检测生物素标记。

在本应用手册中，我们将演示 4 个不同转录因子的检测，并说明 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 是测量化学发光信号的最佳工具。

材料和方法

细胞培养和处理

将 HI-60 细胞放在 DMEM 中生长到近似密度 106 细胞/毫升。分离细胞，一半细胞用 500 nM 佛波醇十四烷基醋酸酯 (PMA) 和 100nM 离子霉素 (IM) 处理。PMA/IM 处理通过诱导生长因子和转录因子可增强细胞生长和分化 (3)。

核酸提取物准备

采用 Alpha Innotech 公司根据优化 Dignam 实验方案 (5) 生产的核酸提取试剂盒，从受激和非受激 HL-60 细胞 (ATCC#CCL-240) (4) 中制备核酸提取物。简单地用离心法收集培养细胞，在磷酸盐缓冲盐水中洗涤去掉细胞培养基。然后让细胞在完全低渗细胞溶解缓冲液中膨大，再添加洗涤剂溶液溶解细胞。采用温和的离心法收集细胞核。去除细胞质 (上清液)。上清液可以存放在 -80 摄氏度下用于其它检测项目的分析。核酸微粒在完全核酸洗涤缓冲液中洗涤 2 次，将核蛋白从 DNA 中使用完全萃取缓冲液 1 和完全萃取缓冲液 2 混合物萃取分离。用离心方法纯化核酸提取物，存放在 -80 摄氏度下以备使用。重要的是待检提取物用 Alpha Innotech 公司的核酸提取试剂盒制备。用其它厂家或“自制”的试剂盒或试剂来制备的提取物可能得到不正确的结果。

Alpha Innotech 公司微孔板转录因子检测

所有 Alpha Innotech 微孔板转录因子检测试剂盒包括下列溶液和试剂。值得注意的是检测方案和捕捉微孔板应为通用类型，因此不同转录因子的检测可以同时相同微孔板上进行。

- 转录因子结合混合物 (I 和 II)
- 10 倍稀释洗涤液、杂交缓冲液/加速剂
- 耦合物稀释液
- 链霉亲和素碱性磷酸酶耦合物
- PCR 微孔板、微孔板密封剂、微孔板盖板
- 化学发光底物

检测方案包括 4 个主要步骤：结合、分解、杂交和检测。

• 结合

在结合步骤中，核酸提取物首先与结合混合物 I 混合，混合物 I 是包括背景 DNA 的优化溶液，能减少非特异性核酸结合到标记 DNA 上。在结合混合物 II 内添加标记 DNA 探针，随后转录因子结合到标记 DNA 上。

把 15 微升结合混合物 I 添加到所要求数量的 PCR 板微孔中。3 微升样品稀释液添加到阴性和阳性试剂对照微孔中，3 微升核酸提取液或组合蛋白添加到包含结合混合物 I 的样品微孔中。每个微孔彻底混合，轻轻上下移液 2-3 次，用微孔板盖盖住微孔板。反应物在室温下温育 20 分钟，然后添加 15ul 结合混合物 2 到含结合混合物 I 的微孔中。微孔内再次混合，在 25 摄

氏度下在热量循环器中温育 20 分钟。

- **分解**

在分解步骤中，把含专有核酸酶的溶液添加到反应中。核酸酶溶解许多没有被结合的转录因子保护的标记 DNA。溶解液中从 DNA 释放出生物素标记。在溶解缓冲液中稀释溶解液，然后制备完全溶解缓冲液。除了阳性检测对照微孔，把 25ul 完全溶解试剂加到所有微孔中。在微孔里混合，然后在 37 摄氏度下温育 20 分钟。

- **杂交**

在杂交步骤中，将完整的生物素标记 DNA 探针固定在捕捉微孔板的表面。

通过在杂交缓冲液中添加杂交加速剂制备完全杂交缓冲液。把数微升完全杂交缓冲液加到捕捉微孔板的每个微孔中。对每个样品，把 50 微升从 PCR 微孔板上转移到含完全杂交缓冲液的微孔板微孔中。微孔板放置在微孔板振荡器中，在室温下发生杂交 45 分钟。

- **检测**

洗涤后，结合生物素采用链霉亲和素碱性磷酸酶和化学发光底物检测。

微孔用 1 倍洗涤缓冲液洗涤 4 次，把 100 微升含链霉亲和素碱性磷酸酶耦合物的检测试剂添加到每个微孔中。室温下温育 30 分钟后，微孔板重新用 1 倍洗涤缓冲液洗涤 4 次。把 75 微升化学发光底物加到每个微孔中，微孔板在读数前于 37 摄氏度下温育 30 分钟。

- **用 Tecan Genios 酶标仪测量化学发光信号**

底物温育后，微孔板在 Tecan Genios 微孔板阅读器上于化学发光模式下按 100 增量设置模式读数。在微孔板上放置盖罩防止微孔间发生干扰。初始读数后，在阳性对照微孔中添加 25 微升 2M 盐酸淬灭。阳性对照微孔产生的高信号可在邻近的低信号微孔上引起干扰。

使用 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 进行化学发光成像

在 Tecan Genios 酶标仪上读数后，微孔板用 FluorChem HD 在光圈 II、8 秒曝光时间(sensitivity=54, gain=6.0)条件下成像。如果微孔板没有被 Tecan Genios 酶标仪读出，则捕捉微孔板的第一张图像，阴性对照微孔添加 25 微升 2M 盐酸淬灭。

因为这些微孔发出的光线水平高，超过了来自邻近微孔的信号，所以要求在阳性测试对照微孔中添加终止液。然后获得微孔板的第二张图像，分析第二张图像的结果。结果用 AlphaEase HD 软件定量。

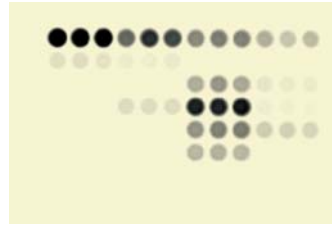


图 3：由 FluorChem HD 产生的微孔板图像

结果

#1 号实验：滴定 NF-κ p50 蛋白

重组 NF-κ p50 蛋白以每孔 150ng 浓度调整到每孔 1ng。每个浓度样品一式三份，Tecan Genios 酶标仪和 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 系统用于评价相对光强度单位。图 3 和 4 显示了 Alph Innotech 公司的 FluoChem HD 系统和 Tecan Genios 酶标仪任意光学单位测量关系，两种仪器能够检测相对低浓度的 NF-κ p50 蛋白（图 3）。图 4 描述光强度测量在 FluoChem HD 系统和 Tecan Genios 酶标仪之间的光强度的关联度（ $r^2=0.9934$ ）。

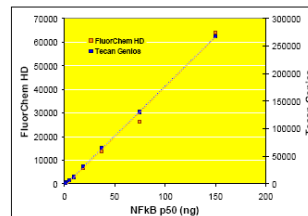


图 3：图示相对光学单位（左 X 轴）（Alpha Innotech 公司的 FluoChem HD 系统）和标准化成 NF-κ p50 蛋白滴定浓度（X 轴）的 Tecan Genios 酶标仪读数（右 Y 轴）

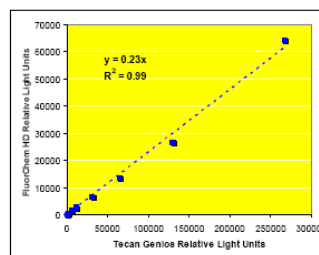


图 4：Alpha Innotech FluorChem HD 成像系统（垂直轴）和

Tecan Genois 酶标仪（水平轴）之间测量的相对光学单位的关联度 $r^2=0.9934$

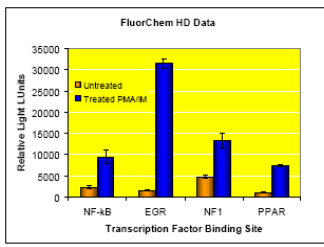


图 5: 使用 FluorChem HD 成像系统采集到的数据。在非受激和 PMA/IM 受激的 HL-60 细胞中测量 NFkB、EGR、PPAR 和 NF1。上述测量在相同微孔板上进行。数据类似于使用如下 Tecan 系统所采集的数据。误差范围代表 \pm 平均标准变异。

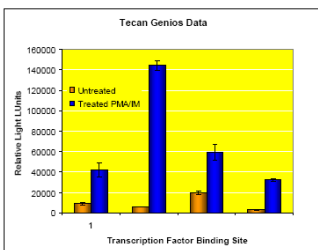


图 6: 使用 Tecan Genois 成像系统采集的数据。在非受激的和 PMA/IM 受激的 HL-60 细胞中测量的 NFkB、EGR、PPAR 和 NF1。测量在相同微孔板上进行。相似于采用如下 FluorChem HD 系统所采集的数据。误差范围代表 \pm 平均标准变异。

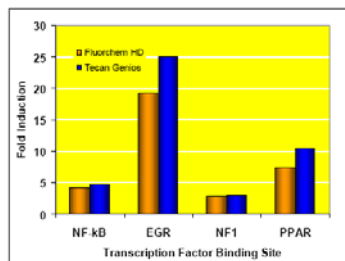


图 7: 作为转录因子丰度的一种量度，在 PMA/IM 刺激的或非受刺激的细胞上采用 Alpha Innotech FluorChem HD 成像系统（图 5）和 Tecan Genois 酶标仪（图 6）获得相对光单位。数值代表每次处理后在一式三份转录因子上获得的平均相对光学单位。测量在相同微孔板上进行。误差范围代表 \pm 平均标准变异。

2 号实验: 检测 NF-k、EGR、NF-1 和 PPAP

以 PMA/IM 处理来刺激，或保持未处理状态的 HL-60 细胞应用多色成像检测，以检测 4 个转录因子的相对数量（NF-k、EGR、NF-1 和 PPAP）。图 5、6 和 7 中描述的数值代表每次用 PMA/IM

处理或不处理的一式三份转录因子中测定的平均相对光学单位量度。使用捕捉微孔或检测微孔板完成全部测量，并标准化成批间变异。PMA/IM 刺激是已知的转录因子向上调节和激活的诱导因素(4)，表示所有 4 种受测因子的转录因子丰度的增加，这由 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 测量(图 5)和 Tecan Genois (图 6) 测量证明了。

这两个仪器之间测量类似性通过在 PMA/IM 刺激细胞中测量的转录因子诱导量级而作进一步评估(图 7)。受激和非受激细胞的转录因子丰度比率，如 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 和 Tecan Genois 所测定的值非常近似。受激细胞产生 4.12 倍的诱导率(NF-kas 由 Alpha Innotech FluorChem HD)，而 Tecan Genois 报告 4.66 倍诱导率。同样地，NF-1 表现 2.85 倍诱导率 (Alpha Innotech FluorChem HD)，而 Tecan Genois 测定为 3.00 倍诱导率。测量的最大分歧在于测定 EGR 的 19.30 倍诱导率 (Alpha Innotech FluorChem HD)，而 Tecan Genois 酶标仪测定为 25.01 倍诱导率。这都归结于可接受的批间变异。

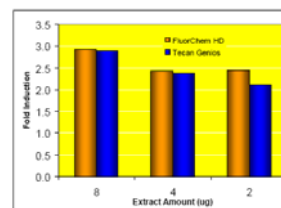


图 8: 在从 PMA/IM 受激或未受激 HL-60 细胞的滴定核酸提取物中, CREB 结合位点丰度的诱导率为 8 倍。诱导率用 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 系统（紫色柱状）和 Tecan Genois 系统（蓝色柱状）测定。

HL-60 细胞重新用 PMA/IM 刺激，或保持不处理状态，如材料和方法一节所描述。将从两种细胞样本总体中得到的 8-2ug 核酸提取物进行滴定处理，评价 CREB 转录因子丰度。CREB 诱导量级由受激和非受激细胞的相对光学单位比率表达，如图 8 所描述。由 FluorChem HD 系统和 Tecan Genois 系统测定的 CREB 丰度倍数诱导率近似地一致。另外，两种仪器的测量证实了这种检测的灵敏度，即在核酸提取物中转录因子结合数量小于 2 微克。这种检测能够在非常小的样品中测量转录因子的活性。当组织提取中源样品有限时，这是一种重要的特色。

讨论

选择灵敏度高、动态范围大和再现水平可接受的一种成像平台对于产生质量高的可靠数据至关重要。微孔板检测要求在标准 96 孔微孔板模式下对大量平行检测样品进行成像和量化。当把在多种凝胶模式上普遍进行的检测样品转移到微孔板检测系

统时，研究者选择一种高度集成的检测系统，而没有选择那种集成困难的系统，则有可能降低成本，改善数据质量。

可以同时在一个 96 孔微孔板上完成多种转录因子评价和多种样品处理，这样就增加了再现性和成本效率。与传统转录因子检测一样，很少有样品材料要求检测呈阳性，在低丰度样品中 96 孔微孔板模式下目的蛋白检测的相关限制条件减少了。检测罕有转录差异的能力无论与样品数量或生物学丰度有关或无关，都保证研究者能完成以前不可能完成的研究。另外，成像系统和检测之间的灵敏度对于数据的成功收集也是至关重要。FluorChem HD 系统结合了以量子效率加强的真正 16 位相机，因此灵敏度高并支持化学发光成像（图 9）。

从微孔板亮度计 (Tecan Genios™) 和 FluorChem® HD 系统 (Alpha Innotech) 获得的结果证明生物成像系统能够采用多个转录因子基本效价测定工具 (Alpha Innotech)，测定提取于培养细胞的核酸提取物中的转录因子的 DNA 结合活性，从而获取高质量数据。图 1 至图 9 的信号水平与转录因子在每个核酸提取物中的样品数量相关联。该数据清楚地表明基于 CCD 成像系统可以提供灵活的微孔板成像仪替代方案，从而检测化学发光测试和量化测试结果。FluorChem® HD 系统附带的捕捉标

参考资料

1. Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1981. Dec 11 ;9(23): 6505-25.
2. Shen RF, Li Y, Sifers RN, Wang H, Hardick C, Tsai SY, Woo SL. Tissue-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene is controlled by multiple cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 1987. Oct 26; 15(20):8399-415.
3. Kumagai N, Benedict SH, Mills GB, Gelfand EW Requirements for the simultaneous presence of phorbol esters and calcium ionophores in the expression of human T lymphocyte proliferation-related genes. *J. Immunol.* 1987. Sep 1;139(5):1393-9.
4. Gallagher R , et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. 1979. *Blood* 54: 713-33.
5. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 1983. Mar 11;11(5):1475-89.



FluorChem®生物成像系统家族转为化学发光、荧光和可见光成像应用而设计。FluorChem®系列产品结合灵敏度、分辨率和动态范围为客户提供基于凝胶、膜和微孔板检测的优质图像处理功能。

准凝胶图像性能显著地提高了该系统在典型实验室环境中的多种用途。

尽管微孔板成像系统受到单一平台和功能的局限，但类似 Alpha Innotech 公司的 FluorChem HD 成像仪的成像系统在保持高水平的完整数据的同时，在实验设计和平台检测方面也非常灵活。包括由 FluorChem® HD 和 96 孔设计构成的功能强大而灵敏的转录分析方案在内的整合的筛选平台，使研究人员在多重检测的模式下能够定量分析转录因子的 DNA 相互作用。

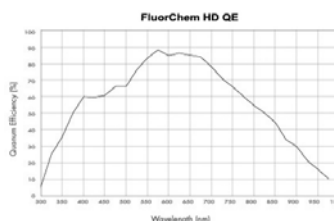


图 9: 量子效率和在 FluorChem® HD 仪器中检测器波长的图示。FluorChem® HD 是能够以高灵敏度对样品进行成像的真正的 16bit 成像系统。