

# 原核生物转录调控研究技术及进展

陈臣 黄芝阳 于海燕 袁海彬 田怀香

(上海应用技术大学香料香精技术与工程学院, 上海 201418)

**摘要:** 原核生物基因表达调控主要发生在转录水平, 研究原核生物的转录调控有利于了解其基因表达调节机制。近年来, 随着分子生物学及相关技术的突破, 转录调控研究技术也不断发展, 因此主要综述了原核生物转录调控的技术方法及其新进展, 包括凝胶电泳迁移率实验、DNase I 足迹技术、染色质免疫共沉淀技术、微量热泳动技术、等温滴定量热法及细菌单杂交系统, 以期系统地了解这些方法的优缺点和适用性, 帮助研究者更好的利用原核生物转录调控为人类造福。

**关键词:** 转录调控; 相互作用; 启动子; 转录因子; 转录因子结合位点

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1384

## Research Technology and Progress in Transcriptional Regulation in Prokaryotes

CHEN Chen HUANG Zhi-yang YU Hai-yan YUAN Hai-bin TIAN Huai-xiang

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418)

**Abstract:** The regulation of gene expression in prokaryotes mainly occurs at the transcriptional level. Knowledge on the regulation of transcription in prokaryotes is conducive to understanding the mechanism of gene expression regulation. In recent years, with the breakthrough of molecular biology and related technologies, the research technology of transcriptional regulation has also been continuously developed. The technical methods and new developments of prokaryotic transcriptional regulation are reviewed in the present study, including electrophoretic mobility shift assay, DNase I footprinting technology, chromatin immunoprecipitation technology, microthermophoresis technology, isothermal titration calorimetry and bacterial one hybrid system, aiming to systematically understand the advantages/disadvantages and suitability of these methods, help researchers to better use the transcriptional regulation of prokaryotes for bringing great benefits to human life.

**Key words:** transcriptional regulation; interaction; promoter; transcription factor; transcription factor binding site

继 Francois Jacob 和 Jacques Monod 在操纵子学说中提出基因转录调控的概念之后, 科学家开始意识到转录调控在原核生物调控中的重要性。1995 年实现了第一个原核生物的全基因组测序<sup>[1]</sup>, 随着测序技术不断地进步, 大量完整的基因组序列快速出现<sup>[2-3]</sup>, 尤其是人类基因组计划的顺利进行, 使得研究的焦点由结构基因组学过渡为功能基因组学<sup>[4]</sup>, 而基因转录调控正是功能基因组学的一个重要内容。

基因的调控可在多个层次上进行, 包括基因水平、转录水平、转录后水平、翻译水平和翻译后水平的调控。与真核生物相比, 原核生物的调控主要发生在转录水平, 根据调控机制的不同可分为负转录调控和正转录调控。由于调控的关键步骤主要是在启动子的转录阶段, 所以对启动子和转录进行研究具有重要的意义。启动子附近存在一段特定序列能够结合称为转录因子 (transcription factors, TFs)

收稿日期: 2021-11-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972197)

作者简介: 陈臣, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术、食品风味; E-mail: chenchen@sit.edu.cn

通讯作者: 田怀香, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味化学; E-mail: tianhx@sit.edu.cn

的蛋白质,结合 RNA 聚合酶并由此起始基因转录<sup>[5]</sup>,转录因子在调节细菌中的基因表达方面起核心作用,它通过与位于启动子区的结合位点(transcription factor binding sites, TFBSs)相结合,从而激活或抑制相应基因的转录。历史上,研究最多的转录因子之一是大肠杆菌(*Escherichia coli*)的乳糖阻遏蛋白<sup>[6]</sup>。近年来,在解析微生物生理功能或某些功能成分生物合成研究中的转录因子不断被挖掘,转录因子与结合位点及其调控方式已经成为研究的热点。大量研究表明,找到这些特定的片段和位点对于研究基因的转录调控有重要的意义,有助于进一步揭开蛋白质与核酸相互作用的规律,了解原核生物的基因转录调控机制。随着分子生物学及相关技术研究不断发展与完善,一些新的方法应运而生,为阐明原核生物的基因调控提供了有力的工具。通过改造原核生物的转录调控网络,调整代谢流向构建高效的

细胞工厂,更好发挥原核生物作为生产宿主的优势,对于突破传统代谢工程方法改变细胞表型及提高目标化合物产量等方面具有广阔的前景<sup>[7]</sup>。

本文主要综述了有关原核生物转录调控中核酸-蛋白质相互作用现有的一些研究技术,包括凝胶电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)、DNase I footprinting 技术、染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术、微量热泳动技术(MicroScale Thermophoresis, MST)、等温滴定定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)及细菌单杂交系统(bacterial-one-hybrid system, B1H),分别从6种方法的原理、应用和优缺点等方面进行介绍(表1),并展望了未来的研究热点,为进一步阐明原核生物的基因调控提供借鉴。

表1 原核生物转录调控研究技术总结

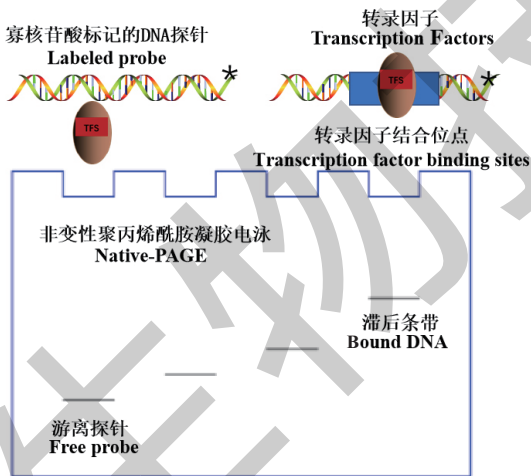
Table 1 Summary of research techniques on transcriptional regulation in prokaryotes

研究技术 Method	英文名称/缩写 Name/Abbreviation	优缺点 Advantages/Disadvantages	适用性 Applicability	参考文献 Reference
体外 方法	凝胶电泳迁移率 实验 EMSA	方法简单、灵敏度高,放射性标记探针安全性低成本高,电泳运行条件下蛋白质-DNA 复合体不稳定	适用于验证转录因子与假定 DNA 结合位点直接相互作用及结合位点突变对结合作用的影响	[8-9]
	等温滴定定量热法 ITC	蛋白质无需固定化或修饰,样品消耗量少,可区分结合常数相近的配体相互作用及比较结构与结合作用的关系,对温度适应范围广但难以解释复杂系统中的相互作用	适用于成分简单的超高/超低亲和力和力相互作用系统及复杂的相互作用,可获得丰富的热力学信息	[10-12]
	DNase I footprinting 技术	分辨率高、可区分同一 DNA 片段多个不连续结合位点,但需要较多蛋白质才能产生清晰足迹,易产生超敏位点受到切割	适用于未纯化蛋白样品的检测,判断同一片段是否存在多个结合位点获得结合序列及比较各自亲和力和力	[13]
	微量热泳动技术 MST	对相互作用的分子大小或质量无选择性,具有较好的适用性,对结合亲和力和力准确测定,可检测低至 pM 级别的结合亲和力和力,可在溶液环境中进行,无需固定分子避免结合假阳性	适用于结合亲和力和力弱,样品量小,样品所处环境复杂的情况	[14]
体内 方法	染色质-免疫共 沉淀技术 ChIP	接近细胞内真实情况,可研究转录因子对启动子结合的动态过程,但实验重复性不佳,获得良好实验结果对经验依赖性较高,对实验环境的要求严格	适用于确定转录因子修饰位置及低丰度转录因子结合分析	[15]
	细菌单杂交 B1H	细菌转化效率高构建文库质粒容量更大,无需复杂的仪器,转录因子需要能在大肠杆菌中表达,可能存在假阳性和假阴性的情况,结果需要进一步验证	适用于未纯化蛋白样品的检测,缺少相应仪器,用分子生物学手段进行筛选,转录因子要求能在大肠杆菌中表达,可发现新的转录因子	[16]

## 1 凝胶电泳迁移率实验 (EMSA)

### 1.1 EMSA基本原理

EMSA 是一种在体外研究蛋白质与核酸相互作用的简单、廉价、快速而灵敏的技术, 它可实现对目的蛋白与核酸作用的定性和定量分析<sup>[8, 17]</sup>, 此外, 还可用于热力学和动力学参数的定量测量以及构象变化的分析<sup>[18]</sup>。EMSA 的作用原理为(图 1): 通常是将寡核苷酸标记的 DNA 或 RNA 探针与 DNA 特异结合蛋白或 RNA 一同孵育, 随后通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE) 分离蛋白质-核酸复合物与游离的探针。由于目的蛋白与核酸探针结合后分子量增大, 故其电泳迁移率会降低, 在凝胶中将会看到阻滞的条带<sup>[17]</sup>。其电泳迁移率是生物分子的固有物理性质, 与生物大分子大小、电荷和分离介质的粘度有关<sup>[19]</sup>。根据所显示滞后带的有无和量的多少, 来反映 DNA 结合蛋白与 DNA 探针的结合活性和特异性, 并可以计算出两者的结合常数或解离常数。



星号表示标记的探针, TFs 表示转录因子, TFBS 表示转录因子结合位点  
Asterisks indicate labeled probes, TFs indicate transcription factors, and TFBS indicate transcription factor binding sites

图 1 EMSA 实验的基本原理

Fig. 1 Basic principle of EMSA experiment

### 1.2 EMSA 鉴定转录调控因子-结合位点直接相互作用及适用性分析

EMSA 实验有许多优点, 传统的 EMSA 实验一

般采用放射性同位素 ( $^{32}\text{P}$ ) 标记核酸探针, 其基本操作技术简单, 灵敏度高, 研究表明, 即使待测样品的浓度  $\leq 0.1 \text{ nmol/L}$ , 样品的体积  $\leq 20 \mu\text{L}$  也可进行测定<sup>[8]</sup>。但是同位素的半衰期短, 实验周期长, 对人体及环境均会产生危害且处理成本高<sup>[20]</sup>。因此许多研究者对该方法进行了改进, 出现了采用生物素或地高辛标记的核酸探针代替传统的放射性同位素标记的探针, 利用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶化学发光检测系统检测<sup>[21]</sup>。例如葛兴枫等<sup>[22]</sup>利用经蛋白酶 K 消化步骤优化的生物素标记的 EMSA 方法, 也可明显观察到核酸适配体与靶蛋白结合的阻滞条带, 与同位素标记的 EMSA 实验无明显差异。此外这两种方法安全、成本低且检测时间短。然而 Vavrova 等<sup>[20]</sup>研究表明, 网织红细胞系统体外翻译蛋白质不适用于非放射性 EMSA, 因为网织红细胞裂解物中存在干扰的生物素化蛋白质; Tokunaga 等<sup>[23]</sup>也发现在使用地高辛标记的探针检测转录因子的过程中阴性对照实验存在相当大的非特异性变化带的问题, 影响目标蛋白的检测。另一个限制因素是电泳过程中蛋白质与核酸的复合物处于非化学平衡状态, 转录因子的结合作用可能被减弱, 同时某些络合物在凝胶中的稳定性显著高于溶液环境, 使得转录因子与 DNA 的亲合力检测结果偏低, 或是 EMSA 实验对某些相互作用分子的研究效果不佳<sup>[8, 24]</sup>。

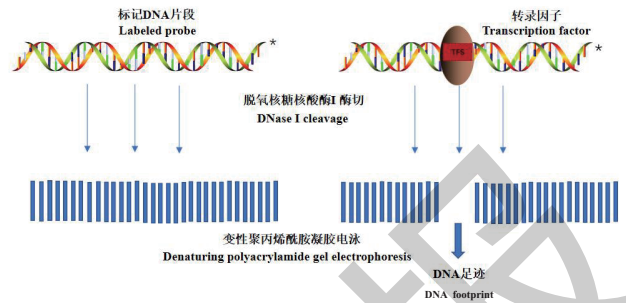
EMSA 实验的主要应用之一是鉴定转录因子与 DNA 结合蛋白的作用位点, Brown 等<sup>[25]</sup>在研究德氏乳杆菌乳酸亚种 CRL581 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581) 中与蛋白水解系统相关的基因时, 通过 EMSA 实验发现 YebC 与蛋白水解酶系统相关基因 *priL*、*oppA1* 和 *opts* 启动子区域结合, 表明 YebC 是关键蛋白水解酶基因的转录调控因子。王丽滨<sup>[26]</sup>利用 EMSA 实验验证了碳代谢调控蛋白 A (catabolite control protein A, CcpA) 与肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 荚膜多糖基因座转录调控区域的结合, 为研究肺炎链球菌的致病机理及防治提供了理论依据。本课题组研究植物乳杆菌 CcpA 对碳分解代谢抑制作用 (carbon catabolite repression, CCR) 的调控作用时, 通过 EMSA 证实 CcpA 与分解代谢反应元件 (catabolite responsive element, cre) 位点的结合<sup>[27]</sup>。

EMSA 是一项较为成熟的研究 DNA-蛋白质相互作用的技术,可获得蛋白质-核酸相互作用的亲和力、特异性、动力学特性及最小结合位点。EMSA 的优点是可以分析与核酸结合的多个蛋白质或蛋白质复合物,但 EMSA 在体外进行实验不能精确揭示体内蛋白质-DNA 的相互作用,转录因子需要通过硫酸铵分步沉淀、凝胶过滤层析、离子交换层析等技术进行一定程度的纯化,增加了实验操作的复杂性。此外有许多变量只能通过经验确定,要根据具体相互作用的物质调整反应条件和凝胶运行条件,核酸靶标、结合反应的条件以及凝胶电泳的条件是实验优化主要考虑的因素<sup>[28]</sup>。

## 2 DNase I footprinting 技术

### 2.1 DNase I footprinting 基本原理

DNase I footprinting 技术是用于体外研究蛋白质与 DNA 结合位点的方法。它的原理是(图 2):首先对待测双链 DNA 片段中一条链的一端选择性地标记,再加入适当浓度的脱氧核糖核酸酶 I (DNase I),在 DNA 双链上形成缺口,经过变性后聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,放射自显影,即形成以相差一个核苷酸为梯度的 DNA 条带<sup>[29]</sup>。但当 DNA 片段与相应的序列特异性 DNA 结合蛋白结合后, DNA 结合蛋白可局部抑制 DNase I 对相应 DNA 片段的消化,因此在放射自显影图谱上, DNA 梯度条带在结合区域中断,从而形成一空白区域,恰似蛋白质在 DNA 片段上留下的足迹,根据其放射自显影呈现的结果把这种研究 DNA-蛋白质特异性结合的方法形象地称为足迹法。如果要得出与目的蛋白特异性结合的碱基序列,可以进一步对 DNA 进行测序。经过 40 余年的发展 DNase I footprinting 技术不断得到完善,包括:(1)对双链 DNA 片段其中一条链进行标记时采用生物素进行末端标记,避免放射性同位素的掺入,减少危害;(2)可利用固定相磁珠对传统 DNase I footprinting 技术进行改进,在获取特异性 DNA 结合蛋白时省略了硫酸铵分步沉淀、离子交换层析、凝胶过滤层析等蛋白纯化步骤,可适用于未经纯化的蛋白粗提物内特异性 DNA 结合蛋白的研究,与传统方法相比具有操作简便、效率高、使用范围更广泛等显著优势<sup>[30]</sup>。



对 DNA 片段中的一条链进行标记,加入适当浓度脱氧核糖核酸酶 I (DNase I),与目的蛋白结合的 DNA 基序不被 DNase I 水解,经过对比未结合目的蛋白 DNA 片段的放射自显影图谱可得到中断的 DNA 梯度条带。Adding appropriate concentration of deoxyribonuclease I (DNase I) to label strand in the DNA fragment, the DNA motif bound to the target protein will not be hydrolyzed by DNase I. After comparing the autoradiograph of the DNA fragment not bound to the target protein, interrupted DNA gradient bands can be obtained.

图 2 DNase I footprinting 技术基本原理

Fig. 2 Basic principle of DNase I footprint technology

### 2.2 DNase I footprinting 获取结合位点及适用性分析

DNase I footprinting 技术在研究生物体转录调控中有广泛的应用,常用来得到对某个确定基因具有调控作用的调控因子在基因组上的结合位点。Gong 等<sup>[31]</sup>研究短链乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) GlnR 对谷氨酸依赖的耐受性的调节作用,为确定 *GadR* 基因和 *gadCB* 操纵子的 GlnR 结合位点,用 6-羧基荧光素 (6-FAM) 标记的 DNA 片段进行 DNase I footprinting 分析发现了  $P_{gadR}$  和  $P_{gadCB}$  分别和 GlnR 的结合序列。Ihara 等<sup>[32]</sup>研究大肠杆菌在 L-丙氨酸积累后,编码一种 L-丙氨酸输出蛋白的 *alaE* 基因的表达受到氮代谢全局调控因子亮氨酸反应调节蛋白 (LRP) 的正向调控,为进一步识别 LRP 的结合位点采用了 DNase I footprinting 技术找出 LRP 与 *alaE* 上游区域 -161--83 bp 的核苷酸序列结合。较多情况下转录因子与受到调控作用的基因存在多个结合位点, DNase I footprinting 技术能找出位于同一片段不连续的结合位点并获得各自的结合序列。Yang 等<sup>[33]</sup>研究植物乳杆菌 (*Lactobacillus pl-antarum*) 在高浓度乙醇环境下的强适应性发现调节因子 AcrR 与编码 3-羟基酰基-ACP 脱水酶 (*FabZ1*) 基因的启动子  $P_{FabZ1}$  结合调控 *FabZ1* 的转录表达,利用 DNase I footprinting 技术获得  $P_{FabZ1}$  上两个特异的 AcrR 结合

位点。

与其他转录调控研究技术相比, DNase I footprinting 技术不仅证实了 DNA 序列与目标蛋白质特异性结合, 还可以得出调控因子与 DNA 调控元件特异性结合的 DNA 序列, 为研究生物体转录调控网络提供了极大的便利。DNase I footprinting 也可用于研究 EMSA 技术表现不佳的转录因子, 例如一种相对低亲和力的 DNA 结合蛋白 xUBF 在 DNase I footprinting 分析中取得比 EMSA 更好的效果<sup>[13]</sup>。但在进行 DNase I footprinting 分析时要有足够多的蛋白质才能产生清晰的足迹, 而蛋白质含量增加要求 DNase I 浓度也要相应升高, 由于 DNase I 本身是一种蛋白, 也可竞争结合在相应的位点干扰蛋白质结合靶基因出现假阳性影响实验结果准确性, 所以实验前必须仔细滴定 DNase I 浓度<sup>[34]</sup>。

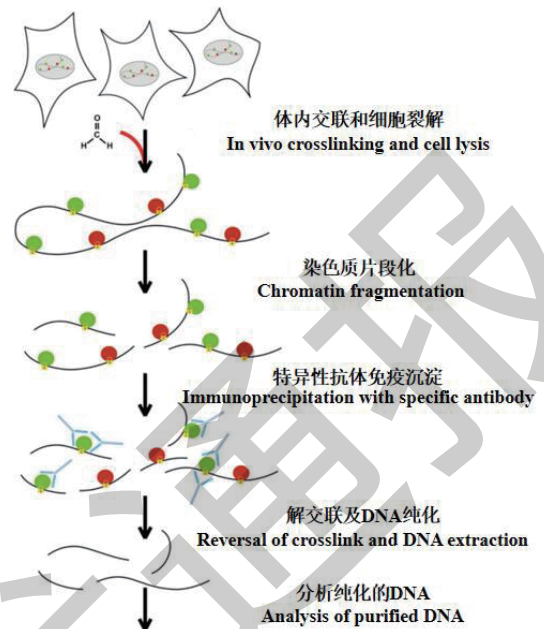
### 3 染色质 - 免疫共沉淀技术 (ChIP)

#### 3.1 ChIP基本原理

ChIP 技术是研究蛋白质和基因组 DNA 特定区域相互作用一种有效的方法<sup>[35]</sup>, 是用于评估蛋白质与体内特定 DNA 区域结合的多用途技术。1993 年, 在果蝇的培养细胞中, Polycomb 阻遏蛋白是第一个使用 ChIP 技术进行定位的蛋白质, 为了解其生物学功能奠定基础<sup>[36]</sup>。ChIP 技术是一个多步骤的过程, 每个步骤都需要标准化以获得最佳结果。其作用原理为 (图 3)<sup>[37]</sup>: 通常是在生理状态下将细胞内的 DNA 与蛋白质交联在一起<sup>[37]</sup>, 通过机械或酶消化将染色质碎片化后, 用目的蛋白的特异性抗体免疫沉淀富集 DNA- 蛋白质交联复合体<sup>[38]</sup>, 只有与目的蛋白结合的 DNA 才能被沉淀下来, 获得目的蛋白结合的 DNA 后, 通过 PCR、芯片和测序技术等, 以定量检测特定的 DNA 靶标<sup>[15]</sup>。ChIP 技术可用于分析转录因子、转录辅因子、DNA 复制因子和 DNA 修复蛋白的结合<sup>[39]</sup>, 是研究细胞内蛋白质 -DNA 相互作用的重要技术。

#### 3.2 ChIP筛选结合位点及适用性分析

最初, ChIP 技术用于研究高乙酰化组蛋白与特定 DNA 序列的结合, 以进一步了解组蛋白乙酰化在转录中的作用<sup>[40]</sup>。近年来, 为确定转录因子在基因组内的结合位点并监测其分布的动态变化, 开发了



在体内通过交联剂将目的蛋白与 DNA 交联, 再将交联得到的染色质复合物片段化处理, 通过目的蛋白特异性抗体沉淀富集目的蛋白结合的 DNA 片段, 对复合物解交联、纯化并分析 DNA 产物

Cross-link the target protein with DNA *in vivo* through a cross-linking agent, and then fragment the DNA and protein complex. After that, precipitate with the specific antibody of the target protein to enrich the DNA fragments bound to the target protein. Reversal of crosslink and DNA extraction, finally analysis of purified DNA

图 3 ChIP 实验的基本原理

Fig. 3 Basic principle of ChIP experiment

与芯片杂交结合的染色质免疫沉淀技术 (ChIP-chip), 并且已经被广泛应用于鉴定真核生物基因组上 DNA 结合蛋白的位置<sup>[41]</sup>, 研究表明此方法也可用于原核生物。Ratib 等<sup>[42]</sup>利用 ChIP-chip 技术先在体内交联 DNA- 蛋白质复合物再与基因芯片杂交检测到 ChvI 蛋白除 EMSA 实验获得的其他结合位点, 通过 ChIP-chip 技术获得了较其他体外检测方法更多的与 ChvI 蛋白直接结合的靶基因。Yun 等<sup>[43]</sup>利用 ChIP-chip 技术筛选恶臭假单胞菌 KT2440 (*Pseudomonas putida* KT2440) 基因组中调控因子 Pmr、TurA 和 TurB 的结合区域。

ChIP 与高通量测序相结合 (ChIP-seq) 是体内蛋白质 -DNA 相互作用的全基因组分析的有力工具。基本原理是先获得与转录调控因子特异性结合的 DNA 片段, 再通过测序技术确定其基因序列。近年来, ChIP-seq 逐渐超越了 ChIP-chip, 越来越多地

应用于转录调控研究中。Shao 等<sup>[44]</sup>在研究囊性纤维化患者的条件致病铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 内一种全局调控因子 RpoN 对铜绿假单胞菌一组毒力因子和群体感应基因的作用, 利用 ChIP-seq 鉴定了 RpoN 的 1 068 个结合位点, 并通过 EMSA 等技术证实它们之间存在特异性结合作用。2012 年, Bard 等<sup>[45]</sup>通过分析转录因子 EVI1 靶向序列的特征, 发现在 EVI1 的 ChIP-seq 峰附近常常伴随有低聚果糖结合位点, 并通过 ChIP-seq 和芯片技术证实 FOS 是 EVI1 的相互作用分子。本课题组通过 ChIP-seq 技术证实两个调控植物乳杆菌中 FOS 代谢的基因簇的预测启动子区域存在 6 个潜在的 CcpA 结合 cre 位点, 揭示了依赖 CcpA 的 CCR 作用调节 FOS 代谢的调控网络<sup>[27]</sup>。

ChIP 技术是研究 DNA-蛋白质互作的常用技术, 具有特异性较强且 DNA 富集效率高的特点。从研究目的来说, 更多情况下研究者希望得到真实反映在相应生理条件下转录因子与 DNA 的结合情况, 作为一种体内研究方法 ChIP 技术则能很好满足这一需求。但 ChIP 技术也相对考验操作经验, ChIP 技术对染色质片段的长度以及实验中其他影响因素有较高要求, 如以甲醛为交联剂时影响转录因子的分布情况, 使用交联剂时需要注意交联剂浓度和交联时间、优化超声破碎参数使染色质的破碎片段长度在一定范围、需要选择合适的抗体等, 结果分析时也需要格外注意, 与目的蛋白结合的其他蛋白质也会与 DNA 结合影响实验结果<sup>[46]</sup>。

## 4 微量热泳动技术 (MST)

### 4.1 MST基本原理

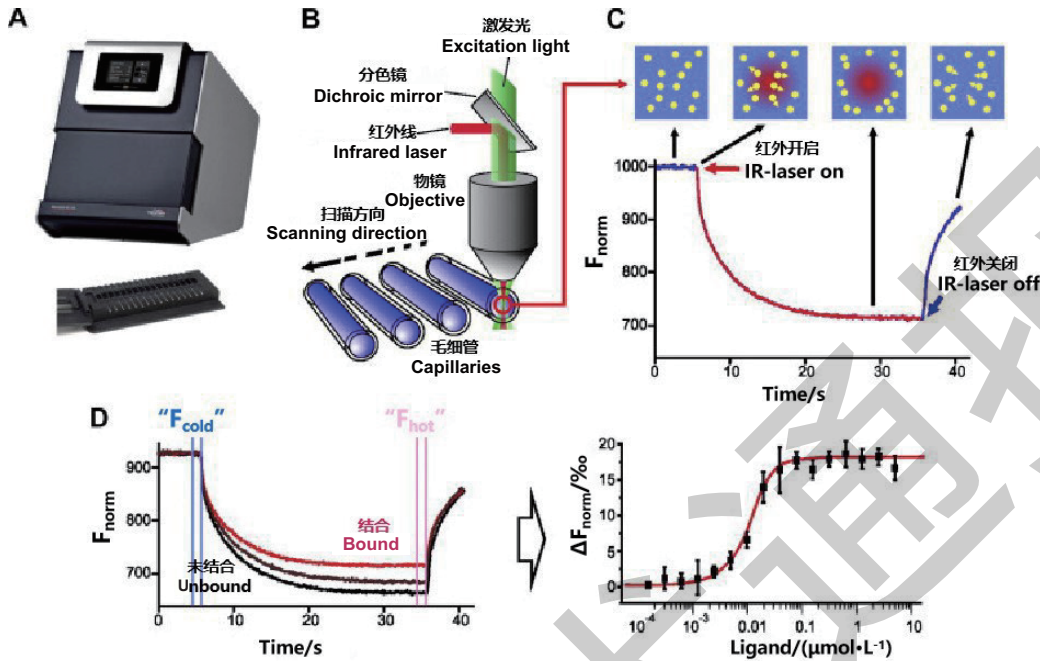
MST 是一种基于荧光检测的优势, 与热泳动相结合, 能快速、精确量化微升溶液中生物分子相互作用的方法。这项技术的基础是一种称为热泳的物理效应, 它描述了分子通过温度梯度的定向运动。分子的热泳特性取决于其大小、电荷和水化层<sup>[47]</sup>。其作用原理为 (图 4)<sup>[48]</sup>: 运行 MST 实验时, 红外激光瞬间加热生成一个微观温度梯度场, 通过共价结合的荧光染料、荧光融合蛋白或蛋白自身色氨酸荧光来监测并定量分析分子的定向移动<sup>[49]</sup>, 以检测

相互作用的生物分子间的亲和性。简而言之, 其中一种分子用荧光染料标记并保持恒定的浓度, 另一种分子被稀释至适宜的倍数, 建立等浓度梯度稀释系列, 以此产生大量浓度范围, 随后将这两种分子混合并加载到用以扫描的毛细管中, 样品经温度梯度, 荧光探测器跟踪荧光标记分子的运动。分子在初始温度和新温度下的荧光差异产生未标记分子的结合曲线<sup>[50]</sup>。另外, MST 还可以进行分子间竞争结合测定、多结合配体的测定、稳定性测定和筛选测定, 获取化学计量和热力学参数等<sup>[51]</sup>。

### 4.2 MST定量分析结合相互作用及适用性分析

近年来, MST 成功地用于分析各种生物分子相互作用, 如寡核苷酸相互作用<sup>[52]</sup>、蛋白质-DNA 相互作用<sup>[53]</sup>、蛋白质-小分子蛋白质相互作用和蛋白质-脂质相互作用<sup>[54-55]</sup>。在蛋白质与 DNA 的相互作用研究中, Papageorgiou 等<sup>[56]</sup>用 MST 方法检测嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 组蛋白类 DNA 结合蛋白 HUT<sub>h</sub> 与 *pUC18* 质粒 DNA 的相互作用, 测得了 HUT<sub>h</sub> 与 *pUC18* 结合的解离常数, 并在相同实验条件下测定了另外两个 HU 蛋白与 *pUC18* 的亲合力得出了 HU 蛋白与 DNA 分子结合的化学计量比, 发现 MST 方法重复性好。MST 技术提供了方便的数据分析系统, 根据实验的需要配置了多种曲线拟合的选项, 在数据采集的动态过程中即可分析数据<sup>[47]</sup>。而且 MST 技术在几乎任何的溶液环境都适用, 使某些复杂体系如细胞裂解液中相互作用分子的测量更加简便<sup>[57]</sup>。

MST 技术的优势是快速、灵敏、所需样品量少、对研究对象并无特殊的选择性、无相互作用分子质量和大小以及相互作用后尺寸变化较大等要求<sup>[14]</sup>, 同时由于 MST 的检测过程是在溶液中进行所以该技术提供了接近自然状态的检测方法<sup>[58]</sup>, 并且利用检测仪器分析软件得出 MST 结合曲线并进行数据分析可以方便得出配体分子是否结合、结合位点数量及亲和力等信息<sup>[59]</sup>。因此 MST 技术已广泛用于生命科学研究的诸多方面。但是, MST 也存在一定的局限性, 比如仪器价格昂贵、不能直接确定具体的结合位点等。



A: 荧光探测器; B: MST 光学元件示意图; C: MST 实验信号曲线; D: MST 结合实验

A: Fluorescence detector. B: MST optical element schematic diagram. C: MST experiment signal curve. D: MST combination experiment

图 4 MST 实验的基本原理

Fig. 4 Basic principle of MST experiment

## 5 等温滴定热法 (ITC)

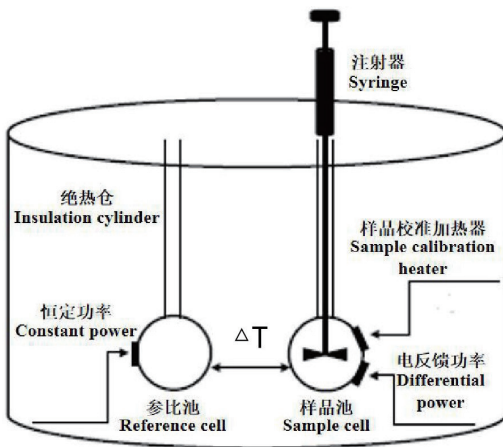
### 5.1 ITC基本原理

ITC 是一种广泛用于研究分子间结合相互作用的方法, ITC 实验的主要数据是热分析图, 图中记录了绝热的对照池和样品池之间保持恒定的温差所需的时间进程。其原理为(图 5)<sup>[10]</sup>将已知浓度的反应物滴定到样品中, 每次样品的注入都会引起样品池中溶液成分的变化, 并且在其反应达到新的平衡期间, 系统将记录反应热并形成相应的峰, 每个峰的面积表示在样品与样品池中组分反应时产生或消耗的总热量。例如, 在模拟整合加热的等温线之后, 可以得到反应焓变、结合亲和力和结合化学计量等信息<sup>[60]</sup>。

### 5.2 ITC 研究结合作用模式及适用性分析

在过去的几十年里, ITC 已经被应用到众多的系统中。这些研究大多集中于分子间的相互作用, 如蛋白质之间、蛋白质与小配体之间、DNA 与其他大分子系统之间以及酶动力学中<sup>[61]</sup>。在原核生

物的转录调控研究中, Zhuo 等<sup>[62]</sup>研究黄色粘球菌 DK1622 (*Myxococcus xanthus* DK1622) *groELs* 差异性表达的转录调控网络, 通过 ITC 技术用 DNA 滴定粘球菌 DK1622 的 HrcA 蛋白, 分析 HrcA 蛋白和分子伴侣表达反向重复序列 (controlling inverted repeat of chaperone expression, CIRCE) 之间的相互作用, 发现 HrcA 蛋白不能与 CIRCE<sub>2<sup>groESL1</sup></sub> 元件结合, 而倾向于与 CIRCE<sub>1<sup>groESL1</sup></sub> 结合, 其次是 CIRCE<sub>groEL2</sub>。2014 年, Wang 等<sup>[63]</sup>通过该方法对一些调控因子与启动子的结合参数进行了详细的表征, 另外还对调控因子结合效应物小分子的相关参数进行了分析, 展示了外源抗生素 JdB 对天蓝色链霉菌 ScbR2 (*Streptomyces coelicolor* ScbR2) 的结合情况, 数据表明它们近似 1:1 结合, 取得了较好的研究效果。虽然 ITC 技术可应用于多种系统相互作用的研究, 但传统的 ITC 技术直接滴定的方法难以用于超高 ( $K_a > 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) / 超低 ( $K_a < 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) 亲和力系统的测定, 利用与目标分子具有较弱亲和作用的竞争性配体采取置换滴定



已知浓度的反应物滴定到样品中引起样品池中组分之间反应吸热或放热，温度补偿系统使样品池与参比池之间维持恒定的温差，通过记录数据模拟整合加热的等温线之后，可以得到反应焓变、结合亲和力和结合化学计量等信息

The titration of reactants of known concentration into the sample causes the reaction between the components in the sample cell to be endothermic or exothermic. The temperature compensation system maintains a constant temperature difference between the sample cell and the reference cell, and the data are recorded to simulate the integrated heating isotherm. After that, information about the reaction enthalpy change, binding affinity and binding stoichiometry can be obtained.

图5 ITC 实验的基本原理

Fig. 5 Basic principle of ITC experiment

的方式，可获得准确的热力学信息，提高该方法的适用性<sup>[11-12]</sup>。ITC 技术还可更进一步研究转录调控因子的某一结构域与 DNA 序列的关系，得出结合亲和力的具体信息、反应焓变和熵等参数可帮助研究相互作用分子之间的结合模式，为更深入研究转录调控因子提供了丰富的信息<sup>[64]</sup>。

ITC 在分子相互作用研究方面有两大优势。首先，ITC 主要应用于天然蛋白，不需要对其进行修饰；其次，ITC 提供了丰富的热力学信息，包括焓值、熵值和热容量等。因此，该技术提供的丰富的信息常用来推断分子间相互作用反应机制，例如结合位点的数目、不同构象反应物滴定的热力学差异等<sup>[65]</sup>。然而，传统的 ITC 也存在局限性，其分析受到随机热谱图噪声影响，且单个滴定实验信息量有限。因此，Brautigam 等<sup>[66]</sup>提出一个基于自动形状分析注射峰的无偏差热成像积分的方案，然后将来自不同量热滴定实验的等温线组合进行全局分析，并将结合参数的统计分析结果以图形直观地表示。

## 6 细菌单杂交系统 (bacterial-one-hybrid system)

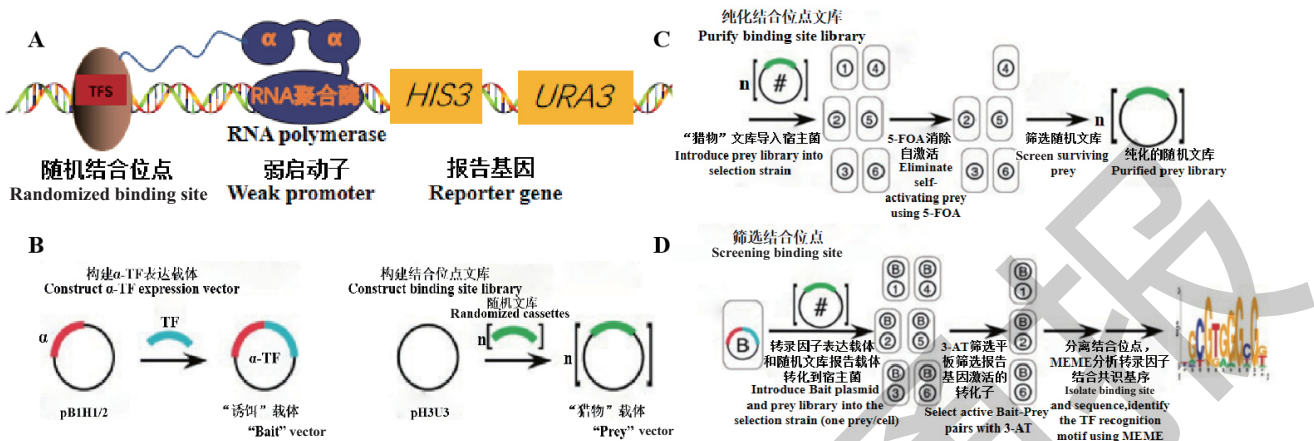
### 6.1 细菌单杂交系统基本原理

细菌单杂交系统是一种在体内研究转录因子和目的基因相互作用的研究技术，该技术是在酵母单杂交和细菌双杂交技术的基础上发展而来。细菌单杂交系统的原理是转录因子与 RNA 聚合酶的  $\alpha$  亚基融合表达，识别随机文库载体上的 DNA 片段并与其结合，使 RNA 聚合酶聚集到报告基因上游弱启动子区域，激活报告基因 *his3* 和 *ura3* 表达 (图 6)<sup>[67]</sup>。该系统包括 3 个组成部分：转录因子表达载体、结合随机位点文库的报告载体和营养缺陷型宿主菌<sup>[68]</sup>。转录因子与启动子区域结合激活报告基因 *his3* 和 *ura3*，有利于组氨酸和尿嘧啶合成，转录因子表达载体和随机文库报告载体转化到营养缺陷型宿主菌中使其在含有一定浓度 3-氨基-1, 2, 4-三唑 (3-AT) 的缺乏组氨酸和尿嘧啶筛选平板上生长，筛选出与转录因子相互作用的 DNA 片段。

### 6.2 细菌单杂交筛选转录调控因子及适用性分析

细菌单杂交系统在研究蛋白质-DNA 相互作用方面得到了广泛的应用，如 Hebdon 等<sup>[69]</sup>利用细菌单杂交系统筛选了艰难梭状芽孢杆菌 R20291 (*Clostridioides difficile* R20291) 反应调节因子 RR\_1586 的可能调控靶点，并利用 EMSA 验证了 RR\_1586 与该段基因序列的结合，证实了 RR\_1586 结合位点位于可能的靶基因上游。Zhai 等<sup>[70]</sup>发现保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 在酸胁迫条件下预测的转录调控因子 Ldb0677 表达上调 1.84 倍，用细菌单杂交和 EMSA 测定了 Ldb0677 的 DNA 结合特异性，表明它可能是保加利亚乳杆菌酸胁迫反应的主要调节因子。对于基因转录调控研究，建立有关物种的转录调控因子数据库，包括已经证实的转录因子、全基因组结合位点、位置权重矩阵 (position frequency matrix, PFM) 等信息，对快速构建相关的转录调控网络有很大帮助，细菌单杂交系统因其较高的转化效率被用于建立转录因子特异性结合数据库<sup>[71]</sup>。

与 EMSA 相比，细菌单杂交系统不需要对转录因子进行蛋白纯化；此外，细菌生长速度较快，具



A : 转录因子识别结合位点启动报告基因表达 ; B : 分别构建  $\alpha$ -TF 表达载体和结合位点文库 ; C : 消除自激活现象纯化结合位点文库 ; D : 筛选并分析结合位点

A : Transcription factor recognition binding sites activate the expressions of the reporter genes. B : Construct  $\alpha$ -TF expression vector and binding site library respectively. C : Eliminate self-activation to purify binding site library. D : Selection and analysis of binding sites

图 6 细菌单杂交系统基本原理

Fig. 6 Basic principle of bacterial one hybrid system

有更高的转化效率,与酵母单杂交系统相比此技术可以搜索更大的随机文库。通过此方法有利于发现与相应 DNA 序列特异性结合的潜在转录因子。此方法具有操作简单,无需复杂仪器且转化效率高的特点,适用于转录因子结合位点鉴定并进行高通量分析,但有可能出现假阳性的结果,所以往往需要与其他技术联用来验证结果的准确性。

## 7 总结与展望

基因表达调控是生物遗传调控的一个重要方面,转录调控是原核生物关键调控步骤且是一个非常复杂的过程。本文总结了原核生物 DNA-蛋白质相互作用的研究技术,主要从基本原理、实验方法、注意事项及其进展进行综述。通过其具体应用了解这些研究技术在研究原核生物基因转录调控网络的重要作用及其发展趋势。

尽管上述的每项研究技术都是一项独立的技术,但是目前看来某种研究技术都存在各自的优缺点和适用性,可以根据情况选择合适的技术而且往往需要相互补充才能确认 DNA-蛋白质相互作用的特异性和亲和性,因此在研究中通常两项或两项以上技术结合使用。此外,对于转录调控网络的研究技术还有待于进一步地发展,通过各种技术手段建立转

录因子与启动子之间的动态调控网络更为重要,以期能够重新解释原核生物的各种生理现象,为构建更加复杂、更准确地反映原核生物生命现象的动态网络提供更多的经验。随着后基因时代的发展,原核生物基因转录调控研究技术的应用会越来越广泛。对这些研究技术的改进或在原有技术基础上开发出新技术使其适用于更多的情况,为原核生物的基因改造提供新的靶点和思路,从而更好地发挥原核生物作为生产宿主的优势,助力创造绿色低碳、可持续发展的资源节约型生产方式,为人类造福。

## 参考文献

- [1] Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd [J]. *Science*, 1995, 269 ( 5223 ) : 496-512.
- [2] Faria JP, Overbeek R, Xia FF, et al. Genome-scale bacterial transcriptional regulatory networks : reconstruction and integrated analysis with metabolic models [J]. *Brief Bioinform*, 2014, 15 ( 4 ) : 592-611.
- [3] Kono N, Arakawa K. Nanopore sequencing : review of potential applications in functional genomics [J]. *Dev Growth Differ*, 2019, 61 ( 5 ) : 316-326.
- [4] 陈竺,黄薇,傅刚,等.人类基因组计划现状与展望 [J]. *自然*

- 杂志, 2000, 22 (3): 125-133, 188.
- Chen Z, Huang W, Fu G, et al. Human genome project progress and prospect [J]. Nat Mag, 2000, 22 (3): 125-133, 188.
- [5] Majewska M, Wysokińska H, Kuźma Ł, et al. Eukaryotic and prokaryotic promoter databases as valuable tools in exploring the regulation of gene transcription: a comprehensive overview [J]. Gene, 2018, 644: 38-48.
- [6] Monico C, Capitanio M, Belcastro G, et al. Optical methods to study protein-DNA interactions *in vitro* and in living cells at the single-molecule level [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (2): 3961-3992.
- [7] 周子康, 许平. 全局转录调控在细胞工厂构建中的应用与进展 [J]. 化工进展, 2021, 40 (3): 1248-1251.
- Zhou ZK, Xu P. Application and progress of global transcription regulation in microbial cell factory construction [J]. Chem Ind Eng Prog, 2021, 40 (3): 1248-1251.
- [8] Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions [J]. Nat Protoc, 2007, 2 (8): 1849-1861.
- [9] Unterholzner SJ, Rozhon W, Poppenberger B. Analysis of *in vitro* DNA interactions of brassinosteroid-controlled transcription factors using electrophoretic mobility shift assay [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1564: 133-144.
- [10] 齐心洁, 王玥, 等. 等温滴定量热法在蛋白质-配体相互作用中的应用 [J]. 生物技术通报, 2017, 33 (5): 40-49.
- Qi XJ, Wang Y, et al. Applications of isothermal titration calorimetry in protein-ligand interactions [J]. Biotechnol Bull, 2017, 33 (5): 40-49.
- [11] Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands [J]. Nat Protoc, 2006, 1 (1): 186-191.
- [12] Velazquez-Campoy A, Freire E. ITC in the post-genomic era...? priceless [J]. Biophys Chem, 2005, 115 (2-3): 115-124.
- [13] Leblanc B, Moss T. DNase I footprinting [M] // Tom Moss. DNA-Protein Interactions. New Jersey: Humana Press, 2001: 31-38.
- [14] 李丽琴, 石童, 周国超, 等. MST 技术在生命科学中的应用进展 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17 (32): 6393-6397.
- Li LQ, Shi T, Zhou GC, et al. Progress on the applications of microscale thermophoresis technology in life science [J]. Prog Mod Biomed, 2017, 17 (32): 6393-6397.
- [15] Gade P, Kalvakolanu DV. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity [J]. Methods Mol Biol, 2012, 809: 85-104.
- [16] Christensen RG, Gupta A, Zuo Z, et al. A modified bacterial one-hybrid system yields improved quantitative models of transcription factor specificity [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (12): e83.
- [17] Bak G, Han K, et al. Electrophoretic mobility shift assay of RNA-RNA complexes [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1240: 153-163.
- [18] Künne T, Westra ER, Brouns SJJ. Electrophoretic mobility shift assay of DNA and CRISPR-cas ribonucleoprotein complexes [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1311: 171-184.
- [19] Pan YC, Karns K, Herr AE. Microfluidic electrophoretic mobility shift assays for quantitative biochemical analysis [J]. Electrophoresis, 2014, 35 (15): 2078-2090.
- [20] Vavrova A, Vrzal R, Dvorak Z. A nonradioactive electrophoretic mobility shift assay for measurement of pregnane X receptor binding activity to CYP3A4 response element [J]. ELECTROPHORESIS, 2013, 34 (13): 1863-1668.
- [21] Cornelussen RNM, Gupta S, Knowlton AA. Regulation of prostaglandin A1-induced heat shock protein expression in isolated cardiomyocytes [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001 (8): 1447-1454.
- [22] 葛兴枫, 李慧, 李少华, 等. 用改良的非同位素凝胶电泳迁移实验鉴定核酸适配体与靶蛋白的结合 [J]. 生物技术通讯, 2015, 26 (2): 249-251.
- Ge XF, Li H, Li SH, et al. A modified non-isotope EMSA technique for identification of aptamer binding to its target protein [J]. Lett Biotechnol, 2015, 26 (2): 249-251.
- [23] Tokunaga S, Stegeman JJ. Elimination of nonspecific bands in non-radioactive electrophoretic mobility shift assays using the digoxigenin system [J]. Anal Biochem, 2014, 465: 70-72.
- [24] Fried MG, Bromberg JL. Factors that affect the stability of protein-DNA complexes during gel electrophoresis [J]. Electrophoresis, 1997, 18 (1): 6-11.
- [25] Brown L, Villegas JM, Elean M, et al. YebC, a putative transcriptional factor involved in the regulation of the proteolytic system of *Lactobacillus* [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 8579.
- [26] 王丽滨. 肺炎链球菌糖代谢蛋白 CcpA 对荚膜多糖的调控研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2015.
- Wang LB. The regulation effect of CcpA protein on the biosynthesis of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2015.

- [27] Chen C, Lu YQ, Wang LL, et al. CepA-dependent carbon catabolite repression regulates fructooligosaccharides metabolism in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9 : 1114.
- [28] Keyhani J, Keyhani E. Detection of DNA autoantibodies by electrophoretic mobility shift assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1901 : 133-152.
- [29] Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, et al. Footprinting : a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands [J]. *Methods*, 2007, 42 ( 2 ) : 128-140.
- [30] 徐冬冬, 刘德培, 吕湘, 等. 固相 DNase I 足迹法研究 DNA-蛋白质相互作用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28 ( 4 ) : 587-590.
- Xu DD, Liu DP, Lv X, et al. A method for the study of DNA-protein interaction : solid-phase DNase I footprinting [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2001, 28 ( 4 ) : 587-590.
- [31] Gong LC, Ren C, Xu Y. GlnR negatively regulates glutamate-dependent acid resistance in *Lactobacillus brevis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86 ( 7 ) : e02615-e02619.
- [32] Ihara K, Sato K, Hori H, et al. Expression of the *alaE* gene is positively regulated by the global regulator Lrp in response to intracellular accumulation of l-alanine in *Escherichia coli* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2017, 123 ( 4 ) : 444-450.
- [33] Yang XP, Teng KL, Li LL, et al. Transcriptional regulator AcrR increases ethanol tolerance through regulation of fatty acid synthesis in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85 ( 22 ) : e01690-e01619.
- [34] 王智. DNaseI 足纹法 [J]. *基础医学与临床*, 1990, 10 ( 3 ) : 59-63.
- Wang Z. DNase I-footprinting assay [J]. *Basic Med Sci Clin*, 1990, 10 ( 3 ) : 59-63.
- [35] Wagner M, Jung J, Koslowski M, et al. Chromatin immunoprecipitation assay to identify genomic binding sites of regulatory factors [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1366 : 53-65.
- [36] Orlando V, Paro R. Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin [J]. *Cell*, 1993, 75 ( 6 ) : 1187-1198.
- [37] Wiehle L, Breiling A. Chromatin immunoprecipitation [M] // Lanzaolo C, Bodega B. Polycomb Group Proteins. New York : Humana Press, 2016 : 7-21.
- [38] Dahl JA, Collas P. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 ( 4 ) : 1037-1046.
- [39] Walton CB, Matter ML. Chromatin immunoprecipitation assay : examining the interaction of NFkB with the VEGF promoter [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1332 : 75-87.
- [40] Chen H, Lin RJ, Xie W, et al. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase [J]. *Cell*, 1999, 98 ( 5 ) : 675-686.
- [41] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation : multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34 ( 5 ) : 628-645.
- [42] Ratib NR, Sabio EY, Mendoza C, et al. Genome-wide identification of genes directly regulated by ChvI and a consensus sequence for ChvI binding in *Sinorhizobium meliloti* [J]. *Mol Microbiol*, 2018, 110 ( 4 ) : 596-615.
- [43] Yun CS, Takahashi Y, Shintani M, et al. MvaT family proteins encoded on IncP-7 plasmid pCAR1 and the host chromosome regulate the host transcriptome cooperatively but differently [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 82 ( 3 ) : 832-842.
- [44] Shao XL, Zhang XN, Zhang YC, et al. RpoN-dependent direct regulation of quorum sensing and the type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *J Bacteriol*, 2018, 200 ( 16 ) : e00205-e00218.
- [45] Bard-Chapeau EA, Jeyakani J, Kok CH, et al. Ecotopic viral integration site 1 ( EVI1 ) regulates multiple cellular processes important for cancer and is a synergistic partner for FOS protein in invasive tumors [J]. *PNAS*, 2012, 109 ( 6 ) : 2168-2173.
- [46] 王泓力, 焦雨铃. 染色质免疫共沉淀实验方法 [J]. *植物学报*, 2020, 55 ( 4 ) : 475-480.
- Wang HL, Jiao YL. Protocols for chromatin immunoprecipitation [J]. *Chin Bull Bot*, 2020, 55 ( 4 ) : 475-480.
- [47] Breitsprecher D, Schlinck N, Witte D, et al. Aptamer binding studies using MicroScale thermophoresis [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1380 : 99-111.
- [48] Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, et al. MicroScale thermophoresis : interaction analysis and beyond [J]. *J Mol Struct*, 2014, 1077 : 101-113.
- [49] Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, et al. Molecular

- interaction studies using microscale thermophoresis [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2011, 9 (4): 342-353.
- [50] Gudim I, Lofstad M, Hammerstad M, et al. Measurement of FNR-NrdI interaction by microscale thermophoresis (MST) [J]. *Bio-protocol*, 2017, 7 (8): e2223.
- [51] Entzian C, Schubert T. Studying small molecule-aptamer interactions using microScale thermophoresis (MST) [J]. *Methods*, 2016, 97: 27-34.
- [52] Wienken CJ, Baaske P, Duhr S, et al. Thermophoretic melting curves quantify the conformation and stability of RNA and DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (8): e52.
- [53] Zillner K, Filarsky M, Rachow K, et al. Large-scale organization of ribosomal DNA chromatin is regulated by Tip5 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (10): 5251-5262.
- [54] Shang X, Marchioni F, Evelyn CR, et al. Small-molecule inhibitors targeting G-protein-coupled Rho guanine nucleotide exchange factors [J]. *PNAS*, 2013, 110 (8): 3155-3160.
- [55] van den Bogaart G, Meyenberg K, et al. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate increases Ca<sup>2+</sup> affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (20): 16447-16453.
- [56] Papageorgiou AC, Adam PS, et al. HU histone-like DNA-binding protein from *Thermus thermophilus*: structural and evolutionary analyses [J]. *Extremophiles*, 2016, 20 (5): 695-709.
- [57] Seidel SAI, Dijkman PM, Lea WA, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions [J]. *Methods*, 2013, 59 (3): 301-315.
- [58] 吴萌, 李竑, 陈铭. 两种实验技术在蛋白质-蛋白质相互作用检测中的应用 [J]. *生命的化学*, 2021 (2): 353-360.  
Wu M, Li H, Chen M. An overview of BLI and MST applications in protein-protein interaction [J]. *Chem Life*, 2021 (2): 353-360.
- [59] Wang Q, Wang J, Song SX, et al. Microscale thermophoresis in the investigation of biomolecular interactions [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2020, 29 (9): 656-665.
- [60] Keller S, Vargas C, Zhao HY, et al. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis [J]. *Anal Chem*, 2012, 84 (11): 5066-5073.
- [61] Boudker O, Oh S. Isothermal titration calorimetry of ion-coupled membrane transporters [J]. *Methods*, 2015, 76: 171-182.
- [62] Zhuo L, Zhang Z, Pan Z, et al. *CIRCE element* evolved for the coordinated transcriptional regulation of bacterial duplicate groELs [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018, 1861 (10): 928-937.
- [63] Wang W, Ji J, Li X, et al. Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor* [J]. *PNAS*, 2014, 111 (15): 5688-5693.
- [64] Yamasaki K, Akutsu Y, Yamasaki T, et al. Enhanced affinity of racemic phosphorothioate DNA with transcription factor SATB1 arising from diastereomer-specific hydrogen bonds and hydrophobic contacts [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (8): 4551-4561.
- [65] Weber A, Dettling M, Brunner H, et al. Isothermal titration calorimetry of molecularly imprinted polymer nanospheres [J]. *Macromol Rapid Commun*, 2002, 23 (14): 824-828.
- [66] Brautigam CA, Zhao HY, et al. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions [J]. *Nat Protoc*, 2016 (5): 882-894.
- [67] Meng XD, Wolfe SA. Identifying DNA sequences recognized by a transcription factor using a bacterial one-hybrid system [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (1): 30-45.
- [68] 翟征远. 德氏乳杆菌保加利亚亚种 CAUH1 酸耐受机制的蛋白组学研究及抗酸胁迫基因 *Ldb0677* 和 *pyk* 的功能分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.  
Zhai ZY. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CAUH1 and functional identification of acid stress-related genes *Ldb0677* and *pyk* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [69] Hebdon SD, Menon SK, Richter-Addo GB, et al. Regulatory targets of the response regulator RR\_1586 from *Clostridioides difficile* identified using a bacterial one-hybrid screen [J]. *J Bacteriol*, 2018, 200 (23): e00351-e00318.
- [70] Zhai ZY, Douillard FP, An HR, et al. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CAUH1 and functional identification of a novel acid stress-related transcriptional regulator *Ldb0677* [J]. *Environ Microbiol*, 2014, 16 (6): 1524-1537.
- [71] Zhu LJ, Christensen RG, Kazemian M, et al. FlyFactorSurvey: a database of *Drosophila* transcription factor binding specificities determined using the bacterial one-hybrid system [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (Database issue): D111-D117.