

转录因子 XBP-1 的融合表达、纯化及多克隆抗体的制备

刘雨飞^{1,2)}, 丁丽华¹⁾, 郝春芳¹⁾, 方言¹⁾,
赵福弟²⁾, 黄翠芬¹⁾, 杨晓¹⁾, 叶棋浓¹⁾*

(¹⁾军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850; ²⁾北京大学医学院,吉林 132001)

摘要 人 X 盒结合蛋白 1(XBP-1)为一种转录因子,与多种肿瘤的发生、发展有密切关系。XBP-1 有 2 种剪切形式,即 XBP-1S 和 XBP-1U。将这 2 种剪切形式中的一段相同编码序列(编码 82~147 位氨基酸)重组于谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合蛋白表达载体 pGEX-KG 中,构建成重组质粒 pGST-XBP-1(82~147 位氨基酸)。将该重组质粒转化 *E. coli* DH5 后,表达 GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白,经谷胱甘肽-Sepharose 4B 亲和层析获得纯化的融合蛋白。用此融合蛋白免疫家兔制备多克隆抗体。利用制备的抗体分别用 Western 印迹和免疫细胞化学检测 XBP-1 的 2 种剪切形式在哺乳动物细胞中的表达。结果表明,该抗体对 XBP-1 的 2 种剪切形式均具有反应原性,效价高,特异性好,可以用于进一步研究 XBP-1 的功能。

关键词 人 X 盒结合蛋白 1(XBP-1),融合表达,多克隆抗体

中图分类号 Q78,R34

Expression and Purification of XBP-1 Fusion Protein and Preparation of Polyclonal Antibody Against Protein

LIU Yu-fei^{1,2)}, DING Li-hua¹⁾, HAO Chun-fang¹⁾, FANG Yan¹⁾,
ZHAO Fu-di²⁾, HUANG Cui-fen¹⁾, YANG Xiao¹⁾, YE Qi-nong¹⁾*

(¹⁾ Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China; ²⁾ College of Medicine, Beihua University, Jilin 132001, China)

Abstract X-box binding protein-1(XBP-1) is a transcription factor that plays an important role in regulating proliferation of cancer cells. XBP-1 has two splicing variants that were designated XBP-1S and XBP-1U. The coding sequences(82~147 residues) of XBP-1S and XBP-1U were cloned into the expression vector pGEX-KG, which directs expression of glutathione S-transferase (GST) fusion protein. The GST-XBP-1(82~147 residues) fusion protein expression vector was constructed. The recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* DH5. The GST-XBP-1(82~147 residues) fusion protein was expressed and then purified by glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography. The polyclonal antibody against GST-XBP-1(82~147 residues) fusion protein was prepared by immunizing rabbit with the purified protein. The ectopic expression of XBP-1S and XBP-1U in 293T cells were confirmed by Western blotting and immunocytochemistry with the antiserum. The polyclonal antibody recognized both of the splicing variants of XBP-1 with high titer and specificity. These results suggest that the polyclonal antibody can be used for further studies of XBP-1 function.

Key words X-box binding protein-1(XBP-1), fusion expression, polyclonal antibody

收稿日期:2004-01-19,接受日期:2004-04-23

国家高技术研究发展计划(863项目)(No. 2002BA711A02-5)和国家自然科学基金项目(No. 30370738)资助

*联系人 Tel:010-66931830, E-mail:yeqn@yahoo.com

Received: January 19, 2004; Accepted: April 23, 2004

Supported by National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No. 2002BA711A02-5) and National Natural Science Foundation of China, No. 30370738

* Corresponding author Tel:010-66931830, E-mail:yeqn@yahoo.com

人 X 盒结合蛋白 1(XBP-1)是一种转录因子,通过与靶基因启动子序列中的 X 盒结合激活靶基因的转录,故称为 X 盒结合蛋白. XBP-1 是一个碱性亮氨酸拉链(b-zip)蛋白,由 Liou 等于 1990 年克隆得到^[1],并一直认为只存在一种形式,即 XBP-1U. 最近发现了 XBP-1 的另外一种剪切形式,即 XBP-1S. XBP-1S 是在内质网应激时^[2,3],由 型跨膜蛋白激酶/核糖核酸内切酶(type transmembrane protein kinase/endoribonuclease, IRE1)剪切 XBP-1U mRNA 产生.

XBP-1 在成人正常组织中广泛存在,在胚胎期的外分泌腺体、成骨细胞、成软骨细胞和肝脏中高表达^[1,4]. XBP-1 是肝细胞生长必需的转录因子^[5]. 研究表明, XBP-1 参与调控 IL-6 的生成,并通过非折叠蛋白质应答(unfolded protein response, UPR)途径促进 B 细胞向浆细胞的分化^[6]. 在人多骨髓瘤细胞中, XBP-1 的异常活动可能促进恶性浆细胞分化^[7]. 在肝细胞癌及原发性乳腺癌时均发现 XBP-1 过表达^[8,9]. 在人类前列腺癌时 XBP-1 表达的负调控与肿瘤进展相关^[10].

由于 XBP-1 在正常生理及病理过程中均起到重要作用,因此对 XBP-1 功能的深入研究具有重要意义. 本文成功地构建了 GST-XBP-1 融合蛋白表达载体,以 GST 融合的方式表达了 XBP-1 部分序列,并获得高特异性抗体. 为进一步研究 XBP-1 的功能提供了有力的工具.

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

克隆载体 pGEX-KG、*E. coli* DH5 均为本实验室保存. pcDNA3-FLAG-XBP-1S 和 pcDNA3-FLAG-XBP-1U 重组质粒由本实验室构建及保存^[11].

1.2 细胞和细胞培养

293T 细胞和 HeLa 细胞采用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃, 5% CO₂ 培养箱内常规培养.

1.3 抗体

抗 FLAG 的单克隆抗体购自 Sigma 公司. 用于对照的抗 XBP-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司. 辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 购自 Vector 公司.

1.4 分子生物试剂

限制性内切酶 *Bam*H 和 *Xho* 购自 NEB 公司,高保真 *pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及 IPTG 购自 Promega 公司,质粒提取试剂盒(包括小量提取、大量制备两种)购自 Qiagen 公司,DNA 胶回收试

剂盒及 PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司.

1.5 重组质粒的构建

以用于酵母双杂交的乳腺 cDNA 文库(Clontech)为模板,以 P1(5'-CGGGATCCGTA GCA GCTCAGACTGCCA G3)和 P2(5'-CCGCTC GA GTTACTCCTCTTCA GCAACCA G3)为引物,PCR 扩增编码 82~147 位氨基酸的 XBP-1 片段. 以 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切 PCR 产物,将 PCR 产物插入到同样双酶切的 pGEX-KG 载体中,即得重组质粒 pGST-XBP-1(82~147 位氨基酸).

上述克隆所用 PCR 扩增条件为:94℃ 变性 1 min 后,按以下参数进行 25 次循环:94℃ 变性 1 min,55℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min. 最后 72℃ 延伸 7 min. PCR 扩增所用酶为 *pfu* DNA 聚合酶. 重组质粒经载体上的通用引物测序.

1.6 GST 融合蛋白的诱导表达及纯化

将上述构建的表达 GST 的融合蛋白的重组质粒和表达 GST 的空载体 pGEX-KG 转化到 *E. coli* DH5 中. 转化子 37℃ 振荡过夜,再按 2% 的接种量转接,30℃ 培养 6 h 后,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,20℃ 继续诱导培养过夜. 收集上述诱导菌,用谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒亲和层析法纯化 GST 融合蛋白,基本按 Pharmacia 公司提供的方法进行. 即按 10:1 (V/V) 的比例加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.3 mmol/L DTT, 0.1% NP-40 及蛋白酶抑制剂),超声破碎,离心收集上清液,加入适量谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒,结合 3 h. 再收集谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒,用细胞裂解液充分洗脱未结合蛋白质后,即得到结合有 GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白或 GST 蛋白的谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒.

1.7 多克隆抗体的制备

将纯化的 GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白与福氏完全佐剂 1:1 混匀后,皮内多点注射家兔. 初次免疫后每 3 周加强免疫一次,末次免疫后第 10 d 心脏取血,免疫血清于 -70℃ 保存.

1.8 哺乳动物细胞的转染

用无双抗的 DMEM 培养基(含 10% FBS)将 293T 细胞接种在 12 孔板中. 接种后 24 h,将总量为 1.0 μg DNA 与 80 μl DMEM 培养基混合,再将 2.5 μl Lipofectamine 2000(Invitrogen)与 80 μl DMEM 培养基混合,然后将上述两种溶液混合,室温放置 20 min,加入到细胞中.

1.9 Western 印迹检测

293T 细胞转染 24 h 后,收集细胞,加入 SDS 加样缓冲液,煮沸 10 min,离心后取上清液进行 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜上,分别用自制免疫血清和 HLAG 抗体进行 Western 印迹检测.用自制免疫血清进行 Western 印迹检测时,用 100 g/L 脱脂奶粉 4 封闭过夜,加入用 100 g/L 脱脂奶粉 1 2000 稀释的免疫血清,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 5 次,每次 10 min,加入用 50 g/L 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 7 min,用化学发光法显色 5 min,压片显影.用 HLAG 抗体进行 Western 印迹检测时,用 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入用 50 g/L 脱脂奶粉 1 2000 稀释的 HLAG 抗体,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 7 min,加入用 50 g/L 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 7 min,用化学发光法显色 5 min,压片显影.

1.10 免疫细胞化学分析

293T 细胞转染 24 h 后,弃去培养基,用 3 % 新鲜配制多聚甲醛固定.经 0.5 % Triton X-100 处理和 1 % 羊血清封闭后加自制免疫血清(1:100),室温温育 2 h,用含 1 % 羊血清的 PBS 洗 3 次,每次 10 min.然后加入荧光素标记的羊抗兔 IgG 室温温育 1 h, PBS 洗 3 次,每次 10 min,最后用 Hoechst33258 进行核染色,并于荧光显微镜下观察.

1.11 内源性 XBP-1 表达的检测

用无双抗的 DMEM 培养基(含 10 % FBS)将 HeLa

细胞接种在 12 孔板中.接种后 24 h,加入 tunicamycin 至终浓度 2 μ g/ml,分别于 5 h、6 h 收集细胞进行 Western 印迹检测,并以 1.9 中收集的转染后 293T 细胞作为对照.方法同 1.9 所述.

2 结果

2.1 GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pGST-XBP-1(82~147 位氨基酸)转化到 *E. coli* DH5 中,转化菌经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE.结果表明(Fig. 1A),与阴性对照 DH5 相比,DH5 (pGEX-KG)特异地表达了分子量约为 26 kD 的蛋白,而 DH5 (pGST-XBP-1(82~147 位氨基酸))特异地表达了分子量约为 33 kD 的预期蛋白. Western 印迹检测表明(Fig. 1B),这些特异表达带均可与 GST 抗体发生特异反应,说明 GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白的构建及表达获得成功.

2.2 GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白的纯化

GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)融合蛋白在大肠杆菌中经低温诱导表达后,获得了较大量的可溶性蛋白.这些可溶性蛋白经谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒亲和层析后进行 SDS-PAGE.结果表明(Fig. 2A),GST-XBP-1(82~147 位氨基酸)和 GST 分别为纯的单一蛋白条带. Western 印迹进一步检测表明(Fig. 2B),这些蛋白条带均可与 GST 抗体发生特异反应.

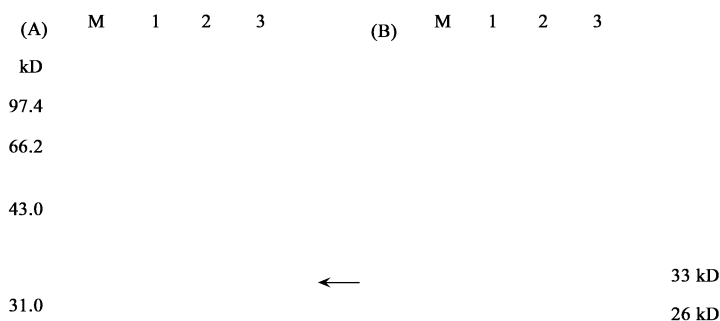


Fig. 1 Expression of GST-XBP-1(82~147 residues) fusion protein in *E. coli* DH5

(A) SDS-PAGE of GST-XBP-1(82~147 residues) expression.

(B) Western blot analysis of GST-XBP-1(82~147 residues) fusion protein.

M:protein marker ;1:Lysate from *E. coli* DH5 ;2:Lysate from *E. coli* DH5 containing empty vector ;

3:Lysate from *E. coli* DH5 containng pGST-XBP-1(82~147 residues)

2.3 XBP-1 在哺乳动物细胞中的表达及多克隆抗体的鉴定

为便于 XBP-1 抗体特异性的验证,本文以带有 HLAG 标签的 XBP-1 蛋白作为对照.将 pcDNA3-

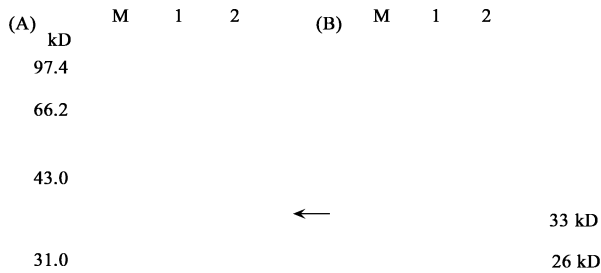


Fig. 2 Purification of GST-XBP-1 (82 ~ 147 residues) fusion protein
 (A) SDS-PAGE of purified GST-XBP-1 (82 ~ 147 residues) fusion protein.
 (B) Western blot analysis of purified GST-XBP-1 (82 ~ 147 residues) fusion protein.
 M:protein marker ;1 : GST protein ;2 : GST-XBP-1 fusion protein

FLAG XBP-1 S 和 pcDNA3-FLAG XBP-1 U 重组质粒分别转染 293T 细胞,收集细胞总蛋白质进行 SDS-PAGE,用 FLAG 抗体(Sigma)进行 Western 印迹分析.结果表明(Fig. 3A),转染 pcDNA3-FLAG XBP-1 S 的 293T 细胞表达了分子量约 50 kD 的 FLAG XBP-1 S 蛋白,转染 pcDNA3-FLAG XBP-1 U 的 293T 细胞表达了

分子量约 35 kD 的 FLAG XBP-1U 蛋白,而 293T 细胞无蛋白质条带,与预期结果相同.用自制免疫血清进行 Western 印迹分析,结果表明(Fig. 3B),转染 XBP-1 两种剪切形式重组质粒的 293T 细胞均可检测到分子量正确的蛋白条带,且条带位置与用 FLAG 抗体检测的条带的位置相同,而 293T 细胞未检测到任何条带,说明 293T 细胞无内源性 XBP-1 或其表达水平很低. SDS-PAGE 结果(Fig. 3C)表明,转染 pcDNA3-FLAG XBP-1 的 293T 细胞与 293T 细胞相比在分子量 35 kD 及 50 kD 处均未见明显单一条带,这些结果说明制备的多克隆抗体能特异地与 FLAG XBP-1S 和 FLAG XBP-1U 蛋白反应.

2.4 免疫细胞化学分析

按材料和方法所述,用自制免疫血清对转染 pcDNA3-FLAG XBP-1 S 和 pcDNA3-FLAG XBP-1 U 的 293T 细胞进行免疫细胞化学分析.结果(Fig. 4)表明,在转染 XBP-1 两种剪切形式重组质粒的 293T 细胞中均可观察到荧光,且主要为核染色,而 293T 细胞无荧光.说明制备的多克隆抗体完全可以用于免疫细胞化学分析.

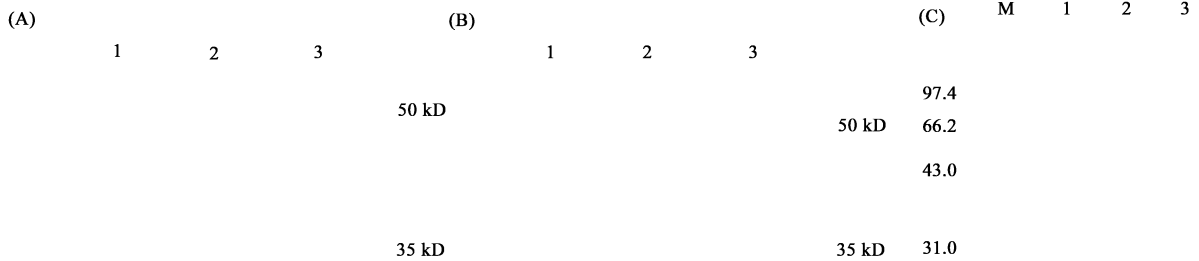


Fig. 3 Expression of FLAG XBP-1 in 293T cells
 (A) Western blot analysis of FLAG XBP-1 with anti-FLAG antibody.
 (B) Western blot analysis of FLAG XBP-1 with anti-XBP-1 antibody.
 (C) SDS-PAGE of FLAG XBP-1.
 M:protein marker ;1 :293T cells ;2 :293T cells transfected with pcDNA-FLAG XBP-1 U ;3 :293T cells transfected with pcDNA-FLAG XBP-1 S

2.5 内源性 XBP-1 表达的检测

目前对内源性 XBP-1U 的检测大多局限于 mRNA 水平的检测^[2],主要原因可能是 XBP-1U 蛋白在体内极易降解. XBP-1S 为一内质网应激蛋白,在内质网应激试剂(如 tunicamycin)作用下,可检测到 XBP-1S 蛋白.用自制的免疫血清进行 Western 印迹分析检测内源性 XBP-1 的表达表明(Fig. 5),Hela 细胞用 tunicamycin 处理 5 h、6 h 后即可检测到 XBP-1S 的表达,但在 XBP-1U 相应位置未见到任何条带.

3 讨论

虽然目前发现了 XBP-1 在多种肿瘤发展过程中起重要作用,但其具体机制尚不清楚. XBP-1 作为一种转录因子,必然参与许多基因的表达. MHC 类基因 A、DR、DP 中的 cAMP 反应元件(cAMP responsive element, CRE)是 XBP-1 的结合序列, XBP-1 还可以与含有 ACGT 核心的 CRE 样元件及一些 TPA 反应元件(TPA response element, TRE)结合^[12]. XBP-1

可以激活人类 T 细胞白血病/淋巴瘤病毒 (human T-cell leukemia/lymphoma virus, HTLV-1) 的转录^[12], 而 HTLV-1 是与人类肿瘤发生密切相关的一种 RNA 病毒. 本实验室的研究表明, XBP-1 能提高雌激素受

体 ER 转录活性^[11]. 但 XBP-1 如何影响乳腺癌的发生发展尚不清楚. 因此深入了解 XBP-1 的表达分布、上下游分子及其在细胞调控中的作用具有重要意义.

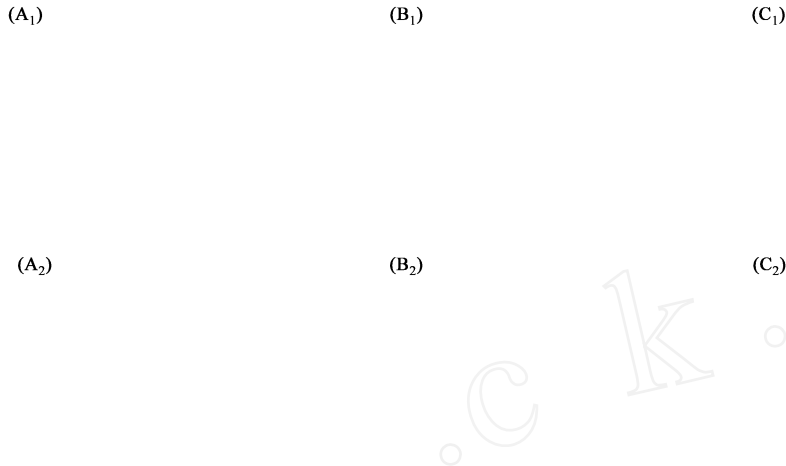


Fig. 4 Immunocytochemistry analysis of XBP-1 expression in 293T cells with anti-XBP-1 antibody

- (A₁) 293T cells stained with normal serum.
- (A₂) 293T cells stained with Hoechst 33258.
- (B₁) FLAG XBP-1S-transfected 293T cells stained with anti-XBP-1 antibody.
- (B₂) FLAG XBP-1S-transfected 293T cells stained with Hoechst 33258.
- (C₁) FLAG XBP-1U-transfected 293T cells stained with anti-XBP-1 antibody.
- (C₂) FLAG XBP-1U-transfected 293T cells stained with Hoechst 33258.

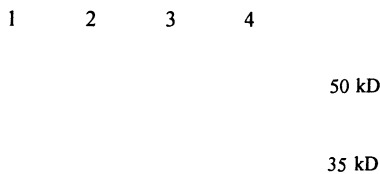


Fig. 5 Western blot analysis of endogenous XBP-1 expression

- 1: HeLa cells treated with 2 µg/ml tunicamycin for 5 hours;
- 2: HeLa cells treated with 2 µg/ml tunicamycin for 6 hours;
- 3: 293T cells transfected with pcDNA-FLAG XBP-1S;
- 4: 293T cells transfected with pcDNA-FLAG XBP-1U

抗体是研究基因功能的重要工具. 尽管越来越多的证据表明, XBP-1 在生理和病理过程中均起重要作用, 但出售 XBP-1 抗体的公司极少. 即使有商业化抗体 (如 Santa Cruz 公司的 XBP-1 抗体), 其滴度也不高. 如商业化 XBP-1 抗体用于真核表达的 FLAG XBP-1S 和 FLAG XBP-1U 蛋白检测的稀释度仅为 1 200 (数据略), 而我们所用的稀释度为 1 2000, 且信

号强于商业化抗体. 由于我们所用的 XBP-1 的抗原区 (82 ~ 147 位氨基酸) 不同于商业化抗体的抗原区 (76 ~ 260 位氨基酸), 因此我们选择的抗原区也许更合适.

XBP-1 有两种剪切形式, 即 XBP-1U 和 XBP-1S. 两者分别由 260 和 376 个氨基酸组成, 且 N 端具有相同的 b-zip 结构域. 为了获得对 XBP-1 两种剪切形式均有反应原性的抗体, 我们选择两者中的一段相同序列 (82 ~ 147 位氨基酸) 进行融合表达, 用来制备 XBP-1 的特异性抗体.

GST 蛋白分子量约为 26 kD, 用此衍生的融合蛋白免疫家兔所产生的抗体会有一部分是针对 GST 蛋白的. 为了鉴定所得抗体的特异性, 我们将 XBP-1S、XBP-1U 的编码序列克隆到带有 FLAG 标签的真核表达载体中, 使其在哺乳动物细胞中表达, 并用 FLAG 抗体和自制的免疫血清进行比较鉴定. 避免了用 GST 融合蛋白鉴定会导致免疫血清与 GST 蛋白交叉反应的问题, 同时也证明了此免疫血清既能识

别原核表达 XBP-1 又能识别真核表达 XBP-1 (Fig. 3 和数据略),表明了免疫血清对 XBP-1 蛋白的良好特异性. 该策略也适用于其它抗体的鉴定.

本文成功制备了特异性和效价良好的抗 XBP-1 多克隆抗体,并可用于 Western 印迹分析和免疫细胞化学研究,为今后 XBP-1 的表达分布检测、细胞内定位及与其它蛋白质间相互作用等许多研究工作的开展奠定了基础.

参考文献 (References)

- Liou H C, Boothby M R, Finn P W, Davidson R, Nabavi N, Zeleznik-Le N J, Ting J P, Gimcher L H. A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 1990, **247**(4950): 1581 ~ 1584
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001, **107**(7): 881 ~ 891
- Calton M, Zeng H, Urano F, Till J H, Hubbard S R, Harding H P, Clark S G, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 2002, **415**(6867): 92 ~ 96
- Clauss I M, Gravalles E M, Darling J M, Shapiro F, Gimcher M J, Gimcher L H. In situ hybridization studies suggest a role for the basic region/leucine zipper protein hXBP-1 in exocrine gland and skeletal development during mouse embryo genesis. *Dev Dyn*, 1993, **197**(2): 146 ~ 156
- Reimold A M, Erkin A, Clauss I, Perkins A, Friend D S, Zhong J, Horton H F, Scott A, Orkin S H, Byrne M C, Grusby M J, Gimcher L H. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev*, 1999, **14**: 152 ~ 157
- Iwakoshi N N, Lee A H, Gimcher L H. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev*, 2003, **194**: 29 ~ 38
- Reimold A M, Iwakoshi N N, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles E M, Friend D, Grusby M J, Alt F, Gimcher L H. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 2001, **412**(6844): 300 ~ 307
- Kishimoto T, Kokura K, Ohkawa N, Makino Y, Yoshida M, Hirohashi S, Niwa S, Muramatsu M, Tamura T. Enhanced expression of a new class liver-enriched bZIP transcription factor, hepatocarcinogenesis-related transcription factor, in hepatocellular carcinomas of rats and humans. *Cell Growth Differ*, 1998, **9**: 337 ~ 344
- Fujimoto T, Onda M, Nagai H, Nagahata T, Ogawa K, Eni M. Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers. *Breast Cancer*, 2000, **10**(4): 301 ~ 306
- Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Ikeda Y, Cho Y M, Nishiyama N, Fujita T, Inoue T, Hioki T, Sugimura Y, Ushijima T, Shirai T. Down-regulation of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) expression correlates with tumor progression in human prostate cancers. *Prostate*, 2002, **50**(3): 154 ~ 161
- Ding L H, Yan J H, Zhu J H, Zhong H J, Lu Q J, Wang Z H, Huang C F, Ye Q N. Ligand-independent activation of estrogen by XBP-1. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(18): 5266 ~ 5274
- Clauss I M, Chu M, Zhao J L, Gimcher L H. The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**(10): 1855 ~ 1864