文章编号:1000-5404(2007)01-0021-03

论著

核因子 NF-κB p65 亚基 TAD 的克隆及表达

侯春丽,应大君,魏 勇 (第三军医大学基础医学部人体解剖学教研室,国家教育部生物力学与组织工程重点实验室生物力学室,重庆 400038)

提 要: 目的 获得 NF-κB p65 亚基转录激活区域(transcription activation domain, TAD),构建真核表达载体并在内皮细胞中检测其表达。**方法** 培养人脐静脉内皮细胞,提取总 RNA,经 RT-PCR 得到 p65 TAD 基因片段,测序正确后插入带有绿色荧光蛋白的真核表达载体 pEGFP-N1,构建表达载体 pEGFP-N1-p65 TAD,然后转染内皮细胞,荧光显微镜下观察表达情况,同时用 Western blot 分析蛋白的表达。**结果** 有效地扩增了 p65 TAD 783 bp 的目的基因片段。酶切结果表明所构建的含 p65 TAD 基因的质粒与设计相同。p65 TAD 在脐静脉内皮细胞中得到了高效的表达。**结论** 成功地构建了 p65 TAD 的真核表达载体并实现了在内皮细胞中的高效表达。

关键词: 核转录因子 NF-κB;p65 亚基转录激活区域;克隆;表达
中图法分类号: R392.11; R394-33; R394.3 **文献标识码**: A

Clone and expression of nuclear factor κB p65 TAD

HOU Chun-li, YING Da-jun, WEI Yong (Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To acquire NF-κB p65 TAD (transcription activation domain) and construct its eukaryotic expression vector and express it in endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and total RNA was extracted. The p65 TAD gene was amplified by RT-PCR. After sequencing, the p65 TAD gene was inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-N1 with the green fluorescence protein, named pEGFP-N1-p65 TAD. pEGFP-N1-p65 TAD was transfected into HUVECs and its expression was observed under fluorescence microscope and analyzed by Western blotting. **Results** p65 TAD (288 – 548) was cloned successfully. The constructed plasmid including p65 TAD gene was identical to the designed. p65 TAD gene was expressed successfully in HUVECs. **Conclusion** The construction of eukaryotic expression vector including p65 TAD gene and its expression in HUVECs are very successful.

Key words: nuclear factor κB; p65 transcription activation domain; clone; expression

NF-κB 是一种具有多项转录调节作用的转录因子,它广泛存在于各种细胞中,是多信号转导途径的汇聚点,它不仅参与介导了免疫应答、炎症反应、病毒复制、细胞凋亡和增殖的多种基因的表达调控,而且与很多炎性相关疾病的发病机制有密切关系。研究表明受 NF-κB 调节的基因有 200 多种,其激活因子不少于 150 种[1]。通常所指的 NF-κB 为 p65 和 p50 的异源二聚体。对 p65 和 p50 的结构进行分析可知,p65 的 C 端序列中含有转录激活结构域,可以激活靶基因的转录,而 p50 的 C 端不含跨域激活区[2]。因此,细胞内如 IL-8、TNF-α、ICAM-1 等多种细胞因子、黏附因子的过度表达与 p65 的激活结构域有直接关系。国外研究报道,体外获得的 p65 TAD 片段与 VP16 同样具有激活靶基因转录的功能,这就为蛋白质工程开辟了一条新路。本实验中我们用 RT-PCR 法扩增了 p65 TAD 基因片段,并实现了在内皮细胞中表达,为下游实验奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

真核表达载体 pEGFP-N1、T 载体及大肠杆菌 DH10B 均由

基金项目:国家自然科学基金(30472027)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30472027)
作者简介:侯春丽(1977 –),女,山东省潍坊市人,博士研究生,主要从事蛋白质表达方面的研究。电话:(023)68752225,E-mail: houchunliwf@163.com
通讯作者:应大君,电话:(023)68752226
收稿日期:2006-05-08;**修回日期**:2006-09-26

本室保存。质粒快速抽提试剂盒购自北京博大泰克公司，TriPure 为 Roche 公司产品，RT-PCR 试剂盒购自上海升博，限制性内切酶 *Nhe* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ以及 T_4-DNA 连接酶均购自大连宝生物公司，DOTAP 脂质体转染试剂为 Roche 公司产品。M199 完全培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司。PCR 引物由上海升博公司设计并合成，S：5′-AGTGAGCCCATGGAATTCCAGTACC-3′；A：3′-CCACTGCG GACGGGAGGGGTCTCGT-5′兔抗人单克隆 NF-κB p65 抗体（Santa Cruz，USA），辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔抗体购自武汉博士德生物工程公司，Brofard 法试剂盒为碧云天生物技术研究所产品。

1.2 脐静脉内皮细胞的培养、总 RNA 的提取及 RT-PCR

无菌人脐带（15～20 cm）取自本校西南医院，置 D-Hanks 中 4 ℃保存，于 3 h 内使用。先用 D-Hanks 冲洗脐带内、外血，再用 0.25% 胰蛋白酶灌注脐带后，于 37 ℃消化 15 min，用含 10% 胎牛血清的 M199 培养基终止消化。1 000 r/min 离心 8 min，弃上清。加入含 20% 胎牛血清的 M199 培养，以 $1\times10^5/cm^2$ 的密度接种于 75 cm^2 培养瓶内，于 37 ℃、5% CO_2 孵箱内静置培养。为减少细胞代次对结果的影响，均采用原代培养细胞进行实验。

当细胞生长融合至 75%～80%，提取其总 RNA，具体步骤参见 Roche 公司的 TriPure 分离试剂说明。RT-PCR 采用升博公司的 RT-PCR 试剂盒（操作步骤略）。

1.3 重组真核表达载体的构建与酶切鉴定

将扩增得到的 p65 TAD 基因片段插入 T 载体，测序正确后，经限制性内切酶 *Nhe* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ酶切后与质粒 pEGFP-N1 重组，得到表达载体 pEGFP-N1-p65 TAD。构建完后进行相应的酶切鉴定。

1.4 DOTAP 脂质体介导的基因转染

1.4.1 原代脐静脉内皮细胞的培养　方法同 1.2。

1.4.2 细胞转染及抗 G418 阳性克隆的筛选　细胞常规传代，以 3×10^5/孔接种到六孔培养板（内置经赖氨酸处理的盖玻片）。当细胞融合至 80% 左右进行转染。转染前用无血清培养基洗涤细胞，然后每孔加入 900 μl 无血清培养基继续培养。转染采用 DOTAP 脂质体介导法，具体步骤见 Roche 公司试剂操作手册。转染 24 h 后弃去转染液，换回正常培养液继续培养 2 d 后弃培养液，用含 G418 300 μg/ml 的 M199 培养液进行筛选，收集阳性细胞。

1.5 荧光显微镜观察 pEGFP-N1-p65 TAD 表达情况

荧光显微镜下观察经 G418 300 μg/ml 筛选后收集到阳性细胞，并拍照记录。

1.6 Western blot 分析 NF-κB p65 蛋白的表达

1.6.1 细胞总蛋白的提取及定量　选择经 G418 筛选后生长良好的细胞，用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 遍，0.05% 胰蛋白酶消化，1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞，弃上清，加入预冷的裂解缓冲液，4 ℃裂解 30 min，然后将裂解物 16 000 r/min 离心 10 min，取上清即为提取的细胞总蛋白。采用 Brofard 法测定蛋白浓度。

1.6.2 Western blot 检测 NF-κB p65 蛋白的表达　取一定量的蛋白样品，加入等体积的 2×SDS 电泳上样缓冲液，100 ℃加热 5 min，室温冷却，12 000 r/min 离心 1 min，取上清做 SDS-PAGE 分析。参照《分子克隆》的方法，将得到的蛋白产物进行 SDS-PAGE 电泳，以每泳道 20 μl 上样，电泳后，电转移至硝酸纤维素膜上，经 5% 的脱脂奶粉包被液在室温下封闭 2 h 后，加入一抗兔抗人 NF-KB p65 抗体（按 1∶200 用 0.01 mol/L PBS 稀释），4 ℃放置过夜。PBS 洗去未结合的一抗，加入辣根过氧化物酶标记的二抗鼠抗兔抗体（按 1∶3 000 用 0.01 mol/L PBS 稀释），平稳摇动，室温 2 h。弃二抗，用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤后，加入发光显色剂，立即反应，在暗室中压 X 线片，曝光自显影。

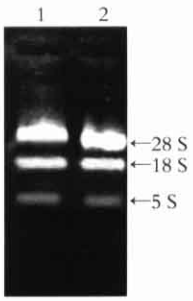
2 结果

2.1 脐静脉内皮细胞的形态学观察

倒置相差显微镜下可见最初细胞以团簇状形成于培养瓶的底层，继而细胞迅速生长，融合成片状，5～6 d 后细胞呈单层多角形镶嵌排列，如铺路石状生长。

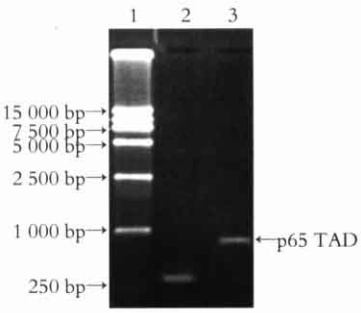
2.2 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR

提取细胞总 RNA 的纯度由 $D(260)/D(280)$ 值表示，实验中提取的总 RNA 比值大于 1.79，表示提取成功（图 1）。RT-PCR 结果显示，扩增的 p65 TAD 条带较明显（图 2）。基因测序的结果表明，实验中扩增的 p65 TAD 片段的基因序列与 GenBank 所报道的序列完全一致。



1，2：细胞总 RNA

图 1 提取细胞总 RNA 电泳图



1：DNA 标准；2：参照；3：p65 TAD

图 2 p65 TAD RT-PCR 电泳图

2.3 重组表达载体的酶切鉴定

对构建的载体 pEGFP-N1-p65 TAD 进行酶切鉴定，结果表

明所构建的含 p65 TAD 基因的质粒与设计相同(图 3)。



1：DNA 标准；2：经 *Nhe* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切后的 pEGFP-N1-p65 TAD

图 3　pEGFP-N1-p65 TAD 经双酶切后电泳图

2.4　荧光显微镜下观察 pEGFP-N1-p65 TAD 表达情况

如图 4 所示，被转染的内皮细胞中可见有较强的绿色荧光，表明 pEGFP-N1-p65 TAD 在内皮细胞中得到了高效的表达。

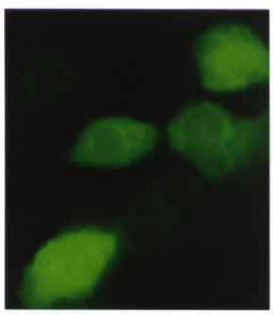
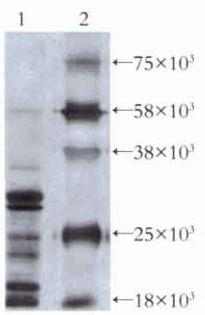


图 4　pEGFP-N1-p65 TAD 的表达　(荧光显微镜×400)

2.5　Western blot 分析 NF-κB p65 蛋白的表达

Western blot 结果显示，得到的 27.4×10^3 的蛋白可被 p65 抗体所识别，这说明获得的可溶性的蛋白正是所要表达的目的蛋白(图 5)。



1：细胞总蛋白；2：蛋白分子量标准

图 5　细胞总蛋白的 SDS-PAGE 分析

3　讨论

NF-κB 是 Sen 和 Baltimore[3] 于 1986 年首次发现的在成熟的 B 细胞、浆细胞中存在与免疫球蛋白 κ 轻链增强子 10 bp DNA 序列特异结合的蛋白。NF-κB 的活化会导致多种细胞因子、黏附因子的过度表达，而许多临床疾病如心血管疾病、肺部疾病等大部分都存在着细胞因子网络的失衡及某些细胞因子、黏附因子的高表达。NF-κB 可被视为复杂信号级联反应的重要一站，其与靶基因上的 κB 位点结合，引起靶基因的转录，从而产生一系列变态反应[4,5]。如前所述，通常所指的 NF-κB 为 p50 和 p65 的异源二聚体，几乎存在于所有细胞中。对该二聚体的结构分析可知，p65 的 C 端序列中含有转录激活结构域(TAD)，可以激活靶基因的转录，而 p50 的 C 端不含跨域激活区。据国外研究报道[6,7]，虽然 NF-κB p65 和疱疹样病毒 VP16 都具有强酸性的激活区域并且有一些类似的功能特征，但其激活机制是不同的，而且体外获得的 p65 TAD 片段的激活能力优于疱疹样病毒 VP16。本实验通过 RT-PCR 法，成功克隆了 p65 TAD 基因片段，并且荧光显微镜分析结果和 Western blot 结果均表均明实验中构建的质粒在内皮细胞中获得了表达，为下一步体外人工合成转录因子奠定了基础。

参考文献：

[1] Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors[J]. Oncogene, 1999, 18(49): 6853 - 6866.

[2] Chen F E, Huang D B, Chen Y Q, *et al*. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA[J]. Nature, 1998, 391(6665): 410 - 413.

[3] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46(5): 705 - 716.

[4] 刘　杰，廖　辉，刘立思. 核因子-κB 的生物学特性及其与变态反应性疾病的相关关系[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19(14): 669 - 672.

[5] 李道明，李珊珊，赵志花，等. 食管鳞癌组织中核转录因子 κB P65 蛋白及 IκBα 的表达[J]. 郑州大学学报：医学版, 2004, 39(6): 967 - 970.

[6] Zhang L, Spratt S K, Liu Q, *et al*. Synthetic zinc finger transcription factor action at endogenous chromosomal site. Activation of the human erythropoietin gene [J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 33850 - 33860.

[7] Liu P Q, Rebar E J, Zhang L, *et al*. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11323 - 11334.

(编辑　王　红)