论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0572-04

人高迁移率族蛋白的分子改建及原核表达

陈 婧,袁志强,彭毅志 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 构建人高迁移率族蛋白(high mobility group box 1 protein, HMGB1)突变体及表达与鉴定目的蛋白,为进一步通过HMGB1突变体蛋白与天然HMGB1竞争结合相应受体而抑制其致炎效应奠定了基础。**方法** 在已成功克隆和表达人HMGB1的基础上,采用一步反向PCR致突变法构建人HMGB1 cDNA的6个突变体,并分别克隆于原核表达载体pQE-80L上,表达6个相应的重组HMGB1突变体蛋白,并经Western blot鉴定。**结果** 获得人HMGB1 cDNA的6个突变体,并成功构建到原核表达载体pQE-80L上,诱导表达且经Western blot鉴定了目的蛋白。**结论** 成功构建人HMGB1突变体,并进行了目的蛋白表达的鉴定。

关键词: HMGB1;克隆;突变;表达

中图法分类号: R341; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

Reconstruction and prokaryotic expression of human high mobility group box 1 protein

CHEN Jing, YUAN Zhi-qiang, PENG Yi-zhi (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To design and prepare recombinant mutant human high mobility group box 1 protein (HMGB1s) that can combine with HMGB1 receptors but cannot produce inflammatory effect, and accordingly lead to the creation of a new potential agent for anti-inflammatory therapy. Methods This experiment was based on successful clone and expression of human HMGB1. Six mutant HMGB1 cDNA were designed and constructed by one step inverse PCR. They were cloned into prokaryotic expressive vector pQE80L and followed with production of mutant HMGB1s and identification by Western blotting. Results Six mutant proteins were designed and constructed into prokaryotic expressive vector pQE80L. The recombinant HMGB1 proteins were obtained and identified by Western blotting. Conclusion Human HMGB1 mutants have been successfully constructed and the expression and characterization of intent proteins are identified. It will lay a foundation for further study on biological functions of HMGB1.

Key words: high mobility group box 1 protein; clone; mutation; prokaryotic expression

高迁移率族蛋白(high mobility group box 1 protein, HMGB1)是一种在真核细胞中广泛表达并且高度保守的蛋白。它首先是作为一种DNA结合蛋白而被发现的,对正常转录调节和基因表达起重要作用的结构因子[1]。最近研究证明,除在细胞内作用之外,HMGB1能被激活的免疫细胞(如巨噬细胞、单核细胞)释放到细胞外环境,作为介导致命的内毒素血症和脓毒症的一种晚期介质[2-5],在全身性炎症及脓毒症的发生、发展中起重要作用。

而且它提供了临床干预炎症进展的较宽的窗口期,而针对其他炎症因子,如TNF的临床干预窗口期很窄。因此,该分子成为防治全身性炎症及脓毒症的措施中极具吸引力的一个重要靶标。本实验在已成功克隆和表达人HMGB1分子的基础上,利用基因工程技术,借助一步反向PCR致突变法构建人HMGB1 cDNA的6个突变体并分别克隆于原核表达载体pQE-80L,制备6个相应的重组HMGB1突变体蛋白,以便进一步根据各突变体蛋白与受体结合情况及其致炎效应,筛选出只与受体结合而不能诱发炎症反应的突变

基金项目:国家自然科学基金(30400469)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400469)

作者简介:陈 婧(1982-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事晚期致炎因子HMGB1方面的研究。电话:(023)68759128

通讯作者:袁志强,电话:(023)68754176
彭毅志,电话:(023)68754175

收稿日期:2006-09-08;**修回日期**:2006-10-31

体。本研究旨在设计、制备 HMGB1 突变体蛋白，通过与天然 HMGB1 竞争结合相应受体而抑制其致炎效应，有望为抗炎治疗提供新型候选制剂，而且有助于揭示 HMGB1 分子发挥作用的关键区域，为深入阐明 HMGB1 的作用机制提供新的有力依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　标本、菌种和质粒　　人新鲜扁桃体组织取自西南医院耳鼻咽喉科临床手术切除的扁桃体；质粒 pUC18，大肠杆菌 JM109、DH5α 由本室保存，pQE-80L 购自 Qiagen 公司。

1.1.2　引物及主要试剂　　PCR 引物由上海生工公司合成；Tripure RNA 提取试剂（Roche 公司）；RT-PCR 试剂盒（Promega 公司）；限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶（Promega 公司）；PCR 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒（Omega 公司）；突变试剂盒（TaKaRa 公司）；羊抗人 HMGB1 抗体（Santa Cruz 公司）；HRP 标记的鼠抗羊 IgG（华美公司）；浓缩 DAB 显色液（北京中同生物技术有限公司）；硝酸纤维素膜（Roche 公司）。

1.2　方法

1.2.1　人 HMGB1 的克隆　　取人新鲜扁桃体组织，按 Tripure 试剂盒说明提取细胞总 RNA，经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性，经紫外分光光度计测定其浓度。RT-PCR 扩增人 HMGB1 cDNA，基因片段大小为 648 bp。根据 GenBank 中编码人 HMGB1 的 cDNA 序列，设计 1 对特异性引物：上游 P1：5′-GCGGTACCATGGGCAAAGGAGATCCT-3′，下游 P2：5′-GCAAGCTTTTATTCATCATCATCATC-3′，其中 P1 的 5′端引入 *Kpn* Ⅰ酶切位点，P2 的 5′端引入 *Hind* Ⅲ酶切位点。RT-PCR 按试剂盒说明进行。纯化回收 RT-PCR 产物。将 RT-PCR 产物及载体 pUC18 经 *Hind*Ⅲ + *Kpn* Ⅰ双酶切后，分别用纯化试剂盒进行回收，按常规条件于 16 ℃连接 12 h，将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞，经蓝白筛选获得阳性重组子，提取质粒，经 *Hind*Ⅲ + *Kpn* Ⅰ酶切鉴定获得重组质粒（命名为 pUC18/HMGB1）。然后由上海生工公司进行序列测定。

1.2.2　人 HMGB1 突变体的构建　　Li 等[6] 通过突变的方法发现 HMGB1 B box 中的前 20 个氨基酸，即 HMGB1 全长中 89 ~ 108 位氨基酸是发挥促炎作用的关键功能区域。因此，本实验将对 HMGB1 89 ~ 108 位氨基酸进行突变。关于一步反向 PCR 致突变法构建人 mHMGB1 cDNA 的简要过程如下：①在待突变部位的两侧沿相反方向设计 1 对引物；针对单纯缺失突变，使上游或下游引物 5′端的起点向相应的 3′端移动待缺失长度；针对单纯置换突变，则将拟用作置换的序列直接设计在上游或下游引物的 5′端；针对既有缺失又有置换的联合突变，则在使上游或下游引物的 5′端的起点向相应的 3′端移动待缺失长度的同时，将拟用作置换的序列设计在上游或下游引物 5′端。②以克隆有人 HMGB1 cDNA 的环行质粒（载体是 pUC18）为模板，利用高保真 DNA 聚合酶扩增包括载体在内的重组 DNA 分子。③对 PCR 产物进行 5′末端磷酸化。④在 DNA 连接酶的作用下完成分子的自身环化并转化大肠杆菌。⑤挑取转化细菌单克隆扩增培养，分别提取各克隆来源的重组质粒并对其中的克隆片段进行 DNA 序列测定，从中筛选出含有目的突变的重组子，即含有目的 mHMGB1 cDNA 的重组质粒，经 *Hind*Ⅲ/*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定阳性克隆，然后由上海英骏公司进行序列测定，重组质粒分别命名为：pUC18/HMGB1 M1，pUC18/HMGB1 M2，pUC18/HMGB1 M3，pUC18/HMGB1 M4，pUC18/HMGB1 M5，pUC18/HMGB1 M6。根据突变位点设计引物如下。

（1）HMGB1 M1：以两个甘氨酸替换 96 ~ 99 四个氨基酸“KRPP”。上游引物 1：5′-GGAGGATCGGCCTTCTTCCT -3′；下游引物 1：5′-GGGTGCATTGGGATCCTTG-3′。

（2）HMGB1 M2：以两个甘氨酸替换 102 ~ 105 4 个氨基酸“FFLF”。上游引物 2：5′-GGAGGATGCTCTGAGTATCGC-3′；下游引物 2：5′-GGCCGAAGGAGGCCTCTT-3′。

（3）HMGB1 M3：以两个甘氨酸替换 94 ~ 99 6 个氨基酸“APKRPP”。上游引物 3：5′-GGAGGATCGGCCTTCTTCCT-3′；下游引物 3：5′-ATTGGGATCCTTGAACTTCTTTT-3′。

（4）HMGB1 M4：以两个甘氨酸替换 100 ~ 105 6 个氨基酸“SAFFLF”。上游引物 4：5′-GGAGGATGCTCTGAGTATCGCC-3′；下游引物 4：5′-AGGAGGCCTCTTGGGTGCA -3′。

（5）HMGB1 M5：以两个甘氨酸替换 89 ~ 93 5 个氨基酸“FKDPN”。上游引物 5：5′-GGAGGAGCACCCAAGAGGC-3′；下游引物 5：5′-CTTCTTTTTTGTCTCCCCTTTG-3′。

（6）HMGB1 M6：缺失掉 107 ~ 108 两个氨基酸“SE”。上游引物 6：5′-TATCGCCCAAAAATCAAAGGA-3′；下游引物 6：5′-GCAGAAGAGGAAGAAGGCCG -3′。

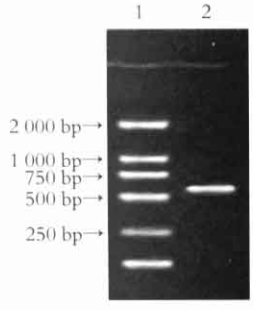
1.2.3　表达载体的构建及目的蛋白表达　　将测序正确的 pUC18/HMGB1、pUC18/HMGB1 M1、pUC18/HMGB1 M2、pUC18/HMGB1 M3、pUC18/HMGB1 M4、pUC18/HMGB1 M5、pUC18/HMGB1 M6 经 *Kpn* Ⅰ/*Hind*Ⅲ双酶切，回收目的片段并连接于原核表达载体 pQE-80L。将重组原核表达载体转化至大肠杆菌 DH5α，经质粒提取和 *Kpn* Ⅰ/*Hind*Ⅲ双酶切鉴定得到重组原核表达载体，分别命名为：pQE-80L/HMGB1、pQE-80L/HMGB1 M1、pQE-80L/HMGB1 M2、pQE-80L/HMGB1 M3、pQE-80L/HMGB1 M4、pQE-80L/HMGB1 M5、pQE-80L/HMGB1 M6。挑取含重组原核表达载体的单个菌落接种于 LB 培养基（含 50 mg/L 氨苄青霉素），37 ℃培养过夜后，按 2% 接种于新鲜的 LB 培养基（含 50 mg/L 氨苄青霉素），37 ℃继续培养至 $D(600)$ 约为 0.7，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，诱导 4 h 后，离心收菌，行 SDS-PAGE（分离胶 120 g/L，积层胶 50 g/L）。

1.2.4　目的蛋白的鉴定（Western blotting）　　其简要步骤是：将诱导表达的产物先行 SDS-PAGE，然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜（NC 膜）上，取下 NC 膜短暂漂洗后用丽春红染膜，待蛋白标准条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干，用记号笔标记蛋白标准各条带，继而经漂洗去除用丽春红，然后依次经50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h，与羊抗人 HMGB1 单抗孵育1 h，与 HRP 标记的鼠抗羊 IgG 孵育 1 h，每步完成后均严格洗膜，最后加 DAB 避光显色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 HMGB1 的 cDNA

扩增产物行电泳后，可见清晰条带，片段大小约为 648 bp（图1）。

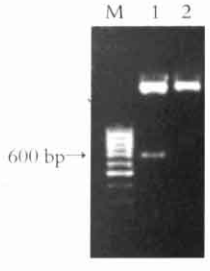


1：DNA 标准（DL2000）；2：编码人 HMGB1 的 cDNA

图1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 人 HMGB1 的克隆

RT-PCR 产物与 pUC18 载体连接后，经蓝白斑筛选及 *Kpn* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切鉴定阳性克隆，行琼脂糖凝胶电泳，可见大小约为 648 bp 的目的片段（图2）。

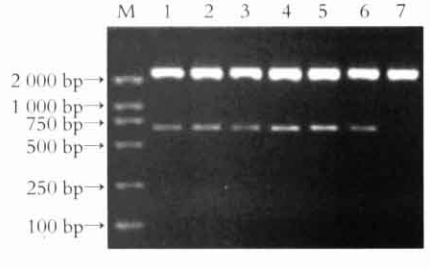


M：DNA 标准；1：pUC18/HMGB1；2：pUC18

图2 重组质粒的酶切鉴定

2.3 人 HMGB1 突变体的构建

以质粒 pUC18/HMGB1 为模板，采用一步反向 PCR 致突变法构建6个突变体，经 *Kpn* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切，电泳显示相应大小的各种突变体片段，阳性重组质粒经测序进一步验证，插入方向及阅读框均正确（图3）。

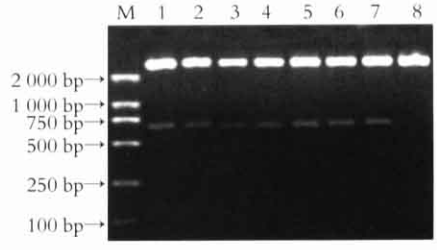


M：标准（DL2000）；1：pUC18/HMGB1 M1；2：pUC18/HMGB1 M2；3：pUC18/HMGB1 M3；4：pUC18/HMGB1 M4；5：pUC18/HMGB1 M5；6：pUC18/HMGB1 M6；7：pUC18

图3 HMGB1 突变体的酶切鉴定

2.4 原核表达载体的构建

将序列正确的 HMGB1 各突变体分别克隆于原核表达载体 pQE-80L，得到重组原核表达质粒，经 *Kpn* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双经酶切鉴定阳性重组质粒，电泳显示相应大小的目的片段（图4）。

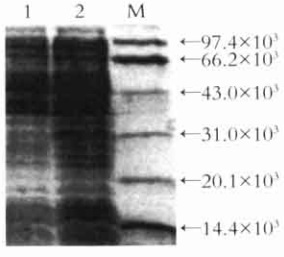


M：标准（DL2000）；1：pQE-80L/HMGB1 M1；2：pQE-80L/HMGB1 M2；3：pQE-80L/HMGB1 M3；4：pQE-80L/HMGB1 M4；5：pQE-80L/HMGB1 M5；6：pQE-80L/HMGB1 M6；7：pQE-80L/HMGB1；8：pQE-80L

图4 原核表达载体的酶切鉴定

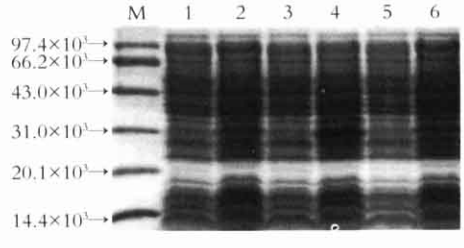
2.5 重组蛋白的表达与鉴定

重组原核表达载体转化至大肠杆菌 DH5α 后，以 IPTG 诱导表达，对细胞裂解液进行 SDS-PAGE，结果显示重组目的蛋白在约 30×10^3 处有一条带，与预期结果一致（图5～7）。



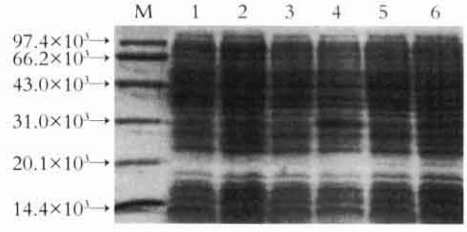
1：pQE-80L/HMGB1 M1 未经 IPTG 诱导；2：pQE-80L/HMGB1 M1 经 IPTG 诱导后；M：标准

图5 重组 M1 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析



M：标准；1：pQE-80L/HMGB1 M2 未经 IPTG 诱导；2：pQE-80L/HMGB1 M2 经 IPTG 诱导后；3：pQE-80L/HMGB1 M3 未经 IPTG 诱导；4：pQE-80L/HMGB1 M3 经 IPTG 诱导后；5：pQE-80L/HMGB1 M4 未经 IPTG 诱导；6：pQE-80L/HMGB1 M4 经 IPTG 诱导后

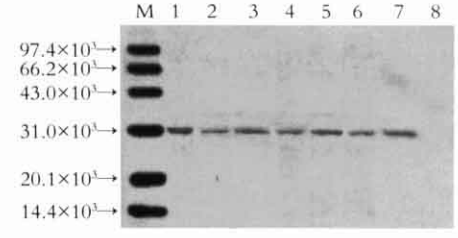
图6 重组 M2、M3、M4 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析



M：标准；1：pQE-80L/HMGB1 M5 未经 IPTG 诱导；2：pQE-80L/HMGB1 M5 经 IPTG 诱导后；3：pQE-80L/HMGB1 M6 未经 IPTG 诱导；4：pQE-80L/HMGB1 M6 经 IPTG 诱导后；5：pQE-80L/HMGB1 未经 IPTG 诱导；6：pQE-80L/HMGB1 经 IPTG 诱导后

图 7　重组 M5、M6、HMGB1 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Western blot 分析显示，经 IPTG 诱导的含重组原核表达载体 pQE-80L/HMGB1、pQE-80L/HMGB1 M1、pQE-80L/HMGB1 M2、pQE-80L/HMGB1 M3、pQE-80L/HMGB1 M4、pQE-80L/HMGB1 M5、pQE-80L/HMGB1 M6 的菌体裂解物能与抗人 HMGB1 单抗特异性反应，在约 30×10^3 处呈现一条带，说明所表达的重组蛋白的确是目的蛋白（图 8）。



M：标准；1：pQE-80L/HMGB1 M1 经 IPTG 诱导；2：pQE-80L/HMGB1 M2 经 IPTG 诱导后；3：pQE-80L/HMGB1 M3 经 IPTG 诱导；4：pQE-80L/HMGB1 M4 经 IPTG 诱导后；5：pQE-80L/HMGB1 M5 经 IPTG 诱导；6：pQE-80L/HMGB1 M6 经 IPTG 诱导后；7：pQE-80L/HMGB1 经 IPTG 诱导后；8：对照 pQE-80L 空载体

图 8　重组蛋白的 Western blot 分析

3　讨论

已有研究表明细胞外的 HMGB1 能引起炎症反应，参与感染和炎症的病理进程[7-9]。最近，HMGB1 被证明是一种全身炎症反应晚期炎症介质[4]。虽然在全身炎症反应中组织损伤和器官衰竭的发病机制是一个很复杂的过程，不能归结为某一个因素，但是一些研究表明对于与炎症脓毒症有关的致死性多器官功能衰竭，HMGB1 是一个必需的重要的中间介质[9-11]。因此，HMGB1 有望成为炎症治疗的新的靶标。

本实验旨在通过基因工程技术构建 HMGB1 的 6 个突变体，目前已成功表达并鉴定了 6 个突变体蛋白。以后的研究将从中筛选出只能与 HMGB1 受体结合，没有致炎效应的突变体，通过竞争性抑制的作用达到抗炎的作用，对研究新型炎症晚期抗炎制剂有一定的意义。

参考文献：

[1] Goodwin G H, Sanders C, Johns E W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids[J]. Eur J Biochem, 1973, 38(1): 14-19.

[2] Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, *et al*. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation[J]. J Immunol, 2000, 165(6): 2950-2954.

[3] Czura C J, Wang H, Tracey K J. Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine[J]. J Endotoxin Res, 2001, 7(4): 315-321.

[4] Wang H, Bloom O, Zhang M, *et al*. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425): 248-251.

[5] Yang H, Wang H, Tracey K J. HMG-1 rediscovered as a cytokine[J]. Shock, 2001, 15(4): 247-253.

[6] Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, *et al*. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1[J]. Mol Med, 2003, 9(1-2): 37-45.

[7] Ulloa L, Batliwalla F M, Andersson U, *et al*. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokine, and potential therapeutic target in arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(4): 876-881.

[8] Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 331-342.

[9] Ulloa L, Tracey K J. The "cytokine profile": a code for sepsis[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(2): 56-63.

[10] Riedemann N C, Guo R F, Ward P A. Novel strategies for the treatment of sepsis[J]. Nat Med, 2003, 9(5): 517-524.

[11] Wang H, Czura C J, Tracey K J. Lipid unites disparate syndromes of sepsis[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 124-125.

（编辑　陈聪连）

《第三军医大学学报》的总被引频次和影响因子持续升高

2006 版中国科技期刊引证报告（核心版）的数据显示，《第三军医大学学报》2005 年度的总被引频次为 1477 次（2004 年度为 1226 次），位列 1652 种统计源期刊的 116 位；影响因子为 0.381（2004 年度为 0.333），位列 1652 种统计源期刊的 642 位。在 42 种医科大学学报中，《第三军医大学学报》的总被引频次位列第二，影响因子位列第九。