DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.013
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
878 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)10-0878-04

NF-κB p50和p65蛋白保守结构域原核表达系统的建立

李生茂,梁华平,徐 祥,刘东擘,沈利群,蒋 琴,胡承香 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 为了获得具有DNA结合活性的人NF-κB p50和p65蛋白,建立人NF-κB p50和p65蛋白保守结构域的原核表达系统。方法 通过PCR法扩增获得人NF-κB p50和p65蛋白保守结构域的cDNA,后分别将其克隆到原核表达载体pET-22b(+)上,转化*E. coli* BL-21,经诱导表达及包涵体的变性和复性处理,获得可溶性p50和p65,同时用Western-Blot鉴定NF-κB p50和p65蛋白的表达,EMSA实验检测NF-κB p50和p65蛋白的DNA结合活性。结果 构建了pET-22b/p50和pET-22b/p65原核表达质粒;p50、p65蛋白在大肠杆菌中的表达均为包涵体;变性、复性后得到了可溶性p50和p65蛋白,浓度达218 μg/ml和158 μg/ml;并证实可溶性p50和p65蛋白均具有DNA结合活性。结论 成功建立了pET-22b/p50和pET-22b/p65原核表达系统,获得了具有DNA结合活性的NF-κB p50和p65蛋白。

关键词:NF-κB;p50/p65;基因表达
中图法分类号:Q503;Q51;Q78 文献标识码:A

Establishment of prokaryotic expression system of Rel homology domain of human NF-κB p50 and p65 proteins

LI Sheng-mao, LIANG Hua-ping, XU-Xiang, LIU Dong-bo, SHEN Li-qun, JIANG-Qin, HU Cheng-xiang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To obtain soluble human NF-κB p50 and p65 proteins having DNA binding ability and to establish the prokaryotic expression system of NF-κB p50 and p65 proteins Rel homology domain (RHD). **Methods** The cDNA of NF-κB p50 and p65 RHD, obtained by using PCR technology, was cloned on prokaryotic expression vectors pET-22b (+) plasmids and expressed in *Escherichia coli* BL-21. The soluble p50 and p65 were obtained after inclusion bodies were denaturalized and renatured. Consequently, the expression of NF-κB p50 and p65 proteins was identified by Western blotting and their DNA binding bioactivity was confirmed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** pET-22b/p50 and pET-22b/p65 were correctly constructed. The p50 and p65 proteins were expressed as inclusion bodies in the precipitation, and their expression levels accounted for 30.2% and 24.2% of total bacterial proteins, respectively. Concentrations of soluble protein, obtained by denaturalizing and renaturing, were 218 μg/ml and 158 μg/ml, respectively. DNA binding bioactivity of the p50 and p65 proteins was identified. **Conclusion** pET-22b/p50 and pET-22b/p65 prokaryotic expression systems are successfully constructed, and NF-κB p50, p65 proteins with DNA binding ability are obtained.

Key words: NF-κB; p50/p65; gene expression

核因子-κB (NF-κB)是一类重要的转录因子,是多信号转导途径的汇聚点,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和致病过程密切相关。因此,许多国内外学者最近提出NF-κB是极具潜力的新型抗炎靶点,以其作为抗炎靶点的研究成为目前的研究热点[1~4]。为了筛选NF-κB的拮抗剂,必需首先获得高纯度并具有生物学活性的NF-κB蛋白。DNA结合活性是转录因子的基本生物学活性,

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203);国家自然科学基金资助项目(30080009;30200270);全军医学科研"十五"计划面上项目(01MB113)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203), the National Natural Science Foundation of China (30080009; 30200270), and the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01MB113)
作者简介:李生茂(1970-),男,青海省西宁市人,硕士研究生,主治医师,主要从事创伤后感染免疫方面的研究。现在武警青海总队医院外科工作。电话:(023)68757431
通信作者:梁华平,电话:(023)68757964,E-mail:huapingliang@hotmail.com
收稿日期:2004-03-01;修回日期:2004-05-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

如果能够特异地抑制转录因子的 DNA 结合活性, 既能达到抑制转录因子生物学活性的目的。而如果用全长 NF-κB 作为筛选靶标, 将增大筛选的工作量, 同时为抑制剂的鉴定工作带来困难。目前, 不能购买到仅具有 DNA 结合活性的 NF-κB 蛋白片段。据文献[5] 报道, 人 NF-κB p50 (1-333aa)和 p65 (1-367aa)的保守结构域即具有 DNA 结合活性。为此, 本研究欲将人 NF-κB p50 和 p65 的保守结构域 cDNA 片段克隆入原核表达载体, 用原核表达的方法获得可溶并具有 DNA 结合活性的 p50 和 p65 蛋白。

1　材料和方法

1.1　材料

菌株和载体: 大肠杆菌 DH5α、BL-21、pRSV- NF-κB 1(p50)、pRSV-RelA 质粒、原核表达载体 pET-22b(+)均由本室保存; pUCm-T 载体购自上海申能博采生物公司。

试剂: Ex *Taq* 酶、限性内切酶、DNA T_4 连接酶、PCR marker 均购自 TaKaRa 公司, 质粒抽提、DNA 胶回收、PCR 纯化试剂盒购自 Omega 公司, 兔抗人单克隆 NF-κB p50、NF-κBp65 抗体、HRP 酶标鼠抗兔抗体(SantaCruz, USA), T4 寡核苷酸激酶购于 Pharmacia 公司, poly(dI-dC)购自美国 Roch 公司, NF-κB 双链寡核苷酸探针 5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′; 3′-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5′及 PCR 引物均由上海申友公司合成, 测序由大连宝生物公司完成, 其它试剂均为国产或进口分析纯。

仪器: Gene Amp PCR system 2400 仪为 PE 产品, 破碎仪 UP 200 s 为 Dr. Hielscher GmbH 产品, 扫描仪为 Bio-Rad 产品。

1.2　p50, p65 保守结构域 cDNA 基因序列的扩增

NF-κB p50 和 p65 引物如下:

p50　P_1: GAATTCAATGGCAGAAGATGATCC

　　P_2: AAGCTTTCAGAGCTTCTGACGTTTCC

p65　P_1: CGGGATCCCATGGACGAACTGTTCCC

　　P_2: CGAAGCTTTCAAGCAATGCGTCGAGGTG

GAATTC、GGATCC、AAGCTT 分别为 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ酶切位点。以 pRSV-NF-κB_1(p50)、pRSV-RelA 质粒为模板, 行 PCR 扩增目的片段。PCR 产物行琼脂糖凝胶(15 g/L)电泳, 凝胶成像系统分析结果。

1.3　p50, p65 保守结构域 cDNA 表达载体的构建

上述 PCR 产物回收纯化后, 用 DNA T_4 连接酶与 pUCm-T 载体进行连接, 重组子用蓝白斑筛选, PCR、限制行内切酶分析鉴定正确后, 分别命名为 pUCm-T/p50 和 pUCm-T/p65。

将 pUCm-T/p50 和 pUCm-T/p65 分别用 *Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ + *Hind*Ⅲ酶切, 回收纯化目的片段后, 分别克隆入用相同限制性内切酶消化的 pET-22b(+)载体中, 重组子分别用 *Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ + *Hind*Ⅲ酶切鉴定, 后送大连宝生物公司测序, 并命名为 pET-22b/p50 和 pET-22b/p65。

1.4　p50 和 p65 蛋白的诱导表达

将构建成功的 pET-22b/p50 和 pET-22b/p65 表达载体转化至蛋白表达菌株 *E. coli* BL-21 中, 于 30 ℃, IPTG 浓度 0.4 mmol/L 条件下, 在 LB 培养基(100 mg/L 氨苄青霉素)中诱导 4 h 后, SDS-PAGE 鉴定蛋白表达, 同时作空菌、未诱导和空载体对照。

分析目的蛋白表达与诱导时间、诱导剂浓度和诱导温度的关系。在 30 ℃分别以 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 终浓度, 诱导 4 h 后, 检测表达量; 以 0.4 mmol/L 的 IPTG 为诱导浓度, 分别诱导 1、2、4 和 8 h 后, 检测表达量; 再分别以 28 ℃、30 ℃进行诱导表达, 观察诱导温度变化后是否有可溶性的 p50 和 p65 蛋白表达。

1.5　p50 和 p65 的大规模诱导表达、包涵体洗脱、变性和复性

各用 500 ml LB(100 mg/L 氨苄青霉素)以 0.4 mmol/L 的 IPTG 于 30 ℃诱导表达 4 h, 菌体超声破菌后离心, 分别用含 0.5% Triton 和 1.0、2.0、3.0、5.0 mol/L 的尿素缓冲液洗脱沉淀, 将洗脱后包涵体用变性液溶解(7 mol/L urea, 0.5 mol/L NaCl, 1.0 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L PMSF, 10 mmol/L βME and 25 mmol/L Tris-HCl, pH: 7.5)。然后用 8000 MWCO 的透析袋在含不同浓度尿素的上述溶液中进行梯度透析处理 24 h, 透析中换液多次, 最后以含 25 mmol/L Tris-HCl 和 20 mmol/L NaCl 的溶液透析 12 h, 至透析液总量达 4 L。回收透析袋内容物, 离心后上清行 SDS-PAGE 分析。并用 Bradford 法定量透析产物。

1.6　免疫蛋白印迹法(Western-Blot)分析 NF-κB p50 和 p65 蛋白表达

按文献[6] 方法进行。将得到的蛋白产物分别行 SDS-PAGE 电泳, 以每泳道 50 μg 上样, 电泳后, 电转移至硝酸纤维素滤膜上, 5%的脱脂奶粉封闭 30 min 后, 分别加入兔抗人多抗 NF-κB p50、NF-κB p65 (1∶1 000)反应 1~2 h, PBS 洗去未结合的一抗, 然后将膜置于 1∶2 500 的辣根过氧化物酶标记的 IgG(鼠抗兔)中反应 1 h, 用 PBS 充分洗涤后, 用增强型化学发光(ECL)显影药盒显影, X 光片记录影像。

1.7　EMSA 法检测蛋白活性

实验中, 有阳性、阴性、竞争 3 组, 即须同时设有核蛋白+标记 DNA、标记 DNA、核蛋白+标记 DNA+过量未标记竞争结合 DNA 这 3 个结合反应组。将 NF-κB 探针经[γ^{32}P] ATP 标记并进行纯化。取 10 μg 核蛋白加入至 5 μl 结合反应缓冲液中(125 mmol/L Hepes, pH: 7.9, 5 mmol/L EDTA, 25 mmol/L DTT, 750 mmol/L NaCl, 50% Glycerol), 加入 poly(dI-dC)(1 μg/μl) 2 μl, BSA 1.0 μl 最后加入 ddH_2O 12 μl, 室温孵育 15 min 后加入[γ^{32}P] ATP 标记的特异探针 2 μl, 室温孵育 30 min, 用 6% 非变性的聚丙烯酰氨凝胶电泳 2 h (200 V), 取胶, 烘干, 于−70 ℃放射自显影。

2　结果

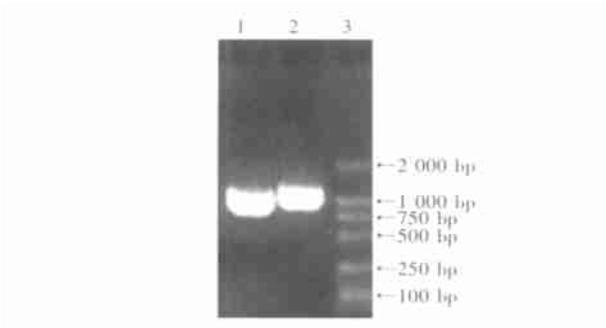
2.1　人 p50, p65 cDNA 的扩增

获得的 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳鉴定, 可见 p50 和 p65 分别在 1 100 bp 和 1 000 bp 处呈现与预期产物相对分子质量大小相符的 DNA 条带(图 1)。

2.2　p50, p65 cDNA 表达载体的构建与鉴定

将获得的 pET-22b/p50 和 pET-22b/p65 重组质粒用 *Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ + *Hind*Ⅲ进行酶切鉴定, 1.5% 琼脂糖电泳见有 1 100 bp 和 1 000 bp 的目的条带出现, 大小与我们的 PCR 产物一致(图 2)。进一步测序表明, pET-22b/p50 和 pET-22b/p65 中插入的序列与 Gene-Bank 中 p50, p65 的序列一致, 读码框架与设计相符。

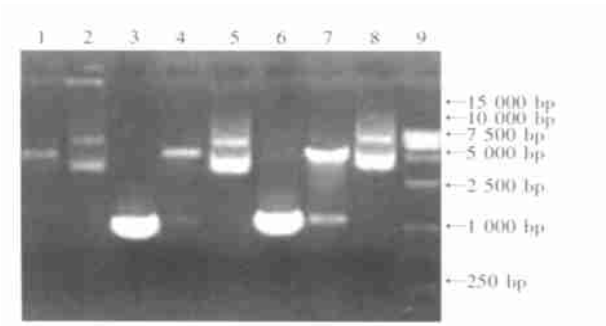
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: p65 cDNA; 2: p50 cDNA; 3: DNA marker DL2000

图1 p50/p65 cDNA PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of p50/p65 cDNA



1: pET-22b plasmid (*Eco*RⅠ + *Hind* Ⅲ); 2: pET-22b plasmid; 3: p65 cDNA PCR products; 4: pET-22b/p65 plasmid (*Bam*HⅠ + *Hind* Ⅲ); 5: pET-22b/p65 plasmid; 6: p50 cDNA PCR products; 7: pET-22b/p50 plasmid (*Eco*RⅠ + *Hind* Ⅲ); 8: pET-22b/p50 plasmid; 9. DNA marker DL15000

图2 酶切鉴定重组质粒 **pET-22b/p50** 和 **pET-22b/p65**

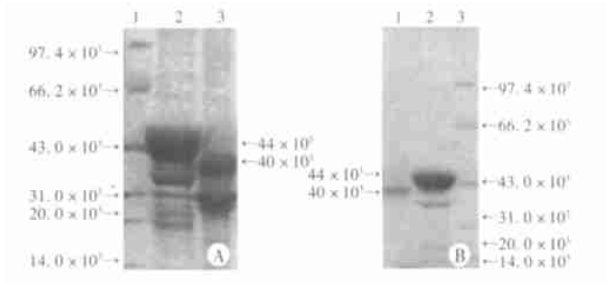
Fig 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmids pET-22b/p50 and pET-22b/p65

2.3 p50 和 p65 蛋白的诱导表达

从电泳结果观察, pET-22b/p50 和 pET-22b/p65 转化的菌株诱导后分别在约 44×10^3 和 40×10^3 处出现1条蛋白带, 与预期结果一致, 目的蛋白在 IPTG 浓度为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 时的表达没有发现明显差异, 表明一定范围内, 诱导剂浓度对蛋白表达没有影响, 最低诱导剂浓度为 0.1 mmol/L; 诱导后1、2 和4 h 时目的蛋白表达逐渐增多, 诱导表达量于4 h 处相对较高, p50 的表达明显比 p65 高。低温(28 ℃、30 ℃)进行诱导表达, 超声破菌后上清中无可溶性的目的蛋白表达, 说明 p50 和 p65 均以包涵体的形式表达。

2.4 p50 和 p65 包涵体的纯化、变性和复性

将大量诱导后的表达产物用 Triton X-100 洗涤3 次, 后分别以1、2、3、4、5 mol/L 的尿素溶液洗涤沉淀, 提高包涵体纯度。将洗涤后的沉淀溶于 7 mol/L 的尿素溶液, 后分别用含 5、4、3、2、1 mol/L 的尿素溶液阶梯透析 24 h, 最后以含 25 mmol/L Tris-HCl 和 20 mmol/L NaCl 的溶液透析 12 h, 得到可溶性的目的蛋白, SDS-PAGE 证实变性、复性处理后杂蛋白明显减少, 用 Bradford 法定量 p50 和 p65 蛋白浓度分别为 218 μg/ml 和 158 μg/ml (图3)。



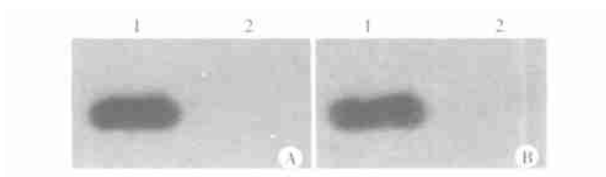
(A): 1: Protein molecular weight marker; 2: p50 protein inclusion bodies; 3: p65 protein inclusion bodies; (B): p50/p65 protein inclusion bodies after being denaturalized and naturalized; 1: p65 pr; 2: p50 protein; 3: Protein molecular weight marker

图3 **p50、p65** 蛋白包涵体变性复性后电泳图

Fig 3 SDS-PAGE analysis of the p50/p65 protein inclusion bodies after being denaturalized and naturalized

2.5 Western-Blot 杂交分析 NF-κB p50 和 p65 蛋白表达

Western-Blot 结果显示, 得到的 44×10^3 和 40×10^3 的蛋白分别被相应的抗 p50 和抗 p65 抗体所识别, 这说明获得的可溶性的蛋白是所需的目的蛋白(图4)。



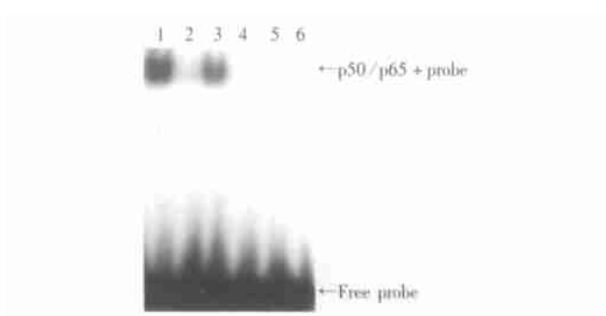
(A) 1: p50; 2: Control (pET-22b products); (B) 1: p65; 2: Control (pET-22b products)

图4 **Western blot** 鉴定 **p50、p65** 蛋白

Fig 4 Western blot analysis of p50/p65 protein

2.6 EMSA

凝胶阻滞实验结果显示我们的目的蛋白与标记探针结合组出现明显的滞后条带, 而单纯的标记探针组和加有过量的未标记探针组没有滞后条带出现(图5)。这说明我们得到的 p50 和 p65 蛋白能与特异性的 NF-κB 探针结合, 证实其具有生物活性。



1: p50+ labeled probe; 2: p50+ labeled probe+ superfluous unlabeled probe; 3: p65+ labeled probe; 4: p65+ labeled probe+ superfluous unlabeled probe; 5, 6: Labeled probe

图5 **EMSA** 鉴定 **p50、p65** 蛋白 **DNA** 结合活性

Fig 5 Electrophoretic mobility shift assay of DNA binding bioactivity of p50/p65

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

NF-κB 在免疫应答、炎症反应、病毒复制、细胞凋亡和增殖等多种细胞活动中起关键的作用。在哺乳动物细胞中, NF-κB 有 5 个家族成员: RelA (p65)、RelB、c-Rel、p50 (NF-κB$_1$)和 p52。它们的 N 末端均含有约 300 个氨基酸的 Rel 同源结构域(rel homology domain, RHD), 该结构域的主要功能为介导 Rel 蛋白与 DNA 间的特异性结合, 与 NF-κB 抑制蛋白家族成员相互作用和两亚基间的二聚体化作用, 并携有参与活化的 NF-κB 由细胞质向细胞核的转移的核定位信号[7]。NF-κB 通常以同源或异源二聚体的形式存在于几乎所有类型的细胞中, 其中以 p50/p65 异源二聚体形式最为常见。研究表明, NF-κB 可高效诱导 60 多种细胞因子、粘附分子、趋化因子和急性期反应蛋白基因的表达, 同时对参与炎症反应放大与延续的多种酶基因的表达也具有重要的调控作用。此外, 肿瘤、自身免疫性疾病、慢性炎性相关性疾病及某些神经性疾病等的发生、发展, 均与 NF-κB 的过度活化有着密切关系。因此, 以 NF-κB 为靶点, 筛选、研制其拮抗药物具有重要的理论意义和临床价值[8,9]。

针对 NF-κB 的主要拮抗策略有很多, 但迄今直接用于特异性抑制 NF-κB 与 κB 序列结合的多肽类拮抗剂除本研究小组外, 国内外少见其他报道。目前, 本小组已经从随机肽库中筛选出了多条与 NF-κB p50 和 p65 同源结构域有相互作用的多肽, 为进一步筛选与验证多肽与 NF-κB 的结合能力, 拟进行 Pull-down、Biosensor 等后续实验, 为此, 选用 NF-κB p50/p65 的同源保守结构域进行克隆表达, 获得具有 DNA 结合活性的 p50 和 p65 蛋白很有必要。

虽然, 原核表达的产物往往以包涵体形式存在, 但可以用变性复性的方法使蛋白进行重折叠, 恢复其天然结构。本实验中用 pRSV-NF-κB(p50)、pRSV-RelA 质粒为模版 PCR 扩增 p50 和 p65 的保守结构域 cDNA, 再与 pET-22b(+)表达载体连接, 成功构建了原核表达载体 pET-22b/p50 和 pET-22b/p65, 并在蛋白酶缺陷型的大肠杆菌 BL-21 中获得了高效表达。观察到目的蛋白以包涵体形式存在, 几乎没有找到可溶的目的蛋白。在 IPTG 0.4 mmol/L 条件下, 诱导 1 h 就可有目的蛋白表达, 4 h 达到完全表达, 一定范围内, 诱导剂浓度对蛋白表达没有影响, 最低诱导剂浓度为 0.1 mmol/L, 7 mol/L 尿素存在的条件下, 其包涵体溶解, 经变性复性处理后可得到可溶的活性蛋白, 蛋白定量后 p50, p65 蛋白浓度分别为 218 μg/ml 和 158 μg/ml。由于后续实验所需要的蛋白不必要有很高的纯度, 故没有进行蛋白的纯化工作。

NF-κB 的活性包括 DNA 结合活性和反式激活活性两种。用 NF-κB 报告基因分析法可检测其反式激活活性, 而凝胶迁移率分析显示的为其 DNA 结合活性。电泳迁移率改变实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA), 是目前研究序列特异性 DNA 结合蛋白的常用方法之一[10], 主要依据特异性 DNA 探针与核蛋白结合反应后在聚丙烯酰胺凝胶电泳, 观察有无滞后的游离 DNA 条带, 从而判断有无序列特异性 DNA 结合蛋白的存在。在本实验中过量未标记 DNA 片段能竞争结合标记片段, 提示核蛋白-标记 DNA 复合物滞后条带具有特异性。

综上所述, 我们成功地构建了人 p50 和 p65 基因原核表达质粒, 并制备了高纯度的具有 DNA 结合活性的 p50 和 p65 蛋白, 从而为进一步研究 NF-κB 的生物学功能和筛选与 NF-κB 相互作用的功能活性多肽的 Pull-down、Biosensor 等后续实验提供了充足的蛋白来源。

参考文献:

[1] Hoffmann A, Levchenko A, Scott M L, *et al*. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation[J]. Science, 2002, 298(5596): 1241－1245.

[2] Lin L, Spoor M S, Gerth A J, *et al*. Modulation of Th1 activation and inflammation by the NF-kappaB repressor Foxj1[J]. Foxj1. Science. 2004, 303(5660): 1017－1020.

[3] Lopez-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, *et al*. Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis[J]. Am J Pathol, 2002, 161(4): 1497－1505.

[4] Yamamoto Y, Gaynor R B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer[J]. J Clin Invest, 2001, 107(2): 135－142.

[5] Chen F E, Kempiak. S, Huang D B, *et al*. Construction, expression, purification and functional analysis of recombinant NF-κB p50/p65 heterodimer[J]. Protein Eng, 1999, 12(5): 423－428.

[6] F. 奥斯伯, 金斯顿, J. G. 塞德曼等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 366－376.

[7] Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-κB[J]. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10: 405－455.

[8] 徐　祥, 梁华平, 刘　昕, 等. p65 DNA 结合域的克隆、表达及其酵母双杂交自身激活作用检测[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 123－126.

[9] Chen FE, Huang DB, Chen YQ, *et al*. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-κB bound to DNA[J]. Nature, 1998, 391(6665): 410－413.

[10] 梁国栋. 最新分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 4－6.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net