DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.014
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)02-0123-04

论著

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

徐 祥[1],梁华平[1],刘 昕[2],代佳平[2],刘 琛[1],罗 艳[1],王正国[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所第一研究室,重庆 400042;[2]基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 获得NF-κB p65亚基DNA结合域cDNA及构建酵母双杂交系统中的靶基因,并检测靶基因的表达和自身激活活性。方法 利用引物二聚体搭桥技术,扩增p65亚基DNA结合域基因片段,并将其克隆入酵母双杂交载体pGBKT7 DNA-BD。应用醋酸锂法转化酵母细胞AH109,在SD/-Trp选择培养基上培养,观察转化株的生长情况。按尿素/SDS法抽提酵母蛋白,用SDS-PAGE电泳和Western-blot鉴定靶蛋白在酵母细胞中的表达。利用液相法和平板法检测阳性转化株β-半乳糖苷酶的活性。结果 获得p65 DNA结合域基因片段,并成功构建酵母双杂交系统中的靶基因。靶基因能在酵母细胞中表达,对酵母细胞无毒性作用,无自身激活活性。结论 NF-κB p65亚基DNA结合域可作为酵母双杂合系统中的靶基因,用于肽库筛选,捕捉与之相互作用的多肽。

关键词:核因子-κB;p65;酵母双杂交;自身激活作用;酵母表达
中图法分类号:Q785;Q786;R379 文献标识码:A

Cloning and expression of NF-κB p65 subunit DNA binding domain and detection of its self-activation in the yeast two-hybrid system

XU Xiang, LIANG Hua-ping, LIU Xin, DAI Jia-ping, LIU Chen, LUO Yan, WANG Zheng-guo (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To obtain NF-κB p65 subunit DNA binding domain cDNA, and measure its autonomous activation in yeast two-hybrid system. **Methods** After the fragment of NF-κB p65 subunit DNA binding domain was amplified with primer dimer bridge building, it was inserted into pGBKT7 DNA-BD vector (named as pGBKT7 DNA-BD/p65). After being automatically sequenced, the recombinant plasmid was transformed into yeast cells AH109 with polyethylene glycol/lithium acetate method, and the growth of transformants were observed in the SD/-Trp selective medium. After the yeast total protein was extracted by using Urea/SDS method, the expression of pGBKT7 DNA-BD/p65 in the yeast cells was identified with SDS-PAGE and western-blotting. β-galactosidase activity of positive clones was tested with liquid assay and plate assay respectively. **Results** NF-κB p65 subunit DNA binding domain cDNA was obtained, and inserted into pGBKT7 DNA-BD vector successfully. NF-κB p65 subunit DNA binding domain was expressed in the AH109 cells, but had neither ability of autonomous reporter gene activation, nor toxicity to the yeast cells. **Conclusion** NF-κB p65 subunit DNA binding domain can serve as target gene of yeast two-hybrid system used in screening of polypeptide library to trap the protein interacting with it.

Key words: NF-κB; p65; yeast two-hybrid system; autonomous activation; expression in yeast cells

核因子-κB(NF-κB),作为一种普遍存在的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,不仅参与介导了免疫应答、病毒复制、细胞凋亡和增殖的多种基因的表达调控,而且在调节炎症反应的基因中起关键作用[1]。故许多学者认为NF-κB是一个新型抗炎靶点。从理论上讲,如能有效拮抗NF-κB的活化,则可起到以一当十、事半功倍的抗炎效果[2]。NF-κB几乎存在于所有细胞中,系由两种Rel家族蛋白构成的二聚体蛋白质。由p50和p65亚基形成的异源二聚体是NF-κB的典型代表,是NF-κB所有形式中最重要的一种。此异二聚体的氨基末端可构成1个环状结构域,由其介导与DNA碱基特异性结合[3]。因此,本研究拟扩增人p65亚基DNA结合域,并克隆入酵母双杂交系统的pGBKT7 DNA-BD载体,转化酵母细胞AH109,检测GAL4 DNA-BD/p65融合蛋白能否在酵母细胞中表达,证实p65 DNA结合域有无自身激活活性和对酵母细胞有无毒性作用。为进一步利用酵母双杂交技术筛选NF-κB相

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);重庆市科委基金资助项目(2000-6319)
作者简介:徐 祥(1972—),男,云南省昆明市人,硕士,助理研究员,主要从事创伤后炎症、免疫和感染发生机制方面的研究。电话:(023)68757431
收稿日期:2001-01-05;修回日期:2001-09-05

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

互作用多肽打下基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

SD、Trp-Do Supplement、Leu-Do Supplement、YPD、DMSO、兔抗c-Myc单克隆抗体为Clontech公司产品。胰蛋白胨、酵母提取物为Oxoid公司产品。X-gal、PEG4000、鲑鱼精DNA为Sigma公司。内切酶、T4连接酶和质粒抽提试剂盒购自罗氏公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种和质粒

$pGBKT_7$ DNA-BD、$pGBKT_7$-Lam、PCL-1质粒和AH109酵母菌株为Clontech公司产品。*E. coli* DH5α由第三军医大学分子遗传学教研室提供。

1.3 扩增p65 DNA结合域基因片段

根据GenBank公布的p65核苷酸序列及其基因的功能结构域分析，设计一对3′端有12个碱基互补的引物对，分别在上游引物和下游引物5′端加入*Nde*Ⅰ和*Pst*Ⅰ酶切位点和酶切保护碱基，在上引物酶切位点后引入3个甘氨酸密码子。引物序列如下，长度分别为93 bp和84 bp。北京塞百盛公司合成，PAGE方式纯化。扩增方法见文献[4]，PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

p1: 5′-ggaattccatatgggcggcggagagcagcccaagcagcggggcatgcgctt ccgctacaagtgcgaggggcgctccgcgggcag**catcccagg**-3′

p2: 3′-**gtcgtaggg**ccgctctcctcgtgtctat ggtggttctgggtgggtggtagttctagttaccgatgtgtcctggacgtcaacc-5′

1.4 p65 DNA结合域基因片段的克隆和测序

PCR产物回收纯化后，用限制性内切酶*Nde*Ⅰ和*Pst*Ⅰ进行双酶切，与用相同内切酶消化的$pGBKT_7$ DNA-BD载体片段按分子比3∶1(mol/mol)的比例，在T4 DNA连接酶催化下，4 ℃连接16~18 h，转化*E. coli* DH5α感受态细胞，将转化液涂布于含100 μg/ml卡那霉素的LB琼脂板上，37 ℃孵育过夜。随机挑取单个克隆，增菌后，以碱裂解法提取重组质粒，用*Hind*Ⅲ，*Pst*Ⅰ酶切鉴定。重组质粒的核苷酸序列测定由上海基康公司完成。

1.5 重组质粒转化酵母细胞AH109

采用醋酸锂法制备酵母AH109感受态细胞。取阳性重组质粒$pGBKT_7$ DNA-BD/p65、载体质粒$pGBKT_7$ DNA-BD、阳性对照质粒pCL-1和阴性对照质粒$pGBKT_7$-Lam 0.1 μg，分别加0.1 mg鲑精DNA后与100 μl酵母感受态细胞混合，热休克细胞15 min，将对照质粒pCL-1转化液涂布SD/-Leu固体培养板，其它转化液涂布SD/-Trp固体培养板，30 ℃倒置培养2~3 d，进行营养缺陷筛选。

1.6 DNA-BD/p65融合蛋白表达检测

按尿素/SDS法抽提AH109空菌、$pGBKT_7$ DNA-BD质粒转化菌和$pGBKT_7$ DNA-BD/p65质粒转化菌的酵母蛋白，样品进行12%的SDS-PAGE电泳，一半做考马斯亮蓝染色检测融合蛋白表达。另一半电泳转移至PVDF膜上，以兔抗标签c-Myc的单克隆抗体为一抗，羊抗兔IgG/HRP为二抗进行Western-blot，化学发光法显影鉴定重组蛋白的表达。

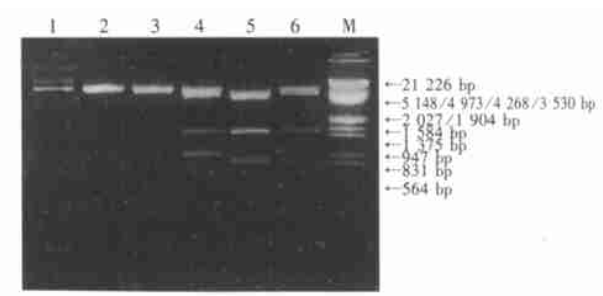
1.7 p65 DNA结合域自身激活作用检测

采用β-半乳糖苷酶克隆滤膜影印法(液相法)分析p65 DNA结合域自身激活作用。各挑取4~5个含阳性对照质粒pCL-1、阴性对照质粒$pGBKT_7$-Lam和重组质粒$pGBKT_7$ DNA-BD/p65的酵母菌落，点在滤纸上，置入液氮5 s裂菌，再将滤纸放入含X-gal和β-巯基乙醇的Z缓冲液中显色30~60 min，观察显色结果。同时，利用平板诱导试验检测β-半乳糖苷酶的表达，即将菌落接种于含X-gal的诱导培养基SD/Gal/Raf/-Leu(阳性对照)和SD/Gal/Raf/-Trp(重组质粒和阴性对照)上，30℃倒置培养2~3 d，观察菌落颜色变化。

2 结果

2.1 p65 DNA结合域基因片段的扩增及克隆鉴定

人p65亚基DNA结合域基因片段约135 bp。因其片段较小，与DNA-BD蛋白融合后，其空间构型可能被较大的DNA-BD蛋白覆盖，影响肽库的筛选，因此在基因片段上游引入3个甘氨酸密码子，增加连接连的柔性。加上酶切位点和保护碱基，PCR扩增片段约长165 bp。PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定，可见一条的清晰带，大小与预计片段165 bp相符。胶回收PCR产物，酶切纯化后，与$pGBKT_7$ DNA-BD载体连接。重组质粒经*Hind*Ⅲ酶切，阳性重组质粒可切出984 bp DNA片段的滞后带，见图1。



1: pGBKT7 DNA-BD with *Pst*Ⅰ digestion; 2: Recombinant plasmid with *Pst*Ⅰ digestion; 3: Recombinant plasmid with *Pst*Ⅰ digestion; 4: $pGBKT_7$ DNA-BD with *Hind*Ⅲ digestion; 5: Recombinant plasmid with *Hind*Ⅲ digestion; 6: Recombinant plasmid with *Hind*Ⅲ digestion; M: Lamda DNA/*EcoR*Ⅰ + *Hind*Ⅲ Marker

图1 重组质粒**$pGBKT_7$ DNA-BD/p65**的酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant plasmid $pGBKT_7$ DNA-BD/p65

2.2 p65 DNA结合域基因片段核苷酸序列测定

将酶切鉴定正确的重组质粒测序，测序结果与模板序列进行比较，证明基因片段与模板序列吻合。读码框正确。

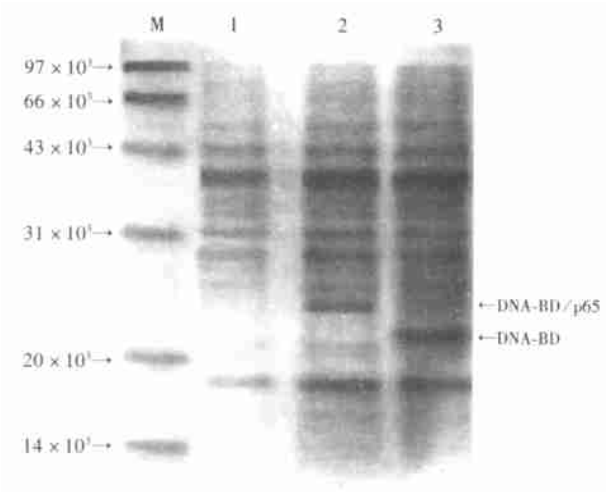
2.3 重组质粒转化酵母细胞及融合基因的表达鉴定

2.3.1 重组质粒和对照质粒转化酵母细胞 阳性对照质粒pCL-1为一含蓝白筛选报告基因的质粒，能激活报告基因β-半乳糖苷酶的表达。同时含亮氨酸缺陷筛选基因，转化后的酵母菌在SD/-Leu培养基平板上生长良好；重组质粒$pGBKT_7$ DNA-BD/p65、载体质粒$pGBKT_7$ DNA-BD和阴性对照质粒$pGBKT_7$-Lam含色氨酸缺陷筛选基因，转化后的酵母菌在SD/-Trp上生长良好，表明p65 DNA结合域的表达对酵母细胞无毒性作用。

2.3.2 Gal4 DNA-BD/P65融合蛋白在酵母菌中表达及SDS-PAGE鉴定 SDS-PAGE电泳结果见图2。阳性菌在大约26×10^3处，空载体菌在大约22×10^3处的蛋白带与宿主菌蛋白带有区别，此有差异的蛋白带分子量大小与DNA-BD和DNA-BD/P65

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

融合蛋白分子量大小相符。利用 Bio-Rad Gel Doc 凝胶扫描系统扫描, Quantity One 软件分析结果表明, 融合蛋白的表达量约占总蛋白量的 5%。

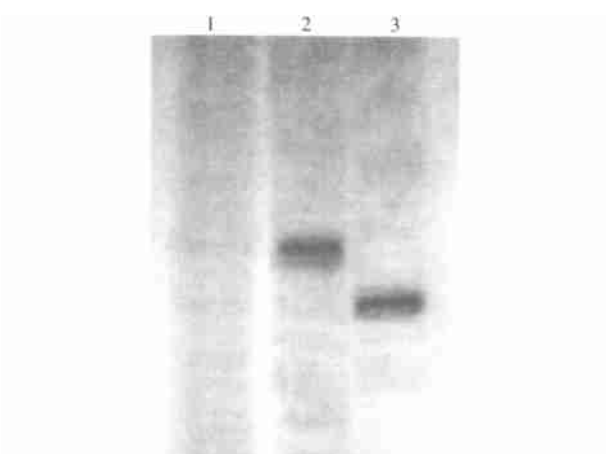


M: Marker of relative molecular weights; 1: Normal AH109 cells; 2: $pGBKT_7$ DNA-BD/p65; 3: $pGBKT_7$ DNA-BD transformant

图 2　SDS-PAGE 鉴定 Gal4 DNA-BD/P65 融合蛋白表达

Fig 2　SDS-PAGE for Gal4 DNA-BD/p65 fusion protein

2.3.3　重组融合蛋白的 Western-blot 鉴定　Western-blot 结果见图 3。空载体菌在大约 22×10^3 处, 阳性菌在大约 26×10^3 处有阳性反应, 对照菌在同样的位置没有出现条带。



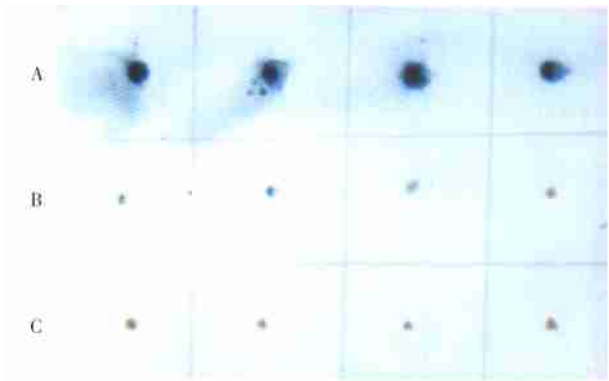
1: Normal AH109; 2: $pGBKT_7$ DNA-BD/p65 transformant; 3: $pGBKT_7$ DNA-BD transformant

图 3　Western-blot 鉴定 Gal4 DNA-BD/P65 融合蛋白表达

Fig 3　Western blot of Gal4 DNA— BD/p65 fusion protein

2.4　p65 DNA 结合域基因片段自主激活作用检测

β-半乳糖苷酶克隆滤膜影印法分析结果显示, 阳性对照菌落呈蓝色, 且扩散面积较大。阴性对照和试验菌落呈白色, 面积与菌落大小相当, 见图 4。平板法检测结果与滤膜影印法一致, 在含 X-gal 的诱导平板上, 阳性菌落划痕呈蓝色, 而阴性菌落与试验菌落均为白色, 表明无自身激活作用。



A: Positive control containing plasmid pCL-1; B: $pGBKT_7$ DNA-BD/p65 transfected bacterium; C: Negative control containing plasmid $pGBKT_7$-Lam

图 4　NF-κB p65 亚基 DNA 结合域自身激活作用的检测

Fig 4　Detection of autonomous reporter gene activation of NF-κB p65 subunit DNA binding domain

3　讨论

NF-κB 是一种普遍存在的转录因子, 首先由 Sen 和 Baltimore 于 1986 年从 B 淋巴细胞核抽提物中检测到, 并发现其能与免疫球蛋白 κ 链基因增强子 κB 序列 (5′-GGGATTTCC-3′) 特异结合, 并能促进 κ 链基因表达。除此之外, 近来还发现, NF-κB 能与调控免疫应答、炎症反应、细胞分化和生长、细胞粘附和细胞凋亡所必需的许多细胞因子、粘附因子等基因启动子或增强子部位的 κB 位点发生特异性结合, 启动和调节这些基因的转录, 在机体的免疫应答、炎症反应和细胞的生长发育等方面发挥着重要的作用[1]。如过度表达可引起许多急慢性炎性疾病[5]。p50/p65 异源二聚体是 NF-κB 的典型代表, 几乎存在于体内所有细胞中。晶体衍射技术分析显示, NF-κB p50/p65 异源二聚体通过 p50 亚基的 Arg-54、Arg-56、Tyr-57、Glu-60、His-64 和 Lys-241 氨基酸残基特异地识别 κB 序列 5′端的 $5'\text{-}G^{-5}G^{-4}G^{-3}A^{-2}C^{-1}\text{-}3'$ 碱基序列, p65 亚基的 Arg-33、Arg-35、Arg-36、Glu-39、和 Arg-187 氨基酸残基特异地识别 κB 序列 3′端的 $5'\text{-}T^{+1}T^{+2}C^{+3}C^{+4}\text{-}3'$ 碱基序列而与 κB 序列特异结合, 启动相关基因转录和表达[3]。因此, 本研究以人 p65 DNA 结合的结构域为靶蛋白, 根据其基因序列, 合成引物, 利用引物搭桥扩增法, 扩增出约 165 bp 的基因片段, 其大小与设计的片段大小相一致, 表明已获得 p65 DNA 结合域的 cDNA。酵母表达载体 $pGBKT_7$ DNA-BD 含有卡那霉素和 Trp 标志, 启动子为 ADH1, 其下游是 Gal4 DNA-BD 基因, 其后是多克隆位点。本研究将 p65 DNA 结合域基因片段重组入 Gal4 DNA-BD 基因下游, 使 p65 与 Gal4 DNA-BD 连接成融合蛋白。此载体

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

含3个 *Hind* Ⅲ酶切位点，经 *Hind* Ⅲ酶切后可获得长度分别为4 938、1 498、868 bp的3个基因片段。靶基因重组入空载体，可使868 bp的酶切片段增加为984 bp。采用 *Hind* Ⅲ单酶切鉴定较双酶切鉴定效果更为明显。测序结果证实 *Hind* Ⅲ酶切鉴定获得的阳性克隆株为正确的重组克隆株。

酵母双杂交是一种灵敏度较高，且结果可信的研究蛋白相互作用的技术，其已被广泛应用于研究蛋白质功能、寻找新基因和筛选多肽药物。但同时这一系统也存在一些问题，假阳性便是其中很突出的问题。靶基因的自身激活作用就是造成假阳性结果的重要原因。本实验所选择的靶基因为转录因子，发生自身激活作用的可能性很大。另外，靶基因在酵母细胞中表达是进行酵母双杂交实验的前提条件。因此，为证实靶蛋白p65 DNA结合域能否在酵母菌株表达，且能否发生自身激活作用，本实验将p65 DNA结合域基因片段克隆入酵母高表达质粒pGBKT7 DNA-BD，与Gal4 DNA-BD形成融合蛋白。经SDS-PAGE电泳和Western-blot鉴定证实，融合蛋白能在AH109酵母菌中表达。β-半乳糖苷酶克隆滤膜影印法和平板法检测结果显示，p65 DNA结合域无自身激活作用。同时酵母细胞生长良好，说明p65 DNA结合域对宿主菌无毒性作用。因此，构建好的载体可与纯化的肽库同时或依次共转化酵母细胞，进行肽库筛选，寻找与NF-κB DNA结合域相互作用的多肽。

参考文献：

[1] Baeuerle P A, Baltimore D. NF-κB: ten years after[J]. Cell, 1996, 87(1): 13-20.

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

[3] Chen F E, Huang D B, Chen Y Q, *et al*. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-κB bound to DNA[J]. Nature, 1998, 391(22): 410-413.

[4] 徐 祥，刘 昕，梁华平，等. 引物二聚体在目的基因克隆中的应用初探[J]. 临床检验杂志，2001，107(1)：3-10.

[5] Baldwin A S. Series Introduction: The transcription factor NF-kappaB and human disease[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 3-10.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)02-0126-01

合并严重重要脏器损伤的四肢骨折的治疗

Treatment for limb fracture complicated with severe injuries of major organs

贺小兵 （重庆市涪陵中心医院骨科，涪陵 408000）

就56例四肢骨折合并严重重要脏器损伤的病例治疗总结报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

全部病例均有四肢一处以上的骨折，每一病例至少有一处骨折应进行手术治疗，其中开放性骨折22例。年龄14～65岁。男性37例，女性19例。交通事故伤28例，高处坠落伤17例，重物压砸伤8例，其他损伤3例。合并颅脑损伤24例，肝脏损伤7例，脾破裂6例，血气胸13例，肾脏及膀胱损伤6例。

1.2 治疗

全部病例均首先进行抢救和支持生命的治疗，如抗休克、止血和颅脑、肝脾、胸腔、肾脏的手术，同时进行骨折治疗的26例，其中22例开放性骨折均同时进行了一定的处理，如清创内固定、外固定、骨外固定、骨牵引等，1～3 d内手术的19例，3～10 d内手术的5例，10 d后手术的6例。

2 结果

除手术后1周内死亡的8例外，其余病例均随访3～36个月，随访1年以上的39例。发生骨不连5例，其中肱骨骨折2例，胫腓骨骨折3例，均为颅脑损伤病人，经手术植骨半环槽式骨外固定治疗愈合。存在明显关节功能障碍的16例，12例经过理疗、推拿按摩均有不同程度的恢复，2例行了关节手术松解。

3 讨论

对于多发伤患者应尽可能详细地了解损伤机制、现场抢救及搬运情况，首先对呼吸通道、呼吸和循环状况进行评估，排查出损伤严重和可能危及生命的损伤部位，抢救和支持生命始终是严重创伤救治的首要任务，而骨折的治疗则应视病人的全身情况来确定治疗的时机和方法。本组56例患者都合并有重要

（下转130页）

作者简介：贺小兵(1962－)，男，重庆市武隆县人，副主任医师，主要从事骨外固定技术和意外伤者心理方面的研究。电话：(023)72230814

收稿日期：2002-05-08；修回日期：2002-10-11

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