DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.057
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0743-03

技术方法

单核细胞核因子-κB活性的检测及应用

Detection and application of nuclear factor-κB activity

郭振辉,洪 新,毛宝龄,钱桂生,邹霞英 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨单核细胞(Mo)NF-κB核易位及其检测方法,了解脂多糖(LPS)对NF-κB的活化作用。方法 采用免疫组化方法和凝胶电泳迁移率改变分析(EMSA)法。结果 Mo免疫组化结果,胞浆组化染色强阳性,其胞核染色弱阳性;LPS刺激Mo后,胞核组化染色显强阳性。EMSA示LPS刺激组的自显影密度远高于正常对照组($P<0.01$)。结论 Mo受LPS刺激后,免疫组化方法证实在完整细胞中NF-κB核易位并活化;EMSA证明LPS刺激后,NF-κB核易位大量增加,与κB序列结合活力大为增强。

核因子-κB(NF-κB)是具有多向性转录调节作用的序列特异性DNA结合蛋白。细胞静息时,NF-κB与抑制蛋白(IκB)偶联成无活性的三聚体存在于胞浆[1]。脂多糖(LPS)等刺激因素可激活靶细胞,使IκB降解,NF-κB二聚体快速发生核易位(活化),与基因启动子和/或增强子中特定的κB序列结合,启动和调控众多参与炎症过程的细胞因子和炎症介质基因表达,因而NF-κB在各种炎症反应中的作用正日益受到重视[2]。但稳定和可靠的NF-κB核易位之检测方法在国内尚不成熟。为此,本实验拟通过LPS刺激人单核细胞(Mo)后,采用免疫组化方法,检测NF-κB在胞内分布的改变以及采用凝胶电泳迁移率改变分析(EMSA)法,检测Mo核蛋白提取物中NF-κB的活性,以探讨NF-κB核易位及其检测方法,检测Mo核蛋白提取物中NF-κB的活性。由此了解LPS对NF-κB的活化作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LPS(大肠杆菌O111:B_4内毒素)、RPMI 1640、苯甲基磺酰氟(PSMA)、NP-40、二硫苏糖醇(DTT),购自Sigma公司;T_4多核苷酸激酶、Polydi-dc(宝灵曼);γ-^{32}P dATP(北京亚辉);山羊抗人p50多抗、兔抗人p65和免疫组化染色S-P试剂盒(Santa Cruz);κB序列双链寡核苷酸探针5′ ……GGGACTTTCC……3′(上海细胞生物研究所合成)。其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 主要器材

24孔、96孔培养板(Costar USA);TGLL-18型高速低温离心机(江苏太仓医疗器械厂);CO_2培养箱(Sheldon USA);垂直电泳仪,凝胶干燥仪,真空泵(Bio-Rad USA)。

1.3 实验方法

1.3.1 Mo分离和实验分组 采健康献血员肝素化全血100 ml,分离全血单个核细胞,粘贴法收集Mo,台盼蓝染色判断活力。Mo分别接种于96孔板(1×10^5/孔)和24孔板(5×10^6/孔)。分正常对照组和LPS(10 μg/ml)刺激组,孵育2 h后,24孔板所收集细胞用于提取核蛋白,96孔板细胞经4%多聚甲聚固定后用于免疫组织化学检查。

1.3.2 p65免疫组织化学 正常对照和LPS刺激组固定细胞经3%H_2O_2封闭内源性过氧化物酶和0.3%曲拉通增加胞膜、核膜通透性处理,加兔抗人p65多抗(一抗1∶100稀释),同时对照组一孔以PBS代替一抗作阴性对照,其余步骤按S-P试剂盒说明进行。

1.3.3 Mo核蛋白提取和κB序列探针标记 参照Schreiber等[3]的方法,收集的细胞先后经裂解液A(10 mmol/L MEPES,10 mmol/L KCl,0.1 mmol/L EDTA,0.1 mmol/L EGTA,1 mmol/L DTT,0.5 mmol/L PMSF)处理以裂解胞膜;所得胞核经裂解液C(20 mmol/L HEPES,0.4 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L EGTA,1 mmol/L DTT,1 mmol/L PMSF)处理,提取的核蛋白以Bradford法[4]测定其浓度,置-70 ℃备用。含κB序列双链寡核苷酸探针,在T_4多核苷酸激酶作用下,以γ-^{32}P ATP标记其5′端,纯化后,测定探针的放射性。

1.3.4 EMSA法检测NF-κB活性及其特异性 参照Shenkar等[5]的方法:①取对照组和LPS刺激组核提取物各3 μg与标记探针2 μl混合;②LPS刺激组核提取物3 μg与标记探针2 μl混合后分别加入50、100、200倍未标记探针作特异性竞争;③LPS组的另一样本加1 μl(0.4 μg)山羊抗人p50多抗、兔抗人p65多抗4 ℃孵育1 h后加入标记探针2 μl。上述混合物加于结合缓冲液中[10 mmol/L Tris·HCl、50 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L DTT,1 mmol/L $MgCl_2$、体积比4%的甘油,Poly(di-dc)0.24 μg],总体积为20 μl;另加6× 上样缓冲液(0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯青FF,30%甘油水溶液),在6%非变性聚丙稀酰胺凝胶电泳;凝胶固定后置胶干燥仪烤胶,-70 ℃放射自显影,显影电泳带测定其密度单位(RDU)。

2 结果

LPS刺激Mo前,胞浆免疫组化染色强阳性,其胞核染色弱阳性;LPS刺激Mo后,胞核免疫组化染色显强阳性,见图1、2。EMSA检测的电泳滞后带经Bio 210图像扫描仪进行密度扫描,采用Photoshop软件测定其灰度值和滞后带面积,二者的乘积表示核提取物中NF-κB与标记探针结合的活性(自显影电泳带测定密度单位RDU值)。EMSA示LPS刺激组的自显影带密度远高于正常对照组(5.1±0.2)增至(31.3±0.5)($P<0.01$)。特异性抑制试验,未标记探针的浓度达标记探针的100倍时,竞

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730210)
作者简介:郭振辉(1962-),男,福建省晋江县人,博士,主治医师,主要从事急性肺损伤、慢阻肺方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)86662205-53625
收稿日期:2000-01-31;修回日期:2000-11-15

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

争结合反应明显，表现为电泳滞后带变淡，达 200 倍时，滞后带逐渐消失；抗体超迁移试验，加入 0.4 μg 抗 p50、p65 多克隆抗体后，电泳滞后带变淡且更为滞后，见图 3、4。

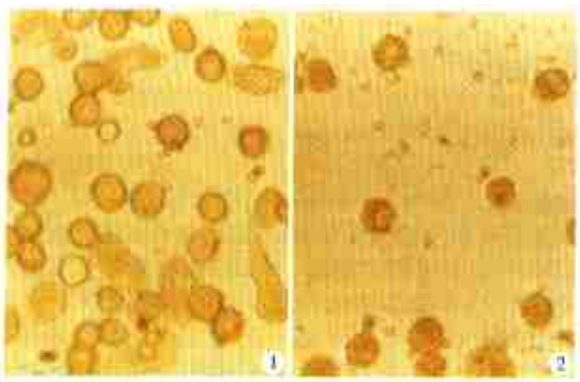


图 1 Mo 受 LPS 刺激前，p65 免疫组化结果 胞浆组化染色强阳性 (S-P× 400)

图 2 Mo 受 LPS 刺激后，p65 免疫组化结果 胞核组化染色强阳性 (S-P× 400)

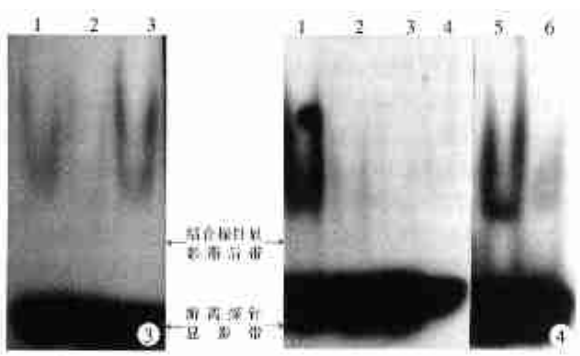


图 3 Mo 受 LPS 刺激后核蛋白提取物中 NF-κB 活性变化 1：LPS 刺激后 0.5 h；2：对照组；3：LPS 刺激后 1 h

图 4 凝胶电泳迁移率改变(EMSA)法特异性检测的结果 1：LPS 致伤组核提取物 3 μg 与标记探针 2 μl(1 ng DNA)；2：另加未标记探针 100 倍；3：另加未标记探针 200 倍；4：另加 p65 兔抗人多克隆抗体；5：LPS 致伤组核提取物 3 μg 与标记探针 2 μl (1 ng DNA)；6：另加 p50 兔抗人多克隆抗体

3 讨论

NF-κB(p50-RelA)二聚体中，RelA(p65)含有反式激活区，在启动基因中起主要作用[6]，故本实验选取 p65 多抗作一抗，通过免疫组化以证明核易位的 NF-κB 中含有起转录作用的 p65。静息时，NF-κB 与 IκBs 结合以无活性的三聚体存在于胞浆中[1]，因而本实验对照组表现为胞浆免疫组化染色强阳性；其胞核染色弱阳性，表明其 NF-κB 轻度活化而核易位，这主要是 Mo 获取过程中，离心、混悬和刮取等刺激致其轻度活化有关。LPS 与 Mo 胞膜 CD14 结合，通过相应的信号转导激活 IκB 激酶(IKK)而介导 IκBs 降解，导致 NF-κB 活化而核易位[7]。因而，LPS 实验组，胞核免疫组化染色显强阳性。

核蛋白提取过程中，需通过胞膜裂解除去胞浆成分。本实验 Mo 经裂解液 A 处理后，其细胞形态消失，镜下可见完整胞核；胞核经裂解液 C 裂解所得核提取物采用 Bradford 法测定蛋白浓度，表明通过上述方法所测核蛋白确切稳定。在电泳迁移实验中，需掌握非变性凝胶制备时聚丙烯酰胺浓度，依照文献报道制备 4%～6%非变性聚丙稀酰胺，当浓度 4%～5%时，其凝聚时间超过 2 h，而 6%浓度可在 20 min 内凝聚良好，故本实验采用 6%非变性聚丙烯酰胺制备凝胶。

与特异性 κB 序列结合是 NF-κB 核易位后启动和调控基因转录的关键[1]。本实验采用 γ-^{32}P dATP 5′ 末端标记的含特异性 κB 序列的 DNA 探针，EMSA 检测 NF-κB 与 κB 序列结合的活性。NF-κB 与标记探针结合，探针在电泳中的迁移率降低，从而形成滞后的电泳条带，经自显影检测其密度，一方面反映了 NF-κB 与 KB 序列的结合活性，另一方面间接反映了易位至胞核的 NF-κB 数量。实验中，LPS 刺激组的自显影密度远高于正常对照组，表明 Mo 受 LPS 刺激后，NF-κB 被迅速激活，其核易位显著增加，与 κB 序列的结合活性显著增强。

EMSA 结果的特异性可通过竞争抑制试验和抗体超迁移试验加以证实[5]。同时加入标记和未标记含 κB 序列的探针，二者与 NF-κB 发生竞争性结合，当未标记探针浓度远高于标记探针时，标记探针与 NF-κB 结合的数量大大减少，因而本实验中，随着未标记探针浓度的增加，电泳条带逐渐变淡乃至消失；NF-κB 的 p50-RelA 二聚体中，p50 含有顺式作用的 DNA 结合区，也即 p50 在与 κB 序列结合中起主要作用[8]，抗 p50 抗体与 p50 结合后可产生空间位阻效应，选择性阻抑 NF-κB 与 κB 序列结合，并使 NF-κB 分子量增大，因而本实验的抗体超迁移试验表现为电泳带变淡且更为滞后。通过上述二个实验证明，LPS 激活 NF-κB 核移位，其 p50 与 κB 序列是特异性结合。

本实验 Mo 受 LPS 刺激，免疫组化方法证实在完整细胞中 NF-κB 活化并核易位；确切而稳定的核蛋白提取为核易位的活化 NF-κB 测定创造条件，EMSA 证明，LPS 刺激后，NF-κB 核易位大量增加，与 κB 序列结合活力大为增强。而竞争抑制实验和抗体超迁移实验证明了 NF-κB 与 κB 序列结合的特异性。通过 LPS 激刺 Mo 使 NF-κB 活化而核易位的研究，对于感染引致的 SIRS(也称 Sepsis)介导 MODS 发生机制的认识及为其控制提供线索具有重要意义。

关键词：核因子-κB；检测方法；免疫组化
中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Baeuerle P A, Hankel T. Function and activation of NF-κB in the immune system[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 141—179.

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

[2] Barnes P J, Adcock I M. NF-κB: a pivotal role in asthma and a new target for therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(2): 46—50.
[3] Schreiber E, Matthias P, Muller M M, *et al*. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts" prepared from a small number of cells [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(15): 6 419.
[4] 孙志贤 主编. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995. 392—394.
[5] Shenkar R, Schwartz M D, Terada L S, *et al*. Hemorrhage activates NF-κB in murine lung mononuclear cells *in vivo*[J]. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt 1): L729—L735.
[6] Schmitz M L, Baeuerle P A. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-κB[J]. EMBO J, 1991, 10(12): 3 805—3 817.
[7] Delude R L, Fenton M J, Savedra R Jr, *et al*. CD14-mediated translocation of nuclear factor-κB induced by lipopolysaccharide does not require tyrosine kinase activity[J]. J Biol Chem, 1994, 269(35): 22 253—22 260.
[8] Fan C M, Maniatis T. Generation of P50 subunit of NF-κB by processing of P105 through an ATP-dependent pathway[J]. Nature, 1991, 354(6 352): 395—398.

(编辑 陈聪连)

技术方法

文章编号: 1000-5404(2001)06-0745-02

介绍一种快速反转录聚合酶链反应

Introduction of an access of reverse transcription polymerase chain reaction

张敬如 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室, 重庆 400038)

提 要: 目的 介绍一种特异、高效的快速 PCR 方法。方法 总 RNA 分成 2 份, 采用相同反应体系, 分别用普通 PCR 方法和快速 PCR 方法同时扩增 FasL。结果 虽然两种方法均能成功扩增 FasL 基因, 但普通 PCR 方法耗时 3 h 48 min, 而且还存在非特异性片段; 而快速 PCR 方法耗时仅 2 h 6 min, 而且没有出现非特异片段。结论 快速 PCR 方法不仅极大的缩短了反应时间, 同时提高了反应的特异性。

快速对于反转录聚合酶链反应(Reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR)或聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)而言不仅意味着省时, 更重要的是增加了反应的特异性。一步法 RT-PCR 实现了用一个试管, 两种酶(AMV 逆转录酶和 *Tfl* DNA 聚合酶)不间断的实现反转录和 PCR 扩增, 节省了时间, 由于反转录和 PCR 均由特异性引物引导进行, 增加了反应的特异性。但其 PCR 每一步持续时间仍需 0.5~2 min。我们利用快速 PCR 仪大幅度降低了 PCR 每一步持续时间, 不仅实现了一步完成 RT-PCR 且每一步持续时间仅需 5 s, 反应的特异性进一步提高, 现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 实验设计

用 1 台快速 PCR 仪和实验室常用的普通 PCR 仪分别按常规程序和我们设计的快速程序对同一来源的总 RNA 模板进行 RT-PCR, 以扩增存在于人类非小细胞肺癌组织中的 FasL 基因转录产物[1], 比较两种方法所需的时间和产物的特异性, 每种方法重复 3 次。

1.2 实验材料

PCR 引物: 上游引物 5'-CTGGGGATGTTTCAGCTCTTC-3', 下游引物 5'-CTTCACTCCAGAAAGCAGGAC-3'(上海生工生物工程有限公司合成); Access RT-PCR 试剂盒, PCR 相关试剂均购自 Promega; 快速 PCR 仪为 HYBAID 公司出品的 PCR EXPRESS, 普通 PCR 仪为 Amplitron II 型; 凝胶电泳扫描仪(Gel Doc 2000, Bio Rad)。

1.3 实验方法

手术切除直径 4 cm 非小细胞肺癌组织, 按试剂说明用 TriPure 提取总 RNA。总 RNA 分成 2 份, 采用相同反应体系, 分别用普通 PCR 方法和快速 PCR 扩增 FasL。50 μl 反应总体积含: 总 RNA 2.28 μg, 上下游引物各 0.5 μmol/L, 每种 dNTP 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L, AMV 反转录酶和 *Tfl* DNA 聚合酶各 5 U。

普通 PCR 仪运行程序 1: 48 ℃ 45 min 反转录; 94 ℃ 2 min 灭活 AMV; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 35 个循环; 72 ℃最后延伸 7 min。

快速 PCR 仪运行程序 2: 48 ℃ 45 min 反转录; 94 ℃ 2 min 灭活 AMV 反转录酶; 94 ℃ 5 s, 55 ℃ 5 s, 72 ℃ 5 s, 共 35 个循环; 72 ℃最后延伸 10 s。

1%琼脂糖凝胶电泳同时检测两种方法获得的 PCR 产物, 凝胶电泳扫描仪读取电泳结果, 比较两种情况下产物的特异性。上述过程重复 3 次。

2 结果

两种方法均扩增获得大约 230 bp 的片段, 与 FasL 的理论长度(231 bp)基本符合[2]。但是, 程序 1 耗时 3 h 48 min, 而程序 2 仅需 2 h 6 min。程序 1 所得产物电泳结果存在明显的非特异性拖尾条带, 而程序 2 消除了产物中非特异性条带, 见图 1。共进行 3 次实验, 结果一致。

作者简介: 张敬如(1972—), 女, 河北省深泽县人, 助理实验师。电话: (023) 68752243

收稿日期: 2001-03-17; 修回日期: 2001-05-08

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