

# 电泳迁移率变动分析化学发光法检测 T 细胞 NF- $\kappa$ B 活性

孙大康, 李柏青

[摘要]目的: 建立凝胶电泳迁移率变动分析(EMSA)化学发光法检测 T 细胞激活后核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活性的方法。方法: 人外周血单个核细胞(PBMC)用抗 CD3 单克隆抗体(mAb)激活 T 细胞后, 提取细胞核蛋白与生物素标记的 NF- $\kappa$ B 特异性探针结合, 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至正电荷尼龙膜, 加链霉亲和素辣根过氧化物酶和化学发光底物后用 X 光胶片显影, 检测 NF- $\kappa$ B 活性。结果: 人 PBMC 用抗 CD3 mAb 刺激后 15 min 明显可见 NF- $\kappa$ B 活化, 30 min 时达高峰, 60 min 时降低。结论: EMSA 化学发光法检测转录因子活性是一种较简捷和高灵敏度的技术, 可用于检测 T 细胞活化后 NF- $\kappa$ B 活性变化。

[关键词] 免疫学技术; 凝胶电泳迁移率变动分析; 增强化学发光; 核因子- $\kappa$ B T 细胞

[中国图书资料分类号] R 446.61 [文献标识码] A

## Detection of NF- $\kappa$ B activity in T cells by electrophoretic mobility shift assay and enhanced chemiluminescent technique

SUN Da kang LI Bai qing

(Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for detection of NF- $\kappa$ B activity in human T cells after activation using gel electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and enhanced chemiluminescent (ECL) technique. **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with anti CD3 mAb to generate activated T cells. Cell nuclear protein extracts were mixed with biotin label probe of NF- $\kappa$ B specific oligonucleotides sequence and protein probe complex were separated from free probe by electrophoresis in nondenaturing polyacrylamide gel and electrotransferred to positive charged nylon membrane and added with streptavidin HRP conjugate and enhanced chemiluminescent reagent to detect NF- $\kappa$ B activity. **Results** The NF- $\kappa$ B shift band were detected at 15 min after stimulation of human PBMC, and reached maximum peak at 30 min, and then decreased at 60 min of stimulation, and the results of control group demonstrated the method with high specific and sensitivity. **Conclusions** Enhanced chemiluminescence based EMSA is very convenient and high sensitive technique to detect nuclear factor such as NF- $\kappa$ B activity in T cells after activation.

[Key words] immunologic technique; electrophoretic mobility shift assay; enhanced chemiluminescent; NF- $\kappa$ B; T cells

核因子- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 是一类普遍存在的重要转录调节因子, 参与多种基因的转录, 对调控细胞的生长、发育、分化及凋亡等都具有重要作用<sup>[1]</sup>。NF- $\kappa$ B 首先由 Sen 和 Baltimore 于 1986 年在 B 细胞中发现, 由于其可以与编码免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因的增强子序列特异性结合, 因此命名为 NF- $\kappa$ B。近十几年来, 由于 NF- $\kappa$ B 参与多种细胞的生物活性, 因此始终是生物医学领域研究的热点。

凝胶电泳迁移率变动分析 (gel electrophoretic mobility shift assay, EMSA), 是目前最常用的检测 NF- $\kappa$ B 活性的方法。根据标记探针物质的不同, 分为放射性标记和非放射性标记两类。放射性标记

以 <sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸探针为代表, 该方法灵敏度高, 一直作为常规应用。但由于放射性标记对实验器材要求较高, 半衰期较短, 以及涉及同位素防护问题, 限制其更广泛的应用。目前以生物素、地高辛为代表的非放射性标记应用有了长足的发展, 尤其是在检测灵敏度方面已经达到甚至超过了放射性标记灵敏度, 可达 pg 水平。下面结合本室在检测 T 细胞活化后 NF- $\kappa$ B 活化的实验研究方法, 介绍一种以生物素标记寡核苷酸探针, 应用增强化学发光系统和 EMSA 技术检测 NF- $\kappa$ B 活化的方法。

### 1 材料与方法

1.1 细胞 抽取健康成年人外周血, 常规密度梯度离心法分离获取外周血单个核细胞 (PBMC), 用含 5% NBS 5% 人自体血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为  $(1 \sim 2) \times 10^6 / \text{ml}$  植入 24 孔细胞培养板中, 每孔 1 ml 每孔加入 OKT3 mAb  $5 \mu\text{g}$  用于激活 T 细胞。将细胞置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

1.2 主要试剂及仪器 LightShift<sup>TM</sup> Chemiluminescent EMSA Kit 购自 PERCE 公司, 试剂盒提供结合缓冲

[收稿日期] 2005-07-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (3070721)

[作者单位] 蚌埠医学院 免疫学教研室; 安徽省感染与免疫重点实验室 (蚌埠医学院), 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 孙大康 (1973-), 男, 硕士 (现在工作单位: 山东滨州医学院 免疫学教研室), 研究方向: 细胞和分子免疫学

[通讯作者] 李柏青, 教授, 硕士生导师, E-mail: bb\_bq1@yahoo.com

液, 封闭液, Poly (dI-dC), 链霉亲和素耦联辣根过氧化物酶, 鲁米诺增强液和过氧化物溶液等; 生物素标记单链寡核苷酸探针由上海生工合成并进行 3'端标记生物素, 与 NF- $\kappa$ B 结合寡核苷酸互补序列: (1) 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG G-3'; (2) 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'; NP-40 PMSF 华美公司; Aprotinin Leupeptin Roche 公司; 电泳仪, Mini Protean 3 CELL (BD-RAD 公司); 转移电泳槽, DYY-III (北京市六一仪器厂)。

1.3 核蛋白抽提 T 细胞核蛋白的抽提步骤参照文献<sup>[2]</sup>进行: (1) 收集不同处理组细胞 ( $5 \times 10^6$ ), 冷 PBS 洗涤细胞 1 次,  $4^\circ\text{C}$ , 400 r/min 离心 5 min。 (2) 把细胞重悬于  $400 \mu\text{l}$  缓冲液 A ( $10 \text{ mmol/L}$  HEPES, pH 7.9,  $10 \text{ mmol/L}$  KCl,  $1.5 \text{ mmol/L}$  MgCl<sub>2</sub>,  $0.1 \text{ mmol/L}$  EDTA,  $0.5 \text{ mmol/L}$  DTT,  $0.5 \text{ mmol/L}$  PMSF, Aprotinin  $2 \mu\text{g/ml}$ , Leupeptin  $2 \mu\text{g/ml}$ ), 涡旋混匀 10 s 冰浴 10 min。加入  $8 \mu\text{l}$  15% NP-40 至终体积分数为 0.1%, 涡旋混匀 10 s 重置于冰上 5 min。 (3) 于  $4^\circ\text{C}$ , 6 000 r/min 离心 1 min 弃上清。加入  $400 \mu\text{l}$  缓冲液 A 重悬细胞核沉淀, 涡旋混匀 10 s 以洗涤细胞核沉淀。  $4^\circ\text{C}$ , 6 000 r/min 离心 1 min 仔细弃上清。 (4) 细胞核沉淀重悬于  $50 \mu\text{l}$  缓冲液 B ( $20 \text{ mmol/L}$  HEPES, pH 7.9,  $420 \text{ mmol/L}$  NaCl,  $1.5 \text{ mmol/L}$  MgCl<sub>2</sub>,  $0.1 \text{ mmol/L}$  EDTA,  $1 \text{ mmol/L}$  DTT,  $0.5 \text{ mmol/L}$  PMSF, Aprotinin  $2 \mu\text{g/ml}$ , Leupeptin  $2 \mu\text{g/ml}$ , 25% 甘油), 涡旋混匀 15 s 置于摇床上冰浴 30 min 以抽提核蛋白。 (5) 于  $4^\circ\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 10 min 上清液为核蛋白提取物, 分成小份, 保存于  $-70^\circ\text{C}$  直至使用, 核蛋白提取物用 Bradford 法测定蛋白含量。

#### 1.4 EMSA

1.4.1 寡核苷酸探针退火 各取  $15 \mu\text{l}$  NF- $\kappa$ B 互补单链寡核苷酸探针 ( $20 \text{ nmol}$ ), 充分混合后, 室温孵育 1 h。

1.4.2 制备非变性 6% 聚丙烯酰胺凝胶, 并在 100 V 电压下, 预电泳 30~60 min。

1.4.3 寡核苷酸探针与核蛋白结合反应 在  $20 \mu\text{l}$  反应体系中, 依次加入  $2 \mu\text{l}$   $10 \times$  结合缓冲液 ( $10 \text{ mmol/L}$  Tris,  $500 \text{ mmol/L}$  KCl,  $10 \text{ mmol/L}$  DTT, pH 7.5) 和  $1 \mu\text{l}$  Poly (dI-dC) ( $1 \mu\text{g/ml}$ ),  $2 \sim 4 \mu\text{g}$  核蛋白及  $2 \mu\text{l}$  双链 NF- $\kappa$ B 寡核苷酸探针 ( $20 \text{ fmol}$ )。加超纯水至  $20 \mu\text{l}$  混匀后, 室温反应 30 min。

1.4.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜及紫外交联 每个反应 ( $20 \mu\text{l}$ ) 加  $5 \times$  上样缓冲液  $5 \mu\text{l}$  混匀后每孔上样  $20 \mu\text{l}$  在  $0.5 \times$  TBE 电泳缓冲液、100 V 恒压电泳, 至溴酚蓝移动到凝胶 2 B~3 A 处停止。小心剥

离凝胶, 在  $0.5 \times$  TBE 转印缓冲液中, 将含有核蛋白-核苷酸探针复合物和游离探针的凝胶转移至带正电荷的尼龙膜, 380 mA 恒流, 30~60 min。用紫外手提式分析仪 ( $254 \text{ nm}$ ) 在尼龙膜上方大约  $0.5 \sim 1 \text{ cm}$  处照射 5~10 min 使寡核苷酸探针交联于尼龙膜上。

1.4.5 增强化学发光法检测生物素标记寡核苷酸探针 将已转印尼龙膜转移至一个可热封塑料袋, 加  $15 \text{ ml}$  预热的封闭液, 室温下摇动孵育 15 min。再将尼龙膜转移至一新塑料袋中, 加入  $15 \mu\text{l}$  链霉亲和素耦联辣根过氧化物酶与  $15 \text{ ml}$  预热封闭液的混合液, 室温下摇动孵育 15 min。随后将尼龙膜转移至一浅托盘中, 加入  $20 \text{ ml}$  洗涤缓冲液, 平缓摇动 5 min 共四次。尼龙膜浸入  $20 \text{ ml}$  平衡缓冲液 5 min。最后, 把尼龙膜转移至另一浅托盘中, 将  $3 \text{ ml}$  鲁米诺增强液和  $3 \text{ ml}$  过氧化物溶液混匀后加入, 使尼龙膜浸于底物溶液中 5 min。将尼龙膜取出, 滤纸吸取尼龙膜边缘残余底物溶液, 用保鲜膜包裹。在暗室中, 把 X 光胶片置于其上, 曝光 2~5 min 后, 显影、定影。

1.4.6 获取图像的 X 光胶片在室温下干燥, 图像扫描后用“捷达专业数码凝胶成像与分析系统”进行积分光密度分析。

## 2 结果

人 PBMC 用抗 CD3 mAb 刺激后 15 min 即可检测到 NF- $\kappa$ B 有明显活化 (见图 1A, 泳道 2), 30 min 时 NF- $\kappa$ B 活化到达最强高峰 (见图 1A, 泳道 3) 至 60 min 时, 逐渐降低。使用凝胶成像分析系统对图像作积分光密度值 (DD) 分析, 可见到 (见图 1B), PBMC 在 CD3 mAb 刺激前的 NF- $\kappa$ B 活性很低, 为 144.1, 刺激后 15 min 和 30 min 时, 则分别为 666.5 和 1 228.7 到 60 min 时, 则渐下降为 773.4。在实验中设置多个质控对照组, 图 2 中泳道 1 至泳道 4 为质控泳道。阴性对照 (NC) (见图 2 泳道 1) 是在反应物中加生物素标记 NF- $\kappa$ B 探针, 而未加核蛋白提取物, 故未见到有 NF- $\kappa$ B 结合探针的滞后条带; 阳性对照 (PC) (见图 2 泳道 2) 是在反应物中加生物素标记 NF- $\kappa$ B 探针和抗 CD3 mAb 刺激 PBMC 30 min 后的核蛋白提取物, 出现非常强的 NF- $\kappa$ B 滞后条带。特异性竞争性抑制 (SC) (见图 2 泳道 3) 是在反应物中加入 100 倍过量的未标记 NF- $\kappa$ B 探针, 可显著地阻断生物素标记的 NF- $\kappa$ B 探针与核蛋白提取物中 NF- $\kappa$ B 的结合, 没有见到 NF- $\kappa$ B 滞后条带的出现。非特异性竞争性抑制 (NSC) (见图 2 泳道 4); 加入 100 倍过量的未标记 AP-1 探针, 对生物素标记 NF- $\kappa$ B 探针与核蛋白提取物中 NF- $\kappa$ B 的结

合无明显影响。对照质控实验的结果表明,该方法有很高的特异性。另外,细胞培养 12~15天,经不

含血清培养液“饥饿”培养后,用抗 CD3mAb再次刺激时, NF- $\kappa$ B活性明显增加(见图 2的泳道 5和 6)。

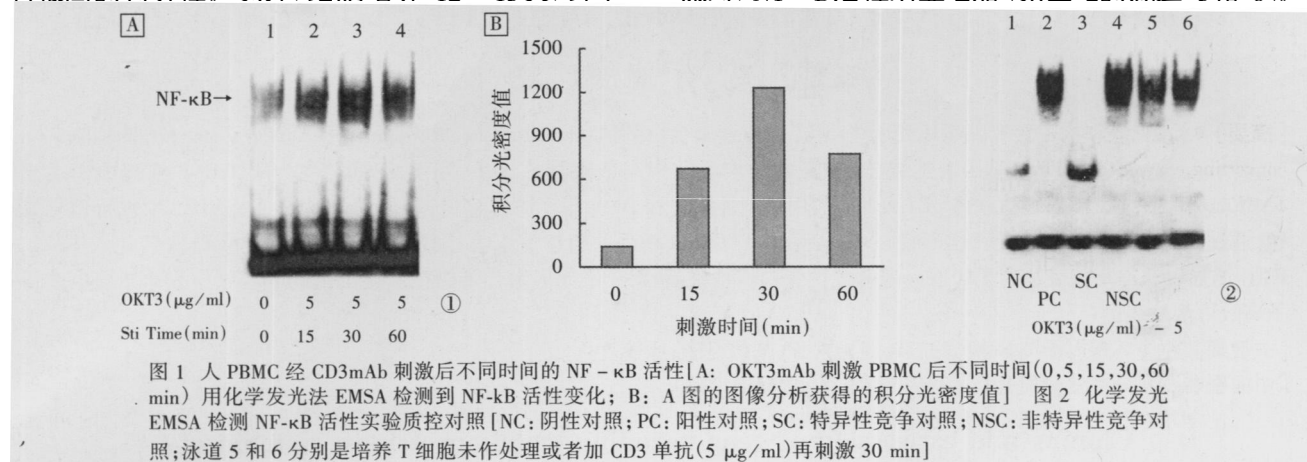


图 1 人 PBMC 经 CD3mAb 刺激后不同时间的 NF- $\kappa$ B 活性 [A: OKT3mAb 刺激 PBMC 后不同时间(0,5,15,30,60 min)用化学发光法 EMSA 检测到 NF- $\kappa$ B 活性变化; B: A 图的图像分析获得的积分光密度值] 图 2 化学发光 EMSA 检测 NF- $\kappa$ B 活性实验质控对照 [NC: 阴性对照; PC: 阳性对照; SC: 特异性竞争对照; NSC: 非特异性竞争对照; 泳道 5 和 6 分别是培养 T 细胞未作处理或者加 CD3 单抗(5  $\mu$ g/ml)再刺激 30 min]

### 3 讨论

EMSA 提供了一种简捷和灵敏的检测序列特异性 DNA 结合蛋白(转录因子)的方法。EMSA 依赖于探针与转录因子的结合能力。待探测序列的寡核苷酸探针与核蛋白抽提物室温下孵育后相连接,在非变性聚丙烯酰胺中电泳时,探针-DNA 结合蛋白复合物的电泳迁移率明显慢于自由探针,从而使两者得以分离<sup>[3]</sup>。如果寡核苷酸探针是以 <sup>32</sup>P 放射性标记,电泳后的聚丙烯酰胺凝胶用 X 光胶片在低温显影呈像。如果寡核苷酸探针是以生物素、地高辛进行的非放射性标记,需将电泳后的聚丙烯酰胺凝胶转膜至带正电荷的尼龙膜上,然后通过化学发光显影。链霉亲和素有 4 个相同亚基,能结合 4 个生物素分子,二者亲和力极强,亲和常数 ( $K_a$ ) 达  $10^{15} \text{ mol}^{-1}$ 。因此二者能快速结合,且不易受外界干扰,具有高度特异性和稳定性<sup>[4]</sup>。增强化学发光法常采用的酶包括 HRP(辣根过氧化物酶)和 AP(碱性磷酸酶)两种。对于 HRP,一般以鲁米诺和过氧化氢为化学发光底物。鲁米诺为 3-氨基苯二甲酰肼类,碱性溶液中形成叠氮醌,在 HRP 的催化作用下,叠氮醌与过氧化氢作用生成不稳定的桥式六元环过氧化物(激发态),当其从激发态回迁至基态时,多余的能量以光子的能量释放出来,形成可见光,峰值波长约在 425 nm。但是,在进行免疫分析时,由于分子的空间位阻效应,其发光强度较低,衰减迅速,导致检测的灵敏度和稳定性并不理想。以化学发光为基础,在对碘苯酚或其他新型增强发光剂的作用下,其发光强度可增强千倍,并可以显著延长发光时间。除酚类增强剂之外,某些特定的芳香胺(联苯胺、苯胺)以及苯基硼酸衍生物(1,1-苯基-4-硼酸、

四苯硼钠)等均可作为 HRP 的化学发光增强剂。上述增强剂在结构上相似,均为具有 1~2 个取代基团的苯环或萘环。

用增强化学发光法 EMSA 技术检测 NF- $\kappa$ B 等转录因子活性的操作过程,包括核蛋白抽提、探针退火、探针与转录因子结合、非变性连续电泳、转膜、紫外交联和 ECL。其中核蛋白抽提、非变性连续电泳、转膜三步尤为关键。

获取核蛋白的方法很多,本实验主要采用不同的渗透压来获取核蛋白。缓冲液 A 为低渗液,细胞外的水在渗透作用下由胞外进入胞内,使得细胞体积增大,加入非离子型去垢剂(NP40 或 Triton 100)后,细胞膜快速破碎。当把细胞核浸入高渗缓冲液 B 中后,细胞核内的水在渗透作用下由细胞核内移出,同时把细胞核内的转录因子抽提出来。(1)关于蛋白酶抑制剂选用。EDTA、PMSF、Aprotinin、Leupeptin 是最为常用的蛋白酶抑制剂组合,也有很多实验室中只采用 PMSF 和 EDTA 作蛋白酶抑制剂<sup>[5]</sup>。在核蛋白抽提过程中,更应注意使细胞尽量处于低温状态,以降低蛋白酶的活性,减少在抽提过程中核蛋白的降解。(2)关于离心力、离心时间的选择。在核蛋白抽提过程中,第一次离心使细胞核沉淀,弃上清保留细胞核。第二次离心,使细胞核及碎片沉淀,吸取上清保存待用。在相关文献中,各种离心力、离心时间的选择多种多样,让人难以取舍。在此推荐最常用的设定选择:第一次离心设定,15 000~20 000 r/min 离心 30 s,或者 5 000~6 000 r/min 离心 2~5 min。第二次离心设定,12 000~20 000 r/min 离心 10~15 min 通过增大离心力,延长离心时间,使细胞核及碎片尽量沉淀,以提高核蛋白抽提液的“纯度”。(3)关于裂解细胞数量。由于转录因子含量相对较低,裂解细胞数一般需要

# 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 转换酶基因金属蛋白酶区的克隆及表达

张玉心<sup>1</sup>, 马涛<sup>2</sup>, 陈治文<sup>1</sup>, 夏俊<sup>1</sup>

[摘要]目的:克隆和构建含有肿瘤坏死因子- $\alpha$ 转换酶金属蛋白酶区(metalloproteinase domain of human tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme TACEmp)基因表达载体,并在大肠埃希菌中高效表达。方法:用RT-PCR方法,从THP-1细胞中扩增出TACEmp基因片段,插入表达载体pET-DsbA<sup>mut</sup>,用限制性酶切和DNA测序进行鉴定;转化到大肠埃希菌BL21中进行诱导表达,通过SDS-PAGE电泳分析表达产物。结果:克隆TACEmp基因并构建重组表达载体pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp转化入BL21, IPTG诱导后获得高效表达的TACEmp融合表达蛋白。结论:利用分子伴侣融合蛋白技术使TACEmp在原核表达系统中获得了高效可溶性表达。

[关键词] 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 转换酶;二硫键异构酶;基因克隆;原核表达

[中国图书资料分类法分类号] R 730.3 [文献标识码] A

## Cloning and expression of gene encoding metalloproteinase domain of tumor necrosis factor $\alpha$ converting enzyme

ZHANG Yuxin MA Tao CHEN Zhiwen XIA Jun

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To construct expression vector of the metalloproteinase domain of human tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme (TACEmp) and express its protein in *E. coli*. **Methods** RT-PCR and sequencing were used to clone and confirm the TACEmp gene. The fusion expression vector was constructed with the prokaryotic expression vector including disulfide isomerase dsbA gene and the TACEmp, named pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp and transformed into *E. coli* BL21. After induced by IPTG, expression product was analyzed by SDS-PAGE. **Results** TACEmp was cloned by RT-PCR. The recombinant vector pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp was constructed. The fusion protein was expressed at high level in *E. coli*. **Conclusions** The TACEmp was expressed at high level in prokaryotic expression system by using fusion protein technology. The expression of TACEmp protein may be useful for the study of biological functions of TACEmp and its biotherapy in TACEmp related diseases.

[Key words] tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme; disulfide isomerase; gene cloning; prokaryotic expression

肿瘤坏死因子- $\alpha$ 前体转换酶(tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme, TACE)是一种金属蛋白

水解酶,参与多种细胞膜蛋白外功能区的脱落过程<sup>[1]</sup>,其特异地裂解TNF- $\alpha$ 前体后释放可溶性的分泌型TNF- $\alpha$ (sTNF- $\alpha$ )所介导的炎症反应及其在药物发现上的作用日益受到重视。研究表明在关节炎<sup>[2]</sup>、子宫内膜异位<sup>[3]</sup>、老年性痴呆<sup>[4]</sup>等疾病中均有TACE和sTNF- $\alpha$ 的表达增加。用抑制剂抑制TACE的活性对关节炎、癌症和糖尿病有潜在治疗作用<sup>[5]</sup>。因此对TACE的性质及作用机制的确定,

[收稿日期] 2005-06-22

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2005k285); 蚌埠医学院科研项目(No. BY0408)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生物化学和分子生物学教研室, 2. 药物分析教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张玉心(1976-),女,硕士,讲师。

$5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ ,由于增强化学发光法灵敏度很高, $5 \times 10^6$ 个细胞也可取得较为理想的结果。但对于某些“丰度”较低的转录因子检测,可酌情提高裂解细胞数。(4)在进行非变性连续电泳时,由于SDS等离子型去垢剂可引起蛋白不可逆的变性,影响探针与转录因子复合物的稳定性,因此在电泳前应彻底清洗电泳槽及制胶玻片,以减小SDS对实验的影响。(5)转膜时必须尽量减少滤纸、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜之间的气泡。如果三者之间的间隙存在气泡,将造成“转膜断路”,阻断探针-转录因子复合物或自由探针向尼龙膜的移动。

### [参考文献]

- [1] 张劲松,张宗梁,王兴宇,等. 转录因子NF- $\kappa$ B的研究进展[J]. 科学通报, 2002, 47(5): 323-329
- [2] Matsumoto M, Yanada T, Yoshinaga SK, et al. Essential role of NF- $\kappa$ B inducing kinase in T cell activation through the TCR/CD3 pathway[J]. *J Immunol* 2002, 169(3): 1151-1158.
- [3] Latchman DS. 转录因子实用技术[M]. 第2版. 北京:清华大学出版社, 2004. 2-4.
- [4] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 1998. 138-139.
- [5] Andreone TL, O'Connor M, Denenberg A, et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 regulates activation of activator protein 1 in murine fibroblasts[J]. *J Immunol* 2003, 170(4): 2113-2120.