

胡波,魏后军,范志宇,等. 兔 NF- $\kappa$ B p50 蛋白质的原核表达及鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(22):223-225.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.052

# 兔 NF- $\kappa$ B p50 蛋白质的原核表达及鉴定

胡波,魏后军,范志宇,仇汝龙,宋艳华,陈萌萌,朱伟峰,徐为中,王芳  
(江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,江苏南京 210014)

**摘要:**为获得可溶性表达的兔 NF- $\kappa$ B p50 蛋白,本研究对兔 p50 基因进行大肠杆菌密码子优化及合成,并连接于原核表达载体 pGEX-4T-1 中,转化大肠杆菌 Origami B(DE3)菌株,经异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,获得 GST-p50 融合蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示,GST-p50 蛋白主要以可溶形式高效表达。经谷胱甘肽 S 转移酶(GST)磁珠纯化及蛋白免疫印迹(western blot)鉴定,所表达的 GST-p50 蛋白具有良好的反应原性。研究结果为进一步开展兔 NF- $\kappa$ B 互作蛋白及信号通路的研究奠定了基础。

**关键词:**NF- $\kappa$ B;p50 蛋白;原核表达;鉴定;兔

**中图分类号:**S858.291 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)22-0223-03

NF- $\kappa$ B 家族是细胞中一类重要的转录调控因子,包含 RelA(p65)、RelB、C-Rel、NF- $\kappa$ B1(p50)和 NF- $\kappa$ B2(p52)5 个成员。该蛋白家族成员以同源或异源二聚体形式存在,包括 p50 同源二聚体、p65 同源二聚体和 p50/p65 异源二聚体等,其中 p50/p65 异源二聚体是 NF- $\kappa$ B 最广泛的形式<sup>[1]</sup>。NF- $\kappa$ B 在免疫应答、炎症反应、细胞增殖和凋亡中均发挥重要的调控作用<sup>[2-4]</sup>,对其的研究一直是信号转导和免疫学研究领域的热点。

p50 蛋白含有大小为 24 ku 的 NF- $\kappa$ B 同源结构域 Rel homology domain(RHD),具有 DNA 结合、二聚化及核转位等功能,在 NF- $\kappa$ B 介导的调控作用中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。研究发现,p50 同源二聚体对机体的炎症反应有抑制作用,且

HDAC1 与 p50 的相互作用能抑制炎症相关基因的表达<sup>[6]</sup>。此外,p50 在肾细胞癌及胶质母细胞瘤中也发挥重要的调控作用,p50 的缺失可降低肿瘤生长并延长生存期<sup>[7-9]</sup>。

兔作为一种重要的试验动物,其 NF- $\kappa$ B 分子及其调控机制的研究尚未展开,在各种病理状态下其 NF- $\kappa$ B 通路的激活/抑制及其关键分子的作用研究均缺乏相应的基础和手段。本研究通过表达 NF- $\kappa$ B p50 亚基,以期为研究兔 NF- $\kappa$ B 通路调控机制及在相关疾病中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

序列优化的 NF- $\kappa$ B p50 基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并连接于 pGEX-4T-1 载体;*E. coli* Origami B(DE3)感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

### 1.2 主要试剂和工具酶

Blue Plus II Protein Marker(蛋白分子量标准,北京全式金生物技术有限公司);SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗人 NF- $\kappa$ B p50 蛋白多克隆抗体(南京善本生物技术有限公司);酶标山羊抗兔 IgG(HRP-IgG)购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;GST 磁珠购自南京金斯瑞生物技术有限公司;氯化钠、磷酸氢二

收稿日期:2019-09-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31600130);现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:胡波(1982—),男,江苏南京人,博士,副研究员,主要从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究。E-mail:hubolshg@163.com。

通信作者:王芳,博士,研究员,主要从事畜禽疫病防控及免疫机理研究。E-mail:rwangfang@126.com。

[8]王常安,户国,孙鹏,等. 饲料蛋白质和脂肪水平对亚东鲑亲鱼生长性能、消化酶活性和血清指标的影响[J]. 动物营养学报,2017,29(2):571-582.

[9]钱国英. 饲料中不同蛋白质、纤维素、脂肪水平对加州鲈鱼生长的影响[J]. 动物营养学报,2000,12(2):48-52.

[10]陈曦飞,许洁,艾春香. 黄颡鱼的营养需求研究与配合饲料研发[J]. 饲料工业,2011,32(10):48-51.

[11]刘珂珂,王华朗. 草鱼饲料与营养需求研究进展[J]. 广东饲料,2008,17(3):36-38.

[12]张媛媛,刘波,周传朋,等. 团头鲂对营养需求的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(32):18239-18241.

[13]Chong A S C, Ishak S D, Osman Z, et al. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of female swordtails

*Xiphophorus helleri*(Poeciliidae)[J]. Aquaculture,2004,234(1/2/3/4):381-392.

[14]Masrizal Z, Udin M, Zein U, et al. Effect of energy, lipid and protein content in broodstock diets on spawning fecundity and eggs quality of giant gourami (*Ospheronemus gouramy* Lac)[J]. Pakistan J Nutr, 2015,14(7):412-416.

[15]Duray M, Kohno H, Pascual F. The effect of lipid-enriched broodstock diets on spawning and on egg and larval quality of hatchery-bred rabbitfish (*Siganus guttatus*)[J]. Philippine Scientist,1994(31):42-57.

[16]Watanabe T. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream[J]. Nippon Suisan Gakkaishi,1984,50(3):495-501.

钠、氯化钾等试剂均为国产分析纯。

1.3 兔 NF-κB p50 蛋白的序列分析

以 DNASTar 软件对 p50 蛋白序列进行氨基酸比对及功能区分分析,并采用 Disulfind 在线工具 (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>) 进行二硫键预测及分析。

1.4 重组表达载体 pGEX-4T-1-p50 的获得

采用 OptimumGene™ 软件对兔 p50 基因序列 (GenBank No. XM017347386) 进行大肠杆菌密码子优化,优化序列经合成后连接至 pGEX-4T-1 载体中,获得重组表达载体 pGEX-4T-1-p50。

1.5 GST-p50 融合蛋白的诱导表达

将重组质粒 pGEX-4T-1-p50 转化大肠杆菌 Origami B (DE3) 菌株,挑取单菌落接种到含氨苄青霉素 (100 μg/mL)、卡那霉素 (50 μg/mL) 和四环素 (20 μg/mL) 的 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养过夜,按 1:100 体积比将培养物接种于含以上 3 种抗生素的新鲜 LB 液体培养基中,振荡培养至  $D_{600\text{ nm}}$  值为 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG),16 ℃ 诱导表达过夜,12 000 r/min 离心收集菌体,磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬后冰浴超声破碎,分别收集上清和沉淀,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。

1.6 GST-p50 蛋白的纯化及蛋白免疫印迹 (western blot) 鉴定

按“1.5”节的方法大量诱导表达 GST-p50 蛋白,经超声破碎后,12 000 r/min 离心收集上清液,采用 GST 磁珠纯化目的蛋白,具体操作按 GST 磁珠说明书进行。将纯化后的 GST-p50 蛋白进行 SDS-PAGE,采用半干转印法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,以针对 p50 的多克隆抗体 (1:1 000 稀释) 为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释) 为二抗进行反应,ECL (增强化学发光法) 显色观察结果。

2 结果与分析

2.1 兔 p50 序列分析

以 DNASTar 软件对 p50 序列进行分析,结果表明,兔 p50 基因全长 1 299 bp,编码 432 个氨基酸。参照已报道的人 p50 蛋白 NTD、DD、Linker 和 Flexible region 等区域划分,通过氨基酸序列比对,发现兔 p50 蛋白同样存在相同的功能区 (图 1)。对兔 p50 基因编码蛋白的进一步分析显示,兔 p50 蛋白的相对分子质量为 47 404.83,等电点 (pI) 为 7.46,序列中共含有 7 个半胱氨酸 (Cys)。通过 Disulfind 在线工具进行二硫键预测,结果表明,p50 蛋白单体共可形成 3 对二硫键,分别位于 NTD 区和 Linker 区 (表 1)。

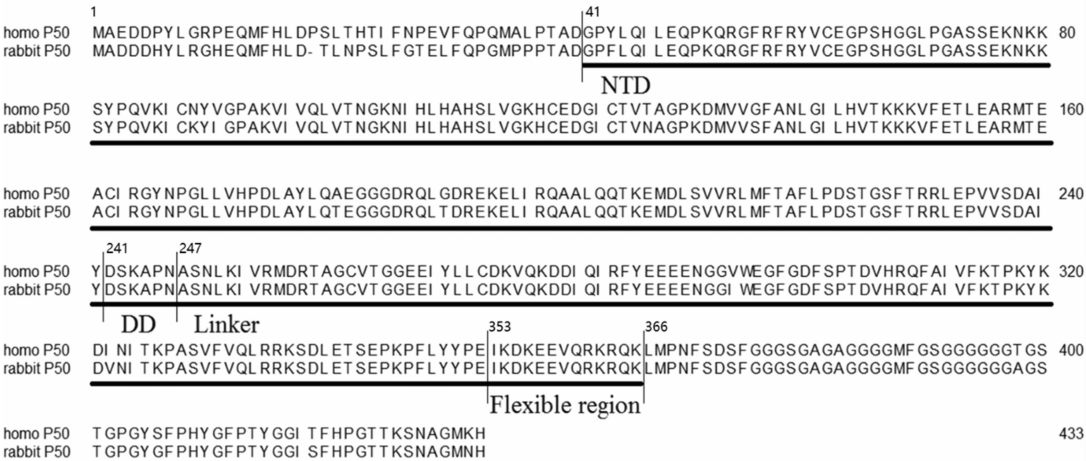


图1 兔和人 p50 蛋白序列比对及分析

表 1 预测的二硫键位点

| 二硫键数 | 二硫键位点         | 二硫键所在区域  |
|------|---------------|----------|
| 1    | 61aa ~ 87aa   | NTD 区    |
| 2    | 118aa ~ 123aa | NTD 区    |
| 3    | 261aa ~ 272aa | Linker 区 |

2.3 GST-p50 蛋白的表达及纯化

将重组质粒 pGEX-4T-1-p50 转化 *E. coli* Origami B (DE3) 菌株,经 IPTG 诱导表达,超声破碎后,上清和沉淀的 SDS-PAGE 电泳结果显示,在约 76 ku 处有 1 条明显的蛋白条带,与预期大小一致 (图 2),表明重组 GST-p50 蛋白主要以可溶形式表达。经 Image J 软件分析,上清中 GST-p50 蛋白量是包涵体的 3.07 倍 (图 3)。

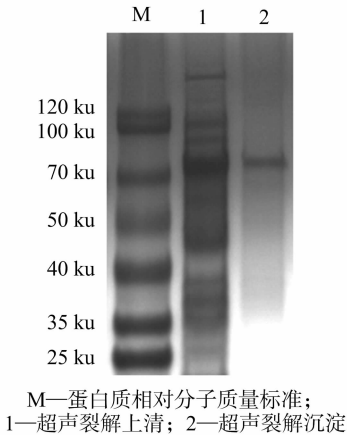


图2 GST-p50 蛋白质表达的 SDS-PAGE 分析

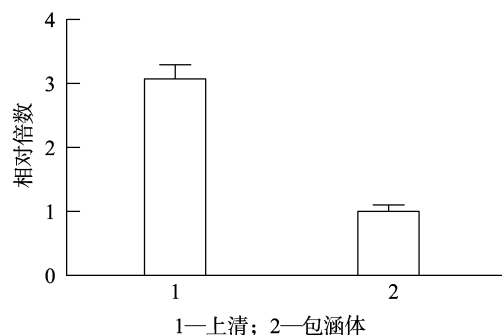
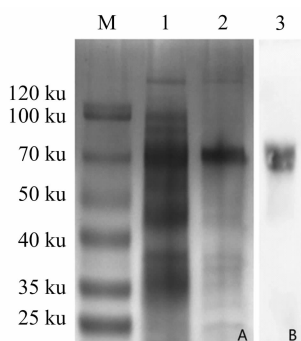


图3 GST-p50 蛋白质表达量分析

#### 2.4 GST-p50 蛋白的纯化及鉴定

采用 GST 磁珠对表达上清中 GST-p50 蛋白进行纯化, SDS-PAGE 电泳表明, 获得了纯化的 GST-p50 蛋白, Western Blot 鉴定结果显示, 所表达纯化的融合蛋白能被 p50 抗体特异性识别(图 4), 表明 p50 蛋白表达正确。



M—蛋白质相对分子质量标准; 1—超声裂解上清;  
2—纯化的 GST-p50 蛋白; 3—GST-p50 蛋白的 Western blot

图4 GST-p50 蛋白的纯化及鉴定

### 3 讨论

获得大量纯化的蛋白质是蛋白质理化性质和功能研究的基础, 迄今大肠杆菌表达系统由于其遗传背景清楚、表达高效、经济方便等特点仍然是最常用的蛋白质表达系统。大肠杆菌表达外源蛋白可分为胞外分泌、周质表达和胞质表达 3 种形式。胞质表达方式的蛋白质表达量最高, 但易形成无活性的包涵体, 须经过复杂的变性复性过程才能得到有活性的目的蛋白<sup>[10]</sup>, 因此提高蛋白的可溶性表达是原核表达中须要重点考虑的因素之一。

已有研究表明, 人源和猪源 NF- $\kappa$ B p50 蛋白质在大肠杆菌中均以包涵体形式表达, 须进行变性、复性、纯化等一系列处理才能用于后续研究<sup>[1,11]</sup>, 且蛋白复性的效率并不高。目前普遍认为包涵体的形成是因为二硫键错配导致错误折叠的结果, 且优化密码子、降低表达温度、分子伴侣、融合表达可溶性多肽等方法是提高蛋白质可溶性表达的主要策略<sup>[12-15]</sup>。因此本研究中, 首先对 p50 蛋白质序列及二硫键形成进行了分析, 发现 p50 序列含有 7 个半胱氨酸, 其中 6 个可形成 3 对二硫键, 分别位于 NTD 和 Linker 区域。这些二硫键在表达过程中能否正确折叠和配对可能对所表达的 p50 蛋白质的可溶性及活性十分关键。因此本研究选择了可高效促进蛋白二硫

键正确折叠的 Origami B (DE3) 大肠杆菌作为表达宿主菌。此外, 优化 p50 基因序列密码子、采用 GST 融合表达载体及 16 °C 低温诱导等方法, 成功表达了 p50 蛋白质。经分析, 其可溶性蛋白表达量是包涵体的 3 倍以上, 实现了 p50 蛋白质的高效可溶表达, 为后续 p50 相互作用蛋白质及 NF- $\kappa$ B 信号通路的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 王潇娣, 朱玲, 蔡雨函, 等. 猪 NF- $\kappa$ B p65/p50 亚基的原核表达及其对猪繁殖与呼吸综合征病毒增殖的影响[J]. 病毒学报, 2013, 29(6): 621-631.
- [2] Qin Z H, Tao L Y, Chen X. Dual roles of NF- $\kappa$ B in cell survival and implications of NF- $\kappa$ B inhibitors in neuroprotective therapy[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2007, 28(12): 1859-1872.
- [3] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling[J]. Cell, 2008, 132(3): 344-362.
- [4] Chen J E, Chen Z J. Regulation of NF- $\kappa$ B by ubiquitination[J]. Current Opinion in Immunology, 2013, 25(1): 4-12.
- [5] Kumar M, Dadhwal P, Atreya H S, et al. Backbone resonance assignments of the dimeric domain of the p50 NF- $\kappa$ B subunit[J]. Biomolecular NMR Assignments, 2019(8): 1-3.
- [6] Cartwright T N, Worrell J C, Marchetti L, et al. HDAC1 interacts with the p50 NF- $\kappa$ B subunit via its nuclear localization sequence to constrain inflammatory gene expression[J]. Biochimica et Biophysica Acta (Gene Regulatory Mechanisms), 2018, 1861(10): 962-970.
- [7] de Souza Braga M, Da Silva Paiva K B, Foguer K, et al. Involvement of the NF- $\kappa$ B/p50/Bcl-3 complex in response to antiangiogenic therapy in a mouse model of metastatic renal cell carcinoma[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2014, 68(7): 873-879.
- [8] Theresa B, Allison M, Sarah H B, et al. Deletion of NF- $\kappa$ B p50 alters murine glioblastoma tumor-associated macrophage polarization, reduces tumor growth and prolongs survival[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2015, 3(2): 395.
- [9] Barberi T, Martin A, Suresh R, et al. Absence of host NF- $\kappa$ B p50 induces murine glioblastoma tumor regression, increases survival, and decreases T-cell induction of tumor-associated macrophage M2 polarization[J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2018, 67(10): 1491-1503.
- [10] 刘爽, 胡宝成. 原核系统可溶性表达策略[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(2): 172-175.
- [11] 李生茂, 梁华平, 徐祥, 等. GST Pull-down 实验鉴定 NF- $\kappa$ B 相互作用多肽[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(1): 94-97.
- [12] 韩平, 盖园明, 朱蓓薇, 等. hTNFR1 在大肠杆菌中可溶性表达及纯化[J]. 生物技术进展, 2018, 8(3): 246-253.
- [13] 郭玉堃, 郭婉莹, 明胜利, 等. O 型口蹄疫病毒衣壳蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及电泳检测[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(7): 1265-1271.
- [14] 孙杰, 秦飞燕, 朱言柱, 等. 犬 I 型腺病毒结构蛋白 Knob 的可溶性表达及免疫原性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(15): 10-14.
- [15] 刘盼婉, 周雪晨, 朱雪蛟, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达及在小鼠体内免疫特性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(4): 50-56.