

人 HMGB1 A box 和 B box cDNA 的克隆与表达

张 艳, 何凤田, 李蓉芬, 连继勤, 杨朝辉, 高会广

张艳, 何凤田, 李蓉芬, 连继勤, 杨朝辉, 高会广, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室 重庆市 400038
张艳, 女, 1978-02-09 生, 重庆市人, 汉族. 2002 年中国人民解放军第三军医大学硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究.
项目负责人: 何凤田, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室. tmmubiozy@yahoo.com.cn
电话: 023-68752263 传真: 023-68753462
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-18

Cloning and expression of HMGB1 A box and B box cDNAs

Yan Zhang, Feng-Tian Hen, Rong-Fen Li, Ji-Qin Lian, Zhao-Hui Yang, Hui-Guang Gao

Yan Zhang, Feng-Tian Hen, Rong-Fen Li, Ji-Qin Lian, Zhao-Hui Yang, Hui-Guang Gao, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Dr. Feng-Tian Hen, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. tmmubiozy@yahoo.com.cn
Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To clone human HMGB1 A box and B box cDNA, to construct their prokaryotic expression vectors and to express their products for examining their activity.

METHODS: The total RNA was extracted from human tonsil and the human HMGB1 A box and B box cDNA sequence were amplified using RT-PCR, and inserted into pUC19 for sequence analysis. Then the identified cDNAs were inserted into the new type of prokaryotic expression vector pQE-80 L/DHFR. Having induced by IPTG for 4 h, we confirmed the confusion protein by SDS-PAGE, then identified the expressed confusion protein by Western blotting.

RESULTS: The target DNA fragments by RT-PCR were completely same as the sequence reported in GenBank. The recombinant prokaryotic expression vector was constructed and the fusion protein expressed, which was then identified by Western blotting.

CONCLUSION: Cloning of HMGB1 A box and B box cDNA, construction of their prokaryotic expression vectors and expression of fusion protein have provided the fundamental proof for examining their biological activity.

Zhang Y, Hen FT, Li RF, Lian JQ, Yang ZH, Gao HG. Cloning and expression of HMGB1 A box and B box cDNAs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(6):1365-1368

摘要

目的: 克隆人 HMGB1 中的 A box (1-85 aa) 和 B box (88-162 aa) 的 cDNA, 构建重组原核表达载体并对其诱导表

达, 为检测其生物学活性做准备.

方法: 提取人新鲜扁桃体组织总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出人 HMGB1 A box 和 B box 的 cDNA 序列, 并分别克隆至载体 pUC19 进行序列测定, 随后分别构建于高效原核表达载体 pQE-80L/DHFR 中, 经 IPTG 诱导 4 h 后, 可表达 M_r 约 35 000, 34 000 的融合蛋白. Western Blotting 鉴定所表达的目的蛋白.

结果: 经 RT-PCR 扩增得到了 255 bp 和 225 bp 的 DNA 片段, 经序列分析与 GenBank 中报道的已知序列完全一致, 构建了含融合蛋白的重组表达质粒, 诱导表达了目的蛋白, 经 Western Blotting 证实, 在 M_r 分别约为 35 000 和 34 000 处有两条清楚的蛋白带.

结论: HMGB1 A box 和 B box cDNA 的克隆, 原核表达载体的构建及目的蛋白的表达鉴定, 为进一步研究 HMGB1 A box 和 B box 的生物学功能奠定了基础.

张艳, 何凤田, 李蓉芬, 连继勤, 杨朝辉, 高会广. 人 HMGB1 A box 和 B box cDNA 的克隆与表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(6):1365-1368
<http://www.wjnet.com/1009-3079/12/1365.asp>

0 引言

高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box-1, HMGB1), 是根据其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有很高的迁移率而得名. 他是一个重要的晚期致炎因子, 与全身性炎症及其并发症毒性综合征 (sepsis syndrome) 的发生与发展密切相关. 巨噬/单核细胞、垂体细胞受内毒素、IL-1 α 、TNF 刺激后均能释放 HMGB1, HMGB1 也可刺激巨噬/单核细胞释放致炎因子, 如 TNF, IL-1 α , IL-1 β 等^[1]. 因此, HMGB1 成为抗炎治疗新靶点^[2-4]. 目前发现 HMGB1 还与肿瘤的生长和侵袭 (如乳腺癌, 胃肠道肿瘤等)^[5-6] 以及类风湿关节炎有关^[7]. 经结构功能分析 HMGB1 的致炎活性位于 B box, 而另一个结合 DNA 的功能结构域 HMGB1 A box 却能竞争性抑制 HMGB1 的活性, 但其作用机制尚不清楚. 因此, 我们以人新鲜扁桃体组织总 RNA 为材料, 经 RT-PCR 扩增出人 HMGB1 A box 和 B box 的 cDNA 序列, 并将其克隆于载体 pUC19 进行测序, 随后构建于高效原核表达载体 pQE-80L/DHFR, 进一步诱导该蛋白的表达, 从而为今后的深入研究其生物学功能及作用机制打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人新鲜扁桃体组织取自临床手术切除的扁桃体;质粒 pUC19 购自华美公司;原核表达载体 pQE-80L/DHFR 由本室保存;大肠杆菌 JM109、DH5 α 由本室保存;Tripure RNA 提取试剂为 Roche 公司产品;PCR 引物由上海生工公司合成;RT-PCR 及 PCR 纯化试剂盒为 Promega 公司产品;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;小鼠抗人 His 抗体购自德国 Qiagen 公司;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自华美公司;浓缩 DAB 显色液购自北京中同生物技术有限公司;硝酸纤维素膜为 Roche 公司产品。

1.2 方法 取人新鲜扁桃体组织,按 Tripure 试剂盒说明提取细胞总 RNA,经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,经紫外分光光度计测定其浓度。RT-PCR 扩增人 HMGB1 A box 和 B box cDNA。根据 GenBank 中编码人 HMGB1 A box (1-85 aa), HMGB1 B box (88-162 aa) 的 cDNA 序列,分别设计一对特异性引物。HMGB1 A box 上游引物:5' - GC GGT ACC ATG GGC AAA GGA GAT CCT A-3' (划线部分为 Kpn I 酶切位点),下游引物:5' - GC AAG CTT TCA TGT CTC CCC TTT GGG A-3' (划线部分为 Hind III 酶切位点);HMGB1 B box 上游引物:5' - CC GGT ACC AAG TTC AAG GAT CCC AAT -3' (划线部分为 Kpn I 酶切位点);下游引物:5' - CC AAG CTT TCA ATA TGC AGC AAT ATC C -3' (划线部分为 Hind III 酶切位点)。RT-PCR 按试剂盒说明进行:RNA 5 μ L (约 1 μ g), 5 \times 反应 buffer 10 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, dNTP 1 μ L, 25 mmol/L MgSO $_4$ 2 μ L, AMV 反转录酶 1 μ L (5U), Tfi DNA 聚合酶 1 μ L (5U), ddH $_2$ O 26 μ L, 总体积为 50 μ L;反应程序为 48 $^{\circ}$ C 45 min; 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 (94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 68 $^{\circ}$ C 2 min) \times 40 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 7 min。分别取 5 μ L RT-PCR 产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶扫描仪下观察并记录结果。将 RT-PCR 产物及载体 pUC19 经 Hind III + Kpn I 酶切后,分别用纯化试剂盒进行回收,按

常规条件于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h, 将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞,经蓝白筛选获得阳性重组子,提取质粒,经 Hind III + Kpn I 酶切鉴定获得重组质粒 (命名为 pUC19/HMGB1 A box, pUC19/HMGB1 B box)。然后由上海生工公司进行序列测定。行 DNA 测序后,以 Hind III + Kpn I 酶切 pUC19/HMGB1 A box, pUC19/HMGB1 B box 质粒,回收目的片段并连接于原核表达载体 pQE-80L/DHFR。将重组原核表达载体转化至大肠杆菌 DH5 α , 经质粒提取和酶切鉴定得到重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/HMGB1 A box, pQE-80L/DHFR/HMGB1 B box。挑取含重组原核表达载体的单个菌落接种于 LB 培养基 (含 50 mg/L 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后,按 10 g/L 接种于新鲜 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600\text{ nm}}$ 约为 0.7, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 4 h 后,离心收菌,行 SDS-PAGE (分离胶 120 g/L, 积层胶 50 g/L), 再经灰度扫描确定菌体总蛋白中目的蛋白的比例。以所表达目的蛋白上的 His 标签肽为标志,经 Western blot 行进一步鉴定,其简要步骤是:将诱导表达的产物先行 SDS-PAGE, 然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上,取下 NC 膜短暂漂洗后用丽春红染膜,待蛋白 marker 条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干,用记号笔标记蛋白 marker 各条带,继后经漂洗去除丽春红,然后依次经 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 与抗 -His 单抗孵育 1 h, 与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h, 每步完成后均严格洗膜,最后加 DAB 避光显色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 HMGB1 A box 和 B box 的 cDNA 扩增产物行电泳后,可见清晰条带,片段大小分别约为 255 bp 和 225 bp (图 1)。

2.2 阳性重组子的筛选 阳性重组子 pUC19/HMGB1 A box, pUC19/HMGB1 B box 经酶切后,分别可见约为 255 bp 和 225 bp 大小的目的片段 (图 2)。

2.3 序列测定

人 HMGB1 A box cDNA 序列

```
ATGGGCAAAG GAGATCCTAA GAAGCCGAGA GGCAAATGT CATCATATGC
ATTTTTGTG CAAACTTGTC GGGAGGAGCA TAAGAAGAAG CACCCAGATG
CTTCAGTCAA CTTCTCAGAG TTTTCTAAGA AGTGCTCAGA GAGGTGGAAG
ACCATGTCTG CTAAAGAGAA AGGAAAATTT GAAGATATGG CAAAAGCGGA
CAAGGCCCGT TATGAAAGAG AAATGAAAAC CTATATCCCT CCCAAAGGGG
AGACA
```

人 HMGB1 B box cDNA 序列

```
AAGTTCAAGG ATCCCAATGC ACCCAAGAGG CCTCCTTCGG CCTTCTTCCT
CTTCTGCTCT GAGTATCGCC CAAAATCAA AGGAGAACAT CCTGGCCTGT
CCATTGGTGA TGTTGCGAAG AACTGGGAG AGATGTGGAA TAACACTGCT
GCAGATGACA AGCAGCCTTA TGAAAAGAAG GCTGCGAAGC TGAAGGAAAA
ATACGAAAA GATATTGCTG CATAT
```

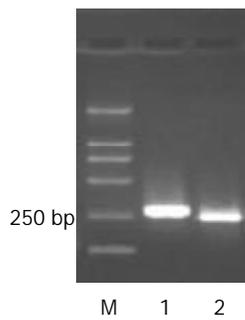


图1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果. 1: 人 HMGB1 A box cDNA; 2: 人 HMGB1 B box cDNA.

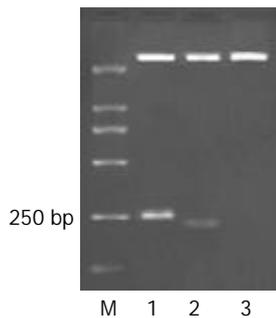


图2 重组质粒的酶切鉴定. 1: pUC19/ HMGB1 A box /Hind III + Kpn I; 2: pUC19/ HMGB1 B box /Hind III + Kpn I; 3: pUC19/ Hind III + Kpn I.

2.4 重组原核表达载体的构建 将序列正确的 HMGB1 A box, B box cDNA 分别克隆于原核表达载体 pQE-80L/DHFR 得到重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/HMGB1A box, pQE-80L/DHFR/HMGB1B box, 经酶切后分别见约为 255 bp 和 225 bp 大小的目的片段(图 3).

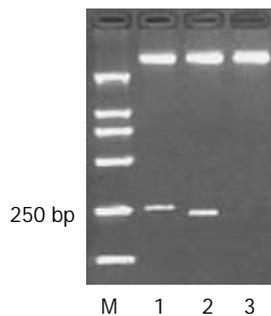


图3 重组原核表达载体的酶切鉴定. 1: pQE-80L/DHFR / HMGB1 A box /Hind III + Kpn I; 2: pQE-80L/DHFR / HMGB1 B box /Hind III + Kpn I; 3: pQE-80L/DHFR / Hind III + Kpn I.

2.5 重组蛋白的表达与鉴定 重组原核表达载体转化至大肠杆菌 DH5 α 后, 以 IPTG 诱导表达, 对细胞裂解液进行 SDS-PAGE, 结果显示重组目的蛋白在 M_r 35 000, M_r 34 000 处分别有一清晰条带, 与预期结果一致, 而含融合蛋白 DHFR 的空载体 pQE-80L/DHFR 的菌株在 M_r 26 000 处有一清晰条带(图 4). 灰度扫描显示目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 40%, 这表明目的蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达. 以 His 标签肽为标志的 Western blot 分析显示, 经 IPTG 诱导的含重组原核表达载体

pQE-80L/DHFR/HMGB1A box, pQE-80L/DHFR/HMGB1 B box 的菌体裂解物能与抗 -His 单抗特异性反应, 在约 M_r 35 000 与 M_r 34 000 处呈现一条带, 而经同样诱导的含融合蛋白 DHFR 的空载体 pQE-80L/DHFR 在约 M_r 26 000 有一清晰条带, 说明所表达的融合蛋白的确是目的蛋白(图 5).

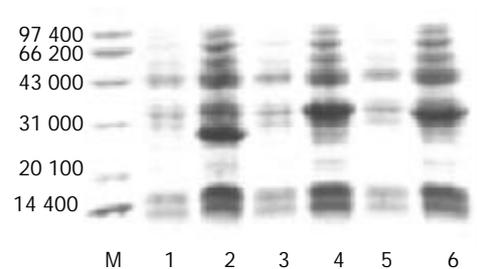


图4 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析. 1: 对照质粒 pQE-80L/DHFR 未经 IPTG 诱导; 2: 对照质粒 pQE-80L/DHFR 经 IPTG 诱导后; 3: 重组质粒 pQE-80L/DHFR/HMGB1 A box 未经 IPTG 诱导; 4: 重组质粒 pQE-80L/DHFR/HMGB1 A box 经 IPTG 诱导后; 5: 重组质粒 pQE-80 L/DHFR/HMGB1 B box 未经 IPTG 诱导; 6: 重组质粒 pQE-80 L/DHFR/HMGB1 B box 经 IPTG 诱导后.

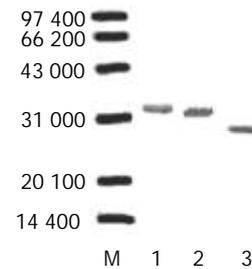


图5 重组蛋白的 Western blot 鉴定. 1: 重组质粒 pQE-80L/DHFR/HMGB1 A box 经 IPTG 诱导后; 2: 重组质粒 pQE-80L/DHFR/HMGB1 B box 经 IPTG 诱导后; 3: 对照质粒 pQE-80L/DHFR 经 IPTG 诱导后.

3 讨论

HMGB1 是高迁移率族蛋白超家族的成员, 根据结构特点高迁移率族蛋白超家族可分为 HMGB、HMGN、HMGA 三类家族, 而 HMGB1 属于 HMGB 家族, 真核细胞染色质中含有丰富的 HMGB1, 人 HMGB1 含 215 个氨基酸残基, 基因定位于染色体 13q12. N 端富含赖氨酸, 而氨基酸序列高度保守的 C 端(又称产酸尾端, “acidic tail”, 富含天冬氨酸和谷氨酸. HMGB1 含有 2 个约 80aa 组成的 “L” 型的 HMG box, 分别是 A box (1-85 aa) 和 B box (88-162 aa) 是结合 DNA 的功能结构域. 其中 B box 是 HMGB1 发挥致炎功能的主要区域^[8], 而 A box 却能竞争性抑制 HMGB1 的致炎功能. 膜相关的 HMGB1 结合的受体是 RAGE (receptor for advanced glycation end products). 内皮细胞、血管平滑肌细胞、神经元、单核/巨噬细胞均表达 RAGE^[9]. HMGB1 与 RAGE 高亲和力结合, 较其他的 RAGE 配体高 7 倍. HMGB1 与 RAGE 结合能诱导大鼠平滑肌细胞的迁移^[10]和促进轴突生长^[11], 而且能抑制肿瘤的生长和转移^[12]. 目前的研究发现细胞表面可能还存在着其他的 HMGB1

受体^[13].

目前,发现HMGB1可作为晚期致炎因子,密切参与炎症的发生发展.动物实验表明,大鼠经致死量脂多糖(LPS)处理后,TNF、IL-1 β 等早期致炎因子一般在6 h内达到高峰,然后很快回到基础水平,而大鼠仍在攻击后数日内死亡,故提示内毒素血症致死死亡的过程中,存在一种迟发递质即HMGB1起着重要的作用.TNF基因敲除小鼠在注射高剂量的内毒素后数小时至数天内也发生死亡.同时,Wang et al用LPS刺激大鼠RAW264.7细胞,并用SDS-PAGE法分析此条件培养基,发现LPS刺激后18 h即可诱发一种M_r30 000的蛋白质出现,而在早期此种蛋白质并不突出,经氨基酸序列分析证实这种迟发递质为大鼠HMGB1.巨噬细胞、单核细胞、垂体细胞受内毒素、IL-1、TNF刺激后在胞内形成富含HMGB1的囊泡,再以胞吐的方式释放HMGB1^[14],同时,HMGB1也可刺激单核细胞、巨噬细胞释放致炎因子,如TNF,IL-1 α ,IL-1 β ,IL-6,IL-8,MIP-1 α ,MIP-1 β 等.因此,我们选用了手术切除的人新鲜扁桃体组织来提取总RNA,最终获得了与已知序列完全一致的目的片段.

由于HMGB1A box、HMGB1 B box的分子量分别只有10 000和9 000,难以在细菌体内形成正确的折叠和稳定表达,容易被降解,因此我们从pQE-40L质粒上截取了表达二氢叶酸还原酶(DHFR)的基因片段,与目的基因片段一起连接于表达载体pQE-80L上,从而获得了HMGB1A box、HMGB1 B box融合蛋白稳定的表达.另外,我们所采用的原核表达载pQE-80L是一种高效表达载体,该载体表达的目的蛋白量可达到细胞蛋白总量的50%,表达蛋白的N端带有6 \times His-tag,便于纯化和检测.

4 参考文献

1 Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimu-

- lates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565-570
- 2 Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Crit Care Med* 2003; 31:S46-50
- 3 Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *J Endotoxin Res* 2002;8:469-472
- 4 Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 2002;72: 1084-1091
- 5 Lotze MT, DeMarco RA. Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4:1405-1409
- 6 Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 2004;164:441-449
- 7 Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med* 2004;255:344-350
- 8 Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, Wang H, Warren HS, Moldawer LL, Fink MP, Andersson U, Tracey KJ, Yang H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box-1. *Mol Med* 2003;9:37-45
- 9 Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:368-375
- 10 Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrighi G, Bianchi ME. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001;152:1197-1206
- 11 Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze HH. N-Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem* 2002;80:998-1008
- 12 Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphotericin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000;405: 354-360
- 13 Sparatore B, Pedrazzi M, Passalacqua M, Gaggero D, Patrone M, Pontremoli S, Melloni E. Stimulation of erythroleukemia cell differentiation by extracellular high-mobility group box protein 1 is independent of the receptor for advanced glycation end-products. *Biochem J* 2002;363:529-535
- 14 Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002;3:995-1001