

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00551

转录因子 NF- κ B 活性检测技术

凌小倩, 王进科

东南大学生物电子学国家重点实验室, 南京 210096

摘要: NF- κ B 是一种诱导性转录因子, 广泛存在于各种细胞, 在细胞受到各种刺激时可被激活, 调节大量靶基因, 因此在很多重要细胞进程, 如细胞生长、分化、凋亡和癌变中均发挥重要作用。自其发现以来的 25 年中, NF- κ B 是生物医学科学各领域中被持续大量深入研究的前沿热点转录因子, 同时也是疾病治疗和药物筛选的重要靶点。NF- κ B 的活性检测是研究其活化和功能首当其冲的实验内容, 因此 NF- κ B 的活性检测技术历来受到重视和不断发展。特别是近几年来, 随着各学科的发展, 出现了多种 NF- κ B 活性检测新技术, 如基于双链 DNA 修饰微孔板的类 ELISA 分析、膜结合分析、各种荧光共振能量转移分析、基于内外切酶保护的荧光报告及核酸扩增分析、基于免疫微球的质谱及流式细胞分析, 以及物理化学分析等。其中有些技术已经对 NF- κ B 的研究发挥了重要作用。文章对近年来发展的各种检测技术进行了分类综述, 以便从事 NF- κ B 相关研究的科研人员对该种转录因子的检测分析技术有一个全貌的了解, 并有益于在其研究中选择恰当合适的实验方法。此外, 对这些技术的学习和理解, 可能激发研究人员对现有技术的改进和发展新的技术。

关键词: 转录因子; NF- κ B; 活性; 检测

Techniques for assaying the activity of transcription factor NF- κ B

LING Xiao-Qian, WANG Jin-Ke

The State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China

Abstract: NF- κ B is a stimulatory transcription factor that is ubiquitous in almost all kinds of cells. When cells are under various stimuli, NF- κ B is activated and regulates large numbers of target genes, and thus controls important cellular processes, ranging from cell growth and differentiation to apoptosis and cancer. Therefore, NF- κ B is a forefront hotspot transcription factor that is intensively studied in virtually all fields of biomedical sciences, and becomes a promising target for disease therapy and drug screening. The activity detection is the first and inevitable step for the studies of NF- κ B activation and function. Therefore, the techniques for detection of NF- κ B activity have always been paid more attention and continuously developed. Especially in recent year, along with the development of each disciplines, various new techniques have been developed, including ELISA-like assays based on dsDNA-coupled plate, filter binding assays, FRET assays, fluorescence reporting and nucleic acids amplification assays based on exonuclease and endonuclease, MS and flow cytometry

收稿日期: 2012-09-20; 修回日期: 2012-10-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 61171030)和江苏省社会发展项目(编号: BE2012741)资助

作者简介: 凌小倩, 硕士研究生, 专业方向: 生物物理学。E-mail: xqlingseu@yahoo.cn

通讯作者: 王进科, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物医学工程。E-mail: wangjinke@seu.edu.cn

网络出版时间: 2013-3-12 15:25:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130312.1525.004.html>

assays based on immunomicrobeads, and other biophysical and electrochemical assays. Some of these techniques have already played important roles in NF- κ B studies. This paper reviewed new techniques developed in recent years by classification, in order to provide an overview of NF- κ B activity assays, which may be helpful for researchers to select appropriate techniques used in their studies. Moreover, the learning and understanding of these techniques may inspire researchers to improve currently existing techniques and develop novel methods for the studies of NF- κ B.

Keywords: transcription factor; NF- κ B; activity; assay

核因子 κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一类转录因子 (Transcription factor, TF), 因其在 1986 年 Sen 和 Baltimore^[1] 首先从 B 淋巴细胞核抽提物中检出, 可与免疫球蛋白的轻链基因增强子 κ B 结合而被命名为 NF- κ B。其蛋白质家族中有 5 个成员, Rel A(p65)、RelB、c-Rel、NF- κ B1(p50 和它的前体 p105) 和 NF- κ B2(p52 和它的前体 p100)^[2-4]。通常 NF- κ B 是指家族中的一个同源二聚体或异源二聚体, 细胞中最常见的是 p50-p65 的异二聚体。NF- κ B 在细胞质中结合到它的抑制因子 I κ B 上以不活动的状态存在; 当细胞受到刺激时, NF- κ B 的抑制因子 I κ B 磷酸化, 从而将 NF- κ B 从 I κ B 复合物中释放出来, 释放出来的 NF- κ B 从细胞质进入细胞核中^[5,6], 特异性地识别并结合其结合位点 (称为 κ B 位点, 共同基序为 5'-GGGRNYYYCC-3', 其中 R 代表嘌呤, Y 代表嘧啶, N 代表任意核苷酸)^[7], 调控其靶基因的转录。

虽然最初发现于淋巴细胞中, 但后来的研究逐渐发现 NF- κ B 广泛地存在各种组织细胞中, 并且是一种诱导性转录因子, 可在多种诱导因素 (如病毒、紫外线、脂多糖、肿瘤坏死因子 α 、佛波酯、白细胞介素 6 等) 的刺激下被活化, 调控大量的靶基因^[8-13]。大量的研究表明, NF- κ B 及其信号通路在很多生物过程包括先天和适应性的免疫应答^[14]、氧化应激反应、衰老和癌症中扮演着重要的角色。它的失调与许多免疫疾病以及一些癌症直接相关, 在风湿性关节炎、哮喘、慢性肠炎病人的病灶部位通常会观察到高表达活化的 NF- κ B^[15]。此外, 在急性淋巴瘤、白血病、前列腺癌以及卵巢癌中都发现了 NF- κ B 的组成性激活^[16,17]。目前, 还在多种肿瘤中发现存在 NF- κ B 的非生理性高表达和组成性激活现象^[18,19], 同时还伴有 IKK 的持续激活或 I κ B 的激活缺陷等^[20-22]。最近发现 NF- κ B 与儿童孤独症^[23]也存在密切

关系。NF- κ B 已经成为疾病治疗 (如帕金森症^[24]、肿瘤^[25,26]) 和药物筛选的重要靶点。

由于 NF- κ B 在很多生物过程中发挥重要作用, 针对 NF- κ B 家族的研究越来越受到关注, 研究文献呈逐年快速增长的趋势。事实上, 自发现以来的 25 年中, 转录因子 NF- κ B 家族几乎是生物医学科学所有领域深入研究的对象, 对该转录因子家族功能和调控的研究一直是免疫学、肿瘤学及分子病理学研究的前沿, 并且这些研究伴随着分子生物学、基因工程、系统生物学及计算生物中概念和技术的不断发展, 从而在阐明 NF- κ B 活化的诱因、NF- κ B 通路的组分以及 NF- κ B 生理和病理功能方面取得了显著的进展^[27]。

由于 NF- κ B 研究的持续热度, 针对其活性检测及 DNA 结合特异性分析的研究方法和实验技术被不断发展出来, 促进了 NF- κ B 的研究。鉴于研究方法和实验技术对 NF- κ B 基础及生物医学应用研究的重要意义, 本文对近年来发展的各种检测技术进行了分类综述, 以便从事 NF- κ B 相关研究的科研人员对该种转录因子的检测分析技术有一个全貌的了解, 并有益于选择恰当合适的实验方法。

1 检测 NF- κ B 活性的常规技术

检测 NF- κ B 活性的经典技术包括电泳迁移率变动分析 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 和酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。

EMSA 是一种使用标记的双链 DNA (dsDNA) 探针来研究转录因子蛋白与 DNA 调控区序列结合的技术, 可对 DNA 序列特异性结合转录因子蛋白进行定性和定量检测, 是目前检测转录因子活性的金标准技术^[28,29]。EMSA 检测中, DNA/转录因子蛋白复

合体在自然聚丙烯酰胺凝胶电泳(native PAGE)中的迁移率小于游离 DNA 探针, 从而形成滞后条带, 而滞后条带的有无及量的多少, 反映了转录因子蛋白与 DNA 探针的结合活性^[30]、转录因子蛋白的表达及活化水平^[31], 并能计算出转录因子蛋白与 DNA 探针的结合常数或解离常数^[32,33]。EMSA 实验按照探针标记物的不同分为: 放射性 EMSA^[34]、化学发光 EMSA^[35]、普通荧光 EMSA^[36]以及近红外荧光 EMSA^[37,38]。放射性 EMSA 由于其高灵敏性和极低的背景而被广泛地用于检测 NF- κ B 的活性及其 DNA 结合特异性^[39,40]。化学发光 EMSA 因其非放射性优点, 也被用于检测 NF- κ B 的活性, 如华东等^[41]建立了两种检测 NF- κ B 的化学发光 EMSA 程序。目前已有各种商业化的检测 NF- κ B 的化学发光 EMSA 试剂盒, 如: Nonradioactive NF- κ B EMSA Kit (Viagene Biotech)、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit(PIERCE)。近红外荧光 EMSA 以其非放射性、实验程序简单、检测速度快、灵敏度高、背景低等优点成为目前成像效果最好的 EMSA 技术。高婧等^[42]建立了 3 种检测 NF- κ B 的近红外荧光 EMSA 程序。Li-Cor Biosciences 公司提供了一种商业化的近红外荧光素标记的寡核苷酸: IRDye700 NF- κ B 共有序列寡核苷酸, 已被快速大量用于以近红外荧光 EMSA 方法检测 NF- κ B 活性^[43~48]。

ELISA 的基本原理是将受检样本和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应, 然后通过洗涤将固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开, 最后加入酶反应底物, 底物被酶催化后变为有色产物, 故可根据颜色反应的深浅定性或定量分析。根据检测目的和操作步骤不同, ELISA 分为直接法、间接法、双抗体夹心法和竞争法 4 种类型。根据酶底物产生的信号不同, ELISA 方法可分为显色法、化学发光法和荧光法。这些不同种类的 ELISA 方法都适于检测 NF- κ B 活性^[49~52]。ELISA 方法的优点是特异性强、检测灵敏度高、无放射性同位素污染等, 缺点是检测过程冗长, 且在使用细胞裂解物作为受检样本时, 不能区分转录因子蛋白是否具有 DNA 结合活性。目前已有各种商业化的 NF- κ B ELISA 检测试剂盒, 如: PathScan® Total NF- κ B p65 Sandwich ELISA Kit(Cell signaling technology)、NF- κ B p65(Total)ELISA Kit(Invitrogen)^[49~52]。

近些年, 随着 NF- κ B 研究的拓展和深入, 这些经典技术也凸显出其费时费力、通量低等局限性, 因此检测 NF- κ B 的新技术应运而生。这些新技术主要包括: 基于 dsDNA 修饰微孔板的类 ELISA 分析、膜结合分析、荧光共振能量转移、基于外切酶保护的荧光报告技术、基于酶保护及核酸扩增的检测方法、寡核苷酸质量标签法、基于流式细胞仪的免疫分析法, 以及物理化学分析方法等。

2 基于 dsDNA 修饰微孔板的类 ELISA 分析方法

2.1 DPI-ELISA

2001 年, Renard 等^[53]提出了基于 dsDNA 修饰微孔板进行 NF- κ B 检测的类 ELISA 方法, 该方法因基于 DNA 与蛋白质的互作, 有的文献也称为 DNA-蛋白质互作 ELISA(DNA-protein interaction-ELISA, DPI-ELISA^[54]), 或转录因子酶联免疫分析(Transcription factor enzyme-linked immunoassay, TF-EIA^[55])。在该方法中, 首先将含有 NF- κ B 结合位点(如 GGGA CTTTCC)的 dsDNA 寡核苷酸固定于微孔板底部, 然后将蛋白质样品(如细胞核提取物)在微孔板中孵育, 使 NF- κ B 蛋白结合到 dsDNA 上, 经洗涤除去非特异性结合后, 先后使 NF- κ B 特异抗体(Antibody, Ab)及酶[如辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)]标记的二抗与微孔板孵育, 最后加入酶的底物(如四甲基联苯胺), 通过酶促显色, 并在特定波长下(如 450 nm)读取分析 OD 值, 根据 OD 值的大小定量样本中 NF- κ B 的活性(图 1)。该分析方法简单实用、无放射性、重复性高、特异性好, 比常规的放射性 EMSA 敏感性高, 可直接将细胞裂解物作为样本, 更适于高通量筛选, 因此, 近年来在 NF- κ B 研究中已经被广泛应用。此外, 很多学者对该技术还进行了改进和发展^[56~59], 如 Wang 等^[60,61]使用 NOS 基团修饰的微孔板固定氨基修饰的 dsDNA 以制备 dsDNA 修饰微孔板用于检测 NF- κ B, 较使用亲合素^[53]或链亲合素^[53,57]修饰的微孔板显著降低了制备 dsDNA 修饰微孔板的实验成本。

由于该技术实用性强, 因此, 该技术已经被广泛商业化, 多家生物技术公司提供包含全套检测试剂的试剂盒, 如 NF- κ B Combo Transcription factor

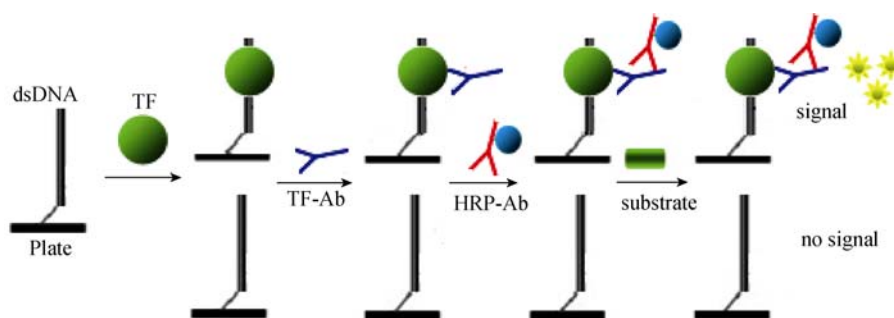


图 1 DPI-ELISA 技术检测转录因子活性原理示意图

assay kit (Cayman Chemical)^[62]、NF- κ B ELISA Kit (Panomics)、TransAM™ NF- κ B Transcription Factor Assay Kits(Active Motif)^[63,64]、BD Mercury™ TransFactor NF- κ B Kit (BD Biosciences)、NF- κ B Transcription factor assay kit(Cayman Chemical)、NF- κ B Transcription Factor AssayColorimetric(Che-micon International)、Colorimetric Enzyme Immuno-assay for NF- κ B(Oxford Biomedical Research)、NF- κ B Transcription Factor Assay Kit(Rockland Immuno-chemicals)等。以上试剂盒都使用酶促显色进行信号检测。

除使用酶显色底物外,在最后的检测步骤中也可以加入化学发光底物(如 ECL 或 CSPD),使用光度计、带化学发光模块的酶标仪(如 Bio-TekSynergy HT),或带冷 CCD 的照相系统(如化学发光成像仪)检测信号。如 BD TransFactor NF- κ B Chemiluminescent Kit 及 BD TransFactor NF- κ B Family Chemiluminescent Kit(BD Biosciences Clontech)、Enzyme Immunoassay for NF- κ B(Oxford Biomedical Research)、EZ-Detect™ Transcription Factor Kits for NF- κ B p50/p65(PIERCE)^[65]、TransAM® NF- κ B Chemi Transcription Factor ELISA Kits(Active Motif)^[66]等试剂盒。与比色分析相比较,化学发光灵敏性高(每孔可检测<10pg 的 NF- κ B p50)、线性范围宽(0~1000pg NF- κ B p50/孔, $r^2>0.99$)但其化学发光信号会随时间延长而衰减^[56]。

此外,最近有研究报道可将 dsDNA 包被的微孔板(Cayman Chemical)与近红外荧光标记的抗体(Li-COR biosciences)相结合,用于 NF- κ B 活性的检测^[67]。这有可能成为 DPI-ELISA 方法一个重要的趋势,因为在 800 nm 的近红外荧光区,动物的组织、常用的生化检测载体(如玻片、微孔板、固相膜等)

具有最低的荧光本底,可使检测的灵敏性和成像效果达到最佳。

与 EMSA 相比较,基于 DPI-ELISA 的 NF- κ B 活性检测方法最显著的优点是可以实现大量样本的快速高通量检测,非常有利于 NF- κ B 活性抑制药物的筛选和大量样本的快速测定。和传统 ELISA 相比较,DPI-ELISA 是在 DNA 与蛋白质相互作用的水平上检测 NF- κ B 活性,能够检测出细胞内真正处于活化状态的 NF- κ B,因为与抑制蛋白 I κ B 结合的 NF- κ B 并不具有 DNA 结合活性,是处于非活性状态的 NF- κ B。但传统 ELISA 检测只是在蛋白质-蛋白质(抗原-抗体)相互作用水平的检测 NF- κ B,那些与抑制蛋白 I κ B 结合的 NF- κ B 也可能与抗体结合,因此,难以反映细胞内真正的 NF- κ B 活化水平。而且目前的传统 ELISA NF- κ B 检测方法基本上都是双抗夹心法^[49-52],这就需要制备两种抗不同抗原表位的 NF- κ B 抗体,因此检测的成本也很高。

2.2 Exo -ELISA

核酸外切酶 (Exonuclease, *Exo*) 作用于 dsDNA,沿 3'→5'方向逐步切去单核苷酸。*Exo* 与底物的每次结合,只切除最末的几个核苷酸,从而对 dsDNA 产生渐进缺失。*Exo* 最适底物是平末端或 3'凹陷末端 DNA,3'突出末端拮抗该酶的切割,拮抗程度随 3'突出末端的长度而改变,4 碱基或更长的突出完全不能被切割。正是因为 *Exo* 的这些特性,它被广泛用于转录因子的足迹分析。2006 年, Wang 等^[68]发展了 *Exo* 介导的类 ELISA 分析方法,用于检测转录因子的 DNA-结合活性(图 2)。该方法将带有转录因子结合位点和特殊标记[如地高辛(Digoxigenin, DIG)或生物素]的 dsDNA 寡核苷酸固定在微孔板中,之后让待检蛋白样品与微孔板孵育,经

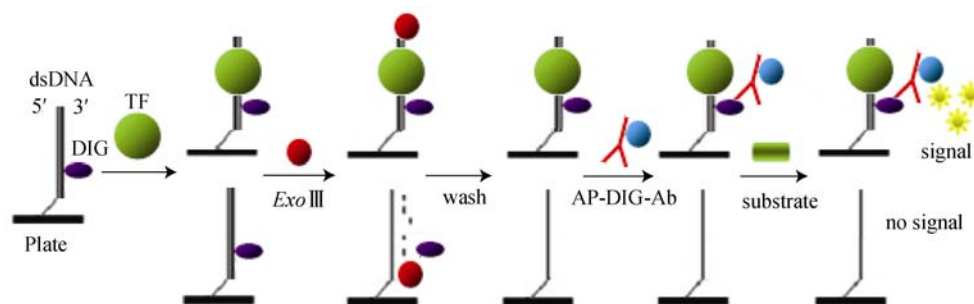


图2 Exo-ELISA 检测转录因子蛋白示意图

洗涤后用 *Exo* 处理, 最后用酶[如碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP)]标记的抗体(如抗地高辛抗体)或链亲和素及其显色底物显示信号。该方法被成功用于 NF- κ B 等转录因子的检测。该方法对 DPI-ELISA 的改进之处在于不需要转录因子抗体, 这对难以获取抗体的转录因子蛋白的检测非常有利。但其缺点是 *Exo* 的不完全切割可能会造成一定的假阳性; 同时有些转录因子蛋白可能无法有效阻碍 *Exo* 的外切, 被 *Exo* 剥离, 造成假阴性。

3 膜结合法

早在 2000 年, Menetski^[69]就报道了用硝酸纤维素膜结合法检测 NF- κ B 与 DNA 相互作用。膜结合法的检测原理是膜只结合蛋白质, 不结合 DNA, 因此能将蛋白质结合的 DNA 滞留在膜上, DNA 滞留量取决于样品中靶蛋白的丰度及 DNA 结合活性。由于滤膜法操作简便快速, 同时又具有较高的敏感度, 目前已经有基于滤膜法检测 NF- κ B 活性的商业化试剂盒, 如 NF- κ B Filter Plate Assay(Signosis)^[70~72]。2007 年, Tonooka 等^[73]将膜结合法与一种可检测 DNA 的化学发光试剂相结合, 发展了一种可以简单、快速且高敏感性分析 NF- κ B 的方法。在该方法中, 首先让待检蛋白样品与含有 NF- κ B 结合位点的 dsDNA 探针孵育, 形成 dsDNA-NF- κ B 复合物, 之后

通过离心过滤将未结合的 dsDNA 分离滤除, 再使用 SDS 将复合物中的 DNA 释放出来, 最后在收集的结合型 dsDNA 中加入化学发光试剂 3,4,5-三甲氧基苯基乙二醛 (3',4',5'-trimethoxyphenylglyoxal, TMPG), 该试剂能选择性的识别寡核苷酸或 DNA 中的鸟嘌呤基团, 与其形成化学发光产物^[74], 所以检测到的发光强度与样本中 NF- κ B 丰度呈正相关(图 3)。

该方法不需要任何标记的探针和抗体, 具有仪器简单、检测限低、线性范围宽等优点, 在核提取物中最低可以检测到 5 nmol/L 的 NF- κ B; 敏感度与其他的方法荧光 EMSA 和 ELISA 相似^[73]。但是, 同其他的光谱系统一样, 化学发光分析过程也有同样的缺点, 比如选择性差, 会对一个系列的化合物做出反应, 而不是针对单个的某一化合物。另一个缺点是化学发光的发射强度依赖于各种环境因素, 在不同的环境体系中, 发射强度和时间的曲线有较大的差别, 所以必须严格控制外界各种因素。

4 荧光共振能量转移

荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)是 Perrin 在 20 世纪初首先发现的, 1948 年 Foster 创立了理论原理^[75,76], 故也称为 Forster 能量转移, 是指两个荧光发色基团在足够靠近时, 一般为 7~10 nm, 当供体(Donor, D)基团吸收

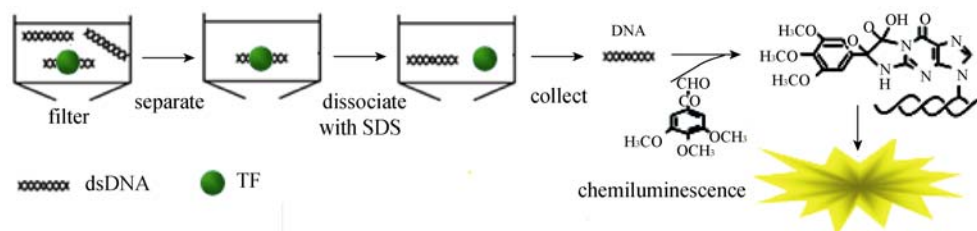


图3 膜结合法配合化学发光检测 NF- κ B 活性示意图

一定频率的光子后被激发到更高的电子能态,在该电子回到基态前,通过偶极子相互作用,实现了能量向邻近受体(Acceptor, A)基团的转移(即发生能量共振转移)。FRET 是一种非辐射能量跃迁,通过分子间的电偶极相互作用,将供体激发态能量转移到受体激发态的过程,使供体荧光强度降低,而受体可以发射更强于本身的特征荧光(敏化荧光),也可以不发荧光(猝灭荧光),同时也伴随着荧光寿命的相应延长或缩短。能量转移的效率和供体的发射光谱与受体的吸收光谱的重叠程度、供体与受体的跃迁偶极的相对取向、供体与受体之间的距离等因素有关。近些年来很多基于 FRET 研究蛋白质-DNA 相互作用的方法发展迅速,并在生物大分子相互作用、免疫分析、核酸检测等方面得到广泛应用。各种 FRET 技术也被充分开发用于 NF- κ B 的检测。

4.1 FRET 技术

2006 年, Giannetti 等^[77]发展了基于 FRET 检测激活态 NF- κ B 的方法(图 4)。使用 Cy5(荧光供体)标记含有 NF- κ B 结合位点(GGGACTTTCC)的 dsDNA 探针,并将该探针固定于石英玻璃管内壁表面; NF- κ B p50 蛋白则使用 BHQ-3(荧光受体)标记,此为黑洞淬灭基团(Quencher, Q);当靶蛋白加入到石英玻璃管中并与固定于其表面的 dsDNA 探针结合时, Cy5 与 BHQ-3 两基团距离足够近,通过激发光(635 nm)激发供体基团 Cy5 时,发生高效 FRET, Cy5 发出

的荧光被荧光受体 BHQ-3 吸收,则在光电仪器上观察到荧光淬灭。该系统稳定、可重复性高,激活态 NF- κ B p50 加入可淬灭 90% 的 Cy5 荧光。在实际样品的检测过程中, BHQ-3 标记的 NF- κ B 蛋白可与样本中的 NF- κ B 蛋白竞争性结合荧光标记 DNA,产生不同效率的 FRET,以此可判断样品中 NF- κ B 蛋白的活性。该系统的显著优点是可再生性,即固定于石英管内的 Cy5-dsDNA 探针,在完成一次结合检测后,经 20%(w/v) SDS 溶液洗涤除去结合的蛋白, Cy5-dsDNA 探针可用于再次检测。

4.2 *Exo* -FRET 技术

2005 年, Wang 等^[78]首次将 FRET 与 DNA 足迹分析结合,发展了 FRET 探针 *Exo* 保护分析法(图 5)。该分析方法中使用的 dsDNA 探针在中间含有一个 FRET 对, 荧光供体为 FAM 基团, 荧光受体为黑洞淬灭基团 Dabcyl 基团。dsDNA 探针的 FRET 对两侧含有 NF- κ B 结合位点。若核提取物中存在 NF- κ B, 则 NF- κ B 将结合到 DNA 探针的两个序列特异性结合位点上, 同时保护了 FRET 对不被 *Exo* 切割脱落, 近而产生高效的 FRET, 可观察到荧光强度的增加; 若核提取物中未含有 NF- κ B, *Exo* 对裸露的探针进行消化, 使 FRET 对分离, 从而产生低效的 FRET。样本中 NF- κ B 的丰度与荧光强度呈正相关。该方法有几个优点: 首先, FRET 探针的设计、准备和应用相对简单、灵活; 其次, 不需要标记靶蛋白,

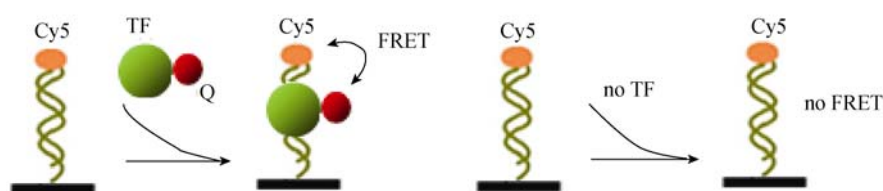


图 4 FRET 检测转录因子 NF- κ B 原理示意图

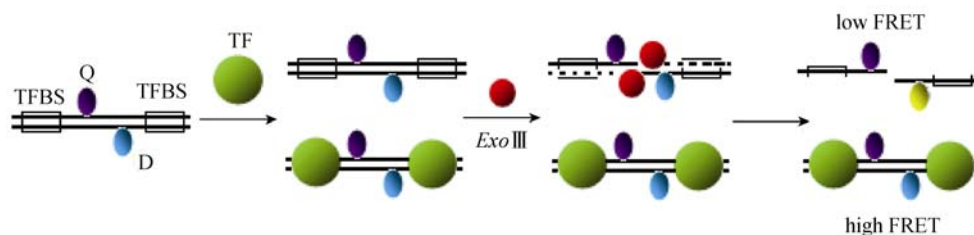


图 5 *Exo* -FRET 技术检测转录因子活性原理示意图

保持了靶蛋白的自然特性, 可以直接检测粗核提取物中的 NF- κ B 活性; 此外, 建立 DNA-蛋白质结合和 *Exo* 消化的理想条件比较简单; 最后, 该分析方法实验程序简单省时, 仅包括 DNA-蛋白质结合、*Exo* 消化和停止 3 个步骤, 整个实验过程仅用 30 min。该方法的缺点是 *Exo* 的切割不完全或剥离靶蛋白, 可能造成假阳性和假阴性。

4.3 RE-FRET 技术

2007 年, He 等^[79]将限制性内切酶(Restriction endonuclease, RE)与 FRET 技术相结合发展了检测 NF- κ B 的新方法(图 6)。该方法中, 在 NF- κ B 特异性 dsDNA 探针的一条链 5'端标记 FAM 荧光基团作为荧光供体, 另一条链 3'端标记 TAMRA 荧光基团作为荧光受体, 当两条寡核苷酸链退火后, 相邻的供体和受体荧光基团就可以进行高效的 FRET^[80,81]。在探针上 NF- κ B 的识别序列(GGGAAATTCC)内嵌一限制性内切酶的酶切位点(RE site, RES), 如 *Apo* 的切点(AAATTC), 当 NF- κ B 结合到 dsDNA 探针上时, 它的结合阻止了限制性内切酶 *Apo* 与 dsDNA 探针上酶切位点的结合, 检测系统呈高 FRET 信号; 而 NF- κ B 未结合时, 裸露的探针则被限制性内切酶 *Apo*I 结合并切割, 供体和受体基团分离, 检测系统

呈低 FRET 信号。该分析方法可以非常灵敏地检测纯化的 NF- κ B p50(0.2~20 pmol), 以及核提取物(如 0.5~10 μ g TNF α 诱导 20 min 的 HeLa 细胞核提取物)和细胞裂解物中的 NF- κ B, 灵敏度与 EMSA 相似, 但却比 EMSA 省时省力, 适于开发高通量平台。还可以通过寡核苷酸 FRET 探针的设计以避免潜在的接触介导的淬灭^[82]来提高检测的灵敏度。该方法主要缺点是限制性内切酶的消化效率可能影响检测结果。此外, 要用于其他转录因子, 可能难以设计内嵌限制性内切酶切点的 DNA 探针。

4.4 链竞争 FRET 技术

2008 年, Wang 等^[83]发展了基于链竞争的 FRET 技术, 用于检测 NF- κ B(图 7)。在该方法中, 首先设计含有 NF- κ B 结合位点的 dsDNA 探针, 其中一条较长的链在 5'端使用荧光基团(供体基团)标记(5'-Fluorophore-TTGGGACTTTCCCAAGATAGT AAG-3'), 另一条较短的互补链则在 3'端使用淬灭基团(受体基团)标记(5'-CTTGGGAAAGTCCCAA Iowa black FQ-3'); 同时设计一个较长的无标记互补单链作为竞争链(5'-CTTCATATCTTGGGAAAGTCC CAA-3')。在 NF- κ B 不存在时, 竞争链会竞争性地置换双链探针中的短链, 从而将荧光基团和淬灭

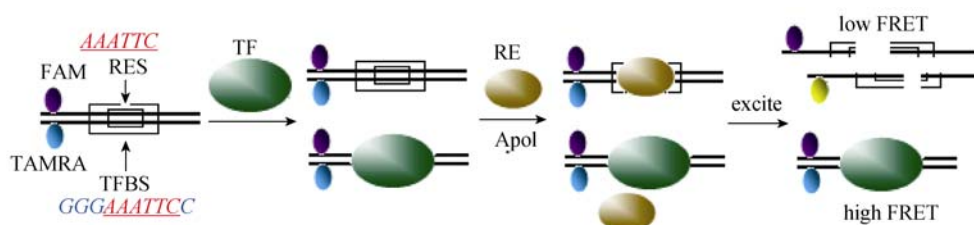


图 6 ER-FRET 技术检测 NF- κ B 活性原理示意图

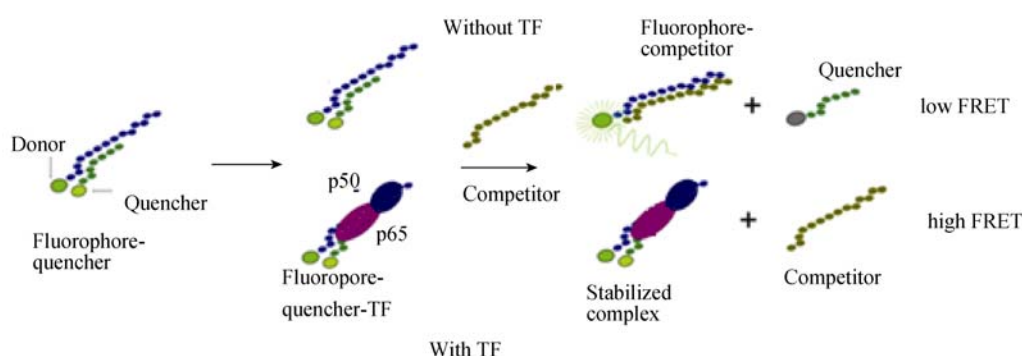


图 7 链竞争 FRET 技术检测 NF- κ B 示意图

基团分开,产生低 FRET 信号;若 NF- κ B 存在, NF- κ B 会结合到 dsDNA 探针上,从而稳定了 dsDNA 探针,竞争链无法置换短链,使荧光基团和淬灭基团保持在一起,产生高 FRET 信号。该方法是一个均相反应,不需要任何凝胶分离或者固定的步骤,可以在 1 h 内完成检测,省时省力;检测灵敏度高,检测极限在纳摩尔范围;不需要对蛋白进行标记;在实验中,淬灭基团标记探针链与荧光基团标记探针链的浓度可以灵活调整以达到最大的信噪比。另外,该方法可以在高通量微孔板平台和多通道微流体装置上实现 NF- κ B 活性抑制分子(如化学防癌化合物)的大规模筛选。该方法的不足之处是它属于关灯(turn-off)检测,且对环境变化比较敏感。

4.5 三链核酸 FRET 技术

2009 年, Altevogt 等^[84]发明了检测 NF- κ B 的三链核酸 FRET 技术(图 8)。该技术中作者设计了含有 NF- κ B 结合位点(GGGGATTTTCCC)的回折 DNA(Backfolding DNA, bfDNA)探针(类似发卡结构),该探针在回折双链区可与另一短寡核苷酸(14 bp; 同型嘧啶序列)形成三链结构的核酸分子;并且在 bfDNA 上引入供体荧光素(Carbostyryl, 喹诺酮),而在短寡核苷酸上引入受体荧光素[Ru(II) Bathophenanthroline complex, 钌(II)-红菲绕啉复合物]。为了增强双链螺旋的稳定性,形成回折结构的两条寡核苷酸用六乙二醇(L)间隔子连接起来,这样既有利最佳杂交,又增强三链螺旋的稳定性。当 NF- κ B 存在时,可与三链核酸 FRET 探针结合,并置换掉带有受体荧光素的同型嘧啶序列,使得受体远离供体, FRET 效率下降。检测反应中供体荧光的增强或 FRET 效率的下降与活性 NF- κ B 蛋白的丰度相关。三链核酸 FRET 探针对加入探针溶液的 NF- κ B 蛋白非常敏感,可在 5 min 内作出完全响应,并且在之后的 85 min 内检测体系的荧光强度(360 nm 激发、

620 nm 发射)不再变化,维持稳定。该方法的优点是检测过程是一个均相反应,而且检测过程非常简单快捷。缺点是三链探针的制备比较麻烦,需要序列的精心设计,使其符合三链核酸形成的条件(Hoogsteen TAT 和 C⁺GC 三联体),并且三链杂交形成稳定的三链螺旋需优化杂交条件。

4.6 抗体辅助的链竞争 FRET 技术

2001 年, Jones 等^[85]提出检测 NF- κ B 的抗体辅助链竞争 FRET 技术(图 9)。在该技术中将谷胱甘肽转移酶(Gutathionine transferase, GST)抗体用 Cy3 标记,将含有 NF- κ B 结合位点的 dsDNA 探针用 Cy5 标记,再将 Cy3 标记的 GST 抗体和 Cy5 标记的 dsDNA 探针与 GST-融合的 NF- κ B p65 蛋白共孵育,由于 Cy3 标记的 GST 抗体和 Cy5 标记的 dsDNA 探针同时与 GST-融合的 NF- κ B p65 蛋白结合,拉近了 Cy3 与 Cy5 的距离,产生 FRET。但当加入未标记的竞争性 dsDNA 分子时,竞争性 dsDNA 分子竞争性置换 Cy5 标记的 dsDNA 探针,此时通过 FRET 效率的变化,可评价 NF- κ B 对不同 DNA 分子结合的亲和性及特异性。该方法若用 cs124DTPA(Tb)(A terbium chelate of carbostyryl 124-diethylenetriaminepentaacetic acid)标记 dsDNA 探针作为供体,而用 Cy3 标记 GST 抗体作为受体,则可以做时间分辨的 FRET 检测,如动态检测不同序列 DNA(特异性和非特异性序列)对“GST 抗体-GST-p65-dsDNA”三聚体复合物 FRET 的竞争效果,评价不同序列对 NF- κ B p65 的结合亲和性。上述以 Cy3 为供体、以 Cy5 为受体的 FRET 系统,则为稳态 FRET 系统,其检测效果不及时间分辨 FRET 系统。在实际样品的检测中,样品中的 NF- κ B 蛋白可竞争 GST-p65,实现样品中 NF- κ B 蛋白活性的检测。此外,若将该系统中的 GST 改为 NF- κ B 抗体,用样品的自然 NF- κ B 蛋白拉近荧光标记的抗体和 dsDNA 探针,也可实现样品中

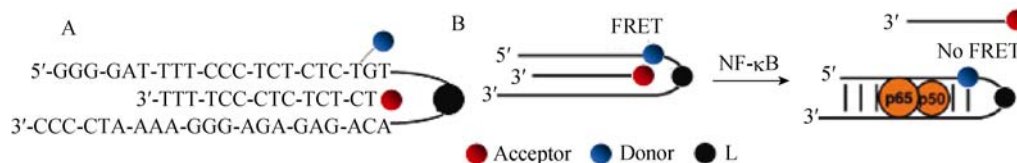


图 8 三链核酸 FRET 技术检测 NF- κ B 示意图

L: 六乙二醇(Hexaethyleneglycol)。

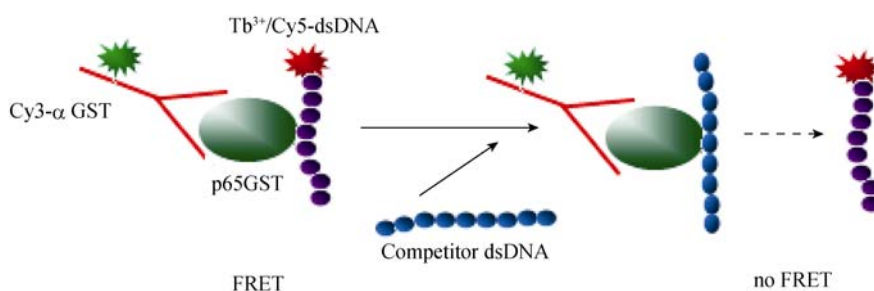


图 9 抗体辅助链竞争 FRET 技术检测 NF- κ B 与 DNA 互作示意图

NF- κ B 活性的检测。

4.7 CCP-FRET 技术

2012 年, Liu 等^[86]发展了基于阳离子共轭聚合物(Cationic conjugated polymer, CCP)和 *Exo* 的高敏感性 DNA-结合蛋白 FRET 检测方法(图 10)。CCP 是一种新型荧光分子, 其独特的共轭骨架结构使其具有一些传统荧光基团不具备的优点。首先它的摩尔吸光系数大, 荧光量子产率较高; 其次是共轭聚合物具有分子导线的功能, 可实现荧光信号的放大; 其侧链上的正电荷可以静电吸附核酸等分子。在该方法中, 设计一条含有靶蛋白结合位点(Protein-binding site, PBS)的 dsDNA 探针, 其中 dsDNA 探针的一端具有突出的 3'端和荧光标记(F1)的 5'端, 另一端为平末端。若样本中没有 DNA 结合蛋白(DNA-binding protein, DBP)(如 NF- κ B)时, *Exo* 从平末端 3'端开始消化, 最终只剩下一个单链 DNA 和一些小的片段, 荧光基团从探针上丢失; 当加入 CCP 时, CCP 与未酶解的链结合, 产生低 FRET 信号; 当样本中存在 DBP 时, DBP 与 DNA 探针结合, 阻止了 *Exo* 消化, 保护了荧光基团; 当加入 CCP 时, 它与 DNA 探针-蛋白复合物之间发生强烈的静电相互作用, 产生高 FRET 信号。

用, 产生高 FRET 信号。

该方法可以对纯化的重组 NF- κ B 蛋白和 HeLa 细胞核提取物进行高敏感性、高选择性、高比色度的检测。在核蛋白中, 激活态 NF- κ B p50 的检测极限是 $1 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 比之前的报道提高了 5 000 多倍^[78]。由于该方法在低 FRET 时, 在紫外透射仪下呈深蓝色荧光, 而在高 FRET 时, 在紫外透射仪下呈亮绿色, 因此是一种开灯(turn-on)检测, 因而优于之前提到的关灯(turn-off)检测^[77,83]。这些特性使得此方法可用于医学诊断样本的检测。其次, 该方法为均相分析, 不需要中间处理, 只需混合样本和测试溶液, 得到的结果使用紫外透射仪直接可见。最后, 该方法简便、低耗, 只需要在含有靶蛋白结合位点的寡核苷酸探针上进行荧光标记, 既避免了复杂又昂贵的双标记或蛋白标记, 又保留了靶蛋白的自然特性, 而且可以在粗细胞提取物中进行检测^[86]。该分析方法缺点是 *Exo* 的割不完全或剥离靶蛋白, 可能造成假阳性和假阴性。

4.8 近红外荧光-FRET

2008 年, Zhang 等^[37]设计了含有 NF- κ B 特异性结合位点的双链寡聚核苷酸探针, 将近红外染料

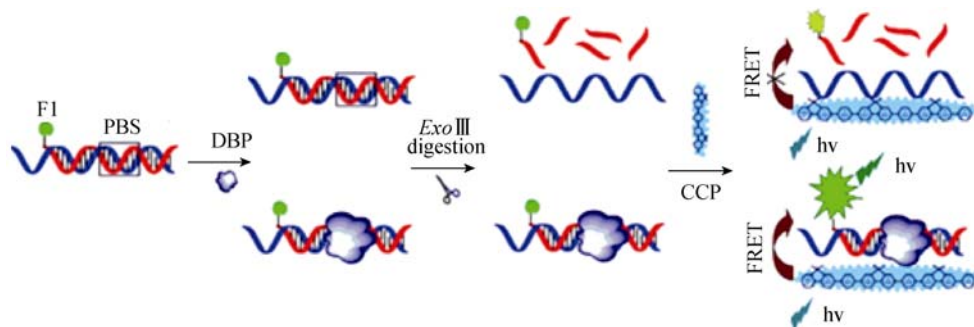


图 10 CCP-FRET 技术检测 DNA 结合蛋白原理示意图

Cy5.5 作为荧光供体连接于双链寡聚核苷酸的一条链 3'端, 而将另外一种近红外染料 Cy7 作为荧光受体连接于互补链上与 NF- κ B 特异性结合的部位, 两种荧光间产生 FRET。作者将这种双链寡聚核苷酸探针称为寡核苷酸双荧光报告子(ODN)(图 11A)。当样本中存在 NF- κ B p50 时, FRET 的效率发生了改变, 说明 p50 与双链寡聚核苷酸探针结合, 从而引起了 Cy5.5 和 Cy7 之间距离的改变(图 11B)。同时, 他们还设计并制备了另两种双近红外素标记的 FRET 探针, 其中一种为非发光性 ODN(Cy5.5/QSY21), 另一条为发光性 ODN(Cy5.5/800CW)(图 11A)^[38]。实验发现非发光性 ODN 可用于检测体外样品中的 NF- κ B 活性(NF- κ B p50 的加入会极快地导致 Cy5.5 荧光增强), 而发光性 ODN(Cy5.5/800CW)可检测活细胞中的 NF- κ B 活性。

4.9 分子信标技术

2011 年, Vallée-Bélisle 等^[87]发展了转录因子信标技术(Transcription factor molecular beacon, TF-MB)(图 12)。TF-MB 的设计是把一个特异的 dsDNA 结合序列转换成分子开关。首先通过选择一个能够特异识别靶蛋白的 dsDNA 结合序列, 使用软件相对准确地预测 DNA 的热力学构象, 然后纳入附加的核酸序列来创建一个可以在不同的构象之间转换的结构: 一个包含靶蛋白特异的 DNA 结合序列的茎环结

构, 和一个双链信标茎干区, 是一个没有识别元件的“无结合”结构。在无结合状态下两个“无结合”结构茎分别标记荧光基团(荧光供体)和淬灭基团(荧光受体)。靶转录因子蛋白的结合通过群体移动机制驱使构象平衡转向可结合茎环状态^[88], 构象发生转换时两个“无结合”结构茎分开, 荧光供受体分开, 红色茎互补配对成双链状态, 靶蛋白与之结合并稳定该构象, 通过荧光激增来发出信号, 且所检测到的荧光强度与溶液中靶蛋白的丰度成正比。对转录因子 NF- κ B 的检测表明, 该种结构的分子信标可检测纳摩尔级的蛋白[K_d=53 (12 nmol/L)], 并且具有很好的特异性, 对 NF- κ B 蛋白能做出快速应答(40 nmol/L)。

TF-MB 与现存 DNA 结合活性检测的其他方法相比有着很大的优势。如, 不使用试剂、没有洗涤或转移等步骤(如 ELISA/western 印迹), 是均相分析; 也无需电泳(如 EMSA)、特异性抗体(如 ELISA)等。其次, 转录因子信标也同样比基于荧光偏振的检测方法有更多的选择性, 基于荧光偏振的检测方法仅限于使用高纯度的样品^[89]。最后, 基于它们的结合-诱导的信号激活特性, TF-MB 提供了一种理想的定量探针, 用于在体内监测 DNA-结合活性。TF-MB 检测技术的缺点是转录因子信标的设计有一定的难度, 需要验证效果, 且双荧光标记成本较高。另外, 温度是影响转录因子信标行为的一个重要因

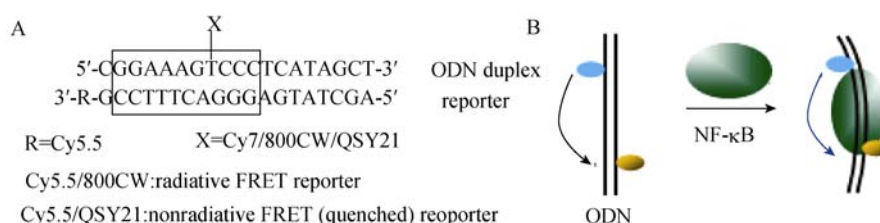


图 11 近红外荧光 FRET 检测 NF- κ B 示意图

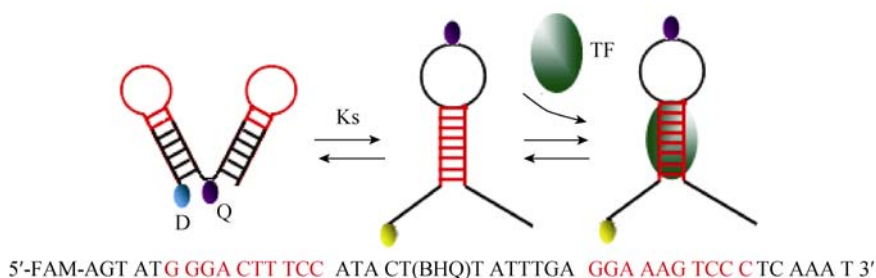


图 12 转录因子分子信标检测 NF- κ B 活性原理示意图

素。信标分子在较低温度时可以保持稳定的发夹结构, 但较高的温度会破坏其稳定的发夹结构, 甚至使其伸展为随机线状, 此时荧光基团与猝灭基团分开, 从而发射出荧光。TF-MB 的构象还受到环境 pH 的影响。

5 基于核酸外切酶保护的荧光报告技术

5.1 *Exo* -Sybrgreen 染色法

2006 年 Chen 等^[90]将 *Exo* 与 Sybrgreen 染色相结合检测转录因子蛋白(图 13)。首先设计 dsDNA 探针, 探针的一端为平末端且含有转录因子结合位点, 另一端为 5 个碱基的 3'突出端, 以防被 *Exo* 切, 检测前用 Sybrgreen 结合 dsDNA 探针, 呈现荧光。若细胞核提取物中存在转录因子(如 NF- κ B), 它将结合至探针的转录因子结合位点上, 阻碍 *Exo* 酶切割 dsDNA 探针, 可观察到高荧光强度; 相反, 若核提取物中不存在 NF- κ B, 裸露的 dsDNA 探针被 *Exo* 从平末端 3'端开始消化, 同时 Sybrgreen 被释放, 只能观察到低荧光强度。样本中 NF- κ B 活性与观察到的荧光强度呈正相关。该方法快速、简便、敏感性高且费用较低, 除了用于检测序列特异性 DNA 结合蛋白以外, 还可用于评估 NF- κ B 的亲合力, 因此该技术在科研、医学诊断和药物筛选方面具有广泛的潜在应用。该方法的缺点是 *Exo* 的切割不完全或剥离靶蛋白, 可能造成假阳性和假阴性。此

外, Sybrgreen 的结合会导致 DNA 刚性增强, 可能干扰转录因子的结合。

5.2 *Exo* 分子开关技术

2011 年, Ma 等^[91]描述了将化学发光与 *Exo* 相结合研究 NF- κ B 活性的策略(图 14)。该分析方法依赖于 *Exo* 的 3'→5'酶活性和作为 DNA 分子光开关的钌配合物。钌配合物是特指一类在水溶液中不发光或微弱发光(此时为关状态), 在 dsDNA 存在的状态下就可以插入双链中而使其荧光免受淬灭, 从而发光强度大幅度增强的金属配合物, 与结合前相比荧光增强 10^4 倍(此时为开状态)。首先设计一个内含 NF- κ B 结合位点的发夹结构寡核苷酸, 互补配对后靶蛋白的结合位点位于其开口处。若靶蛋白 NF- κ B 不存在, *Exo* 随即从 3'端对其进行消化, 由于钌配合物对单链 DNA 的弱结合性, 只能检测到弱的发光效应; 若靶蛋白 NF- κ B 存在, 则结合至其结合位点上, 使 *Exo* 无法对探针进行消化, 从而保护了寡核苷酸的发夹结构, 钌配合物插入其中, 检测到强的发光效应, 从而可以根据发光强度定量样本中的靶蛋白。该分析方法灵敏度高、干扰小, 最低可以检测 nmol 级的 NF- κ B p50 蛋白。钌配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 被认为是发光性能迄今最好的 DNA 分子光开关配合物, 但与 DNA 作用的选择性不强, 检测溶液中加入的防止非特异性结合的鲑鱼精 DNA、poly(dI-dC)等可能造成背景信号。

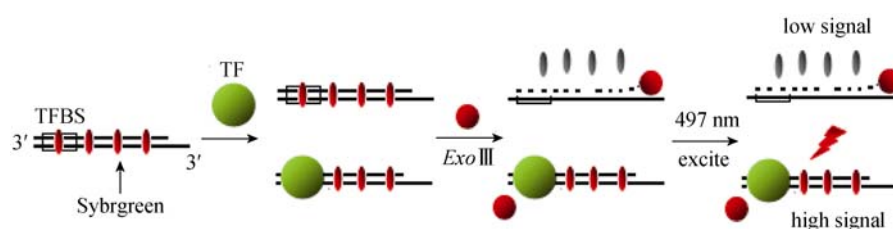


图 13 *Exo* -Sybrgreen 染色法检测转录因子活性原理示意图

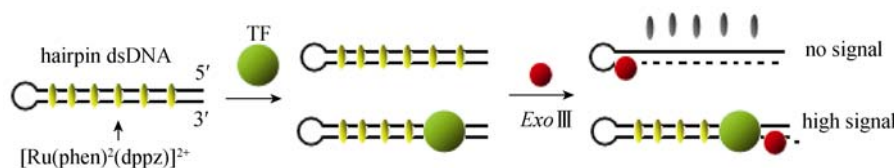


图 14 使用分子开关技术检测转录因子活性原理示意图

6 基于酶保护及核酸扩增的检测方法

6.1 *Exo* -DNA 聚合酶检测法

2005 年, Fukumori 等^[92]发展了一个包括 *Exo* 和 *Taq* DNA 聚合酶反应的 DNA-结合蛋白检测新方法(图 15)。该方法设计一个含有转录因子蛋白(如 NF- κ B)结合位点的发卡结构双链探针, 且转录因子蛋白结合位点位于发卡结构的环旁, 转录因子蛋白的结合可保护 *Exo* 对发卡结构的完全切割, 从而保留发卡引物, 之后使用热启动 *Taq* 酶延伸, 并在延伸中渗入荧光染料标记的 dUTP。如无转录因子蛋白结合, 则 *Exo* 对发卡结构完全切割, 破坏发卡引物, 聚合酶延伸反应无法进行。该方法可以在液相中完成, 最后通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳观察荧光条带的强弱以判断样本中转录因子蛋白的丰度。也可以将发卡引物通过环部位固定到固相支持物上, 延伸经洗涤再观察信号, 后者可以以微阵列的方式实现转录因子蛋白的高通量检测。该方法的优点是 *Exo*-*Taq* 反应步骤简单, 不需要蛋白标记, 不需要抗体, 且荧光染料标记的单核苷酸还可以使用其他标记, 如生物素、地高辛等代替, 检测系统灵活。与依赖抗体的微阵列方法相比, *Exo*-*Taq* 反应系统中 *Exo* 活性较抗体稳定且 *Exo* 的终止反应可以用于检测很多靶蛋白, 此外, 因为只需常用酶 *Exo* 和 *Taq* DNA 聚合酶, 该反应系统耗费低。与 EMSA、DNA 足迹相比, 该反应可以以均相和微阵列的形式在 20 min 内完成。该分析方法缺点是 *Exo* 的切割不完全或剥离靶蛋白, 可能造成假阳性和

假阴性, 同时 *Taq* DNA 聚合酶的聚合活性也可能影响结果。

6.2 *Exo* -定量 PCR 检测法

2007 年, Hou 等^[93]将普通的 *Exo* 与定量 PCR 相结合定量检测 DNA-结合蛋白(图 16)。该分析方法的原理基本同 *Exo* -Sybrgreen 染色法, 只是采用荧光定量 PCR 检测被转录因子结合所保护的 DNA 探针。检测过程主要分 3 个步骤: 蛋白质-DNA 相互作用、*Exo* 切割和实时 PCR 扩增。该分析方法可以快速、高敏感性、高通量检测纯化的重组蛋白或细胞提取物中转录因子蛋白, 可定量检测 fmol 浓度的蛋白。此外, 该分析不需要靶蛋白特异的抗体, 降低了高通量检测的成本。此方法的缺点是 *Exo* 的不完全切割造成的假阳性可能比上述其他基于 *Exo* 的方法都严重, 因为 PCR 是一个信号放大系统。

6.3 内切酶-RCA 方法

2009 年, Li 等^[94]发展了在微阵列上通过滚环扩增(Rolling circle amplification, RCA)定量检测 DNA-结合蛋白的方法(图 17)。该方法中, 首先将生物素标记的引物与单链的 DNA 环复性, 形成部分双链区, 该双链区中紧密排列限制性内切酶位点(RES)和转录因子结合位点(TFBS)(如 5'-GAATTCGGGACTTTCC-3'; 其中 GAATTC 为 *Eco*R 切割位点; GGGACTTTCC 为 NF- κ B 结合位点)。复性后的引物-环复合物固定于预包被有链亲和素的玻片上。当转录因子蛋白结合至其结合位点上后, 由于空间位阻限制性内切酶则无法接触其切割位点, 固定的引物就可以

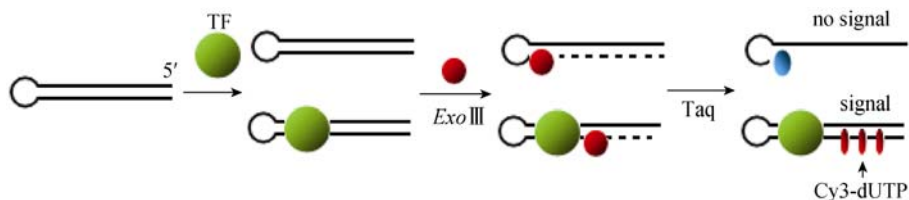


图 15 *Exo* -*Taq* 反应检测转录因子蛋白原理示意图

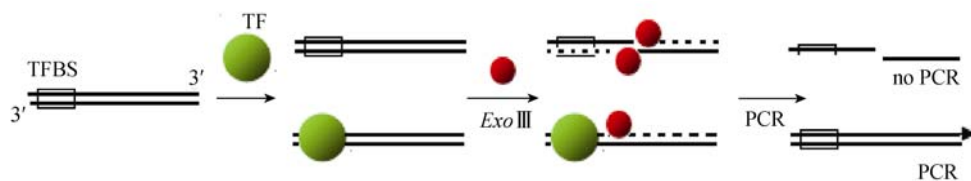


图 16 *Exo* -定量 PCR 相结合检测转录因子蛋白示意图

通过单链的环状 DNA 进行滚环扩增; 若没有转录因子蛋白结合到转录因子结合位点上, 则限制性内切酶结合其切割位点, 随后就不会有滚环扩增。因此, 可以通过滚环扩增的信号高敏感性地检测序列特异性 DNA-结合转录因子蛋白的活性。滚环扩增的信号使用一条 Cy3 标记的与扩增序列杂交的寡核苷酸来报告。此分析方法灵敏度高, 当蛋白浓度低至 1 pg/ μ L 时仍能检测到相对强的荧光信号, 明显比基于内切酶检测序列特异性 DNA-结合蛋白的方法灵敏。而且, 当在玻片上点样不同的探针时, 可以在细胞裂解液中同时检测不同的 DNA 结合蛋白。该方法的缺点是限制性内切酶的低效率酶切可能造成假阳性; 此外在限制性内切酶长时间的酶切过程中, 转录因子蛋白可能从 DNA 上脱落, 造成假阴性。

7 OMT- MS 技术

2007 年, Zhang 等^[95]提出将寡核苷酸质量标签 (Oligonucleotide mass tag, OMT) 用于质谱 (Mass spectrometry, MS) 分析检测转录因子蛋白的新方法 (图 18)。首先设计并制备 dsDNA 探针, 每种探针具

有相似的结构, 由两端的 PCR 引物复性序列 (恒定序列 A、D) 和中间 OMT 序列 (B) 及转录因子结合位点 (C) 序列构成, 每种假定的结合序列都对应一个独特的 OMT。然后将 dsDNA 探针与靶蛋白一同孵育, 随后加入一抗孵育, 再加入预包被有二抗的磁性微珠孵育; 孵育结束后将与微珠结合的探针进行 PCR 扩增, 扩增结合后用虾碱性磷酸酶 (Shrimp AP, SAP) 失活未使用的 dNTP; 再用延伸引物和延伸混合物 (含有 ddTTP、dATP、dGTP 及 dCTP) 进行引物延伸反应, 产生仅有延伸引物和标签序列构成的寡核苷酸 (延伸反应在标签序列结尾处终止), 对寡核苷酸进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分析。该方法不但可用于 NF- κ B 的定量检测, 还可以检测 NF- κ B 纯蛋白 (如重组 p50) 以及细胞提取物 (如 HeLa 细胞核提取物) 中 NF- κ B 蛋白对不同 DNA 序列的结合特异性。此方法的不足之处是需要转录因子抗体、二抗包被微珠等比较昂贵的实验材料, 此外其检测依赖于质谱仪。

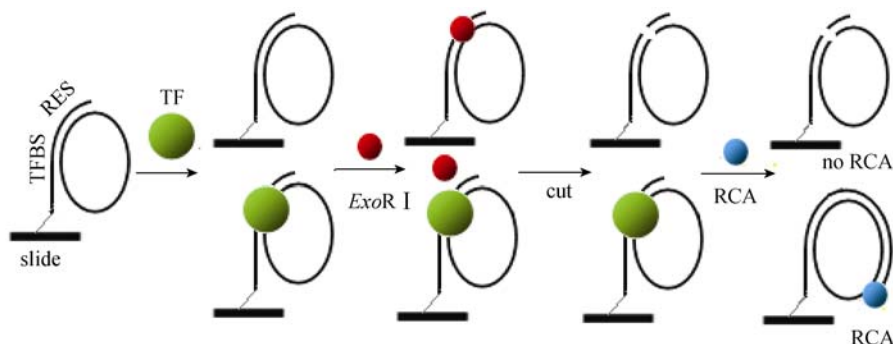


图 17 内切酶结合 RCA 检测转录因子蛋白原理示意图

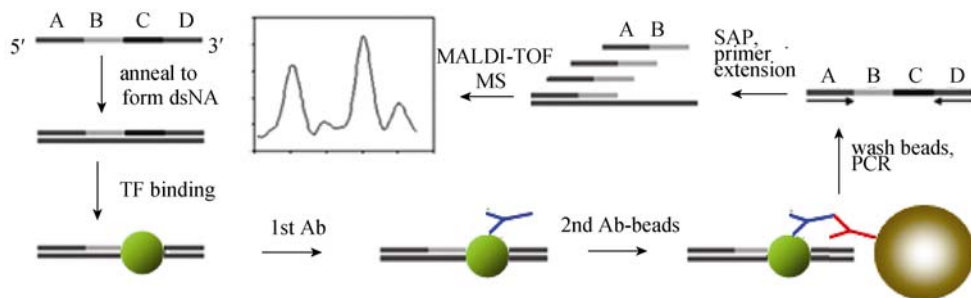


图 18 OMT-MS 技术检测转录因子原理示意图

8 MIA-TF 技术

2010 年, Lin 等^[96]发展了一种基于微球免疫分析检测转录因子活性的方法(Microsphere-based immunoassay to measure the activity of transcription factors, MIA-TF)(图 19)。该方法中首先将生物素标记 dsDNA 与蛋白样品混合孵育, 形成 DNA/蛋白复合物, 之后用亲和素耦联的微球捕获 DNA/蛋白复合物, 再使微球表面的 DNA/蛋白复合物与蛋白抗体和荧光标记的二抗结合, 最后用流式细胞仪分析微球的荧光来报告转录因子活性。该方法的优点是在不需要核蛋白纯化的前提下检测 96 微孔板中培养的细胞中 NF- κ B 的活性, 当核提取物中 NF- κ B 的量在 50~1 000 ng 时就能检测出荧光激增, 且敏感性高、非特异性结合低。该方法的不足之处是依赖于比较昂贵的流式细胞仪, 因此限制了其推广应用。此外, 该方法还需要高质量转录因子蛋白抗体。该方法与 2003 年 Yang 等^[97]建立的基于微球的免疫荧光检测法非常相似。在 Yang 等的研究中首先将巯基修饰的含 NF- κ B 结合位点的 dsDNA 连接到聚苯乙烯微球上, 再让该蛋白样品与该种微球结合反应, 将 NF- κ B 捕获到微球表面, 之后再让微球先后与 NF- κ B 特异的抗体(抗 p50 和抗 p65)以及荧光(Alexa Fluor 488)标记的二抗结合反应, 最后用流式细胞仪检测分析微球。该方法不但可以检测 NF- κ B 的活性, 还可以筛选“一球一探针”的微球文库, 鉴定 NF- κ B 能够结合的 DNA 序列。此外, 还可以使用不同荧光标记的二抗进行不同转录因子蛋白(如 NF- κ B p50 和 p65)结合微球的分选。

9 物理化学技术

9.1 AFM 原子力显微镜

原子力显微镜(Atomic force microscopy, AFM)是近年来发展非常迅速的一种研究手段, 因为其分辨率高、样品消耗量少、工作范围宽, 可以在自然状态(空气或者液体)下对生物医学样品直接进行成像, AFM 已成为研究生物医学样品和生物大分子的重要工具之一。2010 年, Menotta 等^[98]报道用原子力显微镜分析 NF- κ B 的活性。首先将含有 NF- κ B 结合位点的 dsDNA 固定到云母片上, 从而建立一个可以从细胞裂解物中捕获激活态 NF- κ B 的表面, 进而达

到从少量的生物样本中检测 NF- κ B 活性的目的。AFM 是一个具有纳米级分辨率和操纵纳米级结构的强大成像系统, 可以在 pmol 蛋白浓度相对定量和绝对定量 NF- κ B, 并可以看到 NF- κ B 的形状, 从而确定是否为激活状态, 比凝胶迁移实验灵敏度提高了 1 000 多倍, 从培养的细胞样本到生物体液细胞都可以实现 NF- κ B 的活性测量, 且整个实验过程无放射性标记。但该方法也有其不足之处, 首先, 原子力显微镜价格昂贵, 普通实验室很难实现; 其次, 原子力显微镜成像范围较小, 受探头影响大, 速度慢等。

9.2 邻近闪烁分析(SPA)

1979 年, Hart 和 Greenwald^[99]第一次提出邻近闪烁分析(Scintillation proximity assay, SPA), Udenfriend 等^[100]使其成为简单而通用的方法。SPA 技术是一种依赖于内含闪烁体微球的固体均相技术, 当同位素标记的配体与受体分子结合时, 放射性同位素分子与内含闪烁体的微球之间距离足够近, 此时放射性同位素衰变释放出的 β 粒子可以激发微球发射荧光; 当游离的同位素标记配体与微球距离较远时, 则不能够激发荧光。使用 SPA 技术研究蛋白质-DNA 相互作用时有两种不同的方式, 一是放射性标记转录因子蛋白(图 20A); 二是放射性标记 DNA(图 20B)。采用放射性标记转录因子蛋白时, 放射性标记的转录因子蛋白和生物素标记的 DNA 结合, 形成蛋白-DNA 复合物, 再使用链亲和素包被的 SPA 微球捕获该复合物, 拉近 SPA 微球与放射性标记转录因子蛋白的距离, 此时放射性同位素衰变释放出的 β 粒子激发 SPA 微球发射荧光。采用放射性标记 DNA 时, 放射性标记 DNA 和转录因子蛋白结合, 形成 DNA/蛋白复合物, 再使用转录因子蛋白抗体将复合物捕获到蛋白质 A 包被的 SPA 微球上, 从而拉近 SPA 微球与放射性标记 DNA 的距离, 使放射性同位素激发 SPA 微球发出荧光。SPA 技术较传统分析蛋白质与 DNA 相互作用的方法相比, 在通量、定量和安全性方面都有很大的优势。该技术的整个过程无需分离步骤, 只需通过观察检测系统的荧光强度变化就可以实现目标 DNA 结合蛋白的定量, 而且简便快速、灵敏度高、特异性强、且可连续侦测。该方法的缺点是放射性同位素的使用带来安全性等问题。此外, 需减少非特异性结合、增加信噪比和

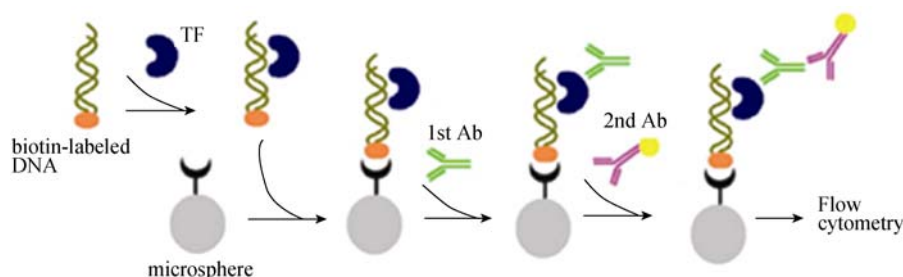


图 19 MIA-TF 检测转录因子活性示意图

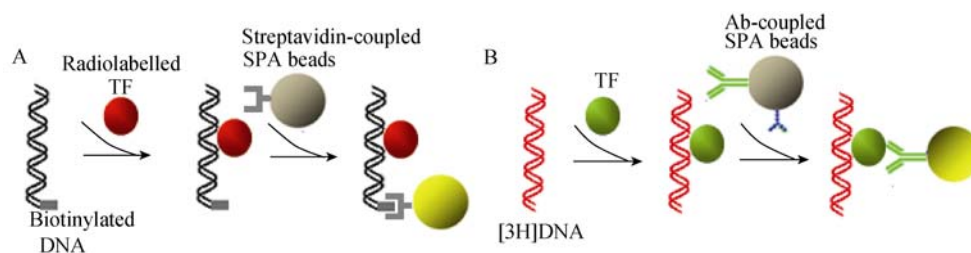


图 20 SPA 检测转录因子活性原理示意图

强化检测结果的可靠性。

9.3 阻抗光谱学

2011 年, Tersch 和 Lisdat^[101]应用 DNA 阻抗传感器检测转录因子-DNA 相互作用。该传感器将巯基修饰的单链 DNA 固定到金芯片电极上, 再将互补单链 DNA 杂交复性, 形成 dsDNA 探针, 此时由于 DNA 携带大量负电荷引起传感器电极电荷转移电阻的增加。然而当转录因子 NF- κ B p50 结合到 dsDNA 探针上时, 由于蛋白所带电荷对 DNA 电荷的中和作用, 引起电荷转移阻抗的降低。这种电荷转移阻抗信号的改变反映了样本中靶蛋白的丰度, 起到检测靶蛋白的作用。

10 结 语

NF- κ B 是一种免疫和炎症相关的诱导性转录因子, 自 1985 年被发现以来, 该转录因子一直是生物医学科学各领域中被持续、广泛和深入研究的热点转录因子^[27]。近年来, 我们也以转录因子 NF- κ B 为研究对象, 进行了转录因子活性及转录因子与 DNA 相互作用的高通量、高灵敏性检测技术的研究, 发展了数种转录因子, 特别是 NF- κ B 活性检测的新技术, 包括优化的化学放光 EMSA^[41]及近红外荧光 EMSA^[42]实验技术、基于 NOS 基团修饰微孔板的

DPI-ELISA 实验技术^[60,61]、Exo⁻ELISA 技术^[68]、Exo⁻FRET 技术及限制性内切酶-RCA 技术^[94]。这些技术都被成功用于 NF- κ B 等转录因子的活性检测。我们首次提出的基于核酸外切酶 Exo⁻的转录因子检测技术(Exo⁻-FRET), 促进了该领域其他 Exo⁻相关检测技术的发展, 如 ExoIII-ELISA 技术^[68]、CCP-FRET 技术^[86]、Exo⁻-Sybrgreen 染色法^[90]、Exo⁻分子开关技术等^[91]、Exo⁻-DNA 聚合酶检测法^[92]、Exo⁻-定量 PCR 检测法^[93]等, 受到国际同行的高度评价^[102]。

基于我们对 NF- κ B 活性检测技术的研究、对该领域国际上研究现状的深入了解, 以及 NF- κ B 活性检测技术对 NF- κ B 功能研究和药物筛选的重要意义, 我们在本文中对近年来发展的 NF- κ B 活性检测新技术进行了综述, 这些新技术主要包括 DPI-ELISA 技术、膜结合检测技术、各种 FRET 检测技术、基于内外切酶保护的荧光报告及核酸扩增检测技术、基于免疫微球的质谱及流式细胞分析, 以及物理化学检测技术等。这些技术为 NF- κ B 的研究提供了大量新的可选方法, 可供不同研究领域的人员根据自身的学科特点和仪器设备等选择使用。根据各种技术的优缺点、实际操作的难易程度和应用的广泛程度, 以及我们的工作经验, 我们认为近红外荧光 EMSA 技术^[42-48]与 DPI-ELISA 技术^[53-65,67]特异性

好、灵敏度高、成本低、操作简便,是最值得推广应用和优先使用的 NF- κ B 活性检测技术。

最后,需要指出的是,本文综述的所有技术都报道被用于 NF- κ B 活性的检测,但某些方法是专门针对 NF- κ B 活性检测设计的,如核酸内切酶 FRET 技术^[79]、基于链竞争的 FRET 技术^[83]、三链核酸 FRET 技术^[84]及转录因子信标技术(TF-MB)^[87],其检测原理可能难以用于其他转录因子,而有些方法具有很好的通用性,可通过改变检测中所用的含有转录因子结合位点的 DNA 探针的序列,用于其他转录因子的检测,如近红外荧光 EMSA 技术、DPI-ELISA 技术等。因此,本文综述的 NF- κ B 活性检测技术,对研究其他转录因子的科研人员也具有借鉴意义。

参考文献(References):

- [1] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986, 46(5): 705–716. [DOI](#)
- [2] Grilli M, Chiu JJS, Lenardo MJ. NF- κ B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*, 1993, 143: 1–62. [DOI](#)
- [3] Kopp EB, Ghosh S. NF- κ B and Rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*, 1995, 58: 1–27. [DOI](#)
- [4] Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, 1995, 9(22): 2723–2735. [DOI](#)
- [5] Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell*, 1998, 95(6): 759–770. [DOI](#)
- [6] Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell*, 1998, 95(6): 749–758. [DOI](#)
- [7] Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*, 1998, 391(6665): 410–413. [DOI](#)
- [8] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 1999, 18(49): 6853–6866. [DOI](#)
- [9] Lim CA, Yao F, Wong JJY, George J, Xu H, Chiu KP, Sung WK, Lipovich L, Vega VB, Chen J, Shahab A, Zhao XD, Hibberd M, Wei CL, Lim B, Ng HH, Ruan YJ, Chin KC. Genome-wide mapping of REIA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF- κ B upon TLR4 activation. *Mol Cell*, 2007, 27(4): 622–635. [DOI](#)
- [10] Giorgetti L, Siggers T, Tiana G, Caprara G, Notarbartolo S, Corona T, Pasparakis M, Milani P, Bulyk ML, Natoli G. Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs. *Mol Cell*, 2010, 37(3): 418–428. [DOI](#)
- [11] Bunting K, Rao S, Hardy K, Woltring D, Denyer GS, Wang J, Gerondakis S, Shannon MF. Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF- κ B transcription factor c-Rel. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7097–7109. [DOI](#)
- [12] Tian B, Nowak DE, Jamaluddin M, Wang SF, Brasier AR. Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor- κ B transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17435–17448. [DOI](#)
- [13] Kasowski M, Grubert F, Heffelfinger C, Hariharan M, Asabere A, Waszak SM, Habegger L, Rozowsky J, Shi M, Urban AE, Hong MY, Karczewski KJ, Huber W, Weissman SM, Gerstein MB, Korbel JO, Snyder M. Variation in transcription factor binding among humans. *Science*, 2010, 328(5975): 232–235. [DOI](#)
- [14] Caamano J, Hunter CA. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15(3): 414–429. [DOI](#)
- [15] Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 2001, 107(1): 7–11. [DOI](#)
- [16] Rayet B, G  linas C. Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 1999, 18(49): 6938–6947. [DOI](#)
- [17] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16(1): 225–260. [DOI](#)
- [18] Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto N. Constitutive activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 1999, 93(7): 2360–2368. [DOI](#)
- [19] Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B. Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 1997, 100(12): 2961–2969. [DOI](#)
- [20] Wood LD, Richmond A. Constitutive and cytokine-induced expression of the melanoma growth stimulatory activity/GRO α gene requires both NF- κ B and novel constitutive factors. *J Biol Chem*, 1995, 270(51): 30619–30626. [DOI](#)
- [21] Wang DZ, Yang W, Du JG, Devalaraja MN, Liang P, Matsumoto K, Tsubakimoto K, Endo T, Richmond A.

- MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression. *Oncogene*, 2000, 19(40): 4647–4659. [DOI](#)
- [22] Shattuck-Brandt RL, Richmond AA. Enhanced degradation of I- κ B α contributes to endogenous activation of NF- κ B in Hs294T melanoma cells. *Cancer Res*, 1997, 57(14): 3032–3039. [DOI](#)
- [23] Naik US, Gangadharan C, Abbagani K, Nagalla B, Dasari N, Manna SK. A study of nuclear transcription factor- κ B in childhood autism. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19488. [DOI](#)
- [24] Flood PM, Qian L, Peterson LJ, Zhang F, Shi JS, Gao HM, Hong JS. Transcriptional factor NF- κ B as a target for therapy in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011, doi: 10.4061/2011/216298. [DOI](#)
- [25] Mauro C, Zazzeroni F, Papa S, Bubici C, Franzoso G. The NF- κ B transcription factor pathway as a therapeutic target in cancer: methods for detection of NF- κ B activity. *Methods Mol Biol*, 2009, 512: 169–207. [DOI](#)
- [26] Orlowski RZ, Baldwin AS Jr. NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*, 2002, 8(8): 385–389. [DOI](#)
- [27] Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF- κ B research. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 5–13. [DOI](#)
- [28] Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9(23): 6505–6525. [DOI](#)
- [29] Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, 2007, 2(8): 1849–1861. [DOI](#)
- [30] Garner MM, Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9(13): 3047–3060. [DOI](#)
- [31] Woo AJ, Dods JS, Susanto E, Ulgiati D, Abraham LJ. A proteomics approach for the identification of DNA binding activities observed in the electrophoretic mobility shift assay. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(6): 472–478. [DOI](#)
- [32] Foulds GJ, Etzkorn FA. DNA-binding affinities of MyoD and E47 homo- and hetero-dimers by capillary electrophoresis mobility shift assay. *J Chromatogr A*, 1999, 862(2): 231–236. [DOI](#)
- [33] Senear DF, Brenowitz M. Determination of binding constants for cooperative site-specific protein-DNA interactions using the gel mobility-shift assay. *J Biol Chem*, 1991, 266(21): 13661–13671. [DOI](#)
- [34] Bourcier T. Electromobility Shift Analysis (EMSA) Applied to the study of NF- κ B binding interactions in vascular smooth muscle cells. *Methods Mol Med*, 1999, 30: 159–167. [DOI](#)
- [35] Hart DJ, Speight RE, Sutherland JD, Blackburn JM. Analysis of the NF- κ B p50 dimer interface by diversity screening. *J Mol Biol*, 2001, 310(3): 563–575. [DOI](#)
- [36] Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, Humburg P, Lone IN, Saliba D, Siggers T, Bulyk M, Angelov D, Dimitrov S, Udalovala IA, Ragoussis J. Extensive characterization of NF- κ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol*, 2011, 12(7): R70. [DOI](#)
- [37] Zhang SR, Metelev V, Tabatadze D, Zamecnik PC, Bogdanov A Jr. Fluorescence resonance energy transfer in near-infrared fluorescent oligonucleotide probes for detecting protein-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(11): 4156–4161. [DOI](#)
- [38] Zhang SR, Metelev V, Tabatadze D, Zamecnik P, Bogdanov A Jr. Near-infrared fluorescent oligodeoxynucleotide reporters for sensing NF- κ B DNA interactions *in vitro*. *Oligonucleotides*, 2008, 18(3): 235–243. [DOI](#)
- [39] Nijnik A, Mott R, Kwiatkowski DP, Udalovala IA. Comparing the fine specificity of DNA binding by NF- κ B p50 and p52 using principal coordinates analysis. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(5): 1497–501. [DOI](#)
- [40] Udalovala IA, Mott R, Field D, Kwiatkowski D. Quantitative prediction of NF- κ B DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8167–8172. [DOI](#)
- [41] Hua D, Li ML, Wang JK. A comparison between two chemiluminescent electrophoresis mobility shift assay (EMSA) methods. *J Biomed Eng Res*, 2007, 26(2): 111–115. [DOI](#)
- [42] Gao J, Liu Y, Wang J. Experimental methods of near-infrared fluorescence electrophoresis mobility shift assay. *Lett Biotechnol*, 2011, 22(1): 71–76. [DOI](#)
- [43] Bao B, Ali S, Kong DJ, Sarkar SH, Wang ZW, Banerjee S, Aboukameel A, Padhye S, Philip PA, Sarkar FH. Antitumor activity of a novel compound-CDF is mediated by regulating miR-21, miR-200, and PTEN in pancreatic cancer. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17850. [DOI](#)
- [44] Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, Kim S, Snyder SH. Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*, 2012, 45(1): 13–24. [DOI](#)
- [45] Corbett GT, Roy A, Pahan K. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, upregulates IL-1 receptor antagonist in mouse cortical neurons: implications for neuronal self-

- defense. *J Immunol*, 2012, 189(2): 1002–1013. [DOI](#)
- [46] Valentine R, Dawson CW, Hu C, Shah KM, Owen TJ, Date KL, Maia SP, Shao J, Arrand JR, Young LS, O'Neil JD. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 inhibits the canonical NF- κ B pathway in carcinoma cells by inhibiting IKK phosphorylation. *Mol Cancer*, 2010, 9: 1. [DOI](#)
- [47] Roy A, Ghosh A, Jana A, Liu XJ, Brahmachari S, Gendelman HE, Pahan K. Sodium phenylbutyrate controls neuroinflammatory and antioxidant activities and protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38113. [DOI](#)
- [48] Ali S, El-Rayes BF, Sarkar FH, Philip PA. Simultaneous targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways for pancreatic cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(12): 1943–1951. [DOI](#)
- [49] Qamar W, Khan R, Khan AQ, Rehman MU, Lateef A, Tahir M, Ali F, Sultana S. Alleviation of lung injury by glycyrrhizic acid in benzo(a)pyrene exposed rats: Probable role of soluble epoxide hydrolase and thioredoxin reductase. *Toxicology*, 2012, 291(1–3): 25–31. [DOI](#)
- [50] Khan AQ, Nafees S, Sultana S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NF- κ B activation and proinflammatory cytokine production. *Toxicology*, 2011, 279(1–3): 108–114. [DOI](#)
- [51] Hu DN, Chen M, Zhang DY, Ye F, McCormick SA, Chan CC. Interleukin-1 β increases baseline expression and secretion of interleukin-6 by human uveal melanocytes in vitro via the p38 MAPK/NF- κ B pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 3767–3774. [DOI](#)
- [52] Wu WC, Hu DN, Gao HX, Chen M, Wang D, Rosen R, McCormick SA. Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced production of interleukin-6 by retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*, 2010, 16: 1864–1873. [DOI](#)
- [53] Renard P, Ernest I, Houbion A, Art M, Le Calvez H, Raes M, Remacle J. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NF- κ B. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(4): E21. [DOI](#)
- [54] Brand LH, Kirchler T, Hummel S, Chaban C, Wanke D. DPI-ELISA: a fast and versatile method to specify the binding of plant transcription factors to DNA *in vitro*. *Plant Methods*, 2010, 6: 25. [DOI](#)
- [55] Shen Z, Peedikayil J, Olson GK, Siebert PD, Fang Y. Multiple transcription factor profiling by enzyme-linked immunoassay. *BioTechniques*, 2002, 32(5): 1168, 1170–1172, 1174. [DOI](#)
- [56] Gupta SV, McGowen RM, Li YW, Callewaert DM, Brown TR, Sarkar FH. Quantitative chemiluminescent immunoassay for NF- κ B-DNA binding activity. *J Immunoassay Immunochem*, 2005, 26(2): 125–143. [DOI](#)
- [57] Benotmane AM, Hoylaerts MF, Collen D, Belayew A. Nonisotopic quantitative analysis of protein-DNA interactions at equilibrium. *Anal Biochem*, 1997, 250(2): 181–185. [DOI](#)
- [58] Gubler ML, Abarzúa P. Nonradioactive assay for sequence-specific DNA binding proteins. *BioTechniques*, 1995, 18(6): 1008, 1011–1014. [DOI](#)
- [59] Jagelská E, Brázda V, Pospisilová S, Vojtesek B, Palecek E. New ELISA technique for analysis of p53 protein/DNA binding properties. *J Immunol Methods*, 2002, 267(2): 227–235. [DOI](#)
- [60] Wang JK, Li JL, Li ML, Hua D, Chen HM. Assay of DNA-binding proteins with a dsDNA-coupled plate. *Clin Biochem*, 2006, 39(2): 167–175. [DOI](#)
- [61] Li JL, Chen HM, Li ML, Hua D, Lu ZH, Wang JK. An optimized assay for transcription factor NF- κ B with dsDNA-coupled microplate. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 55(1): 31–37. [DOI](#)
- [62] Shin VY, Jin H, Ng EK, Cheng AS, Chong WW, Wong CY, Leung WK, Sung JJ, Chu KM. NF- κ B targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 240–245. [DOI](#)
- [63] Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, Behr TM, Jung P, Angermann CE, Ertl G, Bauersachs J. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(3): 749–756. [DOI](#)
- [64] Challis B, Heyman J, Baer S, Wasden C. Simplified quantitation of activated transcription factors. *Nat Methods*, 2006, 3(9): doi: 10.1038/nmeth907. [DOI](#)
- [65] Rosenau C, Emery D, Kaboord B, Qoronfleh MW. Development of a high-throughput plate-based chemiluminescent transcription factor assay. *J Biomol Screen*, 2004, 9(4): 334–342. [DOI](#)
- [66] Schaaf MJ, Willetts L, Hayes BP, Maschera B, Stylianou E, Farrow SN. The relationship between intranuclear mobility of the NF- κ B subunit p65 and its DNA binding affinity. *J Biol Chem*, 2006, 281(31): 22409–22420. [DOI](#)
- [67] Lourenco AP, Vasques-Novoa F, Fontoura D, Bras-Silva C, Roncon-Albuquerque R Jr, Leite-Moreira AF. A Western-type diet attenuates pulmonary hypertension with heart failure and cardiac cachexia in rats. *J Nutr*, 2011, 141(11): 1954–1960. [DOI](#)
- [68] Wang JK, Li ML, Hua D, Chen QX. Exonuclease-mediated ELISA-like assay for detecting DNA-binding

- activity of transcription factors: measurement of activated NF- κ B. *BioTechniques*, 2006, 41(1): 79–87. [DOI](#)
- [69] Menetski JP. The structure of the nuclear factor- κ B protein-DNA complex varies with DNA-binding site sequence. *J Biol Chem*, 2000, 275(11): 7619–7625. [DOI](#)
- [70] Li Y, Ma J, Zhu HQ, Singh M, Hill D, Greer PA, Arnold JM, Abel ED, Peng TQ. Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes. *Diabetes*, 2011, 60(11): 2985–2994. [DOI](#)
- [71] Ying WZ, Wang PX, Aaron KJ, Basnayake K, Sanders PW. Immunoglobulin light chains activate nuclear factor- κ B in renal epithelial cells through a Src-dependent mechanism. *Blood*, 2011, 117(4): 1301–1307. [DOI](#)
- [72] Cui CJ, Shi Q, Zhang XL, Liu XY, Bai YY, Li J, Liu SH, Hu SS, Wei YJ. CRP promotes MMP-10 expression via c-Raf/MEK/ERK and JAK1/ERK pathways in cardiomyocytes. *Cell Signal*, 2012, 24(3): 810–818. [DOI](#)
- [73] Tonooka K, Kabashima T, Yamasuji M, Kai M. Facile determination of DNA-binding nuclear factor- κ B by chemiluminescence detection. *Anal Biochem*, 2007, 364(1): 30–36. [DOI](#)
- [74] Kai M, Kishida S, Sakai K. A chemiluminescence derivatization method for detecting nucleic acids and DNA probes using a trimethoxyphenylglyoxal reagent that recognizes guanine. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 381(2–3): 155–163. [DOI](#)
- [75] Förster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 1946, 33(6): 166–175. [DOI](#)
- [76] Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen Der Physik*, 1948, 2(1–2): 55–75. [DOI](#)
- [77] Giannetti A, Citti L, Domenici C, Tedeschi L, Baldini F, Wabuyele MB, Vo-Dinh T. FRET-based protein-DNA binding assay for detection of active NF- κ B. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, 113(2): 649–654. [DOI](#)
- [78] Wang JK, Li TX, Guo XY, Lu ZH. Exonuclease III protection assay with FRET probe for detecting DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(2): e23. [DOI](#)
- [79] He HJ, Pires R, Zhu TN, Zhou AH, Gaigalas AK, Zou SG, Wang LL. Fluorescence resonance energy transfer-based method for detection of DNA binding activities of nuclear factor κ B. *BioTechniques*, 2007, 43(1): 93–98. [DOI](#)
- [80] Ghosh SS, Eis PS, Blumeyer K, Fearon K, Millar DP. Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(15): 3155–3159. [DOI](#)
- [81] Wang L, Gaigalas AK, Blasic J, Holden MJ, Gallagher DT, Pires R. Fluorescence resonance energy transfer between donor-acceptor pair on two oligonucleotides hybridized adjacently to DNA template. *Biopolymers*, 2003, 72(6): 401–412. [DOI](#)
- [82] Marras SAE, Kramer FR, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(21): e122. [DOI](#)
- [83] Wang ZH, Gidwani V, Sun Z, Zhang DD, Wong PK. Development of a molecular assay for rapid screening of chemopreventive compounds targeting Nrf2. *JALA*, 2008, 13(4): 243–248. [DOI](#)
- [84] Altevogt D, Hrenn A, Kern C, Clima L, Bannwarth W, Merfort I. A new assay format for NF- κ B based on a DNA triple helix and a fluorescence resonance energy transfer. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(19): 3934–3939. [DOI](#)
- [85] Jones SG, Lee DY, Wright JF, Jones CN, Teear ML, Gregory SJ, Burns DD. Improvements in the sensitivity of time resolved fluorescence energy transfer assays. *J Fluoresce*, 2001, 11(1): 13–21. [DOI](#)
- [86] Liu XF, Ouyang L, Huang YQ, Feng XM, Fan QL, Huang W. Highly sensitive detection of DNA-binding proteins based on a cationic conjugated polymer via a target-mediated fluorescence resonance energy transfer (TMFRET) strategy. *Polym Chem*, 2012, 3(3): 703–709. [DOI](#)
- [87] Vallée-Bélisle A, Bonham AJ, Reich NO, Ricci F, Plaxco KW. Transcription factor beacons for the quantitative detection of DNA binding activity. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(35): 13836–13839. [DOI](#)
- [88] Vallée-Bélisle A, Ricci F, Plaxco KW. Thermodynamic basis for the optimization of binding-induced biomolecular switches and structure-switching biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 13802–13807. [DOI](#)
- [89] Jantz D, Berg JM. Binding assays get into the groove. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(2): 126–127. [DOI](#)
- [90] Chen ZZ, Ji MJ, Hou P, Lu ZH. Exo-Dye-based assay for rapid, inexpensive, and sensitive detection of DNA-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1254–1263. [DOI](#)
- [91] Ma DL, Xu T, Chan DSH, Man BYW, Fong WF, Leung CH. A highly selective, label-free, homogenous luminescent switch-on probe for the detection of nanomolar transcription factor NF- κ B. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(10): e67. [DOI](#)
- [92] Fukumori T, Miyachi H, Yokoyama K. Exo-*Taq*-based detection of DNA-binding protein for homogeneous and microarray format. *J Biochem*, 2005, 138(4): 473–478. [DOI](#)
- [93] Hou P, Chen ZZ, Ji MJ, He NY, Lu ZH. Real-time PCR

- assay for ultrasensitive quantification of DNA-binding proteins. *Clin Chem*, 2007, 53(4): 581–586. [DOI](#)
- [94] Li ML, Zhou DR, Zhao H, Wang JK, Lu ZH. Endonuclease-rolling circle amplification-based method for sensitive analysis of DNA-binding protein. *Chinese Chem Lett*, 2009, 20(11): 1315–1318. [DOI](#)
- [95] Zhang LG, Kasif S, Cantor CR. Quantifying DNA-protein binding specificities by using oligonucleotide mass tags and mass spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3061–3066. [DOI](#)
- [96] Lin YL, Lai YJ, Tsai NM, Peng TC, Liu YK, Lee RP, Tsai CJ, Liao KW. A new microsphere-based immunoassay for measuring the activity of transcription factors. *Biol Proced Online*, 2010, 12(1): 18–26. [DOI](#)
- [97] Yang XB, Li X, Prow TW, Reece LM, Bassett SE, Luxon BA, Herzog NK, Aronson J, Shope RE, Leary JF, Gorenstein DG. Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(10): e54. [DOI](#)
- [98] Menotta M, Crinelli R, Carloni E, Bianchi M, Giacomini E, Valbusa U, Magnani M. Label-free quantification of activated NF- κ B in biological samples by atomic force microscopy. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(11): 2490–2496. [DOI](#)
- [99] Hart HE, Greenwald EB. Scintillation proximity assay (SPA)-a new method of immunoassay. Direct and inhibition mode detection with human albumin and rabbit antihuman albumin. *Mol Immunol*, 1979, 16(4): 265–267. [DOI](#)
- [100] Udenfriend S, Gerber L, Nelson N. Scintillation proximity assay: a sensitive and continuous isotopic method for monitoring ligand/receptor and antigen/antibody interactions. *Anal Biochem*, 1987, 161(2): 494–500. [DOI](#)
- [101] Tersch C, Lisdat F. Label-free detection of protein-DNA interactions using electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 2011, 56(22): 7673–7679. [DOI](#)
- [102] Leung CH, Chan DS, He HZ, Cheng Z, Yang H, Ma DL. Luminescent detection of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(3): 941–955. [DOI](#)

•综合信息•

2012 年版北京大学核心期刊目录

Q(除 Q94/Q98)生物科学(除植物学, 动物学/人类学)

1. 生态学报; 2. 生物多样性; 3. 应用生态学报; 4. 微生物学报; 5. 遗传; 6. 生物化学与生物物理进展; 7. 生态学杂志; 8. 生物工程学报; 9. 微生物学通报; 10. 古脊椎动物学报; 11. 中国生物工程杂志; 12. 水生生物学报; 13. 中国生物化学与分子生物学报; 14. 应用与环境生物学报; 15. 中国科学.C 辑, 生命科学(改名为: 中国科学.生命科学); 16. 微体古生物学报; 17. 古生物学报; 18. 生物物理学报; 19. 生物技术; 20. 生物技术通报; 21. 生命科学研究; 22. 生态科学; 23. 细胞生物学杂志(改名为: 中国细胞生物学学报)。