

人 TLR2 胞外区基因酵母表达载体的构建及表达研究*

孙守勋¹, 刘 静², 解立威¹, 柏雪婷¹, 单 娜¹, 孟冬娅¹

(1. 中一东北国际医院临床检验中心, 沈阳 110179; 2. 沈阳军区总医院检验科, 沈阳 110003)

摘要:目的 在真核生物酵母细胞中表达人 Toll 样受体 2(TLR2)胞外区基因。方法 以重组质粒 pAdTrack-TLR2 为模板,应用 PCR 方法扩增 TLR2 胞外区基因,克隆到 pMD18-T 载体中并测序鉴定,酶切回收后连接到酵母表达质粒 pGBKT7 中并转化酵母菌 Y187,测定其在 Y187 中的自激活现象及毒性,提取酵母蛋白质,行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析。结果 成功扩增出 TLR2 胞外区基因,测序结果与 GenBank 中序列一致。酶切回收的目的基因成功克隆入酵母表达载体 pGBKT7 中并转化酵母菌 Y187 后证实无重组质粒的自激活作用,Western blot 分析显示该基因在酵母细胞中表达。结论 成功构建了 TLR2 胞外区基因的酵母表达载体,并在酵母细胞 Y187 中正确表达,为后续研究奠定了基础。

关键词:人 Toll 样受体 2;基因表达;酵母双杂交

中图分类号:Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-024-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.008

Construction and Expression of Expressive Vector of the TLR2 Extracellular Domain Gene of Human in Yeast Cell

SUN Shou-xun¹, LIU Jing², XIE Li-wei¹, BAI Xue-ting¹, SHAN Na¹, MENG Dong-ya¹

(1. Department of Central Clinical Laboratory,

Northeast International Hospital, Shenyang 110179, China;

2. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of PLA, Shenyang 110003, China)

Abstract: Objective To construct and express the TLR2 extracellular domain gene of human in yeast cell. **Methods** Human TLR2 extracellular domain cDNA was amplified by PCR from recombinant plasmids pAdTrack-TLR2 and inserted into pMD18-T vector. The gene of TLR2 was cut from pMD18-TLR2 vector and cloned into yeast expressive plasmid pGBKT7, and pGBKT7-TLR2 was then transformed into yeast Y187. The toxicity and self-activation of the pGBKT7-TLR2 in Y187 yeast was tested. The yeast protein was isolated and analyzed with SDS-PAGE and Western blotting hybridization. **Results** The gene fragment was successfully obtained by PCR. After TA cloned, its sequence was in conformity with the sequence reported in GenBank. The digested fragment was cloned into pGBKT7 vector and transformed into yeast cell Y187, and no self-activating transcriptional activation and toxicity was observed in Y187. The SDS-PAGE and Western blotting assay showed that the TLR2 protein existed in yeast cells. **Conclusion** The TLR2 extracellular domain gene of human was successfully expressed into yeast system, which lays the foundation for further study on the structure and biological activity of TLR2.

Keywords: TLR2; gene expression; yeast two hybrid

Toll 样受体 2(TLR2)是目前已知的识别配体最多的 Toll 样受体,在人体内与脂多糖(LPS)发生反应,识别各种病原微生物后激活固有免疫应答,诱导 T 细胞分化成熟后启动适应性免疫应答^[1~3]。TLR2 的胞外区结构域是受体作用的重要功能区域,在 TLR2 参与的信号传导途径中发挥着组织和引导的重要作用,与 TLR2 的配体特异性密切相关,在其所介导的炎症反应中,其胞外区结构域是一个很有前景的炎症介质的阻断剂,因此具有潜在的抗炎治疗价值^[4],更是值得我们在不同层次上加以深入研究。本实验采用酵母双杂交系统,构建了 TLR2 胞外区基因的酵母表达载体,并转化

酵母菌 Y187 对其进行表达,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 含有 TLR2 胞外区 cDNA 的重组质粒 pAdTrack-TLR2 由前期实验工作完成^[3]。表达载体 pGBKT7 及酵母菌株 Y187,酵母 YPD 培养基,SD/-Trp 等培养基购自 Clontech 公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国 Omega 公司;pMD18-T 载体, Taq 酶, T4DNA 连接酶,限制性内切酶 EcoR I 和 Sal I 为 TakaRa 公司产品;c-myc 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(HRP-IgG)购自北京中山生物公司;醋酸锂、半硫酸腺苷, IPTG, X-gal 为 Sigma 产品;其余

* 作者简介:孙守勋(1979—),男,医学硕士,副主任医师,主要从事微生物学与分子生物学方面的研究,E-mail:sunshouxun_79@163.com。

通讯作者:孟冬娅,E-mail:13309889399@189.cn。

试剂为进口及国产分析纯,引物合成及 DNA 测序由上海英骏公司完成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增及序列测定:根据 GenBank 中人 TLR2 基因序列,设计一对扩增 TLR2 胞外区序列的引物,设计方法同笔者发表文献[5],上游引物包含 EcoR I 的酶切位点(下划线表示):5'-GCCGAATTCATGCCACATACTTTGTGGA TGGT-3',下游引物包含 Sal I 的酶切位点(下划线表示):5'-CGGGTCGACTCACATTAAGGG-TACAGTCATCAG-3',内含启动子 ATG 和终止密码子 TCA。应用设计的引物,以质粒 pAdTrack-TLR2 为模板,建立 PCR 反应体系扩增目的基因,与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 α 感受态细胞中,经蓝白斑筛选后行测序鉴定,具体操作步骤同笔者发表文献[4]。

1.2.2 酵母表达质粒 pGBKT7-TLR2 的构建:构建的 pMD18-TLR2 质粒经测序鉴定后,酶切回收目的片段。用 EcoRI 和 Sal I 双酶切 pGBKT7 质粒使之线性化后,用 T4DNA 连接酶 16℃ 过夜与目的片段连接,产物转化感受态 DH5 α ,筛选阳性克隆。

1.2.3 重组质粒 pGBKT7-TLR2 转化酵母菌及自激活作用检测:按常规方法将酵母菌 Y187 制备成感受态,将构建正确的重组质粒 pGBKT7-TLR2 转化入酵母细胞 Y187,具体操作按 Clontech 公司提供的说明书进行,转化后铺板于 SD/-Trp/X-gal 培养基进行筛选,观察转化菌的生长情况。

1.2.4 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测表达产物:重组质粒转入 Y187 后在 SD/-Trp/X-gal 培养基上培养 3 天后,挑取白色、直径 2~3 mm 大小的菌落接种于 SD/-Trp 培养液中,30℃ 振荡过夜,再转入到 50 ml YPD 培养液中,继续振荡至 A₆₀₀ 达到 0.5,离心收菌,按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测表达产物,同时以未转化的酵母菌株 Y187 作为空白对照。

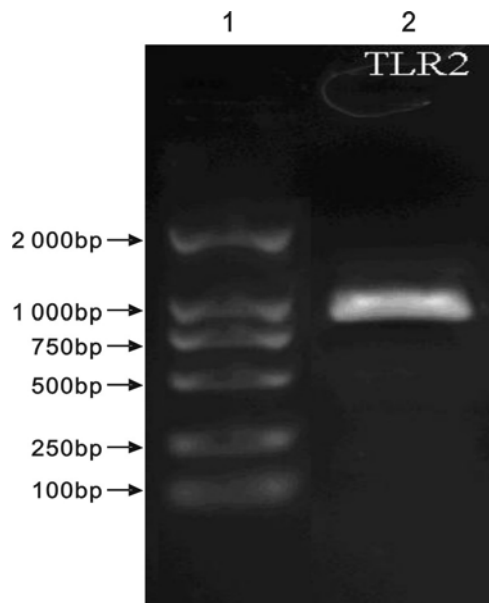
2 结果

2.1 PCR 产物的分析及序列测定 取 PCR 产物经 1 ml/dl 琼脂糖凝胶电泳显示,扩增产物大小约为 1 000 bp 左右,同预期目的片段的大小符合,见图 1。该片段经测序证实结果与 GenBank 中序列一致。

2.2 重组质粒 pGBKT7-TLR2 的鉴定 提取重组质粒 pGBKT7-TLR2 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切鉴定,可见 1 000 bp 的目的片段条带,证明插入片段正确,重组质粒构建成功,见图 2。

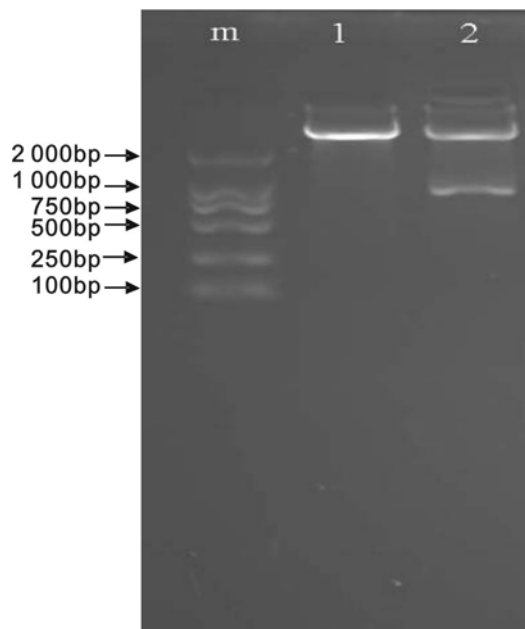
2.3 重组质粒转化酵母菌 我们选用的 Y187 菌

株,在其转录调控区下游含有 LacZ 报告基因,其被激活后,在 X-gal 存在时,酵母菌克隆为蓝色。实验中当重组质粒转入 Y187 后在 SD/-Trp/X-gal 缺陷培养基上培养 3 天后,在平板上长出白色菌落,说明 TLR2 胞外区蛋白对酵母菌无毒性,同时也无自发激活 LacZ 报告基因的作用。



1:DNA marker DL2000;2:PCR 扩增产物。

图 1 PCR 产物的琼脂糖电泳图

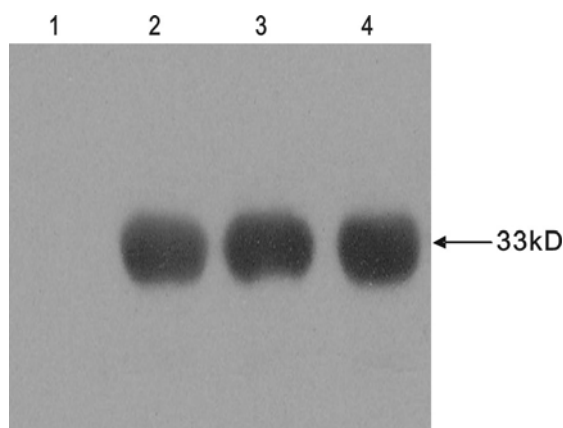


M:DNA marker DL2000;1:pGBKT7 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切;2:pGBKT7-TLR2 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切。

图 2 重组质粒 pGBKT7-TLR2 的酶切鉴定图谱

2.4 TLR2 胞外区蛋白在酵母细胞中的表达检测

酵母细胞蛋白提取液经 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测 TLR2 胞外区蛋白的表达,在转入 pGBKT7-TLR2 的菌株中出现 33KD 的特异性目的条带,而未转化的 Y187 菌株杂交结果为阴性,见图 3。



1:未转化的酵母细胞;2~4:转入 pGBKT7-TLR2 的酵母细胞。

图3 Western-blot 检测表达产物

3 讨论 目前,Toll样受体2(TLR2)在免疫应答各个环节中的功能和作用日渐引起研究者的广泛关注,其胞外区与果蝇具有高度的同源性,是识别病原体的重要结构成分^[6,7],在TLR2介导的免疫防御反应中发挥重要作用,一直以来对于TLR2的研究包括其结构与功能,病原体识别的模式,信号传导途径等众多方面。已知在Toll样受体家族中,TLR2是表达范围最广、识别病原微生物及其产物种类最多的分子,它不仅可对病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)进行识别、结合,并引发一系列的信号传导,导致炎症介质的释放,引起天然免疫防御,还能够介导对热休克蛋白等内源性抗原的识别,是联系天然免疫和获得性免疫的桥梁^[8]。近年有学者发现,痤疮丙酸杆菌可以通过TLR2依赖的NF- κ B途径调节机体的炎症及免疫反应,如果抑制TLR2的功能与表达,就有可能抑制痤疮的进展,研制出治疗痤疮的新型药物^[9]。顾焱^[10]的研究显示TLR2在子宫内膜异位症的发病和发展过程中起关键性作用。可见TLR2在免疫反应和许多疾病发展中扮演重要角色,对其在各个方面还有深入研究的意义。本实验正是采用酵母双杂交系统,构建了TLR2胞外区基因的酵母表达载体以进行后续的深入研究。

酵母双杂交技术与其他在体外检测蛋白间相互作用的方法相比具有快速、有效、便捷的优点,由于是在活细胞内进行实验,比其它体外试验更能够在某种程度上反映蛋白质在生理条件下的活性状态,该技术能够保持蛋白质间结构的完整性,提高反应的灵敏度和检测的精确度,实验结果可靠^[11]。本实验首先扩增了TLR2胞外区基因,并将之克隆到酵母表达载体上,经测序及酶切验证无误,表明载体构建成功。但是酵母双杂交也有一定的缺陷性,目的蛋白在酵母菌株表达时有产生毒性的可能,引起假阴性,或可能直接激活报告基因而产生

假阳性,排除这些影响因素将是目的蛋白能否在酵母系统中正确表达的关键^[12]。本研究中构建的表达载体pGBKT7-TLR2转化到酵母菌Y187中,利用报告基因LacZ检测诱饵蛋白有无自激活作用,实验结果证明,转化的重组载体在SD/-Trp/X-gal平板中生长出白色克隆子,表明融合表达载体能在酵母中表达,无毒性 and 自激活作用,酵母细胞蛋白提取液经SDS-PAGE电泳和Western-blot检测TLR2胞外区蛋白能在酵母菌中稳定表达。综合以上,我们建立的目的基因蛋白表达系统,对深入了解TLR2胞外区蛋白的功能、生物活性及信号传导途径具有重要意义。

参考文献:

- [1] Lalancette-Hebert M, Faustin O, Thammisetty SS, et al. Live imaging of the innate immune response in neonates reveals differential TLR2 dependent activation patterns in sterile inflammation and infection [J]. Brain Behavior and Immunity, 2017, 65 (5): 2312-2327.
- [2] Paarnio K, Vayrynen S, Kai K, et al. Divergent expression of bacterial wall sensing toll-like receptors 2 and 4 in colorectal cancer [J]. World Journal of Gastroenterology, 2017, 23(26): 4831-4838.
- [3] 王方平, 张平安, 杨晓燕. 高迁移率蛋白B1介导Toll样受体信号通路的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 162-164.
Wang FP, Zhang PA, Yang XY. Updates on the pathways of toll-like receptors Mediated by HMGB1 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3): 162-164.
- [4] 孙守勋, 李强, 刘静, 等. 人Toll样受体2胞外区基因重组腺病毒的制备及鉴定 [J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(4): 470-473.
Sun SX, Li Q, Liu J, et al. Preparation and identification of recombinant adenovirus containing the Toll-like receptor 2 extracellular domain gene of human [J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2009, 34(4): 470-473.
- [5] 孙守勋, 李强, 刘静, 等. 人TLR2胞外区基因的原核表达及其抗体的制备 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(9): 887-889.
Sun SX, Li Q, Liu J, et al. Prokaryotic expression of the toll-like receptor 2 extracellular domain gene of human and its polyclonal antibody preparation [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2008, 24(9): 887-889.
- [6] Avishek D, Pokhraj G, Debapriya S, et al. Role of toll like receptors in bacterial and viral diseases-A systemic approach [J]. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 2017, 10(5): 2232-2239. (下转 30 页)

(上接 26 页)

- [7] 刘 箴, 冷 静. 中药对病毒感染中 Toll 样受体表达调节的实验研究概况[J]. 广西中医药大学学报, 2017, 20(2): 68-71.
- Liu Z, Leng J. Traditional Chinese medicine on toll-like receptors expression regulation of virus infection Experimental research work[J]. Journal of Guangxi University of Chinese Medicine, 2017, 20(2): 68-71.
- [8] 邹皓琳, 祝 峰, 王新元. 类风湿性关节炎患者外周血单核细胞 TLR2 的表达及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 112-113, 116.
- Zou HL, Zhu F, Wang XY. Expression of TLR2 on the surface of monocyte in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis as well as its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 112-113, 116.
- [9] 蒋姝枫, 孙丽蕴. Toll 样受体 2 与痤疮相关性研究进展[J]. 实用皮肤病学杂志, 2017, 10(2): 94-97.
- Jiang SF, Sun LY. Research progress on the correlation between TLR2 and acne[J]. Journal of Practical Dermatology, 2017, 10(2): 94-97.
- [10] 顾 焯. Toll 样受体 2 在子宫内膜异位症病人异位和正常内膜组织中的表达及意义[J]. 安徽医药

2017, 21(8): 1460-1462.

- Gu Y. Expression and significance of TLR2 in ectopic and normal endometrium from patients with endometriosis [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2017, 21(8): 1460-1462.
- [11] 文丽梅, 王建华, 卢 帅, 等. 细粒棘球绦胰岛素受体(EgInsR)与人胰岛素(HuIns)酵母双杂交载体的构建及自激活鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(9): 821-824.
- Wen LM, Wang JH, Lu S, et al. Construction of *Echinococcus granulosus* InsR and HuIns vectors for a yeast two-hybrid system and analysis of their auto-activity[J]. Journal of Pathogen Biology, 2016, 11(9): 821-824.
- [12] 李 静, 李 亮, 张传山, 等. 基于酵母双杂交的 EgSmadE 表达载体构建及自激活检测[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(6): 535-539.
- Li J, Li L, Zhang CS, et al. Construction and identification of DNA-AD and DNA BD vectors for EgSmadE in a yeast two-hybrid system[J]. Journal of Pathogen Biology, 2017, 12(6): 535-539.

收稿日期: 2018-01-11

修回日期: 2018-02-26