

· 论 著 ·

人 TLR1 胞外段的克隆及测序分析*

黄黎¹, 周丽珍², 年四季¹, 刘佳佳¹, 袁青^{1△}

(泸州医学院:1. 基础部;2. 附属口腔医院, 四川泸州 646000)

摘要:目的 构建人 Toll 样受体 1(TLR1)胞外段原核表达质粒。方法 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)从人外周血单个核细胞(PBMC)mRNA 中扩增人 TLR1 胞外区 cDNA;将扩增的目的基因与原核表达载体 pET30a(+)质粒经 Nco I 和 Not I 双酶切后连接,转化 E. coli BL21(DE3),筛选转化子,菌落 PCR 及测序验证克隆序列的正确性。结果 测序结果表明,成功构建 pET30a(+)-TLR1 胞外区基因重组质粒,并转化感受态 E. coli BL21(DE3)。结论 TLR1 胞外段在大肠杆菌 BL21 中正确克隆,为 TLR1 信号通路的进一步研究打下了基础。

关键词:Toll 样受体 1;pET30a(+);逆转录-聚合酶链式反应;克隆

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.005

中图分类号:R392.32;R364.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)17-2251-02

Clone and sequencing analysis of human TLR1 extracellular cDNA codon domain*

HUANG Li¹, ZHOU Li-zhen², NIAN Si-ji¹, et al.

(1. Department of Basic Medicine; 2. Hospital of Stomatology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To construct the prokaryotic expression plasmid of extracellular domain of human Toll-like receptor 1 (eTLR1). **Methods** Human TLR1 extracellular cDNA codon domain was amplified by RT-PCR and digested by Nco I and Not I, and then cloned into pET30a(+) plasmid. The constructed recombinant plasmid pET30a(+)-eTLR1 was transferred into E. coli BL21(DE3) and the positive clones were determined by PCR. **Results** The eTLR1 was proved to be correct by DNA sequencing. **Conclusion** The gene of human TLR1 extracellular cDNA codon domain is successfully cloned into prokaryotic expression plasmid pET30a(+) of E. coli BL21(DE3), which will provide the basis for the advanced study of TLR1 signaling pathway.

Key words: TLR1; pET30a(+); RT-PCR; clone

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)作为细胞表面模式识别受体,可识别多种病原相关分子模式(PAMPs)^[1],经髓样分化蛋白 88(MyD88)依赖和非依赖的信号转导途径介导机体的天然免疫,同时在机体适应性免疫中也发挥重要作用^[2-6]。目前,人 TLR2、TLR3、TLR4、TLR7 和 TLR9 等受体相继被克隆、表达,并用于对病原分子的识别机制和信号转导机制研究。关于人 TLR1 的克隆和表达,国内尚未见报道。本研究拟扩增人 TLR1 胞外区 cDNA,构建含 TLR1 胞外区基因的 pET30a(+)-TLR1 重组质粒,转化 E. coli BL21(DE3)。所获阳性克隆子可用于 TLR1 的原核表达,并用于其对病原分子的识别机制及信号转导机制研究,从而可进一步阐明 TLR1 相关免疫及炎症机制,为寻找新的治疗途径与靶点提供思路。

1 材料与与方法

1.1 材料 人淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司,TRNzol Total RNA Reagent 购自北京 Tiangen 公司;MMLV 反转录酶购自美国 Promega 公司, TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司;胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京 Tiangen 公司;原核表达载体 pET30a(+)、E. coli BL21(DE3)由本研究室保存;T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;其余试剂均为国产分析纯;引物合成由上海博尚生物技术有限公司完成,DNA 测序由上海生工生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 人外周血单个核细胞(PBMC)分离 采取健康志愿者外周静脉血(EDTA 抗凝),按人淋巴细胞分离液试剂盒操作说

明分离出 PBMC,磷酸盐缓冲液(D-Hank's 液, pH 7.4)洗涤、重悬,备提取 RNA 用。

1.2.2 总 RNA 提取 Trizol 法提取 PBMC 总 RNA,具体步骤按北京 Tiangen 公司的 TRNzol Total RNA Reagent 操作说明进行。总 RNA 进行 -70 ℃ 保存。

1.2.3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增目的片段 在基因库中根据人 TLR1 的 Gene ID(7096)查找其基因序列,结合原核表达载体 pET30a(+)上的多克隆位点采用 Primer Premier5.0 设计一对 TLR1 胞外区基因扩增引物,并在其中引入酶切位点。上游引物:5'-GTC CCATGG CTA CTA GCA TCT TCC ATT TT-3';下游引物:5'-ATA GCGGCCGCTTA GTT GCA GGA TAA TCC AGA-3'。其中上游引物 5'端引入 Nco I 酶切位点(下划线表示),下游引物 5'端引入 Not I 酶切位点(下划线表示)。以提取的人 PBMC 总 RNA 为模板,按常规方法建立逆转录反应体系及条件合成 cDNA,采用降落 PCR(touchdown PCR, TD-PCR)扩增目的基因。最适反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,52 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min 30 s,30 个循环;72 ℃ 再延伸 10 min。1% TAE 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物。

1.2.4 重组原核表达载体的构建与鉴定 用 Nco I 和 Not I 分别双酶切纯化回收的目的基因片段和 pET30a(+)质粒,经琼脂糖凝胶电泳分析并切胶回收后,用 T4 DNA 连接酶将酶切后的目的基因和载体按摩尔比 3 : 1 进行混合,16 ℃ 过夜连接。采用 CaCl₂ 法制备感受态 E. coli BL21(DE3),将重组体

* 基金项目:四川省教育厅青年基金资助项目(07ZB036);四川省卫生厅科研基金资助项目(90203,80164);泸州市科技局、泸州市医学院课题资助。△ 通讯作者,E-mail:yquannsj@yahoo.com.cn。

pET30a(+)-TLR1 胞外区基因转化感受态表达菌株,涂布于 Amp⁺ 的 LB 平板上,37 °C 温箱孵育 16 h,挑取单个菌落于 LB 液体培养基中,扩大培养,做菌落 PCR 鉴定,对鉴定正确的质粒将其菌液送公司测序。

2 结果

2.1 人 PBMC 总 RNA 的提取 紫外-可见分光光度计检测分析:总 RNA 浓度 = 280.6 ng/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2.00,说明提取的 RNA 浓度较高,纯度好。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性:电泳结果清晰可见 18 s 和 28 s 条带,且约为 2:1(图 1),表明 RNA 无明显降解,此 RNA 制剂可直接用于 RT-PCR。

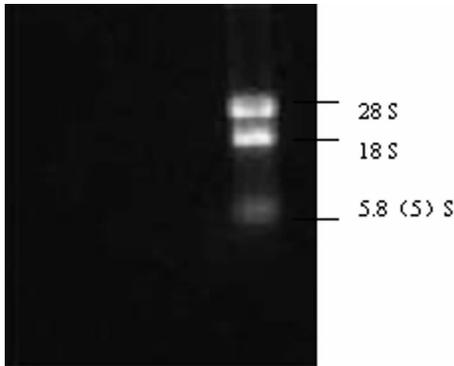


图 1 PBMC 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

2.2 TLR1 胞外区基因的扩增 利用提取的总 RNA,应用 RT-PCR 技术,所获扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见约 1 735 bp 大小片段(图 2),与预期相符。表明目的基因扩增成功。

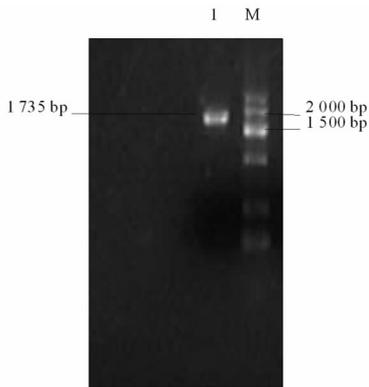


图 2 TLR1 胞外区 cDNA RT-PCR 扩增

2.3 重组表达载体的构建与鉴定

由 T4 DNA 连接酶连接

双酶切后的目的基因和表达载体 pET30a(+),转化感受态 E. coli BL21(DE3)。菌落 PCR 鉴定,结果表明 4 个克隆子扩增产物电泳后都出现了一条 1 735 bp 左右的片段(图 3);筛选出的阳性克隆子送上海生工测序,结果与 GeneBank 公布的 TLR1 序列一致(GeneBank 登陆号:NM_003263)。证实插入序列与设计完全相符,成功构建重组表达载体 TLR1 胞外区基因 pET30a(+)

3 讨论

TLR1 作为 TLRs 家族的重要成员,其在机体免疫应答中的作用日渐引起研究者的广泛关注。已知 TLR1 分布于多种免疫细胞,如单核细胞、中性粒细胞、T 细胞、B 细胞、NK 细胞等,可识别包括三酰基脂肽在内的多种菌体成分,通过 TLR1/2 异二聚体刺激免疫应答^[7]。TLR1 多态性可调节对脂肽的先天性免疫应答反应和对广谱致病菌的临床易感性^[8]。Johnson 等^[9]报道 TLR1 单核苷酸多态性(I602S)与受体细胞表面的异常移位相关,可降低血单核细胞对细菌激动剂的应答,与麻风病的发病相关^[10]。但总体来说,TLR1 相关的研究还不是非常清楚和全面,对于 TLR1 识别微生物细胞壁成分以及细菌脂蛋白是直接的还是间接的,其识别机制怎样,以及 TLR1 还可识别其他哪些 PAMPs? 其结构基础及相互作用机制如何,均有待进一步研究阐明。

本项目克隆的目的片段经表达后,可制备纯化的 TLR1 胞外区蛋白,为后续研究提供重要的实验材料。(1)制备的 TLR1 胞外区蛋白可用于分析 TLR1 与病原体或其产物配体相互作用的识别机制。如研究 TLR1 能与哪些配体相作用,其作用方式如何,是直接作用还是间接作用等。(2)TLR1 胞外区蛋白可用于后续实验筛选制备高亲和力、特异性强的人源单链抗体。相应的人源单链抗体又可用于对 TLR1 的阻断效应和基因沉默研究。此外,单链抗体基因结构简单,可进行基因操作,适合于细胞内表达。由此可将 TLR1 的人源单链抗体转染细胞,作为胞内抗体,干扰 TLR1 的功能,研究 TLR1 正常表达和受干扰后的细胞生物学效应。

综上所述,获取纯化的 TLR1 胞外区蛋白后,可将其用于进一步研究 TLR1 对病原分子识别机制及信号转导机制,阐明 TLR1 相关免疫及炎症机制,为寻找新的治疗途径与靶点提供思路。

参考文献:

- [1] Akashi-Takamura S. Recognition of microbes via Toll-like receptors (TLRs)[J]. Nippon Rinsho, 2005, 63 Suppl 4: 102.
- [2] Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders[J]. Semin Immunol, 2009, 21(4): 242.
- [3] 孙守勋, 蒲晓允. Toll 样受体 2 的研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(5): 533.
- [4] 余晓东, 吴小候. Toll 样受体与器官移植[J]. 重庆医学, 2006, 35(24): 2287.
- [5] 刘京平, 苏有坤. Toll 样受体研究进展与自身免疫性疾病[J]. 广西医学, 2006, 28(2): 235.
- [6] 侯一峰, 何韶衡. TLR1-TLR4 在人嗜碱性粒细胞中的表达[J]. 海南医学, 2005, 16(7): 133.
- [7] Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from mycoplasma pneumoniae activate nuclear factor-kappa B through toll-like receptors 1 and 2[J]. Immunology, 2007, 121(4): 473.

的管理。但是由于仪器、试剂耗材数量多、种类复杂,若管理不善,易造成浪费或缺货。此外,在 PI 负责制下课题组的建立根据课题经费而定,并随课题经费的变化而变化,因此 PI 还需要对实验室财务进行管理。为满足这一需要,系统开发了仪器、试剂耗材、财务管理功能模块。实验室研究和管理人员可根据各自权限进行物质的预定、购买、维修、报修、查询等操作。局域网外用户通过 IE 登录系统后,系统在界面上列出的当日所有仪器的预约情况一览表,在 B/S 模式下实现的仪器预约分布图(图 3),随之可按权限进行仪器预约操作。而 PI 则可根据权限对所辖人员的仪器使用情况等进行查询。



图 3 仪器预约界面

临床科研实验室系统具有智能诊断、干预等信息处理能力。例如,PI 根据实验室研究工作的特点制订试剂耗材常备库存低值预警规则,当某一试剂库存量小于该低值时,系统自动提示研究人员向 PI 提出订购申请,经批准后统一订购。还可定义试剂过期停用报警、仪器定期维护提示等预警规则。

3.3 信息系统对实验室绩效管理的支持 临床科研实验室信息系统的统计输出功能模块可用于对实验室中产生的各种数据进行统计和汇总。例如,对单价在 40 万元以上的科研仪器年使用情况及年度效益形成统计数据上报;对仪器设备年维修情况进行统计汇总,产生实验室年度效益评价表等可用于支持决策的统计数据;将高质量的论文或可转化的科技成果等转化为衡量课题组成绩的标尺等。这些统计汇总数据可方便 PI 对实验室绩效进行评估,发现实验室管理薄弱环节,不断提高实验室管理水平。

3.4 信息系统对实验室数据管理及实验室质量控制的支持 临床科研实验室信息系统对检测数据自动采集并存储于各个研究人员或课题组的目录之下。具有权限的研究人员可对此进行查看和修改,系统对修改后数据标记修改标志。

目前,许多工业检测实验室已经被强制纳入 ISO/DIS9000 质量管理体系接受认证,但是大多数临床科研实验室的质量控制却很薄弱。加强实验过程及结果的质量控制,对于保证研究结果的可靠性、提高实验室公信力都有重要意义。系统由 PI 组织人员编写标准操作文件(standard operation protocol, SOP),并将 SOP 贯穿到系统的流程设计中,由信息系统来帮

助相关人员明确实验室的工作流程并强制实施,同时规范实验室记录,克服实验的随意性,推动整个工作流程的规范化。研究人员还可以按权限在实验室网站上下载 SOP 文件及仪器说明书等。

4 讨 论

本系统试运行情况表明,该系统能高效完成既定的功能,实现智能化的、以实验室为核心的、整体环境的全方位管理。新型信息管理系统将多种与实验室管理相关的模块集成起来,运用科学的工具与手段采集信息、处理数据,全面、综合地利用信息资源。通过灵活的权限设置、查询设置及各模块间的密切关联,使 PI 能够及时、准确地从实物和价值两方面了解其管辖范围内各类设备耗材的运行状况、研究人员情况、经费使用情况等,便于 PI 对人力、物力和财力资源进行统筹安排;规范实验室记录,克服随意性,帮助相关人员明确工作流程,对于防止学术造假也有一定的意义;引入了绩效考评机制,辅助财务核算与分析;有利于实验室责任追踪制度的建立,便于及时发现系统内部的薄弱环节,从而加速管理改革的进程。

该系统能充分满足 PI 负责制下实验室管理所需的数据处理与事务处理功能,为实验室提供信息存储、交换和统计分析的网络化平台,全方位地对整个实验室的运行实施管理。其成功开发与应用,将推动临床科研实验室管理技术的进步及相应科技管理体制的改革,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 徐鸣华,顾奋勇,杜春桃,等. 我国高校与中科院现行科技管理模式的比较[J]. 研究与发展管理,2007,19(5):116.
- [2] 刘树郁,林明河. 实验室管理体制改革的实践和探索[J]. 实验室研究与探索,2001,20(2):6.
- [3] 张志樵. LIMS 应用集成新进展[J]. 数字石油和化工,2008(5):2.
- [4] 徐乐,张元才. 实验室信息管理系统现状综述[J]. 科技情报开发与经济,2008,18(31):186.
- [5] 沈才梁. Delphi 2005 环境下调用 SQL Sever 2000 存储过程的几种途径[J]. 计算机与网络,2005,(15):16.
- [6] 启明工作室. DELPHI+SQL SERVER 数据库应用系统开发与实例[M]. 北京:人民邮电出版社,2005:67.
- [7] 廖志英,董安邦. 基于 C/S 和 B/S 混合结构的管理信息系统运行模式[J]. 计算机工程与应用,2002,38(2):184.
- [8] 刘永清,肖忠东,董安邦. 基于三层 C/S、B/S 集成的物流信息系统体系结构的研究[J]. 湖南科技大学学报:自然科学版,2005,9(20):86.
- [9] 郝新保,常智杰. PI 负责模式下分子生物学实验室运行管理浅析[J]. 实验技术与管理,2004,21(1):141.

(收稿日期:2009-12-30)

(上接第 2252 页)

- [8] Omueti KO, Mazur DJ, Thompson KS, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides[J]. Eur J Immunol,2007,37(8):2280.
- [9] Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against

- leprosy[J]. J Immunol,2007,178(12):7520.
- [10] Schuring RP, Hamann L, Faber WR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions[J]. J Infect Dis,2009,199(12):1816.

(收稿日期:2009-11-13 修回日期:2010-02-12)