论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0020-04

Toll样受体4胞外区在毕赤酵母系统的初步表达及鉴定

杨清武[1],牟 玲[2],朱佩芳[3],王正国[3],蒋建新[3],王景周[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆400042,[2]预防医学院毒理学教研室,重庆400038,[3]大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆400042)

提 要:目的 利用毕赤酵母系统对Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)胞外区进行初步表达及鉴定,为相关研究奠定基础。**方法** 用PCR获得扩增TLR4胞外区DNA,经序列分析后,插入含AOX1启动子和α分泌信号肽序列的毕赤酵母表达载体中,构建pPIC9K/TLR4胞外区的重组质粒;转化酵母宿主菌GS115后,G418筛选多拷贝转化子;菌落PCR鉴定后,摇菌培养,1%甲醇诱导表达。SDS-PAGE分析表达产物,并利用Western blot法鉴定。**结果** PCR扩增的TLR4胞外区基因序列与GenBank数据库中的序列一致,构建的重组质粒经酶切及测序证实,成功构建了pPIC9K/TLR4胞外区的重组质粒。经过G418筛选后,共获得200个高拷贝转化子,菌落PCR鉴定其中5个克隆,能扩增出特异的TLR4胞外区基因片段,表明TLR4胞外区基因完全整合到毕赤酵母中;SDS-PAGE分析显示,表达产物以可溶性分子形式存在于上清中,薄层凝胶扫描分析显示诱导表达4 d的表达量达上清的50.35%,Western blot分析表明表达蛋白能与TLR4单抗结合。**结论** 利用毕赤酵母系统成功地对TLR4胞外区进行了表达及鉴定,为进一步筛选高表达菌株、蛋白纯化、功能研究奠定基础。

关键词: Toll样受体4;脓毒症;内毒素;毕赤酵母

中图法分类号: R392.13; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Primary expression and identification of TLR4 extracellular fragment in *Pichia pastoris*

YANG Qing-wu[1], MOU Ling[2], ZHU Pei-fang[3], WANG Zheng-guo[3], JIANG Jian-xin[3], WANG Jing-zhou[1] ([1]Department of Neurology, [3]Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042; [2]Department of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express and identify of Toll-like receptor 4 (TLR4) extracellular fragment in *Pichia pastoris* and to provide basis for the related researches. **Methods** The human TLR4 extracellular cDNA fragment was amplified by PCR and after confirming by DNA sequence analysis, was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K containing AOX1 promoter and lead sequence of α factor gene to form a pPIC9K/TLR4 extracellular recombinant expression plasmid. The recombinant plasmid was transformed into GS115 and high copies transformants were screened with G418. After being identified by colony PCR, transformants were cultured in flasks and induced by 1% methanol. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and were identified by Western blot analysis. **Results** The sequencing showed that TLR4 extracellular gene was identical to that in Genbank. The analysis for the recombinant plasmid DNA digested by enzyme demonstrated that the recombinant expression plasmids of pPIC9K/TLR4 extracellular were constructed successfully. After screening by G418, 200 high-copy-number of transformants were acquired. The special TLR4 extracellular gene segment was obtained by identification with colony PCR, which showed that TLR4 extracellular gene of 5 clones were inserted into *Pichia pastoris*. After methanol induction for 4 d, the expression proteins came up to 50.35% of total proteins in medium supernatant as shown by SDS-PAGE. Western blot analysis proved that the expression protein could bind to TLR4 monoclonal antibody specifically. **Conclusion** TLR4 extracellular protein is expressed and identified successfully by *Pichia pastoris* system, which can provide basis for the researches of further screening of high expression colony, protein purification, and functional research.

Key words: Toll-like receptor 4; sepsis; lipopolysaccharide; *Pichia pastoris*

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203)、国家自然科学基金资助项目(30170968)和全军医药卫生科研基金资助项目(01Q105) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203), the National Natural Science Foundation of China (30170968), and the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (01Q105)

作者简介: 杨清武(1971-),男,四川省南江县人,博士,主治医师,讲师,主要从事感染与免疫、急性脑血管病并发多器官功能障碍方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757343

收稿日期: 2004-06-13;**修回日期:** 2004-10-15

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克等常见的并发症，进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征，已成为临床危重患者的重要死亡原因，至今仍无有效的防治措施，因此探索新的防治手段，成为急待解决的问题[1,2]。研究表明：TLR4 是一个新的 LPS 作用的关键受体和信号分子，已成为脓毒症、脓毒性休克等 LPS 相关疾病治疗的关键靶点[3,4]。以 TLR4 为靶，寻找其拮抗剂，通过拮抗 TLR4 的功能，从而拮抗 LPS 的信号转导，将减轻脓毒症、脓毒性休克时对器官组织的损伤。可望为脓毒症、脓毒性休克等 LPS 相关疾病治疗提供新方法和新途径，具有重要的临床意义。利用重组可溶性受体可竞争受体与配体的结合的特点，开发受体的拮抗剂，已广泛用于实验和临床研究，有的甚至应用于临床[5]。虽然，重组可溶性受体也存在分子量大、组织渗透性弱、体内运输能力差和不稳定等缺点，但也不失为一种切实可行的办法。更为感兴趣的是在此基础上可以进一步获得拮抗短肽（有的为受体的功能域，有的为通过肽库筛选获得），将避免可溶性受体的一些缺陷。同时以此为基础设计出能模拟大分子药物的短肽，已成为药物开发的一种有效的方法而广为运用[6]。我们曾利用原核表达系统获得了 TLR4 可溶性受体[7]，但其包涵体多，复性后活性很低，分析原因可能与 TLR4 胞外区本身蛋白结够及原核表达系统的局限性有关。毕赤酵母基因表达系统是一种新型的外源基因表达系统，兼有原核细胞良好的可操作性和真核系统的后加工，发酵条件简单、表达水平高、适宜高密度培养，且有分泌表达的优势，为工业化生产及纯化提供了极大的方便[8]。为此，我们利用毕赤酵母系统对 TLR4 的胞外区进行了初步表达，结果成功表达了可溶性 TLR4 受体，为后期表达条件的进一步优化、蛋白纯化和功能研究奠定了坚实的基础。

1　材料与方法

1.1　材料

人 TLR4 质粒由意大利 Mario Neg 研究所 Muzio 教授提供；pPIC-9K 及 GS115 酵母菌株由北京中国预防医学科学院，病毒基因工程国家重点实验室张智清教授提供。pMD18-T 购自日本 Takara 公司，限制性内切酶 *Avr* Ⅱ、*Not* Ⅰ为 New England 公司产品，购自 Takara 公司。大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。酵母表达系统为 Invitrogen 公司产品。蛋白胨、YNB（酵母氮碱）为 Difco 公司产品。G418 为 Roche 公司产品。PCR 回收试剂盒为罗氏公司产品。凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、DNA 连接试剂盒、pMD18-T 载体亚克隆试剂盒为 Takara 公司产品。TLR4 单克隆抗体由本室制备[9]。

1.2　方法

1.2.1　引物设计合成　　按 TLR4 胞外区的基因序列，设计如下：上游引物：5′-CCT AGG ATG GAG CTG AAT TTC T-3′，下游引物：5′-CGC CGG CGA TTG ATA TTC AAA CTC-3′。上游引物带 Avr Ⅱ的酶切位点，下游引物带 *Not* Ⅰ的酶切位点。

1.2.2　目的片段的扩增　　以人 TLR4 质粒为模板，反应条件为：94 ℃变性 5 min 后，进入 30 个循环：94 ℃，30 s；62 ℃，50 s；72 ℃，1.5 min；最后 72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。

1.2.3　构建 pIC9K-TLR4 融合表达载体　　构建策略见图 1。将 PCR 产物插入 pPMD18-T 载体，转化宿主菌 DH5α。提取质粒，DNA 测序正确后，回收约 1 800 bp 目的片段，插入的 pPIC-9K 相同位点（pPIC-9K 经 *Avr* Ⅱ、*Not* Ⅰ双酶切）进行连接。回收连接产物，转化宿主菌 DH5α，提取质粒，酶切及测序鉴定。

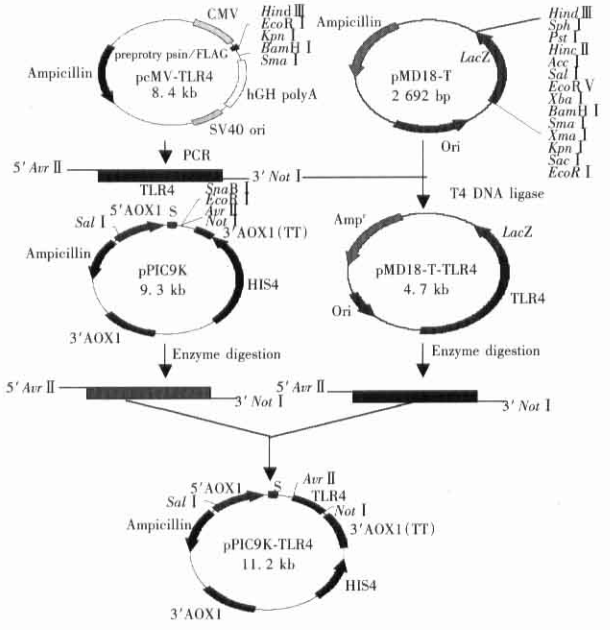


图 1　pPIC9K-TLR4 融合表达载体构建策略

Fig 1　The strategy for construction of pPIC9K-TLR4 expression vector

1.2.4　重组质粒转化酵母宿主菌 GS115　　将酵母菌 GS115 制备成感受态，取出 100 μl 与 10 μg *Sac* Ⅰ单酶切线形化的重组表达质粒混合，转入 0.2 cm 的预先预冷的电转杯后，冰浴 5 min，以 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪于 1 500 V、25 μF、200 Ω 条件下电转化，立即向其中加入 1 ml 冰浴的山梨醇，将菌液均匀涂布于事先准备好的 MD/-His 平板，30 ℃孵箱 3 d 后观察。

1.2.5　高拷贝整合转化子的筛选　　参照 Ivtrogen 公司试剂盒说明书的方法进行。将 His + 的阳性转化子，用无菌水稀释至 1D_{600}值（1D_{600}相当于 5×10^7 的酵母细胞），然后用 10^5 的细胞分别涂布于逐渐增高的 G418-YPD（0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 g/L）平板上，30 ℃孵箱 5 d 后观察。选取具有高 G418 抗性且生长良好的菌株作为表达株。

1.2.6　高拷贝转化子的 PCR 检测　　为进一步验证 TLR4 胞外区是否整合到酵母菌的基因组中，参照文献[10]的方法进行。TLR4 胞外区的特定引物（扩增出约 500 bp 的特异片段）进行常规 PCR 反应，条件 94 ℃ 3 min 后，进入以下循环：95 ℃ 45 s，54℃ 45 s，72 ℃ 1 min，共 32 个循环；最后 72 ℃延伸

10 min。若能扩增出 500 bp 的鉴定为真正的重组阳性高拷贝克隆，用于后续蛋白的诱导表达。

1.2.7 表达菌株的初步诱导表达 参照 Invitrogen 公司的说明书进行，具体如下：①接种单菌落于 100 ml BMGY 液体培养基中，30 ℃摇床剧烈震荡(300 r/min)培养，至 $D_{600}\approx4.0$。②离心、收集菌体，用 20 ml BMMY 培养基重悬，30 ℃摇床剧烈震荡(300 r/min)培养。③每天取样 1 ml，并补加甲醇于培养基中至终浓度 1%，共诱导表达 4～6 d。④离心取诱导表达 4 d 上清进行 SDS-PAGE 电泳观察。

1.2.8 表达产物 Western blot 鉴定 参照文献[11]方法进行。一抗为鼠抗人 TLR4 单克隆抗体(稀释度为 1∶1 500)，(小鼠抗人 TLR4 单抗为本部分实验制备)。二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG(稀释度为 1∶2 000)。

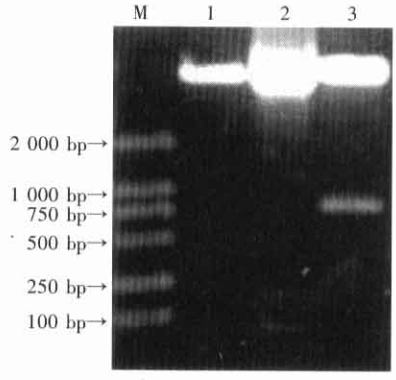
2 结果

2.1 PCR 扩增 TLR4 的胞外区

运用上述反应体系，成功扩增出 TLR4 的胞外去片段，约 1 800 bp，与 TLR4 胞外区 DNA 片段相似，初步表明成功获得 TLR4 胞外区 cDNA。

2.2 pPIC9K-TLR4 融合表达载体的构建与鉴定

结果表明：构建的 pPIC9K-TLR4 质粒转化 DH5α 后，提取质粒，酶切鉴定，能切出预期大小的片段(约 500 bp。因重组质粒含 *Eco*RⅠ酶切位点，用 *Eco*RⅠ酶切后可切除约 500 bp 的片段)表明插入方向正确。DNA 测序结果与文献报道完全一致，表明载体构建成功(图 2)。



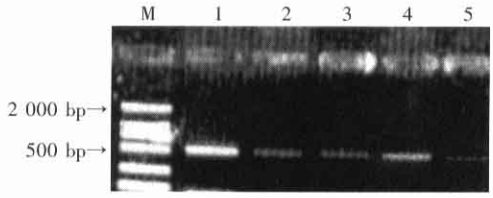
M：DNA marker；1：pPIC9K plasmid；2：pPIC9K-TLR4 plasmid；3：pPIC9K-TLR4 plasmid digested with *Eco*RⅠ

图 2 重组质粒 pPIC9K-TLR4 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pPIC9K-TLR4

2.3 高拷贝的筛选与 PCR 方法检测

经过 MD/-His 的初步筛选后，再用 G418 筛选高拷贝克隆，结果共获得约 200 个克隆(在 3～4 mg/ml 的 G418 平板生长)。随机挑取 5 个克隆，提取基因组，进行 PCR 反应，均能特异的扩增出 TLR4 的特征性片段，表明 TLR4 确实已整合到酵母的染色体上，但 1 号和 4 号克隆整合的拷贝数可能明显高于其他 3 个克隆(图 3)。



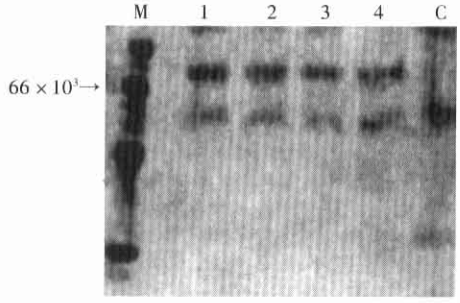
M：DNA marker；1－5：No 1－5 GS115 transfected pPIC9k-TLR4

图 3 高拷贝酵母克隆的 PCR 检测

Fig 3 PCR detection of high-copy-number clones for pPIC9K-TLR4 in GS115

2.4 可溶性 TLR4 蛋白的初步表达

对上述 4 个克隆进行了初步表达，取 20 μl 表达上清进行 SDS-PAGE 电泳发现，在分子量约 66×10^3 处有一新生蛋白带出现，而用 pPIC9K 空载体转染的酵母细胞则无该条带的出现，表明已初步成功表达可溶的 TLR4 胞外区，即可溶性 TLR4 受体。薄层凝胶扫描分析显示诱导表达 4 d 的表达量达上清的 50.35%(图 4)。



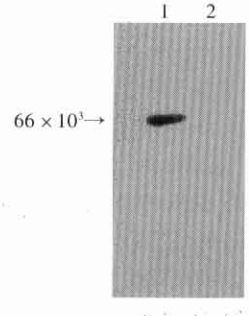
M：Protein marker；1－4：No 1－4 GS115 transfected pPIC9K-TLR4；C：GS115 transfected pPIC9K

图 4 毕赤酵母表达可溶性 TLR4 胞外区蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of soluble TLR4 extracellular expression in GS115

2.5 Western blot 的鉴定结果

用表达上清为样品，在约 66×10^3 处可见清晰的单一阳性反应条带，而用 pPIC9K 空载体转染的酵母细胞的表达上清则无该条带的出现，表明成功表达了 TLR4 胞外区蛋白，见图 5。



1：GS115 transfected with pPIC9K-TLR4 vector；2：GS115 transfected with pPIC9K vector

图 5 毕赤酵母表达可溶性 TLR4 胞外区蛋白的 Western blot 分析

Fig 5 Western blot analysis of soluble TLR4 extracellular expression in GS115

3　讨论

鉴于 TLR4 已成为脓毒症、脓毒性休克等 LPS 相关疾病治疗的关键靶点[3,4]，同时利用重组可溶性受体可竞争受体与配体的结合的特点，开发受体的拮抗剂，已广泛用于实验和临床研究，有的甚至应用于临床，所以获得可溶性 TLR4 显得非常必要。表达 TLR4 有以下优势：①可溶性 TLR4 本身为 TLR4 的阻断剂，可据此观察可溶性 TLR4 对 TLR4 的拮抗效应；②在此基础上可进一步获得 TLR4 的拮抗短肽，为后期药物开发奠定基础；③可制备全分子抗原的抗体；④因目前还未见可溶性 TLR4 的成功报道，如果获得的可溶性 TLR4 受体的产量足够，也可为 TLR4 的信号转导及其相关领域的研究提供充足的实验材料。我们曾利用原核表达系统获得了 TLR4 可溶性受体[7]，但其包涵体多，复性后活性很低。可能与 TLR4 受体的胞外区有 9 个糖基化位点[12]，不适合用原核表达体系进行表达有关。因此我们利用毕赤酵母 pPIC9K 的表达体系，毕赤酵母(pichia pastoris)基因表达系统是一种新型的外源基因表达系统。为此本研究在前期研究的基础上，利用该系统，初步成功表达了可溶性 TLR4 蛋白。但该方法仍有不足之处，例如：要获得一个高表达的菌株，往往需要进行大量的筛选工作；对蛋白的过度糖基化，增加了表达可溶蛋白的难度等。另外，有人认为有 20% ~ 30% 的蛋白不适合用该系统表达。在实验过程中我们发现，表达某种蛋白可能没有一个固定的模式，某种蛋白最适合哪种表达体系来进行表达，也难以预料。往往需要运用不同的表达载体、采用不同的表达体系才能得出适合的结论。

外源基因的拷贝数是影响其表达量的一个重要因素。一般整合的拷贝数越多，表达量就越高，但并不是绝对的。有时单拷贝和多拷贝对表达量无明显影响。甚至多拷贝的表达量比单拷贝表达量要低。本研究对其他不同 G418 抗性的转化子作初步筛选时发现，TLR4 胞外区基因多拷贝转化子的表达量明显高于单拷贝子，且随基因拷贝数的增加而相应增加(资料未显示)。

我们利用毕赤酵母 pPIC9K 的表达体系，初步表达了可溶性 TLR4 蛋白，尽管目的蛋白占总蛋白量的比例较高，但非常遗憾的是，由于时间方面的限制，我们未能进行大规模的筛选高表达菌株，没有进一步进行高密度发酵实验。我们的目的是初步表达 TLR4 的可溶性受体，并利用它研究其对 TLR4 介导 LPS 对细胞激活效应的拮抗作用，如效果肯定，同时也为进一步获得拮抗多肽奠定基础，也为脓毒症、脓毒性休克的防止提供新的途径。因此，以后的工作应该进行大规模的筛选和诱导，以期能获得高效表达的酵母基因工程菌，进一步表达纯化和功能研究，然后在此基础上筛选拮抗性多肽，为最终获得 TLR4 的新型拮抗剂奠定坚实的基础。

参考文献：

[1] 常　山，张雅萍，赵永亮，等. 鸡抗内毒素卵黄抗体 IgY 的制备[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1199 - 1201.

[2] 梁自文，杨宗城，罗向东，等. 内毒素对培养人脐静脉内皮细胞高能磷酸合成的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：813 - 815.

[3] Yang Q W，Zhu P F，Wang Z G，*et al*. TLR4，a novel signal transducer for lipopolysaccharide[J]. J Chin Trai，2002，5(1)：55 - 58.

[4] Beutler B. TLR4：central component of the sole mammalian LPS sensor [J]. Curr Opin Immun，2000，12(1)：20 - 26.

[5] 王吉村，刘新平，聂晓燕，等. 盘状结构域受体 2 胞外区的可溶性表达、纯化和功能鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报，2001，33(6)：647 - 652.

[6] 马　骊，王小宁，张智清，等. 人血管内皮生长因子受体配体结合域[J]. 生物化学与生物物理学报，2000，12(1)：463 - 468.

[7] 段朝霞，蒋建新，杨清武，等. TLR4 胞外段在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及鉴定[J]. 免疫学杂志，2003，19(4)：274 - 277.

[8] 欧阳立明，张惠展，张嗣良，等. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展，2000，27(2)：151 - 153.

[9] 杨清武，朱佩芳，王正国，等. 抗人 TLR4 样受体 4 合成肽单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 解放军医学杂志，2002，27(1)：11 - 12.

[10] 蔡　欣，段聚宝，邹民吉，等. 一种快速鉴定重组酵母克隆的方法[J]. 军事医学科学院院刊，2000，24(2)：151 - 152.

[11] 颜子颖，王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1996，888 - 897.

[12] da Silva Correia J D，Ulevitch R J. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor[J]. J Biol Chem，2002，277(3)：1845 - 1854.

(编辑　王　红)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名，作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或通过电子邮件以附件形式发送至学报信箱 E-mail：aamnt@mail.tmmu.com.cn(投外稿件请邮寄)。

本刊编辑部