文章编号:1000-5404(2006)21-2115-04

论著

TLR4基因3′未翻译区内11 367位点突变对荧光素酶表达的影响

段朝霞,朱佩芳,王正国,蒋建新 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 分别构建含TLR4基因3′未翻译区及11 367位点突变的含荧光素酶基因的表达质粒,应用双荧光报告系统观察TLR4基因3′未翻译区对荧光素酶基因表达的影响。**方法** 采用基因工程的方法构建含TLR4基因3′未翻译区及11 367位点突变的含荧光素酶基因的表达载体,用LipofectAMINE™2000转染HEK293细胞,化学发光法检测荧光素酶活性。**结果** 经酶切及测序鉴定显示,TLR4基因3′未翻译区及11 367位点突变的片段正确插入荧光素酶表达载体pGL3-promoter中,应用双荧光报告系统检测显示pGL3-11 367G质粒转染后荧光素酶活性显著高于pGL3-11 367C。**结论** TLR4基因3′未翻译区单核苷酸多态性能抑制荧光素酶基因的表达。

关键词: TLR4; 单核苷酸多态性;荧光素酶;定点突变
中图法分类号: Q786; Q782 **文献标识码:** A

Influence of 3′ untranslated region single nucleotide polymorphism of TLR4 gene on luciferase gene expression

DUAN Zhao-xia, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-guo, JIANG Jian-xin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct two luciferase gene expression vectors which contain TLR4 gene 3′ untranslated region and 3′ untranslated region 11 367 site-mutant respectively, and use double-fluorescence reporter system to observe the influence of 3′ untranslated region single nucleotide polymorphism of TLR4 gene on luciferase gene expression. **Methods** The luciferase gene expression vectors which contain TLR4 gene 3′ untranslated region and 3′ untranslated region 11 367 site-mutant segment respectively were constructed by the gene engineering technology, and then transfected into the HEK293 cells by LipofectAMINE™2000, finally the activities of fluorescence were detected by the chemic-luminescence. **Results** The sequence of human TLR4 gene 3′ untranslated region was identical with that of TLR4 gene 3′ untranslated region recorded in the GenBank. The analysis for recombinant plasmid DNA digested by *Xba* Ⅰ and *Sma* Ⅰ demonstrated that the TLR4 gene 3′ untranslated region and 3′ untranslated region 11 367 site-mutant segment were inserted exactly into pGL3-promotor respectively. The activities of fluorescence of pGL3-11 367G were higher than pGL3-11 367C ($P<0.05$). **Conclusion** TLR4 gene 3′ untranslated region single nucleotide polymorphism can inhibit the expression of luciferase gene.

Key words: TLR4; single nucleotide polymorphism; luciferase gene; site-mutant

近年来,随着人类基因组计划的进展,有关疾病与基因多态性关系的研究日益受到重视。研究证实,基因多态性是决定人体对应激易感性与耐受性、临床表型多样性及药物治疗反应差异性的重要因素[1]。因此,发现和研究与疾病易感性相关的基因具有重要临床意义。脓毒症是严重创伤、烧伤、休克、外科大手术后等常见的并发症,是临床危重患者死亡的主要原因,多年来一直是临床和科研工作者攻克的重点,其易感基因的选择也越来越引起人们的重视。TLR4是近年来发现的LPS的最重要的模式识别受体,它是将LPS

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G199054203);国家杰出青年科学基金资助项目(30325040)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G199054203), the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30325040)
作者简介: 段朝霞(1973-),女,四川省蓬溪县人,博士,实习研究员,主要从事失控性炎症反应分子机制方面的研究。电话:(023)68757814
通讯作者: 蒋建新,电话:(023)68757460, E-mail:jiangjx@cta.cq.cn
收稿日期: 2006-02-27;**修回日期:** 2006-07-20

的刺激信号直接传入细胞内的一种跨膜信号受体，在介导革兰阴性细菌及其 LPS 的宿主反应中发挥关键作用[2]。近年来，TLR4 基因多态性与脓毒症易感性的相关研究已引起广泛关注[3]。国外有报道高加索人群中 TLR4 基因编码区也发生低频多态性，其中两个单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs）可引起蛋白结构变异（Asp299Gly 和 Thr399Ile），这种变异被证实与革兰阴性菌感染易感性和动脉粥样硬化有关[4,5]。本实验室研究证实 TLR4 基因 3′端未翻译区（3′ untranslated region，3′UTR）11 367 位点 SNP 可影响 TLR4 蛋白表达水平及 LPS 刺激后 TNF-α 分泌水平[6]。由于 3′UTR 序列与基因转录后调控及蛋白表达有密切关系，3′UTR 出现 SNP 可能影响基因的表达及转录的稳定性。为进一步研究 TLR4 基因 3′UTR 影响 TLR4 蛋白表达的机制，本研究应用双荧光报告系统研究 TLR4 基因 3′UTR 对荧光素酶表达的影响，以分析其影响 TLR4 蛋白表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌种

pGL3-promotor 及 pGL3 系列载体、为 promega 公司产品，pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品，Amp 抗性大肠杆菌 HB101 由本室自己保存。

1.2 相关试剂

Ex Taq 酶及限制性内切酶、连接试剂盒、质粒抽提、凝胶回收试剂盒、定点突变试剂盒均购自 TaKaRa 公司。LipofectAMINE™2000 及双荧光报告系统试剂盒购自 promega 公司。

1.3 仪器

Gene Amp PCR System 2400 为 Perkin-Elmer 公司产品，Bio-Rad Digital Science 凝胶成像系统分别为 Bio-Rad 公司产品。

1.4 PCR 扩增 TLR4 基因 3′UTR

根据 GeneBank 中的 TLR4 基因序列（AF177765.1）设计一对扩增 TLR4 基因 3′UTR 的引物：上游引物 P1 为：5′CGG GAT CCA TGG AGC TGA ATT TCT-3′，下游引物 P2 为：5′GTC GAC TCA GAT ATT CAA ACT C-3′。在上下游引物的 5′端都引入 *Xba* Ⅰ的酶切位点（pGL3-promotor 上荧光素酶基因编码区下游只有 *Xba* Ⅰ一个酶切位点）。以人基因组 DNA 为模板，用 P1-P2 引物扩增 TLR4 基因 3′UTR（10 361～11 487 bp）。反应体系为：模板 1 μl，10×Buffer 5 μl，dNTP 4 μl，$MgCl_2$ 4 μl，上游引物 2 μl，下游引物 2 μl，*Taq* 酶 0.5 μl，无菌三蒸水 31.5 μl。反应条件为：94 ℃ 3 min；（94 ℃ 30 s；58 ℃ 50 s；72 ℃ 1 min）30 个循环；72 ℃ 10 min。所获得的 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，DNA 参照 marker 为 DL2000。

1.5 pGL3-11 367G 的构建与鉴定

将用 P1-P2 扩增的产物经纯化后按操作说明连入 pMD18-T 载体，转化大肠杆菌 HB101 感受态，用 α 互补作用及 *Xga* Ⅰ进行重组克隆的筛选，所选阳性克隆经 LB 培养后，提取质粒用 *Xba* Ⅰ酶切鉴定并取菌液送 TaKaRa 公司（大连）测序。对测序正确的 pMD18-TLR4 重组质粒用 *Xba* Ⅰ酶切，回收的 TLR4 目的片段克隆到经同样酶切处理的 pGL3-promotor 中，得到荧光素酶表达载体 pGL3-11 367G，转化大肠杆菌 HB101 感受态，氨苄青霉素筛选，阳性克隆经 *Xba* Ⅰ酶切鉴定，然后用 *Sma* Ⅰ酶切鉴定插入片段的方向（正向插入时 *Sma* Ⅰ后应有约 3 000 bp 和 3 100 bp两条带，反向插入时 *Sma* Ⅰ后应有约 1 900 bp 和 4 200 bp两条带）。

1.6 pGL3-11 367C 的构建与鉴定

根据突变试剂盒的原理设计一对 5′端邻接，3′端方向相反的引物用以引入变异点，进行 PCR 扩增（使用高保真 DNA 聚合酶），引物序列如下：上游 5′- CCT CAT GAA ATG AGT TGC AGC AGA AG- 3′；下游 5′- TCA CCC CGG CTT TAT CAG CCC ATA TG- 3′。以人基因组 DNA 为模板，PCR 反应体系为：模板 1 μl，10×Pyrobest Buffer 5 μl，dNTP 4 μl，上游引物 2 μl，下游引物 2 μl，Pyrobest *Taq* 酶 0.5 μl，无菌三蒸水 35.5 μl。反应条件为：94 ℃ 3 min；（94 ℃ 30 s；55 ℃ 30 s；72 ℃ 5 min）30 个循环；72 ℃ 10 min。所获得的 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，切胶回收目的片段，然后将扩增的 DNA 片断末端平滑及 5′末端磷酸化，再进行自身连接，转化大肠杆菌 HB101 感受态，氨苄青霉素筛选，挑取阳性克隆经 LB 培养后，提取质粒后送 TaKaRa 公司（大连）测序。然后将测序正确的阳性克隆用 *Xba* Ⅰ酶切，回收的目的片段克隆到经同样酶切处理的 pGL3-promoter 中，得到荧光素酶表达载体 pGL3-11 367C，转化大肠杆菌 HB101 感受态，氨苄青霉素筛选，阳性克隆经 *Xba* Ⅰ酶切鉴定，然后用 *Sma* Ⅰ酶切鉴定插入片段的方向。

1.7 细胞培养及质粒转染

细胞为本室保存的 HEK293 细胞，用 RPMI1640 培养基加 10% 的小牛血清。将成功构建的含 TLR4 基因 3′UTR 及其 11 367位点突变的荧光素酶表达质粒 pGL3-11 367G 及 pGL3-11 367C，用 Lipofectmain™2000 转染 HEK293 细胞，方法见试剂盒使用说明，转染后 48～72 h 用双荧光报告系统试剂盒测定荧光素酶活性。

1.8 荧光素酶活性检测

分为 4 组，分别为 pGL3-basic 质粒、pGL3-promoter 质粒、pGL3-11 367G 质粒、pGL3-11 367C 质粒转染后的 HEK293 细胞，方法见试剂盒使用说明，记录数据。

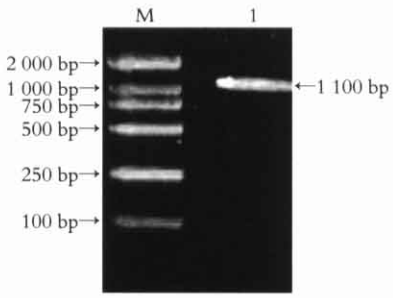
1.9 统计学处理

荧光素酶活性用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 TLR4 基因 3′UTR 扩增

以健康人全血基因组 DNA 为模板，PCR 扩增 TLR4 基因完整的 3′UTR，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定显示，扩增产物约为 1 100 bp 左右的 DNA 带，同预期片段的大小符合（图 1）。

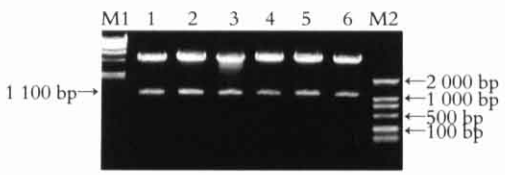


1：PCR 扩增产物；M：DL2000 标准

图 1　PCR 扩增结果

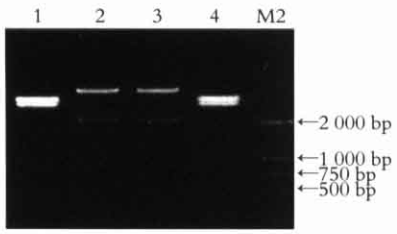
2.2　pGL3-11 367G 质粒的构建

pGL3-11 367G 质粒经 *Xba* Ⅰ酶切后，出现约 1 100 bp 的片段，表明插入的目的片段正确（图 2）。经 *Sma* Ⅰ酶切出现约 3 000 bp和 3 100 bp 两条带，证实为正向插入（图 3），经测序表明 pGL3-11 367G 中的插入片段与 GeneBank 中的 TLR4 基因序列（AF177765.1）一致。



M1：*Hind* Ⅲ酶切片段；1～6：质粒 *Xba* Ⅰ酶切结果；M2：DL2000 标准

图 2　pGL3-11 367G 质粒 *Xba* Ⅰ酶切结果

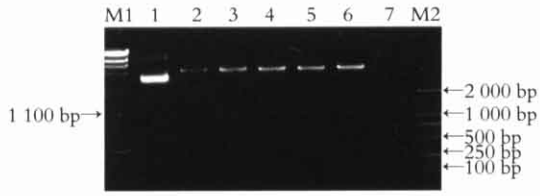


1、4：正向插入质粒；2、3：反向插入质粒；M2：DL2000 标准

图 3　pGL3-11 367G 质粒 *Sma* Ⅰ酶切结果

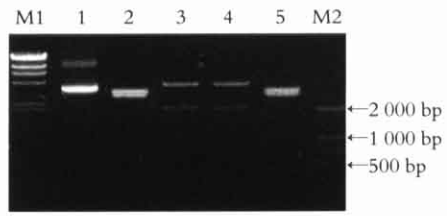
2.3　pGL3-11 367C 质粒的构建

用设计的突变引物，以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增（使用高保真 DNA 聚合酶），然后将扩增的 DNA 片断末端平滑及 5′末端磷酸化，再进行自身连接、转化、挑取阳性克隆测序后证实突变成功，然后将突变体经 *Xba* Ⅰ酶切后连入经同样酶切后的 pGL3-promoter 中，获得 pGL3-11 367C，转化大肠杆菌 HB101 感受态细胞，挑取阳性克隆，小量提取质粒 DNA，用 *Xba* Ⅰ酶切鉴定（图 2），切下了约为 1 100 bp 的插入片段；然后用 *Sma* Ⅰ酶切鉴定连入方向，切出约 3 000 bp 和 3 100 bp 两条带证实为正向插入（图 4、5）。



M1：*Hind* Ⅲ酶切片段；1：未酶切的质粒；2：pGL3-pro 质粒；3～6：质粒 *Xba* Ⅰ酶切结果；7：插入片段；M2：DL2000 标准

图 4　pGL3-11 367G 质粒 *Xba* Ⅰ酶切结果



M1：*Hind* Ⅲ酶切片段；1：未酶切的质粒；2、5：正向插入质粒；3、4：反向插入质粒；M2：DL2000 标准

图 5　pGL3-11 367G 质粒 Sma Ⅰ酶切结果

2.4　荧光素酶活性检测

转染后 48～72 h 用化学发光法检测各转染质粒的荧光素酶活性。其结果见表 1，可见 pGL3-11 367C 显著低于 pGL3-11 367G，pGL3-basic 质粒的荧光素酶活性基本上为零、pGL3-promotor 质粒的荧光素酶活性最高，说明 TLR4 基因 3′UTR 的 C 等位基因能抑制荧光素酶活性，荧光素酶活性测定结果见表 1。

表 1　荧光素酶活性测定结果

组别	荧光素酶活性
pGL3-basic	0.007 6 ± 0.001 2
pGL3-promotor	0.503 0 ± 0.098 0
pGL3-11 367G	0.375 0 ± 0.074 0[a]
pGL3-11 367C	0.018 9 ± 0.003 3

a：$P<0.05$，与 pGL3-11 367C 比较

3　讨论

研究表明，TLR4 是天然免疫系统中的一种重要模式识别受体，它不仅能特异地识别 LPS，而且能转导 LPS 的跨膜信号，是介导 LPS 激活/损伤的关键受体，在脓毒症、内毒素休克、多器官功能障碍综合征等病理过程中起着非常重要的作用[7,8]，被认为是脓毒症及其他 LPS 相关疾病防治的新靶点。许多研究表明，人 TLR4 基因编码区多态性与多种疾病有关[4,5]。但 TLR4 基因其它区域的基因多态性是否也与脓毒症的易感性有关？其编码区的多态性（Asp299Gly 和 Thr399Ile）在中国人群中是否也有相同的分布及生物

学功能？目前尚不清楚。本实验室曾对我国10个民族、27个个体TLR4基因重要区域直接测序，检测到4个SNP[9]，分别位于基因的5′区和3′端未翻译区（3′UTR）。3′UTR的2个SNP（11 367位点的G→C及10 764位点的T→C）在dbSNP中尚未见登录。3′UTR可能具有转录后调控功能，可能影响基因的表达，也与蛋白表达有关。本室已观察了TLR4基因3′UTR 11 367位点的SNP对TLR4蛋白表达的影响（10 764位点由于突变频率太低未予研究），发现3′UTR的C等位基因可使TLR4蛋白表达降低[6]，为进一步深入研究11 367位点SNP影响TLR4蛋白表达的机制，因此本研究用定点突变的方法做初步探讨，为下一步深入研究中国人群中TLR4基因SNP的生物学意义提供更丰富的实验依据。

定点突变是研究基因功能的重要技术之一，它可以有目的地改变DNA序列中的碱基，不仅可以阐明基因表达的调控机制，还可研究蛋白质结构与功能间的关系，也可以改变目的蛋白的氨基酸，使之更符合研究者的要求。最常用的就是用PCR技术进行定点突变，应用PCR技术构建突变体时多采用重叠延伸的方法[10]。

本研究在设计时采用一步反向PCR法，只需设计一对5′端邻接，3′端方向相反的引物用以引入变异点，进行PCR扩增，然后将扩增的DNA片断末端平滑及5′末端磷酸化，再进行自身连接、转化、即可挑取阳性克隆酶切以及测序鉴定，成功地构建了定点突变质粒。该方法以1对引物代替常规的两对引物进行定点突变，不仅节省了引物合成的费用，更重要的是操作非常简单，省时，成功率也高，是进行定点突变的一种高效的方法。

双荧光报告系统是研究启动子和增强子区域功能的简单易行的一个方法，本研究选用的PGL3荧光素酶报告基因载体可直接用于基因表达调节的定性研究，它含有修饰过的火焰虫荧光素酶基因的编码区（以保证荧光素酶基因本身不受其他转录信号的影响），转染该载体后的真核细胞中可直接用荧光素酶分析试剂盒（promega公司配套产品）快速、灵敏地检测转录活性。pGL3载体在荧光素酶基因编码区的下游正好有一个酶切位点，可用于研究插入3′UTR对荧光素酶表达的调节作用。本研究用荧光素酶分析试剂盒（双荧光报告系统）显示TLR4基因3′UTR 11 367位点的C等位基因能抑制荧光素酶活性，说明TLR4基因3′UTR 11 367位点的SNP能够影响基因的表达。3′UTR不仅仅能改变mRNA的稳定性，主要是影响转录子的翻译。3′UTR介导的翻译调节一般是导致翻译抑制[11,12]，极少数的可促进翻译过程[11,13]。本研究结果证实，TLR4基因3′UTR 11 367位点的C等位基因也主要起沉降子的作用，即抑制基因的表达，因此可以初步推断出3′UTR 11 367位点SNP影响TLR4蛋白的表达可能是通过沉寂TLR4基因所致。

参考文献：

[1] 姚咏明，盛志勇. 我国创伤脓毒症基础研究新进展[J]. 中华创伤杂志，2003，19(1)：9－12.

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

[3] ARBOUR N C，LORENZ E，SCHUTTE B C，*et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans [J]. Nat Genet，2000，25(2)：187－191.

[4] SMIRNOVA I，HAMBLIN M T，MCBRIDE C，*et al*. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in human[J]. Genetics，2001，158(4)：1657－1664.

[5] LORENZ E，MIRA J P，FREES K L，*et al*. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock [J]. Arch Intern Med，2002，162(9)：1028－1032.

[6] 段朝霞，朱佩芳，李 玮，等. Toll样受体4基因3'未翻译区多态性对其蛋白表达的影响[J]. 中华创伤杂志，2006，22(6)：454－458.

[7] ROCK F L，HARDIMAN G，TIMANS J C，*et al*. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll [J]. Proc Natl Acad Sic U S A，1998，95(2)：588－593.

[8] LIEN E，INGALLS R R. Toll-like receptors [J]. Crit Care Med，2002，30(1 Suppl)：S1－S11.

[9] 冯 凯，周钢桥，翟 芸，等. TLR4基因多态性在中国人群中的初步研究[J]. 中华医学遗传学杂志，2005，22(1)：99－101.

[10] 黄培堂，俞纬源，周 芬，等. PCR技术的原理和应用[M]. 北京：中国科学技术出版社，1990：41－44.

[11] IKUSHIMA H，NISHIDA T，TAKEDA K，*et al*. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is downregulated after operation [J]. Surgery，2004，135(4)：376－385.

[12] KRUYS V，WATHELET M，POUPART P，*et al*. The 3′untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1987，84(17)：6030－6034.

[13] SPICHER A，GUICHERIT O M，DURET L，*et al*. Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress [J]. Mol Cell Biol，1998，18(12)：7371－7382.

（编辑 陈聪连）