论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1246-03

人 TLR9 真核表达载体在 HEK293T 细胞中的表达

丁国富,吴 翀,蒋为薇,李 军,罗 平,周 红 (第三军医大学药学院药理学教研室,重庆 400038)

摘 要:**目的** 构建人 Toll 样受体 9(TLR9)全长序列与绿色荧光蛋白 GFP 的重组质粒,观察融合蛋白在 HEK293T 细胞内表达并检测其应答 CpG DNA 的能力。**方法** PCR 法扩增 TLR9 全长,限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切绿色荧光真核表达质粒 pcDNA3/GFP 和 TLR9 全长,构建重组质粒 pcDNA3-TLR9/GFP,脂质体转染人胚肾 293T 细胞(HEK293T),荧光显微镜下观察绿色荧光融合蛋白在细胞内的表达与分布;将重组质粒与 NF-κB 荧光素酶报告质粒 pGL2-luc 共转染 HEK293T 细胞,CpG DNA(10 mg/L)刺激后,化学发光法检测细胞内荧光素酶活性。**结果** 成功构建 pcDNA3-TLR9/GFP 质粒,经酶切及测序分析证实载体构建正确;转染细胞后,在荧光显微镜下观察到 TLR9/GFP 融合蛋白大量表达;重组质粒与 pGL2-luc 共转染细胞,应用荧光报告系统检测显示,CpG DNA 刺激后荧光素酶活性显著高于生理盐水对照组($P<0.01$)。**结论** 重组质粒 pcDNA3-TLR9/GFP 在 HEK293T 细胞中表达的 TLR9/GFP 绿色荧光融合蛋白,能够识别 CpG DNA 并诱导增加胞内 NF-κB 转录活性。

关键词:Toll 样受体 9;克隆;真核表达;核转录因子-κB;荧光素酶
中图法分类号:R329-33;R392.1;R392.2 **文献标识码**:A

Expression of pcDNA3-TLR9/GFP in HEK293T cells

DING Guo-fu, WU Chong, JIANG Wei-wei, LI Jun, LUO Ping, ZHOU Hong (Department of Pharmacology, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct a plasmid encoding the human Toll-like receptor 9 (TLR9) full length and green fluorescent protein (GFP), and investigate the expression of TLR9/GFP fusion protein in HEK293T cells in order to detect its response to CpG DNA stimulation. **Methods** According to the sequence of human TLR9 gene recorded in GenBank, primers of TLR9 full length were designed. The objective gene fragment was amplified by PCR, digested by *Bam*H Ⅰ and *Xho* Ⅰ, and cloned into pcDNA3/GFP plasmid. After being identified by enzyme digestion and sequencing, the recombinant vector was transfected into HEK293T cells. The green fluorescence and cellular localization of TLR9/GFP fusion protein were observed by fluorescent microscopy. Meanwhile, the luciferase activity of HEK293T co-transfected with pcDNA3-TLR9/GFP and pGL2-luc (NF-κB-luciferase reporter) following CpG DNA stimulation were measured by using luciferase reporter assay. **Results** The recombinant pcDNA3-TLR9/GFP had been confirmed to be correct constructed after sequencing identification. Following successful transfection to HEK293T with the plasmid, the green fluorescent TLR9/GFP fusion protein was expressed in cells. The luciferase activity of HEK293T co-transfected with pcDNA3-TLR9/GFP and pGL2-luc was increased significantly after stimulated with CpG DNA (10 mg/L). **Conclusion** The recombinant pcDNA3-TLR9/GFP is constructed successfully and the TLR9/GFP fusion protein which can respond to CpG DNA stimulation were expressed in HEK293T.

Key words: Toll-like receptor 9; clone; eukaryotic expression; NF-κB; luciferase

创伤、烧伤及感染引起的脓毒症是临床患者死亡的主要原因之一,至今尚缺乏有效的治疗手段。CpG DNA(CpG-containing DNA,CpG DNA)是导致脓毒症的病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns,PAMPs)之一,它通过激活单核-吞噬细胞系统大量释放 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-12 等多种前炎症细胞因子引起脓毒症的发生[1]。Toll 样受体(Toll-like receptors,TLRs)家族的 TLR9 是巨噬细胞识别 CpG DNA 的模式识别受体,TLR9 直接结合 CpG DNA 从而启动炎症信号,最终引起机体全身炎症反应[2]。本研究应用基因重组技术,将 TLR9 全长克隆进能表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的真核表

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30572365)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30572365)
作者简介:丁国富,男,江苏省靖江市人,博士研究生,主治医师,主要从事炎症药理方面的研究。电话:(023)68752265,E-mail:dingguofu@sohu.com
通信作者:周 红,电话:(023)68752266,E-mail:zhouh64@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-09-07;修回日期:2008-01-21

达载体 pcDNA3/GFP 中，成功实现了其在 HEK293T 细胞中的表达，为进一步研究 TLR9 的结构与功能奠定了工作基础。

1　材料与方法

1.1　材料

绿色荧光真核表达质粒 pcDNA3/GFP 本室构建并保存，NF-κB 荧光素酶报告质粒 pGL2-luc、海肾荧光素酶报告质粒 pRL-CMV 由第三军医大学尹华华馈赠。高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR、胶回收纯化试剂盒、限制性内切酶为大连宝生物公司产品，T_4 DNA 连接酶购自 Promega 公司，质粒纯化试剂盒购自 Qiagen 公司，脂质体转染试剂 DOTAP 为 Roche 公司产品，荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。CpG DNA 序列：5′-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3′，核酸骨架为硫代磷酸修饰，由上海生工公司合成。HEK293T 细胞购自 ATCC 公司，DMEM 培养液、低内毒素胎牛血清购自 HyClone 公司，所有细胞培养耗材均为 BD 公司产品。

1.2　PCR 引物设计及目的基因片段的获得

引物设计参照 TLR9 mRNA 序列（GenBank：AF245704）设计，由 TaKaRa 公司合成，正向引物中加入 *Bam*H Ⅰ酶切位点，反向引物中加入 *Xho* Ⅰ酶切位点，引物序列如下：正向：5′-GAAGCCCCTGCCCGGATCCATGGGTTTCTGC-3′，反向：5′-TCCGGCTCACTCGAGTTCGGCCGTGGGTCCCTG-3′。下划线为酶切位点。

以人 TLR9 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增参数：94 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 3 min，循环 20 次，72 ℃ 充分延伸 10 min，胶回收纯化 PCR 产物。

1.3　构建 pcDNA3-TLR9/GFP 质粒

*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切质粒 pcDNA3/GFP 和 TLR9 目的片段，T_4 DNA 连接酶连接载体与目的片断的酶切产物，连接产物转化大肠杆菌 DH5α，挑选单菌落，提取重组质粒酶切鉴定，最终经测序证实序列正确。具体操作参照文献[3]进行。

1.4　pcDNA3-TLR9/GFP 在 HEK293T 细胞中的表达

在 24 孔板中培养 HEK293T 细胞，待其生长融合达 80% 左右时准备转染。取 500 ng pcDNA3-TLR9/GFP（pcDNA3.0 为阴性对照），以无血清 DMEM 培养液稀释至终体积为 100 μl，另取 5 μl DOTAP 用无血清 DMEM 培养液稀释至 50 μl，二者混合均匀，室温下放置 15 min，加入培养板中，继续培养，10 h 后弃去转染液，更换含血清 DMEM 培养液，24 h 后取培养板在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白在 HEK293T 细胞中的表达。

1.5　CpG DNA 对 HEK293T 细胞 NF-κB 活性的影响

按上述方法共转染 500 ng pcDNA3-TLR9/GFP（pcDNA3-GFP 为对照）与 200 ng pGL2-luc，同时，为了校正转染效率的差异，每组均加入 4 ng 内参照质粒 pRL-CMV，10 h 后弃去转染液，更换新鲜 DMEM 培养液，24 h 后，加入 CpG DNA（10 mg/L）或生理盐水，再过 12 h 后收集细胞，按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性强度，并计算萤火虫荧光与海肾荧光的比值。

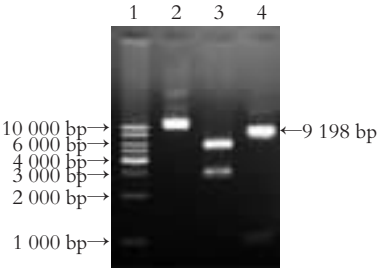
1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　真核表达质粒 pcDNA3-TLR9/GFP 的构建

PCR 法扩增 TLR9 全长片段，*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，将其插入绿色荧光真核表达载体 pcDNA3/GFP 内，得到 9 198 bp 的重组 pcDNA3-TLR9/GFP，经酶切及测序分析证实 TLR9 全长片段插入了质粒 pcDNA3/GFP 内（图 1）。

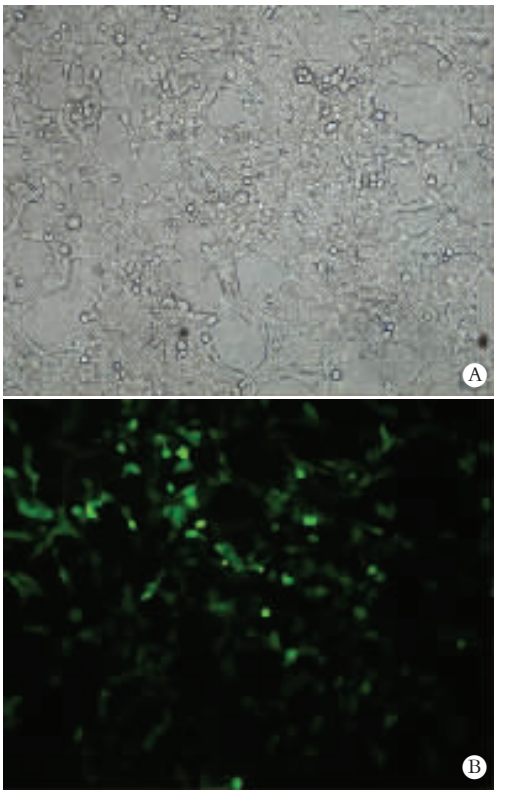


1：DNA 标准（1 kb Ladder）；2：pcDNA3-TLR9/GFP 质粒；3：*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切产物；4：*Hind* Ⅲ单酶切产物

图 1　pcDNA3-TLR9/GFP 酶切鉴定

2.2　pcDNA3-TLR9/GFP 转染 HEK293T 细胞

在荧光显微镜下观察，转染不含有 GFP 的 pcDNA3 质粒后 HEK293T 细胞内无荧光；转染重组质粒 pcDNA3-TLR9/GFP 后，细胞内出现很强的绿色荧光，说明 TLR9/GFP 融合蛋白成功表达（图 2）。

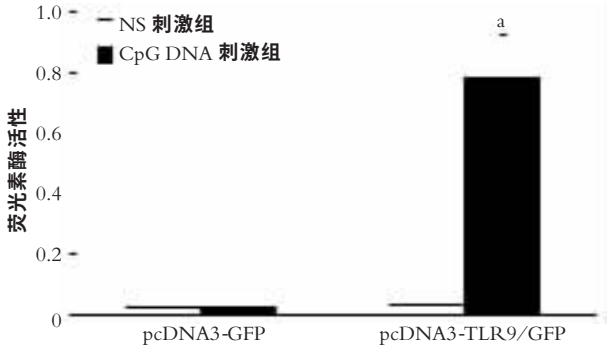


A：转染 pcDNA3 的细胞；B：转染 pcDNA3-TLR9/GFP 的细胞

图 2　pcDNA3-TLR9/GFP 在 HEK293T 细胞中的表达
（荧光显微镜 ×200）

2.3 转染 pcDNA3-TLR9/GFP 的 HEK293T 细胞应答 CpG DNA 刺激

化学发光法检测各组细胞的荧光素酶活性，未加 CpG DNA 刺激时，各组细胞的萤火虫荧光素酶活性基本上为零；CpG DNA 刺激后，由于正常 HEK293T 细胞缺乏 TLR9 受体，不能识别 CpG DNA，因此荧光素酶活性很低，转染 pcDNA3-TLR9/GFP 细胞内荧光素酶活性增加（$P<0.01$），说明 TLR9/GFP 融合蛋白具备野生型 TLR9 的受体功能，能识别 CpG DNA，从而诱导 NF-κB 的转录活性增加（图3）。



a：$P<0.01$，与转染 pcDNA3-TLR9/GFP 后 NS 刺激组比较

图3 CpG DNA 对 HEK293T 细胞 NF-κB 活性的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

3 讨论

TLR9 是巨噬细胞识别 CpG DNA 的模式识别受体，由 1 032 个氨基酸残基组成（人和鼠的 TLR9 长度相同）。激活后 TLR9 使 NF-κB 进入核内，诱导特定基因的表达，导致细胞因子的大量释放[2]，因此，NF-κB 的活性可以作为 TLR9 受体活化与否的一个指标。TLR9 受体胞外区与识别配体有关[4]，但是到目前为止，TLR9 胞外区与 CpG DNA 的结合位点究竟位于何处、TLR9 是如何识别 CpG DNA 还不清楚。因此，深入研究 TLR9 受体的蛋白结构，明确 TLR9 识别 CpG DNA 的分子机制，对寻找以 TLR9 为靶点的抗炎药物有着重要意义[5]。

由于原核表达系统不能进行糖基化，从而使表达的蛋白缺乏正确的生物学功能，因此 TLR 不宜在大肠杆菌中表达[6]。目前研究报道的 TLR 受体的获得或者通过在昆虫细胞中表达[7]、或者从 HEK 细胞中获得[8]。在目前条件下，利用 HEK293T 细胞进行 TLR 结构与功能的关系研究仍是首选。本研究中使用的 pcDNA3 表达载体是一种高效真核表达载体，并在其多克隆位点下游插入表达绿色荧光蛋白 GFP 的序列，GFP 的荧光强度可作为 TLR9 是否表达以及表达强弱的标志。

我们将 pcDNA3-TLR9/GFP 转染 HEK293T 细胞，荧光显微镜观察显示 TLR9/GFP 融合蛋白表达后定位于细胞之内。我们既往研究证实[9,10]，氯喹（内体酸化抑制剂）能够抑制 CpG DNA 的酸化降解，从而抑制 TLR9 对炎症信号的转导，降低 CpG DNA 诱导的细胞因子的释放、降低 CpG DNA 攻击小鼠的死亡率，并推测内体的酸化过程是 TLR9 识别 CpG DNA 的一个重要环节。Latz 等[11]研究发现，TLR9 受体是一个贮存受体，在细胞受到 CpG DNA 刺激后迅速由粗面内质网转移到内体中。我们在实验中所观察到的细胞内定位是否就在粗面内质网中，还有待于进一步研究。

如果仅仅从荧光强度来判断 TLR9 是否表达还不够充分，因为还需要了解表达的融合蛋白是否具有野生型受体功能，即识别 CpG DNA 启动炎症信号转导，最终活化 NF-κB 的能力。HEK293T 细胞缺乏 TLR9 受体，对 CpG DNA 刺激无应答[8]。在转染了 pcDNA3-TLR9/GFP 重组质粒以及荧光素酶报告质粒 pGL2-luc、并经 CpG DNA 刺激后，细胞内荧光素酶表达增加，反映 NF-κB 的活性增强，说明 TLR9/GFP 融合蛋白具备野生型 TLR9 的受体功能，能识别 CpG DNA，增强 NF-κB 的转录调控能力。

参考文献：

[1] Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, *et al*. Bacterial DNA causes septic shock[J]. Nature, 1997, 386(6623): 336-337.

[2] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al*. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA[J]. Nature, 2000, 408(6813): 740-745.

[3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京 科学出版社, 2006.

[4] Bell J K, Mullen G E, Leifer C A, *et al*. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors [J]. Trends Immunol, 2003, 24(10): 528-533.

[5] Krieg A M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6): 471-484.

[6] Sun J, Duffy K E, Ranjith-Kumar C T, *et al*. Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation[J]. J Biol Chem, 2006, 281(16): 11144-11151.

[7] Choe J, Kelker M S, Wilson I A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain[J]. Science, 2005, 309(5734): 581-585.

[8] Barton G M, Kagan J C, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA[J]. Nat Immunol, 2006, 7(1): 49-56.

[9] Zhou H, Ding G, Liu W, *et al*. Lipopolysaccharide could be internalized into human peripheral blood mononuclear cells and elicit TNF-alpha release, but not via the pathway of toll-like receptor 4 on the cell surface[J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(5): 373-377.

[10] 周 红, 罗 平, 郑 江, 等. 氯喹抑制 EC DNA、内毒素协同诱导的 IL-6 释放[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(3): 203-205.

[11] Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, *et al*. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome[J]. Nat Immunol, 2004, 5(2): 190-198.

（编辑 邓强庭）