

猪 TOLL 样受体 7 全基因的扩增、克隆及生物信息学分析

钞安军 吴宇阳 李 坤 卢权威 崔保安 陈红英

(河南农业大学 牧医工程学院 河南 郑州 450002)

摘要: 根据猪 Toll 样受体 7 基因(*TLR7*) 序列设计、合成 1 对引物,直接从三元猪外周血淋巴细胞中提取总 RNA,应用 RT-PCR 技术扩增三元猪 *TLR7* 全基因,并进行克隆和测序。测序结果表明,获得了三元猪 *TLR7* 全基因序列,其大小为 3 160 bp,包含一个完整阅读框(3 153 bp),编码 1 051 个氨基酸残基,有 15 个潜在的 N-糖基化位点和 4 个潜在的磷酸化位点,信号肽切割部位位于第 29~30 位氨基酸之间,跨膜基因序列为第 844~866 位。*TLR7* 基因存在种属的差异性,亲缘关系越近,同源性越高。三元猪 *TLR7* 基因的成功克隆为进一步研究猪 *TLR7* 基因表达、生物学功能、揭示 ssRNA 病毒入侵宿主的致病机制以及猪抗病毒免疫及育种的相关研究奠定了基础。

关键词: 三元猪; *TLR7* 基因; 克隆; 进化分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)01-0112-05

Amplification, Cloning and Bioinformatic Analysis of Porcine *TLR7* Gene

CHAO An-jun, WU Yu-yang, LI Kun, LU Quan-wei, CUI Bao-an, CHEN Hong-ying

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: One pair of primers was designed and synthesized according to the nucleic acid sequence of porcine toll-like receptor 7(*TLR7*) gene. The *TLR7* gene from Sanyuan pig was amplified by RT-PCR from the total RNA extracted from peripheral blood lymphocytes, and then cloned and sequenced. The result showed that the full length of *TLR7* gene sequence from Sanyuan pig was consisted of 3 160 bp, which included one open-reading frame(3 153 bp), encoding 1 051 amino acid residues. There were fifteen potential N-glycosylation sites and four potential phosphorylation sites. The cleavage sites of signal peptide were predicted to be in 29th or 30th of the amino acid sequence, and the transmembrane helices in proteins was in 844-866th amino acid sequence. The results of comparative sequence analysis and phylogenetic tree analysis indicated that the *TLR7* gene had difference of genus, and the nearer the genetic relationship, the higher homology. This study paved the way for future study of porcine *TLR7* gene expression, biological function, mechanisms of infection with ssRNA viruses, antiviral immunity and breeding.

Key words: Sanyuan pig; *TLR7* gene; Cloning; Phylogenetic analysis

Toll 样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)可以识别来源于微生物的具有保守结构的分子,在动物机体的先天免疫、炎症控制以及机体的适应性免疫中扮演着重要角色,并且在宿主对病原微生物的识别过程中也起了重要作用^[1]。TLRs 能与病原体的固有分子结合,进而激发信号转导作用,诱导趋化因子和细胞因子等的分泌^[2],发挥固有免疫的防御作用,并激活一系列适应性免疫反应。目前为止,在脊椎动物中已经发现了 TLR1~13^[3],分别识别不同细

菌和病毒且介导机体对不同细菌和病毒的免疫应答。猪、牛、羊等动物的 TLRs 基因均已被克隆,且对其中某些分子的功能也进行了深入性研究^[4]。

TLR7 是 Toll 样受体的成员之一,主要能够识别富尿嘧啶的单链 RNA,活化的 *TLR7* 能够启动髓系分化因子 88 依赖性信号通路^[5],激活 I 型 IFN 和核转录因子 NF- κ B 的产生,从而介导抗病毒免疫应答^[6]。有研究证明,某些 TLR 配体具有抗病毒作用。Nian H 等^[7]研究表明,*TLR7* 配体 R-848 能够

收稿日期:2012-11-23

基金项目:河南省重大科技专项(111100110300)

作者简介:钞安军(1988-),男,河南新乡人,硕士研究生,主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

通讯作者:陈红英(1965-),女,四川仁寿人,博士,教授,主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

降低 HIV 在单核细胞中的复制,并且能够延缓 HIV 发病的进程; Alter 等^[8]研究发现,来自 HIV-1 的 ss-RNA 可作为 TLR7 的配体,活化 NK 细胞,进而增强机体 NK 细胞对病毒的自然杀伤作用。Hackl D 等^[9]的研究表明,TLR7 配体能降低调节性 T 细胞 (Treg) 的生成量,从而降低其产生 Foxp3 的量,其中 Foxp3 对 T 细胞增殖有抑制作用;另外,魏伟^[10]的研究证实了 HCV 感染所引起的天然免疫反应由 TLR7 分子介导,TLR7 分子激活信号的缺失将导致机体抗 HCV 感染免疫应答水平显著下降。并且一些小分子 TLR7 配体已在临床用于治疗病毒性感染和肿瘤^[11]。目前人们对 TLR7 的亚细胞定位和其识别配体后所形成的免疫效应尚不甚清楚,因此,本研究采集三元猪血液分离淋巴细胞,提取总 RNA,采用 RT-PCR 技术,克隆了猪 TLR7 全基因,并对测序结果进行了生物信息学分析,旨在为深入研究猪 TLR7 功能及揭示机体抗感染免疫的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

三元猪外周血采自河南郑州某屠宰场; LA-Taq 酶、DNA Marker (DL5000 和 DL2000)、pMD18-T 载体、Hind III、BamH I 限制性内切酶购自 Takara; 高纯总 RNA 快速提取试剂盒、离心柱型质粒 DNA 小量制备试剂盒、胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; DH5 α 感受态细胞购自天根公司; 淋巴细胞分离液购自索莱宝公司; 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; 其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中的猪 TLR7 核苷酸序列 (DQ333222), 利用引物软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物, 该对引物理论跨幅 3 160 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。

上游引物 P1: 5'-GAAGATGGTTTTTCCAGTGTG-3';

下游引物 P2: 5'-GAGCTAGGCTGTCTCTTTGAA-3'。

1.3 猪外周血做总 RNA 的提取

利用淋巴细胞分离液从三元猪血液中分离猪外周血淋巴细胞, 参照高纯总 RNA 快速提取试剂盒操作步骤提取猪外周血淋巴细胞总 RNA。

1.4 猪 TLR7 全基因的 RT-PCR 扩增

取上述 RNA 悬浮液 1 μ L, 加入 1 μ L Oligo (dT)₁₈ 作为反转录引物, 利用反转录试剂盒进行反转录, 用分光光度计测量其浓度为 6 594.6 ng/ μ L, 立即进行 PCR, 50 μ L PCR 扩增体系如下: LA Taq 0.5 μ L、cDNA 1 μ L、LA Buffer 5 μ L、dNTP 8 μ L、

ddH₂O 35.5 μ L。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min、57 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物用 0.8% 琼脂糖电泳检测结果。

1.5 猪 TLR7 全基因的克隆与鉴定

将回收的 PCR 产物连接于 pMD18-T 载体中, 转化入 DH5 α 感受态细胞, 于含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 琼脂培养基上培养 12 ~ 16 h, 挑取白斑菌落于含有 Amp 的 LB 肉汤中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h。以离心柱型质粒 DNA 小量制备试剂盒提取重组质粒进行 PCR 及酶切电泳检测鉴定, 选择酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送往华大基因公司进行序列测定。

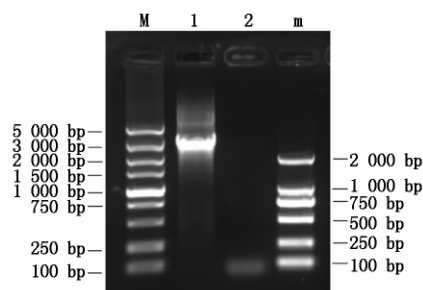
1.6 猪 TLR7 基因序列生物信息学分析

用 DNASTar 软件将克隆的猪 TLR7 基因与 GenBank 中查得的猪及其他动物的 TLR7 基因及推导的氨基酸序列进行比对分析, 并应用丹麦技术大学生物序列分析中心 (CBS) 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 上的 SignalP 4.0 Server (信号肽预测)、TMHMM Server V2.0 (跨膜区预测)、YinOYang (O-糖基化位点预测)、NetNGlyc 1.0 (N-糖基化位点)、BepiPred 1.0 Server (抗原决定簇及亚细胞定位预测)、NetPhos 2.0 Server (磷酸化位点预测) 等软件对猪 TLR7 基因序列进行在线分析。

2 结果与分析

2.1 猪 TLR7 全基因的 RT-PCR 扩增

直接从三元猪的外周血淋巴细胞提取总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 获得 1 条约 3 160 bp 的特异性带 (图 1), 与预期扩增片段长度一致。



M. DNA Marker DL5000; 1. RT-PCR 产物;
2. 阴性对照; m. DNA Marker DL2000。
M. DNA Marker DL5000; 1. RT-PCR product;
2. Negative control; m. DNA Marker DL2000。

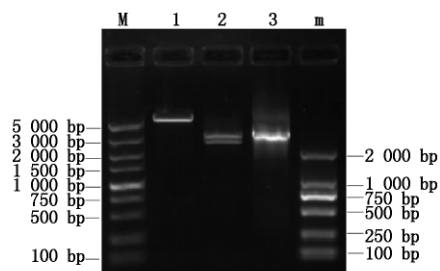
图 1 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis map for RT-PCR products

2.2 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

提取重组质粒并进行 PCR 扩增、电泳, 同样出现 1 条约 3 160 bp 的特异条带; 重组质粒经 BamH I 单酶切、电泳出现 1 条大小约 5 800 bp 的

带;经 *Hind* III、*Bam*H I 双酶切电泳出现 2 条带:其中 1 条带为载体质粒 约 2 700 bp,另 1 条带为所克隆的猪 *TLR7* 全基因片段 约 3 160 bp(图 2)。



M. DNA Marker DL5000; 1. *Bam*H I 酶切重组质粒; 2. *Bam*H I、*Hind* III 酶切重组质粒; 3. 重组质粒 PCR 产物; m. DNA Marker DL2000。

M. DNA Marker DL5000; 1. Recombinant plasmid digestion by *Bam*H I; 2. Recombinant plasmid digestion by *Bam*H I and *Hind* III; 3. Recombinant plasmid PCR product; m. DNA Marker DL2000.

图 2 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion (*Bam*H I *Hind* III) and PCR

2.3 猪 *TLR7* 基因序列分析、糖基化及磷酸化位点的预测

测序报告的三元猪 *TLR7* 基因的全长为 3 153 bp,包含一个完整阅读框,共编码 1 051 个氨基酸,分子质量为 120.9 kDa,等电点为 7.28。将获得的三元猪 *TLR7* 序列注册 GenBank,登陆号为 JQ664686。

将三元猪 *TLR7* 基因推导的氨基酸序列通过 Yinoyang 1.2 在线分析和 NetNGlycyl 1.0 在线分析对

O-糖基化位点及 N-糖基化位点进行预测。结果显示,三元猪 *TLR7* 基因推导的氨基酸中有 15 个潜在的 N-糖基化位点,有 25 个与二硫键形成有关的半胱氨酸,不存在潜在的 O-糖基化位点。在线软件对其磷酸化位点分析结果表明,该氨基酸序列含有 4 个潜在的磷酸化位点。

2.4 猪 *TLR7* 蛋白结构、抗原性分析及亚细胞定位分析

DNASar 软件对三元猪 *TLR7* 蛋白分子的蛋白的二级结构、柔韧区域、及抗原指数的预测结果如图 3 所示。

应用在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>)及 DNASar(Protean)对三元猪 *TLR7* 基因编码的蛋白进行抗原表位分析,结果显示其抗原表位主要集中在第 30 ~ 45,54 ~ 69,214 ~ 225,265 ~ 278,431 ~ 459,476 ~ 495,528 ~ 540,669 ~ 679,814 ~ 826,1013 ~ 1024 和 1045 ~ 1050 位氨基酸。另外亲水性测相图表明,三元猪 *TLR7* 基因编码蛋白质疏水性最小值为 -3.51,最大值为 2.09。在线分析网站(<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>)对提交肽链序列分析结果表明,三元猪 *TLR7* 基因表达的蛋白有 33.3% 在高尔基体,33.3% 在细胞膜,33.3% 在内质网。

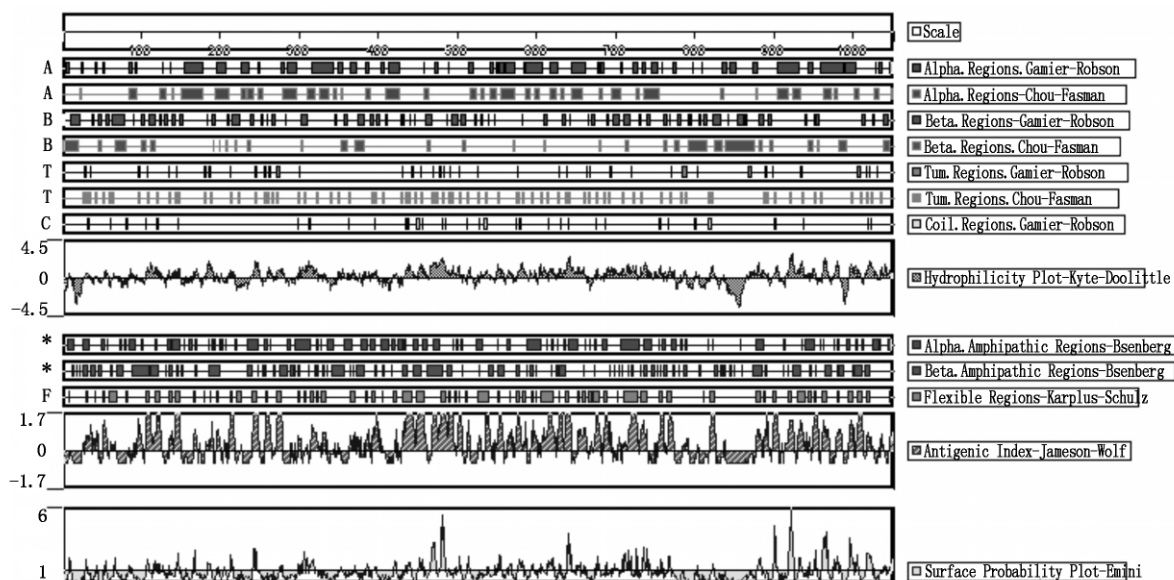


图 3 三元猪 *TLR7* 结构及抗原性分析

Fig. 3 Analysis of structure and antigenic index of *TLR7* from Sanyuan pig

2.5 信号肽和跨膜区分析

将三元猪 *TLR7* 基因氨基酸序列用在线分析软件 SignalP 4.0 Server 及 TMHMM Server V2.0 分析,结果表明其信号肽切割部位最可能位于第 29 ~ 30 位氨基酸,跨膜氨基酸序列为 844 ~ 866 位氨基酸

(图 4)。

2.6 猪 *TLR7* 基因序列比较分析及进化分析

将得到的三元猪 *TLR7* 基因序列与 GenBank 上发表的 9 条猪 *TLR7* 基因序列(GU936191、EF426479、DQ333222、AB258453、GU013760、DQ647699、EF583901、

AB086188、EF469730) 进行比较分析发现, 克隆的三元猪 *TLR7* 基因序列与 EF426479、EF583901 同源性为 99.9%, 与 EF426479 相比变异点为 C²⁵⁰T、G⁶⁸²A、T⁴⁶⁵C, 与 EF583901 相比存在 C²⁵⁰T、G⁶⁸²A 的变异, 从而引起三元猪 *TLR7* 基因推导的氨基酸序列中第

84 位氨基酸由丝氨酸(S)突变为脯氨酸(P), 第 228 位由苏氨酸(T)突变为丙氨酸(A), 与 EF426479、EF583901 氨基酸同源性为 99.8%, 与另外 7 条序列的核苷酸同源性在 99.0%~99.9% 之间, 推导的氨基酸序列同源性在 99.0%~99.8%。

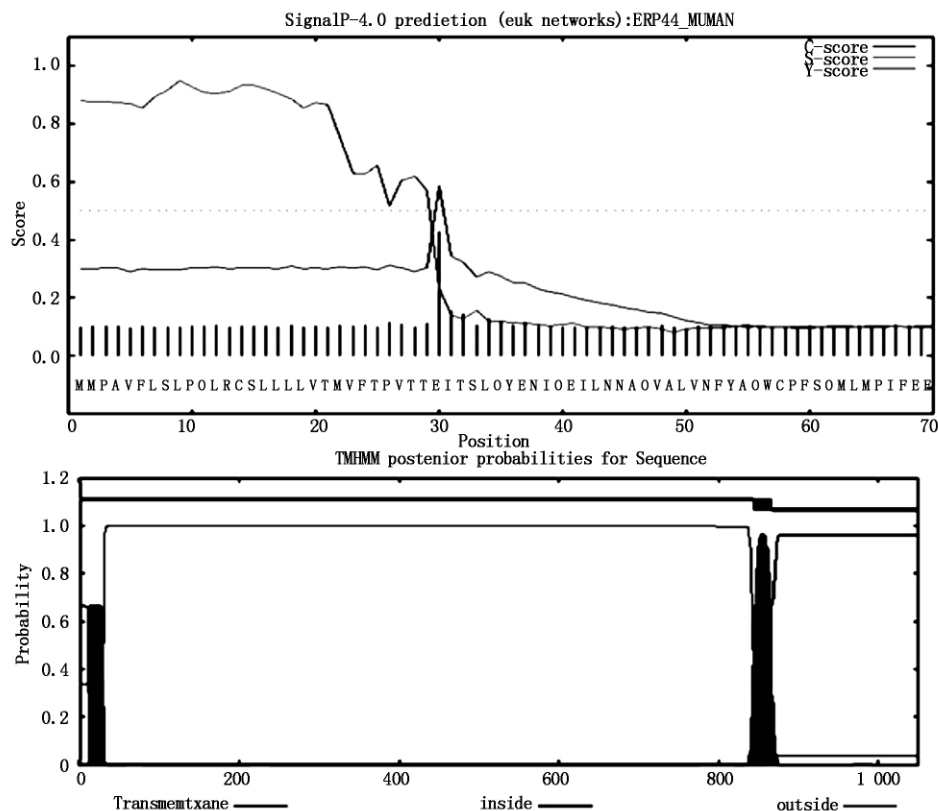


图4 三元猪 *TLR7* 的信号肽预测

Fig. 4 The prediction of signal peptide of *TLR7* from Sanyuan pig

三元猪 *TLR7* 与羊 (HQ529279)、牛 (HQ529275)、猫 (NM_001080133)、狗 (DQ333224)、人 (BC033651)、鼠 (BC132385) 的 *TLR7* 基因核苷酸序列同源性分别为 90.3%、90.2%、88.5%、87.9%、87.3% 和 80.8%, 与鸡 (NM_001011688) 核苷酸同源性为 66.3%。三元猪 *TLR7* 基因推导的氨基酸序列与羊、牛、猫、狗、人、小鼠 *TLR7* 基因氨基

酸同源性为 91.0%、90.6%、86.7%、87.3%、84.9%、78.2%, 而与鸡的氨基酸同源性仅为 64.0%。

将克隆的三元猪 *TLR7* 序列及 GenBank 上 9 条猪 *TLR7* 基因序列与人和其他 6 种动物的 *TLR7* 基因核苷酸序列绘制成进化树, 该进化树可分为 2 组 (图 5), 第一组是人和哺乳动物, 包括猪、牛、绵羊、犬、猫和小鼠; 第二组是鸡。

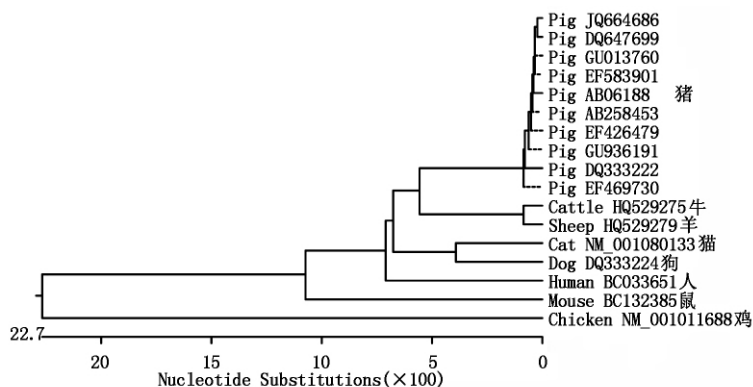


图5 猪、人和其他动物 *TLR7* 基因核苷酸序列的遗传进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of *TLR7* genes of pig human and other animals

3 讨论

TLRs 作为能够识别病原体的“模式”受体,是体内天然免疫系统的重要组成部分,在机体抵抗感染的免疫应答中起了重要作用。其中 *TLR7* 可通过 MyD88 途径产生 I 型干扰素和炎症性细胞因子^[12],在机体抗单链 RNA 病毒(如 HCV、HIV 和流感病毒等)的免疫应答中发挥着非常重要的作用。

目前,世界范围内口蹄疫(FMD)、猪瘟(HC)、猪繁殖与呼吸障碍综合征(PRRS)、猪传染性胃肠炎(TGE)等单链 RNA(ssRNA)病毒病频繁暴发,对养猪业造成了巨大经济损失。为了对猪 *TLR7* 分子的结构与功能进行深入研究,以及探讨病原与宿主互作的分子机理,本研究根据猪 *TLR7* 基因序列设计、合成 1 对引物,应用 RT-PCR 技术从三元猪外周血淋巴细胞中提取的总 RNA 中扩增三元猪 *TLR7* 全基因,克隆并进行基因生物学信息分析。结果表明,克隆的三元猪 *TLR7* 全基因大小为 3 160 bp,包含一个完整阅读框(3 153 bp),共编码 1 051 个氨基酸残基。含有 15 个潜在的 N-糖基化位点,4 个潜在的磷酸化位点,并有 25 个与二硫键形成相关的半胱氨酸。猪 *TLR7* 基因表达的蛋白有 33.3% 在高尔基体,33.3% 在细胞膜,33.3% 在内质网。信号肽切割部位位于第 29–30 位氨基酸,跨膜氨基酸序列为 844–866 位氨基酸。三元猪 *TLR7* 全基因的成功克隆及其生物信息学的分析为进一步研究猪 *TLR7* 基因表达、生物学活性分析、揭示 ssRNA 病毒入侵宿主的致病机制、猪抗病毒免疫以及遗传育种等相关研究奠定了基础。

克隆的三元猪 *TLR7* 基因序列与 GenBank 上发表的 9 条猪 *TLR7* 基因序列进行比对分析发现,克隆的三元猪 *TLR7* 基因序列与 EF426479、EF583901 核苷酸序列同源性为 99.9%,氨基酸同源性为 99.8%,并无插入和缺失变异,但是,在 84 和 228 位存在氨基酸点变异,这可能是不同猪种为适应各自生存环境自然进化的结果,也可能是不同猪种及不同个体对病毒性疫病抵抗力不同而致的差异。*TLR7* 基因序列比对及遗传进化树分析发现,克隆的三元猪 *TLR7* 基因与 GenBank 上 9 条猪 *TLR7* 基因处在一个小的分支中,表明它们之间的亲缘关系近,核苷酸同源性在 99%~99.9% 之间;与人和羊、牛和猫等哺乳动物处在一个较小的分支中,亲缘关系

较近,核苷酸同源性在 80.8%~90.3% 之间;而与鸡 *TLR7* 基因亲缘关系较远,核苷酸同源性仅为 66.3%,表明 *TLR7* 基因存在种属差异性,其亲缘关系越近,同源性就越高。

参考文献:

- [1] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity [J]. *Int Immunol* 2005, 17(1): 1–14.
- [2] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity [J]. *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(3): 124–130.
- [3] Santiago-Raber M L, Dunand-Sauthier I, Wu T, et al. Critical role of *TLR7* in the acceleration of systemic lupus erythematosus in *TLR9*-deficient mice [J]. *J Autoimmun*, 2010, 34(4): 339–348.
- [4] 段风云, 房永祥, 陈国华, 等. 猪 *Toll* 样受体 7 基因的克隆及序列分析 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, (6): 599–601.
- [5] Lund J M, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA virus by toll-like receptor 7 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(15): 5598–5603.
- [6] Antos B P, Valverde J V, Rohr P, et al. *TLR7/8/9* polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from Southern Brazil [J]. *Lupus*, 2012, 21(3): 302–309.
- [7] Nian H, Geng W Q, Cui H L, et al. R-848 triggers the expression of *TLR7/8* and suppresses HIV replication in monocytes [J]. *BMC Infect Dis* 2012, 12(5): 1–11.
- [8] Meier A, Alter G, Frahm N, et al. MyD88-Dependent Immune Activation Mediated by Human Immunodeficiency Virus Type 1-Encoded Toll-Like Receptor Ligands [J]. *J Virol* 2007, 81(15): 8180–8191.
- [9] Hackl D, Loschko J, Sparwasser T, et al. Activation of dendritic cells via *TLR7* reduces Foxp3 expression and suppressive function in induced Tregs [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1334–1343.
- [10] 魏伟. *TLR7* 在 HCV 感染过程中的免疫激活及胞内区功能研究 [D]. 西安: 第二军医大学, 2011.
- [11] 闫小毅, 曹雪涛. *TLR7* 介导抗病毒免疫应答研究进展 [J]. *国外医学: 免疫学分册* 2005, 28(5): 292–295.
- [12] Gordon K B, Gorski K S, Gibson S J, et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human *TLR7* and *TLR8* [J]. *J Immunol* 2005, 174(3): 1259–1268.