· 实验研究 ·

TGF-β1 和 TGF-βII 型受体酵母表达载体构建*

左魁阳[1], 陈梦茜[2], 韩瑞杰[1], 王小花[2], 孟娜娜[1], 金秀东[1], 刘海峰[1]

摘　要: 目的　克隆人转化生长因子 β1(TGF-β1)和 4 个受体基因片段, 构建酵母表达载体, 为应用酵母双杂交筛选与 TGF-β1 相互作用的 TβRII 区域提供技术支持。**方法**　提取人血液中 RNA, 逆转录转为 cDNA, PCR 扩增 TGF-β1 和 4 个受体(TβRII-A、TβRII-B、TβRII-C、TβRII-D)基因片段, 双酶切后, 分别插入酵母双杂交表达载体 pGBKT7 和 pGADT7; 经过 PCR 扩增、双酶切和 DNA 测序鉴定后, 构建质粒 pGBKT7-TGF-β1 和 pGADT7-TβRII-A、pGADT7-TβRII-B、pGADT7-TβRII-C 和 pGADT7-TβRII-D。**结果**　成功扩增TGF-β1基因(1 200 bp)和 TβRII-A(453 bp)、TβRII-B(366 bp)、TβRII-C(276 bp)和 TβRII-D(165 bp)基因片段, 经 PCR、双酶切和 DNA 测序鉴定插入到酵母双杂交载体序列正确。**结论**　成功构建 pGBKT7-TGF-β1 和 pGADT7-TβRII-A、pGADT7-TβRII-B、pGADT7-TβRII-C 和 pGADT7-TβRII-D 酵母双杂交表达载体。

关键词: 人转化生长因子 β1(TGF-β1); TGFβ Ⅱ 型受体; 质粒构建; 酵母双杂交

中图分类号: R 97　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)06-0926-04　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-06-15

Construction and identification of yeast two-hybrid expression vector containing human transforming growth factor-beta 1 and different fragments of transforming growth factor-beta receptor type II

ZUO Kui-yang*, CHEN Meng-xi, HAN Rui-jie, et al (* *Medical Research Center, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang Province* 157011, China)

Abstract: Objective　To clone human transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) and 4 genome fragments of its receptor and to construct the yeast expression vector to provide technical support for using yeast two-hybrid in identification of interaction domain of TGF-β type II receptor (TβRII) with TGF-β1. **Methods**　The gene TGF-β1 and gene fragments of TβRII from the RNA of human peripheral blood were amplified with regular PCR using specific primers, and then cloned into yeast two-hybrid expression vector pGBKT7 and pGADT7. The recombinant plasmids pGBKT7-TGF-β1 and pGADT7-TβRII-A, pGADT7-TβRII-B, pGADT7-TβRII-C, pGADT7-TβRII-D sequences were confirmed with PCR, restriction endonucleases digestion, and automated DNA sequencing. **Results**　The yeast two-hybrid expression vector pGBKT7-TGF-β1 (1 200 bp) and pGADT7-TβRII-A (453 bp), pGADT7-TβRII-B (366 bp), pGADT7-TβRII-C (276 bp), pGADT7-TβRII-D (165 bp) were successfully constructed and the sequences of the plasmids' DNA were correct. **Conclusion**　The yeast two-hybrid expression vectors pGBKTT-TGFβ1 and pGADT7-TβRIIA, B, C, and D were successfully constructed.

Key words: transforming growth factor-beta 1; transforming growth factor-beta receptor type II; plasmid construction; yeast two-hybrid

组织器官(肝脏、肾脏、心肌组织等)纤维化引起的器官功能衰竭, 已成为危害人类健康的重要原因之一, 而人转化生长因子 β1(transforming growth factor beta 1, TGF－β1)在纤维化发生发展中起重要作用[1]。在哺乳动物中, 已经克隆出 3 种 TGF－β, 分别为 TGF－β1、TGF－β2 和 TGF－β3。虽然它们在体外显示类似的功能, 但在纤维化的发生发展中, 多由于 TGF－β1 的过量表达引起细胞外基质(extracelluar matrix, ECM)和胶原蛋白的过度产生、沉积而引起纤维化, 因此 TGF-β1 被认为是器官纤维化的一个关键环节。TGF-β1 的生物学功能是通过与其细胞膜上的受体相结合来实现的, 其受体包括转化生长因子 I、II、III 型受体(TβRI、TβRII、TβRIII)。TGF-β1 首先与 TβRII 结合, 使其二聚化, 二聚化的 TβRII 可使 TβRI 转磷酸化, 引起TGF-β/Smads 和非 TGF-β/Smads 信号转导[2]而调控基因转录。因此, TβRII 对于 TGF-β1 的生物活性是必须的[3-4]。酵母双杂交技术广泛用于检测蛋白质－蛋白相互作用[5-7], 用于酵母双杂交系统检测的蛋白质, 分别与含有 DNA 结合结构域酵母双杂交诱

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81500471); 黑龙江省自然科学基金(H2015080); 黑龙江省卫生厅项目(2014－212; 2016－355); 研究生创新科研基金(2014YJSCX－07)

作者单位: 1. 牡丹江医学院医药研究中心, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院基础医学院

作者简介: 左魁阳(1988－), 男, 黑龙江牡丹江人, 硕士在读, 研究方向: 抗纤维化。

通讯作者: 刘海峰, E-mail: fenghailiu510@163.com; 金秀东, E-mail: mdjmujin@163.com

数字出版日期: 2017－5－5 13:05

数字出版网址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170505.1305.012.html

饵载体(pGBKT7)或转录因子的激活结构域酵母双杂交激活载体(pGADT7)结合,这 2 种蛋白质的相互作用带来 AD(activating domain)和 BD(binding domain)结构域共同激活下游的转录基因。本研究从人血液提取 RNA,逆转录为 cDNA,PCR 扩增 TGF-β1 基因和 4 个截短型 TβRII(TβRII-A、TβRII-B、TβRII-C、TβRII-D),将其分别插入到 pGBKT7 和 pGADT7 中,旨在为下一步应用酵母双杂交筛选与 TGF-β1 相互作用的 TβRII 的区域提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　主要试剂　酵母双杂交载体 pGADT7、pGBKT7、大肠杆菌感受态细胞(DH5α)(牡丹江医学院医药研究中心);质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技北京有限公司);TRizol® LS Reagent(上海拜力生物科技有限公司);2 × Es Taq MasterMix(Dye)(北京康为世纪公司);10 × PCR Buffer for KOD-Plus-Neo、2 mM dNTPs、25 mM $MgSO_4$、KOD-Plus-Neo(日本东洋纺公司);Nde I、Bam HI、EcoR I、T4 DNA 连接酶、10 × T4 DNA 连接 Buffer(宝生物工程大连有限公司),Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(罗氏诊断产品上海有限公司);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2　RNA 提取和逆转录　人新鲜血液 RNA 抽提,每 0.25 mL 血液样品中加入 0.75 mL Trizol® LS,混匀;参照 TRizol® LS 试剂说明书进行样品分离、RNA 沉淀、RNA 洗涤和悬浮。用紫外分光光度计测量 RNA 浓度及纯度。RNA 样本用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录:RNA 1 μg、anchored-oligo $[dT]_{18}$ Primer 1 μL、random hexamer primer 2 μL、用水补至 13 μL,混匀,65 ℃、10 min,冰上 2 min,向混合液中加入 5 × transcriptor RT reaction buffer 4 μL, protector RNase inhibitor 0.5 μL, deoxynucleotide mix 2 μL, transcriptor reverse transcriptase 0.5 μL;逆转录条件为:25 ℃、10 min,50 ℃、1 h,85 ℃、5 min,4 ℃、1 h。

1.3　TGF-β1 基因和 4 种受体基因片段扩增　利用引物设计软件设计引物(表 1),以 RT 产物 cDNA 为模板,分别以 F11&R22、F1&R1、F2&R1、F3&R1、F4&R1 为引物,PCR 扩增 TGF-β1 基因和 TβRII-A,TβRII-B,TβRII-C 和 TβRII-D 基因片段。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min,每个循环 95 ℃、30 s,55 ℃、30 s,72 ℃、1 min 30 s/50 s,共 35 个循环,最后 72 ℃总延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳后,按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书做胶回收。

1.4　酵母双杂交载体构建　经限制性内切酶 Nde I 和 EcoR I 酶切 pGBKT7 质粒和 TGF-β1 基因片段,以及限制性内切酶 Bam HI 和 EcoR I 酶切 pGADT7 质粒和 TBRII-A、TBRII-B、TBRII-C、TBRII-D 4 个基因片段,割胶回收,在 T4 DNA 连接酶作用下 16 ℃ 连接过夜,转化至氯化钙法制备的 DH5α 中,涂布到含有卡那霉素/氨苄霉素的平板培养基上,37 ℃ 烘箱过夜培养 12 h,挑取单克隆菌落。

表 1　引物序列

引物名称	核酸序列(5′-3′)	长度(bp)
F11	GGGAATTCCATATGCCGCCCTCCGGGCT-GCGGCTGCT	37
R22	CCGGAATTCGCTGCACTTGCAGGAGCG-CACGATCATGTT	39
F1	CCGGAATTCATGGGTCGGGGGCTGCT	26
F2	CCGGAATTCGTGAGATTTTCCACCTGTGAC	29
F3	CCGGAATTCGCTGTATGGAGAAAGAATGACG	31
F4	CCGGAATTCATGAAGGAAAAAAAAAAGC-CTGGTG	34
R1	CGCGGATCCAGCCACACAGACTTCCT	26

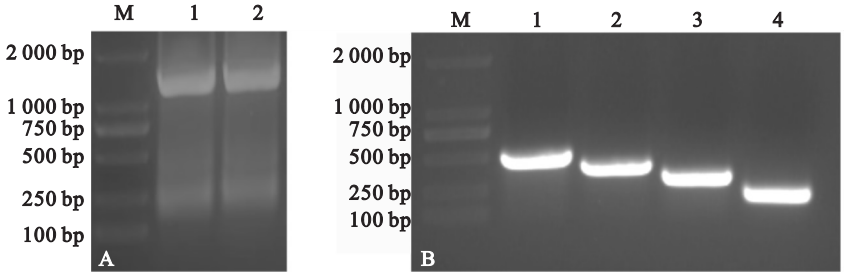
1.5　酵母双杂交载体鉴定　将挑取的单克隆菌落,在含卡那霉素/氨苄霉素 LB(溶菌肉汤)液体培养基培养后,抽提质粒,进行 PCR 和双酶切鉴定,鉴定正确的阳性菌株送上海生工生物工程有限公司测序。新重组的质粒分别命名为:pGBKT7-TGF-β1 和 pGADT7-TβRII-A、pGADT7-TβRII-B、pGADT7-TβRII-C、pGADT7-TβRII-D。

2　结　果

2.1　目的基因 TGF-β1 和受体扩增(图 1)　以逆转录 cDNA 为模板和 F11&R22 为引物,TGF-β1 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,产物条带大小约为 1 200 bp 左右,与预期一致(图 1A)。以逆转录 cDNA 为模板和 F1&R1、F2&R2、F3&R3、F4&R4 为引物,PCR 扩增产物经1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,TβRII-A、TβRII-B、TβRII-C 和 TβRII-D 产物条带大小分别为 453、366、276、165 bp 左右,与预期一致(图 1B)。

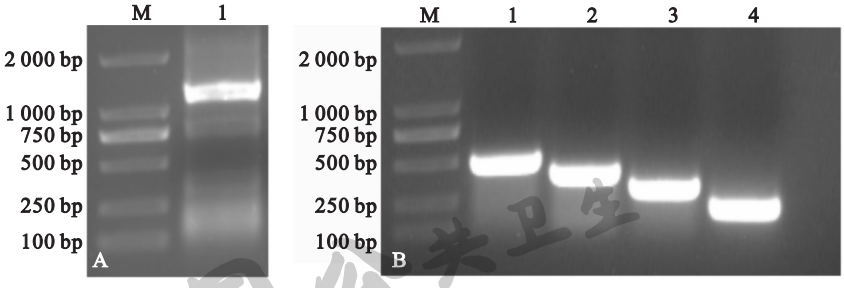
2.2　酵母双杂交载体的 PCR 鉴定(图 2)　将挑取的克隆菌株 DH5α/pGBKT7-TGF-β1 加入到 Luria-Bertani(LB)液体培养基内摇菌过夜,抽提质粒 pGBKT7-TGF-β1 为模板,以 F11&R22 为引物进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 1 200 bp 处有一明亮单一条带,与预期结果相符(图 2A)。试剂盒抽提 DH5α/pGADT7-TβRII-A、B、C、D 菌株质粒,质粒为模板,以 F1&R1、F2&R2、F3&R3、F4&R4 为引物,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,分别在 453、366、276、165 bp 处有一明亮单一条带,与预期结果相符(图 2B)。

中国公共卫生 CPH



注：A1 – 2：TGF-β1；B1 ~ 4：TβRII-A、B、C、D。

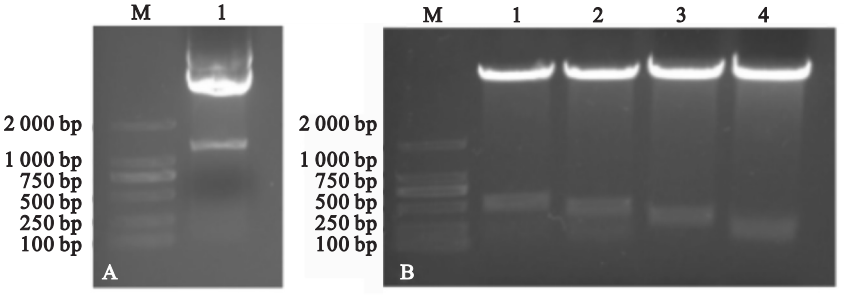
图 1　TGF-β1（A）和 TβRII 受体（B）PCR 扩增产物电泳图



注：A1：TGF-β1 质粒；B1 ~ 4：TβRII-A、B、C、D 质粒。

图 2　TGF-β1 和 TβRII-A、B、C、D 质粒 PCR 扩增产物电泳图

2.3　酵母双杂交载体的双酶切鉴定（图 3）　抽提 DH5α/pGBKT7-TGF-β1 菌株质粒，经限制性内切酶 Nde I 和 EcoR I 双酶切，酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示，pGBKT7 载体 7 300 bp 左右和 TGF-β1 基因片段 1 200 bp，分别与预期酶切条带相符（图 3A）。抽提 DH5α/pGADT7-TβRII-A、B、C、D 菌株质粒，经限制性内切酶 Bam HI 和 EcoR I 双酶切，酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示，pGADT7 载体 8 000 bp 左右和 TβRII-A 基因片段 453 bp、TβRII-B 基因片段 366 bp、TβRII-C 基因片段 276 bp、TβRII-D 基因片段 165 bp 目的条带，分别与预期酶切条带相符（图 3B）。



注：A1：TGF-β1 质粒；B1 ~ 4：TβRII-A、B、C、D 质粒。

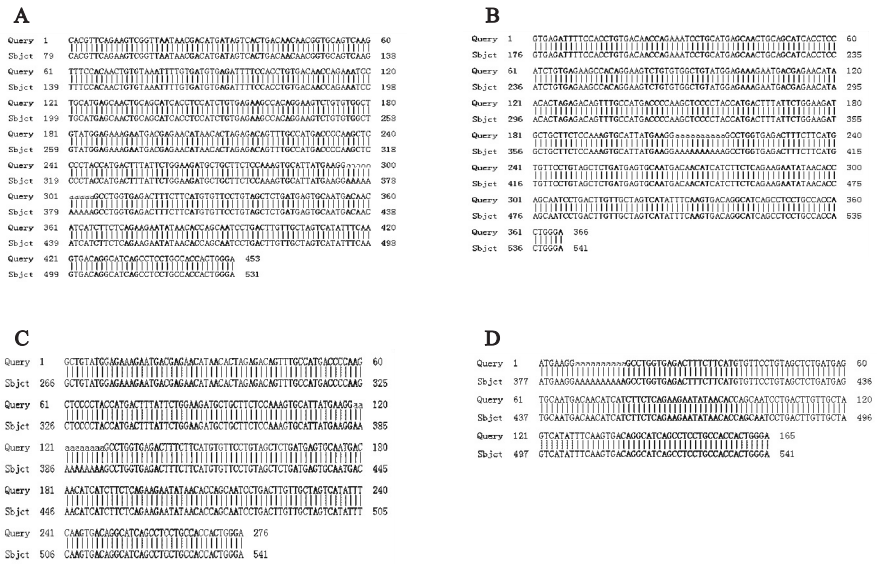
图 3　TGF-β1 和 TβRII-A、B、C、D 质粒酶切鉴定

2.4　酵母双杂交载体的 DNA 测序（图 4）　将试剂盒抽提的 pGADT7-TβRII-A、B、C、D 菌株质粒送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，结果表明插入在 pGADT7 载体上的序列 TβRII-A、TβRII-B、TβRII-C 和 TβRII-D 与 Genebank 公布的序列相一致。

3　讨　论

转化生长因子-β（TGF-β）在纤维化过程中发挥关键作用，被公认为是纤维化形成与发展的启动枢纽，TGF-β1 的过量表达是诱发纤维化疾病的重要因素，而 TGF-β1 和 TβRII 的相互作用在 TGF-β1/Smad 和 TGF-β1/MAPK（mitogen-activated protein kinase）介导的信号通路中发挥着关键作用。因此，如能筛选到与 TGF-β1 相互作用较强的 TβRII，将与野生型 TβRII 竞争结合过量表达的 TGF-β1，弱化野生型 TβRII 与 TGF-β1 的相互作用，可起到抗纤维化作用。本研究拟构建 TGF-β1 和 4 个截短型人转化生长因子 β II 型受体（TβRII-A、B、C、D）基因片段的酵母双杂交表达载体，构建好的 4 个截短型人转化生长因子 β II 型受体（TβRII-A、TβRII-B、TβRII-C 和 TβRII-D）分别对应的氨基酸数为 151、122、92、55 aa。

中国公共卫生 CPH



注：A：TβRII-A 基因；B：TβRII-B 基因；C：TβRII-C 基因；D：TβRII-D 基因。

图 4　运用 NCBI BLAST 软件比对 pGADT7 载体上的 TβRII-A、B、C、D 序列

在人血液中提取 RNA 过程中，置放 6 h 以上的血液所提取的 RNA 很容易降解，而用新鲜血液提取 RNA 降解概率则会减小。同时，RNA 洗涤时，加入 75% 乙醇混匀，4 ℃、14 000 g 离心 5 min，弃掉上清液，干燥空气中放置 5 ~ 10 min，需让乙醇全部挥发，以免影响 RNA 浓度。另外，为防止 RNA 降解，可以在 Trizol® LS 中加入异硫氰酸胍。异硫氰酸胍被认为是最有效的 RNA 酶抑制剂，它在裂解组织的同时也使 RNA 酶失活。它既可破坏细胞结构使核酸从核蛋白中解离出来，又对 RNA 酶有强烈的变性作用。因此，当样品为富含 RNA 酶的组织时，利用它可取得满意的效果[8]。

酵母表达外源基因具有一定的翻译后加工能力，收获的外源蛋白质具有一定程度上的折叠加工和糖基化修饰，性质较原核表达的蛋白质更加稳定，特别适合于表达真核生物基因和制备蛋白质。而目前常用的酵母表达系统之一为巴斯德毕氏酵母，基因可得到高水平的表达[9]。由于 TGF-β1 基因片段为 1 200 bp 左右，目的基因片段相对较大，因此 TGF-β1 与 pGADT7 连接相对困难，解决的方法主要包括：适当增加基因片段和质粒的摩尔比；增加连接的时间；将目的基因与载体进行梯度连接；涂板后过夜观察固体培养基菌落情况，以增加阳性克隆的出现。本研究结果表明成功构建 TGF-β1 和 4 个不同的 TβRII 基因片段的酵母表达载体，可为进一步运用酵母双杂交系统筛选与 TGF-β1 相互作用的 TβRII 的关键区域提供技术支持。

参考文献

[1] Painemal P, Acuña MJ, Riquelme C, et al. Transforming growth factor type beta 1 increases the expression of angiotensin II receptor type 2 by a SMAD-and p38 MAPK-dependent mechanism in skeletal muscle[J]. Biofactors, 2013, 39(4): 467 – 475.

[2] Luo BL, Niu RC, Feng JT, et al. Downregulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor in chronic obstructive lung disease: the role of TGF-β/Smads signaling pathways[J]. Archives of Medical Research, 2008, 39(4): 388 – 396.

[3] Narimatsu M, Labibi B, Wrana JL, et al. Analysis of Hippo and TGFβ signaling in polarizing epithelial cells and mouse embryos[J]. Differentiation, 2016, 91(4 – 5): 109 – 118.

[4] Gu W, Fukuda T, Isaji T, et al. α1, 6-Fucosylation regulates neurite formation via the activin/phospho-Smad2 pathway in PC12 cells: the implicated dual effects of Fut8 for TGF-β/activin-mediated signaling[J]. Faseb Journal, 2013, 27(10): 3947 – 3958.

[5] Ma W, Kilaru S, Collins C, et al. Libraries for two-hybrid screening of yeast and hyphal growth forms in *Zymoseptoria tritici*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 79: 94 – 101.

[6] Gao JX, Jing J, Yu CJ, et al. Construction of a high-quality yeast two-hybrid library and its application in identification of interacting proteins with Brn1 in *Curvularia lunata*[J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(2): 108 – 114.

[7] Stynen B, Tournu H, Tavernier J, et al. Diversity in genetic *in vivo* methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews Mmbr, 2012, 76(2): 331 – 382.

[8] 杨利丽，刘红英，杨和军，等. 一种改进的异硫氰酸胍法结合硅胶膜离心吸附柱提取孕妇外周血微量胎儿 RNA 的方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2012，28(2)：177 – 181.

[9] 吴蒙，刘宇鸽，李改瑞，等. H5N1 禽流感病毒 HA 与 NA 基因克隆及分泌表达[J]. 中国公共卫生，2011，27(1)：37 – 39.

收稿日期： 2016-12-01　（解学魁编校）