

草鱼MyoD 基因原核表达研究^{*}

王立新^{1,2}, 白俊杰¹, 叶 星¹, 罗建仁¹, 陈 宏^{2,3}, 简 清¹, 劳海华¹

(1 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 中国水产科学研究院 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

3 徐州师范大学 细胞和分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116)

[摘 要] 采用PCR 方法对草鱼MyoD 基因开放阅读框进行了改造扩增, 构建了草鱼MyoD 基因的原核表达载体pBV 220-M yoD, 并进行了初步的原核表达研究。结果表明, 构建的原核表达载体pBV 220-M yoD 含有草鱼MyoD 基因完整的开放阅读框; 该原核表达载体表达产物的相对分子质量为34 ku, 其表达产物占全菌蛋白的10.8%, 表达量较低。

[关键词] 草鱼; MyoD 基因; 原核表达

[中图分类号] S965.112; Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)10-0006-05

成肌分化抗原(myogenic differentiation antigen, MyoD)是生肌调节因子MRFs家族的主要成员之一,是脊椎动物胚胎期肌肉发育的主导调控基因,对骨骼肌的形成和分化起主要作用,MyoD缺失可导致成肌细胞的增殖和分化无法进行^[1-2]。因此,该基因自1987年Devis^[3]首次发现以来,即引起了诸多学者的广泛兴趣,先后对高等脊椎动物特别是人和小鼠MyoD基因的结构^[4-5]、功能^[6]、调控途径^[7-8]及医学诊断^[9]和分子标记^[10-11]进行了深入研究。有关鱼类MyoD基因的研究也有一些报道,A tsushi等^[12]研究了鲤鱼MyoD基因在发育过程中的表达规律;Genevieve等^[13]研究了胚胎发育温度对鲱鱼肌肉分化过程中调控基因表达的影响;Thomas等^[14]研究了大西洋鲑鱼在胚胎发育过程中MyoD等基因的表达;王立新等^[15]报道了草鱼MyoD基因的全序列。然而作为一个有潜在应用价值的功能基因,MyoD基因的体外表达及其表达产物对肌肉发育调控的研究还未见报道,为此本研究以我国特有的主要池塘养殖品种草鱼为研究对象,对草鱼MyoD基因进行了原核表达研究,以期为该基因在水产动物中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌DH5 α 和pBV 220质粒均由中国水产

科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室保存;限制性内切酶EcoRI, BamHI为华美公司产品;T4DNA连接酶为Promega公司产品;DNA Marker、蛋白质Marker为上海Sangon生物工程公司产品;Taq酶、DNA纯化试剂盒为大连宝生物工程公司(TaKaRa)产品;PCR仪为TaKaRa产品;紫外凝胶成像仪和凝胶薄层扫描仪为Alpha公司产品。

1.2 PCR扩增引物设计

本研究根据已经扩增获得的草鱼MyoD基因全长cDNA序列设计了P1, P2, P3 3条用于原核表达的PCR引物,其中P1用于改造开放阅读框上游约43 bp处的EcoRI酶切位点,序列为:5'-ctt ccc cat ctc atc agc tga tga a tt cta cg-3'(a处的原碱基为a);P2, P3均含EcoRI酶切位点,用于MyoD基因开放阅读框两端的改造,以便于下一步原核表达载体的构建,P2序列为:5'-cgg aat tca tgg agt tgt cgg ata ttc cct tcc cca tc-3';含起始密码子atg;P3序列为:5'-gcg aat tct taa aga act tga tag atg g-3';含大肠杆菌的强终止密码子taa。

1.3 草鱼MyoD基因开放阅读框的PCR改造

先以3'RACE和5'RACE产物为模板,以P1, P3为引物,用高保真DNA聚合酶对EcoRI酶切位点进行PCR改造,反应体系为:ddH₂O 39 μ L, 10 $\times$

* [收稿日期] 2005-12-23

[基金项目] 中国水产科学研究院重点基金项目(99-08-02)

[作者简介] 王立新(1968-),男,陕西南郑人,讲师,博士,主要从事水生动物细胞与分子生物学研究。E-mail: Fisherwanglx@yahoo.com.cn

[通讯作者] 白俊杰(1957-),男,福建福州市人,研究员,主要从事水产生物技术和遗传育种研究。E-mail: jibai@163.net

Pfu PCR Buffer 5 μL , dNTP (10 mmol/L) 2 μL , P1 1 μL , P3 1 μL , 3 'RACE 和 5 'RACE 产物各 0.5 μL , Pfu Taq 1 μL , 总体积 50 μL 。PCR 扩增反应条件为: 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 56 复性 30 s, 72 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72 延伸 7 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。然后再以此 PCR 产物为模板, P2, P3 为引物进行成熟肽改造 PCR 扩增, 反应体系为: ddH₂O 39.5 μL , 10 $\times$ Pfu PCR Buffer 5 μL , dNTP (10 mmol/L) 2 μL , P2 1 μL , P3 1 μL , 第 1 次 PCR 产物 0.5 μL , Pfu Taq 1 μL , 总体积 50 μL 。PCR 扩增反应条件为: 94 预变性 3 min, 94 变性 30 s, 49 复性 30 s, 72 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72 延伸 7 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。目的条带用 TaKaRa 凝胶回收试剂盒进行回收纯化。

1.4 原核表达载体 pBV 220-MyoD 的构建

将原核表达载体 pBV 220 和草鱼 MyoD 成熟肽改造的 PCR 产物用 *EcoR* I 酶切并纯化, 酶切后的 pBV 220 经小牛胸腺肽去磷酸化后, 与纯化后的草鱼 MyoD 用 T₄DNA 连接酶在 4 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 在含氨苄的 LB 固体培养基上挑选阳性转化子, 进行 *EcoR* I 酶切鉴定, 并利用草鱼 MyoD 基因开放阅读框末端 20 bp 处的 *Bam* H I 酶切位点进行片段插入方向的鉴定, 最后挑选其中 1 个阳性转化子 (pBV 220-MyoD 16) 送大连宝生物工程公

司测序。

1.5 诱导表达

将含有 pBV 220-MyoD 16 载体的单菌落接种于 3 mL 含氨苄的 LB 液体培养基中, 同时接种 1 个空的 pBV 220 单菌落作对照, 37 振荡培养过夜, 第 2 天按 1:50 转接于 50 mL 含氨苄的液体 LB 培养基中, 扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时立即放入 42 水浴摇床进行热诱导表达, 诱导过程中每隔 1 h 在超净工作台上取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中, 4 保存备用, 直至 4 h。诱导结束后, 分别将各次取得的菌液 10 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 沉淀用 500 μL 蒸馏水洗 1 次, 重悬于 100 μL 蒸馏水中, 加入 100 μL 2 $\times$ SDS 上样缓冲液后, 于沸水中煮 5~10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。电泳凝胶经考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色后用凝胶薄层扫描仪扫描并计算表达蛋白占全菌蛋白的百分比。

2 结果与分析

2.1 草鱼 MyoD 基因原核表达载体的鉴定

通过 2 次 PCR 改造获得了编码草鱼 MyoD 成熟肽的 DNA 片段 (图 1), 该片段回收纯化后经 *EcoR* I 酶切与原核表达载体 pBV 220 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 后获得了多个阳性转化子。挑选其中 12, 14, 16, 22 号转化子用 *EcoR* I 酶切鉴定插入片段大小, 结果 4 个转化子均酶切出大小约 800 bp 的目的片段 (图 2)。

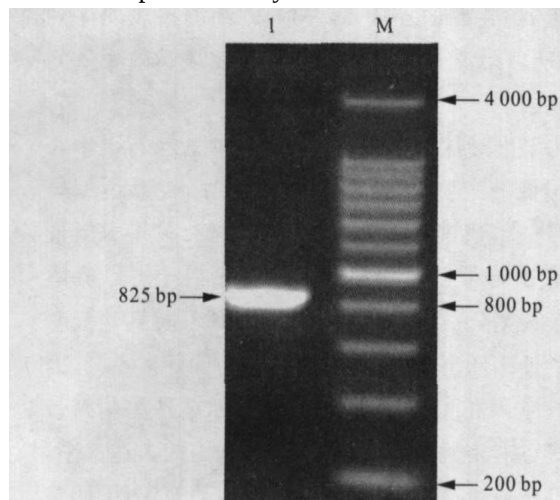


图 1 草鱼 MyoD 改造的 PCR 产物的电泳

1. 改造 PCR 扩增产物; M. 200 bp DNA Marker

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1. Products of PCR reconstructed; M. 200 bp Marker

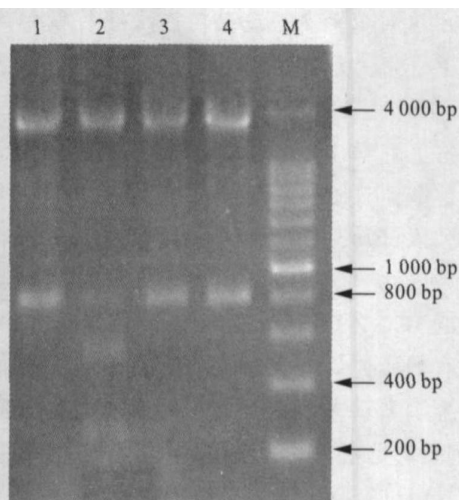


图 2 pBV220-MyoD 表达载体的 *EcoR* I 酶切鉴定

1~4. 12, 14, 16, 22 号转化子的 *EcoR* I 酶切电泳; M. DNA Marker

Fig. 2 *EcoR* I digestion of recombinant plasmids

1-4. Transformants 12, 14, 16, 22 digested by *EcoR* I respectively; 5. DNA Marker

进一步的 *Bam*H I 酶切插入方向鉴定结果表明, 14, 16 号转化子插入的目的片段方向正确(图3)。将其中的16 号转化子送大连宝生物有限公司测序, 结果和已获得的草鱼 *MyoD* 基因开放阅读框序列一致(除1 个改造的 *Eco*R I 外), 未发现移码突变, 说明本次构建的草鱼 *MyoD* 基因原核表达载体完全正确, 可以用于诱导表达研究。

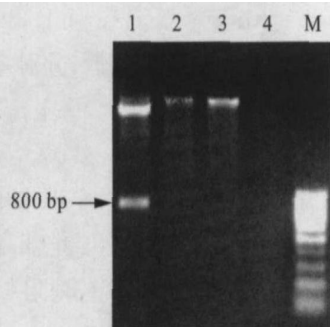


图3 pBV220-MyoD 表达载体的 *Bam*H I 酶切鉴定
1~4. 12, 14, 16, 22 号转化子的 *Bam*H I 酶切电泳; M. DNA Marker
Fig. 3 *Bam*H I digestion of recombinated plasmids
1-4. Transformants 12, 14, 16, 22 digested by
*Bam*H I respectively; M. 100 bp DNA Marker

2.2 草鱼 *MyoD* 基因原核表达载体的诱导表达

由图4 可知, 16 号转化子经 42 °C 热诱导后, 在约 34 ku 处有 1 条和目的蛋白大小相符且随诱导时间延长表达量显著增加的特异带, 凝胶薄层扫描仪扫描结果显示, 诱导 4 h 的表达量仅占全菌蛋白的 10.8%, 表达量较低。

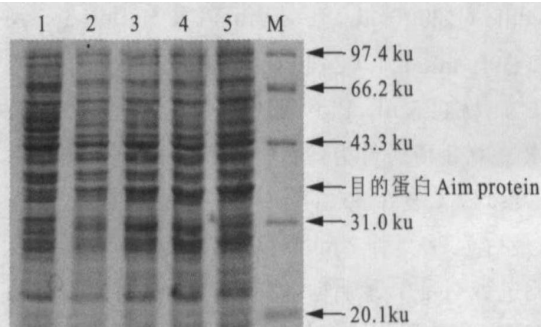


图4 pBV220-MyoD16 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳
1. 空 pBV220 热诱导 4 h; 2~5. 重组 pBV220-MyoD
热诱导 1~4 h; M. 蛋白 Marker
Fig. 4 SDS-PAGE of pBV220-MyoD16 induced 1-4 h
1. pBV220 induced 4 h; 2-5. pBV220-MyoD16
induced 1-4 h; M. Protein Marker

3 讨论

目前, 有关 *MyoD* 基因的体外表达研究极少有成功的报道^[16-17]。为此, 本研究选用目前较为常用的、由我国科研工作者构建的高效原核表达载体 pBV 220^[18], 对草鱼 *MyoD* 基因在大肠杆菌中的表达进行了研究。为了防止插入位点对外源基因表达的影响, 本研究采用 PCR 方法突变了该基因位于开放阅读框上游 43 bp 处的 *Eco*R I 酶切位点, 从而在构建表达载体时使外源基因插入到最常使用的第 1 个克隆位点 (*Eco*R I 酶切位点), 经诱导该基因在大肠杆菌 DH5 α 中获得了表达, 表达量约占 DH5 α 全菌蛋白的 10.8%, 表达量较低。

已有的研究认为, 造成外源基因表达量偏低的主要因素有外源基因的二级结构 (GC 含量过高)、SD 序列至起始密码子的碱基数 (即距离 D)、碱基组成^[19-21]、mRNA 的局部二级结构以及 mRNA 的丰度和宿主菌对密码子的偏好性^[22-25]。经分析, 草鱼 *MyoD* 基因 mRNA 前端 GC 含量不足 50%, 不会形成较多的二级结构影响外源基因的表达^[20]。至于蛋白质结构二级结构对翻译速度的影响, Thanaraj 等^[26]和李晓琴等^[27]的研究都认为, α 螺旋和高频密

码子相对应, 即 α 螺旋结构有利于翻译速度的提高。而草鱼 *MyoD* 基因编码的蛋白具有 HLH α 螺旋环螺旋结构, 因此其蛋白质二级结构不会影响该基因的翻译速度。同时本研究为了避免距离 D 对表达水平的影响, 特异选择 *Eco*R I 作为插入外源基因的克隆位点, 构建好的 pBV 220-MyoD 经测序表明序列正确, 所以距离 D 的长度也不应该是表达效率低的主要原因。

为了继续探讨草鱼 *MyoD* 基因在大肠杆菌中表达量偏低的主要原因, 后又对草鱼 *MyoD* 基因编码的氨基酸组成进行了分析, 发现其含有较多大肠杆菌稀有密码子特别是精氨酸稀有密码子。已有研究^[22-23]表明, 真核生物和原核生物对不同氨基酸密码子的使用频率不同, 即对密码子的偏好性不同, 因此真核基因在大肠杆菌中表达时, 如果外源基因带有较多稀有密码子, 则会影响真核基因的表达水平, 甚至会造成蛋白质翻译的障碍。在本研究中, 编码草鱼 *MyoD* 蛋白的 20 个精氨酸有 18 个是大肠杆菌的稀有密码子, 其中 AGG 7 个 (密码子频率 3.47%)、AGA 7 个 (密码子频率 5.72%)、CGA 2 个 (密码子频率 6.67%)、CGG 2 个 (密码子频率 11.08%), 精氨酸稀有密码子高达 90%。Soheila 等^[17]在鼠上的研

究发现, 大肠杆菌精氨酸稀有密码子对基因的表达有影响, 将MyoG 基因中的AGG 突变为CGU 后, MyoG 基因在大肠杆菌中获得了高表达。提示大肠杆菌对密码子的偏性可能是造成草鱼MyoD 基因在

大肠杆菌中表达量较低的主要因素。因此, 草鱼MyoD 基因的高效表达应选用真核表达载体或进行稀有密码子改造。

[参考文献]

- [1] Sabourin L A, Rudnicki M A. The molecular regulation of myogenesis[J]. Clin genet, 2000, 57(1): 16-25
- [2] Alves H J, Alvares L E, Gabriel J E, et al. Influence of the neural tube/notochord complex on MyoD expression and cellular proliferation in chicken embryos[J]. Braz J Med Biol Res, 2003, 36(2): 191-197.
- [3] Davis R L, Weintraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts[J]. Cell, 1987, 51(6): 987-1000
- [4] Murre C, McCaw P S, Baltimore D A. New DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins[J]. Cell, 1989, 56 (5): 777-784
- [5] Ma P C, Rould M A, Weintraub H, et al. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation[J]. Cell, 1994, 77(3): 451-459
- [6] Yablonska R Z, Rudnicki M A, Rivera A J, et al. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD[J]. Dev Biol, 1999, 210(2): 440-452
- [7] Sartorelli V, Puri P L, Hamamori Y, et al. Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program[J]. Molec Cell, 1999, 4(5): 725-734
- [8] Guttridge D C, Mayo M W, Madrid L V, et al. NF-kappa-B-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia[J]. Science, 2000, 289(5488): 2363-2366
- [9] 沈燕国, 徐建光, 顾玉东, 等. 成肌调节因子MyoD 和Myf-5 在人体失神经骨骼肌中的表达及其临床意义[J]. 复旦学报: 医学版, 2002, 7(4): 264-267.
- [10] Ernst C W, Vaske D A, Larson G R, et al. Msp I restriction fragment length polymorphism at the swine myogenin locus[J]. Journal of Animal Science, 1993, 71(12): 3479
- [11] Ann Soumillion, Johf Erkens, Johannes A, et al. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus[J]. Mammalian Genome, 1997, 8(8): 564-568
- [12] Atsushi Kobiyama, Yoshiaki N ihei, Yasushi Hirayama, et al. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp[J]. The Journal of Experimental Biology, 1998, 201(20): 2801-2813
- [13] Genevieve K, Temple, Nicholas J. et al. Embryonic temperature and the relative timing of muscle specific genes during development in herring (*Clupea harengus* L.) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2001, 204(12): 3629-3637.
- [14] Thomas E H, Nicholas J C, Jon A J. Temperature and the expression of seven muscle-specific protein genes during embryogenesis in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2003, 206(18): 3187-3200
- [15] 王立新, 白俊杰, 叶 星, 等. 草鱼MyoD 基因cDNA 克隆和序列分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 2134-2138
- [16] Chen Yau-Hung, Liang Chin-Tien, Tsai Huai-Jen. Expression, purification and DNA-binding activity of tilapia muscle-specific transcription factor, MyoD, produced in *Escherichia coli* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2002, 131(4): 794-805
- [17] Soheila J, Maleki, Barry K, et al. High-level expression and rapid purification of MyoD, myogenin, and E12[J]. Protein Expression and Purification, 1997, 9(1): 91-99
- [18] 李伍举, 吴加金. pBV 220 载体中外源基因表达水平定量分析[J]. 病毒学报, 1997, 13(2): 126-133
- [19] 张智清, 张 颖, 路秀华, 等. 人粒细胞- 巨噬细胞集落刺激因子cDNA 5'端的修饰提高其在大肠杆菌中的表达[J]. 病毒学报, 1993, 9(2): 136-143
- [20] 阎锡蕴, 汤 健, 吴小平, 等. 血管内皮生长因子人单链抗体基因克隆、高效表达、亲和力成熟及生物活性鉴定[J]. 中国科学, 2000, 30(4): 394-400
- [21] Varenne S, Buc J, Loubes R, et al. Translation is non-uniform process: effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chain[J]. J Mol Biol, 1984, 180(3): 549-576
- [22] Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and selective codon usage in efficiently expressed genes[J]. Gene, 1982, 18(3): 199-209
- [23] Varenne S, Baty D, Verheij H, et al. The maximum rate of gene expression is dependent on the downstream context of unfavourable codon[J]. Biochimie, 1989, 71(11): 1221-1229
- [24] Yarus M, Folley L S. Sense codons are found in specific contexts[J]. J Mol Biol, 1985, 182(4): 529-540
- [25] Guisez Y, Robbens J, Renaut E, et al. Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting

from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis[J]. *J Theor Biol*, 1993, 162(2): 243-252

[26] Thanaraj T A, Argos P. Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA [J]. *Protein Science*, 1996, 5(10): 1973-1983

[27] 李晓琴, 罗辽复, 刘次全. 同义密码子的反常蛋白质二级结构偏好性[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(4): 441-444

Expression of grass carp *MyoD* in *Escherichia coli*

WANG Li-xin^{1,2}, BAI Jun-jie¹, YE Xin¹, LUO Jian-ren¹, CHEN Hong^{2,3}, JIAN Qing¹, LAO Hai-hua¹

(1 Pearl River Fisheries Research Institute, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China;

2 Fishery science department of Animal Science and Technology College, Northwest A & F University,

Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Xuzhou Normal University, Institute of Bio-Cellular and Molecular, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: PCR was used to reconstruct the open reading frame of grass carp *MyoD*, and the expression vector pBV 220-*MyoD* was constructed to research the expression of *MyoD* in *E. coli* on this basis. The results showed that: The pBV 220-*MyoD* was constructed successfully, and there was a proper band at the 34 ku, after the expression vector was induced at 42 °C, but the level of expression was not so high, only 10.8% of the total proteins of *Escherichia coli*.

Key words: grass carp; *MyoD* gene; expression in *E. coli*

(上接第5页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)10-0001-CA

Effects of CLA on layer immunity function under heat stress models

II. change of cell factor, hormone level, anti-oxidized ability

GAO Yun-ying¹, LI Hao-bo¹, JIANG Yan-fen¹, LEI Jin-min²,

PAN Ya-feng³, HUANG Jian-wen¹, MA Qiu-ming¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Luochuan County Veterinarian Sanitary Supervision Examination Center, Luochuan, Shaanxi 727400, China;

3 Yintai Area Animal Husbandry and Veterinary Station, Tongchuan, Shaanxi 727000, China)

Abstract: 120 25-week old Hailan (brown) layers were divided into two groups according to factorial design, the birds were put into two artificial climate rooms and caged with two steps and ladders type respectively, and the hot stress model was established for 22 °C for 5 d → 30 °C (pre-test) for 5 d → 32 °C for 5 d → 35 °C for 5 d → 22 °C for 5 d (recovery). Experiment group were fed with basal diet added with 2 g/kg conjugate linoleic acid (CLA), and control group were fed with basis dietary. The test lasted for 25 d to study the effect of hot stress on cell factor, hormone level, anti-oxidized ability of the laying hen. The result indicated that, at 30 °C 119 h, 32 °C 119 h, 35 °C 119 h, 22 °C 119 h (restores), the hot stress suppressed the blood serum obviously $L\text{-}\beta$ -L-6, TNF- α , the cortisol, prostaglandin E_2 and the MDA secretion ($P < 0.01$), promoted blood serum thyroxine T_3 , the T_4 secretion and strengthened anti-oxidized ability ($P < 0.01$), thus slowed down the decline of the layer immunity level resulted from the high temperature environment, and reduced the negative effects.

Key words: conjugate linoleic acid; layer; heat stress; cell factor; hormone level; anti-oxidized ability