

猪肌生成抑制素基因成熟蛋白编码 序列的表达与纯化^{*}

张 锐¹, 孙美榕², 张红莲¹, 杨 捷¹, 黄 燕¹, 陈绍红¹, 杜 慧¹, 欧阳红生³

(1 湛江海洋大学 现代生化中心, 广东 湛江 524088; 2 深圳科安信公司, 广东 深圳 518057;

3 中国人民解放军 军需大学 生物化学与分子生物学教研室, 吉林 长春 130062)

[摘 要] 猪肌生成抑制素基因myostatin (MSTN)的cDNA在去除信号肽后,对成熟蛋白编码序列PCR扩增出1.2 kb片段,将该片段与pMD18-T载体连接,转化JM109受体菌细胞,筛选阳性克隆,并测序分析,结果表明其与设计序列完全一致。将该克隆载体的质粒DNA用带有BamH I和Sal I内切酶识别序列的另1对引物进行PCR扩增,将回收的1.2 kb PCR目的片段定向克隆到pET28a(+)表达载体上,成功地构建了猪肌生成抑制素成熟蛋白编码的原核表达载体。对成功构建的表达载体阳性克隆在LB液体培养基中用异丙基硫代- β D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达,SDS-PAGE凝胶电泳显示,重组菌表达的MSTN蛋白是以包涵体的形式表达的;SDS-PAGE凝胶经薄层扫描仪扫描分析,表达的MSTN包涵体蛋白占菌体不溶性蛋白含量的27.9%,表达的MSTN分子质量为41.4513 ku。因为所构建的表达载体中含六聚组氨酸标签,用His-trap亲和柱进行纯化后,纯度可达92.5%。

[关键词] 猪肌生成抑制素基因;成熟蛋白编码序列;表达;纯化

[中图分类号] Q786; S828.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0053-04

肌生成抑制素是控制骨骼肌生长的一种负调控因子^[1~3],由McPherron等^[4]在研究转化生长因子- β (TGF- β)超家族时,用该家族的蛋白质同源保守序列设计简并性引物,以小鼠基因组DNA为模板进行PCR扩增而得到的一种新的生长因子,被命名为生长分化因子8(GDF-8)^[5]。用基因打靶敲除GDF-8基因制备了基因缺失小鼠,其骨骼肌重量是普通小鼠的2~3倍以上^[6],而脂肪未随之增加^[7~9]。GDF-8基因突变的牛为双肌牛^[10~13]。因此,根据GDF-8功能将其定名为肌生成抑制素(Myostatin, MSTN)^[14]。肌生成抑制素研究的突破将对猪肉、肉牛等畜禽的瘦肉率和肉质等生产性能的提高具有重要意义^[15,16]。

1 材料与方法

1.1 材 料

猪肌生成抑制素cDNA基因成熟蛋白编码序列的表达载体,由中国人民解放军军需大学生物化学与分子生物学教研室构建。

pET28a(+)为含T7噬菌体 Φ 10基因启动子

(T7启动子)的原核高效表达载体,是带有含6个组氨酸的蛋白纯化标签及信号肽的表达载体,购自Novagen公司;E. coli BL21(DE3),基因型为 $hsdSgal(\lambda cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)$,由中国人民解放军军需大学生物化学与分子生物学教研室保存;蛋白纯化试剂盒、His-trap亲和柱纯化试剂盒、TALONTM Metal Affinity Resin购自Clontech公司,用于带有多聚组氨酸标签蛋白的纯化;其他生化试剂:咪唑、Evans Blue、BSA、MES、甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等购自Sigma公司;常用生化试剂:异丙基硫代- β D-半乳糖苷(IPTG)、胰蛋白酶、酵母提取物、EDTA、Na₂Tris、丙三醇、SDS、 β 巯基乙醇、考马斯亮蓝R-250等均为TaKaRa公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 猪肌生成抑制素成熟蛋白编码序列的扩增
依据猪肌生成抑制素基因的cDNA设计引物^[4](OYHS029, OYHS005),PCR扩增MSTN目的DNA片段,PCR条件为:94 45 s,55 45 s,72 90 s,30个循环,72 延伸10 min。对PCR产物

^{*} [收稿日期] 2003-07-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30070563);军队医药卫生青年基金项目(98Q079)

[作者简介] 张 锐(1968-),女,新疆阿克苏人,讲师,硕士,主要从事生物化学与分子生物学研究。

进行1%的琼脂糖电泳。回收目的片段。

1.2.2 猪肌生成抑制素成熟蛋白编码序列的克隆及筛选 用TaKaRa公司的pMD18-T载体试剂盒,将回收的MSTN-cDNA PCR目的片段与pMD18-T载体连接,在含有X-Gal底物和IPTG诱导物及氨苄青霉素(Amp^r)的固体LB平板上,将连接产物转化到JM109受体菌感受态细胞中,筛选阳性质粒,PCR扩增、双酶切初步鉴定后,用ALF快速自动测序仪测序,测序结果用DNASIS软件分析。

1.2.3 表达载体的构建 从获得的含目的片段的克隆载体细菌中提取质粒,用带有BamH I和Sal I内切酶识别序列的引物(OYHS051, OYHS052)进行PCR扩增,将回收的1.2 kb PCR目的片段克隆到pMD18-T载体上,所得重组质粒用BamH I和Sal I双酶切,回收到的酶切产物与用同样限制性内切酶酶解的pET28a(+)质粒定向连接。连接产物依次转化到JM109和溶原性的BL21(DE3)感受态细胞中,对筛选出的阳性克隆用上述转化子鉴定法初步鉴定后,再用ALF快速自动测序仪测序。

1.2.4 大肠杆菌重组蛋白的诱导表达、分析与纯化 划线法分离工程菌,挑取单个菌落活化培养;按1%扩大培养,37℃振荡培养约4~5 h (OD₆₀₀为0.6~0.8),加入1 mol/L IPTG,使终浓度为0.5

mmol/L,继续培养4~6 h。4 6000 g离心20 min,收集菌体;200 mL TE洗涤菌体,菌体在-20℃放置过夜;菌体溶于30 mL TE (Tris和EDTA, Na₂配制的缓冲溶液),冰浴超声波破碎(超声5 s,间歇9 s,总共超声15~30 min);室温15 000 g离心30 min,沉淀即为粗提包涵体,TE洗涤包涵体,分别取上清组分和沉淀组分溶解于上样缓冲液中煮沸10 min后,进行SDS-PAGE电泳。

按照Clontech公司的TALON™金属亲和树脂纯化法对表达蛋白纯化、洗脱,收集蛋白。以上各步均留样做SDS-PAGE电泳分析、拍照和扫描。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增

对猪肌生成抑制素成熟蛋白编码序列的cDNA去除前52个碱基,即去除信号肽进行PCR扩增,对其产物用1%琼脂糖进行电泳,在1.2 kb处出现明亮的特异带(图1),表明得到了特异的条带。

2.2 克隆及筛选

2.2.1 鉴定阳性克隆质粒 回收扩增片段,与克隆载体pMD18-T连接,转化JM109受体菌,对阳性克隆提取质粒,结果出现明显的3条带(图2),表明已成功地将目的基因连接到pMD18-T载体上。

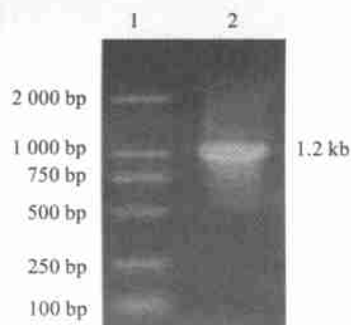


图1 PCR扩增产物

1. Marker DL 2000; 2. 1.2 kb 目的条带

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1. Marker DL 2000; 2. 1.2 kb PCR product

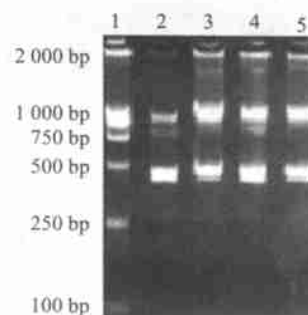


图2 阳性克隆质粒提取图谱

1. Marker DL 2000; 2~5. 质粒

Fig. 2 Plasmid of positive clone

1. Marker DL 2000; 2~5. Plasmid of positive clone

2.2.2 酶切选择正向克隆 对阳性菌质粒用Hind III酶解,电泳结果显示3号菌出现约405 bp的片段,说明3号菌的目的DNA与pMD18-T载体之间为正向连接,而其余菌均出现683 bp的片段,说明其余菌目的DNA与pMD18-T载体之间均为反向连接(图3)。

2.3 表达载体的构建

2.3.1 重组菌的酶切鉴定 对构建的表达载体重

组质粒MSTN-pET28a(+)-BL21,用BamH I和Sal I双酶切得到了1.2 kb的目的片段(图4),表明得到了目的蛋白。

2.3.2 重组菌的测序鉴定 对构建的表达载体重组质粒MSTN-pET28a(+)-BL21经TakaRa测序分析,结果表明目的片段定向插入且阅读框架正确,说明成功构建了肌生成抑制素的原核表达载体。

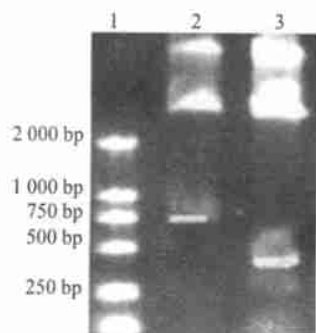


图3 克隆载体 MSTN-pMD18-T-JM109 酶切

1. Marker DL 2000; 2, 3. 阳性质粒酶切产物

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of MSTN-pMD18-T-JM109

1. Marker DL 2000; 2, 3. Restriction enzyme digestion of MSTN-pMD18-T-JM109

2.4 大肠杆菌重组蛋白的诱导表达、分析与纯化

对表达载体阳性克隆 MSTN-pET28a(+)-BL21 用 IPTG 诱导表达, 对包涵体超声破碎, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 可见到分子质量为 41.451.3 ku 的蛋白带(图5)。

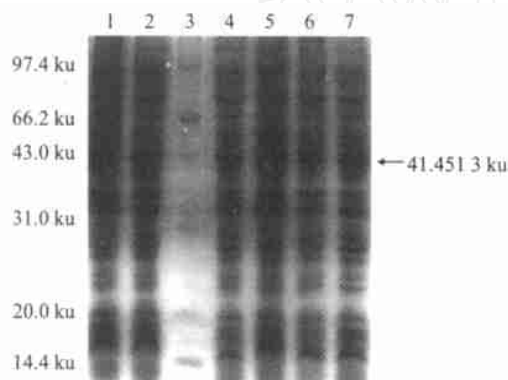


图5 MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3) 表达的 SDS-PAGE 分析

1. BL21(DE3) 空白菌; 2. 未诱导的 MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3); 3. 蛋白分子质量标准 marker; 4~7. 诱导后 MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3) 工程菌

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression product

1. BL21(DE3); 2. Control experiment of MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3); 3. Low molecular protein marker; 4~7. Expression product

SDS-PAGE 凝胶经薄层扫描仪扫描分析, 表达

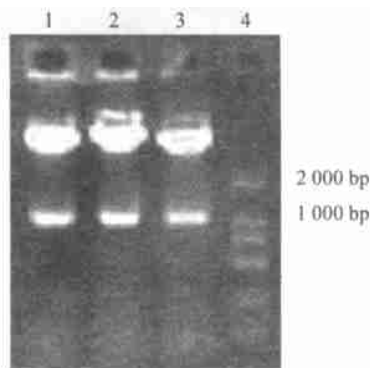


图4 表达载体 MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3)酶切

1~3. 表达载体酶切产物; 4. Marker DL 2000

Fig. 4 Restriction enzyme analysis of MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3)

1~3. Restriction enzyme digestion MSTN-pET28a(+)-BL21(DE3); 4. Marker DL 2000

的 MSTN 包涵体蛋白占菌体不溶性蛋白含量的 27.9%。因为所构建的表达载体中含六聚组氨酸标签, 用 His-trap 亲和柱进行纯化后, 纯度可达 92.5%。

3 讨论

由于在原核表达载体系统中缺乏翻译后加工过程, 真核生物的信号肽难以切除^[17], 因此, 本试验重新合成了引物^[18], 去除了 MSTN-cDNA 的信号肽, 从而成功地构建了肌生成抑制素成熟蛋白编码序列的原核表达载体。

pET28a(+) 为含 T7 噬菌体 $\Phi 10$ 基因启动子 (T7 启动子) 的原核高效表达载体, 应该可以调动细胞内几乎所有的能源来参与外源基因的表达, 诱导后外源蛋白的产量最高可达菌体总蛋白的 50% 以上。但是影响基因表达的因素很多, 如转录的 mRNA 的二级结构会干扰 AUG 翻译起始密码子或核糖体结合位点, 从而影响翻译效率; 目的基因中过量的稀有密码子也是低水平表达的一个潜在原因; 克隆 DNA 的突变也会产生意外终止密码子等。因此, 有待于进一步研究以提高该基因的表达效率。pET28a(+) 带有含 6 个组氨酸的蛋白纯化标签及信号肽, 有利于表达蛋白的纯化及表达产物生物活性的保持。

[参考文献]

- [1] Thomas M, Langley B, Berry C, et al Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(51): 40235- 40243
- [2] Miller J B, Ransey C B, Claborn S W, et al Cellular and molecular diversity in skeletal muscle development: new s from *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bio Essays*, 2000, 15(3): 191- 195
- [3] Kirk S, Oldham J, Kambadur R, et al Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration[J]. *Cell Physiol*, 2000, 184(3): 356- 363
- [4] McPherron A C, Lawler A M, Se-Jin Lee Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member[J].

- Nature, 1997, 387(6628): 83- 90
- [5] Sakuma K, Watanabe K, Sano M, et al Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1497(1): 77- 88
- [6] Hamrick A C, McPherron C O, Lovejoy C O, et al Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice[J]. Bone, 2002, 71(1): 63- 68
- [7] Yamanouchi K, Soeta C. Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 510- 516
- [8] Ludolph D C. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program[J]. The FASEB Journal, 1995, 9: 1595- 1604
- [9] Olson E N. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage[J]. Dev Biol, 1992, 154: 261- 272
- [10] Karin L, Coppeters W. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay[J]. Anim Genet, 2000, 31(6): 396- 399
- [11] Sassoon D A. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis[J]. Dev Biol, 1993, 156: 11- 23
- [12] Hughes S M. Running without regulators[J]. Nature, 1992, 360: 536- 537
- [13] Smith J A, Lewis A M. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon[J]. Anim Genet, 2000, 31(5): 306- 309
- [14] Casas E, Stone R T, Keele J W, et al A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene[J]. Anim Sci, 2001, 79(4): 854- 860
- [15] Dickman S. Gene mutation provides more meat on the hoof[J]. Science, 1997, 277(5334): 1922- 1923
- [16] Georges M. Reproduction nutrition development[J]. Biol Chem, 1996, 36(6): 651- 657
- [17] 张玉静, 欧阳红生, 阮承迈, 等. 分子遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [18] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 1998 8-55

Expression and purification of mature protein coding sequence of porcine myostatin gene in prokaryotic expression vector

ZHANG Rui¹, SUN Mei-rong², ZHANG Hong-lan¹, YANG Jie¹,
HUANG Yan¹, CHEN Shao-hong¹, DU Hui¹, OUYANG Hong-sheng³

(1 The Centre of Modern Biochemistry, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China;

2 Shenzhen K & C Industrial Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong 518000, China;

3 Faculty of Biochemistry and Biotechnology, Quartermaster University of PLA, Changchun, Jilin 130062, China)

Abstract Myostatin is a negative regulator of skeletal muscle growth. The skeletal muscle of mutant animals with null or low activity of myostatin would show significantly larger diameter or more quantity of fiber, which was termed double muscling. In order to investigate the relationship between myostatin and high lean meat rate and plump-hipped trait, the expression vectors of mature protein coding sequence (MPCS) of porcine myostatin (MSTN) were constructed. Then the recombinant MPCS-MSTN-pET28a(+)-BL21 plasmid was cultured with Luria-Broth (LB) medium and induced with IPTG and detected by SDS-PAGE. The mature protein coding sequence of porcine myostatin gene was expressed in the form of inclusion bodies (IB). Expression amount accounted 27.9% of the total protein of the transformed host cell by analysis of thin-layer scanner. Comparison with different inducing time showed that the expression amount of recombinant MSTN protein was the highest after being induced for 3-4 hours. The expression protein of porcine myostatin (MSTN) was purified by HisTrapTM for purification of histidine-tagged proteins (Pharmacia Biotech). The purity of expressed recombinant MSTN protein reached to 92.5%.

Key words: porcine myostatin gene; mature protein coding sequence; expression; purification