

## 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<sup>1</sup>, 孙美榕<sup>2</sup>, 欧阳红生<sup>3\*\*</sup>, 张玉静<sup>3</sup>

( 1. 湛江海洋大学现代生化中心, 广东 湛江 524088; 2. 深圳科安信有限公司, 广东 深圳 518000;  
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 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, 筛选阳性克隆测序分析, 结果表明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一对引物进行 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。对成功构建表达载体阳性克隆在 LB 液体培养基中用 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 分子量为 41 451.3D。因为所构建的表达载体中含六聚组氨酸标签, 则用 His-trap 亲和柱进行纯化后, 纯度可达 92.5%。该试验为获得较好的猪肌生成抑制素基因抗原、制备抗体打下了良好的基础。

**关键词:** 猪肌生成抑制素基因; 成熟蛋白编码序列; 表达与纯化

中图分类号: S 828.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2004)03-0255-05

## Expression and Purification of Mature Protein Coding Sequence of Porcine Myostatin Gene in Prokaryotic Expression Vector

ZHANG Rui<sup>1</sup>, SUN Mei-rong<sup>2</sup>, OUYANG Hong-Sheng<sup>3</sup>, ZHANG Yu-Jing<sup>3</sup>

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

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

3. Faculty of Biochemistry and Biomolecular Biology, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China )

**Abstract:** Myostatin is a negative regulator for the growth of the skeletal muscle. 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 as double muscling. In order to investigate the influence of myostatin for the lean meat rate and the plump-hipped trait, the expression vector of mature protein coding sequence(MPCS) of porcine myostatin(MSTN) was constructed. The recombinant MPCS-MSTN-pET-28a(+) plasmid was transformed into E. coli BL21, which then 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 is equal to the 27.9% of the total proteins in the

\* 收稿日期: 2003-09-11

\*\* 通讯作者 E-mail: ouyhs@public.cc.jl.cn

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

作者简介: 张锐(1968-), 女, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学教学与科研工作。

transformed host cell showed in thin-layer scanner analysis. The different inducing time showed the different expression level of recombinant MSTN protein with the highest level when 3 ~ 4 h inducing time. The expressed histidine-tagged porcine myostatin(MSTN) protein was purified by HisTrap<sup>TM</sup> affinity chromatographic column (Pharmacia Biotech). The purity of expressed recombinant MSTN protein was as high as to 92.5%. The results lay a good foundation for the application of MSTN molecular biological technique in animal nutrition and breeding.

**Key words:** recombinant porcine myostatin gene; coding sequence for mature MSTN; expression and purification

肌生成抑制素是一种骨骼肌生长的负调控因子<sup>[1~3]</sup>,是由 Se - Jin Lee 等(1997)在研究转化生长因子 -  $\beta$ (TGF -  $\beta$ )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<sup>[4]</sup>,被命名为生长分化因子 8(GDF - 8)<sup>[5]</sup>。用基因打靶敲除 GDF - 8 基因,制备了基因缺失小鼠,其骨骼肌的重量是普通小鼠的 2 ~ 3 倍以上<sup>[6]</sup>,而脂肪并未随之增加<sup>[7~9]</sup>。该基因突变的牛为双肌牛<sup>[10~13]</sup>。因此,根据其功能才将其定名为肌生成抑制素(Myostatin, MSTN)<sup>[14]</sup>。肌生成抑制素研究的突破将对猪、肉鸡、肉牛等畜禽的瘦肉率和肉质等生产性能的提高具有特别重要的意义<sup>[15]</sup>。

## 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 T<sub>7</sub> 噬菌体  $\Phi$  10 基因启动子(T<sub>7</sub> 启动子)的原核高效表达载体(Studier FW. et al. 1986),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 hsdS gal ( $\lambda$ clts 857 ind 1 Sam 7 nin 5 lacUV 5 - T 7 gene 1),以上菌种均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, TALON<sup>TM</sup> Metal Affinity Resin, 购自 Clontech 公司,用于带有多聚组氨酸标签蛋白的纯化;其它生化试剂: 脲、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: 胰蛋白酶、酵母提取物、EDTA. Na<sub>2</sub>, Tris, 丙三醇、SDS,  $\beta$  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

依猪肌生成抑制素基因的 cDNA 设计引物<sup>[4]</sup>(OYHS029, OYHS005), PCR 扩增 MSTN 目的 DNA 片段, PCR 条件为: 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min. 对 PCR 产物进行 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

采用 TaKaRa 公司的 pMD 18 - 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<sup>r</sup>)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、双酶切等初步鉴定后, 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

从所得到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仍然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 °C 振荡培养约 4 ~ 5 h (OD<sub>600</sub> 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 °C 6 000 g 20 min 离心收集菌体; 200 mL TE 洗涤菌体, 菌体 - 20 °C 放置过夜; 菌体溶于 30 mL TE, 冰浴超声波破碎(超声 5.5 s, 间歇 9.9 s, 总共超声时间 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用上样缓冲液处理后进行 SDS - PAGE 电泳。

按照 Clontech 公司的 TALONTM Metal Affinity Resin User Manual 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,扫描结果。

## 2 结果

### 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)。

### 2.2 克隆及筛选

(1) 回收扩增片段,与克隆载体 pMD 18 - 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)。

#### (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 pMD 18 - 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 pMD 18 - T 载体之间均为反向连接(图 3)。

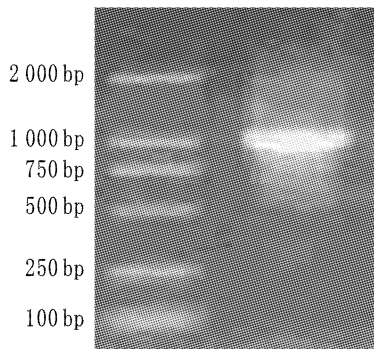
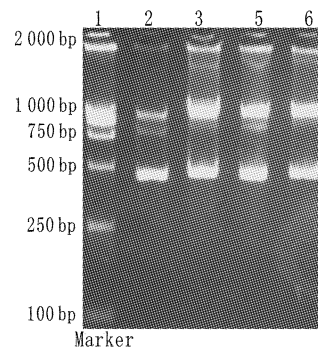
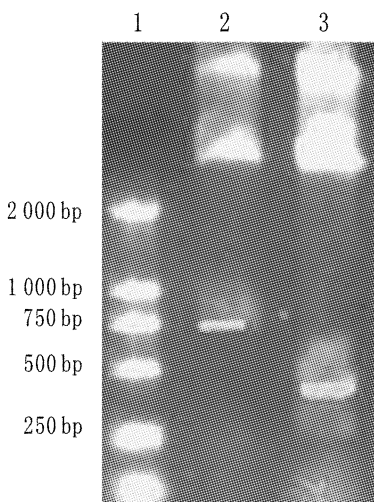


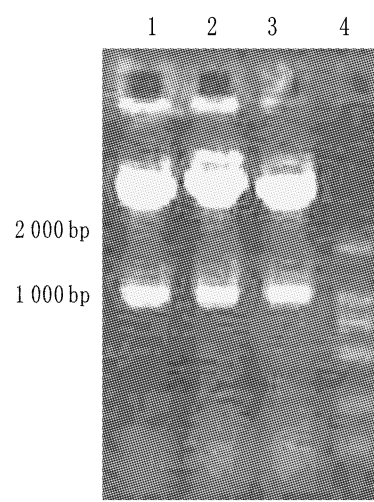
图 1 PCR 扩增产物  
Fig. 1 The PCR products



1:Marker DL2000; 2,3,4,5:质粒  
图 2 阳性克隆质粒提取图谱  
Fig. 2 The vector extraction of positive clone



MSTN - pMD18T - JM109 酶切  
1. 阳性质粒酶切产物  
图 3 克隆载体  
Fig. 3 Clone vector



MSTN - pET28a(+) - BL21(DE3)酶切  
1 - 3. 表达载体酶切产物; 4. Marker DL2000  
图 4 表达载体  
Fig. 4 Expression vector

## 2.3 表达载体的构建

### 2.3.1 重组菌的酶切鉴定

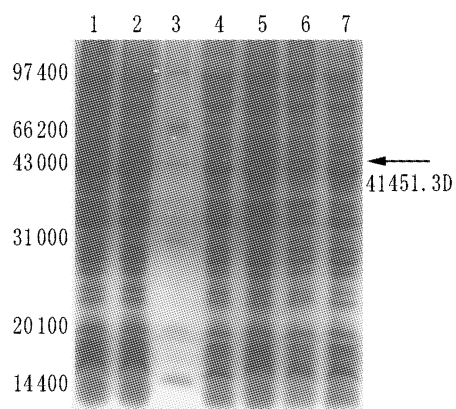
对构建的表达载体重组质粒 MSTN - pET28a (+) - BL21, 用 BamH I 和 Sal I 双酶切得到了 1.2 kb 的目的片段(图 4)。

### 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, 测序结果分析表明目的片段定向插入且阅读框架正确, 表明成功地构建了肌生成抑制素的原核表达载体。

## 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, 可见到分子量为 41 451.3 D 的蛋白带(图 5)。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%。因为所构建的表达载体中含六聚组氨酸标签, 则用 His - trap 亲和柱进行纯化后, 纯度可达 92.5%。



1: BL21(DE3)空白菌;

2: 未诱导的 MSTN - pET28a (+) - BL21(DE3);

3: 蛋白分子量标准 Marker;

4 - 7: 诱导后 MSTN - pET28a (+) - BL21(DE3)工程菌

图 5 MSTN - pET28 a (+) - BL21(DE3)表达的 SDS - PAGE 分析

Fig. 5 SDS - PAGE analysis of expressed

MSTN - pET28 a (+) - BL21(DE3)

## 3 讨论

(1)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<sup>[16]</sup>, 因此本实验中我们重新合成引物<sup>[17]</sup>, 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。

(2)pET28a(+), 为含 T<sub>7</sub> 噬菌体 Φ 10 基因启动子(T<sub>7</sub> 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 翻译起始密码子和/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): 40 235 - 40 243.
- [2] MILLER J B, RANSEY C B, CLABORN S W, et al.. Cellular and molecular diversity in skeletal muscle development: news from in vitro and in vivo[J]. *BioEssays*, 2000, 15(3): 191 - 195.
- [3] KIRK S, OLDHAM J, KAMBADUR R, et al.. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 184(3): 356 - 363.
- [4] FIRULLI A B, SHARMA M, SMITH T P L, et al.. Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity[J]. *TIG*, 1997, 13: 364 - 369.
- [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] YAMANOUCI 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 DCI. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program[J]. *The FASEB Journal*, 1995, 9: 1 595 - 1 604.

- [9] OLSON E N. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage[J]. *Dev Biol*, 1992, 154: 261 – 272.
- [10] KARIM L, COPPIETERS 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, KKKLE 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]. *J Anim Sci*, 2001, 79(4): 854 – 860.
- [15] DICKMAN S. Gene mutation provides more meat on the hoof[J]. *Science*, 1997, 277(5 334): 1 922 – 1 933.
- [16] 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.
- [17] J 萨姆鲁克, EF 弗里奇. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1998.

=====

(上接第245页)

- [9] WACHIRA F N. Genetic diversity in tea revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers[J]. *Tea*, 1996, 12(2): 60 – 68.
- [10] 季鹏章, 周家齐, 张俊, 等. 42个茶树杂交品系茶氨酸含量的氨基酸自动分析[J]. *昆明理工大学学报*, 2002, 27(增刊): 513 – 516.
- [11] 张虹. 应用氨基酸自动分析仪测定茶中氨基酸的组成[J]. *茶业通报*, 1982, (5): 6 – 10.
- [12] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. *浙江农业大学学报*, 1997, 23(6): 123 – 126.
- [13] 季鹏章, 鄢波, 张俊, 等. 茶树杂交品系 DNA 提取与 RAPD 扩增研究[A], 2002 中国青年农业科学学术年报[C]. 中国农业出版社, 2002. 313 – 316.
- [14] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. *中国科学(B 辑)*, 1993, 23(6): 589 – 594.
- [15] 莫惠栋. 数量遗传学的新发展——数量性状基因图谱的构建和应用[J]. *中国农业科学*, 1996, 29(2): 8 – 16.