

猪 Follistatin cDNA 克隆及在大肠杆菌中的表达

Porcine Follistatin cDNA Cloning and Expression in *Escherichia coli*

何 新¹ Δ , 齐 冰¹ Δ , 何立千², 陈永福³, 刘桂生¹, 陈清轩^{1*}

HE Xin¹ Δ , QI Bing¹ Δ , HE Li-Qian², CHEN Yong-Fu³, LIU Gui-Sheng¹ and CHEN Qing-Xuan^{1*}

1 中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100080

2 北京联合大学师范学院应用生物技术系 北京 100083

3 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094

4 中国科学院研究生院 北京 100049

1 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2 Department of application Biotechnology, Normal College, Beijing Union University, Beijing 100083, China

3 State Key Laboratory for Arobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

4 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

摘 要 提取猪卵巢总 RNA, 用 RT-PCR 方法克隆了猪 Follistatin cDNA 的完整开放阅读框, 长 1038 bp。将 Follistatin cDNA 连接到原核表达载体 pGEX-4T-3 中, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 以 IPTG 诱导, 进行了 GST-FS 融合蛋白表达。用 SDS-PAGE 和 Western 杂交检测, 结果显示在 63kD 处有特异性表达蛋白。

关键词 RT-PCR 猪 Follistatin cDNA 原核表达

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0677-05

Abstract The total RNA was extracted from porcine ovary. Porcine Follistatin cDNA was cloned by RT-PCR. Complete porcine follistatin cDNA coding sequences are presented including 1038 bp of open reading frame. The purified porcine follistatin cDNA was inserted into pGEX-4T-3 vector to construct the prokaryotic fusion protein expression vector. The recombinant expression plasmid was transformed into BL21 (DE3) and expression was induced by IPTG. Protein products were detected by SDS-PAGE and confirmed by Western blotting analysis, which showed that the yield of the Follistatin cDNA was a 63kD protein expression vector. Follistatin protein was expressed in the form of glutathione-S-transferase (GST) fusion protein in *E. coli*.

Key words RT-PCR, porcine follistatin cDNA, prokaryotes expression

动物肌肉发育不仅依靠激素调节, 而且某些组织特异性效应因子也影响肌肉发育。肌肉生长抑制素(Myostatin)就是一种新近发现的重要效应因子^[1], 因此许多能缓解肌抑素作用的措施都能有效刺激肌

肉的发育^[2,3]。Follistatin(FS)——卵泡抑制素, 对垂体促卵泡素(FSH)具有抑制作用, 故又称为 FSH 抑制蛋白(FSH-suppressing protein, Follistatin)^[4]。Follistatin 是 TGF- β 超家族中许多成员的抑制蛋白,

Received: December 26, 2005; Accepted: March 13, 2006.

This work was supported by the grants from Normal College, Beijing Union University and Jilin Jingqishen Co. Limited.

* Corresponding author. Tel: 86-10-82614427; E-mail: qingxuanchen@yahoo.com

Δ The two authors contributed equally to this work.

北京联合大学师范学院和吉林精气神有限公司赞助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

属分泌型多肽。以往的研究发现:Follistatin 在细胞间的通讯中起介导作用;可有效诱导软骨的形成^[5,6];在胚胎发生过程中,对中胚层的形成有诱导作用^[7];在神经组织的分化及器官的发生中发挥重要作用^[8]。近几年的研究结果显示:Follistatin 对肌肉生长抑制因子 Myostatin 有抑制作用^[9]。基于其重要的生理功能,本研究将以我国主要的家畜品系猪作为研究对象,克隆其 Follistatin cDNA 的完整编码框序列,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行 GST-FS 融合蛋白的表达,该表达产物可作为饲料添加剂,以期达到促进猪肌肉持续增长的目的。本研究内容在国内尚未见相关的研究报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、试剂、质粒:载体 pGEM-T、pGEX-4T-3 购自 Promega 公司;大肠杆菌菌株 BL21(DE3)、感受态菌株 DH5 α 均购自天为时代公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶底物 NBT 和 BCIP、IPTG 和 X-gal 等试剂均购自 Gibco 公司;丙烯酰胺、N,N-亚甲双双丙烯酰胺、鼠抗 Follistatin 单抗均为 Sigma 公司产品。

1.1.2 动物材料:实验中所用的黑猪卵巢取自精气神公司动物养殖基地。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取、RT-PCR 及片段的克隆:取新鲜黑猪卵巢经 PBS 冲洗后,置于液氮中冷冻并进行研磨。用 Qiagen 公司 RNeasy Mini Kit 进行 total RNA 的提取。具体操作按 Protocol 进行。用 40 μ L 无菌水洗脱柱体,获得了高质量的 RNA 产物。

参照牛 Follistatin cDNA 序列和猪 Follistatin 基因序列进行 PCR 引物设计。利用 Clontech 公司的 Smart RACE cDNA Amplification Kit 进行逆转录,合成 cDNA。并进行 3'RACE,经 PCR 扩增得到 1.1kb 的产物。PCR 产物经低熔点胶回收,与克隆载体 pGEM-T 连接,转化 DH5 α ,经蓝白斑筛选,对阳性克隆进行 DNA 测序分析。

1.2.2 表达质粒的构建:在引物 5'端引入合适的酶切位点 *Sal* I、*Xho* I,将测序正确的 PCR 产物以 *Sal* I、*Xho* I 进行酶切,低熔点胶回收片段,酶切回收后的 Follistatin cDNA 与经 *Sal* I、*Xho* I 酶切回收后的载体 pGEX-4T-3 连接,构建重组质粒 pGEX-FS。将连接产物转入 DH5 α ,经酶切鉴定连接正确。

1.2.3 Follistatin cDNA 在大肠杆菌中的表达:将鉴

定过的原核重组表达质粒和空质粒分别转化宿主菌 BL21,涂布于含有相应抗生素的 LB 琼脂培养板上,37 $^{\circ}$ C 培养 10~16h。挑选 4~6 个单菌落分别接种到含相应抗生素的 5mL LB 管中,于 37 $^{\circ}$ C 剧烈摇动培养 8~12h;同时挑取空质粒所转化菌株作为对照。取上述培养物按 1:20 的比例接种到两个含抗生素的 5mL 新鲜 LB 管中,37 $^{\circ}$ C 剧烈摇动培养 1~1.5h,使菌液的 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8。向上述其中一个转接管中加入终浓度为 0.1~1mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 继续培养 3~4h。另一管为非诱导对照。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印记(Western blot)分析:选择适当条件用 IPTG 诱导表达,收集培养液,5000r/min 离心 10min,弃上清。用 PBS 漂洗菌体沉淀。按照 5mL/g 的量用 PBS (或结合缓冲液)重悬菌体沉淀,冰浴下进行超声破碎细胞。于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000g 的转速离心 20min,取离心后的菌液上清直接进行 SDS-PAGE 检测,以考马斯亮蓝染色。

SDS-PAGE 电泳后,将凝胶放入电转缓冲液中,将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,然后进行抗原与抗体反应。一抗为鼠抗 Follistatin 单抗,二抗为碱性磷酸酶标记的兔抗鼠抗体。

2 结果

2.1 Follistatin cDNA 的克隆及测序

采用 Clontech 公司的 Smart RACE cDNA Amplification Kit 进行逆转录。参照 Follistatin 基因家族 cDNA 的 5'和 3'端序列,设计合成两条引物,以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。电泳结果显示,PCR 产物中有多条非特异带,随后我们又以该 PCR 产物为模板,进行了 PCR 扩增,最后获得 1.1kb 左右的 DNA 条带(图 1)。目的片段经琼脂糖凝胶电泳胶纯化回收后,与克隆载体 pGEM-T 连接,转化 DH5 α 菌,经蓝白斑筛选,将经酶切鉴定的阳性克隆送检测序。将测序结果与 GenBank 进行 Blast 比对,比对结果表明:该 1.1kb 的片段为猪 Follistatin cDNA。该序列与牛 Follistatin cDNA 有 95% 的同源性。

Follistatin cDNA 及其编码蛋白的序列如图 2 所示,用翻译的氨基酸序列比较 Prosite 数据库后发现它还具有一些基本功能序列,如 PKC 磷酸化位点等。这是一个长 1038bp 的 Follistatin cDNA 序列,由 1032bp 的完整开放读框,5bp 的 5'非编码区组成,编码 344 个氨基酸。经计算机搜索 EMBL/GenBank/

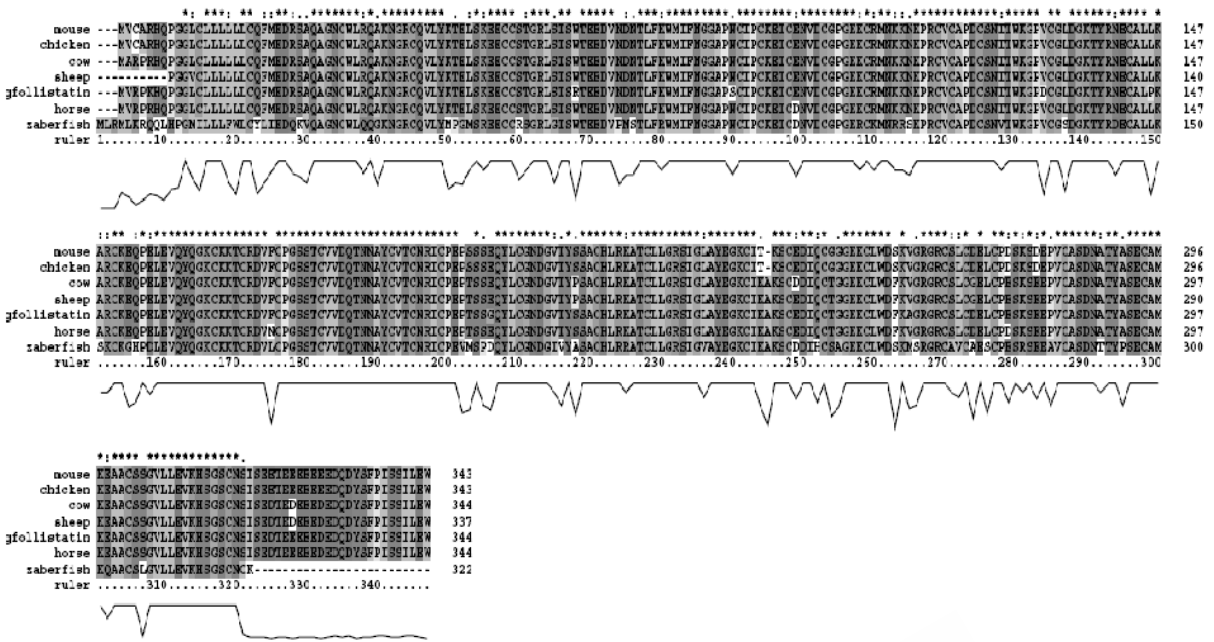


图3 FS氨基酸序列比对图

Fig.3 CLUSTAL X(1.8) multiple amino acid sequence alignment of FS

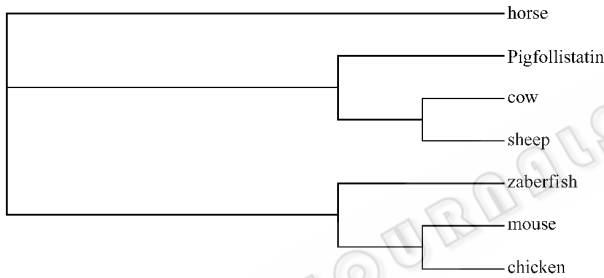


图4 Follistatin 进化树

Fig.4 Phlogenetic tree of Follistatin

从 SDS-PAGE 结果(图 5)可以看出,诱导后的样品有明显的蛋白表达条带,凝胶灰度扫描从低分子量蛋白 Marker 可见:其表达产物的分子量约为 63kD 与其理论推算值相一致。蛋白印记实验显示经诱导后的表达产物在 63kD 处呈现阳性结果(图 6)。

2.3 Follistatin 基因在大肠杆菌中的表达

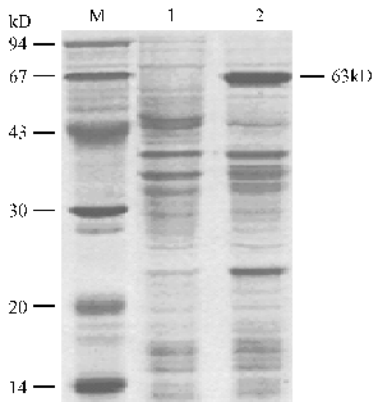


图5 FS 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of FS expression productions in *E. coli*

M : standard protein marker ; 1 : sample before IPTG induction ; 2 : sample after IPTG induction.

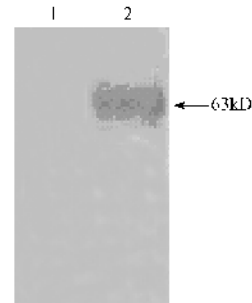


图6 FS cDNA 表达产物的蛋白杂交分析

Fig.6 Western blot analysis of FS cDNA expression products in *E. coli*

1 : sample before IPTG induction ; 2 : sample after IPTG induction.

3 讨论

在生物体内,Follistatin 对 TGF-β 家族成员具有抑制作用,这其中包括 Myostatin。Myostatin 是现在已知的最强的肌肉生长抑制因子^[10],Follistatin 通过与 Myostatin 的 5' 端的特异性结合,阻碍 Myostatin 与 Smad 通路的进入,从而抑制 Myostatin 生理功能的发挥^[11],进而得到促进猪肌肉持续生长效果。

本研究首次成功克隆了黑猪 Follistatin cDNA 全序列,并构建了表达质粒,成功地进行了猪 Follistatin 基因在大肠杆菌中的表达,表达产量较高。SDS-PAGE 图谱显示在分子量 63kD 处有明显的蛋白表达条带,这与 Follistatin-GST 融合基因编码的蛋白理论推算值相符合。Western blot 图谱也显示在 63kD 处有明显的杂交带,这表明表达产物能与 Follistatin 单抗进行免疫反应。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Antoniou E, Grosz M. PCR based detection of bovine myostatin Q204x mutation. *Anim Gen*, 1999, **30**(3):231 - 232
- [2] Kambadur R, Sharma M, Smith TP *et al.* Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 1997, **7**(9):910 - 916
- [3] Oldham JM, Martyn JA, Sharma M *et al.* Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscle than normal-muscle cattle fetuses, *Am J physiol Regulatory Integrative Com Physio*, 2001, **280**: 1488 - 1493
- [4] Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML *et al.* Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Endocrinol*, 1989, **3**: 651 - 659
- [5] Anthor HG, Nicholas I, Mckinnell C *et al.* Follistatin complexes Myostatin and antagonizes Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol*, 2004, **270**: 19 - 30
- [6] Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. *Spine*, 2002, **27**: S10 - 15
- [7] Gamer LW, Wolfman NM, Celeste AJ *et al.* A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 1999, **208**: 222 - 232
- [8] Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol*, 1998, **17**(4):287 - 322
- [9] Armand AS, Della Gaspera B, Launay T *et al.* Expression and neural control of follistatin versus myostatin genes during regeneration of mouse soleus. *Dev Dyn*, 2003, **227**: 256 - 265
- [10] Antoniou E, Grosz M. PCR based detection of bovine myostatin Q204x mutation. *Anim Genet*, 1999, **30**(3):231 - 232
- [11] Hill JJ, Davies MV, Pearson AA *et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**: 40735 - 40741
- [12] Lee SJ, Mepheron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2001, **98**: 9306 - 9311