

研究报告

猪肌肉素基因的 cDNA 克隆与表达

王伟杰, 李宏基, 韩立强, 王月影, 王静, 李卫华, 林茂旺, 台玉磊, 张志强, 藏猛, 王艳龄, 杨国宇

河南农业大学动物生理生化实验室, 郑州 450002

摘要: 从人肌肉素基因出发, 在 dbEST 数据库中进行同源性搜索, 找到七个有较高同源性的 Expressed Sequence Tag(DY426490, CF787546, AJ660979, AJ664670, AJ663820, AJ680159, DN106254)。通过拼接和进一步 RT-PCR 实验验证, 获得猪肌肉素基因全长 cDNA 序列, 其全长 651 bp, 开放阅读框为 54~452 bp, 编码有 132 个氨基酸。同源性分析结果表明, 与人、小鼠和大鼠的肌肉素基因 cDNA 编码区(CDS)同源性分别为 87.2%、77.6%和 77.9%。利用克隆出的猪肌肉素 cDNA, 构建表达载体 pGEX-4T-1-musclin, 并在 BL21 大肠杆菌中成功表达和纯化了分子量为 38.59 kD 的融合蛋白 GST-Musclin, 并运用蛋白印迹技术进行鉴定。

关键词: 猪, 肌肉素基因, 表达, 纯化, 鉴定

Cloning and Expression of the Pig Skeletal Muscle Musclin Gene

Weijie Wang, Hongji Li, Liqiang Han, Yueying Wang, Jing Wang, Weihua Li, Maowang Lin, Yulei Tai, Zhiqiang Zhang, Meng Zang, Yanling Wang, and Guoyu Yang

Laboratory of Animal Physiology & Biochemistry, He'nan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: We found seven tag sequence with high homology in dbEST by using human musclin gene, and got its cDNA sequence, which consists of 651bp and the open reading frame was 54~452 bp detected by RT-PCR, encoding 132 amino acid residue protein. The new gene has high homology with that of human, mouse and rat, the rate is 87.2%, 77.6% and 77.9%, respectively; the gene fragment was cloned into expression vector pGEX-4T-1, and the recombinant was transformed into *E. coli* BL21. Induced by IPTG, the fusion protein GST-musclin, a 38.59 kD protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 and identified by Western blotting.

Keywords: pig, musclin gene, expression, purification, identification

Musclin 是由 Nishizawa H 等(2004)^[1]利用信号序列捕集(SST)技术, 在小鼠骨骼肌发现的一种新的活性多肽。小鼠、大鼠、人 Musclin 含有 130~133 个氨基酸残基, 分子量为 11 kD, 其 N-端含有一个 30 个左右氨基酸残基的信号肽, 在 C-末端还存在与

利钠利尿肽家族高度同源的蛋白质片段及“KKKR”模序的丝氨酸蛋白酶切位点; 小鼠 musclin 的氨基酸序列与人、大鼠的同源性分别为 75.9%和 90.2%。Northern blotting 结果表明, 小鼠 Musclin mRNA 仅特异表达于骨骼肌, mRNA 的表达受机体营养状况

Received: November 29, 2007; **Accepted:** January 18, 2008

Supported by: Important Project of Tackle Key Problems in Science and Technology of Henan Province(No. 0523010500).

Corresponding author: Guoyu Yang. Tel: +86-371-63558101; E-mail: haubiochem@163.com

河南省重点科技攻关项目(No. 0523010500)资助。

及胰岛素等激素水平的调节。Banzet S 等(2007)^[2]采用 Real-time PCR 检测了 Musclin mRNA 在大鼠骨骼肌中的分布及其与肌纤维类型的关系,证实 Musclin 主要在快缩、糖酵解型(Fast-Glycolytic fiber)肌纤维中表达,且随着纤维类型的转换其表达量有所变化。

目前,尚未见有关于猪 Musclin 基因的研究报道。本试验利用 RT-PCR 技术克隆了猪 Musclin 基因,并进一步设计了表达引物,构建表达载体 pGEX-4T-1-musclin,在 BL21 大肠杆菌中成功表达纯化了融合蛋白 GST-Musclin,并通过 Western blotting 检测做了进一步的证明。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用到的通用引物、反转录酶、RNA 酶抑制剂、pMD19-T 载体、dNTP-mix、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 购于宝生物(大连)有限公司。动物 RNA OUT 购于绵阳高新区天泽基因工程有限公司。2×Taq PCR MasterMix (含染料)、Western blotting 膜封闭液、Anti-GST antibody、IgG-HRP 和 DAB 显色剂购于 TIANGEN 公司。实验样本来自郑州新大牧业有限公司提供的大白和长白杂交的二元健康猪。

1.2 EST 电子克隆和分析

以人骨骼肌肌肉素预测基因序列(AY573933)为模板,利用 Blast 程序,在美国的 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)检索 ESTs,找到 7 条同源性较高基因序列(GenBank Accession No. DY426490, CF787546, AJ660979, AJ664670, AJ663820, AJ680159, DN106254)。然后,用 DNASTAR 软件将大于 100 bp 且相似性在 80% 以上的 ESTs 拼接、延伸。电子延伸后的序列利用 ORF-finder 工具进行开放阅读框的识别。

1.2.1 总 RNA 的抽提

取猪骨骼肌 0.1 g,采用 RNA OUT 提取总 RNA,溶解于 15 μL DEPC 处理的水中备用。

1.2.2 阅读框的 RT-PCR 验证和序列分析

在阅读框起始密码子和终止密码子两侧设计一对引物-F1 和 R1。引物设计采用 BioXM 软件,引物序列: F1(5' CACAAGATGATGGACTGGAGACTGG

3')和 R1(5' AGGATTAATTAGCCTCTGGAATTTG 3');引物由宝生物(大连)有限公司合成。以提取的总 RNA 为模板,用 TaKaRa AMV Reverse Transcriptase XL 反转录成 cDNA。以反转录 cDNA 为模板合成第二条链。PCR 反应体系: 95°C 预变性 5 min, 然后 95°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 进行纯化。

1.2.3 DNA 序列测定及分析

将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD19-T 载体上,转化到 CaCl₂ 法制备的 *E. coli* DH5α 感受态细胞。序列测定由北京三博远志生物技术有限公司完成。

1.2.4 序列分析

在 NCBI 上运行 Blast, ORF Finder, SignalP 及 BioXM 软件分析。

1.3 猪 Musclin 原核表达纯化和鉴定

1.3.1 表达引物设计

根据以上提交发表的肌肉素 cDNA 序列,利用引物设计软件 Bioxm 分别设计 musclin 组件的上、下游引物,5' TAGGATCCATGGATGTCACGACAA 3' 和 5' TA CTCGATTAGCCTCTGGAATTTGA 3'。在上游引物 5' 端加入 BamHI 酶切位点和保护碱基 TA,下游引物 5' 端加入 XhoI 酶切位点和保护碱基 TA。

1.3.2 Musclin 原核表达载体的构建、鉴定

将 PCR 产物和原核表达载体 pGEX-4T-1 分别用 BamHI 和 XhoI 分别进行双酶切,分别回收目的片段和载体酶切大片段,将二者用 TaKaRa 公司的 T4 DNA 连接酶在 16°C 连接 4 h,连接产物转入用 CaCl₂ 致敏的 DH5α 菌株中,提取转化质粒,经 PCR 与测序鉴定连接方向正确后将质粒转入 BL21 菌株。

1.3.3 pGEX-4T-1-musclin 在原核细胞中的表达

pGEX-4T-1-musclin 在原核细胞中的表达: 将含 pGEX-4T-1-musclin 的 BL21 菌株接种进行诱导表达,诱导时,在菌液 OD₆₀₀ 的吸收值达到 0.7 时,加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L, 35°C 继续振荡 4 h。分别取 0.5 mL 菌液,离心收集菌体,加 20 μL 1×SDS 加样缓冲液,振荡混匀后沸水浴加热 5 min,用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定表达结果。

1.3.4 GST-Musclin 融合蛋白的纯化

GST-Musclin 融合蛋白的纯化: 将 IPTG 诱导后的菌液 200 mL 于 4°C、5000 r/min 离心 10 min, 10 mL 磷酸盐缓冲液(Phosphoresce buffer solution, PBS)菌体, 加 1% Triton X-100(V/V)、1% β-巯基乙醇(V/V)、Aprotinin 至(1 mmol/L), 加溶菌酶至 1 mg/mL, 蜗旋混匀, 室温作用 15 min。超声波破碎, 每次 1 min(80 W), 间隔 1 min, 共破碎 7 次, 冰上操作。然后 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清与 PBS 重悬的谷胱甘肽琼脂糖小球颠倒混匀 1 h。离心弃上清, 冷 PBS 洗 3 次。500 μL 还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液(10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗脱 3 次并收集洗脱缓冲液。后将纯化的蛋白与 2 × 蛋白电泳上样缓冲液等体积混合吹打均匀, 100°C 沸水浴 10 min。冷却至室温, 上样, 进行 15%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束考马斯亮蓝染色 1 h, 最后脱色 6 h, 可见光下观察条带并照相。

1.3.5 Western blotting 检测 GST-Musclin 融合蛋白

通过利用针对 GST 的抗体进行 Western blotting 检测, 从而进一步说明结果的可靠性。

2 结果

2.1 EST 的电子克隆和开放阅读框 RT-PCR 验证

电子克隆后序列长度 651 bp。ORF 开放阅读框分析表明, 开放阅读框长 399 bp(54~452 bp)编码 132 个氨基酸(图 1)。与人、小鼠和大鼠的骨骼肌肌肉素基因 cDNA 编码区有较高同源性, 同源性分别为

为 87.2%、77.6%和 77.9%(图 2)。猪肌肉素推测编码氨基酸序列长度为 132aa, SignalP 预测信号肽为 N-端 1~27aa, 氨基酸序列中含有“KKKR”结构和与小鼠 ANP, BNP, CNP 蛋白的同源性区域说明猪肌肉素结构特征与人、大鼠和小鼠肌肉素相一致。与人、小鼠和大鼠的骨骼肌肌肉素蛋白序列同源性分别为 87.1%、72.3%和 72.7%。在开放阅读框两端设计特异引物, 以骨骼肌总 mRNA 为模板进行 RT-PCR 实验验证, 结果与电子克隆结果完全一致。序列提交 GenBank 收录(GenBank Accession No.: EF503638)。

gggaaactgcacagacaggactttaaagttagaatcctgattttcacaag
1 atgatggactggagactggcaagtgtcattttatcctggotgtgacgctgatgctotgg
M M D W R L A S V H F I L A V T L M L W
agctcaggaaaagtgtccttcaatggatgtcacgacaaaaggccttggattcgaactata
61 S S G K V L S M D V T T K A F D S E L I
gatgtgaaccaccacccacaatgacagaagaatcagotactgttcggcagctaaa
121 D V E P P P T M T E K S A T D L A A K
ctcttactcttgatgaactgtgtctctggagaatgatgtgattgaacaaagaagaaa
181 L L L L D E L V S L E N D V I E T K K K
agaagcttctctggttttggttctccctggacagactctcagcagctctcagatcat
241 R S F S G F G S P L D R L S A G S P D H
aaagtaaacagaggaaagttagtagatcatccaaaaagcattcggcatccccgtgat
301 K G K Q R K V V D H P K K R F G I P V D
cggattgtgaaaccggcttccaaattccagaggctaa
361 R I G R N R L P N S R G *
tgaatgtcacagaaacatggaagatgcttcagtgaaagtcttcacactccttaagatt
aaacttcaaggaaacattctgtaatccttccctgagctggaacttcagttcatcacatca
cagttattgtacaactcaattaataattatgacgttaatttcaatgatgga

图 1 Musclin 的 cDNA 序列和推测的蛋白质序列
Fig. 1 cDNA and predicted protein sequence of Musclin

2.2 pGEX-4T-1-musclin 在原核细胞中的表达结果

将构建好的原核表达载体转入 BL21 大肠杆菌中进行表达, 表达的蛋白条带大约 38.59 kD, 和预期融合蛋白 GST-Musclin 的分子量一致, SDS-PAGE 电泳结果见图 3。

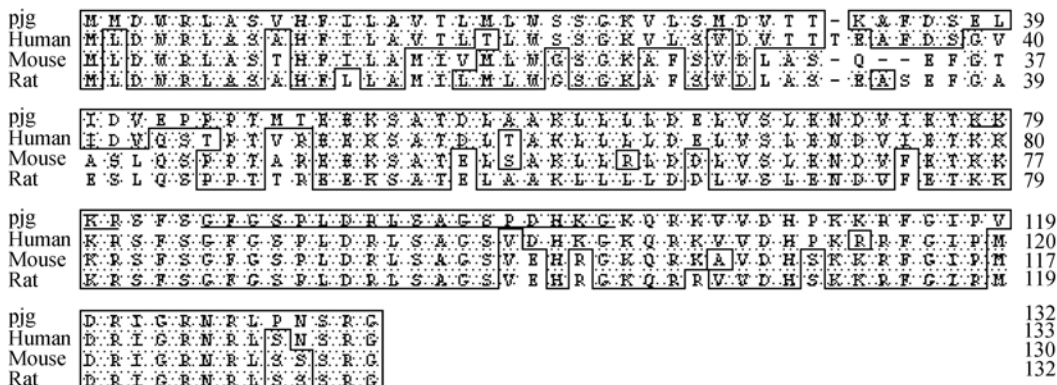


图 2 Musclin 蛋白序列同源性比对图
Fig. 2 Multiple sequence alignment result of Musclin protein

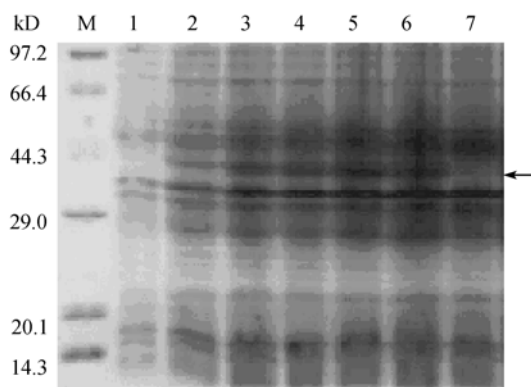


图 3 pGEX-4T-1 的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the expressed protein pGEX-4T-1 by SDS-PAGE

1: uninduced bacteria; 2-6: deposition of induced; pGEX-4T-1 recombinant bacteria; 7: control; M: protein marker

2.3 GST-Musclin 融合蛋白纯化结果

将纯化的产物用 15% 的 SDS-PAGE 电泳检测, 结果见图 4。图中从左至右分别为 3 次收集的样品, 每个样品点 2 个。



图 4 GST-Musclin 融合蛋白纯化结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified GST-Musclin

2.4 Western blotting 检测结果

将转膜好的 NC 膜先在清水中漂洗, 后放入 DAB 显色液中, 大约 45 s 检测到结果, 立即放入 TBST 溶液中终止反应。最终结果见图 5。

3 讨论

继脂肪组织和血管的内分泌功能发现后, 传统的内分泌概念被打破, 推测分泌活性物质的功能是各种组织细胞固有的生物学行为之一。近年大量试验研究资料表明骨骼肌能表达、合成和分泌多种生物信号分子, 包括调节肽、细胞因子和生长因子等, 以旁分泌和/或自分泌方式调节骨骼肌的生长、代谢和运动功能, 甚至以血液循环内分泌的方式调节机

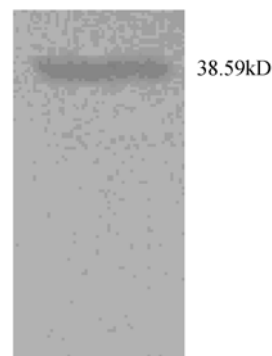


图 5 Western blotting 检测 GST-Musclin 融合蛋白

Fig. 5 Identification of the purified GST-Musclin by Western blotting

体远隔器官组织的功能, 因此提出了肌肉因子 (myokines) 的概念^[3]。目前已证实骨骼肌分泌的细胞因子有 IL-6、TNF- α 、IGF-1、Myostatin 等^[4-7]。Nishizawa H 等(2004)^[1]发现并命名的“musclin”, 其意指在肌肉组织“特异性”表达的细胞因子。Thomas G 等(2003)^[8]从骨骼组织中获得一活性多肽, 并命名为“osteocrin”, 推测可能是成骨细胞的一种调节因子。现已证实 musclin 与 osteocrin 应为同一基因, 只是存在时空性表达差异^[9], 在胚胎期该基因可能主要在骨骼组织表达, 成年期主要在肌肉组织表达。

有关 musclin 的生物学功能尚不十分清楚。Nishizawa H 等(2004)^[1]研究证实, 进食影响 musclin 的表达, 禁食 48 h 后, 小鼠腓肠肌中 musclin 的 mRNA 表达几乎消失, 重新进食后 24 h, mRNA 表达恢复; STZ 诱导的胰岛素缺陷小鼠腓肠肌 musclin 的 mRNA 表达显著降低; 在胰岛素抵抗小鼠模型 musclin 的 mRNA 表达均显著升高; 离体实验中发现胰岛素和 IGF-1 呈浓度依赖的升高肌细胞 musclin 的 mRNA 表达, 而肾上腺素、异丙肾上腺素及 forskolin 则明显降低 musclin 的 mRNA 表达; 在 C2C12 细胞, musclin 明显的抑制胰岛素促进的葡萄糖的摄入及糖元的合成。因此, musclin 可能是肌细胞的能量调节因子。PPAR γ 激动剂 troglitazone 可诱导人肌细胞 musclin 的表达, 但其信号传导途径尚不清楚^[10]。

本试验利用 RT-PCR 技术克隆了猪 musclin 基因, 所测得的序列中具有类似于利尿肽家族的丝氨酸蛋白酶切位点-KKKR。由此可推断, 其可能与营养代谢病的发生与发展有一定的关系。所以进一步

设计了表达引物, 构建表达载体 pGEX-4T1-musclin, 在 BL21 大肠杆菌中成功表达并纯化了融合蛋白 GST-Musclin。目的旨在获得表达蛋白, 制备其多克隆抗体, 从而为进一步研究肌肉素的作用位点及其对营养代谢病发生的机理打下基础。

REFERENCES

- [1] Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, *et al.* Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem.* 2004, **279**(19): 19391–19395.
- [2] Banzet S, Koulmann N, Sanchez H, *et al.* Musclin gene expression is strongly related to fast-glycolytic phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, **353**(3): 713–718.
- [3] Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, *et al.* The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc.* 2004, **63**(2): 263–267.
- [4] Pedersen BK, Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6—a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain Behav Immun.* 2005, **19**(5): 371–376.
- [5] Martin CM, Russell JL, Ferdous A, *et al.* Molecular signatures define myogenic stem cell populations. *Stem Cell Rev.* 2006, **2**(1): 37–42.
- [6] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature.* 1997, **387**: 83–90.
- [7] Zhang J, Tang CS. The endocrine function of skeletal muscle. *Progress in Physiological Sciences.* 2006, **37**(3): 193–198.
- [8] 张靓, 唐朝枢. 骨骼肌的内分泌功能. *生理科学进展.* 2006, **37**(3): 193–198.
- [9] Thomas G, Moffatt P, Salois P, *et al.* Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype. *J Biol Chem.* 2003, **278**(50): 50563–50571.
- [10] Bord S, Ireland DC, Moffatt P, *et al.* Characterization of osteocrin expression in human bone. *J Histochem Cytochem.* 2005, **53**(10): 1181–1187.
- [11] Staiger H, Haas C, Machicao F, *et al.* The PPAR γ agonist troglitazone induces musclin mRNA expression in human myotubes. *Horm Metab Res.* 2006, **38**(9): 614–616.

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。

《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。

《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。

《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>