

鸡生长分化因子 GDF-8 cDNA 的克隆、表达及蛋白纯化

杨威 王海霞 陈岩 张勇 朱大海*

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

关键词 GDF-8, 融合蛋白, 表达, 纯化

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0460-03

1997 年 John Hopkins 大学的 McPherron AC 等^[1]从小鼠骨骼肌 cDNA 文库中克隆得到 1 个新基因 GDF-8(Growth and Differential Factor-8),从蛋白结构来看 ,GDF-8 因子具有 TGF- β 超家族的典型结构特征 ,其中包括分泌用的信号肽、蛋白酶水解加工位点及含 9 个半胱氨酸残基的高度保守的 C 端区域。进一步研究发现 GDF-8 主要在小鼠的骨骼肌中表达 ,并且 GDF-8 基因敲除鼠的骨骼肌是正常野生型小鼠的 3 倍以上^[2] ,这是继 1982 年 Palmiter 等将大鼠的生长激素基因转入小鼠体内产生“超级小鼠”之后的又一只“超级小鼠”。由此可见 GDF-8 因子对骨骼肌的生长具有抑制作用 ,因而被称为肌肉生长抑制素(Myostatin)^[1]。研究比利时蓝牛的 GDF-8 基因时发现 ,骨骼肌高度发达的比利时蓝牛其 GDF-8 基因由于突变不能合成有活性的 GDF-8 因子^[3,4] ,因此推测比利时蓝牛骨骼肌的超量生长可能是由于在骨骼肌细胞中缺少 GDF-8 因子的抑制作用所致。另外 ,在 HIV 感染所引起的骨骼肌萎缩而消瘦的病人中 ,GDF-8 基因的表达高于正常人^[5] ,提示人类中的某些肌萎缩疾病很可能与 GDF-8 因子表达异常直接相关。

目前世界范围内对 GDF-8 基因及其功能的研究还较少 ,但其重要性已日益得到生物学、医学及动物育种学界的广泛关注。本研究主要是以鸡的骨骼肌为实验材料 ,利用 RT-PCR 的方法从鸡的骨骼肌总 RNA 中扩增得到半长 GDF-8 的 cDNA 片段 ,并克隆到 pTrcHisB 表达载体上。从而诱导表达 GDF-8 融合蛋白 ,通过金属螯合亲和层析得到大量纯化的 GDF-8 蛋白 ,为制备 GDF-8 抗体和进一步研究 GDF-8 的功能与抑制骨骼肌生长的作用机制打下了良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及组织样品 :原核高效表达载体 pTrcHisB 质粒与大肠杆菌 Top10 均购自 Invitrogene 公司。实验中用到的肌肉组织样品采自于 30 日龄的肉用仔鸡。

1.1.2 酶和试剂 :所用限制酶、Taq DNA 聚合酶为 Gibco 公

司产品 ;T4DNA Ligase、异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(IPTG)为 Promega 公司产品 ;RT-PCR 试剂盒购自 Clontech 公司 ;溴苄青霉素、PMSF、核酸分子量标准为 Sigma 公司产品 ;镍-NTA 琼脂糖介质为 Qiagen 公司产品 ;DNA 胶回收试剂盒购自原平皓公司。其它常用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR :骨骼肌组织总 RNA 的提取。在液氮中研磨 -70℃ 保存的鸡的肌肉组织至粉末状 ,其总 RNA 的提取按 Gibco 公司 TRIzol Reagent 操作说明书进行。根据 McPherron , A.C.1997 年发表的鸡 GDF-8 的 cDNA 序列^[2,3] ,我们利用 Oligo 软件设计一对引物扩增鸡的 GDF-8 基因 3' 端半长核苷酸序列。上游引物 P1 的核苷酸序列为 :

5'-CCGCCGATCCGATCTCTGCGAGAGTATTGATGTG-3'

含 BamHI 酶切位点 ;下游引物 P2 的核苷酸序列为 :

5'-ACCGCCCTCGAGTCATGAGCACCCGCAACGATCTACAA-3'

含 XhoI 酶切位点(引物由上海生工生物工程公司合成)。RT-PCR 采用 Clontech 公司 Advantage RT-for-PCR kit , mRNA 反转录模板为 1 μ g 在 PE 9700DNA 扩增仪上扩增 ,扩增参数为 :反转录(RT)—42℃ 1h ,94℃ 5min ,5℃ 5min ;PCR—95℃ 5min ,94℃ 1min ,50℃ 1min ,72℃ 1min ,循环 35 次 ,72℃ 延伸 10min。

1.2.2 重组表达质粒 pTrcHisB-GDF8 的构建 :RT-PCR 扩增得到的鸡 GDF-8 cDNA 经琼脂糖凝胶电泳分离 ,采用 glass milk 法回收纯化 ,具体过程参见 DNA 回收试剂盒说明。用 BamHI 和 XhoI 双酶切 ,连接至 pTrcHisB 相应的酶切位点之间 ,转化大肠杆菌 Top10 ,小量法提取质粒进行酶切鉴定与 PCR 鉴定。具体步骤参见文献[7]。

1.2.3 GDF-8 在大肠杆菌中的诱导表达 :含重组质粒 pTrcHisB-GDF8 的大肠杆菌 Top10 在 LA 液体培养基中 37℃ 震荡培养过夜(Amp 浓度为 100 μ g/ μ L) ,用新鲜培养基按 1:5 稀释 ,继续培养 1h ,加 IPTG 至终浓度 1mmol/L ,继续诱导培养 4.5h 后取 1mL 培养液离心收集菌体 ,加入 100 μ L H₂O 和 100 μ L 2 \times SDS Loading Buffer ,100℃ 煮沸 10min。得到的全菌

收稿日期 2000-12-18 ,修回日期 2001-02-26。

基金项目 国家 863 高技术研究与发展计划项目基金资助(21-04-06)和黑龙江省攻关项目。

* 通讯作者。Tel 86-451-6412865 ;Fax 86-451-6412865 ;E-mail :dahaizhu@hotmail.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色进行检测。

1.2.4 GDF-8 重组蛋白的分离纯化 经鉴定半长的 GDF-8 重组蛋白为可溶性蛋白。因此大量培养及诱导经转化的 Top10 大肠杆菌,收获的菌体在冰浴中超声破碎,离心收集上清液(4℃,15000r/min,15min)。用镍亲和和层析的方法分离带有 6 个组氨酸的重组 GDF-8 融合蛋白:将样品与镍-琼脂糖介质在 4℃ 条件下作用 1h 后装柱,用含 10mmol/L 及 20mmol/L 咪唑的 MCAC 溶液洗杂蛋白,再用含 100mmol/L ~ 500mmol/L 咪唑的 MCAC 溶液洗脱目的蛋白,最终分离得到纯化的鸡 C 端半长 GDF-8 重组蛋白。

2 实验结果

2.1 鸡半长 GDF-8 cDNA 的克隆和重组表达质粒的构建

从鸡的骨骼肌组织中提取总 RNA,并以此为模板进行 RT-PCR 反应扩增得到 3' 一侧的半长 GDF-8 基因。扩增片段长度相当于 527bp,与设计基本相符。电泳回收的 PCR 产物与 pTrcHisB 载体连接并转化感受态大肠杆菌 Top10 后,经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切以及 PCR 鉴定重组质粒。琼脂糖凝胶电泳结果表明,插入片段长度约为 527bp,与预期基本一致。结果见图 1。

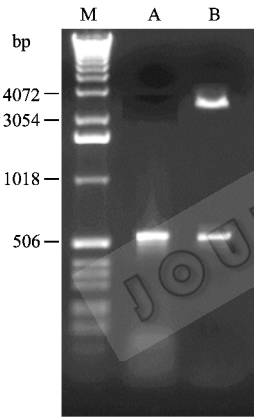


图 1 RT-PCR 与酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product of GDF-8 gene and digestion of recombinant plasmid with *Bam*HI and *Xho*I

M. DNA molecular weight marker ; A. RT-PCR product of 3'half-length chicken GDF-8 ; B. Recombinant plasmid digested with *Bam*HI and *Xho*I

2.2 鸡半长 GDF-8 在大肠杆菌中的诱导表达

高效原核表达载体 pTrcHisB 的启动子为来源于 *trp* 与 *lac* 的杂合启动子,其自身编码 *lacO* 操纵子与 *lacI^q* 抑制子基因,同时其 N 端编码了 6 个组氨酸的标签以利于快速纯化。本实验以 Top10 作为宿主菌,利用 IPTG(终浓度 1mmol/L)诱导表达,对蛋白表达产物进行 12% SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色。诱导表达的融合蛋白分子量约为 20kD,与预期结果相一致。结果如图 2。

2.3 重组融合蛋白 GDF-8 的纯化

对转入重组质粒的宿主菌 Top10 进行大规模培养及诱导表达,离心收集菌体并进行超声破碎,离心取上清液进行

镍离子柱亲和和层析,分步洗脱并收集目的蛋白洗脱液,所得纯化产物的 SDS-PAGE 结果如图 3 所示。

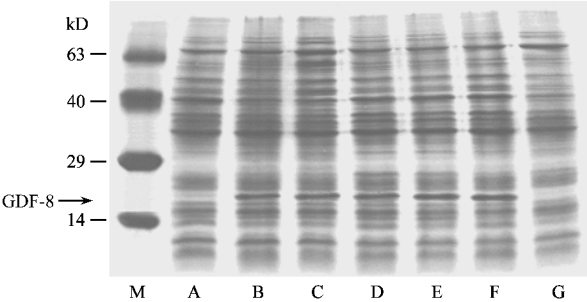


图 2 鸡 GDF-8 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE assay of expression products of chicken GDF-8 gene in *E. coli*

M. Protein size marker ; A. G. *E. coli* Top10 carrying plasmid pTrcHisB-GDF8 without induction ; B ~ F. *E. coli* Top10 carrying plasmid pTrcHisB-GDF8 after induction for 4.5h

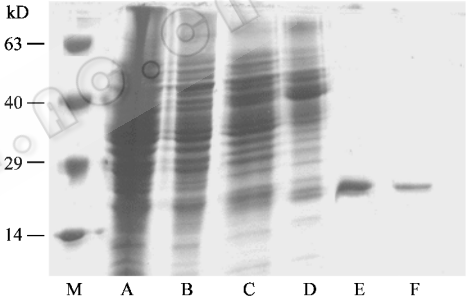


图 3 鸡 C 端半长 GDF-8 表达产物亲和层析 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE assay of affinity chromatography products of chicken C-terminal GDF-8

M. Protein size marke ; A. Whole bacteria proteins before loading Ni^{+} -NTA affinity chromatography column ; B. Flow-out liquid from Ni^{+} -NTA affinity chromatography column ; C. Wash liquid with 10mmol/L imidazole MCAC ; D. Wash liquid with 20mmol/L imidazole MCAC ; E. Wash liquid with 200mmol/L imidazole MCAC ; F. Wash liquid with 500mmol/L imidazole MCAC

3 讨 论

本研究试图通过 RT-PCR 的方法扩增得到并克隆鸡 GDF-8 基因的全长 cDNA,再进行诱导表达,然而检测结果并不理想。这可能是由于完整 GDF-8 蛋白的结构对宿主菌的生长发育具有一定的毒害作用。因此选用 GDF-8 3' 端半长 cDNA 进行诱导表达,表达量仍然不是很高,但可以通过大量培养与亲和层析纯化的方法得到较多量的目的蛋白,从而为进一步研究 GDF-8 的功能奠定了基础。

产蛋鸡和肉用仔鸡经过长期的遗传选育在生长发育上有着根本的差异,特别是在骨骼肌的生长发育方面,肉用仔鸡骨骼肌的发达程度远远高于产蛋鸡。这种骨骼肌生长发

育的差异使禽类成为我们研究动物肌细胞的生长和分化的

比较好的动物模型。这也是本实验选用鸡为实验材料的初衷。

从目前国内外的研究来看,对 GDF-8 如何控制骨骼肌细胞生长发育的分子机理一无所知。但我们已经知道,TGF- β 超家族生长因子是通过与其细胞表面受体相结合引起受体的自身磷酸化或诱导下一步级联放大反应来发挥他们在细胞内的生物学作用的^[8]。可以推测,鸡的 GDF-8 在控制骨骼肌生长发育时可能是通过与其受体的相结合而将分子信号传递给细胞,最终导致肌细胞停止生长或引起肌细胞凋亡,从而抑制了骨骼肌的生长。本实验克隆了鸡 GDF-8 基因并分离和提纯了 GDF-8 蛋白,从而为寻找鸡 GDF-8 的受体,研究在信号传递中它与其受体相结合对骨骼肌生长发育的调控机制奠定了基础。这一研究工作还将为进一步深入探讨骨骼肌生长发育的机理积累新的理论基础。

作为骨骼肌生长抑制因子,GDF-8 基因的克隆及表达产物的分离提纯在实践上也有重要作用。一旦 GDF-8 的作用机制得以阐明,根据 GDF-8 特有的生理功能,可以设想,敲除 GDF-8 后将消除其对鸡骨骼肌生长发育的抑制作用,使骨骼肌生长加快,从而培育出超速生长的肉用仔鸡,这将为畜牧业食用肉类的动物育种开辟一条新途径。在临床应用方面,阐明人 GDF-8 基因的结构和功能,可以对临床上某些肌肉相关疾病的诊断、治疗和预后提供理论依据。比如,Robert E 等^[9]发现人的 GDF-8 保守区有多态性,可以作为肌肉相关性状的选择标记用于临床检测。GDF-8 的剔除也有望用于肌肉萎缩症的治疗。而所有这些设想的实现都有赖于在克隆 GDF-8 并分离提纯其蛋白的基础上作进一步的研究和探讨。

REFERENCES (参考文献)

- [1] McPherron A C ,Lawler A M ,Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* ,1997 , 387 (6628) 83 ~ 90
- [2] Palmiter R D ,Brinster R L ,Hammer R E *et al* . Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* ,1992 ,300 (5893) 611 ~ 615
- [3] Grobet L ,Martin L J ,Poncellet D *et al* . Adeletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* , 1997 ,17 :71 ~ 79
- [4] McPherron AC ,Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,94 (23) :12457 ~ 12461
- [5] Gonzalez-Cadavid N F. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 ,95 (25) :14938 ~ 14943
- [6] McPherron A C ,Lee S J. Submitted (15-AUG-1997) Molecular Biology and Genetics , Johns Hopkins University School of Medicine ,725N. Wolfe St. ,Baltimore ,MD21205 ,USA
- [7] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [8] Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* ,1998 ,67 : 753 ~ 791
- [9] Ferrell R E ,Conte V ,Lawrence E C *et al* . Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics* ,1999 ,62 (2) 203 ~ 207

Cloning ,Expression and Purification of the Chicken Growth and Differentiation Factor-8

YANG Wei WANG Hai-Xia CHEN Yan ZHANG Yong ZHU Da-Hai*

(Department of Life Science and Engineering ,Harbin Institute of Technology ,Harbin 150001 ,China)

Abstract Growth and Differentiation Factor-8 (GDF-8) is a new member of TGF- β super-family. It has been shown that GDF-8 is specifically expressed in skeleton muscle in mouse and its function is to inhibit the growth of muscle cell ,so it is named as *Myostatin* . Here ,we amplified 3'half-length GDF-8 cDNA from chicken skeleton muscle by RT-PCR ,and cloned it into the prokaryotic expression vector pTrcHisB ,which was then transformed into *E. coli* Top10 cells. The recombinant 6 \times His-GDF-8 fusion protein expressed in the Top10 cells was purified by Ni⁺ -Affinity Chromatography for future study.

Key words GDF-8 , fusion protein , expression , purification

Received :December 18 ,2000

This work was supported by grant from National High Technology Program (21-04-06).

* Corresponding author. Tel 86-451-6412865 ,Fax 86-451-6412865 ,E-mail :zhaizhu@hotmail.com

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