猪 Follistatin cDNA 克隆及在大肠杆菌中的表达

Porcine Follistatin cDNA Cloning and Expression in Escherichia coli

HE Xin^{1} $^{A\Gamma}$, QI $Bing^{1}$ $^{A\Gamma}$, HE Li-Qian 2 , CHEN Yong-Fu 3 , LIU Gui-Sheng 1 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 A 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^[23]。Follistatin(FS)——卵泡抑制素,对垂体促卵泡素(FSH)具有抑制作用,故又名为FSH抑制蛋白(FSH-suppressing protein,Follistatin)⁴¹。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.

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

 Γ 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。

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^[56];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 DH5α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-亚甲叉双丙烯酰胺、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 40μL 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 产物经低融点胶回收,与克隆载体 pGEM-T连接 转化 DH5α,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 ,低融点胶回收片段 ,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 $DH5\alpha$,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℃培养 $10 \sim 16$ h。 挑选 $4 \sim 6$ 个单菌落分别接种到含相应抗生素的 5 mL LB 管中,于 37 $\mathbb C$ 剧烈摇动培养 $8 \sim 12$ h;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 5 mL 新鲜 LB 管中,37 $\mathbb C$ 剧烈摇动培养 $1 \sim 1.5$ h,使菌液的 $0D_{60}$ 达到 $0.6 \sim 0.8$ 。向上述其中一个转接管中加入终浓度为 $0.1 \sim 1$ mmol/L 的 IPTG 37 $\mathbb C$ 继续培养 $3 \sim 4$ h。 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℃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-PACE 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切胶纯化回收后 ,与克隆载体 pGEM-T 连接 ,转化 DH5 a 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余氯基酸矿 经前净机搜索 EMBL/GenBank/n

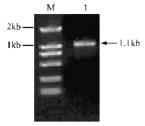


图 1 PCR 扩增的 Follistatin cDNA 电泳图 Fig. 1 PCR for Follistatin cDNA M:DL2000 DNA marker;1:PCR production.

DDBJ 数据库确认该 cDNA 与牛、羊 Follistatin cDNA 的同源性较高,命名为 PFS 即猪 Follistatin,并已登陆 GenBank,其全序列的接受号为 AJ 783901。该基因

CCAGA

在距离起始密码子 ATG 上游 = 3 区和下游 + 4 区位上分别是 A 和 G ,这种围绕启始密码子的序列特征是高效转录基因启始的一致信号 ,因而进一步证实 Follistatin 具有重要的生理功能。

2.2 猪 Follistatin 与其它物种的同源性比较及进化 树分析

利用 Clastal W 软件对各个物种的 Follistatin 基因序列进行比对(图 3)和进化树分析(图 4)。猪 Follistatin 蛋白序列与其它物种该蛋白同源性的比较结果表明:Follistatin 在进化上处于高度保守的状态,从低等的爪蟾到斑马鱼至小鼠、人都具有很高的同源性。

1 ATGGTCCGTCCCAAGCACCAGCCCGGCGGCTATGCCTCCTGCTGCTGCTGCTGCCAG 1 M V R P K H Q P G G L C L LLLC L L TTCATGGAGGACCGCAGCCCCAGGCTGGGAATTGCTGGCTCCGCCAAGCAAAAAACGGC MEDRSA С Q A G N W L RQA 121 CGCTGCCAGGTCCTGTATAAAACCGAACTGAGCAGGAGGAGTGCTGCAGCACCGGCCGC V L Y s KEECC R C Q K Т E L 181 CTGAGCACCTCCCGGACTGAGGAGGACGTAAACGACAACACACTTTTCAAGTGGATGATT NT ST S R Т E E D V N D F K W L 241 TTCAATGGAGGTGCCCCCAGCTGCATCCCATGTAAAGAAACGTGCGAGAACGTGGACTGT N G GAP s c T PC K E Т C Ε v 301 GGGCCCGGGAAAAATGCCGAATGAACAAGAAGAACAAACCCCGCTGCGTCTGCGCCCCG K C PGK R M N K K N K P R С 361 GATTGTTCTAACATCACCTGGAAAGGCCCAGACTGTGGGCTGGATGGGAAAACCTACCGC SNITW G P D CGL K D G K 421 AACGAATGTGCTCTCCCCAAGGCCAGATGTAAAGAACAGCCGGAACTGGAAGTCCAGTAC ECA С K L L P K Α R Ε Q Ρ E 481 CAAGGCAAATGTAAAAAGACCTGTCGGGATGTTTTCTGTCCAGGCAGCTCCACATGTGTG GKC K K V F C G S т CRD P 541 GTGGACCAGACTAATAATGCCTACTGTGTGACATGTAACCGCATTTGCCCAGAGCCCACC DQT N N Α Y C V т N R Ι С 601 TCCTCAGGACAGTATCTCTGTGGGAATGATGGAGTGACCTACTCCAGTGCCTGTCACCTG S G Q Y L C G N D G т S 661 AGAAAGGCTACCTGCCTACTGGGCAGATCTATTGGATTGGCCTATGAGGGAAAGTGTATC I CLL GRS L Α 721 AAAGCAAAGTCCTGTGAAGACATCCAGTGCACTGGTGGAAAAAAGTGCTTATGGGATTTC AKS E D Q C G G 781 AAGGCTGGCAGAGGCCGTTGTTCCCTCTGCGATGAGCTGTGCCCTGAGAGTAAGTCTGAG R C SLC E L С Ρ S 281 E KEA PVC S D NAT YAS E С 901 GCCTGTTCCTCAGGTGTGCTGCTGGAAGTAAAGCACTCTGGATCTTGCAACTCCATTTCA N C S S GVL v K H S G S C SIS L Ε 961 GAAGACACCGAGGAGGAGGAGGAAGATGAAGACCAGGACTACAGCTTTCCTATATCTTCT 321 E D T E E E Ε E D E D Q D Y S F 1021ATTCTAGAGTGGTAA 341 I L E W *

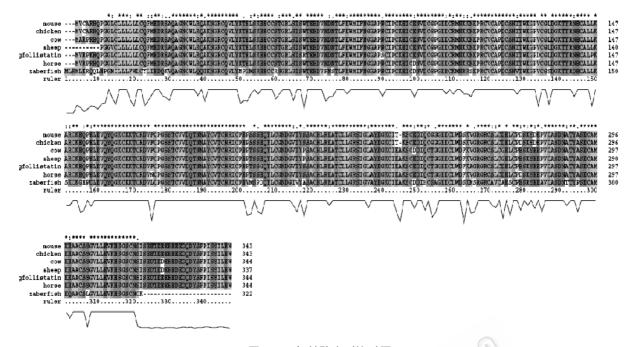


图 3 FS 氨基酸序列比对图

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

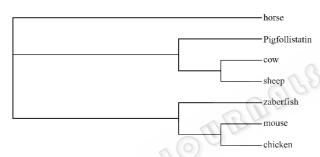


图 4 Follistatin 进化树

Fig.4 Phlogenetic tree of Follistatin

2.3 Follistatin 基因在大肠杆菌中的表达

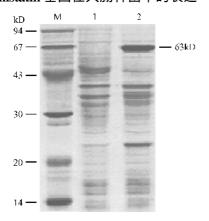


图 5 FS 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

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

M : standard protein marker ; $\mathbf{1}$: sample before IPTG induction ; $\mathbf{2}$: sample after IPTG induction.

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)。

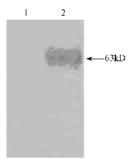


图 6 FS cDNA 表达产物的蛋白杂交分析 Fig. 6 Western blot analysis of FS cDNA expression products in *E. coli*

 $\boldsymbol{1}$; sample before IPTG induction ; $\boldsymbol{2}$; 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 海量線上进而得到促进循肌肉持续生长效果。s. im ac. cn

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-muscled 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 greaterin 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 , 3 551 – 659

- [5] Amthor HG , Nicholas I , Mckinnell C *et al* . Follistatin complexes Myostatin and antagonizes Myostatin-medated inhibition of myogeneses. *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, Mcpherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proceedings of National Academy of Sciences, 2001, 98: 9306 – 9311