

青岛文昌鱼肌球蛋白重链基因片段的重组表达

马俊凯^{1,2}, 谭训刚¹, 张培军¹, 徐 芑^{1,2}, 邢福国^{1,2}, 徐永立¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 将青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 肌球蛋白重链基因片段亚克隆到 pET-30a 质粒, 构建出重组表达载体并转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 中。经 SDS-PAGE 和 Western 杂交检测表明, 在 IPTG 诱导下含有重组载体的菌株可表达分子质量约 30 ku 的融合蛋白。诱导条件优化实验结果显示, 该菌株经 0.2 mmol/L IPTG 诱导 1 h 就可大量表达此蛋白。可溶性实验确认该重组蛋白是可溶性蛋白。本研究为文昌鱼肌球蛋白重链特异性抗体的制备奠定了基础。

关键词: 青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*); 肌球蛋白重链 (MyHC); 重组表达

中图分类号: Q 786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)06-0052-04

肌球蛋白是构成骨骼肌粗丝的主要成分, 为一种重要的肌动蛋白依赖型的马达蛋白^[1-3], 一般由一对重链 (MyHC) 和两对轻链 (MLC) 组成。肌球蛋白重链 (MyHC) 具有 ATPase 活性、肌动蛋白结合位点以及 α 螺旋卷曲螺旋 (α helix coiled coil) 尾部等重要特性^[4], 是决定肌纤维收缩性质的主要分子之一, 在许多物种中得到了广泛研究; 但是目前有关文昌鱼 MyHC 的报道还很少^[5,6]。文昌鱼具有与脊椎动物相似但更为简单的身体发育图式, 是研究脊椎动物起源与进化的重要模式动物。虽然文昌鱼成体肌细胞在细胞水平上类似于脊椎动物早期胚胎肌细胞^[7], 但是却不能被抗脊椎动物 MyHC 的抗体所识别^[8], 因而文昌鱼的 MyHC 序列与脊椎动物 MyHC 序列之间存在较大差别。因此, 通过分子生物学的手段对文昌鱼 MyHC 基因进行研究将加深人们对脊椎动物早期肌肉进化机制和 MyHC 多样性的认识。

在本实验中, 作者将 PCR 扩增得到的青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 成体肌球蛋白重链基因片段亚克隆到 pET-30a 载体上, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 中进行了重组表达, 获得了具有组氨酸标签 (His-tag) 的可溶性融合蛋白, 为制备文昌鱼肌球蛋白特异性抗体提供了很好的材料, 并为进一步了解文昌鱼肌球蛋白的结构和功能打下了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

青岛文昌鱼成体采集于青岛沙子口, 饲养于中

国科学院海洋研究所水族楼中, 每天投喂单胞藻或螺旋藻, 换水并连续充气。

1.2 试剂

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, AMV 反转录酶和 Taq 酶购自上海 Promega 公司, pUCnrT 质粒、IPTG 和 DAB 购自上海生工生物工程有限公司, 胶回收试剂盒购自华舜公司, 限制性内切酶和 T4 连接酶购自大连宝生物 (Takara) 公司, 质粒 pET-30a 购自 Novagen 公司, 鼠抗组氨酸标签 (Anti His) 单克隆抗体和分子量标准购自 Tiangen 公司, HRP 标记羊抗鼠二抗购自中杉金桥公司, 硝酸纤维素膜购自 Pore 公司, B-per 试剂购自 Pierce 公司, 其余均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 重组表达质粒的构建

使用 TRIzol 试剂提取文昌鱼成体总 RNA, AMV 反转录酶反转合成 cDNA 第一链。以此 cDNA 为模板, 使用 Taq 酶进行 PCR 扩增, 反应条件为:

收稿日期: 2006 12 07 修回日期: 2007 03 20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (B12032407)

作者简介: 马俊凯 (1980-), 男, 回族, 山东济宁人, 硕士, 主要从事海洋动物分子发育生物学研究, 电话: 0532-82898559, E-mail: mjk_wz@126.com; 谭训刚, 通讯作者, 电话: 0532-82898559, E-mail: tanxgj@yahoo.com; 张培军, 通讯作者, 电话: 0532-82898551, E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 72℃延伸 10 min。引物^[6]分别为: mhc5: 5'-ATTGACGACGAACAGAGGCAAG-3'; mhc3: 5'-TCACTGGAAGCTCAGCTGCTTGA-3'; 3' 加入了终止密码子 TGA。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳回收, 克隆到 pUCmrT 载体中 (pUG mhc) 并测序。

利用限制性内切酶 *NotI* 和 *XhoI* 将目的片段从 pUG mhc 中释放出来, 纯化后与经过同样酶切并纯化的表达质粒 pET-30a 相连, 得到具有组氨酸标签 (His tag) 的重组表达质粒 (pET-mhc)。将 pET-mhc 转化大肠杆菌 *E. coli* XLI-blue 感受态细胞, 涂布含卡那霉素的 LB 平板, 37℃培养过夜。挑取单菌落, 扩大培养, 提取质粒。经 *NotI* 和 *XhoI* 双酶切初步鉴定出阳性质粒, 然后将阳性质粒测序, 验证其读码顺序是否完全正确。

1.3.2 重组蛋白的表达和检测

将读码顺序正确的 pET-mhc 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂布含卡那霉素的 LB 平板, 37℃培养过夜。挑取单克隆接种到 2.5 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃, 200 r/min 振荡培养过夜, 然后按 1:100 比例稀释转接并继续培养至 A_{600} 值为 0.7~0.8, 经 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h。以未加 IPTG 诱导的菌液为空白对照, 进行 SDS-PAGE (12% 分离胶, 5% 浓缩胶) 和 Western 杂交检测。随后通过分别改变 IPTG 终浓度和诱导时间两个因素, 对诱导条件进行了优化。首先将诱导时间设定为 3 h, IPTG 终浓度分别设为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L; 在确定最适的 IPTG 终浓度后, 保持 IPTG 终浓度不变, 分别诱导 1, 2, 3, 4, 5 h, 确定最佳的诱导时间。

1.3.3 重组蛋白的可溶性检验

为检测重组蛋白在菌体中的存在形式, 用 B per 试剂处理诱导后的菌体, 分别收集上清和沉淀进行 SDS PAGE 和 Western 杂交检测。具体操作如下: 取 1 mL 菌液, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体; 加入 100 μ L B per 重悬菌体反复吹打直至匀浆化, 漩涡震荡 1 min; 13 000 r/min 离心 5 min, 分别收集上清和沉淀。100 μ L B per 重悬沉淀, 上清和沉淀各取 10 μ L 用于 SDS PAGE 和 Western 杂交检测。

2 结果

2.1 青岛文昌鱼肌球蛋白重链基因片段的重组表达

将 PCR 扩增产物测序结果进行同源性比较和序

列分析, 发现该序列全长 594 bp (该序列已被 GenBank 接受, 序列号为 EF471042), 编码位于肌球蛋白重链尾部的 197 个氨基酸, 预测有 α 螺旋卷曲螺旋 (α helix coiled coil) 结构。该序列与日本文昌鱼相应片段氨基酸的 (gi23491588) 同源性为 63%; 并与其它多种生物对应 MyHC 序列具有较高的同源性, 例如, 与七鳃鳗 MHC (gi38347761) 同源性为 48%, 与爪蟾 vMHC (gi59544096) 同源性为 46%, 与鸡 skMHC (gi6683485) 同源性为 48%, 与人 MHC (gi558669) 同源性为 47%。因此可以确认作者得到的确为肌球蛋白重链基因片段。

pET-mhc 经 *NotI* 和 *XhoI* 双酶切, 获得了分子量大小约 600 bp 的片段 (图 1), 与目的片段大小相吻合, 说明青岛文昌鱼肌球蛋白重链基因片段已克隆到 pET-30a 中。测序结果表明插入片段的阅读框架完全正确。

对 0.6 mmol/L IPTG 诱导 3 h 条件下的产物进行 SDS PAGE 及 Western 杂交分析。结果表明有一条分子质量大约 30 ku 的特异性蛋白带出现 (图 2A), 并且该蛋白能被抗组氨酸标签的单抗特异性识别 (图 2B), 因此可以肯定这个分子质量大约 30 ku 的蛋白就是含有组氨酸标签 (His tag) 的青岛文昌鱼肌球蛋白重链融合蛋白, 其大小和预测的融合蛋白大小相吻合。

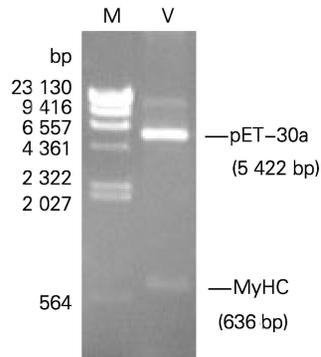


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant vector

M. 为核酸分子量标准 (λ DN A/Hind III); V 表示 *NotI* 和 *XhoI* 双酶切后的重组表达载体

M: Marker (λ DN A/Hind III); V: Recombinant vector after enzyme digestion

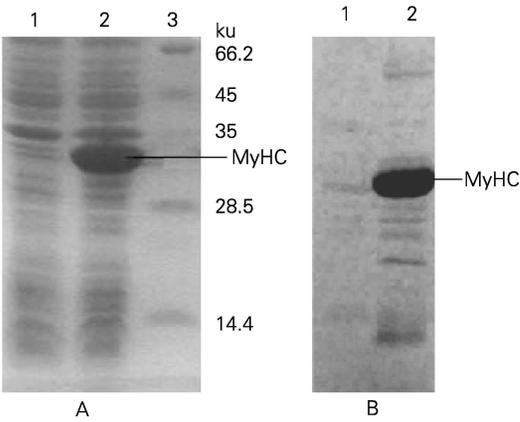


图2 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳和 Western 杂交检测

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot of recombinant protein
A. SDS-PAGE; B. Western 杂交; 1. 阴性对照 (未加 IPTG 诱导的菌体); 2. 0.6 mol/L IPTG 诱导 3 h 条件下的产物; 3. 蛋白质分子质量标准

A. SDS-PAGE; B. Western blot; 1. Negative control; 2. The expression of recombinant protein after 3 h induction of 0.6 mol/L IPTG; 3. Marker

2.2 重组蛋白表达条件的优化

为快速、经济地大量制备该蛋白, 作者对蛋白表达的诱导条件进行了优化。结果显示, 当诱导时间固定在 3 h 时, 0.2 mol/L 的 IPTG 即可使融合蛋白得到大量表达 (图 3A), 并且随着 IPTG 浓度的增大蛋白产量没有发生明显的变化。随后在 IPTG 终浓度固定为 0.2 mol/L 的条件下, 融合蛋白的产量没有随着时间的延长而呈现出明显的变化, 因此诱导 1 h 是较合适的 (图 3B)。所以, 作者确定最快速、经济的诱导体系为: IPTG 终浓度 0.2 mol/L, 诱导时间 1 h。

2.3 重组蛋白的可溶性检验

重组蛋白是以包涵体还是可溶状态存在, 决定了其纯化的方式及后续工作复杂程度。若以包涵体存在, 重组蛋白将在变性状态下进行纯化, 纯化后还需要进一步复性, 才能够进行相关的应用; 而以可溶状态存在的蛋白纯化后不需要复性就可以进行相关的应用, 省去了复性的麻烦。SDS-PAGE (图 4A) 以及 Western 杂交 (图 4B) 检测结果表明, 经过 B per 试剂处理后得到的上清中含有绝大部分的融合蛋白, 并且此蛋白可被抗组氨酸标签 (His tag) 的单克隆抗体特异性识别。该检测表明此融合蛋白在菌体中主要以可溶状态存在。

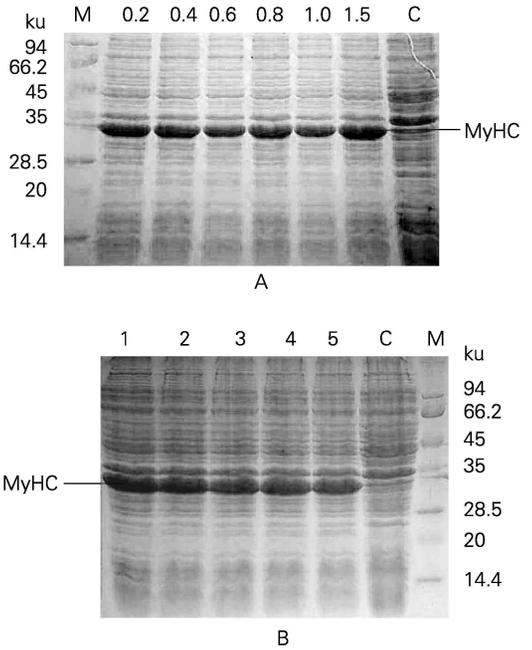


图3 重组蛋白在不同诱导条件下的表达

Fig. 3 The expression of recombinant protein under different inducing conditions

A. 重组蛋白在不同浓度 IPTG 诱导下的表达; M. 蛋白质分子质量标准; C. 阴性对照; 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 分别表示 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 mol/L 的 IPTG; B. 重组蛋白在不同诱导时间后的表达; 1, 2, 3, 4, 5 分别表示诱导时间 1, 2, 3, 4, 5 h

A. The expression of recombinant protein by different concentrations of IPTG; M. Marker; C. Negative control; 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 mol/L IPTG; B. The expression of recombinant protein by different inducing times; 1, 2, 3, 4, 5 h

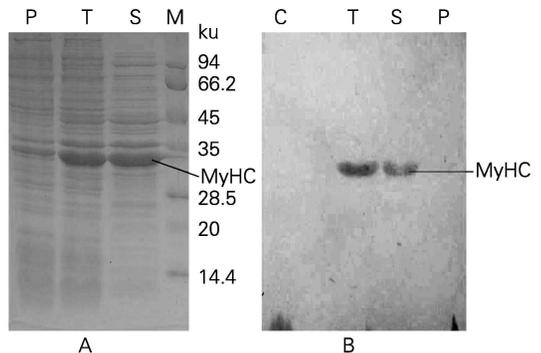


图4 B per 试剂处理后融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western 杂交检测

Fig. 4 Solubility testing experiment of recombinant protein
A. SDS-PAGE; B. Western 杂交; P. 沉淀; T. 菌体全部诱导产物; S. 上清; M. 蛋白质分子质量标准; C. 阴性对照

A. SDS-PAGE; B. Western blot; P. Pellet; T. Total induced proteins; S. Supernatant; M. Marker; C. Negative control

3 讨论

pET-30a 是常用的融合表达载体,其表达的融合蛋白由于具有组氨酸标签而易于检测和纯化。在本实验中,作者首次将青岛文昌鱼肌球蛋白重链尾部基因片段亚克隆到 pET-30a,表达出了可溶性的融合蛋白。根据克隆到的肌球蛋白重链基因核苷酸序列推测蛋白质分子质量大小约为 23 ku,加上融合表达的部分,预测融合蛋白分子质量为 30 ku 左右,与 SDS-PAGE 和 Western 杂交检测结果相一致。在培养温度不变的条件下, IPTG 浓度和诱导时间对蛋白的表达量影响不大,低浓度的 IPTG (0.2 mmol/L) 和较短的诱导时间(1 h) 就可以使融合蛋白得到大量表达。

此融合蛋白表达量大、可溶,很适合用来制备针对文昌鱼肌球蛋白的多克隆抗体,对文昌鱼肌肉发育模式的研究有一定的意义。肌球蛋白是一种具有 ATPase 活性的收缩蛋白,是使肌纤维行使正常功能的必要蛋白;而其 ATPase 活性由肌球蛋白重链所控制,不同重链异构体的存在使肌纤维可以表现出不同的收缩速度和代谢特性。Flood^[9]通过组织学方法在文昌鱼肌节中发现了与鱼类快、慢肌类似的两种肌纤维,但在生化及分子水平还未得到证实;Miller^[8]用 5 种在脊椎动物中应用广泛的抗肌球蛋白重链单克隆抗体对文昌鱼肌肉进行免疫杂交也未获得成功。目前有两种方法常用来检测肌肉组织中肌纤维异构体的组成,即聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫组化,在文昌鱼中还未见到有相关研究报道。作者的可溶性重组蛋白可用来制备多克隆抗体,从而对聚丙烯酰胺凝胶电泳结果进行鉴定,甚至可以筛选出特定的单克隆抗体进行免疫组化,这将有助于加深对文昌鱼肌纤维的认识。

参考文献:

- [1] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 第三版,北京:高等教育出版社,2002. 218-220.
- [2] Foth B J, Goedecke M C, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification [J]. *PNAS*, 2006, **103**(10): 3 683-3 686.
- [3] Goodson H V, Dawson S C. Multiplying myosins [J]. *PNAS*, 2006, **103**(10): 3 498-3 499.
- [4] Weiss A, Schiaffino S, Leinwand L A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: Implications for functional diversity [J]. *J Mol Biol*, 1999, **290**: 61-75.
- [5] Holland L Z. Muscle development in amphioxus: morphology, biochemistry, and molecular biology [J]. *Israel Journal of Zoology*, 1996, **42**: 235-246.
- [6] Urano A, Suzuki M, Zhang P J, et al. Expression of muscle related genes and two MyoD genes during amphioxus notochord development [J]. *Evolution & Development*, 2003, **5**(5): 447-458.
- [7] Holland L Z, Pace D A, Blink M L, et al. Sequence and expression of amphioxus alkali myosin light chain (AmphiMLC-alk) throughout development: Implications for vertebrate myogenesis [J]. *Dev Biol*, 1995, **171**: 665-676.
- [8] Miller J B, Teal S B, Stockdale F E. Evolutionarily conserved sequence of striated muscle myosin heavy chain isoforms [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**: 13 122-13 130.
- [9] Flood P R. Structure of the segmental trunk muscle in amphioxus, with notes on the course and endings of the so-called ventral root fibers [J]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1968, **84**: 389-416.

Recombinant expression of Qingdao amphioxus myosin heavy chain gene fragment

MA Jun-kai^{1,2}, TAN Xun-gang¹, ZHANG Pei-jun¹, XU Peng^{1,2}, XING Fur-guo^{1,2}, XU Yong-li¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Dec. 7, 2006

Key words: Qingdao amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*); Myosin heavy chain (MyHC); recombinant expression

Abstract: Qingdao amphioxus myosin heavy chain gene fragment was subcloned into plasmid pET-30a to construct a His-tagged recombinant plasmid pET-mhc. Then the pET-mhc was transformed into *Escherichia coli* BL21 to express the recombinant protein when the IPTG was presented in the culture medium. The fusion protein was expressed and confirmed about 30 ku by SDS-PAGE and Western blot. The concentration of the IPTG and the length of inducing time often affected the protein expression level, so they were optimized. It was found that the protein can be expressed at high level after being induced by 0.2 mmol/L IPTG for 1 h. The recombinant protein was proved to be soluble through the solubility testing experiment.

(本文编辑:张培新)