

肌抑素(Myostatin)基因突变体活性区的 克隆、表达及活性的研究

杨兴元 侯 健 安晓荣 关 宏 苟克勉 杨树洪 陈立栋 陈永福*

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 生物学院 北京 100094)

摘 要 肌抑素 Myostatin 是肌肉发育的重要抑制因子,肌抑素的突变,使其抑制功能的全部或几乎全部丧失,表现为肌肉细胞的增大和肌纤维束的增加。采用 PCR 技术,从肌抑素天然突变的双肌牛皮尔蒙特(Piedmontese)的基因组中扩增得到肌抑素突变体的活性区,并将其亚克隆到 pMD18-T 载体上,利用基因重组技术,构建原核表达质粒 pET30a(+)-action/Myostatin,在大肠杆菌中高效表达,采用亲和层析法纯化表达产物,并将其共孵育于离体培养的绵羊肌肉细胞,检测肌抑素突变体的生化活性,结果显示肌抑素的突变体具有促进肌肉细胞增生和增殖的功能。

关键词 牛 Myostatin, 突变体, 肌肉细胞, 增殖增生

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0480-04

肌肉的产量是肉用家畜和家禽的重要经济性状,对饲养业的经济效益起决定性作用。半个世纪以来,育种工作者通过常规育种方法,培养出许多生长速度快、瘦肉率高、节省饲料的畜群品种,并且研究了主宰这些优良经济性状的主效基因,其中最使人感兴趣的是造成牛肌肉异常发达的“双肌”性状的基因。2001年,由 Michel Georges 领导的研究组,历经十余年的研究,发现比利时蓝牛(Belgium Blue)的双肌性状是由于肌抑素基因突变造成的^[1]。与此同时,由美国农业部的 Tim Smith 领导的研究组和由霍普金斯大学的 Sejin Lee 领导的研究小组也发现比利时蓝牛以及皮尔蒙特牛(Piedmontese)的双肌性状,是肌抑素基因突变造成的^[2,3]。基因敲除实验和体内表达肌抑素拮抗因子的实验,证明肌抑素基因是限制肌肉超常发育的负调控基因^[8-10],任何可以干扰肌抑素基因表达或表达产物活性的措施,都有可能刺激肌肉超常发育^[3-5]。

上述研究表明,肌抑素基因是一个提高畜禽肌肉产量的重要基因,通过分子生物学手段操纵肌抑素基因可以获得重大经济效益。国外研究的主流是试图通过基因敲除和转基因的方法达到上述目标。然而,基因敲除需要很长时间才能取得实效,转基因方法又会面对消费者对转基因食品接受问题,均会影响对这个提高畜牧业生产效益有重大潜在作用的基因利用。因此,应用一个高效表达系统生产肌抑素的拮抗因子,作为一种药物来调节它的机能,从而增加肌肉产

量,就成为另一种技术选择。作为这一思路的可行性研究,本文报道克隆和表达皮尔蒙特牛的肌抑素基因活性区突变基因,并通过离体培养的肌肉细胞检测其生理活性。

1 材料与方法

1.1 化学试剂和实验材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 为本实验室冻存,绵羊骨骼肌来自昌平实验站。各种限制酶购自美国 Promega NEB 公司, dNTPs、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺及培养基、蛋白胨、购自 Sigma 公司, Taq 酶为华美产品, DNA 纯化试剂盒、其他化学试剂为国产或进口分装。图像分析系统 ImageMaster VDS 图象处理系统为 Pharmacia Biotech 公司。细胞培养溶液和用品购自 Gibco 公司。

1.2 Myostatin 突变体生物活性片段的扩增、克隆与鉴定

本实验从纯种皮尔蒙特牛血样(中国农科院畜牧研究所)中提取总基因组 DNA(参见分子克隆)根据 pET-30a(+)表达载体(Invitrogen 公司)多克隆位点区特点和 Myostatin 活性区氨基酸序列设计引物(由上海生物技术工程公司合成),上游引物 5'-GCTGCAGACTCCTTTTGAAGTCAAG-3'引入 Sac I 位点,下游引物 5'-CGGTACCTCATGAACACCCACAGCGATC-3'引入 Pst I 位点,以皮尔蒙特牛总基因组为模板,PCR 扩增 0.39kb 的 Myostatin cDNA 的生物活性编码区域,以 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 次循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 凝胶电泳回

收稿日期 2003-02-28, 修回日期 2003-04-23。

基金项目 本研究受国家“863”计划项目(No. 2002AA206311)资助。

* 通讯作者。 Tel 86-10-62893463; Fax 86-10-62893463; E-mail zhncau@public3.beta.net.cn

收与 pMD18-T(大连宝生物)重组。重组质粒经限制酶鉴定、DNA 序列分析筛选(100 mg/L)阳性克隆,阳性克隆命名为 pMD18-T-action/Myostatin。

1.3 Myostatin 原核表达质粒的构建

将 MD18-T-action/Myostatin 经 *Sal* I, *Eco* R I 双酶切消化后,并将其克隆至 pET30a(+)载体(Invitrogen 公司),转化大肠杆菌 BL21,筛选(80mg/L kanamycin 平板上)重组子,制备质粒 DNA 酶切鉴定有无插入片段,并进行确证性 DNA 序列分析,构建表达质粒 pET30a(+)-action/ Myostatin。

1.4 重组 pET30a(+)-action/Myostatin 的表达及产物分离

将构建的表达质粒 pET30a(+)-action/ Myostatin 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,分别取 BL21/pET30a(+)-action/ Myostatin 和 BL21/pET30a(+)接种于 5 mL 的 LB 培养基中,菌株在含有 80 mg/L 卡那霉素的 LB 培养液中,37℃ 培养 12 h 后,按 1:50 放大培养至 A_{600} 为 0.5,加入 IPTG(Sigma 公司)至终浓度 0.5% 37℃ 继续培养 4 h,离心收集菌体,用含 8 mol/L 尿素的 PBS 重悬菌体,超声破碎细菌,用 QIAexpressionist 蛋白纯化试剂盒(QIAGEN Inc 公司)纯化重组融合蛋白,然后用肠激酶切除其 N 端引导序列-硫氧还蛋白,用 Ekaway 试剂盒去除肠激酶,15% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(蛋白标准分子量为上海东风试剂厂产品)对表达细菌的全菌体、纯化的融合蛋白、经酶切的融合蛋白及目的蛋白等成分进行鉴定,薄层扫描进行含量和纯度分析(图像分析系统 ImageMaster VDS 图象处理系统为 Pharmacia Biotech 公司产品)。

1.5 Myostatin 活性区蛋白的纯化和复性

Myostatin 活性区蛋白在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在,收取菌体,经裂解离心及包涵体洗涤后,纯度可达 86%,然后用尿素溶解包涵体,利用凝胶过滤层析对目的蛋白进行 SDS-PAGE 分析,银染电泳凝胶上除了目的蛋白带外,不存在其他的杂带,薄层扫描表明,目的蛋白的纯度可达到 96% 以上。

1.6 Myostatin 活性区蛋白对培养的绵羊肌肉细胞的作用

绵羊肌肉细胞的分离、培养和传代,参见文献[11]。用含 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养液(Gibco 公司),在 37℃,5% CO₂ 条件下传代培养绵羊骨骼肌肌肉细胞,该细胞经 PBS 漂洗、胰酶消化,用上述培养液制成细胞悬液,接种到 24 孔板继续培养。24 h 后,吸弃培养液,测定组加入 0.5 mL 培养液和 10 μL 不同浓度 Myostatin 活性区蛋白样品,对照组加入 0.5 mL 培养液和 10 μL 的 PBS,室温孵育 20 min,在加入培养液使每孔培养液体积为 0.8 mL 48 h 后,重复上述步骤,72 h 后按白细胞计数法,低倍镜下计数肌肉细胞。

1.7 方差统计分析测定组与对照组差异

统计结果用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Myostatin 活性区片段的扩增、克隆与鉴定

0.7% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物约 390bp,回收后与 pMD 18-T 重组,经限制性酶切鉴定、DNA 序列分析证实,与 GenBank 中所提供的野生型序列比较,在其活性区有一单碱基突变,由 A→G,这与(Ferenc Jeanplong)报道完全一致(图 1)。

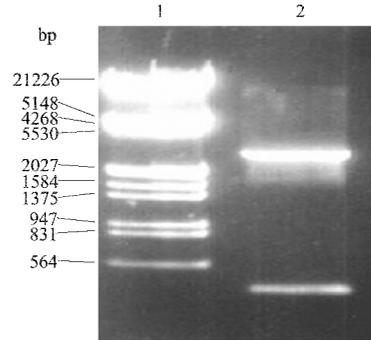


图 1 重组质粒 pMD18-T-Myostatin 的酶切分析

Fig.1 Restriction analysis of pMD18-T-Myostatin

1. λDNA *Eco* R I / *Hind* III marker

2. pMD18-T-Myostatin/ *Sal* I / *Eco* R I

2.2 大肠杆菌表达质粒 pET30a(+)-action/Myostatin 的鉴定

重组质粒 pET30a(+)-action/Myostatin 经酶切鉴定、DNA 序列分析与 GenBank 结果相符合,阅读框(ORF)正确。以重组质粒 pET30a(+)-action/ Myostatin 为模板,PCR 扩增产物为 390bp(图 2)。

2.3 表达产物的含量、浓度

15% SDS-PAGE 电泳显示,转化菌在 13.5kD 处有一条浓集带,而只转入 pET30a(+)空载体的对照菌未见该条带,提示 pET30a(+)-action/ Myostatin 已表达,0.5% IPTG 诱导表达 3 h 培养液中总蛋白量达最高,约达 100 mg/L,超声波破碎处理后,其中可溶性目的蛋白约 80 mg/L(图 3)。

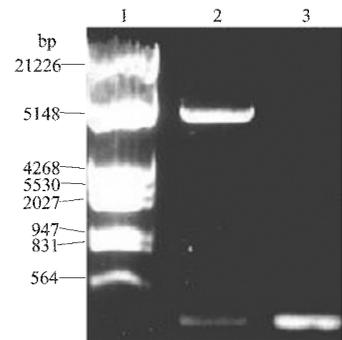


图 2 表达载体及重组质粒的限制酶分析

Fig.2 Restriction analysis of pET30a(+)-action/Myostatin

1. λDNA *Eco* R I / *Hind* III marker ;

2. pET30a(+)-action/Myostatin/ *Sal* I / *Eco* R I

3. PCR products

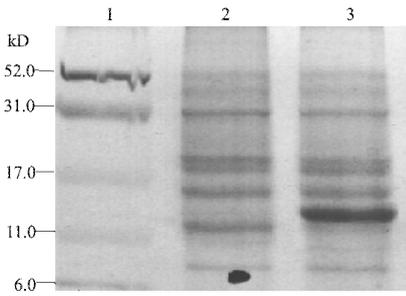


图3 pET30α(+)-action/Myostatin 重组融合蛋白的表达

Fig.3 Expression of pET30α(+)-action/ Myostatin

1. Protein marker ; 2. Control

3. Expression of pET30α(+)-action/Myostatin

表1 Myostatin 突变体活性区蛋白表达产物对肌肉细胞的影响

Table 1 Effect of Myostatin action protein on muscle cells

Protein($\mu\text{g/L}$)	0.0	1.0	2.0	2.5	5.0	10.0	50.0	100.0
Muscle cells($10^4/\text{well}$) ¹⁾	2.4 ± 0.15	$3.1 \pm 0.00^{2)}$	$3.5 \pm 0.16^{2)}$	$3.4 \pm 0.00^{2)}$	$3.8 \pm 0.16^{2)}$	$4.0 \pm 0.00^{2)}$	$4.2 \pm 0.16^{2)}$	$3.7 \pm 0.00^{2)}$

¹⁾mean \pm SEM ²⁾vs PBS group, $P < 0.01$

个细胞进行分析,测定组明显高于对照组,实验结果表明,可提高体外培养3、7、14、21d肌肉细胞的存活率。利用图像分析软件对实验组和对照组细胞进行了分析,计算两组细胞面积的变化,结果表明,检测组的细胞面积较对照组有明显增加($P < 0.05$),表明对肌肉细胞生长状态有着明显的影响作用。

3 讨论

本实验选择皮尔蒙特牛肌肉抑制素基因主要原因是:皮尔蒙特牛肌肉抑制素基因是一自然突变体,其明显的特点是对肌肉的抑制作用的缺失,而表现“双肌”现象^[7]。本文用PCR的方法从皮尔蒙特牛(Piedmontese)的基因组中扩增得到Myostatin突变体的C-端生物活性区域,选用大肠杆菌作为表达系统,使其在宿主菌BL21中获得了高效表达。目的蛋白可占全菌体蛋白的30%以上。以绵羊肌肉细胞作为材料,经过活性测定表明,Myostatin的突变体具有促进肌肉细胞增生和增殖的功能。

动物肌肉发育不仅依靠激素调节,某些组织特异性效应因子也影响肌肉发育,肌抑素就是新近发现的一种重要效应因子。有实验证据表明,肌抑素是肌肉发育的负调节因子。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,敲除肌抑素基因的小鼠能够使体重增加一倍^[14],表达蛋白前肽切割位点发生突变的肌抑素基因^[13],表达肌抑素N端序列^[14]和表达可抑制肌抑素作用的其它蛋白基因^[12,15],都能显著刺激肌肉发育。上述初步研究结果表明,操纵肌抑素一类组织特异性肌肉发育效应因子,可以有效地提高畜产肉性能而不影响动物繁殖能力和健康状况,是动物基因工程中一个全新的和有希望的研究方向。

然而,到目前为止,绝大部分研究报道集中在通过基因打靶和转基因技术,消除和限制肌抑素的作用,基因敲除和转基因虽然可以一劳永逸地培育产肉性能优良的新品种,但

2.4 表达产物的活性分析

实验发现,细胞培养10代时,细胞形态无异常。第3代传代时将加入蛋白与加PBS作对照实验,做8个梯度,连续培养5代后测定组细胞数,结果发现,实验组明显高于PBS对照组(表1)。有意思的是,随着蛋白浓度的增加,细胞数明显增加,当浓度达到 $50 \mu\text{g/L}$ 后细胞数反而减少,目前还不知是什么原因,可能是蛋白剂量阈值所决定的。

2.5 Myostatin 突变体活性区蛋白对绵羊肌肉细胞生长的影响

结果表明:Myostatin 突变体活性区蛋白也能促进细胞的增生,同等倍数检测肌肉细胞的形态大小,利用测微尺对单

需花费很长时间,才能在生产上发挥作用。例如:中国有5亿头猪,通过基因操作培育一种产肉性能好的猪品种,并使它繁育到5亿只,不是一代人可以完成的工作。相反,如果体外生产一种制剂,例如,突变的肌抑素蛋白,肌抑素蛋白N端引导肽,肌抑素抗体或者干扰RNA(RNAi),通过注射去阻断肌抑素的功能,产生效益的时间就可以大大缩短。现在的问题是,体外生产的蛋白可不可以抑制这个基因的作用?需要注射多少蛋白才能产生明显的效应?生产成本如何?为探索这一条新的思路,我们克隆和表达了皮尔蒙特牛的突变型肌抑素基因C端活性肽,并利用体外培养的肌肉细胞进行检验。初步的实验结果表明,肌肉细胞分裂加快,体积变大,与体内抑制肌抑素功能产生肌肉纤维数增加(Hyperplasia)和纤维变粗(Hypertrophy)的实验结果一致,提示我们这是一条值得探索的技术路线。目前,我们正在活体注射突变蛋白抑制肌抑素功能的动物实验,实验结果将在近期报道。

致谢 感谢本实验室硕士生曾俊伟、张莹和崔秀宏女士在实验和写作中的鼎力帮助和有益的建议。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hughes S M. Running without regulators. *Nature*, 1992, **360**: 536-537
- [2] Jeanplong F, Sharma M, Somers W G *et al.* Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, **220**: 31-37
- [3] Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol*, 1990, **6**: 597-641
- [4] Jakowlew S B, Dillard P J, Spom M *et al.* Complementary deoxyribonucleic acid encoding transforming growth factor beta4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol*, 1998, **2**: 1186-1195
- [5] Yamaguchi Y, Mann D M, Ruoslahti E. Negative regulation of trans-

- 346 281 – 284
- [6] Cheifetz S , Bellon T , Cales C *et al.* Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* , 1992 , **267** , 19027 – 19030
- [7] Kambadur R , Sharma M , Timothy P L *et al.* Mutation in myostatin (GDF-8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research* , 1997 , **7** (9) : 910 – 916
- [8] Poncelet D. Functional characterization of the bovine myostatin gene product. *Animal Genetics* , 1998 , **29** (suppl. 1) : 51
- [9] Antoniou E , Grosz M. PCR based detection of bovine myostatin Q204X mutation. *Anim Genet Jun* , 1999 , **30** (3) : 231 – 232
- [10] Oldham J M , Martyn J A , Sharma M *et al.* Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscle than normal-muscled cattle fetuses , *Am. J Physiol Regulatory Integrative Com Physiol* , 2001 , **280** : R1488 – R1493
- [11] Gou K M , An X R , Guan H *et al.* Transgenic twin lambs cloned by granulose cells. *Cloning & Stem Cells* , 2003 , **5** : 71 – 78
- [12] Bosgdanovich S , Krag T O , Barton E R *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* , 2002 , **420** : 418 – 421
- [13] Zhu X *et al.* Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Letter* , 2000 , **474** : 71 – 75
- [14] Yang J , Ratovitski T , Brady J P *et al.* Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Molecular Reprod And Development* , 2001 , **9999** : 1 – 11
- [15] Lee S J , Mepheron A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS* , 2001 , **98** (16) : 9306 – 9311

Molecular Cloning , Expression Mutation of Myostatin and Study on Biochemical Activity of Its C-terminal Peptide

YANG Xing-Yuan HOU Jian AN Xiao-Rong GUAN Hong GOU Ke-Mian

YANG Shu-Hong CHEN Li-Dong CHEN Yong-Fu*

(The State Key Laboratories for Agrobiotechnologies , college of biology , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract Myostatin , a member of the TGF- β family , negatively regulates skeletal muscle development . Mutation of myostatin activity leads to increases muscle growth and carcass lean yield . The bovine myostatin mutation cDNA was amplified by polymerase chain reaction , and then sub-cloned into the expression vector pET-30a(+) to form the expression plasmid pET30a(+)-action/ Myostatin . The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 . The overexpression product of pET30a(+)-action/ Myostatin was been showed *in vitro* . Sheep skeletal muscle cell were cultured with the purified myostatin mutation C-terminal peptide . The results of this study suggest that had a powerful activity to stimulate the hyperplasia and proliferation of sheep muscle cells and shows high biochemical activity .

Key words myostatin of bovine , mutation , muscle cell , hyperplasia , proliferation

Received : 02-28-2003

This work was supported by Grant from National “ 863 ” High-tech Project (No. 2002AA206311) .

* Corresponding author . Tel 86-10-62893463 ; Fax 86-10-62893463 ; E-mail : chncau@public3 . beta . net . cn

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