

mMR-1 基因的克隆和在毕赤酵母中分泌表达

Cloning of mMR-1 Gene and Expression in *Pichia pastoris* Systems

李天伯¹, 胡 洋^{2*}, 王以光^{1**}, 夏焕章²

LI Tian-Bo¹, HU Yang^{2*}, WANG Yi-Guang^{1**} and XIA Huan-Zhang²

1. 中国医学科学院中国协和医科大学, 北京 100050

2. 沈阳药科大学, 沈阳 110015

1. Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China

摘 要 hMR-1 为本实验室首次克隆发现的一个人类新基因, 是一种和三种肌肉收缩蛋白及多种细胞信号蛋白具有相互作用的膜蛋白。经与鼠基因组数据库进行同源分析后设计合成引物, 利用 RT-PCR 技术从小鼠 C57BL/6J 脾脏 T 淋巴细胞总 RNA 中反转录得到鼠源 MR-1 基因(mMR-1), 提交 GenBank, 收录号(AY299972)。序列分析证明其与入源 MR-1 基因(hMR-1)同源性为 90.1%。构建表达载体 pPIC9-mMR-1 电转化 *Pichia pastoris* GS115, 筛选得到整合分泌表达 mMR-1 蛋白的重组酵母菌株。表达目的蛋白分子量 25kD, 诱导 5d 时产量达到 50mg/L, 通过 Western blot 验证了表达产物的正确性。本研究为进一步研究新基因 MR-1 的生物学功能奠定了基础。

关键词 MR-1, 克隆与表达, 毕赤酵母

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0025-05

Abstract hMR-1 (Homo Myofibrillogenesis Regulator 1, AF417001) is a novel homo gene, which was firstly cloned in our laboratory. The former studies revealed that hMR-1 is a transmembrane protein which shows protein interaction with sarcomeric proteins like myomesin I, myosin regulatory light chain, β -enolase and some cell regulator proteins such as eukaryotic translation initiation factor3 subunit 5 (eIF3S5) and etc. In this work, we focused on cloning the homologous gene of hMR-1 from mouse C57BL/6J and exploring its expression using *Pichia pastoris* yeast system.

Two pairs of primers were synthesized according to the hMR-1 gene homologous sequence on mouse genome chromosome 1. The mouse MR-1 gene (mMR-1) was cloned by PCR following the first round RT-PCR from mouse C57BL/6J spleen total RNA. Sequence analysis verified that mMR-1 gene and amino acids sequence showed 90.4% and 90.1% identity with hMR-1, respectively. The prediction of hydrophobic transmembrane structure of mMR-1 suggested it is also a transmembrane protein.

The mMR-1 *Pichia pastoris* expression vector pPIC9-mMR-1 was constructed by fusion of the flanking mMR-1 ORF in the pPIC9 plasmid. After linearization of pPIC9-mMR-1 with *Sal* I, the 8.5kb DNA fragment was transformed into *Pichia pastoris* GS115 strain by electroporation. GS115/Mut⁺ pPIC9-mMR-1 transformants were selected on minimal methanol medium. Integration of

Received: June 17, 2004; Accepted: August 18, 2004.

This work was supported by Grant from Beijing Foundation of Sciences and Technology Project(No. H020220020310).

* Equally contributed as first author.

** Corresponding author. Tel: 86-10-63038137; E-mail: wangyh456@yahoo.com.cn

北京市科技计划重大项目基金资助(No. H020220020310)。

mMR-1 gene into the yeast genome in the recombinants was verified by PCR from the transformants total DNA. The mMR-1 protein was expressed by induction under the concentration of 0.5% methanol. The specific induced protein of 25 kD molecular mass in SDS-PAGE was confirmed to be the mMR-1 protein by Western blot using hMR-1 polyclonal antibody. The expression level of this recombinant mMR-1 protein was about 50 mg/L.

The successful expression of mMR-1 in the *Pichia pastoris* GS115 will facilitate the further functional analysis of the novel gene MR-1 in animal model.

Key words MR-1, cloning and expression, *Pichia pastoris*

本课题组在研究工作中发现了一个可能具有多种功能的人类新基因,命名为人肌纤生成调节因子, hMR-1 (homo-myofibrillogenesis regulator 1, AF417001)^[1]。该基因由 426bp 组成,编码 142 个氨基酸,含有一段由 17 个氨基酸形成的疏水性跨膜区。同源序列分析在人已知基因库中未检索到其它相关蛋白。Northern blot 表明 hMR-1 在骨骼肌、心肌中具有较高表达;研究表明该蛋白与肌肉收缩单元中起重要作用的肌球蛋白重链组成蛋白 Myomesin1、肌球蛋白轻链调控蛋白 MRLC2 和 β -烯醇化酶具有相互作用。同时, hMR-1 蛋白还与真核细胞转录起始因子 3 第 5 亚基 eIF3S5 (initiation factor 3 subunit 5) 和一个含有 Ras GTPases、pH 和含锌指的 ArfGAP 结构域的未知功能蛋白 MRIP1 具有相互作用。这些结果提示 MR-1 可能在肌肉收缩单元中起到结构或调控功能的重要作用^[1,2]。已知 myomesin 是纹状肌 M 带的组成部分,与肌球蛋白 (myosin) 和肌联蛋白 (titin) 一起负责 M 带的组装和维持^[3];肌球蛋白轻链调控蛋白 (MRLC2) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶的底物,被有丝分裂因子活化蛋白激酶 (MAPK) 激活^[4],其磷酸化在肌肉收缩中起关键作用,在非肌肉细胞的肌动蛋白 (actin) 纤维化中也起重要作用^[5],曾有报道在心肌肥大患者中检测到 MRLC2 基因的突变^[6]。烯醇化酶是参与肌肉收缩的糖酵解酶,其存在形式与组织发育的特异性相关^[7]。这些结果提示 MR-1 可能在肌肉收缩单元中起重要的调控作用。同时真核细胞转录因子与肿瘤的发生有关^[8]。因此,深入研究 MR-1 的生理功能与作用机制应具有重要的理论与实际意义。本文报道克隆得到鼠源 MR-1 基因, mMR-1, 并在毕赤酵母系统中对其进行了成功表达,为今后在动物水平中研究 MR-1 基因的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和实验用动物:毕赤酵母表达系

统^[9]; *Pichia* 酵母 GS115、表达载体 pPIC9, 军事医学科学院生物工程研究所马清钧教授惠赠。小鼠 C57BL/6J 购自中国医学科学院协和医科大学实验动物研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器: 酵母转化子筛选、表达所用 MM (Minimal Methanol Medium)、MD (Minimal Dextrose Medium)、BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)、BMMY (Buffered Methanol-complex Medium) 培养基均按操作手册^[10] 配制; DNA 凝胶回收和总 RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司; RT-PCR 试剂盒为 Invitrogen 公司产品; 限制酶、T4-DNA 连接酶、LA-Taq 酶购自 TaKaRa 公司, 兔抗 hMR-1 蛋白多克隆抗体由本实验室制备, 羊抗兔 IgG-HRP、ECL Kit 购自 Santa Cruz 公司。蛋白定量试剂盒购自 BioRad 公司。其它试剂均为国产或进口分析纯。Alpha Imager2200 图像处理系统购自 Alpha 公司; 蛋白质电泳仪和 GENE PULSER II 电穿孔仪为 BioRad 公司产品; PTC200 基因扩增仪购自 MJ 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析: 同源序列比对通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 服务器进行, 采用核酸数据库为 GenBank。基因在小鼠染色体上的定位通过与小鼠基因组数据库同源比较获得。蛋白质结构域分析通过 ExPASy (<http://us.expasy.org/>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 服务器进行。蛋白质三维结构预测和蛋白质疏水性分析分别在 3D-PSSM Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>) 和 TMHMM server2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 上进行。

1.2.2 mMR-1 基因的克隆和表达载体构建: 小鼠 C57BL/6J 脾脏 T 淋巴细胞分离和总 RNA 提取方法按照试剂盒说明书进行。根据 hMR-1 和分析预测其鼠源同源基因 mMR-1 的 cDNA 序列设计合成引物, 引物 1: 5'-ATGGCGCGCGTGGTAGCTGCT-3'; 引物 2: 5'-TCAGGTCTGGGCCCCAGACCCAAAC-3'。RT-PCR 扩增条件为 50℃ 保温 30min, 94℃ 变性 2 min, 然后

94℃变性 15s, 55℃ 30s, 72℃ 1 min, 40 个循环后 72℃延伸 10 min。将目的片段凝胶回收,经 T 载体克隆后测序。根据克隆得到序列和毕赤酵母表达载体 pPIC9 的多克隆位点设计引物,引物 3:5'-ATTA-CAATTCATGGCGGCGGTGGTAGCTCCT-3' (含 *EcoR* I 位点);引物 4:5'-ATATGCGGCCGCTCAGGTCTGGGC-CCCAGACCCAAC-3' (含 *Not* I 位点)。PCR 条件为 95℃变性 5 min,循环参数为 94℃ 40s,57℃ 40s,72℃ 1 min,共 30 个循环,然后 72℃延伸 10 min。所有引物合成及 DNA 测序均在上海生工公司完成。

1.2.3 酵母的转化、筛选和重组子验证:采用电转化方法转化酵母细胞^[10]。转化条件为:电压 1.5 kV,电容 25 μF,电阻 400 Ω。线性化 DNA 酵母转化液涂布 MD 平板,30℃培养 2~3d 后挑选单克隆,同时在 MD 和 MM 平板培养基上划线筛选 Mut⁺ (Methanol utilization plus)表型的转化子。挑取酵母转化子单菌落接种 MD 培养液进行培养,提取总 DNA,用引物 1, 2 进行 PCR 鉴定有目的基因的整合。

1.2.4 酵母转化子的培养和诱导表达:将筛选得到重组子酵母单克隆接种于 30 mL BMGY 培养基中,30℃摇瓶培养至 A₆₀₀ 达到 1.0。将菌体重悬于 30 mL BMMY 培养基中,30℃振荡培养 5d。每 24 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%,同时培养物取样 1 mL 离心,上清加三氯醋酸至终浓度为 20%,10 000r/min 离心 15 min 沉淀蛋白,用丙酮洗涤后进行 12% SDS-PAGE 分析。

1.2.5 表达产物的 Western blot 分析:将酵母表达的 mMR-1 蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后,湿法转 PVDF 膜,4℃封闭过夜。利用本实验室制备的 hMR-1 蛋白兔多克隆抗体作为一抗,1000 倍稀释后室温作用 1 h,洗膜 3 次,每次 10 min;再以羊抗兔 IgG-HRP 为二抗,5000 倍稀释后室温作用 1 h,洗膜 3 次,每次 10min;用 ECL Western blot 检测试剂盒进行检测。

2 结果

2.1 mMR-1 基因的克隆

分离小鼠 C57BL/6J 脾脏 T 淋巴细胞,提取总 RNA。以总 RNA 为模板,通过引物 1,2 进行 RT-PCR 扩增得到一条大小约 450 bp 的目的条带。将此 DNA 片段回收后以其为模板,用 1,2 引物进行再次 PCR 扩增,得到高浓度的特异产物,如图 1。将得到的 cDNA 片段克隆至 T 载体进行测序,结果表明,外源小鼠 cDNA 片段包含 429 个核苷酸,对应编码 142 个氨基酸。同源比较分析证明,该小鼠 cDNA 与已

知人源 MR-1 基因(hMR-1) ORF 429bp 序列同源性达到 90.4%,且分 3 个外显子,定位于小鼠 1 号染色体 NT_039170.1,与 hMR-1 的外显子组成和基因组定位情况相似。由此推测所克隆得到序列为完整小鼠 MR-1 基因,命名为 mMR-1,递交 GenBank,收录号为 AY299972。

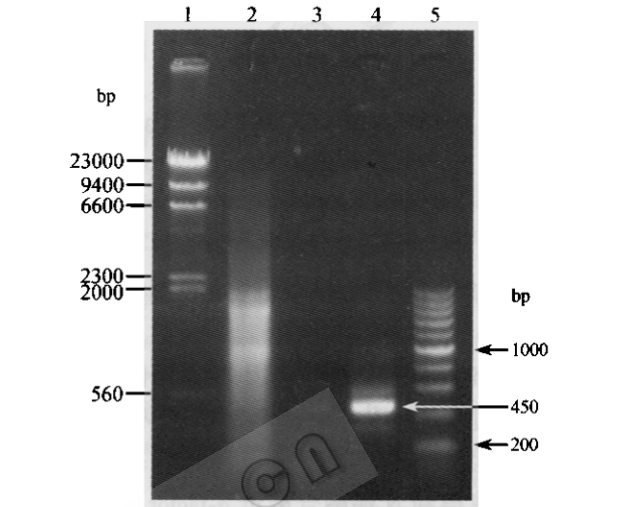


图 1 mMR-1 基因 RT-PCR 扩增产物电泳
Fig.1 Electrophoresis of RT-PCR of mMR-1 gene
1: λ-HindIII digest DNA Marker; 2: Total RNA; 3: RT-PCR product; 4: PCR product; 5: 200bp ladder DNA marker.

2.2 mMR-1 序列分析和蛋白质结构预测

使用 LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) 程序将 mMR-1 预测氨基酸序列与 hMR-1 进行比较分析,发现两者同源性达到 90.1%,有 14 个氨基酸差异,其中有 8 个为同族氨基酸变异,如图 2。

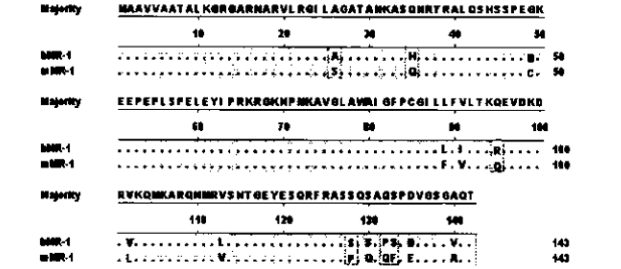


图 2 mMR-1 与 hMR-1 氨基酸序列的同源比较
Fig.2 Protein homology analysis of mMR-1 with hMR-1
The different amino acids in mMR-1 and hMR-1 proteins are shown in box.

将 mMR-1 蛋白序列在 3D-PSSM Server 和 TM-HMM server2.0 上分别进行三维结构预测和蛋白质疏水性分析,发现 mMR-1 蛋白在 75 至 92 位氨基酸处存在一个明显疏水跨膜结构区域(图 3),与 hMR-1

高度相似^[1],由此推测 mMR-1 同样为一种定位于细胞核膜的膜蛋白。

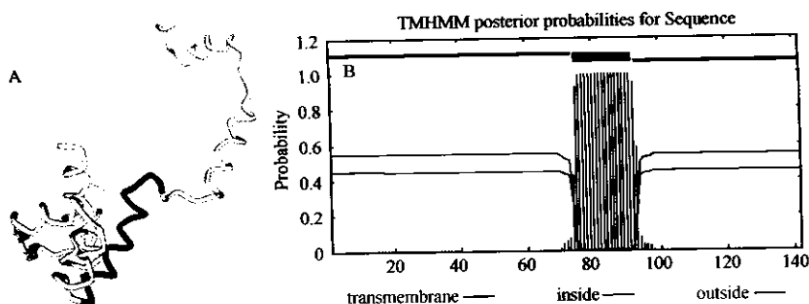


图3 mMR-1 氨基酸序列的 3D 构象分析

Fig.3 3D structure analysis of mMR-1 amino acids sequence

A: 3D-PSSM analysis results of mMR-1 15-132aa protein 3D structure, colored region represents the transmembrane region; B: TMHMM server2.0 analysis results of mMR-1 protein, a transmembrane segment was predicted from 75 to 92 amino acids.

2.3 mMR-1 酵母表达载体的构建和阳性克隆株的筛选

利用构建含有 mMR-1 基因的 T 载体质粒 DNA 为模板,通过引物 3 和 4 进行 PCR 获得两端含 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切位点的 mMR-1 完整编码基因。经酶切、连接构建得到 N 端融合酵母 α -factor 分泌信号肽的 mMR-1 表达载体 pPIC9-mMR-1,测序证明序列和读框正确。pPIC9-mMR-1 质粒经 *Sal*I 单酶切线性化后凝胶回收,电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。在 MD 和 MM 平板培养基上筛选得到 His^+ 、 Mut^+ 表型转化子克隆。将酵母转化子单克隆提取总 DNA,用引物 1、2 进行 PCR 鉴定,筛选得到基因组中整合有 mMR-1 表达基因的转化子 GS115/ Mut^+ pPIC9-mMR-1,如图 4。

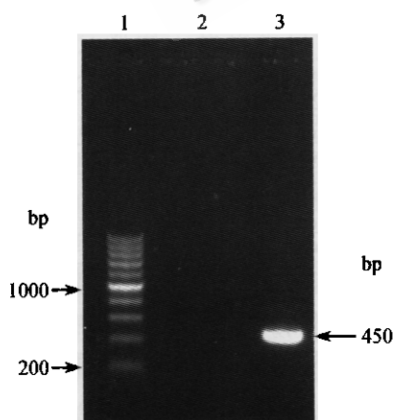


图4 PCR 鉴定 mMR-1 基因的整合

Fig.4 PCR analysis of the integration status of mMR-1 gene

1: 200bp ladder DNA Marker; 2: GS115(Negative control); 3: GS115/ Mut^+ pPIC9 transformant (Negative control); 4: GS115/ Mut^+ pPIC9-mMR-1 transformant.

2.4 mMR-1 蛋白的表达

将鉴定得到的重组酵母转化子按 1.2.4 所描述方法进行诱导表达。从第 3 天开始分别取样进行蛋白电泳,发酵上清液经终浓度为 20% 三氯醋酸处理得到沉淀,经丙酮洗涤后加入蛋白电泳缓冲液煮沸 5min,进行 SDS-PAGE 电泳分析。表达目的蛋白分子量为 25 kD,如图 5。经凝胶灰度扫描分析,诱导第 5 天 mMR-1 蛋白占上清总蛋白的 30.9%。处理后的上清总蛋白定量结果为 160 mg/L,由此得出诱导第 5 天时 mMR-1 蛋白产量为 50 mg/L。

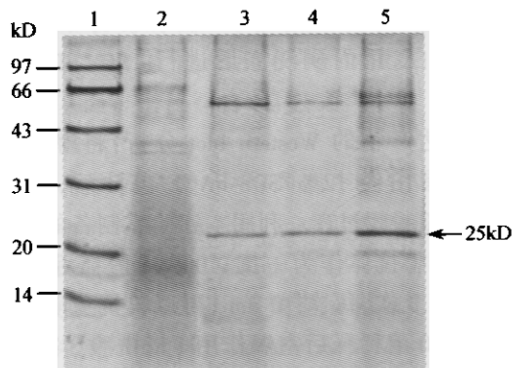


图5 SDS-PAGE 分析 mMR-1 蛋白在毕赤酵母 GS115 中的表达

Fig.5 SDS-PAGE analysis of mMR-1 protein expressed in recombinant *Pichia pastoris* GS115

1: low molecular weight protein standard; 2: GS115/ Mut^+ pPIC9 (Negative control); 3 ~ 5: GS115/ Mut^+ pPIC9-mMR-1 (induced for 3, 4, 5 days).

2.5 Western blot 分析

利用兔抗 hMR-1 多克隆抗体检测重组酵母 GS115/ Mut^+ pPIC9-mMR-1 经诱导发酵上清总蛋白,如图 6。由于 mMR-1 和 hMR-1 蛋白同源性达到

90.1%,采用针对 hMR-1 蛋白制备的多克隆抗体对 mMR-1 蛋白进行 Western blot,结果显示具有较强的特异性和剂量相关性。

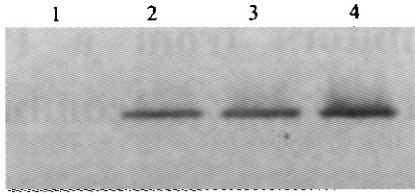


图6 Western 鉴定 mMR-1 蛋白在重组毕赤酵母 GS115 中的表达

Fig.6 Western blot of mMR-1 protein expressed in recombinant *Pichia pastoris* GS115

1: the yeast culture supernatant from GS115/Mut⁺ pPIC9 (negative control); 2, 3, 4: the yeast culture supernatant from GS115/Mut⁺ pPIC9-mMR-1 induced for 3, 4, 5 days, respectively.

3 讨 论

基于人、大鼠、小鼠、酵母等多种生物基因组数据库的测序完成,综合归纳生物信息学分析结果并进一步结合分子生物学技术操作已成为一种快速、有效的克隆不同种属中同源新基因的策略^[11]。本研究通过生物信息学分析小鼠 C57BL/6J 基因组数据设计合成引物,从小鼠脾脏 T 淋巴细胞总 RNA 中反转录得到了鼠源 MR-1 基因,命名为 mMR-1 (AY299972)。本实验采用了两次扩增的方法,第一轮 RT-PCR 后获得目的产物纯度较低,推测可能由于模板总 RNA 样本中所含的目的基因丰度较低所致,通过第二轮 PCR 将目的基因进一步扩增,获得可进一步基因操作的目的产物。测序结果经分析,发现 mMR-1 定位于小鼠第 1 号染色体上,与 hMR-1 基因同样由 3 个外显子构成,两者同源性达到 90.1%。利用克隆获得的人、小鼠 MR-1 基因序列检索已知基因组物种,结果显示 MR-1 基因在人、小鼠、大鼠、猪和牛中具有同源保守序列,而在果蝇、河豚、酵母和已知植物、微生物中不具有相似序列,提示 MR-1 基因有可能局限于哺乳动物中。

甲醇酵母基因表达系统是一种最近迅速发展的外源蛋白质生产系统,可利用甲醇为唯一碳源和能源,主要有 *H. Polymorpha*、*Candida Bodinii*、*Pichia Pastoris* 三种,其中毕赤酵母 *Pichia Pastoris* 作为基因表达使用得最为广泛^[9]。mMR-1 蛋白质结构预测表明,在其 75 至 92 位氨基酸位点间存在一疏水跨膜结构区域,与 hMR-1 一致,后者被研究证明为一种膜蛋白,定位于细胞核膜。因而推测 mMR-1 同样为

一种整合型膜蛋白,膜嵌段为疏水区在脂双层中,两端亲水区在膜内外两侧。生理活性状态的膜蛋白一般以单聚体或多聚体的形式存在,使得膜蛋白的表达往往比较困难。但是,由于 mMR-1 蛋白的等电点较高, $pI = 10.3$,而在经诱导发酵过程中培养液的 pH 值偏酸性,这使得目的蛋白带有正电荷,有可能提高了其在发酵液中的溶解,有利于蛋白的表达。本实验利用毕赤酵母 *Pichia pastoris* 使 mMR-1 蛋白实现了分泌表达。所表达的 mMR-1 蛋白经 Western blot 验证具特异性和剂量相关性。本研究为进一步对 MR-1 基因生物学功能的深入研究奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Li TB(李天伯), Liu XH(刘秀华), Feng S(冯爽) *et al.* MR-1, a novel gene in human muscle. *Acta Biochim et Biophysica Sinica*, 2004, 36(6): 412 - 418
- [2] Li TB(李天伯), Feng S(冯爽), Hu Y(胡洋) *et al.* Studies on a novel gene MR-1 involved in the regulation of muscle contraction by yeast two-hybrid system and proof of their interaction *in vitro*. *Journal of Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志增刊), 2003, Supplement 20 - 21
- [3] Grove BK, Kurer V, Lehner C *et al.* A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol*, 1984, 98(2): 518 - 24
- [4] Suizu F, Ueda K, Iwasaki T *et al.* Activation of actin-activated MgATPase activity of myosin II by phosphorylation with MAPK-activated protein kinase-1b (RSK-2). *J Biochem (Tokyo)*, 2000, 128(3): 435 - 40
- [5] Iwasaki T, Murata-Hori M, Ishitobi S *et al.* Diphosphorylated MR-LC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells. *Cell Struct Funct*, 2001, 26(6): 677 - 683
- [6] Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S *et al.* Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet*, 1996, 13(1): 63 - 69
- [7] Fougereousse F, Edom-Vovard F, Merkulova T *et al.* The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis. *J Muscle Res Cell Motil*, 2001, 22(6): 535 - 544
- [8] Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW *et al.* Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ*, 2000, 7(7): 603 - 615
- [9] Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY *et al.* *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12): 3376 - 3385
- [10] Sudbery PE, Gleeson MAG. *Molecular and cell biology of yeasts*. London. Blackie Press, 1989
- [11] Bashardes S, Lovett M. cDNA detection and analysis. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5(1): 15 - 20