

红鳍东方鲀 *FoxO1* 基因的原核表达及纯化

张伟^a, 李翠萍^a, 杨志军^a, 何广杰^{b*}

(新乡医学院 a.基础医学院; b.法医系, 河南 新乡 453003)

摘要: 采集红鳍东方鲀脂肪组织提取其总 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增和克隆红鳍东方鲀 *FoxO1* 基因的 ORF, 并构建其原核表达载体 pET-32/*FoxO1*, 在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行表达, 通过 IPTG 诱导表达, 对重组 *FoxO1* 蛋白进行可溶性分析、纯化及鉴定, 结果表明: 重组质粒 pET32a/*FoxO1* 被成功构建; 用 IPTG 进行诱导表达, 融合蛋白主要以可溶蛋白形式存在, 能与抗 His 标签的兔多克隆抗体发生特异性反应; 纯化出了融合表达蛋白, 获得了相对分子质量约为 110 000 的重组蛋白。

关键词: 红鳍东方鲀; *FoxO1* 基因; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S917; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2016)01-0081-04

Prokaryotic expression and purification of *FoxO1* gene from torafugu *Takifugu rubripes*

Zhang Wei^a, Li Cuiping^a, Yang Zhijun^a, He Guangjie^{b*}

(a.School of Basic Medical Science; b.Department of Forensic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: The ORF of *FoxO1* gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from total RNA extracted from adipose tissues of torafugu *Takifugu rubripes*. PET-32a/Sirt1, the prokaryotic expression vector, was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) for *FoxO1* expression. Through IPTG inducing expression, the induced fusion protein was purified and verified by SDS-PAGE and Western Blot. As a result, the full-length open reading frame of torafugu *FoxO1* cDNA was successfully cloned, and the recombinant vector was constructed. The expressed fusion proteins induced by IPTG were soluble protein. The fusion proteins with tag His were also purified, and the molecular weight of the recombinant protein was about 110 000.

Keywords: *Takifugu rubripes*; *FoxO1* gene; prokaryotic expression; protein purification

目前, 无论在人类医学还是在农业动物生物学领域, 关于脂肪组织发育及其调控的研究均备受瞩目。鱼肉的品质及脂肪沉积调控成了水产学科研究中的重要内容。脂肪代谢在分子水平上是受关键基因和酶调控的。Forkhead 转录因子来源于果蝇的“叉头”突变, 又称为 *Fox* 基因。该基因在酵母和真核细胞生物中广泛存在。*Fox* 基因含有 17 个亚家族, 其中对 *FoxO* 家族的研究最为深入^[1]。哺乳动物中 *FoxO* 家族中有 4 个转录因子, 分别为 *FoxO1*、*FoxO3*、*FoxO4* 和 *FoxO6*^[2]。*FoxO1* 是 *FoxO* 亚家族

中的主要成员之一, 可能通过多条通路来调控细胞的增殖与分化^[3-4]、凋亡^[5]、细胞周期^[6]、葡萄糖代谢^[7]以及脂肪代谢^[8-9]等。*FoxO1* 是胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路中重要的转录因子, 通过调节下游的靶基因来调节脂肪代谢等^[10]。*FoxO1* 基因能够抑制前体脂肪细胞的增值分化, 从而使脂肪的形成减少^[11]。*FoxO1* 能够抑制 PPAR γ 功能复合体与 DNA 的结合^[12]。Fajas 等^[13]发现 *FoxO1* 可能通过抑制 PPAR γ 、p21 及 p27 等的下游靶基因表达来减少脂肪生成。*FoxO1* 也可以通过抑制 MyoD 来阻碍

骨骼肌的分化^[14-15]。目前,关于鱼类 *FoxO1* 基因的研究尚少。红鳍东方鲀是一种模式生物,其肉质鲜美,营养丰富,也是中国沿海地区养殖的主要鱼种之一。本研究中以红鳍东方鲀为研究对象,研究其 *FoxO1* 基因的原核表达及纯化,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

采用红鳍东方鲀作为试验样本。取红鳍东方鲀的脂肪组织,用灭菌 DEPC 处理水冲洗组织样,在液氮速冻 1 h 后取出,置于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 红鳍东方鲀 *FoxO1* 基因的鉴定

本试验以斑马鱼 *FoxO1* 的氨基酸序列(NP_001070725.2)为探针,对红鳍东方鲀基因组数据库(<http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>)进行 BLAST 分析,以获得新的红鳍东方鲀 *FoxO1* cDNA 序列。

1.2.2 *FoxO1* 基因的克隆

利用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)抽取脂肪组织总 RNA。以总 RNA 为模板,利用 SuperScript III reverse transcriptase(Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, 美国)合成 cDNA 第一链。根据预测的 *FoxO1* 基因序列,在 ORF 区两端设计引物(上游引物为 5'-ATGGCGGAAGCAGCCCA-3'; 下游引物为 5'-CCCTG ACACCCAGCTGTGC-3')。RT-PCR 反应扩增条件为:94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。利用 T-A 克隆将 PCR 产物于 pGEM T-easy 载体(Promega, USA)进行相连,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上初步筛选阳性克隆。菌落 PCR 鉴定阳性克隆,选择 3 个阳性克隆送 Invitrogen(上海)公司进行测序。

1.2.3 原核表达载体的构建及鉴定

根据克隆得到的红鳍东方鲀 cDNA *FoxO1* 的 ORF 序列设计特异引物(上游引物 P1 为 5'-CGGAA TTC^{EcoR I} ATGGCGGAAGCAGCCCA-3'; 下游引物 P2 为 5'-CCGCTCGAG^{Xho I} CCCTGACACCCAGCTGTGC-3'),引物对的划线部分分别为 *EcoR I* 酶切

位点和 *Xho I* 酶切位点。RT-PCR 反应体系: cDNA 模版 1.0 μL, 10 μmol/L P1 1.0 μL, 10 μmol/L P2 1.0 μL, 10×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 2.5 μL, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2.0 μL, ddH₂O 17.0 μL, 1 U/μL KOD-Plus-Neo 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μL, 总计 25 μL。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 61 °C 复性 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 电泳回收产物与克隆载体 pGEM T-easy (Promega 公司)连接,并转化入大肠杆菌感受态细胞 JM109,在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养,通过蓝白斑法筛选阳性克隆,并进行质粒抽提。将得到的 *FoxO1* 基因克隆质粒与 pET32a 质粒同时用 *EcoR I* 和 *Xho I* 酶切 3 h, 然后进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段和载体,并利用 T4 DNA 连接酶进行连接后转化到大肠杆菌 JM109。随机挑选克隆进行菌落 PCR 和双酶切鉴定,并对阳性克隆进行增菌培养,抽提质粒,送 Invitrogen(上海)公司进行测序验证。

1.2.4 重组质粒 pET32a/*FoxO1* 的诱导表达

对经 pET32a/*FoxO1* 测序鉴定正确的重组质粒转化到 Rosetta(DE3)大肠杆菌中,在平板上随机挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定,将鉴定结果为阳性克隆的接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,在 37 °C 过夜振荡培养后,按 1:50 转接到 20 mL 同样的培养基中振荡培养至 OD 值为 0.8,取出 5 mL 菌液作为未诱导对照,其他加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 诱导 5 h 后离心,收集菌体,装菌体放入冰上,利用超声波进行破碎,10 000 ×g 4 °C 离心 20 min 后将上清液转到新离心管,把 PBS 缓冲液加到沉淀组分中充分悬浮振荡。将样品加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后煮沸裂解 5 min。利用 SDS-PAGE 电泳技术检测目的蛋白的表达。

1.2.5 目的蛋白的纯化与 Western Blot 检测

使用镍柱纯化上清部分,先上低盐缓冲液平衡柱材,再用上清液上柱,重悬柱材,冰浴 30 min,弃去流出液,用 15 倍柱体积低盐缓冲液洗脱,10 倍柱体积高盐缓冲液洗脱,5 倍柱体积低盐缓冲液洗脱,2 倍柱体积洗脱液洗脱,收集样品液,纯化结果用 SDS-PAGE 检测。

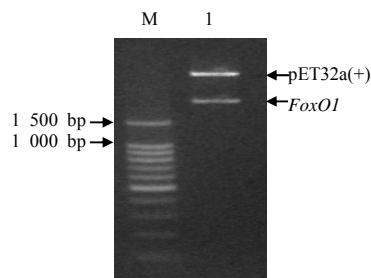
从 SDS-PAGE 胶上切下需要转膜的部分,用纯

水进行冲洗。将滤纸剪成与胶大小相当,共剪6张,同时也将PVDF膜剪成和胶大小相当。在转移缓冲液中把PVDF膜与滤纸浸没平衡10 min。按照滤纸、胶、PVDF膜、滤纸的顺序从负极到正极摆放,连接电源。将凝胶面积按 0.8 mA/cm^2 接通电流,电转移1.5 h后将电源关掉,将PVDF取出后放进塑料袋,加封闭液和1:1000稀释的Anti-His Antibody(GE Healthcare 公司),封口。37 °C摇床中温育1 h后取出PVDF膜,先用纯水冲洗,再用TBST漂洗3次,每次10 min。将PVDF膜放入内加封闭液和经1:2000稀释的HRP标记羊抗鼠酶标二抗塑料袋进行封闭,摇床中37 °C温育1 h后取出PVDF膜,用PBS漂洗3次,ECL显色,暗室曝光,观察结果。

2 结果与分析

2.1 pET32a/FoxO1 重组表达载体的构建

红鳍东方鲀脂肪组织中提取的总RNA经RT-PCR扩增后,可获得约2049 bp的条带,条带符合预期大小。测序结果显示,此序列全长2049 bp。图1中1条为载体,1条为目的条带。测序结果表明,所测序列没有碱基缺失及变异,可初步确认所构建的pET32a/FoxO1重组表达质粒是成功的,可以进行后续试验。



M DNA marker 相对分子质量100; 1 pET-32a/FoxO1 质粒双酶切。

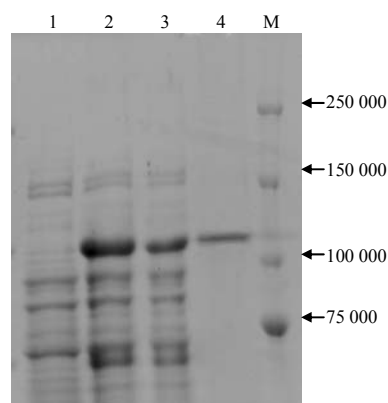
图1 重组质粒pET32a/FoxO1的酶切分析结果

Fig.1 Restriction analysis on recombinant plasmid of pET32a/FoxO1

2.2 pET-32a/FoxO1 重组表达与纯化的融合蛋白

将pET-32a/FoxO1转化到大肠杆菌 Rosetta (DE3),与诱导前相比,经IPTG诱导后,SDS-PAGE电泳图谱中增加了大小约110000的蛋白条带,其相对分子质量与推测融合蛋白的相当,而转入空质粒pET32a的阴性对照在诱导前后均未见相应的蛋白条带(图2)。表达的目的蛋白主要以可溶蛋白形式存

在,在沉淀中含有部分目的蛋白。试验结果可初步证实FoxO1已在大肠杆菌中获得成功表达。该试验3次重复试验的SDS-PAGE电泳结果基本一致。



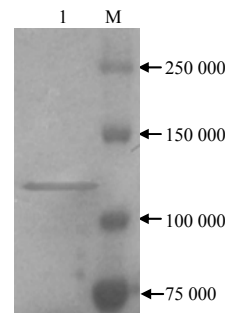
M 蛋白相对分子质量标准; 1 pET32a(+)诱导后表达蛋白; 2 pET32a/FoxO1诱导裂解后的上清液; 3 pET32a/FoxO1诱导裂解后的沉淀; 4 纯化后的蛋白。

图2 重组质粒表达产物的SDS-PAGE分析结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis on expression products of FoxO1 in Rosetta (DE3)

2.3 Western Blot 分析结果

由图3可知,经pET32a/FoxO1重组质粒诱导及纯化后,检测到1条相对分子质量约110000的蛋白条带,这进一步证实纯化蛋白为含6-His标签的红鳍东方鲀FoxO1融合蛋白。



M 蛋白相对分子质量标准; 1 纯化的重组蛋白。

图3 目的蛋白的Western Blot检测结果

Fig.3 Identification results via Western Blot on FoxO1

3 结论与讨论

FoxO1是参与哺乳动物脂肪代谢过程的重要的转录因子,通过多条信号转导通路参与脂肪细胞的增殖、分化与凋亡。目前已发现FoxO1存在于哺乳类、鸟类、爬行类和鱼类等多种脊椎动物中,生物信息学分析发现鱼类FoxO1序列与陆上动物既具有相似的保守结构特征,也具有不同的结构特征,提示FoxO1在鱼类和陆上动物的脂肪代谢中可能

发挥着不同的调节作用。在大肠杆菌表达菌株中表达外源重组蛋白是目前应用较多的研究方法,其遗传背景研究较为清楚,因此,应用较为广泛。目前常用的蛋白质标签有 GST-tag、His-tag、HSV-tag 及 Flag-tag 等。因为 pET 系统所带标签小,纯化方便,不影响蛋白质的活性,pET-32a(+)表达载体的 N 端含有编码 6 个组氨酸标签(6×His-Tag)的序列,所以,用其进行重组蛋白鉴定和纯化较为方便^[16-17]。成功获得重组蛋白原核表达的关键因素有表达菌株基因型、诱导温度、诱导时间及诱导剂浓度等。IPTG 为本研究中所选用的诱导剂,其浓度过低会因为刺激不够而使重组蛋白的表达量不足;浓度过高会因为毒性较大而导致重组蛋白表达量减少。诱导温度的高低及时间的长短主要决定细菌的生长速率,从而影响蛋白质的外源表达。外源重组蛋白质的原核表达一般选择在合适温度进行 5 h 左右的诱导。

为了在体外进一步研究红鳍东方鲀 *FoxO1* 基因的功能,将红鳍东方鲀 *FoxO1* 基因克隆到原核表达载体 pET-32a,成功构建了重组表达质粒 pET-32a/*FoxO1*。将重组质粒转化到 Rosetta(DE3)大肠杆菌中,利用 IPTG 进行诱导表达,菌液上清液中的表达量较多。将上清液过镍柱进行纯化,用盐溶液进行洗脱,利用 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 技术进行鉴定,发现纯化后蛋白质的相对分子质量约为 110 000,表明所得到蛋白为带 6 个 His 的 *FoxO1* 融合蛋白质。pET-32a/*FoxO1* 重组质粒的构建及 *FoxO1* 融合蛋白的成功表达,可为抗体制备及 *FoxO1* 蛋白功能的深入研究,尤其为鱼类脂肪代谢作用的研究提供参考依据。

参考文献:

- [1] 陈小玲,黄志清,毛湘冰,等. *FoxO1* 的功能研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(9): 90-93.
- [2] 朱允和,周海宁,杨波,等. *FoxO1* 基因研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 28(5): 423-425.
- [3] Bois P R, Grosveld G C. FKHR (*FoxO1a*) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts[J]. EMBO J, 2003, 22(5): 1147-1157.
- [4] Armoni M, Harel C, Karni S, et al. *Foxo1* represses peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 and - γ 2 gene promoters in primary adipocytes: a novel paradigm to increase insulin sensitivity[J]. J Biol Chem, 2006, 281(29): 19881-19891.
- [5] Shen M, Lin F, Zhang J, et al. Involvement of the up-regulated *FoxO1* expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2012, 287(31): 25727-25740.
- [6] Yuan C, Wang L, Zhou L, et al. The function of *Foxo1* in the late phases of the cell cycle is suppressed by PLK1-mediated phosphorylation [J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 807-819.
- [7] Shin D J, Joshi P, Hong S H. Genome-wide analysis of *FoxO1* binding in hepatic chromatin: potential involvement of *FoxO1* in linking retinoid signaling to hepatic gluconeogenesis [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(22): 11499-11509.
- [8] Bastie C C, Nahle Z, McLoughlin T, et al. *FoxO1* stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and independent mechanisms [J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 14222-14229.
- [9] Zhang W W, Sandip P, Balwant C, et al. *FoxO1* regulates multiple metabolic pathways in the liver [J]. J Biol Chem, 2006, 281(15): 10105-10117.
- [10] Xu J, Liao K. Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(34): 35914-35922.
- [11] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor *FoxO1* regulates adipocyte differentiation [J]. Dev Cell, 2003, 4(1): 119-129.
- [12] Dowell P, Otto T C, Adi S, et al. Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor γ and *Foxo1* signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2003, 278(46): 45485-45491.
- [13] Fajas L, Landsberg R L, Huss-Garcia Y, et al. E2Fs regulate adipocyte differentiation[J]. Developmental Cell, 2002, 3(1): 39-49.
- [14] Allen D L, Unterman T G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by *FoxO* and SMAD transcription factors[J]. AJP Cell Physiology, 2007, 292(5): S62-S63.
- [15] Mcfarlane C, Plummer E, Thomas M, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-independent, *FoxO1*-dependent mechanism[J]. Journal of Cellular Physiology, 2006, 209(2): 501-514.
- [16] Ribas A V, Ho P L, Tanizaki M M, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2000, 31(2): 91-94.
- [17] Zhao J H, Xu Z, Hua Z C. Expression of human cardiac-specific homeobox protein in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2000, 18(3): 316-319.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库