

# 甲基 CpG 结合域四聚体蛋白的原核表达、纯化及鉴定

朱小华 李 锋 陈国梁 杨永生 林尽染 徐金华<sup>△</sup> 项蕾红

(复旦大学附属华山医院皮肤科 上海 200040)

**【摘要】** 目的 在大肠埃希菌中表达甲基 CpG 结合域四聚体蛋白,并对其进行纯化和鉴定。方法 将重组表达质粒 4×MBD-pET30b+ 转化大肠埃希菌 DH5a 克隆扩增并测序鉴定后,转化大肠埃希菌 BL21(DE<sub>3</sub>)后接种于 LB 培养基中,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导重组蛋白的表达,表达产物经 Ni-NTA 亲和层析纯化,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定蛋白表达,用此蛋白免疫染色人胚肾细胞后用荧光显微镜观察。结果 克隆质粒测序结果与理论预期完全一致,SDS-PAGE 显示在大肠埃希菌中表达出相对分子量为 46 000 的目标蛋白,Western blot 显示目标蛋白带有 His 融合标签(氨基端)和 HA 标签(羧基端)。荧光显微镜观察显示 MBD 蛋白能与细胞内的甲基化 CpG 基序特异性结合。结论 成功表达并纯化了具有免疫原性的甲基 CpG 结合域四聚体蛋白,为今后进一步研究 DNA 甲基化奠定了基础。

**【关键词】** 甲基 CpG 结合域; 原核表达; 蛋白纯化; DNA 甲基化

**【中图分类号】** Q 51 **【文献标志码】** A

## Prokaryotic expression, purification and identification of tetrameric-protein of methyl-CpG-binding domain

ZHU Xiao-hua, LI Feng, CHEN Guo-linag, YANG Yong-sheng,

LIN Jin-ran, XU Jin-hua<sup>△</sup>, XIANG Lei-hong

(Department of Dermatology, HuaShan hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

**【Abstract】** **Objective** To express, purify and identify tetrameric protein of methyl-CpG-binding domain in *E. coli*. **Methods** The recombinant plasmid 4×MBD-pET30b+ were transformed into *E. coli* DH5a for clonal expansion and sequenced, then the tetrameric-proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) under the induction of IPTG. Moreover, the expression products were purified by Ni-NTA chromatography, and were determined by SDS-PAGE and Western blot. Immunostain 293T cells with the proteins were analyzed by fluorescence microscope. **Results** The sequence analysis showed orientation right and was identical with the expectation. SDS-PAGE and Western blot demonstrated that the molecular weight of the tetrameric-protein was 46 000 with the N-terminal His-tag and the C-terminal HA-tag. The MBD proteins can bind to the intracellular CpG DNA specifically. **Conclusions** The tetrameric-proteins of methyl-CpG-binding domain are successfully expressed and purified in *E. coli*. This results establish a groundwork for the further researches on DNA methylation.

**【Key words】** methyl-CpG-binding domain; prokaryotic expression; protein purification; DNA methylation

在哺乳动物中,甲基化 CpG 结合蛋白家族包括 5 类多肽,MBD1、MBD2、MBD3、MBD4 和 MeCP2

已显示能优先与对称的甲基化 CpG 基序结合<sup>[1]</sup>。这些蛋白共有提供特异性 DNA 结合的 MBD<sup>[2]</sup>。

目前对 DNA 甲基化整体水平的检测方法有质谱测定法、酶甲基团分析法<sup>[3]</sup>和高效液相色谱法<sup>[4]</sup>。这些定量方法通过抗 5-甲基胞嘧啶(m<sup>5</sup>C)抗体的使用来补充定位分析,抗 m<sup>5</sup>C 抗体的缺点是当 DNA 是单链时结合表位才能最佳暴露并且在检测前细胞与 DNA 需常规变性。而 MBD 对天然双链 DNA 具有特异性。MBD 另外的潜在好处是能特异性与对称甲基化 CpG 序列的 m<sup>5</sup>C 结合<sup>[2]</sup>,目前国外已开始尝试应用 MBD 蛋白检测 DNA 甲基化水平,并且可以筛选出新的甲基化 CpG 位点。因此有必要构建一个在体外和体内检测 DNA 甲基化 CpG 的高级试剂,从而为今后进一步研究 DNA 甲基化奠定基础。

## 材料和方法

**材料** 重组表达质粒 4 × MBD-pET30b + 由英国爱丁堡大学 Adrian P. Bird 博士惠赠;大肠埃希



图 1 MBD 四聚体蛋白示意图

Fig 1 Delineation of the tetrameric protein of methyl-CpG-binding domain

**重组蛋白的表达** 将测序正确的重组表达质粒 4 × MBD-pET30b + 转化入大肠埃希菌 BL21(DE<sub>3</sub>),接种于含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 培养液,37 °C 震荡培养过夜。过夜菌 1:100 接种于 500 mL 含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 培养液,37 °C 剧烈震荡培养至 D<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,诱导表达 4 h,4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 15 min 后收集细菌,准备超声破碎。

**重组蛋白的纯化** 收集的细菌中加入 10 mL His 变性缓冲溶液(6 mol/L GuHCl,0.3 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.01 mol/L Tris.Cl,10 mmol/L b-ME,10 mmol/L Imidazole,pH 8),混匀,冰浴条件下行超声破碎(每次 10 s,间歇 20 s,超声 80 次)。12 000 g、4 °C 离心 30 min,收集上清。将该上清液加入经过 His 变性缓冲溶液预洗的 Ni-NTA,4 °C 结合 3 h。以 10 mL His 变性缓冲溶液漂洗色谱柱,依次降低 GuHCl 的浓度(每次降低 0.5 mol/L),然后以 10 mL 复性缓冲溶液漂洗(0.3 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.01 mol/L Tris.Cl,10 mmol/L b-ME,10 mmol/L Imidazole,pH 8),最后用洗脱缓冲溶液(0.3 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.01 mol/L Tris.Cl,10 mmol/L b-ME,250 mmol/L Imidazole,pH 8)洗脱

菌 DH5a,BL21(DE<sub>3</sub>),蛋白分子量标准、ECL 试剂盒、抗 HA 抗体(北京天根公司);DNA 分子量标准(NEB 公司);质粒抽提试剂盒(上海生工);抗 His 抗体(Novagen 公司);HRP 标记的二抗(Santa Cruz 公司);带 Ni 的 NTA 琼脂糖(Qiagen 公司)。

**重组表达质粒的克隆扩增及测序鉴定** 将重组表达质粒 4 × MBD-pET30b + 转化入大肠埃希菌 DH5a,涂布 LB 平板,倒置于 37 °C 温箱培养,12 h 后 LB 平板上随机挑取单个菌落,接种于 2 mL 含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 培养液中,37 °C 振荡培养过夜。将培养过夜的 2 mL 菌液 6 000 g 离心 5 min,弃上清。按试剂盒说明抽提质粒,抽提的质粒经 2% 琼脂糖电泳鉴定后,调浓度为 20 ng/μL 送 Invitrogen 公司测序。MBD 四聚体蛋白示意图如图 1,带有氨基端的 His 融合标签、核定位信号和羧基端的 HA 标签。核定位信号促进蛋白进入核内与 DNA 结合,采用四聚体模式可增强结合力,His 标签、HA 标签可用于定量检测分析。

目的蛋白。用微量离心管 5 000 g 离心进一步纯化后 -20 °C 保存。

**SDS-PAGE 电泳分析及 Western blot 检测** 将未经过诱导和经过诱导的菌液及目的蛋白洗脱液行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色分析。采用化学显色的 Western blot 检测:将电泳凝胶作适当调整,切取相等大小的 3M 滤纸和硝酸纤维素膜,按正确顺序叠放后,进行免疫印迹。硝酸纤维素膜用试剂封闭液封闭 2 h 后分别加入抗 His 标签(1:2 000)和抗 HA 标签(1:1 000)的小鼠单克隆一抗,4 °C 过夜。用 TBST 洗去未结合的抗体,加入辣根过氧化物酶(HRP)羊抗鼠 IgG 二抗(1:1 000),室温孵育 3 h,加入底物 ECLA 和 ECLB 混合液显色。

**免疫染色** 将 293T 细胞,预先培养在玻片上贴壁生长到合适密度(1 × 10<sup>5</sup> 个/cm<sup>2</sup>)。然后按以下步骤操作:(1)用 PBS 清洗 1 次;(2)4% 的多聚甲醛 PBS 在室温固定 20 min;(3)用 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min;(4)用含 0.5% Triton-X-100 的 PBS 在室温通透化处理 15 min;(5)用 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min;(6)在室温用含 10% NGS 的 PBS 封闭 1 h;(7)在 37 °C 用 4 × MBD(50 μg/mL)孵育 0.5 h;(8)用含 0.1% Tween 20 的 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min;(9)在 37 °C 用抗 HA 标签(1:500)

的小鼠单克隆一抗孵育 0.5 h; (10)用含 0.1% Tween 20 的 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min; (11)用铝箔包裹后在室温下用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗孵育 1 h 以上; (12)去除二抗,加入 DAPI 染色液室温作用 15 min 以上; (13)用含 0.1% Tween 20 的 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min; (14)用荧光显微镜观察,保存实验结果。

## 结 果

**重组表达质粒的克隆扩增及测序鉴定** 将克隆扩增的重组表达质粒 4×MBD-pET30b+ 抽提后经 2%琼脂糖电泳,可见相对分子量 6 500 bp 的条带(图 2),经 Invitrogen 公司测序显示带有氨基端的 His 融合标签、核定位信号和羧基端的 HA 标签,MBD 域的序列与 Genbank 完全一致(图 3)。

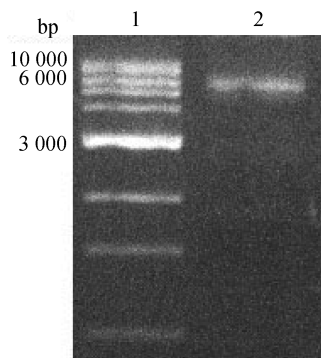


图 2 重组表达质粒电泳鉴定

Fig 2 Electrophoresis of the recombinant plasmid

1: DNA marker; 2: 4×MBD-pET30b+

**SDS-PAGE 电泳分析及 Western blot 检测** 将未经过诱导和经过诱导的菌液及目的蛋白洗脱液行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色分析。在相对分子量约 4 600 处有明显的条带,与预期的 pET30b+ 表达的 His 融和蛋白大小一致(DNAstar 软件分析分子量 45812.62)。经灰度扫描软件分

析,纯化的蛋白浓度约为 50 μg/mL。经 Western blot 分析显示 MBD 四聚体蛋白 4×MBD 带有氨基端的 His 融合标签和羧基端的 HA 标签,提示目的蛋白表达成功,且具有免疫原性。

G A T C C G A A G C A A A G T T G A G C T G A C T C G  
360 365 370 375 380 385

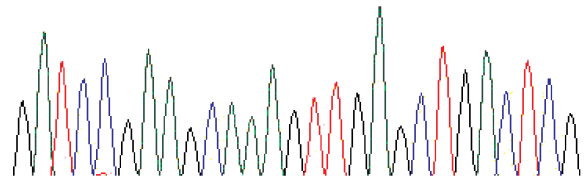


图 3 重组表达质粒测序鉴定

Fig 3 Sequence of the recombinant plasmid

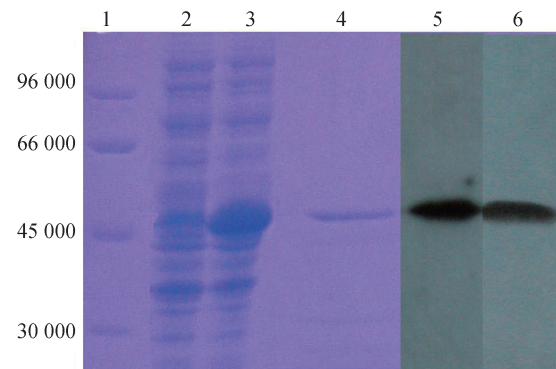
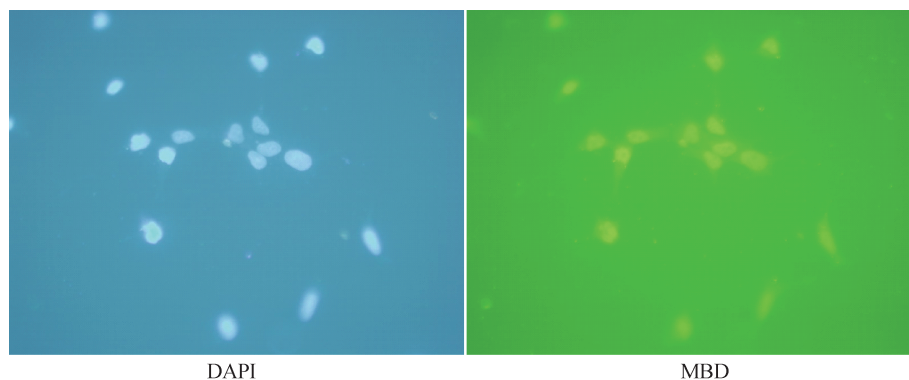


图 4 SDS-PAGE 电泳分析及 Western blot 检测

Fig 4 SDS-PAGE and analysis result of Western blot

1: Protein marker; 2: Lysate of the 4×MBD-pET30b+ BL21 (DE3) without IPTG; 3: Lysate of the 4×MBD-pET30b+ BL21 (DE3) with IPTG; 4: Ni-TAT purified His-4×MBD; 5: Western blot of HA tag of the His-4×MBD; 6: Western blot of His tag of the His-4×MBD

**免疫染色** 293T 细胞免疫染色分析显示,4×MBD 能与甲基化 CpG 特异性结合,与 DAPI 复染的部分完全重合(图 5)。



DAPI

MBD

图 5 4×MBD 与 DAPI 免疫染色 293T 细胞后荧光显微镜观察

Fig 5 The observation result of immunostain 293T cells using 4×MBD and DAPI under fluorescence microscope

## 讨 论

选择甲基 CpG 结合域 (methyl-CpG-binding domain, MBD) 构建高亲和力的甲基化 CpG 结合蛋白, 因为 MBD 在生化和结构上具有特征性, 并已知能识别单独的甲基化 CpG<sup>[5]</sup>。四聚体 MBD 蛋白的优势是能识别双链 DNA 的甲基化 DNA, 因而并不要求细胞学标本遭受危害标本完整性的变性环境, 构建此蛋白对于建立新型的甲基化 CpG 位点试剂具有重要的意义。

通过 SDS-PAGE 电泳分析及 Western blot 检测, 表明我们成功表达并纯化了具有免疫原性的甲基 CpG 结合域四聚体蛋白。测序结果显示 MBD 域的序列与 Genbank 完全一致, 融合基因带有氨基端的 His 融合标签、核定位信号和羧基端的 HA 标签。核定位信号促进蛋白进入核内与 DNA 结合, His 标签、HA 标签可用于定量检测分析。采用四聚体模式可增强结合力, 四聚体 MBD 蛋白与甲基化 CpG 的底物结合的亲和力比单倍体 MBD 蛋白高 100 倍<sup>[6]</sup>。四聚体 MBD 蛋白与甲基化 DNA 分子的结合增加基于两方面的原因: (1) 四聚体 MBD 蛋白比单独的 MBD 有更高的 DNA 结合位点, 由于 DNA 蛋白碰撞的增加产生了稳定相互作用的可能。而且, 当复合物解离时, 局部的 MBD 浓度高于单个 MBD, 有利于重结合。(2) 四聚体 MBD 蛋白能与 DNA 分子的多重 mCpG 相互作用, 从而增加了复合物的稳定性。

通过 293T 细胞免疫染色分析显示, 四聚体

MBD 蛋白与 DAPI 结合的 DNA 部位完全重合, 说明构建的四聚体 MBD 蛋白能与甲基化 CpG 特异性结合。因此本研究构建的四聚体 MBD 蛋白可作为检测基因组 DNA 甲基化 CpG 位点的敏感和特异性的试剂。同时, 四聚体 MBD 蛋白能在实验室简单生产、细菌性表达并相对便宜。此外国外的研究显示 MBD 还可筛选出新的甲基化 CpG 位点, 因此我们构建表达的 MBD 蛋白今后进一步研究 DNA 甲基化奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(11): 6 538 - 6 547.
- [2] Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(21): 4 886 - 4 892.
- [3] Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 193(3): 1 184 - 1 190.
- [4] Ramsahoye BH. Measurement of genome-wide DNA cytosine-5 methylation by reversed-phase high-pressure liquid chromatography [J]. *Methods Mol Biol*, 2002, 200: 17 - 27.
- [5] Ohki I, Shimotake N, Fujita N, et al. Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA[J]. *Cell*, 2001, 105(4): 487 - 497.
- [6] Jørgensen HF, Adie K, Chaubert P, et al. Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(13): e96.

(收稿日期: 2008 - 06 - 04; 编辑: 王蔚)