

## 甲基化 CpG 结合域重组蛋白的表达与鉴定

徐 建<sup>1,2</sup>, 潘世扬<sup>1,2\*</sup>, 许雨乔<sup>2</sup>, 孙瑞红<sup>2</sup>, 黄 蕾<sup>2</sup>, 彭珊珊<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院检验医学部, 国家临床检验重点专科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学医学检验系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:在大肠杆菌中表达甲基化 CpG 结合域(methyl-CpG-binding domain, MBD)重组蛋白。方法:对人甲基化 CpG 结合蛋白 2(methyl-CpG-binding protein 2, Mecp2)的 MBD 区行密码子优化,将人工合成的 DNA 克隆至原核表达载体 pGS21a,在大肠杆菌 *E. coli* Rosetta(DE3)中诱导表达,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定蛋白表达;镍亲和层析柱纯化重组蛋白。表面等离子共振分析重组 MBD 蛋白与甲基化 DNA 的结合能力。结果:酶切和核酸测序证实,成功构建了含密码子优化的 MBD 基因的原核表达载体。SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示,MBD 重组蛋白在大肠杆菌中得到表达。亲和层析法纯化后获得了相对分子量为 38 000 的 MBD 重组蛋白。SPR 分析显示 MBD 重组蛋白能特异结合甲基化 DNA。结论:成功构建含密码子优化的 MBD 基因的原核表达载体,MBD 重组蛋白能在大肠杆菌中表达。

**[关键词]** 甲基化 CpG 结合域; 甲基化 CpG 结合蛋白 2; 原核表达

**[中图分类号]** Q786

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)11-1511-05

## Expression and identification of recombinant MBD proteins

XU Jian<sup>1,2</sup>, PAN Shi-yang<sup>1,2\*</sup>, XU Yu-qiao<sup>2</sup>, SUN Rui-hong<sup>2</sup>, HUANG Lei<sup>2</sup>, PENG Shan-shan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, National Key Clinical Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Faculty of Laboratory Medicine, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To express methyl-CpG-binding domain (MBD) recombinant proteins in *E. coli*. **Methods:** DNA encoding MBD of human methyl-CpG-binding protein 2 (Mecp2) was optimized for *E. coli* preferred codons. The codon-optimized MBD coding sequence was synthesized, and then was subcloned into pGS21a to construct recombinant expression plasmid. Recombinant protein expression was induced in *E. coli* Rosetta-gami (DE3). Recombinant proteins were detected by SDS-PAGE and Western blot, and then purified using Nickel-affinity chromatography columns. The interaction between recombinant MBD proteins and methylated DNA was analyzed by surface plasmon resonance (SPR). **Results:** Enzyme digestion and DNA sequencing demonstrated the prokaryotic expression vector carrying codon-optimized MBD gene was successfully constructed. SDS-PAGE and Western blot results indicated that recombinant MBD proteins were expressed in *E. coli*. Finally, recombinant MBD proteins with the relative molecular weight of 38 000 were purified by affinity chromatography. SPR analysis demonstrated that the recombinant MBD proteins could bind methylated DNA specially. **Conclusion:** The prokaryotic expression vector carrying codon-optimized MBD gene was successfully constructed, and recombinant MBD proteins were expressed in *E. coli* successfully.

**[Key words]** methyl-CpG-binding domain; methyl-CpG-binding protein 2; prokaryotic expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1511-1515]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30972821, 30901262); 江苏省自然科学基金(BK2009440); 江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(ky102j201205)

\*通讯作者, E-mail: sypan@njmu.edu.cn

甲基化 CpG 结合蛋白(methyl-CpG-binding proteins, Mecps)是一类与甲基化 CpG 岛特异性结合的转录调控因子,其能在启动子的甲基化 CpG 岛区募集 DNA 甲基转移酶、组蛋白甲基化酶和组蛋白去乙酰化酶,介导基因表达沉默,在抑癌基因沉默、X 染色体失活及印记基因沉默中发挥关键作用<sup>[1]</sup>。Mecps 含有保守的甲基 CpG 结合域(methyl-CpG-

binding domain, MBD), 是其与甲基化 DNA 结合的关键区域。由于 MBD 具有特异结合甲基化 DNA 的特点, 已被用于制备 MBD 亲和柱和甲基化芯片<sup>[2]</sup>。本研究对人甲基化 CpG 结合蛋白 2 (methyl-CpG-binding protein 2, Mecp2) 的 MBD 区行密码子优化, 将人工合成的 DNA 克隆至原核表达载体 pGS21a, 在大肠杆菌中诱导表达, 获得了 MBD 重组蛋白。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

质粒 pUC57, pGS21a 和宿主菌 *E. coli* Rosetta (DE3) 均为本室保存。限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、DNA 分子质量标准物(日本 TaKaRa 公司); 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒和 His-Tag 单克隆抗体(北京天根公司); HRP 标记的羊抗鼠 IgG、PVDF 膜、蛋白质分子质量标准物和 ECL 化学发光检测试剂盒(美国 Millipore 公司); IPTG(上海生工公司); 镍柱(美国 GE 公司); 表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器 UMPHO450 和 405 型传感器芯片(北京 Cytotrend 公司)。常流缓冲液为 HBS-EP(pH7.4), 含 10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L EDTA 及 0.005% P20。N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、N-乙基-N-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺[N-ethyl-NP-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide, EDC]、乙醇胺、醋酸钠、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)及配制 HBS-EP 的化学试剂均为美国 Sigma 公司产品。甲基化 DNA poly(mCGA) 含 12 个 5-甲基胞嘧啶(5-mC), 其正义链序列为 5'-GATC<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGA<sub>m</sub>CGATC-3'; 以胞嘧啶(C)替代 5-mC 即为非甲基化 DNA poly(CGA)。DNA 由上海生工合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组表达质粒的构建

根据人 Mecp2 的 MBD 氨基酸序列, 采用大肠杆菌偏爱的密码子设计 DNA 序列, 委托南京金斯瑞公司人工合成, 并克隆至载体 pUC57。Kpn I 和 Xho I 双酶切后亚克隆至表达载体 pGS21a, 构建重组表达质粒 pGS21a-MBD。重组表达质粒经酶切和测序验证。

#### 1.2.2 目的基因在大肠杆菌中的表达

重组表达质粒 pGS21a-MBD 转化感受态大肠杆菌 *E. coli* Rosetta(DE3)。挑取单克隆, 接种含氨苄青

霉素的 LB 液体培养基, 37°C, 200 r/min 振荡过夜。次日取过夜培养物按 1:50 比例转种至含氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基, 37°C 振荡, 至  $D(600\text{ nm})$  值达 0.4 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续振荡培养 6 h。离心收集细菌沉淀用 PBS 洗涤 3 次并重悬。取适量重悬的菌液加入电泳上样缓冲液, 100°C 煮沸 5 min, 离心取上清用于 SDS-PAGE 电泳。

#### 1.2.3 Western blot 法验证重组蛋白的表达

采用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 蛋白转印至 PVDF 膜, 以抗 His-Tag 单抗为一抗(1:1 000), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(1:4 000)。最后用 ECL 化学发光法检测膜上的抗原-抗体复合物。

#### 1.2.4 重组蛋白的纯化

取经 Western blot 验证有目的蛋白表达的菌液, 4°C 4 000 r/min 离心 15 min; 预冷的 PBS 洗涤沉淀, 离心去上清, 以 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 重悬, 并加入 0.1 倍体积的 10 mg/ml 溶菌酶, 4°C 下作用 30 min; 超声破碎细菌 3 次, 每次 10 s; 10 000 r/min 4°C 离心 15 min, 收集上清。取上清加入镍柱中, 按照产品说明书操作。收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定。

#### 1.2.5 SPR 生物传感器检测

设定系统温度为 37°C, 流速为 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ 。取 0.4 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 各 75  $\mu\text{l}$ , 混匀后进样, 用于激活 405 芯片表面的葡聚糖羧基。以 pH4.0 的醋酸钠缓冲溶液稀释重组 MBD 蛋白至 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 取 100  $\mu\text{l}$  进样包被。再进 100  $\mu\text{l}$  1 mol/L 乙醇胺, 封闭芯片表面未参加反应的羧基位点。以相同浓度的 BSA 包被另一张芯片作对照。包被完成后, 检测相互作用。取 100  $\mu\text{l}$  0.2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  poly(mCGA) 和 poly(CGA), 分别进样于芯片上的并行通道。同时取未包被的空白通道, 进 HBS-EP, 作为参考通道。结果分析时, 用实验通道扣减参考通道, 以消除由于温度波动等因素造成的系统误差。

## 2 结果

### 2.1 密码子优化

采用大肠杆菌偏爱的密码子设计 MBD 的 DNA 序列, 全长 264 bp(图 1), 并人工合成。

### 2.2 重组表达质粒的双酶切鉴定

重组质粒 pGS21a-MBD 用 Kpn I 和 Xho I 双酶切后, 得到约 250 bp 和 5 000 bp 两个片段, 与目的片段大小一致(图 2A)。进一步测序后证实目的基因

克隆至 pGS21a 载体中。

### 2.3 重组蛋白的表达及纯化

pGS21a-MBD 转化的大肠杆菌 *E. coli* Rosetta (DE3) 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳分析显示在

相对分子量约为 38 000 处出现特异性条带, 与预期的重组蛋白大小一致(图 2B)。以镍柱亲和层析纯化重组蛋白, 洗脱液用 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果显示在近 38 000 处有单一条带(图 3)。

```

Opti:GCC AGC GCG AGC CCG AAA CAG CGT CGT AGC ATT ATT CGC GAT CGC GGC CCG ATG TAT GAT 60
Wild:--T T-- GCG TC- --C ---- --G --C TC-- --C --C --T --C --G --A --C ----
Amin: A S A S P K Q R R S I I R D R G P M Y D

Opti:GAT CCG ACC CTG CCG GAA GGC TGG ACC CGT AAA CTG AAA CAG CGT AAA AGC GGC CGT AGC 180
Wild:--C --C ---- --T ---- --A --G --G --T --G --A --G ---- TCT ---- --C TCT
Amin: D P T L P E G W T R K L K Q R K S G R S

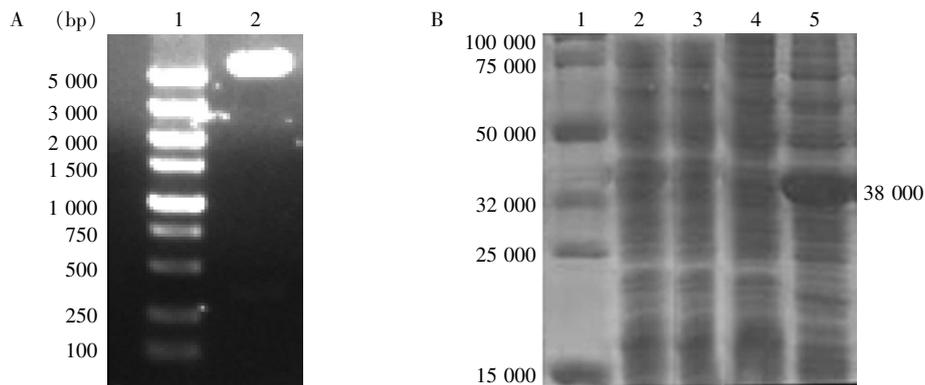
Opti:GCG GGC AAA TAT GAT GTG TAT CTG ATT AAC CCG CAG GGT AAA GCG TTT CGT AGC AAA GTG 180
Wild:--T --G --G ---- --T --C --T --C ---- --A ---- --C --C --C TCT ----
Amin: A G K K Y D V Y L I N P Q G K A F R S K V

Opti:GAA CTG ATT GCG TAT TTT GAA AAA GTG GGC GAT ACC AGC CTG GAT CCG AAC GAT TTT GAT 240
Wild:--G T-- ---- --C --C ---- --G --A ---- --C --A TC- ---- --C --T --T ---- --C
Amin: E L I A Y F E K V G D T S L D P N D F D

Opti:TTT ACC GTG ACC GGT CGT GGT AGC 264
Wild:--C --G --A --T --G --G-- --G ----
Amin: F T V T G R G S
    
```

图 1 密码子优化的 MBD 核酸序列

Figure 1 The nucleotide sequence of MBD with optimized codon



A: 重组质粒的酶切鉴定。1: DNA Marker; 2: pGS21a-MBD 双酶切结果。B: 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析。1: 蛋白 Marker; 2: 野生型 MBD 基因转化的未诱导的细菌; 3: 野生型 MBD 基因转化的诱导后的细菌; 4: 密码子优化的 MBD 基因转化的未诱导的细菌; 5: 密码子优化的 MBD 基因转化的诱导后的细菌。

图 2 重组质粒的酶切鉴定和重组蛋白的表达

Figure 2 Verification of recombinant plasmids by restriction enzyme digestion and SDS-PAGE electrophoresis analysis of expression products

### 2.4 重组蛋白的免疫印迹鉴定

用 His-Tag 的单抗进行 Western blot 检测, 在约 38 000 处出现一特异条带(图 4), 与预期分子量接近, 表明重组蛋白确在大肠杆菌中表达。

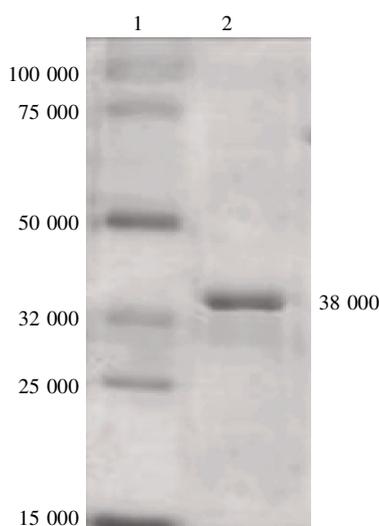
### 2.5 SPR 检测 MBD 蛋白与甲基化 DNA 的相互作用

甲基化 poly(<sub>m</sub>CGA) 流经包被有重组 MBD 的芯片表面, SPR 角逐渐增大至 126 m°, 进样结束后, SPR 角逐渐缩小, 但 5 min 后 SPR 角较进样前仍有 77 m° 的抬高。而当非甲基化核酸 poly(CGA) 流过包被有重组 MBD 的芯片表面时, SPR 角未发生改变, SPR 响应曲线与 DNA 流经包被有 BSA 的芯片时类

似(图 5)。

## 3 讨论

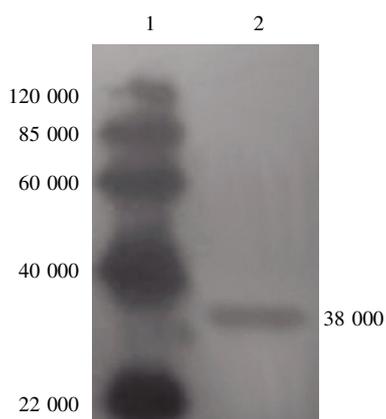
DNA 甲基化是指由 Mecps 介导, 在胞嘧啶 5 位碳原子上加入一个甲基基团, 使之变成 5-甲基胞嘧啶(5-<sub>m</sub>C)的化学反应; 是基因在转录水平调控的主要方式之一<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞抑癌基因启动子部位的 CpG 岛通常表现为高甲基化状态。抑癌基因甲基化在早期癌, 甚至癌前病变中即已出现, 是肿瘤早期检测的重要分子指标。抑癌基因甲基化的检测对肿瘤的早期诊断和治疗有十分重要的意义<sup>[4]</sup>。



1: 蛋白 Marker; 2: 纯化后的重组蛋白。

图 3 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 电泳分析

Figure 3 SDS-PAGE electrophoresis analysis of purified proteins



1: 蛋白 Marker; 2: MBD 重组蛋白。

图 4 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Figure 4 Western blot analysis of recombinant proteins

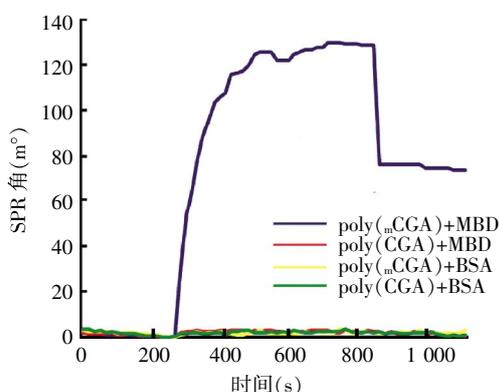


图 5 SPR 检测 MBD 蛋白与甲基化 DNA 的相互作用

Figure 5 SPR analysis of interaction between MBD and methylated DNA

DNA 甲基化的检测方法可分为两大类<sup>[5]</sup>:一是亚硫酸氢盐化学修饰法。该法是基于亚硫酸氢钠可将非甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶,而不改变甲基化胞嘧啶的原理。常用的检测方法包括亚硫酸氢盐修饰后测序法、甲基化特异性 PCR 和甲基化特异性荧光定量 PCR 等。二是非亚硫酸氢盐法。主要包括:①将 DNA 裂解为碱基,通过色谱柱分离后,经紫外光测定其吸收峰并定量的高效液相色谱法;②利用 DNA 甲基化敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 和不敏感的同裂酶 *Msp* I 消化 DNA 的限制性内切酶法;③利用特异性的单克隆抗体与甲基化的胞嘧啶之间的抗原抗体反应的免疫学方法等。其中,亚硫酸氢盐化学修饰法和限制性内切酶法及其衍生技术是目前最常用的检测方法。

现有的甲基化检测方法普遍存在操作流程繁琐、检测稳定性不佳等缺陷。高效液相色谱法操作复杂,技术要求高;免疫学方法只能在甲基化的胞嘧啶处于非碱基对状态下进行检测;限制性内切酶法仅用于检测内切酶识别位点处的甲基化状态,且易因为不完全消化导致假阳性的结果。即使目前广泛使用的亚硫酸氢盐法,依然存在化学修饰耗时长、胞嘧啶转化为尿嘧啶不完全、大量 DNA 降解等诸多问题<sup>[5-6]</sup>。

基于 MBD 能特异结合甲基化 DNA,Shiraishi 等<sup>[7]</sup>提出用 MBD 柱层析法筛选甲基化 DNA 的思路。在此基础上,Zou 等<sup>[8]</sup>以 MBD 柱层析法富集粪便中的甲基化 DNA,以定量 PCR 测定特定基因的甲基化,用于大肠癌的早期诊断。Gebhard<sup>[9]</sup>和 Rauch 等<sup>[10]</sup>发明了以 MBD 富集甲基化 DNA 与基因芯片相结合的 DNA 甲基化检测芯片。上述方案与传统检测方法比较更简便快捷。

目前,MBD 亲和柱和 DNA 甲基化芯片,多选用甲基 CpG 结构域蛋白 2(methyl-CpG binding domain protein 2,MBD2)全蛋白作为原料。然而,虽然 MBD2 对甲基化 DNA 亲和力高,但其与非甲基化 DNA 也存在有一定的结合作用<sup>[11-12]</sup>。Mecp2 是第一个被发现的 Mecp 家族成员,其 MBD 区不但与甲基化 DNA 亲和力高,而且特异性强<sup>[13-14]</sup>。Cross 等<sup>[15]</sup>在大肠杆菌中表达了鼠 Mecp2 的 MBD,用于富集甲基化 DNA。为了后续将 MBD 用于人甲基化 DNA 的检测,本研究表达了人 Mecp2 的 MBD 重组蛋白。

在预实验中我们将人 Mecp2 蛋白的 MBD 区所对应的核酸序列克隆至 pGS21a 载体中,结果未能在大肠杆菌中表达。由于 MBD 核酸中存在大量稀

有密码子,推测其可能影响了基因在大肠杆菌内的复制、转录、翻译的效率以及 mRNA 的稳定性,从而导致重组蛋白表达失败。本研究根据大肠杆菌的密码子偏爱性,对 MBD 的 DNA 进行密码子优化,以大肠杆菌表达偏好更高的密码子代替原始序列中的相应密码子,获得了高水平的 MBD 重组蛋白表达。SPR 分析表明重组 MBD 能特异结合甲基化 DNA,而不结合非甲基化 DNA,提示该蛋白可用于制备 MBD 亲和柱等工具,用于 DNA 甲基化的检测。

本研究通过密码子优化的方式,成功制备了 MBD 重组蛋白,为基于 MBD 的 DNA 甲基化检测技术的建立奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Fournier A, Sasai N, Nakao M, et al. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance [J]. *Brief Funct Genomics*, 2012, 11 (3): 251-264
- [2] Zou X, Ma W, Solov'ov IA, et al. Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(6): 2747-2758
- [3] Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108 (1): 43-51
- [4] Li XQ, Guo YY, De W. DNA methylation and microRNAs in cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(9): 882-888
- [5] Dahl C, Guldborg P. DNA methylation analysis techniques [J]. *Biogerontology*, 2003, 4(4): 233-250
- [6] Tanaka K, Okamoto A. Degradation of DNA by bisulfite treatment [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(7): 1912-1915
- [7] Shiraiishi M, Sekiguchi A, Oates AJ, et al. Methyl-CpG binding domain column chromatography as a tool for the analysis of genomic DNA methylation [J]. *Ana Biochem*, 2004, 329(1): 1-10
- [8] Zou H, Harrington J, Rego RL, et al. A novel method to capture methylated human DNA from stool; implications for colorectal cancer screening [J]. *Clin Chem*, 2007, 53 (9): 1646-1651
- [9] Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, et al. Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6118-6128
- [10] Rauch T, Li H, Wu X, et al. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7939-7947
- [11] Berger J, Bird A. Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33 (Pt 6): 1537-1540
- [12] Dhasarathy A, Wade PA. The MBD protein family-reading an epigenetic mark? [J]. *Mutat Res*, 2008, 647(1-2): 39-43
- [13] Adkins NL, Georgel PT. MeCP2: structure and function [J]. *Biochem Cell Biol*, 2011, 89(1): 1-11
- [14] Hansen JC, Wexler BB, Rogers DJ, et al. DNA binding restricts the intrinsic conformational flexibility of methyl CpG binding protein 2 (Mecp2) [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 18938-18948
- [15] Cross SH, Charlton JA, Nan X, et al. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column [J]. *Nat Genet*, 1994, 6(3): 236-244

[收稿日期] 2012-08-06