

文章编号: 1674-5566(2017)03-0339-09

DOI:10.12024/jsou.20161001881

金鱼 *Tgf2* 转座酶的原核表达及其 DNA 结合活性

司蕊蕊¹, 赵 茜¹, 卢梦琪¹, 邹曙明², 蒋霞云^{1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

摘 要: 金鱼 *Tgf2* 转座子基因属于 *Hobo/Activator/Tam3 (hAT)* 超家族, 其编码的活性转座酶能在多种鱼类转座中介导基因插入及诱变, 因此在鱼类重要性状主控基因的筛选、功能解释及育种等方面具有重要的应用前景。鉴于 *Tgf2* 转座酶基因 (JN886591) 存在众多稀有密码子, 本研究依据大肠杆菌对密码子的偏好性, 对金鱼 *Tgf2* 转座酶基因进行密码子优化, 所得 *Tgf2* 转座酶基因连接原核表达载体 pET-28a(+), 将重组载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞。该大肠杆菌细胞在培养温度 37 °C、OD₆₀₀ ≈ 0.5 时用 IPTG 诱导获得高效表达, 即菌体中含有 8.8% 的重组蛋白, 上清液中含有 4.0% 重组蛋白。采用亲和层析纯化从菌体上清液中分离得到分子量约 70 ku 的可溶性重组蛋白, 经 MALDI-(TOF)/TOF 串联质谱鉴定其为重组 *Tgf2* 转座酶。进而采用分子排阻色谱法研究转座酶的 DNA 结合活性, 结果表明: 所得重组 *Tgf2* 转座酶能识别并结合含 *Tgf2* 转座子特异性亚末端重复序列的 DNA 探针, 即启动转座。采用原核表达体系高效获得重组 *Tgf2* 转座酶, 为其作为工具酶应用于鱼类生物学研究奠定必要的基础。

关键词: *Tgf2*; 转座酶; 原核表达; DNA 结合活性

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

转座子 (transposon) 是一类能够在基因组中移动的遗传因子, 其过程称为转座 (transposition)。随着多个基因组测序计划的进行, 原核和真核生物界陆续发现众多转座子, 转座子因此被认为是自然界变异和进化的重要推动力之一^[1-2]。转座子可介导基因组插入突变、基因重排、基因修饰及基因治疗^[3-6], 因此有望开发成为重要的遗传学、生物学工具^[7-9]。

DNA 转座子在宿主基因组通过“剪切-粘贴”的机制变更位置^[10-11]。自主的 DNA 转座子能编码活性转座酶^[12-13]以介导转座过程, 但由于受到来自宿主的钝化作用, 迄今自然界生物体内仅发现极少数的天然活性转座子, 如 *Tol2*、*PiggyBac*、*Tgf2* 等^[14-16]。*hAT* 超家族的 *Tgf2* 转座子首先在我国的金鱼 (*Carassius auratus*) 中发现, 它存在于草金、鹤顶红、硫金等多个品系中, 能编码完整、具有活性的转座酶, 并在斑马鱼及团头鲂中介导转座^[17], 是具有潜力的鱼类遗传学工具之一。前

期研究显示: 大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中以低温 (22 °C)、低吸光度 (OD₆₀₀ ≈ 0.3) 条件下诱导, 可表达可溶、活性的 *Tgf2* 转座酶^[18]。鉴于大肠杆菌 BL21 菌株表达外源蛋白有更高的效率和稳定性, 本研究根据大肠杆菌的密码子偏好性, 优化并合成了金鱼 *Tgf2* 转座酶编码区基因, 与 pET-28a(+) 载体重组, 采用大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为宿主菌株, 以期获得 *Tgf2* 转座酶的高效表达, 为 *Tgf2* 转座酶的发酵生产及应用创造先决条件。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌种和试剂

pET-28a(+) 为本实验室保存; BL21 (DE3)、质粒小提试剂盒、DNA 分子量 marker 以及 T₄ DNA 连接酶购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 蛋白质分子量 marker 购自上海生工生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2016-10-19 修回日期: 2016-12-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31201760, 31572220)

作者简介: 司蕊蕊 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物学。E-mail: sirui1991328@163.com

通信作者: 蒋霞云, E-mail: jiangxy@shou.edu.cn

1.2 *Tgf2* 转座酶的密码子优化

参考编码 *Tgf2* 转座酶的 cDNA 序列 (JN886591), 根据大肠杆菌密码子的偏好性对其密码子进行优化, 同时在 5' 端和 3' 端分别添加 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 优化后的 *Tgf2* 转座酶基因命名为 *Tgf2TP Plus*。

1.3 重组表达载体 pET-28a(+)-*Tgf2TP Plus* 的构建

pET-28a(+) 采用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 经 37 °C 孵育 3 h, 琼脂糖凝胶电泳检测后回收 DNA。回收的酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳检测。*Tgf2TP Plus* 和 pET-28a(+) 回收片段通过 T₄ DNA 连接酶, 在 16 °C 反应 4 h, 构建重组载体 pET-28a(+)-*Tgf2TP Plus*。将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 37 °C 培养过夜。通过菌落 PCR、琼脂糖凝胶电泳检测重组表达载体。

1.4 阳性克隆菌的筛选和鉴定

转化成功的 DH5 α 细胞在 LB 培养基中 37 °C 摇床培养约 12 h, 离心得到菌体后, 通过质粒小提试剂盒提取重组表达载体 pET-28a(+)-*Tgf2TP Plus*, 将重组载体转化到 BL21(DE3) 感受态细胞中, LB 液体培养基培养 1 h 后涂布于含有卡那霉素抗性的固体 LB 培养基上, 37 °C 过夜培养。

选择长势优良的单菌落, 利用引物 *Tgf2TP Plus-F* (5'-TGTTAGCAGCCGGATCTCA-3') 和 *Tgf2TP Plus-R* (5'-ACTGGTGGACAGCAAATGG-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μ L): 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L; DNA 模板 1 μ L; 10 \times PCR Buffer 2 μ L; dNTPs 2 μ L; *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L; 加无菌水补足 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min、94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min、30 个循环、72 °C 延迟 30 s。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测后, 挑选阳性克隆菌落送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 重组蛋白的诱导表达

将测序确证的重组单菌落 BL21(DE3) 在含有卡那霉素抗性的 LB 培养液中、37 °C 摇床培养 (220 r/min) 至 OD₆₀₀ \approx 0.5, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 在 37 °C、150 r/min 振荡培养。诱导结束后, 收集菌

液于离心管中, 于 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 重悬于磷酸盐缓冲液中 (pH 7.4), 用于 SDS-PAGE 分析 (浓缩胶 5%, 分离胶 12%), 利用 BandScan 软件对重组蛋白进行定量分析。

1.6 重组蛋白的纯化及鉴定

IPTG 诱导宿主菌表达 4 h、12 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 磷酸盐缓冲液重悬, 在冰上进行超声波破碎 30 min (功率 100 W, 超声破碎时间 3 s, 间隔 6 s)。细菌破碎液以 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。上清液通过 0.22 μ m 滤膜过滤, 采用 HisTrapTM HP (GE Healthcare) 亲和层析, 流速为 1 mL/min, 平衡缓冲液为 20 mmol/L 磷酸盐、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑, 结合缓冲液为 20 mmol/L 磷酸盐、0.5 mol/L NaCl、40 mmol/L 咪唑, 洗脱缓冲液为 20 mmol/L 磷酸盐、0.5 mol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑, 根据紫外吸收值 (OD₂₈₀) 收集目的蛋白组分。

收集的洗脱液通过 SDS-PAGE 分析, 从 SDS-PAGE 凝胶上切割合适的条带, 送至北京华大蛋白质研究中心有限公司进行 MALDI-(TOF)/TOF 串联质谱鉴定。

1.7 *Tgf2* 转座酶的体外 DNA 结合活性

50 bp 核苷酸探针 L50 (5'-CAGAGGTGTAAA AGTACTTAAGTAATTTTACTTGATTACTGTACTTA AGT-3'), 其序列取自 *Tgf2* 转座子左臂反向重复末端。将合成的正义链和反义链均以 50 μ mol/L 浓度混合, 加入 DNA 寡核苷酸退火缓冲液 (碧云天生物技术有限公司, 中国南通), 混匀后放入 PCR 仪进行退火反应。退火步骤: 95 °C 变性 2 min; 每 90 s 下降 1 °C、降至 25 °C (约 90 min)。探针溶液于 -20 °C 保存。

采用 Superdex200 葡聚糖层析柱, 利用分子排阻色谱法, 0.5 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲液洗脱, 流速为 0.5 mL/min。分别以重组蛋白和探针为空白对照, 用两种不同浓度的探针与转座酶混合 (*Tgf2* 转座酶与探针 L50 的摩尔浓度比分别为 1:0.67 和 1:2), 室温孵育 20 min 后上样, 根据紫外吸收值 (OD₂₈₀, OD₂₆₀) 的变化, 判断转座酶是否具有体外 DNA 结合活性^[19-21]。

2 结果与分析

2.1 *Tgf2* 转座酶的密码子优化

不同细胞内可用 tRNAs 量的差异, 导致同一

密码子在不同生物体的利用率不同,即密码子的偏好性,它是采用原核生物表达真核基因时重要的影响因素之一。*Tgf2* 转座子基因来源于金鱼 (*C. auratus*),其编码的转座酶 (*Tgf2TP*) 不但使用了琥珀密码子(UAG)作为终止密码子,还含有多个大肠杆菌难以识别的稀有密码子,如 AGG, AGA, AUA, CUA, CGA, CGG, CCC 和 UCG (图 1)。经稀有密码子分析软件 (GenScript Rare Codon Analysis Tool) 分析表明:*Tgf2TP* 的密码子适应指数 (Codon adaptation index, CAI) 为 0.61, GC 含量

为 45.62%,密码子使用频率分布系数 (Codon frequency distribution, CFD) 为 13%。依据大肠杆菌密码子的偏好性、优化得到的 *Tgf2TP Plus* 对原有的终止密码子和绝大多数稀有密码子进行了同义替换 (图 1)。从而,使 *Tgf2TP Plus* 的 CAI 指数为 0.86, 达到理想值区间 (0.8 ~ 1.0); GC 含量为 53.11%, 符合理想值区间 (30% ~ 70%), 避免了低频率密码子的使用;终止密码子替换为 UGA。

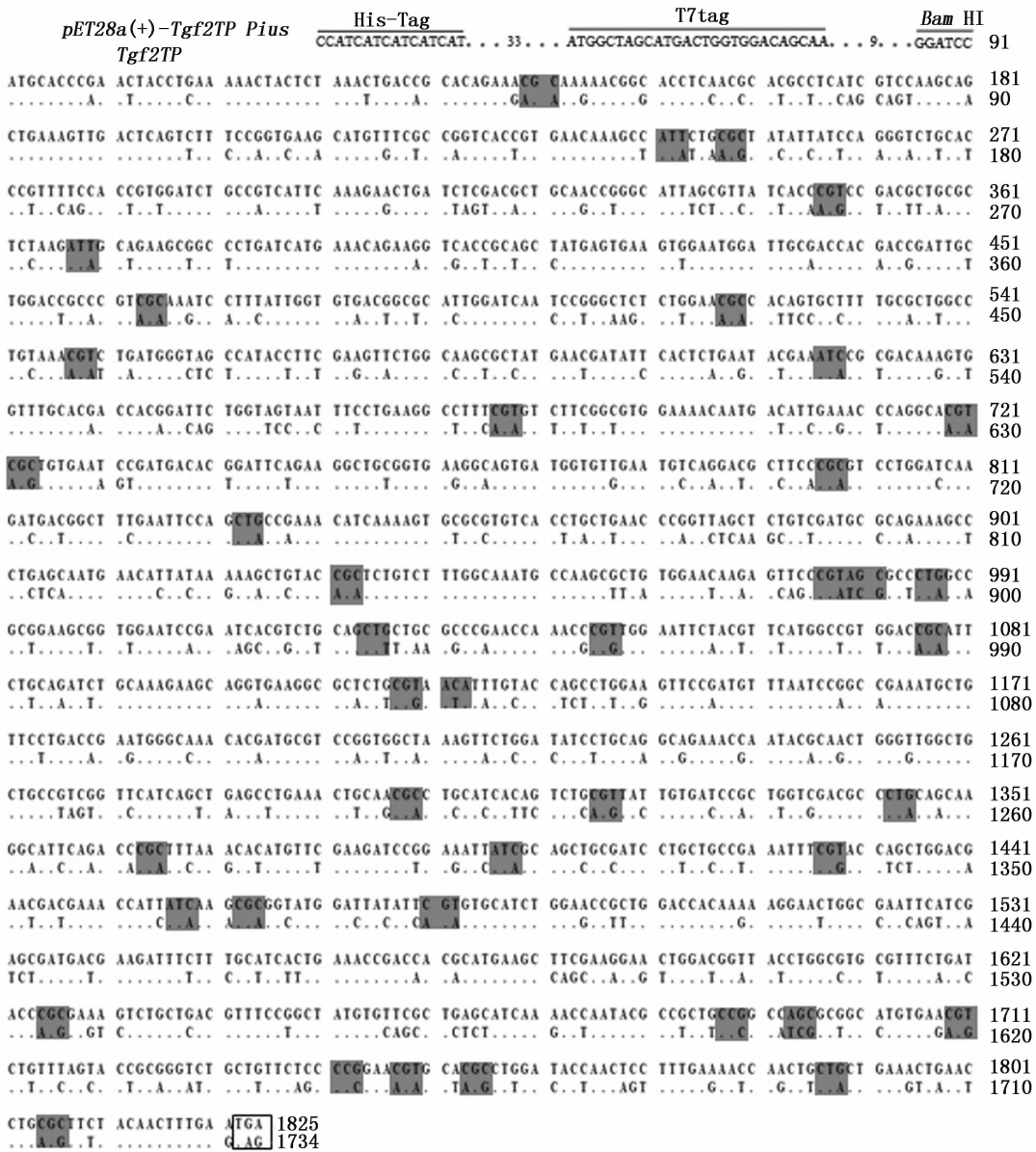


图 1 *Tgf2TP* 和密码子优化后 *Tgf2TP Plus* 的序列比对

Fig. 1 Alignment of *Tgf2TP* and *Tgf2TP Plus* derived from codon optimization

图中阴影标识不同的稀有密码子及其优化,终止密码子以黑框标识

In the figure, the different codons and their optimization are identified by shadows and the termination codon is identified by a black box

2.2 阳性克隆菌的筛选和鉴定

利用基因全合成方法获得 *Tgf2TP Plus*, 借助添加的 5' 端 *BamH I* 和 3' 端 *Xho I* 酶切位点将 *Tgf2TP Plus* 连接到 pET-28a(+) 上, 构建重组表达载体 pET-28a(+)-*Tgf2TP Plus*。将重组载体转化到 BL21(DE3) 感受态细胞后, 利用卡那霉素抗性平板筛选转化子。挑选长势优良的单菌落用于 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)显示: 约 1 700 bp 处呈现明显的亮条带。阳性单菌落的测序结果表明: *Tgf2TP Plus* 的序列正确、并且正确插入 pET-28a(+) 载体, 未出现阅读框的移码或改变, *Tgf2* 转座酶将融合表达 His-Tag 组氨酸标签(图 1), 利于后期的蛋白质纯化。

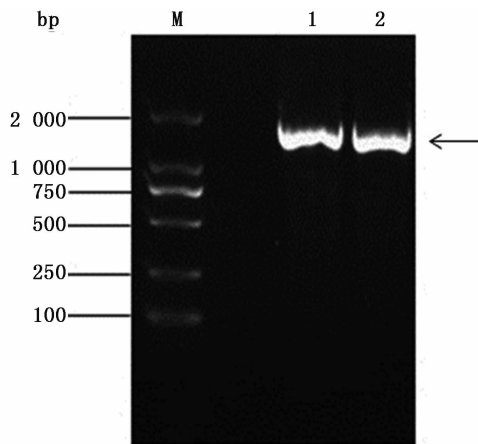


图 2 重组质粒 pET28a-*Tgf2TP Plus* 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of recombinant plasmid pET28a-*Tgf2TP Plus*

M. DNA 标准分子量 marker; 1-2. PCR 检测产物

M. DNA marker; 1-2. Product of PCR detection

2.3 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的重组单菌落 BL21(DE3)/pET-28a(+)-*Tgf2TP Plus* 在 LB 抗性培养液中, 37 °C 培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ 加入 IPTG (1.0 mmol/L), 诱导表达 4 h 后, 收集菌液, 离心重悬后, 采用 SDS-PAGE 分析。结果显示(图 3): 与诱导前相比较, 诱导后的菌体蛋白在约 70 ku 处表达量明显增加, 即重组蛋白得以表达。经 BandScan 软件分析, 表达的重组蛋白占菌体总蛋白约 8.8%。前期研究的 *Tgf2* 转座酶表达条件为: 低温(22 °C)培养、低吸光度诱导 ($OD_{600} \approx 0.3$)^[18]。此条件下, 大肠杆菌 Rosetta (DE3) 表达重组蛋白量占菌体总蛋白的约 4.2%。

经过密码子的优化, 金鱼 *Tgf2* 转座酶在

BL21(DE3) 宿主菌中得以表达, 表达量从之前的约 4.2% 提高到了约 8.8%, 即表达量提高了一倍。培养温度提高到 37 °C, 可以缩短发酵周期; 对数生长中期诱导能降低发酵过程中染菌的风险。这些为后续发酵生产金鱼 *Tgf2* 转座酶提供了保障。

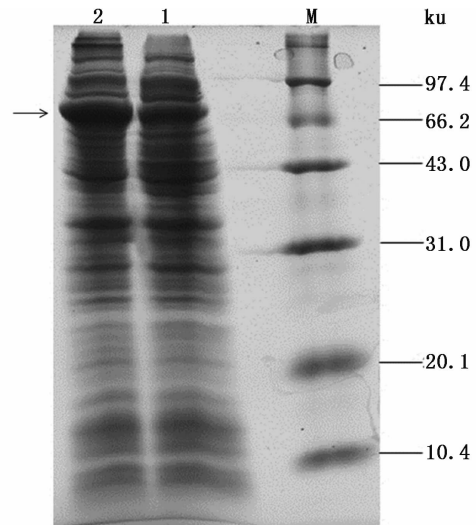


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

M. 低分子量蛋白质 marker; 1. 未诱导、含有重组质粒的 BL21(DE3) 总蛋白; 2. 经诱导、含有重组质粒的 BL21(DE3) 总蛋白

M. Protein molecular weight marker; 1. Total proteins of bacteria BL21(DE3) with recombinant plasmid without induction; 2. Total proteins of bacteria BL21(DE3) with recombinant plasmid under induced condition

2.4 重组蛋白的纯化

收集诱导后培养的菌体、采用超声波破碎后离心得到上清液, 通过 HisTrapTM HP 亲和柱纯化, 收集的洗脱液进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4 所示, 上清液经亲和层析可得到纯度较高的重组蛋白。通过 BandScan 分析, 从总菌体出发, 较纯重组蛋白 (>70%) 的回收率约为 0.28% (表 1)。

2.5 重组蛋白的鉴定

从 SDS-PAGE 胶上切割纯化后的重组蛋白, 进行质谱分析, 结果如图 5 所示: 二级质谱检测到的肽片段序列(图 5a 中阴影)与 GenBank 中的 *Tgf2* 转座酶相比对, 相同片段覆盖率达到 64.6% (图 5 未显示)。其中 3 处寡肽段(图 5a 中黑框)的 MS/MS 质谱图如图 5b, c, d 所示。质谱结果表明, 表达的重组蛋白为金鱼 *Tgf2* 转座酶。

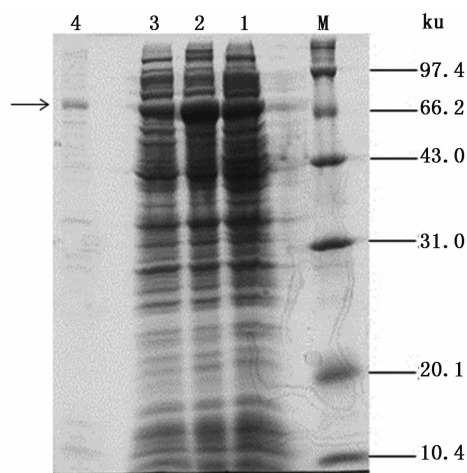


图4 重组蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein purification

M. 低分子量蛋白质 marker; 1. 未诱导、含有重组质粒的 BL21 (DE3) 总蛋白; 2. 经诱导、含有重组质粒的 BL21 (DE3) 总蛋白; 3. 经诱导、含有重组质粒的细胞经过超声破壁后的上清液; 4. 经过亲和和纯化后的重组蛋白

M. Protein molecular weight marker; 1. Total proteins with recombinant plasmid without induction; 2. Total proteins with recombinant plasmid with induction; 3. Supernatant portion of induced bacteria with recombinant plasmid after ultrasonictreatment; 4. Recombinant proteins by affinity chromatography purification

表1 重组蛋白的纯化

Tab. 1 Purification of the recombinant proteins

纯化步骤 Purification steps	总蛋白量/mg Total proteins	纯度/% Purity	回收率/% Recovery
总菌体 Total bacterial	32.6	8.8	100
上清液 Supernatant	19.8	4.0	61
洗脱液 Eluent	0.39	71	1.2

注:以 150 mL 总菌液为例

Note: take 150 mL total bacterial liquid as an example

2.6 *Tgf2* 转座酶的体外 DNA 结合活性

活性转座酶能识别转座子的左右臂序列、并与之结合,以启动后续的 DNA 切割、靶位点的整合等转座过程^[22-23]。本实验采用的 DNA 探针 L50 包含 *Tgf2* 左臂反向重复末端,其分子筛层析洗脱曲线呈现核酸洗脱峰(图 6b- I , b- II), 出峰

时间约为 28 min 且 $OD_{260} > OD_{280}$;单独孵育的重组 *Tgf2* 转座酶呈现蛋白洗脱峰(图 6a), 出峰时间约为 18 min 且 OD_{260} 与 OD_{280} 相当。

当 *Tgf2* 转座酶与探针 L50 分别以不同摩尔浓度比(1:0.67 和 1:2)混合孵育,随后的洗脱曲线(图 6b- I , c- I)都显示:约为 18 min 时出现的蛋白洗脱峰增高显著,此结果与 Hermes 转座酶的研究结果一致^[20]。hAT 家族转座酶以多聚体存在,多聚体通常由若干个二聚体组成空腔结构,以容纳 DNA^[20],故蛋白与核酸形成复合物的层析行为可能更符合蛋白质特征。

3 讨论

本研究通过优化金鱼 *Tgf2* 转座酶编码区密码子,构建重组载体 pET-28a(+)-*Tgf2TP Plus*, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中;大肠杆菌培养温度为 37 °C、培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ 时诱导,菌体中含有 8.8% 的重组蛋白,其中上清液含有 4.0% 重组蛋白。通过亲和层析从上清液中纯化得到较高纯度 (> 70%) 的重组蛋白,采用 MALDI-TOF/TOF 串联质谱对重组蛋白进行鉴定,确定表达的重组蛋白即为金鱼 *Tgf2* 转座酶。利用分子筛层析确定了重组金鱼 *Tgf2* 转座酶能识别、结合含 *Tgf2* 转座子特异性亚末端重复序列的 DNA 探针,即具有体外 DNA 结合活性。

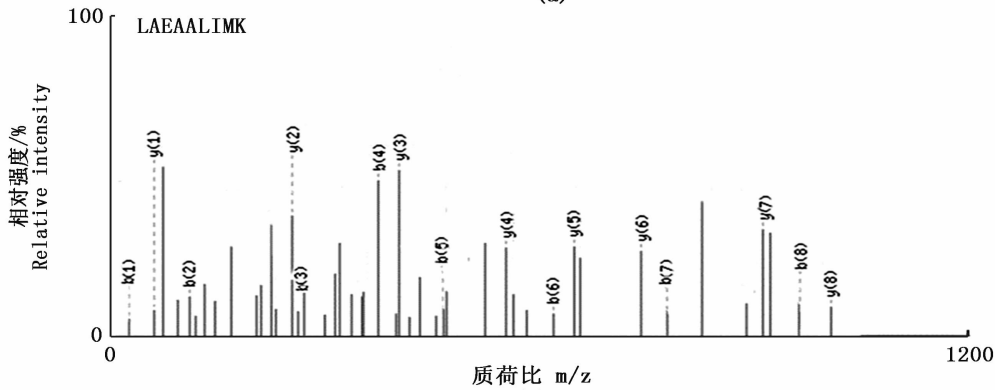
转座酶的活性对转座子的功能起到至关重要的作用,如转座子 Sleeping beauty 和 Frog Prince 转座活性的唤醒均有赖于其编码转座酶分子水平的重建和关键结构域的改造^[24-25]。转座酶能够识别 DNA 序列,催化切割及整合,使转座得以进行,故重组转座酶的开发是对转座子应用的有益补充。和 mRNA 转染相比,应用转座酶转染具有的潜在优势为:(1)避免可能的转座延迟,以提高转座效率;(2)适于异源系统。在众多的转座子中,报道显示重组 *Ac*、*Hermes*、*Tol2*、*Tgf2* 转座酶具有生物活性^[18,26-27],本研究实践了通过优化密码子改善重组 *Tgf2* 转座酶表达的方法,并提高了目的蛋白的产量,为后续发酵生产 *Tgf2* 转座酶提供保障,也为 *Tgf2* 转座酶作为工具酶的应用提供支撑。

*Tgf2*转座酶序列

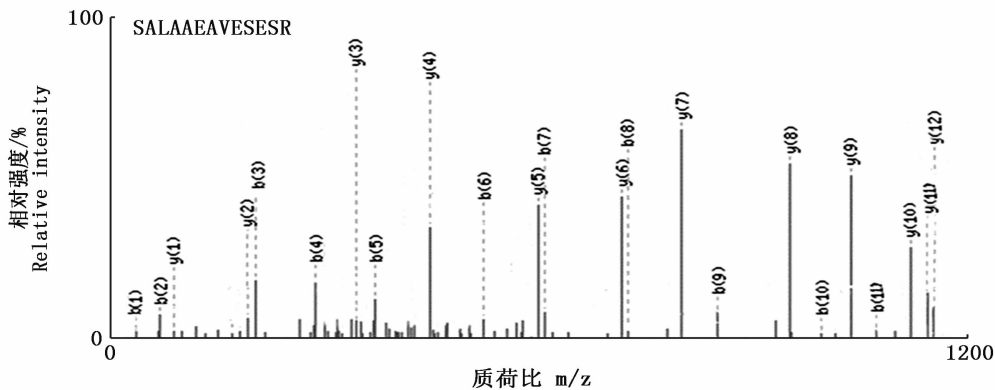
```

1  MHPNYLKNYS KLTAQKRKNG TSTHASSSKQ LKVDVFPVK HVSPVTVNKA
51  ILRYIIQGLH PFSTVDLPSP KELISTLQPG ISVITRPTLR SKLAEAALIM
101  KQKVTAAMSE VEWIATTTDC WTARRKSFIFG VTAHWINPGS LERHSAFALA
151  CKRLMGSHTF EVLASAMNDI HSEYEIRDKV VCTTTDSGSN FLKAFRVFGV
201  ENNDIETQAR RCESDDTDSE GCGEGSDGVE CQDASRVLDQ DDGFEFQLPK
251  HQKCACHLLN PVSSVDAQKA LSNEHYKKLY RSVFGKCQAL WNKSSRSALA
301  LAEVESESRL QLLRPNQTRW NSTFMAVDRI LQICKEAGEG ALRNICTSLE
351  VPMFNPAEML FLTEWANTMR PVAKVLDILQ AETNTQLGWL LPSVHQLSLK
401  LQRLHHSRLRY CDPLVDALQQ GIQTRFKHMF EDPETIAAAI LLPKFRTSWT
451  NDETIIKRGM DYIRVHLEPL DHKKELANSS SDEDEFFASL KPTTHEASKE
501  LDGYLACVSD TRESLLTFPA MCSLSIKINT PLPASAACER LFSTAGLLFS
551  PERARLDTNS FENQLLLKLN LRFYNFE
    
```

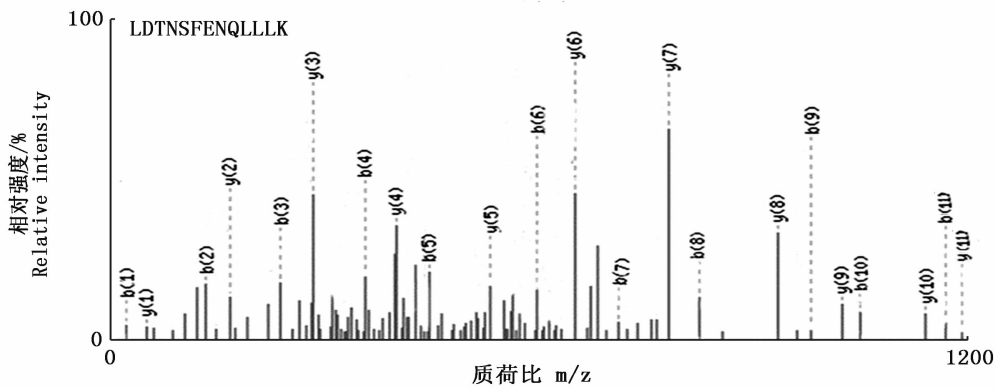
(a)



(b)



(c)

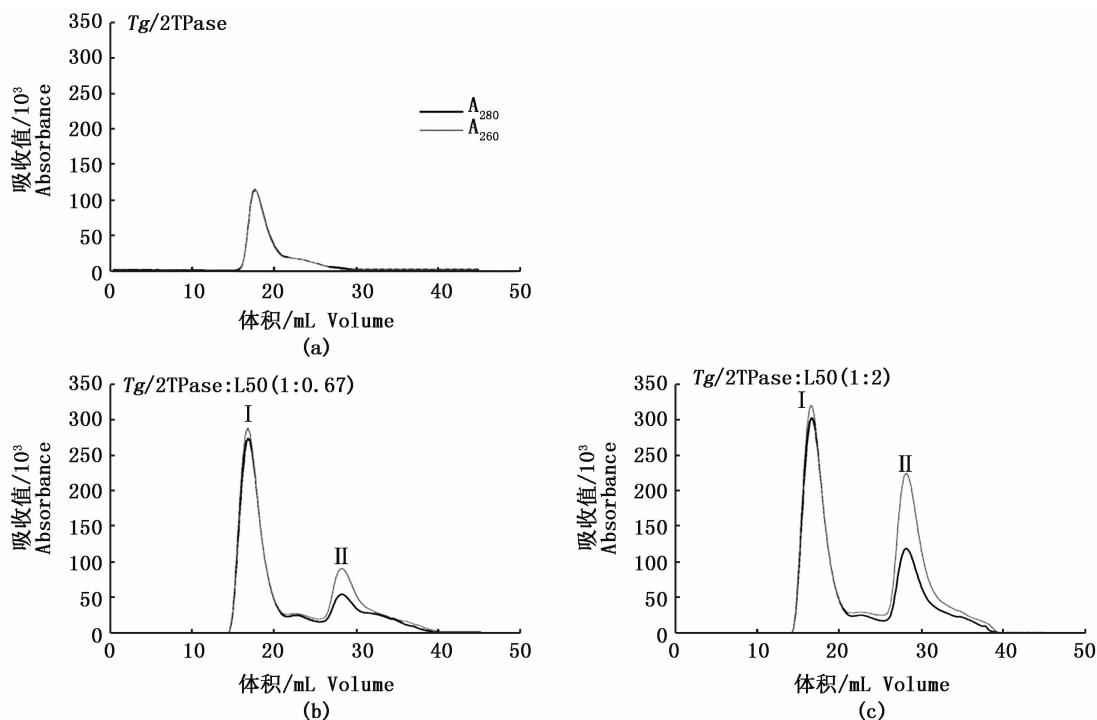


(d)

图5 *Tgf2* 转座酶的质谱鉴定

Fig. 5 Identification of *Tgf2* transposase by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry

(a) 推测重组 *Tgf2* 转座酶的氨基酸序列; (b-d) 串联质谱测序的部分肽段
 (a) Putative amino acid sequence of recombinant *Tgf2* transposase; (b-d) MS/MS spectra of some peptide fragments

图 6 *Tgf2* 转座酶的体外 DNA 结合活性Fig. 6 DNA binding activity of *Tgf2TP*

(a) *Tgf2* 转座酶的洗脱图谱; (b, c) *Tgf2* 转座酶和 DNA 探针(摩尔比分别为 1:0.67 和 1:2)的洗脱图谱

(a) Elution profile of *Tgf2TP* alone; (b, c) Elution profiles of incubation mixtures of *Tgf2TP* and L50 of different proportion (b. 1:0.67, c. 1:2)

参考文献:

- [1] HUANG C R L, BURNS K H, BOEKE J D. Active transposition in genomes[J]. Annual Review of Genetics, 2012, 46(1): 651-675.
- [2] FESCHOTTE C, PRITHAM E J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes [J]. Annual Review of Genetics, 2007, 41(1): 331-368.
- [3] KAWAKAMI K. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates[J]. Genome Biology, 2007, 8(s1): S7.
- [4] NAGAYOSHI S, HAYASHI E, ABE G, et al. Insertional mutagenesis by the *Tol2* transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*[J]. Development, 2008, 135(1): 159-169.
- [5] HE X Z, LI J, LONG Y, et al. Gene transfer and mutagenesis mediated by *Sleeping Beauty* transposon in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Transgenic Research, 2013, 22(5): 913-924.
- [6] FURUSHIMA K, JANG C W, CHEN D W, et al. Insertional mutagenesis by a hybrid *PiggyBac* and *Sleeping Beauty* transposon in the rat[J]. Genetics, 2012, 192(4): 1235-1248.
- [7] GEURTS A M, WILBER A, CARLSON C M, et al. Conditional
- [8] FROSCHAUER A, SPROTT D, GERWIEN F, et al. Effective generation of transgenic reporter and gene trap lines of the medaka (*Oryzias latipes*) using the *Ac/Ds* transposon system [J]. Transgenic Research, 2012, 21(1): 149-162.
- [9] CLARK K J, GEURTS A M, BELL J B, et al. Transposon vectors for gene-trap insertional mutagenesis in vertebrates [J]. Genesis, 2004, 39(4): 225-233.
- [10] BENJAK A, FORNECK A, CASACUBERTA J M. Genome-wide analysis of the "cut-and-paste" transposons of grapevine [J]. PLoS One, 2008, 3(9): e3107.
- [11] ZHANG J B, PETERSON T. Transposition of reversed *Ac* element ends generates chromosome rearrangements in maize [J]. Genetics, 2004, 167(4): 1929-1937.
- [12] CHENG L D, JIANG X Y, TIAN Y M, et al. The goldfish *hAT*-family transposon *Tgf2* is capable of autonomous excision in zebrafish embryos[J]. Gene, 2014, 536(1): 74-78.
- [13] CLARK K J, CARLSON D F, LEAVER M J, et al. Passport, a native Tc1 transposon from flatfish, is functionally active in vertebrate cells[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(4): 1239-1247.
- [14] KOGA A, SUZUKI M, INAGAKI H, et al. Transposable

- element in fish[J]. *Nature*, 1996, 383(6595): 30.
- [15] FRASER M J, SMITH G E, SUMMERS M D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses [J]. *Journal of Virology*, 1983, 47(2): 287-300.
- [16] 邹曙明, 杜雪地, 袁剑, 等. 金鱼 *hAT* 家族转座子 *Tgf2* 的克隆及其结构[J]. *遗传*, 2010, 32(12): 1263-1268.
- ZOU S M, DU X D, YUAN J, et al. Cloning of goldfish *hAT* transposon *Tgf2* and its structure [J]. *Hereditas*, 2010, 32(12): 1263-1268.
- [17] JIANG X Y, DU X D, TIAN Y M, et al. Goldfish transposase *Tgf2* presumably from recent horizontal transfer is active [J]. *The FASEB Journal*, 2012, 26(7): 2743-2752.
- [18] XU H L, SHEN X D, HOU F, et al. Prokaryotic expression and purification of soluble goldfish *Tgf2* transposase with transposition activity [J]. *Molecular Biotechnology*, 2015, 57(1): 94-100.
- [19] SHIBANO T, TAKEDA M, SUETAKE I, et al. Recombinant *Tol2* transposase with activity in *Xenopus embryos* [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(22): 4333-4336.
- [20] HICKMAN A B, EWIS H E, LI X H, et al. Structural basis of *hAT* transposon end recognition by Hermes, an octameric DNA transposase from *Musca domestica* [J]. *Cell*, 2014, 158(2): 353-367.
- [21] JIANG X Y, HOU F, SHEN X D, et al. The N-terminal zinc finger domain of *Tgf2* transposase contributes to DNA binding and to transposition activity [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27101.
- [22] RICE P A, BAKER T A. Comparative architecture of transposase and integrase complexes [J]. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(4): 302-307.
- [23] ESSERS L, ADOLPHS R H, KUNZE R. A highly conserved domain of the maize *activator* transposase is involved in dimerization [J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(2): 211-223.
- [24] IVICS Z, HACKETT P B, PLASTERK R H, et al. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 501-510.
- [25] GALLARDO-GÁLVEZ J B, MÉNDEZ T, BÉJAR J, et al. Endogenous transposases affect differently *Sleeping Beauty* and *Frog Prince* transposons in fish cells [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(4): 695-705.
- [26] GRABUNDZIJA I, IRGANG M, MÁTÉS L, et al. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells [J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(6): 1200-1209.
- [27] NI J, WANGENSTEEN K J, NELSEN D, et al. Active recombinant *Tol2* transposase for gene transfer and gene discovery applications [J]. *Mobile DNA*, 2016, 7: 6.

Prokaryotic expression of goldfish *Tgf2* transposase and its DNA binding activity

SI Ruirui¹, ZHAO Xi¹, LU Mengqi¹, ZOU Shuming², JIANG Xiayun^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: Goldfish *Tgf2*, a transposon of Hobo/Activator/Tam3 (*hAT*) superfamily, encodes active transposase which is capable of mediating gene insertion and mutagenesis in a series of fish species. Therefore, it has great potential in applications such as screening master genes of important traits, functional explanation of genes and fish breeding. For existence of many rare codons in *Tgf2* transposase cDNA (*Tgf2TP*, JN886591), *Tgf2TP* was optimized based on codon preference of *E. coli*. The synthesized *Tgf2TP* was then cloned into pET-28a(+) and transformed into BL21(DE3) cells. After incubation at temperature (37 °C) and induction when OD₆₀₀ ≈ 0.5, the cells produced high yield of recombinant proteins, which accounted for 8.8% of total proteins in cells and 4.0% of supernatant proteins in lysates. By affinity chromatography purified recombinant protein (70 ku) was obtained, subjected to MALDI-(TOF)/TOF and identified as *Tgf2* transposase (*Tgf2TP*). Then size exclusion chromatography was applied to evaluate DNA-binding activity of *Tgf2TP*. The results showed that recombinant *Tgf2TP* recognized and bound specific DNA probes containing sub-terminal repeat sequences of *Tgf2*, which means start of transposition. The prokaryotic expression system for *Tgf2TP* not only provided soluble and active transposase efficiently, but also laid a foundation for *Tgf2TP* used as enzyme tools in a variety of fish biology research.

Key words: *Tgf2*; transposase; prokaryotic expression; DNA binding activity