

人肥胖基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

祝 骥^{1,2}, 马文丽¹, 毛向明¹, 李 凌¹, 宋艳斌¹, 郑文岭³ (¹南方医科大学分子生物学研究所, 广东 广州 510515; ²中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; ³广州军区广州总医院分子肿瘤研究所, 广东 广州 510010)

摘要:目的 克隆中国人的肥胖基因,并在大肠杆菌中高效表达人瘦素蛋白。方法 用 RT-PCR 从培养的中国人脂肪细胞提取的总 RNA 中扩增出肥胖基因,与 TA 载体连接后进行核酸序列测定,并将该基因定向克隆至高效表达质粒 pBV220,在大肠杆菌中表达。结果 克隆出中国人肥胖基因,其 cDNA 序列与文献报道的一致,构建了重组质粒 pBV220-OB,并成功地实现了人肥胖基因在大肠杆菌中的表达。结论 人肥胖基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达,为进一步研究该基因在肥胖症及其相关疾病中的作用,以及在脂肪代谢与脂肪细胞分化中的调控机制奠定基础。

关键词:肥胖症;肥胖基因;反转录 PCR;基因表达;瘦素蛋白

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)04-0395-04

Cloning of human obesity gene and its expression in *E. coli*

ZHU Ji^{1,2}, MA Wen-li¹, MAO Xiang-ming¹, LI Ling¹, SONG Yan-bin¹, ZHENG Wen-ling³

¹Institute of Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China; ³Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To clone the obesity gene of Chinese and express human leptin in *E. coli*. **Method** The obesity gene was amplified from the total RNA isolated from cultured human adipocytes of Chinese by reverse transcriptional PCR, inserted into TA-vector and cloned into the expression plasmid pBV220 after sequence identification. **Results** DNA sequencing confirmed that the isolated obesity gene was identical to the previously reported sequence. The recombinant plasmid pBV220-OB was constructed and leptin successfully expressed in *E. coli*. **Conclusion** Successful cloning and expression of human obesity gene in *E. coli* may facilitate further research of the mechanism of fat metabolism and adipocyte differentiation.

Key words: obesity; obesity gene; reverse transcriptional polymerase chain reaction; gene expression; leptin

肥胖被定义为能量摄入和能量消耗之间的系统不平衡造成的营养紊乱;肥胖会导致高血压、冠心病、非胰岛素依赖糖尿病等疾病。作为一个严重困扰人类的健康问题,近几年来日益受到人们的关注。但目前的治疗方法长期减肥效果较差而且副作用较大。自从1994年发现肥胖(obese, Ob)相关基因后,使基因治疗肥胖成为可能^[1];人的 Ob 基因与大鼠和小鼠分别有 83%和 84%的同源性,而小鼠和大鼠之间有 96%的同源性^[2,3]。瘦素蛋白(leptin)是 Ob 基因的蛋白产物,它由 167 个氨基酸组成,相对分子质量为 16 000。其前体含有 21 个氨基酸的信号肽,分泌到血液中时被切掉信号肽而成为活性分子。已发现它在人和小鼠中有抑制饮食摄入、加强新陈代谢、保持身体能量平衡等重要作用、它通过与其受体结合,信号作用于下丘脑

而起调节作用。在人体中如果 leptin 或其受体突变会造成早发性肥胖和肥胖综合症,目前认为 leptin 是一种具有多种代谢调节作用的激素^[4,5]。

为了进一步研究 leptin 的功能,我们用 RT-PCR 技术从培养的人前脂肪细胞诱导分化的脂肪细胞中分离了人 Ob 基因,并将该基因定向克隆于高效表达载体质粒 pBV220,在大肠杆菌中进行了体外表达。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 质粒及菌株 pMD 18-T vector 购自宝生物(大连)工程公司;表达载体质粒 pBV220 由暨南大学熊盛博士惠赠;大肠杆菌 JM109 及 TG1 为本室提供。

1.1.2 细胞 人前脂肪细胞系 F626 由本室从中国人腹部皮下脂肪分离并培养保存。

1.1.3 主要试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*Hind* III、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶及其它 PCR 及 RT-PCR 相关试剂均等购自宝生物(大连)工程公司;PCR 产物纯化试剂盒购自 Qiagen 公司;质粒 DNA 提取试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品;Ob 基因引物由本室用美

收稿日期:2004-11-09

基金项目:国家自然科学基金(39880032);广州市重点科技攻关项目(990448022)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (39880032) and Key Research Project of Guangdong Province (990448022)

作者简介:祝 骥(1967-),男,2002年毕业于华南理工大学,博士,助理研究员

通讯作者:马文丽,电话:020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

国 ABI 公司 3900 合成仪自行合成; DMEM-F12、小牛血清、等购自 Gibco BRL 公司; 胰岛素、地塞米松等购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 人前脂肪细胞培养及脂肪细胞总 RNA 提取 人前脂肪细胞系 F626 培养于含 10% 小牛血清、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、100 U/ml 青霉素的 DMEM-F12 培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。诱导脂肪细胞分化时在培养基中加入胰岛素、地塞米松, 其浓度分别为 1.5、1 $\mu\text{mol/L}$, 每 2 天更换 1 次培养基。

药物诱导分化成熟的脂肪细胞经胰酶消化后, 取约 1×10^7 细胞。PBS 液洗涤后, 加入 1 ml 的 Trizol 溶液混合均匀, 然后加入 0.2 ml 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 混匀后室温静置 10 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 30 min。取上清到新管并加等体积异丙醇混匀, 15 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 30 min。弃上清, 加 75% 的乙醇清洗 RNA 沉淀, 真空干燥 2~3 min, 溶于 30 μl 的 DEPC- H_2O 中, 用 DU530 (BECKMAN) 紫外分光光度仪进行定量及 1% 琼脂糖电泳检测后, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 Ob 基因的 RT-PCR 扩增 根据文献报道的人 Ob 基因序列, 设计引物 P1: 5'-CG GAA TTC ATG GTG CCC ATC CAA AAA GTC-3', P2: 5'-TT GGA TCC TCA GCA CCC AGG GCT GAG GTC-3', 上游引物 5' 端引入 *EcoR* I 位点, 下游引物 5' 端引入 *Bam*H I 位点。在第一链 cDNA 的逆转录合成中使用 3' 端引物 P2 代替 Oligo dT 进行逆转录, 逆转录酶为 AMV, 在 ABI 公司 2400 PCR 仪中按如下条件进行: 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 反应一个循环, 总体积 20 μl 。反应完成后进行 PCR 扩增, 在上述反应体系中加入 10 \times RNA PCR 缓冲液 8 μl , 25 mmol/L 的 MgCl_2 6 μl , 5 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 2 μl , Taq DNA 酶 0.5 μl , dd H_2O 61.5 μl 使总反应体积达到 100 μl 。PCR 反应体系如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 进行 35 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 5 μl PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 Ob 基因的克隆、鉴定及序列分析 将 RT-PCR 扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 溶于 25 μl 去离子无菌水中, 用 DU530 紫外分光光度仪定量, 然后与 pMD 18-T 载体连接 (方法见试剂盒说明书), 反应体系为: 1 μl pMD 18-T vector、0.2 pmol DNA、连接缓冲液 5 μl 、加 dd H_2O 至总体积 10 μl 、16 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 h。转化大肠杆菌 JM109, 涂平板, 平板上加 40 μl 的 IPTG (20 mg/ml) 及 4 μl 的 X-Gal (200 mg/ml), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 形成分布均匀的菌落。挑选阳性菌落进行

PCR 鉴定, 分别用自行设计的 Ob 基因扩增引物和用于序列测定的 pMD 18-T 载体上的测序引物进行扩增, 其产物分别应为 460 和 600 bp 左右。对正确扩增的克隆用试剂盒提取质粒, 然后在 ABI377 序列分析仪上用正反向引物进行序列测定。

1.2.4 原核表达质粒的构建 用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 对 Ob cDNA 的 PCR 扩增产物和 pBV220 进行双酶切, 然后在 T_4 连接酶作用下将 Ob cDNA 定向插入 pBV220, 构建原核表达质粒 pBV220-OB, 转化感受态大肠杆菌 TG1。挑选氨苄青霉素阳性单菌落进行培养, 取 300 μl 菌液在沸水中裂解后离心取上清作为模板进行 PCR 快速鉴定, 对 PCR 鉴定的重组菌落扩大培养并提取质粒进行 *Hind* III 单酶切和 *EcoR* I 及 *Bam*H I 双酶切, 1% 琼脂糖电泳检测。

1.2.5 人 Ob 基因在大肠杆菌中表达 将 Ob 基因的重组表达菌株及非重组质粒转化菌株分两组接种于含 LB 培养基, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 A600 为 0.5 时, 迅速升温至 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养。培养结束后收集菌体, 超声波破碎, 将沉淀溶解于 7 mol/L 尿素中, 进行 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色。

2 结果

2.1 脂肪细胞 RNA 提取及 RT-PCR 扩增 Ob 基因

分化成熟的脂肪细胞用 Trizol 试剂一步法提取的总 RNA, 经紫外分光光度仪测定, 其 D_{260}/D_{280} 之值为 1.953, 电泳结果显示 18 和 28 s 的条带清晰, 比例约为 1:2, 说明总 RNA 很少降解 (图 1A)。RT-PCR 产物电泳结果显示在约 450 bp 出现特异扩增条带 (图 1B)。

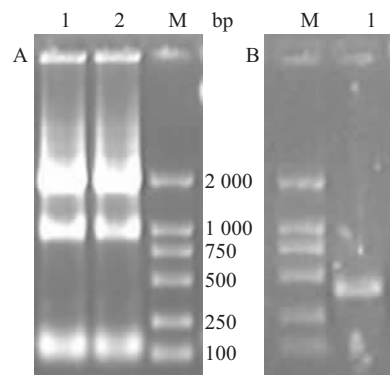


图 1 总 RNA 提取与 RT-PCR

Fig.1 Isolation of total RNA and RT-PCR

A: Lanes 1 and 2, total adipocyte RNA; B: Lane 1: RT-PCR products of the obesity gene

2.2 Ob 基因的克隆、鉴定及序列分析

将大小为 450 bp 的 RT-PCR 产物用 *Hind* III 酶

切,出现约 350 和 100 bp 片段。与预期相符(图 2)。然后将 RT-PCR 克隆至 pMD 18-T 载体中,转化 JM109 后阳性克隆,经 Ob 基因特异引物 PCR 初步鉴定后,再进行序列测定(图 3 为部分序列),测序结果如下:

```

ATGTCCAAGC  TGTGCCCATC  CAAAAAGTCC
AAGATGACAC  CAAAACCCTC  ATCAAGACAA
TTGTCACCAG  GATCAATGAC  ATTTACACACA
CGCAGTCAGT  CTCCTCCAAA  CAGAAAGTCA
CCGGTTTGGA  CTTCATTCCT  GGGCTCCACC
CCATCCTGAC  CTTATCCAAG  ATGGACCAGA
CACTGGCAGT  CTACCAACAG  ATCCTCACCA
TGTATGCCTT  CCAGAAACGT  GATCCAAATA
TCCAACGACC  TGGAGAACCT  CCGGGATCTT
CTTCACGTGC  TGGCCTTCTC  TAAGAGCTGC
CACTTGCCCT  GGGCCAGTGG  CCTGGAGACC
TTGGACAGCC  TGGGGGGAGT  CCTGGAAGCT
TCAGGCTACT  CCACAGAGGT  GGTGGCCCTG
  
```

```

AGCAGGCTGC  AGGGGTCTCT  GCAGGACATG
CTGTGGCAGC  TGGACCTCAG  CCCTGGGTGC
TAA
  
```

将该序列在 GenBank 进行 Blast 序列分析,结果表明,克隆的 OB 基因编码序列与文献报道的结果一致。

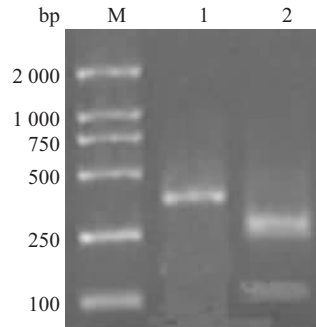


图 2 RT-PCR 产物的酶切鉴定

Fig.2 Restriction map analysis of RT-PCR products

M: DNA markers; Lane 1: PCR amplified obesity gene (450 bp);

Lane 2: *Hind* III cleaved obesity gene

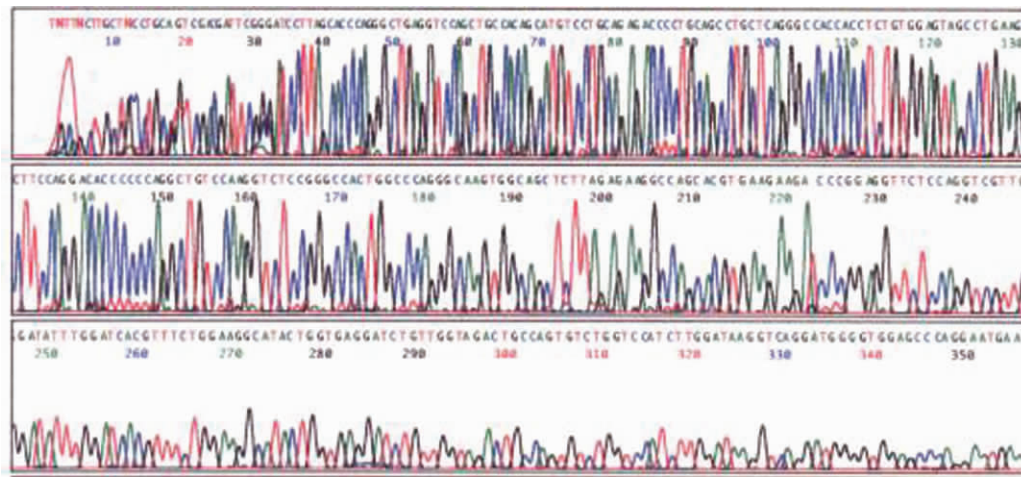


图 3 Ob cDNA 序列分析

Fig.3 Obesity gene cDNA sequence analysis

2.3 Ob 基因原核表达构建

Ob 基因的 PCR 产物及 pBV220 质粒经 *Eco*R I 及 *Bam*H I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分离回收与纯化后,用 *T*₄DNA 连接酶将 Ob 基因与 pBV220 连接,转化大肠杆菌 TG1, 对抗性筛选阳性的克隆提取质粒 DNA,并进行 *Eco*R I 及 *Bam*H I 酶切鉴定,得到阳性克隆 pBV220-OB。

2.4 Ob 基因的原核表达

转化 pBV220-OB 的大肠杆菌 TG1 阳性克隆经 42 °C 诱导培养 4~6 h,对菌体进行适当处理后的蛋白抽提物作 15% 的 SDS-PAGE 检测,结果显示,在相对分子质量为 16 000 处有一特异的蛋白表达带,大小与 Ob 基因表达产物 leptin 一致。薄层扫描结果显示,此蛋白约占菌体总蛋白的 13%。

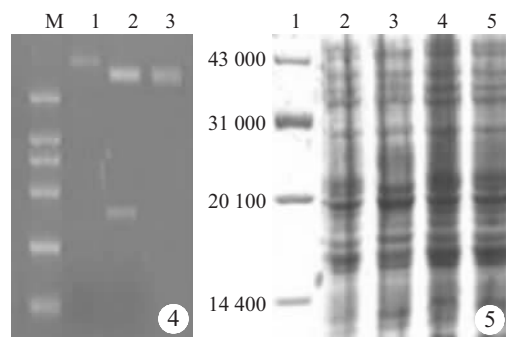


图 4 重组质粒的鉴定

Fig.4 Identification of the recombinant plasmids

Lane 1: pBV220-OB; Lane 2: pBV220-OB/ *Eco*R I +*Bam*H I TG1 with;

Lane 3: pBV220; M: Marker

图 5 Ob 基因表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the obesity gene products

Lane 1: protein markers; Lanes 2-3: Total cell protein of pBV220-OB after induction; Lanes 4-5: Total cell protein of TG1 with pBV220 after induction

3 讨论

肥胖是最常见的营养障碍性疾病, 表现为机体脂肪组织的量过多和(或)脂肪组织与其它软组织的比例过高。已知肥胖同糖尿病、高血压、高血脂甚至肿瘤的发病有关, 此肥胖已经成为一个倍受科学界重视的公共健康问题^[6]。

肥胖的分子机制尤其是基因表达调控的研究^[7]是目前最为活跃并取得迅速进展的领域之一。在较短的时间里便完成了克隆 Ob 基因、阐明基因产物-leptin 的结构、克隆 leptin 受体的基因并部分阐明 leptin 作用的机制, 发现 leptin 除了调节脂肪与能量代谢外, 还有不少其它方面的作用, leptin 可引起造血细胞的分裂、分化^[8]; 可能直接或间接地影响下丘脑-垂体-性腺轴的功能, 对黄体生成素释放激素、促卵泡激素和黄体生成素的释放均呈现双相调节^[9]。目前发现 leptin 对生殖、发育、骨骼生长、交感系统和神经内分泌等有着广泛的作用^[10,11]。

由于 leptin 功能的多样性, 其作用的分子机制还不完全清楚, 为此尚需进行多方面的研究。而大量 leptin 的获得将有助于其功能的深入研究。

利用基因工程重组菌生产 leptin 是一条有效的途径。而 Ob 基因通常是直接从白色脂肪组织克隆。白色脂肪组织中大部分物质是脂肪, mRNA 的丰度极低, 其 RNA 的提取比较困难。我们采取从人腹部皮下脂肪组织分离到人前脂肪细胞并进一步诱导分化脂肪细胞。人前脂肪细胞培养体系的建立不仅为脂肪细胞分化奠定了基础, 而且为 Ob 基因的克隆提供很好的材料。我们从胰岛素与地塞米松诱导分化的脂肪细胞中分离到高质量的 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增出 Ob 基因的完整的 cDNA, 测序结果与文献报道的完全一致。

Ob 基因表达载体的构建及其在大肠杆菌中的成功表达, 为进一步研究 leptin 的功能及应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-32.
- [2] Murakami T, Shima K. Cloning of rat obese cDNA and its expression in obese rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209(3): 944-52.
- [3] Isse N, Ogawa Y, Tamura N, *et al.* Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(46): 27728-33.
- [4] Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 967: 379-88.
- [5] Holst D, Grimaldi PA. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2002, 13(3): 241-5.
- [6] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 肥胖患者脂肪组织中消脂素及其受体基因的表达[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(8): 615-7.
Chen G, Lin LX, Zhuang WT, *et al.* Expression of leptin and leptin receptor gene in the adipose tissue of obese patients[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21(8): 615-7.
- [7] 朱利娜, 马文丽, 毛向明, 等. 人胎盘基因表达谱芯片的初步研究[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(5): 400-4.
Zhu LN, Ma WL, Mao XM, *et al.* Preliminary study of DNA microarray of human placenta gene expression profile [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(5): 400-4.
- [8] Gainsford T, Willson TA, Metcalf D. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14564-8.
- [9] Yu WH, Kimura M, Walczewska A, *et al.* Role of leptin in hypothalamic-pituitary function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(3): 1023-8.
- [10] Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone[J]. *Cell Res*, 2000, 10(2): 81-92.
- [11] Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, *et al.* Leptin: a review of its peripheral actions and interactions [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, 26(11):1407-33.

(责任编辑:陈望忠)