

猪肥胖基因在大肠杆菌中的高效融合表达*

昔奋攻 李 宁** 戴茹娟 刘兆良 吴常信

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

(新疆农科院微生物所, 乌鲁木齐 830000)

(中国农业大学动物科技学院遗传组, 北京 100094)

摘 要 采用 PCR 方法扩增猪肥胖基因编码的成熟蛋白 cDNA 序列, 并在 5 端加上 *BamH* 位点, 3 端加上 *EcoR* 位点, 将 5 端密码子 CCC 转变为大肠杆菌常见密码子 CCG, 扩增得到 459 bp 的片段, 克隆于融合表达载体 pGEX-2T *BamH* 和 *EcoR* 位点, 酶切、测序正确, 经 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达出一条约 42 kD 的融合蛋白, 其中 26 kD 为 pGEX-2T 中自带的谷胱甘肽转移酶, 16 kD 是猪肥胖基因表达产物瘦蛋白。利用非融合表达产品制备抗血清, 检测融合表达的重组蛋白, Western-blot 为阳性。

关键词 猪 肥胖基因 大肠杆菌 表达

肥胖基因 (ob) 是近几年克隆的一个新基因, 该基因产物——瘦蛋白 (leptin) 是由脂肪组织产生并分泌的 167 个氨基酸组成的多肽, 分泌蛋白分子量约 16 kD, 是反映体内脂肪组成及体内脂肪含量和调节体重的重要信号因子 (Zhang *et al.*, 1994)。自 1994 年美国 Rockefeller 大学的 J. M. Friedman 克隆了鼠的肥胖基因, 国内外对此基因进行了大量研究, 提出并证实了 leptin 蛋白对脂肪含量和体重调节的作用 (Pelleymount *et al.*, 1995; Halaas, 1995; Campfield *et al.*, 1995)。肥胖基因在各种白色脂肪中大量表达并与体内脂肪含量存在正相关, 肥胖个体的肥胖基因的基因表达量远远高于瘦个体 (Considine *et al.*, 1995; Carsson *et al.*, 1997), 其调节机制与脂肪平衡理论相符合, leptin 蛋白可能通过影响下丘脑的神经肽 Y 来调节动物的摄食, 即可以直接或间接作用于中枢神经系统从而抑制摄食和调节能量消耗, 而且该蛋白可能对其它组织具有内分泌、旁分泌和自分泌作用 (Ogawa *et al.*, 1995; Masuzaki *et al.*, 1995)。1997 年中国农业大学李宁克隆了猪肥胖的基因全部 cDNA 序列 (Dai *et al.*, 2000), 并对猪肥胖基因的多态性进行了分析 (Xi *et al.*, 2000), 关于猪肥胖基因的基因表达和其对猪个体生长及摄食的研究还未见报道。本研究对猪肥胖基因在大肠杆菌中

进行了融合表达, 表达量最高达 49.1%, 并就猪肥胖基因的表达及表达产物纯化做一初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

猪肥胖基因由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室克隆, 表达载体 pGEX-2T 购自 Amersham Pharmacia 公司, *BamH*、*EcoR* 等限制性内切酶和 T₄DNA 连接酶购自 BioLab 公司, 测序试剂盒购自 PE 公司, 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5、BL21、JM83、JM107、JM109 和 C600 等菌株为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物合成和扩增 根据已报道的猪肥胖基因序列 (Dai *et al.*, 2000) 合成引物并将编码成熟肽的第二个密码子 CCC 转变为大肠杆菌常见密码子 CCG:

引物 1 5' GGGATCCGTGCC-
GATCTGGA GA GTCCA GGA TG3

引物 2 5' GGAATTCTTCAAG-
GCTTCA GCA GCCA GGG3

PCR 扩增条件是在 GeneAmp 9600 PCR 仪上按 94 30 s, 65 30 s, 72 50 s 的反应程序循环 30 次, 72 延伸 7 min, 降温至 4 , 用 1.0% 的琼

2000-02-16 收稿, 2000-10-30 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870588)

** 通讯作者 E-mail: ningbau@public3.bta.net

第一作者简介 昔奋攻, 男, 33 岁, 硕士, 助理研究员。研究方向: 基因表达与调控。

脂糖电泳检测。

1.2.2 PCR产物的克隆和核酸序列分析 PCR产物和融合表达载体 pGEX-2T 经 BamH、EcoR 双酶切、回收、连接和转化大肠杆菌 DH5 菌株，得到 pGEMX-POB 质粒，经 PCR 酶切和测序鉴定正确。

1.2.3 肥胖基因在大肠杆菌 BL21 中的表达 按 2% 的接种量将含有 pGEMX-POB 质粒转化大肠杆菌 BL21，接入 LB 培养基中，在 OD600 值分别为 0.249、0.432、0.583、0.803、0.987、1.232、1.623 和 1.892 时加入 IPTG，终浓度至 0.1 mmol/L 诱导 2.5 h (按菌液 新鲜培养基 = 3 : 1 在诱导时补充培养基)。

1.2.4 肥胖基因在不同大肠杆菌中的表达 将 pGEMX-POB 质粒分别转入大肠杆菌 DH5、BL21、JM83、JM107、JM109 和 C600 中，在 OD600 为 0.9~1.0 时加入补充培养基和 IPTG 诱导 2.5 h。

1.2.5 不同浓度 IPTG 诱导 将含有 pGEMX-POB 质粒的 BL21 大肠杆菌培养至 OD600 约为 0.9~1.0 时，加入 IPTG 诱导 2.5 h，终浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、5.00 和 10.00 mmol/L 进行诱导。

1.2.6 不同时间诱导 将含有 pGEMX-OB 质粒的 BL21 大肠杆菌培养至 OD600 约为 0.9~1.0 时，加入 IPTG 诱导，诱导时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 h。

1.2.7 包涵体的提取 离心收集诱导的菌体，反

复冻融 3 次，加 DNase 37 消化 1 h，用含有 1% Triton-100 的 STE 缓冲液洗涤，离心 10 000 r/min 收集包涵体，反复洗涤 3~5 次，得到包涵体。

1.2.8 蛋白质纯化 在包含体中加入 8 mol/L 尿素 (pH 8.8) 过夜，使蛋白变性溶解，12 000 r/min 离心，取上清，缓慢加入预冷的 3 倍体积 10 mmol/L 乙醇胺 (pH 8.3)，4 放置 2 h，12 000 r/min 离心，上清用 10 mmol/L Tris·Cl (pH 8.3) 缓冲液透析两天，每天换 3 次透析液，产品冷冻抽干。

1.2.9 Western-Blot 检测 一抗为本室制备，利用地高辛标记的二抗进行 Western-blotting 检测。

2 结果

2.1 猪、人和鼠去除信号肽的肥胖基因 cDNA 序列的比较

采用引物 1 和引物 2 PCR 扩增后得到猪肥胖基因编码成熟蛋白的 cDNA 序列，与人和鼠的该基因 cDNA 序列比较，结果如图 1 所示。结果表明猪与人、鼠去除信号肽的肥胖基因 cDNA 之间的碱基序列同源性较高，分别为 89.5% 和 84.9%；此 cDNA 序列所编码的成熟肽氨基酸之间的同源性分别为 87.0% 和 82.9%。

2.2 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达

据大肠杆菌 BL21 生长曲线，在补给营养的条件下，pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 不同生长期间 (OD600: 0.2~1.9) 的表达量扫描结果如表 1 所示，表达 SDS-PAGE 电泳图谱如图 2 所示。

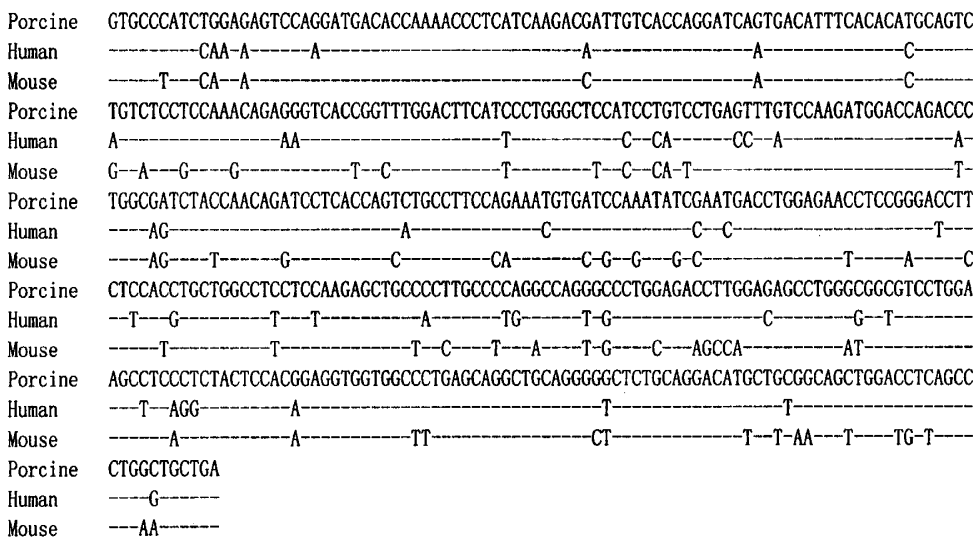


图 1 猪、人、鼠去除信号肽的肥胖基因 编码成熟肽 cDNA 序列比较

Fig. 1 The comparison of ob cDNA sequence encoding mature protein in porcine, human and mouse

表 1 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达

Table 1 Expression of pGEMX-POB fusion protein from *E. coli* BL21 transformant

	1	2	3	4	5	6	7	8
不同 OD ₆₀₀ 值 (Different OD ₆₀₀)	0.249	0.432	0.583	0.803	0.987	1.232	1.623	1.892
表达量 (%) (Expression level)	34.5	37.7	38.4	40.0	41.1	41.5	38.7	37.9

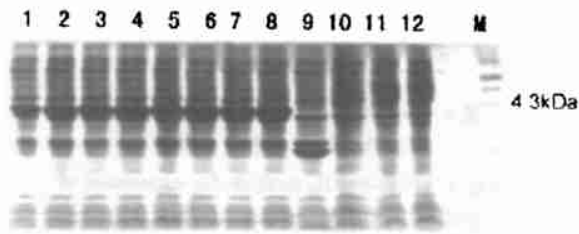


图 2 GST-POB 在大肠杆菌 BL21 中表达的

SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis for expression of GST-POB fusion protein from transformant

1~8: 转有 pGEMX-POB 的大肠杆菌 BL21 在 LB 培养基中不同生长期间 (OD₆₀₀ 0.25~1.89) 诱导表达的电泳结果 (Bacterial protein from BL21 transformed with pGEMX-POB and induced with 0.1 mmol/L IPTG in different OD₆₀₀)

9: pGEX-2T 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达 (Bacterial proteins from BL21 transformed with pGEX-2T and induced with 0.1 mmol/L IPTG)

10: 转有 pGEX-2T 的大肠杆菌 BL21 总蛋白 (Bacterial proteins from BL21 transformed with pGEX-2T and induced without IPTG)

11: 大肠杆菌 BL21 的诱导结果 (Bacterial proteins from BL21 induced with 0.1 mmol/L IPTG)

12: 大肠杆菌 BL21 的总蛋白 (Bacterial proteins from BL21 induced without IPTG)

M: 蛋白分子量标准 (Protein molecular weight standards)

2.3 pGEMX-POB 在不同菌株中的表达

不同菌株中 pGEMX-POB 诱导表达结果见表 2, 表达电泳图谱如图 3 所示。其中 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21、JM83 中表达较高, 在大肠杆菌 DH5 较低。

表 2 pGEMX-POB 在不同菌株中的表达

Table 2 Expression of pGEMX-POB fusion protein from different *E. coli* transformant

	1	2	3	4	5	6
不同菌株 (Different <i>E. coli</i>)	DH5	C600	BL21	JM83	JM107	JM109
表达量 (%) (Expression level)	26.2	37.4	41.0	40.5	37.8	29.6

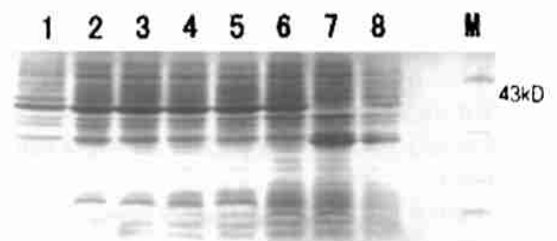


图 3 pGEMX-POB 在不同菌株中表达的

SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis for expression of pGEMX-POB fusion protein from different *E. coli* transformant

1~6: pGEMX-POB 分别转化大肠杆菌 DH5、C600、BL21、JM83、JM107 和 JM109 的表达 (Bacterial proteins from different *E. coli* DH5、C600、BL21、JM83、JM107 和 JM109 transformed with pGEMX-POB and induced with 0.1 mmol/L IPTG at OD₆₀₀ 0.9~1.0)

7: pGEX-2T 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from BL21 transformed with pGEX-2T and induced with IPTG)

8: 转有 pGEX-2T 的大肠杆菌 BL21 总蛋白 (Bacterial protein from BL21 transformed with pGEX-2T and induced without IPTG)

M: 蛋白分子量标准 (Protein molecular weight standards)

表 3 不同浓度 IPTG 诱导 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达

Table 3 Expression of pGEMX-POB fusion protein from *E. coli* BL21 transformant in different concentration of IPTG

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
不同浓度 IPTG (mmol/L) (Different concentration of IPTG)	0.01	0.05	0.10	0.20	0.40	0.60	0.8	1.0	5.0	10.0
表达量 (Expression level %)	-	33.9	46.3	47.5	46.4	49.1	47.1	48.1	39.8	38.6

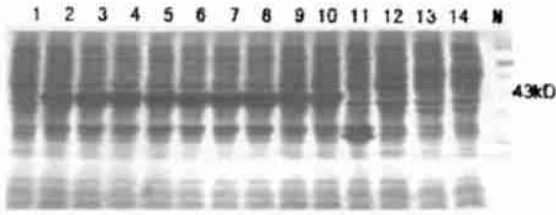


图 4 不同浓度 IPTG 诱导 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE analysis for expression of pGEMX-POB fusion protein from *E. coli* BL21 transformant in different concentration of IPTG

- 1~10: 不同浓度 IPTG 诱导 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformant with pGEMX-POB and induced with IPTG from 0.01 to 10 mmol/L)
- 11: pGEX-2T 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from BL21 transformant with pGEX-2T and induced with 0.1 mmol/L IPTG)
- 12: 转有 pGEX-2T 的大肠杆菌 BL21 总蛋白 (Bacterial proteins from BL21 transformant with pGEX-2T and induced without IPTG)
- 13: 大肠杆菌 BL21 的诱导结果 (Bacterial proteins from BL21 induced with 0.1 mmol/L IPTG)
- 14: 大肠杆菌 BL2 的总蛋白 (Bacterial proteins from BL2 induced without IPTG)
- M: 蛋白分子量标准 (Protein molecular weight standards)

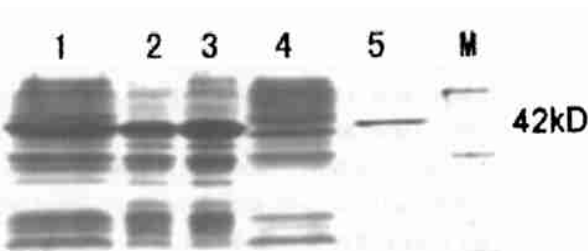


图 6 纯化的蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 6 SDS-PAGE analysis for purification protein

- 1: pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformant with pGEMX-POB and induced with 0.1 mmol/L IPTG)
- 2~3: 包涵体 (The inclusion body of bacterial lysate)
- 4: 细胞裂解上清 (The supernatant of lysate from expression of pGEMX-POB)
- 5: 纯化的蛋白质 (Purification of recombinant protein)
- M: 蛋白分子量标准 (Protein molecular weight standards)

2.4 不同浓度 IPTG 诱导 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达

不同浓度 IPTG 诱导 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中表达量见表 3, 表达电泳图谱见图 4 所示。

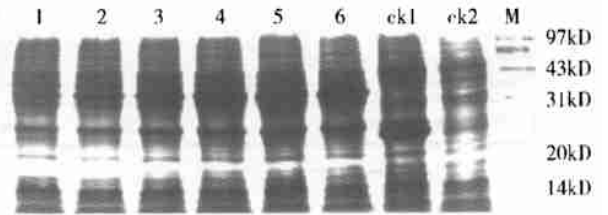


图 5 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中不同诱导时间表达电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis for expression of pGEMX-POB fusion protein from *E. coli* BL21 transformant in different induction time

- 1~6: 不同时间诱导 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformant with pGEMX-POB and induced in different time)
- ck1: pGEX-2T 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from BL21 transformant with pGEX-2T and induced with 0.1 mmol/L IPTG)
- ck2: 转有 pGEX-2T 的大肠杆菌 BL21 的总蛋白 (Bacterial proteins from BL21 transformant with pGEX-2T and induced without IPTG)
- M: 蛋白分子量标准 (Protein molecular weight standards)

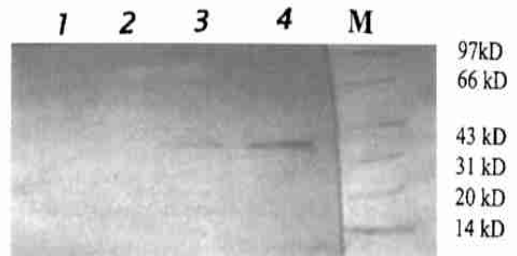


图 7 表达产物的 Western-blot 检测

Fig. 7 Western-blotting analyzing the expression of pGEMX-POB gene in *E. coli*

- 1: 转有 pGEX-2T 的大肠杆菌 BL21 的总蛋白 (Bacterial proteins from BL21 transformant with pGEX-2T and induced without IPTG)
- 2: 转有 pGEMX-POB 的大肠杆菌 BL21 的总蛋白 (Bacterial proteins from BL21 transformant with pGEMX-POB and induced without IPTG)
- 3~4: pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达 (Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformant with pGEMX-POB and induced with 0.1 mmol/L IPTG)
- MW: 标准分子量 (Protein molecular weight standards)

2.5 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中不同诱导时间的表达

pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中不同诱导时间表达量见表 4, 表达电泳图谱见图 5, 结果表明在菌

体生长至 OD₆₀₀ 为 0.9 左右时, 加入 0.1 mmol/L IPTG 和补充培养基, 诱导 0.5 ~ 1.5 h 表达量较低, 诱导 2 h 后表达量较高。

表 4 不同诱导时间 pGEMX-POB 在大肠杆菌 BL21 中的表达

Table 4 Expression of pGEMX-POB fusion protein from *E. coli* BL21 transformant in different induce time

	1	2	3	4	5	6
诱导时间 (Induce time: hr)	0.5	1	1.5	2.0	2.5	3
表达量 (Expression level %)	12.5	17.0	20.4	22.7	27.4	29.1

2.6 蛋白质纯化

pGEMX-POB 在 IPTG 诱导下表达融合蛋白表达量为 27.0%, 经裂解细胞 STE 洗涤一次后其占菌体蛋白的 42.0%, 经 5 次洗涤后其纯度达 48.2%, 经变性和复性后其纯度达 91.6%。扫描蛋白图谱见图 6 所示。

2.7 Western-Blot 检测

利用本室制备的猪抗兔血清检测表达的重组蛋

白, 检测结果见图 7。

3 讨论

序列比较表明猪、人和鼠 cDNA 序列和氨基酸序列同源性较高, 具有较强的保守性。本室构建的高效表达质粒 pGEMX-POB 阅读框结构正确, 未出现移码和突变, pGEMX-POB 在 IPTG 诱导下能够稳定高效表达融合蛋白, 并以包涵体形式存在于大肠杆菌中。实验发现, pGEMX-POB 可以在多种大肠杆菌中高效表达, 但诱导表达对菌株有一定选择性, 过高的诱导物浓度, 并不能提高表达量, IPTG 终浓度为 0.01 mmol/L 时不能诱导表达。在营养充分的条件下, 其在菌体不同生长期诱导均能高效表达, 菌体生长至 OD₆₀₀ 0.2 ~ 1.9 之间诱导表达量变化无明显差异。诱导时间表达结果表明, 随着诱导时间的延长, 表达量有所提高。从经济角度来看 pGEMX-POB 的最佳表达条件是: 在大肠杆菌 BL21 中, 当菌体生长至 OD₆₀₀ 为 0.9 ~ 1.0 时, 加入 1/3 的补充培养基和 IPTG, IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导 2.5 h, 最高表达量达 49.1%。

参考文献 (References)

- Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos and P. Burn 1995 Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural network. *Science* **269**: 546 ~ 549.
- Carlsson, B., K. Lindell, B. Gabrielsson, C. Karlsson, R. Bjarnason, O. Westphal, U. Karlsson, L. Sjöström and L. M. Carlsson 1997 Obese (ob) gene defects are rare in human obesity. *Obes. Res.* **5**: 30 ~ 35.
- Considine, R. V., E. L. Considine, C. J. Williams, M. R. Nyce, S. A. Magosin, T. L. Bauer, E. L. Rosato, J. Colberg and J. F. Caro 1995 Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J. Clin. Invest.* **95** (6): 2 986 ~ 2 988.
- Dai, R. J., N. Li and C. X. Wu 2000 Clonings and analysis of pig obese cDNA gene. *J. Genetics* **27** (4): 290 ~ 297. [戴茹娟, 李 宁, 吴常信 2000 猪肥胖基因 cDNA 的克隆与分析. *遗传学报* **27** (4): 290 ~ 297.]
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, S. K. Burley and J. M. Friedman 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**: 543 ~ 546.
- Ogawa, Y., H. Masuzaki, N. Isse, T. Okazaki, K. Mori, M. Shigemoto, N. Satoh, N. Tamura, K. Hosoda and Y. Yoshimasa 1995 Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rat. *J. Clin. Invest.* **96** (3): 1 647 ~ 1 652.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Kawada, T. Fushiki and K. Nakao 1995 Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rat fed high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2 216** (1): 355 ~ 358.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**: 540 ~ 543.
- Xi, F. G., R. J. Dai, N. Li, G. S. Cao, Y. F. Zhao and C. X. Wu 2000 RFLP polymorphic analysis on obese gene locus in swine. *J. Agr. Biotech.* **8** (2): 123 ~ 125. [昔奋功, 戴茹娟, 李 宁, 曹更生, 赵要风, 吴常信 2000 猪肥胖基因位点的 RFLP 多态性分析. *农业生物技术学报* **8** (2): 123 ~ 125.]
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372** (6 505): 425 ~ 432.

外 文 摘 要 (Abstract)

HIGH EXPRESSION OF PORCINE OBESE GENE IN *E. COLI* *

XI Fen-Gong LI Ning ** DAI Ru-Juan LIU Zhao-Liang WU Chang-Xin

(National Laboratory of Agribiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(Institute of Microbiology, Academy of Xinjiang Agricultural Science, Urumqi 830000, China)

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

A 459 bp fragment of porcine obese cDNA, which encodes ob mature protein without signal peptide, was amplified by PCR technique. The DNA fragment has been modified as follow: an *EcoR* site was included in the 5' end and the codon CCC of it was changed to CCG, which was more frequently used in *E. coli*, and a *BamH* site was designed in the 3' end. Then the fragment was cloned into expression vector pGEX-2T and the correct construction was confirmed by sequencing. 0.1 mmol/L IPTG can induce high level expression of GST-OB fused protein under the control of P_{tac} promote, which consisted of 26 kD GST and 16 kD leptin. The yield of recombinant protein was over 49.1% of total cellular and expressed as inclusion bodies. The recombinant protein was purified with the different pH. Western-blotting testing of the porcine expression of pGEMX-POB in *E. coli* BL21 was positive.

Key words Porcine, Obese gene, *E. coli*, Expression

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39870588)

** Corresponding author