

蒙古红鲌肥胖基因 cDNA 的克隆与组织表达特异性研究

潘庭双¹ 龙良启¹ 吴小平¹ 罗晓松² 邹世平²

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要: 本文根据已知的人和鼠 *ob* 基因序列设计引物, 采用 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 技术, 从蒙古红鲌脂肪组织 RNA 中扩增到 *ob* 基因片段, 获得 *ob* 基因编码区 438bp 的序列。与人和其他动物比较, 蒙古红鲌与人、猪和鼠 *ob* 基因核苷酸编码序列的同源性分别为 82.9%、84.0% 和 99.1%, 蒙古红鲌 *ob* 基因编码的蛋白 leptin 氨基酸序列与人、猪和鼠的同源性分别为 80.8%、78.8% 和 95.9%; 运用 RT-PCR 技术分析 *ob* 基因表达的组织特异性, 结果表明: *ob* 基因在脂肪和肝脏组织中表达量最大, 在心脏、脾脏、肌肉、脑、卵巢中表达量减少, 在肾脏中微量表达, 而在精巢和肠道组织中不表达。

关键词: 蒙古红鲌; *ob* 基因; leptin; 组织

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)01-0094-05

肥胖基因(*obese gene*; *ob gene*)于 1954 年在小鼠中发现, 为常染色体隐性遗传。Zhang Y^[1] 等于 1994 年首次报道利用定位克隆技术获得小鼠 *ob* 基因的 cDNA 序列, 通过对小鼠 *ob* 基因的克隆和分析充分证明了 *ob/ob* 肥胖型小鼠的肥胖表型是由于 *ob* 基因的无义突变而不能产生正常功能蛋白质造成的。人、鼠的大量研究表明, *ob* 基因的表达产物“瘦素”(leptin)主要作用于大脑的摄食和饱食中枢, 对体脂的蓄积、体重、摄食行为、繁殖、免疫力有重要的调节作用。因此, *ob* 基因及其产物可能在鱼类生理功能调节中起重要的调节作用。鱼类有别于鼠和人, Zhang Y^[1] 等在克隆鼠与人的 *ob* 基因时已通过 southern 杂交证实了鳗鱼 *ob* 基因的存在, Johnson R M^[2] 等(2000)通过应用鼠的 leptin 抗体原位杂交也证实了 *ob* 基因在鱼中的存在, 然而鱼类的 *ob* 基因序列及其 leptin 氨基酸序列与功能尚未见报道。鉴于此, 本文克隆了蒙古红鲌(*Erythroculter mongolicus*) *ob* 基因并对其组织表达特异性进行了分析, 为进一步研究该功能基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 蒙古红鲌取于武汉市南湖, 健康无病,

雄鱼体长 16cm, 体重 112g; 雌鱼体长为 18cm, 体重 120g。取其脂肪、肝脏、肠、心脏、脾脏、肾脏、肌肉、脑、卵巢、精巢等组织, 用蒸馏水漂洗干净, 再用滤纸吸干水分, 供提取总 RNA。

1.2 试剂 宿主菌 *E. coli* DH5 α 、克隆载体 pBlue-script SK(+) 均为本实验室保种, 反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶、连接酶均购自大连宝生物公司, 氨苄青霉素为华北制药公司产品, X-gal、IPTG 为 Amersham 公司产品, β -巯基乙醇、异硫氰酸胍为 Sigma 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取和浓度测定 参照文献[3, 4] 用一步法提取总 RNA。取蒙古红鲌脂肪(肠系膜)、肝脏、肠、心脏、脾脏、肾脏、肌肉、脑、卵巢、精巢等组织各 0.2g, 在含有 2.8mL 变性液的均浆器中破碎细胞, 转入 10mL 离心管中后加入 0.28mL (pH4.0) NaCOOH, 再加酚: 氯仿: 异戊醇, 振荡后离心取上清。加等体积异丙醇于 -20℃ 静置 30min 沉淀总 RNA。重复以上操作一次。总 RNA 稀释为 0.5 μ g/ μ L 供 RT-PCR 使用。用 Eppendorf BIO-photometer 测定含量与纯度。

收稿日期: 2005-10-18; 修订日期: 2006-09-20

基金项目: 湖北省自然科学基金(NO: 2000JJ04)资助

作者简介: 潘庭双(1973—), 男, 安徽安庆人; 硕士研究生; 主要从事鱼类遗传育种工作

通讯作者: 龙良启, Tel: 027-87285918, E-mail: wulong491024@mail.hzau.edu.cn

1.3.2 RT-PCR 方法 参照人和小鼠 *ob* 基因编码区设计引物,引物由大连宝生物公司合成,引物中引入了 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切位点。上游引物 F₁: 5'-ACAGGAATTCGTGCCTTAT-3', 下游引物 F₂: 5'-ACCAAGCTTCTCAGCATTACAGGGCT-3'。RT-PCR PCR 仪为 MJ Research (PTC-200), RT-PCR 参照试剂盒说明书,在 25 μ L 反应体系中进行。反应体系包括 10 \times RT-PCR buffer 2.5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 溶液 5 μ L, 10mmol/L dNTPs 2.5 μ L, 140U/ μ L RNAase inhibitor 0.5 μ L, 5U/ μ L AMV-RTase 0.5 μ L, 5U/ μ L Taq 0.5 μ L, 20 μ mol/L 引物 F₁ 0.5 μ L, 20 μ mol/L 引物 F₂ 0.5 μ L, 0.5 μ g/ μ L 总 RNA 1 μ L, ddH₂O 11.5 μ L。反应程序依次为 50 $^{\circ}$ C 反转录 30min、94 $^{\circ}$ C 变性 5min、35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30s、55 $^{\circ}$ C 退火 30s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30s)、72 $^{\circ}$ C 延伸 10min、4 $^{\circ}$ C 保存。取 15 μ L RT-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.3.3 RT-PCR 产物的克隆与初步鉴定 用试剂盒回收 RT-PCR 产物,回收产物与 pBluescript SK(+) 载体连接,重组质粒命名为 pSK(+)-OB。转化大肠杆菌 DH5 α ,挑出乳白色的菌落进行 PCR 扩增并提取重组质粒进行双酶切鉴定。

1.3.4 序列分析与同源性比较 鉴定后的质粒送大连宝生物公司测序。测得的蒙古红鲌 *ob* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列用 blast 和 Clustalx1.8 软件与人、猪和鼠等进行同源性比较。

2 结 果

2.1 *ob* 基因的克隆与序列分析

以 OD₂₈₀/OD₂₆₀ 比值在 1.8—2.0 之内的脂肪组织总 RNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,扩增结果如图 1 所示。从图 1 可见扩增出的产物大小为 450bp 左右。将回收后 RT-PCR 扩增产物与 pBluescript SK(+) 载体定向连接,转化后筛选出白斑阳性克隆。取阳性克隆扩大培养并 PCR 扩增和提取质粒,质粒

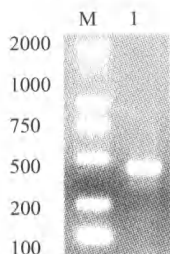


图 1 RT-PCR 扩增的产物
Fig.1 the product by RT-PCR
1: product, M: maker

用 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定,结果为一条大小为 450bp 左右带(图 2,图 3),说明载体上已连上了 *ob* 基因。通过测序,获得蒙古红鲌 cDNA 序列(该序列现已被 GenBank 收录,登录号为 AY497007)。

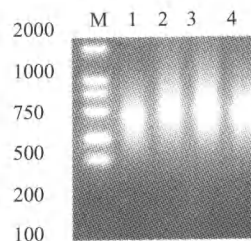


图 2 重组质粒 PCR 扩增鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid by PCR

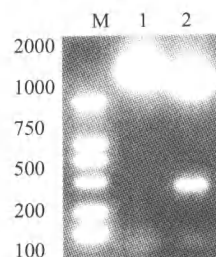


图 3 双酶切鉴定重组质粒

Fig.3 Identification of the plasmid by double-enzyme digestion

1. 空质粒, 2. 重组质粒双酶切

1. Blank control, 2. Double enzyme digestion plasmid

2.2 *ob* 基因同源性分析

蒙古红鲌 *ob* 基因 cDNA 序列及其编码区的蛋白质氨基酸序列与人、猪和鼠比较结果分别见图 4 和图 5。由图 4 和图 5 可知,蒙古红鲌与人、猪和鼠 *ob* 基因核苷酸序列同源性分别为 82.9%、84.0%、99.1%,而蒙古红鲌与人、猪和鼠 Leptin 蛋白氨基酸同源性分别为 80.8%、78.8%、95.9%。

2.3 *ob* 基因组织表达特异性分析

采用 RT-PCR 分析 *ob* 基因在蒙古红鲌不同组织的表达分布,结果如图 6 所示。从图 6 中可以看出,*ob* 基因在脂肪和肝脏组织中表达量较大,在心脏、脾脏、肌肉、脑、卵巢中表达量减少,在肾脏中微量表达,而在精巢和肠道组织中不表达。

3 讨 论

近年来,脂肪细胞源性的细胞因子已成为动物细胞因子研究的热点,鱼类不少细胞因子已经有了研究并取得许多进展^[5],但鱼类脂肪细胞源性的细胞因子的研究报道较少。本研究克隆了蒙古红鲌肥胖基因,为鱼类脂肪细胞源性的细胞因子的研究奠定了基础。

本研究克隆了蒙古红鲌肥胖基因(*ob*)编码区序列,经比较,蒙古红鲌 *ob* 基因编码区核苷酸序列与人、猪和小鼠 *ob* 基因编码区序列同源性分别为 82.9%、84.0% 和 99.1%,*leptin* 蛋白的氨基酸序列的同源性分别为 80.8%、78.8% 和 95.9%。这一结果表明 *ob* 基因在不同物种之间具有保守性,而且蒙古红鲌 *ob* 基因编码序列与小鼠同源性最高,与猪次之,与人最低,这一趋势与生物进化趋势是吻合的。比较蒙古红鲌 *ob* 基因编码区核苷酸序列与人、猪和小鼠 *ob* 基因编码区核苷酸序列,共有 93 处发生了点突变,比较蒙古红鲌 *ob* 基因编码区氨基酸序列与人、猪和小鼠 *ob* 基因编码区氨基酸,其中 38 处发生了突变,其中 8 处由亲水性氨基酸变疏水性氨基酸,有 3 处由疏水性氨基酸变亲水性氨基酸。在进化过程中某些位点上的突变只要不影响到生物体正常功能就被积累下来,此现象是编码氨基酸的密码子摆动造成的。

ob 基因组织表达特异性的 RT-PCR 分析结果表明:蒙古红鲌 *ob* 基因不仅在脂肪组织中大量表达,而且在肝脏中大量表达,在心脏、脾脏、脑、卵巢、肌肉组织中亦有表达,在肾脏中微量表达,而在肠和精巢中不表达。这一结果与 *ob* 基因在猪中的研究报道有相似之处,在猪的脂肪、肝脏、心脏、肾脏、肌肉组织中均检测到 *ob* 基因的表达,但脂肪组织中表达量较高,其他组织只是微量表达^[6]。这一结果与 *ob* 基因在人和鼠的研究报道有不同之处,在人和鼠的研究中,*ob* 基因主要是在脂肪组织中表达,在胎盘、胃细胞和免疫细胞中有微量表达^[7]。*ob* 基因表达与脂肪细胞的数量有关,蒙古红鲌的肝脏中检测到大量 *ob* 基因表达物,说明蒙古红鲌脂肪合成的部位可能主要在脂肪组织和肝脏。值得注意的是 *ob* 基因在蒙古红鲌脑组织中表达,这与某些非哺乳动物类似^[8],这一结果预示鱼类 *ob* 基因可能有着不同的功能或调节方式。基因的表达与多种因素有关,蒙古红鲌是低等变温动物,要具体阐明 *ob* 基因在蒙古红鲌不同组织中的差异性表达生物学意义及其作用机理,仍需进一步深入研究。

在鼠的研究中已经表明 *ob* 基因表达产物 *leptin* 具有多样生理作用:减少脂肪含量、降低体重、启动青春期发育、性成熟、明显提高生殖水平、提高免疫力等。若鱼的 *ob* 基因具有类似的生理效应,将可在鱼类养殖与加工等方面具有重大应用价值。如冷水性成熟期较长的大型鱼类,通过注射 *leptin* 蛋白或提高鱼体自身 *leptin* 蛋白表达量,提前进入生殖期

和提高生殖水平,可起到资源保护作用;脂肪组织含量减少便于加工;*ob* 基因作为鱼类分子育种上的一个候选基因等。目前关于鱼类 *ob* 基因的研究报道很少,已有的报道主要在 *leptin* 与摄食、脂肪含量的关系方面^[9-13],本文首先克隆了蒙古红鲌 *ob* 基因的编码区,为进一步开展鱼类 *ob* 基因的功能和应用研究奠定了基础。蒙古红鲌为凶猛性鱼类,体脂含量适中且肉质鲜美,对其 *ob* 基因的研究,也可为肉食性鱼类 *ob* 基因的研究提供借鉴。

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: 425—432
- [2] Johnson R M, Johnson T M, Londraville R L. Evidence for *leptin* expression in fishes [J]. *J Exp Zool*, 2000, 286 (7): 718—724
- [3] Lu S D, Li Y X, Hu X N, et al. Technique of Modern Molecular Biology Experiment [M]. Beijing: Higher Education Publishing Company. 1997, 147—149 [卢圣栋,李尹雄,胡晓年,等.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社. 1997, 147—149]
- [4] Lao H H, Bai J J, Ye X, et al. Molecular cloning and analysis of two distinct growth hormone cDNA from *Carassius auratus auratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(1): 74—79 [劳海华,白俊杰,叶星,等.鲫两种不同生长激素 cDNA 的分子克隆和分析.水生生物学报,2004,28(1):74—79]
- [5] Chen X Y, Hou Y Y. Research advances of fish cytokines [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(6): 668—673 [陈旭衍,侯亚义.鱼类细胞因子研究进展.水生生物学报,2004,28(6):668—673]
- [6] Dai R J, Li N, Wu C X. Molecular Cloning and Analyzing of Porcine *Obese* cDNA [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 26(4): 290—296 [戴茹娟,李宁,吴常信.猪肥胖基因 cDNA 的克隆与分析.遗传学报,2000,26(4):290—296]
- [7] Bado A, Levasseur S, Attoub S, et al. The stomach is a source of *leptin* [J]. *Nature*, 1998, 394: 790—793
- [8] Muruzabal F J, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, et al. Immunocytochemical detection of *leptin* in non-mammalian vertebrate stomach [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 128(2): 149—152
- [9] Baker D M, Larsen D A, Swanson P, et al. Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human *leptin* has no clear physiologic effect [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 118(1): 134—138
- [10] Londraville R L, Duvall C S. Murine *leptin* injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 129(1): 56—62
- [11] Mustonen A M, Nieminen P, Hyvärinen H. *Leptin*, *ghrelin*, and energy metabolism of the spawning burbot (*Lota lota*, L.) [J]. *J Exp Zool*, 2002, 293(2): 119—126
- [12] Volkeff H, Eykelbosh A J, Peter R E. Role of *leptin* in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecys-

- tokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting [J]. *Brain Res*, 2003, **972**(1-2): 90—109
- [13] Weil C, Le Bail P Y, Sabin N, *et al*. In vitro action of leptin on

FSH and LH production in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, **130**(1): 2—12

THE MOLECULAR CLONING OF *OBESE* cDNA OF *ERYTHROCULTER MONGOLICUS* AND ITS ORGANIZATION EXPRESSION SPECIFICITY

PAN Ting-Shuang¹, LONG Liang-Qi¹, WU Xiao-Ping¹, LUO Xiao-Song² and ZOU Shi-Ping²

(1. Fisheries College of Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Abstract: In this study, *Erythroculter mongolicus* were taken from the Nanhu Lake, the length and weight of male and female were about 16 centimeters, 112 grams and 18 centimeters, 120 grams, respectively. Tissues such as adipose, liver, heart, spleen, muscle, brain, ovary, kidney and spermary had been obtained from the fish and reserved. After washed with distilled water, total RNAs of each tissue samples were extracted by one step method and the extracted RNA was identified by Eppendorf Bio-photometer. All the total RNA that ratios of OD₂₈₀/OD₂₆₀ were diluted to 0.5μg/μL. The primers designed according to the consensus region of human and mouse *ob* genes were employed to perform RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction). The product of RT-PCR from total RNA of *E. mongolicus* fat tissue and pBluescript SK(+) vector were both digested by *EcoR* I and *Hind* III, then linked and transformed into *E. coli* competent cell. The positive recombinant plasmid was sequenced and got a 438bp coding region DNA sequence. Compared to the nucleotide sequences of *ob* genes in human, pig and mouse, the *ob* genes of *E. mongolicus* had a homology as 82.9%, 84.0% and 99.1%, respectively. The nucleotide sequences of *ob* genes were very conservative among the four animal species. In comparison in the leptin amino acid sequence with human, pig and mouse, the homologies were 80.8%, 78.8% and 95.9% respectively. The result of *ob* gene tissue express specificity by RT-PCR method indicated that *ob* gene was expressed mainly in adipose and liver, less in heart, spleen, muscle, brain, ovary, slightly in kidney and none in spermary and intestines in *E. mongolicus*.

Key words: *Erythroculter mongolicus*; *obese* gene; Leptin; Tissue