

研究简报

肥胖基因的分离及其在大肠杆菌中的表达

邹民吉 王嘉玺¹⁾ 王利红 段聚宝 赵春文 蔡欣

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 利用 PCR 技术自外周血白细胞染色体 DNA 中扩增获取了肥胖基因 (ob 基因) 的外显子 2 和 3 序列, 经过拼接, 获得了全长的 ob 基因编码序列。测序结果表明, 获得的序列与文献报道完全一致。利用 PCR 技术扩增出成熟蛋白的编码序列, 克隆至表达载体 pBV220 中获得了表达菌株, 并对表达产物进行了初步纯化, 为进一步研究 ob 基因产物的功能与应用奠定了基础。

关键词 肥胖基因, PCR 扩增, 克隆与表达

学科分类号 R392-33

肥胖基因 (ob 基因) 产物即减肥素 (leptin) 是一种与人体肥胖相关联的激素样物质, 自 1994 年 Zhang 首次分离了小鼠 ob 基因以来, 因其具有调节体重的应用前景而引起人们的关注。对人 ob 基因的研究发现, 人类减肥素作用于下丘脑, 通过神经性作用降低食欲, 减少食物的摄取, 进而使体重下降。ob 基因是由三个外显子和两个内含子组成, 编码 167 个氨基酸, 氨基端的 21 个氨基酸残基为信号肽序列, 成熟蛋白的编码序列位于第 2 和第 3 个外显子。为研究人类 ob 基因的结构和功能以及表达产物调节体重的作用机理, 我们自染色体 DNA 中分离了 ob 基因的两个外显子, 经拼接后获得了编码成熟蛋白的全长序列, 并导入大肠杆菌获得了表达。

1 材料与方法

1.1 材料

粗分人白细胞购自解放军 307 医院血库, PCR 扩增仪为美国 PE 公司产品 2400 型, 实验中所用限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等均购自美国 Promega 公司。纯化所用试剂购自 Pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 染色体 DNA 的提取: 以淋巴细胞分离液离心自粗分白细胞中分离得单个核细胞, 2 ml TE (20 mmol/L Tris pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 悬浮细胞, 加入 20 ml 的提取缓冲液 (20 mmol/L Tris pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 20 mg/L RNase, 0.5% SDS, 蛋白酶 K 100 mg/L), 37℃ 水浴 3 h, 加入等体积的酚, 缓慢颠倒混匀 10 min,

12 000 r/min 4℃ 离心 5 min, 取上相加入 0.2 倍体积的 10 mol/L NH₄Ac, 2 倍体积的无水乙醇, 沉淀 DNA, 70% 的乙醇洗 DNA 两次, 空气干燥, 溶于 200 μl 灭菌双蒸水中备用。

1.2.2 PCR 扩增: 设计一组扩增引物分别扩增 ob 基因的外显子 2 和 3 的 DNA 序列 (图 1) 及一个用于扩增成熟蛋白编码序列的引物, 序列为: P_L1: 5'-GGAATTCAAAATGCATTGGGGAACCCCT-3'; P_R1: 5'-GGGGTACCGTGTGTGAAATGTCATTGA-3'; P_L2: 5'-GGGGTACCAGTCAGTCTCCTCCAAACA-3'; P_R2: 5'-CGGGATCCTTAGCACCCAGG-GCTGAGGTC-3'; P_L3: 5'-GGAATTCAAATGGTGCCCATCCAAAAAGTCCA-3'。取染色体 DNA 10 μl, 分别加入引物及其他反应试剂, 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 进行 35 个循环的扩增反应, 最后一个循环 72℃ 延长 5 min, 反应结束后, 取 5 μl 反应物进行电泳检测。

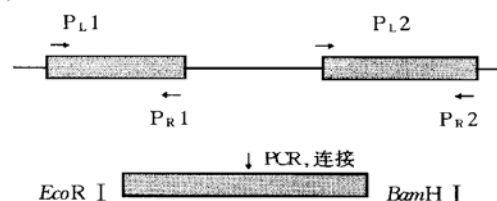


图 1 PCR 扩增示意图

1.2.3 扩增产物序列分析: 将 PCR 扩增的两个 DNA 片段经 Kpn I 酶消化后, 以 T4DNA 聚合酶削平突出的 5' 端, T4DNA 连接酶使两者连接, 经

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (010) 66931322; E-mail: wangjx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1998-11-05, 修回日期: 1999-04-15

EcoR I 和 *Bam* H I 酶切, 组入 pUC18 载体中, 提取重组质粒 DNA, 采用 DNA 自动测序仪进行 DNA 序列分析。

1.2.4 表达质粒的构建: 见图 2。

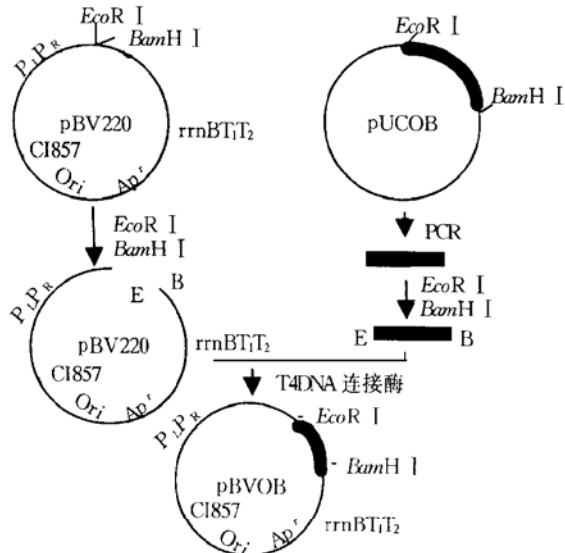


图 2 表达质粒 pBVOB 的构建

1.2.5 重组克隆的诱导表达: 取重组克隆接种于 LB 培养基中, 30℃ 振荡培养过夜, 次日按一定比例接种于 M9-CA 培养基中, 30℃ 培养至 A_{600} 为 0.4~0.6, 迅速移入 42℃ 水浴中诱导表达 4.5 h, 取诱导的菌体进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测。

2 结 果

2.1 PCR 扩增及其产物的连接

两组 PCR 扩增产物的电泳检测结果显示, 在

5' GAATTCAAATGCAATTGGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGG
CCCTATCTTTTCTATGTCCAAGCTTGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAGATG
ACACCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCACCAGGATCAATGACATTTCA
CACACGCAGTCAGTCTCCTCCAAACAGAAAGTCACCGGTTTGGACTTCAT
TCCTGGGCTCCACCCCATCCTGACCTTATCCAAGATGGACCAGACACTGG
CAGTCTACCAACAGATCCTCACCAGTATGCCTTCCAGAAACGTGATCCAA
ATATCCAACGACCTGGAGAACCTCCGGGATCTTCTTCACGTGCTGGCCTT
CTCTAAGAGCTGCCACTTGGCCTGGGCCAGTGGCCTGGAGACCTTGGACA
GCCTGGGGGGAGTCTTGAAGCTTCAGGCTACTCCACAGAGCTGGTGGCC
CTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAGCTGGACCT
CAGCCCTGGGTGCTAAGGATCC 3'

序列分析结果表明, 分离自汉族个体染色体 DNA 的 ob 基因编码序列与国外报道完全一致, 无任何变异。

150 bp 和 350 bp 的位置各产生一个非常特异的 DNA 片段, 两个片段的大小与扩增 ob 的两个编码区大小相似, 经过酶切、削平及连接后, 克隆至 pUC18 载体中, 以重组质粒为模板, 同时加入上述 4 种引物, 进行 PCR 扩增, 产生三个大小不一的 DNA 片段, 分别为 150 bp、350 bp、500 bp, 大小分别与两个 PCR 产物及连接产物相符, 结果见图 3。

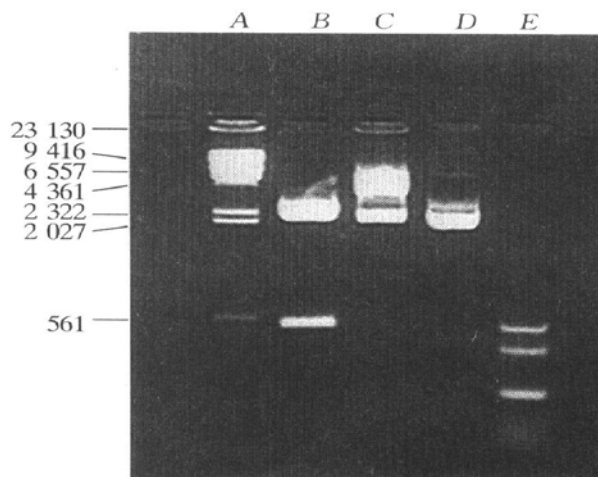


图 3 重组质粒的鉴定

A: 分子质量标准; B: 重组质粒 pUCOB 酶切分析 (*EcoR* I / *Bam* H I); C: pUCOB 未酶切质粒; D: *EcoR* I / *Bam* H I 酶切的 pUC18; E: PCR 扩增产物。

2.2 DNA 序列分析

将大小为 500 bp 的 DNA 片段克隆至 pUC18 载体中, 利用测序引物进行 DNA 序列分析, 其全序列为:

2.3 ob 基因的克隆与表达

利用引物 PL3 和 PR2 自上述克隆扩增出 ob 基因成熟蛋白的编码序列, 经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶

切, 与经过相同酶切的表达载体 pBV220 相连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 受体菌, 提取转化子的质粒 DNA, 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切分析, 得阳性重组克隆, 将此克隆命名为 pBVOB. 将 pBVOB 接种于 M9-CA 培养基中, 经过 42 $^{\circ}$ C 诱导 4.5 h, 诱导菌进行 SDS-PAGE 检测 (图 4), 结果显示, 在分子质量为 16 ku 处有一特异的蛋白表达带, 大小与 ob 基因表达产物相一致. 薄层扫描结果显示, 此蛋白约占菌体总蛋白的 15%, 取部分诱导菌超声破碎, 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 分别取上清与沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 表达产物以包含体的形式存在于破碎后的沉淀中.

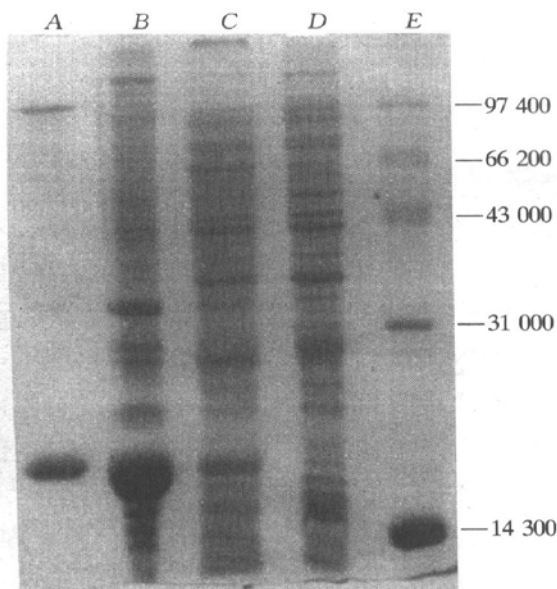


图 4 重组克隆的表达及其产物的初步纯化

A: QFF 初步纯化产物; B: 提取的包含体; C: 42 $^{\circ}$ C 诱导表达的全菌; D: pBV220 空载体对照菌体; E: 分子质量标准.

2.4 表达产物的初步纯化

提取包涵体, 分别以 TE 和 2 mol/L 尿素进行洗涤, 以 8 mol/L 尿素溶解包涵体, 稀释后在谷胱甘肽体系中复性, 经过 QFF 柱纯化, 表达产物的纯度可达 85% 以上.

3 讨 论

鉴于白色脂肪组织中大部分物质是脂肪, mRNA 的丰度也很低, 从中分离编码减肥素 cDNA 比较困难. 我们采取了有别于文献报道的方法, 即从人外周血分离单个核细胞, 提取染色体 DNA, 再利用 PCR 技术扩增出位于第 2、3 外显子上的 ob 编码区, 经过拼接得到了完整的编码序列, 测序结果与报道的完全一致, 表明我们的分离方法是成功

的, 同时也说明了不同种族之间 ob 基因序列无差异. 利用 PCR 技术扩增出 ob 基因成熟蛋白的编码序列并克隆至表达载体 pBV220 中, 获得了表达菌株并对表达产物进行了初步纯化, 为进一步研究减肥素的功能及应用奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Campfield L A, Smith F J, Guisez Y, *et al.* Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 1995, **269** (4): 546~ 549
- 2 Caro J F, Sinha M K, Kolaczynski J W, *et al.* Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, 1996b, **45** (11): 1455~ 1462
- 3 Considine R V, Considine E L, Williams C J, *et al.* Mutation screening and identification of sequence variation in the human ob gene coding region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996b, **220** (3): 735~ 739
- 4 Cong D W, Bi S, Pratey R E, *et al.* Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem*, 1996, **271** (8): 3971~ 3974
- 5 Halaas J L, Gajiwala K S, Maffei M, *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 1995, **269** (4): 543~ 546
- 6 Isse N, Ogawa Y, Tamura N, *et al.* Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*, 1995, **270** (46): 27728~ 27733
- 7 Leroy P, Dessolin S, Billageois P, *et al.* Expression of ob gene in adipose cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (5): 2365~ 2368
- 8 Niki T, Mori H, Tamori Y, *et al.* Human obese gene. Molecular screening in Japanese and Asian Indian NIDDM patients associated with obesity. *Diabetes*, 1996, **45** (5): 675~ 678
- 9 Pelleymounter M A, Cullen M J, Baker M B, *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob ob mice. *Science*, 1995, **269** (4): 540~ 543
- 10 邹民吉, 王嘉玺, 任启生, 等. 利用聚合酶链反应扩增基因片段. *生物化学与生物物理进展* (Zou M J, Wang J X, Ren Q S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*), 1992, **30** (4): 304~ 306

Isolation of ob Gene and Its Expression in *E. coli*.

ZOU Min-Ji, WANG Jia-Xi, WANG Li-Hong, DUAN Ju-Bao, CAI Xin (*Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The exon 2, 3 of ob gene were isolated from chromosome of human peripheral leucocytes by means of PCR technology. The full-length coding region of ob gene was obtained by *in vitro* splicing with ligase. DNA sequencing confirmed that the isolated ob coding sequence is identical to that reported in the literature. The coding sequence for mature OB protein was amplified by PCR, and then cloned into an expression vector pBV220. As a result, an expression bacteria strain was obtained. The expressed product was preliminarily purified for further study.

Key words ob gene, PCR, clone, expression