

## 人 resistin 基因原核表达载体构建和表达

何祥梁<sup>1</sup>, 何东华<sup>2</sup>, 黎 锋<sup>3</sup>, 杨 川<sup>3</sup>, 程 桦<sup>3</sup>, 傅祖植<sup>3</sup>

(中山大学 1. 附属第一医院急诊科, 2. 达安基因公司, 3. 附属第二医院内分泌科, 广东 广州 510080)

**摘 要:** 【目的】构建人 resistin 基因原核表达载体并观察其表达, 为开展对 resistin 的研究打下实验基础。【方法】酚氯仿一步法从一位 2 型糖尿病合并胆管癌患者腹壁皮下脂肪组织抽取总 RNA, RT-PCR 法扩增出 resistin 基因 cDNA, 经测序后, PCR 产物亚克隆入 T 载体, 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 分别酶切重组 T 质粒和原核表达载体 pGENKS, 然后 resistin 基因片段和表达载体通过 T4DNA 连接酶进行定向连接, 用核酸内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I 酶切和测序方法鉴定出重组表达质粒。重组表达质粒转化大肠杆菌 JM109, 经 1 mmol/L IPTG 在 32 °C 诱导表达 2 h, 裂解细菌, 进行 PAGE 凝胶电泳鉴定融合蛋白的表达。【结果】RT-PCR 扩增产物分子大小为 327 bp, 序列分析表明为人 resistin 基因完整编码区。PCR 产物与 T 载体连接、转化大肠杆菌后, 从细菌质粒中酶切回收了目的片段。重组表达质粒经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切后能产生出 327 bp、4 980 bp 大小的两个片段, 序列分析表明重组表达质粒包含人 resistin 基因完整编码区, 基因编码无移位, PAGE 凝胶电泳表明在细菌裂解上清有分子质量为 39.5 kD 的融合蛋白。【结论】成功构建了人 resistin 基因原核表达载体, 且构建的载体能表达出含目的蛋白的融合蛋白, 为下一步研究打下了实验基础。

关键词: 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; resistin; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: R 587.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-0413-04

## Construction and Expression of A Prokaryotic Expression Vector Containing Human Resistin Gene

HE Xiang-liang<sup>1</sup>, HE Dong-hua<sup>2</sup>, LI Feng<sup>3</sup>, YANG Chuan<sup>3</sup>, CHENG Hua<sup>3</sup>, FU Zu-zhi<sup>3</sup>

(1 Department of Emergency, The First Affiliated Hospital, 2. Da An Gene Company, 3. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct a prokaryotic expression vector containing human resistin gene and observe its expression, to lay a foundation for further study on resistin. 【Methods】The total RNA was extracted from abdominal subcutaneous tissue of type 2 diabetic patients using routine method. The resistin cDNA was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced, and subcloned into T vector. The recombinant T plasmid was identified by PCR and digestion analysis of restriction endonuclease *EcoR* I and *kpn* I. Then, the gene fragment of resistin was obtained by the digestion of recombined T plasmid with endonuclease *EcoR* I and *Kpn* I. The prokaryotic expression vector pGENKS was digested with same endonucleases. The gene fragment of resistin was orientationally linked into vector pGENKS by T4 DNA ligase, and the recombined expression plasmid was identified by digestion analysis of endonuclease *EcoR* I and *Kpn* I and sequence analysis. The recombined expression plasmid was transduced into JM109 by heatshock, and the expression of resistin protein was induced by 1 mmol/L IPTG at 32 °C for 2 hours, and the fusion protein of GST/resistin was analyzed by SDS-PAGE after lysis of bacteria. 【Results】The molecular size of RT-PCR products was about 327 bp by gel electrophoresis analysis. Sequence analysis of RT-PCR products demonstrated that it contained the complete code region of human resistin gene. The

收稿日期: 2003-06-18

基金项目: 中国博士后科研启动基金资助项目(第 31 期)

作者简介: 何祥梁(1964 -), 男, 江西九江人, 内分泌博士后, 主治医师, 讲师. E-mail: hxliang2000@163.net

recombined expression plasmid pGENKS-re was digested into two fragments of about 327 bp and 4 980 bp by endonuclease *EcoR* I and *Kpn* I, and sequence analysis of the recombined expression plasmid demonstrated that it contained a complete code region of human resistin gene. A GST/resistin fusion protein molecule of 39.5 kD was found in supernatant of lysis of bacteria by SDS-PAGE electrophoresis. **【Conclusion】** A prokaryotic expression plasmid containing human resistin gene is successfully constructed, and it can express out objective protein, which has laid a concrete foundation for future study on resistin.

**Key words:** type 2 diabetes; insulin resistance; resistin; gene clone; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci) 2004 25(5) 413-416]

2001年初 Steppan<sup>[1]</sup> 在进行脂肪细胞诱导分化、基因筛选时意外发现了抵抗素(resistin)mRNA,该 mRNA 仅在白色脂肪细胞表达,棕色脂肪细胞中几乎不表达,其它组织如乳腺、性腺有高表达。人 resistin mRNA 全长 476 个 nt,编码区 327nt (包含一个终止码,其本身不编码氨基酸),编码 108 个氨基酸,人 resistin 分子质量为 10.5 kD。对该蛋白质功能的初步研究表明,它是一个与 2 型糖尿病、肥胖症与胰岛素抵抗密切相关的脂肪细胞特异分泌的激素。为了开展对 resistin 的研究,进一步了解其功能及在糖尿病发病机制中的作用,我们构建了人 resistin 基因的原核表达载体并观察其表达,为以后的工作打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

腹壁脂肪组织取自中山大学附属第二医院普外科 1 名患 2 型糖尿病并因胆管癌而需手术治疗的患者的患者, RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、A/T 载体及限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I 均购自晶美公司,原核表达质粒 pGENKS 由中山大学附属第二医院中心实验室邓庆丽教授惠赠。

### 1.2 方法

①引物:引物 1 (47~64) 5'GCGAATTCGATGAAAGCTCTCTGTCTC 3'引物 2 (355~373) 5'GC GGTACC TCAGGGCTGCACACGACA3',画线处分别为 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点,G 表示为使连接后不产生移码突变而添加一个碱基,扩增片段长 327 bp 片段。②总 RNA 制备:取少量脂肪组织置于含裂解液的匀浆器中匀浆,按 RNA 提取试剂盒操作说明提取总 RNA,并用紫外分光仪测纯度及定量。③ RT-PCR:总 RNA 0.1 μg、引物 2 1 pmol/L、10 mmol/L dNTP 1 μL、逆转录酶 2 U、5 × 反应缓冲

液 4 μL,加 DEPC 水补至 20 μL,37 °C 孵育 1 h,95 °C 5 min 灭活逆转录酶。PCR 反应体系包括:上下游引物各 10 pmol/L、*Taq* 酶 2 U、cDNA 3 μL、2 mmol/L dNTP 2 μL、5 × 反应缓冲液 4 μL,加 3 d 水补至 20 μL,反应按 94 °C 预变性 3 min,94 °C 30 s,55 °C 45 s,72 °C 50 s,共 35 个循环,最后 72 °C 充分延伸 7 min。产物经 10 g/L 琼脂糖(含溴化乙锭)凝胶与分子 marker 对比电泳,并回收后进行正反向测序(中山大学达安基因中心)。④重组质粒的构建与鉴定,回收片段与 A/T 载体连接后转化大肠杆菌 JM109、挑选白色菌落进行 PCR 鉴定,然后用 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切阳性重组质粒,得到 resistin 基因编码区 cDNA。原核表达载体 pGENKS 用同样酶切,片段与载体在 T4 DNA 连接酶作用下进行连接后再转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性菌落,经酶切鉴定后,最后再进行 resistin cDNA 核苷酸序列分析(中山大学肿瘤医院分子中心)。⑤重组表达质粒转化大肠杆菌 JM109,小量常规摇菌后,32 °C 1 mmol/L IPTG 诱导 2 h 收菌,冻融法裂解细菌,离心分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

## 2 结果

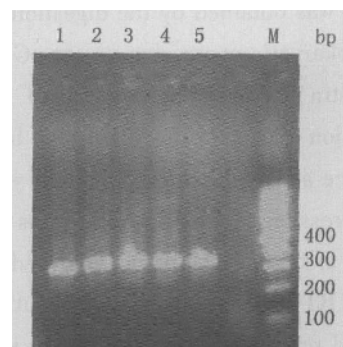


图 1 RT-PCR 扩增 resistin 基因 cDNA 片段

**Fig. 1 Resistin gene cDNA fragment amplified by RT-PCR**

Lane 1, 2, 3, 4, and 5 were 327 bp resistin gene fragments; lane 6: Marker, its molecule size is 100 bp in difference

### 2.1 RT-PCR

RT-PCR 产物经与分子 marker 对比电泳结果表明,扩增片段与期望分子量 327 bp 大小一致(见图1)。PCR 产物测序结果表明扩增的 resistin 基因编码区与基因库报道的序列一致(略, GenBank AF323081)。PCR 产物与 T 载体连接、转化大肠杆菌后,从重组 T 质粒中酶切回收了目的片段(见图 2)。

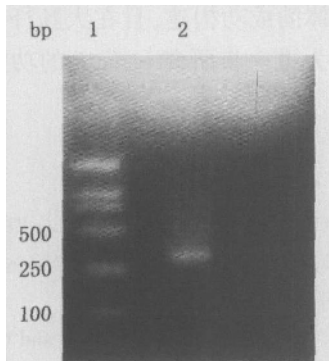


图 2 重组 T 载体经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切回收的 327 bp resistin 基因片段

Fig. 2 327 bp resistin gene fragment obtained from recombinant T plasmid with digestion analysis of *EcoR* I and *Kpn* I

lane 1: Marker, DL2000(Gene Company); lane 2: 327 bp resistin gene fragment

### 2.2 重组表达质粒 pGENKS-re 酶切鉴定

重组表达质粒经 *EcoR* I 单酶切能使其线性化(见图 3 lane 2),而经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切产生分子大小为 327 bp、4 980 bp 2 个片段(见图 3 lane 1)。

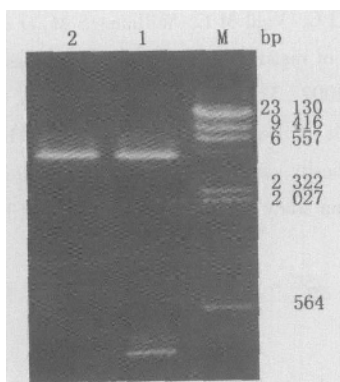


图 3 重组表达质粒酶切鉴定

Fig. 3 Digestion analysis of recombined expression plasmid pGENKS-re

lane M:  $\lambda$ DNA *Hind* III Marker; lane 1: two fragment of 327 bp and 4 980 bp were produced by digestion analysis of recombined expression plasmid pGENKS-re with *EcoR* I and *Kpn* I; lane 2: recombined expression plasmid pGENKS-re was analyzed only with *EcoR* I digestion

### 2.3 重组表达质粒核苷酸序列分析

重组表达质粒 pGENKS-re 序列分析表明 resistin 基因编码区完整地插入 *EcoR* I、*Kpn* I 酶切位点间,基因无移码突变。

### 2.4 GST-resistin 融合蛋白的表达

含重组表达质粒的大肠杆菌经 IPTG 诱导表达后,裂解细菌上清、沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,表明融合蛋白以溶解形式存在,沉淀中仅少量,见图 4。

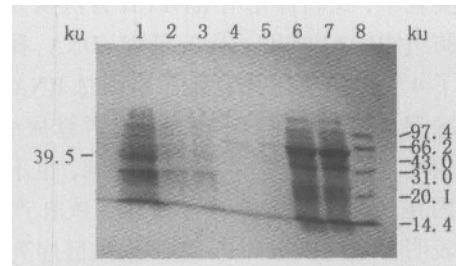


图 4 GST/resistin 融合蛋白在大肠杆菌中表达

Fig. 4 GST/resistin fusion protein expressed in *E. coli*

lane 1 was supernatant of lysis of bacterium which transfected with control vector, lane 2 and 3 were sediment of lysis of two bacteria which transfected with control vector respectively, lane 4 and 5 were sediment of lysis of two bacteria which transfected with recombined expression plasmid pGENKS-re respectively; lane 6 and 7 were supernatant of lysis of two bacteria which transfected with recombined expression plasmid pGENKS-re respectively; lane 8: protein marker

## 3 讨论

resistin(暂译为抵抗素)是 2001 年初由 Stepan 等<sup>[1]</sup>首次报道的一种由脂肪细胞特异分泌的激素。他的研究发现,遗传和饮食引起的肥胖小鼠血循环中 resistin 水平升高,抗糖尿病药噻唑烷二酮类药罗格列酮 (rosiglitazone) 能降低血循环中 resistin 水平,脂肪细胞对胰岛素刺激引起的葡萄糖摄取因 resistin 被中和而增高或因用 resistin 作用而下降,用抗 resistin IgG 抗体中和能改善饮食诱导肥胖小鼠的血糖和提高胰岛素的敏感性。基于 resistin 的上述功能,Steppan 等认为它是与 2 型糖尿病胰岛素抵抗及肥胖症相关的重要激素。目前有关 resistin 的研究还不多,且出现不一致的报道。Negave<sup>[2]</sup>检测正常胰岛素敏感性、胰岛素抵抗、2 型糖尿病 3 组超重的 42 例患者,发现 resistin 在大多数脂肪细胞或脂肪组织不表达或表达很低,肌肉细胞不表达,3 组间 resistin 表达无差异,他认为 resistin 并不是 2 型糖尿病、肥胖症和胰岛素抵抗的

主要连接相关因素,这与 Steppan 的报道十分相悖,说明在人和小鼠间该基因的表达和功能可能存在较大的差异。而 Savage 等<sup>[3]</sup>的报道部分支持 Steppan 的研究结果:他发现肥胖的人白色脂肪组织 resistin mRNA 表达比瘦的人高,新分离的脂肪细胞表达很低且与 BMI 无关,在前脂肪细胞、内皮细胞和血管平滑肌无表达,血液中单核细胞有高表达。

在实验中,我们首先用 RT-PCR 方法从人腹壁皮下脂肪组织中扩增出 resistin 基因 cDNA,我们先后提取了 4 位外科手术患者脂肪组织总 RNA (合并糖尿病),结果仅从一位患者(合并糖尿病)中扩增出该基因,除外实验本身因素影响,也不能排除该基因在个体间的表达存在差异。PCR 产物序列分析表明扩增的人 resistin 基因编码区序列与报道的序列完全一致,国外进行 resistin 基因 DNA 大样本测序表明该基因编码区未发现多态性<sup>[4-6]</sup>。而非编码区发现存在单核苷酸多态性,但与 2 型糖尿病和肥胖症的临床表型无关。在克隆过程中,我们使用了 A/T 载体进行亚克隆,由于 PCR 在扩增时会自动在产物两端加上腺苷酸 A,而设计好的 T 载体两粘端恰好是 T,因此能进行配对连接起来,T 载体具有蓝白斑筛选功能,这样容易找出重组子。然后从设计的酶切位点处切下目的片段,定向克隆到表达载体上,这样比 PCR 产物直接酶切更准确,因为 PCR 产物酶切成功与否不能判断。许多实践表明应用 T 载体进行亚克隆比直接 PCR 产物进行酶切克隆更方便,我们的实验也证明了这一点。

我们使用带谷胱甘肽 S 转移酶基因的融合表达载体 pGENKS,该基因可表达 29 ku 的谷胱甘肽 S 转移酶(GST),在 GST 的 C 端有凝血酶特异识别切割位点,其下游有多克隆位点,可插入外源基因,两个基因表达产物即为融合蛋白,可通过凝血酶进行切割分离。融合表达载体:提高相对分子量,增加

蛋白质的稳定性;含有部分细菌宿主的蛋白质成分,有助于重组蛋白质的稳定、高产量表达;易于纯化蛋白质。我们用该载体成功构建了含 resistin 基因的融合表达载体,SDS-PAGE 凝胶电泳发现分子质量为 39.5 ku 的融合蛋白主要在裂解上清,而沉淀中很少,说明该蛋白质以溶解形式而非包含体形式存在,因此后来的纯化工作更容易。resistin 基因原核表达载体的成功构建,且在大肠杆菌中能表达目的蛋白,为进一步研究 resistin 的功能打下了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Steppan C M, Bailey S T, Bhat S, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. *Nature*, 2001, 109 (18): 307-12.
- [2] Negave I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle[J]. *Biochem and Biophys Commun Res*, 2001, 285(2): 561-4.
- [3] Savage D B, Sewter C P, Klenk E S, *et al.* Resistin/Fizz3 Expression in Relation to Obesity and Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  action in human[J]. *Diabetes*, 2001, 50(5): 2199-202.
- [4] Osawa H, Onuma H, Murakami A, *et al.* Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene: the absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphism with Japanese type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2002, 51(3): 863-6.
- [5] Engert J C, Vohl M C, Williams S M, *et al.* 5' flanking variants of resistin are associated with obesity[J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1629-34.
- [6] Sentinelli F, Romeo S, Arca M, *et al.* Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study[J]. *Diabetes*, 2002, 51(3): 860-2.

(编辑 张恩健)