

含短胞内段的 SD 大鼠全长瘦素受体的 cDNA 克隆

王佑民, 丁鹤林, 程 桦, 傅祖植

(中山医科大学孙逸仙纪念医院内分泌科, 广东 广州 510120)

关键词: 肥胖症; 瘦素受体; 克隆; 分子

中图分类号: R 332 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)03-S04-03

肥胖是现代社会的常见病, 是胰岛素抵抗综合症的组成部分, 它的分子发病机制多年来一直不清楚, 1994 年瘦素基因(OB 基因)和 1995 年瘦素受体基因(OBR 基因)的克隆成功^{1,2}, 使肥胖症的分子发病机制研究进入了新的时代。目前已知瘦素是由脂肪细胞分泌, 具有降低食欲、增加能量消耗、减轻体重作用, 并参与糖、脂肪和蛋白质的代谢调节。体内瘦素受体蛋白存在多种异构体, 它们的生理作用和作用机制未完全明确。本实验室通过逆转录多聚酶链反应技术(RT-PCR)克隆含短胞内段的全长瘦素受体(OBRa)cDNA, 为进一步探索 OBRa 生理作用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

正常雄性 SD 大鼠, 体质量约 250 g(购自中山医科大学动物实验中心), rneasy mini kit 购自 QIAGEN 公司, first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR(AMV)和 expandTM high fidelity PCR system 购自 Roche 公司, pMD18T 和限制性内切酶 *Xba* I、*Hind* III、*Bam* HI、*Xho* I、*Eco*RV、*Hinc* II 以及 DNA marker λ -EcoT14 I digest (421, 925, 1489, 1882, 2690, 3472, 4254, 6223, 7743)和 DL2000(100, 250, 500, 750, 1000, 2000)购自 TakaRa Biotech 公司, JM109 由本院林百欣医学实验中心提供。

1.2 引物设计

两对引物包含了全长 OBRa 的细胞外段、跨膜段和胞内段编码区, 引物序列为: S1(1-25) GGAAAGCTTATGACGTGTCAGAAATTCTATGTGG, A1(1279-1255) CGATCACATATAATTCAGCGTAGCG, S2(1094-1117) TTTG-GTGATGAATCTAGCCGAGA, A2(2692-2670) CTTCTA-GAGAGAGACTTCAAAGAGTGTCCGCT, 划线分别为 *Hind* III 的限制性酶切位点和 *Xba* I 的限制性酶切位点。

1.3 SD 大鼠肺组织 RNA 的制备

腹腔内注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉大鼠, 取肺组织, 立即置于装有裂解液的试管内, 用 Rotor stator 匀浆器把肺组织磨碎并匀浆, 按 RNeasy mini kit(Qiagen)操作步骤抽提总 RNA, 测定 A 值, 琼脂糖凝胶电泳, 以判断抽提的

RNA 质量。

1.4 RT-PCR

总 RNA 1 μ g, 10 倍逆转录反应缓冲液 2 μ L, 0.025 mol/L MgCl₂ 4 μ L, 0.01 mol/L 的 4 种单核苷酸各 2 μ L、序列特异性下游引物(2.5 \times 10⁻⁵ mol/L) 1 μ L, RNA 酶抑制剂 50 U, AMV 逆转录酶 20 U, 加无菌水使反应体积达 20 μ L, 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 进行 RT-PCR, 99 $^{\circ}$ C 5 min 使酶失活。为了扩增 OBRa 基因 cDNA 片段, 在一个 50 μ L 的反应体系中进行 PCR, 最终反应体系中包含 10 倍 PCR 反应缓冲液 5 μ L, 0.01 mol/L 的 4 种单核苷酸各 1 μ L, 0.025 mol/L MgCl₂ 4 μ L, 上下游引物各(2.5 \times 10⁻⁵ mol/L) 0.7 μ L, 逆转录反应产物 1 μ L, 酶混合物 2.6 U, 94 $^{\circ}$ C 孵育 1 min 后, 以 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s 反应条件扩增 28 个循环(基因扩增仪: Barnstead Thermolyne, USA)。回收扩增产物, 并经限制性内切酶酶切初步鉴定。

1.5 重组质粒的构建及鉴定

将上述回收的扩增产物插入质粒 pMD18T, 通过蓝白斑筛选出阳性菌落, 酶切鉴定其连接方向后, 用 *Xba* I、*Hind* III 双酶切 2 个重组质粒, 将切得的目的片段 S1-A1 与重组质粒中 S2-A2 定向连接, 筛选出带有全长 OBRa 基因 cDNA 的阳性克隆, 通过限制性内切酶酶切和核苷酸序列测定进行鉴定, 核苷酸序列分析是利用与载体互补的引物, 通过双脱氧链终止法进行 (ABI373 自动 DNA 测序仪, Perkin-Elmer 公司)。

2 结 果

2.1 RT-PCR 产物的酶切分析

RT-PCR 产物 S1-A1 为 1 条长 1 279 bp 的双链 DNA, 经 *Bam* HI 酶切得 252 bp 和 1027 bp, 见图 1。RT-PCR 产物 S2-A2 为 1 条长 1 598 bp 的双链 DNA, 经 *Hinc* II 酶切得 322 bp 和 1276 bp, 见图 2。

2.2 重组质粒酶切分析

含 S1-A1 重组质粒 pMD18TS1-A1 经 *Xba* I、*Hind* III 双酶切得 2 692 bp 和 1 279 bp。含 S2-A2 重组质粒 pMD18TS2-A2 经 *Xba* I、*Hind* III 双酶

收稿日期: 2001-10-23

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(980117); 卫生部科研基金资助项目(98-1-091)

作者简介: 王佑民(1964-), 男, 安徽潜山人, 博士生, 副教授。

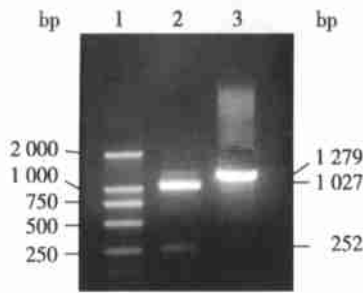


图1 RT-PCR产物 S1-A1 的酶切

Fig 1 RT-PCR product S1-A1 cut by endonuclease (agarose electrophoresis)

Lane 1 DNA marker, lane 2 RT-PCR product *Bam*HI cut,

Lane 3 RT-PCR product

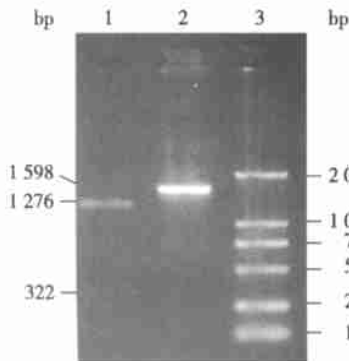


图2 RT-PCR产物 S2-A2 的酶切

Fig 2 RT-PCR product S2-A2 cut by endonuclease (agarose electrophoresis)

Lane 1 RT-PCR product *Hinc*II cut, lane 2 RT-PCR product,

lane 3 DNA marker

切得 2 692 bp 和 1 598 bp 部分未完全切断的片段约 4 290 bp. *Hin*dIII酶切得 4 290 bp. 含全长 OBRa 基因 cDNA 的

重组质粒经 *Hinc*II 酶切得 1 758 bp 和 3 619 bp, *Eco*RV 酶切得 5 377 bp 见图 3.

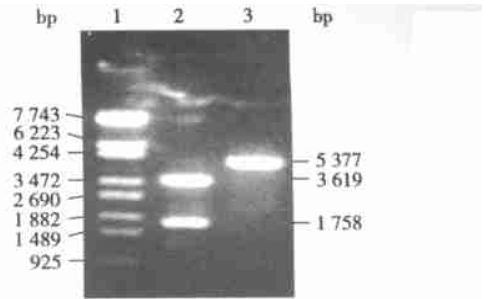


图3 含全长 OBRa 基因 cDNA 的重组质粒酶切

Fig 3 Recombinant with complete OBRa cDNA by restrictive digest (agarose electrophoresis)

Lane 1 DNA marker, lane 2 recombinant cut by *Hinc*II, lane 3 recombinant cut by *Eco*RV

2.3 核苷酸序列分析

以起始密码子腺苷酸为 1 开始编码, 全长 2 685 bp. 两次 cDNA 克隆核苷酸序列分析, 结果均有 228 位 T→C 和 515 位 T→C 的变异(划线处), 前者编码的氨基酸仍为 Gly, 后者则使编码的氨基酸从 Leu→Ser, 余序列与文献报道的一致. 在 I 类细胞因子受体(如 gp130)中保存的两个 Trp-Ser-X-Trp-Ser 主题, 其编码序列仍存在于本次克隆的 OBRa cDNA, 如斜体所示.

3 讨论

瘦素受体为一跨膜蛋白, 由于 OBR 基因转录后在 C 末端编码外显子处发生不同接叠, 故瘦素受体蛋白有多种异构体, 它们具有相同的胞外段和跨膜段, 但胞内段长短不一. 胞外段长约 816 个氨基酸, 跨膜段约 34 个氨基酸.

1 ATGAGCTGTC AGAAATCTA TGTGGTTTTC TTACTCTGGG AATTTCTGTA TGTGATAACT GCACCTAACC TGGCCTATCC AACCTCTCCG TGGAGATTTA AGCTGTTTTC TGGCCGACGC
121 AGTACAACCTG ATGACTCCTT TCTCTCTCCG CTGCGAGTCC CAACAAATAC TTGCTCTTTC AAGGGGCTT CTGAACACT TCTTGAAGCT AAATTTAAT CAACTGQCCT CTAGG TTTCT
241 GAGTTATCCA AAACATTTC CCACCTGTGC TTTCGGAATG AGCAAGTCA AAACCTGCTC GCACCTCAGC GCACCACTGA AGGGAAGAGC CTGCTCTCAG TGGTGAAGCC TTTAGTTTTC
361 CCGCAACTAG GTCTAAACTG GGACATAGAC TGCTGGATGA AAGGGGACTT GACATTATTC ATCTGTCATA TGGAACATT ACTTAAGAAC CCGTCTAAGA ATTATGACTC TAAGG TTCAC
481 CTTTTATATG ATCTGCGTGA AGTTATAGAT GATTCCGCTC TGCCGCCACT GAAAGACAGC TTTACAGACTG TCCAGTGCAC CTGCAGTGT OGGGAATGGC AATGTCATCT ACCAGTAACC
601 AGAGCCAAAG TCAACTACGC TCTTCTGATG TATTAGAAA TCACATCTGC TGCTG TGACT TTTCACTAC CTCTAATGTC ACTGCAQCQC ATGCTTGTTC TGAAGCCGA TCCACCGCTG
721 GCTTGGC TA TGGAACTCAC AGATGATGTT AATTTAAGA TTTCACTGGA CAGCCAAACA AAAGCAAGCT TTCCACTTCA ATA TCAGG TG AAATATTTAG AGAATCTAC AATCG TAAGA
841 GAGCCTGCTC AAA TCGTCTC GGATACATCT CTGCTGCTAG ACAGCGTGCT TCTCGGTCT TCATACGAAG TCCAAG TGAG GAGCAAGAGA CTGGATGGCT CAGGAGTC **TG GAGTGACTGG**
961 **AGTTTACTCT** CAACTCTTAC CACACAAGAT GTCATGTA TT TTCACCCAA AA TTCTGAGC AGTGTGGAT GCAATGCTTC CTTTTCGTC ATCTACAAAA A TGAGAACCA GACTATCTCC
1081 TCAAAACAAA TAG TTTGG TG GATGAATCTA GCCGAGAAGA TCCCGAGAC ACAGTACAAG ACTGTGAGTG ACCACATTAG CAAAGTCAC TTTCTCAACC TGAAAGCCAC CAGACCTGGA
1201 GCGAAGTTTA CCTATGATG AGCTGACTGC TGCATGAGC AGCCATGCCA TCACCGCTAC GCTCAATTAT ATGTGATGTA TGTCAATATC AATATATCAT GTGAAACTGA CCGGACTCTA
1321 ACTAAAATGA CTTCGAGATG GTCACCCAGC ACAA TCCAAAT CACTAGTGGG AAGCACTGTC CAGTTGAGT TATCAGAGCC CAGCCTGAC TGTCCCGATA ATCCATCTAT TCGTCTCACT
1441 TCAGAGCTCA AAAACTGGCT CTTCACAGCA GA TGGCTTTT ATGAATG TGT TTTCCAGCCA ATCTTTCTAT TATCTGCTA TACAATGTGG ATCAGGATCA ACCATTCTTT AGGTTTCACT
1561 GACTCTCCAC CAAGCTGTG T CCTTCCTGAC TCCGTAGTAA AAGCACTAC TCCATCTAAT G TAAAAGCAG AGATTACTAT AAACACTGGA TTATTGAAAG TA TCTTGGA AAAGCCAGTC
1681 TTTCCAGAGA ATAACTTCA GTTCCAGATT CGATATGGCT TAAATGGAAA AGAAATACAA TGGAGACAC AGGAGTATT CGATGCAAAA TCAAATGGC CCAGCCTGCC AGTGTCAGAT
1801 CTCTCTGGG TCTATGCTT ACAGGTTCCG TGCCGGCGGT TGGATGCACT ACGGTAT **TGG AGAATTGGA GCAGT**CCAGC CTACACTCTT TGCATGGATG TAAAAGTTCC TATGAGAGGG
1921 CCTGAATCT GGAGAATAAT GGATGGGAT ATTACTAAAA AGGAGAGAAA TGTCACCTTG CTTTGGAAAG CACTGATGAA AAATGACTCA CTG TGTAGTG TGAGGAGGT A TGTGTTGAA
2041 CATGCTACTG CACACAATGG GACATGCTCA CAAGATGTGG GAAATCAGAC CAATCTCCT TTTCTGTGG CAGAATCAGC ACACACTGTT ACAGTTCTGG CCATCAATTC CATCGGTGCC
2161 TCCCTTCTGA A TTTTAACTT TACG TCTCA TGGCCCATGA G TAAAGTGA TTGCTGTGCAG TCACCTCAGT CTTATGCCCT GAGCAGCAGC TGGCTCATCC TTTCTGGAC ACTG TCAACT
2281 AATGATTATA GTCTGTTATA TCTGTTTATT GAATGGAAGA AOCCTAATGA TGATGATGGA ATGAAGTGGC TTAGAATCC TTGGAATG TT AACAAGTATT ATA TGCATGA TAATTTTATT
2401 CCTATGAGA AATATCACTT TAGCTTTAC CCAGTATTTA TGGAAAGACT TGGAAAACA AAGATAATTA ATGCTTTTAC CAAAGATGAT ATCCCAAAC AGCAAAATGA TGCAGGCTGC
2521 TATGCACTTG TACGATAAT TATTTCCTCT TGTGTCTGCT TGGCTGGAAC ACTGTAA TT TCACACCA GAATGAAAA GTTGTTTGG GACGATGTC CAAACCCAAA GAATTTCTC
2641 TCCGCAACAG CACTTAATTT CAAAAGAGA GGGGACACTC TTGTA

目前发现 3 种异构体, OBRa 的胞内段有 32~34 个氨基酸, 含长胞内段的异构体 OBRb 胞内段有 303 个氨基酸, 一种缺乏跨膜段的可溶性受体 OBRc 仅有 808 个氨基酸^[2]。OBRa 在全身各组织细胞均有表达, 其作用尚未明确。根据脑脉络膜上表达高水平的 OBRa, 推测 OBRa 起着将瘦素从血液转运入脑脊液的作用^[3], 也可能参与调节 OBRb 的功能^[4]。可溶性受体是循环中瘦素结合蛋白之一, 参与维持代谢稳定, 甚至可影响瘦素转运和组织利用。

肥胖症是代谢紊乱综合症中的一种, 并与遗传相关。尽管 db/db 小鼠、Zucker fa/fa 大鼠和 koletsky f/f 鼠因 OBR 基因突变, 导致瘦素作用下降, 使鼠出现肥胖^[5~7], 但人类绝大多数肥胖患者并无 OBR 基因突变, 并且发现多数肥胖患者体内瘦素水平正常或偏高^[8], 说明肥胖患者存在瘦素抵抗状态, 其产生的可能环节有: ①瘦素与其受体蛋白结合异常, ②瘦素通过血脑屏障能力降低, ③瘦素受体功能不全。这些都与基因有关, 因此, 开展 OBR 基因克隆具有重要意义。

序列分析结果发现 cDNA 序列 228 位 T→C 和 515 位 T→C 变异, 前者编码的氨基酸仍为 Gly, 后者则使编码的氨基酸从 Leu→Ser, 余序列与文献报道的一致^[9]。为排除 RT-PCR 的误读, 以同一 RNA 为模板, 再次进行 RT-PCR, 产物序列分析结果显示, 在同样位点出现同样的变异, 因此, 该位点的变异不是误读所致, 可能是基因的多态性, 但需证实。OBR 属于第一类细胞因子受体家族, 第一类细胞因子受体保存有两个 Trp-Ser-X-Trp-Ser 主题, 本次 OBRcDNA 克隆亦存在此两个主题。至于两个位点的碱基变异是否影响其表达产物的功能, 需进一步研究。

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.
- [2] Tartaglia L A, Dembski M, Weng X, *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R[J]. *Cell* 99, 83(7): 1263.
- [3] Golden P L, Maccagnan T J, Partridge W M. Human blood-brain barrier leptin receptor[J]. *J Clin Invest* 1997, 99(1): 14.
- [4] Houseknecht K L, Mantzoros C S, Kuliawat R, *et al.* Evidence for leptin binding proteins in serum of rodents and humans; modulation with obesity[J]. *Diabetes* 1996, 45(11): 1638.
- [5] Lee G H, Proenca R, Montez J M, *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice[J]. *Nature* 1996, 379(6566): 632.
- [6] Crouse J A, Elliott G E, Burgess T L, *et al.* Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation[J]. *J Biol Chem* 1998, 273(29): 18365.
- [7] Wu-Peng X S, Chua S C Jr, Okada N, *et al.* Phenotype of obese Koletsky (f) rat due to Tyr 763 stop mutation in the extracellular domain of leptin receptor: evidence for deficient plasma-to-csf transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat[J]. *Diabetes* 1997, 46(3): 513.
- [8] Considine R V, Considine E L, Williams C J, *et al.* The hypothalamic leptin receptor in humans: Identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations[J]. *Diabetes* 1996, 45(7): 992.
- [9] Lida M, Murakami T, Ishida K, *et al.* Substitution at codon 269 (glutamine→proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 224(2): 597.

(编辑 黄小延)

(上接第 231 页 from page 231)

years of age be considered as an essential population to be given the health education, and to be encouraged to quit smoking and control the spread of diseases caused by smoking. All officials and government in Guangdong province should take serious consideration of this issue, make plans or measures and implement them to control the spread of smoking, and should regard it as an important task to deal with.

(Acknowledgement: this research was sponsored by Prof. Eli Swarz and Ru Zhan-ming in Dental hospital affiliated to Hong Kong University; and incorporated with the leaders and related staff of The Bureau of Health in Guangzhou, Zhan-jiang, Shantou, Qingyuan cites Prof. Liang Bin-chang of SUMS, Dr. Liao Lun-hua participated in part of the sampling work)

Reference:

- [1] Thun M, Glynn T. Improving the treatment of tobacco dependence[J]. *Br Med J* 2000, 321(2): 311.
- [2] Peto R, Darby S, Deo H, *et al.* Smoking, Smoking cessation, and lung cancer in the HK since 1950: Combination of national statistics with two case-control studies[J]. *Br Med J* 2000, 321(2): 323.
- [3] Gu X Q, Gu M J. Smoking is harmful to health and longevity[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing Press 1994. 131~158.
- [4] Qu X S. Life style, behavior and health[M]. Tianjing: Tianjing Science and Technology Publishing Press 1994. 142~152.
- [5] China Prevention Medicine Academy, The disease control department of the ministry of health of China, Chinese smoking and health association. The National epidemiological investigation of smoking behavior in 1996[M]. Beijing: China Science and Technology Publishing Press, 1997. 8~6.

(编辑 黄小延)