

人瘦素基因克隆与序列测定

徐明彤¹, 吕 凌², 钟光恕¹, 程 桦¹, 傅祖植¹

(中山医科大学 1. 孙逸仙纪念医院内分泌科; 2. 分子医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】构建人瘦素基因 cDNA 克隆, 并进行序列分析。【方法】用逆转录聚合酶链反应扩增人瘦素基因 cDNA, 获得片段(640 bp)连接至 pUC19 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α 。以末端终止法进行序列测定。【结果】所克隆的人瘦素 cDNA 含全长的人瘦素基因编码区, 仅 287 位的腺苷酸被鸟苷酸代替, 导致 96 位编码谷氨酰胺的密码子 CAA 改变为编码精氨酸的 CGA, 其意义尚待阐明。【结论】以逆转录聚合酶链反应方法成功地构建了人瘦素基因 cDNA 克隆。

关键词: 瘦素; 克隆; 分子; 序列分析; DNA

中图分类号: R589.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0104-04

Cloning and Sequencing of Human Leptin Gene cDNA

XU Ming-tong¹, LU Ling², ZHONG Guang-shu¹, CHENG Hua¹, FU Zu-zhi¹

(1. Division of Endocrinology, Memorial Hospital; 2. Department of Molecular Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To construct the cDNA clone and analyze the sequence of human leptin gene. 【Methods】The full human leptin cDNA fragment was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The obtained fragment of 640 bp was inserted into pUC19 vector and transformed to *E. Coli* DH5 α . The recombinant plasmid pUC19-ob was sequenced by dideoxy nucleotide chain termination method. 【Results】A full human leptin cDNA fragment was obtained, and a base substitution (A to G) of coding region at the position 287 was detected leading to a replacement of glutamin by arginine. Its physiological significance need further studying. 【Conclusions】The human leptin gene cDNA clone was constructed by RT-PCR.

Key words: leptin; cloning; molecular; sequencing analysis; DNA

瘦素(leptin, Lep)是近年发现的一种由脂肪细胞分泌的激素, 研究表明其具有减少摄食、增强代谢从而调节体重的生物效应^[1, 2]。为进一步探讨瘦素基因(leptin gene, 旧称肥胖基因, ob gene)的分子生物学特性, 我们用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从一名正常体重的中国汉族人脂肪组织中克隆获得了人 Lep cDNA, 进行了序列测定。

来自广东省汉族 55 岁女性右腹股沟斜疝患者, 体质量(体重)指数: 21.7 kg/m², 手术时取出腹部皮下脂肪, 即冻存于液氮中。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、cDNA 第一链合成试剂盒、ExpendTM High Fidelity PCR System 购自 Boehringer Mannheim 公司, T7 DNA 多聚酶测序试剂盒购自 Promega 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计 根据已报道的 Lep 基因 cDNA 序列^[3], 设计合成 5 条引物, 其中 Lep1 和 Lep2 用

1 材料与方 法

1.1 标本来源

收稿日期: 1999-11-09

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(950364)

作者简介: 徐明彤(1967-)女, 广东清远人, 硕士, 主治医师

于 PCR 扩增 Lep 基因 cDNA 序列, 预期扩增片段 634 bp, 包括全部编码序列; Lep3、Lep4 和 Lep5 用于序列测定及克隆鉴定。引物序列在 GenBank 的 D49487 号序列中位置。

1.3.2 脂肪组织总 RNA 制备 参照异硫氰酸胍一步法进行^[4]。

1.3.3 逆转录和 PCR 扩增 以脂肪组织总 RNA 为模板, 加入引物 Lep2, 以 AMV 逆转录酶进行逆转录。其后采用 ExpendTM High Fidelity PCR System 进行 PCR 扩增; 反应参数为 94 °C, 50 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min 20 s; 30 循环。

1.3.4 扩增片段的克隆及鉴定^[5] 扩增片段用低熔点琼脂糖电泳回收, 质粒载体 pUC19 以限制性内切酶 *Sma* I 酶切, T4 连接酶作用下使其连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经氨苄青霉素蓝白斑筛选后, 挑取白色菌落, 少量扩增, 以碱裂解法提取质粒 DNA 进行酶切、PCR 鉴定。

1.3.5 重组体 DNA 序列测定 用 pUC/M13 正反向通用引物及特异引物 Lep3、Lep4 和 Lep5, 以 [α -³²P] dATP 标记, 采用末端终止法进行获得片段的序列测定。

2 结果

2.1 Lep 基因 cDNA 的 RT-PCR 结果

RT-PCR 扩增产物在 1 g/mL 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下见一清晰的特异扩增带, 与标准 DNA 分子量对照, 大小与理论预期 (634 bp) 相符 (图 1)。

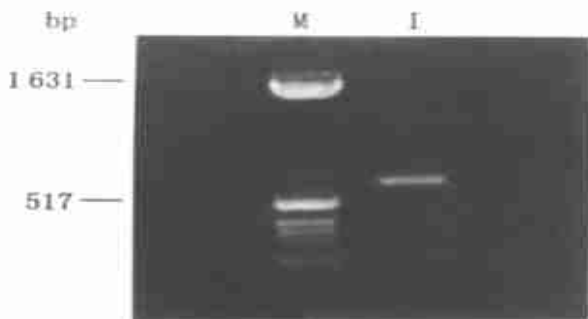


图 1 Leptin cDNA 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplified product of Leptin cDNA by PCR

M. DNA marker (pBR322/ *Hinf* I); 1. RT-PCR product

2.2 pUC19-Lep 重组体的鉴定

图 2 示重组体的 PCR 鉴定结果, 证实有目的基因片段插入。BamH I 酶切后的重组质粒 pUC19-Lep (3324bp) 电泳位置较线性化 pUC19 载

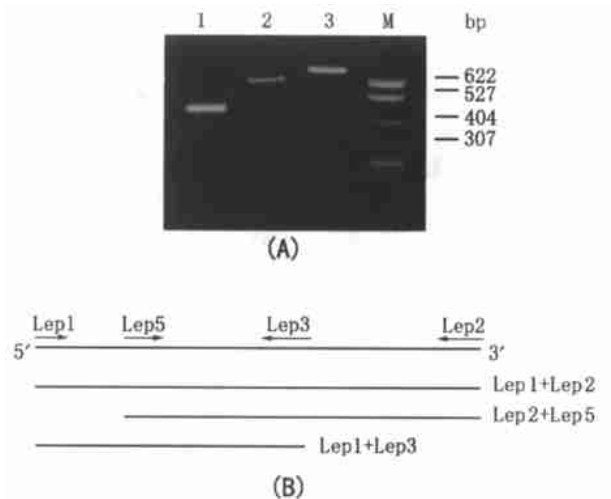


图 2 重组质粒 pUC19-Lep 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant pUC19-Lep plasmid with PCR

(A) Amplified products from pUC19-Lep plasmid by PCR; M. DNA marker (pBR322/ *Msp* I); 1. PCR product primed with Lep1 + Lep3 (437 bp); 2. PCR product primed with Lep2 + Lep5 (570 bp); 3. PCR product primed with Lep1 + Lep2 (634 bp).

(B) Showing the location of PCR primes and the length of amplified products

体 (2 690 bp) 后移。内切酶 *Hind* III 在目的基因 422 bp、载体 pUC19 2 236 bp 处各有一个切点。内切酶 *Pvu* II 在目的基因第 494 bp、载体 2 057 bp 和 2 379 bp 处有切点。内切酶 *Pst* I 在目的基因 467 bp 和 479 bp 处、载体 2 252 bp 处有切点。分别以 *Hind* III、*Pvu* II、*Pst* I 酶切重组质粒 pUC19-Lep, 与目的基因反向插入载体的预期结果相符 (图 3)。

2.3 序列测定结果

用不同引物进行正反向序列测定的结果完全一致。证明获得的人基因 Lep cDNA 长 640 bp, 含有全长的人 Lep 基因编码区 (存编码 49 位谷氨酰胺的密码子 CAG)。检索 GenBank 核苷酸资料库, 其编码区与多个已报道的人 Lep 基因 cDNA 克隆序列基本相同, 相符率达 99.4%, 仅 287 位的腺苷酸被鸟苷酸代替, 导致 96 位编码谷氨酰胺的密码子 CAA 改变为编码精氨酸的 CGA (图 4、5)。

3 讨论

人类 Lep 基因位于染色体 7q31.3, 长 20 kb, 含一个高度保守的编码 166/167 个氨基酸的开放读码框架^[1]。大量事实表明 Lep 及其为中心的

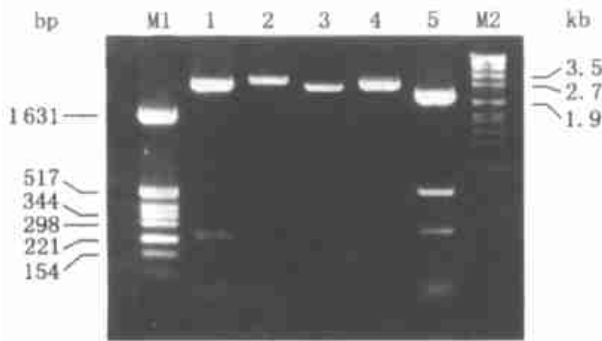


图3 重组质粒 pUC Lep 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pUC19-Lep plasmid with restriction endonuclease

M1. DNA marker (pBR322/ *Hinf* I); M2. DNA marker (Spp I DNA/ *EcoR* I); 1. pUC19-Lep plasmid digested with *Hind* III; 2. pUC19-Lep plasmid digested with *BamH* I ; 3. pUC19-Lep plasmid digested with *BamH* I ; 4. pUC19-Lep plasmid digested with *Pst* I ; 5. pUC19-Lep plasmid digested with *Pvu* II

信号系统在体质量调节中起有重要作用^[1-4], 因而成为目前研究肥胖症的一个热点。遗传性肥胖小鼠 C57BL/6Job/ob Lep 基因 105 位密码子 CGA 发生无义突变, 导致极度肥胖和类似人类的 II 型糖尿病。在人类多数肥胖者中没有发现 Lep 基因的突变, 而表现为脂肪组织中 Lep 基因 mRNA 表达增强, 血浆 Lep 水平升高, 提示存在 Lep 抵抗现象^[9]。仅 Montague^[7] 报道在同一家系中两个肥胖儿童的 Lep 基因 133 位密码子缺失了 1 个鸟苷酸, 而发生了移码突变, 血浆 Lep 水平极低。另外 Strobel^[8] 也在 3 个肥胖者中发现瘦素基因 105 位密码子 C → A 突变, 导致血浆 Lep 水平极低。

我们克隆获得的中国人 Lep 基因 cDNA 长 640 bp, 含有全长的人 Lep 基因编码区, 存 49 位编码谷氨酰胺的密码子 CAG。据报道此密码子在正常体质量个体可因为转录时 mRNA 剪接的滑移而缺失。该谷氨酰胺位于翻译肽链的高保守区, 此多态性的意义还不清楚^[1,3]。与报道序列比较^[3], 本研究克隆的 Lep cDNA 在编码序列 287 位由鸟苷酸代替了腺苷酸, 96 位密码子发生改变, 编码的谷氨酰胺由精氨酸代替。由于测序中进行了正反链多次测定, 结果完全一致; 另外 PCR 过程采用了具有校正功能的聚合酶 (ExpendTM High Fidelity PCR System 含 Pwo DNA 聚合酶^[9], 兼具 5'-3' 聚合活性及 3'-5' 核苷酸外切酶的校正活性), 可以认为此差异是来自 Lep 基因本身的变异。96 位密码子发生改变的分子生物学意义有待进一步研究。

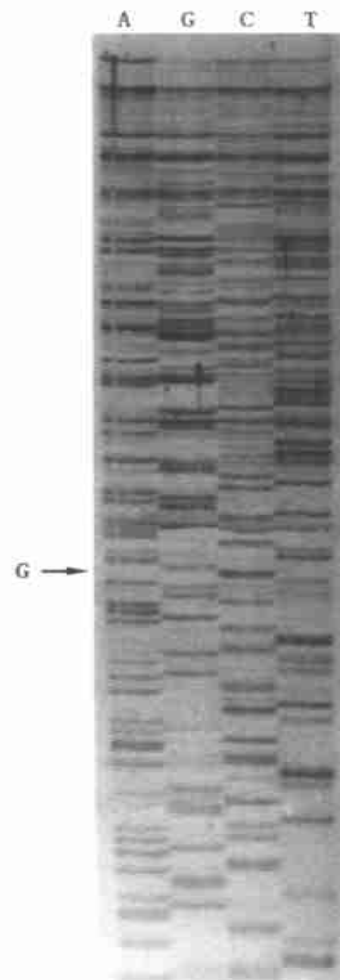


图4 以引物 Lep5 对 leptin cDNA 进行序列测定的放射自显影图

Fig. 4 Sequence analysis of human Lep cDNA by the dideoxy chain termination method

The arrow head indicated a base substitution (A to G) of coding region at the position 287

人 Lep 基因 cDNA 克隆的获得, 为进一步在原核或真核系统中表达 Lep, 研究人类 Lep 基因的表达调节, 研究人 Lep 的生物特性, 探讨 Lep 信号系统在人类体质量调节中的作用机制提供了物质基础。

参考文献:

- [1] Zhang Y 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] Halaas J L, Gajiwala K S, Maffei M, *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene [J]. *Science*, 1995, 269(5223): 543.

```

-17      -10      15      30
CCATCCT  GGGAAGGAAA  ATG CAT TGG GGA ACC CTG TGC GGA TTC TTG TGG CTT
           Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu

           45      60      75      90
TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC CAA GCT GTG CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC
Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp

           105     120     135
ACC AAA ACC CTC ATC AAG ACA ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG
Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr

           150     165     180     195
CAG TCA GTC TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu

           210     225     240
CAC CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC CAA CAG
His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln

           255     270     285     300
ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CGA ATA TCC AAC GAC CTG GAG
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Arg Ile Ser Asn Asp Leu Glu

           315     330     345     360
AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT AAG AGC TGC CAC TTG CCC
Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro

           375     390     405
TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC CTG GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA
Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser

           420     435     450     465
GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC CTG AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC
Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp

           480     495     510     520
ATG CTG TGG CAG CTG GAC CTC AGC CCT GGG TGC TGAGGCCTT GAAGGTCCT
Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys

           530     540     550     560     570     580
CTTCTGCAA GGACTACGTT AAGGGAAGGA ACTCTGGCTT TCAGGTATCT CCAGGATTGA

           590     600     610     620
AGAGCATTGC ATGGACACCC CTTATCAGGA CTCTGTCAAT TCC

```

图5 人 Leptin cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig 5 Nucleotide and deduced amino acid sequence of human Lep cDNA

The arrow head indicated a base substitution (A to G) of coding region at the position 287

- [3] Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, *et al.* Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue [J]. *Diabetes* 1995, 44(7): 855.
- [4] Chomezyski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 42~66.
- [6] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects [J]. *Nature Med*, 1995, 1(11): 1155.
- [7] Montague C T, Farooqi I S, Whitehead J P, *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in human [J]. *Nature*, 1997, 387(6636): 903.
- [8] Strobel A, Issad T, Camoin L, *et al.* A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity [J]. *Nature Gene*, 1998, 18(3): 213.
- [9] Barnes W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6): 2216.

(编辑 黄小延)