

# 人肥胖基因在 pBV221 中的克隆及在大肠杆菌中的表达<sup>①</sup>

于雪梅<sup>1</sup> 朱振宇<sup>2</sup> 傅祖植<sup>1</sup> 马涧泉<sup>2</sup>

(中山医科大学 1 孙逸仙纪念医院内分泌科; 广州, 510120 2 生物化学教研室)

**摘要 目的:** 在大肠杆菌中高效表达人 leptin。 **方法:** 根据中国人肥胖基因 (obese gene, *OB*) cDNA 序列和高效表达质粒 pBV221 的多克隆位点, 设计 PCR 引物, 以含有人 *OB* 的重组质粒 pUC19OB 为模板, 体外扩增人 *OB* 编码 leptin 的片段 (*OB* 1), 并经内切酶消化鉴定。将带有一对限制性内切酶位点的 *OB* 1 和 pBV221 分别进行双酶切, 然后把 *OB* 1 定向克隆于 pBV221 中。 **结果:** 成功地构建了重组质粒 pBV221OB1, 实现了人 leptin 在大肠杆菌中的表达。 **结论:** 采用定向克隆技术, 将 *OB* 1 插入表达质粒 pBV221, 连接效率高, 且重组质粒中 *OB* 1 均为正向插入, 确保了人肥胖基因在大肠杆菌中的表达。

**关键词** 肥胖症/遗传学; 克隆, 分子; 基因表达

**中图分类号** Q 7.78

## CLONING HUMAN OBESITY GENE INTO pBV221 AND ITS EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI

Yu Xuemei<sup>1</sup> Zhu Zhenyu<sup>2</sup> Fu Zuzhi<sup>1</sup> Ma Jianquan<sup>2</sup>

(1 Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Guangzhou, 510120)

2 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences)

**Abstract Objective:** To express human leptin in *E. coli*. **Methods:** According to the sequence of Chinese obesity gene (*OB*) cDNA and the polycloning site of expression plasmid pBV221, two oligonucleotide primers were synthesized. Recombinant plasmid pUC19OB including Chinese *OB* was applied as templates for the amplification of the translated region of the *OB* gene (*OB* 1), and the amplified PCR fragment was verified with restriction enzyme. The *OB* 1 gene sites and pBV221 were cleaved with two kinds of enzymes, then the cleaved *OB* 1 was directionally inserted into pBV221. **Results:** Recombinant expression plasmid pBV221OB1 was constructed and human *OB* was expressed successfully. **Conclusions:** Through directional cloning technique, the ligation between foreign gene *OB* 1 and expression plasmid pBV221 was efficient and the expression of human leptin was successful.

**Subject headings** obesity/genetics; cloning, molecular; gene expression

自从 1994 年肥胖基因 (*OB*) 被克隆后<sup>[1]</sup>, *OB* 及其表达产物 leptin 成为研究的热点。研究发现外源性 leptin 能够减少动物的摄食量、减轻体重、降低血糖和胰岛素水平<sup>[2]</sup>。近期的研究发现 leptin 抑制胰岛素分泌<sup>[3]</sup>, 对脂肪代谢也有影响<sup>[4]</sup>。本室根据 *OB* 的序列, 将中国人 *OB* cDNA 进行了分子克隆和序列测定。人 leptin 是 146 个氨基酸组成的单链蛋白质激素, 其前体含有 21 个氨基酸组成的信号肽。为了使 *OB* 在大肠杆菌中的表达不含有信号肽, 本研究在上述研究的基础上, 作者

采用 PCR 技术从 pUC19OB 重组质粒中扩增 *OB* cDNA 翻译 leptin 的片段 (*OB* 1), 将此片段定向克隆于高效表达质粒 pBV221, 构建了重组质粒 pBV221OB1, 并成功地在大肠杆菌中表达了人 leptin。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

pUC19OB 为本科室保存重组质粒, pBV221 为

本校生化教研室保存质粒, TG1 为本校寄生虫教研室保存菌种, *Taq* DNA 聚合酶为上海复华实业公司产品, *Nco* I 为 Promega 公司产品, T4DNA 连接酶为 Boehringer Mannheim 公司产品。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 引物 I: 5'-GTCCC-CATGGTGGCCG -ATCCAAAAAG-3' (划线部分为 *Nco* I 位点), 引物 II: 5'-CTTCGTC-GACTCAGCTCCCAGGGC-3' (划线部分为 *Sal* I 位点)。

## 1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得 根据 pBV221 的多克隆位点和中国人 *OB* cDNA 翻译 leptin 的序列, 按照引物设计原则设计引物。引物上分别含有 *Nco* I 和 *Sal* I 位点, 使扩增片段除了包括编码 leptin 的全部序列外, 5' 端含有 *Nco* I 位点和起始密码子 ATG, 3' 端含有终止密码 TGA 和 *Sal* I 位点。在 20  $\mu$ L 终体积的反应体系中, 含模板 pUC19OB 10 ng, 引物 I、II 各 36 pmol, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。首先在 94  $^{\circ}$ C 变性 90 s, 然后按 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共循环 30 次, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳 (40 V, 2 h)。PCR 扩增产物经常规方法纯化后, 用 *Hind* III 37  $^{\circ}$ C 消化 1 h, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 酶切、连接、转化、筛选及鉴定 在 20  $\mu$ L 终反应体积中, 含 PCR 产物 (*OB* 1) 0.5  $\mu$ g 或 pBV221 3  $\mu$ g, *Nco* I 7 U 和 *Sal* I 5 U, 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h。1% 琼脂糖凝胶电泳观察酶切完全。用 10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶回收已进行双酶切的 *OB* 1 和 pBV221, 并进行纯化; 然后在 10  $\mu$ L 终反应体系中, 加入已进行双酶切的 *OB* 1 0.1  $\mu$ g, pBV221 0.5  $\mu$ g, T4DNA 连接酶 1U, 16  $^{\circ}$ C 恒温水浴 14 h。按照文献[5]的方法制备感受态的大肠杆菌 TG1。取 5  $\mu$ L 连接产物转化感受态的 TG1, 挑取抗氨苄青霉素的单菌落进行培养。培养物采用小规模碱裂解法抽提质粒 DNA, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 根据质粒的迁移率筛选出含重组质粒 pBV221OB1 的菌落。重组质粒 pBV221OB1 进行 *Sal* I 单酶切和 *Eco*R I 及 *Sal* I 双酶切, 质粒 pBV221 进行 *Sal* I 单酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.3 人 leptin 在大肠杆菌中的表达 大肠杆菌

TG1、质粒 pBV221 和重组体转化的 TG1 在 30  $^{\circ}$ C 培养至  $A_{600}$  为 0.5 时, 除一部分质粒 pBV221 和重组体转化的 TG1 迅速升温至 42  $^{\circ}$ C 诱导培养外, 上述细菌继续 30  $^{\circ}$ C 培养, 持续 6 h。然后收集菌体, 超声波破碎。将沉淀溶解于 7 mol/L 尿素中, 进行 150 g/L SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色后观察结果。

## 2 结果

### 2.2 编码 leptin 的 *OB* 1 的获得

以 pUC19OB 为模板的 PCR 扩增产物见图 1, 第 1 泳道为单一扩增带, 位于 Markers 515~377 bp 之间, 与 *OB* 1 的理论值 460 bp 一致。

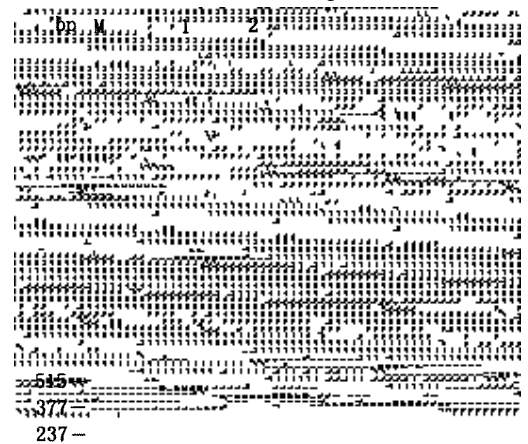


图 1 PCR 扩增的 *OB* 1 和限制性内切酶酶切鉴定  
Fig. 1 PCR amplified *OB* 1 and its restriction enzyme digested fragments

lane M: PCR markers; lane 1: PCR amplified *OB* 1 (460 bp); lane 2: *Hind* III cleaved *OB* 1 (107 bp, 353 bp)

### 2.2 PCR 扩增产物 *OB* 1 的酶切鉴定

以 *Hind* III 消化后的 PCR 产物 *OB* 1 见图 1, 第 2 泳道消化产物为相对分子质量较小的条带, 片段大小与理论值 353 bp 和 107 bp 相符, 初步证明 PCR 所扩增的 460 bp 片段为 *OB* 1。

### 2.3 重组体酶切鉴定

图 2 可见质粒 pBV221 单酶切为单一条带, 约 3 666 bp 大小, 重组质粒单酶切为单一条带, 约 4 102 bp 大小, 重组质粒双酶切为两条带, 约 3 651 bp 和 451 bp 大小。

### 2.4 人 leptin 在大肠杆菌中的表达

与含 pBV221 的 TG1 和未经诱导的含

pBV221OB1 的 TG1 相比, 经 42 °C 诱导的含 pBV221OB1 的 TG1 电泳可见一额外带, 位于 Marker 14 400 ku 附近, 与 leptin 16 000 ku 相近, 为表达的人 leptin(图 3)。

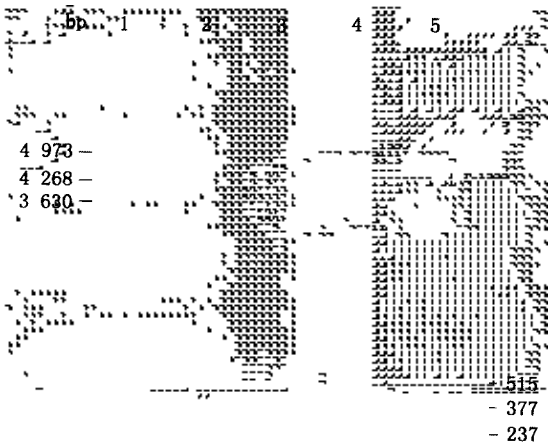


图 2 重组体的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant

lane 1:  $\lambda$  DNA/ *Hind* III + *EcoR* I markers; lane 2: *Sal* I cleaved pBV221 (3 666 bp); lane 3: *Sal* I cleaved pBV221OB1 (4 102 bp); lane 4: *Sal* I and *EcoR* I cleaved pBV221OB1 (3 651 bp, 451 bp); lane 5: PCR Markers

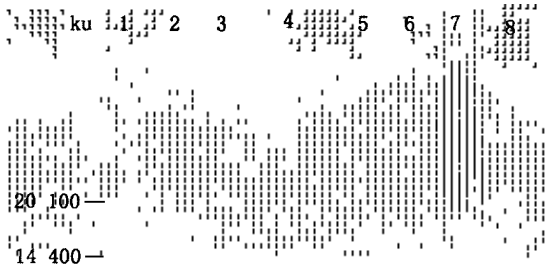


图 3 人 leptin 在大肠杆菌中的表达

Fig. 3 Human leptin expressed in *E. coli*

Lane 1: TG1; Lane 2: TG1 harboring pBV221(30 °C); Lane 3: TG1 harboring pBV221 (42 °C); Lane 4: low molecular weight protein markers; Lane 5 and 6: TG1 harboring pBV221OB1 (42 °C); Lane 7 and 8: TG1 harboring pBV221OB1(30 °C)

### 3 讨论

肥胖是某些慢性病, 如高血压、冠心病、高血脂

症和糖尿病等的一个危险因素。尽管已经确认肥胖是多基因和环境因素共同作用的结果, 但肥胖的遗传基础至今不完全明确, 尚无有效措施预防和治疗肥胖症。肥胖基因突变使 leptin 缺乏, 导致动物和人类出现明显肥胖<sup>[6]</sup>。目前认为脂肪组织向大脑传递信号——leptin, 通过调整摄食和能量代谢以维持机体脂肪量相对恒定。但 leptin 能否成为一种治疗人类肥胖症的有效药物, 以及是否确有与上述疾病的关系, 都有待于进一步的探讨。本研究采用定向克隆技术, 构建了重组质粒 pBV221OB1, 并成功地表达了人 leptin, 为进一步获得高纯度人 leptin 和深入探讨 leptin 生理、药理作用奠定了基础。

在方法学方面, 定向克隆能够有效地限制载体 DNA 分子的自身环化, 提高连接效率。本研究的连接产物中, 重组体的比例占 60%; 另一方面定向克隆能够确保外源基因片段在载体启动子下游的正向插入, 从而使肥胖基因成功地在大肠杆菌中得以表达。因此, 定向克隆技术是一种使基因工程顺利完成方便有效的技术。

### 参 考 文 献

- 1 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al*. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372(6506): 425
- 2 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(5223): 543
- 3 Kieffer T J, Heller R S, Leech C A, *et al*. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive  $K^+$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 1997, 46(6): 1087
- 4 Muoio D M, Dohn G L, Fiedorek F T, *et al*. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscles. *Diabetes*, 1997, 46(8): 1360
- 5 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 1~298
- 6 Montague C T, Fareoqi I S, Whiteheat J P, *et al*. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 1997, 387(6636): 903

(1997 - 12 - 09 收稿 1998 - 06 - 25 修回)