

# 大鼠 OB 基因克隆及其在大肠杆菌中的表达\*

张铁梅 林亚红 韩彩和 金军华 姚文华

(卫生部北京老年医学研究所 北京 100730)

**摘 要** 采用 RT-PCR 技术扩增大鼠 OB cDNA 编码区序列。PCR 产物酶切后定向克隆至 pUC19 质粒。经核苷酸序列测定表明与文献报道的大鼠 OB cDNA 编码区序列一致。继之构建了 pBV220-rOB 表达质粒并获得了 OB 基因在大肠杆菌中的特异表达。大鼠 OB 基因产物的获得为研究肥胖与某些非传染性疾病(如糖尿病、高血压病)间的关系提供了条件。

**关键词** OB 基因, 分子克隆, 原核表达

**分类号** Q75 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0215-19

肥胖主要发生在发达国家及经济发展迅速的发展中国家。肥胖因其与冠心病、高血压病、糖尿病、高脂血症等疾病的发生和进展密切相关而成为影响公众健康的危险因素。

1994 年以来, 肥胖分子生物学的研究取得了突破性的进展。Zhang<sup>[1]</sup>等发表了从 ob/ob 肥胖小鼠克隆 OB(Obese, 肥胖)基因的研究工作。Murakami<sup>[2]</sup>和 Ogawa<sup>[3]</sup>等分别克隆了肥胖大鼠和 SD 大鼠 OB cDNA 核苷酸序列。OB 基因仅特异性地表达于脂肪组织中, 编码产物为 167 个氨基酸的多肽, 命名为 leptin。大鼠 OB mRNA 长约 4.5kb, 在氨基酸水平, 大鼠和小鼠 Leptin 之间有 96% 的同源性; 大鼠与人 Leptin 具有 84% 的同源性。在核苷酸(编码区序列)水平上, 大鼠 OB cDNA 有 96% 与小鼠一致, 84% 与人类一致<sup>[2,3]</sup>。

啮齿类动物是用于医学研究的主要模型动物。目前国内尚无大鼠 OB 基因及其表达产物的研究报道。我们在克隆 Wistar 大鼠 OB 基因编码区核苷酸序列基础上, 构建了原核表达质粒, 并在大肠杆菌中表达获得了大鼠 OB 基因重组蛋白-Leptin。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

RNAgents Total RNA Isolation System Kit、PCR Marker、逆转录酶、各种限制性内切酶、T4 连接酶和 DNA 聚合酶等购自 Promega 公司。GeneClean 试剂盒、蛋白分子量标准购自 Boehringer Mannheim 公司。1kb DNA Ladder 购自 Gibco 公司。pUC19 质粒、大肠杆菌 DH5  $\alpha$  由本室保存。pBV220 质粒由中国预防医学科学院病毒基因工程国家重点实验室张智清教授赠送。

### 1.2 引物设计

根据文献[3]报道的大鼠 OB cDNA 核苷酸序列设计引物, 由美国 Sybersyn 公司合成。5'-端引物为: Sense AGGAATTCATGGTGCCTATCCACAAAGTC, 3'-引物为: Anti-

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770812)

收稿日期: 1998-03-06, 修回日期: 1998-08-17

sense CGGGATCCTCAGCATTTCAGGGCTAAG。5'-端引物去掉 N 末端信号肽序列,并加入 EcoR I 酶切位点和起始密码 ATG,3'-端引物终止密码后设计了 BamH I 酶切位点。

### 1.3 大鼠脂肪组织总 RNA 的提取

断头处死 Wistar 大鼠后立即取 0.25g 附睾周围脂肪组织,按 RNAagents Total RNA Isolation System 操作步骤提取脂肪组织总 RNA。以紫外分光光度计法及 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 的定量及纯度分析。

### 1.4 逆转录及 PCR 扩增 OB cDNA

取总 RNA 5.0 $\mu$ g,加入设计的反义链引物(30  $\mu$ mol/L) 1.0 $\mu$ L 进行逆转录。在 PE 公司提供的专用 PCR 管内加逆转录产物 1.0 $\mu$ L 为模板,加入合成的 sense 和 antisense 引物(30 $\mu$ mol/L)各 0.5 $\mu$ L,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3.0 $\mu$ L,取 10 $\times$  Taq buffer 4.0  $\mu$ L,25 mmol/L dNTPs 4.0  $\mu$ L,72 $^{\circ}$ C 3min 后,加入 10 $\times$  Taq buffer 1.0  $\mu$ L,双蒸水 8.5  $\mu$ L,Taq polymerase 0.5  $\mu$ L 后进行 PCR 扩增(总体积为 50  $\mu$ L)。循环条件:变性 94 $^{\circ}$ C,30s,退火 60 $^{\circ}$ C 45s,延伸 72 $^{\circ}$ C,90s,循环 35 次,再 72 $^{\circ}$ C,5min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,测定为 460bp。

### 1.5 PCR 产物酶切图谱分析

用 Pst I 酶切 PCR 产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳并与 DNA 标准分子量比较鉴定。

### 1.6 大鼠 OB cDNA 克隆

确认特异的 PCR 产物经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后电泳回收。同时将 pUC19 用 EcoR I 和 BamH I 双酶切。在 T4 连接酶作用下,将用 EcoR I 和 BamH I 双酶切回收的长度约为 460bp 的 DNA 片段定向插入 pUC19 中,获重组质粒 pUC19-rOB。转化感受态大肠杆菌 DH5  $\alpha$ ,用 X-gal 筛选重组质粒,制备质粒 DNA 并酶切鉴定。

### 1.7 DNA 序列测定分析

选取经酶切鉴定含有插入片段的细菌克隆,碱裂解/PEG 沉淀法提取并纯化待测质粒 DNA。荧光标记双脱氧末端终止法测序,用微机分析测定结果。

### 1.8 原核表达质粒 pBV220-rOB 构建

将经测序证实核苷酸序列正确的 pUC19-rOB 质粒以及 pBV220 质粒用 EcoR I 和 BamH I 酶切,回收 rOB cDNA 片段和 pBV220。在 T4 连接酶作用下将 rOB cDNA 片段定向插入 pBV220,构建原核表达质粒 pBV220-rOB。转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选重组质粒,制备质粒 DNA 并酶切鉴定插入片段的分子量及方向。

### 1.9 重组 OB 基因产物——Leptin 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

pBV220-rOB 菌株在含有 50 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中,30 $^{\circ}$ C 培养 12h,按 1:50 放大培养至  $A_{600} = 0.3 \sim 0.4$  时,立即转到热诱导温度为 42 $^{\circ}$ C,继续培养 6h 后制备大肠杆菌裂解液。参照分子克隆手册进行 SDS-PAGE 分析。

## 2 实验结果

### 2.1 逆转录 PCR 产物电泳与酶切图谱分析

用 Promega 公司提供的 RNA 分离与纯化 Kit,从大鼠 0.25g 附睾脂肪组织获得了约 100 $\mu$ g 总 RNA,紫外分光光度计测定  $A_{260}/A_{280}$  比值约为 2.0。电泳显示纯度较好的 28S、18S 条带,其中 28S 带宽约为 18S 带宽的 2 倍(结果未显示)。

在逆转录反应体系中,我们应用设计的大鼠 OB cDNA Antisense 作引物。如图 1 所示,PCR 电泳结果显示在 460bp 出现特异的 DNA 条带 (lane 2.3), 而总 RNA 不经逆转录, 直接 PCR, 电泳结果未见任何条带 (lane 4), 提示分离的 RNA 不含 DNA。大鼠 OB cDNA 经计算机分析, PstI 酶切图谱为 235bp、90bp、75bp、48bp、12bp。逆转录 PCR 产物用核酸内切酶 PstI 酶切, 经 2% 琼脂糖电泳, 可见 235bp、90bp、75bp、48bp cDNA 片段, 证实 RT-PCR 产物的特异性 (lane 5)。

## 2.2 pUC19-rOB 的构建与鉴定

用 X-gal 筛选 8 个阳性细菌克隆 (白色菌落), 用 EcoR I 和 BamH I 酶切制备质粒 DNA, 显示 8 个重组

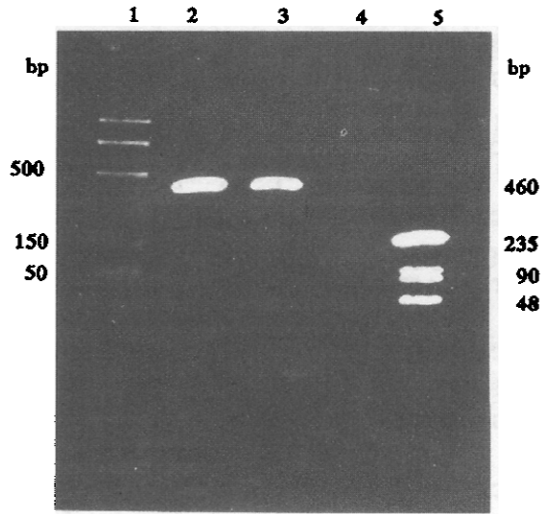


图 1 逆转录 PCR 产物的电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of RT-PCR products

1. PCR marker;
- 2, 3. Amplified product of OB DNA;
4. Amplified product without reverse transcription;
5. Amplified product digested by PstI.

质粒均含有 460bp 的插入片段 (图 2)。对照组为未经酶切的质粒 DNA。

## 2.3 DNA 序列分析

373A 自动测序仪测序结果表明, 本文克隆的大鼠 OB cDNA 序列在去掉了 5' 端信号肽序列, 加入了新的起始密码 ATG 到终止密码的阅读框架与文献报道的大鼠 OB cDNA 核苷酸序列一致 (图 3)。

## 2.4 原核表达质粒 pBV220-rOB 的构建与鉴定

将测序证实的质粒 pUC19-rOB 及 pBV220 质粒经 EcoR I 和 BamH I

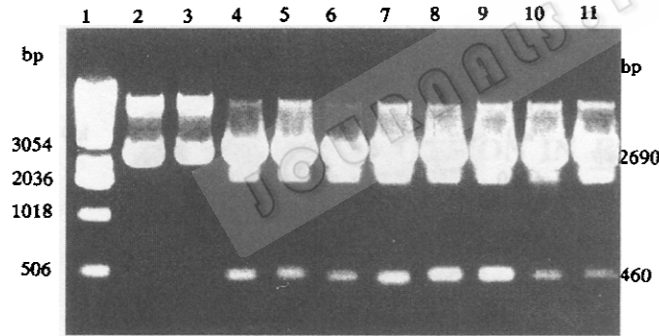


图 2 pUC19-rOB 质粒的鉴定

Fig.2 Identification of plasmid pUC19-rOB

1. 1 kb DNA ladder as marker;
- 2, 3. Without digestion as control;
- 4~11. Digested by EcoR I/BamHI.

酶切, 获得 OB cDNA, 定向插入 pBV220 多克隆位点 EcoR I 和 BamH I 之间。转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选 6 个重组子, 提取质粒 DNA, 用 EcoR I 和 BamH I 酶切, 证实重组子均有 460bp 插入片段 (结果未显示)。

## 2.5 重组 OB 基因蛋白质-Leptin 的表达与 SDS-PAGE 鉴定

SDS-PAGE 表明, 含重组 OB 的 pBV220-rOB 菌株经 42 $^{\circ}$ C 热诱导后, 在分子量为 16.7

```

AGGAATTC      -1
ATG GTG CCT ATC CAC AAA GTC CAG GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC AAG      +48
M  V  P  I  H  K  V  Q  D  D  T  K  T  L  I  K
ACC ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG CAG TCG GTA TCC      +96
T  I  V  T  R  I  N  D  I  S  H  T  Q  S  V  S
GCC AGG CAG AGG GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCC GGG CTT CAC CCC      +144
A  R  Q  R  V  T  G  L  D  F  I  P  G  L  H  P
ATT CTG AGT TTG TCC AAG ATG GAC CAG ACC CTG GCA GTC TAT CAA CAG      +192
I  L  S  L  S  K  M  D  Q  T  L  A  V  Y  Q  Q
ATC CTC ACC AGC TTG CCT TCC CAA AAC GTG CTG CAG ATA GCT CAT GAC      +240
I  L  T  S  L  P  S  Q  N  V  L  Q  I  A  H  D
CTG GAG AAC CTG CGA GAC CTC CTC CAT CTG CTG GCC TTC TCC AAG AGC      +288
L  E  N  L  R  D  L  L  H  L  L  A  F  S  K  S
TGC TCC CTG CCG CAG ACC CGT GGC CTG CAG AAG CCA GAG AGC CTG GAT      +336
C  S  L  P  Q  T  R  G  L  Q  K  P  E  S  L  D
GGC GTC CTG GAA GCC TCG CAC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCT CTG AGC      +384
G  V  L  E  A  S  L  Y  S  T  E  V  V  A  L  S
AGG CTG CAG GGC TCT CTG CAG GAC ATT CTT CAA CAG TTG GAC CTT AGC      +432
R  L  Q  G  S  L  Q  D  I  L  Q  Q  L  D  L  S
CCT GAA TGC TGA  GGATCCCG      +452
P  E  C  ***

```

图3 大鼠 OB cDNA 及氨基酸序列

Fig. 3 Sequence of rat OB cDNA and predicted amino acid

kD 处出现一显著特异蛋白质表达条带(图 4, lane 2), 而未经热诱导(30℃)的菌株仅表达少量特异蛋白质带(lane 3)。含空质粒 pBV220 的菌株热诱导前后均无该特异性带表达(lane 4, 5)。说明 pBV220-rOB 质粒在宿主菌 DH5 $\alpha$  特异表达重组 OB 蛋白——Lep-tin。

### 3 讨论

我们在克隆 Wistar 大鼠 OB 基因编码区序列时, 因大鼠 OB cDNA 3'端非翻译区长达 2.5kb, 故在逆转录时用 antisense 作引物。为了使该基因在大肠杆菌中得到表达, 在克隆时已去掉 N 端信号肽核苷酸序列, 并在 5'端加入起始密码 ATG。为了便于定向克隆, 在 5'端和 3'端引物分别引入限制性核酸内切酶 EcoR I 和 BamH I 酶切位点。克隆的质粒 pUC19-rOB 测序结果表明克隆的 Wistar 大

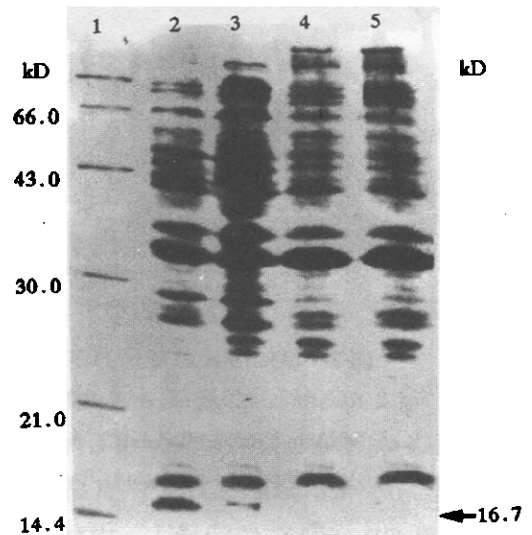


图4 OB 基因蛋白质在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of rOB protein expressed in *E. coli*

1. Protein MW marker; 2. pBV220-rOB/42℃; 3. pBV220-rOB/30℃; 4, 5. pBV 200/42℃, 30℃.

鼠编码区序列为 441bp, 编码 146 个氨基酸, 不含 N 端信号肽序列, 与文献报道的大鼠 OB cDNA 编码区序列一致。现我们正在摸索 OB 蛋白高效表达及保持其生物活性的优化条件。

截至目前的研究结果表明, 补充原核表达的重组小鼠 Leptin 至 ob/ob 肥胖小鼠体内可改善其食欲亢进, 降低体重及血糖并改善胰岛素抵抗现象; Leptin 还可以使正常小鼠体重下降 12%, 降低膳食诱导的肥胖小鼠的体重<sup>[4~6]</sup>。这些研究提示 OB 基因产物——Leptin 在生物体内具有很好的活性。关于 Leptin 在人体的生理及病理生理作用正是目前研究的热点<sup>[7,8]</sup>。

大鼠 OB 基因的克隆及表达成功为在动物模型上研究肥胖与糖尿病等疾病的关系及探索 Leptin 的生理、病理生理效应提供了一个有效的工具, 也为我们进一步克隆表达人 OB 基因提供了经验。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Proena R, Maffei M *et al.* *Nature*, 1994, **372**:425~432.
- [2] Murakami T, Shima K, *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **209**(03):944~952.
- [3] Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N *et al.* *J Clin Invest*, 1995, **96**(3):1647~1652.
- [4] Pelleymounter M A, Cullen M J, Baker M B *et al.* *Science*, 1995, **269**:540~542.
- [5] Halass J L, Gajiwala K S, Maffei M *et al.* *Science*, 1995, **269**:543~545.
- [6] Campfield L A, Smith F J, Guisez Y *et al.* *Science*, 1995, **269**:546~548.
- [7] Bai Y, Zhang s, Kin K S *et al.* *J Biol Chem*, 1996, **271**(24):13939~13942.
- [8] Flier J S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:4242~4245.

## MOLECULAR CLONING OF RAT OB GENE AND ITS EXPRESSION IN *ESCHERCHIA COLI* \*

Zhang Tiermei Lin Yahong Han Caihe Jin Junhua Yao Wenhua  
(Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730)

**Abstract** In order to provide rat OB gene product for studying the relationship between obesity and noninfectious diseases, rat OB cDNA was amplified by RT-PCR technique. 460 bp fragment of OB cDNA was subcloned into EcoRI/BamHI site of plasmid pUC 19. Sequence analysis of OB cDNA revealed that the translation reading frame was identical with that reported in the literature. Thereby plasmid pBV220-rOB was constructed and the specific expression of OB gene in *E. coli* identified by SDS-PAGE electrophoresis was obtained.

**Key words** OB gene, Molecular cloning, Prokaryotic expression

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770812)