

人 Leptin 基因的 cDNA 的克隆和表达

贾振宇^{1*} 伏晓敏¹ 金爱华¹ 曹 江²

(¹浙江省医学科学院 杭州 310013 ;²浙江大学肿瘤研究所 杭州 310009)

摘 要 克隆人 Leptin 基因的 cDNA 并获取表达的 Leptin 蛋白,为进一步研究新的 Leptin 相关蛋白打下基础。以人基因组 DNA 为模板,用引物悬挂延伸 PCR 法,克隆与 6 个组氨酸(6×His)密码子相连的人 Leptin 基因的 cDNA,并将其克隆到体外表达载体 pIVEX2.3MCS 上,通过体外快速翻译系统(Roche 公司的 RTS500 环状模板试剂盒和 RTS500 ProteoMaster 仪器)在体外表达了带有 6×His 的 Leptin 融合蛋白。经 SDS-PAGE 及 Western blot 方法鉴定,融合蛋白大小正确,有 172 个氨基酸,分子量为 19.46kD,具有特异的抗原性,且主要以可溶形式存在于反应液上清中。

关键词 Leptin, cDNA 克隆,融合蛋白,体外表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0476-04

Leptin 最初于 1994 年在 ob/ob 型肥胖小鼠中被发现,为 ob 基因的产物,由脂肪细胞合成^[1]。人类 ob 基因于 1995 年被发现,位于染色体 7q31.3,大约 20kb,由 3 个外显子和 2 个内含子组成^[2]。瘦素基因在脂肪细胞、胎盘和胃肠道细胞中转录翻译。人类瘦素是一个由 167 个氨基酸残基组成的多肽,分子量为 18kD。其氨基端为一由 21 个氨基酸残基组成的分泌信号肽。瘦素转运到微粒体中,随后分泌到血液中^[1,9]。体液中瘦素为由 146 个氨基酸残基组成的分子量为 16kD 的单体。我们在体外翻译系统合成的人 Leptin 融合蛋白有 172 个氨基酸,分子量为 19.46kD。

最初的研究发现瘦素作为饱足的传入信号,控制食物摄入,刺激能量消耗,从而协调体脂储存^[3,4]。瘦素与人体体脂有着密切的关系。体重下降通常导致瘦素分泌量减少,反之则引起瘦素分泌量增加^[10]。瘦素在与体重相关的生理性紊乱(例如肥胖、神经性厌食)的研究中,成为一种新的病理性标记^[5]。同时,瘦素与糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、多血症等有关^[6]。人类生殖对营养状况非常敏感,体脂含量和青春来临的时间有关^[7]。对人类肥胖患者的研究发现,90% 的肥胖患者(身体质量指数 BMI > 30kg/m²)体液中瘦素水平高于正常人,10% 的瘦素水平正常,极个别的瘦素水平很低^[5]。外源瘦素对肥胖患者几乎没有作用,人类肥胖似乎是一种瘦素耐受现象。绝大多数肥胖患者的 ob 基因正常,虽然少数肥胖患者的 ob 基因发生突变,但这些突变没有共同特点^[11,12]。ob 基因启动子序列的多态现象与血清瘦素水平之间没有相关性^[13]。

对瘦素作用机制研究发现,瘦素与其短受体结合后,被运输通过血脑屏障,在下丘脑与其长受体结合,受体通过 JAK/STAT 途径传递信号,阻遏神经多肽(NPY)表达和分泌。NPY 是一种很强的食物摄取刺激因子。因而瘦素通过抑制 NPY mRNA 表达而降低食物摄入。瘦素建立了一种大脑与脂肪代谢状态之间的信号交流。研究^[14,15]表明,肥胖患者血清中游离瘦素和被结合蛋白结合的瘦素浓度高于正常人许多(达 300%),而其脑脊液中瘦素浓度则仅高于正常人 30%。因此,人类肥胖的瘦素耐受性的可能机制包括:瘦素从血转运到脑脊液的通路发生障碍;血液中存在某种瘦素结合物,其与瘦素的可逆性结合可以影响瘦素的生物活性;血液中有瘦素拮抗物或抑制因子;由瘦素诱导的细胞因子阻断瘦素的信号传导通路等。

随着对 Leptin 生理机制研究的深入,可以与 Leptin 发生相互作用的其他蛋白(包括受体)的调控作用愈来愈受到人们的关注。为了寻找与 Leptin 相互作用的蛋白,需要有足够的 Leptin 蛋白及相应的分离分析手段。本研究即在体外重组克隆了人 Leptin cDNA 序列,并成功地在体外翻译表达了带有 6×His 的 Leptin 融合蛋白。这为下一步研究 Leptin 在人体内的调控机制打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:大肠杆菌 DH 5α(由浙江大学肿瘤所保存)。

1.1.2 引物:由上海生工公司合成,序列分别为:1U 5'-CAT

收稿日期 2003-01-21,修回日期 2003-04-18。

项目基金:浙江省自然科学基金资助(No.301033)浙江省卫生厅基金资助。

* 通讯作者。 Tel:86-571-88929214; E-mail:zhenyujia@yahoo.com

ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGG GGA ACC CTG TGC GG-3' ,1D 5'-AGA CTG ACT GCG TGT GTG AAA TGT CAT TGA-3' ,2U :5'-TTC ACA CAC GCA GTC AGT CTC CTC CAA ACA-3' ,2D :5'-CTC GAG TCA GCA CCC AGG GCT GAG G-3'。

1.1.3 酶类和抗体 :Taq 酶、各种限制酶及工具酶以及 PCR 产物克隆试剂盒、pGEM-T-Easy 载体系统均为 Promega 公司产品。小鼠抗人 Leptin 单克隆抗体和兔抗小鼠 IgG 抗体均购自美国 R&D 公司。

1.1.4 分子量标记 :1kb DNA 分子量标记和 BenchMark 预染蛋白质分子量标记均为 Invitrogen/Gibco 公司产品。

1.1.5 蛋白质体外翻译系统 :快速表达系统 RTS500 环状模板试剂盒(包括相应的 pIVEX2.3MCS 载体和 GFP 对照载体)以及快速表达系统仪器 RTS500 ProteoMaster 为 Roche 公司产品。

1.1.6 DNA 回收纯化柱 :QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qia-gen 公司。

1.1.7 培养基 :细菌培养基 LB 由蛋白胨和酵母粉配制而成。氨苄青霉素抗性培养基中抗生素终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.8 SDS-PAGE 及 Western blot :电泳及电转移仪器及 PVDF 膜均为 Bio-Rad 公司产品,化学发光显色 ECL 试剂盒为 Amersham-Pharmacia 公司产品。

1.1.9 其它化学试剂 :购自上海生工公司。

1.2 方法^[8]

1.2.1 人基因组 DNA 的制备 :取正常献血员抗凝血 5 mL,用淋巴细胞分离液分离其中淋巴细胞,并用生理盐水洗细胞 2 次。将细胞悬浮于 10 mL 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0, 0.1 mol/L EDTA, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase, 0.5% SDS),加入蛋白酶 K 至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。置 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 3 h,并不时轻轻搅动悬液。在室温下先后用等体积 Tris 饱和酚、Tris 饱和酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)和氯仿-异戊醇(49:1)抽提。最后吸取上层水相并加入 0.2 体积 10 mol/L NH_4Ac 及 2 倍体积无水乙醇,混匀。用吸头小心地将白色絮状沉淀挑出至另一离心管,挥发干燥后用 TE 溶解备用。

1.2.2 带 6 \times His 密码子的人 Leptin cDNA 的克隆 :采用引物悬挂延伸 PCR 法。先以 1U/1D、2U/2D 为引物,人基因组 DNA 为模板,分别用 PCR 方法扩增带 6 \times His 密码子的编码人 Leptin 基因的第二外显子(连引物序列共 172bp)及第三外显子(连引物序列共 376bp)的序列,然后以此序列为模板,以 1U/2D 为引物,进行第 2 次 PCR,扩增带 6 \times His 密码子的人 Leptin cDNA(连引物序列共 528bp)。最终的 PCR 产物用 pGEM-T-Easy 载体系统试剂盒按照使用说明克隆至 pGEM-T-Easy 载体上,挑选带有 528bp 插入片段的克隆小量提取质粒,并经自动测序仪(Perkin Elmer 377 型)双向测序确认序列的正确性。

1.2.3 6 \times His-Leptin 融合蛋白表达载体的构建及其体外表达 :将上述带 6 \times His 密码子的人 Leptin cDNA 插入片段的克隆载体及体外表达载体 pIVEX2.3MCS 用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,1.0% 琼脂糖电泳分离。割胶回收 528bp 的带 6 \times His 密

码子的人 Leptin cDNA 双酶切片段和 pIVEX2.3MCS 双酶切载体,经 QIAquick Gel Extraction Kit 按照使用说明纯化,并将两者在 T4 DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,转化感受态细胞 DH5 α 。在氨苄青霉素平板上挑选生长出的菌落并小量抽提质粒,经酶切鉴定有 528bp 插入片段的克隆,再经双向测序确认插入序列的正确性。

按照快速表达系统 RTS500 环状模板试剂盒的说明,将 20 μg 溶于 50 μL TE 纯化的构建好的 6 \times His-Leptin 融合蛋白表达载体质粒加入反应体系,在快速表达系统仪器 RTS500 ProteoMaster 仪器上 30 $^{\circ}\text{C}$ 、600 r/min 条件下反应 20 h。GFP 对照载体在相同条件下反应作为对照。反应结束后取样分析,剩余反应物保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.4 SDS-PAGE :取 5 μL 上述反应物于一 0.5 mL Eppendorf 管中,12 000 g 离心 20 s,将上清转移到另一 0.5 mL 微量离心管中,加入等体积 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液(100 mmol/L Tris·Cl, pH 6.8, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油, 200 mmol/L 二硫苏糖醇),沸水浴 5 min 后迅速置冰上。沉淀以 5 μL PBS 悬浮后同样加 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液处理。以 GFP 对照载体反应物作对照。样品处理完毕后进行 20% SDS-PAGE,至溴酚蓝接近凝胶下沿时电泳结束,在室温下考马斯亮蓝染色液(0.25% Coomassie brilliant blue, 50 mL 甲醇, 10 mL 冰乙酸, 40 mL 水)中染色 2 h,然后在脱色液(50 mL 甲醇, 10 mL 冰乙酸, 40 mL 水)中脱色至条带清晰。

1.2.5 Western blot :如上进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后取出凝胶,按电转移仪使用说明进行电转移。电转移缓冲液为 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycine, 15%(V/V)甲醇。电转移条件为 250 mA, 2 h。转移结束后将 PVDF 膜浸于封闭缓冲液(5% 脱脂奶粉, PBS, 0.1% Tween-20,)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭过夜。PBST(PBS, 0.1% Tween-20)洗 3 次,每次 5 min。加 PBST 稀释的小鼠抗人 Leptin 单克隆抗体,室温下反应 2 h。同上用 PBST 洗 3 次,每次 5 min。加 PBST 稀释的 HRP-兔抗鼠 IgG,室温下反应 2 h。同上用 PBST 洗 3 次,每次 5 min。取出 PVDF 膜,沥干后在膜上加 ECL 反应液(A 液和 B 液以 1:1 混匀),使反应液均匀覆盖整张膜。反应 2 min 后沥干反应液,用保鲜膜包裹后在暗盒中曝光、冲片。

2 结果和讨论

2.1 带 6 \times His 密码子的人 Leptin cDNA 的克隆

以引物悬挂延伸 PCR 法,以人基因组 DNA 为模板,先分别扩增编码人 Leptin 蛋白的第二外显子和第三外显子的序列,然后扩增完整的带 6 \times His 密码子的人 Leptin cDNA 序列(见图 1)。克隆到 pGEM-T-Easy 载体上后,用 *Eco*R I 酶切挑选有插入片段的克隆(图 2)进行测序。经测定,克隆到的 Leptin 序列与 GenBank 中人 Leptin 的序列完全一致,并带有设计的酶切位点及 6 \times His 密码子。

2.2 6 \times His-Leptin 融合蛋白表达载体的构建

将上述克隆到的带 6 \times His 密码子的人 Leptin cDNA 片段插入 pIVEX2.3MCS 上,酶切后挑选带有插入片段的克隆,经

测序鉴定,插入位点及开放阅读框完全正确。

2.3 6×His-Leptin 融合蛋白的体外表达

pIVEX-HisLPT 及 GFP 对照载体经快速表达系统表达,可以见到明显的目的蛋白质表达(图3),6×His-Leptin 融合蛋白大小约为 19 kD,与预期(19.4624 kD)相符,且主要以可溶形式存在于反应液上清中。经 Western blot 鉴定,6×His-Leptin 融合蛋白具有很特异的抗原性(图4)。

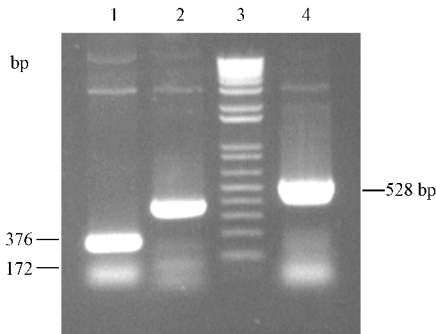


图1 引物悬挂延伸 PCR 法扩增人 Leptin cDNA

Fig.1 Overhang Extension PCR amplification of human Leptin cDNA

1. Amplification of exon 2 of human leptin (with 6×His codons);
2. Amplification of exon 3 of human leptin;
3. 1 kb-plus Molecular weight standard;
4. Amplification of full-length coding region of human leptin (with 6×His codons)

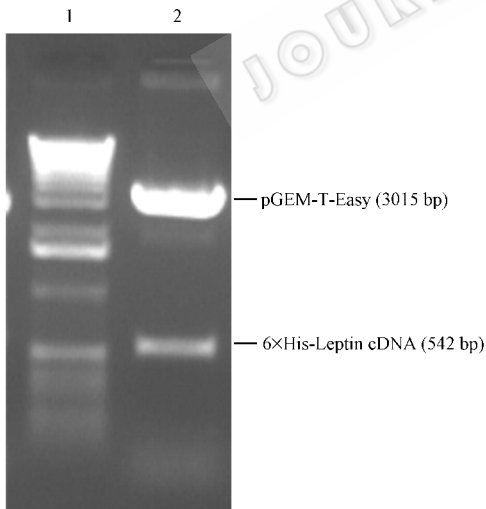


图2 6×His-Leptin cDNA 的克隆

Fig.2 6×His-Leptin cDNA cloning

1. 1 kb-plus Molecular weight standard;
2. pGEM-T-Easy-6×His-Leptin(*EcoR*I digestion)

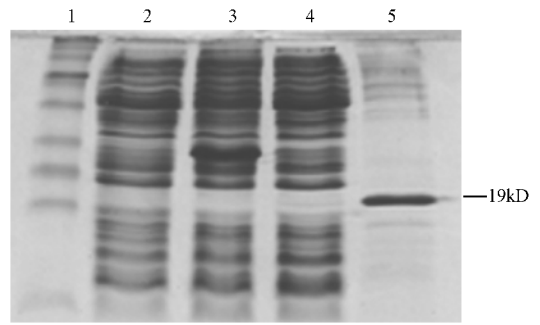


图3 人 6×His-Leptin 融合蛋白表达结果

Fig.3 6×His-Leptin fusion protein expression

1. BenchMark prestained protein molecular weight standard;
2. pIVEX2.3MCS control;
3. GFP vector control;
4. Pellet of 6×His-Leptin *in vitro* translation reaction mixture;
5. Supernatant of 6×His-Leptin *in vitro* translation reaction mixture

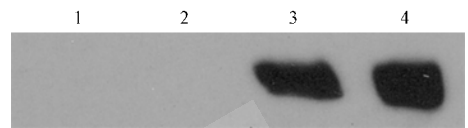


图4 6×His-Leptin 融合蛋白的 Western blot 结果

Fig.4 Western blot of fusion human leptin

1. pIVEX2.3MCS control;
2. GFP vector control;
3. Pellet of 6×His-Leptin *in vitro* translation reaction mixture;
4. Supernatant of 6×His-Leptin *in vitro* translation reaction mixture

本研究采用新颖的引物悬挂延伸 PCR 方法,以外周血中人基因组 DNA 为模板,扩增带有 6×His 密码子的人 Leptin cDNA 序列。该方法无需提取特定组织细胞中 mRNA,再用 RT-PCR 法扩增 cDNA。由于 Leptin 基因(*ob*)在人外周血中基本上不表达,高表达 *ob* 基因的脂肪组织的 RNA 又不易获得,而引物悬挂延伸 PCR 方法则很好地解决了模板来源困难的问题。本研究在体外表达的重组人 Leptin 氨基端设计增加了 6 个组氨酸,以便于利用 His-tag 分离纯化 Leptin。而氨基端系 Leptin 的分泌信号肽,功能区位于氨基端分泌信号肽之后,因此增加的 6 个组氨酸对重组 Leptin 的生理生化功能影响应该不大。我们采用的最新的蛋白质体外快速翻译表达系统(Rapid Translation System, RTS)大大简化了常规的体外转录翻译反应的操作,提高了表达效率,而与大肠杆菌表达系统相比,表达产物单一且产量大,不易产生在大肠杆菌中表达容易形成的包涵体,无需考虑重组 Leptin 表达载体在大肠杆菌中是否表达有毒的蛋白质,无需破壁、去除各种细菌成份,便于分离纯化。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang Y, Proenza R, Maffei M *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, **372**: 425 - 432
- [2] Considine R V, Caro J F. Leptin: genes, concepts and clinical perspective. *Hormone Res*, 1996, **46**: 249 - 256
- [3] Schubring C, Blum W F, Kratzsch J *et al.* Leptin, the *ob* gene product, in female health and disease. *Eur J Obst Gyn Reprod Biol*, 2000, **88**: 121 - 127

- ceming the role of leptin in reproduction. *Mol Cell Endocrinol* ,1999 , **157** : 11 – 12
- [5] Prolo P ,Wong M L , Licinio J. Leptin. *The Intl J Biochem Cell Biol* , 1998 , **30** : 1285 – 1290
- [6] Chehab F F. Leptin as a regulation for adipose mass and reproduction. *Trends in Pharmacol Sci* , 2000 , **21** : 309 – 314
- [7] Stanley M ,Pierroz D D , Flier J S. Leptin ,nutrition and reproduction : timing is everything. *J Clin Endocrinol Metab* , 2000 , **85** : 1 – 7
- [8] Sambrook J ,Russell D. Molecular Cloning : A laboratory Manual . 3rd ed , New York : *Cold Spring Harbor Laboratory Press* , 2001 , Chapter 6 , Protocol 1
- [9] Considine R V , Caro J F. Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* , 1997 , **29** : 1255 – 1272
- [10] Leroy P ,Dessolin S ,Villageois P *et al* . Expression of ob gene in adipose cells regulation by insulin. *J Biol Chem* , 1996 , **271** : 2365 – 2368
- [11] Tomaszuk A ,Simpson C , Williams G. Neuropeptide Y ,the hypothalamas and the regulation of energy homeostasis. *Hormone Res* , 1996 , **46** : 53 – 58
- [12] Stephens T W ,Basinski M ,Bristow P K *et al* . The role of NPY in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* , 1995 , **377** : 530 – 532
- [13] Spitzweg C , Heufelder A E. More clues from fat mice : leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol* , 1997 , **138** : 26 – 29
- [14] Lewandowski K ,Horn R ,O 'Callaghan C J *et al* . Free leptin ,bound leptin and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* , 1999 , **84** (1) : 300 – 306
- [15] Caro J F ,Kolaczynskia J W ,Nyce M R *et al* . Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity : a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* , 1996 , **348** : 159 – 161

cDNA Cloning of Human Leptin and Its Expression

JIA Zhen-Yu^{1*} FU Xiao-Min¹ JIN Ai-Hua¹ CAO Jiang²

(¹ Zhejiang Academy of Medical Sciences ,Hangzhou 310013 ,China ;² Cancer Institute ,Zhejiang University ,Hangzhou 310009 ,China)

Abstract To clone cDNA of human leptin gene and obtain leptin protein for future study on leptin binding proteins. The cDNA of human leptin with 6 × his-tag was cloned by over-hang extension PCR protocol using human genomic DNA as template , and subcloned into *in vitro* expression vector pIVEX2.3MCS , and the fusion protein was expressed *in vitro* by Rapid Translation System (RTS)(RTS500 cycle primer Kit and RTS500 ProteoMaster of Roche company). The apparent molecular weight (19.46 kD) and the immuno-specificity of the fusion protein were confirmed by SDS-PAGE and Western blot , and the expressed fusion protein stayed mainly in the supernatant of the reaction mixture in soluble form. This work provides us solid basis for further study on new leptin-associated proteins.

Key words leptin , cDNA cloning , fusion protein , *in vitro* expression

Received : 01-21-2003

This work was supported by grants from Zhejiang Natural Science Foundation (No. 301033) and Public Health Department of Zhejiang Province.

* Corresponding author. Tel : 86-571-88929214 ; E-mail : zhenyujia@yahoo.com