

# 重组高原鼠兔瘦素原核表达载体的构建、蛋白表达及纯化

邓治莲<sup>1,2</sup> 杨洁<sup>3\*</sup> 赵新全<sup>1\*</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 青藏高原生物进化与适应重点实验室, 西宁 810001)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100049) (3 河北医科大学公共卫生学院, 石家庄 050017)

**摘要:** 瘦素 (leptin) 由 *ob* 基因编码, 对调节能量代谢起着重要作用。本研究建立了高原鼠兔瘦素的原核表达系统, 并对其进行了原核表达。研究中作者从高原鼠兔瘦素基因的 cDNA 文库中, 扩增编码高原鼠兔瘦素的核酸序列, 并利用 DNA 基因重组技术将其克隆到原核表达载体 pET30a(+) 中, 构建了高原鼠兔瘦素原核表达载体 pET30a(+)/ppleptin。对目的片段进行测序确认后, 将其转化到大肠杆菌 BL21 中, 并利用 IPTG 诱导外源性目的蛋白表达。表达的包涵体蛋白经溶解及变性后上柱纯化。重组质粒经测序检测后, 表明原核载体构建正确。同时, SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示, 重组菌在 16KD 处有明显新增条带, 纯化后的目的蛋白条带纯度较高。该结果为高原鼠兔瘦素的后续基础研究提供了基础资料。

**关键词:** 高原鼠兔; 瘦素原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2009) 03-0316-05

## Construction of prokaryotic expression vector: Inducing expression and purification of recombinant plateau pika leptin

DENG Zhilian<sup>1,2</sup>, YANG Jie<sup>3\*</sup>, ZHAO Xinquan<sup>1\*</sup>

(1 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biological Adaptation and Evolution, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract:** Leptin, the production of the *ob* gene, plays an important role in the regulation of energy homeostasis. Plateau pika (*Ochotona curzoniae*) leptin is closed to cold tolerance. In this study, we establish an effective method for expression of recombinant pika leptin in *Escherichia coli*. The gene sequence encoding pika leptin was obtained by PCR from the plateau pika cDNA library and the PCR product was cloned into pET30a(+) by DNA recombination techniques. After DNA sequencing, the confirmed recombinant clone pET30a(+)/ppleptin was transformed into BL21 (DE3) for expression under the induction of IPTG. Due to the expressed protein, the insoluble inclusion body must be separated, denaturated and purified with a Ni sepharose column. The sequencing results of pET30a(+)/ppleptin vector demonstrated that the insert of the pika leptin gene was the same as that of pika gene in GeneBank. At the same time the recombinant protein was identified by SDS-PAGE, and the results revealed that there was a new band of protein around 16KD; this protein was purified successfully. Our results showed that the prokaryotic expression system of pika leptin has been successfully constructed and the purified recombinant protein provides a basis for further research of plateau pika leptin.

**Key words:** Plateau pika (*Ochotona curzoniae*); Leptin prokaryotic expression; Protein purification

自 Zhang 等 (1994) 利用定位克隆技术 (Positional Cloning Technology) 首次成功克隆小鼠的 *ob* 基因 (*obese gene*, 肥胖基因) 以来, *ob* 基因和它的表达产物瘦素 (leptin) 一直是相关领域研究

的热点。瘦素是由 *ob* 基因编码, 主要由白色脂肪细胞分泌的激素, 与分布于中枢神经和外周组织中的瘦素受体结合, 发挥多种重要的生物学功能, 如维持机体的能量平衡、促进机体的新陈代谢、调节

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700073)

作者简介: 邓治莲 (1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事动物生理生态与分子生物学研究。

收稿日期: 2009-02-11; 修回日期: 2009-05-26

\* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: xqzhao@nwipb.ac.cn; sjzyangjie@yahoo.com.cn

生殖与发育、提高动物应激能力及免疫功能, 以及参与造血等。其中 *ob* 基因最重要的功能是调节能量代谢, 从而使动物减少摄食, 增加机体能量消耗、体温及活动量, 以及减轻体重 (Zhang *et al.*, 1994; Farid *et al.*, 1996, 1997; Zamorano *et al.*, 1997; Thierry *et al.*, 1997; Lord *et al.*, 1998) 等。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是生活在青藏高原海拔 3 000 m 以上区域的小型非冬眠植食性哺乳动物, 属兔形目 (Lagomorpha) 鼠兔科 (Ochotonidae) 鼠兔属 (*Ochotona*), 主要分布于青藏高原及其毗邻的尼泊尔和锡金等地 (郑昌琳, 1989), 据古生物资料记载, 现存的各种鼠兔是由古鼠兔亚科 (Subfamily Sinolagomyinae) 演化而来, 在青藏高原的北缘发现他们的化石距今约 3 700 万年 (Heath and Williams, 1981)。在长期的环境适应过程中, 高原鼠兔形成了独特生活方式和适应机制应对青藏高原严酷的环境。近年来, 相关学者在对高原鼠兔 *ob* 基因不同组织表达特征的研究中发现, 高原鼠兔 *ob* 基因可在脑、心、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌和脂肪组织中表达, 其中以白色脂肪组织中的表达量最多, 心脏和肺的表达量次之, 而肝脏和肾脏中 mRNA 表达量最低 (杨洁等, 2007), 这种多组织的表达特征可能对维持高原鼠兔体内瘦素的高水平起到调节作用。与此同时, 一些青藏高原高寒环境对高原鼠兔瘦素的适应性功能进化研究结果显示, 瘦素对冷环境压力较为敏感, 寒冷的环境压力驱动高原鼠兔瘦素发生了适应性功能进化 (Yang *et al.*, 2008)。因此, 高原鼠兔瘦素功能的研究, 将对揭示高原鼠兔生态适应机制起到至关重要的作用。

高原鼠兔 *ob* 基因于 2006 年被克隆 (Yang *et al.*, 2006), 但国内外现今有关高原鼠兔瘦素表达的研究尚为空白。因此, 将高原鼠兔瘦素进行外源性表达, 已成为相关领域继续开展深层次研究较为迫切的基础科学问题。本文利用高原鼠兔瘦素的 cDNA, 构建高原鼠兔瘦素成熟分泌型蛋白编码基因的原核表达载体, 同时通过诱导表达并纯化该蛋白, 为进一步研究高原鼠兔瘦素的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和材料

限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶、DNA 片段纯化试剂盒和 DNA

胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒购自新长江生物科技 (北京) 有限公司; 质粒 pET30a(+) 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存; BL21 感受态购自上海生工; PCR 引物合成及基因测序由上海生工完成; HisTrap HP 蛋白纯化柱购自 GE Healthcare 公司。

### 1.2 高原鼠兔瘦素原核表达载体的构建

高原鼠兔瘦素由 167 个氨基酸组成, 其 N 端含有 21 个氨基酸组成的信号肽, 成熟分泌型蛋白质为 146 个氨基酸。作者重点关注的是瘦素 C 端 146 个氨基酸组成的成熟分泌型蛋白的功能和作用。故利用上游引物 P1 (5' - GGAATTC-CATATGGTGTCCATCTGGAAAGTCCGGGAT - 3', 下划线为限制性内切酶 *Nde* I 酶切位点) 和下游引物 P2 (5' - CCGCTCGAGGCCACCCAGGGCCAATGTCCAG - 3', 下划线为限制性内切酶 *Xho* I 酶切位点) 对编码高原鼠兔瘦素 C 端 146 个氨基酸 (成熟分泌型蛋白) 的 DNA 片段进行扩增, PCR 反应体系包括模板高原鼠兔瘦素 cDNA (0.5 mg/ml) 2  $\mu$ l, 上下游引物 P1 (10  $\mu$ M) 和 P2 (10  $\mu$ M) 各 2  $\mu$ l, 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ l, dNTP Mixture (各 2.5 mM) 4  $\mu$ l 以及 Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 34 个循环。利用 DNA 胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物。用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切 PCR 产物和质粒 pET30a(+), 回收并纯化, 16 $^{\circ}$ C 连接目的片段与载体片段过夜, 转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 重组 DH5 $\alpha$  菌进行菌液 PCR、提取质粒酶切和测序鉴定重组的表达质粒 pET30a(+)/ppleptin 是否构建成功。

### 1.3 高原鼠兔瘦素的表达与纯化

重组质粒 pET30a(+)/ppleptin 转入大肠杆菌 BL21 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 600 nm 的光密度 (optical density, OD) 值为 0.5 ~ 0.7 时, 加入诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 5 h, 4 000 r/min, 15 min 离心收集菌体, 在重悬液 (20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0) 中悬浮, 超声破碎菌体后对全菌液以及离心后的上清和沉淀分别进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

超声破碎后的菌体沉淀依次用 1 M 尿素洗涤液 (1 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100)、2 M 尿素洗涤液 (2 M

尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl, 2% Triton X - 100)、3 M 尿素洗涤液 (3 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl, 1% Triton X - 100)、4 M 尿素洗涤液 (4 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl)、5 M 尿素洗涤液 (5 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl)、6 M 尿素洗涤液 (6 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl) 各洗一遍。洗涤后沉淀用 8 M 尿素变性液 (8 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl) 溶解, 4℃ 放置过夜。溶解过夜的高原鼠兔瘦素变性液 12 000 r/min, 10 min 离心, 留上清。

pET30a (+)/ppleptin 在目的基因前带有 His 基因。含带 His 标签的高原鼠兔瘦素上清液过 His-Trap HP 蛋白纯化凝胶柱, 用预冷的 Binding buffer (8 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, 1 mM  $\beta$ -ME) 清洗以除去未结合的杂蛋白, 然后用 Wash buffer (8 M 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.5 M NaCl, 0.5 mM 咪唑, 1 mM  $\beta$ -ME) 洗脱, 收集洗脱液, SDS-PAGE 鉴定纯化效果。

## 2 结果

### 2.1 高原鼠兔瘦素原核表达载体的构建

以高原鼠兔瘦素 cDNA 为模板, PCR 扩增编码高原鼠兔瘦素 C 端 146 个氨基酸的 DNA 片段, 电泳分析 (图 1A) 显示在 400 ~ 500 bp 之间有一特异 DNA 带, 大小与预计相符。将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pET30a (+) 载体上, 得到重组表达质粒 pET30a (+)/ppleptin。重组表达质粒用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 可得到约 450 bp 和 5 200 bp 的两个片段, 与预期结果一致; 以重组表达质粒为模板, 用 PCR 方法进行扩增, 可得到约 450 bp 大小的核酸片段, 表明目的基因已经克隆到 pET30a (+) 载体中 (图 1B)。经 DNA 测序证实, 连入表达载体 pET30a (+) 中的基因片段与目的序列一致。

### 2.2 高原鼠兔瘦素的表达和纯化

pET30a (+)/ppleptin 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株后, 转化菌经 IPTG 诱导表达, 收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。如图 2, 诱导后的菌液在分子量 14.3 ~ 20.1 KD 之间有 1 条新增条带, 与预计的重组蛋白 (约 16 KD 的高原鼠兔瘦素) 大小吻合。

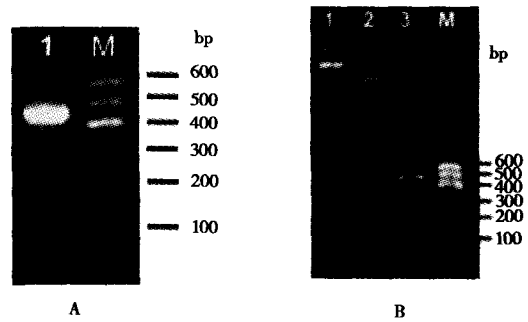


图 1 高原鼠兔瘦素编码基因的 PCR 产物和 pET30a (+)/ppleptin 的重组鉴定. A) M: DNA 分子量标准; 1: PCR 产物; B) M: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 pET30a (+)/ppleptin; 2: *Nde* I 和 *Xho* I 酶切 pET30a (+)/ppleptin; 3: 菌液 PCR

Fig. 1 PCR product for gene sequence encoding plateau pika leptin and analysis of pET30a (+)/ppleptin. A) M: DNA marker; 1: PCR product. B) M: DNA marker; 1: Recombined plasmids of pET30a (+)/ppleptin; 2: pET30a (+)/ppleptin digested with *Nde* I plus *Xho* I; 3: Bacteria liquid PCR

将诱导表达的菌体进行超声破碎, 取其全菌液、上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 发现目的蛋白只在全菌液和沉淀中出现 (图 3), 表明表达的高原鼠兔瘦素以包涵体形式存在。包涵体进行逐步洗涤和变性溶解后, 用 His Trap HP 蛋白纯化柱纯化目的蛋白, SDS-PAGE 鉴定结果显示, 除 16 KD 处有一条目的条带外, 无杂带存在 (图 3), 表明获得的高原鼠兔瘦素纯度高。

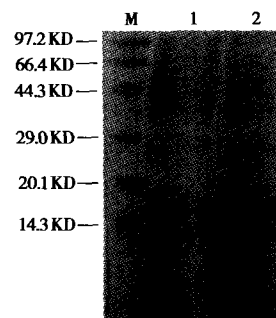


图 2 高原鼠兔瘦素在大肠杆菌中的表达. M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前的 pET30a (+)/ppleptin 菌全菌液蛋白; 2: 诱导后的 pET30a (+)/ppleptin 菌全菌液蛋白

Fig. 2 Expression of plateau pika leptin in *E. coli*. M: Protein molecular weight marker; 1: Total protein of non-induced bacteria containing pET30a (+)/ppleptin; 2: Total protein of induced bacteria containing pET30a (+)/ppleptin

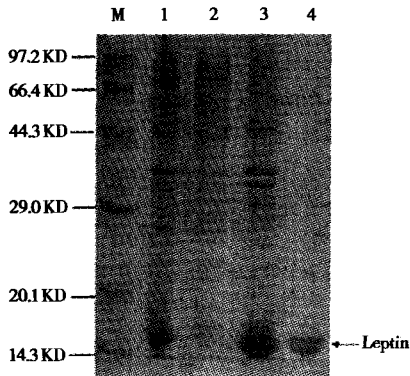


图3 高原鼠兔瘦素的纯化. M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导的 pET30a(+)/pplleptin 菌全菌液蛋白; 2: 诱导的 pET30a(+)/pplleptin 菌菌液上清蛋白; 3: 诱导的 pET30a(+)/pplleptin 菌菌液沉淀蛋白; 4: 纯化后的 pET30a(+)/pplleptin 菌蛋白

Fig. 3 Purification of plateau pika leptin. M: protein molecular weight marker; 1: Total proteins of induced bacteria containing pET30a(+)/pplleptin; 2: Supernatant protein of induced bacteria containing pET30a(+)/pplleptin; 3: Deposit protein of induced bacteria containing pET30a(+)/pplleptin; 4: Purified protein of induced bacteria containing pET30a(+)/pplleptin

### 3 讨论

为了探讨高原鼠兔对青藏高原低温环境适应的分子机理, Yang 等 (2006) 克隆了高原鼠兔 *ob* 基因的全长 cDNA 序列: 高原鼠兔 *ob* 基因 cDNA 序列全长 3 015 bp, 编码区由 504 bp 组成, 位于 66 ~ 569 bp 之间。将高原鼠兔 *ob* 基因编码区与其他物种进行比对, 发现高原鼠兔 *ob* 基因编码区核苷酸序列与猪、狗、牛、猫、人、鼠同源性分别为 83%、82%、81%、81%、81% 和 79%, 推导出的氨基酸序列同源性达 70% ~ 72%。同时发现高原鼠兔瘦素中有 20 个变异位点为高原鼠兔所特有 (Yang *et al.*, 2006)。采用 real time PCR 方法检测高原鼠兔 *ob* 基因 mRNA 在不同组织以及不同海拔下的表达特征发现, 高原鼠兔 *ob* 基因不仅可以在多种组织中表达, 而且随着海拔的增加, 高原鼠兔体内 *ob* 基因的表达量增加, 这提示 *ob* 基因可能是不同海拔下高原鼠兔体内能量代谢调节的一个重要分子 (杨洁等, 2007)。而鼠兔家族 *ob* 基因进化分析的结果, 也表明高原鼠兔瘦素的特异性与寒冷的环境压力之间有着密切的联系 (Yang *et al.*, 2008)。鉴于高原鼠兔生存环境的特殊性及其显著的高能量代谢水平、瘦素在能量代谢调节中的关键作用、以及所揭示的高原鼠兔瘦素的 cDNA 的序列

特征, 启发我们有了如下假设: 高原鼠兔瘦素是否在能量代谢方面较其他脊椎动物瘦素有更显著的作用? 这一问题的探讨, 以获得高原鼠兔瘦素为前提。由于高原鼠兔体内瘦素量极少, 且容易降解, 从动物体内获得的方法不可取, 因此要研究高原鼠兔瘦素功能只有对其进行体外重组表达。本研究对高原鼠兔瘦素进行原核表达, 是其功能研究的一项基础工作。

本研究在构建高原鼠兔瘦素原核表达载体过程中, 由于 *Nde* I 和 *Xho* I 切出的突出末端比一般的突出末端连接效率低, 所以载体与目的片段不易连接上, 需要把握酶切和连接的时间。本研究载体质粒和 PCR 扩增产物 37℃ 双酶切时间控制在 3 h 左右, 16℃ 连接过夜, 有效地解决了此问题。高原鼠兔瘦素原核表达系统在 1 mM IPTG 浓度下 37℃ 诱导表达的目的蛋白均以包涵体形式存在。研究中为了尽可能获得可溶性目的蛋白, 我们曾尝试过多种方法, 如在 37℃ 条件下, 分别用 0.1 mM、2 mM 浓度的 IPTG 诱导 5 ~ 7 h, 表达的目的蛋白均以包涵体形式存在; 25℃ 条件下, 分别在 0.1 mM IPTG、1 mM IPTG、2 mM IPTG 浓度下低温诱导 18 ~ 24 h, 也未见可溶性表达蛋白存在。以上结果表明, 原核表达的高原鼠兔瘦素极不易形成可溶性表达蛋白, 目的蛋白均以包涵体形式存在。为此, 通过参考其他文献并结合我们的实际经验, 作者发现包涵体进行超声波破碎时, 采用超声 5 s, 间歇 5 s 的频率进行 35 ~ 40 min 可获得最佳破碎效果。此外, 在变性蛋白上柱纯化进行洗脱时, 收集第二至第四个柱体积即可回收 98% 的目的蛋白, 获得较高浓度的目的蛋白。这些实验细节为我们高效获得大量高纯度目的蛋白提供了前提。

本研究重组表达并获得了高纯度的高原鼠兔瘦素, 使高原鼠兔低温耐受因子的研究又向前推进了一步。但现阶段获得的是无活性的变性蛋白, 我们将进一步对纯化的高原鼠兔瘦素进行复性, 以获得有活性的目的蛋白, 为高原鼠兔瘦素功能的研究奠定基础, 为高原鼠兔对青藏高原极端环境压力生态适应机制的深层次探讨做准备。

致谢: 河北省石家庄市疾病预防控制中心和河北医科大学公共卫生学院在本研究过程中提供极大的帮助, 青海大学农牧学院祁得林老师和中国科学院西北高原生物研究所部分老师和同学对论文初稿修改提供宝贵建议, 特此一并致谢。

## 参考文献:

- Farid F, Chehab F F, Mary E L, Ronghua L. 1996. Corection of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, **12** (3): 318-320.
- Farid F C, Khalid M, Ronghua L, Mary E L. 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, **275** (5296): 88-90.
- Heath D, Williams D R. 1981. Fertility and pregnancy. In: *Man at High Altitude*, 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 269-281.
- Lord G M, Matarese G, Howard J K, Baker R, Bloom S R, Lechler R. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, **394** (6696): 897-901.
- Thierry T, Francesca G, Sundeep K, Michael D J, Bartolome B, Lawrence R. 1997. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit diferentlation to adipocytes. *Endocrinology*, **140** (4): 1630-1638.
- Yang J, Zhao X Q, Guo S C, Li H G, Qi D L, Wang D P, Cao J H. 2006. Leptin cDNA cloning and its mRNA expression in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) from different altitudes on Qinghai-Tibet Plateau. *Biochem Biophys Res Commun*, **345** (4): 1405-1413.
- Yang J, Zhao X Q, Guo S C, Li H G, Qi D L, Wang D P, Cao J H. 2007. The tissue character of *ob* mRNA in plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Theriol Sin*, **27** (1): 33-38. (in Chinese)
- Yang J, Wang Z L, Zhao X Q, Wang D P, Qi D L, Xu B H, Ren Y H, Tian H F. 2008. Natural selection and adaptive evolution of leptin in the *Ochotona* family driven by the cold environmental stress. *PLoS One*, **3** (1): e1472.
- Zamorano P L, Mahesh V B, De Sevilla L M, Chorich L P, Bhat G K, Brann D W. 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissue of the rat. *Neuroendocrinology*, **65** (3): 223-228.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372** (6505): 425-432.
- Zheng C L, Cai G Q, Liao Y F. 1989. Economic Fauna of Qinghai. In: Li D H ed. *Mammalia*. Xining: Qinghai People's Press, 659-728. (in Chinese)
- 杨洁, 赵新全, 郭松长, 李红阁, 祁得林, 王德鹏, 曹俊虎. 2007. 高原鼠兔 *ob* 基因的组织表达特征. *兽类学报*, **27** (1): 33-38.
- 郑昌琳, 蔡桂全, 廖炎发. 1989. 青海动物志. 哺乳纲. 见: 李德浩主编. 西宁: 青海人民出版社, 659-728.