

藏猪 *obese* 基因编码序列合成 及 *obese* 基因的原核表达

姚娜¹, 马月辉^{1*}, 叶绍辉², 卢亚洲¹, 赵倩君¹, 乔海云¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 基于对人类肥胖病的研究, 推测肥胖基因可能是影响家畜脂肪沉积的一个重要候选基因。研究以藏猪为实验材料, 利用重叠延伸 PCR 方法合成藏猪肥胖基因的 CDS 序列, 并通过构建原核表达系统实现其高效表达。结果表明: 用重叠延伸 PCR 方法获得 504 bp 肥胖基因 CDS 全长序列; SDS-PAGE 检测显示, 在 0.075 mmol/L IPTG 诱导 5 h 时, 瘦素蛋白 Leptin 表达最为高效。藏猪肥胖基因的高效表达研究, 对提高我国地方猪种瘦肉率具有重要的实践意义。

关键词: 肥胖基因; 重叠延伸 PCR; 原核表达; 藏猪

中图分类号: S828.2

文献标识码: B

文章编号: 0258-7033(2011)15-0013-03

肥胖基因 (*obese* 基因, *ob*) 是编码瘦素蛋白 (Leptin) 的基因, 1954 年在小鼠的脂肪组织中首次发现。Leptin 蛋白是调节体内脂肪含量和体重的重要信号因子, 是影响家畜脂肪沉积的一个重要候选基因。它是由脂肪细胞合成分泌, 从血液进入大脑, 与位于下丘脑原生质膜上的 Leptin 受体 (OBR) 结合, 使下丘脑弓状核合成的神经肽 Y (NPY) 减少, 从而产生饱食感, 使进食减少, 能量消耗增加, 在对体脂、体重状况方面起着重要作用, 并与人类肥胖病、糖尿病、心脏病等疾病有关^[1]。藏猪是我国珍贵的高原瘦肉型猪种, 具有皮薄、胴体瘦肉率高、肌肉纤维细、肉质细嫩、适口性极好等特点。

由于新鲜的藏猪样本的采集和保存存在一定难度, 且脂肪组织的 RNA 又不易获得, 而重叠延伸 PCR (OE-PCR) 方法可以解决模板来源困难的问题。OE-PCR 方法是以 DNA 为模板, 通过设计具有部分互补序列的引物, 把 2 个目的片段拼接起来的一种 PCR 方法。OE-PCR 可用于基因全长编码序列的合成、融合基因和基因突变体的创建、竞争引物的扩增、基因克隆、基因突变等一系列基因工程操作^[2-3]。本研究利用 OE-PCR 方法获得藏猪 *ob* 基因的编码序列 (CDS), 使其在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达获得 Leptin 蛋白, 并优化其在原核中高效表达的条件, 为进一步研究藏猪 Leptin 蛋白的性质提供实

验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 (*Bam*H I、*Hind* III)、T4 DNA 连接酶、溶菌酶 (TaKaRa), pfuDNA 聚合酶 (北京汇天东方科技有限公司); 十二烷基硫酸钠 (SDS)、葡萄糖 (北京化工厂), 琼脂糖 (GENETECH)、丙烯酰胺、二甲基甲酰胺 (北京鼎国生物技术发展中心), 琼脂粉、胰蛋白胨、酵母提取物 (OXOID), IPTG、PMSF (TaKaRa) 等。

1.2 菌株与质粒 克隆载体 pMD-18T (TaKaRa)、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (TIANGEN)、表达载体 pET32a (+) (Novagen)、BL21 (DE3) 感受态细胞 (Promega)。

1.3 引物 根据 GenBank 公布的野猪 *ob* 基因序列设计引物 (登录号: U66254)。OP-1-F (5'-ATGGATC CATG CGCTGTGGACCCCTGT-3') 和 OP-1-R (5'-A GACAGACTGCATGTGTGAAATGTCAGTCTGTCTC CTCCAAACA-3') 和 OP-2-F (5'-GACATTTACACATGCAGTCTGTCTC CTCCAAACA-3') 和 OP-2-R (5'-ATAAGCTTTTCAGCA GCCAGGGCT-3') 能扩增出加有互补末端的外显子 2 和外显子 3, 其中 OP-1-R 和 OP-2-F 的部分序列互补。OP-1-F 和 OP-2-R 下划线标注序列分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 的酶切位点。引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

1.4 基因组 DNA 的提取 藏猪耳缘组织样由西藏农牧学院提供, 并置于 75% 的乙醇中, -80 $^{\circ}$ C 保存。用酚氯仿 - 异戊醇法提取基因组 DNA^[4]。用紫外分光光度计 (Nano Drop ND-100) 检测其浓度, 并稀释

收稿日期: 2009-11-25; 修回日期: 2011-03-24

资助项目: “十一五”科技支撑计划 (2006BAD13B08)

作者简介: 姚娜 (1982-), 女, 硕士研究生

* 通讯作者

至 50 ng/μL 作为工作液。

1.5 OE-PCR 方法扩增 *ob* 基因编码区及克隆测序
ob 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 外显子 1 是 *ob* 基因的启动子序列, 成熟蛋白的编码序列位于第 2(144 bp) 和第 3 外显子(360 bp), 共 504 个核苷酸长度; 第 1 个内含子大小为 10.6 kb, 第 2 个内含子大小为 2.3 kb, 转录起始位点在起始密码子上游 54-57 碱基处。其表达产物(Leptin 蛋白)分子量为 18.764 ku, 由 167 个氨基酸编码, 前 21 个氨基酸残基为信号肽序列^[5]。*ob* 基因的结构及引物的 OP-1-R 和 OP-2-F 序列如图 1。

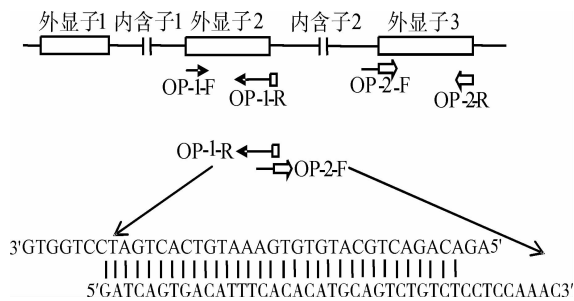


图 1 *ob* 基因结构及引物 OP-1-R 和 OP-2-F 序列

10 μL 反应体系中含 60 ng 模板 DNA, 1 μL 10× PCR Buffer, 0.8 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 0.4 μL 引物(F/R), 0.24 μL DNA 酶(2.5 U/μL)。PCR 扩增条件: 95℃预变性 4 min; 95℃变性 30 s, 66.6℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 25 个循环; 72℃延伸 10 min。首先, 以藏猪基因组 DNA 为模板, 用引物 OP-1-F 和 OP-1-R, pfu DNA 聚合酶扩增第 2 外显子(不包含 5' 非翻译区, 包含保护碱基和 *BamH* I 位点的 8 个碱基、第 3 外显子 5' 端 10 个碱基的反向互补序列的 10 个碱基, 144 bp), 之后用引物 OP-2-F 和 OP-2-R, pfu DNA 聚合酶扩增第 3 外显子(不包含 3' 非翻译区, 包含保护碱基和 *Hind* III 位点的 8 个碱基、第 2 外显子 3' 端 10 个碱基的反向互补序列的 15 个碱基, 360 bp)。最后以第 2 外显子和第 3 外显子同时作为模板, 用引物 OP-1-F 和 OP-2-R、TaqDNA 聚合酶扩增包括 *ob* 基因编码区和 *BamH* I、*Hind* III 酶切位点的片段, 即 OE-PCR 产物。将该 OE-PCR 产物与 pMD18-T 载体体外连接得到 pMD-ob 重组质粒。测序后, 与 GenBank 中野猪(U66254) *ob* 基因 CDS 序列比对验证其是否正确。

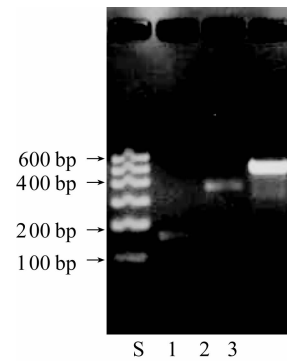
1.6 Leptin 蛋白在 *E. coli* 中的高效表达 将载有藏猪 *ob* 基因 CDS 序列的 pMD-ob 重组质粒及表达载体 pET32a(+) 质粒经 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切后,

回收 *ob* 基因片段以及表达载体大片段, 将两者 22℃ 连接后转化 DH5α 感受态细胞。菌液 PCR 初步鉴定正确后, 提取重组质粒 pET-ob。经测序鉴定正确后, 将重组质粒 pET-ob 转入感受态细胞 BL21(DE3) 中。挑取阳性克隆于 LB(Amp+) 液体培养基中, 37℃ 震荡培养过夜。按 1% 的接种量将菌液转接至 50 mL LB 培养基中, 培养至菌液饱和(OD₆₀₀=0.6) 时, 加入灭菌的终浓度分别为 0.01、0.05、0.075、0.10、0.25、0.50、1.00、1.25、1.50 mmol/L IPTG, 37℃ 震荡连续培养 8 h。每隔 1 h 收集菌液, 加入 SDS 蛋白上样缓冲液混匀后煮沸 10 min, 离心取上清 10 μL 进行 SDS-PAGE 检测。以 BL21(DE3) 的总蛋白, 被诱导的空载 pET32a(+), 未被诱导的 pET-ob 重组质粒在 BL21(DE3) 中表达的蛋白为对照组, 比较不同培养时间、IPTG 浓度下 Leptin 蛋白的表达量。

1.7 蛋白的表达部位 将 50 mL 菌体悬浮于 30 mL PBS 液中, 反复冻融 3 次裂解菌体; 每克菌体加入 16 μL 50 mg/mL 的溶菌酶及 4 μL 100 mmol/L PMSF(蛋白酶抑制剂) 混匀; 4℃ 放置 30 min 后超声波破碎菌体, 离心后分别收集上清和沉淀(沉淀主要为包涵体) 进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果

2.1 OE-PCR 扩增 *ob* 基因 CDS 区 将 *ob* 基因第 2 和第 3 外显子(不包括非翻译区) 分别扩增出来, 然后利用引物 OP-1-R 和 OP-2-F 重叠的部分, 使 2 个外显子重叠组合在一起, 从而跨过中间的内含子, 最后得到 *ob* 基因的 CDS 区。将重组质粒 pMD-ob 测序后, 发现 OE-PCR 扩增产物与已公布 mRNA 的序列一致。1.5% 的琼脂糖凝胶检测扩增结果如图 2。



注: S 为 Marker I; 1 为第 2 外显子扩增产物, 162 bp; 2 为第 3 外显子扩增产物, 383 bp; 3 为 1 与 2 的 OE-PCR 产物, 520 bp

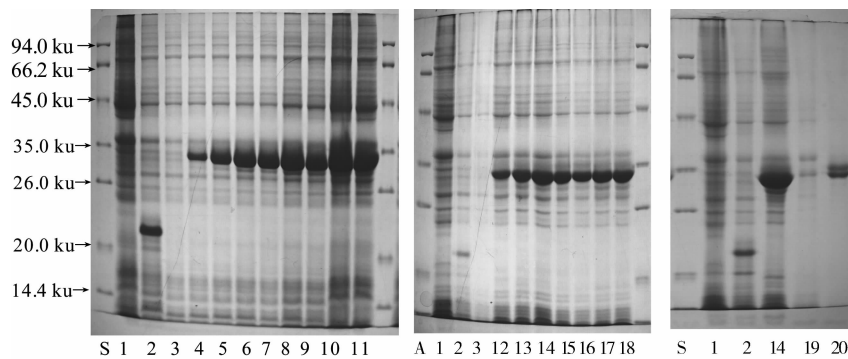
图 2 OE-PCR 合成 *ob* 基因编码区检测结果

2.2 *ob* 基因在大肠杆菌中的表达 经 SDS-PAGE 检测,5 h 时在终浓度 0.075 mmol/L IPTG 诱导下, Leptin 蛋白表达量最高,且该融合蛋白主要在细胞内表达,少部分在细胞外表达(图 3)。

3 讨论

获得基因编码序列的方法很多,包括 PCR、RT-PCR 和 cDNA 文库筛选等。对一些较难获得 mRNA、表达量较低的优良基因、用常规的 RT-PCR 方法不易获得全基因编码序列和物种相近的基因序列来说,可以通过设计搭桥引物,自然而然地将 2 个目的序列拼接在一起,即 OE-PCR 方法。这种方法不但避免了不必要的酶切和连接,且对拼接位点及附近序列没有特殊要求,拼接部位可以根据需要是任意位点。Isse 等^[6]利用荧光原位杂交方法将人 *ob* 基

因定位在 7 号染色体上,并应用 OE-PCR 技术获得了该基因的 cDNA 序列。昔奋攻等^[7]利用 PCR 方法扩增去除信号肽的人肥胖基因 cDNA 序列,并在 *E. coli* BL21(DE3)中表达出有生物学活性的 Leptin 重组蛋白,经纯化注射小白鼠,小白鼠体重明显下降。贾振宇等^[8]以人基因组 DNA 为模板,用 OE-PCR 法,克隆与 6 个组氨酸(6×His)密码子相连的人 *ob* 基因的 cDNA。Dong 等^[9]利用 OE-PCR 方法成功扩增出 1.0~1.5 kb 的 *Mnp*、*Lac* 和 *Cip* 1 基因。本研究采用 OE-PCR 方法在获得藏猪基因组 DNA 基础上,通过设计基因的各个编码区引物,并使引物 OP-1-R 和 OP-2-F 有 32 bp 碱基的重叠,最后顺序拼接 *ob* 基因的全部编码区,并经克隆测序证明了直接以基因组 DNA 为模板克隆并表达 Leptin 蛋白是可行的。



注:S 为蛋白分子量标准;A、B、C 图中的 1 为 BL21(DE3)的总蛋白;2 为在诱导条件下,空载 pET32a(+)在 BL21(DE3)中的表达的蛋白;3 为未诱导时,重组质粒 pET-ob 在 BL21(DE3)中表达的蛋白;A 图中 4~11 为 0.075 mmol/L IPTG 诱导下,1~8 h 时 Leptin 蛋白在 BL21(DE3)中的表达;B 图中 12~18 为诱导 5 h 后,浓度分别为 0.01、0.05、0.075、0.10、0.25、0.50、1.00、1.25、1.50 mmol/L IPTG 诱导下 Leptin 蛋白在 BL21(DE3)中的表达;C 图中 19 为胞内表达蛋白,20 为包涵体中蛋白的检测结果

图 3 Leptin 蛋白在 BL21(DE3)中高效表达

贾振宇等^[8]采用蛋白质体外快速翻译表达系统在体外表达了带有 6×His 的 Leptin 融合蛋白。但是不同培养时间和诱导剂浓度对 Leptin 蛋白的表达量都有影响,本研究经 SDS-PAGE 检测优化了藏猪 Leptin 在原核中高效表达的条件。结果显示,在长时间(7、8 h)和高浓度诱导剂(1.25、1.50 mmol/L)诱导培养时,Leptin 蛋白的表达量相对较高,但是大肠杆菌的代谢副产物也相应增多,出于生产实践的考虑,5 h 时终浓度 0.075 mmol/L IPTG 诱导条件最适宜。这个结论可以为利用生物反应器大量高效的生产 Leptin 蛋白提供基础数据。本研究获得的融合蛋白主要在大肠杆菌细胞中表达,少量在胞外表达。若想进一步获得有生物活性的蛋白,则需经过变性溶

解后,在适当条件下复性形成天然的构象^[12]。

基于目前获得的实验结果,还需对藏猪 Leptin 蛋白活性及理化性质进行进一步研究,这不仅对改善猪肉品质、提高瘦肉率具有重要意义,而且也可对人类肥胖病、糖尿病、心脏病等疾病的预防、控制、治疗研究工作奠定基础、开拓新思路。

参考文献:

- [1] Farooqi I S, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89(3): 980-984.
- [2] Xiao Y H, Yin M H, Hou L, et al. Asymmetric overlap extension PCR method bypassing intermediate purification and the amplification of wild-type template in site-directed mutagenesis [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(6): 925-930.
- [3] Cha-aim K, Fukunaga T, Hoshida H, et al. Reliable fusion PCR

延边黄牛 *CAST* 基因 16 内含子基因多态性与肉质性状相关性分析

张立春¹, 李赵志², 金鑫², 任春宇², 曹阳¹, 周国利³, 金海国^{1*}

(1. 吉林省农业科学院畜牧分院, 吉林公主岭 136100; 2. 延边大学农学院, 吉林龙井 133002;

3. 聊城大学生命科学学院, 山东聊城 252059)

摘要: 钙蛋白酶抑制蛋白(*CAST*)基因多态性主要与肉品嫩度相关, 与其他肉质性状相关的报道较少。研究采用 PCR-SSCP 方法对 321 头延边黄牛 *CAST* 基因 16 内含子进行 SNPs 多态性检测, 并对该座位基因型多态性与肉质性状进行差异显著性分析。结果表明: 延边黄牛该座位具有高多态性; 该位点基因型多态性与蒸煮损失、亚麻酸含量及肉色等多种肉质性状相关; 该位点与肉品多时间点亮度、红色度、黄色度、彩色度及彩色角都存在相关性, 但未表现出普遍规律。研究证明, 牛中 *CAST* 基因与除肉质嫩度外其他肉质性状存在相关性。

关键词: 肉质性状; *CAST*; PCR-SSCP; 延边黄牛

中图分类号: S823.2

文献标识码: B

文章编号: 0258-7033(2010)15-0016-04

钙蛋白酶抑制蛋白(*CAST*)是在细胞内广泛表达的、高效的、专一性的抑制钙蛋白酶活性的蛋白质, 是钙蛋白酶系统中的主要成员。它可以识别钙离子激活后钙蛋白酶所引起的构象变化, 并与之特异性结合, 从而抑制钙蛋白酶活性^[1]。这种特异性结合为钙离子依赖, 当钙离子流失时会自动分离。钙蛋白酶在宰后肉类嫩化过程中起重要作用^[2]。当屠宰后肌肉中钙蛋白酶抑制蛋白活性增加时将显著抑制肌肉蛋白质降解, 因此钙蛋白酶抑制蛋白活性高时可能抑制宰后嫩化过程。Delgado 等^[3]研究表明, 牛、羊宰后其肉嫩化同宰后钙蛋白酶抑制蛋白降解率有关。有关 *CAST* 基因的研究主要集中于其与肉质嫩度相关性方面, 目

前已有报道显示 *CAST* 基因同样与除肉质嫩度以外的肉质性状相关^[4], 说明 *CAST* 基因同样有潜力成为除肉质嫩度外其他肉质性状的候选基因。

延边黄牛作为我国五大地方优良役肉兼用型品种, 具有抗寒耐粗饲、适应性强等优良特性。其肉质具有鲜嫩多汁, 风味优良及营养丰富等特点, 有潜力培育成为我国自主知识产权的高档肉牛新品种。本实验以延边黄牛为研究对象, 设计基因特定区段特异性引物, 采用 PCR-SSCP 方法检测延边黄牛中 *CAST* 基因特定位点的多态性, 并通过与肉质性状数据, 尤其是除嫩度外的肉质性状数据进行差异显著性分析, 探讨延边黄牛中 *CAST* 基因多态性与生产性状的关系。

1 材料与方法

1.1 实验牛群 321 头延边黄牛均来自吉林省延边自治州。饲养及屠宰实验分 3 年进行, 样品采集、肉质性状检测方法详见文献^[5]。

收稿日期: 2010-08-26; 修回日期: 2011-01-14

资助项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA101010); 国家“十一五”科技支撑项目(2008BADB2B01); 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21101)

作者简介: 张立春(1977-), 男, 博士, 黑龙江九三人

* 通讯作者

mediated by GC-rich overlap sequences [J]. *Gene*, 2009, 434(1-2): 43-49.

[4] 萨姆布鲁克, 拉塞尔著, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 463-485.

[5] Bidwell C A, Ji S Q, Frank G R, *et al.* Cloning and expression of the porcine obese gene [J]. *Anim Biotechnol*, 1997, 8(2): 191-206.

[6] Isse N, Ogawa Y, Tamura N, *et al.* Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(46): 27728-27733.

[7] 昔奋攻, 李宁, 吴常信. 人肥胖基因在大肠杆菌中的表达[J]. 高技术通讯, 2005, 15(4): 63-66.

[8] 贾振宇, 伏晓敏, 金爱华, 等. 人 *Leptin* 基因的 cDNA 的克隆和表达[J]. 浙江省医学科学院学报, 2005, (61): 103-107.

[9] Dong B, Mao R, Li B, *et al.* An improved method of gene synthesis based on DNA works software and overlap extension PCR [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 37(3): 195-200.

[10] 李军, 刘美杰, 李勇, 等. 重组蛋白包涵体的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13552-13554.