

大口鲶 *ob* 基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

聂芬¹ 戴汉川² 龙良启² 石小涛^{1,4} 罗晓松^{2,3} 邹世平³

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学动物科学与动物医学学院, 武汉 430070;

3. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000; 4. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

CLONING AND EXPRESSION OF *SILURUS. MERIDIUNLIS OBESE* GENE IN *PICHLA. PASTORIS*

NIE Fen¹, DAI Han-Chuan², LONG Liang-Qi², SHI Xiao-Tao^{1,4}, LUO Xiao-Song^{2,3} and ZOU Shi-Ping³

(1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

2. College of Animal Science & Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

3. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000;

4. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062)

关键词: 大口鲶; *ob* 基因; 毕赤酵母; 克隆; 表达

Key words: *Silurus meridunlis*; *Obese* gene; *Pichia pastoris*; Cloning; Expression

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)01-0112-04

1994年Zhang等人利用定位克隆技术首次成功地克隆出小鼠肥胖基因(*obese* gene, *ob* 基因)及人类同源序列后^[1], 其他动物如鸡、鸭、猪等的肥胖基因结构和部分功能相继得到了报道, 但关于鱼类 *ob* 基因的结构和功能研究报道较少。

ob 基因编码产物为瘦素(Leptin), 瘦素主要由白色脂肪组织分泌, 其他组织如胎盘、乳腺上皮细胞中均可检测到。瘦素由166—167个AA残基组成, N端为20—21个AA残基的信号肽, 成熟蛋白为切去信号肽后的146个AA残基, 分子量为16 kD^[2,3], 它通过作用于下丘脑特异性受体发挥其生物学活性。研究发现, 瘦素对动物脂肪组织和神经内分泌有显著的调控作用, 能通过采食量和能量平衡的调节来促进动物的生长和繁殖, 是反映体内脂肪组成及含量的信号因子^[4]。瘦素的发现为体内能量代谢和脂肪沉积机理的研究开辟了新的领域。

我国是一个水产品养殖大国, 鱼类品种繁多, 不同品种

大型经济鱼类, 对大口鲶 *ob* 基因及表达产物的研究可能有利于探索鱼体内营养状况、能量代谢和脂肪沉积的关系, 这对研究新的营养分配、提高鱼肉品质及保护鱼类健康具有重要应用价值。本文首次扩增出大口鲶 *ob* 基因的 cDNA 编码序列, 并将此基因定向克隆至酵母分泌型表达载体 pPIC9K 的 α 因子信号肽编码序列 3' 端, 实现了大口鲶 *ob* 基因在毕赤酵母中的表达。

1 材料和方法

1.1 实验材料 *E. coli* DH5 α 、GS115 酵母菌和 pPIC9K 分泌型表达载体由本实验室保存。RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、DNA 分子量 marker 均购自 TaKaRa 公司; G418 和 Peptone 购自 Sigma 公司; Yeast extract、YNB、D-Sorbitol 和 D-Biotin 购自上海生工生物工程公司; DNA 快速回收试剂盒购自鼎国生物技术有限责任公司; 低分子量标准蛋白质 Marker 为上海升正生物技术有限公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。培养基 YPD、MD、

收稿日期: 2006-02-16 修订日期: 2006-10-20

基金项目: 湖北省自然科学基金(2000J104)资助

作者简介: 聂芬(1982—), 女, 汉, 湖北天门人; 硕士; 主要从事动物生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: niefennf@yeah.net

通讯作者: 龙良启, E-mail: wulong491024@mail.hzau.edu.cn

MM、BMGY 和 BMMY 均按“Invitrogen 公司操作手册”推荐方法配制。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计 根据已报道的人、鼠、猪、鲤鱼等动物 *ob* 基因 cDNA 编码序列的同源性以及酵母表达载体上的酶切位点设计一对引物,在 5' 端和 3' 端分别设计了 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切位点,并且在酶切位点前面均加了二个保护碱基。引物为:

P1: 5'-AGGAATTCATGCTGCCTATCCAGAAAGTC-3' GAATTC 为 *Eco*RI 酶切位点。

P2: 5'-CGGCGGCGCTCAGCATTACGGCTAACAT-3' GCGGCCGC 为 *Not*I 酶切位点。

1.2.2 RT-PCR 扩增 用大口鲶脂肪组织总 RNA 为模板,以设计的 P1、P2 为上下游引物进行一步法 RT-PCR 扩增,总体积为 25 μ L,具体方法参考文献[5]。RT-PCR 产物在 1% 的琼脂糖上电泳分析并观察结果。

1.2.3 大口鲶 *ob* 基因的克隆与质粒鉴定 DNA 回收试剂盒回收目的片段, *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切后与同样处理的 pPIC9K 分泌型表达载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接。转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,用碱裂解法抽提重组质粒,质粒命名为 pPIC9K-dob。用 PCR 及双酶切进行初步鉴定,阳性克隆送上海博亚生物工程有限公司进行测序。

1.2.4 酵母转化 挑取 GS115 单菌落至 50mL YPD 培养基中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀=1.0。收集细胞,以 25mL 无菌蒸馏水冲洗,室温下 3000r/min 离心 10min,弃水,1mL 1mol/L LiCl 重悬细胞,转入 1.5mL 微量离心管中,高速离心 15s 后收集细胞,再以 400 μ L 0.1mol/L LiCl 重悬细胞,离心,去 LiCl。依次加入下列试剂:240 μ L 50% PEG,36 μ L 1mol/L LiCl,25 μ L 2mg/mL ssDNA,50 μ L 0.2mg/mL *Sal*I 酶切线性化质粒。振荡混匀,30 $^{\circ}$ C 静置 30min,然后在 42 $^{\circ}$ C 水浴 23min,6000r/min 离心,吸去转化液,用 1mL 无菌蒸馏水重悬细胞,将 200 μ L 转化细胞悬液涂布于 RDB 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养直至出现转化子菌落。

1.2.5 酵母菌落 PCR 鉴定 挑单菌落于 2mL YPD 中,过夜培养,再取 1mL 菌液,6000r/min 离心 2min,弃上清,沉淀中加入 1mL PBS(pH7.0),充分混匀,离心弃上清,沉淀悬于 100 μ L TE(pH8.0)中,沸水浴 10min, -20 $^{\circ}$ C 20min,再次沸水浴 1min,6000r/min 离心 3min,取上清为模板作 PCR。

PCR 鉴定目的基因整合至 *P. pichia* 酵母基因组的引物:
 α -Factor: 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'
3'AOX1: 5'-GCAAAATGGCATTCTGACATCC-3'
反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.6 高拷贝整合菌株的筛选 将冻存的阳性重组菌分别划线到含 G418 浓度为 0.25mg/mL、2.0mg/mL、4.0mg/mL 的 YPD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养直至出现转化子菌落,2.0mg/mL 和 4.0mg/mL G418 YPD 平板上均正常生长的菌落为高拷贝整合菌株。

1.2.7 重组酵母的诱导表达 挑单个重组酵母菌接种于 5mL BMGY 培养基中,28 $^{\circ}$ C 培养 16—18h,使其 OD₆₀₀达到 2—6,收获酵母菌,用 BMMY 培养基稀释至 OD₆₀₀=1,28 $^{\circ}$ C 培养 4d,每隔 12h 加甲醇至终浓度为 0.5%,诱导完后离心取上清,进行 SDS-PAGE(15%凝胶),同时设整合有空载体 pPIC9K 的重组的酵母菌培养上清作对照。

2 结 果

2.1 大口鲶 *ob* 基因的获得

按照 1.2.2 方法扩增得到的产物经 1% 琼脂糖电泳显示(图 1),扩增产物的分子量大小约为 460bp,与预期值相符。

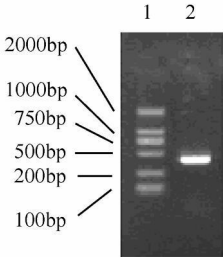


图 1 大口鲶 *ob* 基因 RT-PCR 产物琼脂糖电泳结果
Fig 1 The amplified product of *S. meridionalis ob* by RT-PCR
1 DL2000; 2 RT-PCR 产物 1. DNA molecule marker;
2 Product of RT-PCR

2.2 重组酵母表达载体的酶切鉴定

经 1% 琼脂糖电泳显示,构建的重组酵母表达载体经 *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切处理后(图 2),在 DL2000 DNA 分子标准 500bp 附近出现符合预期设计的 460bp 大小的目的片段和大于 2000bp 的载体。

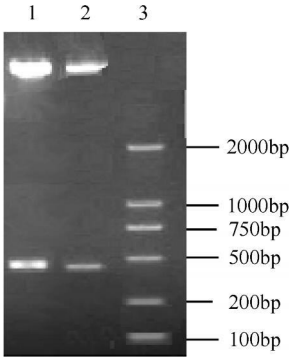


图 2 重组酵母表达载体的酶切鉴定
Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant yeast expression vector pPIC9k-dob
1. pPIC9K-dob/*Eco*RI + *Not*I; 3. DL2000 DNA molecule marker

2.3 大口鲶 *ob* 基因测序结果

将鉴定得到的阳性克隆送上海博亚生物工程有限公司进行测序。得到的核苷酸及推知的氨基酸序列(图 3)。大口鲶 *ob* 基因 cDNA 序列由 438 个核苷酸组成,与报道的鲤鱼 *ob* 基因 cDNA

序列相比具有较高的同源性, 仅有四个核苷酸的差异, 分别在第 104、105、106(均为 G 突变为 C) 位和第 300(G→A) 位。

1 GTG CCT ATC CAG AAA GTC CAG GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC AAG ACC ATT GTC
V P I Q K Y Q D D T K T L I K T I V

55 ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG CAG TCG GTA TCC GCC AAG CAG CCC GTC
T R I N D I S H T Q S V S A K Q P V

109 ACT GGC TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTT CAC CCC ATT CTG AGT TTG TCC AAG ATG
T G L D F I P G L H P I L S L S K M

163 GAC CAG ACT CTG GCA GTC TAT CAA CAG GTC CTC ACC AGC CTG CCT TCC CAA AAT
D Q T L A V Y Q Q V L T S L P S Q N

217 GTG CTG CAG ATA GCC AAT GAC CTG AAG AAT CTC CGA GAC CTC CTC CAT CTG CTG
Y L Q I A N D L K N L R D L L H L L

271 GCC TTC TCC AAG AGC TGC TCC CTG CCT CAA ACC AGT GGC CTG CAG AAG CCA GAG
A F S K S C S L P Q T S G L Q K P E

325 AGC CTG GAT GGC GTC CTG GAA GCC TCA CTC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCT TTG
S L D G V L E A S L Y S T E V V A L

379 AGC AGG CTG CAG GGC TCC CTG CAG GAC ATT CTT CAA CAG TTG GAT GTT AGC CCT
S R L Q G S L Q D I L Q Q L D Y S P

433 GAA TGC
E C

图 3 大口鲶 ob 基因序列及推知的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *S. meridunlis obese* gene

2.4 酵母菌落 PCR 鉴定

毕赤酵母 GS115 为 His 缺陷型菌株, 只有重组质粒整合入其基因组中, 表达 His 后, 菌株才能在不含 His 的选择性平板 RDB 上生长而起筛选作用。在 RDB 平板上分别挑取数株重组 GS115 酵母菌, 采用 1. 2. 3 方法处理, 然后取 1^μL 上清为模板, 在引物 α-Factor 和 3' AOX1 引导下进行 PCR 扩增, 得到的扩增产物在琼脂糖凝胶 1% 泳道中出现大小约 655 bp 的条带(图 4), 与预期结果相符, 表明大口鲶 ob 基因已整合于毕赤酵母 GS115 的染色体 DNA 中。

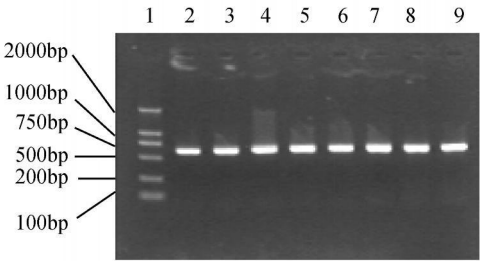


图 4 重组表达载体转化毕赤酵母 GS115 的 PCR 鉴定
Fig 4 Identification of recombinant yeast DNA by PCR
1. DL 2000; 2—9. 阳性重组酵母的 PCR 产物
1 DNA molecule marker; 2—9 PCR product of different positive recombinant yeast (pPIC9k-dob)

2.5 重组酵母的高拷贝筛选及表达产物的检测

载体 pPIC9K 含有来自转座子 Tn903 的 Kan 基因, 可依靠基因剂量效应, 以对 G418 的抗性水平快速筛选出高拷贝

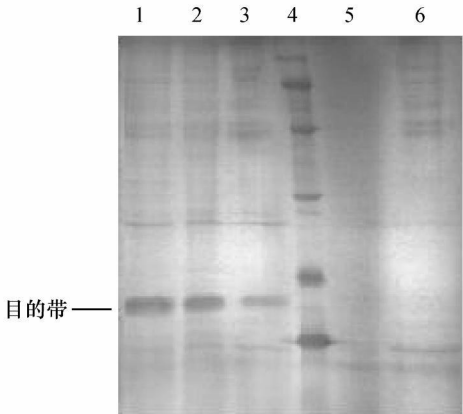


图 5 重组酵母的 SDS-PAGE 分析

Fig 5 Analysis of recombinant yeast by SDS-PAGE

1. 重组酵母诱导 4 天后的上清(G418 2mg/mL); 2—3 重组酵母诱导 4 天后的上清(G418 4mg/mL); 4 蛋白质 Marker 从上至下依次为 97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1, 14.4(kD); 5. 1×SDS 上样缓冲液; 6. pPIC9K 转化的重组菌诱导上清
1. culture supernatants of recombinant *P. pastoris* GS115 (pPIC9k- dob) after induced for 4 days (G418 2mg/ mL); 2—3. culture supematants of recombinant *P. pastoris* GS115 (pPIC9k- dob) after induced for 4 days (G418 4mg/mL); 4. protein Marker from upper to lower: 97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1, 14.4 (kD); 5. 1×SDS sample buffer; 6. culture supematants of *P. pastoris* GS115 transfected with the control plasmid pPIC9k induced as negative control

整合的转化子。将 PCR 鉴定为阳性的重组酵母冻存菌株,

分别划线到含 G418 浓度为 0.25mg/mL、2.0mg/mL、4.0mg/mL 的 YPD 平板上。3 天后,发现 4.0mg/mL 的 G418YPD 平板上长出 4 株,表明为高拷贝重组菌。挑 3 株(4.0mg/mL 2 株 2.0mg/mL 1 株)重组菌分别按 1.2.4 的方法进行诱导。4 天后离心,取 25 μ L 诱导培养上清液进行 SDS-PAGE 分析。结果表明,表达的重组蛋白分子量约为 16kD,而空载体 pPIC9K 转化的重组菌诱导上清则无此蛋白带(图 5),表明目的蛋白得到了表达。

3 讨 论

最近已有近 10 种哺乳动物的肥胖基因序列被初步证实^[6]。研究表明鱼类存在 *ob* 基因,用抗小鼠瘦素抗体检测几种淡水真骨鱼,发现它们的血液、肝脏等组织呈阳性反应^[7],用抗人瘦蛋白抗体检测海七鳃鳗,也发现它的血清、肌肉与贮脂组织抽提液呈阳性反应^[8]。但鱼类 *ob* 基因核苷酸序列的相关报道则很少^[5]。本文对大口鲶 *ob* 基因的序列及其在真核系统中的表达情况进行了部分研究,发现大口鲶 *ob* 基因 cDNA 序列由 438 个核苷酸组成,与报道的鲤鱼 *ob* 基因 cDNA 序列相比具有较高的同源性,仅有 4 个核苷酸的差异。

鉴于原核表达产物往往以包涵体形式存在,蛋白的提取、纯化工艺的烦琐^[9,10],我们将大口鲶 *ob* 基因定向克隆至酵母分泌型表达载体 pPIC9K 的 α 因子信号肽编码序列 3' 端,构建成重组酵母表达载体,尝试应用巴斯德毕赤酵母表达系统来表达目的蛋白-大口鲶瘦素。表达载体与酵母染色体通过同源重组的方式整合至酵母染色体中,同源重组有两种方式,一是线性化载体与宿主染色体发生双交换,取代宿主染色体 AOX1 基因;另一种是经单交换插入宿主染色体的 AOX1 位点或 His4 位点。我们在 LiCl 转化 GS115 时,有意识将表达载体 *SalI* 单酶切线性化后以单交换整合方式与 GS115 染色体 *his* 部分重组,这样整合的拷贝数较多,转化效率比双交换高。在制备酵母感受态时,我们在“Invitrogen 公司操作手册”介绍的 LiCl 法上作了些改进,将 1mL 0.1mol/L LiCl 改为 1mL 1mol/L LiCl,发现转化效率比未改前高,而且高拷贝(4.0mg/mL G418)转化子也更容易得到。诱导培养上清液进行 SDS-PAGE 检测,结果表明,表达的重组蛋白分子量约为 16 kD,与瘦素的理论预计值相符。其活性有待进一步检测。

影响外源蛋白质在毕赤酵母中表达的因素很多,用 *P. pastoris* 系统表达外源基因,虽然运用的都是相同的 AOX1 启动子,但对于不同的外源蛋白,表达量千差万别^[11-15]。除了外源基因序列本身的内在特性如 A+T 含量、低频利用密码子、外源基因的长度外,外源基因的拷贝数、表达条件对表达量高低的影响也极其显著。因此要得到高表达菌株来生产瘦素蛋白,还须在很多方面作改进和尝试。

参考文献:

[1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al*. Positional cloning of the

mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, **372**: 425—432

- [2] Cohen S L, Halaas J L, Friedman J M, *et al*. Human leptin characterization [J]. *Nature*, 1996 **382**: 589—199
- [3] Gong D W, Bi S, Pratley R E, *et al*. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene [J]. *Bio. Chem*, 1995, **27** (8): 3971—3974
- [4] Pellemounter M A, Cullen M J, Baker M B, *et al*. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice [J]. *Science*, 1995, **269**: 540—543
- [5] Dai H C, Long L Q, Ding G. Molecular cloning of the obese gene from the carp *Cyprinus carpio* and its expression in *E. coli* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, **51** (1): 95—100 [戴汉川, 龙良启, 丁光. 鲤鱼肥胖基因的分子克隆及在大肠杆菌中的表达. 动物学报, 2005, **51** (1): 95—100]
- [6] Zhang F, Basinski M B. Crystal structure of the obese protein leptin E 100 [J]. *Nature*, 1997, **387**: 206—209
- [7] Johnson R M, Johnson T M, Londraville R L. Evidence for leptin expression in fishes [J]. *J Exp Zool*, 2000, **286** (7): 718—724
- [8] Yaghoobian S, Fibsa M F, Youson J H. Proteins immunoreactive with antibody against a human leptin fragment are found in serum and tissues of the seakamprey, *Petromyzon marinus* L. [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, **129** (4): 777—785
- [9] Zheng M, Da L, Deng M G, *et al*. Cloning and overexpressing of phycoerythrocyanin operon *F*-gene of *Mastigocladus laminosus* in *Escherichia coli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26** (2): 168—174 [郑敏, 答亮, 邓明刚, 等. 层理鞭枝藻藻红蓝蛋白 F 基因的克隆和表达. 水生生物学报, 2002, **26** (2): 168—174]
- [10] Sun Y N, Wu D, Zhou M, *et al*. Cloning expression and activity analysis of A, E, F genes of anabaena PCC 7120 *pe*-operon [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28** (3): 275—278 [孙亚楠, 武栋, 周明, 等. 鱼腥藻 PCC7120 藻红蓝蛋白操纵子 A、E 和 F 基因的克隆、表达和活性分析. 水生生物学报, 2004, **28** (3): 275—278]
- [11] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review [J]. *Yeast*, 1992, **8**: 423—488
- [12] Wang Y R, Ren H W, An L, *et al*. Expression of human trefoil factor 3 in *Pichia pastoris* and its biological activity analysis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2001, **33** (6): 653—658
- [13] Wang TY, Wang C M, Wei G, *et al*. Expression of the recombinant human interleukin-II in *Pichia pastoris* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2001, **33** (6): 659—664
- [14] Michael J O Donbue. Overexpression in *Pichia pastries* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus [J]. *Protein Expression and Purification*, 1996, **8**: 254—261
- [15] Laborde C, Chemardin P, Bigey F, *et al*. Overexpression of ovine leptin in *Pichia pastoris*: physiological yeast response to leptin production and characterization of the recombinant hormone [J]. *Yeast*, 2004, **21**: 249—263