

陈蓉, 李辉, 施振旦. 犬瘦素受体胞外近跨膜区重组融合蛋白的原核表达与纯化[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 718-720.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.035

犬瘦素受体胞外近跨膜区重组融合蛋白的原核表达与纯化

陈蓉, 李辉, 施振旦

(江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014)

关键词: 犬; 瘦素受体; 原核表达; 亲和层析

中图分类号: S829.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)03-0718-03

Prokaryotic expression and purification of recombinant fusion protein of extracellular near-transmembrane domain of canine leptin receptor

CHEN Rong, LI Hui, SHI Zhen-dan

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Key words: canine; leptin receptor; prokaryotic expression; affinity chromatography

随着人们生活水平的提高,肥胖成为了一个难以应付的健康问题。这一问题甚至也发生于犬、猫等宠物。营养过剩和缺乏运动是导致宠物肥胖的主要原因。肥胖可缩短犬、猫的寿命,且更容易继发某些疾病,如骨骼和关节疾病、呼吸困难、充血性心力衰竭、糖尿病、高血压高血脂症等^[1]。目前,宠物减肥的方法主要有饮食控制、增强运动、药物治疗^[2]和外科手术^[3]。其中,前两种方法需要较长周期,不能短期内发挥效果。

瘦素(Leptin)一直以来被认为是抑制肥胖的主要物质。它是由脂肪组织分泌的一种蛋白质类激素,由 *OB* 基因编码,其主要生理功能是抑制食欲,增加能量消耗,抑制脂肪生成^[4]。瘦素受体(Leptin receptor, LEPR)是 Leptin 的高亲和力受体,属于 I 型细胞因子受体家族^[5]。Leptin 通过与 LEPR 胞外域相结合引发细胞内系列信号转导反应,促进基础代谢,导致脂肪消耗和体质量下降。以 LEPRb 为主的长型受体主要存在于下丘脑神经元^[6],以 LEPRa 为主要的短型

受体多分布于脂肪、心肺等外周组织。

利用激素受体片段免疫动物,产生的抗体可以结合到受体胞外区,并可能产生激素的抑制或促进效应^[7-9]。对鸡的研究结果表明,免疫 LEPR 胞外域抗原可以加强 LEPR 信号转导,促进脂肪消耗,降低体质量^[10];在哺乳动物上,对猪和大鼠的研究结果也表现出类似的降低脂肪沉积的作用^[11]。因此,免疫 LEPR 有可能成为一种降低哺乳动物脂肪沉积和减肥的新方法。本试验拟在大肠杆菌中定向表达犬 LEPR 胞外近跨膜区重组融合蛋白,为下一步主动免疫肥胖犬提供免疫原,并观察其对脂肪沉积的影响,为探寻预防与控制肥胖方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 目的片段的获得

根据 GenBank 上犬 *LEPR* 基因 mRNA 序列(NM_001024634.1)选择胞外近跨膜区基因片段(1 741 ~ 2 340 bp)进行密码子优化(*Escherichia coli*,包括密码子偏爱性、GC 含量和重复序列优化)和基因合成,并添加 5'端 *Bam* H I 酶切位点 GGATCC、3'端终止密码子 TAA 和 3'端 *Eco* R I 酶切位点 GAATTC。

1.2 原核表达载体的构建

将目的片段通过 T4 DNA 连接酶(TaKaRa)连接入经过

收稿日期:2015-07-07

基金项目:江苏省农业自主创新基金项目[CX(14)5032]

作者简介:陈蓉(1985-),女,江苏淮安人,博士,助理研究员,主要从事家禽遗传育种与繁殖方面的研究。(Tel) 025-84390772; (E-mail) chenrong_big@163.com

通讯作者:施振旦, (Tel) 025-84390956; (E-mail) zdshi@jaas.ac.cn

*Bam*HI 和 *Eco*RI (Takara) 酶切过的 pRSET-A 原核表达载体(本实验室保存)中,转化 DH5 α 宿主菌(北京鼎国公司产品),挑取单菌落 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h,提取质粒,经 *Bam* HI 和 *Eco* R I 双酶切鉴定正确的即为 pRSET-*dLEPR* 表达载体。

1.3 原核表达 IPTG 诱导浓度的优化

将 pRSET-*dLEPR* 表达载体转化 BL21 (DE3) 宿主菌(北京鼎国公司产品),挑取阳性菌落,接种于 5 ml LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 振荡培养。待细菌 OD_{600} 值达到 0.6 时,分别用 0 mmol/L、0.01 mmol/L、0.02 mmol/L、0.04 mmol/L、0.08 mmol/L、0.10 mmol/L、0.20 mmol/L、0.40 mmol/L、0.80 mmol/L 和 1.00 mmol/L 的 IPTG 诱导表达重组融合蛋白,并通过 12% SDS-PAGE 和 Western blot 分析重组融合蛋白的表达情况和分子量大小。

1.4 原核表达和包涵体的提取

参照李辉等^[12]的方法,挑取单菌落接种于 10 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡培养 10 h 后,按 1% 比例将上述菌液接种于 1 L LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡培养。待细菌 OD_{600} 值达到 0.6 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG,诱导表达 5 h。取出菌液,4 $^{\circ}$ C,8 000 g 离心 10 min,收集细菌沉淀。向收集的菌体中加入适量的裂解液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0),涡旋振荡至没有明显的细菌团块,然后反复冻融,直至菌体破裂释放出 DNA 使溶液变粘稠。在冰浴条件下进行超声波破碎,超声波破碎时间 5 s,间隔时间 5 s,功率 500 W,破碎次数 60 次。待菌体不再粘稠且成半透明状后,4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 10 min,弃上清,收集的沉淀即为包涵体。将获得的包涵体用洗涤液(20 mmol/L Tris-HCl,4 mol/L 尿素,pH 8.0)重悬,4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 10 min,弃上清,收集沉淀,重复 1 次。最终将包涵体沉淀用溶解液(20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L 尿素,pH 8.0)溶解,并离心除去不溶杂质后备用。

1.5 Ni-NTA Agarose 纯化

采用 Ni-NTA Agarose (Qiagen) 对上述表达的重组融合蛋白(含 6 \times His 标签)进行纯化。纯化过程:用 2 个柱体积的平衡液(20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L 尿素,pH 8.0)平衡 \rightarrow 上样 \rightarrow 用 5 个柱体积的洗涤液(20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L 尿素,5 mmol/L 咪唑(Imidazole),pH 8.0)洗涤 \rightarrow 用 2 个柱体积的洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L 尿素,500 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱,获得 His 标签蛋白质。

2 结果与分析

2.1 犬 LEPR 胞外近跨膜区表达载体的构建及表达产物检测

通过双酶切和 DNA 连接酶将犬 LEPR 胞外近跨膜区基因片段插入原核表达载体 pRSET-A 中,构建了 pRSET-*dLEPR* 表达载体。经过 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切鉴定,获

得了长度为 615 bp 的犬 LEPR 胞外近跨膜区 DNA 条带,大小与预期的一致。然后,将构建好的 pRSET-*dLEPR* 表达载体转化入表达菌株 BL21 (DE3),经过 10 个不同浓度 IPTG 诱导后,在分子量约为 2.7×10^4 处有明显的蛋白质表达条带,大小与预期结果相同。利用抗 His 标签抗体对上述重组融合蛋白(含 6 \times His 标签)进行 Western blot 分析,发现在目的条带处有免疫条带出现。上述结果表明重组质粒 pRSET-*dLEPR* 正确表达出含有犬 LEPR 胞外近跨膜区的重组融合蛋白。

2.2 犬 LEPR 胞外近跨膜区重组融合蛋白的亲 and 层析纯化

经大量培养、反复冻融、超声破碎和洗涤后,获得纯度较高的包涵体蛋白。使用 8 mol/L 尿素溶解并离心除去不溶杂质后,进行亲和层析纯化。经过平衡-上样-洗涤-洗脱后,收集纯化的蛋白质。通过 SDS-PAGE 分析发现,存在蛋白质过载现象,低浓度的咪唑可以将杂蛋白和未结合的重组融合蛋白(含 6 \times His 标签)洗涤下来,而重组融合蛋白可以被高浓度的咪唑洗脱下来。BandScan 软件分析结果显示,犬 LEPR 胞外近跨膜区重组融合蛋白表达量为 55.3%,纯度为 71.2%。

3 讨论

本研究根据犬 LEPR 编码基因的序列特征,选择合成了 C 端胞外近跨膜区部分基因序列(1 741~2 340 bp),并添加了 5'*Bam* H I、3'TAA 和 3'*Eco*RI,序列全长 615 bp。然后,将目的片段插入原核表达载体 pRSET-A 中,构建了重组表达载体 pRSET-*dLEPR*。在表达载体中 T7 启动子的驱动下,表达了一个由 237 个氨基酸残基组成的融合蛋白,分子量约为 2.7×10^4 。该融合蛋白除了包含犬 LEPR 胞外近跨膜区序列外,还包含表达载体编码的 N 端 37 个残基前导肽(含 6 \times His 标签)。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测发现所表达的蛋白质分子量与预测值一致,并且融合表达了 His 标签蛋白,表明犬 LEPR 胞外近跨膜区重组融合蛋白成功表达。随后,采用 Ni-NTA 柱亲和层析纯化方法,获得了较高纯度的重组融合蛋白,为下一步主动免疫肥胖犬提供了免疫原。

犬 LEPR 基因编码 1 166 个氨基酸残基,胞外区有 811 个氨基酸残基,含有 3 个 F3(Fibronectin type 3)结构域和 1 个 IGD(Immunoglobulin-like domain)结构域。不同的区域肽片段在信号传导中可能具有不同的功能。Fong 等^[13]把 Leptin 的结合区定位在人 LEPR 胞外近跨膜区,它包含了第 2 个 CK-F3(Cytokine receptor/fibronectin type 3)结构域,长度约 200 个氨基酸残基。Sandowski 等^[14]证实 Leptin 的结合区与 LEPR 胞外区全长序列相比,结合 Leptin 的能力相似,其他区域作用较小。因此,如果使 LEPR 上某个区域肽片段产生的抗体激活 LEPR 信号转导途径而增强 Leptin 功能的发挥,抑制脂肪沉积,那么选择包含 F3 结构域的胞外近跨膜区是毋

庸置疑的。综合考虑各方面的因素,本研究选择了犬 LEPR 胞外近跨膜区(含 2 个 F3 结构域,581~780 aa)作为目的片段进行蛋白质表达试验,以期获得抑制犬脂肪沉积的重组融合蛋白。

参考文献:

- [1] MARKWELL P J, VAN ERK W, PARKIN G D, et al. Obesity in the dog [J]. *Journal of Small Animal Practice*, 1990, 31(10): 533-537.
- [2] WREN J A, GOSSELLIN J, SUNDERLAND S J. Dirlotapide: a review of its properties and role in the management of obesity in dogs [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2007, 30(Suppl 1): 11-16.
- [3] 陆江, 卢炜, 朱道仙, 等. 袖状胃切除术在治疗中小型犬肥胖症中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2014(5): 173-175.
- [4] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [5] TARTAGLIA L A, DEMBSKI M, WENG X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R [J]. *Cell*, 1995, 83(7): 1263-1271.
- [6] BURGUERA B, COUCE M E, LONG J, et al. The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain [J]. *Neuroendocrinology*, 2000, 71(3): 187-195.
- [7] JEYAKUMAR M, MOUDGAL N R. Immunization of male rabbits with sheep luteal receptor to LH results in production of antibodies exhibiting hormone-agonistic and -antagonistic activities [J]. *J Endocrinol*, 1996, 150(3): 431-443.
- [8] ABDENNEBI L, COUTURE L, GREBERT D, et al. Generating FSH antagonists and agonists through immunization against FSH receptor N-terminal decapeptides [J]. *J Mol Endocrinol*, 1999, 22(2): 151-159.
- [9] ISRAEL D, CHUA S J. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(1): 10-16.
- [10] Lei M M, Wu S Q, Shao X B, et al., Creating leptin-like biofunctions by active immunization against chicken leptin receptor in growing chickens [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2015, 50: 55-64.
- [11] 刘闻, 吴丽红, 徐名村, 等. 免疫瘦素受体胞外近跨膜区重组融合蛋白对 SD 大鼠脂肪沉积的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(6): 832-837.
- [12] 李辉, 陈蓉, 应诗家, 等. 鹅生长激素基因的克隆、原核表达及其重组蛋白质的离子交换纯化 [J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(6): 1387-1391.
- [13] FONG T M, HUANG R R, TOTA M R, et al. Localization of leptin binding domain in the leptin receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 53(2): 234-240.
- [14] SANDOWSKI Y, RAVEN N, GUSSAKOVSKY E E, et al. Subcloning, expression, purification, and characterization of recombinant human leptin-binding domain [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48): 46304-46309.

(责任编辑:张震林)