

人 Leptin 基因在大肠杆菌中的高效表达、纯化及其生物学活性研究

赵跃然 王郡甫 游力 高春义 田志刚* 张捷 韩娜 尹进 孙沛

(山东省肿瘤生物治疗研究中心,山东省医学科学院基础医学研究所 济南 250062)

摘 要 将人 Leptin 表达质粒 pBV220-OB 转化 *E. coli* JM109 经热诱导获得了目的蛋白的表达。经 SDS-PAGE 鉴定分析,表达产物以包涵体形式存在,目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 40% 以上。通过包涵体分离, Sephacryl S200HR 凝胶和 DEAE52 离子交换层析及 Hypersil C18 柱反相色谱纯化,获得纯度在 95% 以上,内毒素含量小于 10EU/mg 的高纯度的重组人 Leptin。Western-blot 鉴定表明,纯化表达产物能和抗 Leptin 抗体特异性结合;蛋白质 N 端 15 个氨基酸序列分析结果和预期的序列一致。纯化产物经复性处理,其分子中 Cys96 和 Cys146 形成二硫键。体内活性检测显示,纯化和复性的 rh-Leptin 明显抑制 BALB/c 小鼠的进食和体重增长,提示其具有明显的生物学活性。

关键词 Leptin 基因表达,大肠杆菌 JM109,蛋白纯化

中图分类号 R318 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0175-04

Leptin 是近年来发现的由肥胖基因(Obes gene, OB)编码、脂肪细胞合成分泌肽类激素。OB 蛋白由 167 个氨基酸组成,其中 N 端 21 个氨基酸为信号肽,成熟 OB 蛋白即 Leptin 为 146 个氨基酸组成的无糖基化的多肽^[1]。其作用于下丘脑的特异受体(OB receptor, OB-R),促进下丘脑神经肽的分泌;或直接作用于相应外周靶细胞的 OB-R,包括作用于早期造血干细胞,促进其分化成熟^[2],作用于免疫系统,调节机体的免疫应答等^[3,4],具有广泛的生物学效应。初步动物实验和临床研究表明,重组人 Leptin(Recombinant human leptin, rh-leptin)可用于肥胖症和 II 型糖尿病的治疗^[5,6]。为探讨重组人 Leptin 用于上述疾病临床治疗的可行性及其生理作用,我们在完成了人 Leptin 基因克隆和在 *E. coli* 表达研究的基础上^[7],进行了其高效表达研究,建立了重组 leptin 的分离纯化技术并进行了初步生物学探讨,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 生化和化学试剂

蛋白胨和酵母提取物为 Oxide 产品;Sephacryl S200HR、DEAE52、Hypersil C18 为购自 Pharmacia;兔抗人 Leptin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology.

Inc.;其它为进口或国产分析纯试剂。

1.2 质粒和菌株

大肠杆菌 JM109 由本室保存,重组 Leptin 表达质粒 pBV220-OB 由本室构建^[7]。

1.3 动物

18±1g 的雌性 BALB/c 小鼠购自山东医科大学实验动物中心。

1.4 重组菌株的获得及诱导表达

重组 Leptin 表达载体 pBV220-OB 转化 JM109 获得 leptin 工程菌株。重组大肠杆菌菌株于 30℃ 振荡培养,培养物 OD₆₀₀=0.6 时,进行热诱导重组蛋白的表达,即 37℃ 继续培养 4h,冰浴 30min, 4℃, 10000g 离心 20min,收集菌体。

1.5 包涵体的制备

按本室常规方法进行。菌体悬浮于 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 100mmol/L NaCl, 于冰浴中超声破碎细菌, 10000g, 离心 20min。沉淀用 50mmol/L Tris-Cl, pH8.0, 0.05% Triton X-100 洗 2 次,而后用 1~6mol/L 的尿素洗 2 次。沉淀的包涵体用 6mol/L 尿素, 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0 溶解。离心,保留上清。

1.6 重组蛋白的纯化

包涵体裂解上清加入 6mol/L 尿素, 50mmol/L

Tris-HCl, pH8.0 平衡的 Sephacryl S200HR 层析柱, 用同一缓冲液进行洗脱, 流速 2mL/min。洗脱液加入用 20mmol/L Tris-HCl, pH8.5, 1 mmol EDTA 预平衡的 DEAE52 柱。上样结束后, 用同一液体洗除柱中的尿素, 进而用 0→0.4mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱。离子交换分离的 Leptin 组份用反相色谱进行纯化。分离柱为 Hypersil C18, 梯度洗脱条件是乙腈 0→70%, 流速 8mL/min。各洗脱组份用 SDS-PAGE 和 Western 印迹鉴定。纯化的 leptin 冻干, 备用。

1.7 重组蛋白的复性

纯化重组蛋白溶于 6 mol/L 的盐酸胍, 20mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2.5mmol/L β-巯基乙醇和 2.5mmol/L DTT 中, 2.5mg/mL, 室温轻轻搅拌 30min。用 6mol/L 脲, 20mmol/L Tris-HCl pH 7.4 和 5 mmol/L β-巯基乙醇溶液进行 1:10 稀释。而后行分步透析: 20mmol/L Tris-HCl pH 7.4 和 5 mmol/L β-巯基乙醇于 4℃ 透析 15~20h; 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 和 5mmol/L DTT 透析 5~8h; 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 和 100mmol/L NaCl 透析 18~24h。最后加入氧化和还原型谷胱甘肽, 终浓度分别为 5 和 0.5mmol/L, 混匀 4℃ 过夜。复性蛋白浓缩, 并用 0.22μm 滤器过滤除菌, 冻干备用。

1.8 SDS-PAGE 和 Western blotting

蛋白电泳样品用 1× SDS-PAGE 上样液溶解, 100℃ 变性 5min, 进行 14% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。重组蛋白表达量和纯度分析用 Kodak 凝胶分析系统进行。

表达产物按常规进行 SDS-PAGE、转膜、封闭并依次加入兔抗入 Leptin 抗体和酶标二抗, 在底物液中显色。

1.9 蛋白定量

用 Bradford 法进行重组蛋白的定量^[8]。

1.10 内毒素含量测定

用无热源水配制内毒素, 浓度为 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015 和 0.0075EU/mL。待检 Leptin 用无热源水溶解。分别取 100μL 的待检样品和内毒素标准加入鲎试剂中, 另用等量的无内毒素水作阴性对照。混匀, 37℃ 水浴 1h, 观察结果。

1.11 氨基酸序列分析

由中国科学院上海分院联合分析测试中心进行。

1.12 动物实验

实验小鼠正常饲养 5d, 去除体重 <17g 和 >21g

的小鼠, 随机分为 2 组, 每组 20 只。实验组腹腔注射 rhLeptin 7.5mg (0.25mL/kg/d, 每日 1 次, 对照组给予等量的生理盐水, 每日定时称重和观察食物摄入量。

2 结果和讨论

2.1 Leptin 在大肠杆菌中的高效表达

Leptin 表达工程菌株, 经热 37℃ 诱导, 表达高水平的重组人 Leptin。经 SDS-PAGE 和 Kodak 凝胶分析系统分析, 重组蛋白占菌体总蛋白的 40% 左右 (图 1); 获得的重组蛋白的分子量为 15kD 左右, 和预期的 16kD 不符。分子量的差异可能和 Leptin 的理化特性有关, 国外亦有类似的报道^[9,10]。

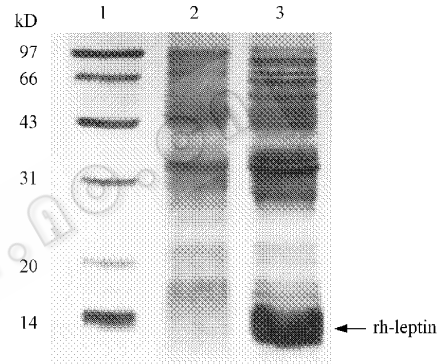


图 1 rh-leptin 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of rh-leptin expressed in *E. coli*
1. Protein marker 2. pBV220 control 3. rh-leptin recombinant

2.2 重组 Leptin 的纯化

重组人 Leptin 在大肠杆菌中的表达产物以包涵体的形式存在, 观察用不同浓度的尿素洗涤包涵体对重组蛋白纯度和丢失的影响, 结果表明 4mol/L 洗涤的效果最佳, 目的蛋白丢失最少而杂蛋白的含量最低。其洗涤后 Leptin 的含量可达 80% 左右 (图 2), 便于进一步的分离纯化。

包涵体裂解物用 Sephacryl S200HR 凝胶层析、DEAE52 离子交换和 Hypersil C18 反相色谱纯化 (图 2, 图 3)。纯化 Leptin 行 SDS-PAGE, 经 Kodak 凝胶分析系统分析, 获得 Leptin 的纯度达 95% 以上。

2.3 重组 Leptin 氧化还原状态的鉴定

Leptin 的 Cys96 和 Cys146 形成二硫键, 为其活性必需^[11]。为检测复性 Leptin 分子内是否有二硫键的存在, 我们进行了其氧化状态的分析。复性的 Leptin (非还原状态) 和用 5mmol/L DTT 还原的

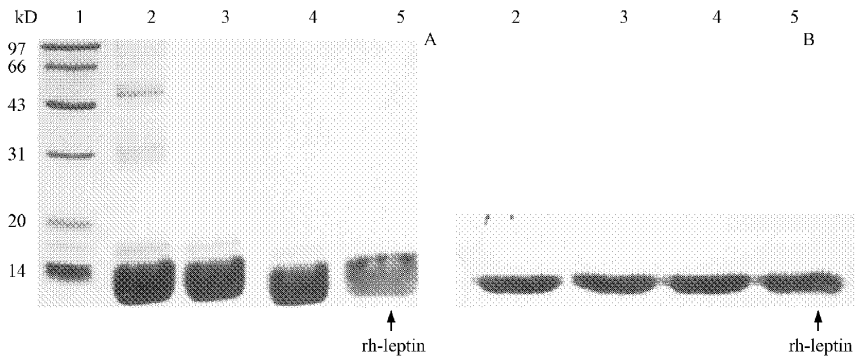


图 2 rh-leptin 纯化物的 SDS-PAGE (A) 和 Western blotting (B)

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) of rh-leptin during the purification

1. Protein marker 2. Inclusion body 3-5. Protein fraction separated with Sephacryl S200HR, DEAE52 and Hypersil C18 respectively

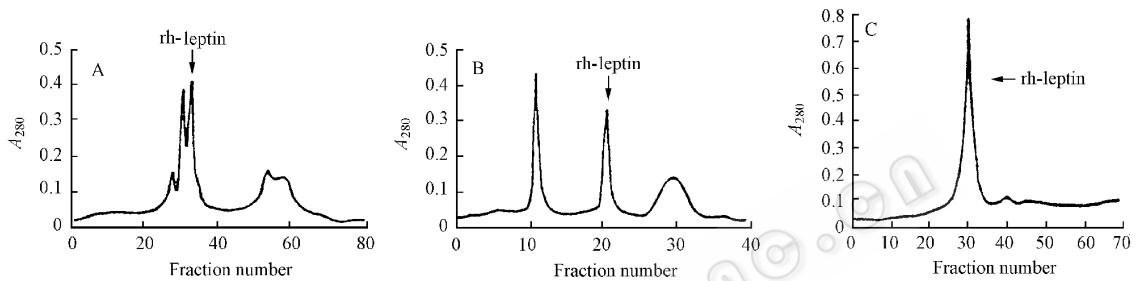


图 3 rh-leptin 的 Sephacryl S200 (A), DEAE52 (B) 和 Hypersil C18 (C) 分离纯化层析图

Fig. 3 Chromatograph of rh-leptin on Sephacryl S200 (A), DEAE52 (B) and Hypersil C18 (C)

Leptin 进行 SDS-PAGE, 后者的迁移率快于前者(图 4)。说明复性 rh-leptin 分子内的 Cys96 和 Cys146 形成了二硫键。

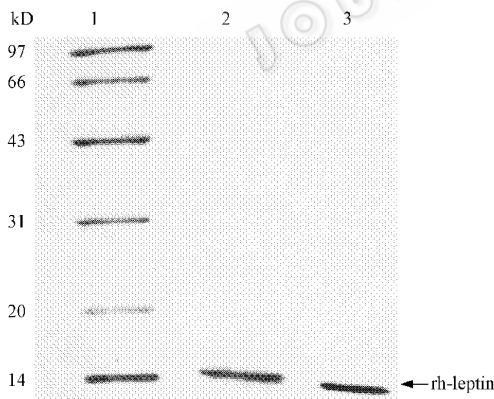


图 4 复性 rh-leptin 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of refolded and reduced rh-leptin

1. Marker 2. Reduced rh-leptin 3. Refolded rh-leptin

2.4 rh-Leptin 的鉴定

2.4.1 Western blotting 在 Leptin 的诱导表达和纯化过程中,用 Western blot 监测目的蛋白的表达和鉴定洗脱液中目的蛋白(图 2)。结果显示,纯化的目的蛋白能和抗人 Leptin 抗体特异结合。

2.4.2 氨基酸序列分析和内毒素含量测定 重组 Leptin 进行 N 端 15 个氨基酸序列分析,结果为 MVPIQKVQDDTKTLI 和预期的序列一致。内毒素测定显示, rh-Leptin 内毒素含量小于 10UE/mg。

2.5 rh-Leptin 的体内生物学活性

观察 rh-Leptin 对 BALB/c 小鼠食物摄入量 and 体重的影响,检测其生物学活性。和对照组比较,实验组小鼠在用药的第 3 天,食物摄入量明显下降 ($P < 0.05$) (表 1),第 4 天体重增长显著降低 ($P < 0.01$) (表 2)。说明获得的 rh-leptin 具有降低实验动物进食和抑制体重增长的作用。

表 1 rh-leptin 对小鼠食物摄入量的影响 ($n = 12$)

Table 1 Effect of rh-leptin on food intake of mice

t/d	Change% of food intake ($\bar{X} \pm SD$)			
	3	4	5	6
rh-leptin	$-30.9 \pm 9.87^*$	$-36.9 \pm 9.73^*$	$-32.4 \pm 8.37^*$	$-40.9 \pm 10.27^*$
Saline (control)	-16.7 ± 8.7	-16.1 ± 9.3	-15.2 ± 6.9	-15.2 ± 5.3

* : $P < 0.01$

表 2 rh-leptin 对小鼠体重的影响($n = 12$)

Table 2 Effect of rh-leptin on body weight gain of mice

t/d	Change% of body weight gain($X \pm SD$)			
	3	4	5	6
rh-leptin	3.009 \pm 0.87	2.01 \pm 0.48*	-1.03 \pm 0.24*	-2.40 \pm 0.39*
Salin(control)	3.70 \pm 0.94	3.09 \pm 0.91	3.93 \pm 0.97	3.93 \pm 1.02

* : $P < 0.01$

高纯度、安全和具生物活性 Leptin 的获得对探讨其治疗肥胖-糖尿病综合症的应用价值和生理功能具有重要意义。本研究获得了表达水平占细胞总蛋白的 40% 以上 rh-leptin 的高效表达菌株,建立了 rh-leptin 的分离纯化技术,通过 Sephacryl S200HR 凝胶、DEAE52 离子交换层析和 Hypersil C18 柱反相色谱纯化,获得纯度在 95% 以上、内毒素含量小于 10EU/mg 的高纯度的具有生物学活性的 Leptin 重组蛋白,为开展 Leptin 的临床和基础研究奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang Y ,Pronenca R ,Maffei M *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* ,1994 **372** : 425~432
- [2] Mikhail A ,Beck EX ,Shafer A *et al.* Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood* ,1997 **89** :1507~1512
- [3] Lord G ,Matarese G ,Howard K *et al.* Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* ,1998 **394** :897~900
- [4] Matarese G. Leptin and immune system :how nutritional status influences the immune response. *Eur Cytokine Netw* 2000 **11** :7~14
- [5] Heymsfield SB ,Greenberg AS ,Fujioka K *et al.* Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults :a randomized ,controlled ,dose-escalation trial. *JAMA* ,1999 **282** :1568~1575
- [6] Shimomura I ,Hammer HE ,Ikemoto S *et al.* Leptin reverse insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* ,1999 **401** :73~76
- [7] ZHAO YR(赵跃然) ,YOU L(游力) ,JIA YH(贾玉华) *et al.* Cloning and expression of human leptin gene in *E. coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学和分子生物学报) 2000 **15** :742~745
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* ,1976 **72** :248~254
- [9] Varnerin JP ,Smith T ,Rosenblum CI *et al.* Production of leptin in *Escherichia coli* :A comparison of methods. *Protein Express Purif* ,1998 **14** :335~342
- [10] Fawzi AB ,Zhang H ,van Heek M *et al.* Purification of milligram quantities of human leptin from recombinant *E. coli*. *Horm Metab Res* ,1996 **28** :694~6979.
- [11] Giese K ,Fantl W , Vitt C *et al.* Reduction of food intake and weight gain by the obprotein requires specific secondary structure and is reversible. *Mol Med* ,1996 **2** :50~58

Purification and Biological Activity of rh-leptin Expressed in *Escherichia coli*

ZHAO Yue-Ran WANG Jun-Fu YOU Li GAO Chun-Yi TIAN Zhi-Gang*

ZHANG Jie HAN Na YIN Jin SUN Rui

(Shandong Tumor Biotherapy Centre ,Institute of Basic Medicine ,Shandong Academy of Medical Sciences Jinan 250062 ,China)

Abstract The human leptin was successfully expressed with high level in *E. coli* under the control of P_L promotor. The yield of recombinant protein was over 40% of total cellular protein and expressed as inclusion bodies. The recombinant human leptin (rh-leptin) was purified with gel filtration ,anion-exchange and reverse chromatography. Refolding was achieved by gradually reducing denaturant using a diafiltration method. The refolded rh-leptin was characterized by SDS-PAGE ,Western-blotting and its first 15 amino acid residues sequence of the N-terminal. The purified product was found to be biologically active ,reducing the food intake and body weight gain upon testing in BALB/c mice.

Key words Leptin gene expression ,*E. coli* JM109 ,protein purification

Received September 15 2000

* Corresponding author. Tel 86-531-2919943 ;Fax 86-531-2951474 ;E-mail yrzhaoy@public.jn.sd.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn