维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)03-0293-03

人脂联素基因的克隆及序列分析

李丙蓉，郑　丹，邓华聪，兰丽珍，郑宏庭，刘金波

（重庆医科大学附属第一医院内分泌科，重庆　400016）

【摘　要】目的：克隆人脂联素基因（apM1），为进一步研究脂联素的功能提供实验基础。方法：应用 RT-PCR 法自人大网膜脂肪组织的总 RNA 中扩增出 apM1 cDNA 全长基因，采用 T-A 克隆法重组到 pGEM-T Vector System 中，通过蓝白斑筛选出阳性克隆后，测序鉴定。结果：从脂肪组织总 RNA 中扩增得到 735bp apM1 基因，其 cDNA 序列与 GenBank 报导的人脂联素基因 apM1 同源性为 99.7%（159 位和 558 位碱基发生了无义突变），获得了质粒 pGEM-T-apM1，测序鉴定正确。结论：成功的克隆了 apM1 基因全长 cDNA。

【关键词】脂联素基因；克隆，分子；逆转录聚合酶链反应；序列分析，DNA

【中国图书分类法分类号】R538　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-10-23

Cloning and sequencing of human apM1 gene

LI Bingrong, et al

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To clone human apM1 gene for the study molecular mechanism of the function of adiponectin. *Methods*: RT-PCR method was used to isolate, from the total RNA of human adipose tissue, cDNA fragment encoding adiponectin, which was linked into pGEM-T Vector, then amplified, and cloned. The sequence was analyzed to identify the recombinant plasmids. *Results*: The result of sequencing indicated that the sequence of the cloned cDNA was identical to that of the corresponding parts of the mRNA for human apM1 in GeneBank except 2 nucleotides. *Conclusion*: Human apM1 cDNA gene was successfully cloned.

【Key words】apM1 gene; Cloning, Molecular; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Sequence analysis, DNA

近年来脂肪组织内分泌功能的发现及其在肥胖、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发病机制中的作用已倍受关注。新近发现的脂联素是由脂肪细胞分泌并在脂肪细胞中高度表达的一种与细胞外基质相互作用的血浆蛋白，随着研究的深入，脂联素的生理作用越发广泛[1-3]：具有抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、减轻体重、增加胰岛素敏感性、抑制肝糖产生和增加骨骼肌葡萄糖摄取的作用。但其作用的分子机制仍不清楚，本研究旨在体外克隆出其基因 apM1 编码序列，为下一步构建表达脂联素重组腺病毒，研究脂联素的功能及调控机制提供实验基础。

作者介绍：李丙蓉（1977-　），女，博士，主要研究方向：糖尿病及慢性并发症的发病机制和防治。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30370670，30070356）；教育部基金资助项目（2-04-1-5-5012）；重庆市科委基金资助项目（03-43-7）；重庆市卫生局基金资助项目（01-2-038）。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　脂肪组织　取自胃大部分切除患者术中取出的大网膜脂肪组织，液氮中冻存。

1.1.2　试剂　Rneasy Mini Kit、逆转录试剂盒、Taq DNA Polymerase 为 QIAGEN 公司产品，Rnase 抑制剂、DNA marker DL2000、Rapid DNA ligation Kit 为大连 TaKaRa 公司产品，pGEM-T Vector System 为 Promega 公司产品，胰蛋白胨和酵母提取物为美国 Oxoid 公司产品，高纯度质粒抽提试剂盒、PCR纯化试剂盒为美国 Omega 公司产品，其余试剂均为国产分析纯。大肠杆菌 DH5α 由第三军医大学野战外科研究所七室提供。

1.1.3　仪器 PTC-100TM　PCR 仪（MJ Research，美国）、低温台式高速离心机（Heraeus，德国）、DNA 电泳系统（Bio-Rad，美国）、RiOsTM and Milli-QTM 水纯化系统（Millipore，美国）、可见光／紫外凝胶扫描分析系统（UVP，美国）、Du-7500 紫外分光光度计（BECKMAN，美国）、梯度 PCR 仪（ep-

维普资讯 http://www.cqvip.com

pendorf MG,德国)、图像分析系统(TECBIAS-6803,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 人脂肪组织总 RNA 的提取 按 QIAGEN 公司 Rneasy Mini Kit 说明书进行操作,从冻存的网膜脂肪组织中提取总 RNA,用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和含量。

1.2.2 引物设计、RT-PCR 及其产物纯化 根据 QIAGEN 逆转录试剂盒说明书进行 RT 反应。根据 GenBank 的 apM1 基因序列用 Primer Premier 5.0 设计能合成 apM1 全长 cDNA 的引物。上游引物和下游引物序列如下:

P1:ATGCTGTTGCTGGGAGCTGTTCTACTGC;

P2:TCAGTTGGTGTCATGGTAGAGAAGAAAG。PCR 反应体系如下:5μl 10×buffer;2μl 4×dNTP;2μl P1;2μl P2;1μl template (RT 反应产物);5U Taq DNA Polymerase;37μl ddH_2O,总反应体积 50μl。反应条件如下:首先 95℃预变性 5min;然后 95℃ 变性 30s,56℃退火 45s,72℃ 延伸 2min,反应 25 个循环;最后 72℃再延伸 10min。RT-PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析后,用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。

1.2.3 apM1 基因克隆及其序列分析 将纯化的 RT-PCR 产物与 pGEM-T Vector System 用宝生物快速连接试剂盒进行连接,取连接反应产物 3μl 转化感受态细胞 DH5α,并和 IPTG、X-GAL 一起混合涂布在氨卞抗性的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。分别挑 10 个白色单菌落到 10 支 5ml 氨卞抗性的培养管中 37 ℃摇床过夜培养。用 Omega 质粒抽提试剂盒提取质粒后,取 5 个克隆送上海鼎安生物科技有限公司测序。

2 结 果

2.1 人脂肪组织总 RNA 提取

应用 QIAGEN 公司 Rneasy Mini Kit 试剂盒提取脂肪组织的总 RNA 获得了较满意的结果,用分光光度计检测 RNA 的纯度:$A_{260nm}/A_{280nm}=2.0$、1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1。

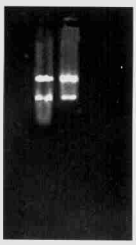


图 1 脂肪组织总 RNA

2.2 RT-PCR 结果

RT-PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,显示在 735bp 左右出现目的条带,与理论值相符,结果如图 2。

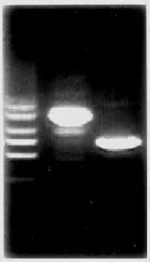


图 2 RT-PCR 扩增全长 apM1 基因

2.3 pGEM-T-apM1 序列分析

采用 T-A 克隆的方法将 PCR 产物与 pGEM-T Vector System 连接、转化,蓝白斑筛选,阳性克隆送测序。用通用引物双向测序,测序结果:159 位碱基:A→G(无义突变);558 位碱基:T→C(无义突变)。其余碱基与 GenBank 的 apM1 基因序列(GI:871886)一致,同源性为 99.7%。正向测序部分图见图 3、反向测序部分图见图 4。双向测序的结果如下:

atgctgttgctgggagctgttctactgctatlagctctgcccggtcatgaccaggaaaccacgactcaaggggcccggagtcctgcttcccctgcccaaggggggcctgcacaggttggatggcgggcatcccagggcatccgggcccataatggggccccgggcegtgatggcagagatggcaccccctggtgagaagggtgagaaaggagatccaggtctlattggtcctaagggagacatcggtgaaaccggagtaccccggggctgaaggtccccgaggcttlccgggaatccaaggcaggaaaggagaacctggagaaggtgcctatgtatacrgctcagcatlcagtgtgggattggagacttacgttactatccccaacatgcccatlcgctttaccaagatcttctacaatcagcaaaaccactatgatggctccactggtaaattccactgcaacattcctgggctgtactacttlgcctaccacatcacagtctatatgaaggatgtgaaggtcagcctcttcaagaaggacaaggctatgcttlcacctacgatcagtaccaggaaaataatgtggaccaggcctccggctctgtgctcctgcatctggaggtgggcgaccaagtctggctccaggtgtatgggaaggagagcgtaatggactctatgctgataatgacaaatgactccacctlcacaggctttcttctctaccatgacaccaactga

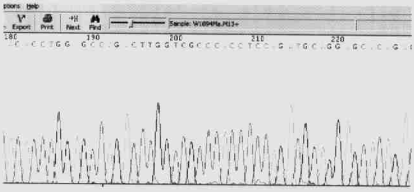


图 3 质粒 pGEM-T-apM1 正向测序部分图谱

维普资讯 http://www.cqvip.com

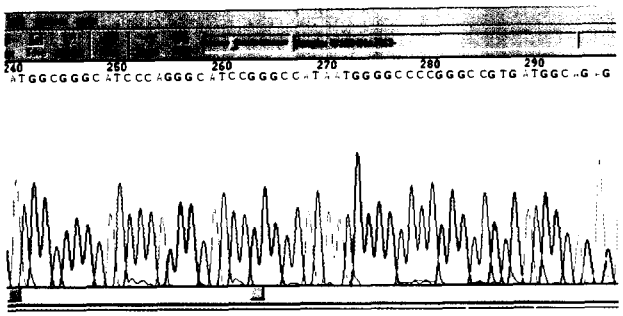


图 4 质粒 pGEM-T-apM1 反向测序部分图谱

3 讨 论

人脂联素基因（adipose most abundant gene transcript 1，apM1），亦称 GBP28、ACDC，定位于 3q27，全基因组扫描显示该区域存在 2 型糖尿病和代谢综合征的易感位点，也是冠脉疾病的候选位点。apM1 是单拷贝基因，长约 17kb，由三个外显子和两个内含子组成。三个外显子分别长 18、222 和 4277bp，其上含有可识别的剪切位点；两个内含子分别长约 0.8 和 12kb。人体内的脂联素由 244 个氨基酸组成，分子量为 30KD，共有三个区域：氨基端信号肽序列（aa 1~18）、胶原样结构域（aa 19~107）和羧基末端的球形结构域（aa 108~244）。

脂联素是由脂肪细胞特异性分泌的，存在于血循环中的一种激素蛋白，其血浆浓度为 5 ~ 30μg/ml，约占全部血清蛋白成分的 0.01%，具有抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、增加胰岛素敏感性、抑制肝糖产生和增加骨骼肌葡萄糖摄取的作用。哺乳动物的脂联素一旦合成，经过翻译后羟基化和糖基化修饰形成 8 种亚型。其中 6 种亚型是糖基化的，胶原结构域内的 68、71、80 和 104 位的赖氨酸残基，94 位的脯氨酸残基是氧连接的糖基化位点。全长的糖基化哺乳动物的脂联素的功能分析揭示了糖基化的脂联素作为胰岛素增敏剂的效应远远强于细菌合成的非糖基化的脂联素。这提示了脂联素的翻译后修饰对其发挥最佳的生物学活性是必需的[4]。所以我们准备在后续的实验中构建脂联素的真核表达载体，使脂联素在真核细胞分泌表达。

肥胖与糖尿病、心血管疾病、癌症紧密相关，在肥胖患者中，血浆脂联素水平是降低的，最近的研究表明脂联素可以通过诱导激活 caspases8、9 和 3 而导致血管内皮细胞凋亡，进而在新生血管形成中起负性调控作用。重组脂联素注入肿瘤模型小鼠可显著抑制原发性肿瘤的生长，该作用与肿瘤血管减少，进而导致肿瘤细胞凋亡增加有关。这提示脂联素作为内源性的血管生成抑制剂，也许可以用于血管生成依赖性疾病（如肿瘤）的治疗[5]。而另外一项研究则提示脂联素具有抗胰岛 β 细胞凋亡的作用。

本实验从脂肪组织中提取总 RNA，进行 RT-PCR 反应，将 PCR 产物用 T-A 克隆法，克隆到 pGEM-T 载体上，获得重组质粒 pGEM-T-apM1，蓝白斑筛选后，双向测序结果显示我们插入 pGEM-T 载体的 PCR 产物序列与报导的人脂联素基因 apM1 序列同源性为 99.7%，有 159 位和 558 位碱基发生无义突变，但不影响 apM1 基因的蛋白表达，提示我们成功的克隆了 apM1 基因。pGEM-T 载体是通过 EcoR Ⅴ酶切 pGEM-5Zf（+）载体，并在 3′ 末端加入胸腺嘧啶构建的，插入位点 3′ -T 突出端可提高 PCR 产物的连接效率。所以用该方法简便、快捷，可大大提高 PCR 产物的连接、克隆效率。通过成功的克隆人脂联素基因全长 cDNA，为重组表达脂联素的腺病毒，进一步研究脂联素的功能及作用的分子机制提供实验基础，亦为代谢综合征的防治寻找一种新的途径。

参 考 文 献

[1] Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight[J]. Nat Med, 2004;10(5):524-529.

[2] Shibata R, Ouchi N, Ito M, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart[J]. Nat Med, 2004; 10(12):1384-1389.

[3] Naderali EK, Estadella D, Rocha M, et al. A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levelsin rat epididymal adipose tissue[J]. Clinical Science, 2003; 105(4):403-408.

[4] Wang Y, Xu A, Knight C, et al. Cooper GJ. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin: potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity[J]. J Biol Chem, 2002;277(22):19521-19529.

[5] Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004;101(8):2476-2481.