DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.021
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0057-04

论著

人PPARγ2 cDNA的克隆及其在大肠杆菌中的表达纯化

曹廷兵,叶治家,彭家和,巩 燕,黄 刚 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆中国人的PPARγ2 cDNA,并在大肠杆菌中进行表达纯化。方法 从正常人面部脂肪组织分离总RNA,采用RT-PCR及序列测定等方法获得人的PPARγ2 cDNA,然后克隆至原核表达载体pET28a,转化至大肠杆菌BL21(DE3),IPTG进行诱导表达;在N末端融合了6×His纯化标签的表达产物进行Westem blot分析和用Ni^{2+}-NTA离子交换树脂进行纯化;纯化蛋白进行SDS-PAGE纯度分析。结果 获得了正常中国人的PPARγ2 cDNA,并成功构建了高效原核表达质粒pET28a-PPARγ2;Western blot结果表明,经IPTG诱导,在大肠杆菌中表达了分子量为56×10^3的PPARγ2目的蛋白;表达产物经Ni^{2+}-NTA离子交换树脂纯化,PPARγ2蛋白的纯度大于90%以上。结论 克隆得到正常中国人PPARγ2 cDNA的序列与Genebank报道的序列一致,并且在*E. coli*中成功表达和纯化了PPARγ2蛋白。此研究为后续PPARγ2功能活性和配体的筛选实验奠定了基础。

关键词:PPARγ;cDNA;克隆;表达
中图法分类号:R785;R786;R378.21 文献标识码:A

Cloning and expression of human PPARγ2 cDNA in *Escherichia coli*

CAO Ting-bing, YE Zhi-jia, PENG Jia-he, GONG Yan, HUANG Gang (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clone and express human PPARγ2 cDNA in *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** PPARγ2 cDNA was obtained from total RNA isolated from adipose tissue of normal human face by RT-PCR and sequencing method, and then PPARγ2 cDNA was inserted into prokaryotic expression vector pET28a for the IPTG-induced expression in *E. coli* BL21(DE3). The expression product fused with 6×His at N-terminal was analyzed by Western blotting, and purified by using Ni^{2+}-NTA ion exchange resin. The purity of PPARγ2 protein was analyzed by SDS-PAGE. **Results** Normal human PPARγ2 cDNA was obtained, and the expression plasmid pET28a-PPARγ2 was constructed successfully. Western blot analysis showed that human PPARγ2 with 56×10^3 molecular weight was expressed in *E. coli* at 20 ℃. The purity of the recombined PPARγ2 was more than 90% after purification using Ni^{2+}-NTA ion exchange resin. **Conclusion** The sequence of Chinese PPARγ2 cDNA shows no difference to the known sequence from the Genbank. PPARγ2 induced and expressed in *E. coli* has been purified successfully.

Key words: PPARγ; cDNA; cloning; expression

过氧化物酶体增生物激活受体(peroxisome Proliferation-activated receptors,PPARs)属于核受体超家族的成员。以往对PPARs的认识不多,只知一些致细胞内脂过氧化物体增多增大的因子可活化这类受体并引起细胞的变化,故而得名。人的PPARs有α、β、γ 3种亚型[1~3]。近几年对PPARγ进行了深入的研究,作为核受体PPARγ参与了各种生物学途径的调节,比如促进脂肪细胞的分化、增强胰岛素的敏感性等。同时PPARγ与某些代谢性疾病,如2型糖尿病、动脉粥样硬化、肿瘤等的发生密切相关[4]。PPARγ有两种异构体PPARγ1和PPARγ2,这两种异构体是由于基因的5′末端选择性启动子和拼接方式的不同而形成的。PPARγ2比PPARγ1在N-末端多30个氨基酸。许多组织表达低水平的PPARγ1,而PPARγ2具有脂肪组织选择性并且在脂肪组织有高水平的表达。PPARγ与维甲酸受体RXR形成异源二聚体,再与DNA调控序列PPREs(PPAR response elements,PPREs)结合。PPREs是AGGNCA半位的直接重复序列,半位间被一个碱基所分隔。在糖、脂肪代谢相关基因的调控区存在PPREs,PPARγ通过与PPREs结合调节这些靶基因的表达。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070358);重庆市科技攻关资助项目(200126)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070358) and the Key Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Chongqing (200126)
作者简介:曹廷兵(1968-),男,重庆市璧山县人,实验师,主要从事真核基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261
通信作者:叶治家,电话:(023)68752261
收稿日期:2002-10-09;修回日期:2003-01-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

我们从正常中国人面部脂肪组织分离总 RNA，采用RT-PCR获得人的 PPARγ2 cDNA，并将之克隆至原核表达载体 pET28a 中进行测序鉴定，进一步将表达质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)进行表达研究。结果表明，所克隆中国人的 PPARγ2 序列与 GenBank 上的序列一致，PPARγ2 在大肠杆菌中获得成功表达，通过降低表达温度，可明显提高表达产物的可溶性。经 Ni^{2+}-NTA 离子交换树脂亲和层析纯化了 PPARγ2 融合蛋白。此研究为后续PPARγ2 的功能活性的研究及配体筛选奠定了基础。

1 资料与方法

1.1 主要试剂

Tripure RNA 分离试剂盒、逆转录试剂盒、pGEM-T Easy Vector、pET28a 原核表达载体购自 Promega 公司；Ni^{2+}-NTA 离子交换树脂和 QIA quick gel extraction kit 购自 Qiagen 公司；PMSF、β-巯基乙醇、T4 DNA 连接试剂盒购自 BM 公司；IPTG、PCR 引物和 PCR 试剂盒购自上海 Sangon 公司。

1.2 脂肪组织 RNA 的提取和纯化

取正常人(美容整形手术者)面部脂肪组织 300 mg 左右，按 Tripure RNA 提取试剂盒方法提取组织总 RNA。提取的 RNA 在紫外分光光度计上测 A_{260}值和 A_{260}/A_{280}比值，确定所提取 RNA 的浓度和纯度，然后进行 RNA 电泳，观察提取 RNA 的质量，按文献[5]方法进行。

1.3 引物设计及 RT-PCR

引物设计时在目的基因的上游 5′端引入 *Nde* Ⅰ 酶切位点，而在下游 3′端引入 *Xho* Ⅰ 酶切位点以便后续克隆。取 2 μg 总 RNA 以 40 nmol/L 的下游 3′端引物为引物合成 cDNA 第 1 条链，反应体积 25 μl，转录方法按 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。取 2 μl 逆转录产物进行 PCR，PCR 反应体积 50 μl；PCR 扩增参数如下：94 ℃，2 min；94 ℃，50 s→42 ℃，50 s→72 ℃，90 s，5 cycles；94 ℃，50 s→55 ℃，50 s→72 ℃，90 s，30 cycles；72 ℃，10 min。

1.4 PCR 产物的克隆

取 5 μl PCR 产物进行预电泳分析，再把其余的 PCR 产物全部电泳，紫外灯下切下目的片段用 QIA quick gel extraction kit 回收；取回收产物的 1/3 浓缩至 3 μl 后，用 pGEM-T Easy 克隆系统克隆，总反应体积 10 μl，方法按试剂盒说明书进行；取 5 μl 连接产物用于转化，在转化的平版上挑选 4 个白色菌落进行质粒 DNA 的提取、酶切鉴定等按常规方法进行。

1.5 PPARγ2 cDNA 序列分析

取 1 μg 经酶切鉴定的 pGEM-T- PPARγ2 质粒，用 T7 和 SP6 引物进行双向 DNA 序列分析。序列分析由上海 Sangon 公司测序部完成。

1.6 pET28a 高效原核表达载体的构建

测序质粒 pGEM-T-PPARγ2 用 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切，电泳回受 PPARγ2 cDNA 片段，然后插入经 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切的高效原核表达载体 pET28a 中。取 10 μl 连接产物转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中，在转化的平板上挑 6 个单菌落进行质粒 DNA 的提取、酶切鉴定等按常规方法进行。

1.7 重组质粒 pET28a-PPARγ2 在大肠杆菌中的表达及可溶性分析

挑取经酶切鉴定的高效原核表达质粒 pET28a-PPARγ2 单菌落，接种于 5 ml LB 液中(卡拉霉素 50 μg/ml LB)，37 ℃，200 r/min 过夜生长；按 1%的比例接种至 5 ml LB 液中，其余条件同上，培养至 A_{600}=0.8 时，加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG，此时将细菌从 37 ℃转入 20 ℃进行低温诱导表达 14 h，取 1.5 ml 细菌液，测 A_{600}值，离心收集细菌沉淀按 0.1 *A* 值加入 20 μl TE 缓冲液，在超声仪上破菌；12 000× g 20 min 离心 4 ℃；分别收集上清和沉淀；10%SDS-PAGE 电泳，检测超声后离心上清和沉淀中 PPARγ 的表达情况。

1.8 Western blot 分析

分别取诱导表达前的细菌和超声后离心上清，进行 10% SDS-PAGE 电泳，电泳完毕把蛋白转印硝酸纤维膜上，5%脱脂奶粉(1× PBS 配制)封闭，6× His 抗体 37 ℃孵育 30 min；1× PBST 洗膜 3 次；用 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h；1× PBST 洗膜 3 次；DAB 显色。

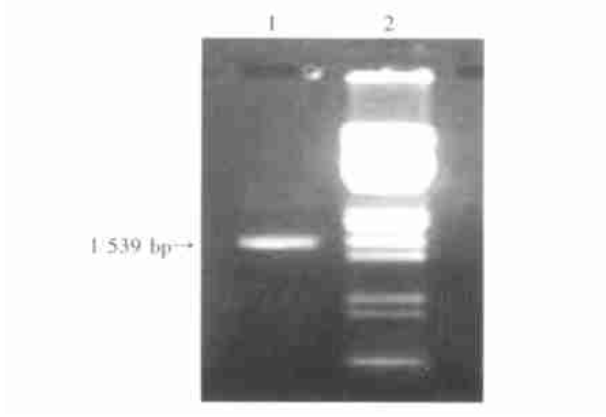
1.9 重组蛋白的 Ni^{2+}-NTA 离子交换树脂亲和层析

接种 pET28a-PPARγ2/BL21(DE3)菌种，37 ℃过夜振荡培养，次日按 1%的比例扩大培养 1 000 ml 菌液，当 A_{600}=0.8 时，加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG，此时把培养温度从 37 ℃转入 20 ℃，诱导表达 14 h，收菌，超声破菌，离心收集上清，然后进行 Ni^{2+}-NTA 树脂亲和层析，具体方法步骤见 Ni^{2+}-NTA 离子交换树脂亲和层析说明书。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，可见一条特异 DNA 条带，与预期值 1 539 bp 大小吻合(图 1)。



1：RT-PCR product；2：λ DNA marker/*Eco* RⅠ ＋*Hin* dⅢ

图 1 RT-PCR 产物 1.2%琼脂糖凝胶电泳结果

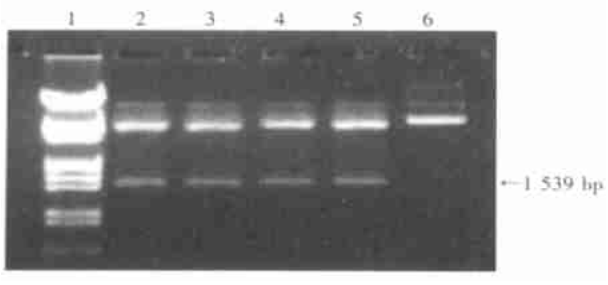
Fig 1 Results of RT-PCR products of electrophoresis by 1.2% agarose

2.2 PCR 扩增片段的克隆及酶切鉴定

在 RT-PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接转化的氨苄青霉

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

素抗性平板上挑 4 个白色单菌落, 用 *Nde*Ⅰ 和 *Xho*Ⅰ 双酶切, 4 个质粒均切出分子量为 1 539 bp DNA 条带(图 2)。



1: λDNA marker/*Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ; 2－5: Recombinant pGEM-T-PPAR; λ digested by *Nde*Ⅰ and *Xho*Ⅰ; 6: No. 5 recombinant pGEM-T-PPARγ undigested

图 2　重组质粒 **pGEM-T-PPARγ 2**的酶切鉴定

Fig 2　Identification of recombinant pGEM-T-PPARγ with enzyme digestion

2.3　重组子的序列测定

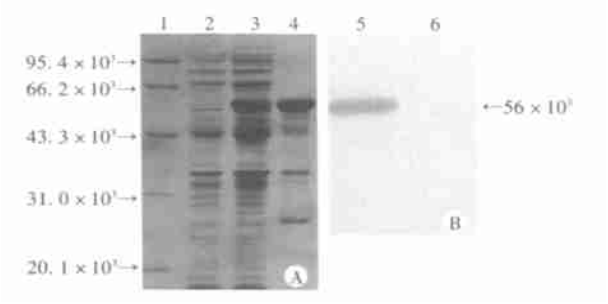
重组质粒 pGEM-T-PPARγ2 测序结果表明该序列与 Gene Bank 中编码人的 PPARγ2 cDNA 序列完全相同, 序列略。

2.4　pET28a-PPARγ2 重组质粒的酶切鉴定及在 *E.Coli* 中的表达

重组质粒双酶切后电泳显示被鉴定的 6 个质粒有 3 个能释放出 1 539 bp 的 DNA 片段, 酶切电泳图谱略。pET28a-PPARγ2/ BL21(DE3)重组菌 IPTG 诱导后, 有可溶性重组蛋白产生, 分子量为 56×10^3, 并且可溶性蛋白的含量为菌体总蛋白的 20%左右(图 3A)。

2.5　重组蛋白的 Western blot 分析

Western blot 结果显示, 诱导后的超声上清中有能与抗 6×His 单抗反应的蛋白, 其分子量约为 56×10^3, 与目的蛋白的理论计算值相吻合, 而诱导前的全菌中却没有条带出现(图 3B)。



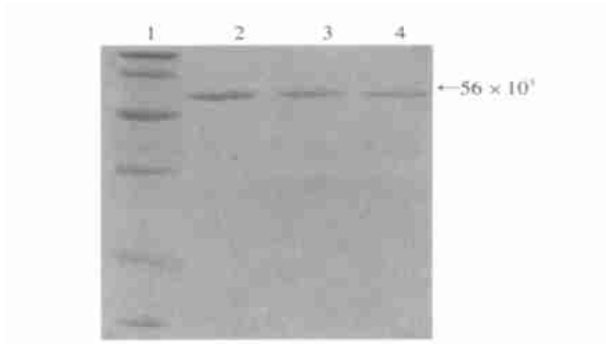
1: Protein molecule marker; 2: Total protein of pET28a-PPARγ2/ BL21 (DE3) before induction; 3: Ultrasound supernatant of pET28a-PPARγ2/ BL21(DE3) after induction; 4: Ultrasound deposit of pET28a-PPARγ2/ BL21(DE3) after induction; 5: Ultrasound supernatant of PET28a-PPARγ2/ BL21 (DE3) after induction; 6: Total protein of PET28a-PPARγ2/ BL21(DE3) before induction

图 3　重组蛋白的 **SDS-PAGE** 电泳图谱和 **Western blot** 分析

Fig 3　SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant proteins

2.6　重组蛋白 PPARγ2 的纯化

菌体超声上清经 Ni^{2+}-NTA 离子交换树脂亲和纯化; 收集洗脱峰进行 15%SDS-PAGE 分析, 结果显示纯化的 PPARγ2 蛋白纯度大于 90%以上(图 4)。



1: Protein molecule marker; 2－4: Collected fraction of the eluate

图 4　纯化重组蛋白的 **SDS-PAGE** 电泳图谱

Fig 4　SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins

3　讨论

PPARγ 在调节糖和脂代谢方面起重要作用。PPARγ 基因突变与肥胖、2 型糖尿病的发生相关。抗 2 型糖尿病的药物 TDZ 在体内作用的靶点就是 PPARγ。PPARγ2 的 115 位氨基酸突变致使 114 位的苏氨酸不能发生磷酸化, PPARγ2 的反馈抑制被解除, PPARγ2 处于持续激活状态, 导致严重肥胖[6]。相反的是, 112 位的脯氨酸突变成丙氨酸致使 PPARγ2 与配体的结合能力及转录激活活性降低, 结果引起以体质量低下为特征的 Finnish 疾病[6]。目前, 2 型糖尿病的发病率在我国有不断上升的趋势, 作者从正常中国人脂肪组织克隆获得 PPARγ2 cDNA, 序列分析结果表明, 中国人 PPARγ2 基因的序列与 Genebank 报道的完全一致。这样, 有关 PPARγ 已有的研究结果将为进一步研究 PPARγ 与我国 2 型糖尿病发病机制之间的关系所借鉴。

PPARγ 具有 2 型核受体的结构, 它包括一个 N 末端不典型的区域, 这个区域包含一个潜在的被称为 AF-1 转录激活功能区, 紧接着是一个有两个锌指结构的 DNA 结合区。在 C-末端有一配体结合域, 其分子模型显示是一个大的疏水口袋, 里面有一个被称为 AF-2 的配体依赖的转录激活功能区[7]。这类蛋白在大肠杆菌中表达由于不能形成正确的折叠, 可溶性较差。我们发现, 在 37 ℃下诱导表达, 可溶性重组蛋白的比例在 10%以下, 当把诱导温度降至 20 ℃, 诱导 14～16 h 后, 可溶性重组蛋白的比例约为 20%。可能的原因是进行低温诱导时减弱了蛋白表面疏水基的相互作用,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

降低了目的蛋白的表达速度,有利于蛋白的正确折叠而形成可溶性的天然空间结构。通过超声破菌,严格分离上清,再直接从上清中进行亲和层析分离纯化获得N端融合6×His的PPARγ2重组蛋白。免去了从包涵体分离蛋白、复性等的复杂步骤。我们分离获得的蛋白纯度在90%以上,可以直接用于配体结合活性的分析及新配体的筛选。

参考文献:

[1] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism[J]. Endocr Rev, 1999, 20(5): 649—688.

[2] Kliewer S A, Forman B M, Blumberg B, *et al*. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(15): 7355—7359.

[3] Tontonoz P, Hu E, Graves R A, *et al*. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer[J]. Genes Dev, 1994, 8(10): 1224—1234.

[4] Rosen E D, Spiegelman B M. PPARγ: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 37731—37734.

[5] 曹廷兵, 叶治家, 巩燕, 等. 一种快速鉴定RNA质量的方法[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(8): 992—993.

[6] Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease [J]. Nature, 2000, 405(6785): 421—424.

[7] Xu H E, Lambert M H, Montana V G, *et al*. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors[J]. Mol Cell, 1999, 3(3): 397—403.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)01-0060-02

造血干细胞移植治疗儿童急性白血病2例

Treating 2 cases of acute leukemia in children with hematopoietic stem cell transplantation

黄 宁, 徐世侠, 吴南海, 胡晓红, 王鹏云, 龚小军 (北京海军总医院儿科, 北京 100037)

在儿童急性白血病的治疗中,采用异基因造血干细胞移植,成为继化疗后又一突破性进展,为难治性急性白血病提供了一个有力的治疗措施[1],越来越受到人们的重视。我们应用HLA相合的同胞脐血移植治疗1例急性单核细胞白血病及1例急性淋巴肉瘤白血病患儿,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 病例

病例1,男,9岁。1997年11月因发热、咽痛伴进行性面色苍白、乏力全身10 d入院,经骨髓检查确诊为AML-M5b。住院后经DA(柔红霉素+阿糖胞苷)方案化疗一个疗程后缓解,相继用DA、HA(三尖杉质碱+阿糖胞苷)及中剂量的阿糖胞苷等方案强化治疗。脐血移植前1周采集自体骨髓按15 ml/kg采集600 ml,后经程控降温冻存于液氮中备用。移植前查体:身高132 cm,体质量31 kg,浅表淋巴结不肿大,心、肺正常,肝脾不大。外周血、骨髓及脑脊液检查均示CR。肝肾功能无异常,肝炎病毒全套检查均阴性,咽拭子、血、尿、大便细菌培养均阴性;血巨细胞病毒IgG(+),IgM(-),B超和X线胸片检查均示肝胆、胰、脾、肾正常。

病例2,男,11岁,体质量50 kg。1998年10月29日因"颈部肿物,皮肤瘀点10 d"入院。查体:肝肋下3 cm,剑下4 cm,脾肋下5 cm,血常规:白细胞54.5×10^9/L,幼稚细胞0.11,血小板42×10^9/L,骨髓原幼淋占0.98,诊断为L2型白血病。淋巴结活检确诊为淋巴肉瘤白血病(B细胞来源),血LDH 742 U/L,确诊:淋巴肉瘤白血病。经COI+L-asp(环磷酰胺、长春新碱、去甲氧柔红霉素、左旋门冬酰胺酶)诱导缓解治疗,第14天复查骨髓完全缓解。曾进行颅脑放疗(18 Gy)。诊断:急性淋巴肉瘤白血病(首次缓解)。本次入院查肝肾功、心电图、心脏彩超、脑片均正常,用威猛加阿糖胞苷强化后循环采血后采集自体骨髓,采集1 200 ml备用。

1.2 供者

例1患儿母亲再孕一男婴,并于产前(孕30周)行脐静脉取血做HLA配型。结果表明脐血HAL-A、B、DR位点儿与患儿完全相合;血型相合,均为O型。例2母亲再孕一女婴,分娩时留取脐血,行HLA配型,结果脐血HLA-A、B、DR位点与患儿完全相合。患者血型A,脐血B型。

1.3 移植过程

1.3.1 预处理方案 采用BU/CY2方案:马利兰(BU)1 mg/kg,1次/6 h,用4 d,共16次,环磷酰胺(CY)60 mg/kg·d,用2 d。

1.3.2 脐血采集 于母亲预产期前10天常规剖腹产,采用一次性无菌采血袋分别采集脐血150 ml(例1)及180 ml(例2),例1采集脐血有核细菌数3.7×10^7/kg,$CD34^+$3.9×10^5/kg,当天回输。例2同时留取6 ml作HLA配型,脐血未经分离全血—196 ℃液氮冷冻,预处理结束后解冻立即回输,回输脐血有核细胞数1.62×10^7/kg,$CD34^+$1.60×10^5/kg。

(下转63页)

作者简介:黄 宁(1943—),女,湖北省洪湖县人,主任医师,主要从事小儿哮喘、小儿血液病方面的研究。电话:(010)66958409

收稿日期:2002-11-05;修回日期:2003-08-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net