

鲈 *PPAR γ* 基因的克隆、组织表达及其抗体制备

钱云霞^{1,2*}, 杨孙孝², 梁洪², 钱伦², 钱凯先¹

(1. 浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310058;

2. 宁波大学生命科学与生物技术学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 根据 GenBank 上其他物种的 *PPAR γ* 基因序列设计兼并引物, 从鲈肝脏 cDNA 中扩增得到鲈 *PPAR γ* 基因 cDNA 序列 1 588 bp, 分析表明该基因的开放阅读框为 1 569 bp, 编码 522 个氨基酸, 理论等电点 6.06, 分子量 59.02 ku。将鲈 *PPAR γ* 氨基酸序列比对后发现与欧洲鲈同源性最高, 为 93.1%; 与金头鲷的同源性为 92.3%, 与人同源性也达到为 61.8%。用 RT-PCR 分析该基因组织表达模式, 结果表明, 鲈 *PPAR γ* 主要分布于肝脏、鳃和脂肪组织。将鲈 *PPAR γ* 开放阅读框 1 569 bp 序列克隆至原核表达载体 pET-28a(+) 构成 pET-28a-*PPAR γ* 1569 重组体, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3), 以终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 对其进行诱导表达 4 h, SDS-PAGE 电泳分析表明, pET-28a-*PPAR γ* 1569 菌株在 66 ku 处有 1 条特异的蛋白带, Western-blotting 检测表明该蛋白为鲈 *PPAR γ* 融合蛋白。用镍离子亲和柱纯化的鲈 *PPAR γ* 融合蛋白免疫小鼠得到其多克隆抗体。用间接 ELISA 法检测鲈 *PPAR γ* 抗体的抗体效价约为 1:16 000。实验结果为进一步研究鲈 *PPAR γ* 蛋白的生物学特性及功能奠定了基础。

关键词: 鲈; 过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ ; 组织表达; 抗体

中图分类号: Q 959.483; Q 786; S 917

文献标识码: A

过氧化物酶体增殖剂激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 是 Issemann 等^[1]于 1990 年在小鼠中发现的一种新型激素核受体, 因其能被某些小分子配体激活, 而且其表达与过氧化物酶体的增殖有关而得名。目前在哺乳动物、鸟类、两栖动物中发现 PPARs 存在三种亚型: *PPAR α* 、*PPAR β* (也称 *PPAR δ*) 和 *PPAR γ* , 分别由不同的基因编码, 具有组织分布特异性^[2]。

PPAR 配体包括内源性配体和外源性配体, 它们在结构上的共同特点是含有一个羧基功能基团和一个疏水区^[3]。对哺乳动物的研究认为, 白三烯 B₄、贝特类药物是 *PPAR α* 的配体, 亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸等不饱和脂肪酸是 *PPAR β* 的配体, 而前列腺素 PGJ₂ 和噻唑烷二酮 (thiazolidinedione) 是 *PPAR γ* 的特异性配体^[3-4]。但是配体对不同亚型 *PPAR* 的激活也不是绝对的, 如苯扎贝特 (bezafibrate) 即可激活 *PPAR α* , 也

可激活 *PPAR β* ^[5]。*PPAR* 被配体激活后, 和视黄酸 X 受体形成异源二聚体后结合到靶基因启动子上游特异的 *PPAR* 反应元件 (*PPAR* response elements, *PPRE*) 而调控这些靶基因的表达, *PPRE* 的结构特点是单碱基插入直接重复序列 DR1, 5'-AGGNCAAAGGTCA-3' 序列^[2-3]。而参与脂肪细胞分化和脂肪代谢的许多蛋白的基因启动子都含有 *PPRE* 序列, 这些蛋白也就成为 *PPAR* 的靶蛋白, 如脂酰辅酶 A 氧化酶, 肝脏脂肪酸结合蛋白等, 所以 *PPAR* 是研究脂类合成、分解、储藏的关键因子, 尤其是 *PPAR γ* 基因, 由于它还参与脂肪细胞的分化, 因而成为用来研究脂肪细胞分化和脂肪代谢调节的重要基因^[2-3, 6]。作为参与脂类代谢关键因子的 *PPAR* 基因在许多鱼中被分离克隆以及进行功能的研究, 这些鱼包括大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[7]、日本红鳍河豚 (*Fugu rubripes*)^[8]、欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[9]、海鲈 (*Salmo trutta*)^[10]、金

收稿日期: 2010-05-06 修回日期: 2010-06-04

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30671608); 浙江省自然科学基金项目 (M303345); 宁波市自然科学基金项目 (2006A610088)

通讯作者: 钱云霞, Tel: 0574-87600169, E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn

头鲷 (*Sparus aurata*) 和 欧 鲈 (*Pleuronectes platessa*)^[11], 这些研究表明, 鱼类也存在 3 种不同的 PPAR 类型, 它们由单独的基因编码并且表现出不同的组织分布类型。

鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 是目前我国海水网箱养殖的重要鱼类之一。本试验以鲈为研究对象, 通过克隆鲈 PPAR γ 基因, 研究其在组织中的分布, 将 PPAR γ 基因在大肠杆菌中进行融合表达、分离纯化并制备其多克隆抗体, 为鲈 PPAR γ 基因的生物功能研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

试验鲈购自宁波大世界水产市场。TaKaRa 1st Strand cDNA synthesis Kit, dNTP, Taq DNA 聚合酶, pMD18-T 载体, 内切酶和 DNA 凝胶回收试剂盒等为 TaKaRa 公司产品(大连)。Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 为本实验室保存。PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。TMB 显色液、小鼠抗 His-tag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和 BeyoECL plus 荧光检测试剂购自碧云天生物技术研究所。Ni-NTA His-Bind Columns 为 Merck 公司产品。SDS, Tris 等其他化学试剂为上海生工产品。

1.2 鲈肝脏 PPAR γ 基因的 cDNA 克隆和序列分析

参照 Trizol 试剂说明书提取鲈肝脏总 RNA。总 RNA 的逆转录反应按照 TaKaRa 1st Strand cDNA synthesis Kit 进行, 所合成的 cDNA 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。根据 GenBank 中已报道鱼类的 PPAR γ 基因的序列设计引物进行 PCR 扩增。具体序列: 上游引物 5' GT (C) C (A) GACATGG-TGGACAC3', 下游引物 5' TTGTTAAAG (T) G (T) CTAATACAAGTC3'。PCR 扩增的循环参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 进行以下 30 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 52 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$ (前 8 个循环每个循环降落 1 $^{\circ}\text{C}$) 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 割胶回收目的片段, 并与 pMD18-T 载体连接, 将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过蓝白斑筛选, 在选择培养基上挑取白色菌落, 少量培养后提取质粒 DNA, 进行酶切鉴定后送上海 Invitrogen 公司双向重复测序。在 GenBank 数据库中进行序列比较分析, 确定序列正确的质粒命

名为 pMD-18T-PPAR γ , 用 Bioedit 软件进行氨基酸序列比对, 用软件 MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net/>) 构建了 PPAR γ 的进化树。

1.3 鲈 PPAR γ 基因的组织表达分析

分别提取鲈肝、鳃、脾脏、大脑、肠、脂肪组织、肾、心脏和肌肉总 RNA, 逆转录为 cDNA, 方法同上。通过已经测序的鲈 PPAR γ 基因的 cDNA 序列和其他动物 PPAR γ 基因 DNA 序列跨内含子设计 RT-PCR 引物, 上游引物 PPGF: ACTACGCCT-CCATCTCCTCC, 下游引物 PPGR: GAAACCCTT-ACAGCCCTCAC, 扩增目的片段长度为 347 bp。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

以 18S 为内标 (AB089346), 上游引物 18SF: GTAGTTCGACCATAAACGATGCC, 下游引物 18SR: AGAAGTTGGACGCCGACCGCAC, 扩增片段长度为 373 bp。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。RT-PCR 电泳产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 鲈 PPAR γ 表达载体 pET-28a-PPAR γ 1569 的构建和筛选

以 pMD-18T-PPAR γ 质粒为模板进行 PCR 反应用以构建鲈 PPAR γ 表达载体 pET-28a-PPAR γ 。正向引物 gal569F 前加 *Nhe* I 酶切位点 GCTAGC, 为 GCTAGCATGGTGGACACCCAG; 反向引物 gal569R 前加 *Hind* III 酶切位点 AAGCTT, AAGCTT CTAATACAAGTCCTTCAT-GATC。PCR 目的片段经纯化后与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 α 菌株, 挑选阳性克隆, 提质粒, 将质粒经过 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后, 与同样经过双酶切的 pET28(+) 质粒连接, 转化 DH5 α 菌株, 挑选阳性克隆测序, 确认为鲈 PPAR γ 表达载体 pET-28a-PPAR γ , 将构建好的质粒转入 BL21 菌株, 进行下一步表达实验。

1.5 鲈 PPAR γ 融合蛋白诱导表达后的 SDS-PAGE 检测

将 BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 菌接入装有 5 mL (卡那霉素终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB 培养液的试管, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日取 100 μL 菌液接入 8 mL 卡那霉素 LB 培养液, 在 50 mL 三角烧瓶中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h。诱导组加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 转入 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 以上。对照

组不加 IPTG,同样在 30 °C 下诱导 4 h 以上。取诱导完的菌液 1 mL 至 1.5 mL 的离心管中,12 000 r/min 离心 1 min 去上清,加入 500 μ L 水,斡旋震荡沉淀菌液,加 2 \times 上样缓冲液 500 μ L,100 °C 下煮沸 5 min 后进行 SDS-PAGE 检测。含 pET-28a 空白载体的大肠杆菌 BL21 做同样处理后进行 SDS-PAGE。

1.6 鲈 PPAR γ 融合蛋白的 Western-blotting 检测

将未经染色的 SDS-PAGE 胶上的蛋白电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 (TBST 配置) 封闭过夜,用 TBST 洗膜 3 次。一抗为小鼠抗 His-tag 单克隆抗体,孵育 1 h 后 TBST 洗膜 3 次。二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,孵育 1 h 后 TBST 用洗膜 4 次。BeyoECL plus 荧光检测试剂进行化学发光反应,然后进行显影和洗片。

1.7 鲈 PPAR γ 融合蛋白的纯化

BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 菌经终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 30 °C 诱导 4 h 后,于 12 000 r/min 离心 10 min 去上清,加入 PBS (1 mol/L pH 7.4) 洗涤两次后超声波破碎,取破碎产物 12 000 r/min 离心 10 min 以分离上清和沉淀,分别取上清和沉淀进 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色以鉴定目的产物是否是包涵体形式。

由于目的产物成包涵体表达,取 200 mL 诱导表达后的菌液经超声处理,12 000 r/min 离心 10 min 得到沉淀,加入 4 mL 的溶解液 (6 mol/L 盐酸胍,20 mmol/L Tris-HCl,pH 9.7,0.5 mol/L NaCl,10 mmol/L DTT),37 °C 水浴 1 h 溶解包涵体。将溶解后的包涵体加入到平衡好的 His-Bind Columns (Ni-IDA) 柱中,用 pH 6.0 的 Tris-HCl 溶液逐步稀释去除盐酸胍,最后加入咪唑液 (20 mmol/L Tris,0.5 mol/L NaCl,500 mmol/L imidazole,pH 6.0) 洗脱目的蛋白,取少量蛋白进行 SDS-PAGE 分析其纯度。

1.8 鲈 PPAR γ 融合蛋白的多克隆抗体制备和抗血清滴度的测定

用考马斯亮蓝法测定纯化得到的目的蛋白含量。首次免疫将 1.2 mL (约 1.0 mg) 纯化的目的蛋白与完全弗氏佐剂以 1:1 体积比完全乳化,腹腔注射 1 周龄小白鼠。一星期后用相同剂量的目的蛋白 (1.2 mL) 和等体积不完全弗氏佐剂注射加强免疫,重复 3 次。末次免疫 1 周后眼眶取血,37 °C 水浴 2 h 后 12 000 r/min 离心分离血清,分装置 -70 °C 冻存。

用 ELISA 法测定多克隆抗体滴度。用包被缓冲液液稀释纯化后的 PPAR γ -His 重组蛋白 4 °C 过夜,次日用 TBST 缓冲液洗 3 次,然后各孔加入 ELISA 封闭液 200 μ L,37 °C 封闭 1 h 后再洗 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1 000),避光孵育 30 min,洗涤液洗涤 3 次,加入 200 μ L TMB 显色液、室温避光孵育 30 min 后加入 50 μ L 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。450 nm 波长处测吸光度。同时用免疫前小鼠血清作对照。

2 结果

2.1 鲈 PPAR γ 基因 cDNA 的克隆和氨基酸序列分析

以鲈肝脏 cDNA 为模板,经过 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖电泳显示特异的目的条带,大小在 1.6 kb 左右,与其它鱼类的 PPAR γ 基因大小一致,而以蒸馏水为模板的阴性对照 PCR 产物则没有目的条带 (图 1)。

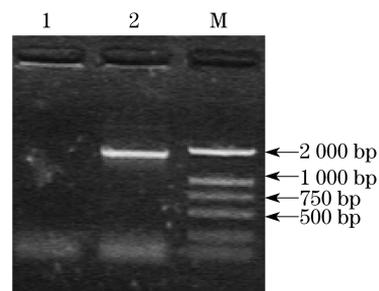


图 1 鲈 PPAR γ 基因 PCR 产物凝胶电泳分析

1. 阴性对照 PCR 产物; 2. PPAR γ PCR 产物; M. DL2000 DNA 标准分子量。

Fig. 1 Gel electrophoresis of *L. japonicus*

PPAR γ PCR product

1. Negative control PCR product; 2. PPAR γ PCR product; M. DL2000 DNA Marker.

将上述 PPAR γ 基因 PCR 产物纯化后与 pMD-18T 载体连接,进行克隆并测序,得到一 1 588 bp 的序列,在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 上进行比对后确认为鲈 PPAR γ 基因,其 CDS 序列长度为 1 569 bp,预测编码由 522 个氨基酸组成的蛋白,理论等电点为 6.06,分子量为 59.02 ku,序列已经登陆 genebank (登录号: DQ345545)。用 ScanProsite (www.expasy.ch/prosite/) 软件对鲈 PPAR γ 氨基酸序列进行功能位点分析发现,鲈 PPAR γ 蛋白 522 个氨基酸残基中共存在 4 个类型的 20 个功能位点,即 7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位

点,6个蛋白激酶 C 磷酸化位点,6个 N-十四酰化位点和1个亮氨酸拉链结构。和多数核受体一样,PPAR γ 的分子结构由 N 端的 A/B 区,DNA 结合域(DNA-binding domain,也叫 C 区),铰链区(hinge domain,D 区)和配体结合域 LBD (ligand-binding domain,E 区)组成(图 2)。DBD 是该蛋白

最保守的区域,和哺乳动物的保守性达到 90% 以上,鲈 PPAR γ DBD 的两个锌指结构分别位于 132~152 与 173~186 的氨基酸区域,其中第 2 个锌指结构的两个 Cys 间只有 3 个氨基酸残基(被 176~178 位的 DLN)隔开,不同于其他核受体由 5 个氨基酸将它们隔开(图 2)。

<i>L.japonicus</i>	-----MVDTQQLLAWPVGFSLNAVDLSELDSSHS	30
<i>D.labrax</i>	-----MVDTQQLLAWPVGFSLNAVDLSEPDSSHS	30
<i>P.flesus</i>	-----MVDTQQLLAWPVGFSLSAVDLSELDSSHS	30
<i>H.sapiens</i>	MGETLGDSPIDPESDSFTDLSANISQENTMVDT-EMPFWPTNFGISSVDLSVMEDHSHS	59
	← A/B domain	
<i>L.japonicus</i>	LNMKHLSTLDYASISSSSITSSLSPLVSCISSANVAYDPSPPQSEEHLTNMDYTNMHSY	90
<i>D.labrax</i>	LDMKHLSTLDYASISSSSIPSSLSPLVSCISPAGVAYDPSPTQSEEHLTNMDYTNMHIY	90
<i>P.flesus</i>	LDMKHLATLDYTSISSASVPSSLSPQLMSSISPVGMAYDPSPPQSEEHLTNMDYTNMHSY	90
<i>H.sapiens</i>	FDIKPFTTVDFSSISTP-----HYEDIPFTRTDPVVADYKYDLKQLQEQS-	104
<i>L.japonicus</i>	RTELDTHNSIKLEPESPPQYSD-SPVFSKLQDDTSTASLNIECRVCGDKASGFHYGVHAC	149
<i>D.labrax</i>	RTEQDTHNSIKLEPESPPQFSD-CPVFSKHQDDTPAAALNIECRVCGDKASGFHYGVHAC	149
<i>P.flesus</i>	RTEPNVHNSIKMEPESPPQYSD-SPVFSKLQDDPTAASLNIECRVCGDKASGFHYGVHAC	149
<i>H.sapiens</i>	-----AIKVEPASPPYYSEKTLQYNKPHEEPSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHAC	156
	→ DNA-binding domain	
<i>L.japonicus</i>	EGCKGFFRRTIRLKLVDHCDLQCRIHKKSRNKCQYCRFQKCLSVGMASHNAIRFGRMPQA	209
<i>D.labrax</i>	EGCKGFFRRTIRLKLVDHCDLHCRHKKSRNKCQYCRFQKCLNVGMASHNAIRFGRMPQA	209
<i>P.flesus</i>	EGCKGFFRRTIRLKLVDHCDLHCRHKKSRNKCQYCRFQKCLNVGMASHNAIRFGRMPQA	209
<i>H.sapiens</i>	EGCKGFFRRTIRLKLVDHCDLNCRIHKKSRNKCQYCRFQKCLAVGMASHNAIRFGRMPQA	216
	→ hinge Domain	
<i>L.japonicus</i>	EKEKLLAEFSSDMEHMHPEAADLRALARHLYEAYLYKYPPLTKAKARAILSGKTGDNAPFV	269
<i>D.labrax</i>	EKEKLLAEFSSDMEHMHPEAADLRALARHLYEAYLYKYPPLTKAKARAILSGKTGDNAPFV	269
<i>P.flesus</i>	EKEKLLAEFSSDMEHMHPEAADLRALARHLYEAYLYKYPPLTKAKARAILSGKTGDNAPFV	269
<i>H.sapiens</i>	EKEKLLAEISSDIDQLNPESADLRALAKHLYDSYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFV	276
<i>L.japonicus</i>	IHDMKSLMEGEQFINCRQMP SQEHQPQTSSLTIGHGGLTG VHPGSECAVL-----	319
<i>D.labrax</i>	IHDMKSLMEGEQFINCKQIPTQEHQPQTALS SVGHGGLMGAHLGSECNIL-----	319
<i>P.flesus</i>	IHDMKSLMEGEQFINCRQMP IQEQQ-QASVLTAAHGGGLTEVHMGS DYGVWGMTSISGQEP	328
<i>H.sapiens</i>	IYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQ-----S-----	302
	— ligand-binding domain	
<i>L.japonicus</i>	-DAVELRFFQSCQSRSAEAVREITEFAKSI PGFIDL DLNDQVTL LKYGVIEVLIIMM APL	378
<i>D.labrax</i>	-DAVELRFFHSCQSRSAEAVREVTEFAKSI PGFINL DLNDQVTL LKYGVIEVLIIMM APL	378
<i>P.flesus</i>	QNALELRFFQSCQSPSAEAVREVTEFAKSI PGFTDL DLNDQVTL LKYGVIEVLIIMM SPL	388
<i>H.sapiens</i>	-KEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSI PGFVNLDLNDQVTL LKYGVHEIIY TMLASL	361
	*	
<i>L.japonicus</i>	MNKDGTLISYGQIFMTREFLKSLRKPFQCMMEPKFEFSVKFNTLELDDSDMALFLAVIIL	438
<i>D.labrax</i>	MNKDGTLIAYGQIFMTREFLKSLRKPFQCMMEPKFEFSVKFNTLELDDSDMALFLAVIIL	438
<i>P.flesus</i>	MNKDGTLISYGQIFMTREFLKSLRKPFQCMMEPKFEFSVKFNTLELDDSDMALFLVVIIL	448
<i>H.sapiens</i>	MNKDGVLISEGQGFMTREFLKSLRKPFQDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIL	421
<i>L.japonicus</i>	SGDRPGLLNKPIERLQETVLHSLLELQLKLNHPDSLQLFAKLLQKMTDLRQIVTDHVHFI	498
<i>D.labrax</i>	SGDRPGLLNKPIEQLOETVLHSLLELQLKLNHPDSLQLFAKLLQKMTDLRQIVTDHVHLI	498
<i>P.flesus</i>	SGDRPGLLNKPIEQLOETVLHSLLELQLKLNHPDSLQLFAKLLQKMTDLRQIVTDHVHLI	508
<i>H.sapiens</i>	SGDRPGLLNKPIEDIQDNLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLL	481
	*	
<i>L.japonicus</i>	QLLKKTEVDMCLHPLLQEI MKDLY	522
<i>D.labrax</i>	QLLKKTEVDMCLHPLLQEI MKDLY	522
<i>P.flesus</i>	QLLKKTEIDMCLHPLLQEI MKDLY	532
<i>H.sapiens</i>	QVIKKTETDMSLHPLLQEI YKDLY	505

图 2 鲈 PPAR γ 的氨基酸序列与其他 2 种鱼及人 PPAR γ 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of *L. japonicus* PPAR γ amino acid sequence and those of 2 fishes and human

对鲈 $PPAR\gamma$ 氨基酸序列进行比对后发现与同为鲈形目的欧洲鲈同源性最高,为 93.1%;与金头鲷的同源性为 92.3%,与人的同源性也达到 61%。根据基因库中报道的鱼和其它生物的 $PPAR\gamma$ 氨基酸序列,我们用软件 MEGA4.0 (<http://www.megasoftware.net/>) 构建了 19 种动物的 $PPAR\gamma$ 的系统进化树(图 3)。从进化树可以看出,不同动物中的 $PPAR\gamma$ 蛋白可以分为 3 个大组,这一结果符合已知的进化规律。第 1 组为两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物,鱼类构成两大组,

鲑鳟鱼类的大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)构成第 2 组;鲈和其他鱼类构成第 3 组。

2.2 鲈 $PPAR\gamma$ 基因的组织表达分析

利用灰度分析软件 Kodak Digital Science 1D 对半定量 RT-PCR 结果进行分析后发现,鲈 $PPAR\gamma$ 基因在所检测的 9 个组织中都有不同水平的表达。其中以肝脏、鳃和脂肪组织的表达为最高,其次是脾、大脑、肠和肾,心脏和肌肉的表达量最小(图 4)。

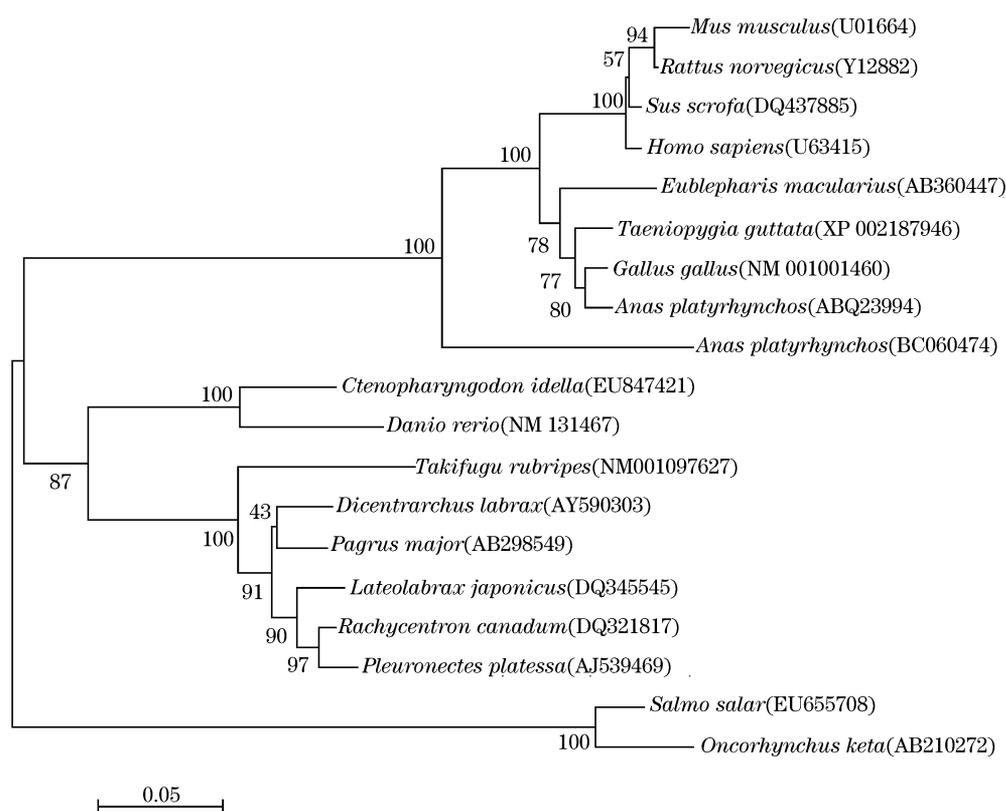


图 3 鲈与其他物种 $PPAR\gamma$ 氨基酸序列进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of $PPAR\gamma$ amino acid sequence of *L. japonicus* and other species

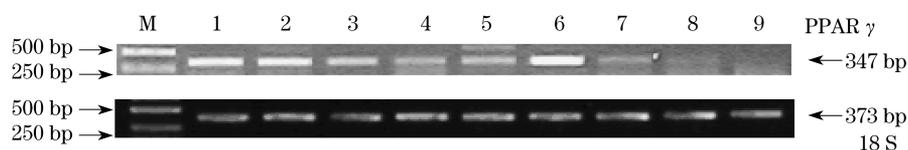


图 4 RT-PCR 分析鲈 $PPAR\gamma$ 基因的组织表达模式

M:DL2000 标准分子量。1. 肝; 2. 鳃; 3. 脾脏; 4. 大脑; 5. 肠; 6. 脂肪组织; 7. 肾; 8. 心脏; 9. 肌肉。

Fig. 4 *L. japonicus* $PPAR\gamma$ expression profiles in different tissues

M:DL2000 markers. 1. liver; 2. gill; 3. spleen; 4. brain; 5. intestine; 6. lipid; 7. kidney; 8. heart; 9. muscle.

2.3 重组鲈 PPAR γ 诱导表达及 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

将构建正确的 pET-28a-1569 质粒转入 BL21 (DE3) 菌株,诱导表达后经 SDS-PAGE 检测发现,经过 1 mmol/L IPTG 在 30 °C 诱导 4 h 后,该菌株比没有经过 IPTG 诱导的菌株和只转入 pET-28a 空质粒的 BL21 (DE3) 菌株在 66 ku 左右多出一条带(图 5-A)。Western-blotting 实验结果显示(图 5-B),pET-28a-1569 质粒在 BL21 (DE3) 菌株中经过 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后存在能与抗 6 \times His 单抗反应的蛋白,其分子质量约为 66 ku 左右,与目的蛋白的理论计算值相吻合,而转入 pET-28a 质粒的 BL21 (DE3) 菌液和转入 pET-28a-1569 质粒诱导前的菌液不能与 6 \times His 单抗反应。以上实验说明 pET-28a-1569 质粒在 BL21 (DE3) 菌株中经过 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后表达了 PPAR γ 的 His 融合蛋白。

2.4 重组鲈 PPAR γ 表达产物的分离纯化和抗体制备

鲈 PPAR γ 的 His 融合蛋白表达菌体经超声波破碎高速离心处理后,分别取上清、沉淀进行 SDS-PAGE 电泳(图 6-A),从结果得知 PPAR γ 蛋白主要在沉淀中,即以包涵体形式存在。将包涵体溶解后加入到 His-Bind Columns(Ni-IDA)柱纯化,SDS-PAGE 电泳分析结果见图 6-B,纯化的

PPAR γ 蛋白经计算机扫描分析表明其纯度在 85% 以上。将纯化后的鲈 PPAR γ 的 His 融合蛋白免疫小鼠,经过 4 次免疫后得到鲈 PPAR γ 的多克隆抗体。以纯化后的融合蛋白 PPAR γ 为包被抗原,抗 PPAR γ 多克隆抗体为夹心抗体,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为酶标二抗,进行 ELISA 检测,滴定曲线如图 7 所示。结果表明,经 4 次免疫后,抗体效价达到 1:16 000。

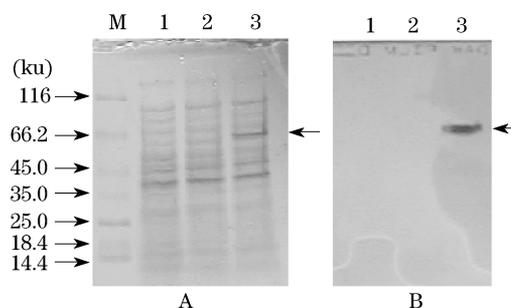


图 5 鲈 PPAR γ 蛋白的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western-blotting 检测(B)

M: 蛋白标准分子量; 1: BL21 (DE3)/pET-28a; 2: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 无 IPTG 诱导; 3: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h。

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blotting for recombinant PPAR γ of *Lateolabrax japonicus*

M: Protein Marker; 1: BL21 (DE3)/pET-28a; 2: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 without IPTG induction; 3: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 induced 4 h by 1mmol/L IPTG.

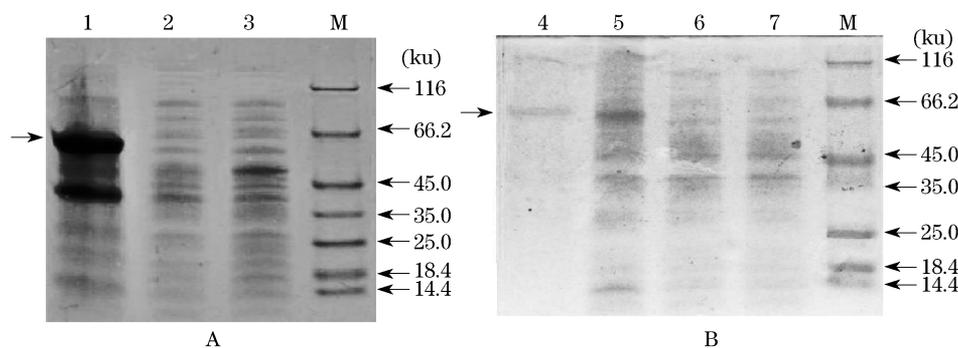


图 6 PPAR γ 重组表达产物与纯化产物的 SDS-PAGE 检测

M: 蛋白标准分子量; 1: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 经 IPTG 诱导超声后沉淀; 2: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 经 IPTG 诱导超声后上清; 3, 6: 无 IPTG 诱导 BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 对照; 4: 经 IPTG 诱导 BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 超声后沉淀的纯化产物; 5: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 经 IPTG 诱导总蛋白; 7: BL21 (DE3)/pET-28a 经 IPTG 诱导总蛋白。

Fig. 6 SDS-PAGE analysis for the purified protein of BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569

M: standard protein marker; 1: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 ultrasonic deposit induced by IPTG; 2: BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 ultrasonic supernatant induced by IPTG; 3, 6: non-induction control; 4: purified product from BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 ultrasonic deposit induced by IPTG; 5: total proteins of BL21 (DE3)/pET-28a-PPAR γ 1569 induced by IPTG; 7: total proteins of BL21 (DE3)/pET-28a induced by IPTG.

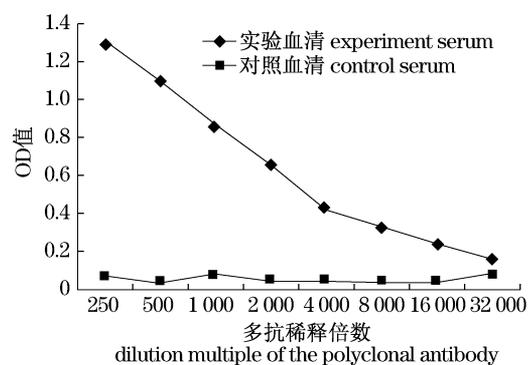


图7 ELISA 检测鲈 PPAR γ 蛋白的多克隆抗体
Fig.7 Indirect ELISA analysis of the polyclonal antibody for Seaperch PPAR γ

3 讨论

我们根据其他动物的 PPAR γ 序列设计兼并引物,用 RT-PCR 的方法率先在鲈肝脏中克隆到 PPAR γ 基因编码区序列,该序列编码由 522 个氨基酸组成的蛋白质。蛋白质序列分析发现,和多数核受体一样,鲈 PPAR γ 的分子结构由 N 端的 A/B 区, DNA 结合域 DBD, 铰链区和配体结合域 LBD 组成。PPAR 不同于其他核受体的特征之一是其 DBD 的第 2 个锌指结构只有 3 个氨基酸残基将两个 Cys 隔开,而其他核受体由 5 个氨基酸将它们隔开(图 2), 鲈 PPAR 蛋白也具有这一特征,而且它与欧洲鲈、金头鲷 PPAR γ 蛋白同源性均高达 90% 以上,因而可以确定我们克隆到的是 PPAR γ 基因。

DNA 结合域是整个 PPAR γ 分子中最保守的部分, 鲈与欧洲鲈、金头鲷和欧鲈 (*Platichthys flesus*) 在 DBD 区域的同源性都高达 98.4%, 与人的同源性也达到 92.3%。Leaver 等^[11] 对金头鲷和欧鲈的研究发现, PPAR 的 DNA 结合域的结合特性在低等脊椎动物鱼类中是保守的, 因而和哺乳动物的 PPAR 一样, 鱼类 PPAR 和视黄酸 X 受体形成二聚体后, 可以和哺乳动物和鱼类某些基因的 PPARE 结合, 推测鱼类 PPAR 依赖的转录激活的目标基因需要哺乳动物类似的启动子结构。到目前为止, 已经在牙鲆 (*Pleuronectes platessa*) 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 基因中发现有 PPARE-like 结构, 而过氧化物酶体增殖剂会引起 GST 基因的表达增加^[12]。

配体结合域 LBD 在 PPAR 结构中也是比较保守的, 鲈与欧洲鲈、金头鲷和人在该区域的同源

性分别为 92.9%、92.1% 和 66.1%。对人 PPAR γ 的空间结构研究表明, 其 G286 和 K303 之间是一个由 16 个氨基酸残基组成的环状结构, 和配体结合后构象会发生变化^[13-14], 而鲈和欧洲鲈 PPAR γ 在该区域为 40 个氨基酸残基, 欧鲈为 51 个氨基酸(图 2)。

在哺乳动物中, PPAR γ 能有效地被单不饱和脂肪酸等天然配体激活, 但是, 这些天然配体对鱼类 PPAR γ 并没有转录激活作用, 同样, 哺乳动物 PPAR γ 的人工配体罗格列酮 (rosiglitazone) 和 GW1929 对金头鲷 PPAR γ 几乎没有激活作用^[11]。人 PPAR γ 的激活作用是基于其配体结合域 LBD 的两个组氨酸 H351 和 H477(图 2 带星号部分) 和噻唑烷二酮及其他脂肪酸配体形成氢键^[13], 所以 Leaver 等^[11] 认为脂肪酸等配体对金头鲷 PPAR γ 没有激活作用的原因是与 H351 对应的氨基酸在金头鲷 PPAR γ 中被异亮氨酸替代的缘故(与人 PPAR γ 中 H477 对应的氨基酸在金头鲷中保持不变)。和欧洲鲈、金头鲷、欧鲈等一样^[9,11], 鲈 PPAR γ 中与人 H351 对应的氨基酸也被异亮氨酸替代, 但是哺乳动物 PPAR γ 的配体是否对鲈 PPAR γ 有激活作用还有待研究。

在哺乳动物中, LBD 末端的 AF2 基序和一些共激活子 (coactivator) 作用, 对核受体配体依赖的转录活性是必需的^[15]。将人 PPAR γ 蛋白的 AF2 基序去掉后, 其转录活性会降低, 核受体和共激活子间的相互作用由于 AF2 基序的缺失而受到影响^[16]。鲈 PPAR γ 蛋白 LBD 的 C 末端也存在 AF2 基序(图 2 双划线部分), 推测其实现转录功能时也需要共激活子的作用。

在啮齿动物中, PPAR γ 主要分布在脂肪组织、脾脏以及单核细胞、巨噬细胞等免疫细胞中, 这与啮齿动物 PPAR γ 的功能为调控脂肪细胞的分化和参与炎症反应相适应^[17]。但我们对鲈 PPAR γ 基因在各个组织中的表达进行 RT-PCR 分析却发现, 鲈的 PPAR γ 基因在心脏、脑、肝脏、肌肉、脾脏、肾脏、鳃和脂肪组织中都有表达, 其中以肝脏、鳃和脂肪组织的表达为最高, 其次是脾、大脑、肠和肾, 心脏和肌肉的表达量最小。这与其他学者对斑马鱼、金头鲷和欧鲈 PPAR γ 的组织分布结果类似, 推测鱼类 PPAR γ 在功能上可能与哺乳动物不同^[11,18]。

我们通过构建鲈 PPAR γ 原核表达载体 pET-

28a-PPAR γ 1569,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达了鲈 PPAR γ ,并将纯化的目标蛋白免疫小鼠制备了鲈 PPAR γ 多克隆抗体,结果表明,该抗体可以特异性的识别纯化的鲈 PPAR γ 蛋白,说明我们制备的多克隆抗体具有良好的免疫学活性,能够满足用免疫学的方法研究鲈 PPAR γ 的蛋白组织分布、细胞内定位等,并为研究鲈 PPAR γ 蛋白功能提供了重要工具。

综上所述,本研究对我国主要海水经济鱼种之一鲈 PPAR γ 基因进行了克隆,用 RT-PCR 对其组织表达做了分析,并在原核系统中得到了 PPAR γ 表达产物,在此基础上制备了抗体,为进一步研究鲈 PPAR γ 蛋白的功能研究奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. Nature, 1990, 347 (6294): 645 - 650.
- [2] Keller H, Dreyer C, Medin J, et al. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers [J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90(6) : 2160 - 2164.
- [3] Hiji A K, Michalik L, Wahli W. PPARs: Transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59 (5): 790 - 798.
- [4] Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, et al. PPARs and their metabolic modulation; new mechanisms for transcriptional regulation? [J]. Journal of Internal Medicine, 2007, 262(2) : 184 - 198.
- [5] Peters J M, Aoyama T, Burns A M, et al. Bezafibrate is a dual ligand for PPAR α and PPAR β ; studies using null mice [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1632 (1 - 3): 80 - 89.
- [6] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors; nuclear control of metabolism [J]. Endocr Rev, 1999, 20(5) : 649 - 688.
- [7] Andersen O, Eijssink V G, Thomassen M, et al. Multiple variants of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma are expressed in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Gene, 2000, 255(2) : 411 - 418.
- [8] Maglich J M, Caravella J A, Lambert M H, et al. The first completed genome sequence from a teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(14) : 4051 - 4058.
- [9] Boukouvala E, Antonopoulou E, Favre-Krey L. Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Lipids, 2004, 39(11) : 1085 - 1092.
- [10] Batista-Pinto C, Rodrigues P, Rocha E, et al. Identification and organ expression of peroxisome proliferator activated receptors in brown trout (*Salmo trutta fario*) [J]. Biochim Biophys Acta, 2005 (2), 1731 : 88 - 94.
- [11] Leaver M J, Boukouvala E, Antonopoulou E. Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish [J]. Endocrinology, 2005, 146(7) : 3150 - 3162.
- [12] Leaver M J, Wright J, George S G. Structure and expression of a cluster of glutathione S-transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*) [J]. Biochem J, 1997, 321(2) : 405 - 412.
- [13] Nolte R T, Wisely G B, Westin S, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. Nature, 1998, 395 (6689): 137 - 143.
- [14] Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, et al. Crystal structure of the ligand binding-domain of the human nuclear receptor PPAR γ [J]. J Biol Chem, 1998, 273 (47): 31108 - 31112.
- [15] Evans R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily [J]. Science, 1988, 240(4854): 889 - 895.
- [16] Gelman L, Zhou G, Fajas L, et al. p300 interacts with the N-and C-terminal part of PPAR γ 2 in a ligand-independent and-dependent manner, respectively [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (12): 7681 - 7688.
- [17] Rosen E D, Spiegelman B M. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and growth [J]. J Biol Chem, 2001, 276(41) : 37731 - 37734.
- [18] Ibabe A, Bilbao E, Cajaraville M P. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Histochem Cell Biol, 2004, 118(3) : 231 - 239.

Gene cloning, tissue expression and preparation of monoclonal antibody of *Lateolabrax japonicus* PPAR γ

QIAN Yun-xia^{1,2*}, YANG Sun-xiao², LIANG Hong², QIAN Lun², QIAN Kai-xian¹

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of ligand-activated nuclear transcription factors that play pivotal roles in lipid and energy homeostasis. A cDNA of 1 688 bp encoding PPAR γ was isolated from liver total RNA of Japanese Seaperch (*Lateolabrax japonicus*) using RT-PCR by degenerate primers based on sequence of other animals published on GenBank. The obtained 1 688 bp Seaperch PPAR γ included 1 569 bp open reading frame encoding a protein of 522 amino acid residues with a theoretical pI of 6.06 and molecular weight of 59.02 ku. The blast analysis indicated that the deduced amino acid sequence of Seaperch PPAR γ shared the highest identity of 93.1% with *Dicentrarchus labrax*, 92.3% with *Sparus aurata* and 61.8% with *Homo sapiens*. RT-PCR analysis showed that the Seaperch PPAR γ was ubiquitously expressed in 9 tissues tested, with the highest expression in liver, gill and lipid tissues, followed by spleen, brain, intestine and kidney, the lowest in heart and muscle. The cDNA sequence of PPAR γ open reading frame was cloned into a prokaryotic expression vector pET-28a(+). The recombinant plasmid pET-28a-PPAR γ 1569 was transfected into *Escherichia coli*. BL21(DE3)pLysS and the PPAR γ expression was induced at 30 °C by addition of 1 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. After 4 h induction with IPTG, the expressed recombinant protein with an apparent molecular mass of 66 ku was found by SDS-PAGE and confirmed by Western-blotting using an antibody specific to 6-His tag. The expressed PPAR γ protein was insoluble and present in the inclusion bodies. These inclusion bodies were solubilized by 6 mol/L guanidine hydrochloride and purified on a Ni²⁺ affinity column (Ni²⁺ His-binding column). After purification, the recombinant PPAR γ was used to immunize mice and the specific polyclonal antibody was obtained. Indirect ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) was established to test the titer of the polyclonal antibody, the result was positive and the titer reached 16 000. Our research serves as a basis for further research into fish PPAR γ 's biological characterization and function.

Key words: Japanese seaperch (*Lateolabrax japonicus*); peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ); tissue expression; antibody

Corresponding author: QIAN Yun-xia. E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn