

# C57BL/6J 小鼠脂肪组织总 RNA 提取及 周脂素基因的克隆

卫兵艳, 刘田福, 郭永昌, 张引红

(山西医科大学实验动物中心, 太原 030001)

**【摘要】** 目的 用改进后的方法提取高质量的 RNA, 以此为模板, 应用 T-A 克隆法克隆 C57BL/6J 小鼠周脂素基因编码区, 对其进行测序验证, 并与 GenBank 比对。方法 在试剂说明书基础上, 改进提取脂肪组织 RNA 的方法, 从 C57BL/6J 附睾脂肪组织提取高质量的总 RNA, 用 RT-PCR 扩增出周脂素编码区基因, 并将目的基因编码区克隆入 pMD18-T 载体中, 转化 E. coli JM109 后, 筛选阳性克隆, 通过限制性内切酶酶切鉴定后, 对其进行测序验证, 并与 GenBank 比对。结果 用改进后的方法成功提取出了高质量的总 RNA, 并且成功提取构建的重组载体中含有周脂素基因的全长序列, 与 GenBank 公布的序列一致。结论 改进的后的脂肪组织 RNA 提取方法是可行的, 并获得周脂素基因的 cDNA, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

**【关键词】** RNA 提取; 周脂素; RT-PCR; 基因克隆; 序列分析

**【中图分类号】** Q781; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0035-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.08.009

## Extraction of Total RNA from C57BL/6J Mouse Adipose Tissue and Cloning of Perilipin Gene

WEI Bing-yan, LIU Tian-fu, GUO Yong-chang, ZHANG Yin-hong

(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

**【Abstract】 Objective** Using an improved method to extract high quality total RNA from mouse epididymal adipose tissue, to clone and analyze the full-length cDNA encoding perilipin. **Methods** According to the specification of reagent, the extraction procedure of total RNA from adipose tissue was modified to extract high quality total RNA from C57BL/6J mouse epididymal adipose tissue. The cDNA encoding perilipin was amplified by RT-PCR using the total RNA. The PCR product was cloned into pMD18-T easy vector and then transformed into E. coli JM109. The recombinant plasmid was identified with restriction enzyme digestion analysis and nucleotide sequencing. **Results** Using the improved method we successfully extracted high quality total RNA. The recombinant pMD18-T easy vector had a complete open reading frame of perilipin and shared 100% homology with the sequence of mRNA for perilipin reported in GenBank. **Conclusions** The improved extraction method of total RNA from fat tissue is feasible. The cDNA of perilipin is successfully cloned, which will be helpful for the further research on its biological function.

**【Key words】** RNA extracting; perilipin; RT-PCR; clone; sequence analysis

脂肪组织不仅是机体的能量储存库, 还是体内 很大的内分泌器官; 它可以合成或分泌多种具有广

[作者简介] 卫兵艳(1984-)女, 硕士生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: wbyan2009@126.com。

[通讯作者] 刘田福(1954-)男, 教授, 研究生导师, 主要研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdltf@yahoo.com.cn。

泛生物活性的蛋白质或细胞因子,包括周脂素(perilipin)、脂联素(adiponectin)、瘦素(leptin)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素6(IL-6)<sup>[1-2]</sup>等这些因子与许多肥胖相关性疾病如胰岛素抵抗、糖尿病、内皮功能障碍、高血压病、动脉硬化症等有关。体内能量代谢的核心反应是脂肪细胞的脂解。近年的研究表明<sup>[3]</sup>,该反应主要由脂酶从胞液易位至细胞内脂滴的表面来调控的,该脂滴表面包被的蛋白中周脂素的磷酸化是 HSL 易位所必需的。由于周脂素在脂质分解中的重要作用,故成为近年来研究的热点。

周脂素是一种新近在大鼠附睾脂肪组织中发现并命名的高磷酸化蛋白,特异表达于脂肪细胞和类固醇生成细胞脂质小滴表面<sup>[4]</sup>。新近研究表明,脂肪分解调控中的关键蛋白 perilipin 可能和 2 型糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化等多种代谢性疾病及心血管疾病有关<sup>[4-6]</sup>。但其作用机制尚不完全清楚。虽然周脂素的功能研究取得了一定进展,但关于周脂素的作用机制以及重组基因药物产品开发等方面,还有待进一步研究。

以脂肪组织为材料提取高质量的总 RNA 主要存在两方面的问题:第一,脂肪组织 RNA 含量较少,每毫克组织样品所得总 RNA 的量小于 0.05  $\mu\text{g}$ ;第二,内源和外源性 RNA 酶对 RNA 的降解。因而所提 RNA 的得率较低。为获得高质量的 RNA 制品,本实验以脂肪组织为材料,经反复试验,在商家提供的总 RNA 提取试剂的操作步骤基础上优化和改进了某些提取过程,从而得到了符合实验要求的高质量的总 RNA。利用改进后的方法提取了 C57BL/6J 小鼠脂肪组织 RNA。以此为模板进行 RT-PCR,克隆了周脂素基因并对核酸序列进行分析,为下一步进行重组周脂素的大量表达及其生物学功能研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物: C57BL/6J 小鼠购于山西医科大学实验动物中心,生产许可证号: SCXK(晋 2009-0001)。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[7]</sup>。

1.1.2 载体及宿主菌:受体菌 E. coli JM109 由本室保存; pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.3 其他相关试剂: RNAiso<sup>TM</sup> Plus、限制性内切

酶 *Spe* I 和 *Not* I、DNA marker,均购于大连 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒购于 OMEGA 公司, LAMP 二步法 RT-PCR 试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、加 A 试剂盒均购于北京康为世纪生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取:按照试剂盒说明书进行,部分操作步骤做相应的改进:(1)取新鲜的脂肪组织并将样品的量加大到 1 g, RNAiso<sup>TM</sup> Plus 的量加大到 20 mL。(2)第 1 次离心后上层含有大量油脂,用吸头除去,保证完全去除油脂污染,然后再离心 5 min。(3)进行两次氯仿抽提,以去除 DNA 的污染。(4)用 75% 的乙醇洗 RNA 沉淀后,再用无水乙醇洗 1 次,缩短 RNA 沉淀晾干的时间,可避免 RNA 在空气中暴露时间过长而增加外源 RNase 对 RNA 的降解。紫外分光光度计测定 RNA 的纯度及含量,利用琼脂糖凝胶电泳快速鉴定所提取的总 RNA 的质量。

1.2.2 引物设计、反转录-聚合酶链反应及其产物纯化

1.2.2.1 引物设计与合成:根据 GenBank 中 C57BL/6J 小鼠周脂素的基因的序列,设计引物:序列如下(下划线部分为酶切位点,斜体部分为保护性碱基):5'端引物:5'-GGACTAGTCTTGGGCGTTTGCCCTTACCT-3'(引入 *Spe* I 酶切位点及保护性碱基),3'端引物:5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCCTTGACGAGCAGCGACCTT-3'(引入 *Not* I 酶切位点及保护性碱基)用于扩增周脂素全长编码区。该引物由北京奥科公司合成。

1.2.2.2 RNA 逆转录为 cDNA:在 0.2 mL 的 PCR 管中加入下列成分:总 RNA (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , Oligo d (T) 18 (100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.5 mmol/L each) 4  $\mu\text{L}$ , 灭 RNA 酶水 4  $\mu\text{L}$ ,混匀后置 PCR 仪中 65 $^{\circ}\text{C}$  5 min,迅速冰浴 10 min,短暂离心后继续加入下列成分:5  $\times$  RT buffer 5  $\mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂 (20 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 0.1 mol/L DTT 2  $\mu\text{L}$ ,混匀后置 PCR 仪中,37 $^{\circ}\text{C}$ ,孵育 2 min 后加入 HiFi-MMLV 逆转录酶 (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,混匀后置 PCR 仪中,37 $^{\circ}\text{C}$  50 min,终止反应,置 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

1.2.2.3 周脂素基因的扩增:在 0.2 mL 的 PCR 管中加入下列成分:cDNA 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  LAMP PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的正、反义引物各 2  $\mu\text{L}$ , dNTP Mix (2.5 mmol/L each) 4  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$  RT-PCR

enhancer 10  $\mu$ L, LAmp DNA polymerase 0.5  $\mu$ L 加双蒸水补足体积至 50  $\mu$ L, 混匀后置 PCR 仪中。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 终止反应。取 PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 紫外灯下观察电泳结果并照相。

1.2.2.4 PCR 产物的纯化回收: PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外灯下切取含有目的基因的琼脂糖凝胶块, 按胶回收试剂盒说明书中的方法, 回收胶块中的目的片段。

1.2.3 周脂素基因编码区克隆、酶切及其 DNA 序列分析:

1.2.3.1 PCR 产物加 A: 纯化的目的基因 7  $\mu$ L, dATP 1  $\mu$ L, 10 $\times$  A-tailing buffer 1  $\mu$ L, Tag DNA polymerase 1  $\mu$ L, 混匀后置 PCR 仪中, 72 $^{\circ}$ C 保温 30 min。

1.2.3.2 PCR 产物 T-A 克隆及鉴定: 在 10  $\mu$ L 连接反应体系中, 将加 A 的目的片段与 pMD18-T 载体按摩尔数 3:1 混合, 加入 T<sub>4</sub> DNA 连接酶和连接缓冲液, 22 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 65 $^{\circ}$ C 10 min 灭活 T<sub>4</sub> DNA 连接酶, 然后取上述连接产物 10  $\mu$ L 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌 100  $\mu$ L, 将转化后的 DH5 $\alpha$  涂布于含氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 及 X-Gal (40  $\mu$ g/mL)、IPTG (24  $\mu$ g/mL) 的 LB 固体培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单个白色菌落置于 LB 液体培养基中, 扩大培养后提取质粒, 经 *spe* I / *Not* I 双酶切鉴定含有目的基因的质粒由大连 TaKaRa 公司进行 DNA 测序, 并将测序结果与 GenBank 中的已知基因序列及氨基酸序列进行比对。

1.2.3.3 C57BL/6J 重组质粒的 DNA 序列分析: 阳性克隆用通用引物测序, 测序结果表明序列与 GenBank 比对达到 100% 一致 (GenBank accession number: NM\_175640.2)。

## 2 结果

### 2.1 C57BL/6J 小鼠附睾脂肪组织总 RNA 的提取结果

提取的总 RNA 经紫外分光光度仪测定 A 值。A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 1.89, 比值在 1.8 ~ 2.0 之间; 总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28s、18s 2 条清晰的条带, 并且 28s/18s  $\approx$  2.0 (图 1), 表明提取的总 RNA 质量符合后续实验的要求, 可用于逆

转录。

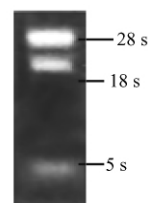


图 1 C57BL/6J 脂肪组织总 RNA 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Representative electrophoresis tracing of the total RNA from C57BL/6J mouse adipose tissue

### 2.2 RT-PCR 结果

提取 C57BL/6J 小鼠附睾脂肪组织的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳可见与预期设计的周脂素基因片段大小一致的扩增条带 (包括两侧酶切位点和保护碱基) (图 2)。

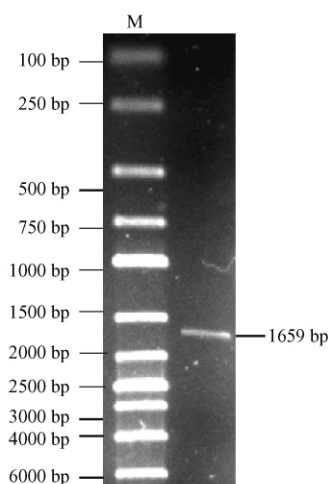


图 2 反转录-聚合酶链反应产物琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 2 Representative electrophoresis tracing of the RT-PCR products

### 2.3 PCR 产物 T-A 克隆结果

经 RT-PCR 扩增的周脂素基因片段与 pMD18-T 载体连接构建成 pMD18-T-*plin* 重组载体, 经 *spe* II / *Not* I 双酶切, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳可见 2 条带, 中 1 条带与 RT-PCR 产物的电泳结果完全一致, 另 1 条与 pMD18-T 载体片段 (2 692 bp) 的大小一致, 见图 3。

### 2.4 周脂素重组质粒的 DNA 序列分析

阳性克隆用通用引物测序, 测序结果表明序列与 GenBank 比对均为 100% 一致 (GenBank accession number: D45371)。测序图谱见图 4、5。表明 pMD18-T 载体中已含有周脂素基因片段。

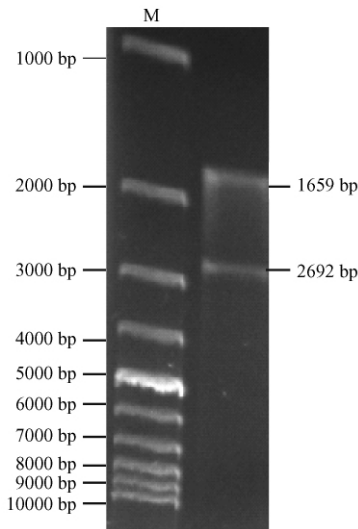


图 3 周脂素重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 3 Electrophoresis of the recombinant plasmid perilipin using double enzyme digestion

### 3 讨论

由于脂肪组织富含脂类物质,单位体积细胞数较少,且单位细胞 RNA 含量也相对较少,按照 RNAiso™ Plus 试剂说明书提取脂肪组织 RNA 效果并不理想,所以如何有效地除去脂类的污染和最大限度地提高产量是在提取脂肪组织 RNA 过程中不可忽视的问题。在脂肪组织 RNA 提取过程中,对其中一些步骤作了适当的改进。本实验主要做到以下几点:①样品量足,一般组织的 RNA 提取样品量大概是 100 mg,本实验将样品量加大到 1 g 进行提取从而保证了 RNA 的得率。②样品组织裂解充分,短时间内液氮研磨至粉末状加入超量的裂解液快速研磨至透明后剧烈震荡 3 min,保证了裂解液与组织的充分接触。③除脂彻底,将样品与裂解液反应后,离心 5 min 后,用吸头除去了上层的脂类,取得

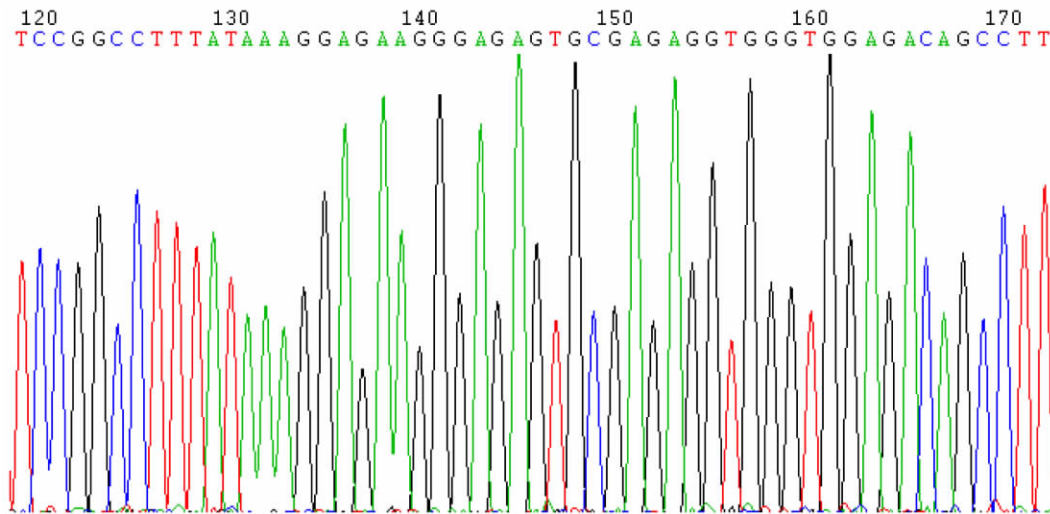


图 4 周脂素的测序图谱

Fig. 4 Sequencing map of the plasmid perilipin



图 5 周脂素克隆序列比对部分结果

Fig. 5 Sequence analysis of the plasmid perilipin

的下层溶液应做同样的 2 次离心以保证完全去除脂类污染。④去除内源和外源性 RNA 酶的影响,实验过程中使用的实验材料均用 0.1% 的 DEPC 水处理

后,高压灭菌,操作过程戴口罩帽子,尽量保持环境洁净,液氮研磨充分,用 75% 的乙醇洗完 RNA 沉淀后,再用无水乙醇洗 1 次<sup>[8]</sup>,以此减少内外源性

RNA 酶的影响。从而得到了高质量的 RNA,为后续扩增周脂素基因做了充分保证。

周脂素由 Plin 基因编码<sup>[9]</sup>。Perilipin 氨基末端大约 100 个氨基酸的区域与 ADRP 的氨基末端区域极为相似,被称为 PAT 结构域。鼠的 perilipin 基因定位于第 7 号染色体,人的基因定位于 15q26,含有 9 个外显子。研究发现,perilipin 可能在脂肪分解调控中起到“分子开关”的作用,在脂肪水解和机体能量代谢过程中发挥着双重作用<sup>[3]</sup>,既可通过阻止脂肪酶接近脂滴降低基础状态下的脂解,又可促进激素刺激的脂肪分解,可以调控脂解率以及脂肪组织中甘油三酯的输出。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 激动剂、瘦素 (leptin) 等均可以影响 perilipin 的表达<sup>[10-12]</sup>。由于周脂素与脂代谢的具体作用目前还不明确<sup>[13,14]</sup>,其可能是联系胰岛素抵抗与代谢性疾病的重要环节,在脂质沉积及有序排列中发挥重要的调控作用<sup>[15-16]</sup>,其在脂代谢中的关键作用可能与肥胖及相关疾病的发生有关<sup>[17]</sup>。

实验经过提取脂肪总 RNA、Rt-PCR、T-A 克隆,得到周脂素编码区重组质粒,测序结果表明,序列与 Genbank 比对均为 100% 一致 (GenBank accession number: NM\_175640.2)。本实验得到没有任何突变的基因,考虑与以下因素有关:①附睾脂肪组织总 RNA 的提取质量较高为进行反转录提供保证。②引物的 GC 比例设定合适 (上游为 55%,下游为 60%) 因而提高了基因扩增的特异性。③割胶纯化时,操作速度很快,减少了紫外线对目的基因的损伤。紫外线可引起 DNA 损伤,应尽量减少其照射时间。④对纯化的目的片段进行了加 A 反应,同时 pMD18-T 克隆载体是线性化的载体,其 3' 端有 1 个 T 伸出,显著提高了重组效率。本实验成功地克隆没有任何突变的周脂素基因,为对其进行精确实验提供了根本保障;为进一步真核表达周脂素蛋白,建立周脂素转基因小鼠,分析周脂素的生物功能及作用机制提供了实验基础;为进一步理解体脂分布异常、胰岛素抵抗开辟一新的方向,最终为探索该类药物的开发提供崭新的思路;可能也将为糖尿病等相关疾病的临床工作提供一种新的防治策略。

#### 参考文献:

[1] Crossno JT Jr, Majka SM, Grazia T, et al. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone

marrow-derived circulating progenitor cells [J]. J Clin Invest, 2006, 116(12): 3220-3228.

- [2] Dalen KT, Dahl T, Holter E, et al. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1771(2): 2102227.
- [3] Moore HP, Silver RB, Mottillo EP, et al. Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase [J]. J Biol Chem, 2005, 280(52): 43109-43120.
- [4] Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets [J]. J Biol Chem, 1991, 266(17): 11341-11346.
- [5] Souza SC, Vargas LM, Yamamoto MT, et al. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 24665-24669.
- [6] Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, et al. Role of PAT proteins in lipid metabolism. Biochimie, 2005, 87: 45-49.
- [7] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. 2006-09-30.
- [8] 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.
- [9] Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr (db/db) mice [J]. Nat Genet 2000, 26: 474-479.
- [10] Fauny JD, Silber J, Zider A. Drosophila lipid storage droplet 2 gene (Lsd-2) is expressed and controls lipid storage in wing imaginal discs [J]. Dev Dyn, 2005, 232(3): 725-732.
- [11] Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, et al. On the control of lipolysis in adipocytes [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 892: 155-168.
- [12] Arimura N, Horiba T, Imagana M, et al. The peroxisome proliferator 2 activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes [J]. J Biol Chem 2004, 279(11): 10070-10076.
- [13] Sztalryd C, Xu G, Dorward H, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation [J]. J Cell Biol, 2003, 161: 1093-1103.
- [14] Clifford GM, Londos C, Fredric B, et al. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes [J]. J Biol Chem 2000, 275: 5011-5015.
- [15] Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(11): 6494-6499.
- [16] Kawai T, Ng MC, Hayes MG, et al. Variation in the perilipin gene (PLIN) affects glucose and lipid metabolism in non-Hispanic white women with and without polycystic ovary syndrome. [J]. Diabetes Res Clin Pract. 2009, 86(3): 186-92.
- [17] Kern PA, Di Gregorio G, Lu T, et al. Perilipin expression in human adipose tissue is elevated with obesity [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(3): 1352-1358.

(修回日期)2011-02-20