

Tạo dòng và biểu hiện protein leptin người tái tổ hợp trong *Escherichia coli*

- Lê Mai Hương Xuân
- Lê Đình Tó
- Đặng Thị Phương Thảo
- Trần Linh Thuộc

Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 20 tháng 7 năm 2013)

TÓM TẮT

Leptin là một hormone có bản chất protein được tiết ra chủ yếu từ mô mỡ, có vai trò quan trọng trong điều hòa lượng thức ăn và quá trình tiêu hao năng lượng của cơ thể. Leptin tái tổ hợp đã được chứng minh có hiệu quả tốt trong việc điều trị bệnh béo phì ở người. Nhằm thu nhận protein leptin tái tổ hợp trong Escherichia coli, chúng tôi đã dòng hóa gene mã hóa cho protein leptin

của người (hob gene) vào vector biểu hiện pET-28a. Khi khảo sát sự biểu hiện protein trong tế bào chủ E. coli BL21(DE3), vector tái tổ hợp pET-hob đã cho thấy khả năng biểu hiện vượt mức protein leptin trong tế bào chất, chủ yếu ở dạng thể vùi. Kết quả này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm sản xuất protein leptin người tái tổ hợp.

Từ khóa: tạo dòng, biểu hiện vượt mức protein, leptin, ob gene, vector biểu hiện.

MỞ ĐẦU

Ở người, protein leptin (h-leptin) được mã hóa bởi gene nằm trên vùng q31.3 của nhiễm sắc thể 7. Vùng gene mã hóa dài khoảng 16352 nucleotide, bao gồm 3 exon được phân cách bởi 2 intron [2]. Leptin sau khi dịch mã có 167 amino acid với chuỗi tín hiệu tiết dài 21 amino acid, sau đó chuỗi peptide tiết bị thủy phân, do đó protein leptin tuần hoàn trong máu có 146 amino acid, lưu thông ở cả hai dạng: dạng tự do và dạng phức hợp khi liên kết với protein mang [7]. h-leptin có khối lượng phân tử 16kD, không đòi hỏi sự glycosyl hóa, cấu trúc bậc ba gồm bốn chuỗi xoắn alpha đối song theo kiểu “up-up-down-down”. Phân tử protein có một vùng kỵ nước được tạo thành từ những tương tác kỵ nước của các amino acid trong các chuỗi xoắn. Trong

phân tử có hai cysteine tạo thành cầu nối disulfide là Cys96-Cys146 [1].

Leptin có vai trò quan trọng trong điều hòa thể trọng. Thông qua vùng dưới đồi leptin điều chỉnh thái độ ăn uống, và sự tiêu hao năng lượng của cơ thể. Thái độ ăn uống được điều hòa bởi các peptide thần kinh ở vùng dưới đồi như NPY (Neuropeptide Y), AgRP (agouti-related peptide) và MSH (alpha-melanocortin stimulating hormone) [5]. Khi chất béo trong cơ thể tăng lên, lượng leptin cũng tăng lên, dẫn đến ức chế sự biểu hiện của NPY và AgRP, và tăng cường sự biểu hiện của MSH. Điều này dẫn đến quá trình tiêu thụ thức ăn giảm xuống, gia tăng tiêu hao năng lượng.

Từ những đặc điểm về hoạt động chức năng, leptin ngày càng được quan tâm nghiên cứu sử

dùng làm thuốc điều trị bệnh béo phì [6]. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) định nghĩa béo phì là tình trạng tích lũy mỡ quá mức và không bình thường tại một vùng cơ thể hoặc toàn thân đến mức ảnh hưởng đến sức khỏe. Người bị béo phì ngoài thân hình phì nộn, nặng nề, khó coi,... còn có nguy cơ mắc nhiều bệnh như rối loạn lipid máu, tăng huyết áp, tai biến mạch máu, sỏi mật, đái tháo đường, xương khớp và ung thư. Theo nhận định của WHO thì béo phì đã trở thành “bệnh dịch toàn cầu”, bệnh đang tăng lên với tốc độ báo động ở cả các nước phát triển và đang phát triển. Năm 2010, ở Việt Nam, bệnh béo phì đã đạt xấp xỉ 26% số lượng người trưởng thành.

Leptin đã thể hiện được ưu thế trong điều trị béo phì bởi nó là một hợp chất sinh học, có thể được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, từ đó cho giá thành rẻ và thân thiện với con người hơn các loại thuốc tổng hợp hóa học khác. Nhằm mục đích tạo ra nguồn leptin dồi dào có chất lượng cao để phục vụ cho việc nghiên cứu phát triển thành dược phẩm, chúng tôi thực hiện bước đầu tiên của đề tài là tạo dòng, biểu hiện protein leptin người tái tổ hợp trong hệ thống *Escherichia coli*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng chủ và plasmid

Chủng *Escherichia coli* DH5 α [F^- , Δ 80lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] dùng làm tế bào chủ để nhân bản plasmid. Chủng *Escherichia coli* BL21(DE3) [F^- *ompThsdS* (r_B^- m_B) *gal dcm* (DE3)] dùng để biểu hiện protein. Vector pET-28a có kích thước 5369bp, chứa T7 promoter kiểm soát sự biểu hiện gene thông qua IPTG được sử dụng để thiết kế vector tái tổ hợp biểu hiện protein h-leptin.

Thiết kế và thu nhận gene *hob* mã hóa cho protein leptin người

Gene mã hóa cho protein leptin người được phân tích và tối ưu một số codon bằng phần mềm

GeneDesiger, việc thay đổi codon nhằm mục đích biểu hiện gene trong hệ thống vi khuẩn *Escherichia coli*. Gene *hob* do chúng tôi thiết kế được đặt tổng hợp và gắn vào vector mang pITDSmart (pIDSmart-*hob*). Đồng thời, chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu 5'-*NcoI-hob* (TTG TAA TGC CCA TGG TGC CGA) và 3'-*XhoI-hob* (ACG CAT CTC GAG TTA GCA GCC) nhằm thu nhận gene mục tiêu bằng phản ứng PCR.

Chương trình PCR thu nhận gene *hob*: 1 chu kỳ: 95°C – 5 phút; 30 chu kỳ: 94°C – 45 giây, 55°C – 45 giây, 72°C – 45 giây; 1 chu kỳ: 72°C – 10 phút. Đoạn gene được khuếch đại sẽ được kiểm tra trên gel agarose 1%.

Cấu trúc vector tái tổ hợp pET-*hob*

Gene *hob* và vector pET-28a được xử lý bằng hai enzyme cắt hạn chế *NcoI* và *XhoI*, sau đó được tinh chế bằng bộ kit Gel Extraction Kit (Biobasic, Canada). Gene *hob* được nối vào vector pET-28a đã được cắt mở vòng nhờ enzyme *T4 DNA ligase* để tạo plasmid tái tổ hợp pET-*hob*. Dung dịch phản ứng nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp hóa biến nạp và được sàng lọc bước đầu trên môi trường LB có chứa kháng sinh kanamycin nồng độ 30 μ g/ml.

Các thể biến nạp thu nhận được sẽ được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'-*NcoI-hob*, 3'-*XhoI-hob* và phương pháp sử dụng enzyme cắt hạn chế với các enzyme *NcoI* và *XhoI*. Ngoài ra, thể biến nạp này còn được kiểm tra chiều bằng phương pháp PCR với cặp mồi 5'-*NcoI-hob* và T7ter. Các sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả tạo dòng được khẳng định bằng phương pháp giải trình tự với mồi T7pro.

Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) có mang vector tái tổ hợp pET-*hob*

Vector tái tổ hợp pET-*hob* được thu nhận và hóa biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Dòng vi khuẩn BL21(DE3) có mang vector tái

hợp là những khuẩn lạc sinh trưởng được trên môi trường LB có bổ sung kanamycine 30 μ g/ml và khi PCR với cặp mồi 5'-*NcoI-hob*, 3'-*XhoI-hob* cho một vạch khuếch đại khoảng 441bp, đúng với kích thước của gene *hob*.

Cảm ứng biểu hiện và phân tích bằng SDS-PAGE

Các dòng BL21(DE3)/pET-*hob* được cấy hoạt hóa trong môi trường LB có chứa kháng sinh kanamycin 30 μ g/ml. Sau 16-18 giờ nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển dịch vi khuẩn qua ống nghiệm chứa 5ml môi trường LB có bổ sung kanamycin 30 μ g/ml, tỉ lệ cấy chuyển 1/10 (v/v), lắc 250rpm ở 37°C. Đến khi dịch vi khuẩn đạt OD₆₀₀ = 0.8-1.0 thì cảm ứng bằng IPTG 0.5mM, tiếp tục lắc 250rpm ở 37°C. Sau 4 giờ cảm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào. Điện di SDS-PAGE để kiểm tra sự biểu hiện vượt mức protein và sử dụng phần mềm Quantity One 4.2.1 để đánh giá tỉ lệ protein tái tổ hợp trong mẫu protein tổng số.

Sau đó, tiến hành phá màng tế bào bằng sóng siêu âm để thu được protein ở các pha tổng, tủa, tan và phân tích sự biểu hiện protein bằng điện di SDS-PAGE. Thực hiện đồng thời hai mẫu đối chứng âm là mẫu dịch nội bào BL21(DE3)/pET-*hob* không cảm ứng IPTG và mẫu dịch nội bào BL21(DE3) không mang vector tái tổ hợp.

Xác nhận sự hiện diện của protein h-leptin bằng Western Blot

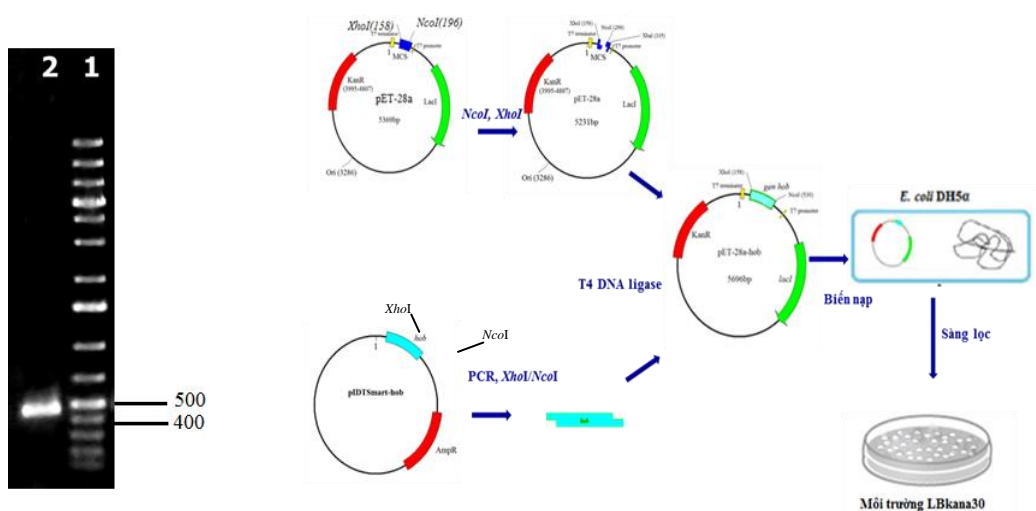
Sau khi điện di, các vạch protein được chuyển lên màng lai nitrocellulose. Màng lai được lai với kháng thể kháng leptin bắt đặc hiệu

với protein leptin và phát hiện bằng kháng thể thứ cấp anti-IgG của dê đánh dấu HRP (Abcam, Anh). Quá trình hiện phim được thực hiện bằng bộ kit ECL (Amersham Bioscience, Anh).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng vector mang và biểu hiện gene *hob* trong *E. coli*

Với mục đích biểu hiện gene *hob* và thu nhận protein leptin tái tổ hợp trong tế bào chủ *E. coli*, chúng tôi sử dụng vector pET-28a làm vector mang gene. Các kết quả phân tích trên trình tự gene *hob* cho thấy trình tự gene này không mang vị trí cắt của các enzyme trong vùng multiple cloning site (MCS) của vector pET-28a. Chúng tôi chọn và sử dụng cặp enzyme *NcoI* và *XhoI* cắt mở vòng vector nhằm đảm bảo gene được chèn đúng chiều. Song song đó, chúng tôi tiến hành thu nhận gene mã hóa cho protein h-leptin (gene *hob*) từ vector pIDTSmart-*hob* bằng phản ứng PCR với mồi đặc hiệu cho gene. Cặp mồi đặc hiệu này có gắn thêm các vị trí cắt của enzyme cắt hạn chế là *NcoI* (mồi xuôi) và *XhoI* (mồi ngược). Gene thu nhận từ phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose. Kết quả phân tích cho thấy chúng tôi thu nhận được một đoạn gene có kích thước 441bp (Hình 1A, giếng 2), đúng với kích thước gene *hob*. Sau khi thu nhận gene *hob* chúng tôi tiến hành xử lý gene với enzyme *NcoI* và *XhoI* nhằm tạo đoạn gene *hob* với hai đầu dính, đoạn gene này được tinh chế và nối vào vector pET-28a đã cắt mở vòng bằng hai enzyme nói trên. Hỗn hợp sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α (Hình 1B).



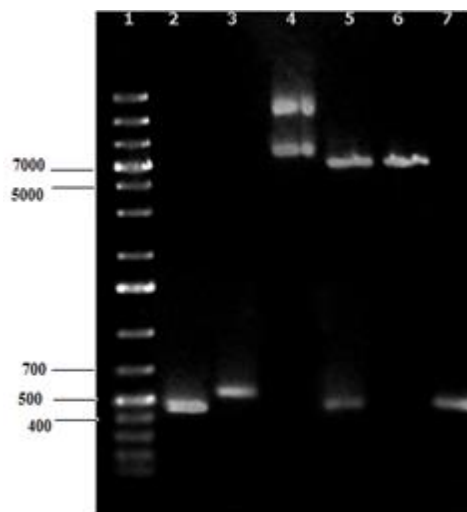
Hình 1A. Thu nhận gene *hob*.

Hình 1B. Sơ đồ tạo dòng plasmid tái tổ hợp pET-*hob*

Vector tái tổ hợp pET-*hob* mang gene chọn lọc là gene kháng kháng sinh kanamycin, do vậy chúng tôi sàng lọc các thể biến nạp *E. coli* dự đoán dựa vào khả năng sinh trưởng trên môi trường LB có bổ sung kanamycine, sau đó thu nhận dịch chiết tế bào từ các thể biến nạp này và sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene *hob* nhằm xác định sự hiện diện của gene *hob* trong thể biến nạp. Đối với các thể biến nạp cho phản ứng dương tính, chúng tôi tiến hành nuôi cấy và thu nhận plasmid. Các plasmid này được kiểm tra sự hiện diện, chiều của gene *hob*, kiểm tra trình tự và sự đồng khung dịch mã.

(giống 7). Như vậy, chúng tôi đã chèn được gene *hob* vào vector pET-28a.

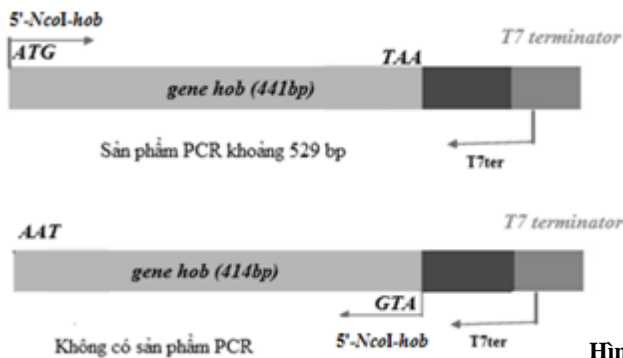
Chúng tôi kiểm tra sự hiện diện của gene *hob* trên vector pET-28a bằng cách PCR plasmid thu được với cặp mồi đặc hiệu cho gene. Kết quả ở Hình 2, giếng 2 của bảng điện di có một vạch có kích thước khoảng 441bp, bằng với vạch kích thước của gene *hob* (giếng 7). Song song đó, chúng tôi tiến hành phản ứng cắt plasmid thu được bằng hai enzyme dùng để tạo dòng là *NcoI* và *XhoI*, kết quả ở giếng 5 có hai vạch: vạch kích thước lớn khoảng 5231bp bằng với kích thước của vector pET-28a được cắt bằng hai enzyme tương ứng (giếng 6), và vạch kích thước nhỏ khoảng 441bp bằng với kích thước gene *hob*



Hình 2. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp. 1: Thang DNA 1kb plus; 2: Sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp với cặp mồi đặc hiệu 5'-*NcoI-hob* và 3'-*XhoI-hob*; 3: Sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp với cặp mồi 5'-*NcoI-hob* và T7ter; 4: Plasmid tái tổ hợp pET-*hob*; 5: Plasmid tái tổ hợp xử lý hai enzyme *NcoI* và *XhoI*; 6: Plasmid pET-28a xử lý với hai enzyme *NcoI* và *XhoI*; 7: Gene *hob* xử lý với hai enzyme *NcoI* và *XhoI*.

Chiều của gene *hob* trong vector pET-28a được khẳng định bằng phương pháp PCR plasmid với cặp mồi đối chiều là mồi xuôi 5'-*NcoI-hob* và mồi T7ter. Nếu gene chèn đúng

chiều sẽ cho vạch khuếch đại có kích thước khoảng 519bp, ngược lại nếu gene không được chèn đúng chiều thì sẽ không có sản phẩm khuếch đại (Hình 3). Kết quả thể hiện ở giếng 3, hình 2, có xuất hiện vạch kích thước khoảng 519bp như mong đợi. Như vậy gene *hob* đã được chèn vào vector pET-28a đúng chiều.



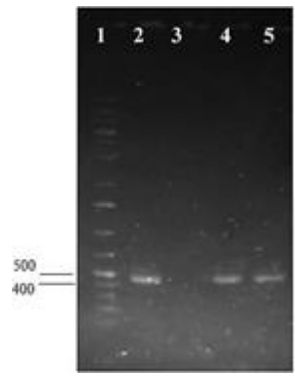
Hình 3. Vị trí mồi 5'-*Nco*I-*hob*, T7ter trên vector tái tổ hợp pET-*hob*.

Đoạn gene *hob* trên plasmid tái tổ hợp pET-*hob* sau khi giải trình tự bằng mồi T7pro và so sánh với trình tự gene mã hóa protein h-leptin đã được thiết kế cho thấy có độ tương đồng 100% và đồng khung dịch mã. Tuy nhiên, vì đề tài đang trong quá trình nghiên cứu nhằm phát triển h-leptin tái tổ hợp thành dược phẩm nên chúng tôi chưa công bố trình tự gene *hob* ở đây.

Tạo dòng BL21(DE3) có mang vector tái tổ hợp pET-*hob*

Sau khi cấu trúc thành công vector tái tổ hợp pET-*hob*, chúng tôi biến nạp vector pET-*hob* vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) và trải trên môi trường LB có bổ sung kanamycin. Những khuẩn lạc mọc được trên môi trường sàng lọc được lựa chọn ngẫu nhiên để PCR kiểm tra sự hiện diện của

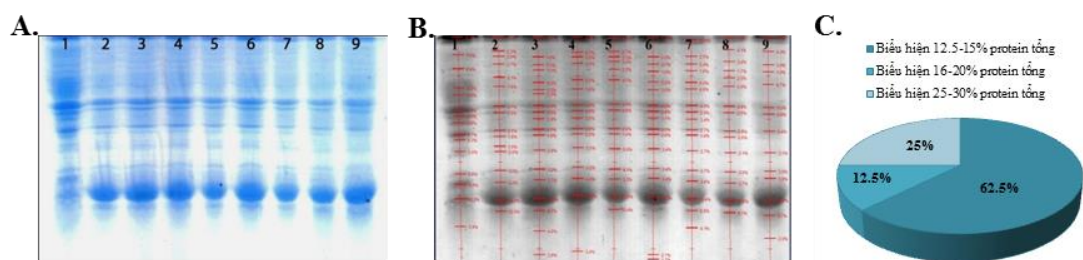
vector tái tổ hợp, sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gene *hob*. Kết quả cho thấy ở Hình 4, giếng 4 và 5 đều xuất hiện vạch khuếch đại tương ứng với kích thước của gene *hob*. Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob*.



Hình 4. Kết quả PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu. 1: Thang DNA 1 kb plus; 2: Chứng dương (khuôn là pIDTSmart-*hob*); 3: Chứng âm; 4, 5: PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu.

Biểu hiện protein h-leptin trong *Escherichia coli*

Điều kiện cảm ứng biểu hiện protein h-leptin như mô tả trong phần phương pháp. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận và xử lý mẫu nhằm kiểm tra bước đầu sự biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE. Kết quả thể hiện trên bảng điện di SDS-PAGE (Hình 5A) cho thấy các dòng *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* kiểm tra đều có sự biểu hiện protein tái tổ hợp tốt. Khi phân tích mức độ biểu hiện protein trên mỗi mẫu bằng phần mềm Quantity One (Hình 5B) cho thấy dòng BL21(DE3)/pET-*hob* ở giếng 6 có tỉ lệ biểu hiện protein tái tổ hợp cao nhất trong các dòng kiểm tra (khoảng 29% tổng số protein).

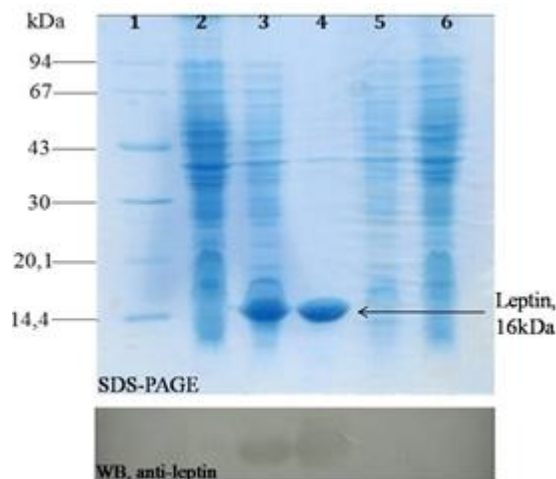


Hình 5. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện vượt mức protein leptin tái tổ hợp. **A.** Kiểm tra sự biểu hiện protein. **B.** Phân tích mức độ biểu hiện của protein. 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (-)IPTG; 2-9: Các dòng khác nhau *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG. **C.** Tỷ lệ các chủng biểu hiện vượt mức protein.

Kết quả khảo sát trên các thể biến nạp *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* cho thấy có 62.5% các thể biến nạp có tỷ lệ biểu hiện vượt mức protein từ 12.5% đến 15% protein tổng số; 12.5% các thể biến nạp biểu hiện protein từ 16% đến 20% trên tổng số protein của tế bào; 25% thể biến nạp có tỷ lệ biểu hiện protein chiếm 25% đến 30% protein tổng số (Hình 5C). Tuy mức độ biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp khác nhau giữa các thể biến nạp nhưng hình thái và quá trình tăng trưởng của các chủng không có sự khác biệt, thể hiện trên đường cong tăng trưởng của các chủng thu được không có sự khác nhau về mặt phân tích thống kê (kết quả không trình bày ở đây). Kết quả khảo sát này cho thấy bên cạnh kiểu gene của chủng chủ, sự biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào chủ ít nhiều phụ thuộc vào sự tương tác giữa vector biểu hiện và chủng chủ, trạng thái sinh lý của các tế bào chủ sau quá trình biến nạp.

Chúng tôi tiến hành chọn dòng *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* có mức độ biểu hiện leptin tái tổ hợp ở mức cao nhất để tiến hành phân tích sự biểu hiện protein bằng phương pháp SDS-PAGE và xác nhận sự biểu hiện bằng Western blot (WB). Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 6) cho thấy giếng 3 tương ứng với mẫu protein tổng số, có vạch protein to, đậm, kích thước khoảng 16 kDa, trong khi đó, hai chứng âm ở giếng 2 và giếng 6 không có sự hiện diện vạch protein này. Mặc khác, ở giếng 4 tương ứng với mẫu protein ở pha tủa, cũng thu được vạch

protein to, đậm, trong khi giếng 5 tương ứng với mẫu protein ở pha tan hầu như không thấy sự xuất hiện của protein này. Các vạch protein tổng (giếng 3) và protein pha tủa (giếng 4) được xác nhận bằng Western blot với kháng thể kháng leptin (Hình 6).



Hình 6. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein h-leptin trong *E. coli* BL21(DE3). 1: Thang protein phân tử lượng thấp; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (-)IPTG; 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG (pha tổng); 4: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG (pha tủa); 5: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG (pha tan); 6: *E. coli* BL21(DE3) (+)IPTG.

Với kết quả trên chúng tôi khẳng định protein h-leptin đã được biểu hiện vượt mức, và protein tồn tại hầu hết ở dạng thể vùi. Sự biểu hiện protein leptin tái tổ hợp ở dạng thể vùi tạo ưu thế thu nhận một lượng lớn protein mục tiêu từ tế bào chủ. Kết quả phân tích SDS-PAGE

cũng cho thấy có thể dễ dàng thu nhận được phân đoạn protein mục tiêu do lượng protein tạp hiện diện trong phân đoạn protein thu được là rất ít (giếng 4, Hình 6). Tuy nhiên, để thu nhận được protein leptin có hoạt tính từ dạng thể vùi cũng cần phải trải qua nhiều công đoạn nhằm tái gấp cuộn protein mục tiêu.

KẾT LUẬN

Hiện nay, bệnh béo phì đang phát triển với tốc độ rất nhanh, nhu cầu nghiên cứu và sử dụng h-leptin tái tổ hợp trở nên cấp thiết. Vì vậy, việc sản xuất protein h-leptin tái tổ hợp trong hệ thống

E. coli hứa hẹn sẽ cung cấp sản phẩm protein tái tổ hợp chất lượng cao, giá thành hợp lý nhằm phục vụ cho nhu cầu sử dụng thuốc ở Việt Nam. Chúng tôi đã thiết kế và cấu trúc thành công vector tái tổ hợp mang gene mã hóa cho protein leptin người (pET-*hob*), đưa vector tái tổ hợp vào chủng *E. coli* biểu hiện BL21(DE3) và đã cảm ứng biểu hiện thành công protein h-leptin ở dạng thể vùi. Những kết quả này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm sản xuất h-leptin tái tổ hợp phát triển thành dược phẩm.

Cloning and expression of recombinant human leptin in *Escherichia coli*

- Le Mai Huong Xuan
- Le Dinh To
- Dang Thi Phuong Thao
- Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Leptin, a peptide hormone, is produced by mature adipocytes and functions primarily in the hypothalamus to reduce food intake and body weight. Recombinant h-leptin has been shown to be effective in obesity treatment. To overexpression of recombinant human leptin in Escherichia coli, the human leptin gene (hob gene) was cloned into the

vector pET-28a. When analysis expression of human leptin in E. coli BL21(DE3) strain, it was found that recombinant vector pET-hob expressed h-leptin proteins in cytoplasm, and mainly as insoluble inclusion bodies. This result will be the premise for researching to produce recombinant human leptin protein.

Key word: cloning, gene expression, leptin, ob gene, vector.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. D. Kline, G. W. Becker, L. M. Churgay *et al.*, Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR, *FEBS Letters*, 407, 239-242 (1997).
- [2]. D.-W. Gong, S. Bi, R. E. Pratley *et al.*, Geneomic Structure and Promoter Analysis of the Human *obese* Gene, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 3971-3974, (1996).
- [3]. F. Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411-421 (1999).
- [4]. F. J. M. Mergulhão, D. K. Summers, G. A. Monteiro, Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*, *Biotechnology Advances*, 23, 177-202 (2005).
- [5]. J. M. Friedman, The function of leptin in nutrition, weight, and physiology, *Nutr Rev*, 60, 10 Pt 2, S1-14; discussion S68-84, 85-7 (2002).
- [6]. R. L. Leibel, The role of leptin in the control of body weight, *Nutr Rev*, 60, 10 Pt 2, S15-9, discussion S68-84, 85-7 (2002).
- [7]. Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei *et al.*, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 372, 425-432 (1994).