

人孤儿受体 GPR81 分子克隆、组织分布及表达工程细胞株的建立 Molecular Cloning, Tissue Distribution and Expression in Engineered Cells of Human Orphan Receptor GPR81

吴芳明^{1,2}, 黄火高³, 胡 明³, 高 月¹, 刘永学^{1*}

WU Fang-Ming^{1,2}, HUANG Huo-Gao³, HU Ming³, GAO Yue¹ and LIU Yong-Xue^{1*}

1 军事医学科学院放射医学研究所药理毒理室, 北京 100850

2 江西中医学院中药系, 南昌 330004

3 海军总医院, 北京 100037

1 Department of Pharmacology and Toxicology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2 Department of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3 Navy General Hospital, Beijing 100037, China

摘 要 采用 PCR 技术分别从人全血基因组 DNA 及引产胚胎肾组织 cDNA 中扩增得到 *gpr81* 的全长 cDNA 序列(1041bp), 运用生物信息学手段绘制该基因的分子进化树, 显示该基因的氨基酸序列与烟酸受体同源性最高; 然后, 采用 RT-PCR 法分析该基因表达的组织分布, 组织表达谱显示该基因在多种组织均有表达, 以心脏及肝脏组织为最高; 利用分子克隆手段构建含 6 × 组氨酸(His)标签蛋白的真核表达载体 pcDNA3.1(-)/his-myc-A-*gpr81*, 通过脂质体介导, 将该重组质粒转染 CHO-K1 细胞, RT-PCR 证实该基因已整合入 CHO-K1 细胞的基因组中, Western-blot 表明 GPR81 在 CHO-GPR81 工程细胞株中有表达。组织表达谱的检测和工程细胞株的建立为进一步研究该受体的生物学功能奠定了基础。

关键词 孤儿 G 蛋白偶联受体, GPR81, 组织分布, 工程细胞株

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0408-05

Abstract The *gpr81* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using human fetus kidney cDNA and whole blood genome DNA as template, respectively. The expression profile of *gpr81* in human fetus was analyzed by RT-PCR and the result indicated GPR81 mRNA was most abundant in fetus liver and heart. In addition, the deduced amino acid of GPR81 was compared with other related molecules by Clustal w/x software, and a molecular phylogenetic tree was constructed with Treeview software. It was showed that GPR81 had the highest homology with nicotinic acid receptor in amino acids. After sequence identification, *gpr81* was inserted into the plasmid pcDNA3.1(-)/his-mycA and then transfected into Chinese hamster ovary cell (CHO-K1). With the selection of G418, an engineered cell line which could stably express *gpr81* was obtained by the indication of RT-PCR and Western-blot detection. The establishment of the cell line will serve as means for further study of GPR81.

Key words orphan G protein-coupled receptor, GPR81, expression profile, engineering cell

Received: October 28, 2005; Accepted: January 16, 2006.

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No. 30171096) and Military Teeth Five Years Plan Medical Science Foundation (No. 01MB056).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932252; E-mail: liuyx@nic.bmi.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 30171096) 和全军“十五”医药卫生基金 (No. 01MB056) 资助项目。

孤儿 G 蛋白偶联受体(orphan G protein-coupled receptors, oGPCRs)是一类内源性配基尚不清楚、功能也尚未确定的 GPCRs 的总称^[1]。最新资料显示,人类总的 GPCRs 数目约为 900 种左右,除去光觉和味觉受体以外,约有 350 种为具有内源性配基的受体^[2]。其中,oGPCRs 超过 100 种。GPCRs 是体内药物最重要的作用靶,当前以 GPCRs 为作用靶点的药物占市售药物的比例高达 40%~50%^[3,4]。因此,寻找 oGPCRs 的配基,使 oGPCRs“去孤儿化”(de-orphanizing)无疑在认识疾病机理及新药研发中举足轻重^[5]。本研究克隆了 oGPCR 成员 *gpr81*(GenBank Accession number:NM-032554)的完整开放阅读框,该基因最初由 Lee^[6]等运用 blast 软件对序列已知受体进行基因组数据库检索并筛选得到。然而,仅仅获得其基因序列远远不够,要真正深入认识该受体,获得其配基则是最关键的环节。因此,本研究在获得 *gpr81* 基因序列之后,对该基因在人胚胎组织中的分布进行了检测,并将其氨基酸序列进行了初步的生物信息学分析,绘制进化树,以推测该受体的可能生理功能及病理意义。在此基础上,构建其真核表达重组载体 pcDNA3.1(-)-his/mycA-*gpr81*,并将该重组表达质粒通过脂质体介导转染中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1),经 G418 抗性筛选获得了稳定表达 GPR81 的工程细胞株。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒、菌株、试剂、细胞及标本:带 6×His 标签的质粒 pcDNA3.1(-)-his/myc-A、大肠杆菌 *E. coli* DH5α 菌株、CHO-K1 细胞、6 月龄胚胎组织标本均为本室保存;反转录试剂盒、限制性内切酶 *Xba* I、*Eco*R I 购自 TaKaRa 公司;X-gal、T4 DNA 连接酶、G418、核酸片段纯化试剂盒、快速连接试剂盒 DNA ligation kit 购自 Promega 公司;IPTG、PVDF 膜为北京欣经科生物技术公司产品;全血基因组提取试剂盒、去内毒素质粒小量提取试剂盒购自北京天为时代科技有限公司;DMEM 粉、Trizol 试剂及 Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;KOD plus 为 ToYoBo 公司产品;新生牛血清为杭州民海生物产品;新鲜静脉血采自志愿者;抗 6×His 抗体购自 NEB 公司;ECL 化学发光试剂盒购自 Amersham 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成:参照 *gpr81* 基因序列,设计并合成 PCR 扩增引物(见表 1),其中,下划线部分

分别为 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切位点,此外,为了使质粒 pcDNA3.1(-)-his/myc-A 上携带的 6×His 标签蛋白在 *gpr81* 基因表达的同时也得到表达,我们将扩增 *gpr81* 的下游引物去掉终止密码子。同时,合成一对人源内参照基因 *gapdh* 的引物。所有引物均由赛百盛公司合成。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 primer sequences used for PCR amplification

Construct	Primer sequence
Pa	5'-GCTCTAGA ATGTACAACGGGTGCTGCTG-3' (<i>gpr81</i> upstream primer)
Pb	5'-GCTCTAGA ATGTACAACGGGTGCTGCTG-3' (<i>gpr81</i> upstream primer)
P1	5'-ACGGATTGCGTACTG-3' (<i>gapdh</i> upstream primer)
P2	5'-TGATTTGGAGGGATCTCGC-3' (<i>gapdh</i> downstream primer)

1.2.2 *gpr81* 全长 cDNA 的克隆及测序:按 Trizol 试剂盒说明书提取人胚胎肾组织总 RNA,反转录试剂盒进行 RT-PCR,反应参数为:42℃ 60min,99℃ 5min,5℃ 5min 合成 cDNA 链,再以该 cDNA 为模板,以 Pa、Pb 为引物,高保真酶 KOD plus 进行 PCR 扩增,获得 GPR81 的完整编码双链 DNA,扩增参数为:94℃ 45s,60℃ 30s,72℃ 1min20s,32 个循环。另外,按全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书的操作提取人全血基因组 DNA,并以基因组 DNA 为模板,与上述相同的参数进行 PCR 扩增。核酸的纯化、酶切、连接等步骤均参照分子克隆实验指南第二版操作进行^[7],经 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切后,亚克隆到 pcDNA3.1(-)-his/mycA 中,得到相应的真核表达重组载体 pcDNA3.1(-)-his/mycA-GPR81,转化至 *E. coli* DH5α,挑取阳性克隆,测序。

1.2.3 *gpr81* 在人胚胎组织中的分布:按照 RNA 提取试剂盒说明书的步骤,提取人胚胎 17 个组织的总 RNA,17 个组织包括心、大肠、脑干、肾上腺、脾、肺、小脑、小肠、胆囊、大脑、脊髓、肾、胰、肠腺、中脑、胎盘、肝。然后参照反转录试剂盒说明书进行 RT-PCR,反应参数同前。扩增 *gpr81* 基因,扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳并成像分析,以 Image J 软件对产物条带光密度值进行计算,以 *gapdh* 作为内参照。结果以 *gpr81/gapdh* 光密度的比值表示。

1.2.4 GPR81 氨基酸序列的分子进化树分析:利用 NCBI 数据库上 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)软件对 GPR81 基因进行序列的对库比对,得到与该基因同源性较高的序列,用蛋白质序列多重对齐软件 Clustal w/x (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行聚类分析,TreeView 软件绘制分子进化树。

1.2.5 CHO 细胞的培养、转染及阳性克隆的筛选:

CHO-K1 细胞在含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中培养,每隔 3~4 天传代一次。转染前 1d,接种 4×10^5 个处于对数生长期的 CHO-K1 细胞于六孔板中,使细胞在转染时贴壁 90% 左右。转染步骤参照 Lipofectamine 2000 转染试剂的说明书进行。转染后 24h,胰酶消化传代。转染后 48h,在细胞培养体系加入终浓度为 1mg/mL 的 G418 进行筛选,持续加压 1~2 周,挑选阳性单克隆,扩增传代。对于空载体和表达载体的细胞株分别命名为 CHO-pc3.1(-) 和 CHO-GPR81。

1.2.6 RT-PCR 分析 CHO-GPR81 工程细胞株 *gpr81* mRNA 的表达:为了检测 *gpr81* 是否转染成功及其是否整合到 CHO 细胞基因组 DNA 中,提取阳性克隆传代细胞株的总 RNA,RT-PCR 检测 *gpr81* 基因在工程细胞株中 mRNA 水平上的表达。

1.2.7 Western-blot 分析 CHO-GPR81 工程细胞株 GPR81 蛋白的表达:鉴于 GPR81 表达产物将定位于细胞膜,故采用膜/疏水蛋白两相分离系统方法提取工程细胞的膜总蛋白,Brandford 法对蛋白进行定量。

每例标本取总蛋白 50 μ g 上样进行 SDS-PAGE 电泳,分离后电转移至膜上,封闭后,加入一抗(鼠的抗 6 \times His 的单克隆抗体,1:500)和辣根过氧化物酶结合的二抗(羊抗鼠,1:2500)孵育 1h,TBST 洗涤后加入 ECL 显色试剂,曝光于 Kodak 胶片进行观察。阳性对照采用带 his 标签蛋白的大肠杆菌裂解物。

2 结果

2.1 *gpr81*cDNA 的 PCR 扩增及序列测定

测序结果显示,以人胚胎肾组织的 cDNA 或人血液基因组 DNA 为模板,均可扩增到 1041bp 的产物,而且同 GenBank 已登录序列相一致,说明 *gpr81* 没有内含子,与多数 GPCRs 基因无内含子的规律相符。

2.2 *gpr81* 基因的组织表达分析

从图 1 可见,*gpr81* 在人胚胎组织的分布比较广泛,由高到低依次是:肝、心、胎盘、胰腺、脾、大脑、胆囊、肾、脊髓、脑干、肾上腺、小脑组织,但除心脏、肝脏及胎盘外,各个组织表达的量都不太高。而大肠、肺、小肠、肠腺及中脑组织中则未见表达。

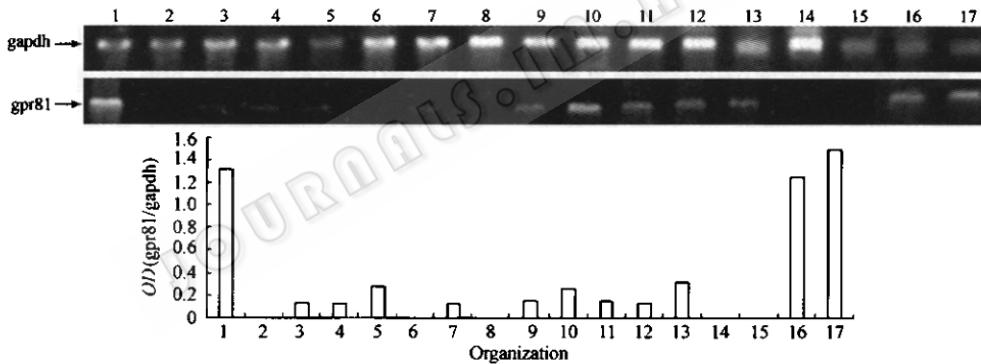


图 1 GPR81 在人胚胎各组织的分布图

Fig.1 Expression profile of the GPR81 mRNA in the different tissues from human fetus

1: heart; 2: large intestine; 3: brainstem; 4: adrenal gland; 5: spleen; 6: lung; 7: cerebellum; 8: small intestine; 9: gallbladder; 10: cerebrum; 11: spinal cord; 12: kidney; 13: pancreas; 14: intestinal gland; 15: midbrain; 16: placenta; 17: liver.

2.3 *gpr81* 基因的生物信息学分析

BLAST 结果显示,人源 *gpr81* 与其它动物来源的同一受体同源性很高,达到 90% 以上,说明该受体在物种间的保守性很高。分子进化树显示,GPR81 与近年“去孤儿化”的烟酸受体 HM74A^[8] 同源性很高,可达 53%,并且在其跨膜疏水区域的同源性更高,可达 70%,说明该受体可能与烟酸受体在结构上存在一定的亲缘关系,提示该受体的配基有可能是烟酸的类似物(图 2,图 3)。该分析结果对于寻找 GPR81 的配基具有较重要的参考价值。

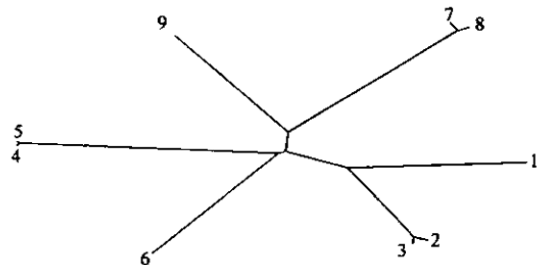


图 2 GPR81 及其同系物的分子进化树

Fig.2 The molecular evolution tree of GPR81 and its homologues
1: hGPR81; 2: HM74A; 3: HM74; 4: h5-oxo-ETE GPCR; 5: hTG1019; 6: hGPR31; 7: hcysLTR2; 8: hcysLTR2-like; 9: hp2Y1.

2.4 *gpr81* 表达质粒的构建及鉴定

所得 *gpr81*cDNA 序列经酶切后亚克隆到 pcDNA3.1(-)-his/mycA 质粒中,所得重组质粒经过

酶切鉴定表明, *gpr81* 已成功连接到载体中(图 4), 该载体供建立 *gpr81* 稳定表达工程细胞株之用。

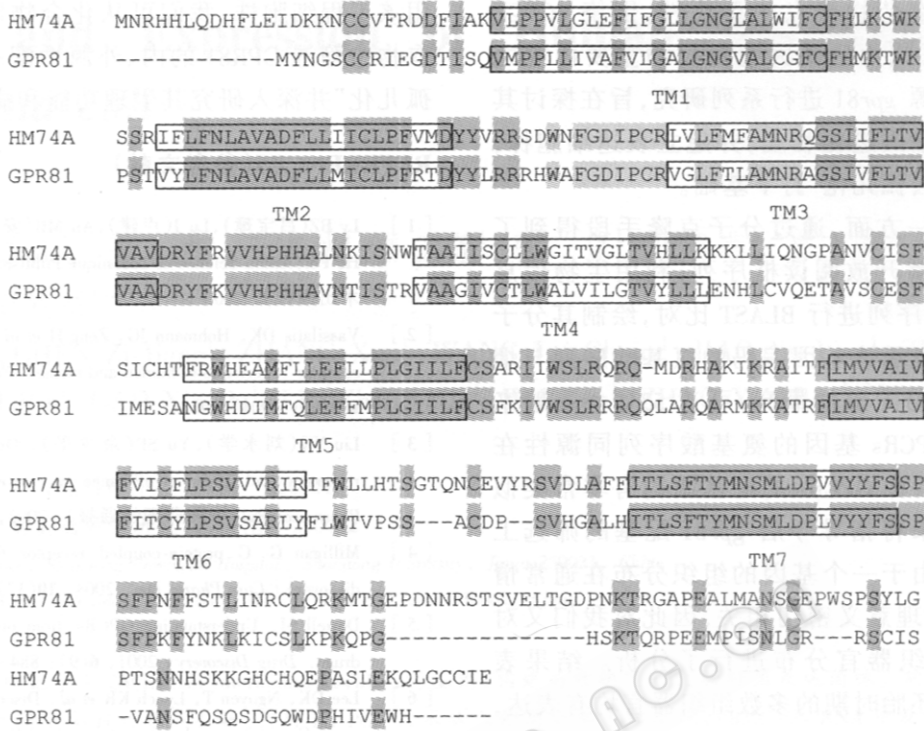


图 3 GPR81 与 HM74A 氨基酸序列比较图(框内为跨膜区)
Fig.3 The comparison of GPR81 and HM74A in amino acid sequence

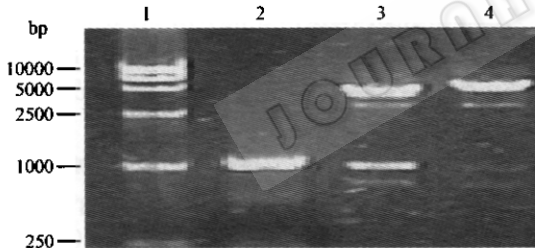


图 4 *gpr81* 基因的 PCR 及重组质粒 pcDNA3.1(-)-his/mycA-*gpr81* 酶切鉴定
Fig.4 Agarose gel Electrophoresis analysis of RT-PCR or PCR products and enzymatic cleavage for pcDNA3.1(-)-his/mycA-*gpr81*

1: Marker DL15000; 2: PCR product from fetus kidney cDNA; 3: pcDNA3.1(-)-his/mycA-*gpr81*/ *Xba* I + *Eco*R I; 4: pcDNA3.1(-)-his/mycA-*gpr81*/ *Xba* I.

2.5 工程细胞株 CHO-GPR81 稳定表达 GPR81 的鉴定

CHO-k1 细胞经过 *gpr81* 表达质粒转染后,经 G418 抗性筛选得到抗性克隆,将所得抗性克隆继续培养传代。为了检验 GPR81 在细胞中表达的稳定性,对分传 20 代以上的细胞株进行 RT-PCR 和 Western-blot 鉴定。结果表明,所得细胞克隆既可检

测到 *gpr81*mRNA,又表达其蛋白分子(图 5)。

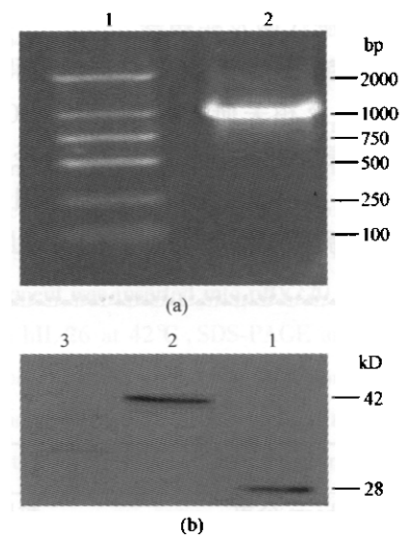


图 5 RT-PCR(a)及 Western blot(b)检测 *gpr81*mRNA 及其蛋白在工程细胞株 CHO-GPR81 的稳定表达
Fig.5 RT-PCR(a) and western - blot (b)analysis of GPR81 expression in the engineering cells of CHO-GPR81 (a) 1: DL2000 DNA marker; 2: *gpr81* (b) 1: positive control; 2: CHO-GPR81; 3: CHO-pc3.1(-).

3 讨论

GPCRs 一直是药物靶点研究的核心之一。鉴于 oGPCRs 作为潜在药物靶点的重要性,围绕 oGPCR 进行深入研究已成为后基因组时代的重要内容之一,本文选择人源 *gpr81* 进行系列研究,旨在探讨其组织分布特点、基因进化程度,并建立表达细胞株,为最终实现其“去孤儿化”打下基础。

本研究中,一方面,通过分子克隆手段得到了 *gpr81* 基因的完整开放阅读框序列,利用生物信息学手段对该基因序列进行 BLAST 比对,绘制其分子进化树,进化树显示该基因编码的氨基酸序列与烟酸受体 HM74A 的同源性最高,可达 53%。一般来说,如果两个 GPCRs 基因的氨基酸序列同源性在 45% 以上,则这两种 GPCRs 的配基结构有非常类似的可能^[9],该结果将指导今后 *gpr81* 配基的筛选工作。另一方面,由于一个基因的组织分布在通常情况下与其生理病理意义密切相关,因此对我们又对 *gpr81* 的胚胎组织器官分布进行了分析。结果表明,该受体虽在胚胎时期的多数组织器官均有表达,但在心脏、肝脏及胎盘组织最为明显,预示着 *gpr81* 参与了胚胎器官组织的发育过程,也很可能与出生后相关器官有关的功能密切相关。因此,上述结果提示,在下一步该受体“去孤儿化”及功能研究中可着重从以下内容入手:1)烟酸脂质代谢;2)心血管方面的疾病;3)肝脏代谢及疾病等。

GPR81 稳定表达的工程细胞株的获得,是进行 *gpr81* 配基筛选及相关研究的前提。CHO-K1 细胞作为哺乳动物表达中常用的宿主细胞,经检测该细胞中并无 *gpr81* 基因的表达,可避免基因的内源性表达对研究体系的影响,因此,CHO-K1 也是 *gpr81*

表达的理想细胞株。我们将构建的载体转至 CHO-K1 中,经筛选得到了阳性克隆,扩增后经鉴定能稳定表达人源 GPR81 蛋白,符合我们的实验要求。利用该工程细胞株,我们可从化合物库或人体组织提取物中筛选 GPR81 的内、外源性配基,进而使之“去孤儿化”并深入研究其生理功能和病理意义。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lv BZ(吕宝璋), Lu J(卢建), An MB(安明榜). Receptorology. He Fei: Anhui Science & Technique Publishing House(安徽科学技术出版社), 2000
- [2] Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H *et al.* The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Pro Natl Acad Sci*, 2003, 100(8): 4903 - 4908
- [3] Liu YX(刘永学), Yu SP(余少平). Orphan G protein-coupled receptors and their significance as novel drug targets. *Chin Pharmacol Bul*(中国药理学通报), 2003, 14(17): 431 - 437
- [4] Milligan G. G protein-coupled receptor fusion proteins in drug discovery. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(17): 1989 - 2001
- [5] Dowell SJ. Understanding GPCRs, from orphan receptors to novel drugs. *Drug Discovery*, 2001, 6(9): 884 - 886
- [6] Lee DK, Nguyen T, Lynch KR *et al.* Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, 2001, 275(1): 83 - 91
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Soga T, Kamohara M, Takasaki J *et al.* Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2003, 303: 364 - 369
- [9] Yuan GS(袁广胜), Pan GT(潘光堂), Liu YX(刘永学) *et al.* Application of bioinformatics in ligand screening of orphan G protein-coupled receptors. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), 2005, 16: 71 - 73