DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.06.001

· 基础医学 ·

食欲素 2 型受体点突变体表达载体的构建*

刘明慧[1▲]　王春梅[2]　陈　京[2]

([1] 曲阜师范大学,曲阜 273165;[2] 济宁医学院神经生物学研究所,济宁 272067)

摘　要　目的　构建带有黄色荧光蛋白突变体 Venus 标签的食欲素 2 型受体(Orexin type 2 receptor, OX2R)点突变的真核表达载体,拟用于后续明确突变位点在 OX2R 介导的信号通路中的作用。**方法**　先根据 OX2R 的基因序列设计带有点突变及酶切位点(Hind III 和 Bam HI)的特异性引物,然后利用聚合酶链式反应(PCR)技术,以 Human OX2R 为模板,构建 OX2R 的突变体。用 Hind III 和 Bam HI 对产物及质粒 pVenus-N1 进行双酶切,然后回收,连接,转化,获得重组的突变体质粒。并对重组质粒进行酶切与测序鉴定。最后将突变质粒转染 HEK293T 细胞,利用超高分分辨率显微镜观察突变质粒的表达及定位。**结果**　PCR 扩增到预期的目的基因片段,酶切与测序结果显示 OX2R 的突变载体构建成功。超高分分辨率显微镜观察到突变质粒与野生质粒均可在 HEK293T 细胞膜上表达。**结论**　成功构建了 OX2R 点突变的表达载体,为进一步研究 OX2R 的关键位点及针对 OX2R 新药的开发奠定了基础。

关键词　OX2R;点突变;表达载体;HEK293T 细胞

中图分类号:Q52　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2017)12-389-04

Construction of OX2R mutant expression vector

LIU Minghui[1], *WANG Chunmei*[2], *CHEN Jing*[2]

([1] *Qufu Normal University*, *Qufu* 273165, *China*;

[2] *Institute of Neurobiology*, *Jining Medical University*, *Jining* 272067, *China*)

Abstract: ***Objective***　To confirm the key sites of OX2R in the signaling pathway mediated by OX2R receptor, the point mutant vectors of OX2R with Venus were constructed. ***Methods***　Specific primers with restriction sites (Hind III and Bam HI) and mutant point were designed according to the gene sequence of OX2R. Then, the fragments containing mutant points were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the plasmid Human OX2R as template. The PCR products were digested by enzyme Hind III and Bam HI, and cloned into plasmid pVenus-N1. The mutant vectors of OX2R were identified by restriction enzyme and DNA sequencing. Finally, the mutants were transfected into HEK293T cells, and the expression of them was confirmed by ultra high resolution microscope. ***Results***　We got the fragments containing mutant points by PCR, and sequencing results showed the vectors were correct. The mutant plasmids and control plasmid were expressed on the member of HEK293T observed by ultra high resolution microscope. ***Conclusion***　The mutant expression vectors of OX2R were successfully constructed. The mutant vectors can be used to study the effect of key point in OX2R on the signal pathways and benefit to the development of new drugs.

Keywords: OX2R; Point mutation; Expression vector; HEK293T cells

* [基金项目]山东省自然基金项目 (ZR2013CQ031, ZR2015CL021)

▲ 刘明慧,曲阜师范大学 2015 级研究生

食欲素位于下丘脑、具有促进摄食功能的兴奋性神经肽,由前体食欲素加工修饰形成两个单体(Orexin A 和 Orexin B)。食欲素受体分为两种亚型(OX1R 和 OX2R)[1],OX1R 广泛分布于大脑中的下丘脑腹内侧核及海马等区域,OX2R 广泛分布于皮层、海马、下丘脑室旁核等区域[2]。1999 年,Lin 等[3]通过对杜宾犬发作性睡病的研究,发现了 OX2R 的基因变化,同时,另一小组在 OX2R 基因敲除小鼠中发现发作性睡病的特点[4],两项研究均证明食欲素在发作性睡病中发挥着重要的作用。食欲素信号通路在哺乳动物的自我调节系统方面扮演着重要的角色,Orexin 不仅在食欲方面发挥着重要作用,而且在睡眠与觉醒、注意力、奖赏与寻求、应激、心血管疾病等方面亦发挥着重要作用。

OX2R 是机体功能调节的重要受体,很多种疾病的发生发展与其氨基酸突变关系密切。有研究报道,偏头痛、焦虑等症状与 OX2R 1246G > A 单核苷酸的突变有关[5-6],单核苷酸突变后干扰 OX2R 二聚化使 OX2R 的功能下降[7],从而导致疾病的发生。迄今为止已知的 OX2R 多态性还有 OX2R (Cys193Ser)、OX2R (Ile293Val)、OX2R (Thr401Ile)等位点突变,这些突变位点在一定程度上改变了受体的结构,从而直接或间接地影响着受体与 G 蛋白相互作用之间的特异性[8]。我们前期实验发现,当 Orexin A 刺激后,OX2R 的 223 及 243 位酪氨酸突变为丙氨酸(Tyr223/243Ala),Orexin B 刺激后,231 位苏氨酸突变为丙氨酸(Thr231Ala),结果显示这几个氨基酸在发挥 OX2R 的功能方面起到重要作用。为进一步明确这几个位点的作用,本实验我们利用分子生物学方法构建含有这 3 个位点的突变体,为下一步明确 OX2R 功能及作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

载体 pEGFP-OX2R 和 pVenus-N1 由英国华威大学陈京博士馈赠。dNTP mixture、5 × ps buffer、Prime STAR Ploymerase、Bam HI、Hind III、T4-DNA 连接酶、T4-Buffer 均购自大连 TakaRa 公司。感受态大肠杆菌 E. coli DH5α、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒,均购买自北京天根生物公司。引物均由上海生物工程有限公司合成。HEK293T 细胞系购买于 ATCC 公司,DMEM 培养基购自 Gibco 公司,转染试剂 Lipofectamine2000、opti 均购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 在 Pubmed-GeneBank 中获取人 OX2R 的 cDNA 序列,并根据该序列特点及 pVenus-N1 的序列特点,利用 Primer 3.0 设计引物,引物两端含有内切酶酶切位点。见表 1。

表 1 引物序列

名称	引物序列
OX2R-F	CCCAAGCTTATGTCCGGCACCAAATTGGAGGAC(Hind III)
OX2R-R	CGCGGATCCCCCCAGTTTTGAAGTGGTCCTGCT(Bam HI)
OX2R-223F	TATCCCAAGATGGCGCACATCTGTTTCTTT
OX2R-223R	AAAGAAACAGATGTGCGCCATCTTGGGATA
OX2R-243F	ATGGTGTTGGCTGCTCTGCAAATATTTCGC
OX2R-243R	GCGAAATAT TTGCAGAGCAGCCAACACCAT
OX2R-231F	TTTCTGGTGGCCTACATGGCACCACTGTGT
OX2R-231R	ACACAGTGGTGCCATGTAGGCCACCAGAAA

1.2.2 突变体的构建 以 pEGFP-OX2R 为模板,进行两步 PCR 扩增,扩增体系为 50μl:模板 4 μl,dNTP 8μl,5 × buffer 10μl,DNA 酶 1μl,上下游引物各 1μl,ddH_2O 5μl。PCR 反应程序:95℃ 5min;95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,32 个循环;72℃ 10min;4℃ 保存。通过琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物。第一步 PCR 是以 pEGFP-OX2R 为模板,OX2R-F 分别与 OX2R223-R、OX2R243-R、OX2R231-R 为引物和以 OX2R223-F、OX2R243-F、OX2R231-F 与 OX2R-R 为引物进行 PCR 反应,命名为第一组和第二组反应,产物回收后用紫外分光光度计测浓度和纯度。第二步 PCR 是以第一组和第二组反应得到的 PCR 产物同时作为扩增模板,OX2R-F 与 OX2R-R 为引物进行 PCR 反应,回收后检测浓度和纯度。Bam HI、Hind III 双酶切 PCR 产物及载体 pVenus-N1。酶切体系:10 × K 2μl,Bam HI 2μl,Hind III 2μl,PCR 产物或载体 10μl,ddH_2O 4μl。酶切产物经琼脂糖凝胶回收,T4-DNA 连接酶连接。连接体系为:T4-buffer 2μl,T4-DNA 连接酶 2μl,PCR 产物 8μl,载体 6μl;4℃ 放置 2h,16℃ 过夜。连接产物转化至大肠杆菌 DH5α,37℃ 恒温培养过夜,挑取单克隆菌体,进行 PCR 菌落鉴定。鉴定正确的菌落过夜摇菌,提取质粒。将提取质粒用 Bam HI 及 Hind III 进行双酶切鉴定。酶切正确的质粒送上海生工测序部测序。

1.2.3　转染突变体至 HEK293T 细胞　将状态良好、处于对数生长期的 HEK293T 细胞用胰酶消化传到 24 孔板，保持细胞生长达到约 90% 的浓度时，将 2μl lip 与 50μl opti 混合 5min 作为 A 液，1μg 构建的突变质粒与 50μl opti 混合作为 B 液，将 A、B 液混合均匀，静止 30min 后，将混合液加到 24 孔板内的细胞中，同时转染野生型质粒作为对照。待细胞生长 12h 后将其按照 1∶20 的比例传到铺有盖玻片的 12 孔板内，当细胞舒展后开始做片，0.1% 的 Triton X-100 打孔，DAPI 染细胞核，利用超高分分辨率显微镜观察黄色荧光蛋白，检测 OX2R 野生型及突变体在 HEK293T 细胞中的表达。

2　结果

2.1　突变体的构建

以 pEGFP-OX2R 为模板，第一步 PCR 扩增后，经琼脂糖凝胶电泳得到特异性条带（图 1）。第二步 PCR 扩增后，经琼脂糖凝胶电泳得到特异性条带，与 OX2R 已知长度相符（图 2）。重组突变体双酶切后，电泳结果显示两条 DNA 条带，一条较大的条带和一条长度约为 1400bp 的条带，与理论相符，初步证明突变体构建成功（图 3）。突变体测序图谱和测序结果显示，除突变位点按预期发生碱基突变外，其余序列均与 OX2R 序列完全一致，证明突变体构建成功。见图 4。

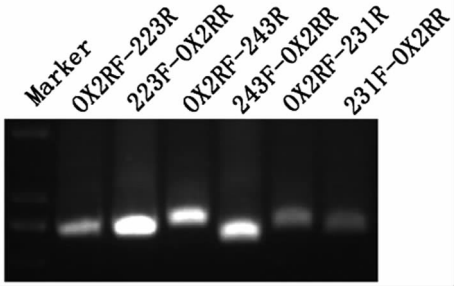


图 1　第一步 PCR 扩增产物

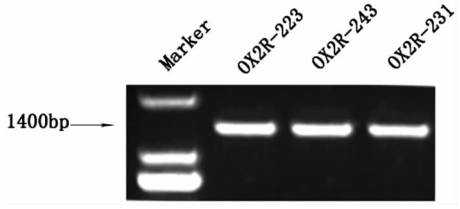


图 2　第二步 PCR 扩增产物

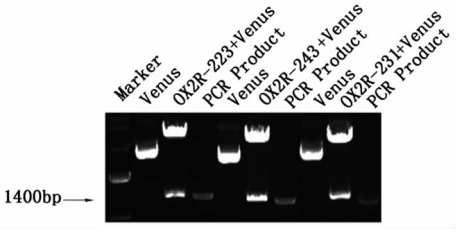
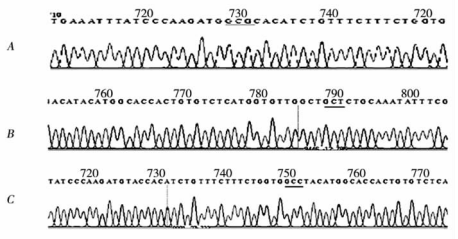


图 3　双酶切电泳图

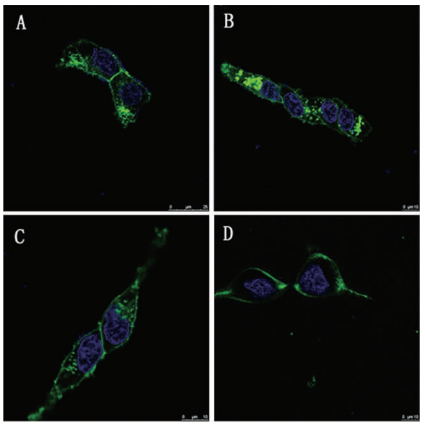


注：A 下划线标注意为 TAC 变为 GCG；
B 下划线标注意为 TAT 变为 GCT；
C 下划线标注意为 ACA 变为 GCC

图 4　OX2R 点突变体的测序图谱

2.2　检测突变体在 HEK293T 细胞中的表达

利用超高分分辨率显微镜观察突变体的表达，图 5（A）为野生 OX2R 在 HEK293T 细胞中的表达，可知 OX2R 主要在细胞膜上表达，与前期研究结果一致。图 5（B）为 223 点突变体的表达，图 5（C）为 243 点突变体的表达，图 5（D）为 231 点突变体的表达，结果均显示突变受体均在 HEK293T 细胞膜上表达，同时也表明这 3 个突变位点不影响受体在细胞膜上的表达，均可以用于下游实验。



注：A. 野生型质粒的表达；
B. 223 位点突变体质粒的表达；
C. 243 位点突变体质粒的表达；
D. 231 位点突变体质粒的表达

图 5　野生型与突变型质粒在 HEK293T 细胞中的表达

3 讨论

GPCR 是目前已知的膜受体中最大家族，由氨基端、羧基端、7 个跨膜肽、3 个胞内环及 3 个胞外环组成，故又称 7 次跨膜受体。当 GPCR 与其配体结合后引起受体的构象发生改变，从而激活胞内 G 蛋白，引起一系列的级联反应，启动细胞信号转导通路，介导生理功能，维持生物体稳态[9-10]。因此，当 GPCR 发生突变或者缺失后，就会引起机体功能失调导致疾病产生。OX2R 属于 G 蛋白偶联受体（GPCR），通过 G 蛋白信号通路发挥生理作用，当 OX2R 在受环境因素或在病理条件下发生突变后，势必影响与食欲素的结合及下游的信号通路，从而直接或间接的影响食欲素的生物学作用，引起心血管及神经系统的疾病。

OX2R 基因多态性对机体的影响研究相对较少。在我们的前期实验研究中，发现 OX2R 被 Orexin A 和 Orexin B 刺激后，223、243、231 3 个位点的碱基发生了突变，造成编码不同的氨基酸，从而形成不同结构、序列的蛋白质。因此，本文利用了分子生物学技术，成功构建了 3 个突变体的质粒，为证明其是否正常表达，本实验选用 HEK293T 细胞作为模型细胞，此细胞为裸细胞，不影响质粒转染之后的任何表达，而且转染效率较高，常被选用作为转染的工具细胞来检测质粒的表达。此次实验将构建的 pOX2R-Venus 质粒成功转染至 HEK293T 细胞中，利用超高分分辨率显微镜观测到野生型与突变型受体均能够在该细胞质膜部位表达，同时此次构建的真核表达载体为下一步研究该受体的功能等机制奠定基础。

本文是我们进一步研究 OX2R 功能的基础，下一步我们将采用 Western blotting 技术、Q-RTPCR 技术、生物发光共振能量转移等技术，研究 OX2R 突变受体与 G 蛋白之间的相互作用，阐明这 3 个突变位点的氨基酸分别在信号转导通路，生物学功能中发挥的重要作用。

参考文献：

[1] Gotter AL, Webber AL, Coleman PJ, et al. International uUnion of basic and clinical pharmacology. LXXXVI. Orexin receptor function, nomenclature and pharmacology[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(3): 389-420. DOI: 10.1124/pr.111.005546.

[2] Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, et al. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain[J]. FEBS Lett, 1998, 438(1-2): 71-75.

[3] Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene[J]. Cell, 1999, 98(3): 365-376.

[4] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation[J]. Cell, 1999, 98(4): 437-451.

[5] Schürks M, Limmroth V, Geissler I, et al. Association between migraine and the G1246A polymorphism in the hypocretin receptor 2 gene[J]. Headache, 2007, 47(8): 1195-1199.

[6] Annerbrink K, Westberg L, Olsson M, et al. Panic disorder is associated with the Val308Iso polymorphism in the hypocretin receptor gene[J]. Psychiatr Genet, 2011, 21(2): 85-89. DOI: 10.1097/YPG.0b013e328341a3db.

[7] Rainero I, Gallone S, Rubino E, et al. Haplotype analysis confirms the association between the HCRTR2 gene and cluster headache[J]. Headache, 2008, 48(7): 1108-1114. DOI: 10.1111/j.1526-4610.2008.01080.x. Epub 2008 Apr 8.

[8] 黄伟伟，池恒，唐吉友. Orexin 受体基因多态性与神经精神疾病的研究进展[J]. 临床神经病学杂志，2016，29(2)：151-153.

[9] Bockaert J. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success[J]. EMBO J, 1999, 18(7): 1723-1729.

[10] Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 639-650.

[11] Dryja TP. Doyne Lecture. Rhodopsin and autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. Eye (Lond), 1992, 6(Pt 1): 1-10.

[12] Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, et al. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone[J]. Nature, 1992, 357(6376): 333-335.

[13] Parma J, Duprez L, Van Sande J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas[J]. Nature, 1993, 365(6447): 649-651.

（收稿日期 2017-11-09）
（本文编辑：石俊强）