

人 G 蛋白偶联受体 107 表达载体构建及细胞定位的研究

冯 阳¹, 贺 凡¹, 涂珍珍¹, 臧丹丹², 倪鸣岳¹, 周海胜^{1,2}

摘要 目的 克隆人 G 蛋白偶联受体 107 (GPR107) 基因以构建真核表达载体,并探讨 GPR107 在真核细胞中的亚细胞定位。方法 通过分子克隆技术克隆人 GPR107 基因的 cDNA; 利用真核细胞表达载体 pCMV-Tag2B 构建重组载体 pCMV-Tag2B-GPR107,瞬时转染至 293T 细胞,Western blot 检测 GPR107 的表达变化; 采用免疫荧光标记,激光共聚焦显微镜观察 GPR107 在细胞中的定位。结果 经过基因测序证实获得人 GPR107 的 cDNA; 成功构建真核表达载体 pCMV-Tag2B-GPR107; Western blot 结果显示,与未转染组比较,转染组 GPR107 表达量明显上调。激光共聚焦显微镜观察显示 GPR107 主要表达于细胞质。结论 GPR107 在 293T 细胞中过表达,并定位于细胞质。

关键词 GPR107; 表达; 转染; 亚细胞定位

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)07-1012-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.002

G 蛋白偶联受体 107 (G protein-coupled receptor 107, GPR107) 是 G 蛋白偶联受体超家族成员,因尚未找到其天然配体,属于孤儿受体^[1]。人类 GPR107 的 cDNA 最先从肺组织中获得克隆。GPR107 蛋白结构分析显示其 N-末端存在疏水的信号肽和 7 个跨膜区,这是 G 蛋白偶联受体超家族成员的典型特征^[2]。GPR107 在系统发育上高度保守,有研究^[3]表明 GPR107 与网格蛋白和逆转录蛋白 VPS35 结合,并且可能负责受体从内细胞室返回质膜,GPR107 可能是与 G 蛋白结合以调节细胞内囊泡运输的受体之一。

为了过量表达 GPR107 蛋白并确定其亚细胞定位,利用分子克隆技术构建质粒 pCMV-Tag2B-GPR107,将其转染至人胚肾上皮细胞 (HEK 293T),通过 Western blot、激光共聚焦等方法,观察转染前

后 GPR107 在体内的表达变化及其亚细胞分布,为进一步研究 GPR107 的功能及作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系与载体 人胚胎肾细胞系 293T 细胞在该实验室保存; 真核细胞表达载体 pCMV-Tag-2B 购自美国 Promega 公司; 克隆载体 pMD-18T 购自大连宝生物有限公司; 自人 cDNA 文库中获得 GPR107 cDNA 的质粒 (克隆号: 23329) 由厦门大学韩家淮教授惠赠。

1.1.2 引物 根据韩家淮教授实验室提供人 GPR107 基因的 mRNA 序列,利用 Primer-BLAST 在线软件进行引物设计。根据真核表达载体 pCMV-Tag 2B 多克隆位点的限制性核酸内切酶,在上游和下游引物的 5' 端分别引入限制性核酸内切酶 BamH I 和 Hind III 的识别序列及其保护碱基。使用的引物序列为: 上游引物 P1, 5'-CGCGGATCCGCGATG-GCCGCTCTGGCGC-3' (红色表示 BamH I 识别位点); 下游引物 P2, 5'-CCCAGCCTTGGGCACGGCGC-CTTCCCAC-3' (红色表示 Hind III 识别位点)。引物由上海生物工程有限公司合成。

1.1.3 主要试剂 DMEM 高糖培养基、青霉素和链霉素双抗混合液、磷酸盐缓冲液 (PBS) 均购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Corning 公司; Taq 酶、PCR 试剂盒、DNA Marker 均购自日本 TaKaRa 公司; 转染试剂 I'mafect 购自北京 Imagen 公司; 鼠源抗 GPR107 和兔源抗 GAPDH 抗体均购自安徽朵能生物科技有限公司; 兔源抗 Flag 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 按 1:150 扩增含 GPR107 cDNA 的质粒菌液,培养过夜后提取质粒。以提取的质粒 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增 GPR107 cDNA。PCR 的条件是: 95℃、5 min, 95℃、30 s, 65℃、30 s, 72℃、100 s, 72℃、5 min, 共 35 个循环。琼脂糖凝胶电泳分离目的 DNA,切胶回收目的片段,与 pMD18-T Vector 连接构建重组克隆载体,利

2020-12-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81772909)

作者单位: ¹ 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

² 安徽医科大学科研实验中心,合肥 230032

作者简介: 冯 阳,女,硕士研究生;

周海胜,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

用 BamH I 和 Hind III 消化 pCMV-Tag 2B 载体和重组的克隆载体,切胶回收目的 DNA,用 T4 DNA 连接酶连接 GPR107 目的片段和 pCMV-Tag 2B 载体,然后转化到感受态细胞中,平板克隆后挑取菌落扩大培养,PCR 鉴定,提取质粒,经 BamH I、Hind III 双酶切后,选取酶切鉴定条带位置一致的克隆,送上海生物工程股份有限公司测序。

1.2.2 细胞培养 人胚胎肾细胞系 293T 使用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基,于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。

1.2.3 重组质粒 pCMV-Tag2B-GPR107 瞬时转染细胞 293T 细胞以 1×10^6 接种于 60 mm 培养皿,待其贴壁后长至 70% ~ 80% 密度后进行转染,转染前 1 h,更换新鲜的完全培养基,置 37 °C、5% CO₂ 培养,同时配置转染工作液,脂质体与 DNA 的比例为 1 : 1.5,即将 4 μ l I'mafect 转染试剂稀释至 100 μ l 不含血清的培养液中轻轻混匀、6 μ g DNA 稀释至 100 μ l 不含血清的培养液中轻轻混匀,室温放置 5 min 后,将 I'mafect 稀释液逐滴加入 DNA 稀释液中,轻轻混匀后室温放置 20 min,将 200 μ l 转染工作液逐滴加入 293T 培养液中,6 h 后更换含 10% FBS 的高糖 DMEM,培养 48 h 后收取蛋白。

1.2.4 Western blot 实验 转染 48 h 后,收集细胞总蛋白。制备 10% 的 SDS-PAGE 凝胶,上样后 80 V 恒压待浓缩胶平齐后,120 V 恒压至最底端,恒流 200 mA、90 min 转膜,4 °C 封闭 5 h,4 °C 过夜孵育一抗 GPR107(1 : 2 000)、GAPDH(1 : 5 000)。次日 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,4 °C HRP 标记的二抗孵育 3 h,TBST 洗涤 3 次后,ECL 发光试剂反应,凝胶成像系统采集图像,最后用 Image J 软件对目的条带进行灰度分析。

1.2.5 激光共聚焦实验 先将 pCMV-Tag2B-GPR107 瞬时转染细胞至 293T 细胞,待 24 h 后取 20% 左右已经转染的细胞铺至玻底培养皿,待细胞贴壁,24 h 后,弃培养基,PBS 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.3% Triton X-100 透化剂透化,加入 3% 马血清封闭 1 h,一抗(兔源抗 Flag)4 °C 孵育过夜,使用带荧光标记 Alexa Fluor 647 的二抗 4 °C 孵育 2 h,室温染核 10 min,激光共聚焦显微镜观察、拍片。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,多组均数间两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 pCMV-Tag2B-GPR107 载体构建结果 利用人 cDNA 文库中获得的 GPR107 cDNA 质粒为模板,通过 PCR 获得人 GPR107 cDNA(图 1A),GPR107 目的片段长度为 1 659 bp,连接到克隆载体 pMD18-T Vector 上并将其菌液进行 PCR 鉴定。PCR 结果显示,提取的 10 个克隆中有 7 个克隆为阳性重组载体(图 1B)。将 2 号克隆进行扩增、提取质粒 DNA、BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定,获得与目的片段大小一致的 DNA(图 1C)。将此目的 DNA 亚克隆到带有 Flag 标签的 pCMV-Tag2B 载体并进行 PCR 鉴定,筛选出 4 个阳性的重组表达载体(图 1D),选取 2 号克隆进行 DNA 测序,将测序结果与原 cDNA 序列进行比对,实验表明目的基因无突变且表达框无误以及 pCMV-Tag2B-GPR107 载体构建成功。

2.2 重组质粒 pCMV-Tag2B-GPR107 转染 293T 细胞后蛋白表达量变化 为了在细胞水平检测 GPR107 的表达量变化,将 pCMV-Tag2B-GPR107 重组质粒转染至 293T 细胞,48 h 后提取蛋白,结果显示:未转染组 GPR107 蛋白相对表达量为 0.28,Flag 蛋白相对表达量为 0.31,转染组 GPR107 蛋白相对表达量为 0.59,Flag 蛋白相对表达量为 0.81,故与未转染组比较,转染了 pCMV-Tag2B-GPR107 的实验组 GPR107 的蛋白量明显上调($F = 28.408, P = 0.033$);同样转染组 Flag 蛋白量也明显上调($F = 87.433, P = 0.011$)(图 2)。

2.3 激光共聚焦显微镜实验结果 为了检测 GPR107 在细胞内的定位情况,将 pCMV-Tag2B-GPR107 转染 293T 细胞,于激光共聚焦显微镜下观察 GPR107 细胞内的分布情况,图 3 结果显示 GPR107 主要分布在细胞质中。

3 讨论

GPR107 是最早从哺乳动物肺中克隆到的 cDNA,属于一个新的编码蛋白家族的成员。人类 GPR107 基因位于 9q34.11 的常染色体区域,基因全长 86.4 kb,包含 18 个外显子^[4]。其蛋白质结构分析提示疏水信号肽序列位于氨基末端、一个较长的胞外结构域和 7 个跨膜结构域(LUSTR 结构域),这 7 次跨膜结构域与 GPCRs 相似,位于羧基末端。而在每个 LUSTR 亚家族中,第 3 个细胞内环高度保守,通常在其他 GPCR 的第 3 个细胞内环结构域参

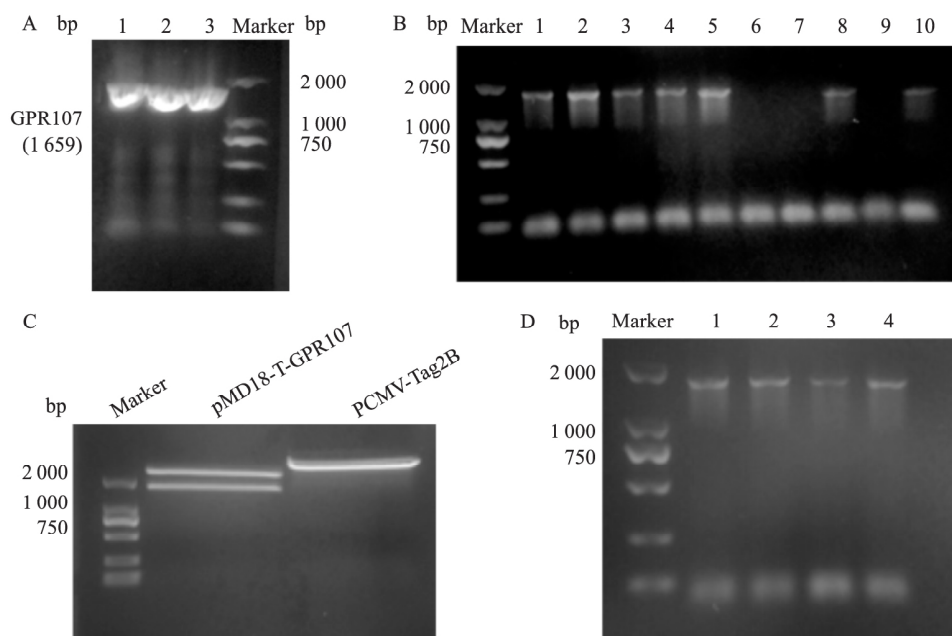


图1 pCMV-Tag2B-GPR107 载体构建

A: GPR107 片段 PCR 结果(1~3: 不同克隆编号); B: GPR107 与 T 载体连接后菌液 PCR 结果(1~10: 不同重组克隆载体的菌液编号); C: BamH I 和 Hind III 双酶切与 T 载体连接的 GPR107 质粒及 pCMV-Tag 2B; D: pCMV-Tag 2B 与 GPR107 连接后的菌液 PCR(1~4: 不同重组表达载体的菌液编号)

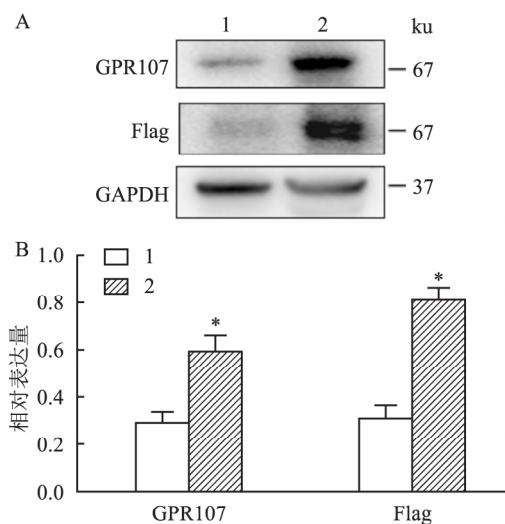


图2 Western blot 检测 GPR107 在 293T 细胞中的表达量

A: 293T 细胞 GPR107 和 Flag 的表达; B: GAPDH 作为内参, GPR107 和 Flag 相对定量分析; 1: 293T/未转染组; 2: 293T/GPR107 组; 与 293T/未转染组比较: * $P < 0.05$

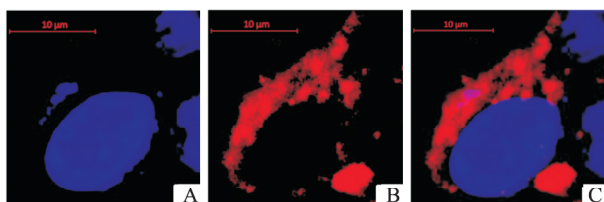


图3 GPR107 在 293T 细胞中的定位 ×640

A: 细胞核染色图, DAPI 染色代表细胞核; B: 红色代表 Flag, 即 pCMV-Tag2B-GPR107 在细胞中的表达量; C: A、B 两图合并结果

与 G 蛋白结合和受体信号传递, 表明 LUSTR 蛋白的这一区域也参与 G 蛋白偶联的信号转导过程^[4-5]。因此, 确定 GPR107 在细胞中的分布, 为证实 GPR107 羧基末端对其细胞定位及转运过程中的作用奠定基础。

为了确定 GPR107 蛋白在细胞内分布, 该研究构建了人 GPR107 的真核表达载体, 在转染 293T 细胞后获取总蛋白进行 Western blot 分析, 结果显示 GPR107 在人 293T 细胞中成功过量表达。GPR107 是具有 7 个跨膜的蛋白, 既往研究^[6]表明 GPR107 的主要功能可能是与 G 蛋白结合以调节细胞内囊泡运输。而富含囊泡的亚细胞器结构主要是分布于细胞质中的内质网和高尔基体, 免疫荧光共定位结果显示 GPR107 在细胞内表达主要在细胞质中, 而在细胞核中未见 GPR107 的表达, 这与文献^[6]报道的 GPR107 定位于高尔基体与核质有差异, 可能与 GPR107 表达的细胞种类有关。

既往研究^[6]表明, GPR107 可能是一种神经生长抑素的候选受体, 通过与神经生长抑素相互作用, 在心血管功能的中枢调控中发挥重要作用, 而且 GPR107 在胰腺组织中具有较高的表达水平。研究^[7]表明, 在小鼠和人胰腺细胞上 GPR107 和神经生长抑素可以发生共定位, 可能参与胰腺分泌进而影响消化系统的功能。此外, 有报道^[8-9] GPR107 在

肝癌和前列腺癌组织中具有较高表达水平,提示 GPR107 可能与肿瘤的发生发展密切相关。故 GPR107 在 293T 细胞中的过表达或许也是与肿瘤有关,具体机制有待进一步研究。

GPR107 在高等真核生物中普遍的表达和保守模式^[1]使得 GPR107 可能属于在高尔基体中协调 G 蛋白依赖事件的 GPCRs^[1-12]。通过成功构建人 GPR107 的真核表达载体,研究表明能在 293T 细胞中过量表达,并主要分布在细胞质中,为后续研究其作用机制奠定基础。同时,需要对 GPR107 在不同细胞中表达定位的差异性与 GPR107 的功能及其作用机制进行更深入研究。

参考文献

- [1] Tafesse F G, Guimaraes C P, Maruyama T, et al. GPR107, a G-protein-coupled receptor essential for intoxication by pseudomonas aeruginosa exotoxin A, localizes to the Golgi and is cleaved by furin [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(35): 24005–18.
- [2] Zhou G L, Na S Y, Niedra R, et al. Deficits in receptor-mediated endocytosis and recycling in cells from mice with GPR107 locus disruption [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127: 3916–27.
- [3] Edgar A J. Human GPR107 and murine GPR108 are members of the LUSTR family of proteins found in both plants and animals, having similar topology to G-protein coupled receptors [J]. *DNA Seq*, 2007, 18(3): 235–41.
- [4] Georgoussi Z, Merkouris M, Mullaney I, et al. Selective interactions of mu-opioid receptors with pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1359: 263–74.
- [5] Hawes B E, Luttrell L M, Exum S T, et al. Inhibition of G protein-coupled receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptor [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 15776–85.
- [6] Yosten G L, Redlinger L J, Samson W K. Evidence for an interaction of neuronostatin with the orphan G protein-coupled receptor, GPR107 [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 303(9): R941–9.
- [7] Elirick M M, Samson W K, Corbett J A, et al. Neuronostatin acts via GPR107 to increase cAMP-independent PKA phosphorylation and proglucagon mRNA accumulation in pancreatic α -cells [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016, 310(2): R143–55.
- [8] Huang G, Jiang H, Lin Y, et al. LncGPR107 drives the self-renewal of liver tumor initiating cells and liver tumorigenesis through GPR107-dependent manner [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 121.
- [9] Sáez-Martín P, Jiménez-Vacas J M, León-González A J, et al. Unleashing the diagnostic, prognostic and therapeutic potential of the neuronostatin/GPR107 system in prostate cancer [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(6): 1703.
- [10] Gorbushin A M, Klimovich A V, Iakovleva N V. Himasthla elongata: effect of infection on expression of the LUSTR-like receptor mRNA in common periwinkle haemocytes [J]. *Exp Parasitol*, 2009, 123(1): 24–30.
- [11] Jamora C, Takizawa P A, Zaarour R F, et al. Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G proteins [J]. *Cell*, 1997, 91(5): 617–26.
- [12] Stow J L, de Almeida J B, Narula N, et al. A heterotrimeric G protein, G α i-3, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LLC-PK1 epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1991, 114(6): 1113–24.

Construction and cellular localization of human G protein coupled receptor 107 expression vector

Feng Yang, He Fan, Tu Zhenzhen, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct eukaryotic expression vector and to explore the subcellular localization of GPR107 in eukaryotic cells, human G protein coupled receptor 107 (GPR107) gene is cloned. **Methods** Firstly, the cDNA of human GPR107 gene was cloned by molecular cloning technique, and the recombinant vector pCMV-Tag2B-GPR107 was constructed by eukaryotic expression vector pCMV-Tag2B. The expression of GPR107 was detected by Western blot, and the localization of GPR107 in 293T cells was observed by immunofluorescence labeling and laser confocal microscope. **Results** The cDNA of human GPR107 was confirmed by gene sequencing and the eukaryotic expression vector pCMV-Tag2B-GPR107 was constructed successfully. The results of Western blot showed that compared with the non-transfection group, the expression of GPR107 in the transfection group was significantly up-regulated. Laser confocal microscopy showed that GPR107 was mainly expressed in the cytoplasm. **Conclusion** GPR107 is overexpressed in 293T cells and localized in the cytoplasm.

Key words GPR107; expression; transfection; cellular localization