

## 小鼠 OX2βR 突变体表达载体的构建\*

潘衍有 王春梅 陈京<sup>△</sup> 白波<sup>△</sup>

(济宁医学院泰山学者实验室, 山东 济宁 272067)

**摘要 目的** 通过分子生物学方法构建小鼠 Orexin 2β 受体(mOX2βR) C 末端突变表达载体。**方法** 设计特异性引物, 采用聚合酶链反应(PCR)技术, 通过胶回收、酶切、连接、转化和测序等生物技术, 构建 mOX2βR 突变体的表达载体。**结果** 成功构建 mOX2βR 突变表达载体, 将其分别命名为 mu1、mu2 和 mu3。**结论** 成功构建了 mOX2βR C 端不同的突变体, 为进一步研究 mOX2βR C 末端氨基酸在信号通路中的作用奠定了基础。

**关键词** mOX2βR; 突变体; G 蛋白耦联受体; 表达载体

**中图分类号**: R37 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2013)10-313-05

### Construction of mouse OX2βR mutant expression plasmid

PAN Yan-you, WANG Chun-mei, CHEN Jing, et al

(Taishan Scholar Laboratory of Jining Medical University, Jining 272067, China)

**Abstract: Objective** To construct the mOX2βR mutation expression vector by using molecular biology method. **Methods** We had designed specific primer in our research. These genes were amplified by Polymerase Chain Reaction(PCR) using the plasmid pcDNA3.1-mOX2βR as template. The PCR product was cut by restriction endonuclease BamH I and Xba I, connected by T4 DNA ligase and then be transformed into the *E. coli* competence DH5α. The construct of expression vector of mOX2βR mutants was identified by DNA sequencing. **Results** We successfully built mOX2βR mutant expression vector named mu1, mu2 and mu3, respectively. **Conclusion** The mouse OX2βR mutant expression vectors were successfully constructed, and the expression vectors can be used to study the influence of mOX2βR carboxyl terminal mutations on the signal pathways, which will lay the foundation for the development of new drugs.

**Key words**: mOX2βR; Carboxyl terminal mutant; G protein coupled receptor; Expression vector

食欲素(Orexins)有促进食欲、参与能量平衡<sup>[1]</sup>、增强胃酸分泌<sup>[2]</sup>和糖皮质激素释放的作用<sup>[3]</sup>,并参与生殖功能<sup>[4]</sup>、心血管<sup>[5]</sup>和睡眠觉醒周期的调节,还在发作性睡病的发病机制中发挥重要的作用<sup>[6]</sup>。Orexins 受体是细胞膜 G 蛋白耦联受体(GPCRs)超家族 A 的成员<sup>[7]</sup>。它能与多个 G 蛋白偶联,具有组织特异性<sup>[4]</sup>,并受到发育和营养状态的影响<sup>[7]</sup>。在人类和小鼠中,Orexins 通过结合并激活它们的 2 个 G 蛋白耦联受体,Orexin 1 型受体(Orexin1 receptor,OX1R)和 Orexin 2 型受体

(Orexin2 receptor,OX2R)发挥作用。

小鼠 mOX2R C 末端选择性剪接产生 2 个受体 mOX2αR(mouse Orexin2α receptor,mOX2αR)和 mOX2βR (mouse Orexin2β receptor,mOX2βR)<sup>[8-9]</sup>。mOX2αR 是由 7 个外显子和 6 个内含子编码的含 443 个氨基酸的受体,mOX2βR 的 C 末端比 mOX2αR 多 17 个氨基酸,是由 8 个外显子和 7 个内含子编码的含 460 个氨基酸的受体,因此 2 种 mRNA 翻译出的肽段氨基酸序列差异 17 个氨基酸<sup>[8]</sup>。

我们对小鼠脑中 mOX2βR 和 mOX2αR 基因的差异表达进行了研究。试图构建 mOX2βR 羧基端不同部位突变的 3 个突变体,旨在为进一步研究这些突变对下游信号通路的作用奠定基础。

\* [基金项目]国家自然科学基金项目(编号:81241052、81070961、31271243);济宁市科技局项目(编号:2012jnjc08);济宁医学院青年基金项目(编号:TYQ2011K200)

<sup>△</sup>[通信作者]陈京,E-mail:chenjnm@163.com

白波,E-mail:bbai@mail.jnmc.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本实验所用大肠杆菌菌株为 *E. coli* DH5 $\alpha$ (上海生工公司),克隆和表达载体为 pcDNA3.1(本实验室保存)。

高纯度质粒小量提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物公司,限制性内切酶、Taq 酶、T4 DNA 连接酶等修饰酶购置于

宝生物(大连)公司。本实验所用引物均由上海生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物的设计** 在数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=AY336085>)中获得 mOX2 $\beta$ R 的基因序列,利用生物软件 DNAMAN 设计分析引物,并在引物的 5' 端分别加上内切酶 BamH I 和 Xba I 的酶切位点及 3~4 个保护碱基(引物序列见表 1),引物均由上海生工公司合成。

表 1 扩增突变体的引物序列

目的基因	引物名称	引物序列(5'-3')
mOX2 $\beta$ R-mu1	F1	CTAGTCTAGAATGTCCAGCACCAAAGTGGAGG
	R1	CGCGGATCCCTATCCCTGCTGTAGATACCAG
mOX2 $\beta$ R-mu2	F1	CTAGTCTAGAATGTCCAGCACCAAAGTGGAGG
	R2	CGCGGATCCCTATGAAGATGGTACTCCCTGC
mOX2 $\beta$ R-mu3	F1	CTAGTCTAGAATGTCCAGCACCAAAGTGGAGG
	R3	CGCGGATCCCTAGGTGGACAGGAGTGAAGAT
mOX2 $\beta$ R	F1	CTAGTCTAGAATGTCCAGCACCAAAGTGGAGG
	R4	CGCGGATCCCTAGACCTCCAGCCAGGTGGAC

**1.2.2 PCR 扩增** 上述引物合成后,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系(50 $\mu$ l)如下:2 $\times$ 反应缓冲液 25 $\mu$ l,10 $\mu$ M 上游引物 1 $\mu$ l,10 $\mu$ M 下游引物 1 $\mu$ l,DNA 2 $\mu$ l(小于 1 $\mu$ g),ddH<sub>2</sub>O 21 $\mu$ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 40s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min;4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.3 酶切反应** 对 PCR 产物和载体 pcDNA3.1 分别进行双酶切,酶切体系为(50 $\mu$ l):10 $\times$ K Buffer 5 $\mu$ l,BamH I 2.5 $\mu$ l,Xba I 2.5 $\mu$ l,PCR 产物 15 $\mu$ l(pcDNA3.1 10 $\mu$ l),ddH<sub>2</sub>O 补足 50 $\mu$ l。

酶切反应在 37 $^{\circ}$ C 水浴中进行,3h 后酶切反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳,利用凝胶回收试剂盒回收酶切产物。

**1.2.4 目的片段的回收** 按琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 DNA 目的片段。

**1.2.5 连接反应** 将上述酶切产物进行连接,连接体系为(20 $\mu$ l):10 $\times$ 连接 Buffer 2 $\mu$ l,载体片段 6 $\mu$ l,目的基因片段 10 $\mu$ l,T4 DNA 连接酶 2 $\mu$ l。连接反应在 4 $^{\circ}$ C 下进行。16~20h 后,70 $^{\circ}$ C 水浴 10min 灭活连接酶,终止连接反应。将连接产物暂

时储存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱,等待转化。

**1.2.6 转化反应** 1)准备 LB/Amp/IPTG/X-Gal 固体培养基(每板涂浓度为 50mg/ml 的 IPTG 溶液和 20g/ml 的 X-Gal 各 40 $\mu$ l,室温下放置 2~3h);2)从 -80 $^{\circ}$ C 冰柜中取出感受态细胞,手持管壁将其融化,立即转移至冰浴静置 10min;3)将待转化的 DNA(每 100 $\mu$ l 感受态细胞加入 50ng DNA,体积不要超过感受态细胞体积的 5%)适量体积转移至感受态菌液中,轻轻混匀,冰浴中静置 20min;4)42 $^{\circ}$ C 准确热击 90s,然后立即冰浴 2min。加入 900 $\mu$ l LB 液体培养基(不含抗生素),37 $^{\circ}$ C 摇床 150rpm 振荡培养 1h;5)4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 1min,弃去上清后,用 80 $\mu$ l 液体 LB 培养基悬浮沉淀。取适量涂于含有 IPTG/X-Gal 的平板培养基上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~20h。选取透明菌落,进行菌落 PCR 鉴定。

**1.2.7 碱法小量质粒 DNA 的提取** 按高纯度质粒小量提取试剂盒说明书步骤提取质粒。

**1.2.8 测序反应** 测序引物见表 2。

表 2 测序引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
T7	TAATAADCGACTCACTATAGGG
SP6	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
M13+	GGTAACGCCAGGGTTTTCC
M13-	CAGGAAACAGCTATGACC

DNA 序列测定分别在上海生工生物工程技术有限公司和北京六合华大基因科技股份有限公司进行。

1.3 序列分析

核苷酸序列测定后,利用 Vector NTI 10.0 和

DNAman 生物软件进行序列拼接、分析和比对。

2 结果

2.1 PCR 引物的设计

我们以 mOX2βR (AY336085) 序列为模板分别设计了 4 对引物,上游引物为共用引物 F1,下游引物命名为 R1、R2、R3 和 R4(引物序列见表 1),在 mOX2βR 序列上对应的相应位置如图 1 所示。用设计的引物进行 PCR 扩增,所得扩增产物分别对应突变体 1(mu1)、突变体 2(mu2)、突变体 3(mu3)和 mOX2βR,各产物片段长度分别依次相差 12bp。

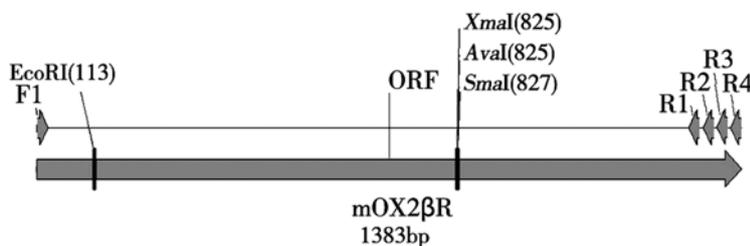


图 1 引物设计模式图

2.2 PCR 扩增产物

通过 PCR 反应实验,得到扩增产物,利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,结果发现在 1400bp 左右出现特异性条带,与预计条带大小相符(图 2)。

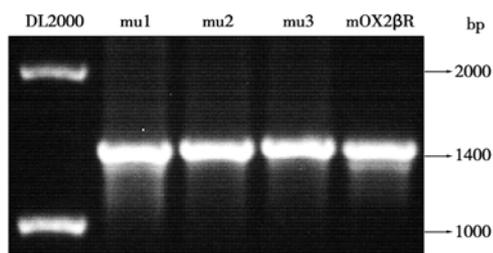


图 2 PCR 产物电泳图

2.3 酶切检测图

分别利用 BamH I 和 Xba I 双酶切构建好的重组质粒,出现 2 条 DNA 条带,大小分别在 1400bp 和 5500bp 左右,符合预期(图 3)。

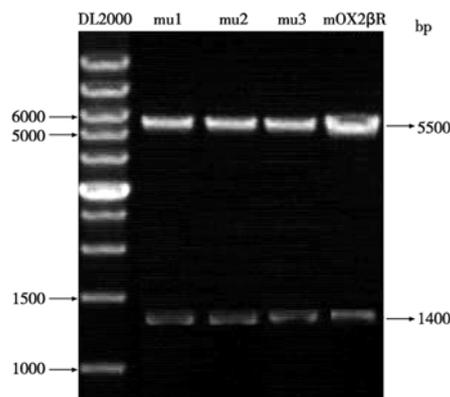


图 3 酶切产物电泳图

2.4 序列比对图

通过比较突变体 1、2、3 和 mOX2βR 模板的核苷酸序列,发现在序列的 3'端依次存在 12bp 的差异(图 4)。

将核苷酸翻译成蛋白质后,通过比对发现,蛋白质突变体 1、2、3 和原序列之间依次相差 4 个氨基酸(图 5)。

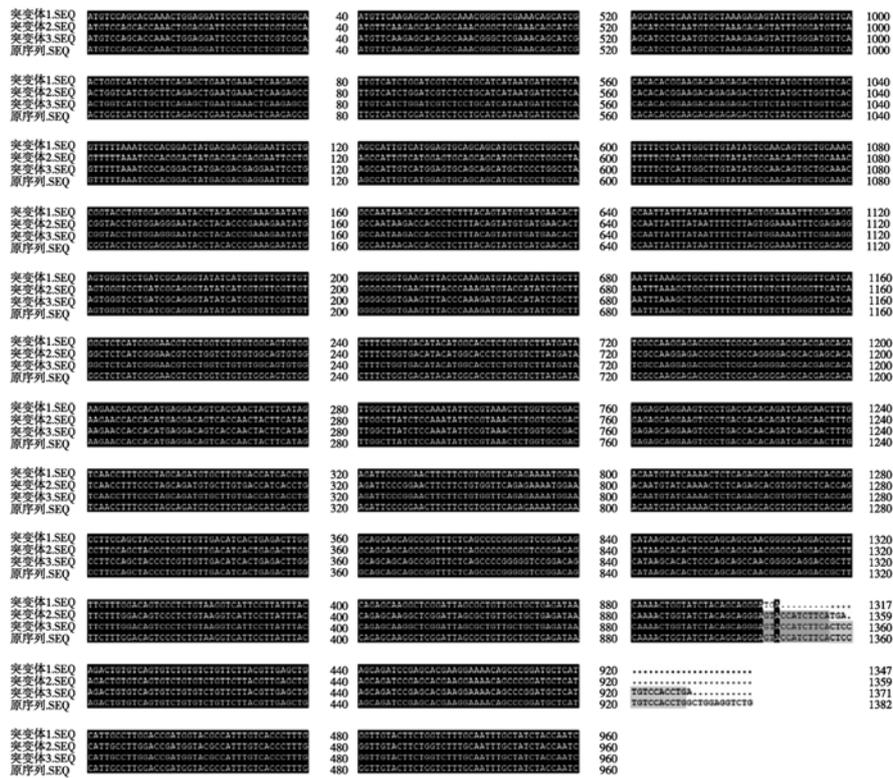


图4 核苷酸序列比对图

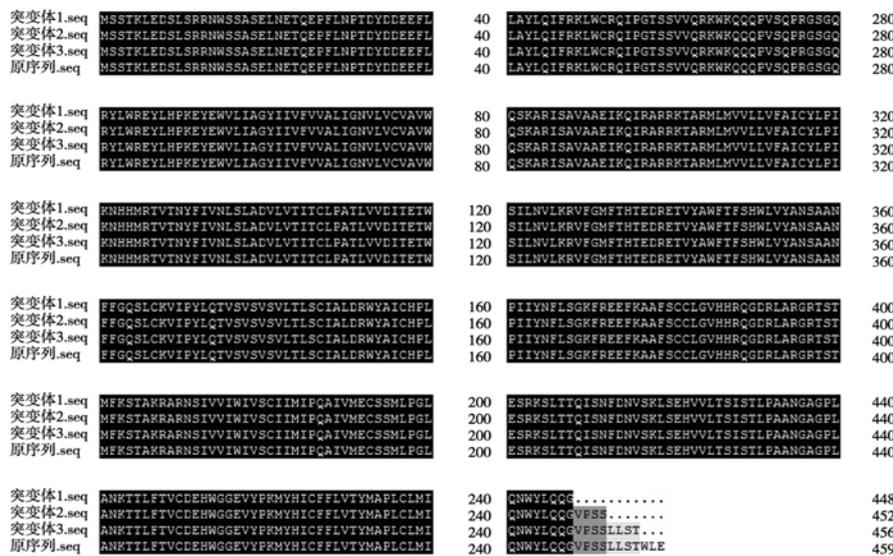


图5 氨基酸序列比对图

### 3 讨论

Orexins 的发现对于发作性睡病的诊断具有重大意义。Orexin 基因敲除大鼠可制成人发作性睡病的动物模型<sup>[6]</sup>。我们的前期研究表明,Orexin B 与 mOX2βR 作用后产生的肌醇三磷酸(inositol

triphosphate, IP3)与 mOX2αR 相比显著增加,显示这 2 个受体具有不同的功能及发挥重要的生理作用<sup>[8]</sup>。随后,我们对小鼠脑中 mOX2αR 和 mOX2βR 基因的差异表达进行了详细的研究。采用 RT-PCR 和原位杂交技术,我们发现 mOX2αR 可在除纹状体、中脑和小脑前部的(下转第 319 页)

高,活化了 p38 MAPK<sup>[4]</sup>。洛伐他汀、氟伐他汀和辛伐他汀对肝癌 HepG2 细胞均具有毒性作用<sup>[5]</sup>。在前列腺癌 PC3 细胞中,阿伐他汀增强了放疗的敏感性<sup>[6]</sup>。洛伐他汀还引起了卵巢癌细胞凋亡,增强了阿霉素的抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。氧化应激在药物抗肿瘤中发挥重要作用,ROS 生成过多或清除能力降低导致氧化应激,引起脂质过氧化、DNA 损伤和蛋白质表达异常,细胞发生凋亡。他汀类药物在抑制肿瘤生长的过程中引起了氧化应激,导致肿瘤细胞凋亡<sup>[7]</sup>。在我们实验中,洛伐他汀引起了喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞凋亡,可能与洛伐他汀引起了 Hep-2 超氧化物生成增加有关。

**参考文献:**

[1] Hoque A, Chen H, Xu XC. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(1):88-94.  
 [2] Martirosyan A, Clendening JW, Goard CA, et al. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance[J]. *BMC cancer*,

2010, 10:103.  
 [3] Platz EA, Till C, Goodman PJ, et al. Men with low serum cholesterol have a lower risk of high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(11): 2807-2813.  
 [4] Chang HL, Chen CY, Hsu YF, et al. Simvastatin induced HCT116 colorectal cancer cell apoptosis through p38MAPK-p53-survivin signaling cascade[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, 1830(8):4053-4064.  
 [5] Kah J, Wustenberg A, Keller AD, et al. Selective induction of apoptosis by HMG-CoA reductase inhibitors in hepatoma cells and dependence on p53 expression[J]. *Oncology reports*, 2012, 28(3):1077-1083.  
 [6] He Z, Mangala LS, Theriot CA, et al. Cell killing and radiosensitizing effects of atorvastatin in PC3 prostate cancer cells[J]. *Journal of radiation research*, 2012, 53(2):225-233.  
 [7] Shi Y, Felley-Bosco E, Marti TM, et al. Differential effects of lovastatin on cisplatin responses in normal human mesothelial cells versus cancer cells; implication for therapy[J]. *PLoS one*, 2012, 7(9):e45354.

(收稿日期 2013-07-25)

(上接第 316 页)

的脑组织中检测到,而且 mOX2R 的 2 个受体在小鼠脑中差异表达<sup>[9]</sup>。

小鼠 Orexin 2 型受体 C 末端选择性剪接产生 2 个受体 mOX2 $\alpha$ R 和 mOX2 $\beta$ R, 后者的 C 末端比前者的多 17 个氨基酸<sup>[8-9]</sup>。本文利用分子克隆技术,通过对 mOX2 $\beta$ R C 末端进行基因突变,成功构建了 mOX2 $\beta$ R C 末端不同部位突变的 3 个突变体。进一步,我们将采用共聚焦显微镜、免疫共沉淀、生物发光共振能量转移、生物发光共振能量转移及细胞增殖等实验技术系统地 2 个受体的 C 末端的功能序列进行进一步的探究。阐明哪些氨基酸残基在信号转导途径中起重要和关键作用,为探寻相关疾病治疗的新突破点及新药开发奠定理论基础。

**参考文献:**

[1] Ida T, Nakahara K, Katayama T, et al. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats[J]. *Brain Res*, 1999, 821(2):526-529.  
 [2] Takahashi N, Okumura T, Yamada H, et al. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254

(3):623-627.  
 [3] Malendowicz LK, Tortorella C, and Nussdorfer GG. Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999, 70(4-6):185-188.  
 [4] Karteris E, Chen J, Randeve HS. Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(4):1957-1962. (K E and Chen J joint first authors)  
 [5] Samson WK, Gosnell B, Chang JK, et al. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain[J]. *Brain Res*, 1999, 831(1-2):248-253.  
 [6] 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.  
 [7] Karteris E, Machado R, Chen J, et al. Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(6):E1089-E1100.  
 [8] Chen J, Randeve HS. Genomic organization of mouse orexin receptors; characterization of two novel tissue-specific splice variants[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(11):2790-2804.  
 [9] Chen J, Karteris E, Collins D, et al. Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain[J]. *Brain Res*, 2006, 1103(1):20-24.

(收稿日期 2013-08-20)