

大鼠 NPY Y2 受体基因的克隆及 C 端肽的表达和纯化*

程希平 肖华胜 黄文晋 张萍 鞠躬 张旭

(第四军医大学中国人民解放军神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 Y2 受体亚型是早期发现的 NPY 的两种主要受体亚型之一, 参与 NPY 所介导的多种生理和病理功能。为了制备 Y2 受体抗体和开展 Y2 受体的定位研究, 用 RT-PCR 方法从大鼠海马的总 RNA 扩增 NPY 的 Y2 受体全长基因, 接着 PCR 扩增 Y2 受体的 C 端片段, 克隆入表达载体中, 建立了重组 NPY Y2 受体 C 端肽的表达菌株, 并对表达产物进行纯化。

关键词 Y2 受体, 神经肽 Y, 克隆, 表达

学科分类号 R322.81

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是一种具有 36 个氨基酸的多肽, 它和肽 YY 及胰多肽同属胰多肽家族^[1]。哺乳动物中枢及外周神经系统中广泛分布着含 NPY 的神经元和神经纤维。应用 NPY 的各种肽片段进行的受体结合实验以及药理学试验均证明 NPY 具有多种受体亚型^[2]。其中 Y1 和 Y2 受体是早期认识的两种主要受体亚型, 它们分别主要表现为突触后和突触前受体^[3]。Y1 受体和 Y2 受体均已被克隆, 而且还有其他多种受体亚型存在^[2]。Y2 受体作为突触前受体, 起抑制递质释放的作用。例如: Y2 受体在中枢神经系统的海马部位表达, 抑制谷氨酸等递质的释放^[4]。另外, 大鼠外周神经损伤后, 背根节中 Y2 受体作为突触前和/或自身受体发挥着重要作用^[5]。对 Y2 受体的功能进行深入研究, 需要对其在细胞和亚细胞水平进行定位, 然而目前国际上尚无抗 Y2 受体的抗体。作为制备抗体的第一步, 本研究从大鼠海马中获得 Y2 受体编码序列, 成功构建 Y2 受体 C 端肽的表达工程菌, 并对表达的 Y2 受体 C 端肽进行了纯化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种: 大肠杆菌 DH5 α , JM109 菌种为本教研室保存; pUC19 质粒购自美国 Gibco 公司, pGEM-T Easy 质粒购自美国 Promega 公司, pGEX-4T-3 质粒购自瑞典 Pharmacia 公司。

1.1.2 寡聚核苷酸引物: 北京赛百盛公司合成。

1.1.3 试剂盒和酶类: RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒及各种限制性内切酶、连接酶和 Taq

酶均为美国 Promega 公司产品; 高纯质粒提取试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品; T7 测序试剂盒为瑞典 Pharmacia 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增 Y2 受体全长基因: 按照 RNA 提取试剂盒操作指南所示方法提取大鼠海马总 RNA, 以提取的大鼠海马 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增 Y2 受体的全长基因。引物序列如下: 5' 端引物: 5'-GTGACCATGGGCCCATAGGTG-3' (Y2 受体 cDNA 205~227 核苷酸序列); 3' 端引物: 5'-ACAGTCGACTTACACGTTGGTGGCC-3' (Y2 受体 cDNA 1341~1365 核苷酸的反向互补序列)。5' 端引物引入 *Nco*I 酶切位点, 3' 端引物引入 *Sal*I 酶切位点。

1.2.2 RT-PCR 产物克隆及鉴定: 纯化的 RT-PCR 扩增产物经 *Nco*I 酶切, Klenow 补平, *Sal*I 酶切; pUC19 质粒进行 *Sma*I 和 *Sal*I 双酶切后, 片段与载体进行连接反应, 转化感受态 DH5 α , 挑选并鉴定阳性克隆子, 用 T7 测序试剂盒操作指南的 Sanger 双脱氧链终止法进行测序。

1.2.3 PCR 扩增 Y2 受体 C 端核酸片段及其克隆和鉴定: 针对 Y2 受体的 C 端设计引物, 5' 端引物为 5'-AAGCTTTCCTCTCAGCGTTT-3' (Y2 受体 cDNA 1211~1230 核苷酸序列); 3' 端引物同上, 以经测序的 Y2 受体质粒为模板, PCR 扩增 Y2 受体 C 端片段, 纯化的 PCR 扩增产物克隆到 pGEM-T Easy 载体中进行测序。

* 国家自然科学基金 (39525010, 39830160 和 39500045) 资助。

Tel: (029) 3374563, E-mail: xpch@21cn.com

收稿日期: 2000-01-26, 修回日期: 2000-04-08

1.2.4 构建 Y2 受体 C 端片段的重组表达载体: Y2 受体 C 端的 PCR 扩增产物经纯化后进行 *Sal* I 酶切; pGEX-4T-3 质粒进行 *Sma* I 和 *Sal* I 双酶切. 酶切产物经纯化回收后进行连接反应, 挑选阳性克隆子. 正确构建的阳性克隆子命名为 pGEX-Y2R (图 1).

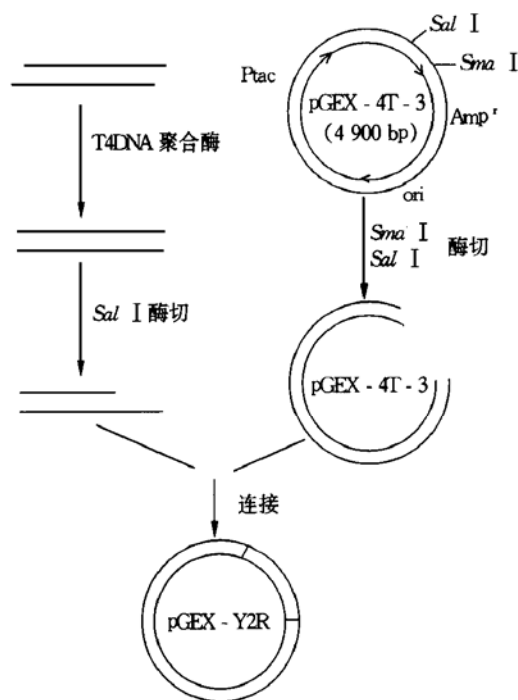


图 1 重组质粒 pGEX-Y2R 的构建

1.2.5 目的蛋白的诱导表达: 工程菌在含氨苄青霉素 (100 g/L) 的 LB 培养液中培养过夜后, 按 2/10 接种量进行转接, 250 r/min 37℃ 振荡至细菌生长到对数期 (约 3 h), 加入异丙基 β-D 硫代半乳糖苷 (终浓度 1 mmol/L) 诱导, 继续 37℃ 通气培养 5 h. 10 000 g 离心 2 min 收集菌体, 超声破菌, 12 000 g 离心 15 min 分离上清和沉淀, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表达蛋白的含量及分子质量.

1.2.6 目的蛋白的纯化: 如上所述诱导大量细菌表达目的蛋白, 超声破菌, 8 mol/L 尿素对蛋白质进行变性, 精氨酸透析复性后, 应用谷胱甘肽琼脂糖亲和和层析柱对目的蛋白进行亲和层析纯化, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色.

2 结 果

2.1 Y2 受体全长基因和 C 端片段的扩增

RT-PCR 扩增 Y2 受体全长基因, 得到约 1.1 kb 的片段 (图 2); PCR 扩增 Y2 受体 C 端片

段, 得到约 150 bp 的片段 (图 3).

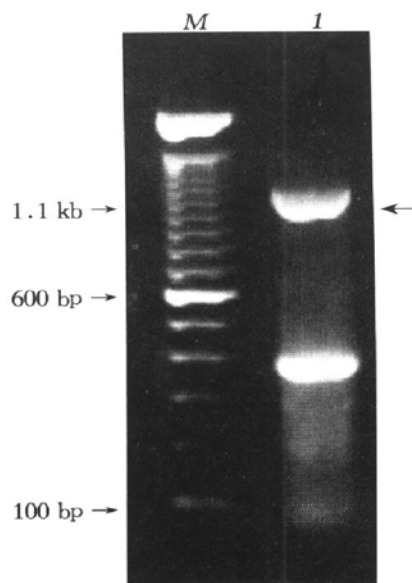


图 2 Y2 受体 RT-PCR 扩增结果

M: 100 bp DNA 分子质量标准参照物; I: 箭头示 Y2 受体全长基因扩增产物.

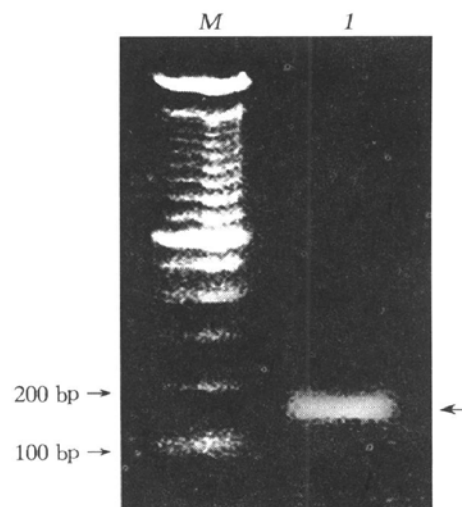


图 3 Y2 受体 C 端基因 PCR 扩增结果

M: 100 bp DNA 分子质量标准参照物; I: 箭头示 Y2 受体 C 端基因 PCR 扩增产物.

2.2 核苷酸序列测定

挑选含插入片段的阳性克隆, 用高纯质粒提取试剂盒提取质粒, 进行 Sanger 双脱氧链终止法测序, Y2 受体全长基因的 5' 端和 3' 端分别测序约 200 bp, 表明所扩增的 Y2 受体基因与已知基因完全相符. Y2 受体 C 端进行全长测序, 结果表明所扩增的 Y2 受体 C 端 155 个核苷酸序列与已知 Y2 受体基因的序列完全相符 (图 4).

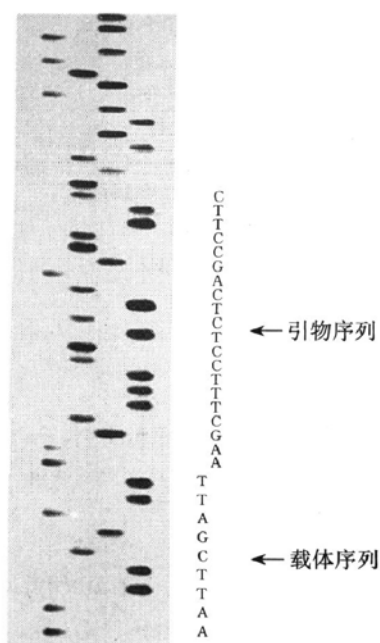


图4 Y2受体C端基因部分序列测定的放射自显影图谱

2.3 重组Y2受体C端肽在大肠杆菌中的表达

pGEX-Y2R 重组质粒以大肠杆菌 DH5 α 为宿主菌, 按方法1.2.4进行异丙基 β -D 硫代半乳糖苷诱导表达, 然后 SDS-PAGE 电泳检测, 考马斯亮蓝染色, pGEX-Y2R 工程菌经异丙基 β -D 硫代半乳糖苷诱导后与未经诱导的相比较, 菌体总蛋白于分子质量 32 ku 处蛋白量可见明显的增多, 表明含 pGEX-Y2R 重组质粒的工程菌经异丙基 β -D 硫代半乳糖苷诱导后, 表达了 GST 和约 6 ku 的 Y2 受体 C 端的融合蛋白 (图 5)。

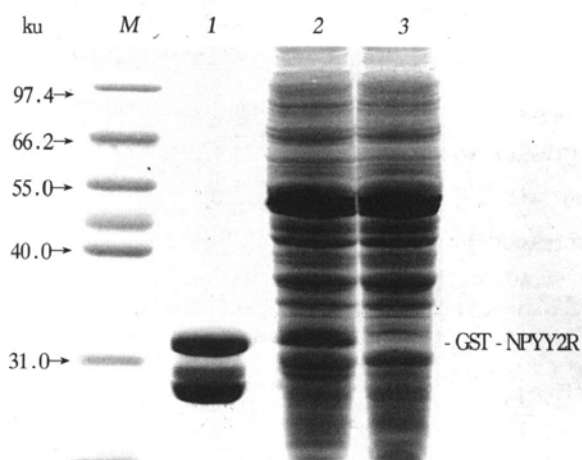


图5 重组 pGEX-Y2R 诱导表达后的 SDS PAGE 结果

M: 蛋白质分子质量标准参照物; 1: 纯化的 Y2 受体 C 端蛋白的融合蛋白 (GST-NPY2R); 2: 诱导后的重组 pGEX-Y2R 菌体蛋白; 3: 未诱导的重组 pGEX-Y2R 菌体蛋白。

2.4 目的蛋白的纯化和鉴定

应用精氨酸氧化法对经 8 mol/L 尿素变性的蛋白质成功地进行了复性, 复性后的目的蛋白经谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱纯化和富集, 得到了位于分子质量 32 ku 处的蛋白质条带 (图 5)。

3 讨 论

NPY 是中枢和外周神经系统中分布最广泛的神经肽之一, 参与摄食、心血管活动和感觉等生理功能^[6]。Y1 和 Y2 受体是早期认识的 NPY 的两种主要受体亚型, Y2 受体象 Y1 受体一样与 NPY 和肽 YY 有高亲和性, 与胰多肽的亲合性较低, 它与 Y1 受体亲和特异性的不同在于它与配基 C 端片段的高亲和性, 如 NPY13~36。Y2 受体作为 NPY 的重要受体之一, 它的功能愈来愈引起人们的注意, 它参与抑制性递质的释放^[4], 慢性痛的病理过程^[5]以及焦虑的形成^[7]等。

本研究扩增出 Y2 受体的全长基因, 并进行了克隆鉴定, 验证性测序结果与已发表的 Y2 受体序列相符。接着尝试用原核表达载体表达 Y2 受体的全长蛋白, 我们应用 pGEX-KG、pBV220、pBV221 以及 pGEX-4T-3 等原核表达载体进行 Y2 受体全长蛋白表达质粒的构建, 成功地进行了各种载体的构建, 但在诱导表达过程中, 各个构建载体的蛋白质产物中均未检测到相应的表达蛋白。考虑到 Y2 受体是具有 7 次跨膜结构的 G 蛋白耦联受体^[8], 蛋白质的三级结构复杂, 我们实验室现有的原核表达载体难以表达立体结构这么复杂的真核蛋白。于是, 针对 G 蛋白耦联受体的胞内段的抗原性较强的特点, 我们设计表达 Y2 受体 C 端胞内段肽, 获得了成功。

细菌表达的重组蛋白常常无活性, 并在细菌内大量集聚, 形成难溶的包涵体 (inclusion bodies)^[9]。Y2 受体 C 端肽也不例外, 表达产物形成了难溶的包涵体。因此, 我们必须先将难溶的包涵体蛋白进行溶解, 也就是加入还原剂使半胱氨酸还原, 断裂已经存在的二硫键, 释放出单个多肽链, 然后再对还原性单个多肽进行折叠复性, 包括去掉变性剂, 加入复性剂, 使变性蛋白质折叠成正确的空间结构, 增加其水溶性。在蛋白质的再折叠研究中, 目前有多种成功的方法, 如空气氧化^[10]和谷胱甘肽的再氧化作用等。根据本实验, 我们采取了 8 mol/L 尿素对包涵体蛋白进行变性, β -巯基乙醇打开已存在的错误的二硫键, 然后利用精氨酸

的氧化环境对蛋白质进行复性。在经过多次摸索后,大大提高了表达蛋白溶解度。

利用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱对 GST 融合蛋白进行纯化是较好的纯化原核表达产物的方法,纯化后污染的杂蛋白大多是位于分子质量 70 ku 附近的大肠杆菌自身的蛋白质产物^[11]。同时,我们在研究中观察到,将处理包涵体的条件变温和一些,如缩短超声处理时间,那么将亲和层析纯化后的蛋白质进行电泳,32 ku 处蛋白质的浓度变大,位于其下面的蛋白质条带的浓度变小。另外,纯化产物经凝血酶酶切后,获得了位于 26 ku 和 6 ku 的两条蛋白质条带,提示凝血酶将纯化蛋白酶切为 GST 和 6 ku 的目的蛋白。基于以上结果我们认为图 5 泳道 I 所示的位于 32 ku 蛋白以下的蛋白质条带可能为目的蛋白的降解产物。

对 NPY Y2 受体全长基因的正确克隆,以及 Y2 受体 C 端肽的表达纯化,有助于对 Y2 受体开展进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y: a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 1982, **296** (5858): 659~ 660
- 2 Larhammar D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept*, 1996, **65** (3): 165~ 174
- 3 Wahlestedt C, Yanaihara N, Hakanson R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul Pept*, 1986, **13** (3~ 4): 307~ 318
- 4 Colmers W F, Klapstein G J, Fournier A, *et al.* Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice *in vitro* is mediated by a Y2 receptor. *Br J Pharmacol*, 1991, **102** (1): 41 ~ 44
- 5 Hokfelt T, Broberger C, Zhang X, *et al.* Neuropeptide Y: some view points on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system. *Brain Research Reviews*, 1998, **26** (2~ 3): 154 ~ 166
- 6 Pedrazzini T, Seydoux J, Kunstner P, *et al.* Cardiovascular

response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med*, 1998, **4** (6): 722~ 726

- 7 Nalajima M, Inui A, Asakawa A, *et al.* Neuropeptide Y produces anxiety via Y2-type receptors. *Peptides*, 1998, **19** (2): 359~ 363
- 8 Anders G B, Herbert H. Y-receptor subtypes-how many more? *Trends Neurosci*, 1997, **20** (7): 294~ 298
- 9 Marston F A O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, **240** (1): 11 ~ 12
- 10 Acharya A S, Taniuchi H. Implication of the structure and stability of disulfide intermediates of lysozyme on the mechanism of renaturation. *Mol Cell Biochem*, 1982, **44** (3): 129~ 148
- 11 Sherman M, Goldberg A L. Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1992, **11** (1): 71~ 77

Cloning of Neuropeptide Y Y2 Receptor Gene and Expression and Purification of Its C-terminal Peptide.

CHENG Xi Ping, XIAO Hua Sheng, HUANG Wen Jin, ZHANG Ping, JU Gong, ZHANG Xu (Institute of Neuroscience, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China).

Abstract Y2 receptor, one of the two early recognized major receptor subtypes of neuropeptide Y (NPY) was considered to be involved in multiplicate biological and pathological functions induced by NPY. In order to make antibody against Y2 receptor and study the distribution of Y2 receptor, NPY Y2 receptor gene was amplified by RT-PCR from the total RNA of rat hippocampus. Then the C-terminal fragment of Y2 receptor was amplified by PCR and cloned into expression vector. The expression vector of C-terminal peptide of NPY Y2 receptor was transformed in *E. coli*, and the product of expression was purified.

Key words Y2 receptor, neuropeptide Y, clone, expression

更 正 启 事

发表在本刊 1999 年 26 卷第 5 期 473~ 477 页的文章 (题目: 牛小脑肌醇磷脂激酶 PI (4) K 高产率纯化与特征) 为国家自然科学基金重大资助项目 (19893819-4)。因作者的疏忽,将这一重要注释忽略。特在此补充说明。

作者 2000 年 11 月