

稳定表达甜味受体蛋白 T1R2/T1R3 的 HEK293 细胞系的建立

钱玲玲, 秦玉梅, 邓少平*

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘要: 以小鼠舌组织为对象, 提取总 mRNA, 并以此为模板, 使用自行设计的引物通过 RT-PCR 扩增 Gα15、T1R2 和 T1R3 目的片段。构建重组质粒 pEGFP-C1-Gα15、pDsRed1-N1-T1R2、pcDNATM6.2/N-YFP-DEST-T1R3。以脂质体介导的方法转染 HEK293 细胞, 经抗性筛选后, 通过极限稀释法获得稳定表达 T1R2/T1R3 的 HEK293 细胞系, 最后通过 RT-PCR, 荧光显微镜及 Western blot 方法在基因及蛋白质水平上对建立的稳定表达细胞系进行鉴定。基因及蛋白质水平上的结果均表明, 目的基因 Gα15、T1R2/T1R3 成功导入 HEK293 细胞中, 并且稳定表达。该细胞系的建立为细胞水平上甜味机理的体外研究(如甜味识别热动力学等)提供了稳定的细胞来源。

关键词: 味觉; 甜味受体蛋白 T1R2/T1R3; HEK293; 稳定表达

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)02—0142—06

Establishment of HEK293 Cell Line Stably Expressing Sweet Preceptor Protein T1R2/T1R3

QIAN Ling-ling, QIN Yu-mei, DENG Shao-ping*

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: It is to establish HEK293 cell line which could stably express sweet taste receptor protein T1R2/T1R3. Firstly, extract total mRNA from mouse tongue tissue, then amplify Gα15, T1R2 and T1R3 target gene fragment by RT-PCR with self-designed primers and above total mRNA template. Then, establish the recombinant plasmid pEGFP-C1-Gα15, pDsRed1-N1-T1R2, pcDNATM6.2/N-YFP-DEST-T1R3 and introduce them into the HEK293 cells by liposome. After resistance screening, the HEK293 cell line with the ability of stable expressing T1R2/T1R3 was obtained in a limit dilution method. Finally, the stable cell line with sweet receptor protein T1R2/T1R3 was identified by RT-PCR, fluorescence microscopy and Western blot. The results in gene and protein level show that Gα15, T1R2/T1R3 are successfully introduced into HEK293 cell line and are stably expressed. The establishment of HEK293 cell line provides a stable cell source for

收稿日期: 2012-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30770536); 浙江工商大学省级大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) 项目 (3070JQ4211003); 浙江省研究生创新科研项目 (1110JF431002G)。

* 通信作者: 邓少平 (1956—), 男, 江西新干人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品感官科学与技术方面的研究。

E-mail: spdeng@zjgsu.edu.cn

the study of sweetness mechanism in vitro (such as sweet recognition thermodynamics, etc.) at cell level.

Keywords: taste, sweet receptor protein T1R2/T1R3, HEK293, stable expression

20 世纪初甜味受体的发现,揭开了人类研究甜味感受机理的新篇章,研究者开始从甜味受体的结合与激活角度分析甜味剂结构与活性的关系^[1]。甜味受体 T1R2 和 T1R3 以异二聚体的形式共表达参与甜味识别,对多种天然糖及各种人工甜味剂具有高亲和力,是一种广谱的甜味感受器^[2-4]。当不同的甜味物质与 T1R2/T1R3 受体作用时,或通过激活 G 蛋白的 α 亚基,或通过激活 α 亚基导致与 β 、 γ 亚基的分离,从而引起各下游信号分子途径的开放,最终导致细胞膜去极化和神经递质释放^[5-6],产生甜味感知。

甜味受体的发现,也使各种新技术如分子模拟、异源表达、离子影像及膜片钳电生理技术^[7-10]等如雨后春笋般地涌现出来。作者所在实验室则利用近年来发展起来的等温量热滴定(ITC)技术手段,对细胞水平上甜味感受的热力学进行研究,以期从新的角度诠释甜味识别机理。以味细胞以及 NCI-H716 作为味细胞的替代细胞^[11]为对象,确定了用于细胞甜味识别热力学研究的等温量热滴定各种实验条件;系统的研究了不同浓度的同种甜味剂、同种浓度不同甜味剂与味蕾细胞相互作用的热力学行为;证明了 ITC 作为一种新型实验手段在活细胞层面上通过热力学参量研究受体与配体分子相互作用的物理化学机制的可行性,在甜味识别的热力学机制方面做了开创性工作。但不论是原代味细胞还是替代细胞,由于细胞中蛋白质成分的复杂性及细胞的不稳定性,使得甜味剂与甜味受体相互作用时信号较弱,从而影响了实验结果的稳定性。

作者利用异源表达受体蛋白质技术,通过提取总 RNA、扩增目的基因和重组表达载体,将甜味受体蛋白基因导入 HEK293 细胞,通过筛选获得能够稳定、单一地表达甜味受体蛋白的细胞系,从而为 ITC 实验的顺利进行提供细胞来源,以期实现细胞水平上甜味识别热力学规律研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、质粒和细胞株 6~8 周大 C57BL/

6J 小鼠:SPF 级,购自浙江省医学科学院实验动物中心;大肠杆菌 Stbl3、pEGFP-C1、pDsRed1-N1、pcDNATM6.2/N-YFP-DEST 质粒:购自美国 Invitrogen 公司;HEK293 细胞系:由作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂、PCR 试剂盒、Marker、T4 连接酶和内切酶:均购自 TaKaRa 公司;转染试剂 LipofectamineTM2000 转染试剂:购自美国 Invitrogen 公司;高纯度质粒小提试剂盒:购自 OMEGA 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清:购自美国 Gibco 公司;Gustducin 兔多克隆抗体:购自美国 Santa Cruz 公司;T1R2/T1R3 鼠单克隆抗体:购自美国 Abcam 生物技术公司;二抗:购自上海艾比马特公司;预染蛋白质相对分子质量标准、PVDF 膜:购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠舌组织 mRNA 的提取 取 6~8 周大 C57BL/6J 小鼠置于密闭容器中,通入 N_2 致死,取舌组织,立即投入液氮中,后放入预冷的研钵,研磨至粉末状。在液氮基本挥发完时,加入 Trizol,继续研磨至粉末,粉末呈液态状后,转移至玻璃匀浆器中冰上匀浆。最后根据 mRNA 提取操作方法获取总 mRNA。RNA 样品短期内于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,长期则 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 $G\alpha 15$ 、T1R2 与 T1R3 基因的克隆 参考 NCBI 上 $G\alpha 15$ 、T1R2 与 T1R3 的蛋白编码全序列,再结合初始转录产物 CDS 区序列,使用 Prime primer 5.0 软件设计引物,并在正反向引物的 5'端分别加入 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点,设计所得引物见表 1。引物由上海生工生物公司合成。以小鼠总 mRNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增长度为 1 124 bp 的 $G\alpha 15$ 基因,以及长度分别为 2 531、2 576 bp 的 T1R2 和 T1R3 基因。反转录条件为 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min、冰浴 5 min 变性、退火, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 终止反应。PCR 条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($G\alpha 15$ 、T1R2、T1R3 退火温度分别为 68、61、63 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min/kbp, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10

min。琼脂糖凝胶电泳后回收纯化 PCR 产物。回收产物于-20℃保存备用。

表 1 设计所得 Gα15、T1R2、T1R3 引物

Table 1 Primers designed for Gα15, T1R2, T1R3

引物	NCBI 参考序列	正向引物	反向引物
Gα15	NM_010304.3	5'-CGGTAAACCCCTTCCTTGACGCATTTG-3'	5'-CGACTCGAGAACCTAACCTACCTGCTGTGA-3'
T1R2	NM_031873.1	5'-CGGGGCATCGTCTAAGGCTGTATTG-3'	5'-GCCCTGAATCATGCTATTGAAGTGA-3'
T1R3	NM_031872.2	5'-CGGACTTCGATCCTAGTACCCGCATTTG-3'	5'-CGCATTTTCGGCTAATCGTACCTGCTGTGA-3'

1.2.3 表达载体的构建 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别双酶切目的基因 Gα15、T1R2 与 T1R3, 以及质粒 pEGFP-C1、pDsRed1-N1 与 pcDNA™6.2/N-YFP-DEST, 然后 T4 连接酶 16℃反应过夜。将连接产物转化自制 Stbl3 感受态。氨苄青霉素及卡那霉素培养板筛选出阳性克隆, 最后重组质粒经 PCR、*Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切及送上海生工生物公司进行测序鉴定。

1.2.4 稳定株的构建与筛选 取生长状态良好的 HEK293 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中, 过夜培养, 当汇合度达到 40%~50%时进行转染。将重组表达质粒 Gα15-pEGFP-C1 与 lipofectamine 混合的转染复合物加入到已铺好 HEK293 细胞的培养皿中进行转染。转染 6 h 后, 移除含转染复合物的培养基, 加入 DMEM 完全培养基继续培养。转染 48 h 后, 取部分观察 GFP 荧光, 按照极限稀释法筛选出细胞株后, 加入 G418 至终质量浓度为 5 μg/mL。同时将没有转染的细胞作为空白对照, 加入含 G418 质量浓度为 4 μg/mL 的选择培养基。当对照组细胞全部死亡后, 将实验组 G418 质量浓度降为 2 μg/mL, 继续培养。筛选培养 2 周, 筛选出的抗性单克隆株继续筛选 5 d, 挑取单克隆, 进行扩大培养。再以相同的方法将 T1R2 和 T1R3 共转染 Gα15/HEK293 细胞。其中 G418 为 5 μg/mL, neomycin 与灭稻瘟素质量浓度各 4 μg/mL。

1.2.5 RT-PCR 检测目标基因表达水平 收集稳定转染的 Gα15/T1R2/T1R3/HEK 293 细胞, 利用 RNAiso PLUS 试剂提取细胞总 mRNA, 以 GAPDH 基因为内参基因, 利用自行设计的引物进行 PCR 反应, 扩增出目的基因。PCR 扩增程序设为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 65℃ (Gα15、T1R2、T1R3 退火温度分别为 65、59、63℃) 34 s, 72℃ 1 min/kbp, 40 个循环; 72℃ 5 min。

1.2.6 Western blot 检测蛋白质表达 收集稳定转

染的 Gα15/T1R2/T1R3/HEK293 细胞, 常规培养, 提取细胞蛋白质后, 经 SDS-PAGE 电泳, 转印 PVDF 膜, 封闭 2 h, 然后依次与一抗 (1:1 000 比例稀释) 和二抗 (1:5 000 比例稀释) 反应, 最后化学发光, 凝胶系统拍照获取结果。

2 结果与分析

2.1 小鼠舌组织总 mRNA 提取结果

实验提取 C57BL/6J 小鼠的总 mRNA, 经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。其中 28S 的条带的亮度和宽度大约为 18S 条带的两倍, 说明该总 mRNA 样品完整性好且降解较少。因此本实验所得到的小鼠总 mRNA 可以作为 RT-PCR 模板。

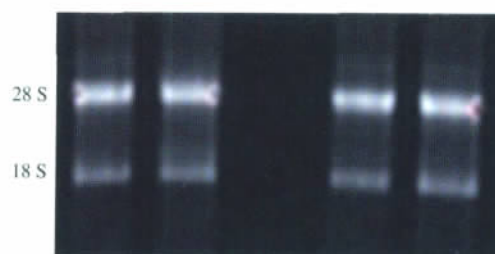


图 1 小鼠舌组织总 mRNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total mRNA products

2.2 目的基因 PCR 扩增结果

以小鼠总 mRNA 为模板, 利用自行设计的 Gα15、T1R2 及 T1R3 引物, 进行 RT-PCR 扩增, 预计分别获得长度为 1 124、2 531、2 576 bp 的目的片段, 经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。发现经 PCR 扩增后, 获得目的基因片段大小与预计大小基本一致。

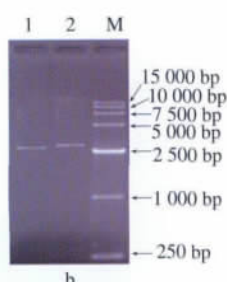
2.3 重组表达质粒的鉴定

pEGFP-C1-Gα15、pDsRed1-N1-T1R2 和 pcDNA™6.2/N-YFP-DEST-T1R3 重组质粒经 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后, 将分别产生长度为 1 124、2 531、2 576 bp 的 Gα15、T1R2、T1R3 目的基因片段

及相应的载体片段。双酶切结果见图 3、图 4。将重组表达质粒送往上海生工生物公司测序,测序结果与源序列比对后发现,G α 15 与 T1R2 同源性达到 100%,仅 T1R3 在 2 545 bp 位点发生一个位点突变,经密码子翻译后,所编码的氨基酸种类保持不变,属于同义突变,证明重组表达质粒构建成功。



M:DL2 000 marke; lane 1:G α 15.



M:DL15 000 marke; lane 1:T1R2; lane 2:T1R3.

图 2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products



M:DL15 000 marker; lane 1,3:recombinant plasmids; lane 2,4:recombinant plasmids digested with *Eco*R I, *Xho* I.

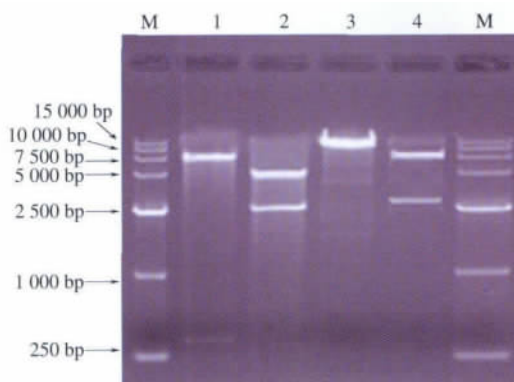
图 3 pEGFP-C1-G α 15 重组质粒双酶切产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of double digestion products of pEGFP-C1-G α 15 recombinant plasmid

2.4 质粒转染效果鉴定

按比例将 PEGFP-G α 15 表达载体转染至 HEK293 细胞中。以成功构建的 G α 15/HEK293 细胞

为基础,将 pDsRed1-N1-T1R2 与 pcDNATM6.2/N-YFP-DEST-T1R3 表达载体共转染至 G α 15/HEK293 细胞中,经单克隆筛选后,将细胞置于激光扫描共聚焦显微镜下观察 GFP/YFP/RFP 荧光,结果见图 5。结果说明,PEGFP-G α 15、pDsRed1-N1-T1R2 与 pcDNATM6.2/N-YFP-DEST-T1R3 三种表达载体已被成功转入 HEK293 细胞且转染效率良好。



M:DL15 000 marker; lane 1:T1R2 recombinant plasmids; lane 2:T1R2 recombinant plasmids digested with *Eco*R I, *Xho* I; lane 3:T1R3 recombinant plasmids; lane 4:T1R3 recombinant plasmids digested with *Eco*R I, *Xho* I.

图 4 pDsRed1-N1-T1R2、pcDNATM6.2/N-YFP-DEST-T1R3 重组质粒双酶切产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of double digestion products of pDsRed1-N1-T1R2、pcDNATM6.2/N-YFP-DEST-T1R3 recombinant plasmids

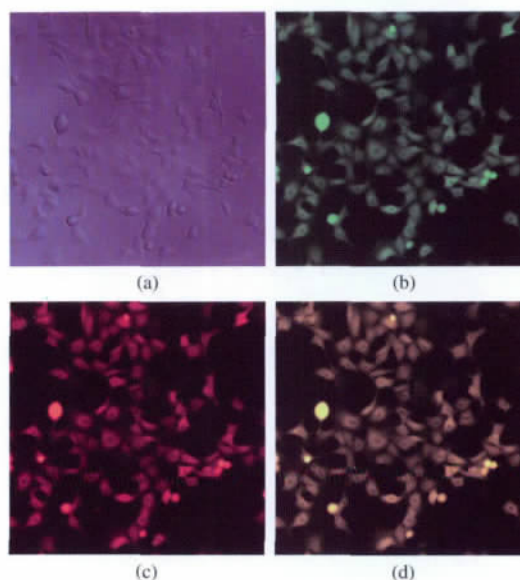
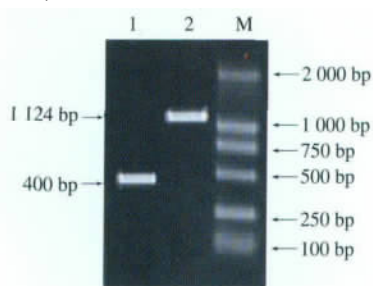


图 5 稳定表达 G α 15/T1R2/T1R3 的 HEK293 细胞

Fig. 5 HEK293 cells express G α 15/T1R2/T1R3. Scale bar represent 30 μ m in A-D

2.5 RT-PCR 检测 Gα15、T1R2、T1R3 表达结果

所得内参基因 GAPDH 和 Gα15、T1R2、T1R3 PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后,电泳条带分别位于 400、1 124、2 531、2 576 bp 左右位置,与实际长度基本一致,结果见图 6、图 7。



M: 2 000 bp marker; lane 1: GAPDH; lane 2: RT-PCR fragment of Gα15 from RNA extracted from Gα15/T1R2/T1R3-HEK293 cells

图 6 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products



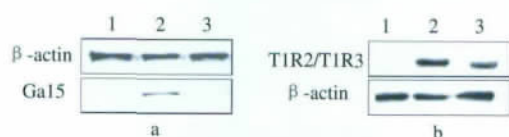
M: 15 000 bp marker; lane 1: GAPDH; lane 2: RT-PCR fragment of T1R2 from RNA of Gα15/T1R2/T1R3-HEK293 cells; lane 3: RT-PCR fragment of T1R3 from RNA of Gα15/T1R2/T1R3-HEK293 cells

图 7 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

2.6 Western blot 蛋白质表达检测结果

表达产物经 Western blot 鉴定结果见图 8。



(a) lane 1: normal HEK293 cells; lane 2: Gα15/T1R2/T1R3-HEK293 cells; lane 3: primary antibody omitted. (b) 1: normal HEK293 cells control; 2, 3: Gα15/T1R2/T1R3-HEK293 cells.

图 8 Western Blot 结果

Fig. 8 Western Blot results

与空白对照组相比,稳定细胞株 HEK293 可以检测到 Gα15、T1R2、T1R3。因此表明所筛选出来的 HEK293 细胞稳定表达了 Gα15、T1R2 以及 T1R3 蛋白。

3 结 语

甜味剂是一类重要的食品添加剂,它赋予食品以甜味。目前人工合成甜味剂在日常食品中应用范围越来越广,使用量越来越大,同时人工合成甜味剂的安全性一直是各国政府和相关科研机构所关注的热点^[12]。大批科学家正在从各个方面寻找方法诠释甜味感受的机制,不仅用来指导新型甜味剂的开发,也利于研究甜味剂的安全性。近年来发展起来的等温滴定微量技术(ITC),通过一次实验便可提供热力学和动力学信息^[13-14]。作者所在实验室即利用 ITC,研究了细胞水平甜味感受的热力学机制,从新的角度进一步研究甜味感受机制。通过前期研究^[15]发现,要实现甜味识别热力学机制的诠释,稳定单一的细胞来源是实验的前提保障。异源表达技术在甜味机理研究中发挥着重要作用^[10],所以作者所在实验利用异源表达技术以 C57BL/6J 小鼠舌组织提取的总 RNA 为模板,扩增了甜味受体 T1R2 和 T1R3,以及甜味受体偶联的 G 蛋白 α15 亚基;选择 pEGFP-C1、pDsRed1-N1、pcDNATM6.2/N-YFP-DEST 构建表达,因上述质粒表达特定的荧光蛋白,简化了转染效率的检测及稳定表达细胞株的筛选,最后利用 PCR 与 Western Blot 技术证明,构建了稳定表达甜味受体蛋白 T1R2/T1R3 的 Gα15/HEK293 细胞株,从而为研究生物动力学和生物热力学提供了稳定的细胞来源。为甜味机理研究提供了良好的材料,也为细胞水平上的其他研究提供方法学基础。蛋白质晶体的获得成为了蛋白质的结构与功能特性研究的瓶颈问题^[16]。甜味研究亦是如此。作者成功构建了稳定单一表达甜味受体的细胞株,同时也为获得甜味受体蛋白提供了坚实的物质基础。

参考文献:

- [1] Vignes S, Dotson C D, Munger S D. The receptor basis of sweet taste in mammals [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2009, 47: 187-202.

- [2] Nelson G, C A J, Hoon M A, et al. An amino acid taste receptor[J]. **Nature**, 2001, 416:199–202.
- [3] Nelson G, H M A, Chandrashekar J, et al. Mammalian sweet taste receptors[J]. **Cell**, 2002, 106:381–390.
- [4] Assadi-Porter F M, Tonelli M, Maillat E L, et al. Interaction between the human sweet-sensing T1R2–T1R3 receptor and sweeteners detected by saturation transfer difference NMR spectroscopy[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2010, 1798:82–86.
- [5] Shin Y K, Martin B, Golden E, et al. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling [J]. **Journal of Neurochemistry**, 2008, 106:455–463.
- [6] Chaudhari N, Roper S D. The cell biology of taste[J]. **Journal of Cell Biology**, 2010, 190(3):285–296.
- [7] Cui M, J P, Maillat E, et al. The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites [J]. **Curr Pharm Des**, 2006, 12:4591–4600.
- [8] Jiang P, J Q, Liu Z, et al. The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279:45068–45075.
- [9] Jiang P, C M, Zhao B, et al. Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005, 280:34296–34305.
- [10] Winnig M, Bufe B, Kratochwil N A, et al. The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor[J]. **BMC Struct Biol**, 2007, 7:66.
- [11] Wang T H, Hui G H, Deng S P. A novel sweet taste cell based sensor[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2010, 26(2):929–934.
- [12] 吴世嘉, 王洪新, 陶冠军. 超高压液相色谱—质谱同时测定白酒中 6 种微量甜味剂的方法研究 [J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(5):670–675.
WU Shi-jia, WANG Hong-xin, TAO Guan-jun. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry method for simultaneous determination of six micro-sweeteners in distilled spirit [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(5):670–675. (in Chinese)
- [13] Chen Z X, Guo G M, Deng S P. Isothermal titration calorimetry study of the interaction of sweeteners with fullerenols as an artificial sweet taste receptor model[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57:2945–2954.
- [14] Weber P C, Salemme F R. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2003, 13:115–121.
- [15] 秦玉梅, 张根华, 石锦芹, 等. 小鼠味蕾细胞分离及体外培养方法[J]. **细胞生物学杂志**, 2009, 31(1):119–122.
QIN Yu-mei, ZHANG Gen-hua, SHI Jin-qin, et al. The isolation and in vitro culture of mouse taste bud cells [J]. **Journal of Cell Biology**, 2009, 31(1):119–122. (in Chinese)
- [16] 耿利强, 尹大川, 卢慧蔓, 等. 原子力显微镜在蛋白质晶体生长研究中的应用[J]. **硅酸盐通报**, 2008, 27(3):512–518.
DI Li-qiang, YIN Da-chuan, LU Hui-meng, et al. Investigations of protein crystals growth by atomic force microscope [J]. **J silicate bulletin**, 2008, 27(3):512–518. (in Chinese)