功能性嗅觉受体的表达及其在仿生传感器中的应用

杜立萍^①, 彭鹤^②, 吴春生^①, 邹玲^①, 赵鲁杭^③, 王平^{①*}

① 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 生物传感器国家专业实验室, 生物医学工程教育部重点实验室, 杭州 310027;

② 天津市第五中心医院检验科, 天津 300450;

③ 浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: cnpwang@zju.edu.cn

2013-04-24 收稿, 2013-07-11 接受, 2013-12-12 网络版发表

国家自然科学基金(31000448, 31228008)和浙江省自然科学基金(LY13H180002)资助

摘要 嗅觉受体是一种表达在嗅上皮嗅觉受体神经元上的 G 蛋白偶联受体, 可以选择性地与气味分子相结合激活细胞内信号转导通路, 使嗅觉受体神经元产生动作电位, 在气味识别过程中起重要作用。为了研究嗅觉受体蛋白与气味分子间的相互作用, 本研究构建了线虫嗅觉受体 ODR-10 真核表达载体并将其异源表达于人胚胎肾细胞 HEK-293 中, 通过细胞免疫荧光和 Western blot 方法对表达效果进行了鉴定。利用细胞内钙离子浓度分析的方法检测表达有嗅觉受体 ODR-10 的细胞对其天然配体丁二酮的响应, 结果证明异源表达的受体依然具有气味识别的功能。将嗅觉受体 ODR-10 作为传感器的敏感元件固定于石英晶体微天平传感器上, 构成质量敏感型气体传感器, 该传感器可以检测丁二酮气体, 具有很高的灵敏度和特异性, 在一定浓度范围内具有线性响应特性。所有结果表明, 在异源细胞系统中表达的 ODR-10 受体蛋白仍具有特异性识别其天然配体的功能, 适合作为敏感元件应用于仿生嗅觉受体传感器的构建。

关键词

嗅觉受体蛋白
ODR-10
功能性表达
石英晶体微天平
仿生传感器

生物嗅觉系统具有卓越的气味辨别能力, 能灵敏特异地识别环境中大量不同的气味分子。随着嗅觉受体基因超家族的发现, 嗅觉的生物机制开始逐渐得到揭示^[1]。嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)属于 G 蛋白偶联受体, 选择性地与气味分子相结合后, 激活细胞内的信号转导通路, 引发细胞内一系列的生物化学级联反应, 使嗅觉受体神经元去极化产生动作电位, 将气味化学信息转化为电信号。这些电信号传导至嗅球和大脑皮层进行信息的编码与处理, 最终形成嗅觉感知。嗅觉系统对生物的生存具有极其重要的意义, 生物通过识别环境中的气味以完成取食、交配、定位、避开天敌和识别有毒物质等生存行为^[2]。

为了探索嗅觉受体蛋白与气味分子的相互作用机理, 科学家们开始在细胞水平研究嗅觉受体蛋白。

然而, 较难在原代嗅觉感受神经元分离得到特定种类的嗅觉受体, 因此研究者将嗅觉受体表达在各种各样的异源细胞系统, 如大肠杆菌(*E. coli*)、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞 Sf9、人胚胎肾(human embryonic kidney)细胞 HEK-293, HeLa, 中国仓鼠(*Cricetulus barabensis*)卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞和大鼠(*Rattus norvegicus*)肾上腺嗜铬细胞瘤(pheochromocytoma)细胞 PC12h 等^[3-7], 为研究嗅觉受体功能提供了新的技术手段。但是在异源细胞系统中表达嗅觉受体还存在一个关键问题, 即嗅觉受体较难在细胞质膜上进行功能性、稳定高效的表达, 可能的原因是表达的嗅觉受体滞留在内质网内, 在蛋白酶的作用下被降解^[8-10]。线虫(*C. elegans*)嗅觉受体 ODR-10 是含有 7 次跨膜结构域的 G-蛋白偶联受

引用格式: 杜立萍, 彭鹤, 吴春生, 等. 功能性嗅觉受体的表达及其在仿生传感器中的应用. 科学通报, 2013, 58: 3829–3838

Du L P, Peng H, Wu C S, et al. Functional expression of olfactory receptor and its application for biomimetic sensors (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 3829–3838, doi: 10.1360/972013-487

体,其天然配体分子是丁二酮,可与丁二酮特异、灵敏地结合^[11]. ODR-10 和丁二酮的特性结合常作为模式嗅觉受体和模式气味分子,广泛地用于嗅觉机理的研究^[12]. 在异源系统中功能性地表达嗅觉受体有利于研究嗅觉受体功能并鉴定其气味配体.

近年来,在生物传感器领域,嗅觉生物材料因其能够对气味分子高度敏感地选择性识别,越来越受到广泛关注,并作为传感器的敏感元件用于构建仿生嗅觉生物传感器^[13]. 嗅觉受体特异性识别气味配体的特性能够有效地改善气体传感器的特异性,并且可用于开发适合现场检测的便携微型化的传感器和仪器;因而基于嗅觉受体的仿生传感器具有广阔的应用前景和重要的商业价值,有望在环境监测、食品安全、疾病早期诊断等领域取得重大应用. 石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)是一种基于压电效应的质量敏感型传感器,可将质量变化信号转换为谐振频率变化信号,从而实现对微小质量改变的灵敏检测^[14].

本研究基于分子生物学技术构建了嗅觉受体 ODR-10 的真核表达载体,其中含有 6xhis 标签和 rho 信号肽^[8],将其转染人胚胎肾细胞(HEK-293)中,成功地表达出了嗅觉受体蛋白 ODR-10;逆转录 PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western blot 技术检验嗅觉受体蛋白在 HEK-293 细胞中的表达;细胞免疫荧光方法检测嗅觉受体蛋白是否成功表达定位于细胞质膜上;采用细胞内钙离子浓度分析的方法检测嗅觉受体蛋白 ODR-10 的气味识别功能;将功能性的嗅觉受体蛋白 ODR-10 作为石英晶体微天平的敏感元件并将其有效地固定耦合,成功地研制成仿生嗅觉受体传感器. 结果表明,该传感器可以检测嗅觉受体 ODR-10 的天然配体丁二酮,具有很高的灵敏度和特异性,而对其他几种结构相似的气体分子响应较低. 该传感器既可以用于特异性地检测气味分子,也可作为通用平台研究嗅觉受体与气味分子的相互作用.

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *E. coli* DH5 α , pcDNA3.1(+)质粒、HEK-293 细胞均由浙江大学医学院生物化学与分子生物学实验室保存. pBluescript SK⁺/odr-10 由美国洛克菲勒大

学 Cornelia I. Bargmann 教授惠赠. Taq DNA 聚合酶、高保真酶 STAR, dNTPs, T4 DNA 连接酶、*Bam*H I, *Eco*R I 和 *Kpn* I 限制性核酸内切酶以及逆转录试剂盒购自大连宝生物公司. 蛋白质 Marker 购自加拿大 Fermentas 公司. PCR 回收试剂盒、DNA Marker 和凝胶回收试剂盒购自广州东盛生物科技有限公司. Lipofectamine 2000, TRIZOL 试剂盒和钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 购自美国 Invitrogen 公司. 小量质粒抽提试剂盒购自杭州新捷生物科技有限公司. RI-PA(radio-immunoprecipitation assay)(强)裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、抗 6xhis 标签小鼠 IgG 一抗、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗小鼠 IgG 二抗、腺苷酸环化酶激活剂(forskolin)购自碧云天生物技术研究. 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基购自上海生物工程技术有限公司. 实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂.

1.2 方法

(i) *odr-10* 扩增引物设计. 以 *odr-10* 的 cDNA 为模板设计引物,进行 PCR 扩增,引物设计利用 Premier 5.0 软件完成,其中上游引物为 5'-GAG-TTGGGATCCATGTCGGGAGAATTGTGG-3',下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点;下游引物为 5'-CAG-TAAGAATTCCGCGTCGGAAGCTTGAGACAA-ATT-3',下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点. 6xhis 标签(波浪下划线部分)和 rho-tag 序列(虚线下划线部分)为 5'-CGGGGTACCGCCATGGCCATCATCAT-CATCACACATGAACGGGACCGAGGGCCCAAA-CTTCTACGTGCCTTTCTCCAACAAGACGGGGCGT-GGTGGGATCCGGC-3',插入到 pcDNA3.1(+)质粒多克隆位点中的 *Kpn* I 和 *Bam*H I 位点间,所有 DNA 序列均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成.

(ii) *odr-10* 目的片段的扩增. 以 pBluescript SK⁺/odr-10 为模板分别用 *odr-10* 的上下游引物进行扩增,PCR 反应如下: 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 36 个循环; 72℃ 5 min 结束扩增. PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收.

(iii) 重组质粒的构建. 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 在 37℃酶切 PCR 回收产物和 pcDNA3.1(+)载体 3 h, 1%琼脂糖凝胶电泳割胶回收.

T₄ DNA 连接酶 16℃连接过夜后转化 *E. coli* DH5α感受态细胞,涂在加有氨苄青霉素的固态 LB(Luria-Bertani)平板上,37℃过夜培养.挑出单克隆菌落,摇菌扩增并从中提取质粒进行双酶切鉴定,鉴定结果正确即完成pcDNA3.1(+)/odr-10质粒的构建.再将合成的 6×his/rho 序列克隆到 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 重组质粒.序列测定由南京金斯瑞生物科技有限公司完成. DNAssist 2.0 软件进行核苷酸序列分析.重组质粒构建如图 1 所示.

(iv) 重组质粒转染 HEK-293 细胞. HEK-293 培养在含 10% FPS, 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37℃, CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养.转染之前,细胞接种在 12 孔板中,用无血清、无双抗的培养基在培养箱中孵育 1 d.待细胞融合度达到 80%~90%时,取 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 质粒 4 μg 和 10 μL 脂质体 Lipofectamine 2000,按脂质体转染说明书进行转染,同时设置空白对照和 pcDNA3.1(+)/空载体阴性对照.

(v) RT-PCR 检测蛋白表达.为验证表达载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 在细胞内 mRNA 水平的表达情况,进行 RT-PCR 检测.在细胞转染 48 h 后,用 TRIZOL 提取细胞总 RNA.根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录合成 cDNA,反应条件为: 65℃ 5 min,冰上急冷;在 PCR 仪上, 42℃ 45 min, 95℃ 5 min;冰上放置.以逆转录后的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增: 95℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个

循环,PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测.

(vi) Western blot. Western blot 技术在蛋白水平检验表达载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 在 HEK-293 细胞中的表达情况.收集转染 48 h 后的细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 遍后,用 RIPA(强)裂解液(含有 1 mmol/L PMSF)提取转染后细胞的总蛋白质,经 BCA (bicinchoninic acid)法定量后,各组等量上样电泳. 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭,抗 6×his 标签小鼠 IgG 一抗按 1:1000 稀释后孵育过夜, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗在室温孵育 1 h. ODRSSEY 双色红外激光成像系统(LI-COR, 美国)进行扫膜检测.

(vii) 细胞免疫荧光化学方法.为检测嗅觉受体蛋白在细胞膜的定位情况,采用细胞免疫荧光化学方法进行检测.表达载体转染细胞 48 h 后弃去细胞培养基,用 PBS 洗涤细胞 3 次.首先用甲醇在-20℃固定转染后的 HEK-293 细胞 20 min,之后用 PBS 洗涤细胞 2 次,每次 5 min,然后用含 10%胎牛血清的 PBS 在 37℃封闭 30 min,以封闭裸露位点,降低检测噪声.封闭结束后用 PBS 洗涤细胞 2 遍,在保湿盒中孵育抗 6×his 标签小鼠 IgG 一抗(1:200) 37℃孵育 1 h,反应结束后洗去未结合的一抗, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗在室温下避光孵育 1 h,用 PBS 洗涤细胞 3 次后,90%甘油封片,指甲油封片四周,在 TE200 激光扫描共聚焦显微镜下(NIKON, 日本)观察细胞表面的荧光分布情况,以表征嗅觉受体蛋白在细胞膜的定位分布.

(viii) 细胞内钙离子浓度分析.嗅觉受体与气味配体结合后,激活细胞内信号转导通路,引起细胞内钙离子浓度升高,因此监测细胞内钙离子浓度变化可以有效地鉴定异源表达嗅觉受体蛋白 ODR-10 的功能.细胞转染 48 h 后,弃掉培养皿中的培养液,用细胞培养液清洗 2 遍,加入浓度为 10 μmol/L 的 Fluo-3/AM 钙离子荧光探针,在 37℃避光孵育 45 min,以使得 Fluo-3/AM 进入细胞内.之后,弃去钙离子荧光探针溶液, Hank's 平衡盐缓冲液(Hank's balanced salt solution, HBSS)(10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L Na₂HPO₄, 137 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂,

图 1 重组表达载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 的图谱
6×his 标签和 rho 信号肽插入到目的片段 odr-10 的 5'端

0.5 mmol/L MgCl_2 , 5 mmol/L 葡萄糖, 0.1% BSA, pH 7.4)清洗 2 遍后, 用 HBSS 缓冲液 37℃ 条件再孵育 20 min, 以使进入细胞内的 Fluo-3/AM 完全转化为 Fluo-3. 游离状态的 Fluo-3 几乎是是非荧光性的, 但当其与钙离子 Ca^{2+} 结合后, 荧光会增加 60~80 倍, 产生较强的荧光, 因此广泛用于检测细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化. Fluo-3/AM 的最大激发波长为 506 nm, 最大发射波长为 526 nm. 实验中使用 2 种细胞, 分别为表达有 ODR-10 的 HEK-293 细胞和未经转染的 HEK-293 细胞, 后者作为阴性对照. 刺激物质包括丁二酮 (1 mmol/L)、腺苷酸环化酶激活剂 forskolin (1 mmol/L)、腺苷酸环化酶抑制剂 MDL12330A (1 mmol/L) 和 HBSS 缓冲液.

(ix) 基于嗅觉受体 ODR-10 的石英晶体微天平生物传感器的构建. 首先彻底清洁石英晶体微天平的金电极. 先将其在乙醇中浸泡 10 min, 氮气吹干; 之后分别在 1 mol/L NaOH 溶液中浸泡 20 min, 1 mol/L HCl 溶液中浸泡 5 min, 浓 H_2SO_4 与 H_2O_2 混合溶液 (体积比 2:3) 中浸泡 1 min, 以除去电极表面的有机和无机杂质, 最后在氮气吹干待用.

为了将嗅觉受体蛋白有效地固定在金电极表面并实现初步纯化, 本实验室采用适配体分子进行蛋白的识别及固定. 适配体是一类可以结合特异靶分子的寡核苷酸分子, 具有很高的特异性和亲和性, 其分子识别和结合性能可以与抗体相比拟, 在生物检测中被广泛使用. 由于本实验室在 HEK-293 细胞系中表达的嗅觉受体带有 6×his 标签, 因而首先将抗 6×his 标签的适配体分子 (5'-GCTATGGGTGG-TCTGGTTGGGATTGGCCCCGGGAGCTGGC-3') 5' 端修饰-SH 基团^[15], -SH 基团与石英晶体微天平的金电极通过 Au-S 键共价结合. 干净石英晶体微天平的金电极置于 5 μmol/L 抗 6×his 标签的适配体和 50 μmol/L 11-巯基十一酸 (mercaptoundecanoic acid, 11-MUA) 混合溶液中孵育 21 h, 表面形成一层规则的自组装单分子层, 其中包括能特异性识别 6×his 标签的适配体. 乙醇彻底清洗未结合的残余分子, 最后氮气干燥. 将从转染细胞中提取的蛋白质溶液孵育在金电极表面, 37℃ 反应 3 h. 结合于石英晶体微天平表面的适配体分子具有特异性识别 6×his 标签的能力, 可以将带有 6×his 标签的嗅觉受体蛋白特异性固定于传感器表面, 不带 6×his 标签的蛋白质则无法结合 (图 2). 这一过程利用适配体分子一步完成实现了

图 2 利用适配体分子特异性固定及纯化嗅觉受体蛋白 ODR-10 示意图

嗅觉受体蛋白的纯化及固定, 不仅特异性地固定了嗅觉受体蛋白, 而且提高了蛋白固定效率. 固定好的嗅觉受体蛋白 ODR-10 作为敏感材料, 结合石英晶体微天平传感器, 可以用于特异性检测气体分子. 为检验抗 6×his 标签的适配体分子固定嗅觉受体蛋白 ODR-10 的特异性和有效性, 实验中采用了另一随机序列的单链 DNA 分子 (5'-HS-ACCTGGGGGAGT-ATTGCGGAGGAAGGT-3') 对 ODR-10 进行固定并对照, 通过传感器对几种气体的特异性响应对适配体的固定效果及特异性进行鉴定.

选用浓度为 100 μL L⁻¹ 的 4 种气味分子 (丁二酮、乙酸异戊酯、苯甲醚、薰衣草精油) 测试基于嗅觉受体石英晶体微天平生物传感器的特异性. 标准浓度气体配制在液态 (静态) 有机气体配气仪 (MF-3B, 环晨公司) 中完成, 通过计算将一定量的液态有机溶液气化后与高纯氮气混合存于气袋 (SKC 股份有限公司, 美国) 中. 待石英晶体微天平的频率基线稳定后, 以恒定流速 (1 mL/s) 向传感器的检测腔通入待测气体, 频率的变化即为传感器的响应信息. 为排除气流的影响, 新鲜空气作为阴性对照. 不同浓度的丁二酮气体用于检测传感器的灵敏度和响应特性.

2 结果

2.1 表达载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 构建结果鉴定

利用 *Kpn* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶对重组表达载

体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 进行双酶切鉴定(图 3)。双切酶反应后,表达载体分为 2 部分,目标基因片段的理论长度大约为 1120 bp,从图 3 中可以看出实际条带所在的位置符合理论值,基本可以验证表达载体已成功构建。测序结果用 DNAssist 2.0 软件分析,所构建的表达质粒序列完全正确。

2.2 嗅觉受体 ODR-10 在 HEK-293 细胞中的表达

(1) RT-PCR 检测重组质粒在 RNA 水平的表达。RT-PCR 从转染后的 HEK-293 细胞中提取总 RNA,以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA,利用相应的引物进行 PCR 扩增目标基因片段,以验证在细胞内 mRNA 水平目标基因是否成功表达(图 4)。从图 4 可以看出在大约在 1000 bp 附近有一明显的条带,由于目标基因片段的理论长度为 1120 bp,所以实际结果与理论值大小一致,说明用表达载体转染后的 HEK-

图 3 表达载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 双酶切后电泳结果图
M 为 DNA marker, 泳道 1, 2, 3 是经过双酶切后表达载体

图 4 RT-PCR 实验结果
泳道 1, 未转染的细胞; 泳道 2, 转染空载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 的细胞; 泳道 3, 转染 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 的细胞; 泳道 M, DNA marker

293 细胞中目标蛋白在 mRNA 水平有高水平的表达。

(2) Western blot 检测蛋白表达。经过转染表达载体的 HEK-293 细胞可以在 43 和 55 kD 之间检测到明显的蛋白条带(图 5, 泳道 2, 3), 而转染 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 的空载体的 HEK-293 细胞未在此范围检测到相应蛋白条带(图 5, 泳道 4)。目标嗅觉受体蛋白的理论大小约为 45 kD, 实验结果所得目的分子条带大小在 43~55 kD 之间, 与理论值一致, 表明嗅觉受体 ODR-10 成功表达在异源细胞系统中。

(3) 细胞免疫荧光化学检测结果。细胞免疫荧光化学检测结果(图 6)表明, 转染 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 的 HEK-293 细胞膜表面均匀地分布一层荧光, 说明带有 6×his 标签的嗅觉受体蛋白成功定位表达于细胞膜表面, 而转染空载体的对照组细胞表面没有荧光分布。

(4) 细胞内钙离子浓度分析结果。监测气味配体与嗅觉受体蛋白结合后细胞内钙离子浓度变化可以有效地鉴定嗅觉受体蛋白 ODR-10 的功能。钙离子敏感荧光探针 Fluo-3 能与胞浆内游离的钙离子结合, 在受激发光照射下可发出荧光。当气味分子丁二酮与表达在细胞膜表面的 ODR-10 蛋白特异性结合后, 激活细胞内信号转导通路, 导致细胞内钙离子浓度增加, 荧光信号增强。Forskolin 作为阳性对照剂, 通过活化细胞内腺苷酸活化酶使 ATP 转化为 cAMP, 继而引起细胞内钙离子浓度的升高。MDL12330A 是信号通路抑制剂, 预先孵育细胞 5 min, 然后加入刺激物质丁二酮, 以观测钙离子荧光变化。实验中采用 2 种细胞, 转染表达载体 pcDNA3.1(+)/6×his/rho/odr-10 的 HEK-293 细胞作为实验组细胞, 未转染的 HEK-293 细胞作为对照组(图 7)。细胞表面表达有嗅觉受体蛋白 ODR-10 的实验组 HEK-293 细胞在受到阳性对照刺激物质 forskolin 和气味物质丁二酮刺激后十几秒后, 细胞内荧光强度迅速增强, 随后慢慢下降; 孵育 MDL12330A 后的实验组细胞在加入丁二

图 5 Western blot 结果
泳道 1, 空白对照; 泳道 2, 3, 转染重组质粒细胞; 泳道 4, 转染空载体细胞, 阴性对照; 泳道 M, 蛋白标准 marker

图 6 细胞免疫荧光化学检测结果

(a), (b) 转染空载体 pcDNA3.1(+) 的 HEK-293 细胞在可见光(a)和荧光(b)视野下的照片; (c), (d) 转染表达载体 pcDNA3.1(+)/6xhis/rho/odr-10 的 HEK-293 细胞在可见光(c)和荧光(d)视野下的照片; (e) 转染表达载体 pcDNA3.1(+)/6xhis/rho/odr-10 的单个 HEK-293 细胞在共聚焦显微镜下的荧光照片

酮刺激后, 细胞内钙离子荧光未出现增强现象; 而 HBSS 缓冲液刺激结果未观察到明显的荧光强度改变 (图 7(a)). 用同样的物质刺激对照组 HEK-293 细胞后, 可观察到仅有 forskolin 引起细胞内荧光强度的显著改变, 而丁二酮和 HBSS 缓冲液未引起细胞内荧光的改变 (图 7(b)), 说明丁二酮刺激实验组细胞荧光强度的改变是由于细胞表面的嗅觉受体蛋白引起的. 经过转染和未经转染的 HEK-293 细胞在丁二酮刺激后细胞内钙离子荧光变化如图 7(c) 所示. 以上结果综合说明, 丁二酮与细胞膜表面的嗅觉受体 ODR-10 特异

性结合后, 通过细胞内 cAMP 信号转导通路引起胞内钙离子浓度升高, 因而表明嗅觉受体 ODR-10 具有良好的生物活性, 能够有效地识别其天然配体丁二酮.

多个细胞内荧光强度变化的统计归一化结果 (图 8) 表明, 实验组细胞在受到嗅觉受体蛋白天然配体丁二酮刺激后, 细胞内荧光强度发生增高, 表明丁二酮刺激后引起细胞内钙离子的瞬时增加. 荧光强度最大的相对变化可达 5%, 之后荧光强度慢慢恢复到基线水平. 当给予其他气味刺激时, 没有检测到细胞内钙离子变化. 图 8 插图 (柱状图) 统计了对丁二酮有

图 7 细胞内钙离子浓度分析结果

纵坐标轴表示 530 nm 波长下细胞内的荧光强度. (a) 转染 pcDNA3.1 (+)/6xhis/rho/odr-10 的实验组 HEK-293 细胞内的荧光强度变化; (b) 未经转染的空白对照组 HEK-293 细胞内的荧光强度变化; (c) 经过转染和未经转染的 HEK-293 细胞对丁二酮的响应对比

反应细胞的数据和比例, 大约有 2.28% 的细胞对丁二酮刺激有反应. 这些结果初步证实了表达的嗅觉受体蛋白的气味分子识别功能. 但是, 由于嗅觉受体蛋白是在异源细胞系统表达的, 嗅觉受体蛋白与异源

细胞的信号转导通路耦合可能存在效率低的问题, 导致很多表达了嗅觉受体蛋白的细胞对丁二酮刺激没有细胞内钙离子增高的响应. 前期的研究也证实, 通过在异源细胞系统共表达嗅觉受体神经元特有的 G_{olf} 蛋白的方法可以增强嗅觉受体与异源的细胞内信号转导通路的耦合效率^[16]. 对细胞内信号转导通路的依赖也是细胞内钙离子浓度分析应用于检测嗅觉受体功能的一个缺点.

(5) 基于嗅觉受体蛋白的石英晶体微天平生物传感器特性. 采用丁二酮、乙酸异戊酯、苯甲醚、薰衣草精油及新鲜空气 5 种气体检测嗅觉受体传感器的特异性. 为直观地比较传感器对不同气体的响应差异, 对传感器的输出频率响应值进行归一化处理, 将最大的频率响应归一化数值定义为 1, 其他归一化数值通过除以最大频率响应值计算得出, 归一化后的数值以均值 $\pm$ 标准差的形式表示. 利用抗 6xhis 标签适配体分子固定嗅觉受体 ODR-10 制备的嗅觉受体传感器对丁二酮的反应明显高于其他测试气味, 而对乙酸异戊酯、苯甲醚、薰衣草精油的响应和新鲜空气的响应结果相当(图 9), t 检验结果表明, 传感器对丁二酮的响应结果与对其他气体的响应结果间具有显著性差异($P < 0.05$); 而利用随机序列固定嗅觉受体 ODR-10 制备的传感器对被测几种气体响应值相当, 没有表现出对丁二酮气体的显著性响应. 这些结果表明采用抗 6xhis 标签适配体分子有效地将异源表达的嗅觉受体 ODR-10 固定在传感器表面, 这种嗅觉受体传感器可以有效特异地检测嗅觉受体的相应气

图 8 表达 ODR-10 蛋白的实验组 HEK-293 细胞和未转染的 HEK-293 细胞荧光变化归一化统计结果

箭头指示刺激加入时刻, 其中插图中的柱状图统计了对丁二酮和 HBSS 缓冲液有反应的细胞数量和比例

图 9 基于嗅觉受体的 QCM 生物传感器对各种气味的反应
** $P < 0.05$

味配体。

仿生嗅觉受体分子传感器的灵敏度通过检测不同浓度的丁二酮气体(图 10)得出, 丁二酮气体的浓度范围在 $10 \sim 100 \mu\text{L L}^{-1}$ 时, 传感器对特异性气味分子丁二酮具有浓度依赖的线性响应特性。传感器的检测下限通过计算空白响应标准差的 3 倍计算得出, 大小为 $1.5 \mu\text{L L}^{-1}$ 。此外本实验室还对相同条件下制备的 5 个仿生嗅觉受体分子器件的灵敏度和检测下限进行统计(表 1)。由表 1 可以知, 采用嗅觉受体蛋白 ODR-10 作为传感器的敏感材料, 利用适配体分子的独特性质实现敏感材料与二级传感器的有效耦合制备的仿生嗅觉分子器件具有较高的灵敏度, 平均检测灵敏度为 $0.553 \pm 0.0236 \text{ Hz}/(\mu\text{L L}^{-1})$, 平均检测下限为 $1.524 \pm 0.0321 \mu\text{L L}^{-1}$ 。这些结果说明, 采用该技术制

图 10 基于嗅觉受体的 QCM 生物传感器对不同浓度丁二酮的响应

表 1 仿生嗅觉受体传感器的灵敏度及检测下限

仿生嗅觉受体分子器件	灵敏度 ($\text{Hz}/(\mu\text{L L}^{-1})$)	R	检测下限 ($\mu\text{L L}^{-1}$)
I	0.534	0.991	1.51
II	0.561	0.982	1.48
III	0.524	0.987	1.56
IV	0.581	0.986	1.52
V	0.566	0.978	1.55
均值	0.553	0.9848	1.524
标准差	0.0236	0.0050	0.0321

备的仿生嗅觉受体分子器件具有良好的可重现性和稳定性。此外制备好的传感器在 4°C 条件下保存, 连续 2 周检测传感器的响应特性, 结果表明, 4°C 条件下保存一周内的传感器依然具有良好的响应特性, 一周之后随着时间的延长响应结果相对不稳定。原因可能是随着保存时间的延长, 传感器表面的嗅觉受体蛋白 ODR-10 结构发生改变, 特异性结合气味配体功能的改变引起的, 这也是当前仿生嗅觉受体分子传感器发展的重要挑战之一, 阻碍了实际应用与商品化发展。可能的解决方案是在传感器表面为嗅觉受体蛋白分子提供天然的环境, 以有效地维持其结构与功能。

以上结果表明, 以嗅觉受体蛋白 ODR-10 作为敏感元件, 利用适配体的独特性质有效地将敏感元件与二级传感器耦合, 制备的仿生嗅觉受体分子器件具有良好的灵敏度、特异性、重复性和稳定性。

3 讨论与结论

本研究将带有 6xhis 标签的嗅觉受体蛋白 ODR-10 成功表达在异源系统 HEK-293 细胞中, 通过 RT-PCR, Western blot, 细胞免疫荧光等技术对嗅觉受体蛋白表达结果进行鉴定。细胞内钙离子浓度分析测试结果表明, 表达在细胞质膜上的嗅觉受体依然保持其天然活性, 能够对其天然配体有特异性响应。鉴于嗅觉受体对其天然配体的特异性识别能力, 嗅觉受体蛋白是一种理想的生物传感材料, 适合用于构建仿生传感器进行气味分子的检测。本研究尝试将其与石英晶体微天平结合, 初步构建了一种基于嗅觉受体的仿生传感器。实验结果表明, 该传感器能够用于检测嗅觉受体的天然配体, 具有很高的灵敏度和特异性。这为基于受体的仿生嗅觉传感器的进一步发展奠定了基础, 同时也为仿生电子鼻的发展提

出了一种新的思路。

尽管如此,在异源细胞体系中进行嗅觉受体的功能性表达还需深入探索,以提高嗅觉受体的表达效率,同时保持嗅觉受体的天然构象及功能。目前研究嗅觉受体在异源系统中的功能性表达趋于分子水平,除了增加信号肽引导嗅觉受体的定位外,还通过共转染 G_{α} 基因以增强嗅觉受体与胞内信号通路的偶联。此外,研究还发现某些受体关联蛋白,如线虫中的 ODR-4 和果蝇(*Drosophila*)的 OR83b,都能改善嗅觉受体在细胞膜的有效定位并有助于维持其功能活

性^[17,18]。在哺乳动物中,4 个不同蛋白家族,包括非嗅觉受体类 G 蛋白偶联受体、受体转运蛋白(receptor transporting protein, RTP)、受体表达增强蛋白(receptor expression enhancing protein, REEP)和 70 kD 热休克蛋白(heat shock protein 70 kD, HSP70),其中某些成员能促进嗅觉受体在 HEK-293 细胞中的表达、细胞膜定位和保持功能活性。此外,不同嗅觉受体表达可能存在不同的方式^[19],对其独特的作用机理的深入研究可以促进嗅觉受体蛋白在异源细胞系统中的稳定高效表达。

参考文献

- 1 Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, 65: 175–187
- 2 Gaillard I, Rouquier S, Giorgi D. Olfactory receptor. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 456–469
- 3 Dhanasekaran D N, Radhika V, Proikas-Cezanne T, et al. Heterologous expression of olfactory receptors for targeted chemosensing. *Ann NY Acad Sci*, 2009, 1170: 157–160
- 4 Song H S, Lee S H, OH E H, et al. Expression, solubilization and purification of a human olfactory receptor from *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 2009, 59: 309–314
- 5 Katada S, Nakagawa T, Kataoka H, et al. Odorant response assays for a heterologously expressed olfactory receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305: 964–969
- 6 Shirokova E, Schmiedeberg K, Bedner P, et al. Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors: G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J Biol Chem*, 2005, 280: 11807–11815
- 7 Matarazzo V, Clot-Faybesse O, Marcet B, et al. Functional characterization of two human olfactory receptors expressed in the baculovirus Sf9 insect cell system. *Chem Senses*, 2005, 30: 195–207
- 8 Lu M, Echeverri F, Moyer B D. Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic*, 2003, 4: 416–433
- 9 McClintock T S, Landers T M, Gimelbrant A A, et al. Functional expression of olfactory-adrenergic receptor chimeras and intracellular retention of heterologously expressed olfactory receptors. *Mol Brain Res*, 1997, 48: 270–278
- 10 Gimelbrant A A, Haley S L, McClintock T S. Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7285–7290
- 11 Sengupta P, Chou J H, Bargmann C I. Odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell*, 1996, 84: 899–909
- 12 Lee J Y, Ko H J, Lee S H, et al. Cell-based measurement of odorant molecules using surface plasmon resonance. *Enzyme Microb Tech*, 2006, 39: 375–380
- 13 吴春生, 王丽江, 刘清君, 等. 嗅觉传导机理及仿生嗅觉传感器的研究进展. *科学通报*, 2007, 52: 1362–1371
- 14 Mairal T, Özalp V C, Lozano Sánchez P, et al. Aptamers: Molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390: 989–1007
- 15 Walter J G, Kökpınar O, Friehs K, et al. Systematic investigation of optical aptamer immobilization for protein-microarray applications. *Anal Chem*, 2008, 80: 7372–7378
- 16 McClintock T S, Landers T M, Gimelbrant A A, et al. Functional expression of olfactory-adrenergic receptor chimeras and intracellular retention of heterologously expressed olfactory receptors. *Mol Brain Res*, 1997, 48: 270–278
- 17 Lee H W, Lee H K, Lee S O, et al. Single-molecule fluorescence study on membrane proteins derived from living organisms: Application to *Drosophila* Olfactory Receptor Or83b. *Biophys J*, 2011, 100: 153a
- 18 Dunham J H, Hall R A. Enhancement of the surface expression of G protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol*, 2009, 27: 541–545
- 19 Bush C F, Hall R A. Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 2289–2295

Functional expression of olfactory receptor and its application for biomimetic sensors

DU LiPing¹, PENG He², WU ChunSheng¹, ZOU Ling¹, ZHAO LuHang³ & WANG Ping¹

¹ Biosensor National Special Laboratory, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Ministry of Education, Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

² Department of Clinical Laboratory, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China;

³ Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

ODR-10, an olfactory receptor protein of *C. elegans*, was used as a model of olfactory receptors expressed in human embryonic kidney (HEK)-293 cells as a fusing protein with 6×his-tag and rho-tag. The expression of the target protein was analyzed by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), Western blot and immunocytochemistry methods. The specific binding to odorant molecules of the olfactory receptor was measured using intracellular Ca²⁺ assays. Then the olfactory receptor ODR-10 was immobilized onto the surface of quartz crystal microbalance (QCM) sensor to fabricate the olfactory receptor-based gas biosensor. The results demonstrated that this biosensor can detect the natural ligand of ODR-10 (diacetyl) with high sensitivity and specificity. All these results indicated that the olfactory receptor ODR-10 has been expressed successfully in the heterologous cell system and it can be used as the sensitive material in the development of biomimetic olfactory receptor-based biosensors.

olfactory receptor protein, ODR-10, functional expression, quartz crystal microbalance, biomimetic sensor

doi: 10.1360/972013-487