

·综述·

G 蛋白偶联受体结构生物学进展

葛保胜

(中国石油大学(华东) 生物工程与技术中心, 中国山东 青岛 266555)

摘要: G 蛋白偶联受体(GPCR)是具有 7 次跨膜螺旋的细胞整合膜蛋白, 它们广泛地参与感光、气味、神经传递以及细胞增殖、分化、迁移等各类生理活动的调控, 是现代药物研发的重要靶点. 然而, GPCR 结构生物学研究却受到高质量蛋白制备、稳定性以及结晶方法等方面的限制. 近年来, 随着新型膜蛋白表达体系、新型去污剂、膜蛋白纯化及结晶技术的发展, 使得 G 蛋白偶联受体结构解析工作取得了可喜的进展, 也为进一步解析更多 GPCR 精细结构及相关药物研发奠定重要基础.

关键词: G 蛋白偶联受体; 结构生物学; 去污剂; 表达; 纯化

中图分类号: Q518.3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)04-0360-06

Progress of Structure Biology on G Protein Coupled Receptors

GE Bao-sheng*

(Center for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum, Qingdao 266555, Shandong, China)

Abstract: G protein coupled receptors are seven-transmembrane integrated membrane proteins, which mediate numerous cellular signal transduction events triggered by a variety of molecules and compounds such as hormones, neurotransmitters, light, odours and taste. Because of their important role in many important physiological activities, such as cell migration, cell differentiation, fetation, cancer and HIV, GPCR had been developed as important drug targets in a lot of diseases. However, it is hard to get sufficient high quality protein for crystallization, together with its instability in detergent solution, which had hampered high-resolution structure determination of GPCRs. Recently, novel expression, purification and crystallization strategies for eukaryotic membrane proteins had been developed, which make it possible to know more detailed relationship of GPCRs, and further develop effective drugs for many related diseases.

Key words: G protein coupled receptor; structure biology; detergent; expression; purification

(Life Science Research, 2009, 13(4) 360-365)

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs), 又称为 7 个 α 螺旋跨膜蛋白受体 (seven α -helices transmembrane segment receptor, 7TM receptor), 是体内最大的蛋白质超家族^[1]. 迄今为止发现的人 GPCR 有上千种, 序列比对发现它们之间的同源性并不高, 但它们都可以与 G 蛋白相互作用, 都具有 7 次跨膜螺旋结构, 所以通称为 G 蛋白偶联受体^[2].

G 蛋白偶联受体是细胞整合膜蛋白, 它可以与激素、神经递质、光、气味分子等小分子物质发生相互作用, 在细胞信号传递中发挥着重要作用. 人类重大疾病的发生往往都与 GPCR 功能紊乱有关. 据统计, 目前 2/3 以上的药物开发以及 1/10 以上的世界前 200 个最畅销药物都是以 GPCR 作为药物靶点^[3].

尽管 GPCR 作为药物靶点的重要性已经非常

收稿日期: 2009-01-06; 修回日期: 2009-06-03

作者简介: 葛保胜(1977-), 男, 山东莘县人, 中国石油大学(华东)生物工程与技术中心讲师, 博士, 主要从事海洋膜蛋白结构与功能研究, Tel: 0532-86981132, E-mail: gebaosheng@upc.edu.cn.

清楚,但是对于它们原子级的精细结构尚不清楚,大大降低了结构依赖性药物设计的针对性。由于天然细胞或组织中 GPCR 的含量很低,需要通过重组表达技术获得,而关于膜蛋白重组过量表达技术尚存在一定的技术难题。其次,由于在膜蛋白提纯过程中需要添加去污剂,这构成了去污剂-膜蛋白-磷脂相互作用的复杂体系。目前对其相互作用机理尚不清楚,加上 GPCR 类蛋白的不稳定性,以及其分子内含有的亲水性小环都无疑增加了这类蛋白提纯和结晶的难度^[4]。

因此,自 1983 年科学家首次预测出了牛 Rhodopsin 结构模型^[5] 后的 20 多年时间里,GPCR 精细结构解析一直进展缓慢。近年来,随着新型重组表达方法的建立、新型去污剂以及结晶技术的发展,人们在 G 蛋白偶联受体的结构解析方面也取得了可喜的进展。

1 G 蛋白偶联受体的高效表达体系

除了牛^[6]、乌贼^[7]等动物的 Rhodopsin 在天然细胞中含量较高可以直接纯化获得足量高质量蛋白用于结晶研究外,其他类型的 GPCR 在细胞或组织中的丰度都较低,必须通过重组表达的方法来制备足量的蛋白进行结构生物学研究。

目前广泛采用的 GPCR 表达体系主要有:原核表达体系、酵母表达体系和动物细胞或病毒表达体系 3 种,其优缺点比较见表 1。

原核表达系统一直在蛋白质结构生物学中占有着重要的地位^[8]。为了让 GPCR 更好地在大肠杆菌中进行活性表达,往往采用融合蛋白策略。麦芽糖结合蛋白最早被用作融合标签用于增强细菌中异源蛋白的可溶性表达,同时它可以牵引目的蛋白到周质空间,充分折叠并插入到质膜上。Marullo 通过将 $\beta 2$ 肾上腺素受体与 MBP 融合表达,最早在大肠杆菌体内获得了具有配基结合活性的 GPCR 受体,证明了利用大肠杆菌表达活性 GPCR 的可行性^[9]。继而 5-羟色胺受体(5HT1a)也用同样的方式表达成功,且表达量有了进一步的提高^[10]。Grisshammer 等^[11]将鼠神经降压素受体(NTR)的 N 末端删去,代之以麦芽糖结合蛋白(MBP),以增强其可溶性表达并帮助其顺利运转到质膜,可以表达得到 mg 级的活性 MBP-NTR 融合蛋白。研究还发现,如果将受体 C 末端同时融合 thioredoxin A 的缺失突变体将会进一步增加受体的稳定性和表达效率。

除了可溶性表达外,Kiefer^[12,13]首次将气味受体在大肠杆菌中进行了包涵体表达和复性研究,并得到了可与气味分子相结合的活性受体。Baneres 等^[14-16]还将白三烯 B4 受体和 5-羟色胺受体在大肠杆菌中进行包涵体表达,经复性后可以获得足量的活性蛋白供结晶条件筛选。

但是原核表达也有其致命的弱点,就是不能进行翻译后修饰。而大部分 GPCR 蛋白都具有不同的翻译后修饰,如磷酸化、糖基化、棕榈酰化等。如果该翻译后修饰对蛋白的活性具有关键的影响,如牛 Rhodopsin Asn15 的糖基化对稳定该蛋白保持在活性状态是必需的,那么 Rhodopsin 就不适合采用原核表达体系^[17]。实验证明,许多 GPCR 蛋白即使没有经过翻译后修饰也具有一定的功能,因此这些蛋白还是可以利用原核表达体系进行异源表达的。

酵母属于真核生物,具有所有的翻译后修饰功能,且生长迅速,可以达到很高的菌体密度,生产成本较低,成为了理想的 GPCR 表达系统。酿酒酵母和毕赤酵母都被成功用于 GPCR 的活性表达。毫无疑问,酵母 GPCRs 会在酵母中具有最高的表达量,但是其他来源的不同受体间的表达情况差别较大,同时由于酵母细胞壁较厚,不容易破壁,且筛选高表达克隆工作量较大,这也限制了其广泛应用^[18]。

哺乳动物细胞和病毒表达体系是近年来发展起来的新型表达体系。由于它们的细胞质环境及细胞膜磷脂组成更接近于真核动物细胞,也具备完整的翻译后修饰功能,可以表达具有充分活性的 GPCR 蛋白,且表达量可达 10 mg/L 以上^[19]。目前 HEK293^[20]和 Semliki Forest 病毒表达体系^[21]已被广泛用来表达功能性 GPCR 蛋白,以用于结构与功能研究及药物筛选。但是由于动物细胞或病毒培养成本较高,且不容易建立稳定的遗传表达体系,所以该体系在规模扩大方面还存在诸多的限制。

基于大肠杆菌、麦胚或动物细胞提取物的无细胞表达体系因其操作简单、方便快捷等优点得到了广泛关注,并应用于 GPCR 的表达中^[22,23],但由于其成本相对较高,目前仅限于小规模探索,尚不能大量制备蛋白用于结构生物学研究。

值得注意的是,对某一受体来说成功的重组表达策略并不意味着对每种受体都适用;不同受体之间,即使属于同一类型的受体,其在一表

达体系中的表达情况也相差很大^[24]。因此对特定受体进行氨基酸序列优化分析,并对宿主、载

体、tag 选择及融合位点以及诱导表达条件进行优化还是必不可少的^[25]。

表 1 不同 GPCR 表达体系的比较^[4]
Table 1 Comparison of different expression systems^[4]

表达体系(Expression systems)	受体类型(Receptors)	优点(Advantages)	缺点(Disadvantages)
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	嘌呤核苷类受体;神经降压素受体,炎症因子类受体	快速、安全、操作简便,容易放大	缺少翻译后修饰,表达量低或形成包涵体,需要重折叠
酵母(Yeast)	多巴胺受体,肾上腺素受体,酵母 GPCR	简便、安全、较易规模化	细胞壁较厚,需要大量筛选高表达克隆
动物细胞或病毒 (Animal cells or viruses)	神经激肽受体,肾上腺素受体; Rhodopsin 及其他	表达范围广,具有完备的翻译后修饰,表达量较高	成本较高,不稳定或安全问题
无细胞体系 (Cell free system)	肾上腺素受体,气味受体等	简便、快速	成本高、得率低

2 G 蛋白偶联受体的增溶及纯化

膜蛋白的提纯一般分为粗膜制品的制备、去污剂增溶和色谱纯化三步。粗膜制品的制备最常用的是差速离心法,先低速离心除去细胞碎片,然后取上清液在 100 000 g 离心 1 h,得到粗膜制品。该方法简单、有效,可富集到绝大部分的膜组分,容易与下游操作结合。缺点是需要超速离心机,且超速离心机容量一般不会太大,对于处理大量样品,工作量比较大,不容易放大^[26]。近年来发展起来的去污剂/聚合物双水相体系主要依靠胶束和聚合物分子间相互作用力来实现成相,工艺开发过程中疏水膜蛋白以疏水作用富集于去污剂相,亲水蛋白以体积排阻效应富集于聚合物相,从而实现膜蛋白的分离纯化^[27]。具有对疏水膜蛋白增溶作用、成相物浓度低、萃取环境温和及操作简单、易放大等特点,是一个值得注意的发展方向。

去污剂增溶是膜蛋白提取过程中的关键步骤。去污剂主要发挥着两方面的作用:首先是打破磷脂双分子层将膜蛋白提取出来;其次是保持膜蛋白在溶液中的稳定性。因此合适的去污剂不仅要膜蛋白具有较强的溶解能力,还要最大限度的保持膜蛋白在溶液中的稳定性,不至于因为聚集而失去活性。通常离子型的表面活性剂具有较强的溶解度,但是也往往与膜蛋白具有较强的相互作用而导致其变性失活。非离子型的表面活性剂作用条件温和,对膜蛋白变性作用较小,具有较好的稳定作用,如 DM、OG、digitonin 等,但

是溶解度往往不如离子型表面活性剂。而两亲表面活性剂性质介于二者之间^[28]。

不仅不同类型去污剂对同一种受体作用情况差别较大,同一种表面活性剂对不同的受体作用情况也不尽一致。如 Cymal 5 对 CCR5 具有较好的溶解和稳定作用,但是它却对同属于趋化因子受体的 CXCR4 起不到同样的效果^[29,30]。Grisshammer 等^[31]还发现将不同类型表面活性剂混合在一起使用,有时还可以大大增强溶解和稳定效果。除此之外,去污剂对膜蛋白的作用还要受到体系中的蛋白组成、缓冲液离子强度、pH、温度、蛋白浓度以及渗透剂存在的影响,从而形成一个相当复杂的体系^[32]。因此去污剂的筛选也完全是一个经验的过程,需要具体问题具体分析。对于特定的 GPCR 来说,进行系统的去污剂筛选是完全必要的。

值得一提的是,在去污剂增溶的同时加入一些小分子的配基(激活剂、阻断剂等)或两亲性多肽等物质可以显著增加膜蛋白的稳定性。例如,人肾上腺素受体只有在阻断剂存在的增溶条件下才可以保持活性稳定^[33]。张曙光等^[34]发现两亲性多肽可以显著增加细菌视紫红质在溶液中的热稳定性。

除了溶解性和稳定性外,去污剂与后继纯化和结晶过程的相容性也要考虑在内。如果不能相容就要考虑在适当的时候进行去污剂交换。一般来说具有较高 CMC 的去污剂比较容易去除干净,交换起来也相对容易^[32]。

在膜蛋白的色谱纯化过程中,一些重组标签

被成功应用于 GPCR 类蛋白的分离纯化。图 1 总结了近年来文献报道的 GPCR 类蛋白表达纯化过程中使用的重组 tag。其中 His tag 使用次数最高,为了提高其特异性,往往将连续 His 个数增加到 8~12 个。其它如 Flag tag、Rho tag、Cmyc tag 等也取得了良好的纯化效果^[32]。另外,可以选择性亲和纯化活性受体的单克隆抗体受到了越来越多的关注,将其偶联在树脂上可以选择性亲和纯化活性受体蛋白^[29]。

如果一步亲和层析得到的目标蛋白纯度还达不到纯度要求,就需要采用离子交换或疏水层析等技术进行进一步的精细纯化,直至纯度达到结晶的要求。最后通常采用 S200 凝胶过滤对纯化得到的蛋白进行单体分离,分离出不容易结晶的聚集体,获得 GPCR 活性单体,用于结晶条件筛选^[35]。

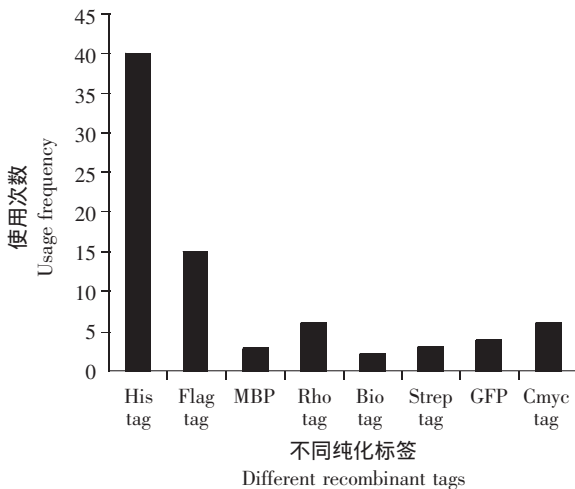


图 1 不同纯化标签使用次数统计

Fig.1 The usage frequency of different recombinant tags

3 G 蛋白偶联受体结构解析进展

自从 1983 年 P.A.Hargrave 首次成功预测出了牛 Rhodopsin 结构模型以后的 20 多年里,关于 GPCR 的结构解析进展缓慢。直到 2000 年 Krzysztof Palczewski 等^[6]解析出了第一个 GPCR (牛 Rhodopsin)的精细结构,分辨率达 2.8 Å,证实了 P.A.Hargrave 的关于 Rhodopsin 7 次跨膜螺旋的结构预测。随着新型高效表达体系和纯化手段的建立,科学家们相继成功表达纯化出了多种人 GPCR 蛋白,并用于结晶条件筛选。

2007 年 Vadim Cherezov 等采用缺失(或点)突变结合融合蛋白技术解析出了第一个人 β 肾上腺素受体 2 的精细结构。他们采用突变技术,

删除影响蛋白稳定性的氨基酸或氨基酸片断,构建了稳定性突变体^[36];同时将胞内第 3 个柔性 loop 与抗体 Fc 片断相融合,得到了 3.7 Å 的人 β2 肾上腺素受体晶体结构^[37]。随后又通过采用更刚性的 T4 溶菌酶替换 Fc 片断,得到了分辨率达 2.4 Å 的融合蛋白晶体^[38]。这两种融合蛋白均保持与配基的结合活性。这是迄今为止获得的第一个人 GPCR 的精细结构,也是第 2 个 GPCR 的高分辨率晶体结构,该结果被 Science 杂志评为 2007 年十大科技进展之一。

2008 年 5 月 Midori Murakami 和 Tsutomu Kouyama 等^[39]报道了从乌贼视细胞中分离得到的 Rhodopsin 的精细结构,分辨率达 3.7 Å,它与牛 Rhodopsin 结构基本相似,主要区别在于牛 Rhodopsin 的 N 末端为无规卷曲,而乌贼 Rhodopsin 的 N 末端形成了规则的 α 螺旋结构,这可能与其生活的海洋环境有密切关系。

2008 年 7 月 Tony Warne 等^[40]采用缺失突变的方法,将火鸡 β1 肾上腺素受体中不稳定的氨基酸进行点突变,同时将较长的 N 末端、C 末端以及胞内 loop 进行缺失突变,降低其柔性,增加了稳定性,最终获得了该突变体 2.7 Å 的精细结构。

2008 年 11 月 Veli-Pekka Jaakola 等^[41]采用类似的方法,将人 A2A 腺苷受体的胞内第 3 个 loop 与 T4 溶菌酶相融合,同时删去该 loop 和 C 末端大部分柔性片断。为了稳定 A2A-T4L-ΔC,在纯化过程中需要同时加入:1)胆酸钠;2)饱和剂量的受体拮抗剂 ZM241385;3)胆固醇琥珀酸单酯。最终获得了该突变体(A2A-T4L-ΔC)与拮抗剂 ZM241385 复合体 2.6 Å 的晶体结构,这也是第二个人 GPCR 的高分辨率晶体结构。

除了上述两个天然分离的 Rhodopsin 的结构外,另外 3 个重组表达得到的 GPCR 晶体结构(见表 2)也为我们提供了两条可能获得 GPCR 高分辨率晶体结构的方法,即融合蛋白法和缺失突变法。尽管二者都对原始蛋白进行了结构改造,这样获得的晶体结构可能会与其实结构有一定的差别,但也为我们更多了解该蛋白的结构与功能关系提供了重要的参考。

近年来,有些学者还提出了另外一种可能获得高质量膜蛋白晶体的方法:盒式突变法。即采用渐进式的多位点突变技术,以亲水残基系统地替换 GPCR 蛋白跨膜螺旋表面的多个疏水残基,改善 GPCR 蛋白的水溶性。最终使跨膜结构

域的疏水性质得到改变,从而获得与自然状态下在膜系统中核心蛋白形态相似、功能相同的突变

GPCR 蛋白,进而获得其精细的原子结构。但该方法尚在探索中,尚未有成功的范例出现。

表 2 成功解析出高分辨率晶体结构的 GPCR 蛋白
Table 2 GPCRs of known structure

GPCR	Resources	Expression system	Detergents*	Recombinant tags	Resolution	References
Rhodopsin	Bovine	-	Octyl- β -glucoside+heptanetriol	-	2.8 Å	[6]
β 2-adrenergic receptor	Human	HEK293	Dodecyl- β -D-maltoside	FLAG	2.4 Å	[38]
Rhodopsin	Squid	-	Octyl- β -glucoside	-	3.7 Å	[39]
β 1-adrenergic receptor	Turkey	Baculovirus	Octyl- β -glucoside	His tag	2.7 Å	[40]
A2A-adenosine receptor	Human	Baculovirus	Dodecyl- β -D-maltoside	FLAG+His	2.6 Å	[41]

注 * 结晶时所用去污剂。

Notes * Detergents used for crystallization.

4 展望

随着新型重组技术的发展,已有上百种 GPCRs 在不同表达体系中得到了过量表达,并获得了高质量的蛋白用于结晶条件筛选。但是到目前为止仅有少数几个获得了高质量的晶体。值得深思的是,既然两个天然提取的 Rhodopsin 可以不经改造直接获得高分辨率晶体,为什么其他 3 个重组表达的受体都需要经过某种程度的改造以后方能获得高分辨率的蛋白晶体呢?分析原因可能有两个^[8]:一是重组表达的蛋白质量尚达不到结晶的要求,需要某些辅助分子,如分子伴侣、配基等,帮助其正确充分折叠;二是蛋白本身的不稳定和柔性阻碍了高质量晶体的形成,需要新型结晶技术的补充,如共结晶技术、融合蛋白技术和缺失突变技术等。

近年来,新型结构分析技术(如冷冻电镜技术,NMR 结构测定技术等)的不断发展,也将为 GPCR 精细结构的解析提供其他行之有效方法^[35]。

参考文献(References):

- [1] BOCKAERT J, PIN J P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 1723-1729.
- [2] GETHER U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors[J]. *Endocr Rev*, 2000, 21: 90-113.
- [3] VANTI W B, SWAMINATHAN S, BLEVINS R, et al. Patent status of the therapeutically important G protein-coupled receptors[J]. *Exp Opin Ther Patents*, 2001, 11: 1861-1887.
- [4] KENNETH L. Structure genomics of GPCRs[J]. *Trends in Biotechnol*, 2005, 23(2): 103-108.
- [5] HARGRAVE P A, MCDOWELLA J H, CURTIS D R. The structure of bovine rhodopsin[J]. *Biophys Struct Mech*, 1983, 9: 235-244.
- [6] PACZEWSKI K, MOTOSHIMA H, FOX B A, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor[J]. *Science*, 2000, 289: 739-745.
- [7] MURAKAMI M, KOUYAMA T. Crystal structure of squid rhodopsin[J]. *Nature*, 2008, 453: 363-368.
- [8] MANCIA F, HENDRICHSON W A. Expression of recombinant G-protein-coupled receptors for structural biology[J]. *Mol Bio Syst*, 2007, 3: 724-734.
- [9] MARULLO S, DELAVIER K C, ESHDAT Y, et al. Human beta 2-adrenergic receptors expressed in *Escherichia coli* membranes retain their pharmacological properties[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 7551-7555.
- [10] BERTIN B, FREISSMUTH M, BREYER R M, et al. Functional expression of the human serotonin 5-HT1A receptor in *Escherichia coli*. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 8200-8206.
- [11] WHITE J F, TRINH L B, SHILOACH J, et al. Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin[J]. *FEBS Lett*, 2004, 564: 289-293.
- [12] KIEFER H, KRIEGER J, OLSZEWSKI J D, et al. Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification reconstitution and ligand binding[J]. *Biochem*, 1996, 35: 16077-16084.
- [13] KIEFER H, MAIER K, VOGEL R. Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*[J]. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27: 908-912.
- [14] BANERES J L, PARELLO J. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G protein[J]. *J Mol Biol*, 2003, 329: 815-829.
- [15] BANERES J L, MARTIN A, HULLOT P, et al. Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1[J]. *J Mol Biol*, 2003, 329: 801-814.
- [16] BANERES J L, MESNIER D, MARTIN A, et al. Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 20253-20260.
- [17] KAUSHAL S, RIDGE K D, KHORANA H G. Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4024-4028.
- [18] MINIC J, SAUTEL M, SALESSE R, et al. Yeast system as a screening tool for pharmacological assessment of G protein

- coupled receptors[J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12 : 961-969.
- [19] REEVES P J, KLEIN S J, GETMANOVA E V, *et al.* Expression and purification of rhodopsin and its mutants from stable mammalian cell lines : application to NMR studies[J]. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27 : 950-955.
- [20] BRIAN L C, KARIN E E, HYEYOUN C, *et al.* Study of a synthetic human olfactory receptor 17-4 : Expression and purification from an inducible mammalian cell line[J]. *PLoS One*, 2008, 3 (8) : e2920.1-9.
- [21] LUNDSTROM K. Semliki forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1610 : 90-96.
- [22] KAISER L, GRAVELAND B J, STEUERWALD D. Efficient cell-free production of olfactory receptors : Detergent optimization, structure, and ligand binding analyses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(41) : 15726-15731.
- [23] SPIRIN A S, BARANOV V I, RYABOVA L A, *et al.* A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield[J]. *Science*, 1988, 242 : 1162-1164.
- [24] MARULLO S, DELAVIER K C, GUILLET J G, *et al.* Expression of human $\beta 1$ and $\beta 2$ adrenergic receptors in *E. coli* as a new tool for ligand screening[J]. *Biotechnol*, 1989, 7 : 923-927.
- [25] REN H, YU D Y, GE B S, *et al.* High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(2) : e4509.
- [26] 刘娟, 朱建航, 范杰平. 去污剂聚合物双水相体系在膜蛋白分离中的应用[J]. *江西科学*(LIU Juan, ZHU Jian-hang, FAN Jie-ping. Application of detergent/polymer aqueous two phase systems for purification of membrane protein[J]. *Jiangxi Science*), 2008, 26(3) : 416-420.
- [27] EVERBERG H, GUSTAVSSON N, TJERNELD F. *Methods in Molecular Biology*[M]. New York : Humana Press, 2008. 2 : 403-412.
- [28] SEDDON A M, CURNOW P, BOOTH P J. Membrane proteins lipids and detergents : not just a soap opera[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1666 : 105-117.
- [29] MIRZABEKOV T, BANNERT N, FARZAN M, *et al.* Enhanced expression native purification and characterization of CCR5 a principal HIV-1 coreceptor[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 28745-28750.
- [30] BABCOCK G J, MIRZABEKOV T, WOJTOWICZ W, *et al.* Ligand binding characteristics of CXCR4 incorporated into paramagnetic proteoliposomes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 : 38433-38440.
- [31] TUCKER J, GRISSHAMMER R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*[J]. *J Biochem*, 1996, 317 : 891-899.
- [32] SARRAMEGNA V, MILON M A, TALMONT F. Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation : a challenge towards structure[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63 : 1149-1164.
- [33] LIITTI S, MATKAINEN M T, SCHEININ M, *et al.* Immunoaffinity purification and reconstitution of human alpha (2)-adrenergic receptor subtype C2 into phospholipids vesicles[J]. *Protein Expr Purif*, 2001, 22 : 1-10.
- [34] ZHAO X J, NAGAI Y, REEVES P J, *et al.* Design short peptide surfactants stabilize G protein-coupled receptor bovine rhodopsin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (47) : 17707-17712.
- [35] WALIAN P, CROSS T, JAP B. Structural genomics of membrane proteins[J]. *Genome Biology*, 2004, 7(5) : 431-439.
- [36] ROSENBAUM D M, CHEREZOV V, HANSON M A, *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into $\beta 2$ -adrenergic receptor function[J]. *Science*, 2007, 318 : 1266-1273.
- [37] RASMUSSEN S F, CHOI H J, ROSENBAUM D M, *et al.* Crystal structure of the human $\beta 2$ adrenergic G-protein-coupled receptor[J]. *Nature*, 2007, 450 : 383-387.
- [38] CHEREZOV V, ROSENBAUM D M, HANSON M A, *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human $\beta 2$ -adrenergic G protein-coupled receptor[J]. *Science*, 2007, 318 : 1258-1265.
- [39] MURAKAMI M, KOUYAMA T. Crystal structure of squid rhodopsin[J]. *Nature*, 2008, 453 : 363-368.
- [40] WARNEL T, SERRANO M J, BAKER J G, *et al.* Structure of a $\beta 1$ -adrenergic G-protein coupled receptor[J]. *Nature*, 2008, 454 : 486-492.
- [41] JAAKOLA V P, GRIFFITH M T, HANSON M A, *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist[J]. *Science*, 2008, 322 (5905) : 1211-1217.

(上接第 345 页)

- [4] 屠其华, 郭晓君, 张行, 等. 改良的石蜡包埋组织中提取高质量基因组 DNA[J]. *中国实验诊断学*(TU Qi-hua, GUO Xiao-jun, ZHANG Xing, *et al.* Improved method of high quality genomic DNA extraction from paraffin-embedded tissues[J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*), 2006, 10(9) : 1001-1003.
- [5] MOERKERK P T, KESSELS H J, TEN KATE J, *et al.* Southern and dot blot analysis of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from colonic carcinomas[J]. *Vichows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990, 58(5) : 351.
- [6] 刘德莉. 一种石蜡包埋组织 DNA 提取方法[J]. *上海医学检验杂志*(LIU De-li. A DNA extraction method from paraffin-embedded tissues[J]. *Shanghai Journal of Medical Laboratory Science*), 2000, 15(2) : 128.
- [7] 贾怡, 周斌, 吕梅励, 等. TritonX-10 快速提取甲醛固定、石蜡包埋组织内 DNA 的方法[J]. *刑事技术*(JIA Yi, ZHOU Bin, LÜ Mei-li, *et al.* A rapid method of DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues by using Triton X-100[J]. *Forensic Science and Technology*), 2003, 6 : 6-8.
- [8] COLLINS E, GLENNON M, HANLEY S, *et al.* Evaluation of a PCR/DNA probe colorimetric membrane assay for identification of *Campylobacter* spp. in human stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39 : 4163-4165.
- [9] 王松梅, 郝志勇, 马景臣, 等. PCR 检测与细菌培养方法在细菌性痢疾监测中的应用比较[J]. *复旦学报(医学版)*(WANG Song-mei, HAO Zhi-yong, MA Jing-chen, *et al.* Underestimated incidence rate of shigellosis : comparison of PCR and coproculture methods in a surveillance study[J]. *Journal of Fudan University(Medical Sciences)*), 2006, 33 : 766-769.