文章编号: 1674 - 7054(2019) 04 - 0307 - 07

烟碱型乙酰胆碱受体 β4 亚基点突变体的构建

张　璐,朱晓鹏,长孙东亭,罗素兰
(海南大学 海洋学院/热带生物资源教育部重点实验室/海口市海洋药物重点实验室,海口 570228)

摘　要: 利用 PCR 介导的定点突变技术构建包含 β4 亚基的烟碱型乙酰胆碱受体点突变体模型,同时采用双电极电压钳技术,对激动剂 ACh 和拮抗剂 α-CTx RegIIA 对突变受体的活性进行检测。结果表明: β4 亚基胞外 N 端序列第 168 位的异亮氨酸(Ile) 成功突变成了丝氨酸(Ser) ,突变后的受体对激动剂 ACh 的活性降低,对拮抗剂 α-CTx RegIIA 的活性降低了 1.4 倍,半阻断剂量(IC_{50}) 为 170 nmol · L^{-1}。

关键词: 烟碱型乙酰胆碱受体; β4 亚基; PCR 介导的定点突变; 双电极电压钳技术
中图分类号: Q 7　　**文献标志码**: A　　DOI: 10. 15886/j. cnki. rdswxb. 2019. 04. 001

烟碱型乙酰胆碱受体(Nicotinic acetylcholine receptors,nAChRs) 是一种由五聚体亚基组成的配体门控离子通道,可分为神经型 nAChRs 和肌肉型 nAChRs。目前,研究较多的神经型 nAChRs 的亚型有: α3β2,α3β4,α4β2,α6/α3β2β3,α7,α9α10 等; 肌肉型 nAChRs 有 α1β1δγ 和 α1β1δε2 类[1]。神经型 nAChRs 与一系列神经生理和病理过程密切相关[2]。β 亚基作为一种重要的辅助型亚基,与 α 亚基结合,形成五聚体结构,协同作用发挥配体门控离子通道的功能。包含 β 亚基的 nAChR 广泛存在于中枢和外周神经系统中,目前,已发现多种疾病与 β 亚基的功能相关,如: 疼痛,帕金森氏症,抑郁症,阿尔茨海默症,药物成瘾及脑损伤修复等[3-8]。β 亚基上氨基酸的变化会造成 nAChRs 功能的变化,从而导致疾病的发生。有研究发现,夜间额叶癫痫症就是因为 nAChR 上的 β2 亚基第 287 位的缬氨酸发生了突变,影响了离子通道的活性,导致出现癫痫症状[9]。定点突变技术是目前研究目的蛋白中关键氨基酸的一种常用技术,利用定点突变技术能定向对关键氨基酸进行突变,研究目的蛋白中关键氨基酸的作用,以及发现配体与受体相互作用的关键位点。如: ZHANGSUN D 等[10]选择 5 个鼠源(rat) β2 亚基上的氨基酸位点设计了点突变体,并选择 α - 芋螺毒素 LvIA(α-Conotoxin LvIA,简称 α-CTx LvIA) 为探针,检测突变型 nAChR 药理学特性的变化,研究发现,胞外 N 端第 59 和 119 位 2 个重要氨基酸位点突变后,受体对 α-CTx LvIA 的结合活性增强。CUNY H 等[11]也利用了定点突变的方式探究 α-CTxs 与 nAChRs 结合的关键氨基酸位点,结果发现,β2 亚基上胞外 N 端第 59 和 113 位氨基酸改变后,受体对 α-CTxs 的敏感性会发生改变。α3β4 nAChR 亚型是治疗尼古丁依赖、药物滥用、小细胞肺癌、过度饮食和肥胖的潜在靶点[12-14]。β4 亚基上的关键氨基酸对 β4 的病理、药理活性具有重要作用,也是许多配体药物作用的重要靶点。研究 β4 亚基上的关键位点信息,对于配体药物及先导化合物的研究具有重要意义。有研究表明,β4 亚基上 Loop F 区域的氨基酸位点可以影响受体与激动剂和拮抗剂的结合[11]。Loop F 中第 168 位的异亮氨酸(Ile) 是 β4 亚基与 β2 亚基的区分性位点,体现出 β4 亚基的药理学特性。笔者利用 PCR 介导的定点突变技术,选择 β4 亚基上胞外 N 端配体结合域 Loop F 中第 168 位的异亮氨酸(Ile) 进行定点突变,构建包含 β4 亚基的烟碱型乙酰胆碱受体点突变体模型,并利用双电极电压钳技术对激动剂 ACh 和拮抗剂 α-CTx RegIIA 对突变受体的活性进行检

收稿日期: 2019 - 03 - 25　　**修回日期**: 2019 - 04 - 29
基金项目: 国家自然科学基金项目(81872794) ; 海南省研究生创新科研课题(Hys2017-58)
作者简介: 张璐(1992 -) ,女,海南大学海洋学院 2016 级硕士研究生. E-mail: 460814394@ qq. com
通信作者: 罗素兰(1969 -) ,女,教授,博导. 研究方向: 海洋药物与生物技术. E-mail: luosulan2003@ 163. com

测,旨在为研究 β4 亚基中关键氨基酸的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 大肠杆菌(*E. coli*) DH5α 感受态细胞由本实验室保存; 含有 α3,β4 nAChRs 亚基基因的质粒获赠于美国犹他大学。乙酰胆碱(ACh) 、胶原酶 A 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 质粒提取试剂盒(OMEGA) ,PCR 突变试剂盒(Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit) ,cRNA 体外转录试剂盒 mMESSAGE mMACHINE Kit,RNA 产物回收试剂盒 MEGA clear Kit 等购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; 质粒线性化所需的多种限制性内切酶等购自宝生物(大连) 有限公司; ND96 生理缓冲液: 96 mmol · L^{-1} NaCl,2 mmol · L^{-1} KCl,1.8 mmol · L^{-1} $CaCl_2$,1 mmol · L^{-1} $MgCl_2$,5 mmol · L^{-1} HEPES,pH7.3 ~ 7.7; 突变引物的合成和突变体的测序由生工生物工程(上海) 股份有限公司完成。实验用雌性非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) 由美国进口(Nasco) 。

1.2 突变体引物的设计 针对鼠源 β2 和 β4 2 种亚基在胞外 N 端配体结合区的氨基酸序列进行对比,选择亚型特异性的差异氨基酸位点作为突变对象。本实验中选择的是鼠源 β4 亚基胞外 N 端氨基酸序列第 168 位的异亮氨酸(Ile) ,将该位点突变成鼠源 β2 亚基对应位置的丝氨酸(Ser) ,可作为研究 2 种亚型特异性的 1 种模型。利用 Primer Premier 5.0 软件设计突变位点的上下游引物(表 1) 。

表 1 突变位点上下游引物序列

Tab.1 Upstream and downstream primer sequences of mutant sites

突变引物 Mutant primer	碱基序列 Sequence of bases(5′→3′)
上游正向引物 FM	GTCGCCCACGGCCAGTATGGATGACTTCAC
下游反向引物 RM	GTGAAGTCATCCATACTGGCCGTGGGCGAC

1.3 PCR 介导的定点突变 以包含鼠源 β4 亚基序列的质粒为模板,采用 PCR 介导的定点突变技术对 β4 亚基上第 168 位氨基酸进行定点突变。包含突变位点的 1 对引物和模板质粒退火后用高保真聚合酶进行扩增。PCR 反应条件为: 95 ℃预变性 2 min,95 ℃变性 20 s,60 ℃退火 10 s,延伸阶段 68 ℃ 3 min,末次循环阶段 68 ℃ 2 min,共 25 个循环。正反向引物的延伸产物退火后配对成为不完整的开环质粒。PCR 扩增得到的产物用 w = 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,电压为 90 V,经过 15 min,观察电泳结果。在 PCR 产物中加 1 μL Dpn Ⅰ酶、37 ℃水浴消化质粒模板,Dpn Ⅰ酶除去模板质粒。开环质粒转入 DH5α 感受态细胞后,选取单克隆,培养后提取质粒。通过测序确定目标位点是否突变正确。

1.4 突变体 RNA 的制备 大量提取突变正确的突变体质粒,使用限制性内切酶 Xho Ⅰ进行酶切,获得线性化模板。酶切产物纯化后,使用 w = 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,保留纯度和浓度符合要求的线性化 DNA 作为体外转录的模板,利用 T3 体外转录试剂盒进行体外转录。20 μL 反应体系: 1 ~ 1.5 μg 模板, 2 μL 10 × Reaction Buffer,10 μL 2 × dNTP,1 μL 逆转录酶,37 ℃,体外转录 4 h,获得对应基因的 cRNA。此外,为了消除质粒模板的影响,使用 DNAse 酶处理转录产物。cRNA 经 RNA 纯化试剂盒纯化后,利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳,检测 cRNA 的浓度和纯度,确定是否符合显微注射的要求。

1.5 非洲爪蟾卵母细胞获取和显微注射 麻醉非洲爪蟾 1 h 后,取出成团卵母细胞,胶原酶酶解后,分离获得单个卵母细胞(图 1) 。β4 亚基突变体 cRNA 和 β4 亚基本体 cRNA 分别与 α3 亚基 cRNA(1∶1) 混合,显微注射到爪蟾卵母细胞,注射 RNA 体积为每个卵母细胞注入 59.8 nL RNA。经注射 cRNA 的卵母细胞在含抗生素的 ND96 生理缓冲液中,17 ℃培养 2 d 后进行电生理活性检测。

A　　B　　C

图 1　卵母细胞酶解分离过程

A:非洲爪蟾; B:成团的卵母细胞;C:显微镜下单个卵母细胞

Fig.1　The process of enzymatic hydrolysis and dissociation of oocytes

A: *Xenopus laevis*; B: Group of oocytes; C: Single oocyte under a microscope

1.6　α3β4 nAChR 及其突变体的药理活性检测　非洲爪蟾卵母细胞注射 cRNA 2 d 后,置于 50 μL 细胞槽中,室温下,利用双电极电压钳进行检测。卵母细胞的钳制电位为 -70 mV。用作重力灌注的 ND96 缓冲液流速为 2 mL·min^{-1}。卵母细胞每分钟给予 1 s 100 μmol·L^{-1} ACh 刺激,以引起内向电流产生。基线稳定后,停止灌流,在细胞槽中加入 5 μL ND96 生理缓冲液或 5 μL 不同浓度的 α-CTx RegIIA 溶液(从低浓度到高浓度: 10^{-9},10^{-8},10^{-7},10^{-6},10^{-5} mol·L^{-1}),静置 5 min 后,开启记录模式,记录不同孵育条件下受体电流的变化。

1.7　数据统计　ND96 溶液孵育非洲爪蟾卵母细胞 5 min 后,以 100 μmol·L^{-1} ACh 刺激 1 s 引发的电流作为基础电流(记录 3 次,取平均值作为标准电流值)。不同浓度 α-CTx RegIIA 孵育卵母细胞 5 min 后,记录 100 μmol·L^{-1} ACh 诱发的电流值作为反应电流值(反应率 = 反应电流值/标准电流值)。根据不同浓度 α-CTx RegIIA 引发的电流反应值,计算它对受体的半数阻断剂量(IC_{50})。剂量反应曲线符合非线性拟合方程:

$$反应率 = 100\ /(1+([toxin]\ /\ IC_{50})^{nH}),$$

式中,nH 是 Hill 系数,[toxin]代表 α-CTx RegIIA 的浓度,IC_{50} 是半阻断浓度。

利用 GraphPad Prism(GraphPad Software,San Diego,CA)软件进行分析和作图。每个数据点至少包含 3 个以上卵母细胞的统计值。

2　结果与分析

2.1　突变体 PCR 产物电泳图　从图 2 可知,孔道 1(加入的是突变体 PCR 产物)扩增条带在 5 000 bp 附近,符合目的条带长度,且条带清晰明亮,可用于下一步转化实验。

2.2　突变体质粒测序　突变体质粒的测序结果和 NCBI 比对结果如图 3 所示。β4 亚基 N 端配体结合区第 168 位密码子 ATC(Ile)突变为密码子 AGT(Ser),定点突变准确无误。

2.3　cRNA 制备　从图 4 可知,孔道 1(突变体质粒)的条带在 3 000 bp 附近,孔道 2(质粒酶切后产物)的条带在 5 000 bp 附近,孔道 2 条带滞后于孔道 1 条带,说明质粒酶切完全。突变体

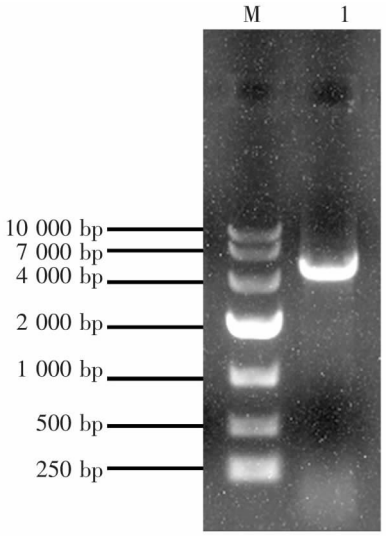

图 2　定点突变 β4 亚基的 PCR 反应产物琼脂糖凝胶电泳图

M:DL 10 000 bp DNA Marker;Lane 1:突变后 β4[I168S]亚基 PCR 反应产物

Fig.2　Agarose gel electrophoresis of DNA of mutated β4[I168S] subunit by PCR reaction

M: DL 10 000 bp DNA Marker; Lane 1: The product of mutated β4[I168S] subunit by PCR reaction

线性模板的质量浓度为 478.3 mg·L^{-1}，$A_{260/280}$ 比值为 1.84；经过纯化后，产物的 $A_{260/280}$ 比值为 1.81，纯度更好，质量浓度为 549.5 mg·L^{-1}（表 2）。线性质粒符合体外转录模板的要求。体外转录收获 50 μL 洗脱产物，紫外分光光度计测定突变体 cRNA 的质量浓度为 698.1 mg·L^{-1}，$A_{260/280}$ 比值为 2.12，符合纯度要求，可用于卵母细胞注射（表 2）。

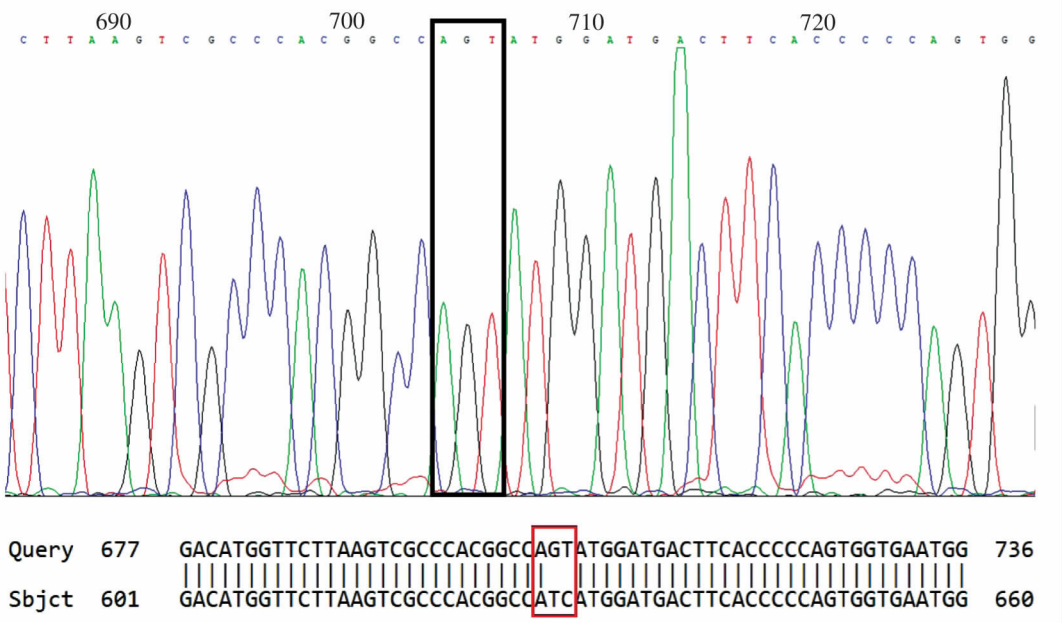

图 3 包含定点突变 β4 亚基序列的质粒测序结果和序列比较图

AGT 代表突变后 β4 亚基 168 位氨基酸对应碱基，ATC 代表代表突变前 β4 亚基 168 位氨基酸对应碱基

Fig. 3 Sequencing results and sequence comparison of plasmid containing site-directed mutant β4 subunit sequences

AGT represents the base corresponding to the amino acid at position 168 of the β4 subunit after mutation, and ATC represents the base corresponding to the amino acid at position 168 of the β4 subunit before the mutation

表 2 突变体质粒，线性 DNA，cRNA 的浓度和 $A_{260/280}$ 比值

Tab. 2 The concentration and ratio of $A_{260/280}$ of mutant plasmid, linear DNA and cRNA

类型 Types	限制性内切酶 Restriction enzyme	启动子 Promoter	质量浓度/(mg·L^{-1}) Concentration	$A_{260/280}$
β4［I168S］质粒	*Xho* Ⅰ	T3	478.3	1.84
β4［I168S］线性 DNA	*Xho* Ⅰ	T3	549.5	1.81
β4［I168S］RNA	*Xho* Ⅰ	T3	698.1	2.12

2.4 突变型受体与本体由乙酰胆碱 ACh 激发的电流比较 以相同浓度 100 μmol·L^{-1} ACh 作用于非洲爪蟾卵母细胞 1 s，引起了内向电流，说明 α3β4 和 α3β4［I168S］nAChR 受体模型成功表达。α3β4 和 α3β4［I168S］nAChR 受体模型的电流大小如图 5 所示，结果发现，相同条件下，本体对 100 μmol·L^{-1} ACh 激动剂引发的开放电流为（690.4±136.5）nA（$n=6$），突变体对 100 μmol·L^{-1} ACh 的诱发电流为（342.6±55.64）nA（$n=15$），经比较，2 种电流差异显著（$P<0.05$）。

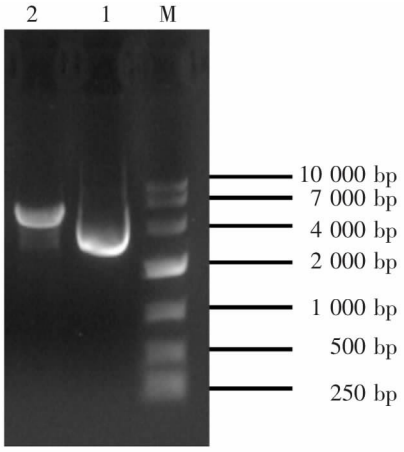

图 4　包含突变体目的基因质粒和酶切后线性质粒的 *w*=0.8%琼脂糖凝胶电泳图
M:DL 10 000 bp DNA Marker;孔道 1:包含突变体 *β4*[I168S]亚基目的基因质粒;孔道 2:酶切后包含突变体 β4[I168S]亚基目的基因线性质粒
Fig.4　0.8% agarose gel electrophoresis of plasmid containing mutant sequence and linear DNA after enzyme digestion
M: DL 10 000 bp DNA Marker; Lane 1: The plasmid containing mutated β4[I168S] subunit sequence; Lane 2: linear DNA containing mutated β4[I168S] subunit sequence after enzyme digestion

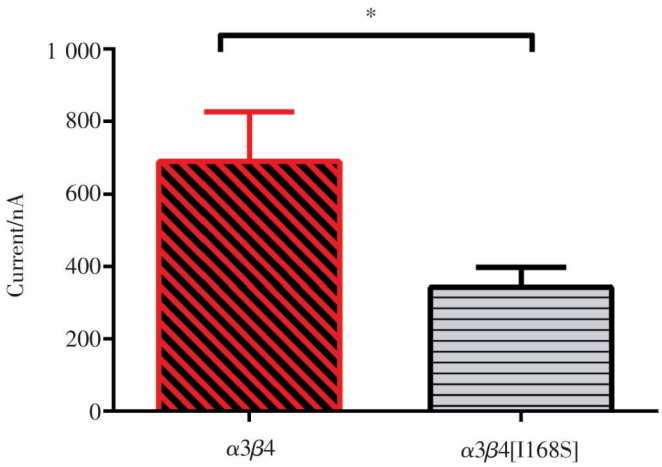

图 5　本体 rα3β4 nAChR 和突变体 rα3β4[I168S] nAChR 电流比较
电流是由 100 μmol·L^{-1} ACh 刺激 1s 激发的,*=*P*<0.05
Fig.5　Comparison of currents between wildtype rα3β4 nAChR and mutant rα3β4[I168S] nAChR
Currents were evoked by 1s pulse ACh (100 μmol·L^{-1}), *=*P*<0.05

2.5　突变型受体与本体的药理活性检测　利用拮抗剂 α-CTx RegIIA 对 α3β4 nAChR 本体和突变体的活性进行研究(图 6),红色曲线代表本体的剂量反应曲线,黑色曲线代表突变体的剂量反应曲线,突变体向右移,证明受体的活性降低。从表 3 可知,α-CTx RegIIA 对 α3β4 nAChR 本体 IC_{50}值为 120 nmol·L^{-1},而对突变体 α3β4 [I168S]nAChR 的 IC_{50}值较本体增大了 1.4 倍,为 170 nmol·L^{-1}。证明 168 位发生突变后,α-CTx RegIIA 对 α3β4 nAChR 的结合活性减弱。

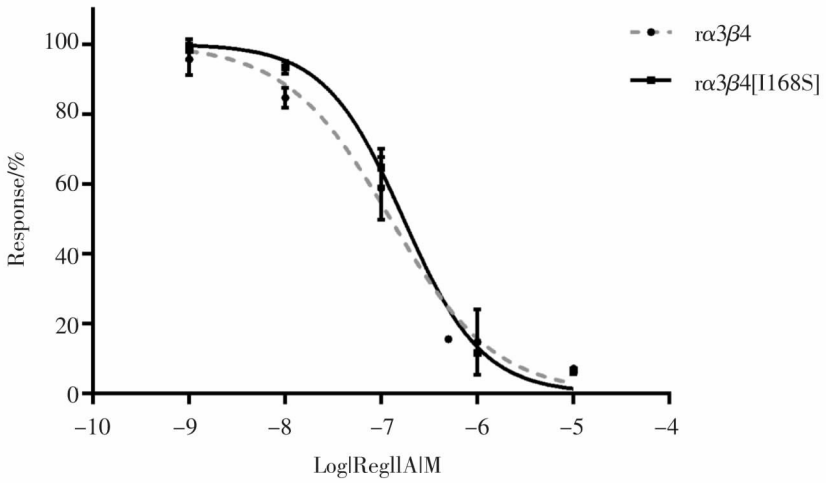

图 6　α-芋螺毒素 RegIIA 对本体和突变体 α3β4 nAChRs 剂量反应曲线
红色虚线代表 α3β4 nAChR,黑色实线代表突变体 α3β4[I168S] nAChR,mean±SEM, *n*=3~5
Fig.6　α-CTx RegIIA dose-response curves for wildtype and mutant α3β4 nAChRs
Red line represents α3β4 nAChR; black line represents α3β4[I168S] nAChR; mean±SEM, *n*=3–5

表 3 α－芋螺毒素 RegIIA 对本体和突变体的半阻断浓度

Tab. 3 The IC_{50} values for block of wildtype and mutant nAChRs by α-CTx RegIIA

受体类型 nAChR subtypes	半数阻断浓度 IC_{50}/(nmol·L^{-1})	比值 Ratio	Hill 系数 Hillslope
α3β4	120	1	0.8
α3β4[I168S]	170	1.4	1.1

注: 比值 = 突变体 IC_{50}/本体 IC_{50}

Note: ratio = mutant IC_{50}/wildtype IC_{50}

3 讨 论

不同亚型的 nAChRs 是许多疾病及相关新药研发的重要靶点。因此,研究 nAChRs 各种亚型的精细结构对阐明 nAChRs 结构及功能的关系,揭示配体药物与 nAChRs 相互作用的分子机制,以及研究 nAChRs 相关疾病的病理和生理过程至关重要。α3β4 是 nAChRs 中重要的 1 种亚型,它广泛分布于外周神经系统和中枢神经系统的内侧缰核、脚间核、后屈束、松果体等组织中,主要参与调节突触间多种神经递质的释放[15]。吴勇等的研究结果表明,针对 α3β4 nAChR 亚型的选择性阻断剂 AT-1001,18-MC 和 α-CTx AuIB 能够降低大鼠模型的烟碱释放作用[16];下丘脑中的 α3β4 nAChR 还参与烟碱介导的食欲降低过程[17]。此外,α3β4nAChR 还与许多疾病的药理和生理作用相关,如小细胞肺癌、机械性损伤修复、疼痛、成瘾等。

β4 亚基作为 α3β4nAChR 中的 1 个关键亚基,不仅参与生理和病理过程的调控,还是许多配体药物作用的重要靶点。但是,目前药物是如何通过 β4 亚基参与神经调控的分子机制尚不清楚,而氨基酸定点突变技术可以确定 β4 亚基上关键氨基酸位点以及阐明药物作用的精细分子机制。有研究表明: 突变 β4 亚基 Loop F 上 D191,D192 位天冬氨酸(Asp)会降低受体对激动剂 Epi 和 CCh 的活性,从而说明了在 β4 亚基和激动剂结合作用中,191,192 位点是 β4 亚基上关键氨基酸位点[18]。本实验利用 PCR 介导的定点突变技术,把位于 β4 亚基中与配体结合关键区域 Loop F 上的第 168 位异亮氨酸(Ile),突变成了 β2 亚基中对应位点的丝氨酸(Ser),该突变体对于研究 α3β2 和 α3β4 两种亚型的敏感性差异具有重要意义。Ile 突变成 Ser 后,氨基酸由非极性氨基酸转变成极性氨基酸,疏水性发生了变化,导致该位点形成的口袋结构发生了变化,对激动剂和拮抗剂的活性也随之改变。笔者选取激动剂 ACh 和拮抗剂 α-CTx RegIIA 研究突变体受体的药理学活性,与本体比较,相同浓度 ACh 刺激突变受体激发的电流值比本体减小,α-CTx RegIIA 对突变体活性减弱。该位点在其他激动剂和拮抗剂的结合中是否具有相同影响,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] GOTTI C, CLEMENTI F, FORNARI A, et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors [J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 78(7): 703 - 711.

[2] WONNACOTT S. Presynaptic nicotinic ACh receptors [J]. Trends in Neurosciences, 1997, 20(2): 92 - 98.

[3] COLLO G, CAVALLERI L, ZOLI M, et al. Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors mediate nicotine-induced Structural plasticity in mouse and human iPSC-derived dopaminergic neurons [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018(9): 15.

[4] LIU Q, TANG Z, GAN Y, et al. Genetic deficiency of beta2-containing nicotinic receptors attenuates brain injury in ischemic stroke [J]. Neuroscience, 2014, 256: 170 - 177.

[5] LUO S, AKONDI K B, ZHANGSUN D, et al. Atypical alpha-conotoxin LtIA from Conus litteratus targets a novel microsite of the alpha3beta2 nicotinic receptor [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(16): 12355 - 12366.

[6] NI R Q, MARUTLE A and NORDBERG A. Modulation of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid-beta interactions in Alzheimer's disease brain [J]. Journal of Alzheimers Disease Jad, 2013, 33(3): 841 - 851.

[7] SCHULZ K M, ANDRUD K M, BURKE M B, et al. The effects of prenatal stress on alpha4 beta2 and alpha7 hippocampal nicotinic acetylcholine receptor levels in adult offspring [J]. Developmental Neurobiology, 2013, 73(11): 806 - 814.

[8] STOKER A K, MARKS M J, MARKOU A. Null mutation of the beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit attenuates nicotine withdrawal-induced anhedonia in mice [J]. Europe Journal Pharmacology, 2015, 753: 146 - 150.

[9] FUSCO M D, BECCHETTI A, PATRIGNANI A, et al. The nicotinic receptor β2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy [J]. Nature Genetics, 2000, 26(3): 275 - 276.

[10] ZHANGSUN D, ZHU X, WU Y, et al. Key residues in the nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit contribute to alpha-conotoxin LvIA binding [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(15): 9855 - 9862.

[11] CUNY H, KOMPELLA S N, TAE H S, et al. Key structural determinants in the agonist binding loops of human beta2 and beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunits contribute to alpha3beta4 subtype selectivity of alpha-conotoxins [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(45): 23779 - 23792.

[12] DAWSON A, MILES M F and DAMAJ M I. The beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit differentially influences ethanol behavioral effects in the mouse [J]. Alcohol, 2013, 47(2): 85 - 94.

[13] DEZFULI G, KELLAR K J, DRETCHEN K L, et al. Evidence for the role of beta2* nAChR desensitization in regulating body weight in obese mice [J]. Neuropharmacology, 2016, 110: 165 - 174.

[14] 孙志华,罗素兰. 烟碱型乙酰胆碱受体及其相关疾病 [J]. 神经药理学报, 2017, 7(1): 53 - 64.

[15] JENSEN A A, FROLUND B, LILJEFORS T, et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations [J]. Journal of medicinal chemistry, 2005, 48(15): 4705 - 4745.

[16] 吴勇,朱晓鹏,安婷婷,等. α - 芋螺毒素与烟碱型乙酰胆碱受体作用的药理学 [J]. 热带生物学报, 2010, 1(1): 78 - 84.

[17] YUAN M, MALAGON A M, YASUDA D, et al. The α3β4 nAChR partial agonist AT-1001 attenuates stress-induced reinstatement of nicotine seeking in a rat model of relapse and induces minimal withdrawal in dependent rats [J]. Behavioural Brain Research, 2017, 333: 251.

[18] LINDOVSKY J, KANIAKOVA M, SVOBODOVA L, et al. Role of negatively charged amino acids in beta 4 F-loop in activation and desensitization of alpha 3 beta 4 rat neuronal nicotinic receptors [J]. Biochimica et biophysica acta, 2008, 1778(4): 864 - 871.

Construction of Nicotinic Acethlcholine Receptor β4 Subunit Mutant

ZHANG Lu, ZHU Xiaopeng, ZHANGSUN Dongting, LUO Sulan

(College of Marine, Hainan University / Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Biological Resources / Hiakou Key Laboratory for Marine Drugs, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: To explain the molecular mechanisms of interaction between β4 nAChR subunit and ligand (agonist ACh and inhibitor α-CTx RegIIA), a mutant of β4 nAChR subunit was constructed by substituting 168th Ile (I) with Ser (S) in the Loop F of N-terminal ligand-binding region, by using the method of site-directed mutagenesis that PCR mediated. The results showed that the inward current of oocytes injected with cRNA of α3β4 [S168I] nAChR could be recorded by two-electrode voltage clamp. The mutant receptor had 1.4 times lower sensitivity to α-CTx RegIIA with a higher IC_{50} of 170 nmol · L^{-1}, compared with the wild-type α3β4 nAChR.

Keywords: nAChR; β4 subunit; PCR-mediated site-directed mutagenesis; two-electrode voltage clamp

(责任编辑: 潘学峰)