

Gi 蛋白真核表达载体的构建及表达检测*

胡祖权, 何天军, 贾 义, 宋萍萍, 邱 炜, 赵远波, 曾 柱**

(贵阳医学院 生物与工程学院 生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 克隆抑制腺苷酸环化酶 G 蛋白(Gi 蛋白)3 个亚基 α 、 β 和 γ 基因, 构建 pEYFP-N- $G_{i\alpha1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta1-\gamma2}$ 真核表达载体, 完成其在真核细胞中的表达检测。方法: 培养肝癌细胞 HepG2, 提取总 RNA 后反转录成 cDNA, 通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 α 、 β 和 γ 的编码基因, 在 α 亚基两端添加酶切位点, 在 β 和 γ 亚基两端分别添加酶切位点和连接肽, 经酶切和连接得到 $G_{i\alpha1}$ 和 $G_{i\beta1-\gamma2}$, 再将 $G_{i\alpha1}$ 和 $G_{i\beta1-\gamma2}$ 基因分别构建到荧光蛋白报告载体 pEYFP-N1 和 pECFP-C1 中, 利用脂质体法将真核表达载体转染到肝癌细胞中, 激光共聚焦显微镜观察分析其表达活性。结果: PCR 扩增获得 Gi 蛋白 α 、 β 和 γ 亚基的编码基因, 在两端添加酶切位点和连接肽后获得的 $G_{i\alpha1}$ 和 $G_{i\beta1-\gamma2}$ 基因, 成功构建了 pEYFP-N- $G_{i\alpha1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta1-\gamma2}$ 真核表达载体, 并在肝癌细胞中实现其真核细胞表达。结论: 成功构建 Gi 蛋白的真核表达载体, 并鉴定其在活细胞中具有表达活性。

[关键词] Gi 蛋白; 脂质体; 转染; 荧光蛋白; 真核表达载体

[中图分类号] Q6-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)06-0794-06

Construction and Detection of the Eukaryotic Expression Vectors of Gi Protein Gene

HU Zuquan, HE Tianjun, JIA Yi, SONG Pingping, QIU Wei, ZHAO Yuanbo, ZENG Zhu

(Department of Biotechnology, College of Biology and Engineering, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To isolate the alpha, beta and gamma subunit genes of Gi protein and construct the eukaryotic expression vectors of pEYFP-N- $G_{i\alpha1}$ and pECFP-C- $G_{i\beta1-\gamma2}$; detecting the expression of vectors in the eukaryotic cells. **Methods:** HepG2 liver cancer cells were cultured and the total RNA was isolated. Then cDNA was transcribed and the coding genes of alpha, beta and gamma subunit were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Enzyme cutting sites in the both ends of alpha subunit were added, while enzyme cutting sites and connecting peptide in the both ends of beta and gamma subunits were added respectively. After enzyme digestion and connection, $G_{i\alpha1}$ gene and $G_{i\beta1-\gamma2}$ fusion gene were obtained. $G_{i\alpha1}$ gene and $G_{i\beta1-\gamma2}$ fusion gene were cloned into the pEYFP-N1 and pECFP-C1 fluorescent protein reporter vectors. The eukaryotic expression vectors were transfected into HepG2 liver cancer cells by lipofectamine method. The laser confocal microscope was used to observe and analyze their expressions in the liver cells. **Results:** The coding genes of alpha, beta and gamma subunit of Gi protein were amplified directly by PCR. The $G_{i\alpha1}$ and $G_{i\beta1-\gamma2}$ genes were obtained after enzyme digestion and connection, the eukaryotic expression vectors of pEYFP-N- $G_{i\alpha1}$ and pECFP-C- $G_{i\beta1-\gamma2}$ were successfully constructed. Subsequently, the vectors were successfully transfected and expressed in the liver cancer cells. **Conclusions:** The eukaryotic expression vectors of Gi protein were successfully constructed and can express in the living cells.

[Key words] Gi protein; liposomes; transfection; fluorescent protein; eukaryotic expression vector

*[基金项目] 国家自然科学基金(11162003, 31260227, 31170886); 教育部科学技术研究重点项目(210196); 贵州省优秀青年科技人才支持计划(2011-24); 贵州省社会发展科技攻关项目[黔科合 SY 字(2011)3065]; 贵州省省长专项基金[黔省专合字(2009)-79]; 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字 2008-2274 和(2013)2058]; 贵州省科技计划[黔科合 LH 字(2014)7092 号]; 贵阳市科学技术项目(2010-筑科农合同字第 1-社-12); 贵州省留学回国人员科技活动基金(2013-8)

**通信作者 E-mail: zengzhu100@sina.com

网络出版时间: 2014-11-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20141119.1351.044.html>

抑制腺苷酸环化酶 G 蛋白(inhibitory adenylate cyclase G protein, Gi 蛋白)是 G 蛋白的一种,在生物体内由 α 、 β 、 γ 三个亚单位结合为复合物联结于细胞膜内表面,其中 α 亚单位起催化作用。G 蛋白偶联受体(guanosine-binding protein coupled receptor, GPCR)能够传递多种不同的细胞外信号进入细胞内,并与异源三聚体 G 蛋白之间相互作用引起一系列的胞内反应^[1-3]。本研究通过从肝癌细胞 HepG2 中提取其总 RNA,并在体外逆转录制备 cDNA,设计 Gi 蛋白 3 个亚基 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 和 $\gamma 2$ 的特异性引物,克隆 3 个亚基编码区的全长序列,并构建 pEYFP-N- $G_{i\alpha 1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 真核表达载体,为进一步利用 FRET 技术研究流体剪切力作用下 GPCR 的构象变化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 TG1 菌株由本实验室保存,荧光蛋白报告载体 pEYFP-N1 和 pECFP-C1 购于吉瑞泰生物科技有限公司,肝癌细胞株(HepG2)由北京大学医学部生物物理实验室馈赠,pGEM-T 载体购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司。TRNzol-A⁺ 试剂购于天根生化科技有限公司,SuperScript[®] III 反转录试剂盒购于美国 Invitrogen 公司,DNA Marker、T4 DNA 连接酶、LA Taq 酶(5 U/ μ L)、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 均购于 Takara 公司,DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司,引物合成和 DNA 测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

肝癌细胞 HepG2 扩大培养,4 ℃,300 g 离心 5 min 收集细胞,采用 TRNzol-A⁺ 法提取细胞总 RNA,配制 1% (w/v) 琼脂糖凝胶或紫外分光光度计检测 RNA 的质量。按照 Qiagen mRNA 纯化试剂盒的操作说明对提取的总 RNA 进行 mRNA 纯化,再以 mRNA 为模板,采用 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 引物和 SuperScript[®] III 反转录酶合成 cDNA。

1.2.2 目的基因扩增

1.2.2.1 $G_{i\alpha 1}$ 、 $G_{i\beta 1}$ 和 $G_{i\gamma 2}$ 基因扩增 根据 NCBI 中 $G_{i\alpha 1}$ 、 $G_{i\beta 1}$ 和 $G_{i\gamma 2}$ 基因(GenBank 登录号 NM_002069、NM_002074 和 NM_053064)的序列设计特异引物。以反转录合成的 cDNA 为模板,分别利用

特异引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 80 s,30 个循环;最后 72 ℃ 10 min。PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒纯化后,经 T4 DNA 连接酶连入 pGEM-T 载体中,转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,菌液涂布于含 100 mg/L Amp 的 2TY 培养基平板上培养,挑取菌落扩大培养后提取质粒 DNA,进行 *Nde*I 和 *Not*I 双酶切鉴定^[4]。鉴定含有预期大小基因片段的菌落送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,测序正确后分别命名为 pGEM-T- $G_{i\alpha 1}$ 、pGEM-T- $G_{i\beta 1}$ 和 pGEM-T- $G_{i\gamma 2}$ 。

1.2.2.2 添加酶切位点和连接肽 以 pGEM-T- $G_{i\alpha 1}$ 质粒 DNA 为模板,利用两端含有酶切位点的引物进行 PCR 扩增,在 $G_{i\alpha 1}$ 基因的 5' 和 3' 端添加 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点;以 pGEM-T- $G_{i\beta 1}$ 质粒 DNA 为模板,利用两端含有酶切位点或连接肽的引物进行 PCR 扩增,在 $G_{i\beta 1}$ 基因的 5' 端添加 *Bam*HI 酶切位点,在 3' 端添加 (Gly₄Ser)₃ 连接肽;以 pGEM-T- $G_{i\gamma 2}$ 质粒 DNA 为模板,利用两端含有酶切位点或连接肽的引物进行 PCR 扩增,在 $G_{i\gamma 2}$ 基因的 5' 端添加 (Gly₄Ser)₃ 连接肽,在 3' 端添加 *Xho*I 酶切位点。

1.2.2.3 SOE-PCR 扩增 $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 融合基因 以添加酶切位点和连接肽的 $G_{i\beta 1}$ 和 $G_{i\gamma 2}$ 为模板,利用 $G_{i\beta 1}$ 在 $G_{i\beta 1}$ 含 *Bam*HI 酶切位点的 5' 端引物和 $G_{i\gamma 2}$ 含 *Xho*I 酶切位点的 3' 端引物进行重叠延伸拼接 PCR (splicing by overhang extension PCR, SOE-PCR) 扩增,获得含有 *Bam*HI、*Xho*I 酶切位点和 (Gly₄Ser)₃ 连接肽的 $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 融合基因片段。DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。

1.2.3 真核表达载体 pEYFP-N- $G_{i\alpha 1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 构建

利用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 分别对 pEYFP-N1 和 pECFP-C1 质粒 DNA 以及 $G_{i\alpha 1}$ 和 $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 基因片段进行双酶切,酶切产物经 DNA 凝胶回收试剂盒回收,纯化后 T4 DNA 连接酶分别将 $G_{i\alpha 1}$ 基因连入 pEYFP-N1 载体, $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 基因连入 pECFP-C1 载体,连接后转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞。将转化的菌液涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的 2TY 培养基平板上培养,挑取菌落扩大培养后提取质粒 DNA,进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定。鉴定含有预期大小基因片段的菌落送交南京金斯瑞生物科技有限公司测序,测序正确后分别命名为 pEYFP-N- $G_{i\alpha 1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 。

1.2.4 重组质粒 DNA 提取

按照 Axygen 生物技术公司的 AxyPrep 无内毒素质粒小量试剂盒的操作说明提取 pEYFP-C- $G_{\alpha 1}$ 和 pECFP-N- $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 质粒 DNA, 紫外分光光度计测量 DNA 含量。

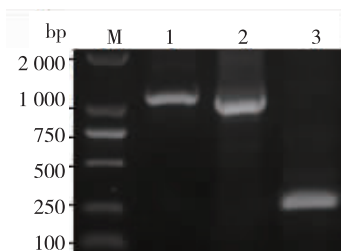
1.2.5 真核表达鉴定

按照 Lipofectamine 2000 说明书中的操作说明将上述提取的 pEYFP-C- $G_{\alpha 1}$ 和 pECFP-N- $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 质粒 DNA 转染到 HepG2 细胞中。在激光共聚焦显微镜 (confocal) 下检测其表达情况。

2 结果

2.1 $G_{\alpha 1}$ 、 $G_{\beta 1}$ 和 $G_{\gamma 2}$ 基因扩增

肝癌细胞株 HepG2 扩大培养后, 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 根据 NCBI 公布的基因序列设计特异引物, PCR 扩增得到 $G_{\alpha 1}$ 、 $G_{\beta 1}$ 和 $G_{\gamma 2}$ 基因片段, 测序结果显示其分别与 NCBI 登录号为 NM_002069、NM_002074 和 NM_053064 的基因序列一致。PCR 扩增产物通过 1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测的结果如图 1 所示。



M 为 DL2000 DNA Marker, 1~3 为 $G_{\alpha 1}$ 、 $G_{\beta 1}$ 和 $G_{\gamma 2}$ 基因片段

图 1 $G_{\alpha 1}$ 、 $G_{\beta 1}$ 和 $G_{\gamma 2}$ 基因 PCR 扩增产物

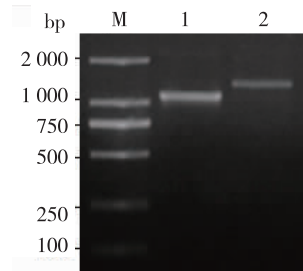
Fig. 1 Agrose gel electrophoresis detection of PCR products of $G_{\alpha 1}$, $G_{\beta 1}$ and $G_{\gamma 2}$ genes

2.2 $G_{\alpha 1}$ 和 $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 目的基因获取

以添加酶切位点和连接肽的 $G_{\beta 1}$ 和 $G_{\gamma 2}$ 为模板, SOE-PCR 扩增得到 $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 融合基因片段。PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收得到, 通过 1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 成功获得 $G_{\alpha 1}$ 和 $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 目的基因片段。

2.3 真核表达载体构建

用限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 分别对 $G_{\alpha 1}$ 和 $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 目的片段以及 pEYFP-N1 和 pECFP-C1 载体的质粒 DNA 进行双酶切, 纯化后分别将 $G_{\alpha 1}$ 基因连入 pEYFP-N1 载体, $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 基因连入

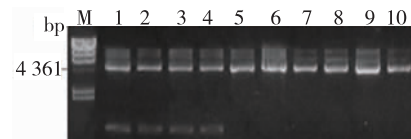


M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为 $G_{\alpha 1}$ 基因片段, 2 为 $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 融合基因

图 2 纯化回收的 $G_{\alpha 1}$ 和 $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 目的基因

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis detection of purified PCR products of $G_{\alpha 1}$ and $G_{\beta 1-\gamma 2}$ genes

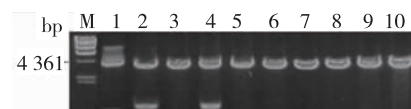
pECFP-C1 载体, 连接产物转化到大肠杆菌 TG1 感受态细胞中, 随机挑取单克隆培养后抽提质粒 DNA 进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定, 图 3 泳道 1~4 为 pEYFP-N- $G_{\alpha 1}$ 的阳性克隆, 图 4 泳道 2 和 4 为 pECFP-C- $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 的阳性克隆, 并送公司测序确定。



M 为 λ -HindIII digest Marker; 1~10 为 10 个单克隆的酶切产物, 其中 1~4 为 pEYFP-N- $G_{\alpha 1}$ 的阳性克隆

图 3 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切鉴定含 pEYFP-N- $G_{\alpha 1}$ 重组质粒 DNA 的阳性克隆

Fig. 3 *Bam*HI and *Xho*I digestion of positive clones containing pECFP-N- $G_{\alpha 1}$ recombinant plasmid DNA



M 为 λ -Hind III digest Marker; 1~10 为 10 个单克隆的酶切产物, 其中 2、4 为 pEYFP-N- $G_{\alpha 1}$ 的阳性克隆

图 4 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切鉴定含 pECFP-C- $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 重组质粒 DNA 的阳性克隆

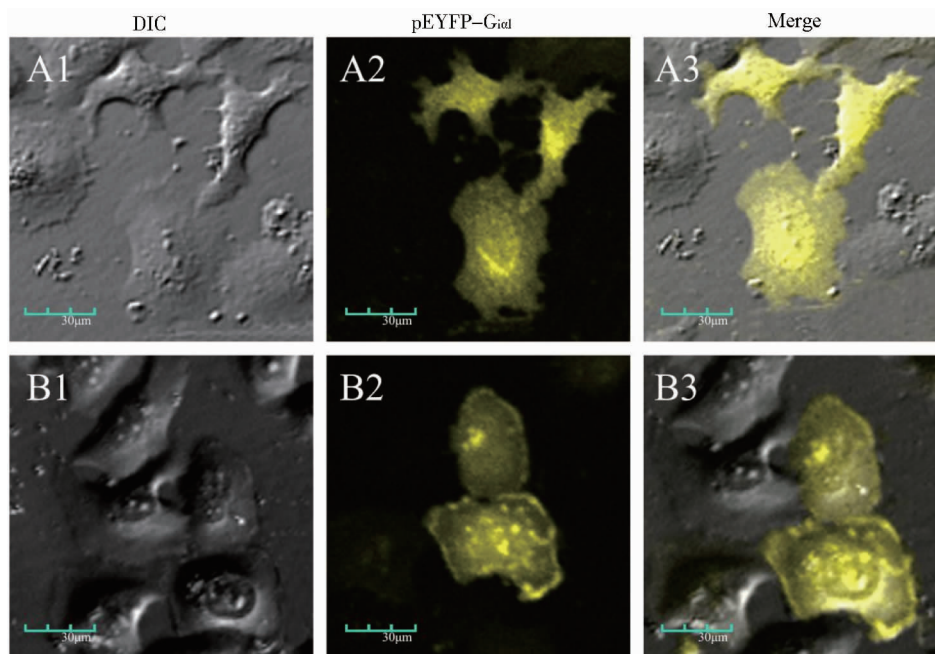
Fig. 4 *Bam*HI and *Xho*I digestion of positive clones containing pECFP-C- $G_{\beta 1-\gamma 2}$ recombinant plasmid DNA

2.4 真核表达鉴定

含有 pEYFP-C- $G_{\alpha 1}$ 和 pECFP-N- $G_{\beta 1-\gamma 2}$ 重组质粒 DNA 的菌液扩大培养, 利用 AxyPrep 无内毒素质粒小量试剂盒分别提取 pEYFP-C- $G_{\alpha 1}$ 和 pECFP-

N-G_{iβ1-γ2} 重组质粒 DNA; 然后利用 Lipofectamine 2000 将重组质粒 DNA 单独或共转染到 HepG2 细胞中, 于 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 18 ~ 48 h 后, 在 25 倍物镜以及激发光波长分别为 433 nm 和 514 nm 的激光共聚焦显微镜下观察 pEYFP-C-G_{iα1}

和 pECFP-N-G_{iβ1-γ2} 载体的表达情况。结果如图 5 ~ 7 所示, 表明构建的 pEYFP-C-G_{iα1} 和 pECFP-N-G_{iβ1-γ2} 真核表达载体能够通过脂质体单独或共转染到肝癌细胞 HepG2 中, 并实现其在活细胞中的表达。



注: A1 和 B1 为显微镜明场下的 HepG2 细胞, A2 和 B2 为 514 nm 波长的激发光下的 HepG2 细胞,

A3 为 A1 和 A2 叠加图, B3 为 B1 和 B2 叠加图

图 5 重组载体 pEYFP-C-G_{iα1} 转染肝癌细胞 HepG2 的表达 (24 h)

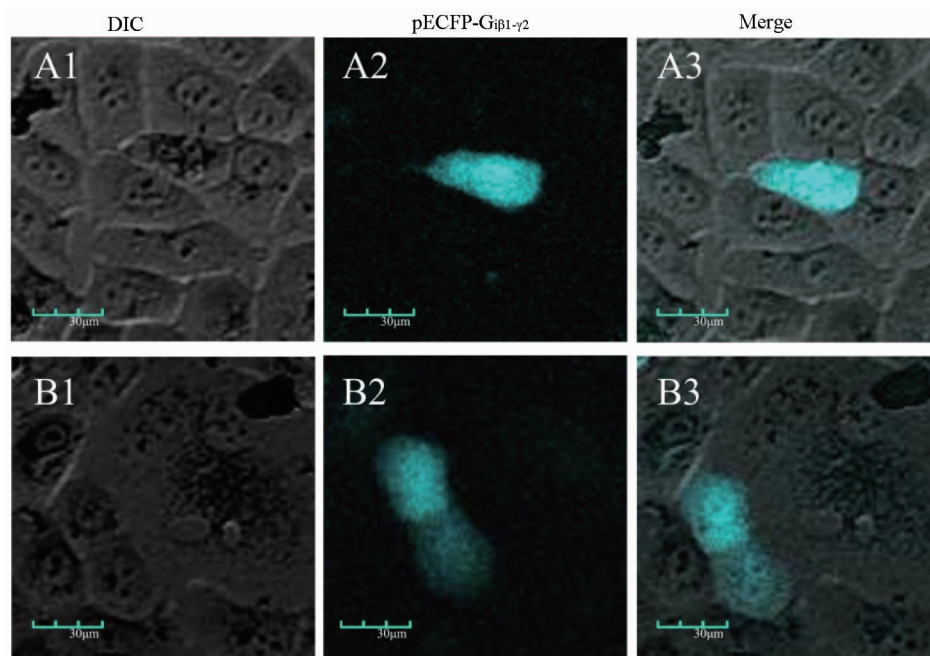
Fig. 5 Expression of the pEYFP-C-G_{iα1} recombinant plasmid in HepG2 liver cancer cells after transfection for 24 h

3 讨论

GPCR 是人类基因组中最大的膜蛋白家族, 约包含 800 ~ 1 000 个成员, GPCR 包含有交替连接的胞外环和胞内环组成的七次跨膜 α-螺旋, 以及 N 端胞外段和 C 端胞内段^[5]。在视觉、嗅觉、味觉以及神经传递等人类各项生理代谢活动过程中发挥着重要的作用, 是细胞外信号向细胞内传递过程中重要的中间体^[6]。当 G 蛋白未被激活时, 它结合一分子的二磷酸鸟苷 (GDP), 同时与 β、γ 亚单位结合。当 G 蛋白遇到活化的受体时, α 亚单位与 GDP 分离, 并与三磷酸鸟苷 (GTP) 结合, 同时与 β、γ 亚单位分离, 此时 G 蛋白处于激活状态。α-GTP 和 β-γ 亚单位均可进一步激活膜的效应器蛋白, 把信号向细胞内转导。因此, 处于活化状态的 GPCR 与 G 蛋白的相互作用是信号转导过程中的一个关键的环节^[7-10], 活化的 G 蛋白还能够调节酶或离子通道等下游效应器^[10-11]。

现有研究表明, G 蛋白偶联受体除了能传递化学信号和感官刺激信号外, 还能感知生理层流体剪切力所产生的力学信号^[12]。课题组的前期研究工作发现, 肿瘤微环境中大量存在的转化生长因子-β₁ 以浓度依赖的方式重组树突状细胞 (dendritic Cells, DCs) 的细胞骨架, 进而损伤其生物物理学特性和运动能力^[13], 但是该研究只考虑了化学因素对 DCs 的影响, 而未考虑物理因素对 DCs 功能的影响, 为了验证 GPCR 是否是 DCs 的力学感受器, 特设计本实验。荧光蛋白已被广泛用于活细胞成相和活细胞中监控分子定位与基因表达^[14]。YFP 和 CFP 被认为是利用 FRET 研究蛋白与蛋白之间相互作用的最好荧光配对^[15], 其中黄色荧光的激发波长为 514 nm, 发射波长为 530 ~ 600 nm, 青色荧光的激发波长为 433/452 nm, 发射波长为 470 ~ 550 nm^[14-15]。

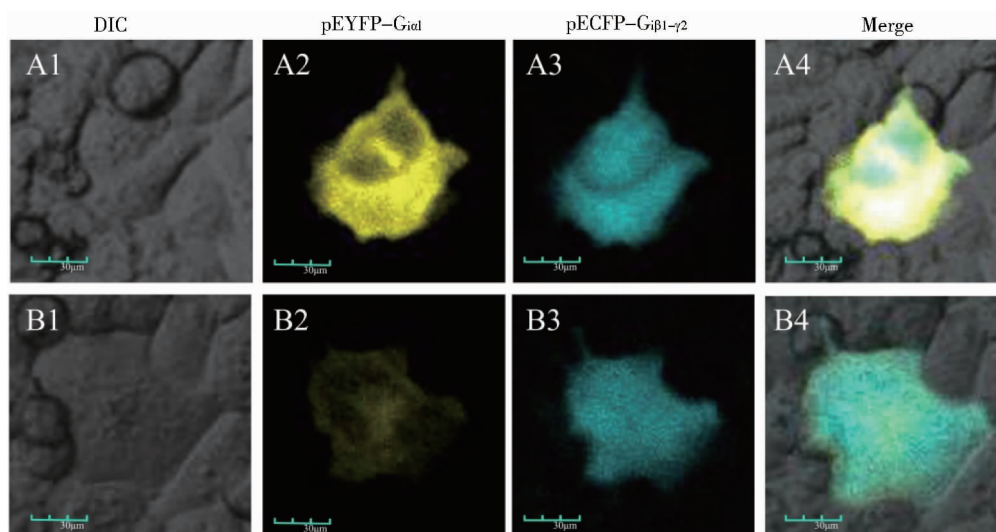
本研究在扩增得到 G_{iα1}、G_{iβ1} 和 G_{iγ2} 编码基因的基础上, 考虑到 Gi 蛋白 3 个亚基在细胞内的相关功能, 即 βγ 亚基在细胞内不管处于活化状态还



注: A1 和 B1 为显微镜明场下的 HepG2 细胞, A2 和 B2 为在 433 nm 波长的激发光下的 HepG2 细胞, A3 为 A1 和 A2 叠加图, B3 为 B1 和 B2 叠加图

图 6 重组载体 pECFP-N- $G_{i\beta1-\gamma2}$ 转染肝癌细胞 HepG2 的表达 (24 h)

Fig. 6 Expression of the pECFP-N- $G_{i\beta1-\gamma2}$ recombinant plasmid in HepG2 liver cancer cells after transfection for 24 h



注: A1 和 B1 为显微镜明场下的 HepG2 细胞, A2 和 B2 为在 514 nm 波长的激发光下的 HepG2 细胞, A3 和 B3 为在 433 nm 波长的激发光下的 HepG2 细胞, A4 为 A1、A2 和 A3 叠加图, B4 为 B1、B2 和 B3 叠加图

图 7 重组载体 pEYFP-C- $G_{\alpha1}$ 和 pECFP-N- $G_{i\beta1-\gamma2}$ 共转染肝癌细胞 HepG2 的表达 (24 h)

Fig. 7 Expression of the pEYFP-C- $G_{\alpha1}$ and pECFP-N- $G_{i\beta1-\gamma2}$ recombinant plasmid in HepG2 liver cancer cells after co-transfection for 24 h

是静息状态, $\beta\gamma$ 亚基都处于二聚体的状态, 本实验通过 SOE-PCR 技术将 β 基因和 γ 基因拼接成 $G_{i\beta1-\gamma2}$ 融合基因, 这样可以方便地将 $G_{\alpha1}$ 和 $G_{i\beta1-\gamma2}$ 基因分别克隆到荧光报告载体 pEYFP-N1 和

pECFP-C1 上, 构建 pEYFP-N- $G_{\alpha1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta1-\gamma2}$ 真核表达载体, 转染到真核细胞中表达后可利用激光共聚焦显微镜的 FRET 功能分析 α -亚基与 $\beta\gamma$ -二聚体之间的距离变化, 进而反映出 GPCR

的构象变化。

本实验在成功构建 pEYFP-N- $G_{i\alpha 1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 真核表达载体后,通过脂质体法单独或共转染到肝癌细胞 HepG2 中,在激光共聚焦显微镜下观察其表达情况。根据图 5~7 的结果来看,构建的真核表达载体无论是单独转染还是共转染,都能在 HepG2 细胞中表达。总之,本实验已成功构建荧光标记的 pEYFP-N- $G_{i\alpha 1}$ 和 pECFP-C- $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 真核表达载体,并实现其真核表达,为后续将 $G_{i\alpha 1}$ 和 $G_{i\beta 1-\gamma 2}$ 转染到成熟 DCs 中,利用 FRET 技术研究在流体剪切力下 GPCR 构象的变化奠定了实验基础。

4 参考文献

- [1] Bünemann M, Frank M, Lohse MJ. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003(26): 16077-16082.
- [2] Jeanneteau F, Chao MV. Promoting neurotrophic effects by GPCR ligands[J]. Novartis Found Symp, 2006(276): 181-189.
- [3] Galés C, Rebois RV, Hogue M, et al. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells[J]. Nat Methods, 2005(3): 177-184.
- [4] Hu ZQ, Li HP, Zhang JB, et al. A phage-displayed chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects Fusarium pathogens and their presence in cereal grains[J]. Anal Chim Acta, 2013(764): 84-92.
- [5] Musnier A, Blanchot B, Reiter E, et al. GPCR signaling to the translation machinery[J]. Cell Signal, 2010(5): 707-716.
- [6] Tao YX. Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: Structure-function insights and therapeutic implications[J]. Pharmacol Ther, 2006(3): 949-973.
- [7] Hein P, Frank M, Hoffmann C, et al. Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells[J]. EMBO J, 2005(23): 4106-4114.
- [8] Vilardaga JP, Bünemann M, Krasel C, et al. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells[J]. Nat Biotechnol, 2003(7): 807-812.
- [9] Frank M, Thümer L, Lohse MJ, et al. G protein activation without subunit dissociation depends on a $G\alpha(i)$ -specific region[J]. J Biol Chem, 2005(26): 24584-24590.
- [10] Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, et al. Insights into G protein structure, function, and regulation[J]. Endocr Rev, 2003(6): 765-781.
- [11] Dupré DJ, Robitaille M, Rebois RV, et al. The role of $G_{\beta\gamma}$ subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2009(49): 31-56.
- [12] Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines[J]. Nat Immunol, 2001(6): 515-522.
- [13] Zheng QN, Long JH, Jia BB, et al. Transforming growth factor- β_1 deteriorates microrheological characteristics and motility of mature dendritic cells in concentration-dependent fashion[J]. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2014(1): 25-40.
- [14] Wang Y, Shyy JY, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2008(10): 1-38.
- [15] Hoffmann C, Gaietta G, Bünemann M, et al. A FLAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells[J]. Nat Methods, 2005(3): 171-176.

(2014-09-20 收稿, 2014-10-18 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅

注意正确使用“百分点”

百分点(1 百分点 = 1%) 的使用现在越来越多,但不少媒体用错了。例如某期刊中说:“2007 年产量为 100 万 t, 2008 年达 112 万 t, 增加了 12 个百分点。”

百分点是一个新的基础数学概念,它只用于比较采用百分数形式表示的数值的增减,例如个人存款的年利率从 3.25% 降至 2.25%,可以说降了 1 百分点,但决不能说降了 1%。如果是降了 1%,则新利率应为 $3.25\% - 3.25\% \times 0.01 = 3.2175\%$ 。可见,上述年产量的增加应用百分数表示,即说“增加了 12%”。

百分点是一个单位,书写时其前面的“个”应删去,正如“5 小时”“10 厘米”不应写作“5 个小时”“10 个厘米”一样。