

## 利用纳米荧光素酶快速预测 G 蛋白偶联受体结构

庄钰铭<sup>1,2</sup>, 郭璐璐<sup>2</sup>, 方国兴<sup>1,2</sup>, 罗欣<sup>2</sup>, 沈思源<sup>2</sup>, 杨帆<sup>2\*</sup>, 周玖瑶<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 511400; 2. 山东大学基础医学院, 山东 济南 250014)

**摘要:** 本文以 $\beta$ 2-肾上腺素能受体 (beta-2 adrenergic receptor,  $\beta$ 2-AR)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、血管紧张素 II -1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 为例, 建立可快速预测 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) N 端、C 端、胞内环、胞外环、跨膜 (transmembrane, TM) 区氨基酸起始位置的方法, 并通过此方法预测 Mas 相关基因 G 蛋白偶联受体 X3 (Mas-related G protein-coupled receptors X3, MRGPRX3) 的结构。具体操作为利用不依赖序列和连接的克隆方法 (sequence and ligation-independent cloning, Slic) 将纳米荧光素酶 (nanoluciferase, NLuc) 插入 GPCRs 的不同位点, 在同一受体表达水平相同的条件下, 检测 NLuc 插入 GPCRs 不同位点对于发光值的影响。结果显示, 当 NLuc 插入 GPCRs 不同位点时, 检测到的 NLuc 发光值不同。当 NLuc 插入 N 端、C 端、胞内环、胞外环等柔性区域时, 发光值在 100 万以上; 插入 TM 区域 (刚性区域) 时, 发光值在 10 万以下, 甚至在 1 万以下; 插在柔性区域与刚性区域的交界处时, 发光值在 10 万~50 万之间, 一般在 10 万左右。本研究建立了一种可快速确定 GPCRs 结构的生化方法, 并用此方法成功预测 MRGPRX3 的结构。此方法能够为配体的虚拟筛选提供有效信息, 为结构药理学提供一定的实验依据。

**关键词:** G 蛋白偶联受体; 纳米荧光素酶; 柔性区域; 刚性区域; 结构预测

中图分类号: R965.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1267-08

## Rapid prediction of G protein-coupled receptor structures using nanoluciferase assay

ZHUANG Yu-ming<sup>1,2</sup>, GUO Lu-lu<sup>2</sup>, FANG Guo-xing<sup>1,2</sup>, LUO Xin<sup>2</sup>, SHEN Si-yuan<sup>2</sup>,  
YANG Fan<sup>2\*</sup>, ZHOU Jiu-yao<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China;

2. Shandong University School of Basic Medicine, Jinan 250014, China)

**Abstract:** Using beta-2 adrenergic receptor, 5-hydroxytryptamine and angiotensin II type 1 receptor as control, we here established a method for rapid prediction of the initial position amino acids of N-terminal, C-terminal, intracellular loops, extracellular loops and transmembrane (TM) regions in G protein-coupled receptors (GPCRs), and successfully predicted the structure of Mas-related G protein-coupled receptors X3 (MRGPRX3). To achieve this purpose, nanoluciferase (NLuc) was inserted into the different sites of these GPCRs' sequence by sequence and ligation-independent cloning (SLIC) method, and the luminescence value were measured to distinguish the different parts of GPCRs. The results showed that luminescence values of NLuc luciferase at TM region were less than 100 000, and the values were higher than 1 000 000 at N terminal, C terminal, or extracellular loops and intracellular loops, and the values were between 100 000 and 500 000 at junction. The predicted MRGPRX3 structure was analyzed in detail and was compared with AlphaFold predicted structure. In conclusion,

收稿日期: 2023-01-29; 修回日期: 2023-02-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31900936).

\*通讯作者 Tel: 13573115758, E-mail: yangfan1357@163.com;

Tel: 18620783138, E-mail: zhoujiuyao@tom.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0076

this method could provide useful information of GPCR structure model for the ligand virtual screening, and could provide certain experimental basis for structural pharmacology.

**Key words:** G protein-coupled receptor; nanoluciferase; flexible area; rigid area; prediction of structure

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 是人类基因组中最大的跨膜受体蛋白家族, 人体内表达 800 多种 GPCRs 参与生物体中 80% 的跨膜信号转导<sup>[1-3]</sup>, GPCRs 可以将细胞外的光照、激素、神经递质等刺激转化为细胞内信号, 参与调节生命活动中大部分的生理过程。GPCRs 表达广泛, 是很多疾病发生的关键因素, 因此是一类重要的药物靶点, 长期以来在药理学领域中发挥重要作用, 它们是中枢神经系统、胃肠道等其他许多疾病领域中的处方药物的靶标<sup>[4-6]</sup>。目前, 2017 年 FDA 批准的临床上有 34% (475 种) 的药物都是靶向 GPCRs 研发的<sup>[7,8]</sup>。

GPCRs 具有相似的结构特征, 它由 7 个跨膜 (transmembrane, TM)  $\alpha$  螺旋蛋白构成,  $\alpha$  螺旋蛋白之间通过 3 个较短的胞外环 (extracellular loops, ECLs) 和胞内环 (intracellular loops, ICLs) 连接, 此外还有 N 端 (N terminal) 部分和 C 端 (C terminal) 部分, 一些 GPCRs 还具有 helix 8 结构<sup>[9,10]</sup>。虽然结构上具有相似性, 但不同 GPCR 之间的差别非常大, 这也决定了其功能的特异性, 因此精确了解 GPCR 的结构, 对于药物设计起到至关重要的作用。近年来, 由于冷冻电镜技术的快速发展, GPCRs 的结构药理学研究取得了许多突破性成果, 得到了几百个 GPCRs 的结构信息<sup>[11-13]</sup>。但是从分子克隆到蛋白纯化<sup>[14-16]</sup>, 再到最终获得冷冻电镜下的复合物结构, 十分耗时。另外, 目前 GPCR 的纯化依然面临一些问题, 如占整个 GPCR 家族大约 50% 的嗅觉受体因其表达量低和易聚集等特点, 在体外很难获得稳定的蛋白, 其冷冻电镜复合物结构解析起来十分困难, 而利用 HEK293 细胞转染的方法可以快速表达蛋白并对其功能进行检测。HEK293 细胞系广泛应用于细胞生物学和生物技术领域, 将重组 DNA 瞬时转染进 HEK293 人类细胞系的手段已十分娴熟<sup>[17-19]</sup>。此外, 生物发光系统广泛应用于生物医学, 如高灵敏度的细胞分析和基于生物发光的分子成像<sup>[20,21]</sup>。其中, 新型的纳米荧光素酶 (nanoluciferase, NLuc) 系统具有应用广泛、灵敏度高、稳定性高和体积小等特点, 为生物发光成像领域开拓了新的可能性<sup>[22,23]</sup>。基于 GPCRs 骨架结构的特殊性, 即 GPCRs 都是由 7 个跨膜螺旋折叠而成, 且相对位置比较固定, 为刚性区域, 而 N 端、C 端及连接跨膜螺旋的 loop 为柔性区域, 本文建立了一种快速检测 NLuc 发光值以预测 GPCRs 结构的系统, 为

预测 GPCRs 结构提供一种新型高效的生化实验方法。

Mas 相关基因 G 蛋白偶联受体 X3 (Mas-related G protein-coupled receptors X3, MRGPRX3) 是 MRGPRs 家族成员中的一种, 属于 G 蛋白偶联受体 A 家族。这类受体是脊椎动物继硬骨鱼进化出现四肢、产生抓挠行为之后所伴随产生的。其原因可能和瘙痒-抓挠循环有关, 动物只有进化到有了四肢之后才会产生抓挠行为。MRGPRX3 是 MRGPRX 亚家族中研究最少的, 是唯一没有激动剂报道的受体, 然而其重要程度不亚于其他痒觉受体。有研究表明, MRGPRX3 介导痒觉和痛觉的信号<sup>[24]</sup>, 且过表达人类 MRGPRX3 的转基因大鼠皮肤表型异常, 证明其可能在表皮细胞增殖过程中起重要作用<sup>[25]</sup>。此外, 最近的一项研究<sup>[26]</sup>显示, 男性婴儿 MRGPRX3 基因的甲基化差异与受孕环境有关, 但在女性婴儿中没有, 这表明 MRGPRX3 基因调控可能调控性别二态性。同时, 在小脑、唾液腺、肺、乳房、睾丸和角膜内皮细胞中均能检测到高水平的 MRGPRX3 mRNA<sup>[27-29]</sup>。因此, 深入研究 MRGPRX3 调控各种生理过程中作用机制及在不同疾病过程中的调控作用显得尤为重要。本文通过建立的 NLuc 快速预测 GPCRs 结构的方法, 预测了 MRGPRX3 这一孤儿受体的结构, 为深入解析 MRGPRX3 配体识别及激活机制提供理论基础, 并为靶向痒觉受体 MRGPRX3 的药物开发提供结构依据。

## 材料与方法

**细胞系** 实验所用的细胞株人胚胎肾细胞 HEK-293T 细胞株购买于中国科学院细胞库。

**菌株** 本文中用于扩增质粒和构建质粒转化的 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京全式金生物公司。

**主要试剂** 中分子量 DNA 标志物购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。DNA 上样缓冲液 (6 $\times$ )、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗购自碧云天生物技术有限公司。琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白胨均购自 OXOID 公司。琼脂糖购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。牛血清白蛋白 (BSA)、多聚甲醛、多聚赖氨酸均购自索莱宝生物科技有限公司。Flag 一抗购自德国 Sigma Aldrich 公司。胎牛血清、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、PBS 缓冲液、青霉素-链霉素双抗均购自生工生物工程股份有限公司。聚乙烯亚胺 (PEI) 购

自翌圣生物科技股份有限公司。腔肠素 400a 购自 Promega 公司。

**主要仪器** PCR 仪 (BioRad 公司)、电泳仪 (北京市六一仪器厂)、金属浴 (Thermo Scientific 公司)、恒温二氧化碳细胞培养箱 (Thermo Fisher 公司)、超净工作台 (苏净安泰公司)、TECAN 酶标仪 (Infinite M200 Pro NanoQuant 公司)、Berthold LB940 微孔板式多功能分析仪 (Berthold Technologies 公司)。

**质粒构建** 在实验室已有  $\beta 2$ -肾上腺素能受体 ( $\beta 2$ -adrenergic receptor,  $\beta 2$ -AR)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、血管紧张素 II-1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 的相应质粒 pcDNA3.1- $\beta 2$ -AR-WT、pcDNA3.1-5-HT<sub>1A</sub>-WT、pcDNA3.1-AT1R-WT 及 pcDNA3.1-MRGPRX3-WT 质粒基础上, 应用不依赖序列和连接的克隆方法 (sequence and ligation-independent cloning, Slic)<sup>[14]</sup> 构建受体不同位点插入 NLuc 的质粒, 所用引物及质粒测序服务均由青岛擎科天成生物技术有限公司合成提供。

**ELISA 检测细胞表面受体表达** 为了评估 NLuc 插入受体不同位点之后受体的表达水平, 使用 PEI 转染试剂在 6 孔板中将已成功构建的质粒瞬时转染 HEK293 细胞; 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后, 将转染的细胞接种到 24 孔板中, 每孔  $2 \times 10^5$  个细胞, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下进一步培养 24 h。将细胞固定在 4% 多聚甲醛中, 室温静置 5 min, 并在室温下用 5% BSA 封闭 1 h。小心吸弃封闭液, 每孔逐滴加入单克隆抗 Flag 一抗 (1:3 000) 在 4 °C 下孵育过夜, 回收一抗, 洗涤后与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗在室温下孵育 1 h。吸弃二抗, 加入 400  $\mu$ L TMB 溶液, 当显色反应到适当颜色 (最弱的孔呈蓝色) 时, 吸出 100  $\mu$ L, 加入到事先准备好的 96 孔板中。向 96 孔板加入 100  $\mu$ L 0.25 mol·L<sup>-1</sup> HCl (以 1× TBST 配制) 终止液终止反应, 并使用 TECAN 酶标仪测量 450 nm 处的光密度值。

**细胞转染与荧光值检测** 人胚胎肾细胞 HEK-293T 由含有 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基, 培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、湿度一定的培养箱中。

用前一天传至 6 孔板中的 HEK-293T 细胞进行转染<sup>[17-19]</sup>, 密度在 50%~70% 为最佳。使用 PEI 转染试剂在 6 孔板中将已成功构建的质粒瞬时转染入 HEK-293T 细胞; 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后, 使用胰蛋白酶消化细胞, 至 1.5 mL 管中, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心后弃上清, 再用 HBSS 重悬细胞并进行细胞铺板, 然后加入 10  $\mu$ L 腔肠素 400a (工作浓度为 5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, 使用时需要现用现配)。平衡 5 min 后, 在具有 410 nm (NLuc-腔肠素 400a) 滤光片的 Berthold LB940 微孔板式多功能

分析仪中读取数据, 积分时间为每孔 1 s。平板连续读取 4 次, 对测量值全部进行分析。

**统计学分析** 采用双侧单因素方差分析及 Turkey 检验进行统计学分析。

## 结果

### 1 NLuc 发光实验方法的建立

在  $\beta 2$ -AR 受体的 N 端、C 端、TM 区域、胞外环、胞内环及交界位置插入 NLuc, 统称为  $\beta 2$ -AR-xNLuc (x 表示 NLuc 插入 GPCR 的氨基酸位置)。构建质粒并利用 Berthold LB940 微孔板式多功能分析仪在具有 410 nm 波长读取 NLuc 发光值。结果显示, N15 (N 端)、K140 (胞内环)、L302 (胞外环)、C383 (C 端) NLuc 发光值均在 100 万以上; S120 (TM 区域) NLuc 发光值在 10 万以下, N196 (交界位置) NLuc 发光值在 50 万以下 (图 1A)。

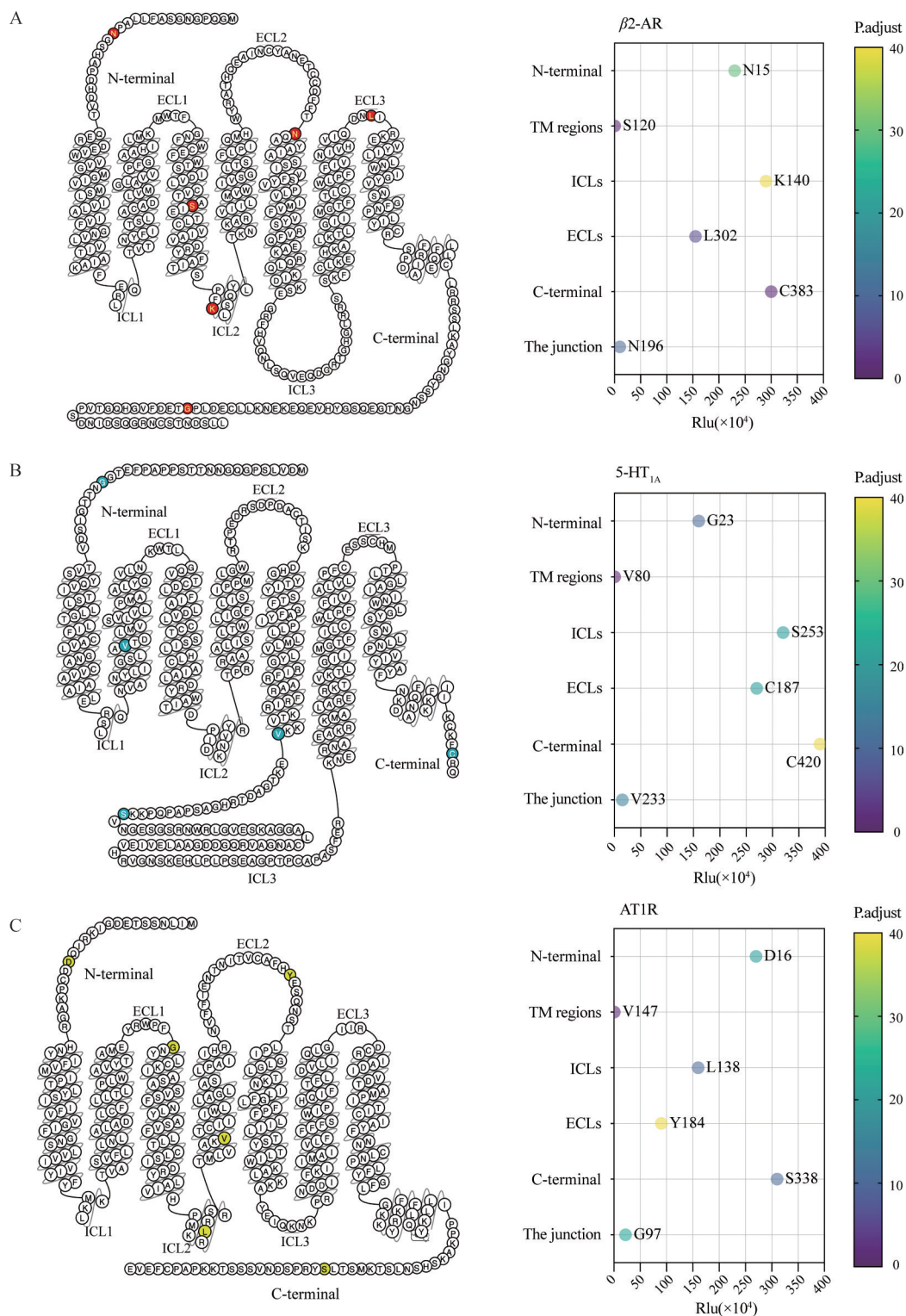
在 5-HT<sub>1A</sub> 受体的 N 端、C 端、TM 区域、胞外环、胞内环及交界位置插入 NLuc, 统称为 5-HT<sub>1A</sub>-xNLuc (x 表示 NLuc 插入 GPCR 的氨基酸位置)。构建质粒并利用 Berthold LB940 微孔板式多功能分析仪在具有 410 nm 波长读取 NLuc 发光值。结果显示, G23 (N 端)、S253 (胞内环)、C187 (胞外环)、C420 (C 端) NLuc 发光值均在 100 万以上; V80 (TM 区域) NLuc 发光值在 10 万以下, V233 (交界位置) NLuc 发光值在 50 万以下 (图 1B)。

在 AT1R 受体的 N 端、C 端、TM 区域、胞外环、胞内环及交界位置插入 NLuc, 统称为 AT1R-xNLuc (x 表示 NLuc 插入 GPCR 的氨基酸位置)。构建质粒并利用 Berthold LB940 微孔板式多功能分析仪在具有 410 nm 波长读取 NLuc 发光值。结果显示, D16 (N 端)、L138 (胞内环)、Y184 (胞外环)、S338 (C 端) NLuc 发光值均在 100 万以上; V147 (TM 区域) NLuc 发光值在 10 万以下, G97 (交界位置) NLuc 发光值在 50 万以下 (图 1C)。

### 2 NLuc 实验方法的总结及应用

通过对  $\beta 2$ -AR 受体、5-HT<sub>1A</sub> 受体、AT1R 受体不同位点插入 NLuc 检测发光值的实验, 总结规律为: ① NLuc 插入位置为柔性区域时, 包括 N 端、C 端、胞外端、胞内端时, NLuc 发光值为 100 万以上; ② NLuc 插入位置为刚性区域时, 如 TM 部分, NLuc 发光受极大影响, 处于 10 万以下, 甚至不到 1 万; ③ NLuc 插入位置处于刚性区域与柔性区域交界位置时, NLuc 发光值处于 10 万~50 万之间, 更接近于 10 万 (图 2A)。

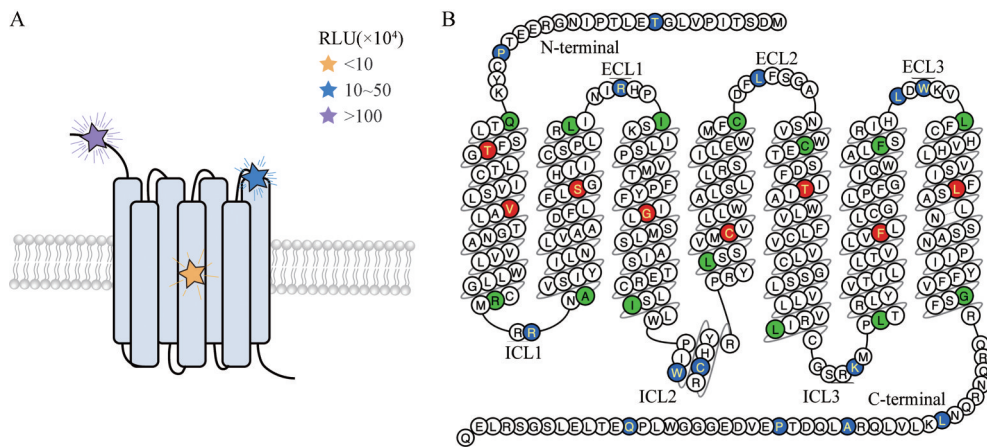
在 pcDNA3.1-MRGPRX3-WT 质粒基础上, 利用 Slic 实验于 T10、P22、Q26、T31、V40、R55、R58、A60、



**Figure 1** Establishment of the NLuc luminescence assay method. Schematic diagram of the luminescence value of  $\beta 2$ -AR-xNLuc (A), 5-HT<sub>1A</sub>-xNLuc (B) and AT1R-xNLuc (C) detection and NLuc insertion position. NLuc: Nanoluciferase;  $\beta 2$ -AR: Beta-2 adrenergic receptor; 5-HT<sub>1A</sub>: 5-Hydroxytryptamine 1A; AT1R: Angiotensin II type 1 receptor; TM: Transmembrane; ICLs: Intracellular loops; ECLs: Extracellular loops

S77、L87、R91、I94、G109、I124、W129、C132、L138、C143、C161、L164、C173、T180、L203、K208、L211、F225、F239、L244、W246、L249、L260、G276、L287、

A294、P299、Q310 等氨基酸后分别插入 NLuc, 统称为 MRGPRX3-xNLuc (x 表示 NLuc 插入 GPCR 的氨基酸位置)。并在 GPCRdb 预测的蛇形图上标注。位于 N



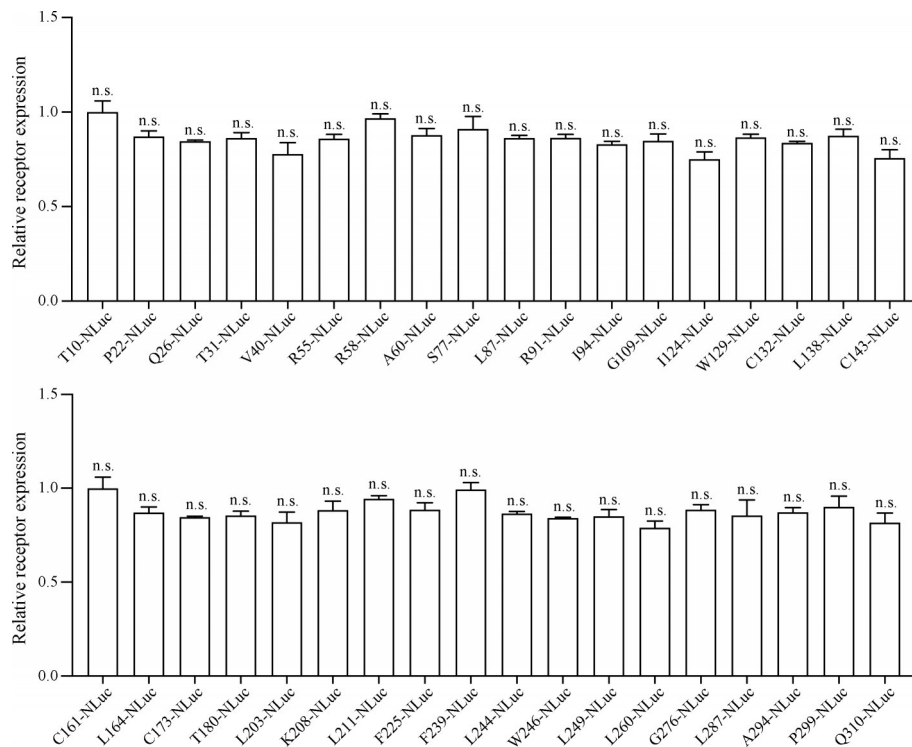
**Figure 2** Summary and application of NLuc experimental methods. A: Schematic diagram of NLuc insertion position corresponding to luminescence value; B: Display of construction sites of MRGPRX3-xNLuc plasmid. Amino acids in the N-terminal, C-terminal and loop regions are represented by blue circles, those in the TM region are represented by red circles, and those in the junction are represented by green circles. MRGPRX3: Mas-related G protein-coupled receptors X3

端、C端及loop区域的氨基酸用蓝色圈表示,位于TM区域的氨基酸用红色圈表示,位于交界处的用绿色圈表示(图2B)。

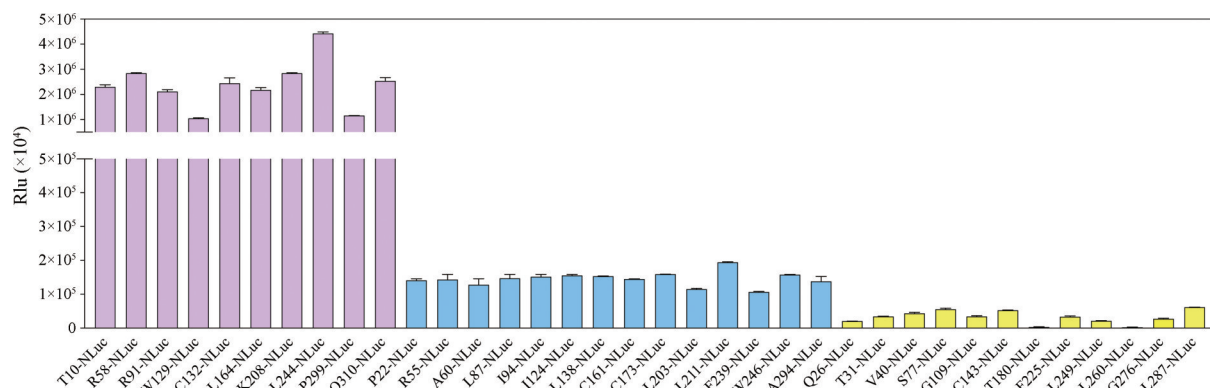
### 3 MRGPRX3-xNLuc的质粒构建及发光值检测

在HEK293细胞中过表达上述成功构建的质粒,ELISA方法结果显示,在受体不同位点插入NLuc后的受体表达量基本一致(图3)。转染并利用Berthold LB940微孔板式多功能分析仪在具有410 nm波长读取NLuc发光值。其中T10-NLuc、R58-NLuc、R91-NLuc、

W129-NLuc、C132-NLuc、L164-NLuc、K208-NLuc、L244-NLuc、P299-NLuc、Q310-NLuc发光值均在100万以上, P22-NLuc、R55-NLuc、A60-NLuc、L87-NLuc、I94-NLuc、I124-NLuc、L138-NLuc、C161-NLuc、C173-NLuc、L203-NLuc、L211-NLuc、F239-NLuc、W246-NLuc、A294-NLuc发光值在10万~50万之间, Q26-NLuc、T31-NLuc、V40-NLuc、S77-NLuc、G109-NLuc、C143-NLuc、T180-NLuc、F225-NLuc、L249-NLuc、L260-NLuc、G276-NLuc、L287-NLuc发光值在10万以下(图4)。



**Figure 3** ELISA results of MRGPRX3-xNLuc expression on cell surface. Mean  $\pm$  SEM from three independent experiments ( $n = 3$ ) were performed in triplicates. n.s.: No significance



**Figure 4** Detection result of luminescence value of MRGPRX3-xNLuc. Purple means the luminescence value is above a million, blue means the luminescence value is between 100 000 and 500 000, and yellow means the luminescence value is less than 100 000

### 4 MRGPRX3 结构预测结果

结合本文中总结的NLuc实验规律及图4可知, T10、R58、R91、W129、C132、L164、K208、L244、P299、Q310可能位于N端、C端及loop区域, P22、R55、A60、L87、I94、I124、L138、C161、C173、L203、L211、F239、W246、A294可能位于N端与TM区域、C端与TM区域或者loop与TM区域的交界处, Q26、T31、V40、S77、G109、C143、T180、F225、L249、L260、G276、L287可能位于TM区域, 预测结构用蛇形图展示(图5)。

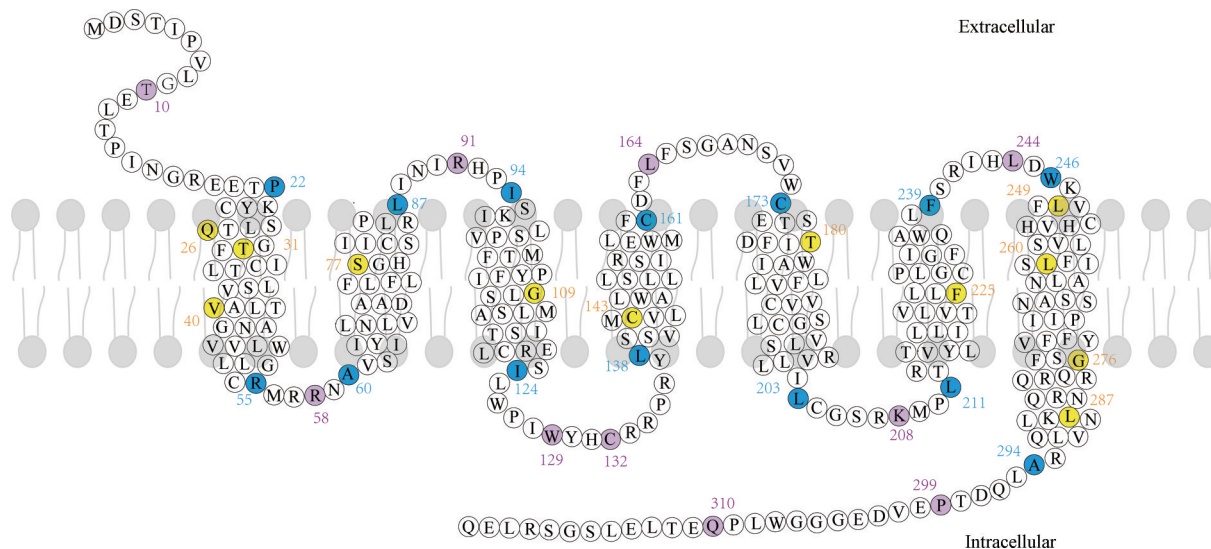
本文利用此方法预测了MRGPRX3, 发现此方法预测的结构与AlphaFold所预测的基本一致, 但存在细微差别, 如AlphaFold预测P93、I94位点在TM3区域, 可信度低, V171、W172在ECL2区域, 残基置信度分数(pLDDT)范围在70~90之间(表1、图6)。

### 讨论

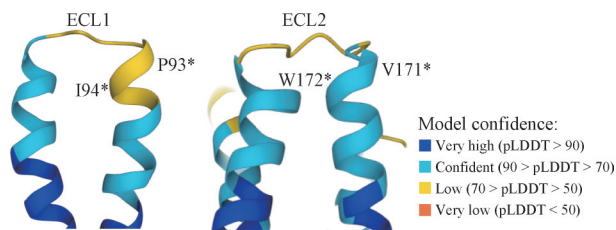
GPCR家族在人体内分布广泛, 功能复杂, 在多种

**Table 1** Comparison of AlphaFold prediction and the method established in this manuscript for predicting MRGPRX3. \*The amino acids differed between the AlphaFold prediction and the NLuc luminescence assay prediction

Domain	AlphaFold prediction	NLuc luminescence assay prediction
N-terminal	M1-E20	M1-E20
TM1	T21-R55	T21-R55
ICL1	M56-N59	M56-N59
TM2	A60-L87	A60-L87
ECL1	I88-H92	I88-H92, P93*, I94*
TM3	P93-I124	S95-I124
ICL2	L125-Y137	L125-Y137
TM4	L138-F163	L138-F163
ECL2	L164-S170	L164-S170, V171*, W172*
TM5	V171-L203	C173-L203
ICL3	C204-L211	C204-L211
TM6	T212-F239	T212-F239
ECL3	S240-K247	S240-K247
TM7	W248-A294	W248-A294
C-terminal	L295-Q322	L295-Q322



**Figure 5** The serpentine graph prediction of MRGPRX3. Purple represents the amino acids in the flexible region, blue represents the amino acids between the flexible region and the rigid region, and yellow represents the amino acids in the rigid region



**Figure 6** Three-dimensional (3D) representation of P93, I94, V171 and W172 in the MRGPRX3 simulated by AlphaFold

疾病的发生和进展过程中扮演着重要的角色。GPCR 是非常重要的药物开发靶点, 研究其结构对药物的研发起着不可替代的作用。

G 蛋白偶联受体又称 7 次跨膜螺旋蛋白, 其结构具有一定的保守性, 本研究利用其结构的特点, 建立了一种能快速预测 GPCRs 结构的方法, 在 pcDNA3.1 质粒上构建 GPCRs 不同位点后插入 NLuc 的质粒, 并通过转染、ELISA 检验及检测其 NLuc 发光值, 通过发光值的大小来判断 NLuc 的插入区域为柔性区域或是刚性区域, 1 周以内则可以预测 GPCRs 的结构。

MRGPRX 家族属于 GPCRs 的一类, 在感觉神经元和免疫细胞上有表达, 近年来作为新型药物靶点受到广泛关注。MRGPRX 家族包括 MRGPRX1、MRGPRX2、RGPRX3、MRGPRX4 四个成员, MRGPRX1 特异性表达在人体的背根神经节中, 能够被抗疟疾药物氯喹和内源性肽段 BAM8-22 激活; MRGPRX2 又称假过敏受体, 在肥大细胞中高表达, 能够被阳离子聚合物 C48/80 和内源性配体 cortistatin-14 所激活, 并且许多临床使用的药物引起的不良反应都与 MRGPRX2 相关; MRGPRX4 已被证实是胆汁淤积性瘙痒的靶点; 而目前对 MRGPRX3 的报道较少, 临床病症不明确且还没有确切的配体, 但 MRGPRX3 在调控人体内各种生理过程中起着不可或缺的作用<sup>[24-29]</sup>。本文通过建立的 NLuc 快速预测 GPCRs 结构的方法, 预测了 MRGPRX3 这一孤儿受体的结构, 为深入解析 MRGPRX3 配体识别及激活机制提供理论基础, 并为靶向痒觉受体 MRGPRX3 的药物开发提供结构依据。

AlphaFold 网站预测了人类 98.5% 的蛋白质结构, 此外还预测大肠杆菌、小鼠等 20 个科研常用生物的蛋白质结构。其预测的结构与实验确定的结构大致相同, 但细节上存在较大偏差。通过将已被解析出来的结构和 AlphaFold 网站预测的结构进行对比发现, AlphaFold 所预测的可信度不高的区域大多为 loop 区域, 然而这个区域往往存在着识别配体或激发下游信号的重要位点。此方法可以为 GPCR 关键位点的确定起到预测的作用, 能够为配体的虚拟筛选提供有效信

息, 为结构药理学提供一定的实验依据。

**作者贡献:** 庄钰铭撰写了论文; 庄钰铭、罗欣、沈思源完成了实验; 庄钰铭、郭璐璐、方国兴分析了实验数据; 杨帆、周玖瑶负责设计本项实验; 全部作者均阅读并参与修改了本文。

**利益冲突:** 本文的作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 60-71.
- [2] Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 147: S46-S55.
- [3] Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 63: 1256-1272.
- [4] Hauser AS, Chavali S, Masuho I, et al. Pharmacogenomics of GPCR drug targets [J]. *Cell*, 2018, 172: 41-54.
- [5] Zhao Q, Wu L, Li J, et al. Research of G-protein coupled receptor related to important human diseases [J]. *China Basic Sci (中国基础科学)*, 2015, 17: 3-8.
- [6] Hutchings CJ. A review of antibody-based therapeutics targeting G protein-coupled receptors: an update [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20: 925-935.
- [7] Slosky LM, Caron MG, Barak LS. Biased allosteric modulators: new frontiers in GPCR drug discovery [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42: 283-299.
- [8] Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, et al. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 829-842.
- [9] Kim S, Malinverni JC, Sliz P, et al. Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine [J]. *Science*, 2007, 317: 961-964.
- [10] Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ, et al. Seven-transmembrane receptors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 639-650.
- [11] Zhang Y, Sun BF, Feng D, et al. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein [J]. *Nature*, 2017, 546: 248-253.
- [12] Ping YQ, Mao C, Xiao P, et al. Structures of the glucocorticoid-bound adhesion receptor GPR97-Go complex [J]. *Nature*, 2021, 589: 620-626.
- [13] Yang F, Guo L, Li Y, et al. Structure, function and pharmacology of human itch receptor complexes [J]. *Nature*, 2021, 600: 164-169.
- [14] Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA *via* SLIC [J]. *Nat Methods*, 2007, 4: 251-256.
- [15] Schneider EH, Seifert R. Sf9 cells: a versatile model system to

- investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 128: 387-418.
- [16] Kozasa T. Purification of G protein subunits from Sf9 insect cells using hexahistidine-tagged alpha and beta gamma subunits [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 237: 21-38.
- [17] Dekevic G, Tasto L, Czermak P, et al. Statistical experimental designs to optimize the transient transfection of HEK 293T cells and determine a transfer criterion from adherent cells to larger-scale cell suspension cultures [J]. *J biotechnol*, 2022, 20: 23-34.
- [18] Backliwal G, Hildinger M, Hasija V, et al. High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99: 721-727.
- [19] Lin YC, Boone M, Meuris L, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4767.
- [20] Li E, Brennan CK, Ramirez A, et al. Macromolecular assembly of bioluminescent protein nanoparticles for enhanced imaging [J]. *Mater Today Bio*, 2022, 8: 100455.
- [21] Petrucci S, Ramón Codina Garcia-Andrade J, Moutsopoulos A, et al. A bioluminescent protein-graphene oxide donor-quencher pair in DNA hybridization assays [J]. *Chempluschem*, 2022, 87: e202200372.
- [22] England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27: 1175-1187.
- [23] Walker JR, Hall MP, Zimprich CA, et al. Highly potent cell-permeable and impermeable NanoLuc luciferase inhibitors [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 1028-1037.
- [24] Han L, Ma C, Liu Q, et al. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 174-182.
- [25] Kaisho Y, Watanabe T, Nakata M, et al. Transgenic rats overexpressing the human MrgX3 gene show cataracts and an abnormal skin phenotype [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330: 653-657.
- [26] Khulan B, Cooper WN, Skinner BM, et al. Periconceptional maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 2086-2101.
- [27] Solleti SK, Bhattacharya S, Ahmad A, et al. MicroRNA expression profiling defines the impact of electronic cigarettes on human airway epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 1081.
- [28] Flegel C, Schöbel N, Altmüller J, et al. RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0128951.
- [29] Kiatsurayanon C, Niyonsaba F, Chieosilapatham P, et al. Ogawa angiogenic peptide (AG)-30/5C activates human keratinocytes to produce cytokines/chemokines and to migrate and proliferate *via* MrgX receptors [J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 83: 190-199.