

小鼠 GPR50 多克隆抗体制备及免疫组化分析

郭 腾, 蔡雯祎, 徐雪莲, 刘晓娜, 兰道亮*

(西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041)

摘 要: G 蛋白偶联受体 50 (GPR50) 定位于细胞膜, 属孤儿 G 蛋白偶联受体家族, 与褪黑素受体具有高度序列相似性。GPR50 的 C 末端可发生水解并转位进入细胞核, 与通用转录因子 TFII-I 等蛋白相互作用, 直接调控约 8 000 个基因的转录, 影响 DNA 损伤应答、细胞周期等生物学过程。本研究综合利用生物信息学与免疫学方法, 针对小鼠 GPR50 蛋白 C 端序列设计抗原肽段, 进而制备其多克隆抗体, 并系统评估该抗体在小鼠细胞系及脑、卵巢、肝等组织中的应用效能。利用生物信息学工具分析小鼠 GPR50 的序列特征、结构组成与进化关系, 筛选潜在优势抗原表位; 合成相应多肽, 以 RTiterFast 佐剂乳化后免疫新西兰兔; 通过 ELISA、Western blot 及免疫组化 (IHC) 对抗体性能进行验证。结果显示, GPR50 蛋白含 591 个氨基酸, 预测分子量约为 65.129 kDa, 理论等电点为 pI 8.92, 整体亲水且性质稳定; 进化分析表明, GPR50 在哺乳动物中保守性较高, 与小鼠亲缘关系最近的是大鼠, 其次为欧旅鼠、人与绵羊, 磷酸化位点多集中于 C 端区域; 所获多克隆抗体效价高于 1:512 000, Western blot 显示清晰且大小相符的特异性条带, 证实抗体识别特异性良好; 在小鼠脑组织中成功检测到 GPR50 的表达与分布定位。结果表明, 研究成功制备了可特异性识别小鼠 GPR50 C 端水解片段和全长的多克隆抗体, 初步验证了其在小鼠脑、卵巢、肝组织及小鼠细胞系中的表达与分布, 为后续深入探究 GPR50 C 端水解切割、核转位过程, 及其在转录调控、代谢稳态、神经精神疾病与肿瘤等领域中的功能机制提供了有价值的实验工具。

关键词: 小鼠; GPR50; 多克隆抗体; 生物信息学; 免疫组化

中图分类号: R392.33

文献标志码: A

文章编号: 2095-4271(2026)05-0488-10

Polyclonal antibody preparation and immunohistochemical analysis of mouse GPR50

Guo Teng, Cai Wenyi, Xu Xuelian, Liu Xiaona, Lan Daoliang*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: G protein-coupled receptor 50 (GPR50), localized to the cell membrane, belongs to the orphan G protein-coupled receptor family and shares high sequence homology with melatonin receptors. The C-terminus of GPR50 can undergo proteolytic cleavage and translocate into the nucleus, where it interacts with the general transcription factor TFII-I and other proteins, directly regulating the transcription of approximately 8 000 genes and influencing biological processes such as DNA damage response and cell cycle. This study combined bioinformatics and immunological approaches to design antigenic peptides targeting the C-terminal sequence of mouse GPR50 for preparing a polyclonal antibody, and systematically evaluated the application efficacy of the obtained antibody in mouse cell lines as well as brain, ovarian, and liver tissues. First, bioinformatics tools were

收稿日期: 2026-03-05

*通信作者, E-mail: landaoliang@163.com

基金项目: 西南民族大学青藏高原研究科技创新团队 (No.2024CXTD02); 西南民族大学双一流学科建设项目 (XM2023020)

引用格式: 郭腾, 蔡雯祎, 徐雪莲, 等. 小鼠 GPR50 多克隆抗体制备及免疫组化分析 [J]. 西南民族大学学报 (自然科学版), 2026, 52 (5): 488-497.

Guo Teng, Cai Wenyi, Xu Xuelian, et al. Polyclonal antibody preparation and immunohistochemical analysis of mouse GPR50 [J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2026, 52(5): 488-497.

employed to analyze the sequence characteristics, structural composition, and evolutionary relationships of mouse GPR50, identifying potential dominant antigenic epitopes. Corresponding peptides were then synthesized, emulsified with RTiterFast adjuvant, and used to immunize New Zealand rabbits. Antibody performance was validated using ELISA, Western blot, and immunohistochemistry (IHC). Results showed that the GPR50 protein consisted of 591 amino acids, with a predicted molecular weight of approximately 65.129 kDa and a theoretical isoelectric point (pI) of 8.92, which was overall hydrophilic and stable in nature. Evolutionary analysis indicated that GPR50 was highly conserved among mammals, with rat having the closest relationship with mouse, followed by *Lemmus lemmus*, human, and sheep. Phosphorylation sites were predominantly clustered in the C-terminal region. The obtained polyclonal antibody exhibited a titer greater than 1:512 000, and Western blot revealed clear, size-specific bands, confirming good antibody specificity. Furthermore, GPR50 expression and localization were successfully detected in mouse brain tissue. This study successfully generated a polyclonal antibody targeting the C-terminus fragment and the full length of mouse GPR50, preliminarily validated its expression and distribution in mouse brain, ovary, liver tissues, and mouse cell lines, and provided a valuable experimental tool for further investigation into the proteolytic cleavage and nuclear translocation of the GPR50 C-terminus, as well as its functional mechanisms in transcriptional regulation, metabolic homeostasis, neuropsychiatric disorders, and tumors.

Keywords: mouse; GPR50; polyclonal antibody; bioinformatics; immunohistochemistry

G 蛋白偶联受体 50(GPR50)是一种与褪黑素受体 MT1 和 MT2 高度同源的孤儿 G 蛋白偶联受体 (GPCR),自其从人垂体 cDNA 文库中被克隆以来,其内源性配体始终未被确定^[1]. 尽管缺乏经典配体, GPR50 绝非功能惰性的分子. 相反,它已成为一个在能量稳态、神经发育、应激反应及多种疾病病理过程中扮演核心角色的关键调节因子^[2-4]. 与经典 GPCR 主要通过 G 蛋白传递信号不同, GPR50 信号机制复杂、功能多面,使其成为跨代谢、神经科学及肿瘤学等多个领域的研究热点.

GPR50 拥有 GPCR 典型的 7 次跨膜结构域,其最显著的特征是一个超过 300 个氨基酸的细胞内羧基末端(C-tail)^[1]. 这个超长的 C 末端是其执行多项关键功能的分子基础. 首先,它是 GPR50 与 MT1 受体形成异源二聚体并拮抗褪黑素信号所必需的结构域^[5];其次,它也是其与转化生长因子- β 受体 I(T β RI)相互作用、从而调节 TGF- β 信号的关键区域^[6]. 研究表明,在钙离子信号等刺激下, GPR50 的 C 末端可被钙依赖性蛋白酶 calpain 特异性切割、释放,随后该切割片段(C-tail fragment)能够转位进入细胞核^[7]. 在核内,它能够与通用转录因子 TFII-I 等蛋白相互作用,直接调控包括 c-fos 在内的约 8 000 个基因的转录,影响诸如 DNA 损伤应答、细胞周期等关键生物学过程^[7]. 此外,该 C 末端还能与组蛋白乙酰转移酶 TIP60 互作,共同调节糖皮质激素受体等核受体的转录活性^[8].

GPR50 深度参与广泛的生理与病理过程. 在能量代谢方面, GPR50 敲除小鼠表现出代谢率升高、抵抗饮食诱导肥胖,并在禁食时易于进入蛰伏样状态,表明它是下丘脑控制能量消耗和体温的关键分子^[4,9-10]. 其基因多态性也与人类血浆甘油三酯和高密度脂蛋白水平相关^[11]. 在神经系统中, GPR50 通过激活 G12/13-RhoA 通路抑制神经突生长^[2],同时又通过调节 Notch 和 Wnt/ β -catenin 信号促进神经祖细胞的自我更新与神经元分化^[3]. 其遗传变异与双相情感障碍、重度抑郁症,特别是女性的季节性情感障碍风险相关联^[12-14]. 在乳腺癌中, GPR50 通过稳定 T β RI 激活 TGF- β 信号,发挥肿瘤抑制功能^[6];而在肝细胞癌中,它则通过上调 ADAM17 激活 Notch 通路,充当驱动肿瘤进展的癌基因^[15-16].

然而,对 GPR50 及其具有关键信号功能的 C 末端切割片段进行深入研究,缺乏有效的检测工具. 特异性、高质量的抗体制备是解析蛋白质表达、定位、相互作用及功能不可或缺的前提^[17]. 尽管已有商业抗体或针对其他表位的抗体被使用,但尚未有能够特异性识别并追踪 GPR50 C 末端切割片段的工具. 开发一种能够特异性识别该区域的抗体,不仅能用于检测全长 GPR50 蛋白,更能作为特异性探针,在复杂的生物样本中鉴别、定位并定量由钙蛋白酶切割产生的 C 末端片段,从而动态监测相关信号通路的激活状态.

本研究旨在制备并系统验证一种针对小鼠 GPR50

蛋白胞内 C 末端序列的兔源多克隆抗体. 通过生物信息学分析选定免疫原多肽序列, 合成多肽后免疫新西兰白兔获得抗血清, 随后通过蛋白质印迹 (Western blot)、免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 等实验全面评估了该抗体的特异性、灵敏度及应用效能. 本研究所制备的抗体, 不仅为小鼠 GPR50 全长蛋白的研究提供了新的工具, 更为深入探究 GPR50 C 末端蛋白水解切割、核转位及其在基因转录调控、代谢稳态、神经精神疾病以及癌症等众多领域中的具体功能机制, 提供了强有力的研究工具.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

抗原多肽的合成由普健生物(武汉)科技有限公司完成; RTiterFast 佐剂(普健生物(武汉)科技有限公司); TMB 显色液、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、脱脂奶粉、HRP 标记山羊抗兔 IgG、GAPDH 抗体、SABC-HRP 试剂盒、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司); ECL 化学

发光试剂盒(BIO-RAD); 多聚甲醛固定液(biosharp).

1.2 主要仪器

酶标仪(BIO-RAD); NanoDrop One/One[®] 微量紫外-可见分光光度计(Thermo Fisher); 垂直电泳转印系统(BIO-RAD); 智能凝胶化学发光成像系统(Thermo Fisher).

1.3 实验动物

选用 2.0~2.5 kg 的 75 日龄健康雌性新西兰大白兔, 在西南民族大学畜牧兽医学院动物实验设施内进行单笼饲养与适应性观察. 相关过程符合动物保护和动物福利的要求.

1.4 生物信息学分析

系统发育分析首先通过 NCBI 的 Ortholog 功能检索了多个物种的 GPR50 序列(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=GPR50>), 选择小鼠、人、大鼠、绵羊、西伯利亚仓鼠、牦牛、鸭嘴兽等共计 43 个物种, 使用 MEGA 软件对每个物种的代表性氨基酸序列进行比对并以邻接法构建系统进化树. 针对 GPR50 蛋白的氨基酸序列、结构及抗原表位进行分析所使用的在线工具与软件详见表 1.

表 1 生物信息学分析软件

Table 1 Software for bioinformatics analysis

软件/网站名称	网址	功能
MEGA	https://www.megasoftware.net	系统进化树构建
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	理化性质分析
ProtScale	https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl	亲水性疏水性分析
TMHMM-2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	蛋白跨膜结构分析
SignalP-6.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0	信号肽预测
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.html	二级结构分析
SWISS MODEL	https://swissmodel.expasy.org	三级结构分析
NetnGlyc 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/netnGlyc	糖基化位点分析
NetPhos 3.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/netPhos	磷酸化位点分析
NovoFocus	https://www.novopro.cn/tools/peptide-antigen-design.html	多肽抗原设计
DNASar	https://www.dnastar.com/software/	抗原表位预测

1.5 多肽合成与免疫程序

基于 NCBI 数据库中小鼠 GPR50 的蛋白序列(登录号 NP_034470.1), 进行抗原肽段的设计. 将该序列提交至在线多肽抗原设计平台 NovoFocus, 在默认参数设置下, 获得了多个潜在抗原表位的评分与序列推荐. 结合 DNASar Protean 软件对蛋白质结构的预测

分析, 从评分较高的候选中筛选出位于蛋白 N 端和 C 端区域的代表性肽段各一条, 分别为 2~21 aa(20 个氨基酸)与 571~585 aa(15 个氨基酸). 将两条选定肽段交由普健生物(武汉)科技有限公司完成化学合成, 均与血蓝蛋白(KLH)进行偶联.

首次免疫使用 0.5 mg 多肽溶于 300 μ L PBS, 与

100 μL RTiterFast 兔用快速佐剂混合. 第7、14、21 d 加强免疫时多肽剂量为0.25 mg, 溶剂与佐剂配比同前. 每次免疫前剃毛并消毒兔背部与腹股沟区域, 将约400 μL 乳剂分数个点皮下注射. 末次免疫1周后经心穿刺或颈动脉采血, 全血37 $^{\circ}\text{C}$ 静置1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后离心获取抗血清, 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用.

1.6 抗血清效价检测

将抗原肽-BSA 偶联物用包被缓冲液稀释至3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入96孔板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被. 弃液后, 每孔用300 μL 洗涤缓冲液清洗3次(每次静置30 s). 加入200 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h, 再次洗涤3次. 将免疫后抗血清与免疫前血清(阴性对照)进行倍比稀释, 各取100 μL 加入对应孔中, 每个稀释度设复孔, 同步设置空白对照孔, 并于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育60 min. 使用洗涤液进行5次充分洗涤, 随后向各孔中加入按1:5 000稀释度配制的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1 h, 洗涤5次. 每孔加入100 μL TMB底物, 室温避光显色10~15 min, 待阳性孔明显变蓝而空白孔无色时, 加入50 μL 2M H_2SO_4 终止反应, 立即于450 nm测定吸光度, 并计算各稀释度下样品与阴性对照的比值.

1.7 抗血清特异性验证

取小鼠脑组织、卵巢及肝样本, 并收集PGK12.1、NIH3T3、GC-1与GC-2细胞系, 样品采用含2%蛋白酶抑制剂和2%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液, 在冰上裂解30 min, 裂解后12 000 r/min离心5 min, 收集上清, 并依比例添加5 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 置于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热10 min, 进行SDS-PAGE分析: 初始电压设置为80 V, 电泳20 min; 将电压提升至120 V, 继续电泳约60 min; 用湿转法在260 mA恒定电流下转膜60 min, 转膜后的NC膜用5%脱脂牛奶室温封闭2 h, PBST缓冲液洗涤3次, 每次10 min. 把制备的抗血清按1:1 500比例用5%脱脂牛奶稀释, 抗GAPDH抗体以1:1 000稀释作为内参, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育8 h, 用PBST清洗, 加入按1:10 000稀释的HRP标记山羊抗兔IgG二抗, 在室温条件下孵育50 min. 经再次洗涤后, 采用ECL化学发光底物进行显影, 最后通过凝胶成像系统采集并保存图像结果.

1.8 免疫组化检测

采用SABC法开展免疫组化染色. 取小鼠大脑组

织经4%多聚甲醛固定48 h后, 依次进行梯度酒精脱水、二甲苯透明及石蜡包埋, 制备5 μm 厚切片. 切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精复水后, 用3% H_2O_2 室温避光孵育10 min以灭活内源酶. 蒸馏水漂洗后, 置于0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液中微波修复抗原, 自然冷却后PBS清洗. 以5% BSA室温封闭50 min, 随后滴加1:400稀释抗血清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜. PBS洗涤后依次加入生物素化二抗(37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min)及SABC复合物(37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min), PBS充分洗涤后使用DAB显色约60 s. 蒸馏水浸洗后苏木素复染, 流水冲洗, 常规脱水透明, 中性树胶封片. 以PBS替代一抗作为阴性对照, 显微镜下观察结果.

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析结果

2.1.1 进化树构建

结果如图1显示(图中红框处为小鼠GPR50蛋白序列), 该系统进化树分为3个主要进化分支: 第1分支由鸟类序列组成, 表明GPR50在鸟类中具有高度的序列保守性; 第2分支包含哺乳动物的褪黑素受体1A(MT1)和1B(MT2), 其中大鼠与小鼠GPR50亲缘关系最近, 其次是欧旅鼠、人、绵羊, 显示其跨物种的功能保守性; 第3分支以鸭嘴兽的褪黑素受体1C(Mel1c)为代表, 它印证了GPR50从有功能的Mel1c受体演化而来^[18]的进化路径.

2.1.2 理化性质分析

对小鼠GPR50蛋白的理化特性进行分析得出, 该蛋白中带负电的氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)占比为6.8%, 而带正电的氨基酸(精氨酸和赖氨酸)占8.9%. 小鼠GPR50的总原子数为9 193, 预测等电点(pI)为8.92, 分子量约为65.129 kDa. 此外, 该蛋白的不稳定性指数计算值为26.56, 说明小鼠GPR50在结构中属于稳定蛋白.

2.1.3 亲水性/疏水性分析

蛋白质三级结构的稳定主要由疏水作用维持. 采用ExPASy-ProtScale工具对小鼠GPR50氨基酸序列进行亲疏水性评估, 结果见图2, 正值代表疏水性, 负值代表亲水性. 分析显示, 第251位的苯丙氨酸(Phe)疏水性最高, 其值为3.411; 而第355位的精氨酸(Arg)亲水性最强, 对应值为-2.978.

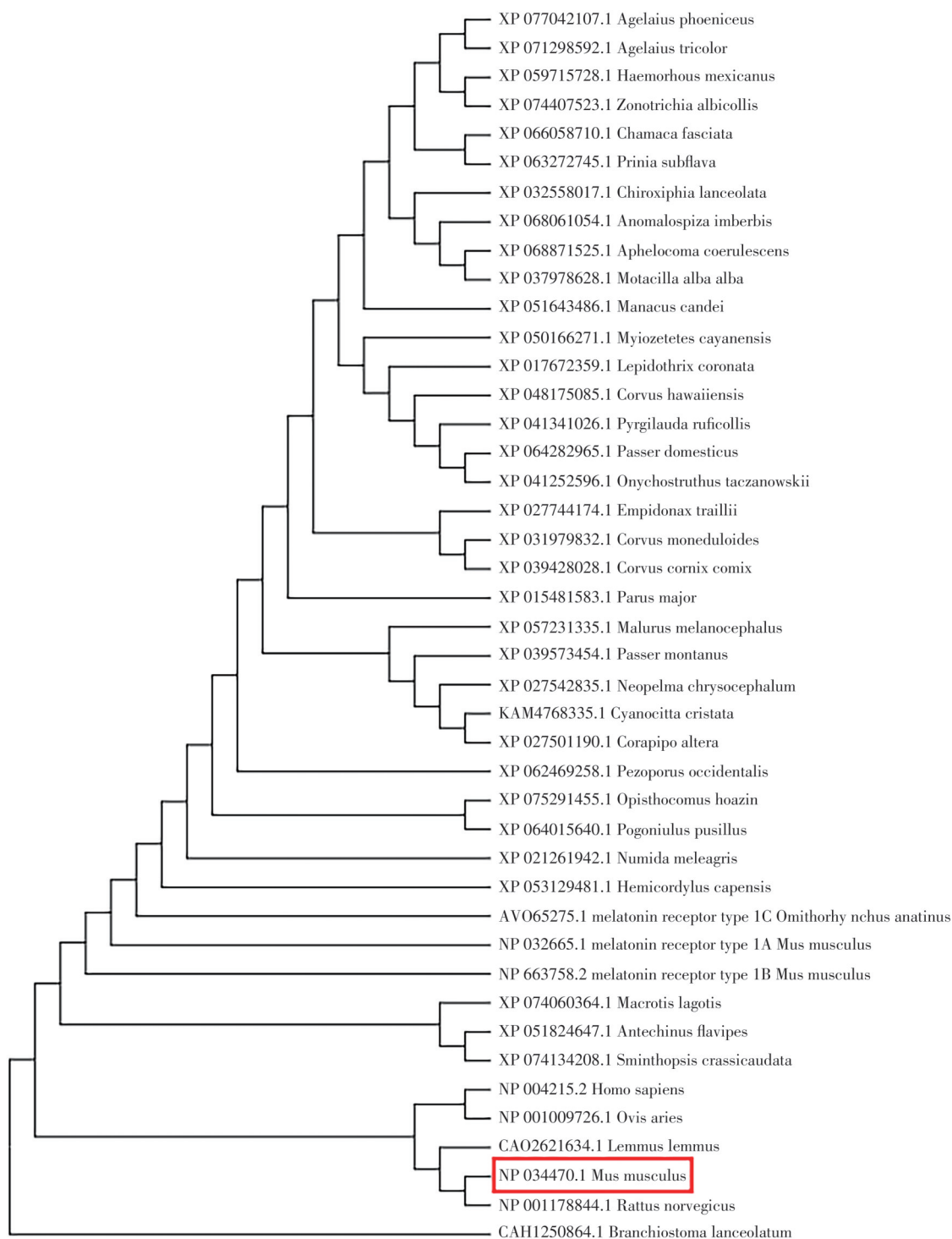


图1 GPR50 系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of GPR50

2.1.4 跨膜结构、信号肽预测

亚细胞定位的预测结果表明(图3),小鼠 GPR50 蛋白拥有 7 个跨膜区,分别位于第 39~59、73~93、112~132、152~172、197~217、248~268、282~302 位氨基酸,

这与 G 蛋白偶联受体超级家族的形态特征一致,且该蛋白拥有一个长达 289 个氨基酸的细胞膜内 C 端长链结构. 小鼠 GPR50 蛋白未检测到信号肽(图4),这也符合 G 蛋白偶联受体超家族的典型结构特征.

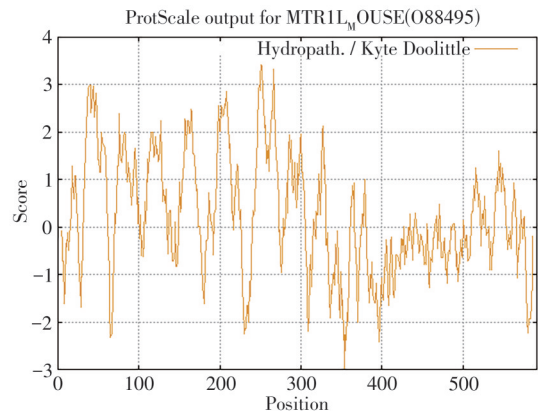


图2 小鼠 GPR50 蛋白的疏水性/亲水性预测结果

Fig.2 Prediction of hydrophobicity/hydrophilicity for mouse GPR50 protein

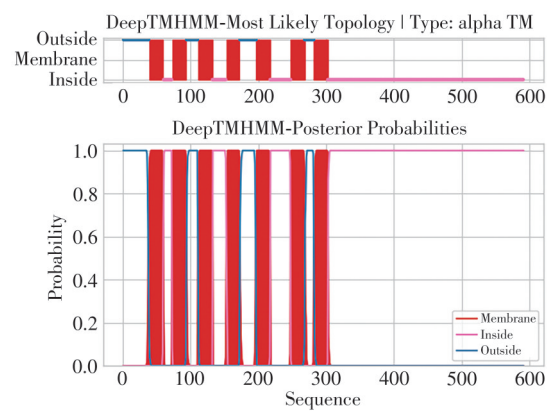


图3 小鼠 GPR50 蛋白的跨膜结构预测

Fig.3 Prediction of the transmembrane structure of mouse GPR50 protein

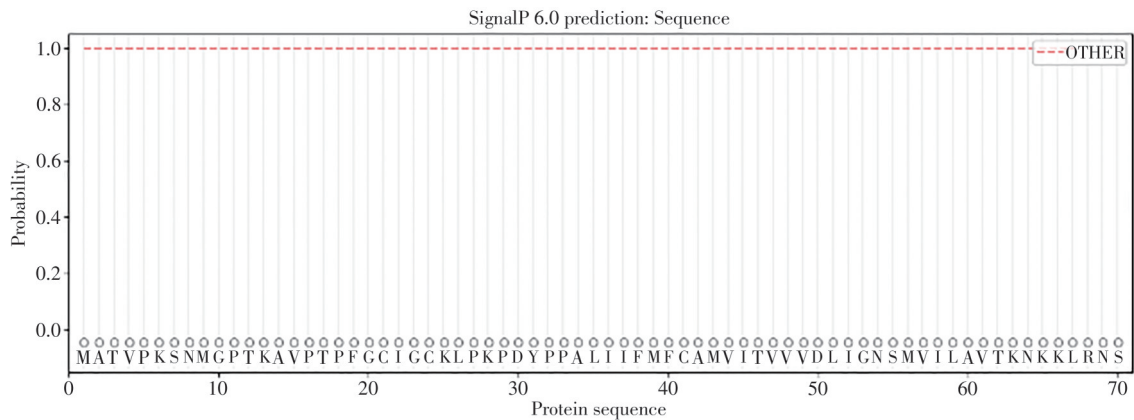


图4 小鼠 GPR50 蛋白信号肽预测结果

Fig.4 Prediction results of signal peptide for mouse GPR50 protein

2.1.5 蛋白质结构分析

蛋白质二级结构体现了多肽链中沿主轴方向规律性排列的周期性空间构象。采用 SOPMA 在线工具对小鼠 GPR50 进行分析(图 5),预测其二级结构组成为 α -螺旋(h)占 27.75%,无规卷曲(c)占 61.08%,未发现 β -转角(t),其余部分被归类

为延伸链。进一步通过 SWISS-MODEL 平台对其三级结构进行建模,所获得的最优模型结构显示(图 6),该蛋白以单体形式存在;模型可靠性评估指标 Qmean 得分与 GMQE(全局模型质量估计)值分别为 0.81 和 0.77,表明所建三级结构模型质量良好。

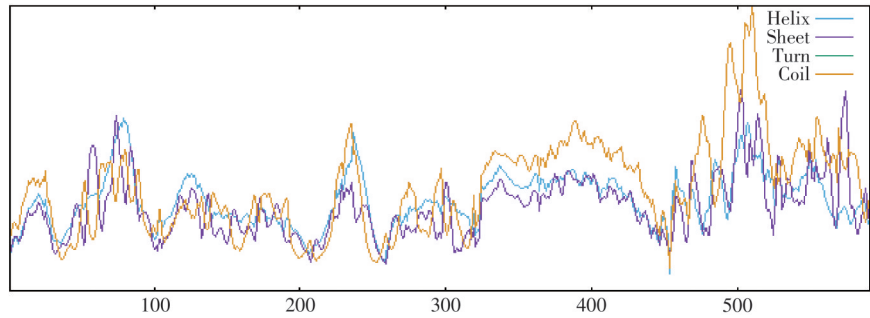


图5 小鼠 GPR50 蛋白二级结构

Fig.5 Secondary structure of mouse GPR50 protein

注:图中蓝色线条表示 α -螺旋(alpha helix);紫色线条表示 β -折叠(beta sheet);黄色线条表示无规则卷曲(random coil)

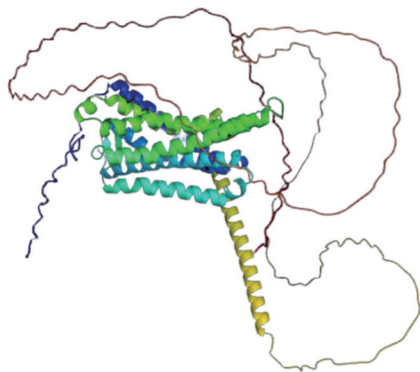


图6 小鼠GPR50蛋白三级结构

Fig.6 Tertiary structure of mouse GPR50 protein

2.1.6 糖基化和磷酸化位点预测

糖基化位点预测结果显示(图7),小鼠GPR50蛋白共含有2个N-糖基化位点,分别位于第126和306位氨基酸.磷酸化位点预测结果显示(图8),小鼠GPR50磷酸化位点以丝氨酸为主(39个),其次为苏氨酸(22个)、酪氨酸(8个),3种磷酸化位点均在C端密集分布.

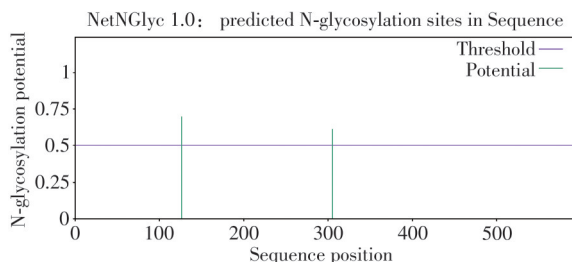


图7 小鼠GPR50蛋白的N-糖基化位点

Fig.7 N-glycosylation sites of mouse GPR50 protein

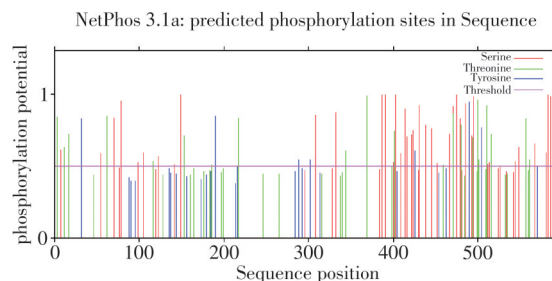


图8 小鼠GPR50蛋白的磷酸化位点

Fig.8 Phosphorylation sites of mouse GPR50 protein

2.2 抗原表位预测

抗原表位的确定依据NovoFocus平台的多肽评分与DNASTar软件的抗原指数预测.从中筛选出N端与C端评分最高的肽段,其在GPR50序列中的位置分别为2~21 aa与571~585 aa,并对应命名为N1与C2. DNASTar的预测结果显示(图9),N1与C2肽段的抗原指数均处于较高水平,且其位置与预测的蛋白质柔性区域彼此重叠.

2.3 抗血清效价检测结果

采用间接ELISA法测定抗血清效价(图10).以稀释后样品 OD_{450} 值与阴性对照比值 ≥ 2.1 为阳性标准.当抗血清稀释至1:512 000时,其 OD_{450} 值仍高于阴性对照2.1倍以上,表明本研究制备的针对小鼠GPR50 N1与C2两段多肽抗原的抗血清的效价均大于1:512 000.

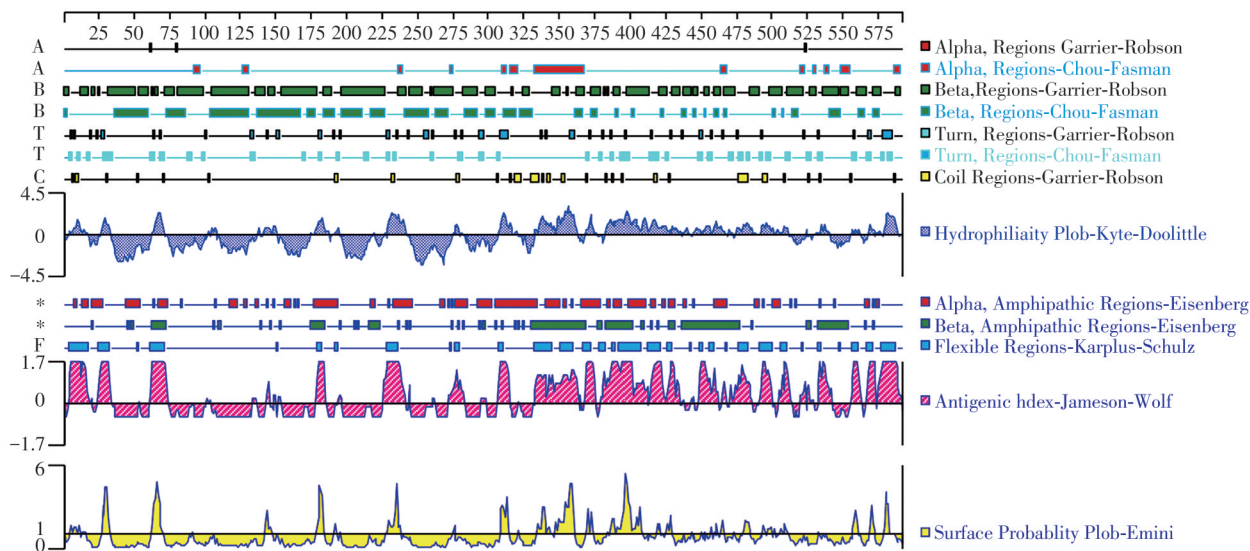
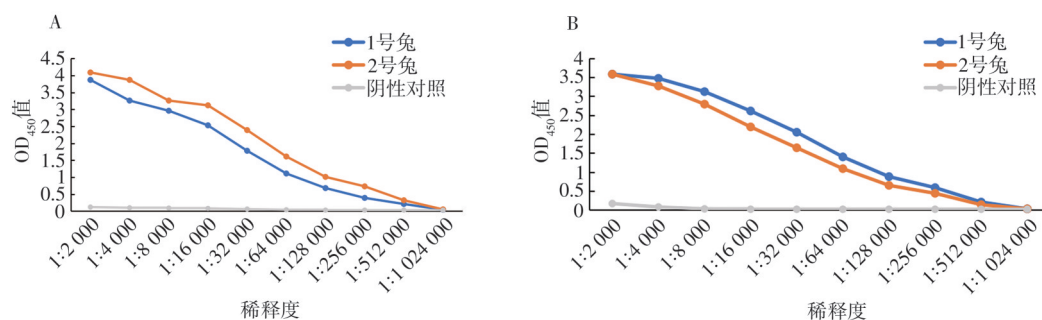


图9 小鼠GPR50蛋白序列结构与抗原表位分析

Fig.9 Analysis of mouse GPR50 protein sequence structure and antigenic epitopes



A. N1多肽抗血清效价;B. C2多肽抗血清效价

图10 小鼠GPR50兔源抗血清效价

Fig.10 Titer of mouse GPR50 rabbit antiserum

2.4 Western blot 验证抗血清特异性

Western blot检测采用GPR50 C2抗血清作为一抗,结果显示(图11),在约65 kDa位置出现一条特异性条带,该大小与小鼠GPR50蛋白单体的分子量一致,另外

在约33 kDa处有一明显条带,对应于小鼠GPR50蛋白裂解后C端片段的大小,此两种条带均说明该抗血清能够与GPR50蛋白特异性结合.七种蛋白样品均显示出相似的结果.由于是多抗,结果显示存在非特异性条带.

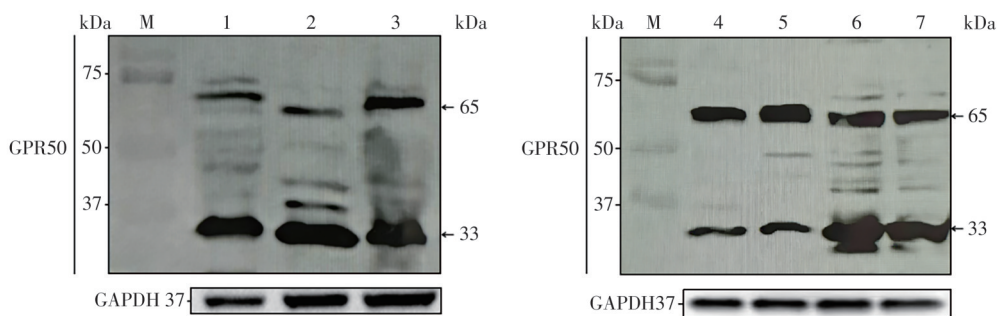


图11 小鼠GPR50兔源抗体 Western blot 结果

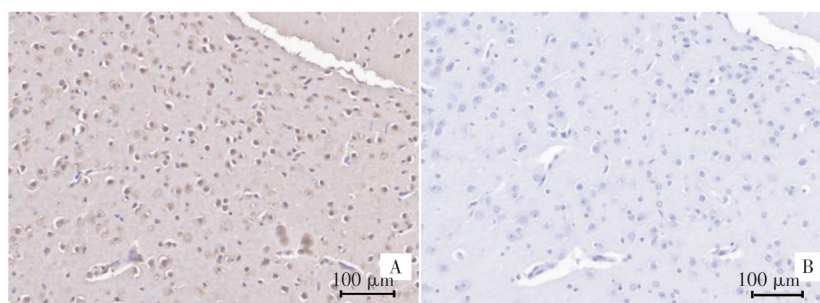
Fig.11 Western blot results of mouse GPR50 using rabbit-derived antibody

注:M. Marker;1. 小鼠脑样品;2. 小鼠卵巢样品;3. 小鼠肝样品;4. 小鼠PGK12.1细胞样品;5. 小鼠NIH/3T3细胞样品;6. 小鼠GC-1 (spg)细胞样品;7. 小鼠GC-2 spd(ts)细胞样品. 内参蛋白GAPDH大小约为37 kDa

2.5 免疫组化检测结果

取小鼠大脑组织固定包埋制作石蜡切片,使用GPR50 C2抗血清作为一抗进行免疫组化检测,结果(图12)表明在大脑组织切片中,多数细胞

的细胞核着色较深,细胞膜也有明显着色,此结果与GPR50的膜定位以及胞内C末端水解入核现象^[7]一致,说明GPR50 C2抗血清可用于免疫组化实验.



A. 试验组,使用GPR50 C2抗血清作为一抗;B. PBS阴性对照

图12 GPR50小鼠大脑切片免疫组化结果

Fig.12 Immunohistochemistry results of GPR50 in mouse brain sections

3 讨论

GPR50作为一种重要的细胞膜受体,其氨基酸序列(尤其是跨膜区)在哺乳动物中高度保守,这一进化特征与文献报道一致,即 GPR50 是哺乳动物褪黑素受体 1c (Mel1c)的直系同源物,在进化中虽因关键氨基酸突变失去了对褪黑素的高亲和力结合能力,目前为未鉴定到内源性配体的孤儿 GPCR,但其 GPCR 家族典型的核心跨膜结构域得以完整保留^[19]. 鉴于 C 末端序列在进化中比跨膜区变异更显著^[20],直接使用人源 GPR50 C 末端抗体检测小鼠蛋白的效果有限. 为此,本研究选取小鼠 GPR50 C 末端的免疫原性区段制备特异性抗体,为小鼠 GPR50 及其 C 末端功能研究提供了适用的检测工具.

亚细胞定位预测结果显示小鼠 GPR50 蛋白拥有 7 个跨膜区,同时拥有一个 C 端长链结构,这不仅符合 G 蛋白偶联受体超家族的典型结构特征,也表明小鼠 GPR50 与人源 GPR50 结构^[17]高度相似. 疏水的跨膜区序列多包埋于细胞膜磷脂双分子层中,易出现表位遮蔽,难以产生能识别天然蛋白的有效抗体,而本研究选取的 571-585 aa 亲水氨基酸序列容易暴露于蛋白天然构象的表面,能有效被免疫细胞的抗原呈递系统识别,从而激发更强的特异性免疫应答. 此外,通过 NovoFocus 平台与 DNASTar 软件联合预测筛选出的 571-585 aa 肽段具有以下理想抗原表位的特征:位于胞内 C 端,无跨膜结构;二级结构以无规卷曲为主,处于高柔性区域;抗原指数处于全序列较高水平,且与其他蛋白无同源序列,可有效避免非特异性结合;位于 C 末端,无密集糖基化修饰位点,不易出现翻译后修饰导致的表位遮蔽.

据文献报道,GPR50 蛋白的 C 末端并非惰性结构,它在 GPR50 执行多项关键功能中发挥着重要作用^[1]. 首先,它是 GPR50 与 MT1 受体异源二聚化并抑制褪黑素信号所必需的区域^[5]. 其次,它也是其与 T β RI 相互作用、调控 TGF- β 信号的关键界面^[6]. 有研究表明,钙蛋白酶(calpain)在靠近 C 末端的位置(如人 GPR50 的 Phe408/Ser409 之间)进行切割,释放出的 C 末端片段(tCTD)可转位入核,直接调控约 8 000 个基因的转录^[7]. 本抗体所识别的 571-585 aa 表位位于此切割产物的末端. 因此,该抗体不仅能识别全长 GPR50,更能特异性捕捉到经切割产生的 C 末端片段,这使得本抗体成为一个能动态监测 GPR50 蛋白水解切割及核转位信号事件的特异性探针.

Western blot 结果显示,在小鼠脑、卵巢、肝组织和 PGK12.1、NIH/3T3、GC-1(spg)、GC-2 spd(ts)细胞样品中均检测到 GPR50 蛋白全长(~65 kDa)的主条带,与生物信息学预测的分子量相符,证明了抗体的特异性. 另外,在多个样品中,~33 kDa 处的条带持续出现,对应于 GPR50 的 C 末端切割片段. 这与 GPR50 存在组成性的或受调控的蛋白水解加工过程^[7]的报道相符. 在脑、卵巢、肝组织中,该片段丰度更高,这与钙蛋白酶在上述组织中呈组成性高表达、具有稳定基础活性的报道一致^[21]. 本研究使用的是未纯化的多克隆抗血清,Western blot 结果中出现的其余杂带,主要为多抗固有的非特异性条带. 磷酸化预测显示 C 末端有大量潜在位点,不同修饰状态可使电泳迁移率发生微小变化,因此可能导致主条带略显弥散.

Western blot 与免疫组化结果证实 GPR50 在小鼠大脑、卵巢、肝等组织中均有表达,这与文献报道的广泛分布一致^[22]. 细胞膜的阳性信号符合 GPR50 作为跨膜 GPCR 的经典定位,而细胞核的强着色则与 GPR50 C 端片段切割后转位入核的现象^[7]相匹配,进一步证实该抗体可有效识别 GPR50 全长蛋白与 C 端切割片段. 据报道,GPR50 在下丘脑区域的表达,关联于 GPR50 在能量稳态和体温调节中的核心作用,即敲除小鼠表现为代谢亢进和蛰伏倾向^[4,10];在皮层和海马的表达,则与其调控神经突生长和神经祖细胞分化的功能相关^[2-3],并提示其在情感障碍(如与抑郁症、双相情感障碍的遗传关联^[12-13])中的潜在功能;GPR50 在肝生理状态下的表达可能与代谢调节有关,而在肝癌中的异常高表达则与促癌作用相关^[15-16]. 因此,本抗体为在这些关键组织中精细定位 GPR50 蛋白、比较其在生理与病理状态下的表达量及细胞内分布变化提供了可靠手段.

抗原表位是抗原分子上能被免疫细胞特异性辨识与结合的关键区域,其性质直接决定了所产生抗体的应用效果. 将合成的较短多肽作为抗原有助于规避因蛋白质高级结构导致的表位遮蔽问题,促使 B 淋巴细胞聚焦于该线性序列产生应答,这有助于提升抗体的靶向特异性,减少非特异性背景信号. 本研究基于生物信息学工具筛选小鼠 GPR50 蛋白的潜在抗原表位,据此合成相应多肽并免疫动物制备抗血清. 酶联免疫吸附测定显示抗血清效价良好,表明所用抗原肽具有较强的免疫原性. 蛋白质免疫印迹和免疫组织化学实验进一步证实了该抗血清的特异性识别能力. 不过,免疫印迹结果

中背景信号偏高,这主要源于多克隆抗体的固有性质,同时未纯化的抗血清及封闭条件等因素也可能对此有所影响;而杂带的出现,则可能由于样本中存在局部序列相似的其他蛋白,这些方面仍需后续实验优化。

4 结论

本研究依托抗原表位预测设计并合成了免疫多肽,成功制备了针对小鼠 GPR50 C 末端的高效价、特异性多克隆抗体,为今后小鼠 GPR50 的蛋白水平研究提供了重要的实验基础,更为深入探究 GPR50 C 末端蛋白水解切割、核转位及其具体功能机制提供了特异性工具。

参考文献

- [1] Reppert S M, Weaver D R, Ebisawa T, et al. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary[J]. *FEBS Letters*, 1996, 386(2-3): 219-224.
- [2] Ahmad R, Luka M, Journe A S, et al. Orphan GPR50 restrains neurite outgrowth and cell migration by activating the G12/13 protein-RhoA pathway in neural progenitor cells and tanycytes[J]. *Journal of Pineal Research*, 2025, 77(2): e70041.
- [3] Ma Y X, Wu Z Q, Feng Y J, et al. G protein coupled receptor 50 promotes self-renewal and neuronal differentiation of embryonic neural progenitor cells through regulation of Notch and Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 458(4): 836-842.
- [4] Bechtold D A, Sidibe A, Saer B R C, et al. A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor[J]. *Current Biology*, 2012, 22(1): 70-77.
- [5] Levoe A, Dam J, Ayoub M A, et al. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization[J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25(13): 3012-3023.
- [6] Wojciech S, Ahmad R, Belaid-Choucair Z, et al. The orphan GPR50 receptor promotes constitutive TGF β receptor signaling and protects against cancer development[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1216.
- [7] Ahmad R, Lahuna O, Sidibe A, et al. GPR50-Ctail cleavage and nuclear translocation: A new signal transduction mode for G protein-coupled receptors[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(24): 5189-5205.
- [8] Li J, Hand L E, Meng Q J, et al. GPR50 interacts with TIP60 to modulate glucocorticoid receptor signalling[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23725.
- [9] Hand L E, Saer B R C, Hui S T, et al. Induction of the metabolic regulator txnlp in fasting-induced and natural torpor[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(6): 2081-2091.
- [10] Ivanova E A, Bechtold D A, Dupré S M, et al. Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2008, 294(1): E176-E182.
- [11] Bhattacharyya S, Luan J A, Challis B, et al. Sequence variants in the melatonin-related receptor gene (GPR50) associate with circulating triglyceride and HDL levels[J]. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(4): 761-766.
- [12] Delavest M, Even C, Benjema N, et al. Association of the intronic rs2072621 polymorphism of the X-linked GPR50 gene with affective disorder with seasonal pattern[J]. *European Psychiatry*, 2012, 27(5): 369-371.
- [13] Macintyre D J, Mcghee K A, Maclean A W, et al. Association of GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor, and affective disorder in an independent sample of the Scottish population[J]. *Neuroscience Letters*, 2010, 475(3): 169-173.
- [14] Thomson P A, Wray N R, Thomson A M, et al. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor[J]. *Molecular Psychiatry*, 2005, 10(5): 470-478.
- [15] Zhao W M, Xi L L, Yu G Y, et al. High expression of GPR50 promotes the proliferation, migration and autophagy of hepatocellular carcinoma cells in vitro[J]. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2023, 17(4): 1435-1447.
- [16] Saha S K, Choi H Y, Yang G M, et al. GPR50 promotes hepatocellular carcinoma progression via the Notch signaling pathway through direct interaction with ADAM17[J]. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2020, 17: 332-349.
- [17] Hamouda H O, Chen P, Levoe A, et al. Detection of the human GPR50 orphan seven transmembrane protein by polyclonal antibodies mapping different epitopes [J]. *Journal of Pineal Research*, 2007, 43(1): 10-15.
- [18] Gautier C, Guenin S P, Riest-Fery I, et al. Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*)[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0191904.
- [19] Dufourny L, Levasseur A, Migaud M, et al. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: Evidence of rapid evolution in mammals[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 105.
- [20] Zhang Y, Li H Q, Yao Y F, et al. Uneven evolutionary rate of the melatonin-related receptor gene (GPR50) in Primates[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 680-690.
- [21] Goll D E, Thompson V F, Li H Q, et al. The calpain system[J]. *Physiological Reviews*, 2003, 83(3): 731-801.
- [22] Batailler M, Mullier A, Sidibe A, et al. Neuroanatomical distribution of the orphan GPR50 receptor in adult sheep and rodent brains [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2012, 24(5): 798-808.

(责任编辑:和力新,殷锋,付强,张阳,肖丽;英文编辑:郑玉才,周序林)