

# 保守的第 52 位色氨酸突变引起的胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段活性丧失

高蔚丰, 王娟

宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021

高蔚丰, 王娟. 保守的第 52 位色氨酸突变引起的胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段活性丧失. 生物工程学报, 2013, 29(1): 87-94.

Gao WF, Wang J. Conserved W<sup>52</sup> led to reduced binding of glucagon-like peptide 1 receptor. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 87-94.

**摘 要:** 通过易错 PCR 方法建立了一个鼠肺不同长度的 nGLP-1R (从第 21 个氨基酸开始到第 145 个氨基酸) 的噬菌体随机突变展示文库, 通过噬菌体表面展示技术检测胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段 (nGLP-1R) 在缺失一段或两段基因后是否还具有结合 Exendin-4 的活性。经 ELISA 分析发现了一株无结合活性的突变株, 命名为 EP16。经测序比对, 发现 EP16 缺失了前 20 个和后 10 个氨基酸, 且第 52 位色氨酸突变为精氨酸。为确定 EP16 与 Exendin-4 无结合活性的原因, 重新构建了无前 20 个和后 10 个氨基酸的 EP16 野生型及第 52 位色氨酸突变为精氨酸的全长 nGLP-1R<sup>W52R</sup> 与 EP16 进行对比分析。结果表明, EP16 的活性丧失是由保守的第 52 位色氨酸突变为精氨酸引起的, 缺失的前 20 个和后 10 个氨基酸没有影响其生物学活性。关键位点单个氨基酸残基的突变可以改变胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段整个蛋白质的生物学活性。

**关键词:** 胰高血糖素样肽 1 受体, Exendin-4, 易错 PCR

## Conserved W<sup>52</sup> led to reduced binding of glucagon-like peptide 1 receptor

Weifeng Gao, and Juan Wang

School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

**Abstract:** Through phage display, we tried to find out whether the N-terminal fragment of glucagon-like peptide 1 receptor (nGLP-1R) still had binding activity to Exendin-4 after missing one or two gene segments. By error-prone PCR,

**Received:** August 15, 2012; **Accepted:** December 5, 2012

**Supported by:** Science Research Program of Ningxia Institution of Higher Education (2010).

**Corresponding author:** Weifeng Gao. Tel: +86-951-3976261; E-mail: stephanie.wf@163.com

宁夏高等学校科学研究项目 (2010 年度) 资助。

We constructed a randomly mutated phage display peptide library with different length of the N-terminal (21-145 residues) extracellular domain of glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) from rat lung. A mutant named EP16 without binding activity was found by ELISA. Through sequence alignment we found that EP16 missed the first 20 and last 10 amino acids and the 52<sup>nd</sup> tryptophan was mutated to arginine. In order to determine why Ep16 did not show its binding ability to Exendin-4, a wild type EP16 without the first 20 and last 10 amino acids and nGLP-1R<sup>W52R</sup> was constructed in which the 52<sup>nd</sup> tryptophan was mutated to arginine. The contrastive analysis showed that the substitution of W<sup>52</sup>R led to a markedly reduced binding ability of EP16. The mutation of the conserved W<sup>52</sup> could change the biologic activity of the protein. The lack of the first 20 and last 10 amino acids had no effect on its biologic activity. Therefore, the mutation of a single amino acid residue of the key sequence could change the biologic activity of the nGLP-1R.

**Keywords:** glucagon-like peptide 1 receptor, exendin-4, error-prone PCR

胰高血糖素样肽 1 受体 (Glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R) 是 Drucher 等于 1987 年在大鼠胰岛瘤细胞 RIN1046-38 中发现, 属于 G 蛋白耦联受体 B 家族中的胰高血糖素样受体亚家族<sup>[1]</sup>。该亚家族最明显的特征是具有相对较长的胞外 N 端序列, 通过 3 对二硫键形成一个球状结构域, 该区域在配体结合过程中起着关键作用<sup>[1-2]</sup>。胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段 (nGLP-1R) 中形成 3 对二硫键的 6 个半胱氨酸是高度保守的。Aruna Bazarsuren 等发现, 3 对二硫键分别是由 C<sup>46</sup> 与 C<sup>71</sup>、C<sup>62</sup> 与 C<sup>104</sup>、以及 C<sup>85</sup> 与 C<sup>126</sup> 形成<sup>[3]</sup>。还有文献报道, nGLP-1R 的 6 个色氨酸中, W<sup>72</sup> 和 W<sup>110</sup> 在 G 蛋白耦联受体家族中是高度保守的<sup>[4]</sup>, 将 W<sup>39</sup>、W<sup>72</sup>、W<sup>91</sup>、W<sup>110</sup>、W<sup>120</sup> 分别突变为丙氨酸 (A) 后, 这些突变体都失去了与 GLP-1 结合的能力。但相反的是, 将受体上的 W<sup>87</sup> 突变为丙氨酸后, 该突变体具有和野生型相同的亲和能力, 其介导的信号转导也很相似<sup>[5-6]</sup>。

肠促胰岛素类似物 (Exendin-4) 的结构与功能与胰高血糖素样肽 1 (Glucagon-like peptide 1, GLP-1) 相似<sup>[7-12]</sup> (与 GLP-1 有 53% 的氨基酸序列一致性), 都是通过其中心域和 C 末端与

GLP-1R 上的 N 末端域之间的相互作用实现其与 GLP-1R 的结合<sup>[13-14]</sup>。GLP-1 与胰岛素分泌和糖代谢调节密切相关<sup>[15]</sup>, 对 GLP-1R 结构和信号传导机制的研究有助于了解其在糖尿病病理进程中的作用, 可望为糖尿病的治疗提供新的方向<sup>[16-21]</sup>。目前, 很多研究集中在配体<sup>[22-24]</sup>及受体片段与 GLP-1 结合位点的研究<sup>[25]</sup>及受体胞内跨膜结构的研究上<sup>[26]</sup>。Exendin-4 与 nGLP-1R 的结合能力比 GLP-1 更强<sup>[13]</sup>, 其结合位点存在差异。考虑到对 nGLP-1R 与 Exendin-4 的结合位点的不可知性, 采用易错 PCR (Error-prone PCR, epPCR) 方法建立了一个鼠肺的不同长度 nGLP-1R (从受体 N 端的第 21 个氨基酸开始到第 145 个氨基酸) 的噬菌体随机突变展示肽库, 然后利用 Exendin-4 筛选, 以此来判断是否某一段基因或两段基因的缺失会影响到 nGLP-1R 与 Exendin-4 结合的活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株大肠杆菌 *E. coli* XL1-Blue、辅助噬菌体 VSCM13 和噬菌粒 Pfuse5 为西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室保存; 质粒

pET-28a(+)-GLP-1R 为华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室自行构建; Exendin-4 为华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室自行纯化。pMD-18T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司; 小鼠抗 M13 噬菌体酶联单抗 Anti-M13-HRP monoclonal conjugate 购自 Amersham Pharmacia 公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品; TMB 显色底物购自天根公司; 胰化蛋白胨和酵母提取物购自 OXOID 公司; 其他试剂均为国产或进口的分析纯。

## 1.2 构建 nGLP-1R 的不同长度的易错 PCR 突变库

考虑到对 nGLP-1R 与 Exendin-4 的结合位点的不可知性, 我们在以前工作的基础上<sup>[27]</sup>根据 nGLP-1R 的基因序列设计了 2 对引物, primer

11f-*Sfi* I 从基因序列的第 30 个碱基开始, primer 21f-*Sfi* I 从基因序列的第 60 个碱基开始, primer 11r-*Sfi* I 则是到基因序列的第 345 位截止, primer 21r-*Sfi* I 则是到基因序列的第 315 位截止 (引物序列如表 1 所示)。以此来判断是否某一段基因或两段基因的缺失会影响到 nGLP-1R 与 Exendin-4 结合的活性。以 pET-28a(+)-GLP-1R 为模板, 用引物 primer 1f-*Sfi* I 作为上游引物, primer 1r-*Sfi* I、primer 11r-*Sfi* I、primer 21r-*Sfi* I 分别作为下游引物; primer 11f-*Sfi* I 作为上游引物, primer 1r-*Sfi* I、primer 11r-*Sfi* I、primer 21r-*Sfi* I 分别作为下游引物; primer 21f-*Sfi* I 作为上游引物, primer 1r-*Sfi* I、primer 11r-*Sfi* I、primer 21r-*Sfi* I 分别作为下游引物, 通过两轮易错 PCR 扩增 9 段长度不同的片段。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer 1f- <i>Sfi</i> I	aaagggcccagccggccggccccgccccaggggtg
Primer 1r- <i>Sfi</i> I	aaagggccccgagccgtacagcgacaggagctgtcc
primer 11f- <i>Sfi</i> I	aaagggcccagccggcctccctctcagacagtgacaga
Primer 11r- <i>Sfi</i> I	aaagggccccgagccggtttctctctcttgcctggac
Primer 21f- <i>Sfi</i> I	aaagggccccgagccgagtagtcggcaccagtgccaac
Primer 21r- <i>Sfi</i> I	aaagggccccgagccctccgacaggtccctccagggc

## 1.3 GLP-1 受体 N 端片段噬菌体突变库的扩增、富集和滴度测定

噬菌体的扩增、富集及滴度测定参考文献[28]进行。以固定于 96 孔板孔中的 50  $\mu\text{g/mL}$  的 Exendin-4 对 nGLP-1R 的随机突变库进行了 3 轮亲和筛选。

## 1.4 单克隆噬菌体的制备

从富集过程中用于计数的平板上随机挑取 20 个单菌落, 分别接种于 10 mL SB (30 g/L 胰化蛋白胨, 20 g/L 酵母提取物, 10 g/L MOPS, 40  $\mu\text{g/mL}$  四环素, 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素, pH 7.0) 中进行扩增, 将扩增后的噬菌体滴度调至

$1.0 \times 10^{12}$  PFU/mL。

### 1.5 噬菌体的 ELISA 检测

在 96 孔板的每孔中加入 50  $\mu$ L Exendin-4 (50  $\mu$ g/mL), 4  $^{\circ}$ C 包被过夜; 清洗后, 加入含脱脂奶粉的 TBST 溶液 (50 mol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 40 g/L 脱脂奶粉, pH 7.5), 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h 后双蒸水洗 5 次; 加入 50  $\mu$ L 单克隆噬菌体上清 ( $1.0 \times 10^{12}$  PFU/mL), 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 充分洗涤; 加入用含 40 g/L 脱脂奶粉的 TBST 按 1 : 1 000 的比例稀释的小鼠抗 M13 噬菌体酶联单抗 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h, 充分洗涤; TMB 显色 15 min 后, 以 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应, 测  $OD_{455}$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 nGLP-1R 的不同长度突变体库的构建

通过两轮易错 PCR 扩增 9 段长度不同的片段 (图 1), 构建 nGLP-1R 随机突变体库, 经平板计数测得的库容量约为  $9.6 \times 10^7$ 。对随机挑选的 30 个突变体的测序结果表明, 11 个产生了移码突变, 5 个存在颠换 (AT-TA), 而每个突变体中至少有 2 个碱基发生了突变, 最多的则有 13 个碱基产生了突变, 这与文献中报道的突变率大于 2% 的突变率范围是相符合的<sup>[29]</sup>。

### 2.2 nGLP-1R 突变库的亲亲和筛选

从对 nGLP-1R 的随机突变库的亲亲和筛选结果 (表 2) 看, 第 1 轮筛选的产率大于  $(1.0 \times 10^{-7})\%$ , 表明筛选过程中筛选方法、菌的生长状态、感染过程或溶液均符合要求。随着淘洗的进行, 产率逐渐升高, 说明具有特异性结合能力的噬菌体通过筛选得到了较好的富集。

### 2.3 nGLP-1R 突变体结合 Exendin-4 活性的鉴定

从生物富集时用于计数的平板上随机挑选了 30 个单菌落, 用 ELISA 法测定了噬菌体上清与 Exendin-4 的结合活性。结果显示, 大部分噬

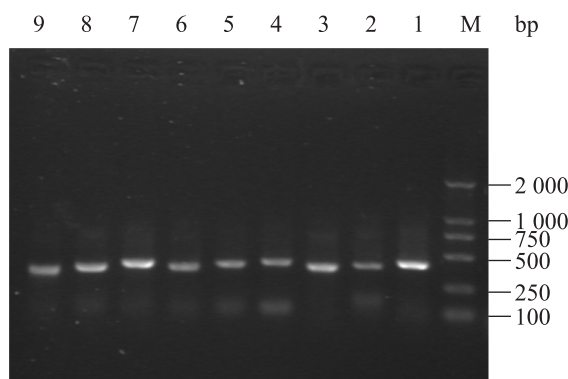


图 1 九段长度不同的 nGLP-1R 片段的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR products of nine nGLP-1R gene segments with different length. M: DNA marker; 1: 345 bp; 2: 315 bp; 3: 285 bp; 4: 315 bp; 5: 285 bp; 6: 255 bp; 7: 375 bp; 8: 345 bp; 9: 315 bp.

表 2 nGLP-1R 噬菌体随机突变库的筛选

Table 2 Enrichment of nGLP-1R phage randomly mutated library by biopanning

Round	Input (PFU/mL)	Output (PFU/mL)	Yield (%)
1	$1.0 \times 10^{12}$	$3.8 \times 10^6$	$3.8 \times 10^{-6}$
2	$1.0 \times 10^{12}$	$4.9 \times 10^7$	$4.9 \times 10^{-5}$
3	$1.0 \times 10^{12}$	$7.2 \times 10^8$	$7.2 \times 10^{-4}$

菌体都具有一定的与 Exendin-4 结合的活性。但其中有一株 EP16 与野生型 nGLP-1R (wt nGLP-1R) 相比没有活性, 通过测序发现, EP16 长度为 95 个氨基酸, 缺失了前面的 20 个和后面的 10 个氨基酸, 并且第 52 位色氨酸突变为精氨酸。为了更好地确定 EP16 与 Exendin-4 无结合活性, 使用引物 primer 21f-*Sfi* I 和 primer 11r-*Sfi* I 构建了野生型 EP16 (wtEP16), 使用重叠 PCR 法构建第 52 位色氨酸突变为精氨酸的全长 nGLP-1R (nGLP-1R<sup>W52R</sup>), 以质粒 pET-28a(+)-GLP-1R 为模板, 以 primer 1f-*Sfi* I 为上游引物, E52 reverse (5'-catctggccagcaggcgtagtca-3') 为下游引物扩增出 nGLP-1R 的前半段基因序列; 以引物 E52 forward (5'-tgactacgcctgctggccagat-3') 为上游引物, primer 1r-*Sfi* I 为下游引物扩增出 nGLP-1R 的后半段基因序列; 以这两段基因序列为模板, primer 1f-*Sfi* I 和 primer 1r-*Sfi* I 为引物, 通过重叠延伸 PCR 法, 改变 wtnGLP-1R 中的第 52 位氨基酸序列。以辅助噬菌体 VSCM13 作为阴性对照, 利用 3 次独立的 ELISA 试验对其结合活性进行验证 (表 3)。结果显示, wtEP16 结合 Exendin-4 的活性与 wtnGLP-1R 相当, nGLP-1R<sup>W52R</sup> 没有结合 Exendin-4 的活性。

## 2.4 EP16 突变体氨基酸序列分析

对筛选得到的 EP16 突变体的氨基酸序列分

析 (图 2) 显示, EP16 中有 1 个氨基酸发生突变: 第 52 位色氨酸 (W) 突变为精氨酸 (R), 且缺失了前 20 个和后 10 个氨基酸。

由于 EP16 既有缺失又有突变, 所以在无法确定其活性的丧失是由于突变造成还是由于缺失部分氨基酸造成的情况下, 构建了 wtEP16 及 nGLP-1R<sup>W52R</sup> 来进行对比。结果发现 wtEP16 是有结合 Exendin-4 活性的, nGLP-1R<sup>W52R</sup> 没有结合 Exendin-4 的活性 (表 3)。由此说明, 突变体 EP16 无活性是由于其第 52 位色氨酸突变为精氨酸而引起的。EP16 失去结合 Exendin-4 的活性可能是由于以下原因: 1) 色氨酸是非极性氨基酸, 在突变为极性带正电的精氨酸后, 可能会对 nGLP-1R 的整个肽链的极性产生影响, 从而影响到受体的折叠构象使得受体与配体 Exendin-4 间的交联反应发生变化。2) 色氨酸是杂环族氨基酸, 其环上带有咪唑环, 而精氨酸是脂肪族氨基酸。根据文献报道, W<sup>39</sup> 突变为丙氨酸(A)后, nGLP-1R 失去了结合 GLP-1 的能力<sup>[5]</sup>。由此可以推断, 氨基酸残基上有没有咪唑基团可能也会在很大程度上影响整个肽链结合 Exendin-4 的活性。

由于 Exendin-4 与 N 端片段的结合活性要比 GLP-1 与 N 端片段的结合活性强, 那么可以猜测其结合位点也是有所差别的, 在 wtEP16 中, W<sup>39</sup>

表 3 ELISA 方法检测噬菌体突变体 EP16 和野生型 EP16 结合 Exendin-4 的活性

Table 3 Binding activity of the mutant EP16 and wtEP16 to Exendin-4 analyzed by ELISA

ELISA ( <i>OD</i> <sub>455</sub> )	wt EP16	Mutant EP16	wt nGLP-1R	nGLP-1R <sup>W52R</sup>	VSCM13
1	0.349	0.168	0.358	0.164	0.163
2	0.411	0.210	0.399	0.208	0.212
3	0.487	0.279	0.468	0.266	0.286

[illegible]

图2 突变体 EP16、野生型 EP16、nGLP-1R<sup>W52R</sup>与野生型 nGLP-1R 的氨基酸序列的比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence between mutant EP16, wtEP16, nGLP-1R<sup>W52R</sup> and wt nGLP-1R.

的缺失没有影响 exendin-4 与受体 N 端片段的结合。但 EP16 则由于其第 52 位 (文献[6]中的第 72 位氨基酸) 氨基酸由 W 突变成了 R 而丧失了活性, 那么可以推测, 对于 nGLP-1R 来说, 其与 GLP-1 的结合需要除 W<sup>87</sup> 外 5 个 W 的参与, 但在 nGLP-1R 与 Exendin-4 作用时, W<sup>39</sup> 的存在与否并不会影响到 nGLP-1R 与 Exendin-4 的结合, 而 W<sup>72</sup> (在本文中为第 52 位氨基酸) 的突变则会影响到它们的结合。这个结果显示, W<sup>72</sup> 对受体 N 端片段与 Exendin-4 的结合的影响要大于 W<sup>39</sup>。

### 3 结论

胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段在缺失了前 20 个和后 10 个氨基酸仍具有生物学活性, 但第 52 位保守氨基酸色氨酸的突变引起了活性的丧失。因此证明了氨基酸残基的极性改变及有无咪唑基团都有可能影响整个肽链结合 Exendin-4 的活性。而关键位点单个氨基酸残基的突变可以改变 nGLP-1R 整个蛋白质的生物学活性。GLP-1R 因在胰岛素分泌和血糖调节方面有重要作用, 基于对 GLP-1R 结构功能及其信号传导通路的认识, 建立相应的药物筛选模型, 寻找非肽

类 GLP-1R 小分子激动剂,具有良好的科学价值和潜在的市场前景。本研究所建立的 nGLP-1R 噬菌体随机突变体库能够很好地应用于受体-配体的结合研究,稍加改造即可成为一个高能量筛选非肽类 GLP-1R 小分子激动剂的方法。

## REFERENCES

- [1] Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagons-like peptide 1. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(8): 8641–8645.
- [2] Tibaduiza EC, Chen C, Beinborn M. A small molecule ligand of the glucagons-like peptide 1 receptor targets its amino-terminal hormone binding domain. J Biol Chem, 2001, 276(41): 37787–37793.
- [3] Vilardaga JP, De Neef P, Di Paolo E, et al. Properties of chimeric secretin and VIP receptor proteins indicate the importance of the *N*-terminal domain for ligand discrimination. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 211: 885–891.
- [4] Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, et al. Highly conserved aspartate 68, tryptophan 73 and glycine 109 in the *N*-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206: 246–252.

- [5] B Van Eyll, Göke B, Wilmen A, et al. Exchange of W39 by A within the N-terminal extracellular domain of the GLP-1 receptor results in a loss of receptor function. *Peptides*, 1996, 17: 565–570.
- [6] Wilmen A, B Van Eyll, Göke B, et al. Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1. *Peptides*, 1997, 18(2): 301–305.
- [7] Neidigh JW, Fesinmeyer RM, Prickett KS, et al. Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry*, 2001, 40(44): 13188–13200.
- [8] Parkes D, Jodka C, Smith PN, et al. Pharmacokinetic actions of exendin-4 in the rat: comparison with glucagon-like peptide-1. *Drug Dev Res*, 2001, 53: 260–267.
- [9] Idris I, Patiag D, Gray S, Donnelly R. Exendin-4 increase insulin sensitivity via a PI-3-kinase-dependent mechanism: contrasting effects of GLP-1. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(5): 993–996.
- [10] Edwards CM, Stanley SA, Davis R, et al. Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(1): E155–E161.
- [11] Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, et al. Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology*, 2000, 141(6): 1936–1941.
- [12] Neidigh JW, Fesinmeyer RM, Prickett KS, et al. Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry*, 2001, 40(44): 13188–13200.
- [13] Doyle ME, Theodorakis MJ, Holloway HW, et al. The importance of the nine-amino acid C-terminal sequence of exendin-4 for binding to the GLP-1 receptor and for biological activity. *Regul Pept*, 2003, 114(2/3): 153–158.
- [14] Lopez de Maturana R, Willshaw A, Kuntzsch A, et al. The isolated N-terminal domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor binds exendin peptides with much higher affinity than GLP-1. *J Biol Chem*, 2003, 278(12): 10195–10200.
- [15] Suleiman Al-Sabah, Dan Donnelly. The positive charge at Lys-288 of the glucagons-like peptide-1 (GLP-1) receptor is important for binding the N-terminus of peptide agonists. *FEBS Lett*, 2003, 553: 342–346.
- [16] Zander M, Madsbad S, Madsen JL, et al. Effect of 6-week course of glucagons-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*, 2002, 359: 824–830.
- [17] Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 2001, 414: 821–827.
- [18] Kieffer TJ, Habener JF. The Glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 1999, 20(6): 876–913.
- [19] Nauck MA, Kleine N, Orskov C, et al. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 1993, 36(8): 741–744.
- [20] Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, et al. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1992, 326(20): 1316–1322.
- [21] Meneilly GS, McIntosh CH, Pederson RA, et al. Effect of glucagon-like peptide 1 on non-insulin-mediated glucose uptake in the elderly patient with diabetes. *Diabetes Care*, 2001, 24(11): 1951–1956.
- [22] Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, et al. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*, 2004, 53(3): 654–662.
- [23] Runge S, Wulff BS, Madsen H, et al. Different domains of the glucagons and glucagons-like peptide-1 receptors provide the critical determinants of ligand selectivity. *Br J Pharmacol*, 2003, 138: 787–794.
- [24] Chicchi GG, Cascieri MA, Graziano MP, et al. Fluorescein-Trp<sup>25</sup>-Exendin-4, a biologically active fluorescent probe for the human GLP-1 receptor. *Peptides*, 1997, 18(2): 319–321.
- [25] López de Maturana R, Donnelly D. The glucagons like peptide-1 receptor binding site for the

- N-terminus of GLP-1 requires polarity at Asp198 rather than negative charge. FEBS Lett, 2002, 350: 244–248.
- [26] Mattias Hällbrink, Tomas Holmqvist, Magnus Olsson, et al. Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are responsible for  $G_{\alpha_s}$  and  $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$  activation. Biochim Biophys Acta, 2001, 1546: 79–86.
- [27] Gao WF, Liu MY, Ma YS. Analysis of the binding site of the N-terminal fragment of glucagon-Like peptide-1 receptor to exendin-4. J East China Univ Sci Technol, 2008, 34(1): 66–70 (in Chinese).
- 高蔚丰, 刘美云, 马昱澍. 胰高血糖素样肽 1 受体 N 端片段与 Exendin-4 的亲位点分析. 华东理工大学学报, 2008, 34(1): 66–70.
- [28] Kay BK, Winter J, McCafferty J. Phage Display of Peptides and Proteins: a Laboratory Manual. San Diego, CA: Academic Press, 1996.
- [29] Chen XS, Wang BA, Wang Z. The condition for error-prone PCR induced mutation. Acad J Second Mil Med Univ, 2003, 24(3): 307–310 (in Chinese). 陈晓穗, 汪保安, 王琰. 错配 PCR 致突变的实验条件研究. 第二军医大学学报, 2003, 24(3): 307–310.

(本文责编 郝丽芳)

## 《生物工程学报》声明：撤销高鹏等发表在本刊2008年

### 24卷2期315–322页的研究论文

近期获悉, 国家自然科学基金委员会监督委员会接到举报, 并经专家调查认定, 高鹏、姚素英等发表的下列两篇标注基金资助的论文存在一稿两投和数据造假问题:

论文 1: 高鹏, 姚素英等. 基于 PGMA 磁微球的纳米机械免疫传感器的片上磁分离. 天津大学学报, 2008, 41(1): 33-38 (投稿日期: 2007-03-20, 修回日期: 2007-05-25)

论文 2: 高鹏, 姚素英等. 基于硒化镉量子点磁微球的微悬臂梁式免疫传感器片上磁分离. 生物工程学报, 2008, 24(2): 315-322 (投稿日期: 2007-07-13, 录用日期: 2007-09-19)

国家自然科学基金委员会监督委员会已在其官方网站 ([http://www.nsfc.gov.cn/nsfc/cen/00/its/jiandu991013/20120511\\_01.html](http://www.nsfc.gov.cn/nsfc/cen/00/its/jiandu991013/20120511_01.html)) 发布了对此事的处理决定。

为了加强我国科技界精神文明建设、提高科技工作者学术道德水平、保护我国科学研究成果的知识产权和维护《生物工程学报》的声誉, 本刊依照我国相关法律规定、参照“全国性学会科技期刊道德公约”, 特做出如下决定:

1. 撤消高鹏等发表在《生物工程学报》2008 年 24 卷 2 期 315–322 页的研究论文;
2. 在《生物工程学报》的纸质版和网页上发布撤消该论文的声明;
3. 《生物工程学报》今后将不再受理该作者的任何投稿。

在此, 《生物工程学报》再次声明, 本刊来稿严禁抄袭、剽窃他人的研究结果或是数据造假。一旦发现, 将追究作者的责任, 并给予严厉处罚。敬请广大作者严格自律, 注重科研诚信。

《生物工程学报》

2012 年 12 月

附: 国家自然科学基金委员会关于高鹏、姚素英的处理决定如下:

1. 给予高鹏通报批评, 取消高鹏国家自然科学基金项目申请资格 5 年 (2012 年 3 月 26 日至 2017 年 3 月 25 日)。
2. 撤销姚素英负责的国家自然科学基金项目“基于硒化镉纳米量子点的悬浮微块阵列免疫芯片分析系统的研究”(项目批准号 60844004), 追回已拨经费。给予姚素英通报批评, 取消姚素英国家自然科学基金项目申请资格 3 年 (2012 年 3 月 26 日至 2015 年 3 月 25 日)。