

猪 β_2 肾上腺素受体的表达、纯化及鉴定

王健^{1,2}, 刘媛¹, 王静²

(1. 河北北方学院食品科学系, 河北张家口 075000)

(2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/农业部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘要: 研究了 β_2 肾上腺素受体(β_2 adrenergic receptor, β_2 AR)基因重组表达质粒在人胚肾细胞293 (Human embryonic kidney cells 293, HEK293)中的瞬时转染及表达产物的纯化和鉴定。将已构建的重组表达质粒瞬时转染HEK293细胞,表达产物制备粗膜蛋白后,采用镍离子亲和层析法纯化得到受体蛋白并进行鉴定。结果表明:重组表达质粒pTriEx-1.1 Hygro- β_2 AR₁₋₄₁₈转染HEK293细胞后表达量和蛋白活性较优,最佳表达时间为转染后72 h。SDS-PAGE和Western blot结果显示,在47 ku左右出现了特异性条带,咪唑的最佳洗脱浓度为250 mmol/L,受体蛋白纯度大于80%。活性鉴定表明:受体蛋白与HRP酶标记的3种 β 激动剂均能特异性结合,检测HRP-克伦特罗、HRP-莱克多巴胺和HRP-沙丁胺醇的OD值分别为0.97、0.91和0.94。通过纯化得到的受体蛋白,约占粗膜蛋白的4.4%。本试验成功获得一定数量纯度和活性较好的 β_2 AR受体蛋白,为受体技术在 β 激动剂多残留检测中的研发和应用奠定了基础。

关键词: 猪; β_2 肾上腺素受体; 表达; 纯化

文章编号: 1673-9078(2016)6-24-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.005

Expression, Purification, and Identification of β_2 Adrenergic Receptors in Pigs

WAGN Jian^{1,2}, LIU Yuan¹, WANG Jing²

(1. Department of Food Science, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China) (2. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agri-products of CAAS, Key Laboratory of Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: A recombinant porcine β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) expression plasmid was transiently transfected in human embryonic kidney cells 293 (HEK293). The expressed products were purified by crude membrane preparation and Ni-NTA-affinity chromatography to yield the receptor protein, followed by identification. The results showed that the HEK293 cells transfected with the recombinant expression plasmid pTriEx-1.1 Hygro- β_2 AR₁₋₄₁₈ exhibited high expression level and protein activity, and the optimal expression time was 72 h after transfection. The results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting indicated a specific band occurred at 47 kDa, the optimal imidazole concentration for elution was 250 mmol/L, and the purity of the receptor protein was more than 80%. The activity assay revealed that the recombinant receptor could specifically bind all three HRP- β -agonists, and the optical density (OD) values obtained for the detection of HRP-CBL, HRP-RAC, and HRP-SAL were 0.97, 0.91, and 0.94, respectively. The purified receptor protein accounted for 4.42% of crude membrane protein. In brief, β_2 AR receptor protein with ideal purity and activity was obtained, laying a foundation for the development and application of this receptor technique in the multi-residue determination of β -agonists.

Key words: pig; β_2 adrenergic receptor; expression; purification

β 肾上腺素受体激动剂(简称 β 激动剂),俗称“瘦肉精”,自20世纪80年代后期开始,该类药物在我国养殖户和饲料企业中被大力推广使用。但鉴于其给人

收稿日期: 2015-08-30

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203094)

作者简介: 王健(1980-),男,博士,副教授,研究方向:农产品质量安全快速检测技术

通讯作者: 王静(1963-),女,博士,教授,研究方向:食品安全与检测技术

畜健康带来的不利影响,包括中国、欧盟在内的大多数国家现均已禁止在畜牧生产中使用该类药物。现行针对 β 激动剂检测的标准和分析方法主要分为确证分析方法和快速检测方法两类,前者^[1,2]具有检测耗时长、成本高、难以实现现场检测等缺点,而后者基于免疫学技术的ELISA^[3]、胶体金层析^[4]等方法只能针对有限的特定目标物检测,对新型的结构类似物束手无策,这就给该类违禁物的监管带来了巨大挑战。受体分析法可实现一类结构功能相似目标物的类特异性

检测,克服了免疫学方法一般只能针对特定靶标物检测的弊端,可实现 β 激动剂类药物的多残留检测和未知物筛查,是解决我国当前畜产品中该类违禁物屡禁不止难题的有力手段。 β_2 肾上腺素受体(β_2 adrenergic receptor, β_2 AR)是 β 激动剂受体分析的核心识别元件,因此制备大量纯度高、活性好的 β_2 AR受体是建立该方法的关键环节。由于天然 β_2 AR在生物体内丰度极低且分离难度大,因此近年来体外异源表达已成为获取该受体的有效策略^[5]。现有研究表明,大肠杆菌^[6]、酵母^[7]、昆虫细胞^[8]、哺乳动物^[9]及无细胞表达系统^[10]均能表达出有功能活性的 β_2 AR蛋白,但表达产物水平和活性因宿主细胞的特点不同而有所差异^[11]。哺乳动物细胞具有复杂的翻译后修饰,膜的性质也最符合GPCRs类膜蛋白的环境,表达产物的结构、糖基化类型和方式与天然蛋白几乎一致,是 β_2 AR较为理想的表达宿主。除体外表达外, β_2 AR受体蛋白的纯化是另一个制约其研发应用的瓶颈和难点之一。目前用于受体蛋白纯化的方法主要为层析技术,具体包括亲和层析、疏水性层析、离子交换层析和凝胶过滤等方法^[12]。

本研究选取哺乳动物细胞中最具代表性的HEK293细胞作为表达系统,将已构建的重组表达质粒瞬时转染该细胞,筛选获得适宜的重组质粒和表达时间,表达产物采用优化的镍离子亲和层析法进行纯化,并对所得重组受体进行活性和含量鉴定,为建立基于重组受体的 β 激动剂快速检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒和细胞

pTriEx-1.1Hygro- β_2 AR₁₋₄₁₈(截去猪 β_2 AR基因C端终止子)和pTriEx-1.1 Hygro- β_2 AR₆₃₋₄₁₈(截去猪 β_2 AR基因N端186个核苷酸和C端终止子)两重组表达质粒均为本实验室前期构建并保存。人胚肾细胞293(Human embryonic kidney cells 293, HEK293)细胞株由北京勤邦生物技术有限公司惠赠。

1.1.2 试剂

DMEM高糖培养基,胎牛血清,购自GIBCO公司;胰蛋白酶购自Sigma公司;转染试剂GeneJuice Transfection Reagent购自Novagen公司;细胞裂解液、PMSF及SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times),BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天公司;His小鼠源单克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自Sigma公司;

Ni-NTA填料购自QIAGEN公司;HRP酶标记的克隆特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇均由北京勤邦生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒在HEK293细胞的瞬时转染

按照细胞培养的常规流程进行HEK293细胞的复苏和传代。在转染前一天,在含有完全生长培养基的平板中每孔接种 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个细胞。 37°C (5% CO_2)条件下孵育过夜,使细胞在转染前达到50%~80%汇合。然后按照转染试剂GeneJuice Transfection Reagent说明书分别将重组穿梭质粒pTriEx-1.1Hygro- β_2 AR₁₋₄₁₈和pTriEx-1.1 Hygro- β_2 AR₆₃₋₄₁₈瞬时转染入HEK293细胞,转染试剂与DNA的最佳比例是3 μL 转染试剂比1 μg DNA。

1.2.2 表达条件的确定和蛋白鉴定

两重组表达质粒的HEK293转染细胞,在 37°C (5% CO_2)下分别孵育48 h、72 h和96 h,确定最佳的表达时间。将细胞液经裂解液裂解后制得粗蛋白,分别用Western blot方法检测蛋白的表达水平,ELISA方法进行活性鉴定,综合两者结果筛选出适宜的重组表达质粒。

1.2.3 表达蛋白粗膜的制备

(1)胰酶消化转染孵育后的HEK293细胞,然后用冰预冷的PBS溶液洗2次,溶于7 mL buffer A(细胞低渗裂解缓冲液)。(2) 4°C 下用组织研磨机破碎细胞30次。(3) 4°C 下将细胞匀浆 $48000 \times g$ 离心20 min,沉淀溶于10 mL buffer A。(4)按照(3)的方法重复离心1次,弃去上清。(5)沉淀称重后,按10 mL/g的比例向其中加入buffer B(细胞溶膜缓冲液)。(6)用组织研磨机将上述悬液破碎20次,然后 4°C 下轻摇1 h。(7)将该溶液 $48000 \times g$ 离心20 min,去除不溶性杂质。(8)上清液测定浓度后进行纯化鉴定。

1.2.4 重组受体蛋白的纯化

采用镍离子亲和层析法进行蛋白纯化。以Ni-NTA树脂为填料,对pTriEx-1.1 Hygro- β_2 AR₁₋₄₁₈转染的HEK293细胞表达产物粗膜蛋白进行纯化,主要步骤为:(1)平衡柱子。用10 CV的Lysis buffer,流速为1 mL/min。(2)上样。将粗膜蛋白溶液加入到平衡好的柱子上,流速为1 mL/min。(3)漂洗。用5 CV~10 CV的Washing buffer漂洗柱子,流速为1 mL/min。(4)洗脱。用Elution buffer以1 mL/min的流速进行洗脱。(5)洗柱。分别用5 CV的Elution buffer-250和Lysis buffer漂洗柱子。最后取适量纯化蛋白进行鉴定, -80°C 保

存。

1.2.5 洗脱缓冲液中咪唑浓度的优化

分别用含有 75 mmol/L、125 mmol/L 和 250 mmol/L 咪唑的 Elution buffer-75、Elution buffer-125 和 Elution buffer-250 三种洗脱缓冲液洗脱，以 1 CV/管对洗脱产物进行收集，然后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测，比较纯化蛋白洗脱效果，确定最优的咪唑浓度。

1.2.6 纯化蛋白的鉴定

对收集的纯化蛋白样品分别进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定，用 ELISA 方法进行活性鉴定，并采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白质含量测定。

2 结果与分析

2.1 猪 β_2AR 基因在 HEK293 细胞中的瞬时表达结果

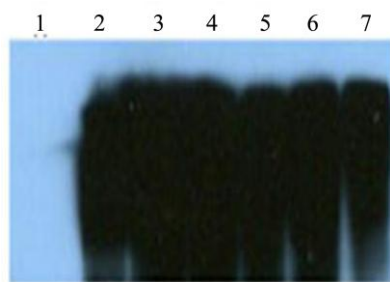


图 1 HEK293 细胞表达产物的 Western blot 结果

Fig.1 Western blot analysis of recombinant porcine β_2AR expressed in HEK293 cells

注：1：未转染 HEK 293 细胞；2-4：pTriEx-1.1 Hygro- β_2AR_{1-418} (48 h, 72h, 96 h)；5-7：pTriEx-1.1 Hygro- β_2AR_{63-418} (48 h, 72h, 96 h)。

分别将两重组穿梭质粒瞬时转染入 HEK293 细胞，37 °C (5% CO₂) 下孵育 48 h、72 h 和 96 h，通过 Western blot 试验检测各表达产物的表达水平。由图 1 所示，与未转染的 HEK293 细胞（第 1 泳道）相比，两重组质粒转染的细胞在不同孵育时间下均出现较浓的特异性条带，说明受体蛋白表达水平较高，从表达量、时间、成本等因素综合考虑选取 72 h 为最佳表达时间。

由 ELISA 活性鉴定结果（表 1）可知，两重组质粒表达产物粗蛋白对 3 种 β 激动剂酶标记物均有不同程度的亲和吸附，其中 pTriEx-1.1 Hygro- β_2AR_{1-418} 转染的 HEK293 细胞表达产物粗蛋白测得的 OD 值更大，因此说明其亲和活性更高。

本研究所用的重组表达质粒为穿梭质粒，可在大

肠杆菌、杆状病毒感染的昆虫细胞和哺乳动物细胞 3 个表达系统进行表达研究。HEK293 细胞被广泛地应用于许多真核基因的表达，特别是多种受体的结构和功能研究，因此本试验选择其为表达系统。本试验比较了全长的野生型目的基因和截掉 N 端 186 个核苷酸的改造基因的表达效果。从蛋白表达水平上看，两基因均表达出了目的蛋白，且蛋白表达量差异不显著，说明 N 端截短改造对表达水平的改善作用并不大，该结论与宋荣^[13]所得试验结论相符。从表达蛋白的活性上看，野生型基因表现更优。综合考虑表达水平和表达蛋白活性的差异，选取 pTriEx-1.1 Hygro- β_2AR_{1-418} 瞬时转染的表达产物进行后续的蛋白纯化研究。

表 1 表达蛋白活性鉴定结果

Table 1 Identification of the biological activity of the recombinant porcine β_2AR protein

酶标抗原种类 包被蛋白种类	HRP-克 伦特罗	HRP-莱克 多巴胺	HRP-沙 丁胺醇
pTriEx-1.1 Hygro- β_2AR_{1-418} 粗蛋白	0.87	0.65	0.85
pTriEx-1.1 Hygro- β_2AR_{63-418} 粗蛋白	0.76	0.58	0.72

2.2 洗脱液中咪唑浓度的优化结果

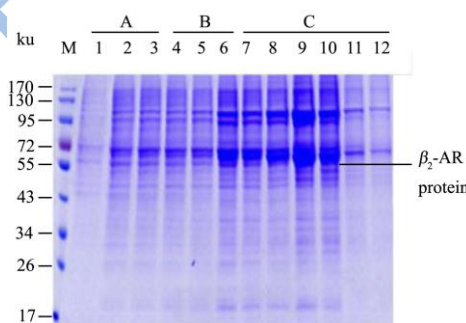


图 2 不同咪唑浓度洗脱蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE image of purified porcine β_2AR protein eluted with different imidazole concentrations

注：M：蛋白质分子量Marker；A(1~3)：75 mmol/L咪唑；B(4~6)：125 mmol/L咪唑；C(7~12)：250 mmol/L咪唑。

为了实现对蛋白的最佳洗脱效果，本试验对洗脱缓冲液 Elution buffer 中咪唑的浓度进行了优化。由图 2 可以看出，咪唑浓度在 250 mmol/L 下时在 55 ku 附近下方出现特异性条带。Western blot 试验结果进一步验证了 SDS-PAGE 得出的结论，与未转染 HEK293 细胞相比，在 75 mmol/L 和 125 mmol/L 咪唑下未出现特异性条带，而在 250 mmol/L 咪唑下在 47 ku 处特异性条带逐渐加深，说明在该浓度下洗脱下了目的蛋白。

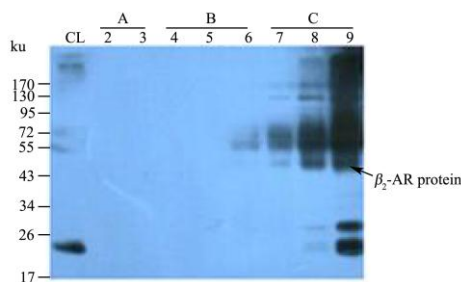


图3 不同咪唑浓度洗脱蛋白 Western blot 电泳图

Fig.3 Western blot analysis of purified porcine β_2 AR protein eluted with different imidazole concentrations

注: CL: 未转染HEK 293细胞; A(2~3): 75 mmol/L咪唑; B(4~6): 125 mmol/L 咪唑; C(7~9): 250 mmol/L 咪唑。

2.3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

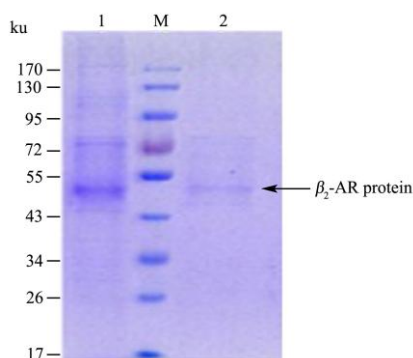


图4 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.4 SDS-PAGE image of purified recombinant porcine β_2 AR protein

注: M: 蛋白质分子量Marker; 1: 浓缩的纯化蛋白; 2: 未浓缩的纯化蛋白。

采用咪唑浓度为 250 mmol/L 的洗脱缓冲液对粗蛋白样品进行纯化, 并用离子交换柱浓缩蛋白。SDS-PAGE 结果(图4)显示浓缩前后纯化蛋白在 47 ku 左右均出现明显的特异性条带。Western blot 结果(图5)显示, 表达蛋白纯化后在 47 ku~55 ku 之间出现了弥散性特异条带, 该分子量范围与 47 ku 接近, 可能的原因是蛋白表达后的甲基化修饰增加了 4 ku-8 ku, 使其中一部分蛋白的分子量较理论值增大。综合分析

表3 BCA 法测定蛋白质浓度

Table 3 Determination of recombinant porcine β_2 AR protein concentration by the BCA method

待测样品	样品浓度 /(μ g/mL)	样品体积 /mL	蛋白质含量/ μ g	纯化蛋白占 粗膜蛋白比例
细胞碎片	583	10	5830	
粗膜蛋白	362	10	3620	4.4%
纯化 β_2 AR 蛋白	80	2	160	

两者检测结果, 受体蛋白的纯度大于 80%。

重组受体的纯化, 往往是在重组受体蛋白的 N 端或 C 端修饰一些标签蛋白, 然后利用联有这些标签蛋白亲和性物质的层析柱进行分离纯化, 是对传统亲和层析方法的发展。本试验所表达的受体蛋白在 C 端修饰有 6 \times His 标签, 因此在纯化时采用了镍离子螯合的亲和层析柱进行纯化。

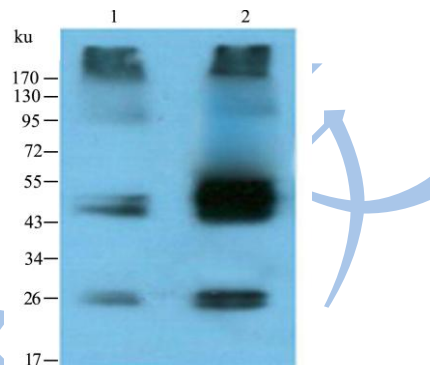


图5 纯化蛋白的 Western blot 电泳结果

Fig.5 Western blot analysis of the purified recombinant porcine β_2 AR protein

注: 1: 未转染HEK 293细胞纯化蛋白; 2: 纯化后的表达蛋白。

2.4 纯化蛋白的活性鉴定

表2 纯化蛋白活性鉴定结果

Table 2 Detection of the biological activity of the purified recombinant porcine β_2 AR

酶标抗原种类	HRP-克伦	HRP-莱克	HRP-沙
包被蛋白种类	特罗	多巴胺	丁胺醇
重组受体纯化蛋白	0.97	0.91	0.94
未转染 HEK293 细胞	0.08	0.08	0.07

采用 ELISA 方法进行活性鉴定, 以未转染的 HEK293 细胞蛋白作为对照。由表 2 可知, 受体蛋白与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇均能够特异性结合, OD 值分别为 0.97、0.91 和 0.94。

2.5 纯化蛋白的含量测定

将纯化过程中得到的 HEK293 细胞碎片、粗膜蛋白和纯化蛋白分别用 BCA 蛋白质浓度测定法进行测定, 具体结果见表 3, 初步判断纯化效率。本试验将瞬时表达后的四板细胞培养皿 (15 cm) 的 HEK293 细胞进行蛋白纯化操作, 共得到 160 μg 纯化蛋白, 约占粗膜蛋白的 4.4%, 纯化蛋白于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 终浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 结论

本研究通过瞬时转染 HEK293 细胞试验筛选得到 pTriEx-1.1 Hygro- $\beta_2\text{AR}_{1-418}$ 重组表达质粒表达效果更优, 最佳表达时间为 72 h。表达产物采用镍离子亲和层析法纯化蛋白, 优化得到洗脱缓冲液中咪唑的最适浓度为 250 mmol/L。SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定结果显示纯化蛋白在 47 ku 左右均出现明显的特异性条带, 蛋白纯度大于 80%。ELISA 活性鉴定表明受体蛋白与 HRP 酶标记的 3 种 β 激动剂均能特异性结合, 检测 HRP-克伦特罗、HRP-莱克多巴胺和 HRP-沙丁胺醇的 OD 值分别为 0.97、0.91 和 0.94。BCA 法测定显示瞬时表达后的四板细胞培养皿 (15 cm) 的 HEK293 细胞共纯化得到 160 μg 蛋白。本研究成功获得了一定数量纯度和活性较优的 $\beta_2\text{AR}$ 重组蛋白, 为基于重组受体的 β 激动剂快速检测方法的研发奠定了基础。

参考文献

- [1] Wang XJ, Zhang F, Ding WQ, et al. Simultaneous determination of 12 β -agonists in feeds by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. J. Chromatogr A., 2013; 1278: 82-88
- [2] Du W, Zhao G, Fu Q, et al. Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples [J]. Food Chem., 2014; 145: 789-795
- [3] Li Y, Lu S, Liu Z, et al. A monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of phenylethanolamine A in tissue of swine [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 40-44
- [4] Gao H, Han J, Yang S, et al. Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of ractopamine and salbutamol [J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 839: 91-96
- [5] Stanasila L, Pattus F, Massotte D. Heterologous expression of G-proteincoupled receptors human opioid receptors under scrutiny [J]. Biochimie, 1998, 80: 563-571
- [6] 王迪. β_2 受体的表达、纯化及在快速检测中的应用[D]. 北京:中国农业科学院, 2008
WANG Di. Expression and purification of β_2 adrenergic receptor and its application in rapid detection technology [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008
- [7] Gerasimov AS, Zeinalov OA, El'darovet MA, et al. Biosynthesis of human β_2 -adrenergic receptor in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification [J]. Molecular Biology of the Cell, 2012, 46(2): 279-286
- [8] Cheng G, Li F, Peng D, et al. Development of an enzyme-linked-receptor assay based on Syrian hamster β_2 -adrenergic receptor for detection of β -agonists [J]. Anal. Biochem., 2014; 459: 18-23
- [9] Chelikani P, Reeves PJ, Rajbhandary UL, et al. The synthesis and high level expression of a β_2 -adrenergic receptor gene in a tetracycline inducible stable mammalian cell line [J]. Protein Sci., 2006, 15(6): 1433-1440
- [10] Yang J, Cirico T, Katzen F, et al. Cell-free synthesis of a functional G protein-coupled receptor complexed with nanometer scale bilayer discs [J]. BMC Biotechnology, 2011, 11: 57-64
- [11] Tate CG, Grishammer R. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors [J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14: 426-430
- [12] 吕宝璋, 卢健, 安明榜. 受体学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000
LV Bao-zhang, LU Jian, AN Ming-bang. Receptorology [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 2000
- [13] 宋荣. β_2 肾上腺素受体基因的克隆及表达[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005
SONG Rong. Cloning and expression of β_2 adrenergic receptor gene [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2005