

网络出版时间: 2023-01-20 16:21:07 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230119.1740.001.html>

◇基础医学研究◇

人源 GRK2 的真核表达、纯化及活性检测

蒋励萍, 陈露颖, 蒯佳婕, 王凤玲, 李浩, 关艳玲, 马旻, 韩陈陈, 魏伟

摘要 目的 构建人源 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 真核表达系统。方法 设计引物, 以 pIRES-EGFP-GRK2 (全长) 基因为模板, PCR 扩增 His-GRK2 目的基因, 将 His-GRK2 目的基因连接在 pcDNA3.1-EGFP 真核表达载体上; 将 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒转染至 HEK 293T 细胞, 48 h 后采用 Western blot 法检测 GRK2 蛋白表达, 通过镍螯合的磁珠法纯化 GRK2 蛋白, 考马斯亮蓝染色和 Western blot 法检测 GRK2 蛋白纯化, His pull down 检测 GRK2 蛋白活性。结果 双酶切和测序鉴定结果表明, pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 真核表达质粒成功构建; Western blot 法检测结果表明, GRK2 蛋白的分子量约为 80 ku, 提示 GRK2 蛋白在 HEK 293T 细胞中成功表达 ($t = 6.433, P = 0.003$); 通过镍螯合的磁珠纯化得到 GRK2 蛋白, His pull down 实验结果表明 GRK2 与前列腺素 E2 受体 4 亚型 (EP4) 结合, 提示 GRK2 蛋白具有生物学活性 ($t = 13.5, P = 0.0002$)。结论 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 真核表达质粒的序列测序正确, 成功构建 GRK2 重组质粒, GRK2 重组质粒在真核细胞 HEK 293T 的细胞中成功表达且表达的蛋白具有生物学活性。

关键词 G 蛋白偶联受体激酶 2; HEK 293T 细胞; 真核表达; 蛋白纯化; 活性鉴定

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0179-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.001

G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled re-

2022-12-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82104187、82173824、81973332); 安徽省自然科学基金 (编号: 2108085QH382); 中国博士后科学基金 (编号: 2021T140002、2021M700184); 安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目 (编号: 2020B430)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 蒋励萍, 女, 硕士研究生;

韩陈陈, 女, 博士, 责任作者, E-mail: chenchenhan@ahmu.edu.cn;

马旻, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: mayang-ahmu@126.com;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

ceptor kinase 2, GRK2) 属于丝/苏氨酸激酶, 参与调节 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptors, GPCRs) 的磷酸化、脱敏和内化^[1]。GRK2 活性和表达的改变在类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 等炎症免疫相关疾病中起着重要作用^[2]。课题组前期研究^[3-5]表明, GRK2 与前列腺素 E2 受体 4 (prostaglandin E2 receptor 4, EP4) 结合, 介导受体过度脱敏, 导致 RA 中成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 的异常增殖和巨噬细胞极化。因此, GRK2 可能通过调控与其结合的蛋白活性或表达, 从而发挥多种生理和病理作用。

为了研究 GRK2 调控 EP4 的分子机制, 本研究利用前期获得的 GRK2 野生型质粒, 连接到高效真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP 上, 构建重组质粒。将重组质粒转染到 HEK 293T 细胞中进行蛋白表达, 通过 Ni-NTA 纯化及超滤获得 His-GRK2 重组蛋白。采用 SDS-PAGE、Western blot、免疫共沉淀及 His pull down 等方法, 鉴定 GRK2 重组蛋白的表达和生物活性, 旨在为进一步研究 GRK2 蛋白对 EP4 的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞、菌株、载体 人胚肾 HEK 293T 细胞购自中国科学院上海细胞库; pcDNA3.1-EGFP 质粒、pIRES-EGFP-GRK2、pIRES-EGFP-EP4 质粒由本课题组前期构建和保存; 大肠埃希菌 DH5 α 购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基及 PBS 购自以色列 BI 公司; Prime STAR 酶、限制性内切酶 Hind III、限制性内切酶 BamH I、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL10000 购自日本 TaKaRa 公司; 切胶回收试剂盒和质粒小提取试剂盒购自 TIANGEN 天根生化科技 (北京) 有限公司; 兔源 GRK2、鼠源 EP4 购自美国 Santa Cruz 公司; 山羊抗兔和山羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 6FF 琼脂糖凝胶微珠购自美国

GE 公司; JetPRIME transfection reagent 转染试剂购自法国 PolyPlus 公司; 考马斯亮蓝染色液购自上海碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜和蛋白超滤管(截留 30~50 ku 蛋白)购自美国 Millipore 公司。

1.1.3 主要仪器 T100™ PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 核酸电泳仪和 DYY-6C 型电泳系统购自北京六一公司; Scientz-IIID 超声波细胞粉碎机购自南京赛飞生物科技有限公司; Tanon 1600 全自动数码凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; ImageQuant LAS 4000 荧光及化学发光成像系统购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计、合成及 PCR 扩增 从 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/> 网站获取人源 GRK2 基因序列(NM 001 619.5), 设计并添加 Hind III 和 BamH I 酶切位点和 C 端 6 × His 标签(CATCAT-CACCATCACCAT)的引物扩增全长约为 2 067 bp 的 GRK2 基因, 上游引物: 5'-CCCAAGCTTATCCACCT-GACCATGAATG-3' (下划线部分是 Hind III 酶切位点), 下游引物: 5'-CGCGGATCCATGGTGATGGT-GATGATGGAGGCCG-3' (下划线部分是 BamH I 酶切位点, 加粗是 6 × His 标签), 所有引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。PCR 反应体系(50 μl): cDNA 1 μl、上游引物 1 μl、下游引物 1 μl、Prime Star DNA 聚合酶 0.5 μl、dNTP 4 μl、5 × Prime Star buffer 10 μl、H₂O 32.5 μl。反应程序如下: 30 个循环(98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 2 min) 进行扩增。将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 出现约 2 067 bp 的条带时利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收产物。

1.2.2 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组真核表达质粒的构建及双酶切鉴定 将 His-GRK2 的 PCR 产物回收片段与 pcDNA3.1-EGFP 质粒, 37 °C, Hind III 和 BamH I 双酶切 2 h, 产物分别经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收试剂盒回收产物。用 T4 DNA 连接酶在 4 °C 条件下连接 His-GRK2 基因片段回收产物与 pcDNA3.1-EGFP 回收产物 12 h。连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 转化液涂板, 37 °C 培养 12~16 h 挑取菌落摇菌培养, 利用质粒提取试剂盒提取质粒。

1.2.3 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组真核表达质粒的测序验证 挑选重组质粒, 经 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定为阳性克隆后送至南京擎科生物科技有限公司进行测序, 以载体的通用引物进

行测序鉴定。测序结果利用 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> 网址进行测序比对。

1.2.4 细胞培养与 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组真核表达质粒的转染 细胞准备: 人 HEK 293T 细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中, 以 10% DMEM 培养液培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 箱中孵育 24 h, 至细胞达到 80%~90% 融合进行转染。

转染方法(6 孔板): ① 制备转染复合物: 取无菌 1.5 ml EP 管, 加入 200 μl 的 jetPRIME buffer, 再加入 2 μg DNA, 快速涡旋 10 s, 混匀后, 加入 4 μl 的 jetPRIME reagent 转染试剂, 快速涡旋 10 s, 混匀后室温静置 10 min。② 转染: 将 6 孔板中培养基弃去, 加入 2 ml 10% DMEM, 将转染复合物加入孔中, 将其置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养 48 h, 观察转染效果。

1.2.5 倒置荧光显微镜观察 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 转染效率 HEK 293T 细胞转染 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒后(带有 EGFP 标签), 培养 48 h, 在倒置荧光显微镜下观察 GRK2 的转染效率并拍照。

1.2.6 Western blot 鉴定 GRK2 蛋白在细胞中的表达 HEK 293T 细胞转染 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒 48 h 后, 加细胞裂解液冰上裂解 30 min, 提取蛋白, BCA 蛋白定量后, 加入 5 × 蛋白上样缓冲液, 沸水煮沸 10 min, Western blot 检测蛋白表达情况。

1.2.7 His-GRK2 重组蛋白的纯化和鉴定 将 GRK2 真核重组质粒转染至 HEK 293T 细胞, 培养 48 h 后, 收集细胞, 加入蛋白裂解液, 通过细胞破碎机破碎细胞, 4 °C 条件下, 13 400 r/min 离心 15 min, 收集蛋白上清液, 将蛋白上清液与 6FF 琼脂糖凝胶微珠 4 °C 摇床孵育 2 h, 离心收集微珠, 4 °C 条件下, 蛋白洗液(含 20 mmol/L 咪唑)洗涤 3 次, 30 min/次, 离心收集微珠, 4 °C 条件下, 蛋白洗脱液(含 300 mmol/L 咪唑)洗涤 3 次, 30 min/次, 分别收集 3 次洗脱蛋白(第 1 次洗脱蛋白、第 2 次洗脱蛋白、第 3 次洗脱蛋白), 将 3 次洗脱蛋白加入 5 ml 超滤管(截留蛋白 30~50 ku)离心, 收集蛋白, 加入蛋白置换液(低盐蛋白缓冲液)于 5 ml 超滤管, 进行离心, 置换蛋白缓冲液, 得到脱盐后的蛋白, 通过考马斯亮蓝染色和 Western blot 检测 3 次洗脱蛋白和脱盐后蛋白的表达。

1.2.8 His pull down 检测 GRK2 蛋白的活性 本研究前期已成功构建 pIRES-EGFP-EP4 质粒, 将与

GRK2 真核重组质粒分别转染 HEK 293T 细胞,收集转染后的细胞,加入蛋白裂解液,通过细胞破碎机破碎细胞后 4 ℃ 条件下,13 400 r/min 离心 15 min,将带有 His 标签的 GRK2 与 6FF 琼脂糖凝胶微珠 4 ℃ 摇床孵育 2 h,离心收集微珠,4 ℃ 条件下,蛋白洗液(含 20 mmol/L 咪唑)洗涤 3 次,30 min/次,离心收集微珠。将过表达 pIRES-EGFP-EP4 的蛋白与处理的微珠 4 ℃ 摇床孵育 12 ~ 16 h。离心收集微珠,加入 20 ~ 30 μl 的蛋白上样缓冲液,沸水煮 10 min,Western blot 检测 GRK2 与 EP4 的共表达。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学处理,实验数据以均数 ± 标准误 (SEM) 表示。采用 t 检验比较两组间差异, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组质粒的构建 利用设计的引物以 pIRES-EGFP-GRK2 基因为

模板,利用合成引物进行 PCR 扩增 His-GRK2 目的基因全长,进行 1% 琼脂糖电泳。凝胶成像系统检测发现,线性 His-GRK2 目的片段位置在 2 067 bp 左右(图 1A)。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳,切胶回收产物。将 PCR 回收产物与 pcDNA3.1-EGFP 空载体通过 Hind III 和 BamH I 进行双酶切,酶切产物通过 T4 DNA 连接酶进行连接,构建 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒,双酶切鉴定结果表明,在 2 067 bp 左右出现线性 His-GRK2 目的片段,在 6 154 bp 左右出现线性 pcDNA3.1-EGFP 目的片段,提示 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒成功构建(图 1B)。同时随机挑选 1 个酶切鉴定阳性的质粒进行测序,并对测序结果进行拼接,利用 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov 网址进行测序比对,发现 GRK2 standard Seq 与测序结果一致,pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组质粒未发生突变,测序序列对比未出现异常,说明 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组质粒成功构建(图 1C)。

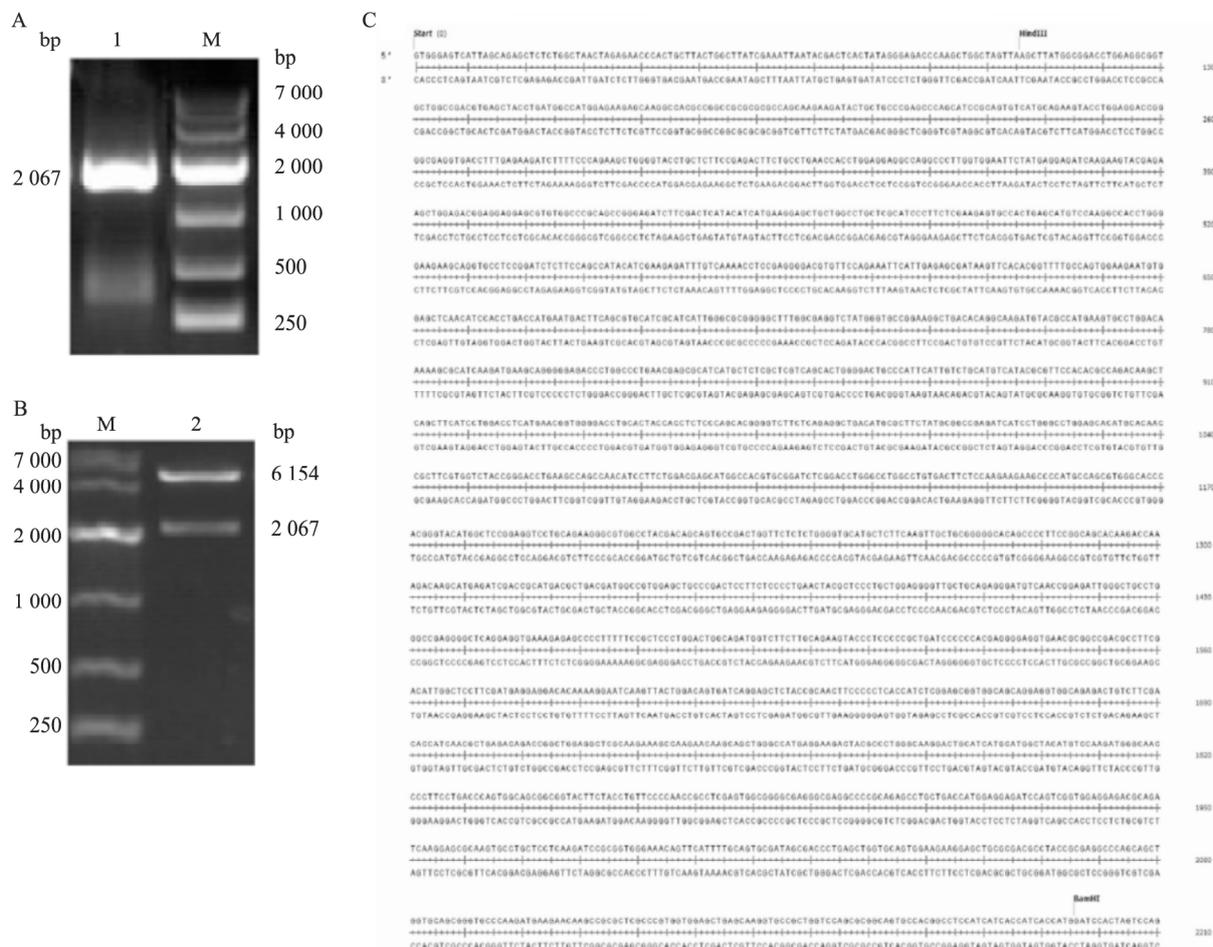


图 1 人源 GRK2 基因 PCR 扩增、酶切鉴定和测序

A: His-GRK2 基因 PCR 产物扩增; B: pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组质粒的酶切鉴定; M: Marker; 1: 线性 His-GRK2 目的片段; 2: pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2; C: pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组质粒的测序结果拼接

2.2 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 蛋白成功表达

HEK 293 T 细胞以 2×10^6 个/孔细胞密度接种于 6 孔板中,转染 pcDNA3.1-EGFP-ctr 和 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 重组质粒,培养 48 h 后,在倒置荧光显微镜下观察转染效果,可见绿色荧光蛋白(EGFP 标签)的表达,pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒转染效果达到 60% 以上(图 2A)。收集转染后的细胞,细胞裂解液冰上裂解 30 min,Western blot 用于检测 GRK2 重组蛋白的表达,结果表明 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 在 HEK 293 T 细胞中过表达($t = 6.433, P = 0.003$) (图 2B)。

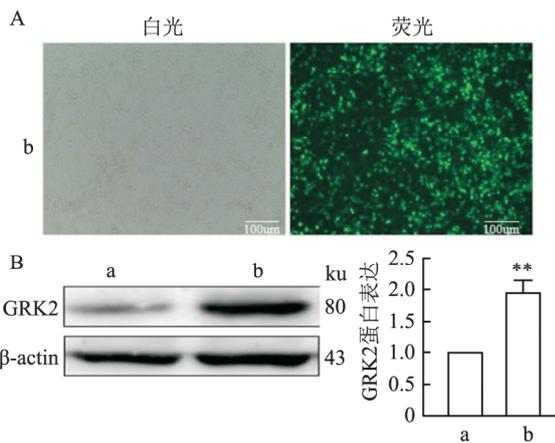


图 2 Western blot 检测 GRK2 蛋白表达

A: 倒置荧光显微镜观察 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 的转染效率 $\times 10$; B: Western blot 检测 GRK2 蛋白表达; a: pc-DNA3.1(+)-EGFP-ctr; b: pc-DNA3.1(+)-EGFP-His-GRK2; 与 pcDNA3.1(+)-EGFP-ctr 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 表达和纯化获得 His-GRK2 重组蛋白

HEK 293T 细胞转染 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒后,裂解蛋白,加入 6FF 琼脂糖凝胶微珠孵育后,加入 1 ml 蛋白洗脱液(高盐),洗脱蛋白进行超滤,得到 500 μ l 蛋白溶液。考马斯亮蓝染色检测 GRK2 蛋白纯化效果见图 3A,Western blot 检测 GRK2 蛋白表达结果见图 3B。结果表明,考马斯亮蓝染色和

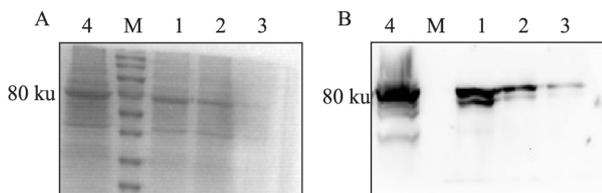


图 3 考马斯亮蓝染色和 Western blot 分析 GRK2 蛋白的表达和纯化

A: 考马斯亮蓝染色检测 GRK2 蛋白纯化效果; B: Western blot 分析 GRK2 蛋白的表达和纯化; M: Marker; 1: 第 1 次洗脱蛋白; 2: 第 2 次洗脱蛋白; 3: 第 3 次洗脱蛋白; 4: 超滤蛋白

Western blot 检测均可以在 80 ku 左右检测 GRK2 阳性蛋白表达。

2.4 GRK2 结合 EP4

HEK 293T 细胞转染 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 质粒,同时转染 pIRES-EGFP-ctr 和 pIRES-EGFP-EP4 质粒,裂解蛋白后,与结合 His 蛋白的镍珠共同孵育,处理后的蛋白样品沸水煮 10 min,Western blot 检测 EP4 蛋白的表达。结果表明,过表达 EP4 可以促进 GRK2 与 EP4 的结合($t = 13.5, P = 0.0002$) (图 4)。

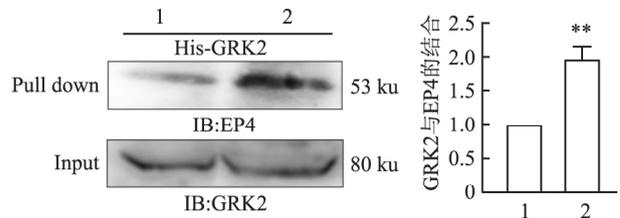


图 4 His pull down 检测 GRK2 与 EP4 的结合能力

1: pIRES-EGFP-ctr; 2: pIRES-EGFP-EP4; 与 pIRES-EGFP-ctr 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

GRK2 由 689 个氨基酸(amino acid, aa)组成,具有 3 个重要的结构域:氨基端(1-185 aa)、激酶活性区(186-513 aa)和羧基端(514-689 aa)^[6]。GRK2 的氨基端具有一个 G 蛋白信号同源域调节(regulator of G protein signaling homology, RH)区,通过结合 G $\beta\gamma$ 等蛋白发挥转膜功能^[7]。GRK2 激酶活性的改变是 GRK2 发挥多种生理和病理功能的重要条件,有研究^[8]表明 220 位的赖氨酸(Lys, K)是决定 GRK2 激酶活性的关键氨基酸位点,Lys220 突变为精氨酸(Arg, R)可使 GRK2 激酶活性丧失。GRK2 的羧基端具有 RH 区和 Pleckstrin 同源(Pleckstrin homology, PH)区,有利于其亚细胞定位和激动剂依赖的转膜,可以与游离 G $\beta\gamma$ 亚单位、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)等蛋白结合^[9-10]。目前已有许多研究表明 GRK2 表达和活性的改变与疾病的发生相关,如 GRK2 表达和活性增加在高血压、心衰以及 RA 的发生和发展中起着重要作用,而 GRK2 的表达和活性的降低与肝癌、多发性硬化症等疾病的发生密切相关^[11]。这些研究结果提示,GRK2 的活性维持在一个平衡状态是研究 GRK2 活性调节剂的主要方向。现已有多种 GRK2 活性调节剂被尝试用于治疗心力衰竭、RA 等疾病,其中帕罗西汀、Gallein、

GSK180736A 等已经进入动物试验阶段^[12-13]。

本实验在 GRK2 的羧基末端引入了 6 × His (CATCATCACCATCACCAT) 的短肽是蛋白纯化常用的标签。目前常用于蛋白纯化的标签蛋白包括 His、Myc、Flag、GST 等标签,但 Myc 重组蛋白的低 pH 洗脱条件往往会降低蛋白质的活力,所以较少用于纯化蛋白,Flag 重组蛋白的纯化成本较高,GST 标签纯化成本低但增溶能力一般。His 标签相较于 Myc、Flag、GST 等标签具有以下优势:① 标签蛋白非常小,不会影响目的蛋白质本身的结构;② 不会影响目的蛋白自身的活性;③ 便于采用固化金属离子亲和层析;④ 操作方便,纯化蛋白成本低。本实验选择 pcDNA3.1-EGFP 真核表达载体构建 His-GRK2 真核表达重组质粒,这与原核表达体系相比,虽然不能一次性获得大量的蛋白,但具有以下优势:外源性真核表达特异性强,具有翻译后加工修饰功能,使其结构、糖基化方式更接近天然蛋白,具有高活性。

获得有活性的 GRK2 蛋白是进一步研究其功能和作用机制的前提。本研究通过设计引物,利用 PCR 扩增技术得到带有 His 标签的 GRK2 基因,并采用分子克隆手段将 GRK2 基因连接到 pcDNA3.1-EGFP 真核表达载体上,成功构建 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 真核表达质粒,通过酶切鉴定和测序结果证明 pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 构建成功。再利用瞬时转染技术将其转染入 HEK 293T 中,通过 Western blot 及考马斯亮蓝染色验证 GRK2 在真核细胞 293T 中正确表达。通过 His pull down 的方法鉴定出 GRK2 与 EP4 的相互作用,具有生物学活性,为后续研究 GRK2 的作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Mendoza-Viveros L, Cheng A H, Cheng H M. GRK2: putting the brakes on the circadian clock[J]. *Receptors Clin Investig*, 2016, 3(1): 10.
- [2] Han C C, Li Y F, Wang Y, et al. Development of inflammatory

- immune response-related drugs based on G protein-coupled receptor kinase 2[J]. *Cell Physiol Biochem* 2018, 51(2): 729-45.
- [3] Jia X Y, Chang Y, Wei F, et al. CP-25 reverses prostaglandin E4 receptor desensitization-induced fibroblast-like synoviocyte dysfunction via the G protein-coupled receptor kinase 2 in autoimmune arthritis[J]. *Acta Pharm Sin* 2019, 40(8): 1029-39.
- [4] Yang X Z, Li S S, Zhao Y J, et al. GRK2 mediated abnormal transduction of PGE2-EP4-cAMP-CREB signaling induces the imbalance of macrophages polarization in collagen-induced arthritis mice[J]. *Cells* 2019, 8(12): 1596.
- [5] Han C C, Li Y F, Zhang Y W, et al. Targeted inhibition of GRK2 kinase domain by CP-25 to reverse fibroblast-like synoviocytes dysfunction and improve collagen-induced arthritis in rats[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(7): 1835-52.
- [6] Han C C, Ma Y, Li Y F, et al. Regulatory effects of GRK2 on GPCRs and non-GPCRs and possible use as a drug target[J]. *Int J Mol Med* 2016, 38(4): 987-94.
- [7] Lodowski D T, Pitcher J A, Capel W D, et al. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gβγ[J]. *Science* 2003, 300(5623): 1256-62.
- [8] Sarnago S, Roca R, de Blasi A, et al. Involvement of intramolecular interactions in the regulation of G protein-coupled receptor kinase 2[J]. *Mol Pharmacol* 2003, 64(3): 629-39.
- [9] Fu X B, Koller S, Abd A J, et al. Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(11): 7738-55.
- [10] Pitcher J A, Tesmer J J, Freeman J L, et al. Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 34531-4.
- [11] Han C C, Liu Q, Zhang Y, et al. CP-25 inhibits PGE2-induced angiogenesis by down-regulating EP4/AC/cAMP/PKA-mediated GRK2 translocation[J]. *Clin Sci (Lond)* 2020, 134(3): 331-47.
- [12] Powell J M, Ebin E, Borzak S, et al. Hypothesis: paroxetine, a G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) inhibitor reduces morbidity and mortality in patients with heart failure[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2017, 22(1): 51-3.
- [13] Wang Q T, Zhang L L, Wu H X, et al. The expression change of β-arrestins in fibroblast-like synoviocytes from rats with collagen-induced arthritis and the effect of total glucosides of paeony[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2): 511-6.

Eukaryotic expression, purification and activity identification of human His-GRK2 recombinant protein

Jiang Liping, Chen Luying, Kuai Jiajie, Wang Fengling, Li Hao, Guan Yanling, Ma Yang, Han Chenchen, Wei Wei
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,
Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education,
Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct a human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) eukaryotic expression

慢性感染阶段弓形虫包囊在小鼠脑组织的动态病理变化

吴梦云^{1,2} 蔡茹¹ 李伊凡², 汪学龙² 姚湧²

摘要 目的 探究弓形虫慢性感染期间弓形虫包囊在感染小鼠脑部各区域的分布与病理变化对小鼠行为与神经精神的影响。方法 使用弓形虫 Prugniald 株灌胃小鼠,记录感染小鼠病情;分别在小鼠感染的第10、30、40、90、120、160天取感染小鼠脑组织,分离出海马下丘脑、前额叶、纹状体和小脑区域,HE染色观察并记录各感染区域的包囊数量和神经病理变化。结果 弓形虫感染小鼠出现竖毛、弓背等症状,在第40天最为显著,随后逐渐恢复,遗留偏瘫和原地打转等症状;在各时间节点,弓形虫包囊的数量均以海马下丘脑最多,前额叶和纹状体次之,小脑最少;弓形虫包囊的直径随着时间推移均呈增大趋势。慢性感染期间,在脑组织各区域均

可观察到弓形虫包囊噬神经现象等特异性病理表现,上述弓形虫脑炎的病理改变在第40天达到顶峰,后逐渐恢复,至第120天增至刺激峰,随后逐渐恢复。结论 弓形虫慢性感染期间的行为和神经精神症状与弓形虫包囊在感染小鼠脑部的定位分布有一定的相关性,并呈现动态变化。

关键词 弓形虫;包囊;脑组织;病理变化;HE染色

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0184-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.002

弓形虫是一种专性细胞内寄生虫,1909年由法国学者发现^[1]。弓形虫全球分布,几乎可以在所有哺乳动物细胞中入侵并复制^[2]。据估计,全球三分之一的人口被弓形虫感染,且大多数人都处于慢性感染阶段^[3]。弓形虫以“特洛伊木马”的模式通过血脑屏障定植于大脑^[4],在慢性感染阶段,弓形虫在神经元内以包囊形式存在,形成免疫豁免^[5]。寄生在中枢神经系统的弓形虫通过基因调控宿主的神经免疫^[6],分泌效应因子和改变宿主神经信号通路^[7]的途径导致宿主脑部神经生理变化,影响宿主的精神和行为,但却可促进自身的生命周期^[8]。此前的研究^[9]表明,弓形虫对大脑特定区域具有明显

2022-12-27 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2019A0264); 安徽理工大学2021年研究生创新基金项目(编号: 2021CX2121)

作者单位: ¹ 安徽理工大学医学院, 淮南 232001

² 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 吴梦云,女,硕士研究生;

蔡茹,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: lxherh@aliyun.com;

姚湧,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yaoyong@ahmu.edu.cn

system. **Methods** The primers were designed, and the His-GRK2 target gene was amplified by PCR using the Pans-EGFP-GrK2 (full-length) gene as the template. The His-GRK2 target gene was connected to the pcDNA3.1-EGFP eukaryotic expression vector. The pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 plasmid was transfected into HEK 293T cells. 48 h later, the expression of GRK2 protein was detected by Western blot, and the GRK2 protein was purified by nickel chelated magnetic bead method. The purification of GRK2 protein was detected by Coomassie bright blue staining and Western blot, and the activity of GRK2 protein was detected by His pull down. **Results** The results of double enzyme digestion and sequencing showed that pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. Western blot analysis showed that the molecular weight of GRK2 protein was about 80 ku, indicating that GRK2 protein was successfully expressed in HEK 293T cells ($t = 6.433$, $P = 0.003$). GRK2 protein was purified by nickel chelated magnetic beads. His pull down experiment results showed that GRK2 was bound to prostaglandin E2 receptor 4 (EP4), suggesting that GRK2 protein had biological activity ($t = 13.5$, $P = 0.0002$). **Conclusion** The pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 eukaryotic expression plasmid was correctly sequenced and the GRK2 recombinant plasmid was successfully constructed. The GRK2 recombinant plasmid was successfully expressed in eukaryotic cells HEK 293T and the protein expressed was biologically active.

Key words G protein coupled receptor kinase 2; HEK 293T cells; eukaryotic expression; protein purification; activity identification