

钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 质粒的构建和表达及其与 Ca_v1.2通道结合的鉴定

王红梅^{1,2}, 王祥卉¹, 张文竹³, 何蕊¹, 廖天佐⁴, 高青华^{1,4}, 郝丽英¹

(1. 中国医科大学药学院药物毒理学教研室, 沈阳 110122; 2. 赤峰市医院药剂科, 内蒙古 赤峰 024000; 3. 中国医科大学继续教育学院综合办公室, 沈阳 110001; 4. 中国医科大学生命科学院发育细胞生物学教研室, 沈阳 110122)

摘要 目的 构建钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 长片段的融合蛋白质质粒, 表达、提取、纯化, 并鉴定其与 Ca_v1.2 通道蛋白的结合。方法 将提取的 pGEX-6p-1/CaMK II 长片段质粒转化到原核大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 摇床培养箱中培养 12 h, 添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷, 促进 GST 融合蛋白的表达。采用 DTT 联合超声破碎法, 谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B (GS-4B) 分离、纯化 GST-CaMK II 长片段后, 经过 PreScission 蛋白酶处理, 切除 GST 标签, 得到 CaMK II 长片段蛋白。采用 15% SDS-PAGE 鉴定 CaMK II 长片段蛋白的分子量和相对纯度; 采用 Bradford 方法测定纯化后蛋白的浓度; 采用 pull-down 结合 Western blotting 鉴定其与 Ca_v1.2 通道蛋白的结合能力。结果 测序结果表明, CaMK II 长片段构建成功。通过 DTT 联合超声破碎法, 得到了较高纯度和浓度的长片段 CaMK II 蛋白, 并能够与心肌 Ca_v1.2 钙通道末端 CT1 蛋白结合。结论 本研究成功构建了 CaMK II 长片段钙调蛋白激酶融合蛋白质质粒, 提取、纯化了能够与 Ca_v1.2 通道蛋白结合并具有生物活性的 CaMK II 长片段蛋白, 为深入研究 CaMK II 蛋白的功能奠定了基础。

关键词 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II; 质粒构建; 分离; 纯化; pull-down

中图分类号 R96 文献标志码 B 文章编号 0258-4646(2025)01-0001-04

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250109.1101.002>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.01.001

Construction and expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II plasmid and identification of Ca_v1.2 channel binding

WANG Hongmei^{1,2}, WANG Xianghui¹, ZHANG Wenzhu³, HE Rui¹, LIAO Tianzuo⁴, GAO Qinghua^{1,4}, HAO Liying¹

(1. Department of Pharmaceutical Toxicology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, China; 2. Pharmacy Department, Chifeng Municipal Hospital, Chifeng 024000, China; 3. General Office, Continuing Education College, China Medical University, Shenyang 110001, China; 4. Department of Developmental Cell Biology, School of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract Objective To construct a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) long-fragment fusion protein plasmid; investigate the expression, extraction, and purification of CaMK II; and identify its binding to the Ca_v1.2 channel. **Methods** The extracted pGEX-6p-1/CaMK II long-fragment plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 receptor cells and cultured in a shaking incubator for 12 h. Isopropyl β-D-thiogalactoside was added to promote GST fusion protein expression. Next, the GST-CaMK II long fragment was isolated and purified with GS-4B using dithiothreitol (DTT) combined with ultrasonic crushing. After treatment with the PreScission protease, the GST label was removed to obtain the CaMK II long-fragment protein. The molecular weight and relative purity of the CaMK II long-fragment protein were determined using 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentration of the purified protein was determined using the Bradford method. The binding ability of the CaMK II long-fragment protein to the Ca_v1.2 channel protein was evaluated using the pull-down method combined with Western blotting. **Results** The sequencing results showed that the CaMK II long fragment was successfully constructed. A CaMK II long-fragment protein with high purity and concentration was obtained using DTT combined with ultrasonic crushing. This protein can bind to the CT1 protein of cardiac Ca_v1.2 calcium channel. **Conclusion** In this study, we successfully constructed a CaMK II long-fragment plasmid. The CaMK II long-fragment protein was extracted and purified, and was determined to bind to Ca_v1.2 channel proteins and exhibit biological activity. Collectively, this study provides a basis for further study of the function of CaMK II.

Keywords Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; plasmid construction; extraction; purification; pull-down

基金项目: 国家自然科学基金 (32271160); 辽宁省科学技术计划 (2022JH2/20200069); 赤峰市自然科学基金 (SZR24098); 中国医科大学大学生创新创业训练计划 (S202410159081)

作者简介: 王红梅 (1989-), 女, 主管药师, 博士研究生。

通信作者: 高青华, E-mail: qhgao@cmu.edu.cn

收稿日期: 2024-06-13

网络出版时间: 2025-01-09 15:39:21

钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II, CaMK II) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能够将底物磷酸化, 并修饰苏氨酸/丝氨酸等重要氨基酸, 从而调节心脏的各种生理和病理过程^[1]。CaMK II 的靶蛋白种类多样, 因而具有广泛的调控作用。CaMK II 作用的多样性与其组织分布和亚细胞定位有关。在哺乳动物中, CaMK II 由 4 种不同的亚型 (α 、 β 、 γ 、 δ) 组成, 具有多种剪接体, 虽然高度同源, 但因组织分布不同, 具有不同的生理功能。CaMK II δ 主要表达在心肌^[2], CaMK II α 和 CaMK II β 主要表达在中枢神经系统, CaMK II γ 在多种组织和细胞中均有表达^[3-4]。CaMK II 的活性可被直接或间接调节, 多样化的 CaMK II 信号通路有助于广泛调节多种生物活动。CaMK II 最初因其在记忆中的作用被广泛关注^[4], 后来研究发现其过度激活在心脏疾病的发生中具有核心作用。因此, CaMK II 有望成为治疗心血管疾病的关键靶点。

本课题组前期采用膜片钳单通道 inside-out 技术, 发现 CaMK II 可以消除 CaM 对 L 型钙通道 run-down 现象调节的时间依赖性, 用 CaMK II 处理 Ca_v1.2 通道的 C 末端片段 (CT1) 后, CaM 与 CT1 的结合能力增加, 说明 CaMK II 磷酸化可提高 CaM 与 Ca_v1.2 通道的结合能力, 进而调节 L 型钙通道功能。目前研究表明, CaMK II 在心肌肥厚^[5]、心律失常^[6]、心力衰竭^[7]、缺血性心脏病和扩张性心肌病等的发生和发展中都具有重要作用。提取高纯度的 CaMK II 在相关心血管疾病研究具有重要意义, 但应用常规技术手段提取 CaMK II 蛋白的效果一直不佳。

本研究通过改进酶切温度和时间, 成功构建长片段 CaMK II 重组质粒并制备纯化长片段 CaMK II 蛋白, 采用 SDS-PAGE 鉴定纯化后 GST-CaMK II 和 CaMK II 蛋白分子量和相对纯度; 采用 pull-down 结合 Western blotting 检测长片段 CaMK II 与 Ca_v1.2 通道的结合能力, 为研究 CaMK II 与钙通道 Ca_v1.2 的相互作用及其分子机制奠定了重要的生物学基础, 为进一步研究 CaMK II 在心血管疾病中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pGEX-6P-1、BL-21 感受态细胞, 由

武汉金开瑞生物工程有限公司合成和提供; DL-二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)、氨苄西林 (ampicillin, Amp)、溶菌酶 (lysozyme, LYS)、膜再生液, 购自北京索莱宝科技有限公司; 三色预染蛋白 marker, 购自上海雅酶生物医药科技有限公司。CaMK II 抗体, 购自英国 abcam 公司; Ca_v1.2 抗体, 购自美国 Omnimabs 公司; 山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗, 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.2 长片段 CaMK II 重组质粒的提取和鉴定

将 pGEX-6p-1/CaMK II 重组质粒 TOP10 (60 μ L) 细菌接种在含 50 μ g/mL Amp 的 1 \times LB 液体培养基中, 摇床培养箱中培养 12 h。10 000 g 离心 1 min, 收集菌液。参照 SanPrep 柱式质粒试剂盒说明书提取质粒, 测定质粒 DNA 浓度, 将质粒 DNA 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 应用 PubMed 网站的 BLAST 软件比对重组质粒同源性。

1.3 BL21 感受态细胞的转化

将 pGEX-6P-1/CaMK II 质粒转入 100 μ L 大肠杆菌 BL21 中, 冰上静置 30 min。42 $^{\circ}$ C 水浴 45 s, 快速放回冰上, 静置 2 min。搅拌混匀, 在 37 $^{\circ}$ C、摇床转速为 200 r/min 下复苏 60 min。5 000 r/min 离心 1 min, 取菌液 50 μ L 均匀涂于含 50 μ g/mL Amp 的 1 \times LB 固体培养基上。在 37 $^{\circ}$ C 细菌培养箱中培养 12~16 h^[8]。

1.4 重组质粒 pGEX-6P-1/CaMK II 的诱导和表达

将重组质粒 pGEX-6P-1/CaMK II 成功转入大肠杆菌 BL21 后, 加入 200 mL 无菌 1 \times LB 培养液, 同时加入 200 μ L Amp (50 mg/mL), 在 37 $^{\circ}$ C、摇床转速为 110 r/min 下振荡过夜。测定菌液光密度, 待 600 nm 波长处光密度值为 0.6~1.0 时, 加入 IPTG 进行诱导, 在 37 $^{\circ}$ C、摇床转速为 130 r/min 下振荡 4 h。

1.5 CaMK II 蛋白的提取

重组蛋白诱导表达 4 h 后, 将 200 mL 菌液分装到 50 mL 无菌离心管中, 配平, 4 000 r/min 离心 10 min 后弃掉上清, 留取沉淀。将沉淀用 PBS 重悬, 加入 100 μ L LYS (0.1 mg/mL) 和 100 μ L DTT (1 mol/L), 充分混匀后冰上静置 30 min, 7 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 超声处理 20 min。16 000 g 离心 10 min, 将上清与 PBS 洗过 2 遍的 300 μ L GS-4B 在 4 $^{\circ}$ C 孵育, 摇晃过夜^[9]。次日早晨, 1 000 r/min 离心, 弃上清, GS-4B 用 5 mL Tris 缓冲液 1 000 r/min 离心 4 次, 转移至 2 mL EP 管中, 加入 295 μ L Tris 缓冲液和 4 μ L

PreScission蛋白酶,室温旋转8 h,800 r/min离心3 min后取上清,得到长片段CaMK II 蛋白。

采用相同技术,从膜蛋白Ca_v1.2中提取出GST-CT1融合蛋白。在重悬液中加入LYS和DTT,冰上静置30 min,超声处理后,加入15% N-月桂酰肌氨酸,再次冰上静置30 min,但不进行PreScission蛋白酶酶切步骤,用于后续鉴定与CaMK II 的结合。

1.6 纯化后蛋白纯度和浓度的测定

1.6.1 CaMK II 纯度的测定:取制备的GST-CaMK II 与酶切后CaMK II 蛋白各10 μL,加入5 μL 1×上样缓冲液,100 °C金属浴5 min后,15% SDS-PAGE电泳80 V 30 min、110 V 90 min后,考马斯亮蓝染色1 h,根据蛋白条带位置,比对蛋白marker条带位置,评估目的蛋白纯度。

1.6.2 CaMK II 蛋白浓度的测定:以牛血清白蛋白作为标准蛋白,绘制标准曲线,计算CaMK II 蛋白浓度。

1.7 CaMK II 蛋白活性的鉴定

采用pull-down结合Western blotting检测CaMK II 生物学活性。GS-4B 连接的GST-CT1 (40 μL) 加入0.7 μmol/L CaMK II ,加入CaCl₂至终浓度为2 mmol/L,

同时加入Tris缓冲液补齐至300 μL体系中,于旋转培养器4 °C结合4 h;反应后用含2 mmol/L Ca²⁺的Tris缓冲液1 000 r/min离心GS-4B 3遍。再向其中加入10 μL 1×上样缓冲液,金属浴100 °C、5 min后,经SDS-PAGE电泳后电转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,TBST洗膜5 min×3次后,Ca_v1.2 抗体(1 : 1 000) 4 °C孵育过夜,次日TBST洗膜7 min×3次,二抗(1 : 50 000) 室温孵育1 h,TBST洗膜7 min×3次,ECL显影。用膜再生液孵育20 min后,用新鲜配制的5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗膜5 min×3次后,CaMK II 抗体(1 : 2 000) 4 °C孵育过夜,次日TBST洗膜5 min×3次后,二抗(1 : 50 000) 室温孵育1 h,TBST洗膜5 min×3次,ECL显影。

2 结果

2.1 重组质粒DNA测序结果

DNA测序结果显示,CaMK II 重组质粒含有1 614 bp DNA片段。通过BLAST软件比对,同源率为100%,读码框架一致,且插入方向一致,表明重组质粒构建成功。见图1。



图1 重组质粒DNA序列鉴定

Fig.1 DNA sequence identification of recombinant plasmid

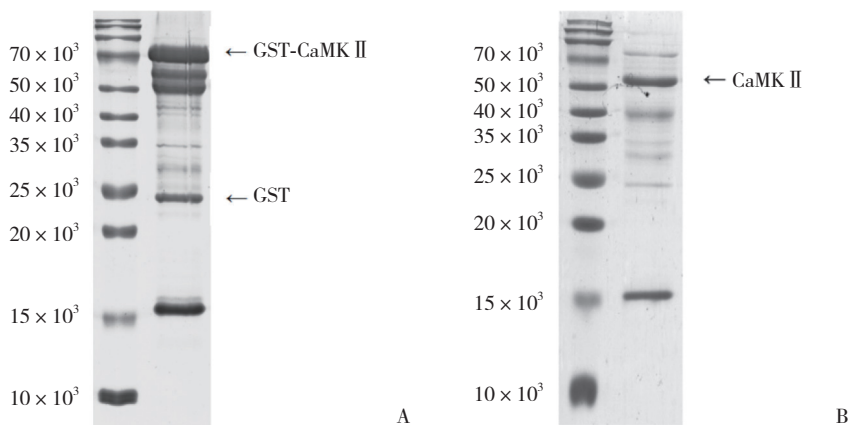
2.2 纯化后CaMK II 蛋白分子量和纯度

CaMK II 蛋白表观分子量约为 54×10^3 。在表观分子量约为 80×10^3 (GST-CaMK II)和 54×10^3 (CaMK II)处出现明显条带,与预期结果相符,表明已经成功

获得纯度较高的CaMK II 蛋白。见图2。

2.3 纯化后蛋白浓度测定

采用牛血清白蛋白作为标准蛋白,绘制标准曲线,计算CaMK II 蛋白浓度为0.59 mg/mL。



A, purified GST-CaMK II ; B, purified CaMK II after PreScission GST treatment.

图2 SDS-PAGE电泳鉴定GST-CaMK II 和CaMK II 蛋白

Fig.2 GST-CaMK II and CaMK II proteins identified using SDS-PAGE

2.4 CaMK II 蛋白活性

将纯化后的CaMK II 蛋白与Ca_v1.2通道蛋白上 GST-CT1蛋白片段相互作用,电化学发光在表观分子量约54 × 10³处出现明显条带,见图3。说明纯化后的CaMK II 蛋白与钙通道蛋白CT1结合能力强,提示具有生物学活性。

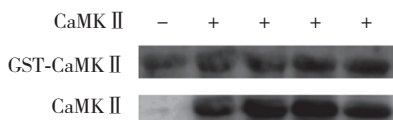


图3 Western blotting检测CaMK II 与GST-CT1结合

Fig.3 Binding of CaMK II to GST-CT1 detected using Western blotting

3 讨论

CaMK II 是一类由Ca²⁺调控的蛋白激酶,当细胞内Ca²⁺增加时,Ca²⁺结合型钙调蛋白(Ca²⁺/CaM)与CaMK II 结合,将假底物从催化结构域中移出,使CaMK II 能够接触底物和ATP,进而发挥其活性。CaMK II 的瞬时激活是可逆的:当细胞内Ca²⁺浓度降低时,CaM脱钙并与CaMK II 解离;当细胞内Ca²⁺浓度持续升高时,CaMK II 持续激活,这一过程常发生在心动过速或心肌动作电位延长期间。此时CaMK II 第287位的苏氨酸(T287,CaMK II α中为T286)发生自身磷酸化,T287自身磷酸化通过2种机制使CaMK II 可以不受Ca²⁺浓度的调节:(1)由于CaMK II 与CaM的亲和力增加了数千倍,从而增加了与CaM的持续结合;(2)CaMK II 也通过降低假底

物与催化结构域的亲和力,促进自身磷酸化。此外,CaMK II 也可由氧化应激、亚硝化应激以及高血糖等刺激而激活^[10]。CaMK II 通过磷酸化下游多种靶点^[11](如兰尼定受体、肌浆网钙ATP酶、受磷蛋白等)参与心肌细胞兴奋收缩偶联。因此,CaMK II 被认为是心律失常、心肌肥厚和心力衰竭的核心靶蛋白。

心脏中CaMK II 的亚型主要为CaMK II δ^[12]。目前已经确定,CaMK II δ经过选择性剪接后有11个剪接变体(CaMK II δ1~ CaMK II δ11),其中CaMK II δ2/C、CaMK II δ3/B和CaMK II δ9的研究最多。本研究提取的CaMK II 蛋白不仅在54 × 10³处有明显条带,在40 × 10³和15 × 10³处也有明显条带,推测这与CaMK II 的剪接体存在形式有关。

CaMK II 是细胞内的重要调节因子,与多种心血管疾病及其他系统疾病密切相关。本研究成功构建了CaMK II 质粒,该质粒能够很好地在大肠杆菌中表达,经过GS-4B beads纯化后,具有较高的纯度、浓度以及生物活性。纯化后的CaMK II 可用于后续Ca²⁺/CaM/CaMK II 调节机制的研究,为进一步阐明CaMK II 相关疾病的发病机制和提供精准的治疗策略奠定了生物学基础。

参考文献:

[1] BHATTACHARYYA M, KARANDUR D, KURIYAN J. Structural insights into the regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12 (6): a035147. DOI: 10.1101/cshperspect.a035147.
 [2] ZHANG J, LIANG R, WANG K, et al. Novel CaMK II -δ inhibitor