

β_2 肾上腺素受体基因在Sf9细胞中的表达及纯化

王 健^{1,2}, 刘 媛¹, 张俊花¹, 韩正政¹, 兰凤英¹

(1.河北北方学院农林科技学院, 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:通过密码子优化、昆虫杆状病毒表达系统(Bac-to-Bac)构建、表达条件筛选及镍柱亲和层析, 研究 β_2 肾上腺素受体(β_2 adrenergic receptor, β_2AR)基因(β_2AR)在昆虫细胞Sf9中的高效表达及纯化策略。方法: 人工合成改造后的 β_2AR 基因, 将其克隆至转移载体pFastBac1中, 构建重组杆状病毒表达质粒pFastBac1- β_2AR' , 转染昆虫细胞Sf9, 优化表达条件, 采用镍离子亲和层析法纯化重组蛋白并进行活性鉴定。结果: 适宜的表达条件为感染细胞使用的感染复数5、感染后表达时间48 h, Western blot分析显示在47 kD左右处出现清晰的特异性条带, 与预期结果一致。纯化的受体蛋白纯度大于90%, 活性鉴定结果显示该受体蛋白可特异性吸附盐酸克伦特罗、沙丁胺醇及莱克多巴胺3种 β 激动剂的酶标记物, OD值分别为0.983、0.947和0.912。结论: 本研究实现了 β_2AR 受体在Sf9细胞中的表达, 且纯化后的受体蛋白保持了较好的 β 激动剂亲和活性, 为利用 β_2AR 受体开展 β 激动剂多残留快速检测技术提供了依据。

关键词: β_2 肾上腺素受体; 杆状病毒表达载体; Sf9细胞; 表达; 纯化

Expression and Purification of β_2 Adrenergic Receptor in Sf9 Cells

WANG Jian^{1,2}, LIU Yuan¹, ZHANG Junhua¹, HAN Zhengzheng¹, LAN Fengying¹

(1. College of Agriculture and Forestry, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products of CAAS, Key Laboratory of Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: Codon optimization, construction of recombinant baculovirus system (Bac-to-Bac), screening of optimal expression conditions and Ni-chelating affinity chromatography were used to develop an efficient strategy for the expression and purification of β_2 adrenergic receptor (β_2AR) gene in Sf9 cells. The modified β_2AR gene was artificially synthesized and cloned to the transfer vector pFastBac1 to construct the recombinant baculovirus expression plasmid pFastBac1- β_2AR' . Then Sf9 cells were transfected with the recombinant plasmid. The expression conditions were optimized. The expression product was purified by Ni-NTA-affinity chromatography and its ligand binding affinity was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the optimal expression conditions were as follows: multiplicity of infection (MOI) of the infected cells, 5; and expression time, 48 h. In the Western blot analysis, a single band with an apparent molecular mass of 47 kD appeared as expected. After purification, the recombinant protein was more than 90% pure. The ligand binding assay indicated that it could specifically bind to all three horseradish peroxidase (HRP)- β -agonists: clenbuterol, salbutamol, ractopamine, and the OD values obtained from ELISA were 0.983, 0.947 and 0.912, respectively. In this paper, the efficient expression of β_2AR in Sf9 cells was accomplished. Furthermore, the purified receptor protein remained better binding affinity to β -agonists, laying a foundation for developing a rapid multi-residue assay for the determination of β -agonists with β_2AR .

Key words: β_2 adrenergic receptor; baculovirus expression vector; Sf9 cells; expression; purification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720006

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0034-06

引文格式:

王健, 刘媛, 张俊花, 等. β_2 肾上腺素受体基因在Sf9细胞中的表达及纯化[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 34-39. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720006. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-09-24

基金项目: 河北北方学院博士启动基金项目(201706); 公益性行业(农业)科研专项(201203094)

作者简介: 王健(1980—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全快速检测技术。E-mail: xuanyuanjian0228@126.com

WANG Jian, LIU Yuan, ZHANG Junhua, et al. Expression and purification of β_2 adrenergic receptor in Sf9 cells[J]. Food Science, 2017, 38(20): 34-39. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201720006. <http://www.spkx.net.cn>

目前, β 激动剂(俗称“瘦肉精”)的违禁添加仍然是影响我国畜产品安全及养殖业健康发展的热点问题之一。特别是多种 β 激动剂的混合使用及新型结构类似物的层出不穷,充分暴露出了现行检测技术对该类违禁物的多残留高通量分析及未知物筛查存在严重不足。

现有针对 β 激动剂检测的标准方法及研究报道主要分为确证检测技术和快速检测技术两大类。确证分析方法常见的有高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)^[1]、气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[2-3]、液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[4-5]和四极杆-飞行时间质谱(quadrupole-time of flight, Q-TOF)^[6-7]等,但其均存在着仪器设备昂贵、操作步骤复杂等固有缺点。近年来快速检测方法顺应市场需要和监管需求异军突起,将传统的抗原抗体识别体系与新兴的材料或信号放大机制相结合形成了多种方法,如酶联免疫吸附(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)^[8-9]、胶体金免疫层析^[10-11]、电化学^[12-13]、量子点^[14]和传感器^[15]等,但它们往往只能检测有限的特定目标物,使用范围仍有很大的局限性。

基于受体的快速检测方法是利用受体与配体间的特异性吸附,从而完成具有相同生物学效应的一类目标物的类特异性测定,可实现对 β 激动剂类违禁物的多残留检测和非目标物分析。 β_2 肾上腺素受体(β_2 adrenergic receptor, β_2 AR)是构建 β 激动剂受体检测方法的关键识别元件,鉴于天然 β_2 AR在生物体内的极低丰度和分离难度,近些年体外表达已成为获得该受体的主流方法^[16]。 β_2 AR是具有7次跨膜 α 螺旋结构的膜蛋白^[17],影响其用于检测方法研究的难点主要集中在重组 β_2 AR受体的数量、活性及纯度等方面。国内外已有研究报道表明,通过大肠杆菌^[18]、酵母^[19]、昆虫细胞^[20]、哺乳动物细胞^[21]以及无细胞表达系统^[22]均可在体外制备具有 β 激动剂亲和活性的蛋白,但表达水平和活性强弱因宿主细胞不同而呈现出较大差异^[23]。其中杆状病毒感染的昆虫细胞草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)卵巢细胞Sf9是 β_2 AR受体最为有效的体外表达体系之一,重组蛋白不仅产量高,而且具有与哺乳动物细胞相近的蛋白活性。但国内相关报道极少,仅见Cheng Guyue等^[24]利用该表达体系对野生型 β_2 AR基因进行了表达和纯化。由于 β_2 AR基因中存在着不适于昆虫细胞表达的稀有密码子,影响了表达效果,因此本研究拟先对野生型 β_2 AR基因改造后再进行表达尝试,以求实现 β_2 AR的高效表达。

本研究首先对前期克隆得到的猪 β_2 AR基因进行改造,然后将其与转移载体pFastBac1连接,构建重组杆状病毒表达质粒并转染Sf9细胞,优化得到适宜的感染细胞感染复数(multiplicity of infection, MOI)和表达时间,采用 Ni^{2+} 亲和层析法纯化重组蛋白并进行ELISA活性分析,以期建立基于重组受体的 β 激动剂多残留快速检测方法提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪 β_2 AR基因重组克隆质粒pMD-18T- β_2 AR由笔者前期构建及所在实验室保存; Sf9细胞 中国协和医科大学基础医学研究所细胞中心。

Bac-to-Bac杆状病毒表达系统(主要包括转移载体pFastBacTM1、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10 BacTM菌株、*E. coli* DH5 α 和转染试剂Cellfectin) 美国Invitrogen公司; T4连接酶 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒 美国Axygen公司; 限制性内切酶EcoR I 和Xba I 美国NEB公司; 昆虫细胞无血清培养基SF 900 II SFM 美国Hyclone公司; 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗 美国Sigma公司; His鼠源单克隆抗体、Ni-NTA树脂 美国Qiagen公司。

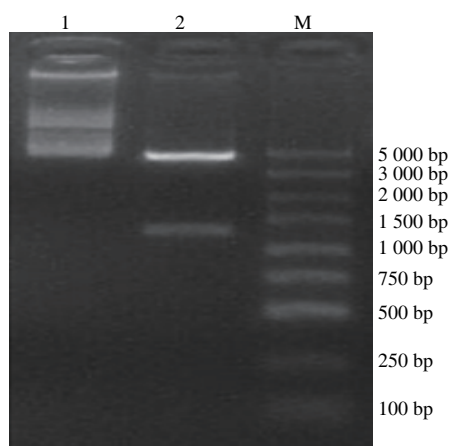
1.2 仪器与设备

9902型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 美国Applied Biosystems公司; Imaging G3凝胶成像仪 北京昊诺斯科技有限公司; Power Pac 300型DNA电泳仪、Powerpac Universal蛋白电泳仪 美国Bio-Rad公司; Multiskan MK3酶标仪 美国Thermo公司; AKTA explorer蛋白纯化系统 美国GE Healthcare公司。

1.3 方法

1.3.1 β_2 AR基因序列的改造与合成

利用ProtParam工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)对已克隆得到的猪 β_2 AR基因(GenBank登录号: KF023571.1)对应的氨基酸序列进行理化特性分析,依据昆虫细胞密码子的偏好性对其进行改造,使其适应昆虫细胞表达系统。分别在改造后基因的5'端和3'端引入限制性内切酶EcoR I 位点和限制性内切酶Xba I 位点,改造后基因由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,用1%琼脂糖凝胶电泳检测。



M. DNA分子质量标准; 1. pFastBac1- β_2AR' 质粒; 2. pFastBac1- β_2AR' 质粒双酶切产物。

图2 重组杆状病毒质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by double restriction enzyme digestion

2.3 重组杆状病毒的鉴定及转染后的细胞病变

采用病毒空斑试验测定病毒滴度, 结果显示P1病毒株滴度为 2×10^6 PFU/mL, P2病毒株滴度为 1×10^7 PFU/mL。用重组杆状病毒质粒转染Sf9细胞, 27 °C潮湿条件下孵育, 观察细胞形态变化: 转染后24 h, 细胞直径逐渐增大且变圆; 转染后24~72 h, 细胞停止增长, 细胞核显著增大; 转染后72 h, 细胞内颗粒状物增多, 部分贴壁细胞脱落甚至凋亡(图3); 以上细胞形态学变化证明重组杆状病毒质粒成功转染Sf9细胞。

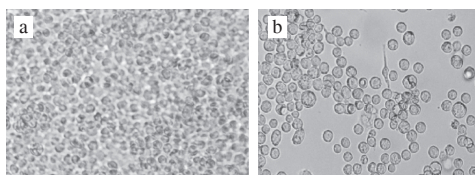
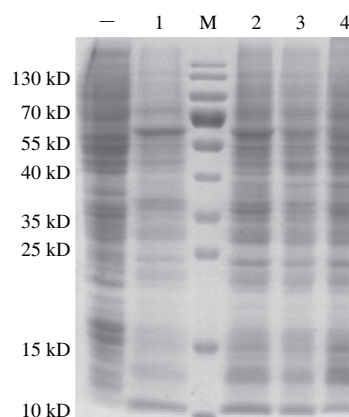


图3 正常Sf9细胞(a)及转染后72 h Sf9细胞(b)显微镜图(×400)

Fig. 3 Normal Sf9 cells and Sf9 cells at 72 h post transfection (× 400)

2.4 表达条件的优化及产物鉴定

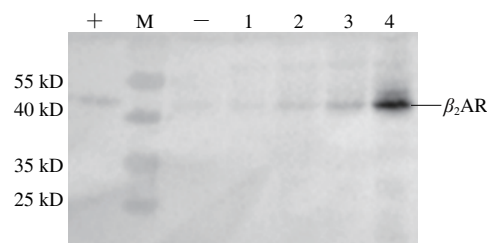
挑选两个鉴定正确的重组杆粒在6孔细胞板中转染Sf9细胞, 每个杆粒转染2个孔, 表达测试结果如图4、5所示。SDS-PAGE结果(图4)显示, 由于检测灵敏度等原因从图中无法清晰地看到目的蛋白条带。Western blot进一步分析(图5)得知, 与正常的Sf9细胞相比, 两重组杆粒均在47 kD左右处出现了单一的特异性反应条带, 与预期结果一致, 且2#杆粒表达产物(3、4泳道)条带更加清晰, 因此选择2#杆粒扩增得到的P3病毒株进行表达条件优化试验。由图6可知, 第2泳道的蛋白条带最为清晰浓重, 因此筛选获得的适宜表达条件为: MOI值5、感染后表达时间48 h。



M. 蛋白质分子质量标准; —. 正常Sf9细胞; 1、2. 1#重组杆粒表达产物; 3、4. 2#重组杆粒表达产物。

图4 Sf9细胞表达产物的SDS-PAGE结果

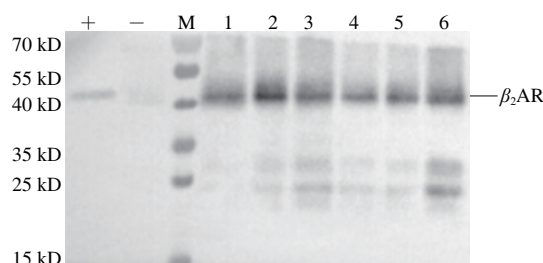
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression product from Sf9 cells



M. 蛋白质分子质量标准; +. His标签蛋白阳性对照; —. 正常Sf9细胞; 1、2. 1#重组杆粒表达产物; 3、4. 2#重组杆粒表达产物。

图5 Sf9细胞表达产物的Western blot结果

Fig. 5 Western blot analysis of expression product on Sf9 cells



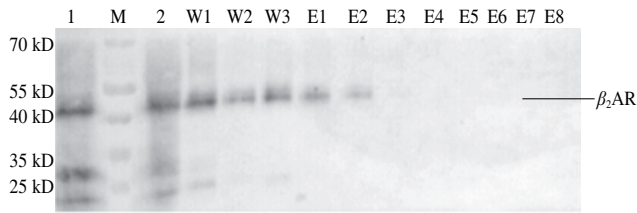
M. 蛋白质相对分子质量标准; +. His标签蛋白阳性对照; —. 正常Sf9细胞; 1~3. 表达时间为48 h, MOI分别为1、5、10时的表达产物; 4~6. 表达时间为72 h, MOI分别为1、5、10时的表达产物。

图6 表达条件优化的Western blot鉴定

Fig. 6 Western blot analysis under the optimized expression conditions

2.5 纯化蛋白的Western blot鉴定

采用镍离子亲和层析法对带有His标签的重组蛋白进行纯化, 结果如图7所示, 过柱后的洗涤液在47 kD左右出现特异性条带, 但同时伴随着弥散性杂蛋白, 说明在洗涤过程中有部分目的蛋白被洗脱。洗脱液E1和E2出现了较为清晰的目的条带, 且几乎无杂蛋白污染, 纯度大于90%, 将其收集后进行活性鉴定。



M.蛋白质分子质量标准；1.上柱前蛋白样品；2.上柱后流穿液；W1~W3.过柱后洗涤液样品；E1~E8.过柱后洗脱液样品。

图7 表达条件优化的Western blot鉴定结果

Fig. 7 Western blot analysis of the purified protein

2.6 纯化蛋白的活性鉴定

以正常的Sf9细胞裂解蛋白为对照，按照已优化的ELISA方法对纯化蛋白进行活性鉴定，结果如表1所示，纯化得到的受体蛋白与盐酸克伦特罗、沙丁胺醇及莱克多巴胺3种 β 激动剂的酶标记物均能够特异性吸附，OD值分别为0.983、0.947和0.912，表明纯化后的重组受体蛋白仍然保持了特异性识别 β 激动剂的生物活性。

表1 纯化蛋白ELISA测定结果
Table 1 Determination of the purified protein by ELISA

包被蛋白种类	OD值		
	HRP-盐酸克伦特罗	HRP-沙丁胺醇	HRP-莱克多巴胺
纯化的重组受体蛋白	0.983	0.947	0.912
正常Sf9细胞裂解蛋白	0.083	0.069	0.058

3 讨论

提高 β_2AR 表达效果的策略有很多，如密码子优化、将疏水氨基酸突变为亲水氨基酸、增加表达基因中的GC含量、摸索适宜的表达条件、不同蛋白标签的作用和有效终止子的使用等^[27]。此外，定点突变也用于提高 β_2AR 的表达水平和活性。如Warne等^[28]在Sf9细胞中表达了截短的火鸡 β_2AR ，其去除了N端的糖基化位点，并将116位的半胱氨酸突变为亮氨酸，达到了每升培养基生产0.5 mg粗蛋白的较高表达水平。本研究所采用的方法是将野生型 β_2AR 基因按照昆虫细胞的密码子偏好性进行优化，使其更适用于昆虫细胞表达系统，同时在C端增加了组氨酸标签，这些操作均在一定程度上提高了蛋白表达水平，接近了每升毫克数量级的表达量，同时组氨酸标签的添加也为后续的纯化操作提供了便利。

昆虫杆状病毒表达系统(Bac-to-Bac)具有人们所普遍接受的一些优点^[29]：可进行转录翻译后的加工修饰，使重组蛋白的生物活性接近天然蛋白；表达水平高，可同时表达多个外源基因；克隆容量大，能插入10 kb左右的外源基因；生物安全性好，在自然条件下杆状病毒对脊椎动物无致病性，也不能在脊椎动物细胞中复制表达和融合，是遗传学上最为安全的表达载体。基于以上原因，该表达系统是一种非常理想的真核表达系统。

由于昆虫杆状病毒表达系统在产量和生物活性方面的良好表现，因此它也是目前国内外用于G蛋白偶联受体(GPCRs)类膜蛋白体外表达最为常用的表达系统。本研究对影响表达水平最为显著的两个因素进行了优化，得到感染细胞使用的MOI最适为5，表明MOI过高或过低时均会对杆状病毒的生长产生抑制效应。适宜的感染时间为感染后48 h，与Cheng Guyue等^[24]所得的结果相同。

膜蛋白的纯化一直以来都被认为具有极大的挑战性， β_2AR 受体具有GPCRs共有的7次跨膜 α 螺旋结构，纯化时面临着蛋白生物活性丧失和回收率不高等难题。本研究依据重组蛋白上添加的6×His标签，采用近年来普遍使用的膜蛋白纯化方法 Ni^{2+} 亲和层析法，并对纯化蛋白进行了Western blot检测和直接ELISA活性鉴定。经典的受体活性鉴定方法多采用以¹²⁵I-CYP为放射性配基的检测法，尽管灵敏性较高，但放射性配基价格昂贵，实验条件复杂，且对操作人员健康影响较大。因此，本实验选择由王迪^[30]采用的ELISA活性鉴定方法，不仅简便安全，而且为后续建立基于受体的非放射性快速分析方法进行了初步探索。

4 结论

本研究利用昆虫杆状病毒表达系统在Sf9细胞中成功表达了密码子优化后的 β_2AR 基因，筛选得到的适宜表达条件为：感染细胞使用的MOI值5、感染后表达时间48 h。Western blot分析可知在47 kD左右出现单一清晰的特异性条带，与目的蛋白分子质量大小一致。纯化后所得受体蛋白纯度大于90%，ELISA活性鉴定结果表明该受体蛋白对盐酸克伦特罗、沙丁胺醇及莱克多巴胺3种 β 激动剂的酶标记物均呈特异性吸附，OD值依次为0.983、0.947和0.912。本实验为 β_2AR 活性蛋白的大量制备及建立基于该受体的 β 激动剂快速检测方法提供了科学依据。

参考文献：

- [1] 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 Chemistry, 2014, 145: 789-795. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.08.094.
- [2] HE L M, SU Y J, ZENG Z L, et al. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 132(3/4): 316-323. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2006.03.013.
- [3] CABAN M, STEPNOWSKI P, KWIATKOWSKI M, et al. Determination of β -blockers and β -agonists using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry-a comparative study of the derivatization step[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(44): 8110-8122. DOI:10.1016/j.chroma.2011.08.093.

- [4] ZHANG M X, LI C, WU Y L, et al. Determination of phenylethanolamine A in animal hair, tissues and feeds by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with QuEChERS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 900: 94-99. DOI:10.1016/j.jchromb.2012.05.030.
- [5] 聂建荣, 朱铭立, 连榿, 等. 液相色谱串联四极杆质谱检测猪肝猪肉中的齐帕特罗、马布特罗、班布特罗、马贲特罗[J]. *广东农业科学*, 2010, 46(4): 257-259; 268. DOI:10.16768/j.issn.1004-874x.2010.04.014.
- [6] 颜春荣, 张波, 方萍, 等. 猪肉中19种 β -受体激动剂的液相色谱串联四极杆-飞行时间质谱(Q-TOF)筛查和确证方法研究[J]. *分析实验室*, 2015, 34(1): 35-39. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2015.0008.
- [7] WANG X J, ZHANG F, DING F, et al. Simultaneous determination of 12 β -agonists in feeds by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1278: 82-88. DOI:10.1016/j.chroma.2012.12.060.
- [8] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.06.085.
- [9] BAI Y, LIU Z, BI Y, et al. Preparation of polyclonal antibodies and development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of phenylethanolamine a in urine samples[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2012, 60(46): 11618-11624. DOI:10.1021/jf3036066.
- [10] LI C H, LUO W, XU H Y, et al. Development of an immunochromatographic assay for rapid and quantitative detection of clenbuterol in swine urine[J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 725-732. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.06.021.
- [11] 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. DOI:10.1016/j.aca.2014.05.024.
- [12] YANG X, FENG B, YANG P, et al. Electrochemical determination of toxic ractopamine at an ordered mesoporous carbon modified electrode[J]. *Food Chemistry*, 2014, 145: 619-624. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.08.093.
- [13] XU W, LIU P, GUO C H, et al. Electrochemical sensor based on a carbon nanotube-modified imprinted sol-gel for selective and sensitive determination of β_2 -agonists[J]. *Microchimica Acta*, 2013, 180(11): 1005-1011. DOI:10.1007/s00604-013-1020-9.
- [14] YAO X, YAN P, TANG Q, et al. Quantum dots based electrochemiluminescent immunosensor by coupling enzymatic amplification for ultrasensitive detection of clenbuterol[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 798: 82-88. DOI:10.1016/j.aca.2013.08.029.
- [15] SUHERMAN, MORITA K, KAWAGUCHI T, et al. Highly selective and sensitive detection of β -agonists using a surface plasmon resonance sensor based on an alkanethiol monolayer functionalized on a Au surface[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67: 356-363. DOI:10.1016/j.bios.2014.08.055.
- [16] STANASILA L, PATTUS F, MASSOTTE D. Heterologous expression of G-proteincoupled receptors human opioid receptors under scrutiny[J]. *Biochimie*, 1998, 80(5/6): 563-571. DOI:10.1016/S0300-9084(00)80021-8.
- [17] 吕志良, 张惟杰. β 肾上腺素受体的结构与功能[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 19(6): 417-421.
- [18] 陈爱亮, 王迪, 白志宏, 等. β_2 AR表达纯化及其在 β_2 激动剂多残留检测中的应用[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(1): 61-63.
- [19] GERASIMOV A S, ZEINALOV O A, EL'DAROV M A, 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. DOI:10.1134/S0026893312020057.
- [20] WARNE T, CHIRNSIDE J, SCHERTLER G F, et al. Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey β_2 -adrenergic receptors for crystallization[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003, 1610: 133-140. DOI:10.1016/S0005-2736(02)00716-2.
- [21] SUBRAMANIAM K, CHEN K, JOSEPH K, et al. The 3'-untranslated region of the β_2 -adrenergic receptor mRNA regulates receptor synthesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(26): 27108-27115. DOI:10.1074/jbc.M401352200.
- [22] YANG J P, 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. DOI:10.1186/1472-6750-11-57.
- [23] TATE C G, GRISSHAMMER R. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors[J]. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14(11): 426-430. DOI:10.1046/j.1472-765x.2000.00755.x.
- [24] 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]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 459: 18-23. DOI:10.1016/j.ab.2014.05.005.
- [25] WANG J, SHE Y X, WANG M, et al. Multiresidue method for analysis of β agonists in swine urine by enzyme linked receptor assay based on β_2 adrenergic receptor expressed in HEK293 cells[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(9): e0139176. DOI:10.1371/journal.pone.0139176.
- [26] 王健. β 激动剂直接竞争酶重组受体分析技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015: 53-60.
- [27] 王迪, 杨曙明, 刘潇威. 蛋白偶联受体在不同表达系统中高水平表达的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2012, 16(6): 545-550. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2012.06.015.
- [28] WARNE T, CHIRNSIDE J, SCHERTLER G F. Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1610(1): 133-140. DOI:10.1016/S0005-2736(02)00716-2.
- [29] 宋月, 姜艳萍, 崔文, 等. 猪圆环病毒2型Cap蛋白在杆状病毒系统表达及鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43(3): 36-41.
- [30] 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: 15-16.