

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.001

· 基础研究 ·

人源酪蛋白激酶 II 催化亚基的构建及表达纯化*

柏学¹ 李彩虹¹ 佟红娜¹ 胡克平^{1Δ} 高海^{2Δ}

(1 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 北京 100193; 2 复旦大学生物医学研究所 上海 200032)

摘要 目的:构建人源 CK2 催化亚基 pET-28a(+)-hcsnk2a1 和 pET-28a(+)-hcsnk2a2 重组质粒,并进行原核表达纯化得到高纯度融合蛋白,为进一步开展 CK2 生理病理机制研究以及 CK2 作为肿瘤抑制靶点相关抑制剂的筛选和评价提供实验基础。**方法:**利用合成的人源 csnk2a1 和 csnk2a2 目的基因片段,将酶切连接得到的重组质粒经测序验证后,进行大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) / Transetta (DE3) 转化。使用合适浓度 IPTG 诱导融合蛋白的表达以得到可溶性的融合蛋白,并应用 AKTA avant 蛋白纯化仪和 Ni²⁺-NTA 预装柱进行纯化,蛋白纯度最后经 SDS-PAGE 胶分离后考马斯亮蓝染色和 Western Blot 检测鉴定。**结果:**测序结果表明 pET-28a(+)-hcsnk2a1 和 pET-28a(+)-hcsnk2a2 质粒均成功被构建;经转化诱导表达后,成功纯化得到相对分子量为 42KD 的 his-hcsnk2a1 和 38KD 的 his-hcsnk2a2 目的融合蛋白。**结论:**首次成功构建得到 pET-28a(+)-hcsnk2a1 和 pET-28a(+)-hcsnk2a2 质粒;并表达纯化得到高浓度和高纯度的 his-hcsnk2a1 和 his-hcsnk2a2 融合蛋白,为后期的蛋白功能研究和抑制剂筛选评价提供了基础。

关键词:原核表达;蛋白纯化;酪蛋白激酶 II;csnk2a1;csnk2a2

中图分类号:Q-33;Q78;Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1201-05

Construction, Expression and Purification of Human Casein Kinase II Catalytic Subunit*

BAI Xue¹, LI Cai-hong¹, TONG Hong-na¹, HU Ke-ping^{1Δ}, GAO Hai^{2Δ}

(1 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100193, China; 2 Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT Objective: Construction of human CK2 catalytic subunits pET-28a(+)-hcsnk2a1 and pET-28a(+)-hcsnk2a2 plasmids; prokaryotic expression and purification of high purity protein. To further study the physiological and pathological mechanism of CK2; as well as screening and evaluation of CK2 as tumor suppressor target related inhibitors. **Methods:** Using the synthesized csnk2a1 and csnk2a2 gene fragments, the recombinant plasmid obtained by enzyme digestion and ligation. After verification by sequencing, the plasmids were transformed into *Escherichia coli* receptor BL21 (DE3) / Transetta (DE3). And the fusion protein was induced by IPTG of appropriate concentration to obtain soluble fusion protein. AKTA avant protein purifier and Ni²⁺-NTA pre-column were used for purification. The purity of the protein was identified by Coomassie brilliant blue staining and Western Blot after SDS-PAGE gel separation. **Results:** The sequencing results showed that both pET-28a (+)-hcsnk2a1 and pET-28a (+)-hcsnk2a2 plasmids were successfully constructed. Besides, the fusion proteins of his-hcsnk2a1 and his-hcsnk2a2 were successfully purified after induction and expression. **Conclusions:** The plasmids pET-28a (+)-hcsnk2a1 and pET-28a (+)-hcsnk2a2 were successfully constructed for the first time, and the high concentration and purity of his-hcsnk2a1 (42KD) and his-hcsnk2a2 (38KD) fusion proteins were obtained, which provided the basis for the later protein function research and inhibitor screening and evaluation.

Key words: Prokaryotic expression; Protein purification; Casein kinase 2; Csnk2a1; Csnk2a2

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q78; Q814 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1201-05

前言

酪蛋白激酶 II 是一种普遍存在的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,在体内能催化多种底物的磷酸化,CK2 在进化过程中高度

* 基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(CIFMS 2016-12M-1-002)

作者简介:柏学(1995-),女,硕士研究生,主要研究方向:蛋白质复合物与疾病关系,E-mail: baixue6624@163.com

Δ 通讯作者:胡克平(1960-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:蛋白质复合物与疾病关系,E-mail: kphu@implad.ac.cn;

高海(1973-),男,博士,研究员,主要研究方向:肿瘤表观遗传学及蛋白复合物功能研究,E-mail: gaohai@fudan.edu.cn

(收稿日期:2019-10-22 接受日期:2019-11-16)

保守,在细胞中发挥增殖、分化、凋亡等重要作用^[1-3]。全酶通常是由两个催化(α 和/或 α')亚单位和两个调节(β)亚单位组成的四聚体^[4]。催化亚基CKII α 和 α' 又分别被称为csnk2a1和csnk2a2,高度同源。现研究发现各个亚基也可单独发挥其作用,游离亚单位也具有催化活性^[5]。CK2在细胞周期进程、基因表达、细胞生长、分化和胚胎发生发挥举足轻重的作用^[6,7],尤其是发现其在肿瘤细胞中明显的异常高表达^[8,9]。因此,近年来人们多关注其在肿瘤细胞生长中的影响,并希望通过相关抑制剂的使用达到肿瘤治疗的目的^[2,10]。虽然现已发现CK2作用广泛,但涉及的具体生物调节机制还需进一步探究。

为了深入研究CK2蛋白功能,我们首先对CK2催化亚基进行了原核表达纯化。在原核表达体系中,GST标签和MBP标签虽然有助于形成可溶性蛋白,更有利于后续纯化^[11-13]。但是,GST标签和MBP标签分子量都较大,在融合蛋白表达的时候,可能会影响目的蛋白的折叠导致其结构功能的改变,所以后续存在需要酶切、去除标签蛋白等问题,操作繁琐且效率低。His标签是由6个组氨酸组成,大小约只有0.8KD,所以一般不会影响目的蛋白空间结构和生理功能^[14,15]。所以本文选择了带有his标签的pET-28a(+)载体进行质粒构建,同时,为了增强融合蛋白的表达水平和可溶性,选择了能够补充稀有密码子

的Transetta(DE3)感受态细胞进行实验。

本文拟通过构建CK2催化亚基质粒,表达纯化出人源融合蛋白his-hcsnk2a1和his-hcsnk2a2,为进一步展开机制研究提供基础。如:由于CK2蛋白与肿瘤相关疾病密切相关,通过纯化得到的蛋白还可偶联CM5芯片,利用Biacore表面等离子共振技术等,通过比较化合物与偶联蛋白亲和力大小,用于研究其作为肿瘤抑制靶点的抑制剂筛选和评价,为肿瘤治疗相关研究提供有效化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

AKTA avant (GE)、HisTrap HP 1 mL (GE)、超声破碎仪(SONICS)、Transetta (DE3) 大肠杆菌感受态(全式金)、BL21 (DE3)大肠杆菌感受态(全式金)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(全式金)、DTT、PMSF、咪唑(AMRESCO)、Tris、甘油、NaCl、蛋白胨、酵母提取物、质粒小提试剂盒(天根)、his-tag抗体(华兴博创)、anti-rabbit二抗(华兴博创)、蛋白Marker、SDS-PAGE预混胶试剂盒(BioRad)、PVDF膜(BioRad)、凝胶成像系统(BioRad)、电泳槽(BioRad)、转膜槽(BioRad)、SimplyBlue™ SafeStain(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a(+)-hcsnk2a1/pET-28a(+)-hcsnk2a2质粒的构建 目的基因序列csnk2a1和csnk2a2由公司合成,用BamHI、HindIII双酶切后,连接到pET-28a(+)载体上,得到pET-28a(+)-hcsnk2a1和pET-28a(+)-hcsnk2a2质粒。

1.2.2 原核融合蛋白的预表达 pET-28a(+)-hcsnk2a1的表达:将构建好的pET-28a hcsnk2a1质粒在大肠杆菌感受态BL21(DE3)中进行转化,于5 mL LB培养基(蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L、NaCl 5 g/L)挑单克隆菌落,37℃摇菌至OD值在0.5-0.8之间,加入0.5 mmol IPTG进行诱导表达。分别在诱

导0 min、0.5 h、1 h、2 h、3 h取样500 μ L。离心,弃培养液,PBS洗一次,在沉淀中加入蛋白上样缓冲液100 μ L,98℃煮沸10分钟。SDS-PAGE胶上样检测融合蛋白的表达。

pET-28a(+)-hcsnk2a2的表达:将构建好的pET-28a hcsnk2a2质粒在大肠杆菌感受态Transetta(DE3)中进行转化,摇菌后加入1 mmol IPTG进行诱导表达,其余操作同上。

1.2.3 原核融合蛋白的纯化 融合蛋白的纯化:根据预表达诱导条件,大摇1 L菌液,IPTG诱导3 h后收菌,并用预冷PBS洗一次。将菌体沉淀用his标签结合缓冲液(20 mmol Tris·HCl、0.5 mol NaCl、20 mmol 咪唑、10%甘油,pH 7.9)重悬,另添加1 mmol DTT及1 mmol PMSF(PMSF每隔半小时补加一次),冰浴环境中超声20 kJ(超声5 s,暂停10 s)。大肠杆菌裂解液于4℃、15 k rpm条件离心30分钟,取上清再用0.22 μ m微孔滤膜过滤,用于纯化上样。

采用Ni²⁺亲和层析柱(HisTrap HP)进行纯化,运行AKTA avant蛋白纯化仪,对系统进行压力阈值、系统泵冲洗等设定。连接预装柱,先用超纯水、his标签结合缓冲液将预装柱平衡至基线平稳(约10-20倍柱体积),再依次进行上样、结合缓冲液洗涤至无非特异性结合蛋白流穿、再以含0.5 mol 咪唑的蛋白洗脱缓冲液(20 mmol Tris·HCl、0.5 mol NaCl、0.5 mol 咪唑、10%甘油,pH 7.9)进行梯度洗脱(咪唑浓度由20 mmol-500 mmol线性增加),待A280出现吸收峰时,分管收集出峰时的洗脱液,用NanoDrop测定洗脱液浓度。

待洗脱完毕后,依次用含500 mmol 咪唑的蛋白洗脱缓冲液洗脱6倍柱体积,50 mmol EDTA洗脱5-10倍柱体积进行脱镍,100 mmol NaOH进行除杂,PBS缓冲液平衡10倍柱体积,超纯水平衡10倍柱体积,100 mmol NiSO₄再生5倍柱体积,超纯水平衡10倍柱体积,最后保存在20%乙醇溶液中。

1.2.4 His-tag融合蛋白的检测 考马斯亮蓝染色:分别取未诱导、诱导后菌(菌体用PBS重悬)、少量超声破碎后的上清、沉淀(PBS重悬)、上柱后的蛋白流穿液、目标峰各管洗脱液加适量蛋白上样缓冲液,98℃煮沸10分钟,离心后上样进行SDS-PAGE胶分离,固定液(50%甲醇、10%乙酸、40%超纯水)处理1 h后,进行考马斯亮蓝染色液染色,检测蛋白表达情况和纯度。

Western Blot:取洗脱液上样进行Western Blot实验,SDS-PAGE胶分离后,以80 V、2 h为转膜条件,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜3次(10 min/次),二抗室温孵育1.5 h,EDL曝光显影。

2 结果

2.1 pET-28a(+)-hcsnk2a1质粒的构建

目的基因序列由公司合成,直接酶切连接到pET-28a(+)载体上,经基因测序验证,得到pET-28a(+)-hcsnk2a1和pET-28a(+)-hcsnk2a2质粒。

2.2 原核融合蛋白的预表达

2.2.1 pET-28a(+)-hcsnk2a1的预表达 SDS-PAGE胶分离后,经固定、考马斯亮蓝染色,如图1显示:在分子量42 KD处,目的蛋白随着诱导时间变化而增多,说明his-hcsnk2a1诱导表达成功,且在诱导3 h时能得到较大量的目的蛋白,可以作为

正式诱导表达的实验条件。

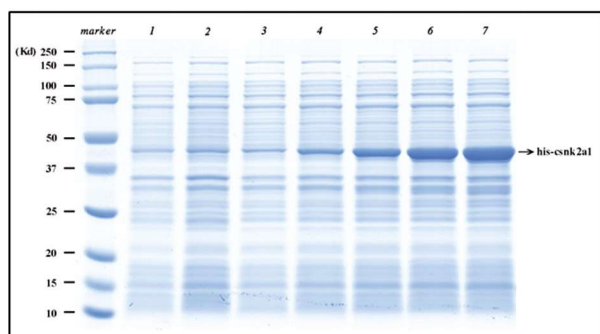


图1 pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG 不同诱导时间目的蛋白表达结果

Fig.1 The result of pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced at different time

Note: 1: pET-28a(+)*hcsnk2a1* uninduced; 2: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 3 h; 3: pET-28a(+)*hcsnk2a1* uninduced; 4: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 0.5 h; 5: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 1 h; 6: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 2 h; 7: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 3 h;

2.2.2 pET-28a(+)*hcsnk2a2* 的预表达 SDS-PAGE 胶分离后,经固定、考马斯亮蓝染色,如图 2 显示:在分子量 38 KD 处,目的蛋白随着诱导时间变化而增多,说明 *his-hcsnk2a2* 诱导表达成功,且在诱导 2-3 h 时能得到较大量的目的蛋白,可以作为正式诱导表达实验的条件。

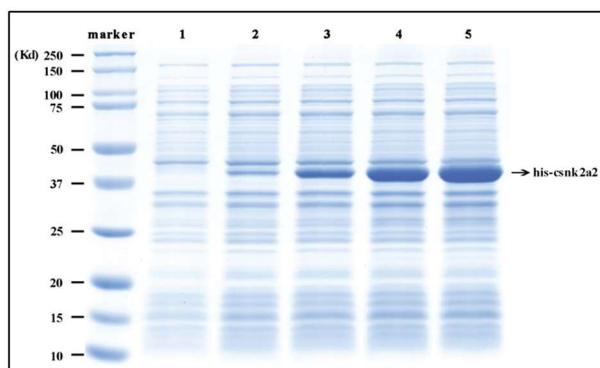


图2 pET-28a(+)*hcsnk2a2* 1 mmol IPTG 不同诱导时间目的蛋白表达结果

Fig.2 The result of pET-28a(+)*hcsnk2a2* 1 mmol IPTG induced at different time

Note: 1: pET-28a(+)*hcsnk2a2* uninduced; 2: pET-28a(+)*hcsnk2a2* 1 mmol IPTG induced 0.5 h; 3: pET-28a(+)*hcsnk2a2* 1 mmol IPTG induced 1 h; 4: pET-28a(+)*hcsnk2a2* 1 mmol IPTG induced 2 h; 5: pET-28a(+)*hcsnk2a2* 1 mmol IPTG induced 3 h;

2.3 融合蛋白的纯化与检测

2.3.1 pET-28a (+) *hcsnk2a1* 的纯化与检测 在梯度洗脱 *his-csnk2a1* 融合蛋白过程中,咪唑浓度达到 200 mmol 时,显示开始出峰,分管收集洗脱液,经 NanoDrop 简单测定蛋白浓度后,总计得到约 5 mg 蛋白(最高浓度达:1.36 mg/mL)。分别取少量超声破碎后的上清、沉淀(PBS 重悬)、上柱后的蛋白流

穿液、目标峰各管洗脱液加适量蛋白上样缓冲液,98℃煮沸 5 min,离心后上样。经 SDS-PAGE 跑胶分离后,固定、考马斯亮蓝染色,可看出目的蛋白有部分表达在裂解液上清中(图 3),且粗略判断纯化得到的蛋白的纯度不低于 95 %(图 4)。

取纯化后的 *his-csnk2a1* 蛋白液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,采用免疫印迹法进行分析,经兔源 *his* 标签抗体孵育,二抗孵育、曝光显色后,在约 42 KD 左右处有特异性蛋白条带(图 7a)。

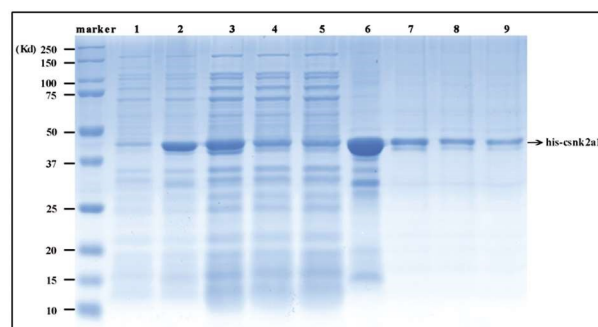


图3 pET-28a(+)*hcsnk2a1* 融合蛋白纯化

Fig.3 Purification of pET-28a(+)*hcsnk2a1* fusion protein

Note: 1: pET-28a(+)*hcsnk2a1* uninduced; 2: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 3 h; 3: the supernatant of *E. coli* lysis; 4, 5: the flow through of supernatant; 6: the precipitate of *E. coli* lysis; 7-9: different elution buffer

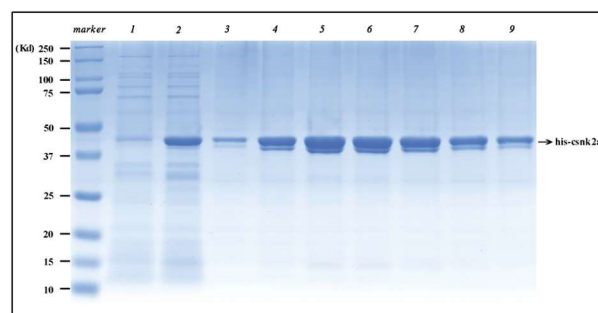


图4 pET-28a(+)*hcsnk2a1* 融合蛋白纯化

Fig.4 Purification of pET-28a(+)*hcsnk2a1* fusion protein

Note: 1: pET-28a(+)*hcsnk2a1* uninduced; 2: pET-28a(+)*hcsnk2a1* 0.5 mmol IPTG induced 3 h; 3-9: different elution buffer

2.3.2 pET-28a(+)*hcsnk2a2* 的纯化与检测 在梯度洗脱目的蛋白过程中,咪唑浓度达到 200 mmol 时,显示出峰,分管收集洗脱液。经 NanoDrop 简单测定蛋白浓度后,总计得到约 5 mg 蛋白(最高浓度达:1.66 mg/mL)。分别取少量超声破碎后的上清、沉淀(PBS 重悬)、上柱后的蛋白流穿液、目标峰各管洗脱液加适量蛋白上样缓冲液,98℃煮沸 5 min,离心后上样。经 SDS-PAGE 跑胶分离后,固定、考马斯亮蓝染色,可看出目的蛋白有部分表达在裂解液上清中(图 5),且粗略判断纯化得到的蛋白的纯度不低于 90 %(图 6)。

取纯化后的 *his-csnk2a2* 蛋白液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,采用免疫印迹法进行分析,经兔源 *his* 标签抗体孵育,二抗孵育、曝光显色后,在约 38 KD 左右处有特异性蛋白条带(图 7b)。

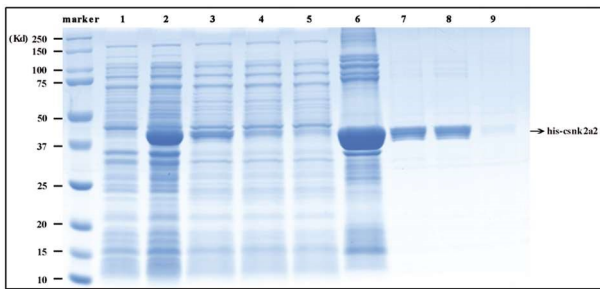


图 5 pET-28a(+)-hcsnk2a2 融合蛋白纯化

Fig.5 Purification of pET-28a(+)-hcsnk2a2 fusion protein

Note: 1: pET-28a(+)-hcsnk2a2 uninduced; 2: pET-28a(+)-hcsnk2a2 1 mmol IPTG induced 3 h; 3: the supernatant of *E. coli* lysis; 4, 5: the flow through of supernatant; 6: the precipitate of *E. coli* lysis; 7-9: different elution buffer

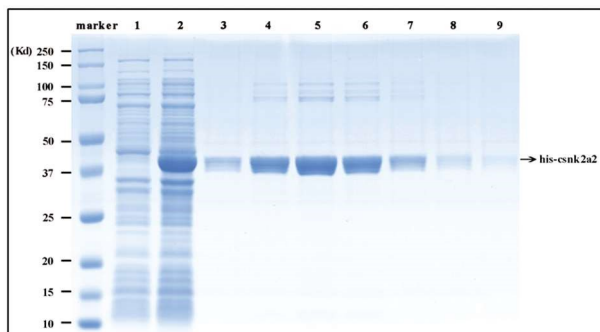


图 6 pET-28a(+)-hcsnk2a2 融合蛋白纯化

Fig.6 Purification of pET-28a(+)-hcsnk2a2 fusion protein

Note: 1: pET-28a(+)-hcsnk2a2 uninduced; 2: pET-28a(+)-hcsnk2a2 1 mmol IPTG induced 3 h; 3-9: different elution buffer

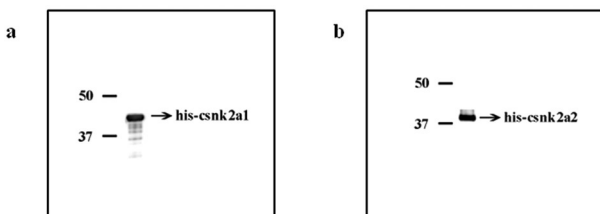


图 7 Western Blot 检测融合蛋白

Fig.7 Western Blot identify the fusion protein

3 讨论

CK2 是一种多功能蛋白激酶,长期以来被认为是一种稳定的异四聚体^[16]。CK2 在体内通过对底物的磷酸化在细胞增殖分化和凋亡、信号的转导等发挥了很大作用^[17-20],甚至跟炎症疾病通路也有密不可分的关系^[21]。有研究表明,在 CK2 α 或 CK2 β 基因敲除小鼠显示胚胎死亡,说明 CK2 在胚胎发育过程中是必不可缺的^[22,23]。此外,研究表明 CK2 可能与细胞骨架改变相关,缺乏 CK2 会导致细胞骨架蛋白质组的实质性改变,从而导致细胞骨架组成蛋白的过度表达和下调^[24,25]。此外还发现在许多肿瘤细胞中 CK2 存在转录和蛋白高水平的表达,以及激酶活性的增加,与认识到的 CK2 的普遍作用是促进细胞生长和抑制细胞凋亡相一致^[26],因此,近年来以 CK2 为靶点的抑制剂在肿瘤治疗中的相关研究受到广泛重视^[5,27,28]。CK2 在生理病理功能上的重要性不言而喻。

为了深入研究 CK2 蛋白功能,纯化得到高纯度和高浓度的 CK2 亚基的融合蛋白至关重要。但是据文献资料研究者刘新光等^[29]通过 DEAE-纤维素层析、P11 离子交换剂和肝素亲和凝胶三步法对人蛋白激酶 CK2 α 亚基进行纯化,操作繁琐且得率较低,纯化得到的目的蛋白浓度也较低。陈小文等^[30]通过对 GST-CK2 α' 融合蛋白依次进行谷胱甘肽-Sephrose 4B 柱纯化、凝血酶酶切后得到的纯 CK2 α' ,依然会产生酶切所需成本、后续如何分离 GST 标签和目的蛋白、最终得率低等相关问题。

pET-28a(+)载体本身带有 6 个组氨酸标签,通过不同咪唑浓度梯度洗脱,逐步摸索实验洗脱条件,较容易直接获得高纯度目的融合蛋白。此外,His 标签大小仅约 0.8 KD,对目的蛋白结构功能影响小,一般可以不用酶切去除,可直接用于蛋白功能研究,此纯化方法既能最大限度保证目标蛋白结构功能,又能得到较高纯度和浓度的目标蛋白用于后续实验。

因此为了拿到较高得率和纯度的 CK2 催化亚基融合蛋白,本文通过对载体构建、蛋白诱导表达条件、纯化方式的选择优化,以简便快速、低成本的方式得到高纯度和高浓度人源酪氨酸蛋白激酶催化亚基的融合蛋白。由于 his-csnk2a1 和 his-csnk2a2 仅携带一个 His 标签,其对目的蛋白功能影响较小,可直接用于后续实验研究。比如用于后续检测蛋白-小分子相互作用,需要将足够浓度和纯度的目标蛋白偶联到 Biacore 系列仪器 CM5 芯片上,通过表面等离子共振检测相互作用亲和力,筛选 CK2 抑制剂等,为相关肿瘤治疗候选药物提供了一个可行性方案。

本文首次构建了 pET-28a(+)-hcsnk2a1 和 pET-28a(+)-hcsnk2a2 原核表达质粒。纯化得到 His 标签人源酪氨酸蛋白激酶 2 催化亚基的融合蛋白:his-csnk2a1 和 his-csnk2a2,且得到的蛋白纯度和浓度都很高,为后续实验开展提供了基础。另外,也为 CK2 蛋白相关研究的其他科研工作者提供了可靠的质粒构建、蛋白表达纯化方案,有利于进一步对 CK2 进行生理病理相关研究。

此外,根据实验中考马斯亮蓝染色结果显示(图 3,5),虽然 CK2 催化亚基融合蛋白表达在菌裂解后上清液中的量明显少于在沉淀中的量,但利用菌裂解后上清液直接上柱结合填料,洗脱得到的目的蛋白总量和浓度足够满足后续实验需求。由此,在相关类似蛋白纯化实验中,即使融合蛋白更多的表达在沉淀中,只要上清液中有存在,我们依然可以采取加大菌量、取上清液直接上柱纯化,也能得到满足条件要求的目的蛋白产物。因此,本实验所探索的蛋白表达纯化方法为此类功能蛋白研究的纯化提供了一个可参考的方向。

参考文献(References)

- [1] Franchin C, Borgo C, Zaramella S, et al. Exploring the CK2 Paradox: Restless, Dangerous, Dispensable[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2017, 10(11): 1-8
- [2] Nunez de Villavicencio-Diaz T, Rabalski A J, Litchfield D W. Protein Kinase CK2: Intricate Relationships within Regulatory Cellular Networks[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2017, 10(1): 1-19
- [3] Berman J M, Mironova E, Stockand J D. Physiological regulation of the epithelial Na⁽⁺⁾ channel by casein kinase II[J]. Am J Physiol-Renal, 2018, 314(3): F367-F372

- [4] Ampofo E, Schmitt B M, Laschke M W, et al. Function of protein kinase CK2 in thrombus formation[J]. *Platelets*, 2018, 30(4): 421-427
- [5] Baier A, Galicka A, Nazaruk J, et al. Selected flavonoid compounds as promising inhibitors of protein kinase CK2 α and CK2 α' , the catalytic subunits of CK2[J]. *Phytochemistry*, 2017, 136: 39-45
- [6] Cheng Z, Gao W, Fan X, et al. Extracellular signal-regulated kinase 5 associates with casein kinase II to regulate GPIb-IX-mediated platelet activation via the PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. *J Thrombo Haemost*, 2017, 15(8): 1679-1688
- [7] Cen L-P, Liu Y-F, Ng T K, et al. Casein kinase-II inhibition promotes retinal ganglion cell survival and axonal regeneration [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 177: 153-159
- [8] Morotti A, Panuzzo C, Crivellaro S, et al. BCR-ABL inactivates cytosolic PTEN through Casein Kinase II mediated tail phosphorylation [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(7): 973-979
- [9] Song C, Pan X, Ge Z, et al. Epigenetic regulation of gene expression by Ikaros, HDAC1 and Casein Kinase II in leukemia [J]. *Leukemia*, 2016, 30(6): 1436-1440
- [10] Richter A, Roelf C, Hamed M, et al. Combined Casein Kinase II inhibition and epigenetic modulation in acute B-lymphoblastic leukemia [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 202-213
- [11] Morales L, Hernández P, Chaparro-Olaya J. Systematic Comparison of Strategies to Achieve Soluble Expression of Plasmodium falciparum Recombinant Proteins in E. coli [J]. *Mol Biotechnol*, 2018, 60(12): 887-900
- [12] Bernier S C, Cantin L, Salesse C. Systematic analysis of the expression, solubility and purification of a passenger protein in fusion with different tags[J]. *Protein Express Purif*, 2018, 152(18): 92-106
- [13] Kobe B, Raran-Kurussi S, Waugh D S. The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated[J]. *Plos One*, 2012, 7(11): e49589
- [14] Christoph Scheich V S a K B. An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography [J]. *BMC Biotechnol*, 2003, 3(12): 1472-6705
- [15] Meng L, Liu Y, Yin X, et al. Effects of His-tag on Catalytic Activity and Enantioselectivity of Recombinant Transaminases [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2019: 1-16
- [16] Kouyanou-Koutsoukou S, Baier A, Kolaitis R M, et al. Cloning and purification of protein kinase CK2 recombinant alpha and beta subunits from the Mediterranean fly *Ceratitis capitata* [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 356(1-2): 261-267
- [17] St-Denis N A, Litchfield D W. Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(11-12): 1817-1829
- [18] Mulekar J J, Bu Q, Chen F, et al. Casein kinase II alpha subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in Arabidopsis[J]. *Plant J*, 2012, 69(2): 343-354
- [19] Bhat W, Boutin G, Rufiange A, et al. Casein Kinase 2 Associates with the Yeast Chromatin Reassembly Factor Spt2/Sin1 To Regulate Its Function in the Repression of Spurious Transcription [J]. *Mol Cell Bio*, 2013, 33(21): 4198-4211
- [20] Padilla-Benavides T, Nasipak B T, Paskavitz A L, et al. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of Brahma-related gene 1 controls myoblast proliferation and contributes to SWI/SNF complex composition [J]. *J Bio Chem*, 2017, 292(45): 18592-18607
- [21] Meng J, Jiang J-J, Atsumi T, et al. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II [J]. *J Immunol*, 2016, 197(8): 3111-3119
- [22] Seldin D C, Lou D Y, Toselli P, et al. Gene targeting of CK2 catalytic subunits[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 316(1-2): 141-147
- [23] Alvarado-Díaz C P, Tapia J C, Antonelli M, et al. Differential localization of α' and β subunits of protein kinase CK2 during rat spermatogenesis[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 338(1): 139-149
- [24] Canton D A, Litchfield D W. The shape of things to come: an emerging role for protein kinase CK2 in the regulation of cell morphology and the cytoskeleton[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(3): 267-275
- [25] D'Amore C, Salizzato V, Borgo C, et al. A Journey through the Cytoskeleton with Protein Kinase CK2 [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(6): 547-562
- [26] Buontempo F, McCubrey J A, Orsini E, et al. Therapeutic targeting of CK2 in acute and chronic leukemias[J]. *Leukemia*, 2018, 32(1): 1-10
- [27] Kim H M, Jeong I, Kim H J, et al. Casein Kinase 2 Inhibitor, CX-4945, as a Potential Targeted Anticancer Agent in Gastric Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6171-6180
- [28] Janeczko M, Maslyk M, Szyzyska R, et al. Interactions between subunits of protein kinase CK2 and their protein substrates influences its sensitivity to specific inhibitors [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 356(1-2): 121-126
- [29] 刘新光, 梁念慈, 马润泉, 等. 重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基的原核表达、纯化与鉴定[J]. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2000, 16(1): 17-22
- [30] 陈小文, 刘新光, 梁景耀, 等. 人蛋白激酶 CK2 α' 亚基在大肠杆菌中的克隆、表达及其重组蛋白的纯化与性质鉴定[J]. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2004, 20(2): 176-182