

# GGPPS 多克隆抗体的制备与鉴定

王江南<sup>1,4</sup>, 丁 尧<sup>1,4</sup>, 来珊珊<sup>1,4</sup>, 陈卫波<sup>2</sup>, 余德才<sup>2</sup>, 李朝军<sup>2,3</sup>, 薛 斌<sup>2,3</sup>

- (1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)
- (2. 南京大学医学院, 江苏 南京 210093)
- (3. 江苏省医学分子技术实验室, 江苏 南京 210093)
- (4. 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 构建人香叶基香叶基二磷酸合成酶基因(*GGPPS*)原核表达载体,制备兔抗人 *GGPPS* 多克隆抗体. 利用 DNA 重组技术构建原核表达载体 pGEX-4T-*GGPPS*, 诱导表达 *GGPPS* 融合蛋白, 分离纯化该融合蛋白后, 作为免疫原免疫家兔制备多克隆抗体. 成功构建了 pGEX-4T-1-*GGPPS* 原核表达载体, 转化 Rosetta 菌株后可高效表达 *GGPPS* 融合蛋白, 成功制备 *GGPPS* 多克隆抗体, 间接 ELISA 法测定抗体效价为 1:32000, 并且抗体具有良好特异性. 成功克隆 *GGPPS* 基因并制备了特异性的兔抗人 *GGPPS* 多克隆抗体, 为进一步研究 *GGPPS* 的功能奠定了基础.

[关键词] *GGPPS*, 原核表达, 融合蛋白, 多克隆抗体

[中图分类号] Q7 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)01-0094-05

## Preparation and Identification of Polyclonal Antibodies of GGPPS

Wang Jiangnan<sup>1,4</sup>, Ding Yao<sup>1,4</sup>, Lai Shanshan<sup>1,4</sup>, Chen Weibo<sup>2</sup>, Yu Decai<sup>2</sup>, Li Chaojun<sup>2,3</sup>, Xue Bin<sup>2,3</sup>

- (1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
- (2. School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China)
- (3. Jiangsu Key Laboratory for Molecular Medicine, Nanjing 210093, China)
- (4. Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** To construct the prokaryotic expression vector of human *GGPPS* gene and prepare the specific polyclonal antibody against *GGPPS*. Construct the prokaryotic expression vector of pGEX-4T-*GGPPS* by DNA recombination technology and induce the expression of *GGPPS* fusion protein. The fusion protein was purified and injected into rabbits to produce polyclonal antibody. The prokaryotic expression vector of pGEX-4T-*GGPPS* was constructed and the antibody of *GGPPS* was obtained. The titer of the antiserum was 1:32 000. The specific polyclonal antibody against *GGPPS* was successfully prepared. The polyclonal antibodies preparation against *GGPPS* provided a good tool for us to study the function involvement of *GGPPS*.

**Key words:** *GGPPS*, prokaryotic expression, fusion protein, polyclonal antibody

香叶基香叶基焦磷酸合成酶(Geranylgeranyl diphosphate synthase, *GGPPS*), (GenBank Accession No. NM\_010282) 是短链异戊烯二磷酸合成酶家族的成员, 可催化法尼基焦磷酸(Farnesyl pyrophosphate, FPP) 与异戊烯焦磷酸(Isopentenyl pyrophosphate, IPP) 的缩合反应, 产生由 20 个碳组成的复合物: 香叶基香叶基焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGPP)<sup>[1]</sup>. 在甲羟戊酸代谢途径中, *GGPPS* 是催化 GGPP 和 FPP 合成的分支点酶<sup>[2]</sup>, 对于 C 端带有 CaaX 模区的 Ras 及 Ras 相关的小 G 蛋白的异戊二烯化修饰发挥重要作用, Ras 等小 G 蛋白经过异戊二烯化修饰后才可进行膜上定位<sup>[1]</sup>. *GGPPS* 蛋白大小为 34kDa<sup>[3]</sup>, 在人体心脏、睾丸、肌肉等组织中均有表达<sup>[3,4]</sup>. 我们的早期研究发现, *GGPPS* 可参与胰岛素信号通路调节, 即刻早期应答基因 *Egr-1* 可通过转录 *GGPPS* 促进 Ras 蛋白的异戊二烯化, 激活 MAPK/ERK 信号通路, 进而通过磷酸

收稿日期: 2012-07-23.  
基金项目: 国家自然科学基金(31171306)、江苏省自然科学基金(BK2011568)、国家自然科学基金(30700394).  
通讯联系人: 薛 斌, 博士, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: xuebintaiji@139.com

化 IRS-1 的 612 位丝氨酸使 IRS 失活,导致细胞和组织发生胰岛素抵抗<sup>[5]</sup>. Amel Dudakovic 等报道,GGPP 缺失可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移<sup>[6]</sup>,但关于 GGPPS 在迁移等功能方面的研究十分缺乏. 同时,目前市售的 GGPPS 单克隆抗体使用效果不理想,为了更好地研究 GGPPS 蛋白在细胞内的功能,本实验制备了针对人类 GGPPS 蛋白的多克隆抗体,并检测黑色素细胞瘤 B16 及具有高迁移能力的 B16BL6 的内源性 GGPPS 表达,为后续对于 GGPPS 影响细胞迁移功能的研究打下基础.

# 1 实验材料与方法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 质粒载体及宿主菌株

T/A-GGPPS 质粒,原核表达融合载体 pGEX-4T-1,大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  及 Rosetta,为本实验室常规保存.

### 1.1.2 实验动物

雄性新西兰大白兔 2 只,体重 2.0 kg ~ 2.5 kg.

### 1.1.3 实验试剂

培养基:Trypton 和 Yeast extract 购自 OXOID 公司. 质粒小量提取试剂盒,PCR 纯化回收试剂盒购自 Bioflux 公司. Glutathione-sepharose 4B fast flow 购自 Amersham 公司. Protein A/G 亲和层析凝胶购自 Roche 公司. 引物由 Invitrogen 公司合成. PCR 相关试剂购自 Takara 公司. 内切酶购自 Takara 公司. PDVF 膜购自 Roche 公司. HRP 标记羊抗兔抗体购自 Boster 公司. Actin 一抗购自 Santa Cruz 公司. 96 孔板购自 Corning 公司. 蛋白质 Marker 购自 NEB 公司,DNA Marker 购自 Takara 公司. 其他常用试剂为国产分析纯试剂. Alexa Fluor 594 标记的羊抗兔 IgG 荧光二抗购自 Invitrogen 公司.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 GGPPS 目的片段的扩增及原核表达载体的构建

以 T/A-GGPPS 克隆质粒(本实验室保存)为模版,扩增 GGPPS (GenBank Accession No. NM\_010282) 目的基因,包含 ORF 第 14 个密码子至终止密码子的 DNA 序列,目的基因长度为 865 bp,并添加酶切位点 *Bam*HI 和 *Xho*I. 引物序列如下:(划线部分为酶切位点)上游:5'-cgc gga tcc tac tta ctt cag tta cca ggt aaa caa gtg aga acc-3'(*Bam*HI),下游:5'-ccg ctc gag tta ttc att ttc ttc ttt gaa cat ctt act taa gtg ttt tac taa ggc t-3'(*Xho*I). PCR 程序设定为:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95  $^{\circ}$ C 变性 40 s,58  $^{\circ}$ C 复性 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,33 个循环以后,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 扩增产物以 1% 的琼脂糖电泳分离. 将此 PCR 产物和 pGEX-4T-1 质粒载体分别经过 *Bam*HI、*Xho*I 2 步单酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,经试剂盒割胶纯化回收,目的基因片段和载体混合后采用 T4 连接酶、10  $\mu$ L 体系(含 T4 连接酶及 10 $\times$ T4 连接缓冲液各 1  $\mu$ L)、16  $^{\circ}$ C 水浴连接过夜,连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于氨苄抗性平板筛选,重组质粒双酶切鉴定后测序分析验证.

### 1.2.2 GGPPS 融合蛋白的诱导表达

重组质粒 pGEX-4T-1-GGPPS 转化至大肠杆菌表达宿主 Rossetta,选择不同的参数条件进行诱导表达:(温度:18  $^{\circ}$ C,25  $^{\circ}$ C,30  $^{\circ}$ C,37  $^{\circ}$ C;IPTG 浓度:0.02 mmol/L,0.1 mmol/L,1.0 mmol/L;培养基选用:LB, M9-葡萄糖,M9-甘油). 最终确认的最佳诱导条件为:采用 M9-甘油培养基培养至 OD 600=1.0,在 25  $^{\circ}$ C 条件下用浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h.

### 1.2.3 SDS-PAGE 电泳分析

将菌液于 4  $^{\circ}$ C 超声波破碎,于 12 000 g/min、4  $^{\circ}$ C 离心 15 min,上清液与等体积 2 $\times$ SDS 上样缓冲液混匀后 99  $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,按照相关文献[7]制备 8% SDS 聚丙烯酰胺分离胶,恒压 80 V 电泳 0.5 h 至溴酚蓝进入分离胶,提高至 120 V 恒压电泳 1 h,分离胶用考马斯亮蓝染色后脱色,凝胶成像后保存图像并分析.

### 1.2.4 GST-GGPPS 融合蛋白的提取及纯化

采用上述优化条件进行大规模诱导表达融合蛋白,GST 融合蛋白抽提按照文献[7]的方法,略加改进. 在 6 000 g/min、4  $^{\circ}$ C 条件下离心 15 min 收集菌体,用 PBS 重悬菌体沉淀,每 g 菌体(湿重)加入 2 mL PBS,4  $^{\circ}$ C 超声波破碎,于 12 000 g/min、4  $^{\circ}$ C 离心 15 min,分别收集上清及沉淀. 上清液按照产品说明书用 Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow 进行亲和纯化,于室温结合 30 min 后 500 g/min 离心收集凝胶,PBS 洗

涤 3 次,加入等体积 GSH 洗脱缓冲液,冰上静置 10 min 后离心收集洗脱液,重复洗脱 5 次.

1.2.5 GGPPS 抗血清制备

采用新西兰大白兔,按照文献步骤制备 GGPPS 抗血清<sup>[8]</sup>. 初次免疫,使用纯化蛋白 1 mg 溶于弗式完全佐剂,皮下多点注射.2 周后,将 1 mg 纯化蛋白溶于弗式不完全佐剂,皮下多点注射加强免疫,1 周后重复加强免疫. 末次免疫后第 10 d,心脏取血 40 mL,于 37 ℃ 水浴 0.5 h,待血液凝缩,离心,在析出的血清中加入终浓度为 0.02% 的叠氮钠,储存于 4 ℃.

1.2.6 GGPPS 抗体纯化

采用亲和层析方法纯化抗血清中的抗体,按照说明加入 Protein A/G 凝胶珠子. 使用前,珠子用 PBS 洗 3 次. 每 100 μL 抗血清加入 100 μL Protein A/G 凝胶,4 ℃ 孵育 30 min,500 g/min 离心 5 min 去除上清,用 PBS 清洗珠子 3 次后,加入洗脱液,离心收集上清,即为纯化的抗体溶液.

1.2.7 GGPPS 抗体鉴定

ELISA 法测定免疫血清的效价,用纯化的 GST-GGPPS 融合蛋白包被 96 孔板,每孔 100 μL,4 ℃ 过夜后弃液体,PBST 洗涤 3 次,5% (W/V) 脱脂奶粉封闭,37 ℃ 孵育 1 h,PBST 洗涤后分别加入不同稀释度的抗血清,同时以免疫前血清作为阴性对照,37 ℃ 孵育 2 h,PBST 洗涤 5 次后加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,37 ℃ 孵育 1 h,加底物 OPD 室温显色 10 min,终止反应后,读取 492 nm 吸光值.

利用 Western Blot 免疫印记检测抗体的特异性,蛋白质样品通过 SDS-PAGE 凝胶分离后,采用湿转法转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,以制备的 GGPPS 抗体作为一抗,1:1 000 稀释后孵育,4 ℃ 过夜,PBST 洗膜,再用抗兔的 IgG-HRP 二抗室温孵育 1 h,PBST 洗膜,最后通过加入 ECL 底物进行曝光.

2 实验结果

2.1 原核表达载体的构建及鉴定

以 T/A-GGPPS 质粒为模版 PCR 扩增 GGPPS 目的片段,将目的片段插入 pGEX-4T-1 载体(图 1A),所得阳性克隆质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后,得到约 865 bp 的释放片段(图 1B),经单菌落扩大培养后提取质粒,经通用引物双向测序,证实序列正确,原核表达载体构建成功,命名为 pGEX-4T-GGPPS 质粒.

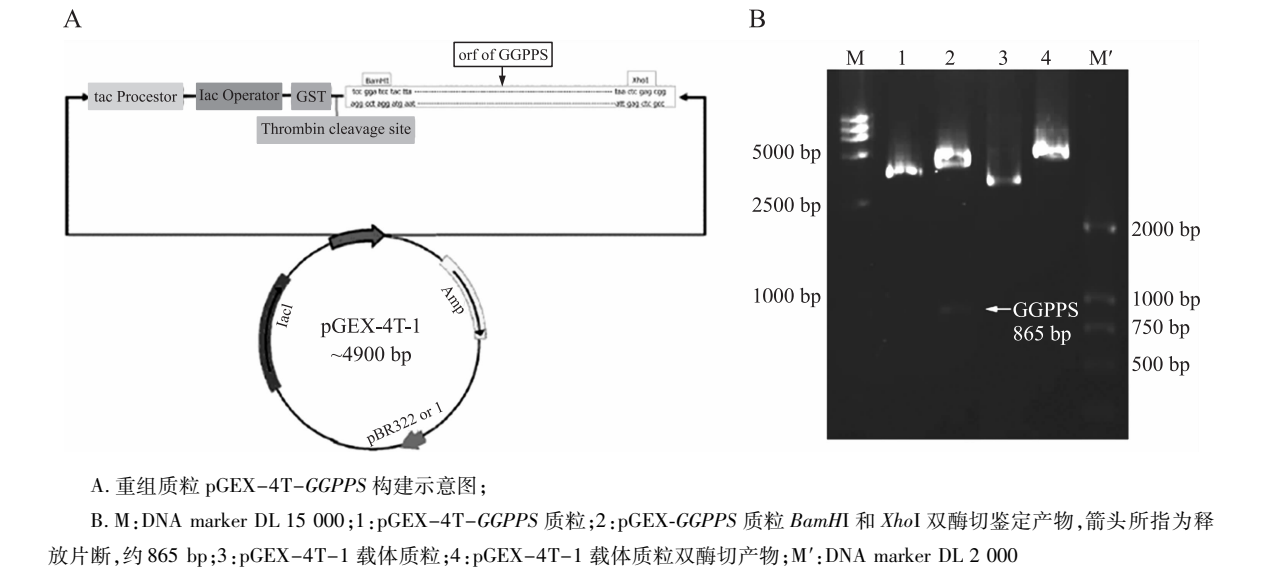


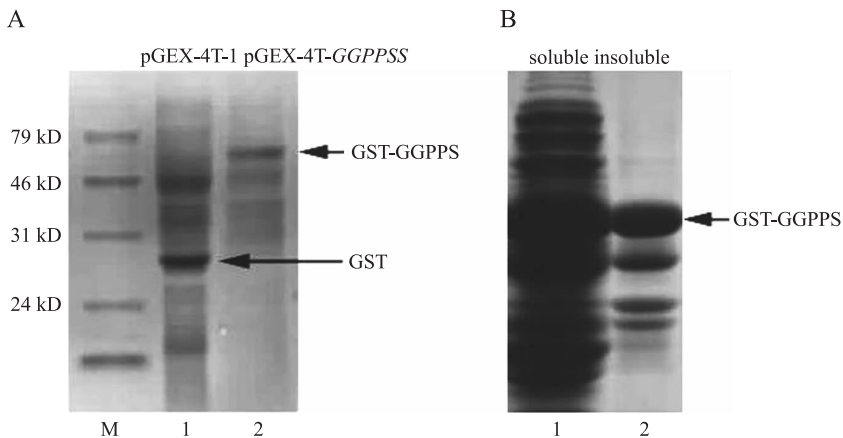
图 1 pGEX-4T-GGPPS 的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of pGEX-4T-GGPPS

2.2 融合蛋白的诱导表达

将作为对照组的 pGEX-4T-1 空载质粒以及实验组 pGEX-4T-GGPPS 表达质粒分别转化入 Rosetta 宿主菌株,采用 M9-甘油培养基培养至 OD<sub>600</sub> = 1.0,在 25 ℃ 条件下用浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h 以获得最佳诱导效果,SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示,GST-GGPPS 融合蛋白条带大小约为 60kD(图 2A),

与理论值一致. 然后将含有 pGEX-4T-GGPPS 质粒的 Rosetta 菌按照上述最佳诱导条件经过 IPTG 大量诱导表达,SDS-PAGE 分析结果显示,上清液中 GST-GGPPS 融合蛋白得率较高(图 2B).

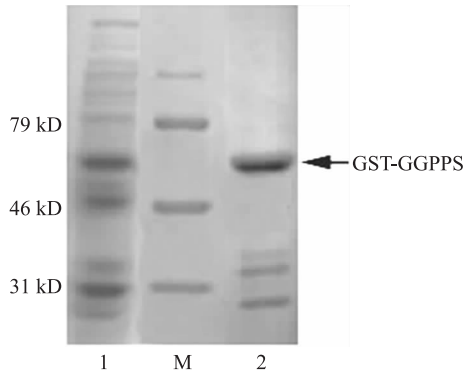


A. 1: 含有 pGEX-4T-1 空载质粒的 Rosetta 菌经 0.1 mmol/L IPTG 小剂量诱导表达所得菌体裂解液总蛋白;2: 含有 pGEX-4T-GGPPS 质粒的 Rosetta 菌经 0.1 mmol/L IPTG 小剂量诱导表达所得菌体裂解液总蛋白;M: 蛋白质 Marker  
B. 1: 含有 pGEX-4T-GGPPS 质粒的 Rosetta 菌经过 0.1 mmol/L IPTG 大量诱导表达所得菌体上清液总蛋白;2: 含有 pGEX-4T-GGPPS 质粒的 Rosetta 菌经过 0.1 mmol/L IPTG 大量诱导表达所得菌体沉淀中总蛋白

图 2 GST-GGPPS 融合蛋白表达  
Fig. 2 Expression of GST-GGPPS fusion protein

2.3 融合蛋白纯化及效价测定

利用 Glutathione-sepharose 4B fast flow 凝胶离心亲和层析法获得 GST-GGPPS 融合蛋白洗脱液,SDS-PAGE 凝胶电泳分析显示纯化所得蛋白条带较为单一,目的蛋白含量足以达到实验要求(图 3). ELISA 法测得所制备 GGPPS 多克隆抗体的效价接近于 1:32 000(图 4).



1: IPTG 诱导表达融合蛋白后菌体裂解液总蛋白;M: 蛋白质 Marker;2: IPTG 诱导表达的融合蛋白亲和层析纯化后所得蛋白

图 3 GST-GGPPS 融合蛋白亲和层析纯化  
Fig. 3 Purification of GST-GGPPS fusion protein by affinity chromatography

2.4 GGPPS 在黑色素细胞瘤细胞株中的表达

用所制备的抗体检测黑色素细胞瘤细胞系 B16 和 B16BL6 的内源性 GGPPS 的表达,Western Blot 分析结果证明制备的 GGPPS 抗体能够特异性识别细胞内源性 GGPPS 蛋白(图 5),而且目的蛋白条带单一,抗体特异性良好.

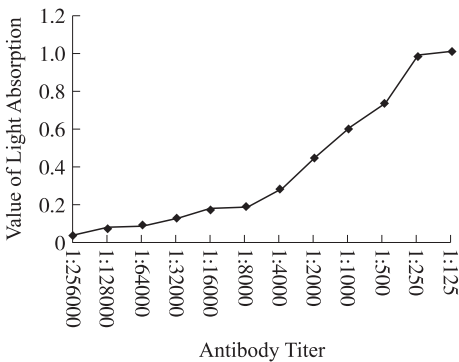


图 4 ELISA 法测定 GGPPS 抗体效价  
Fig. 4 Determination of antibody titer by ELISA

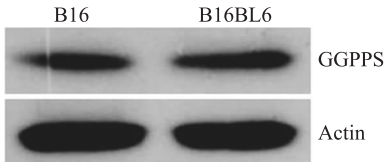


图 5 Western Blot 法检测 GGPPS 抗体特异性  
Fig. 5 Western blot analysis of the specificity of GGPPS antibody

3 讨论

蛋白的翻译后异戊二烯化修饰对于蛋白间的相互作用及蛋白的膜上运输起关键作用,并参与细胞生

长、分化、骨架系统、膜泡运输等重要生理过程<sup>[9]</sup>. 细胞内许多行使重要生理功能的蛋白会发生异戊二烯化修饰,如 G 蛋白异源三聚体亚基以及 lamins<sup>[9]</sup>,特别是作为分子开关的小 G 蛋白家族<sup>[10]</sup>. 蛋白的异戊二烯化是通过 C 末端半胱氨酸残基与 FPP 或 GGPP 的共价结合来实现的<sup>[11]</sup>. GGPPS 介导一分子 IPP 与一分子 FPP 缩合反应为 GGPP,是 GGPP 合成的关键分支点酶<sup>[1,2]</sup>,可作为蛋白异戊二烯化研究的重要靶点.

目前对于 GGPPS 的生物学功能尚未得到明确阐述,为了方便更好地研究 GGPPS 的功能,本实验制备了兔抗人 GGPPS 多克隆抗体. 在原核表达载体制备实验中,我们经过生物信息学分析发现,虽然人类 GGPPS 蛋白亲水性很好,但是序列前 13 个密码子内集中出现多个稀有密码子,会极大地限制外源蛋白的表达效率,而融合蛋白的表达并不需要外源序列具有起始密码子,所以我们决定在目的片段扩增时去除 GGPPS 的前 13 个密码子以提高目的蛋白的表达效率,并且在 GST-GGPPS 融合蛋白的诱导实验中我们改进了诱导温度、时间及 IPTG 浓度等相关因素,大大提高了目的蛋白的表达效率.

本实验利用原核表达的 GGPPS 蛋白免疫雄性新西兰大白兔,制备了高效价的 GGPPS 多克隆抗体,Western Blot 结果表明其可以特异性地识别细胞内的 GGPPS 蛋白,可以有效应用于后续研究.

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Zhao Y, Yu L, Gao J, et al. cDNA cloning, chromosome mapping and expression characterization of human geranylgeranyl pyrophosphate synthase[ J ]. Science in China Series C; Life Sciences, 2000, 43( 6 ) : 613-622.
- [ 2 ] Vicent D, Maratos-Flier E, Kahn C R. The branch point enzyme of the mevalonate pathway for protein prenylation is overexpressed in the ob/ob mouse and induced by adipogenesis[ J ]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20( 6 ) : 2158-2166.
- [ 3 ] Ericsson J, Greene J M, Carter K C, et al. Human geranylgeranyl diphosphate synthase: isolation of the cDNA, chromosomal mapping and tissue expression[ J ]. Journal of Lipid Research, 1998, 39( 9 ) : 1731-1739.
- [ 4 ] Casey P J, Seabra M C. Protein prenyltransferases[ J ]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271( 10 ) : 5 289-5 292.
- [ 5 ] Shen N, Yu X, Pan F Y, et al. An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism[ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286( 61 ) : 14508.
- [ 6 ] Dudakovic A, Tong H, Hohl R J. Geranylgeranyl diphosphate depletion inhibits breast cancer cell migration[ J ]. Investigational New Drugs, 2011, 29 : 912-920.
- [ 7 ] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[ M ]. Woodbury, New York: CSHL Press, 2001.
- [ 8 ] Kothari H, Kumar P, Singh N. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production against a novel drug resistance gene of Leishmania donovani clinical isolate[ J ]. Protein Expression and Purification, 2006, 45( 1 ) : 15-21.
- [ 9 ] McTaggart S. Isoprenylated proteins[ J ]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63( 3 ) : 255-267.
- [ 10 ] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins[ J ]. Physiological Reviews, 2001, 81( 1 ) : 153-208.
- [ 11 ] Lobell R B. Prenylation of Ras GTPase superfamily proteins and their function in immunobiology[ J ]. Advances in Immunology, 1998, 68 : 145-189.

[ 责任编辑: 黄 敏 ]