

# GABARAP 克隆表达及其抗体的制备与应用

李雪旎<sup>1</sup>, 韩亮<sup>1</sup>, 王芳<sup>2</sup>, 黄世思<sup>1</sup>, 张慧<sup>2</sup>, 常智杰<sup>1</sup>

1 清华大学医学院 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084

2 北京师范大学生命科学院 生物医学研究所, 北京 100875

**摘要:** GABARAP(GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein)是最新发现的与 GABA<sub>A</sub>受体 $\gamma 2$ 亚基胞内区有相互作用的蛋白, 目前的研究结果表明它可能是通过与微管相互作用辅助 GABA<sub>A</sub>受体向细胞膜上运输并使受体在膜上聚集。本文中用 PCR 方法扩增出编码人 GABARAP(hGABARAP)的 cDNA 片段, 然后分别克隆到真核表达载体 pcDNA6/HA 和谷胱甘肽转移酶(GST)融合蛋白表达载体 pGEX4T2 中。将后者导入大肠杆菌 BL21 中, 经过 IPTG 诱导后用谷胱甘肽偶联的 Sepharose-4B 柱子纯化出融合蛋白 GST-hGABARAP。以此蛋白作为抗原免疫家兔制备抗 GABARAP 的抗血清, 并用 GST-hGABARAP 偶联的 NHS-activated Sepharose 4 柱子纯化抗体。纯化的抗体可以用于真核细胞中过量表达 hGABARAP 的 Western 和免疫染色检测。结果表明, 过量表达的 hGABARAP 在真核细胞核和细胞质中都有表达, 部分集中于核周区域。

**关键词:** GABARAP, GST 融合蛋白, 抗体

## Cloning and Expression of Human GABARAP and Preparation of Anti-GABARAP Antibodies

Xueni Li<sup>1</sup>, Liang Han<sup>1</sup>, Fang Wang<sup>2</sup>, Sersur Ng<sup>1</sup>, Hui Zhang<sup>2</sup>, and Zhijie Chang<sup>1</sup>

1 School of Medicine, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 Biomedical Research Institute, Life Science College, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

**Abstract:** GABARAP, a microtubule-associated protein, is identified to interact with GABA<sub>A</sub> receptor. Anchoring of the GABA<sub>A</sub> receptor to GABARAP helps to cluster the receptor at the synaptic termini and to mediate fast synaptic transmission. GABARAP may mediate interaction of gephyrin with the GABA<sub>A</sub> receptor to stabilize clusters by forming multimeric structures. Furthermore, GABARAP and gephyrin may play more of a role in receptor sorting and transport to the cell surface than in anchoring to the cytoplasm, because at inhibitory synapses GABARAP appears to associate with transport vesicles rather than the cell surface. The association of GABARAP with NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor), a protein involved in intracellular vesicle transport, supports this hypothesis. We cloned cDNA encoding full-length human GABARAP by nested PCR and inserted it into eukaryon expression vector pcDNA6HA and GST fusion protein expression vector pGEX4T2. The recombinant plasmid pGEX4T2-hGABARAP was transformed into *E. coli* BL21, from which GST-hGABARAP fusion protein was purified after IPTG induction by affinity chromatography with glutathione Sepharose-4B column. The antiserum against GABARAP was generated by immunizing rabbits with the purified GST-hGABARAP and was purified with GST-hGABARAP coupled NHS-activated Sepharose 4 column. The purified poly-

**Received:** May 23, 2007; **Accepted:** July 3, 2007

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30530420) and Tsinghua-Yuyuan Medical Science Research Foundation (No. 202400005-6).

**Corresponding author:** Zhijie Chang. Tel: +86-10-62785076; Fax: +86-10-62773624; E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30530420)和清华-裕元医学科学研究基金(No. 202400005-6)资助。

clonal antibody was effective for Western blotting and immunostaining. The hGABARAP was located both in the cytoplasm and nucleus with an abundant distribution around the peripheral nucleus.

**Keywords:** GABARAP, GST fusion protein, anti-hGABARAP antibodies

$\gamma$ -氨基丁酸 A 型(Gamma aminobutyric acid A, GABA<sub>A</sub>)受体是中枢神经系统内最重要的抑制性神经递质受体, 苯二氮<sup>+</sup>卓类、巴比妥类和神经类固醇等都作用于 GABA<sub>A</sub> 受体进而发挥其镇静、催眠、抗惊厥等作用。其配体 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)在脑组织中广泛存在, 具有神经递质、神经分化剂、代谢中间产物等多项功能<sup>[1]</sup>。GABA<sub>A</sub> 受体是异源五聚体, 共有 5 种亚基, 每种亚基又有不同的亚型( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\rho$ 1-2), 多数受体含有 2 个 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基, 1 个 $\gamma$ 亚基<sup>[2]</sup>。GABA<sub>A</sub> 受体相关蛋白(GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein, GABARAP)是 1999 年首次利用酵母双杂交技术作为 GABA<sub>A</sub> 受体 $\gamma$ <sub>2</sub> 亚基胞内区的相互作用蛋白从人脑 cDNA 文库中被筛选出来并克隆得到的<sup>[3]</sup>。GABARAP 全长 117 个氨基酸, 约 14 kD, 在进化上很保守。氨基酸序列比较显示其与微管结合蛋白的轻链3(MAP/LC3)有较高的同源性(31%相同, 64%相似), 而且其蛋白质特性与很多微管结合蛋白(MAP)相似, 如生理条件下带正电(等电点 9.6), 氨基端有多个基本氨基酸, 羧基端呈酸性等。

目前的研究结果发现, GABARAP 可能通过与微管的结合, 并且介导 Gephyrin 与 GABA<sub>A</sub> 受体的相互作用, 进而协助受体在膜上的聚集<sup>[4,5]</sup>。GABARAP 还可以定位在转运小泡, 并与参与蛋白质向膜运输过程的重要因子 NSF(Nethylmaleimide sensitive fusion protein)存在相互作用, 这又暗示了 GABARAP 可能参与了受体由细胞质向膜上的运输<sup>[6]</sup>。近期研究结果又表明 GABARAP 可以与转铁蛋白受体相互作用<sup>[7]</sup>, 而且在除脑之外的其它组织中均有广泛的分布<sup>[8]</sup>, 推测 GABARAP 可能具有着普遍的协助受体进行生命活动的功能。

为了进一步研究 GABARAP 的功能, 本文通过 PCR 方法克隆了 GABARAP 的编码区并构建了其真核和原核表达载体, 纯化得到 GST-hGABARAP 融合蛋白并作为抗原免疫家兔, 所得抗血清经纯化后置备其多克隆抗体, 应用此抗体检测了 GABARAP 在哺乳动物 COS7 细胞中的分布。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL21, 293T 及 COS7 细胞, 真核表达载体 pcDNA6/HA 及 GST 融合蛋白表达载体 pGEX4T2 为本室保存, 人脑 cDNA 文库购自 Clontech 公司。限制性内切酶及工具酶购自 NEB 公司, DNA 纯化回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 抗 HA 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品, 纯化蛋白用 glutathione-Sepharose 4B Resin, 纯化抗体用 NHS-activated Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow 及 ECF 蛋白印记法检测试剂盒购自 Pharmacia 公司。细胞培养用 DMEM 培养基, FBS(胎牛血清), NCS(新生牛血清)及转染用 Transfectin2000 购自 GIBCO BRL 公司, 转染试剂 Tfx-20 购自 Promega 公司。免疫染色用 TRITC 标记的山羊抗鼠或兔 IgG, DAPI 及封闭用牛血清购自北京中山公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR 扩增:

根据 NCBI 数据库公布的人 GABARAP(hGABARAP)的 cDNA 序列设计 PCR 引物。目前已经发现了 3 个 hGABARAP 同源基因, 分别被命名为 GABARAPL1, GABARAPL2 和 GABARAPL3, 其编码区与 GABARAP 同源性都很高而且氨基端和羧基端的 DNA 序列几乎完全相同。为了得到特异性的 GABARAP 的序列, 设计了两对引物进行槽式 PCR。外侧引物 primer1/2 位于 GABARAP 编码区之外与其他三个同源基因的同源性最低的区域。正向引物位于 GABARAP cDNA 序列第 123 bp 处, 反向引物位于第 726 bp 处。内侧引物 primer3/4 分别位于编码区氨基端和羧基端, 覆盖基因全长。引物序列为外侧引物对 primer1: 5' ACCCCACCTTCTGCCCTC3', primer2: 5' TCCTTCCCAAGTCACACAC3'; 内侧引物对 primer3: 5' TATAGGATCCATGAAGTTCCAGTACAAGGAG3', primer4: 5' TATAGAATTCTCATTTCCCATAGACACTCTC3'。primer3 引入 *Bam*H 酶切位点, primer4 引入 *Eco*R 酶切位点。第一轮 PCR

反应参数如下: 94°C, 30 s; 50°C, 45 s; 72°C, 1 min; 30 个循环。产物稀释 20 倍取 1 mL 作为模板进行二次 PCR, 反应参数如下: 94°C, 30 s; 53°C, 45 s; 72°C, 1 min; 30 个循环。

### 1.2.2 PCR 产物的克隆及序列测定:

二次 PCR 产物经回收后用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切经与同样酶切的 pcDNA6/HA 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选有氨苄抗性的克隆测序鉴定。

### 1.2.3 pGEX4T2-hGABARAP 表达载体的构建:

用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶将插入 pcDNA6 载体中的 GABARAP cDNA 切出, 与经同样酶切的 pGEX4T2 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选有氨苄抗性的克隆进行质粒小提并鉴定。

### 1.2.4 GST-hGABARAP 融合蛋白的诱导表达和纯化:

将 pGEX4T2-hGABARAP 转入大肠杆菌 BL 21, 挑取克隆接种至含氨苄青霉素的 LB 培养基, 37°C 活化过夜, 再以 2% 比例接种至新鲜含氨苄青霉素的 LB 培养基, 培养至  $OD_{600}=0.5$  时加入 IPTG 至终浓度 0.5  $\mu$ mol/L, 诱导 4 h 后, 离心收集菌体, 加入样品处理液, 煮沸 5 min, 而后进行 SDS-PAGE 分析。大量富集细菌培养物裂解液的上清, 用 glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化得到 GST-hGABARAP 融合蛋白。

### 1.2.5 抗 GABARAP 抗体的制备与纯化:

将纯化的 GST-hGABARAP 作为抗原与弗氏佐剂混匀后皮下多点免疫家兔, 获得抗血清, ELISA 检测效价为 1:25 600。将 2 mg GST-hGABARAP 蛋白于 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 中透析过夜, 与经 1 mmol/L HCl 洗涤 NHS-activated Sepharose 4(1 mL)混合过夜,

0.1 mol/L Tris·Cl (pH8.0) 封闭后用 0.1 mol/L Tris·Cl (pH8.0) 和 1 mmol/L HAc (pH3.4) 交替清洗柱子, PBS 清洗平衡。抗血清上柱混合过夜, PBS 清洗平衡后, 以 0.1 mol/L 甘氨酸 (pH2.7) 洗脱。

### 1.2.6 转染及 Western 检测:

实验所用 293T 细胞用 Tfx-20 转染, COS7 细胞用 Transfectin2000 转染。转染 48 h 后, 裂解细胞。裂解缓冲液成分: 80 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.5% NP-40。取 10  $\mu$ L 细胞裂解液跑 SDS-PAGE, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上进行 Western 分析。加入抗体于 37  $^{\circ}$ C 孵育, 一抗二抗各 1 h, 三抗 40 min。最后加入碱性磷酸酶底物显色, Storm (Pharmacia) 扫描显像。

### 1.2.7 免疫染色:

将 COS7 细胞接种至铺有盖玻片的六孔板, 转染 24 h 之后, 用 PBS-4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 而后用 PBS-0.3% TritonX-100 处理 10 min, PBS-10% 牛血清室温封闭 1 h。将盖玻片取出, 一抗(稀释于 PBS-2% 牛血清)室温孵育 1 h, 二抗 TRITC-山羊抗鼠或兔 IgG 闭光室温孵育 1 h 并用 DAPI 复染细胞核, 以甘油封片, 激光共聚焦显微镜 (Olympus BX-61) 拍照。

## 2 结果

### 2.1 hGABARAP 全长 cDNA 的 PCR 扩增及克隆

以人脑 cDNA 文库为模板, 经第一轮 PCR 扩增, 得到约 600 bp 的片段(图 1a), 第二轮 PCR 扩增后, 得到约 320 bp 的片段, 与预期大小一致(图 1b)。将该片段克隆到 pcDNA6/HA 载体上(图 1c), 以 T7 启

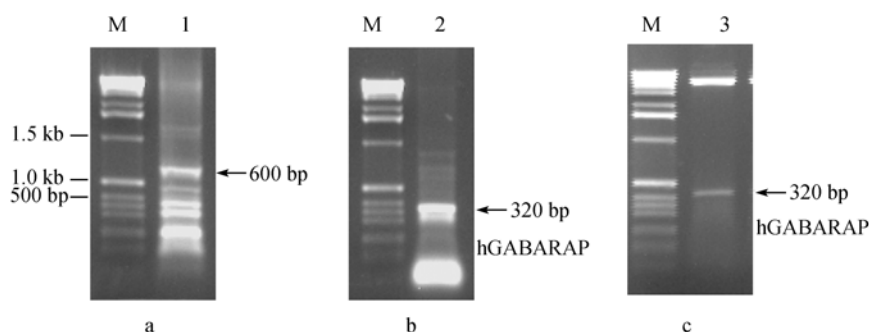


图 1 槽式 PCR 克隆 hGABARAP 全长及 pcDNA6/HA-hGABARAP 的酶切鉴定

Fig. 1 Nested PCR of hGABARAP and enzyme digestion of recombinant plasmid pcDNA6/HA-hGABARAP  
M: DNA marker; 1: products of the first cycle of PCR; a 600 bp DNA fragment is acquired. 2: products of the second cycle of PCR; indicated 320 bp DNA fragment is hGABARAP cDNA. 3: *Bam*H and *Eco*R digestion of recombinant plasmid pcDNA6/HA-hGABARAP

动子为引物进行的测序分析表明, 我们得到了正确的编码 hGABARAP 蛋白的 cDNA 序列。5 端连接 HA 标签, 3 端引入终止密码子, 而且没有错误碱基掺入及缺失突变的发生。

## 2.2 重组 GST-hGABARAP 抗原的表达与纯化

将 pGEX4T2 和 pGEX4T2-hGABARAP 分别导入大肠杆菌 BL21, 用 0.5  $\mu\text{mol/L}$  IPTG 诱导, 4 h 后对全菌裂解液进行 SDS-PAGE 分析, 结果含有 pGEX4T2 空载体的对照菌经诱导后在 26 kD 处出现特异带, 为 GST 蛋白, 含有 pGEX4T2-hGABARAP 的菌株在 40 kD 处有外源蛋白产生(图 2), 大小与 GST-hGABARAP 融合蛋白预期分子量一致。取 200 mL 培养菌裂解液上清(约 20 mL), 经过 glutathione-Sepharose 4B 柱子亲和层析纯化, 获得约 10 mg GST-hGABARAP 蛋白(图 2)。

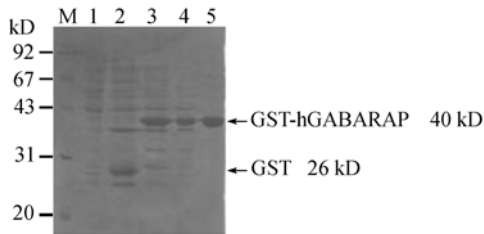


图 2 GST-hGABARAP 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

### Fig. 2 SDS-PAGE analysis of GST-hGABARAP protein

M: protein MW marker; 1: total lysate of un-induced *E. coli* transformed with pGEX4T2; 2: total lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2; 3: total lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2-hGABARAP; 4: supernatant of the lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2-hGABARAP; 5: purified GST-hGABARAP protein

## 2.3 抗 GABARAP 抗体的制备和纯化

用纯化的 GST-hGABARAP 抗原皮下多点免疫家兔, 获得抗 GABARAP 的抗血清, ELISA 检测效价为 1 : 25 600。抗血清经纯化后用于免疫染色和 Western blot 检测。

## 2.4 抗体活性检测

用 pcDNA6/HA-hGABARAP 转染 293T 细胞, 细胞裂解液用于 Western blot 检测, 分别用纯化的抗 GABARAP 多克隆抗体(1 : 1000)(图 3b)和抗 HA 单克隆抗体(1 : 1000)(图 3a)作一抗。自制抗体检测到两条蛋白条带, 一条与 HA 抗体结果一致, 另一条分子量略小的特异条带可能是融合载体 pcDNA6/HA-hGABARAP 在细胞内表达的无标签融合的 hGABARAP 蛋白。

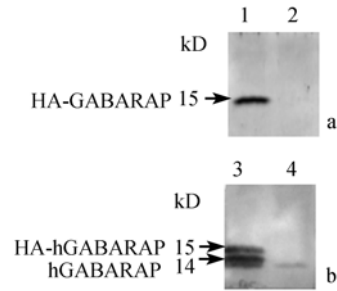


图 3 HA-hGABARAP 在 293T 细胞表达的 Western 分析  
Fig. 3 Western blotting analysis for HA-hGABARAP expressed in 293T cells

1 and 2: lysates of 293T cells transfected with pcDNA6/HA-hGABARAP (1) and pcDNA6 (2) were analyzed with anti-HA monoclonal antibody; 3 and 4: same lysates as 1 and 2 were analyzed with the purified anti-GABARAP polyclonal antibodies

## 2.5 免疫染色

为了进一步检测抗 GABARAP 抗体的活性并观测 hGABARAP 在细胞内的分布, 我们在 COS7 细胞中过量表达 hGABARAP 进行免疫荧光染色, 结果表明 hGABARAP 大量分布在细胞核周围区域, 细胞核与细胞质中也有分布(图 4b), 这与利用抗 HA 抗体进行的染色结果是一致的(图 4a)。

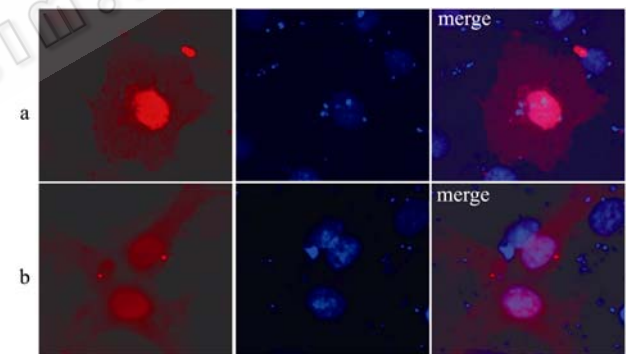


图 4 hGABARAP 在 COS7 细胞中的定位

### Fig. 4 Localization of hGABARAP in COS7 cells

pcDNA6/HA-hGABARAP was transfected into COS7 cells. Immunostaining with anti-HA monoclonal antibody (a) or anti-GABARAP polyclonal antibodies (b) shows both cytoplasm and nuclear localization of hGABARAP and the abundant perinuclear distribution of them (red). Nuclei were labeled with DAPI nuclear dye (blue)

## 3 讨论

上一个十年中, 分子生物学家们作出的卓越贡献让我们了解了各种重要的神经递质受体的分子结构, 针对这些受体所设计的各种药物也成功的开始应用。近几年来, 对神经递质受体的研究进入了一

个新的阶段, 问题集中于受体是如何行使功能的, 受体所存在的蛋白复合物的组成, 受体如何在膜上接受信号以及受体与配体结合的动力学性质。其中一个重要问题就是受体接受神经递质信号时是如何在细胞膜上聚集的。有的神经递质受体, 如乙酰胆碱受体和甘氨酸受体的聚集机制已经有了一些初步的结果<sup>[9,10]</sup>。然而, GABA<sub>A</sub> 受体的聚集机制目前还不清楚。

Gephyrin 是协助甘氨酸受体在膜上聚集的重要分子, gephyrin 缺失的小鼠神经细胞中的 GABA<sub>A</sub> 受体也不能够正常聚集<sup>[11,12]</sup>, 说明 gephyrin 在 GABA<sub>A</sub> 受体的膜上聚集过程中发挥了重要的作用, 但 gephyrin 与 GABA<sub>A</sub> 受体之间并没有相互作用。1999 年 Wang 等人<sup>[3]</sup>发现了可以与微管和 GABA<sub>A</sub> 受体均有相互作用的 GABARAP, 并且随后的结果发现 GABARAP 可以和 gephyrin 相互作用。由此可以初步推断 gephyrin 通过 GABARAP 与 GABA<sub>A</sub> 受体形成复合物, 并沿微管辅助受体向膜上运输和聚集。

本文克隆表达了 hGABARAP 编码区全长, 以 GST-hGABARAP 融合蛋白为抗原免疫家兔并纯化抗血清, 获得了抗 GABARAP 的抗体, 为将来的功能研究提供了基础。GABARAP 在除脑之外的各种正常组织和多种细胞中都有广泛的表达<sup>[7,8]</sup>, 在皮层神经元中呈点状分布<sup>[3]</sup>。Green F. 等人的结果显示 GABARAP 在 Hela 细胞中分散分布部分集中于核周区域。我们利用自制的抗 GABARAP 抗体检测其在 COS7 细胞中过量表达后分布与 Green F. 的结果是类似的: 细胞质和细胞核中均有分布, 核中较多, 核周区域也有明显集中。GABARAP 与他的其他三个家族成员同源性很高, 因此, 本抗体可能会对其它家族成员产生交叉反应, 但由于我们在检测中利用了细胞中过量表达的蛋白, 因此结果没有受到内源性的交叉反应的影响。这一问题在今后 GABARAP 抗体的应用中应当加以注意。

## REFERENCES

- [1] Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2000(1): 16–19.
- [2] Whiting PJ, Bonnert TP, Mckernan R. Molecular and functional diversity of the expanding GABA<sub>A</sub> receptor gene family. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 868: 645–653.
- [3] Wang HB, Bedford FK, Brandon NJ, et al. GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein links GABA<sub>A</sub> receptors and the cytoskeleton. *Nature*, 1999, 397(6714): 69–72.
- [4] Chen L, Wang HB, Vicini S, et al. The gamma-aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABA<sub>A</sub> receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21): 11557–11562.
- [5] Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, et al. The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABA<sub>A</sub>R)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8594–8599.
- [6] Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, et al. The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA<sub>A</sub> receptors. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18(1): 13–25.
- [7] Green F, O'Hare T, Blackwell A, et al. Association of human transferrin receptor with GABARAP. *FEBS Lett*, 2002, 518(1–3): 101–106.
- [8] Xin YR, Yu L, Chen Z, et al. Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein. *Genomics*, 2001, 74(3): 408–413.
- [9] Salpeter MM. Neurobiology. The Constant Junction. *Science*, 1999, 286(5439): 424–425.
- [10] Froehner SC. Gathering glycine receptor synapses. *Science*, 1998, 282(5392): 1277–1279.
- [11] Essrich C, Lorez M, Benson JA, et al. Postsynaptic clustering of major GABA<sub>A</sub> receptor subtypes requires the 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci*, 1998, 1(7): 563–571.
- [12] Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, et al. Loss of postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci*, 1999, 19(21): 9289–9297.