

简报

## 在大肠杆菌中高效表达可用于检测人源 Rap1 活性 RapBD 蛋白方法的建立

李志乾<sup>1,2</sup> 胡颖嵩<sup>2</sup> 张常建<sup>1,2</sup> 刘彦希<sup>2</sup> 韩雪琳<sup>2\*</sup> 韩黎<sup>2\*</sup>

(1. 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院 北京 100850)

(2. 中国人民解放军疾病预防控制中心医院感染监控中心 北京 100071)

**摘要:**【背景】Rap1 是一种小 GTP 酶，其活性的检测方法少，目前主要依赖试剂盒，检测成本太高。而 Rap1 下游效应蛋白 RalGDS 具有 Rap1 结合结构域(Rap binding domain, RapBD)，该结构域能与有活性的 GTP-Rap1 特异性结合。【目的】利用大肠杆菌外源表达 GST-RapBD 融合蛋白，建立经济的检测人源 Rap1 活性的方法。【方法】合成 RapBD 基因序列，插入 pGEX-4T-1 载体，使该质粒表达 GST-RapBD 融合蛋白，再利用 GST 亲和树脂结合大肠杆菌中表达的 GST-RapBD 融合蛋白，最后利用 GST-RapBD 融合蛋白 Pulldown 检测 GTP-Rap1。【结果】建立了检测人源 Rap1 活性的方法。【结论】序列优化使得 pGEX-4T-1 载体在大肠杆菌中高效表达能特异性结合人源 GTP-Rap1 且带有 GST 标签的 RapBD 蛋白，提高了 Pulldown 实验检测 GTP-Rap1 的效率，降低了检测人源小 G 蛋白 Rap1 活性的成本。

**关键词:** Rap1, Rap 结合结构域, 活性检测

### Expression of RapBD in *Escherichia coli* for detecting human Rap1 activity

LI Zhi-Qian<sup>1,2</sup> HU Ying-Song<sup>2</sup> ZHANG Chang-Jian<sup>1,2</sup> LIU Yan-Xi<sup>2</sup>  
HAN Xue-Lin<sup>2\*</sup> HAN Li<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100850, China)

(2. Department of Hospital Infection Control and Research, Institute of Disease Control and Prevention of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100071, China)

**Abstract:** [Background] Rap1 is a kind of small GTPase, and the method of its activity detection is very scanty. At present, the method mainly depends on commercialized kit, resulting in the high cost.

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (81471565)

\*Corresponding authors: HAN Xue-Lin: Tel: 86-10-66948381; E-mail: yilin791228@126.com  
HAN Li: Tel: 86-10-66948316; E-mail: hanlicdc@163.com

Received: March 13, 2018; Accepted: May 03, 2018; Published online (www.cnki.net): June 04, 2018  
基金项目: 国家自然科学基金(81471565)

\*通信作者: 韩雪琳: Tel: 86-10-66948381; E-mail: yilin791228@126.com  
韩黎: Tel: 86-10-66948316; E-mail: hanlicdc@163.com

收稿日期: 2018-03-13; 接受日期: 2018-05-03; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-04

RalGDS has the Rap binding domain (RapBD), which can bind to GTP-Rap1 specifically. **[Objective]** Establish an inexpensive method of detecting human Rap1 activity by exogenous GST-RapBD fusion protein expressed in *Escherichia coli*. **[Methods]** We constructed the plasmid with pGEX-4T-1 vector expressing GST-RapBD fusion protein in *E. coli*, and then combined GST-RapBD with GST affinity resin. Finally, we used GST Pulldown assay to detect Rap1 activity. **[Results]** The method of detecting human Rap1 activity was established successfully. **[Conclusion]** Sequence optimization made pGEX-4T-1 highly express the GST tagged RapBD protein in *E. coli*, which increased the efficiency and decreased the cost of Pulldown assay to detect GTP-Rap1.

**Keywords:** Rap1, Rap binding domain (RapBD), Activity detection

Rap 是一种小 GTP 酶, 属于 Ras 超家族。Rap 分为 2 个亚类: Rap1 和 Rap2, 具有 Rap1A、Rap1B、Rap2A、Rap2B 和 Rap2C 5 个家族成员<sup>[1]</sup>。其中, Rap1 被研究最多, 它通过各种信号通路参与不同的细胞活动, 包括细胞的粘附和增殖以及基因的激活<sup>[2]</sup>。Rap1 不仅可以调控整合蛋白, 也可以调控细胞骨架<sup>[3]</sup>。作为小 GTP 酶, Rap1 通过活性变化来调控这些过程。当 Rap1 以 GDP 结合的形式存在时是没有活性的, 而以 GTP 结合的形式存在时是有活性的。GTP 酶激活蛋白(GAPs)和鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEFs)参与调控小 GTP 酶 Rap1 的活性, GAPs 促进 GTP 酶以 GDP 结合形式存在, 而 GEFs 促进其以 GTP 结合形式存在<sup>[4]</sup>。Rap1 在细胞中起着分子开关的作用, 对于高效的信号转导过程至关重要<sup>[5]</sup>。鉴于此, Rap1 活性的检测显得尤为重要。目前常用的检测 Rap1 活性的成熟方法是 RapBD pulldown 实验, 其原理是利用 Rap1 下游效应蛋白 RalGDS 的 RapBD 结构域能特异性结合 GTP-Rap1<sup>[6]</sup>。市面上现有的 Rap1 活性检测试剂盒, 如 Abcam 公司的 Rap1 Activation Assay Kit, Cell Signaling Technology 公司的 Active Rap1 Detection Kit #8818, 以及 Thermo Fisher Scientific 公司的 Active Rap1 Pull-Down and Detection Kit 也都是利用 RapBD pulldown 的原理<sup>[7-10]</sup>, 它们提供可以直接利用的结合有 RapBD 的琼脂糖珠子。试剂盒虽然使用方便, 但是价格昂贵且生产厂家少。本文将人 RalGDS 蛋白的 RapBD 结构域的基因序列优化后构建在 pGEX-4T-1 质粒载体上, 使融合蛋白 GST-RapBD 在大肠杆菌中大量表达后, 固化在谷胱甘肽亲和树

脂上<sup>[11]</sup>, 再利用融合蛋白 Pulldown GTP-Rap1, 满足了实验室大批量检测 Rap1 活性的需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和质粒

人肺泡上皮细胞 A549、人支气管上皮细胞 BEAS-2B、pGEX-4T-1 质粒为本实验室保存; 大肠杆菌 BL21 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 15.0–20.0, pH 7.2。

细胞裂解液: 25 mmol/L Tris (pH 7.2), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 1% NP-40。

RPMI medium 1640 basic、Fetal bovine serum 购于 Gibco 公司; 谷胱甘肽亲和树脂珠子、异丙基硫代 β-D-半乳糖苷(IPTG)购于 Promega 公司; Rap1 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司。

台式高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 恒温振荡培养箱, 天津市欧诺仪器仪表有限公司; 脱色摇床, 北京六一生物科技有限公司; DNA 混合仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 构建表达 GST-RapBD 的载体

提交需要合成的人源 RalGDS 的 RapBD 氨基酸序列和载体 pGEX-4T-1, 酶切位点为 *Bam*H I 和 *Xho* I, 华大基因公司合成序列并利用 pGEX-4T-1 载体构建能表达 GST-RapBD 的重组质粒, 并将重组质粒导入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中得到亚

克隆。

### 1.3.2 原核表达融合蛋白 GST-RapBD

将转化的感受态细胞涂布到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜。随机挑取单菌落接种至含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 100 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.5 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导 20 h, 对照不加 IPTG 诱导。将菌液转移至 50 mL 离心管中, 3 600 r/min 离心 30 min, 将得到的菌体沉淀加入 PBS 缓冲液, 在冰水混合物上静置, 利用超声破碎仪破碎菌体, 每次超声 2 s, 间歇 2 s, 共 10 min。随后将裂解液转移至 1.5 mL 离心管, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清与 600  $\mu$ L 经过预平衡的 GST beads 在 4 °C 进行孵育 1 h 后, 3 600 r/min 离心 1 min 收集 Beads, 加入预冷的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 4 °C 保存。

### 1.3.3 GST-RapBD pulldown 实验

用 100 mm 培养皿培养 A549 或 BEAS-2B 细胞, 约  $1 \times 10^7$  个细胞/皿。弃去细胞培养基, 用 PBS

缓冲液冲洗 3 遍后, 每皿加入 1 mL 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰上裂解细胞 20 min 后收集细胞。4 °C、14 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 将上清平均分为 2 份, 一份加入 30  $\mu$ L 空载的 GST-beads, 另一份加入 30  $\mu$ L 与细菌裂解液孵育的 GST-RapBD beads, 在 4 °C 进行孵育 1 h 后, 3 600 r/min 离心 1 min 收集 Beads。然后加入预冷的 500  $\mu$ L 细胞裂解液洗涤 Beads, 重复 3 次后加入 30  $\mu$ L 2 $\times$ Loading buffer, 100 °C 金属浴 10 min。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后, 检测 GTP-Rap1。

## 2 结果与分析

### 2.1 RapBD 的氨基酸序列及其原核表达系统中优化后的核苷酸序列

查询 NCBI 得到人源 RapBD 的氨基酸序列如图 1 所示, 共 127 个氨基酸; 原核表达系统中优化后的核苷酸序列见图 2。核苷酸序列两侧的酶切位点为 *Bam*H I 和 *Xho* I。DNA 测序结果表明 RapBD 序列已正确插入载体, GST-RapBD 重组质粒构建成功, 质粒图谱见图 3。

ALPLYNQVGDCCIRVSLDVDNGNMYKSILVTSQDKAPAVIR  
KAMDKHNLEEEEPEDYELLQILSDDRKLKIPENANVFYAMNS  
TANYDFVLKKRTFTKGVKVKHGASSTLPRMKQKGLKIAKGIF

图 1 人源 RapBD 的氨基酸序列

Figure 1 The amino acid sequence of human RapBD

GGATCCGCTCTGCCTCTGTATAATCAGCAGGTGGGTGACT  
GTTGTATTATTCGTGTTAGCCTGGATGTTGATAATGGCAATA  
TGATAAAAGCATCCTGGTGACCAGTCAGGATAAAGCACC  
GGCAGTTATTCGCAAAGCAATGGATAAACATAATCTGGAA  
GAAGAAGAACCAGGAAGATTATGAACTGCTGCAGATTCTG  
AGTGATGATCGTAAACTGAAAATTCCGAAAATGCAAATG  
TGTTTTACGCAATGAATAGCACCAGCAATTATGATTTTGTG  
CTGAAAAACGTACCTTTACCAAAGGCGTGAAAGTGAAA  
CATGGCGCAAGCAGCACCCCTGCCGCGCATGAAACAGAAA  
GGTCTGAAAATTGCAAAAGGTATTTTCTAACTCGAG

图 2 原核表达系统中优化后的核苷酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence optimized in prokaryotic expression system

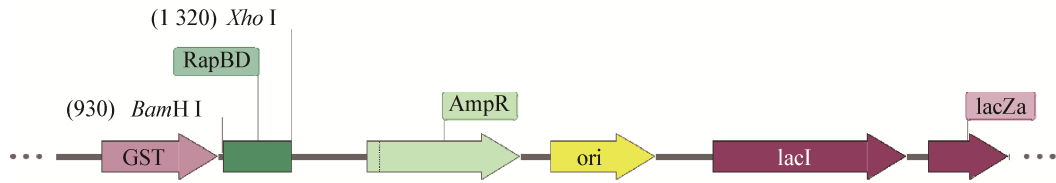


图3 插入 RapBD 的 pGEX-4T-1 质粒图谱  
Figure 3 Plasmid profile of inserted RapBD fragment

## 2.2 GST-RapBD 的诱导表达与纯化

如图4所示, 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后, 考马斯亮蓝染色结果显示在分子量 40 kD 可见融合蛋白条带。融合蛋白 GST-RapBD 在 16 °C、IPTG 诱导条件下培养 20 h 后可在大肠杆菌中大量表达, 见第 2 泳道, 而且用 GST beads 纯化后在相同位置可见融合蛋白条带, 见第 5、6 泳道。蛋白大小符合预期。

除了 A549 细胞, 在 BEAS-2B 细胞中进行验证的考马斯亮蓝染色结果见图 5。

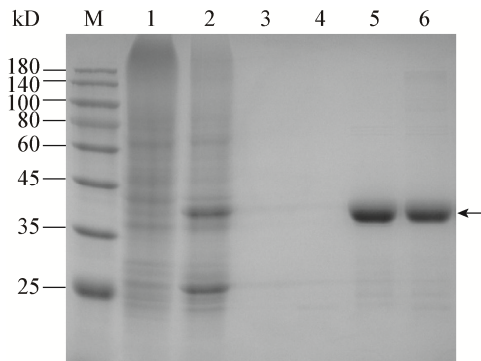


图4 GST-RapBD 融合蛋白表达和纯化及其与 A549 细胞裂解物的结合电泳图

Figure 4 The electropherogram of expression and purification of GST-RapBD fusion protein and its combination with A549 cell lysates

注: M: 预染蛋白 Marker; 1: 未经 IPTG 诱导大肠杆菌, 菌体超声破碎后的裂解物; 2: IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物; 3: 空的 GST beads; 4: A549 细胞裂解物孵育空的 GST beads; 5: IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物处理后的 GST beads; 6: A549 细胞裂解物孵育 IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物处理后的 GST beads.

Note: M: Pre-stained protein marker; 1: Lysates of *E. coli* without IPTG induction; 2: Lysates of *E. coli* induced by IPTG; 3: Empty GST beads; 4: Empty GST beads incubated with lysates of A549 cells; 5: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates; 6: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates and then incubated with lysates of A549 cells.

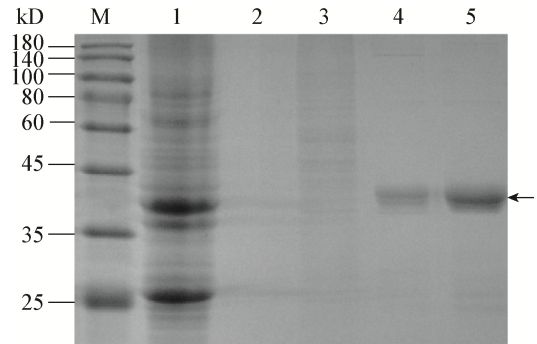


图5 GST-RapBD 融合蛋白表达和纯化及其与 BEAS-2B 细胞裂解物的结合电泳图

Figure 5 The electropherogram of expression and purification of GST-RapBD fusion protein and its combination with BEAS-2B cell lysates

注: M: 预染蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物; 2: 空的 GST beads; 3: BEAS-2B 细胞裂解物孵育空的 GST beads; 4: IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物处理后的 GST beads; 5: BEAS-2B 细胞裂解物孵育 IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物处理后的 GST beads.

Note: M: Pre-stained protein marker; 1: Lysates of *E. coli* induced by IPTG; 2: Empty GST beads; 3: Empty GST beads incubated with lysates of BEAS-2B cells; 4: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates; 5: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates and then incubated with lysates of BEAS-2B cells.

## 2.3 GST-RapBD 融合蛋白特异性结合 GTP-Rap1

采用 GST pulldown 实验检测 GST-RapBD 融合蛋白能否特异性结合 GTP-Rap1。图 6 结果显示, 第 1 泳道中 A549 细胞总蛋白中有 Rap1 的表达, 第 2 泳道中空的 GST beads 不能结合 GTP-Rap1, 而第 5 泳道中构建的重组质粒表达出来的 GST-RapBD 融合蛋白能够特异性结合 GTP-Rap1。

同样地, 构建的重组质粒表达出来的 GST-RapBD 融合蛋白能够特异性结合 BEAS-2B 细胞中的 GTP-Rap1, 如图 7 所示。

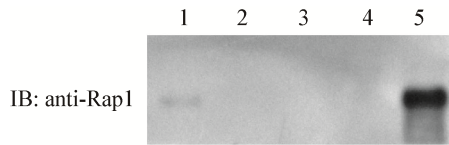


图 6 GST-RapBD 融合蛋白与 A549 细胞中 GTP-Rap1 的特异性结合

Figure 6 The binding of GST-RapBD fusion protein and GTP-Rap1 in A549 cells

注: 1: A549 细胞总蛋白; 2: 空的 GST beads; 3: A549 细胞裂解物孵育空的 GST beads; 4: IPTG 诱导后的大肠杆菌, 菌体超声破碎后的裂解物处理后的 GST beads; 5: A549 细胞裂解物孵育 IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物处理后的 GST beads.

Note: 1: Total protein of A549 cells; 2: Empty GST beads; 3: Empty GST beads incubated with lysates of A549 cells; 4: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates; 5: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates and then incubated with Lysates of A549 cells.

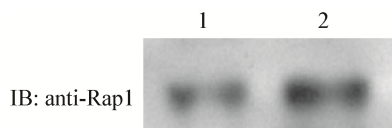


图 7 GST-RapBD 融合蛋白与 BEAS-2B 细胞中 GTP-Rap1 的特异性结合

Figure 7 The binding of GST-RapBD fusion protein and GTP-Rap1 in BEAS-2B cells

注: 1: BEAS-2B 细胞总蛋白; 2: BEAS-2B 细胞裂解物孵育 IPTG 诱导后的大肠杆菌裂解物处理后的 GST beads.

Note: 1: Total protein of BEAS-2B cells; 2: GST beads treated with IPTG-induced *E. coli* lysates and then incubated with lysates of BEAS-2B cells.

### 3 讨论与结论

近年来,大量研究表明 Rap 可以调节细胞粘附和吞噬。在宿主与微生物相互作用的过程中, Rap1 不仅可以调控补体受体 3 介导的吞噬<sup>[12]</sup>, 还可以介导 Fc $\gamma$  受体依赖的吞噬<sup>[13]</sup>。在乙型肝炎病毒的研究中, Rap 调控肝部炎症, 影响肝硬化和肝癌的发生<sup>[14]</sup>。此外, Rap 也参与人类癌细胞的侵袭和转移, 与许多恶性肿瘤的研究密切相关<sup>[15-16]</sup>。Rap 作为小 GTP 酶, 其活性受到 RapGEFs 和 RapGAPs 的调控。RapGEFs 导致 GDP 解离, 促使 GTP 与 Rap 结合, 进而激活 Rap; 而 RapGAPs 加快 Rap 上 GTP 的水解, 促进 Rap 失活<sup>[4]</sup>。已知的 RapGEFs 主

要有 4 类, 分别是 C3G (CrkSH3-domain binding guanine-nucleotide releasing factor)、CD-GEFs (CalDAG-GEF)、PDZ-GEFs 和 Epacs (Exchange protein directly activated by cAMP); 已知的 RapGAPs 主要包括 RapGAPs 和 SPAR (Spine-associated RapGAP) 两类<sup>[17]</sup>。小 GTP 酶 Rap1 的活性变化对于 RapGEFs 和 RapGAPs 以及其他上下游蛋白的研究非常重要, 这就使得 Rap1 的活性检测成为了这些研究的关键。

我们研究了在烟曲霉和肺上皮细胞相互作用过程中第二信使 cAMP 的效应蛋白 Epac 发挥的功能。Epac 是环腺苷酸鸟嘌呤交换因子, 可以激活下游小 G 蛋白酶 Rap1 和 Rap2<sup>[18-19]</sup>。Epac 的活性检测是技术难题, 目前主要是通过检测 Rap 的活性来间接反映。我们构建了能表达人 RapBD 的重组质粒, 操作简单、成本低廉, 使 Rap1 的活性检测不再依赖试剂盒, 可以更加方便、经济地检测 Rap1 活性, 为 Rap1 蛋白功能和作用机制及其相关信号通路的研究提供了便利。

### REFERENCES

- [1] Minato N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis[J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319(15): 2323-2328
- [2] Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, et al. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(8): 741-748
- [3] Jeong HW, Li ZG, Brown MD, et al. IQGAP1 binds Rap1 and modulates its activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20752-20762
- [4] Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(12): 842-857
- [5] Raaijmakers JH, Bos JL. Specificity in Ras and Rap signaling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(17): 10995-10999
- [6] Spaargaren M, Bischoff JR. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(26): 12609-12613
- [7] Parker WH, Qu ZC, May JM. Intracellular ascorbate prevents endothelial barrier permeabilization by thrombin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(35): 21486-21497
- [8] Xiong YW, Ye CJ, Yang NQ, et al. Ubc9 binds to ADAP and is

- required for Rap1 membrane recruitment, Rac1 activation, and integrin-mediated T cell adhesion[J]. *Journal of Immunology*, 2017, 199(12): 4142-4154
- [9] Yang ZK, Kirton HM, Al-Owais M, et al. Epac2-Rap1 signaling regulates reactive oxygen species production and susceptibility to cardiac arrhythmias[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017, 27(3): 117-132
- [10] Genova T, Grolez GP, Camillo C, et al. TRPM8 inhibits endothelial cell migration via a non-channel function by trapping the small GTPase Rap1[J]. *The Journal of Cell Biology* 2017, 216(7): 2107-2130
- [11] Zeng T, Cui ZM, Jiang W, et al. Optimization of the method for measurement of the activity of small GTP binding protein RhoA[J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(4): 103-106 (in Chinese)  
曾婷, 崔照盟, 蒋维, 等. 小 G 蛋白 RhoA 活性检测方法的优化[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(4): 103-106
- [12] Caron E, Self AJ, Hall A. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin  $\alpha M\beta 2$  by LPS and other inflammatory mediators[J]. *Current Biology*, 2000, 10(16): 974-978
- [13] Chung J, Serezani CH, Huang SK, et al. Rap1 activation is required for Fc $\gamma$  receptor-dependent phagocytosis[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181(8): 5501-5509
- [14] Wu AR, Chen H, Xu CF, et al. miR-203a is involved in HBx-induced inflammation by targeting Rap1a[J]. *Experimental Cell Research*, 2016, 349(1): 191-197
- [15] Pizon V, Lerosey I, Chardin P, et al. Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a *ras*-related protein (*rap1B*)[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(15): 7719
- [16] Minato N, Hattori M. Spa-1 (Sipa1) and Rap signaling in leukemia and cancer metastasis[J]. *Cancer Science*, 2009, 100(1): 17-23
- [17] Li SS, Guo XX, An S, et al. Biological function of the small G protein rap[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2016, 47(1): 14-20 (in Chinese)  
李珊珊, 郭晓汐, 安输, 等. 小 G 蛋白 Rap 的信号通路与生物学功能[J]. *生理科学进展*, 2016, 47(1): 14-20
- [18] Pizon V, Desjardins M, Bucci C, et al. Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex[J]. *Journal of Cell Science*, 1994, 107: 1661-1670
- [19] Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1[J]. *Science*, 1998, 282(5397): 2275-2279