

glipr1 基因的原核表达及多克隆抗体制备

生秀梅^{1,2} 陈 龙¹ 王正新²

摘要 目的 克隆表达胶质瘤致病相关蛋白 1 基因(*glipr1*) 并制备多克隆抗体,运用该抗体检测各肿瘤细胞系中 GLIPR1 的表达。方法 通过 PCR 技术以含 *glipr1* 基因的 cDNA 克隆质粒(pLX304-*glipr1*) 为模板获得 *glipr1*(M) 片段,再将此片段克隆至表达载体 pET-45b 上,并转入大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3) 进行表达; Ni 柱纯化后的 GLIPR1(M) 蛋白作为抗原免疫家兔,获得多克隆抗体,Western blot 法检测其特异性,并检测 GLIPR1 在 A549、PC14、LNCaP、PC3 及 U87 细胞中的表达。结果 成功构建了表达载体 pET-45b-*glipr1*(M),并获得了纯化的 GLIPR1(M) 蛋白,成功制备了兔抗 GLIPR1 多克隆抗体,特异性高,可用于检测各细胞系中 GLIPR1 的表达, GLIPR1 在 U87 中的表达最高。结论 成功表达了 GLIPR1(M) 蛋白,并获得了多克隆抗体,为进一步研究 GLIPR1 的功能和作用机制奠定了基础。

关键词 GLIPR1; 蛋白表达; 多克隆抗体

中图分类号 R 34; Q 78

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1436-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.009

胶质瘤致病相关蛋白 1 基因(*glipr1*) 是从胶质瘤细胞中克隆出来的新基因^[1-2]。GLIPR1 蛋白有一段信号肽和一段跨膜区段,在结构上与 PR-1 (group 1 plant pathogenesis-related proteins) 同源^[3-4]。研究^[1-2,5-6]表明 GLIPR1 高表达与髓单核细胞的分化有关,神经胶质瘤和星形细胞瘤发病过程中, GLIPR1 的表达显著增加。亦有报道^[7-9]指出 GLIPR1 是 p53 靶基因,其过表达可诱导前列腺癌、结肠癌的细胞凋亡。前期研究^[10]显示 GLIPR1 高表达抑制肺癌细胞的生长,但其机制尚不明确。该实验通过原核表达 GLIPR1 蛋白的抗原性区段(去除

信号肽及跨膜后区段),制备其兔多克隆抗体,为进一步研究肿瘤细胞中 GLIPR1 的表达、分布规律,以及参与调节肿瘤细胞生长的具体机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 原核表达质粒 pET-45b、*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) 感受态细胞、A549 细胞、LNCaP 细胞、PC14 细胞及 U87 细胞由克拉克亚特兰大肿瘤研究与治疗发展中心保存。人 *glipr1* 基因 cDNA 克隆(HsCD00441029) 购自美国 DNASU 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得 根据 GenBank 注册的 GLIPR1 序列(HQ447422) 设计并合成上下游引物 GLIPR1-NOSIG-F 和 GLIPR1-NOTM-R,分别在上下游引物的 5'端加接 Nde I 和 BamH I 酶切位点序列,引物序列为: GLIPR1-NOSIG-F: 5'-GGAAT-TCCATATGGCAAATATTTTGGCAGATATCG-3'(下划线为 Nde I 酶切位点), GLIPR1-NOTM-R: 5'-CGG-GATCCTTATCTGTTACGTGGATATATGGGCC-3'(下划线为 BamH I 酶切位点)。以含有 *glipr1* 基因的 cDNA 克隆质粒(pLX304-*glipr1*) 为模板,以 GLIPR1-NOSIG-F 和 GLIPR1-NOTM-R 为引物,利用高保真 DNA 聚合酶 pfu 对目的基因进行扩增。扩增片段为 *glipr1* 基因去除 N 末端信号肽序列和去除自跨膜区段开始 C 末端序列的区段,即 *glipr1* 基因的 55~711 bp 部分,在上游引物加上起始密码子 ATG,用 *glipr1*(M) 表示。

1.2.2 重组表达载体的构建及鉴定 胶回收 PCR 产物和表达载体 pET-45b 经 Nde I 和 BamH I 双酶切后,PCR 酶切产物经酚仿-乙醇法纯化后与胶回收的 pET-45b 载体酶切产物用 T4DNA 连接酶室温连接过夜,将连接产物热激转化入 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) 感受态细胞,次日从平板上挑取 12 个菌落接种于含氨苄西林的 LB 平板上,37℃ 培养 8 h 后,将上述菌体和空载体转化菌体收集于含 30 μl 蒸馏水的 EP 管中,再加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 混合液,在振荡器上剧烈振荡,离心(12 000 r/min, 2 min) 后取 10 μl 上清液,用

2016-06-02 接收

基金项目: 江苏大学高级专业人才培养启动基金(编号: 11JDC063); 国家博士后科学基金(编号: 2015M571702)

作者单位: ¹江苏大学医学院生化教研室, 镇江 212013

²The Center for Cancer Research and Therapeutic Development, Dept of Biological Sciences, Clark Atlanta University, Atlanta, GA 30314

作者简介: 生秀梅,女,副教授,博士研究生;

王正新,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: zwang@cau.edu

0.7% 琼脂糖凝胶电泳观察质粒大小,初步筛选阳性克隆质粒,提取初筛阳性克隆质粒经过 PCR 和双酶切验证后,通过 DNA 测序分析最终确认。

1.2.3 重组蛋白的表达 分别挑取含重组质粒 pET-45b-*glipr1*(M) 和空质粒 pET-45b 的 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) 单菌落于 2 ml LB 液体培养基中(氨苄西林 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜。次日以 1:100 比例转接入 20 ml 的 LB 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡至吸光度(optical density, OD) 值 OD₆₀₀ 为 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 4 h,冰浴 10 min 后收集菌体,洗涤后用 500 μl PBS 缓冲液重悬菌液,取出 100 μl 用于全菌蛋白电泳,剩余菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 超声破碎,离心(12 000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 取全菌、上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 重组蛋白纯化 因 GLIPR1(M) 蛋白主要存在于包涵体,用 5 ml 平衡缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄、10 mmol/L Tris-Cl、8 mol/L urea, pH 8.0) 重悬包涵体,混匀后冰浴 30 min。冰浴过程中超声裂解细菌(加入蛋白酶抑制剂 1 mmol/L PMSF)。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。上清液移入塑料离心管中,加入 1 ml 的 NTA-Ni²⁺ 柱,不间断轻轻转动,室温 2 h。将上述混合物转移到 5 ml 注射器中,事先用滤纸封住底部。拔掉注射器针头让液体可以顺利流出。加入洗脱缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄、10 mmol/L Tris-Cl、8 mol/L urea, pH 6.3) 洗涤液,去除杂蛋白,当流出洗涤液 OD₂₈₀ < 0.01 时,向 NTA-Ni²⁺ 柱中加入 1 ml 洗脱液洗脱 4~5 次,收集洗脱液,测蛋白浓度。SDS-PAGE 检测纯化后蛋白的纯度。

1.2.5 GLIPR1(M) 的抗原性分析 利用 anther-prot^[11] 软件按照 Parker et al^[12] 报道的方法对 GLIPR1(M) 进行抗原性分析。

1.2.6 兔抗 GLIPR1(M) 蛋白多克隆抗体的制备 用纯化的 GLIPR1(M) 蛋白作为免疫原,与等体积的弗氏完全佐剂充分研磨至完全乳化,每只家兔以 1 ml 乳化的免疫原,背部皮下多点注射法免疫家兔。初次免疫前采集兔耳缘静脉血液,取血清作阴性对照,第 1 次免疫后每隔 2 周免疫家兔,共免疫 4 次,末次免疫 1 周后颈动脉放血并获得抗血清,用半饱和硫酸铵盐析法和透析除盐法获得粗提的多克隆抗体,分装保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.7 Western blot 法验证 GLIPR1 抗体 以每泳道 2 μg GLIPR1(M) 抗原蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,将转

膜后的 PVDF 膜用含 3% 的脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h 后,分别用上述 anti-GLIPR1 以 1:500、1:1 000、1:2 000、1:10 000 及购自 Abnova 公司(台湾)的 GLIPR1 抗体和对应的二抗进行免疫标记,ECL 化学发光试剂 A、B 液 1:1 混匀,覆盖于 PVDF 膜的蛋白面,全自动凝胶成像系统进行曝光验证 GLIPR1 抗体。

1.2.8 Western blot 法检测 GLIPR1 在各种肿瘤细胞系中的表达 收集 A549、PC14、U87、PC3 及 LNCaP 细胞,用蛋白裂解液裂解后离心(12 000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 取上清液,测定浓度后,以各泳道 5 μg 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,用 1:2 000 的 anti-GLIPR1 和对应的二抗进行免疫标记,检测 A549、PC14、U87、PC3 及 LNCaP 细胞中 GLIPR1 的表达。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-45b-*glipr1*(M) 的构建 以含有 *glipr1* 基因的 cDNA 克隆质粒(pLX304-*glipr1*) 为模板,以 GLIPR1-NOSIG-F 和 GLIPR1-NOTM-R 为引物,PCR 扩增获得约 657 bp 的 DNA 片段,该片段为 *glipr1* 基因去除 N 末端信号肽序列和去除自跨膜区段开始 C 末端序列的区段(图 1A),命名为 *glipr1*(M)。将此片段回收、酶切后插入 pET-45b 构建表达载体 pET-45b-*glipr1*(M),然后转化大肠杆菌 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3),挑取单克隆,提取质粒,经 Nde I 和 BamH I 双酶切验证,证明重组质粒 pET-45b-*glipr1*(M) 构建成功(图 1B)。

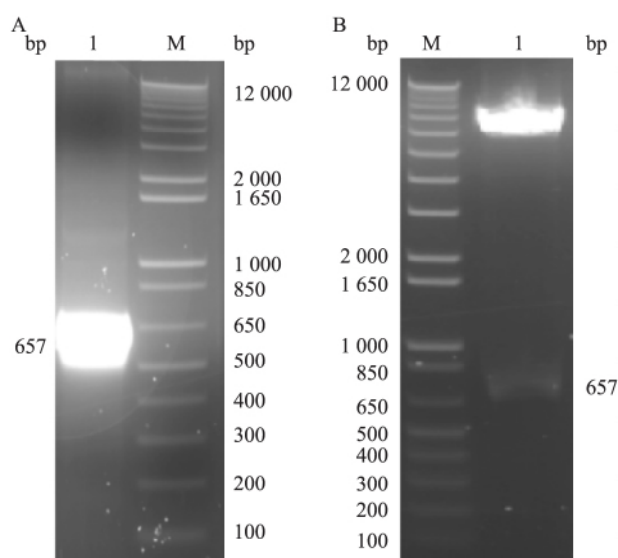


图 1 重组表达质粒 pET-45b-*glipr1*(M) 的构建和鉴定
A: *glipr1*(M) 基因 PCR 产物; 1: PCR 产物; M: 1 000 bp plus DNA Ladder; B: pET-45b-*glipr1*(M) 重组质粒酶切鉴定; M: 1 000 bp plus DNA Ladder; 1: pET-45b-*glipr1*(M) 酶切结果

2.2 重组 GLIPR1 (M) 蛋白的表达与纯化 表达载体 pET-15b-*glipr1* (M) 转入表达宿主菌 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) 中, 37 °C 振荡至 OD₆₀₀ 为 0.6 后, 经 IPTG 诱导 4 h, 超声裂解细菌分别制备全菌蛋白、可溶性上清液和沉淀蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明 pET-15b-*glipr1* (M) 在大肠埃希菌 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) 中成功表达, 但主要以包涵体形式存在(图 2)。通过利用 Ni 柱亲和纯化后, 产物经 SDS-PAGE 电泳分析表明经过纯化后的 GLIPR1 (M) 蛋白纯度较高, 可用于兔抗 GLIPR1 (M) 蛋白的多克隆抗体制备(图 3)。

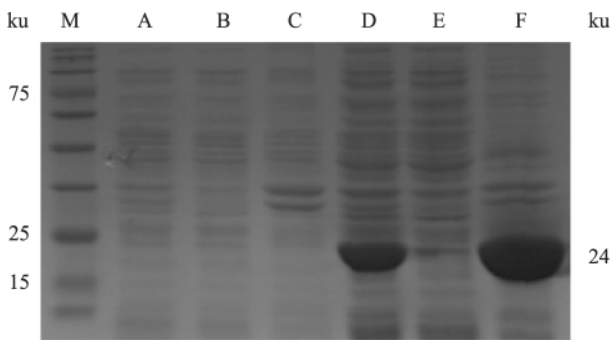


图 2 SDS-PAGE 鉴定重组 GLIPR1 (M) 蛋白

M: 宽范围彩色预染蛋白质标准; A: 空质粒转化菌全菌蛋白; B: 空质粒转化菌上清液; C: 空质粒转化菌包涵体; D: 重组表达菌全菌蛋白; E: 重组表达菌上清; F: 重组表达菌包涵体

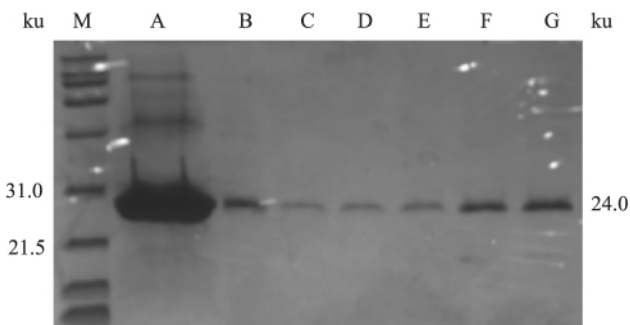


图 3 重组 GLIPR1 (M) 蛋白的纯化

M: 宽范围蛋白质标准; A: 切胶纯化后的 GLIPR1 (M) 蛋白; B ~ G: Ni 柱亲和纯化后的 GLIPR1 (M) 蛋白

2.3 兔抗 GLIPR1 (M) 蛋白的多克隆抗体制备 应用 antherprot 软件对 GLIPR1 (M) 蛋白进行抗原性分析, 证明 GLIPR1 (M) 蛋白抗原性预测值较高, 可用于制备抗 GLIPR1 抗体。将抗 GLIPR1 蛋白的抗血清以 1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000 及 1 : 10 000 倍比稀释作为一抗, GLIPR1 抗体 1 : 1 000 为阳性对照, 以纯化的 GLIPR1 (M) 蛋白为检测对象, 进行 Western blot 分析。结果表明抗 GLIPR1 (M) 蛋白的抗血

清在 24 ku 处能检测到符合预期大小的条带, 且最低效价为 1 : 10 000, 适宜的 Western blot 使用效价为 1 : 2 000 (图 4)。

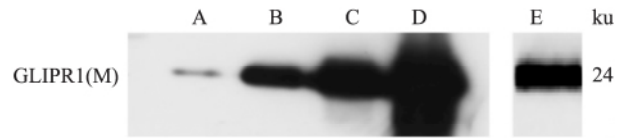


图 4 Western blot 检测抗 GLIPR1 抗体的特异性

A: 1 : 10 000; B: 1 : 2 000; C: 1 : 1 000; D: 1 : 500; E: 1 : 1 000 GLIPR1 抗体与 2 μg GLIPR1 (M) 抗原蛋白

2.4 抗 GLIPR1 抗体检测 GLIPR1 在各细胞系中的表达 为了进一步考察该多克隆抗体是否可用于检测细胞系中 GLIPR1 的表达, 本实验用 1 : 2 000 的 anti-GLIPR1 和对应的二抗进行免疫标记, Western blot 法检测了 A549、PC14、U87、PC3 及 LNCaP 细胞中 GLIPR1 的表达。GLIPR1 (全长约为 30 ku) 在人恶性胶质母细胞瘤 U87 细胞中表达最高, 前列腺癌 PC3 中亦有表达, A549 细胞中只有微量表达, 而 PC14 和 LNCaP 细胞并未检测到 GLIPR1 蛋白。表明本实验制备的抗 GLIPR1 抗体适用于后期 Western blot 分析。见图 5。

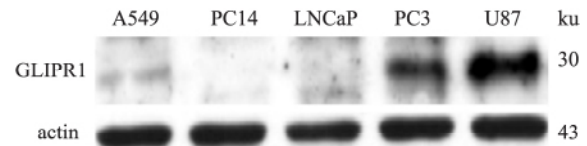


图 5 GLIPR1 在 A549、PC14、LNCaP、PC3 及 U87 细胞中的表达

3 讨论

胶质瘤致病相关蛋白 1 (GLIPR1) 又称为 RTVP-1, 是富含半胱氨酸分泌蛋白家族 CAP 的一员^[3]。早期作为原癌基因被发现于人神经胶质瘤中^[1]。星形脑恶性肿瘤中 GLIPR1 的表达较高, 其表达水平与星形细胞肿瘤的恶性程度呈正相关性^[1-2, 6]。GLIPR1 的高表达促进神经胶质瘤的增殖、存活、侵袭及转移^[6]。肾母细胞瘤中 GLIPR1 亦作为原癌基因发挥作用^[13]。但是, 在前列腺癌细胞中, GLIPR1 表达较低, 为 p53 调节基因, GLIPR1 的高表达可产生活性氧, 从而导致多种前列腺肿瘤细胞系的凋亡^[14]。本实验室前期研究^[10]显示肺癌细胞中 GLIPR1 的 mRNA 水平亦很低, 其高表达会导致 A549 细胞的死亡。GLIPR1 在不同细胞系中的

表达差异和功能差异引起了注意,为进一步研究 GLIPR1 的功能和机制,本研究克隆表达了 GLIPR1 (M) 蛋白,并制备了兔抗重组蛋白的多克隆抗体,特异性高。同时,本研究运用该抗体通过 Western blot 法检测了 A549、PC14、U87、PC3 及 LNCaP 细胞中 GLIPR1 的表达。与前期研究^[1-2,6]报道一致,人恶性胶质母细胞瘤 U87 细胞中 GLIPR1 的表达最高,前列腺癌 PC3 中亦有表达,这与本研究结果 GLIPR1 在 PC3 中执行双重功能一致,即低浓度的 GLIPR1 有利于 PC3 的生长,而高浓度的 PC3 则抑制 PC3 的增殖。A549、PC14 和 LNCaP 细胞中 GLIPR1 的表达较低,与 GLIPR1 在这些细胞中发挥抑癌功能相符^[7-9,14-16]。综上所述,本实验成功制备了高效特异的抗 GLIPR1 多克隆抗体,为进一步研究的功能和机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Murphy E V, Zhang Y, Zhu W, et al. The human glioma pathogenesis-related protein is structurally related to plant pathogenesis-related proteins and its gene is expressed specifically in brain tumors [J]. *Gene*, 1995, 159(1): 131-5.
- [2] Rich T, Chen P, Furman F, et al. RTVP-1, a novel human gene with sequence similarity to genes of diverse species, is expressed in tumor cell lines of glial but not neuronal origin [J]. *Gene*, 1996, 180(1-2): 125-30.
- [3] Gibbs G M, Roelants K, O'Bryan M K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins-roles in reproduction, cancer, and immune defense [J]. *Endocr Rev* 2008, 29(7): 865-97.
- [4] Szyperski T, Fernandez C, Mumenthaler C, et al. Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GLIPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2262-6.
- [5] Gringras M C, Margolin J F. Differential expression of multiple unexpected genes during U937 cell and macrophage differentiation detected by suppressive subtractive hybridization [J]. *Exp Hematol* 2000, 28(1): 65-76.
- [6] Rosenzweig T, Ziv-Av A, Xiang C, et al. Related to testes-specific, vespid, and pathogenesis protein-1 (RTVP-1) is overexpressed in gliomas and regulates the growth, survival, and invasion of glioma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 4139-48.
- [7] Thompson T C. Glioma pathogenesis-related protein 1: tumor-suppressor activities and therapeutic potential [J]. *Yonsei Med J*, 2010, 51(4): 479-83.
- [8] Li L, Ren C, Yang G, et al. GLIPR1 suppresses prostate cancer development through targeted oncoprotein destruction [J]. *Cancer Res* 2011, 71(24): 7694-704.
- [9] Li L, Yang G, Ren C, et al. Glioma pathogenesis-related protein 1 induces prostate cancer cell death through Hsc70-mediated suppression of AURKA and TPX2 [J]. *Mol Oncol* 2013, 7(3): 484-96.
- [10] Sheng X, Bowen N, Wang Z. GLI pathogenesis-related 1 functions as a tumor-suppressor in lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 25.
- [11] Jayaraj S, Reid R, Santi D V. GeMS: an advanced software package for designing synthetic genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(9): 3011-6.
- [12] Parker J M, Guo D, Hodges R S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites [J]. *Biochemistry*, 1986, 25(19): 5425-32.
- [13] Chilukamarri L, Hancock A L, Malik S, et al. Hypomethylation and aberrant expression of the glioma pathogenesis-related 1 gene in Wilms tumors [J]. *Neoplasia* 2007, 9(11): 970-8.
- [14] Li L, Abdel Fattah E, Cao G, et al. Glioma pathogenesis-related protein 1 exerts tumor suppressor activities through proapoptotic reactive oxygen species-c-Jun-NH2 kinase signaling [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 434-43.
- [15] Ren C, Li L, Goltsov A A, et al. mRTPV-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(10): 3345-57.
- [16] Ren C, Li L, Yang G, et al. RTVP-1 a tumor suppressor inactivated by methylation in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3): 969-76.

Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of *glipr1* gene

Sheng Xiumei^{1,2}, Chen Long¹, Wang Zhengxin²

¹Dept of Biochemistry School of Medicine Jiangsu University Zhenjiang 212013;

²Center for Cancer Research and Therapeutic Development Dept of Biological Sciences, Clark Atlanta University, Atlanta, GA 30314)

Abstract Objective To clone and express glioma pathogenesis-related protein 1 gene, and prepare the anti-GLIPR1 polyclonal antibody. Use anti-GLIPR1 to check the expression of GLIPR1 in some cancer cell lines. **Methods** (下转第 1444 页)

- 和免疫的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(6): 499 - 501.
- [7] 董华胜, 秦宜德, 李素萍, 等. 乳源免疫调节肽具有促进体内外淋巴细胞转化的作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(1): 73 - 7.
- [8] Wang W, Gu F, Wei C, et al. PGPIP_N, a therapeutic hexapeptide, suppressed human ovarian cancer growth by targeting Bcl2 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60701.
- [9] Fofaria N M, Srivastava S K. STAT3 induces anoikis resistance, promotes cell invasion and metastatic potential in pancreatic cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(1): 142 - 50.
- [10] Lee H T, Xue J, Chou P C, et al. Stat3 orchestrates interaction between endothelial and tumor cells and inhibition of Stat3 suppresses brain metastasis of breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10016 - 29.
- [11] Bonastre E, Verdura S, Zondervan I, et al. PARD3 inactivation in lung squamous cell carcinomas impairs STAT3 and promotes malignant invasion [J]. *Cancer Res* 2015, 75(7): 1287 - 97.
- [12] Fletcher S, Drewry J A, Shahani V M, et al. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein [J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(6): 825 - 33.
- [13] 王天晓, 刘迎滑, 时小燕, 等. 冬凌草甲素下调 STAT3-HK II 通路诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 397 - 402.

Immunomodulating Peptide enhance the effect of DDP on ovarian cancer cells

Zhou Juan, Liu Chen, Gu Fang, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the concomitant therapy effect of immunomodulating peptide (PGPIP_N) and anti-cancer drug cisplatin (DDP) on the proliferation and migration of ovarian cancer cells *in vitro*. **Methods** The inhibitory action of DDP with PGPIP_N on the proliferation of primary ovarian cancer cells were detected by MTS. Apoptotic ratios and cell cycle of primary ovarian cancer cells were measured by flow cytometry. Cell scratch assays were carried out to test cells' migration. **Results** The result of MTS showed that the inhibition rate of the concomitant group against ovarian cancer cells was significantly higher than the group treated only with DDP. The difference was significant ($P < 0.05$) and in a dose and time dependent manner. Flow cytometry results showed that PGPIP_N could promote the apoptosis of human primary ovarian cancer cells by DDP, and the cycle of cells was arrested in G₀/G₁ phase. Cell scratch assays showed that concomitant therapy significantly inhibited cell movement, of which the difference from the group treated only with DDP of statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** PGPIP_N can improve the effect of DDP on primary ovarian cancer cells.

Key words human primary ovarian cancer cells; drug combination; PGPIP_N; DDP

(上接第 1439 页)

cDNA clone plasmids (pLX304-*glipr1*) were used as template to amplify the *glipr1* (M) fragment by PCR. The fragment was cloned into the pET-15b vector and expressed in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). The GLIPR1 (M) protein was purified by Ni affinity chromatography and was used as antigen to prepare polyclonal antibody. Western blot analysis was used to check the specificity of the antibody and detect the expression of GLIPR1 in A549, PC14, LNCaP, PC3 and U87 cells. **Results** Expression vector pET-15b-*glipr1* (M) was successfully constructed, and the purified GLIPR1 (M) protein was obtained, the polyclonal anti-GLIPR1 antibody was successfully prepared and could be used to check the expression of GLIPR1 in cancer cell lines. GLIPR1 was highly expressed in U87 cells. **Conclusion** The GLIPR1 (M) protein and the polyclonal anti-GLIPR1 antibody are successfully prepared, which lays the foundation for the research of GLIPR1 function mechanism.

Key words GLIPR1; protein expression; polyclonal antibody