

# 集胞蓝细菌 PCC 6803 中 CcmK2 蛋白多克隆抗体的制备与检测

李盼 支瑶 汪方奎 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** CcmK2 蛋白是集胞蓝细菌 PCC 6803 羧酶体外壳蛋白的主要组分, 在羧酶体的组装与功能行使方面扮演重要角色。为解析其功能, 本研究构建了原核表达载体 pET28a-CcmK2, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达带有 6 个组氨酸标签的 CcmK2 重组蛋白。通过金属亲和层析技术, 将 CcmK2 重组蛋白纯化后免疫家兔, 制备抗 CcmK2 多克隆抗体。基于 Dot blot 分析的结果显示: 该多克隆抗体能够有效检测蓝细菌 CcmK2 蛋白; 进一步的抗体特异性分析显示, CcmK2 多克隆抗体与其他羧酶体外壳蛋白存在微弱的抗原抗体反应; 最后, 通过 Western blot 分析证实该多克隆抗体能够特异而灵敏地检测集胞蓝细菌 PCC 6803 中 CcmK2 的丰度。

**关键词** 集胞蓝细菌 PCC 6803; 羧酶体; Western blot; 二氧化碳浓缩机制

**中图分类号** Q 93-33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)01-0012-05

蓝细菌是一类具有产氧光合能力的自养原核微生物, 革兰氏染色阴性, 能够固定  $\text{CO}_2$ 、释放氧气, 对地球有氧层的形成和全球碳循环起到了举足轻重的作用, 常被用作研究光合作用、生物固氮、二氧化碳浓缩机制、细胞发育的模式生物。蓝细菌的二氧化碳固定主要依赖于细胞内的一个蛋白质复合体——羧酶体。羧酶体在蓝细菌中以二十面体的形式存在, 直径 80~140 nm, 外部由 4 nm 左右厚度的致密的蛋白质外壳构成, 内部则充满负责催化  $\text{HCO}_3^-$  生成  $\text{CO}_2$  的碳酸酐酶(CA)和负责  $\text{CO}_2$  固定的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶复合体(RuBisCO)<sup>[1]</sup>。蓝细菌固定二氧化碳的方式是通过核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶(ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)将  $\text{CO}_2$  插入到核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose-1, 5-bisphosphate, RuBP)分子, 然后形成两分子的三磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate, 3-PGA)。其中, RuBisCO 是一个双功能酶, 当细胞质中  $\text{CO}_2$  浓度较高时, 其以 RuBP 为底物生成 3-PGA; 然而当细胞质内  $\text{O}_2$  浓度较高时, RuBisCO 则以  $\text{O}_2$  为底物发生氧化反应生成等量的 3-PGA 和二磷酸甘油酸(2-PGA), 2-PGA 的积累会抑制卡尔文循环中磷酸果

糖激酶和磷酸丙糖异构酶的活性, 从而对细胞产生毒害作用<sup>[2-3]</sup>。已有的研究表明细胞中大多数的 RuBisCO 都位于羧酶体内部, 是蓝细菌  $\text{CO}_2$  固定的主要执行者<sup>[4]</sup>。羧酶体的蛋白质外壳致密, 是维持内部高浓度  $\text{CO}_2$ 、防止  $\text{CO}_2$  扩散的关键性屏障, 但是羧酶体中不含有类似细胞器的脂类物质<sup>[5]</sup>。

致密的羧酶体外壳主要由 4~7 个具有相似的 BMC (bacterial microcompartment domain; PFAM00936) 结构域的蛋白质组成。其中, 集胞蓝细菌 PCC 6803 羧酶体外壳主要由 CcmK1、CcmK2、CcmK3、CcmK4、CcmO 和 CcmL 组成。CcmK2 是羧酶体外壳中的主要组成部分, 其蛋白晶体结构已经获得解析<sup>[1,6]</sup>。本研究以集胞蓝细菌 CcmK2 为对象, 扩增其片段并构建 his<sub>6</sub>-CcmK2 重组表达载体 pET28a-CcmK2, 进行蛋白纯化后免疫家兔, 制备抗血清, 利用 Dot blot 对所制备的血清效价和组织检测特异性进行分析, 旨在为研究细胞内羧酶体相关组分丰度的变化规律及其调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和培养条件

野生型集胞蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC

收稿日期: 2017-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY003)

李盼, 硕士研究生. 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: 835760445@qq.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授. 研究方向: 环境微生物学. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

6803<sup>[7]</sup>、大肠杆菌 TG 和 BL21(DE3)、质粒 pET28a (+)均为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室蓝细菌分室保存的材料。蓝细菌于 30 °C、150 r/min、40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  连续光照培养;大肠杆菌在 LB 培养基<sup>[7]</sup>中于 37 °C、180 r/min 下培养,2 个菌株抗生素的使用终质量浓度均为 Kan 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司;T4 DNA 连接酶和限制性内切酶等均购自 TaKaRa 公司;KOD plus 酶购自 Toyoba 公司;ECL 显色液购自武汉麦克莱博生物科技有限公司;Ni-NTA 镍琼脂糖凝胶购自 QIAGEN 公司。

## 1.2 原核表达载体的构建

以集胞蓝细菌 PCC 6803 的基因组 DNA 为模板<sup>[8]</sup>,采用 CcmK2-S (5'-GGGAATTCCATATG TCCATTGCAGTTGGAATGAT) 和 CcmK2-A (5'-TAACTCGAGTTAATATGTCCGAAATT-GTT)进行 PCR 扩增。扩增产物经过核酸纯化试剂盒纯化后,用 *Nde* I 和 *Xho* I 连入原核表达载体 pET28a(+). 质粒 DNA 的定量、电泳检测、定量分析、酶切反应以及纯化回收、酶连接等操作参照文献<sup>[9]</sup>所描述的方法以及试剂公司提供的试剂使用说明书。构建成功的质粒送往上海生工进行测序分析和验证。

## 1.3 重组蛋白表达与纯化

将 His-Tag 融合目的基因的表达载体 pET28a-CcmK2 转化大肠杆菌 BL21(DE3),涂布于带有相应抗性的 LB 固体培养基,37 °C 恒温培养箱倒置生长 10~12 h。挑取平板上的单菌落至含有 0.8% 葡萄糖的 LB 液体抗性培养基中,37 °C 180 r/min 培养 6~8 h (或过夜)。然后以 1% 的接种比例接种新鲜培养基,震荡培养 2~3 h 后,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导;继续震荡培养 4 h 后,离心收集菌体。

采用裂解缓冲液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 300 mmol/L KCl] 悬浮细胞后进行压力破碎。细胞裂解液经 12 000 r/min 离心 15 min 后,弃上清,加入 10 mL 包涵体溶解缓冲液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 8 mol/L Urea] 将其重悬后,在冰浴条件下静置 20 min,期间可用超声波处理 (以不发热不产生气泡为准) 10 min 促进溶解。将溶解后的澄清液用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。然后用 Ni-NTA 亲和层析柱进行亲和纯

化<sup>[10]</sup>。蛋白浓度采用 Bradford 法<sup>[11]</sup>进行定量。

## 1.4 多克隆抗体制备

将纯化的蛋白 CcmK2 作为抗原进行家兔免疫。初次免疫家兔取 600  $\mu\text{g}$  蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化。以后每隔 2 周加强免疫 1 次,每次取 400  $\mu\text{g}$  蛋白,加入等体积弗氏不完全佐剂,充分乳化后进行家兔免疫。第 3 次免疫后取 2 mL 血液检测效价,抗体效价达到要求后,颈动脉采血,血液在 37 °C 放置 3 h,小心吸取上清 (兔血清)。将抗原免疫家兔后得到的抗血清用硫酸铵沉淀 (每 1 g 兔血清中加入 0.313 g 固体硫酸铵),得到的悬浊液置于 4 °C 保存,使用前将沉淀充分悬浮。

## 1.5 多克隆抗体特异性和效价分析

使用 Dot blot 法检测抗体效价,蛋白不需要通过电泳进行转膜操作,直接结合到硝酸纤维膜或者 PVDF 膜上即可进行抗体抗原免疫反应<sup>[12]</sup>。首先,将抗体和抗原进行稀释。将血清 (S) 硫酸铵沉淀得到的悬浊液用 1 mg/mL BSA 进行 1 : 100 稀释 ( $S_0$ )。将  $S_0$  进行 2 倍梯度稀释 ( $S_1 \sim S_7$ )。将抗原蛋白 (A) 用 1 mg/mL BSA 稀释为 0.01 mg/mL ( $A_0$ )。将  $A_0$  进行 2 倍梯度稀释 ( $A_1 \sim A_7$ )。按照图 3 标识进行点膜,每个孔点 1  $\mu\text{L}$  到硝酸纤维素膜上。将待测抗体按 1 : 1 000 稀释后与膜孵育,然后用羊抗兔二抗 (HRP 标记) 孵育,通过 ECL 试剂显色,获取杂交信号。抗体效价按照文献<sup>[12]</sup>所提供的方法进行计算。

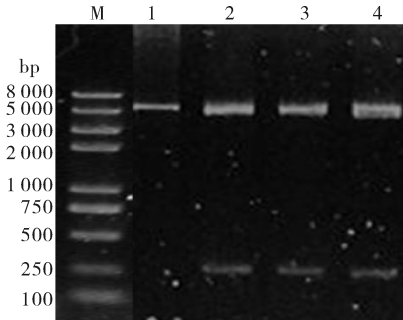
为了进行特异性分析,分别将集胞蓝细菌 PCC 6803 中的 CcmK1、CcmK3 和 CcmK4 进行原核表达和纯化。蓝细菌总蛋白提取利用 Fastprep 方法进行,取样离心,收集处于对数生长期的集胞蓝细菌 PCC 6803 3 mL,加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 和 3  $\mu\text{L}$  PMSF 及适量玻璃珠,FastPrep-24 (MP) 破碎细胞,于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液采用 Bradford 法进行定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组载体的构建

利用 PCR 技术扩增获得集胞蓝细菌 PCC 6803 *CcmK2* 编码基因后,利用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,连入原核表达载体 pET28a (+) 中,得到 pET28a-CcmK2 表达载体。首先抽取 3 个克隆的质粒,通过 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后的凝胶电泳结果显示: 3 个 pET28a-CcmK2 质粒均能够酶切得到 CcmK2

片段的条带(图 1)。将该质粒送往上海生工进行测序分析,进一步证实了克隆序列的准确性。最后将该质粒转入大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3),得到 CcmK2 重组表达菌株。



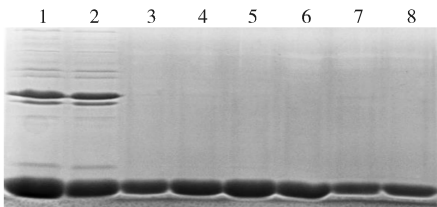
M:DL 2000 plus II 核酸分子质量标准;泳道 1:pET28a 经过 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切;泳道 2~4:pET28a-CcmK2 经过 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切。300 bp 左右片段指示 CcmK2。M indicated the DL2000 plus II standard DNA ladder; Lane 1 showed pET28a digested by *Nde* I and *Xho* I; Lane 2-4 indicated constructs pET28a-CcmK2 digested by *Nde* I and *Xho* I. Approximate 300 bp fragment indicated CcmK2.

图 1 pET28a-CcmK2 质粒构建

Fig.1 Construction and verification of plasmid pET28a-CcmK2

## 2.2 重组 CcmK2 蛋白的表达与纯化

将表达菌株用 LB 培养至对数生长前期,加入 1 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白诱导表达,诱导时间分别设为 1、2、3 和 4 h,取样提取总蛋白进行分析。pET28a-CcmK2 表达菌株在 1 mmol/L 的 IPTG 条件下诱导 4 h 离心收集菌体。经过压力破碎细胞后,再离心收集包涵体蛋白,利用 8 mol/L 尿素进行变性,发现总蛋白中存在大量重组蛋白(图 2)。随后,利用 Ni-NTA 亲和层析纯化的方法获得高纯度 CcmK2 重组蛋白(图 2)。根据染色结果可以确定纯化得到的目的蛋白(泳道 4、5、6)的纯度超过 95%,满足免疫家兔制备多克隆抗体的要求。



泳道 1:诱导后的大肠杆菌总蛋白;泳道 2~8:采用 250 mmol/L 咪唑洗脱依次收集的洗脱液。Lane 1 indicated the induced total protein of *E. coli* and lane 2-8 showed 250 mmol/L imidazole elution flowed through nickel-affinity chromatography column.

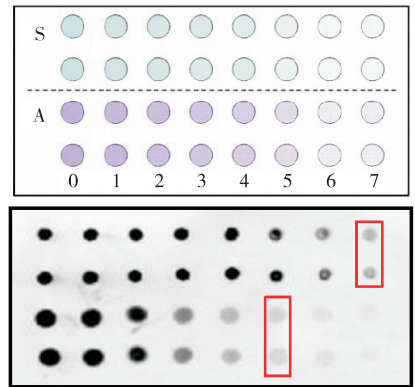
图 2 重组 CcmK2 蛋白的诱导及其纯化

Fig.2 Induction and purification of recombinant CcmK2

## 2.3 抗 CcmK2 多克隆抗体的制备与效价检测

取 600  $\mu$ g 纯化的 CcmK2 蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后,对家兔进行皮下免疫。此后每 2 周对该家兔用 400  $\mu$ g 纯化蛋白进行加强免疫。3 次免疫后,采静脉血,制备抗血清。

本研究采用 Dot blot 方法进行抗体效价检测<sup>[10]</sup>,如图 3 所示, $A_5$ 与  $S_7$ 的信号强度相当。经过计算,CcmK2 抗体效价为  $2^{-2}$ ,即每个 CcmK2 抗原分子结合 4 分子血清蛋白。30  $\mu$ L 抗体血清可以检测的抗原量为  $A_6$ ,对应的 CcmK2 蛋白量 0.16 ng,能够满足对集胞蓝细菌 PCC 6803 体内 CcmK2 蛋白质丰度检测的要求。



上:Dot blot 杂交试验样品分布示意图;下:Dot blot 检测 CcmK2 抗体效价的结果; $S_0$ :100 倍稀释抗血清; $S_1$ - $S_7$ : $S_0$  的 2 倍稀释梯度; $A_0$ :CcmK2 10 ng; $A_1$ - $A_7$ : $A_0$  的 2 倍稀释梯度。Top: Schematic representation of the sample arrangement in Dot blot; Down:Dot blot result of CcmK2 antibody. $S_0$  indicated 100 times dilution of serum;  $S_1$ - $S_7$  mean 2 fold dilution gradient of  $S_0$ .  $A_0$  implied 10 ng of purified CcmK2 protein;  $A_1$ - $A_7$  were 2 fold dilution gradient of  $A_0$ .

图 3 CcmK2 抗体效价检测

Fig.3 Dot blot of CcmK2 antibody

在集胞蓝细菌 PCC 6803 中还存在 3 个 CcmK2 的类似蛋白,分别是 CcmK1、CcmK3 和 CcmK4,将 4 个蛋白质的氨基酸序列进行比对,发现它们在氨基酸序列上具有高度的保守性。为验证 CcmK2 的抗体是否与其他 3 个蛋白存在交叉反应,将 CcmK1、CcmK3 和 CcmK4 进行体外原核表达和纯化后,利用 CcmK2 抗体进行了 Western blot 检测(图 4),4 个相同量的体外重组表达和纯化的外壳蛋白(1 ng)均能够被 CcmK2 抗体检测,但是 CcmK2 的信号明显强很多。另一方面,由于 4 个外壳在分子质量上存在差异,因此,CcmK2 抗体能够特异性地用于 CcmK2 的检测。

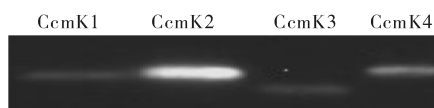
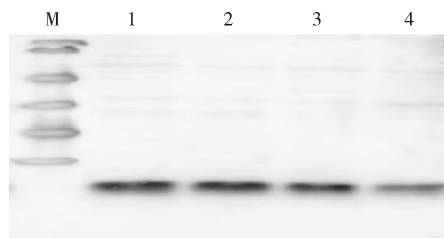


图 4 利用 CcmK2 抗体检测蓝细菌外壳蛋白 CcmK1、CcmK2、CcmK3 和 CcmK4

Fig.4 Detection of CcmK1, CcmK2, CcmK3 and CcmK4 by CcmK2 antibody

## 2.4 CcmK2 多克隆抗体对蓝细菌中 CcmK2 蛋白的检测

为了验证 CcmK2 抗体能否适用于蓝细菌中羧酶体外壳蛋白 CcmK2 的丰度检测,抽提蓝细菌总蛋白后,将抗体稀释 1 000 倍进行 Western blot 检测。结果表明,制备的 CcmK2 抗体能够有效实现对集胞蓝细菌 PCC 6803 中羧酶体外壳蛋白的检测。当总蛋白的量下降到 1.75  $\mu\text{g}$  的时候,仍然有清晰的 CcmK2 的信号。同时,杂信号很少。表明本研究所制备的 CcmK2 多克隆抗体能够特异性地实现对蓝细菌总蛋白中 CcmK2 丰度的灵敏检测<sup>[13]</sup>。



泳道 1~4 分别表示 14、7、3.5 和 1.75  $\mu\text{g}$  蓝细菌总蛋白。Lane 1-4 indicated the loading amount of cyanobacteria total protein were 14, 7, 3.5 and 1.75  $\mu\text{g}$  respectively.

图 5 集胞蓝细菌 PCC 6803 中 CcmK2 蛋白丰度的 Western blot 检测

Fig.5 Western blot analysis for CcmK2 abundance in *Synechocystis* sp. PCC 6803

## 3 讨论

羧酶体是蓝细菌二氧化碳浓缩机制中最主要的组成部分。本研究中 CcmK2 蛋白是羧酶体外壳蛋白中丰度最高的蛋白,也是羧酶体结构维持和功能行使的关键所在。本研究利用 pET28a 为表达载体,在大肠杆菌 BL21 菌株中实现了 CcmK2 的高效诱导表达;进一步通过亲和层析纯化 CcmK2 包涵体,获得了重组的 CcmK2 纯化蛋白;接着以 CcmK2 为抗原免疫家兔制备出抗 CcmK2 的多克隆抗体,并且完成了抗体的效价评估,确定本研究所提供的 CcmK2 多克隆抗体能够用于集胞蓝细菌 PCC 6803

中 CcmK2 丰度的分析。进一步利用该多克隆抗体对原核表达纯化的 CcmK2 的同源蛋白 CcmK1、CcmK3 和 CcmK4 进行的交叉反应测试表明,该抗体同时也能检测到其他 3 个同源蛋白的信号。这可能是由于 CcmK2 的 3 个同源蛋白 CcmK1、CcmK3 和 CcmK4 在 DNA 序列以及蛋白序列上都具有较高的同源性。不过,相比 CcmK2,其检测灵敏度有显著差异。同时,蛋白质大小也存在细微的不同。

利用尿素等蛋白变性剂进行包涵体变性-纯化,然后通过透析复性以获得大量纯化的重组蛋白是多克隆抗体制备中重要的蛋白纯化策略。在本研究中,重组 CcmK2 蛋白在大肠杆菌中具有较高的表达量,但主要以包涵体形式存在。我们采用 8 mol/L 尿素对包涵体进行溶解,进而通过亲和层析获得了重组蛋白。由于 CcmK1、CcmK2、CcmK3 和 CcmK4 序列相似度高,多克隆抗体难以完全予以区分。不过由于 CcmK2 属于丰度最高的羧酶体外壳蛋白,因此,在实际检测中可以通过对总蛋白的量予以控制,进而实现对 CcmK2 的专一检测。总之,CcmK2 多克隆抗体的制备为进一步研究蓝细菌中羧酶体结构及其功能调控奠定了基础。

羧酶体是蓝细菌二氧化碳浓缩机制的核心组成部分,其结构组成对环境的响应有助于我们解析二氧化碳的固定机制。羧酶体内核蛋白 RbcL 的抗体比较广泛地运用于羧酶体分离及纯化研究<sup>[14]</sup>。但是羧酶体外壳蛋白的抗体尚未得到制备和运用。利用  $\alpha$  型羧酶体外壳蛋白 CsoS1 的多克隆抗体,Roberts 等<sup>[15]</sup>分析了海洋蓝细菌 *Prochlorococcus marinus* MED4 中纯化的  $\alpha$  型羧酶体的外壳蛋白的组成。虽然本研究制备的 CcmK2 多克隆抗体能够用于细胞内 CcmK2 丰度的监测,但是,多克隆抗体制备本身的缺陷导致其存在一定的非特异性。一个理想的解决方案是制备不同的蓝细菌羧酶体外壳蛋白的单克隆抗体库,进而筛选各个候选蛋白特异性响应的高灵敏、高特异性的单克隆抗体,为详细分析不同环境中细胞内羧酶体组分丰度变化奠定基础。同时,单克隆抗体也为开展免疫电镜等单细胞原位分析技术用于细胞内羧酶体组分的精细分布提供了科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] TANAKA S, KERFELD C A, SAWAYA M R, et al. Atomic-level models of the bacterial carboxysome shell[J]. Science,

- 2008,319(5866):1083-1086.
- [2] NORMAN E G, COLMAN B. Purification and characterization of phosphoglycolate phosphatase from the cyanobacterium *Coccochloris penicostis* [J]. *Plant physiology*, 1991, 95 (3): 693-698.
- [3] KELLY G J, LATZKO E. Chloroplast phosphofructokinase: II. Partial purification, kinetic and regulatory properties [J]. *Plant physiology*, 1977, 60(2): 295-299.
- [4] SAVAGE D F, AFONSO B, CHEN A H, et al. Spatially ordered dynamics of the bacterial carbon fixation machinery [J]. *Science*, 2010, 327(5970): 1258-1261.
- [5] KUPIRYANOVA E V, SINETOVA M A, CHO S M, et al. CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin [J]. *Photosynthesis research*, 2013, 117(1/2/3): 133-146.
- [6] KERFELD C A, SAWAYA M R, TANAKA S, et al. Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles [J]. *Science*, 2005, 309(5736): 936-938.
- [7] 高良春, 张巨源, 王莉, 等. 培养基中几种重要营养元素对 *Anabaena* sp. strain PCC 7120 及 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 生长的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(6): 17-24.
- [8] 阳桂丹, 张巨源, 陈雯莉. *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 定量 PCR 模板制备方法的改进 [J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(6): 44-51.
- [9] 莎姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2016.
- [10] CROWE J, DOBELI H, GENTZ R, et al. 6× His-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification [J]. *Methods in molecular biology*, 1994, 31: 371-387.
- [11] ERNST O, ZOR T. Linearization of the Bradford protein assay [J]. *Journal of visualized experiments*, 2010(38): e1918. doi: 10.3791/1918.
- [12] VERA-CABRERA L, RENDON A, DIAZ-RODRIGUEZ M, et al. Dot blot assay for detection of anti-diacyltrehalose antibodies in tuberculous patients [J]. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 1999, 6(5): 686-689.
- [13] SCHNEPPENHEIM R, RAUTENBERG P. A luminescence Western blot with enhanced sensitivity for antibodies to human immunodeficiency virus [J]. *European journal of clinical microbiology*, 1987, 6(1): 49-51.
- [14] CAMERON J C, WILSON S C, BERNSTEIN S L, et al. Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway [J]. *Cell*, 2013, 155(5): 1131-1140.
- [15] ROBERTS E W, CAI F, KERFELD C A, et al. Isolation and characterization of the *Prochlorococcus* carboxysome reveal the presence of the novel shell protein CsoS1D [J]. *Journal of bacteriology*, 2012, 194(4): 787-795.

## Preparation and detection of polyclonal antibody to CcmK2 protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803

LI Pan ZHI Yao WANG Fangkui CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** CcmK2, as one of the most abundant carboxysome shell proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803, plays an important role in the assembly and biogenesis of carboxysome. In this study, the prokaryotic expression vector pET28a-CcmK2 was constructed and high yield recombinant CcmK2 protein with six histidine tags was expressed by inducing in *Escherichia coli* BL21 (DE3). In order to produce the polyclonal antibody against rabbit, the highly performed CcmK2 protein was purified with metal affinity chromatography. Result of Dot blot analysis showed that the polyclonal antibody could effectively detect cyanobacterial CcmK2 protein. Result of antibody specificity test showed that CcmK2 polyclonal antibody could weakly reacted with other carboxysome shell proteins. Western blot analysis confirmed that this antibody was able to specifically and sensitively detect the abundance of CcmK2 in cyanobacterium PCC 6803. The polyclonal antibody generated in this study will lay a foundation for further studying the abundance of CcmK2 in cyanobacterium PCC 6803.

**Keywords** *Synechocystis* sp. PCC 6803; carboxysome; Western blot; CO<sub>2</sub> concentrating mechanism