

人抗氧化蛋白-1 在大肠杆菌中的表达、纯化及活性鉴定

毛爽¹, 陈少沛¹, 颜晟¹, 王海鹰², 宁正祥², 李杉¹, 王菊芳¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510006)

摘要: 为得到较纯的具有活性的人抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 1 (Prx1), 本文先用 PCR 的方法扩增了人 Prx1 的 cDNA 序列, 然后将其连接到 pET28 表达载体上, 从而构建了编码全长的人抗氧化蛋白-1 基因的 pET28-Prx1 原核表达质粒。经双酶切及测序鉴定后将表达质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行表达, 并通过 SDS-PAGE 和 western blot 来鉴定表达产物。随后用 Ni-NTA 螯合亲和层析的方法纯化重组蛋白, 并测定该酶的米氏常数, 用质粒保护实验鉴定该蛋白其活性。最终表达载体经酶切和测序鉴定证实构建成功, 表达产物在 SDS-PAGE 和 western blot 图的 25 kD 左右, 与 prx1 真实的蛋白分子量相符, 说明 Prx1 蛋白成功表达。Prx1 纯化后产量达到 7.59 mg/g 菌体, 纯度达到 88.50%。纯化后的 Prx1 在 37 °C 和 pH 7.4 的条件下催化 H₂O₂ 反应的米氏常数 K_m 为 2.06×10⁻⁴ mol/L, 质粒保护实验表明 Prx1 可以保护 pUC18 质粒免受氧化损伤。因此, Prx1 在大肠杆菌中成功表达并得到较纯的活性蛋白。

关键词: 抗氧化蛋白 1; 重组表达; 亲和层析; 蛋白印迹法; 氧化损伤; 质粒保护实验

文章编号: 1673-9078(2014)9-55-59

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.010

Purification and Activity of Human Peroxiredoxin 1 Expressed in *E.coli*

MAO Shuang¹, CHEN Shao-pei¹, YAN Sheng¹, WANG Hai-ying², NING Zheng-xiang², LI Shan¹, WANG Ju-fang¹

(1.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2.School of Light industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to obtain active human peroxiredoxin 1(Prx1) with high purity, Prx1 cDNA sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR), cloned in expression vector pET28 to construct a prokaryotic expression plasmid pET28-Prx1, containing full-length human *Prx1* gene. After endonuclease digestion and DNA sequencing, the plasmid was transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for expression. The expression product was identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting. The recombinant protein was purified by nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity chromatography, the Michaelis constant (K_m) for Prx1 was determined, and the activity of Prx1 was identified by plasmid protection assay. The result of endonuclease digestion and DNA sequencing showed that recombinant plasmid was constructed successfully. The expression product was approximately 25 kDa, as determined by SDS-PAGE and western blotting, which is consistent with the actual molecular weight of human Prx1. After purification, the yield of Prx1 was 7.59 mg/g bacteria, with a purity of 88.50%. The K_m value of purified Prx1 was 2.06×10⁻⁴ mol/L in catalytic reduction of H₂O₂ at 37 °C with a pH value of 7.4. Plasmid protection assay showed that Prx1 could protect pUC18 DNA from oxidative damage. Thus, Prx1 was successfully expressed in *E.coli* and an active protein with high purity was obtained.

Key words: peroxiredoxin 1; recombinant expression; affinity chromatography; western blotting; oxidative damage; plasmid protection assay

在生物体内, 存在着一个复杂的、相互作用的网络来保护细胞免受氧化应激的损害^[1-2]。这个网络主要

收稿日期: 2014-03-28

基金项目: 卫生部重大新药创制(2011ZX09506-001); 新世纪优秀人才支持计划资助(NCET-10-0399); 中国博士后科学基金(2012M521593; 2013T60796)

作者简介: 毛爽(1988-), 女, 硕士研究生, 从事生物化学与分子生物学研究

通讯作者: 王海鹰(1983-), 女, 博士后, 博士, 主要研究领域为生物工程及生物制药

由一些重要的酶组成, 包括超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD), 过氧化氢酶(Catalase), 硫氧还蛋白(Thioredoxin)等。阿尔茨海默症^[3], 帕金森氏^[4], 和神经退行性疾病中的运动神经元疾病^[5]等疾病的发生, 都被认为与氧化还原失衡以及自由基在体内的积累有关。

Peroxiredoxin 是广泛存在于真核生物和原核生物中的一类抗氧化蛋白, 具有抗氧化和清除氧自由基的作用, 可以保护细胞免受过氧化环境及氧自由基的损

害的损伤。Peroxiredoxin 1 (Prx1) 是 Peroxidoxin 蛋白的一种, 在哺乳动物细胞中主要定位于细胞质中, 在多种组织中均有表达, 其在成体肝脏、肾脏以及胚胎中表达水平较高^[5-6]。此外, 它在氧化应激的条件下表达量会显著增加, 在一些恶性肿瘤中有高表达的情况。近期研究表明, Prx1 的表达与肿瘤细胞的增殖、分化、转移、复发等密切相关, 因而可以作为相关肿瘤诊断的标志分子^[7]。Hwang 等研究发现 A549 肺癌细胞敲除 Prx1 使多烯紫杉醇引起的细胞毒性得到增强, 同时体内试验表明相对于对照组实验组较高程度上延滞了 A549 肿瘤的生长^[8]。Bin 等研究发现 Prx1 在上皮细胞-间质转化 EMT 具有重要作用, 而 EMT 与癌细胞迁移密切相关^[9]。Cao 等发现了 Prx1 通过调节 PTEN/AKT 通路抑制肿瘤发生的现象^[10]。

目前国内外对于 Prx1 的研究大多针对其在肿瘤相关方面的机理研究, 国内尚无 Prx1 重组表达的报道。本研究重组表达人 Prx1 的基因并得到大量纯化后的蛋白, 对 Prx1 进行米氏常数测定, 并通过质粒保护实验鉴定酶的活性, 得到的活性蛋白可用于抗氧化活性及相关肿瘤诊断抗体的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

人 Prx1 的 cDNA 序列由复能基因公司(广州)提供。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3) 均由本实验室制备, 质粒 pET28a 为本实验室, 保藏引物由英潍捷基公司合成。

1.1.2 试剂

Primer Star, EcoR I 和 Xho I, T4 连接酶均购自 Takara (大连) 有限公司。质粒小提试剂盒, PCR 产物纯化试剂盒购自 TIANGEN 公司。5mL His-Trap 柱购自 GE 公司。蛋白质定量试剂盒购自 Thermo 公司。抗 His-tag 抗体购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 仪器

PCR 扩增仪、蛋白质电泳仪购自 Bio-Rad 公司, 层析仪 AKTA purifier 型购自美国通用电气公司, Scientz-IIID 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司, 酶标仪 Multiscan Spectrum 型购自 Thermo 公司。

1.1.4 培养基

大肠杆菌采用 LB 培养基培养

1.2 方法

1.2.1 pET28-Prx1 表达质粒构建

以复能公司提供的人 Prx1 的 cDNA 序列为模板, 含高保真酶的 PCR 预混液 Primerstar 扩增目的基因, 所用引物为:

Prx1-F: 5'-TTTAGAATTCATGTCTTCAGGAAATGCTAAAATTG-3'

Prx1-R: 5'-TTCCCTCGAGCTTCTGCTTGGAGAAATATTCTTTG-3'

经限制性内切酶 EcoRI 和 Xho I 酶切后回收目的片段与 pET28a 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 利用含卡那抗性的 LB 平板和菌落 PCR 初步筛选转化子。挑选阳性克隆送至华大基因公司测序鉴定。将构建好的表达质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 获得相应的基因工程菌。

1.2.2 pET28-Prx1 的诱导表达、纯化及 Western Blot 鉴定

从转化的平板上挑取含有 pET28-Prx1 表达质粒的克隆接种至 LB 培养基中(卡那霉素终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 培养过夜后以 3% (V/V) 转接于新鲜的 LB(卡那霉素终浓度同前) 培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养至 OD_{600nm} 达到 0.6 时加入 IPTG(终浓度 0.4 mmol/L) 诱导; 继续培养 18 h 后离心收集菌体。上清液过滤后经镍离子螯合亲和层析柱(5 mL His-Trap, GE) 纯化, 梯度洗脱, 收集不同咪唑浓度处的洗脱峰, SDS-PAGE 检测纯化情况。用蛋白质定量试剂盒测定目的蛋白含量。重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 抗 His-tag 抗体孵育后进行 Western Blot 检测。

1.2.3 硫氰酸铁法测 Prx1 催化 H₂O₂ 的反应活性

重组 Prx1 蛋白的抗氧化活性鉴定主要参考文献^[11]的检测方法。将 5 μL 重组 Prx1 蛋白(约 1.5 μg) 加入 85 μL 的反应缓冲液(1 mmol/L DTT/0.03 \times PBS/0.5%甘油, pH 7.4) 中室温孵育 2 min, 然后加入 10 μL 不同浓度的 H₂O₂ 使反应开始(0.1~2 mmol/L), 反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 待反应至所设定时间时加入 40 μL 26% 的三氯乙酸终止反应。向体系中加入 40 μL 硫酸亚铁铵(Fe(NH₄)₂(SO₄)₂) 和 20 μL 硫氰酸钾(KSCN), 与剩余过氧化氢反应后形成红色络合物, 测定 A_{475nm} 后与 H₂O₂ 标准曲线对比即可得到剩余过氧化氢的含量, 进而计算出反应速度。

1.2.4 Prx1 保护质粒 DNA 免受氧化损伤

正常情况下的 pUC18 质粒呈超螺旋状态(super-coiled form), 然而在受到氧自由基或其它氧化损伤的情况下 pUC18 质粒则会由超螺旋状态变成缺刻状态(nicked form)。若超螺旋质粒出现缺刻, 则

在电泳时的迁移速度也不一样,因此可以应用琼脂糖凝胶电泳对其是否缺刻进行鉴定^[12]。

MFO (Mixed-function oxidation system) 是一种用于体外营造氧化环境的体系,其原理为体系内的 Fe³⁺ 可以造成 DNA 的氧化损伤。本文应用 MFO 体系来鉴定 Prx1 保护 DNA 免受氧化损伤的能力。

具体的实验步骤为:将 1 μg pUC18 质粒与不同浓度的 Prx1 在 MFO 反应液中共孵育,反应体系总体积为 15 μL,包含 40 μmol/L FeCl₃, 10 mmol/L DTT 和 20 mmol/L PBS (pH 7.4)。反应 1 h 后取样进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 pET28-Prx1 表达质粒的构建

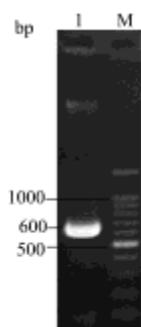


图 1 目的基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of target gene Prx1

注: 1: PCR 产物; M: DNA marker。

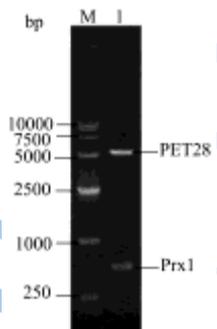


图 2 pET28-Prx1 鉴定

Fig.2 Identification of pET28-Prx1 by double digestion

注: M: DNAMarker; 1: pET28-Prx1 双酶切 (EcoR I/Xho I)。

以复能公司提供的 Prx1 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因,引物两端分别添加 EcoR I 和 Xho I 酶切位点。电泳结果 (图 1) 显示扩增片段大小与预计大小 (600 bp) 一致,割胶回收目的条带,PCR 产物经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后与 pET28a 载体连接,转化 DH5α 大肠杆菌,菌液 PCR 初步筛选后提取转化子质粒进行双酶切鉴定 (图 2),结果显示已插入预计大小的外源

基因。测序结果显示插入的外源基因与人 Prx1 基因序列完全相同,说明人 Prx1 的表达载体已成功构建。

2.2 pET28-Prx1 的诱导表达、纯化及 Western

Blot 鉴定

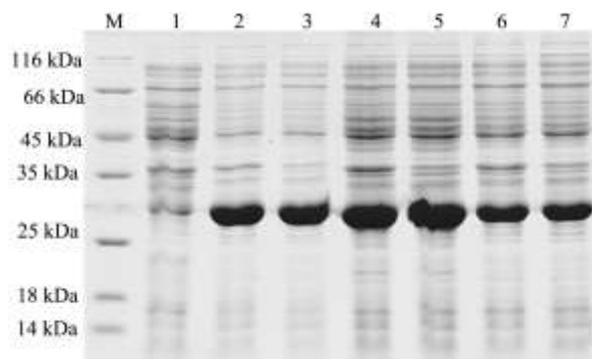


图 3 不同诱导温度下 Prx1 小量表达结果

Fig.3 Optimization of Prx1 expression at different temperatures

注: M: 蛋白 marker; 1: 未诱导全菌; 2: 18 °C 诱导全菌; 3: 18 °C 诱导上清; 4: 25 °C 诱导全菌; 5: 25 °C 诱导上清; 6: 37 °C 诱导全菌; 7: 37 °C 诱导上清。

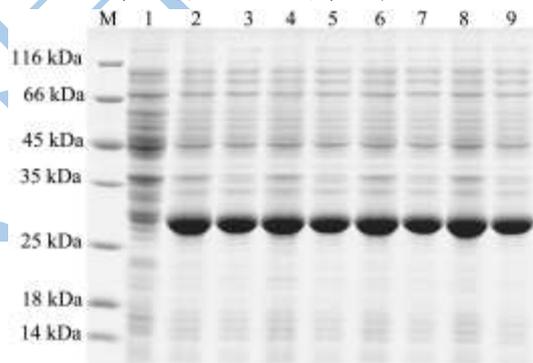


图 4 不同 IPTG 诱导浓度下 Prx1 小量表达结果

Fig.4 Optimization of Prx1 expression with different IPTG concentrations

注: M: 蛋白 marker; 1: 未诱导全菌; 2: 0.4 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 3: 0.4 mmol/L IPTG 诱导下上清; 4: 0.8 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 5: 0.8 mmol/L IPTG 诱导下上清; 6: 1.2 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 7: 1.2 mmol/L IPTG 诱导下上清; 8: 1.6 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 9: 1.6 mmol/L IPTG 诱导下上清。

SDS-PAGE 结果显示 25 kD 附近有明显诱导条带,分子量与理论大小相符合。摸索不同诱导温度和不同 IPTG 诱导浓度条件下重组蛋白的表达情况, SDS-PAGE (图 3) 结果显示 Prx1 在 25 °C 时的表达量最高, Bandscan 软件灰度分析显示目的蛋白占总蛋白的比例达到了 61.20%。IPTG 浓度在 0.4~1.6 mmol/L 范围内对 Prx1 的表达量影响不明显 (图 4)。由于 IPTG 具有细胞毒性,高浓度时不利于细胞生长,在保证表

定量不受明显影响的同时,本文最终选定的诱导 IPTG 终浓度为 0.40 mmol/L。最终确定选用 25 °C 和 IPTG 浓度 0.40 mmol/L 进行 Prx1 的诱导表达,将超声裂解后的菌体上清液用 His-Trap 柱进行亲和层析,用含有不同浓度咪唑的洗脱液进行梯度洗脱,SDS-PAGE(图 5)分析显示随着洗脱液中咪唑浓度的升高(50 mmol/L 至 500 mmol/L),得到的 Prx1 的纯度也越来越高,当洗脱液中咪唑浓度达到 500 mmol/L 时,Prx1 纯度可达到 88.50%,使用 Protein Assay Kit 测定 Prx1 蛋白浓度为 0.92 mg/mL,收集所得蛋白总体积均为 14.00 mL,Prx1 的产量约为 7.59 mg/g 菌体。对纯化后的蛋白进行 Western Blot(用抗 His-tag 抗体)(图 6)分析,结果表明目的蛋白含有 His-tag 标签。

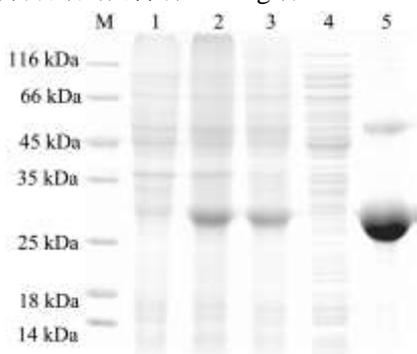


图 5 纯化后 Prx1 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果图

Fig.5 Purification of recombinant Prx1

注: M: 蛋白 marker; 1: 未诱导全菌; 2: 诱导全菌; 3: 诱导上清; 4: 穿过液; 5: 500mmol/L 咪唑处洗脱峰。

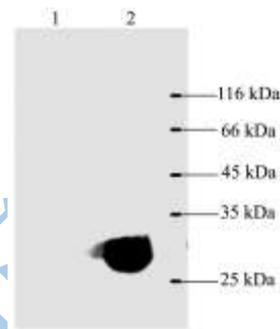


图 6 Prx1 的 Western blotting 鉴定结果图

Fig.6 Western blotting identification of recombinant Prx1

注: 1: 未诱导全菌; 2: 纯化后的 Prx1。

2.3 Prx1 催化 H₂O₂ 反应活性

利用 Prx1 催化 H₂O₂ 转化成 H₂O 和 O₂ 的反应,再应用硫氰酸铁法测定剩余的 H₂O₂ 含量,在测定过程中选择接近人体体温的 37 °C 作为统一测定温度,采用接近人血液酸碱度的 pH7.4 为测定条件。

在 37 °C, pH 为 7.4 的条件下,加入 10 μL 不同浓度的 H₂O 反应 5 min 后测定体系中残余的 H₂O₂ 并

计算出相应反应速度,作出 Prx1 催化 H₂O₂ 反应[S]-[V] 图(图 7)和 Prx1-H₂O₂ 反应的双倒数曲线图(图 8),R² 为 0.9836。分析可知,1.5 μg 重组 Prx1 蛋白催化 H₂O₂ 反应,的最大反应速率 V_{max}≈7.60 μM/min,米氏常数 K_m≈2.06×10⁻⁴ mol/L。Prx1 反应速率低,比较温和,但是 K_m 值很小,比相同条件下过氧化氢酶催化 H₂O₂ 反应的 K_m 值 2.50×10⁻² mol/L 小约 120 倍,说明酶与底物之间亲和力比较高。

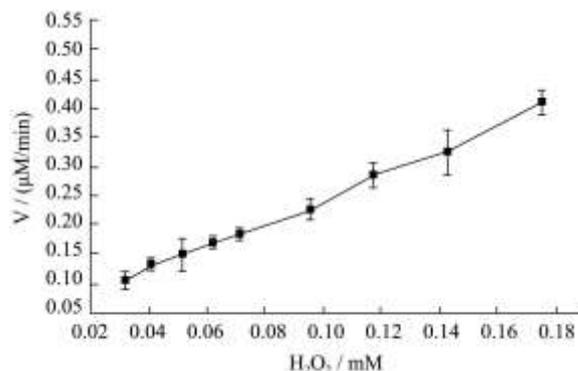


图 7 Prx1 催化 H₂O₂ 反应[S]-[V] 图

Fig.7 [S]-[V] plot of Prx1 catalyzing H₂O₂

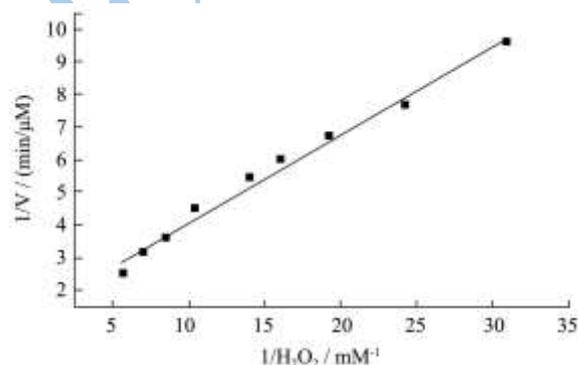


图 8 Prx1 催化 H₂O₂ 反应双倒数曲线图

Fig.8 Double reciprocal curve of Prx1 catalyzing H₂O₂

2.4 Prx1 保护质粒 DNA 免受氧化损伤

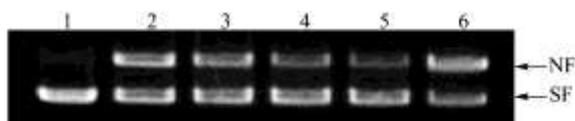


图 9 重组 Prx1 保护质粒免受氧化损伤的电泳鉴定

Fig.9 Plasmid protection activity of recombinant Prx1

注: 1: pUC18 质粒; 2: 质粒+Fe³⁺; 3: 质粒+Fe³⁺+1 μg Prx1; 4: 质粒+Fe³⁺+3 μg Prx1; 5: 质粒+Fe³⁺+5 μg Prx1; 6: 质粒+Fe³⁺+5 μg BSA。

pUC18 质粒受到氧化损伤时会由超螺旋状态(SF)变成缺刻状态(NF),表现在电泳图上则会出现一个位置上的迁移(shift)。从图上(图 9)可以看出,正常情况下的 pUC18 绝大部分是呈超螺旋状态(泳道 1),而在 Fe³⁺ 的氧化下相当一部分则由超螺旋

变成了缺刻状态(泳道2)。Prx1的加入可以一定程度上阻止质粒由超螺旋变成缺刻状态,随着它们浓度的提高,这种保护作用也越来越明显,在图上表现为呈缺刻状态的质粒条带越来越暗(孔道3~5),说明Prx1可以保护质粒免受过氧环境的损伤,并且呈现出剂量依赖效应。牛血清蛋白(BSA)作为缺乏氧化还原催化活性的对照蛋白,没有明显的质粒保护作用(在 Fe^{3+} 的氧化环境下,不能显著抑制质粒从超螺旋状态(SF)向缺刻状态(NF)的转变;孔道6)。这表明Prx1对质粒的保护作用并非由于蛋白的非特异作用,而需要它们的抗氧化活性。

3 结论

3.1 作为一种抗氧化蛋白,Prx1的生理功能是保护细胞免受过氧环境的损伤。近期研究发现Prx1在肿瘤检测方面具有一定的应用前景,在调节细胞增殖和过氧化氢介导的细胞凋亡的研究中具有重要作用。

Neumann等观察到Prx1敲除动物会出现溶血性贫血与血红蛋白不稳定,同时伴随亨氏小体形成,各种恶性肿瘤,如淋巴瘤,肉瘤,癌症的发病率也会增加^[13]。通过双向电泳技术比较正常肺上皮细胞和恶性转化细胞A549的蛋白表达情况,发现Prx1在A549细胞中的表达较正常细胞升高2倍多,它可能是肺癌发生的一个生物标志物。另外Prx1在淋巴瘤,肉瘤,乳腺癌等疾病患者中表达上调,这提示了Prx1在疾病诊断治疗方面具有重要意义,但是对于构建Prx1灵敏迅速的检测方法,以及它们能否成为这些疾病的生物标志物,还需要进一步的研究和评价。

3.2 目前国内外对于Prx1的研究主要集中于肿瘤相关的机理研究,国内尚无重组表达Prx1的相关报道,也无针对Prx1抗氧化活性的研究。国外Liau等^[11]从牛樟芝中提取Prx1 cDNA并构建载体在大肠杆菌中重组表达(产量及纯度未提及),研究了温度、PH、SDS、咪唑和胰蛋白酶对酶活的影响,通过质粒保护试验检测其抗氧化活力。本研究则得到较高纯度的活性蛋白并测定其催化 H_2O_2 反应的米氏常数,还需要在原有基础上深入继续研究Prx1的酶学性质,细化研究酶稳定性和酶活位点等具体结构性质,以及针对Prx1能否作为肿瘤标志物,制备单克隆抗体作为工具研究Prx1在肿瘤细胞扮演的角色。

3.3 本研究利用pET-28原核表达载体,成功构建了pET28-Prx1重组表达质粒,并在大肠杆菌BL21(DE3)中成功进行了表达,得到了高纯度的可溶性蛋白。进行活性检测得到催化 H_2O_2 反应的米氏常数,结果显示重组Prx1比过氧化氢酶具有更高的底物亲和力,并

且利用质粒保护实验初步验证了Prx1蛋白的抗氧化保护活性。

参考文献

- [1] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [J]. *Exp. Physiol.*, 1997, 82(2): 291-295
- [2] Pohanka M. Alzheimers disease and oxidative stress: a review [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2013, 21(3): 356-364
- [3] Smith M A, Rottkamp C A, Nunomura A, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, 1502(1): 139-144
- [4] Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood N W. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 12(11): 521-528
- [5] Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications [J]. *Diabetes Care*, 1996, 19(3): 257-267
- [6] Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein [J]. *Redox. Rep.*, 2002, 7(3): 123-130
- [7] Zhang B, Wang Y, Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy [J]. *Cancer Lett.*, 2009, 286(2): 154-160
- [8] Hwang K E, Park D S, Kim Y S, et al. Prx1 modulates the chemosensitivity of lung cancer to docetaxel through suppression of FOXO1-induced apoptosis [J]. *Int. J. Oncol.*, 2013, 43(1): 72-78
- [9] Ha B, Kim E K, Kim J H, et al. Human peroxiredoxin 1 modulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through its peroxidase activity [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 421(1): 33-37
- [10] Cao J, Schulte J, Knight A, et al. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity [J]. *EMBO J.*, 2009, 28(10): 1505-1517
- [11] Liau Y J, Chen Y T, Lin C Y, et al. Characterisation of 2-Cys peroxiredoxin isozyme (Prx1) from Taiwanofungus camphorata (Niu-chang-chih): Expression and enzyme properties [J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(1): 154-160
- [12] Sun J, Liu X, Li Q. Molecular cloning, expression and antioxidant activity of a peroxiredoxin 2 homologue from *Lampetra japonica* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(5-6): 795-801
- [13] Neumann CA, Krause DS, Carman CV, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression [J]. *Nature*, 2003, 424(6948): 561-565