

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00781

## 中国青岛文昌鱼硫氧还蛋白过氧化物酶表达、纯化及活性特征

廖 剑

南京军区福州总医院检验医学研究所,福州 350025

**[摘要]** 目的:将编码青岛文昌鱼硫氧还蛋白过氧化物酶(TPx)的基因克隆于原核表达载体,并通过表达获得重组的 TPx 蛋白。方法:将已获得的 TPx cDNA 片段克隆于原核表达载体 pET-32a(+)-M,转化大肠杆菌 BL21(DE3),获得重组表达质粒 pET-32a(+)-M-TPx。37℃下经 IPTG 诱导,该融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。获得的重组 TPx 蛋白再经过纯化,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析重组蛋白。并对重组蛋白进行活性鉴定和结构分析。结果:构建的重组质粒 pET-32a(+)-M-TPx 在大肠杆菌中高效表达,经纯化后的重组 TPx 蛋白纯度可达 90%以上,其单体相对分子质量为 24 460。重组 TPx 蛋白是以同源二聚体和单体混合的形式存在,在二硫苏糖醇(DTT)存在时具有还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>活性和对超螺旋 DNA 或对硫醇基敏感蛋白的保护作用。结论:本实验在大肠杆菌表达系统中高效表达了重组 TPx 蛋白,并且证实其活性与其高级结构紧密相关。

**[关键词]** 硫氧还蛋白过氧化物酶;青岛文昌鱼;原核表达;蛋白质纯化;酶活性;结构

**[中图分类号]** R 345.46 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0781-06

### Expression, purification and activity characterization of a thioredoxin peroxidase from *Branchiostoma belcheri Tsingtaunese*

LIAO Jian

Institute of Clinical Laboratory Medicine, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct a prokaryotic expression vector carrying thioredoxin peroxidase (TPx) gene of *Branchiostoma belcheri Tsingtaunese* and express it in *E. coli*. **Methods:** The cDNA fragments encoding TPx were obtained from *Branchiostoma belcheri Tsingtaunese* and were cloned into the expression vector pET-32a(+)-M; the product was used to transform BL21(DE3) cells and expression of TPx protein was induced by IPTG. The recombinant TPx was expressed as a histidine fusion protein in *E. coli* and was purified with Ni chromatography and SP cation exchange chromatography. The expression and purification of TPx were analyzed by SDS-PAGE; the activity and structure of the protein were analyzed. **Results:** The recombinant plasmid pET-32a(+)-M-TPx was highly expressed in *E. coli*. The purity of the protein was over 90% after purification; the molecular weight of the protein monomer was 24 460. The recombinant TPx protein existed as a mixture of both dimer and monomer. The recombinant TPx had a significant thiol-dependent peroxidase activity in the presence of dithiothreitol (DTT), and it could protect plasmid DNA and thiol-protein from damages caused by metal-catalyzed oxidation (MCO). **Conclusion:** The recombinant TPx protein has been successfully expressed in *E. coli*; its activity is closely related to the advanced structures.

**[KEY WORDS]** thioredoxin peroxidase; *Branchiostoma belcheri Tsingtaunese*; prokaryotic expression; protein purification; enzymatic activity; structure [Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7):781-786]

过氧化物还原酶(peroxiredoxins, Prx)是生物体内一类抗氧化蛋白酶,于1988年被Kim等<sup>[1]</sup>在酿酒酵母里发现,属于过氧化物酶家族,在体内主要通过还原过氧化氢和一些过氧化氢物(ROOH+2e<sup>-</sup>→ROH+H<sub>2</sub>O)来实现抗氧化作用。过氧化物酶的氢供体(hydrogen donor)目前发现的主要有谷胱甘肽、硫氧还蛋白、NADH、NADPH。过氧化物还原

酶与其他过氧化物酶比较最明显的特征就是绝大部分的过氧化物还原酶在体内是以硫氧还蛋白作为唯一的氢供体。正因为如此,过氧化物还原酶也被称为硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TPx)。但是并不是所有的过氧化物还原酶都是以硫氧还蛋白作为唯一氢供体<sup>[2]</sup>。

过氧化物还原酶普遍存在于多数生物体内。研

**[收稿日期]** 2007-11-30 **[接受日期]** 2008-03-26

**[作者简介]** 廖 剑, 博士生, 技师. E-mail: pamperslj28@yahoo. cn

究已经证明酵母、植物、动物、原生动、寄生虫甚至细菌和古细菌体内都含有该酶<sup>[3]</sup>,说明过氧化物还原酶在进化上是一个高度保守的蛋白。它的反应机制和具体的生物功能至今仍是一个未解之谜。

原索动物文昌鱼是现存的最接近脊椎动物的物种之一,是研究脊椎动物起源与进化的模式动物<sup>[4]</sup>,研究其过氧化物还原酶的反应机制和生理功能,有助于了解高度保守的过氧化物还原酶在生物进化过程中如何不断完善自己的功能。本研究克隆了青岛文昌鱼的 TPx 基因,获得重组 TPx 蛋白,并对重组蛋白进行了分离纯化和生物活性及结构的研究。

## 1 材料和方法

1.1 质粒与菌株 原核融合表达载体 pET-32a (+)M 由香港科技大学惠赠。大肠杆菌表达宿主菌 BL21(DE3)购自 Stratagene 公司。

1.2 工具酶及主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 及 *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶购自 New England Biolab 公司;PFU 高保真 DNA 聚合酶、dNTP 购自上海生工生物工程公司;Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 为 Omega Biotek 公司产品;低分子标准蛋白购自华美生物公司;IPTG 为 AMRESCO 公司产品。各种规格的层析柱分别购自 Amersham Pharmacia 公司和上海锦华仪器设备厂;Chelating Sepharose Fast Flow<sup>®</sup>、Sephadex G-25 (Fine) 和 SP-Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> 等填料购自 Amersham Pharmacia 公司。谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 和  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$  为 Sigma 公司产品;HEPES 为 Promega 公司产品;ADP、glutamine、dithiothreitol (DTT) 和 glutathione (GSH) 购自上海生工生物工程公司。

1.3 青岛文昌鱼 TPx 基因的引物设计 针对已含有 TPx 基因的质粒 pBSK-TPx 和 pET-32a (+)M 的多克隆位点,利用 Oligo6.0 设计 TPx 基因的 PCR 引物:5'-CGC GGA TCC TCT GCT GGA AAT GCC AAG-3' (引入 *Bam*H I 酶切位点);5'-CCG CTC GAG TCA TTA CTG CTT GGA GAA ATA TTC TTT G -3' (引入 *Xho* I 酶切位点)。由上海生工生物工程公司合成。

1.4 原核表达质粒的构建及鉴定 用 *Bam*H I 双酶切质粒 pBSK-TPx,经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,插入经同样双酶切处理的 pET-32a (+)M 载体,转化至大肠杆菌 BL21(DE3),挑选单菌落,抽提质粒酶切鉴定。

1.5 目的蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 鉴定 将

重组表达质粒转化表达宿主菌 BL21(DE3) 构建工程菌株。挑取工程菌株单菌落接种于 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体加富培养基中,37℃ 剧烈振荡培养 16 h,作为种子菌。取种子菌按 1:100 体积比接种,37℃ 培养至  $D_{600}$  约为 0.5~0.6 时,加入 IPTG 和 20% 葡萄糖至终浓度分别为 1 mmol/L 和 0.2%,于 20℃ 诱导表达 10 h。离心收菌,超声破碎,取总菌液以及离心取上清液进行 SDS-PAGE 分析检测重组蛋白质的表达情况。

1.6 目的蛋白的纯化 将总菌液离心后取上清液,分别经过  $\text{Ni}^{2+}$  金属螯合柱、Sephadex G-25 柱和 SP-Sepharose 阳离子交换柱对目的蛋白进行纯化,收集各个蛋白质洗脱峰进行 SDS-PAGE 分析检测重组蛋白质的纯化情况。

1.7 重组 TPx 蛋白非还原和还原 SDS-PAGE 分析 2× 样品处理缓冲液与样品等体积混匀煮沸 5 min,而后与经还原剂 DTT 处理过的样品一起进行 SDS-PAGE。

1.8 重组 TPx 蛋白高效液相色谱 (HPLC) 测定 将重组 TPx 蛋白干粉溶于 50 mmol/L DTT 溶液,4℃ 放置 12 h<sup>[5]</sup>。将未处理的重组 TPx 蛋白干粉和 DTT 还原过夜的蛋白溶液进行 HPLC 测定。

1.9 重组 TPx 蛋白还原  $\text{H}_2\text{O}_2$  活性实验 该活性实验参照 Lim 等<sup>[6]</sup>的方法。反应体系为 1 ml,包括 5 mmol/L DTT 或者 5 mmol/L GSH,50 mmol/L HEPES-HCl (pH 7.0) 缓冲液和重组 TPx 蛋白 (0、20、50、100 μg/ml)。室温放置 10 min 后,加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200 μmol/L)。分别室温放置反应 0、2.5、5、7.5 min,10 min 后加入 100 μl 质量体积分数为 100% 的 TCA,混匀后立即加入 200 μl 10 mmol/L  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  和 100 μl 2.5 mol/L KSCN,测定  $D_{475}$ 。根据反应剩余的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 KSCN、 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  形成的化合物的  $D_{475}$  来判断重组 TPx 蛋白还原  $\text{H}_2\text{O}_2$  的能力。

1.10 重组 TPx 蛋白保护超螺旋 DNA 实验 参照 Lim 等<sup>[6]</sup>的方法。反应体系为 50 μl,包括 10 mmol/L DTT,3 μmol/L  $\text{FeCl}_3$ ,50 mmol/L HEPES-HCl (pH 7.0) 缓冲液,1 μg 由 PEG 法提取的超螺旋 DNA (pGAPZαA) 和重组 TPx 蛋白 (500、200、100、50、25 μg/ml) 37℃ 温育 2 h。反应完后分别取 10 μl 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,并通过紫外分光成像系统分析结果。

1.11 重组 TPx 蛋白保护 GS 蛋白活性实验 参照 Kim 等<sup>[1]</sup>的方法。反应体系为 50 μl,包括 10 μg/ml GS,10 mmol/L DTT,3 μmol/L  $\text{FeCl}_3$ ,50 mmol/L

咪唑-HCl(pH 7.0)和不同浓度的重组 TPx 蛋白(20 和 100  $\mu\text{g/ml}$ )。该体系包括两部分,一部分为 30  $\mu\text{l}$ ,含有 GS、咪唑和 TPx;另一部分 20  $\mu\text{l}$ ,含有 DTT 和  $\text{FeCl}_3$ 。将两部分混合后 30 $^\circ\text{C}$  温育不同时间(0、2、8、15、25 min),然后加入 2 ml  $\gamma$ -Glutamyltransferase Assay Mixture,30 $^\circ\text{C}$  温育 5 min 后加入 1 ml Stop Mixture,测定  $D_{540}$ 。根据反应剩余的 GS 蛋白转移谷氨酰胺和铁离子形成的  $\gamma$ -Glutamyl-hydroxamate- $\text{Fe}^{3+}$  化合物的  $D_{540}$  来判断重组 TPx 蛋白保护 GS 蛋白活性的能力。

## 2 结果

2.1 pET-32a(+)-M-TPx 表达载体的构建及鉴定 以 pBSK-TPx 为模板 DNA,用已设计引物扩增 TPx 基因,克隆到 pET-32a(+)-M 表达质粒上。小量制备法提取重组质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切重组质粒,可切出与 PCR 产物(610 bp)大小一致的片段,以及与线性载体 pET-32a(+)-M(5.9 kb)大小一致的片段。用 TPx 上下游特异引物扩增重组质粒,也能获得一条与 TPx 预期大小一致的特征片段。见图 1。这都表明 TPx 基因已插入质粒载体 pET-32a(+)-M 中。经 DNA 测序证实该基因为 TPx 基因。

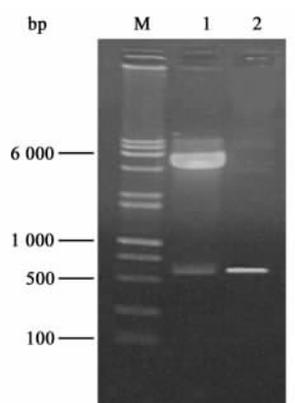


图 1 pET32a(+)-M-TPx 的酶切和 PCR 鉴定

Fig 1 Identification of expression plasmid pET32a(+)-M-TPx by enzymatic digestion and PCR amplification

M:1 kb DNA ladder; 1: PET32a(+)-M-TPx/*Bam*H I + *Xho* I; 2: PET32a(+)-M-TPx PCR amplification

2.2 重组 TPx 蛋白的诱导表达和纯化 重组转化菌经 IPTG 诱导后,经 SDS-PAGE 分析显示,工程菌表达出明显的特异产物带,相对分子质量与用软件 DNATOOLS 6.0 预测的理论值 24 460 相符。将超声破碎后离心得到的上清液进行 SDS-PAGE 分析,显示重组蛋白几乎全部可溶。将工程菌体的超

声上清液分别进行  $\text{Ni}^{2+}$ -Chelating Sepharose 整合层析和 SP-Sepharose 阳离子交换层析,收集洗脱峰,经 SDS-PAGE 分析显示最后获得的重组蛋白纯度可达 90% 以上。见图 2。

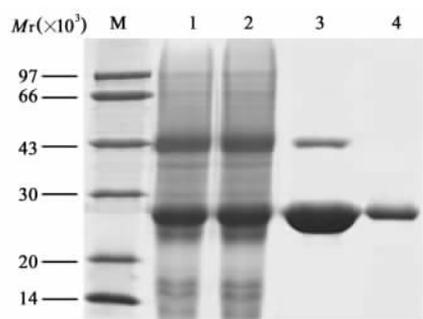


图 2 重组 TPx 蛋白的纯化

Fig 2 SDS-PAGE analysis of recombinant TPx protein

M:Protein marker; 1:Total bacterial proteins; 2: Sonication supernate of the bacterial; 3:Recombinant TPx purified by  $\text{Ni}^{2+}$  chelate column; 4:Recombinant TPx of Lane 3 purified by SP-Sepharose column

2.3 重组 TPx 蛋白的还原和非还原 SDS-PAGE 电泳结果的对比 将重组 TPx 蛋白进行还原和非还原 SDS-PAGE 电泳。见图 3。结果显示,1 号泳道的经过 DTT 还原的重组 TPx 蛋白只有一条目的蛋白带,而未经过 DTT 处理的 2 号泳道的蛋白则呈现几条蛋白带。在 2 号泳道中,有一条大小约为 45 000 的蛋白带,推测是由两个重组 TPx 蛋白单体通过其具有的两个活性的半胱氨酸残基互相形成二硫键而形成的同源二聚体。而在 DTT 的还原下,二硫键被打断,因而在 1 号泳道没有这一条蛋白带。2 号泳道在 25 000 左右有两条蛋白带,应该是重组 TPx 蛋白单体的不同形式。

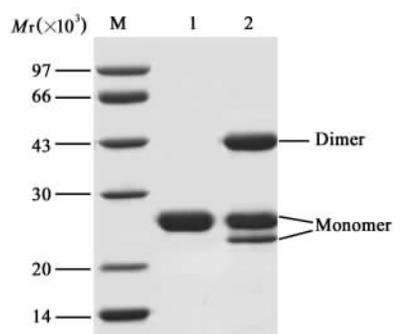


图 3 重组 TPx 蛋白的还原和非还原 SDS-PAGE 电泳结果

Fig 3 Reduced and non-reduced samples of recombinant TPx analyzed by 12% SDS-PAGE

M:Protein marker; 1:Reduced TPx purified by  $\text{Ni}^{2+}$  chelate column and SP-Sepharose column; 2:Non-reduced TPx purified by  $\text{Ni}^{2+}$  chelate column and SP-Sepharose column

2.4 重组 TPx 蛋白 HPLC 测定 分别将用 DTT 还原前后的重组 TPx 蛋白进行 HPLC 分析,见图 4。重组 TPx 蛋白在 DTT 还原前后,HPLC 结果明显不一致。B 图是经过 DTT 还原后的重组 TPx 蛋白的 HPLC 分析结果图,可以清楚看到只有单一的峰(4 号峰)。而 A 图是未经过 DTT 处理的重组 TPx 蛋白,则连续出现三个峰(1、2、3 号峰)。根据文献<sup>[7]</sup>和前面的实验结果,可以推断 1 号峰是重组 TPx 蛋白的同源二聚体,2 号峰和 3 号峰是重组 TPx 蛋白单体的不同形式。这一结果与 SDS-PAGE 的实验结果相一致。

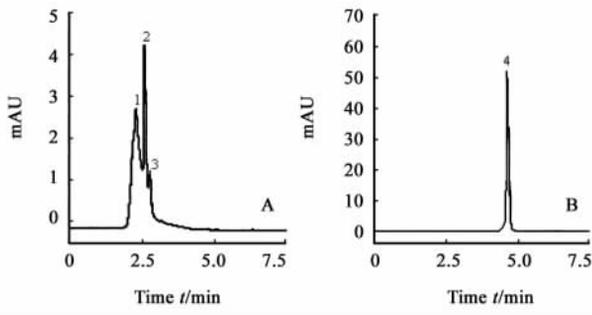


图 4 重组 TPx 蛋白的高效液相色谱(HPLC)分析结果

Fig 4 HPLC analysis of recombinant TPx before(A) and after(B) treatment with 50 mmol/L DTT for 12 h

1-4:Peaks

2.5 重组 TPx 蛋白还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性实验 反应先使用 DTT,加入不同浓度的重组 TPx 蛋白,以反应时间为横坐标,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性为纵坐标作曲线,见图 5。从图 5 可以看到,在加有重组 TPx 蛋白的系列中,随着反应时间的延长,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性逐步降低,说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 被重组 TPx 蛋白还原了。而且随着重组 TPx 蛋白浓度的升高,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性下降越快,说明被还原的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量越多。而没有加入 TPx 组的光密度值基本没有变化。该实验证明了重组的 TPx 蛋白具有还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力,且还原能力与重组 TPx 蛋白浓度成正比。接着做 DTT 和 GSH 的对比实验(该反应时间为 10 min)。以重组 TPx 蛋白浓度为横坐标,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性为纵坐标作柱形图,分别比较重组 TPx 蛋白在有 DTT 或 GSH 的情况下还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力,见图 6。从图 6 可以清楚地看到,在含有 DTT 的情况下,反应 10 min 后,随着重组 TPx 蛋白浓度的不同,不同量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 被还原了。而且随着重组 TPx 蛋白浓度的升高,被还原的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量也越多。而在没有 DTT 的情况下,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 几乎不被重组 TPx 还原。在含有 GSH 的情况下,发现虽然在不同的重组 TPx 蛋白浓度下,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量都有所减少,但无论

重组 TPx 蛋白的浓度高低,残余的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量几乎一致。通过本研究的预实验证明,GSH 本身有一定的还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力。综合上述实验,我们可知 GSH 并不能帮助重组 TPx 蛋白还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

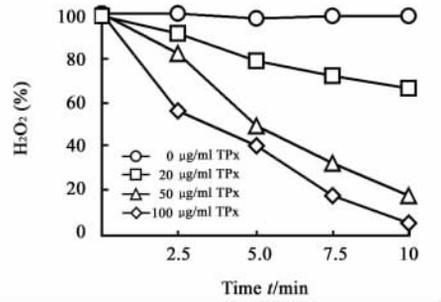


图 5 重组 TPx 蛋白还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性的测定

Fig 5 Reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by recombinant TPx

Reaction mixtures (1 ml) containing 50 mmol/L HEPES (pH 7.0), 5 mmol/L dithiothreitol (DTT), 200 µmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the recombinant TPx protein (0, 20, 50 or 100 µg/ml). The remaining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the reaction mixture was measured using the ferrithiocyanate system. The results were expressed as the ratio of D<sub>475</sub> recorded with the rTPx to that recorded without the rTPx

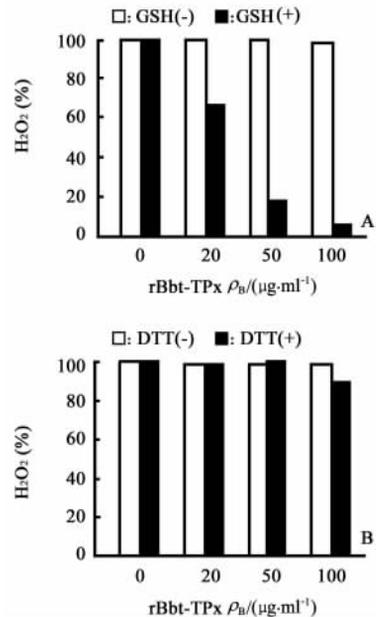


图 6 DTT 和 GSH 对重组 TPx 蛋白还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性的影响

Fig 6 Reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by combination of TPx with DTT or GSH

Effect of 5 mmol/L DTT (A) or 5 mmol/L GSH (B) on the activity of the rTPx protein for reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was examined in a 1 ml reaction volume. Various concentrations of the rTPx protein (0, 20, 50, 100 µg/ml) were incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µmol/L) in the presence or absence of the thiols for 10 min. The remaining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the reaction mixture was measured using the ferrithiocyanate system. The results were expressed as the ratio of D<sub>475</sub> recorded with the rTPx to that recorded without the rTPx protein

**2.6 重组 TPx 蛋白保护超螺旋 DNA 实验** 当反应体系中含有 RSH(如 DTT)和  $Fe^{3+}$  时,氧化还原反应形成的自由基  $OH\cdot$ ,会破坏 DNA 的超螺旋构象,使之形成缺口。反应后取  $5\ \mu\text{l}$  进行琼脂糖电泳检测(胶浓度为 0.8%),并通过紫外分光成像系统分析结果,见图 7。结果显示,作为对照的质粒 DNA 只以超螺旋(supercoil form)一种构象存在(泳道 1),而当同时加入了 DTT 和  $Fe^{3+}$  时,质粒的超螺旋构象几乎被破坏,形成另一种构象(nick form)(泳道 4)。往反应体系中加入重组 TPx 蛋白后,可以看到随着重组 TPx 蛋白浓度的不同,质粒的超螺旋构象受到了不同程度的保护(泳道 5-9),而且质粒的超螺旋构象受到的保护程度与重组 TPx 蛋白的浓度成正比。

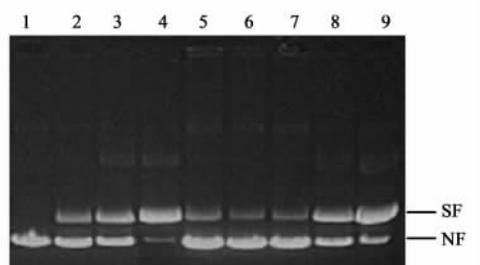


图 7 重组 TPx 蛋白保护超螺旋 DNA 实验的电泳结果

Fig 7 TPx-dependent inactivation of DNA cleavage in a metal-catalyzed oxidation system

1: pGAPZ $\alpha$ A DNA; 2: pGAPZ $\alpha$ A DNA and 10 mmol/L DTT; 3: pGAPZ $\alpha$ A DNA and 3  $\mu\text{mol/L}$   $FeCl_3$ ; 4: pGAPZ $\alpha$ A DNA, 10 mmol/L DTT and 3  $\mu\text{mol/L}$   $FeCl_3$ ; 5-9: pGAPZ $\alpha$ A DNA, 10 mmol/L DTT, 3  $\mu\text{mol/L}$   $FeCl_3$  and 500, 200, 100, 50, 25  $\mu\text{g/ml}$  rTPx, respectively. Migration of the nicked form (NF) and the supercoiled form (SF) of the pGAPZ $\alpha$ A plasmid DNA in the agarose gel are indicated on the right

**2.7 重组 TPx 蛋白保护 GS 蛋白活性实验** 当反应体系中含有 RSH(如 DTT)和  $Fe^{3+}$  时,通过氧化还原反应形成自由基  $OH\cdot$ ,会破坏 GS 蛋白,影响到它的活性。根据 Kim 等<sup>[1]</sup>的方法,检测重组 TPx 蛋白是否有保护 GS 蛋白活性的能力。实验结果见图 8。从图 8 可以看到,在反应体系含 DTT 和  $Fe^{3+}$ 、无重组 TPx 蛋白的时候,GS 蛋白的活性随着反应时间的延长而迅速降低,当反应体系中加入了不同浓度的重组 TPx 蛋白的时候,GS 蛋白的活性得到了不同程度的保护。当重组 TPx 蛋白的浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  的时候,GS 蛋白的活性几乎没有下降。该实验证明了重组 TPx 蛋白对生物体内一些对活性氧族(reactive oxygen species, ROS)非常敏感的蛋白如 GSdanbai 等具有保护作用。

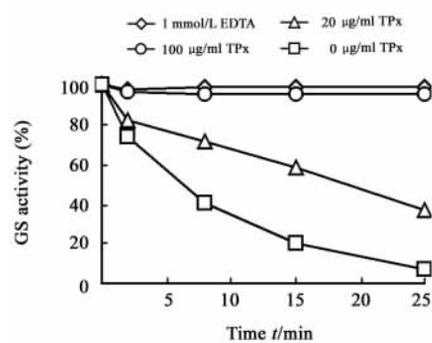


图 8 重组 TPx 蛋白保护谷氨酰胺合成酶(GS)蛋白活性

Fig 8 Protection of glutamine synthetase(GS) by recombinant (TPx) protein via DTT/ $Fe^{3+}$ / $O_2$  system

The inactivation mixture contained 10  $\mu\text{g/ml}$  glutamine synthetase (GS), 10 mmol/L dithiothreitol (DTT), 3  $\mu\text{mol/L}$   $FeCl_3$  and 50 mmol/L imidazole, pH 7.0, in a total volume of 50  $\mu\text{l}$ . All inactivation reactions were carried out at 30 $^{\circ}\text{C}$ . The remaining activity of GS was measured

### 3 讨论

随着对过氧化物还原酶研究的不断深入,人们越来越认识到它在生物体内的重要性。过氧化物还原酶在生物体内的主要功能是细胞脱毒能力,抵抗氧化压力和调节由过氧化氢介导的信号转导和免疫反应,而且其活性与其高级结构紧密相关。我们构建了 pET-32a(+)-M-TPx 原核表达载体并进行了诱导表达,进一步摸索了重组 TPx 蛋白在大肠杆菌中的表达条件,并获得了表达量高、可溶性好的重组蛋白。通过纯化获得了高含量高纯度的重组 TPx 蛋白,并对其活性和结构的进行了初步的研究。这在文昌鱼的过氧化物还原酶研究中是首次报道。

对重组 TPx 蛋白还原  $H_2O_2$  活性研究中,我们发现在含有 DTT 的反应体系中,重组 TPx 蛋白可以还原  $H_2O_2$ ;但是在含有 GSH 的反应体系中,重组的 TPx 蛋白却没有这个功能。研究表明,过氧化物还原酶是通过它的半胱氨酸(Cys)基团来发挥它的活性。这需要一些还原剂作为氢供体保证它的 Cys 残基上的巯基处于还原状态(-SH)。DTT 和 GSH 都是含有-SH 的还原剂,理论上应该都可以作为重组 TPx 蛋白还原  $H_2O_2$  的氢供体。但是经过我们的实验证明,GSH 不能作为重组 TPx 蛋白的氢供体。原因可能在于绝大多数的过氧化物还原酶是属于典型的 2-Cys 过氧化物还原酶,包括重组的文昌鱼 TPx 蛋白。它们单体的两个 Cys 残基自己形成二硫键或者两个单体的 Cys 残基相互通过二硫键连接形成同源二聚体,使得过氧化物还原酶以单体

和同源二聚体混合形式的非活性状态存在<sup>[8]</sup>。当它们需要发挥自身的活性时,通常需要同时具有2个-SH基团的还原剂作为其氢供体(如 DTT)把过氧化物还原酶还原成具有-SH基团的单体的活性状态。而只有1个-SH作为氢供体的还原剂(如 GSH),则可能会造成该酶的二硫键的短暂混乱<sup>[9]</sup>,从而无法将酶还原为它的活性状态。在生物体内同时具有2个-SH的还原剂是硫氧还蛋白(Trx),所以在生物体内这类过氧化物还原酶只能依靠 Trx 氧化还原体系来发挥抗氧化作用。因此将这一类的“-SH”基团命名为硫氧还蛋白过氧化物酶(TPx)。

通过非还原 SDS-PAGE 电泳和 HPLC 分析,重组的 TPx 蛋白存在多种构象,但是在 DTT 的作用下,则只含有单体一种形式。而重组 TPx 蛋白在含有 DTT 的时候才具有还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力说明重组 TPx 蛋白的结构与其活性息息相关。已有的研究发现,过氧化物还原酶的活性与其结构是相互联系的。对典型的 2-Cys 过氧化物还原酶的研究表明,其单体的具有活性的两个 Cys 残基会与另一个单体的 Cys 残基形成二硫键,因而形成同源二聚体<sup>[8]</sup>。通过电子显微镜观察,又发现典型的 2-Cys 过氧化物还原酶的同源二聚体利用氢键形成环状的十聚体。而处于十聚体状态的典型的 2-Cys 过氧化物还原酶,由于其活性基团没有暴露出来,所以没有活性<sup>[9]</sup>。在生物体内,典型的 2-Cys 过氧化物还原酶只能依靠硫氧还蛋白氧化还原体系将其还原成具有活性的单体而发挥作用。在我们的体外还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的实验中,则是用 DTT 来代替 Trx 来完成还原重组 TPx 蛋白的任务,使其具有抗氧化的活性。通过本研究,我们可以发现纯化后的重组 TPx 蛋白平时主要是以非活性的同源二聚体和单体的混合形式存在的,当具有2个-SH基团的还原剂如 DTT 与其作用后,重组 TPx 蛋白被还原成具有活性-SH基团的单体状态,从而具有抗氧化的作用。值得注意的是重组 TPx 蛋白的非还原 SDS-PAGE 图中在单体的位置出现2条蛋白带,根据文献<sup>[7]</sup>的推测可能是由于重组 TPx 蛋白的 Cys 残基发生半胱氨酰化造成的,但是真实的原因有待于进一步研究。

由于获得的文昌鱼样品量少,无法分离到天然的蛋白。为了进一步研究文昌鱼 TPx 蛋白的功能活性,本文对青岛文昌鱼的重组 TPx 蛋白进行了成功的表达和纯化,并对其功能和结构进行了初步的研究,这为下一步全面认识过氧化物酶结构与功能的关系奠定了基础,有助于彻底阐明过氧化物酶各种生理活性机制和具体的生理功能。

## [参考文献]

- [1] Kim K, Kim I H, Lee K, Rhee S G, Stadtman E R. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 4704-4711.
- [2] Seo M S, Kang S W, Kim K, Baines I C, Lee T H, Rhee S G. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 20346-20354.
- [3] Hofmann B, Hecht H J, Flohe L. Peroxiredoxins [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(3-4): 347-364.
- [4] 洪水根. 文昌鱼研究在分子生物学时代再露头角[J]. *厦门科技*, 2003, 1: 49-52.
- [5] Schroder E, Willis A C, Ponting C P. Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1383: 279-291.
- [6] Lim Y S, Cha M K, Kim H K, Uhm T B, Park J W, Kim K, et al. Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192: 273-280.
- [7] Shau H, Kim A T, Hedrick C C, Lusic A J, Tompkins C, Finney R, et al. Endogenous natural killer enhancing factor-B increases cellular resistance to oxidative stresses [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22: 497-507.
- [8] Wood Z A, Schroder E, Robin Harris J R, Poole L B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 32-40.
- [9] Chae H Z, Robison K, Poole L B, Church G, Storz G, Rhee S G. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7017-7021.

[本文编辑] 尹 茶