

文章编号: 1000-7423(2012)-04-0262-06

【论著】

# 湖北钉螺硫氧还蛋白过氧化物酶全长基因克隆、 表达与蛋白活性分析

马宪亮, 刘琴, 张仪\*

**【摘要】** 目的 克隆湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPx) 全长基因 cDNA, 并分析其表达蛋白的抗氧化活性。方法 抽提人工饲养的阴性湖北钉螺总 RNA, 采用逆转录 PCR 方法扩增 TPx 基因片段。使用快速扩增 cDNA 末端法 (RACE) 扩增 TPx 基因, 获得全长基因 cDNA, 与质粒 pGEM-Teasy 连接后, 转化大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$ , 筛选、测序, 并进行生物信息学分析。克隆质粒 pGEM-Teasy/TPx 和表达载体 pET28a 经双酶切后连接, 构建重组表达质粒 pET28a/TPx, 转入 *E. coli* BL21(DE3), 以异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表达产物, 通过组蛋白标签镍离子 (Ni-NTA) 层析柱分离纯化可溶性蛋白。在体外过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 还原试验中, 分别加入不同浓度的 TPx 重组蛋白 (10、20、30、40 和 50  $\mu$ g/ml), 各浓度均设二硫苏糖醇 (DTT) 平行对照, 计算 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率。在 DNA 超螺旋保护试验中, 分别加入 2.5、5.0 和 10  $\mu$ g/ml 重组蛋白, 观察其对 DNA 超螺旋结构的保护作用。结果 TPx 全长基因 cDNA 为 992 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 747 bp, GenBank 登录号为 JN831437, 编码 249 个氨基酸, 预期蛋白相对分子质量 ( $M_r$ ) 为 27 000。重组质粒 pET28a/TPx 构建成功, 经诱导表达和纯化后获得了可溶性重组蛋白。SDS-PAGE 结果显示,  $M_r$  为 27 000。体外 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 还原试验结果显示, 含有 DTT 的反应体系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率均显著高于不含 DTT 的体系 (均  $P < 0.05$ ), 各个浓度组间差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。DNA 超螺旋保护试验结果显示, 5.0  $\mu$ g/ml 组保护效果优于 2.5  $\mu$ g/ml 组, 但 5.0  $\mu$ g/ml 组和 10  $\mu$ g/ml 组的保护效果差异不明显。结论 获得湖北钉螺 TPx 全长基因 cDNA, 且重组表达蛋白具有一定抗氧化功能。

**【关键词】** 湖北钉螺; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 克隆; 表达

中图分类号: R383.241 文献标识码: A

## Cloning, Expression and Activity Analysis of Full-length Gene Encoding Thioredoxin Peroxidase from *Oncomelania hupensis*

MA Xian-liang, LIU Qin, ZHANG Yi\*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre of Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

**【Abstract】 Objective** To clone and express full-length thioredoxin peroxidase (TPx) gene of *Oncomelania hupensis* and study on the peroxidase activity of the recombinant protein. **Methods** Total RNA was obtained from the cultivated *O. hupensis* and a cDNA sequence of the TPx gene was cloned by RT-PCR. The TPx cDNA ends were amplified by the SMARTer RACE cDNA Amplification Kit. After sequencing, blasting and matching, the full-length cDNA of the TPx gene was obtained. The TPx cDNA was ligated with the pGEM-Teasy and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . After sequencing and blasting, the characteristics of biological information of the TPx gene was analyzed. The positive recombinants with pGEM-Teasy/TPx and expression vector pET-28a were digested by the double restriction enzymes, ligated each other, transformed into *E. coli* BL21(DE3), and induced by IPTG for expression. The recombinant TPx was expressed as a histidine fusion protein and was purified with Ni chromatography and NTA cation exchange chromatography. The expressed and purified TPx was analyzed by SDS-PAGE. The different concentrations of TPx recombinant protein (10, 20, 30, 40, and 50  $\mu$ g/ml) were added into hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reduction test *in vitro* to calculate the clearance rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, each concentration

基金项目: 国家传染病科技重大专项 (No. 2012ZX10004220); 上海市自然科学基金 (No. 10ZR1433400)。

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

\* 通讯作者, E-mail: zhang1972003@yahoo.com.cn

with parallel control of dithiothreitol sugar alcohol (DTT). In the protection test of super-coiled DNA, the TPx protein was added with a concentration of 2.5, 5.0, and 10  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, to observe the protective effect of super-coiled DNA in metal-catalyzed oxidation (MCO). **Results** The complete cDNA encoding TPx was 992 bp. ORF was 747 bp with GenBank accession number of JN831437. The ORF encoded 249 amino acids, and the relative molecular weight ( $M_r$ ) of predicted protein was 27 000. The recombinant plasmid pET28a/TPx was built, and the soluble recombinant protein was obtained by induction and purification. The results of SDS-PAGE showed that the  $M_r$  was 27 000.  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction test *in vitro* showed that the  $\text{H}_2\text{O}_2$  clearance rate of reaction system containing DTT was significantly higher than the clearance rate without DTT ( $P<0.05$ ), the difference among various concentrations was not statistically significant ( $P>0.05$ ). The protection of super-coiled DNA showed that the protective effect of 5.0  $\mu\text{g/ml}$  group was better than 2.5  $\mu\text{g/ml}$  group, but there was no difference between the protective effect of 5.0  $\mu\text{g/ml}$  group and 10  $\mu\text{g/ml}$  group. **Conclusion** The full-length cDNA of the TPx gene of *O. hupensis* is obtained, and the recombinant TPx protein shows a certain antioxidant activity.

**[Key words]** *Oncomelania hupensis*; Thioredoxin peroxidase; Clone; Expression

Supported by the National Special Science and Technology Project for Major Infectious Diseases of China (No. 2012ZX10004220) and the Natural Science Fund of Shanghai (No. 10ZR1433400)

\* Corresponding author, E-mail: zhang1972003@yahoo.com.cn

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫惟一的中间宿主, 在日本血吸虫病传播中起着重要作用。硫氧还蛋白过氧化物酶 (thioredoxin peroxidases, TPx) 属于保守的抗氧化蛋白家族, 抗氧化作用显著, 广泛存在于原核生物和真核生物中<sup>[1]</sup>。有关双脐螺和盘鲍的研究发现, TPx 在保护机体免受氧化损伤过程中起着重要作用<sup>[2,3]</sup>, 但关于湖北钉螺 TPx 的研究尚未见报道。本研究拟克隆湖北钉螺的硫氧还蛋白过氧化物酶基因全长 cDNA, 诱导并获得重组 TPx 融合蛋白, 并对重组蛋白进行分离纯化和抗氧化活性的研究, 为探讨湖北钉螺 TPx 的生物学功能和阻断日本血吸虫病传播提供研究依据。

## 材料与方 法

### 1 材料

1.1 实验动物 日本血吸虫毛蚴和阴性湖北钉螺由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所媒介控制室提供。

1.2 质粒和菌株 pET-28a(+)质粒由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所重点实验室提供; 大肠埃希菌 (*E. coli*) 克隆菌 DH5 $\alpha$  和表达菌 BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I, 以及  $T_4$  DNA 连接酶购自美国 New England Biolab 公司; 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 和二硫苏糖醇 (DTT) 购自上海生工生物工程有限公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒 (First Strand cDNA Synthesis Kit ReverTra Ace- $\alpha$ ) 购自日本 TOYOBO 公司; cDNA 末端扩增试剂盒 (SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit) 购自美国 Clontech 公司; 低分子标准蛋白购自北京华美生物有限公司; 异丙基硫

代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 购自美国 AMRESCO 公司; 镍离子螯合琼脂糖凝胶 (Ni-NTA Agarose Flow) 购自德国 QIAGEN 公司; 离子层析柱 (Poly-Prep Chromatography columns) 购自美国 Bio-RAD 公司; 克隆载体 (pGEM-Teasy) 购自美国 Promega 公司; 荧光染料 PCR 混合液 (SYBR Green QRT-PCR Master mix) 购自美国 DBI 公司。

### 2 方法

2.1 湖北钉螺 TPx 的 PCR 扩增 参考湖北钉螺转录组数据库注释的 TPx 基因片段, 利用 Oligo 6.0 软件设计 TPx 基因的 PCR 引物, 上、下游引物序列分别为 TP-F1: 5'-TGTTCCTTCATCAGCCCTATATTTGC-3' 和 TP-R1: 5'-CGTATTAAAGCTCTTCCGGGGCT-3'。利用 TRIzol 试剂提取阴性湖北钉螺总 RNA, 逆转录成 cDNA 为模板, 以 TP-F1 和 TP-R1 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 34 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物, 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

2.2 RACE 扩增 TPx 全长基因 cDNA 以获得的湖北钉螺 TPx 基因的部分序列为模板, 根据 cDNA 末端扩增试剂盒说明书, 利用 Oligo 6.0 软件设计 5'端与 3'端 RACE 引物, 序列分别为 5'GSP1: 5'-CTCTTCCG-GGGCTTTCTGTTTGTG-3' 和 3'GSP2: 5'-CCACAGTC-TGAGAGGTCTGTTTCATCATC-3'。TRIzol 试剂提取湖北钉螺总 RNA, 经 SMARTer 逆转录酶作用生成含 TPx 全长基因 5'末端的 cDNA 和含全长基因 3'末端的 cDNA。以含 5'末端的 cDNA 为模板, 以通用引物 (UPM) 和 5'GSP1 为引物进行 PCR 扩增; 另以含 3'末端的 cDNA 为模板, 以 3'GSP2 和 UPM 为引物

进行 PCR 扩增。分别获得含完整 5' 末端和含完整 3' 末端的 TP<sub>x</sub> 基因片段 cDNA。PCR 反应条件均为：94 °C 1 min；94 °C 30 s，65 °C 30 s，72 °C 3 min，共 35 个循环；72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物后，用 DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化。回收的 DNA 片段与 pGEM-Teasy 载体连接后，转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，挑选阳性菌落，抽提质粒，送上海生工生物工程技术有限公司测序。将测序正确的含完整 5' 末端和含完整 3' 末端的 2 种基因片段序列进行比对，拼接出湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 基因全长 cDNA。

**2.3 TP<sub>x</sub> 基因序列分析与遗传进化分析** 应用 GenScan 软件分析基因编码蛋白质的开放阅读框 (ORF)、信号肽区和 Poly A 信号区，根据开放阅读框预测氨基酸序列、相对分子质量 ( $M_r$ ) 和等电点等信息；利用 SignalP4.0 软件预测蛋白的信号肽信息。用 Blastn 软件对湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 全长基因 cDNA 序列进行序列一致性比较。用 Clustalx1.8 将预测的湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 氨基酸序列与已报道其他种别的 TP<sub>x</sub> 蛋白序列进行比对，MEGA 5.0 根据比对结果，用 Neighbor-Joining (N-J) 法，并进行自展 1 000 次分析，建立系统发育树，分析湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 的遗传进化关系。

**2.4 构建 pET-28a/TP<sub>x</sub> 重组原核表达体系** 为在原核表达体系中获得可溶性的活性蛋白，以不含信号肽序列的 TP<sub>x</sub> 基因，即开放阅读框 (ORF) 序列为模板，利用 Oligo 6.0 软件设计含双酶切位点的原核表达引物，目的产物预期大小为 700 bp，上、下游引物序列分别为 PF：5' -CGGGATCCATGGTCTATCCGCAAGAAACAC -3' 和 PR：5' -CCGCTCGAGTTAGTCTGGAATAATCGTGTC -3'，下划线部分分别为 BamH I 和 Xho I 的酶切位点。抽提湖北钉螺总 RNA，逆转录后，以 PF 和 PR 为引物扩增 TP<sub>x</sub> 全长基因，反应条件为：96 °C 3 min；94 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 2 min，共 33 个循环；72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分析后，回收产物，并与 pGEM-Teasy 载体连接，转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，挑选阳性菌落，抽提质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序鉴定。将测序正确的 pGEM-Teasy/TP<sub>x</sub> 重组质粒和 pET-28a 表达载体用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切后，T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接。转化至表达菌 BL21 (DE3) 中，用含有卡那霉素的 LB 平板筛选阳性菌落，PCR 和双酶切鉴定后，送上海生工生物工程技术有限公司测序。

**2.5 目的蛋白的诱导表达与纯化** 将重组菌接种于 5 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 °C 200 r/min 振荡培养 16 h。按 1:100 接种于 200 ml LB 培养基，37 °C 培养至吸光度值 ( $A_{600}$  值) 为 0.5，加入 IPTG 至终浓度

为 0.5 mmol/L，于 20 °C 诱导表达 4 h。4 °C 4 000 $\times$ g 离心 20 min，收集细菌，超声破菌，4 °C 10 000 $\times$ g 离心 30 min，分别收集上清和沉淀后，进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。上清液用 Ni 柱进行纯化，SDS-PAGE 分析检测重组蛋白的纯化情况。

**2.6 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 还原试验** 利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能与硫氰化钾 (KSCN) 和硫酸亚铁铵 [Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] 形成络合物，通过检测吸光度判断 TP<sub>x</sub> 还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力。参考文献 [3] 的方法，分别检测 10、20、30、40 和 50  $\mu$ g/ml TP<sub>x</sub> 重组蛋白还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水平，同时设含 5 mmol/L DTT 的平行对照，判断 DTT 对重组蛋白还原活性的影响，另设 DTT 对照组和阴性对照组。各反应体系均为 99  $\mu$ l，于 37 °C 孵育 30 min 后，加入 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 至终浓度 50  $\mu$ mol/L，混匀后 37 °C 继续孵育 30 min，加入 900  $\mu$ l 100% 三氯乙酸 (TCA)，混匀后立即加入 200  $\mu$ l 10 mmol/L Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 和 100  $\mu$ l 2.5 mol/L KSCN，测定  $A_{480}$  值。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率 (%) = (DTT 对照组  $A_{480}$  值 - 实验组  $A_{480}$  值) / DTT 对照组  $A_{480}$  值  $\times$  100%。

**2.7 DNA 超螺旋保护试验** 利用超螺旋 DNA 在金属催化氧化系统 (MCO) 中受到羟自由基氧化损伤而形成环状形式 DNA，在 MCO 系统中加入 TP<sub>x</sub>，以此检测 TP<sub>x</sub> 保护 DNA 的效果。参考文献 [4] 的方法，于 3.3 mmol/L DTT 和 16.5  $\mu$ mol/L FeCl<sub>3</sub> 中分别加入 2.5、5.0 和 10.0  $\mu$ g/ml TP<sub>x</sub> 重组蛋白，反应体系为 50  $\mu$ l，混匀后 37 °C 孵育 2 h。加入 300 ng pUC18 超螺旋质粒 DNA，混匀后 37 °C 继续孵育 2.5 h。各取 10  $\mu$ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，并通过紫外分光成像系统分析结果。

### 3 统计学分析

采用 Excel 2007 软件进行统计学分析，两组均数之间的比较采用 *t* 检验。

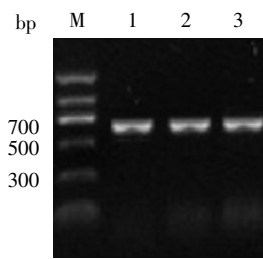
## 结 果

### 1 湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 基因 PCR 扩增

以 TP-F1 和 TP-R1 为引物，PCR 扩增湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 基因，产物大小约为 700 bp，与预期片段大小一致，经测序证实为目的片段 (图 1)。

### 2 湖北钉螺 TP<sub>x</sub> 全长基因 cDNA 的获得与序列分析

经 SMARTer 逆转录酶作用生成的含 TP<sub>x</sub> 全长基因 5' 末端和含全长基因 3' 末端的 cDNA 长度分别约为 400 bp 和 500 bp，PCR 扩增产物含完整 5' 末端的



M: DNA 标记物; 1-3: TPx PCR 扩增产物。  
M: DNA marker; 1-3: PCR product of TPx.

图 1 TPx 的 PCR 扩增产物  
Fig. 1 PCR product of TPx

cDNA 和含完整 3' 末端的 cDNA 经测序后, 长度分别为 123 bp 和 229 bp。拼接后获得全长 cDNA 序列, 全长为 992 bp, 开放阅读框为 747 bp, GenBank 登录号为 JN831437。湖北钉螺 TPx 全长基因 cDNA 序列与 NCBI 已有的 TPx 序列进行序列一致性分析结果显示, 与盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) TPx 基因序列一致性为 73%, 与光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 的一致性为 68%, 与节肢动物蜱 (*Ixodes scapularis*) 的一致性为 67%。

### 3 湖北钉螺 TPx 蛋白氨基酸序列的预测与遗传进化分析

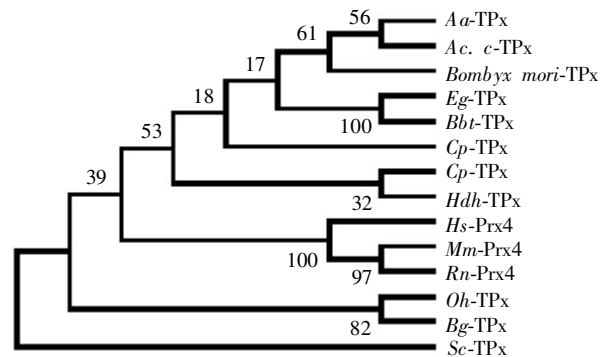
根据湖北钉螺 TPx 全长基因 cDNA 预测其编码蛋白包含 249 个氨基酸,  $M_r$  为 27 000, 等电点(pI)为 5.5; SignalP4.0 预测蛋白质信号肽区为 N-端 1~21 位氨基酸; TPx 基因编码蛋白质含有高度保守区 motif1 (FYPLDFTVCPTTEI) 和 motif2 (HGEVCP), 高度保守的 N-端和 C-端半胱氨酸残基 (C) 分别定位于 97 和 218 位; 使用 motifscan 预测蛋白活性区域属硫氧还蛋白 2-Cys 型 (Thioredoxin 2)。

将已报道的 13 个代表性物种的 TPx 氨基酸序列与湖北钉螺 TPx 预测氨基酸序列构建遗传进化树。无脊椎动物中节肢动物的 TPx 聚为亚群, 自展值为 61; 软体动物中湖北钉螺 TPx 与光滑双脐螺 Bg-TPx 聚为最近的一支, 自展值为 82, 并与哺乳动物 TPx 脊椎动物亚群较近 (图 2)。

### 4 pET-28a/TPx 原核表达载体的构建及鉴定

重组质粒 pET-28a/TPx 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后获得与 PCR 产物大小相同的片段, 约 700 bp (图 3)。测序结果表明, TPx 基因序列无变异, 开放阅读框正确, 可正确表达蛋白。

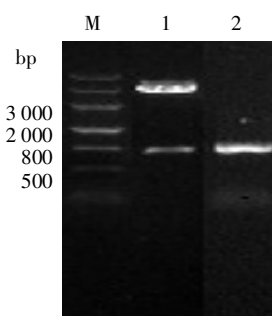
### 5 湖北钉螺 TPx 重组蛋白的诱导表达和纯化



Aa-TPx: 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*), 登录号 AAL37254.1; Ac. c-TPx: 中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*), 登录号 ADT65135.1; Bombyx mori-TPx: 家蚕 (*Bombyx mori*), 登录号 AAR15420.1; Eg-TPx: 细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*), 登录号 AAL84833.1; Tm-TPx: 带绦虫 (*Taenia multiceps*), 登录号 ADW77118.1; Bbt-TPx: 文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*), 登录号 AAU84951.1; Cp-TPx: 褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*), 登录号 ADM88874.1; Hdh-TPx: 盘鲍 (*Haliotis discus hannai*), 登录号 AAZ22925.1; Hs-Prx4: 智人 (*Homo sapiens*), 登录号 NP\_006397.1; Mm-Prx4: 小家鼠 (*Mus musculus*), 登录号 AAH19578.1; Rn-Prx4: 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*), 登录号 AAH59122.1; Oh-TPx: 湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis hupensis*), 登录号 JN831437; Bg-TPx: 光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*), 登录号 AAK26236.1; Sc-TPx: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 登录号 EDN61482.1。

Aa-TPx: *Aedes aegypti*, Accession No. AAL37254.1; Ac. c-TPx: *Apis cerana cerana*, Accession No. ADT65135.1; Bombyx mori-TPx: *Bombyx mori*, Accession No. AAR15420.1; Eg-TPx: *Echinococcus granulosus*, Accession No. AAL84833.1; Tm-TPx: *Taenia multiceps*, Accession No. ADW77118.1; Bbt-TPx: *Branchiostoma belcheri tsingtauense*, Accession No. AAU84951.1; Cp-TPx: *Cristaria plicata*, Accession No. ADM88874.1; Hdh-TPx: *Haliotis discus hannai*, Accession No. AAZ22925.1; Hs-Prx4: *Homo sapiens*, Accession No. NP\_006397.1; Mm-Prx4: *Mus musculus*, Accession No. AAH19578.1; Rn-Prx4: *Rattus norvegicus*, Accession No. AAH59122.1; Oh-TPx: *Oncomelania hupensis hupensis*, Accession No. JN831437; Bg-TPx: *Biomphalaria glabrata*, Accession No. AAK26236.1; Sc-TPx: *Saccharomyces cerevisiae*, Accession No. EDN61482.1.

图 2 湖北钉螺 TPx 全长基因 cDNA 的遗传进化分析  
Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Oncomelania hupensis hupensis* of TPx full-length cDNA



M: DNA 标志物; 1: *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切; 2: PCR 产物。

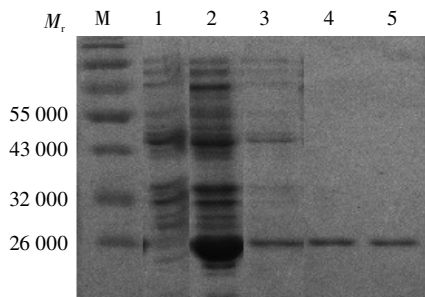
M: DNA marker; 1: Digested by *Bam*H I and *Xho* I; 2: PCR product.

图 3 重组质粒 pET28a/TPx 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pET28a/TPx by PCR and digestion with restriction enzymes

重组表达菌经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析结果显示, 重组表达菌表达产物的相对分子质量与预测的

理论值  $M_r$  27 000 相符，且重组蛋白为可溶性蛋白(图4)。



M: 蛋白标志物; 1: 未诱导; 2: 诱导后全细胞; 3: 诱导后上清; 4、5: 纯化产物。

M: Protein marker; 1: Without induction; 2: After induction; 3: Supernatant of pET28a/TPx after IPTG induction; 4, 5: Purified product.

图 4 重组蛋白 TPx 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant TPx protein

## 6 湖北钉螺 TPx 重组蛋白体外还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 试验

结果显示，10、20、30、40 和 50 μg/ml TPx 重组蛋白的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，而各个浓度组中含有 DTT 的反应体系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率分别为 (55.7±0.6)%、(57.1±0.2)%、(58.3±0.2)%、(59.8±0.4)% 和 (62.3±0.8)%，均显著高于不含 DTT 的反应体系清除率 ( $P<0.05$ )(图 5)。

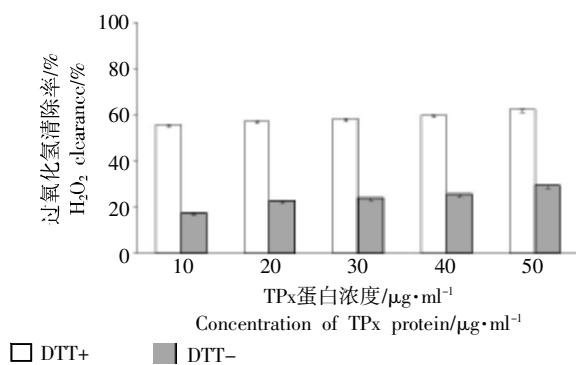


图 5 湖北钉螺 TPx 重组蛋白体外还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 试验

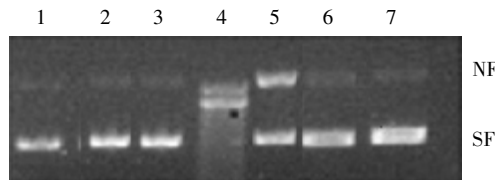
Fig. 5 Peroxidase activity of *O. hupensis* TPx protein

## 7 湖北钉螺 TPx 重组蛋白体外保护 DNA 超螺旋试验

结果显示，在 MCO 系统中加入 2.5、5.0 和 10 μg/ml TPx 重组蛋白均可观察到超螺旋结构 DNA，其中 2.5 μg/ml 组仍有部分 DNA 超螺旋结构被破坏，生成环状 DNA，而 5.0 μg/ml 组和 10 μg/ml 组无环状 DNA 生成。MCO 系统中未加入重组蛋白 TPx 组中，超螺旋状 pUC18 质粒 DNA 完全被破坏(图 6)。

## 讨 论

TPx 作为广泛存在于酵母、真菌、节肢动物和寄



1: pUC18 质粒 DNA; 2: 仅加入 DTT; 3: 仅加入 FeCl<sub>3</sub>; 4: DTT+FeCl<sub>3</sub> (MCO 体系); 5: DTT+FeCl<sub>3</sub>+2.5 μg/ml TPx; 6: DTT+FeCl<sub>3</sub>+5.0 μg/ml TPx; 7: DTT+FeCl<sub>3</sub>+10.0 μg/ml TPx。NF: 环状结构; SF: 超螺旋结构。

1: pUC18 DNA; 2: pUC18 DNA with DTT; 3: pUC18 DNA with FeCl<sub>3</sub>; 4: pUC18 DNA with DTT+FeCl<sub>3</sub> (MCO); 5: pUC18 DNA with DTT+FeCl<sub>3</sub>+2.5 μg/ml TPx; 6: pUC18 DNA with DTT+FeCl<sub>3</sub>+5.0 μg/ml TPx; 7: pUC18 DNA with DTT+FeCl<sub>3</sub>+10.0 μg/ml TPx. NF: Nicked form; SF: Super-coiled form.

图 6 湖北钉螺 TPx 重组蛋白体外保护 DNA 超螺旋试验。

Fig. 6 Protection of super-coiled DNA cleavage by recombinant TPx in metal-catalyzed oxidation

生虫软体动物等多种生物的抗氧化蛋白，在生物体抗氧化作用中发挥重要作用<sup>[5-9]</sup>。TPx 通过调节细胞氧化还原反应、信号转导<sup>[6,10]</sup>和抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>等途径影响细胞的生理功能。研究表明，多数 2-Cys 型 TPx 具有抗氧化活性，并可利用硫氧还蛋白作为供氢体完成抗氧化过程<sup>[12]</sup>。本研究从湖北钉螺中克隆获得 TPx 全长基因，全长 992 bp，其开放阅读框为 750 bp，基因编码 249 个氨基酸。通过生物信息学比对分析发现，湖北钉螺 TPx 氨基酸序列含有 2 个保守半胱氨酸残基，表明湖北钉螺 TPx 属于 TPx 家族中 2-Cys 型。

通过典型的 2-Cys 过氧化物还原酶的研究发现，其单体具有活性的 2 个 Cys 残基会与另 1 个单体的 Cys 残基形成二硫键，因而形成同源二聚体<sup>[13]</sup>。研究发现，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，所以没有活性<sup>[14]</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将其还原成具有活性的单体而发挥作用。本研究通过湖北钉螺 TPx 蛋白体外还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 试验发现，含有 DTT 的反应体系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率均显著高于不含 DTT 的体系，表明湖北钉螺 TPx 蛋白可利用 DTT 供氢体代替硫氧还蛋白，使其具有抗氧化的活性并还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，这与 Hu 等<sup>[4]</sup>报道的结果一致，其抗氧化机制与巯基依赖性相关。研究表明，细胞质中 TPx 具有过氧化物酶活性，调节细胞内活性氧簇 (ROS)，如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平，对于细胞中 DNA 损伤具有保护活性<sup>[3,15]</sup>。本研究通过体外超螺旋 DNA 损伤保护试验发现，在 MCO 系统中，湖北钉螺 TPx 蛋白 5.0 μg/ml 组对于 DNA 的保护效果优于 2.5 μg/ml 组，表明湖北钉螺 TPx 蛋白具有保护 DNA 损伤的作用，

其保护功能与羟自由基损伤相关。

### 参 考 文 献

- [1] Seo MS, Kang SW, Kim K, *et al.* Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(27): 20346-20354.
- [2] Knight M, Raghavan N, Goodall C, *et al.* *Biomphalaria glabrata* peroxiredoxin: effect of *Schistosoma mansoni* infection on differential gene regulation[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 167(1): 20-31.
- [3] Pushpamali WA, De Zoysa M, Kang HS, *et al.* Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(3): 294-307.
- [4] Hu Z, Lee KS, Choo YM, *et al.* Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignitus*[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, 155(3): 272-280.
- [5] Sayed AA, Williams DL. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26159-26166.
- [6] Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins[J]. *Biol Chem*, 2002, 383(3-4): 347-364.
- [7] Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(12): 1543-1552.
- [8] Lee KS, Kim SR, Park NS, *et al.* Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(1): 73-84.
- [9] Hambarde S, Yennamalli RM, Subbarao N, *et al.* Predictive inference on cytoplasmic and mitochondrial thioredoxin peroxidases in the highly radioresistant Lepidopteran insect *Spodoptera frugiperda*[J]. *Bioinformatics*, 2010, 4(9): 399-404.
- [10] Iwai K, Naganuma A, Kuge S. Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxides to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14): 10597-10604.
- [11] Harder S, Bente M, Isermann K, *et al.* Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*[J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(5): 861-870.
- [12] Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(44): 27670-27678.
- [13] Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(1): 32-40.
- [14] Chae HZ, Robison K, Poole LB, *et al.* 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(15): 7017-7021.
- [15] Jiang Q, Yan YH, Hu GK, *et al.* Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2005, 10(4): 659-668.

(收稿日期: 2012-02-20 编辑: 瞿麟平)

(上接第 261 页)

### 参 考 文 献

- [1] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, *et al.* Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [2] Park H, Li Z, Yang XO, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1133-1141.
- [3] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Immunol*, 2006, 177(1): 566-573.
- [4] Rutitzky LI, Stadecker MJ. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(9): 2677-2687.
- [5] Stavitsky AB. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 1-12.
- [6] Chen MG. Schistosomiasis in the world and its control progress [J]. *Chin J Schisto Control*, 2002, 14(2): 81-83. (in Chinese) (陈名刚. 世界血吸虫病流行情况及防治进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(2): 81-83.)
- [7] Chen HH, Zhang RL, Zhu XQ. The research progress of immune pathology in the schistosomiasis japonica [J]. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(1): 75-77, 80. (in Chinese) (陈虹虹, 张仁利, 朱兴全. 日本血吸虫病免疫病理的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报. 2006, 22(1): 75-77, 80.)
- [8] Rutitzky LI, Lopes DRJ, Stadecker MJ. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17 [J]. *J Immunol*, 2005, 175(6): 3920-3926.
- [9] Xu HG, Zhang ZJ, Xia CM. Dynamics of liver tissue immune pathology and IFN- $\gamma$ /IL-4 cytokine levels in mice infected with *Schistosoma japonicum* in different stages[J]. *J Trop Dis Parasit*, 2010, 8(2): 72-74, 100. (in Chinese) (徐海根, 张正姬, 夏超明. 日本血吸虫感染小鼠不同时期肝组织免疫病理与 IFN- $\gamma$ /IL-4 水平的动态变化[J]. 热带病与寄生虫学, 2010, 8(2): 72-74, 100.)
- [10] Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 639-646.
- [11] Liu X, Lee YS, Yu CR, *et al.* Loss of STAT3 in CD4<sup>+</sup> T cells prevents development of experimental autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 2008, 180(9): 6070-6076.
- [12] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1849-1861.
- [13] Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, *et al.* Identification of a novel subset of human circulating memory CD4<sup>+</sup> T cells that produce both IL-17A and IL-4[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(1): 222-230.
- [14] Dunne DW, Cooke A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(5): 420-426.
- [15] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, *et al.* TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T (H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function[J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 236-240.
- [16] Voo KS, Wang YH, Santori FR, *et al.* Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12): 4793-4798.
- [17] Wen XY, He L, Chi Y, *et al.* Dynamics of Th17 cells and their role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mice [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5(11): e1399.

(收稿日期: 2012-03-30 编辑: 张争艳)