

人谷氧还蛋白基因的分子克隆及表达

张春晶, 周宏博, 邹朝霞, 董 钦, 于海涛

张春晶, 于海涛, 齐齐哈尔医学院生化教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
周宏博, 邹朝霞, 董钦, 哈尔滨医科大学大学生化教研室
黑龙江省哈尔滨市 150086

张春晶, 女, 1973 年生, 黑龙江省齐齐哈尔人, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

黑龙江省自然科学基金项目, No. D2004-05

通讯作者: 周宏博, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号, 哈尔滨医科大学大学生化教研室, zhouhongbo6704@yahoo.com.cn

电话: 0451-86671684

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-06

Molecular cloning and expression of human glutaredoxin gene

Chun-Jing Zhang, Hong-Bo Zhou, Chao-Xia Zou, Qin Dong, Hai-Tao Yu

Chun-Jing Zhang, Hai-Tao Yu, Department of Biochemistry, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China
Hong-Bo Zhou, Chao-Xia Zou, Qin Dong, Department of Biochemistry, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2004-05

Correspondence to: Hong-Bo Zhou, Department of Biochemistry, Harbin Medical University, 157 Baojian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhouhongbo6704@yahoo.com.cn

Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-06

Abstract

AIM: To clone and sequence glutaredoxin (Grx) cDNA from human umbilical endothelium cells, and to express it in *E.coli* BL21 (DE3).

METHODS: The total RNA was extracted from human umbilical endothelium cells. Grx cDNA was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and then cloned into pRSETA vector to construct recombinant pRSET-Grx. The products were transformed into *E.coli* (JM109). The positive transformant was identified by bacterium-specific PCR and digestion of restriction endonucleases. The positive clones were purified and sequenced, then transfected into *E.coli* BL21 (DE3). The expression of Grx was induced by IPTG.

RESULTS: Compared the cDNA sequence we obtained with that in GenBank (NM002064), there was one difference in the base pairs, but the amino acid sequence was identical. The recombinant Grx was expressed after induced by IPTG for 4-5 hours, and the apparent M_r 16000 were confirmed by 150 g/L SDS-PAGE.

CONCLUSION: Recombinant human Grx gene was successfully cloned and expressed in *E.coli*.

Key Words: Molecular cloning; Glutaredoxin; Human umbilical endothelium cells

Zhang CJ, Zhou HB, Zou CX, Dong Q, Yu HT. Molecular cloning and expression of human glutaredoxin gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1558-1561

摘要

目的: 克隆人脐静脉内皮细胞谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx)编码区的 cDNA 序列并进行序列测定, 构建原核表达载体并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。

方法: 从人脐静脉内皮细胞中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术, 获得该基因编码区的 cDNA, 并重组入原核克隆表达载体 pRSETA, 构建重组质粒 pRSET-Grx, 通过菌落 PCR 筛选及限制性内切酶鉴定, 选择阳性克隆并测序。将测序正确的重组质粒 pRSET-Grx 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 用 IPTG 诱导表达。

结果: 将所得序列与 GenBank 提供的序列(NM002064)比较, 测出的序列在核苷酸序列上有一处碱基不同, 但在氨基酸序列上与已知序列一致。经 IPTG 诱导 4-5 h 后, 150 g/L SDS-PAGE 分析, 表达出 M_r 16000 的蛋白。

结论: 从人脐静脉内皮细胞中成功地获得 Grx 编码区的 cDNA, 成功构建了原核融合表达载体 pRSET-Grx 并获得表达。

关键词: 分子克隆; 谷氧还蛋白; 人脐静脉内皮细胞

张春晶, 周宏博, 邹朝霞, 董钦, 于海涛. 人谷氧还蛋白基因的分子克隆及表达. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1558-1561
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1558.asp>

0 引言

谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx), 又称巯基转移酶(thioltransferase), 是广泛存在于原核、真核生物中的一种小分子蛋白质, M_r 11800^[1]. Grx 是一种多效性细胞因子, 具有多种生物学功能, 如核糖核苷酸还原酶的辅酶、脱氢抗坏血酸还原酶活性、参与氧化应激作用、抗凋亡作用等^[2-4]. 日前, Grx 在体内具有广泛的抗氧化作用已很肯定. Grx 系统参与维持细胞

的氧化还原状态, 提供细胞质内的还原环境; Grx 系统对活性氧导致的细胞氧化应激损伤有阻抗和治疗的作用, 即 Grx 可通过恢复细胞中一些含有半胱氨酸残基的抗氧化蛋白和转录因子的活性来阻抗氧化应激损伤^[5]. 另外 Grx 的抗氧化作用还表现在他的基因表达在细胞受到氧化应激之后增加, 目前已经有 Grx 在心血管疾病、脑血管疾病、白内障等病理状态下高表达的报道^[6-9]. 由此可见, Grx 的清除自由基和抗氧化作用, 使其在治疗心脑血管等器官缺血再灌注损伤性疾病上有重要价值. Grx 因其能作为一种自由基清除剂减少自由基对组织细胞的损伤, 近年来已成为国际上研究的热点. 由于脐静脉内皮细胞是心血管系统中受氧化应激作用的第一层屏障, 易受到氧化应激损伤, 而脐静脉内皮细胞中 Grx 的克隆表达及是否参与氧化应激调控作用的研究尚属空白. 因此我们根据 GenBank 提供的人 Grx 编码区的 cDNA 序列, 应用 RT-PCR 方法成功克隆获得人脐静脉内皮细胞 Grx 编码区 cDNA 基因, 并进行了序列测定分析和初步表达, 为进一步研究 Grx 的功能及其与氧化应激的关系奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞 (ECV304), 购自中国典型培养物保藏中心; Trizol, RNA 提取 Kit, 限制性内切酶 RT-PCR 试剂盒 (逆转录酶 Kit), T4 连接酶, 快速连接TM 试剂盒, Tag 酶, pRSETA 载体购于 Invitrogen 公司; DNA Marker ϕ X174, DL15 000, 质粒提取 Kit 购自 Promega 公司; 小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 大肠杆菌 JM109 和 BL21 (DE3) 由本室储存; 引物由上海博亚生物技术公司合成.

1.2 方法 按 GenBank 发表的人 Grx 基因开放阅读框 (ORF) 全长序列, 用 Primer 5.0 软件设计上游引物 5'-CTGGATCCGGCATGGCTCAAGAGTT-3', 5' 端设有 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物 5'-CGGAATTCGGGCTGTTCTGTGGTTACTG-3', 5' 端设有 *Eco*R I 酶切位点. 将人脐静脉内皮细胞按常规培养在含 100 mL/L 新生牛血

清的 RPMI1640 培养基中, 于 37℃, 含 50 mL/L 二氧化碳条件下培养, 当细胞生长旺盛并贴壁后, 0.2 g/L EDTA 消化, 重新悬浮细胞接种于 25 mL 培养瓶中, 待细胞融合, 用于实验. 按 RNA 提取 Kit 说明书操作, 得到总 RNA, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定. RT-PCR 扩增按逆转录酶 Kit 说明书操作, 用锚定引物 Oligo (dT) 20 反转录合成第一条链. 将所获得的 cDNA 片段, 置 -20℃ 或 -70℃ 冻存备用. 取逆转录产物进行常规 PCR 扩增, 扩增参数为 94℃, 2 min; 94℃, 30 s; 57℃, 30 s; 72℃, 45 s; 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min. 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 结果.

将扩增的 PCR 产物用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 用小量胶回收试剂盒回收. 将质粒 pRSETA 双酶切后的回收产物做 CIP 处理并回收. 然后按载体: 目的基因 = 1:3 连接线性质粒载体 pRSETA 和人 Grx 基因片段. 连接产物转化用 CaCl_2 法制备的感受态 *E. coli* JM109 细胞, 并将转化菌涂在含有 Amp⁺ 的琼脂糖平板上, 37℃ 倒置培养. 挑取单克隆菌落培养, 先经 PCR 鉴定再提取质粒 DNA 用限制性内切酶 *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切鉴定. 将含有重组质粒的菌液送到上海生工生物工程技术有限公司进行目的基因单项序列测定. 把构建得到的重组 pRSET-Grx 质粒转化到宿主菌 BL21 (DE3) 上, 在 100 mg/L 的 LB 培养基中, 37℃ 倒置培养, 在 OD₆₀₀ 达到 0.7 时, 加入 IPTG 至 0.5 mmol/L, 并在 37℃ 诱导 4-5 h, 以 150 g/L SDS-PAGE 鉴定表达产物.

2 结果

根据核糖体 RNA 的电泳条带判断 RNA 的提取质量. 图 1 中可见 28S 和 18S RNA 条带亮度显示抽提的总 RNA 纯度很高. 28S:18S = 2:1, 表明 RNA 无降解, 并利用核酸计算器测得 $A_{260}/A_{280} = 1.85$, 浓度为 162 g/L. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并以 PCR Marker (ϕ X174) 为分子标准参照物, 可见 PCR 产物约在 392bp 和 341 bp 之间 (图 2), 与预期 370 bp 的目的片段位

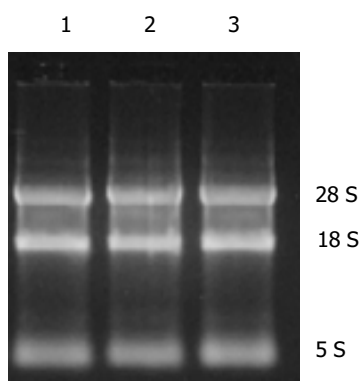


图1 总 RNA 提取.

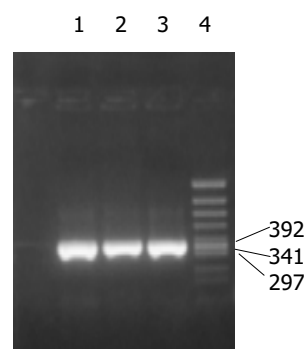


图2 Grx 基因的 PCR 扩增. 1-3: PCR product; 4: PCR Marker (1057, 770, 612, 495, 392, 341, 297, 210 bp fragment, from top to bottom).

置基本一致. 克隆构建的重组质粒命名为 pRSET-Grx. 理论上重组质粒应为 3 230 bp, 双酶切可得到 2 860 bp, 370 bp 两个片段. 采用 PCR 方法扩增阳性克隆后双酶切鉴定, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳(图 3)显示, *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切后重组质粒切出两条带, 切出片段大小均与理论值相符, 系阳性克隆.

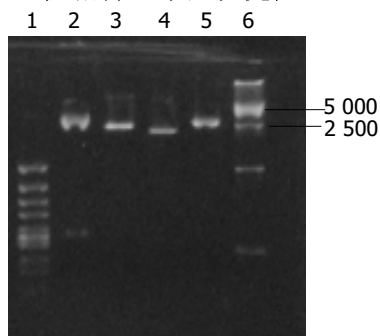


图3 重组质粒 pRSET-Grx 酶切鉴定. 1: PCR Marker; 2: pRSET-Grx digested with *Bam*H I + *Eco*R I; 3: undigested pRSET-Grx; 4: undigested pRSETA; 5: pRSETA digested with *Bam*H I + *Eco*R I; 6: plasmid Marker.

2.1 人脐静脉内皮细胞 Grx 基因序列测定 测定的基因序列长 370 bp, ORF 为 320 bp, 部分序列测序图谱结果见图 4. 用 Dnasis 和 Pmsis 软件程序与 GenBank Data Base 中发表的人 Grx 基因序列进行同源性分析比较, 同源性为 99.7%, 碱基序列只有 1 处不同, 即 ²⁴⁰T-C(前者为人皮肤细胞 Grx 基因), 但相应氨基酸序列(Ile)没有发生改变.

2.2 重组 pRSET-GRX 质粒在大肠杆菌中的表达 将筛选的重组克隆子转化大肠杆菌 BL21(DE3), 获得重组表达菌株, 经 0.5 mmol/L IPTG, 37°C 诱导培养 4-5 h, 其 150 g/L SDS-PAGE 结果(图 5)可见, 表达产物的 M_r 16000. 由于人的谷氧还蛋白含 107 个氨基

酸, M_r 11800, 由于 pRSET-Grx 表达载体 5' 端带有用于表达蛋白纯化的多聚 His 标签, 维持目的基因稳定转录的 T7 噬菌体基因 10 起动子、用于表达抗体检测的抗原决定基因及肠激酶裂解识别位点等标记, 因此谷氧还蛋白的融合蛋白的 M_r 15840, SDS-PAGE 结果与理论值相符.

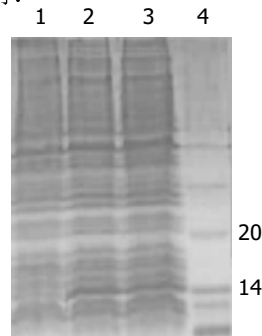


图5 150 g/L SDS-PAGE 分析表达产物. 1: Bacterial sample before induced; 2: Bacterial sample after induced 4 h; 3: Bacterial sample after induced 5 h; 4: Low-range protein molecular weight markers.

3 讨论

由于血管内皮细胞具有复杂的生物学功能, 在国内外科医学界逐渐引起重视, 目前研究最多的是脐静脉内皮细胞. 血管内皮细胞具有活跃的分泌与代谢功能, 他在调节血管功能、维持心血管生理稳态中起着重要作用. 血管内皮也是多种心血管疾病或危险因素作用的重要靶器官, 组成人体的脐静脉内皮细胞除受到内源性氧化应激损伤外, 还受到血液系统中的氧化性物质的作用. 血管内皮细胞功能障碍时, 导致 NO 分泌异常, 与高血压、高血脂症、缺血再灌注的损害和动脉粥样硬化等许多心血管疾病的发生发展有密切关系^[10].

有文献报道, 在活性氧引起的损伤中, 蛋白质氧化损伤先于核酸^[11], 蛋白发生羰基化和糖基化,

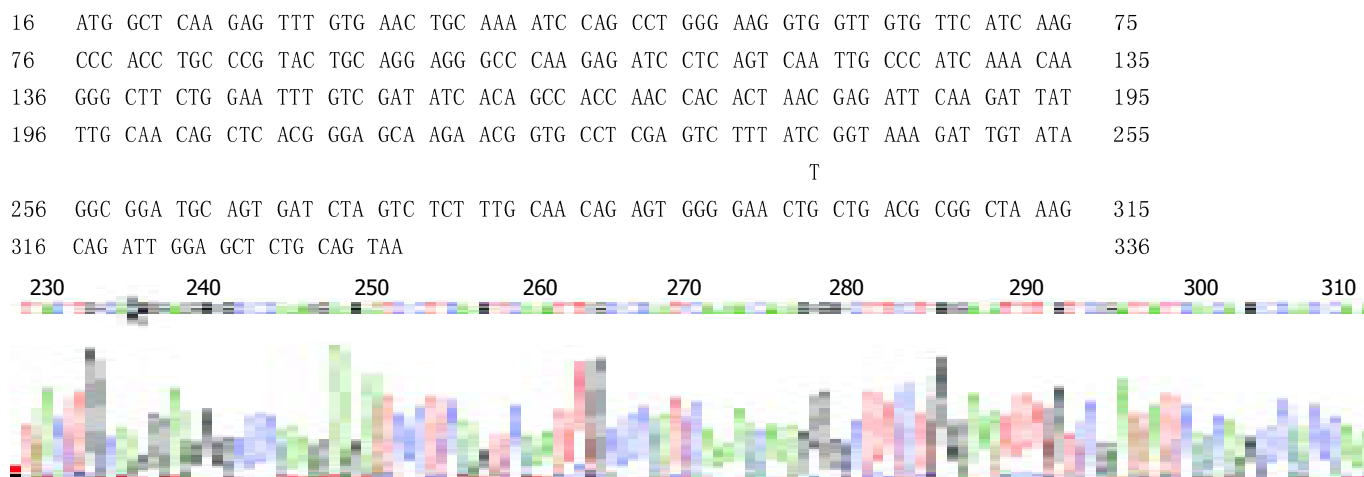


图4 人脐静脉内皮细胞 Grx 编码区的 cDNA 序列.

从而失去生物活性. 已有研究证明, 关于蛋白活性的修复, 除机体内小分子物质发挥作用外, 主要依赖于巯基-二硫键氧化还原酶家族, 而Grx是这个家族的重要组分^[12], 他是利用GSH作为辅酶来催化体内氧化状态的蛋白质上的二硫键还原为巯基, 恢复蛋白质结构和功能, 修复蛋白质活性的抗氧化酶, 对维持体内稳定的氧化还原状态及对活性氧所导致的氧化应激损伤有阻抗和治疗作用^[13]. 最近研究发现, Grx是机体内能特异、高效的还原谷胱甘肽化蛋白的一种酶蛋白^[14-15], Grx特异的恢复氧化应激损伤产生的谷胱甘肽化蛋白活性的能力可能会使其成为热点药物. 目前, 细胞内Grx抵御过氧化氢作用的研究国外已有很多报道^[6-9], 但是关于Grx本身抵御过氧化氢作用的研究, 至今未见报道. 因此, 该蛋白的原核克隆、高效表达及观察Grx保护细胞免受氧化应激损伤作用的研究, 将对于人类氧化应激相关疾病的预防和治疗有重要的意义. 目前, 根据本研究的实验结果, 我们正在进行Grx的优化表达、纯化及体外抗氧化活性的研究, 以便为Grx生物学功能研究及今后的临床应用提供重要的理论依据. 另外, 本实验经30个PCR循环, 370 bp的基因序列中有一处碱基与已知序列的不同, 是PCR过程中的错误参入还是人脐静脉内皮细胞中Grx编码区的cDNA序列就是如此, 还有待进一步论证. 但本实验中出现的不同碱基没有影响氨基酸的排序, 因此, 即使是错配也不必去做更正.

4 参考文献

- 1 Holmgren A. Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2275-2279
- 2 Daily D, Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A, Barzilai A. Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *J Biol Chem* 2001;276:1335-1344
- 3 Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR, Lee YJ. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. *J Biol Chem* 2002;277:46566-46575
- 4 Landino LM, Moynihan KL, Todd JV, Kennett KL. Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:555-560
- 5 Bandyopadhyay S, Starke DW, Mieyal JJ, Gronostajski RM. Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J Biol Chem* 1998;273:392-397
- 6 Prieto-Alamo MJ, Jurado J, Gallardo-Madueno R, Monje-Casas F, Holmgren A, Pueyo C. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2000;275:13398-13405
- 7 Ragbavachari N, Krysan K, Xing K, Loum F. Regulation of thioltransferase expression in human lens epithelial cells. *Investg Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1002-1008
- 8 Okuda M, Inoue N, Azumi H, Seno T, Sumi Y, Hirata Ki, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yodoi J, Yokoyama M. Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1483-1487
- 9 Sahlin L, Wang H, Stjernholm Y, Lundberg M, Ekman G, Holmgren A, Eriksson H. The expression of glutaredoxin is increased in the human cervix in term pregnancy and immediately post-partum, particularly after prostaglandin-induced delivery. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1147-1153
- 10 Schwartz EA, Bizios R, Medow MS, Gerritsen ME. Exposure of human vascular endothelial cells to sustained hydrostatic pressure stimulates proliferation. Involvement of the alphaV integrins. *Circ Res* 1999;84:315-322
- 11 陈媛, 周玫. 自由基医学基础与病理生理. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:14-35
- 12 Jung CH, Thomas JA. S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:61-72
- 13 Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:811-820
- 14 Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med* 2003;35:626-635
- 15 Yoshitake S, Nanri H, Fernando MR, Minakami S. Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J Biochem (Tokyo)* 1994;116:42-46

编辑 潘伯荣 审读 张海宁