

过氧化物酶蛋白 1 真核表达载体构建及在 Hela 细胞的表达与定位 *

刘震西^{1,2} 康瑞霞^{1,2} 刘 芸² 胡水旺² 樊启黄² 李玉花¹ 姜 勇^{2△}

(1 东北林业大学发育生物学实验室 黑龙江 哈尔滨 150040 ;

2 南方医科大学病理生理学教研室 广东省蛋白质组学重点实验室 广东 广州 510515)

摘要 目的 构建过氧化物酶蛋白 1(PRDX 1)的真核表达载体,观察其在 Hela 细胞内表达及定位。方法:提取 BALB/c 小鼠肝脏组织总 RNA,通过 RT-PCR 方法扩增得到小鼠 PRDX 1 编码序列,酶切后克隆至 pcDNA3-myc 载体。重组质粒通过 PCR、酶切、测序证明构建正确后经脂质体转染 Hela 细胞,然后利用 Western blot 和荧光显微镜技术观察该融合蛋白在细胞内表达及定位。结果:经鉴定证明重组质粒构建正确,Western blot 实验显示,该质粒能够在 Hela 细胞中特异表达,免疫荧光试验显示,蛋白产物分布在胞浆和胞核,证明该蛋白在细胞内高表达。结论:成功构建带有 myc 标签的 PRDX 1 真核表达载体,该质粒能够在哺乳细胞中特异表达并且外源性 PRDX 1 蛋白分布在 Hela 细胞胞浆胞核内,为深入研究 PRDX 1 蛋白在细胞内相关生物学研究奠定了基础。

关键词 过氧化物酶 1;分子克隆;蛋白表达定位

中图分类号 :Q75,Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)14-2615-04

Construction of Eukaryotic Expression Vector of Peroxiredoxin and its Expression and Localization in Hela Cells*

LIU Zhen-xi^{1,2}, KANG Rui-xia^{1,2}, LIU Yun², HU Shui-wang², FAN Qi-huang², LI Yu-hua¹, JIANG Yong^{2△}

(1 Key Laboratory of Development Biology, School of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2 Laboratory of Functional Proteomics of Guangdong Province, Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Objective: To construct an eukaryotic vector of Peroxiredoxin 1 (PRDX 1) and detect its expression and localization in Hela cells. **Methods:** The total RNA was extracted from the liver tissues of BALB/c mice, and the corresponding coding sequences of mouse PRDX 1 were amplified by RT-PCR, then they were cloned into the pcDNA3-myc vector to construct a new recombinant plasmid pcDNA3-PRDX 1-myc. The recombinant plasmid was verified by PCR, double digested by restriction endonuclease, and followed by sequencing. Subsequently, the correct construct was transfected into Hela cells with liposome transfection reagent Polyfect. The expression and localization of the fusion protein were detected by Western blot and fluorescence microscope. **Results:** The recombinant plasmid pcDNA3-PRDX 1-myc was correctly constructed. After transfection the recombinant plasmid into Hela cells, the fusion protein was detected in Hela cells by Western blot and the fusion protein was founded in whole cells as shown by fluorescence microscopy. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector for Prdx 1-myc fusion protein has been successfully constructed and effectively expressed in mammalian cells, and it can serve as an important tool for the further study of the correlated biological functions of PRDX 1 in eukaryotic cells.

Key words: PRDX 1; Molecular cloning; Protein expression

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)14-2615-04

前言

Peroxiredoxin 1(PRDX 1)是一种过氧化物酶,属于 2-Cys Peroxiredoxin 抗氧化蛋白超家族。它广泛存在于原核生物和真核生物中,并在多种组织中高表达^[1]。PRDX 1 的主要生化功能是通过硫氧还蛋白还原过氧化物或超氧化物,在消除代谢产生的过氧化物中发挥重要作用^[2-3]。对该家族基因进一步研究表

明,它除具有抗氧化作用外,还具有其他多种功能。Jang 等研究发现,在氧化应激和热休克刺激下,PRDX 1 经历了从过氧化物酶到分子伴侣的功能的改变^[4]。PRDX 1 还可以通过调节体内 H₂O₂ 浓度从而发挥信号转导功能^[5]。PRDX 1 蛋白也被称为增殖相关蛋白(proliferation-associated protein, PAG),与细胞增殖和分化密切相关^[6]。因此,研究 PRDX 1 在不同生理条件下发挥的生理功能以及如何在机体内发挥作用具有重要意义。为深入

* 基金项目:国家重大基础理论研究发展(973)计划项目(2010CB529704);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0731);

国家自然科学基金重点项目(81030055);广东省自然科学基金项目(10251051501000003)

作者简介:刘震西,硕士研究生,主要从事功能蛋白质组学和细胞信号转导方面的研究, E-mail: lzxshn@126.com

△通讯作者:姜勇, E-mail: jiang48231@163.com

(收稿日期:2011-12-21 接受日期:2012-01-17)

研究 PRDX 1 在细胞不同生理状态下的调控机制,本研究构建 myc 标签的 PRDX 1 真核融合表达载体,利用 Western blot 技术检测其在 HeLa 细胞内表达情况,然后利用细胞免疫荧光技术,观察其在 HeLa 细胞中的表达及定位情况。PRDX 1 真核融合表达载体的构建,为我们下一步深入研究 PRDX 1 在细胞内的相关生物学功能提供了一个方便有力的工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级 BALB/c 小鼠由南方医科大学动物所提供。CO₂ 培养箱(Heraeus 公司,德国),荧光显微镜(Leica 公司,德国)。Petri 小皿和细胞培养皿(Corning 公司,美国),真核表达载体 pcDNA3-myc、大肠杆菌菌株 DH5 α 和 HeLa 细胞系(本室保存),DNA ladder、KOD Plus DNA 聚合酶(TOYOBO 公司,日本),限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司,日本),质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒(Axygen 公司,美国),RNeasy Mini Kit、RT-PCT 一步法试剂盒和 PolyFect 转染试剂盒(QIAGEN 公司,德国),DMEM 培养液和胎牛血清(Hyclone 公司,美国),anti-myc 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国),Alexa Fluor 488 偶联的抗鼠 IgG(Molecular Probes 公司,美国),琼脂糖和 LB 培养基(Life Technology 公司,美国),其他试剂均为国产分析纯。引物合成由 Invitrogen 公司(美国)完成。

1.2 方法

1.2.1 BALB/c 小鼠肝脏组织的总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增 PRDX 1 BALB/c 小鼠去眼球放血处死后,迅速取出肝脏组织,液氮速冻下研磨。按 QIAGEN 的 RNA 提取试剂盒操作方法提取总 RNA。以制备的总 RNA 为模板,按照 QIAGEN RT-PCR 一步法试剂盒操作说明行 RT-PCR 反应。扩增引物分别为:上游引物 5'-GC GGTACC ATG TCT TCA GGA AAT GCA AAA ATT GG-3'(下划线为 KpnI 位点);下游引物 5'-TA GGATCC CTT CTGCTT AGA GAA ATA CTC TTT GC-3'(下划线为 BamHI 位点)。产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并切胶回收。

1.2.2 pcDNA3-PRDX 1-myc 重组质粒构建 将 PCR 产物和载体 pcDNA3-myc 用 KpnI 和 BamHI 进行双酶切,酶切产物凝胶电泳回收后,用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接。连接产物转化氯化钙制备的新鲜 DH5 α 感受态菌并接种到含有氨苄青霉素的 LB 琼脂糖培养板,37℃ 孵箱培养 12h。挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡过夜。少量提取质粒,分别进行菌液 PCR、酶切及测序鉴定。构建质粒命名为 pcDNA3-PRDX 1-myc,具体构建流程见文献^[9]。

1.2.3 Western Blot 检测 用含有体积分数为 10% FBS 的 DMEM 在 37℃ 体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中培养 HeLa 细胞。转染前 12h,以 2 \times 10⁵/孔将 HeLa 细胞铺于 3.5cm 细胞培养皿中。待细胞长至 70% 融合时,按 PolyFect 转染试剂盒操作,转染 2 μ g 重组质粒 pcDNA3-PRDX 1-myc 和空载体质粒 pcDNA3 (作为对照)。细胞转染 24h 后收集细胞,按文献^[10]方法取每组细胞进行 Western Blotting 检测。一抗为 Anti-myc(1:1000 稀释)、Anti- β -actin(1:3000 稀释),一抗 4℃ 孵育过夜后,与 1:2000 稀释的 HRP 偶联的抗鼠 IgG 室温孵育 1h,采用 Pierce 公司的 Supersignal West Pico 化学发光底物进行显色,利用 Kodak

IS4000R 图像工作站进行化学发光检测。

1.2.4 脂质体介导的瞬时转染和表达 HeLa 细胞用含有体积分数为 10% FBS 的 DMEM 置于体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中,37℃ 培养。转染前 12h,按每孔 1 \times 10⁴ 个细胞将细胞铺于 Petri 皿中。待细胞长至约 70% 融合时,将 0.2 μ g 重组质粒 pcDNA3-PRDX 1-myc 和空载体质粒 pcDNA3(对照)用无血清培养基稀释至终体积 25 μ l 并混匀,取 1 μ l PolyFect 加入 DNA 中,温和混匀,于室温下孵育 10min。随后加入 150 μ l 含有 10% FBS 的培养基混匀,用 PBS 洗细胞三次,最后将含有 DNA 转染复合物的培养基加入 Petri 皿中。细胞置于 5% 的 CO₂ 孵箱中,37℃ 继续培养。

观察前,去除细胞培养上清,PBS 洗涤 2 次,以质量体积分数为 4% 的多聚甲醛固定细胞 10min,用 PBS 洗一次后,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS(PBST)透化细胞膜 5min,之后用 PBS 洗三次,用质量分数为 0.1% 的硼氰化钠 (NaBH₄) 处理细胞 5min,PBST 洗一次后,用质量分数为 3% 的 BSA 封闭 1h,PBST 洗一次后用 anti-myc 特异性抗体(1:100 稀释)孵育 1h,PBST 洗三次后,用 Alexa Fluor-488 偶联的抗鼠 IgG(1:1000 稀释)室温孵育 1h,用 DAPI 染核 5min 后封片,于倒置荧光显微镜下观察结果并照相。

2 结果

2.1 pcDNA3-PRDX 1-myc 重组质粒构建

以 BALB/c 小鼠肝脏组织的总 RNA 为模板行 RT-PCR 反应,扩增产物行 1%琼脂糖凝胶电泳,可见特异的约 600bp 的片段,与 PRDX 1 编码序列大小相符(图 1)。构建 pcDNA3-PRDX 1-myc 重组质粒鉴定 构建的重组质粒的菌液 PCR 扩增产物进行 1%的琼脂糖电泳可见到特异的约 600bp DNA 片段,与插入的 DNA 序列大小相符,KpnI 和 BamHI 双酶切鉴定产物电泳可见约 5.4kb 和约 600bp 两个条带,一条与 pcDNA3-myc 原质粒 KpnI 和 BamHI 双酶切产物电泳结果一致,另一条与 PCR 扩增产物大小一致(图 1)。DNA 测序结果显示,重组质粒 pcDNA3-PRDX 1-myc 构建正确(结果未给出)。

2.2 Western Blot 检测 PRDX 1-myc 表达

结果显示,pcDNA3-PRDX 1-myc 重组质粒在 HeLa 细胞中可有效的表达含 myc 标签的重组蛋白,分子量大小为 24kD,与小鼠 PRDX 1 蛋白的分子量接近(图 2)。

2.3 pcDNA3-PRDX 1-myc 融合蛋白在 HeLa 细胞中的表达及定位

转染了 pcDNA3-PRDX 1-myc 质粒的 HeLa 细胞在 Petri 小皿培养 24h 后,免疫细胞化学检测外源 PRDX 1 在 HeLa 细胞中有表达。过表达的蛋白定位于细胞浆和胞核中,且基本呈均匀分布,而转染空载体质粒 pcDNA3 的 HeLa 细胞内未检测到标记的蛋白荧光信号(图 3)。

3 讨论

生命的演化经历了从无氧到有氧的过程。在有氧的条件下,生物的代谢反应中会普遍产生活性氧族(reactive oxygen species,ROS),这包括过氧化氢、羟基自由基和超氧阴离子等。ROS 是机体有氧代谢的一个有毒产物,但也是细胞内信号连接

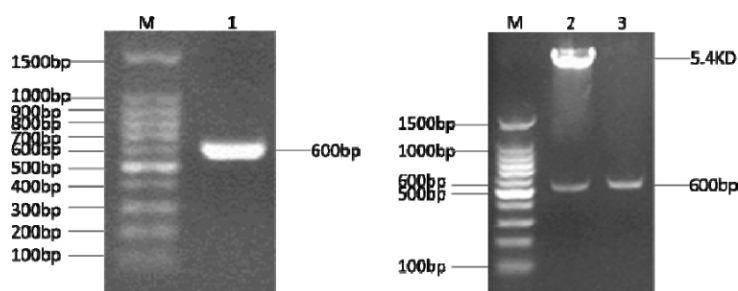


图1 pcDNA3-PRDX 1-myc 真核表达载体的 PCR 鉴定、酶切鉴定及菌液 PCR: M. DNA ladder; 1. PRDX 1 PCR 产物 2. pcDNA3-PRDX 1-myc 经 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切后产物; 3. 菌液 PCR 产物

Fig.1 Analysis of plasmid pcDNA3-PRDX 1-myc with PCR, restrictive endonuclease digestion and bacteria liquid PCR: M. DNA ladder; 1. PADX 1 PCR product 2. pcDNA3-PRDX 1-myc double digested by restriction endonuclease *Kpn*I and *Bam*HI; 3. Bacteria liquid PCR

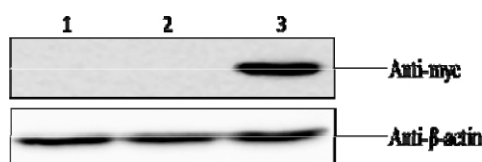


图2 Western blot 检测 PRDX 1-myc 在 HeLa 细胞内表达: 1. 未转染细胞对照 2. 转染空载体 pcDNA3 对照 3. 转染 pcDNA3-PRDX 1-myc 真核表达载体

Fig.2 Expression of Prdx-myc in HeLa cells detected by western blot: 1. HeLa cells transfected nothing; 2. HeLa cells transfected pcDNA3; 3. HeLa cells transfected plasmid pcDNA3-PRDX 1-myc

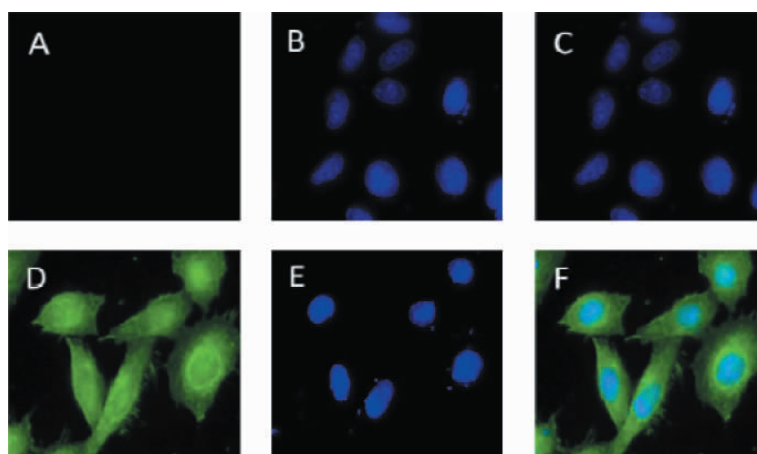


图3 PRDX 1-myc 融合蛋白在 HeLa 细胞中的表达: A-C: 转染 pcDNA3 的 HeLa 细胞; D-F: 转染 pcDNA3-PRDX 1-myc 质粒细胞; A 和 D: 检测转染质粒细胞绿色荧光; B 和 E: 细胞核染色; C: 图片 A 和 B 重叠; F: 图片 D 和 E 重叠

Fig. 3 Detection of the localization of PRDX 1-myc in HeLa cells: A-C: HeLa cells transfected pcDNA3; D-F: HeLa cells transfected pcDNA3-PRDX 1-myc; A-D: detect green fluorescence of transfected HeLa cells; B-E: nucleus staining; C: overlay A and B; F: overlay D and E

的介体, 过量产生的活性氧可能会导致氧应激, 使细胞发生不可修复的损伤, 最终导致细胞凋亡^[11-13]。生物在进化过程中发展形成了各种抗氧化系统, 以抵抗这些活性氧族的破坏作用。

PRDX 1 是抗氧化酶 peroxiredoxin 家族一员, 属 2-Cys Prxs 家族, 编码 299 个氨基酸, 分子大小为 22.110 Da, 其活性位点为 52 位、173 位半胱氨酸氧化还原位点。PRDX 1 的主要生化功能是消除机体代谢产生过氧化物和超氧化物^[2-9]。当机体内过氧化物过高时, 其 52 位 Cys-SOH 与另一分子 Cys-173-SH 形成分子键二聚物, 同时降低体内过氧化氢和烷基氢过氧化物含量, 在机体内发挥抗氧化保护作用^[14]。PRDX 1 具有分子伴侣的功能, Jang 等研究发现, 在氧化应激和热休克刺激下, 2-Cys

Prxs 被过氧化, 分子结构由二聚体变成了高分子量的多聚体, 其功能也由原来的过氧化物酶转变为分子伴侣的功能^[15]; 人类 PRDX 1 (hPrx) 同样具有分子伴侣功能, 将 hPrx 磷酸化的靶氨基酸残基 Thr90 替换为 Asp 模拟磷酸化状态, 其分子伴侣功能明显增强, 并伴随着高分子量复合物形成^[16,17]。PRDX 1 具有调控细胞内的信号传导功能, 2-Cys Prxs 在生物体内分布广泛且对 H_2O_2 具有高亲和力, 从而间接调节细胞内的信号传导^[7]; Chuang 等研究发现, 血小板介导的生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 诱导的细胞内 H_2O_2 的产生是蛋白质酪氨酸磷酸化所必需的, 这些发现表明 H_2O_2 不仅可以氧化损伤细胞, 还可以作为细

胞内第二信使参与调节体内信号转导^[18,19]。PRDX 1 蛋白又被称为增殖相关蛋白,与细胞增殖和分化密切相关^[8]。在原代培养的人乳腺上皮细胞系中,血清刺激能诱导 PRDX 1 的表达升高,但当细胞增殖停止时,PRDX 1 表达降低,这提示 PRDX 1 与细胞增殖与分化密切相关^[20]。由于 PRDX 1 蛋白能够通过清除氧自由基以及以分子伴侣形式参与氧化应激细胞信号通路调节,在细胞的多种生理病理过程扮演了重要的角色,因而近年来已成为研究的热点。

本实验构建了 PRDX 1 的真核表达载体,该表达质粒保留了 PRDX 1 的全长序列。Western blot 检测结果显示该质粒能够在真核细胞中成功表达。为了解 PRDX 1-myc 融合蛋白在 Hela 细胞内的表达定位情况,本研究又进行了细胞免疫荧光实验,结果发现过表达的 PRDX 1-myc 均匀地分布在细胞中,与内源性 PRDX 1 表达分布情况类似。PRDX 1-myc 真核细胞表达载体的成功构建,为进一步研究其在细胞内的定位、移位以及与重要信号分子的共定位奠定了基础,因而为深入阐明 PRDX 1 细胞内的相关生物学功能提供了方便有力的工具。

参考文献(References)

- [1] Mizusawa H, Ishii T, Bannai S, et al. Peroxiredoxin I (macro-phage 23 kDa stress protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283:57-60
- [2] Rhee SG, Chae HZ, Kim K, et al. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38:11-17
- [3] Schroder E, Littlechild JA, Lebedev A, et al. Crystal structure of dimeric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution[J]. *Structure Fold, Des*, 2000, 8: 605- 615
- [4] Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins, *Nature*, 2000, 407: 211-215
- [5] Woo HA, Jeong W, Chang TS, et al. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins[J]. *J. Biol. Chem*, 2005, 280: 3125-3128
- [6] Jang HH, Lee KO, Chi YH, et al. Two enzymes in one, two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function[J]. *Cell*, 2004, 17: 625-635
- [7] Wood ZA, Poole LB, Karplus PA, et al. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling [J]. *Science*, 2003, 300: 650- 653
- [8] Dierick JF, Wenders F, Chainiaux F, et al. Retrovirally mediated over-expression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB[J]. *Biogerontology*, 2003, 4:125-131
- [9] 胡水旺, 孙明晶, 夏高晓, 等. 转甲状腺素蛋白真核表达载体的构建及其细胞内定位[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(6) :693-695
Hu Shui-wang, Sun Ming-jing, Xia Gao-xiao, et al. Construction of a eukaryotic expression vector for Transthyretin and its intracellular localization [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2009, 34(6) :693-695
- [10] 龚小卫, 李涛, 杨婷, 等. 亚硝酸盐诱导 HSP27 的细胞内移位依赖于 p38 MAPK 介导的磷酸化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(7) :581-585
Gong Xiao-wei, Li Tao, Yang Ting, et al. Translocation of HSP27 Induced by Arsenite Depends on Its Phosphorylation Mediated by p38 MAPK [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol*, 2007, 23(07): 581-585
- [11] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, et al. Mitochondria and reactive oxygen species[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 47(4): 333
- [12] 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: 561-565
- [13] Hirotsu S, Abe Y, Okada K, et al. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1999, 96:12333-12338
- [14] Mu ZM, Yin XY, Prochownik EV, et al. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression[J]. *J. Biol. Chem*, 2002, 277(45):43175-43184
- [15] Cesaratto L, Vascotto C, D'Ambrosio C, et al. Overoxidation of peroxiredoxins as an immediate and sensitive marker of oxidative stress in HepG2 cells and its application to the redox effects induced by ischemia/reperfusion in human liver[J]. *Free Radical Research*, 2005, 39(3):255-268
- [16] Jang HH, Kim SY, Park SK, et al. Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580:351-355
- [17] Jang HH, Lee KO, Chi YH, et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function [J]. *Cell*, 2004, 117: 625-635
- [18] Chang MH, Wu MS, Lo WL, et al. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2006, 103(8):2552-2557
- [19] Carola AN, Cao JX, Manevich YF. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(24): 4072-4078
- [20] Phalen TJ, Weirather K, Deming PB, et al. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin that correlate with cell cycle arrest and recovery[J]. *J Cell Biol*, 2006, 175:779-789