

人硫氧还蛋白1多克隆抗体制备及 对内毒素血症新生大鼠的保护作用

赵海燕¹ 陈红武¹ 钱新华¹ 胡旭初²

(1. 南方医科大学南方医院新生儿科, 广东 广州 510515;
2. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 广东 广州 510080)

[摘要] **目的** 克隆人硫氧还蛋白1(hTrx-1)基因并在大肠杆菌表达体系中进行有效表达,制备其多克隆抗体。初步探讨hTrx-1对内毒素血症新生 Sprague-Dawley (SD)大鼠的保护作用。**方法** 从人胎肝细胞中用RT-PCR的方法得到了hTrx-1全长基因,将它克隆到原核表达载体上,在大肠杆菌诱导表达并纯化,纯化的蛋白免疫SD大鼠,制备多克隆抗体。将新生SD大鼠分为正常组、脂多糖(LPS)组和hTrx-1组($n=12$)。正常组、LPS组分别予以腹腔注射生理盐水、LPS(5 mg/kg);hTrx-1组于LPS注射前30 min腹腔注射hTrx-1(10 mg/kg)。观察正常组、LPS组与hTrx-1组新生大鼠24 h死亡率。**结果** 成功构建PET-28a-hTrx-1原核表达载体,表达纯化了hTrx-1,获得高效价多克隆抗体。正常组、LPS组与hTrx-1组大鼠24 h的死亡率分别是0、67%、17% ($\chi^2=14.400$, $P<0.01$)。**结论** 成功制备了hTrx-1多克隆抗体;初步证明了该蛋白对内毒素血症新生SD大鼠具有保护作用。

[中国当代儿科杂志,2011,13(10):837-841]

[关键词] 人硫氧还蛋白1;原核表达;重组蛋白;多克隆抗体;内毒素血症;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)10-0837-05

Preparation of polyclonal antibody of recombinant human thioredoxin-1 and its protective effects on neonatal rats with endotoxemia

ZHAO Hai-Yan, CHEN Hong-Wu, QIAN Xin-Hua, HU Xu-Chu. Department of Neonatology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China (Chen H-W, Email:drchenhongwu@163.com)

Abstract: Objective To clone the gene human thioredoxin 1 (hTrx-1) expressing its protein in the *E. coli* expression system and to obtain its polyclonal antibody, and to study the protective effects of hTrx-1 on neonatal rats with endotoxemia. **Methods** cDNA encoding hTrx-1 from fetal liver cells was isolated by RT-PCR. The hTrx-1 was cloned to the prokaryotic expression plasmid PET-28a to induce its protein expression in the *E. coli* expression system. The purified hTrx-1 was injected into rats to prepare polyclonal antibody. Newborn Sprague-Dawley rats were randomly assigned to three groups: control, lipopolysaccharide (LPS) and hTrx-1 ($n=12$ each). The control and the LPS groups were intraperitoneally injected with normal saline and LPS (5 mg/kg), respectively. The hTrx-1 group received an intraperitoneal injection of hTrx-1 (10 mg/kg) 30 minutes before LPS injection. The mortality rate 24 hrs after injection was compared between the three groups. **Results** The prokaryotic expression plasmid PET-28a-hTrx-1 was constructed. The hTrx-1 protein was expressed and purified. The polyclonal antibody of hTrx-1 with the titer of 1:51200 was prepared. The mortality rate of the control, LPS and hTrx-1 groups was 0, 67% and 17%, respectively ($\chi^2=14.400$, $P<0.01$). **Conclusions** The polyclonal antibody of hTrx-1 is prepared successfully. The hTrx-1 protein has protective effects on neonatal rats with endotoxemia. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (10):837-841]

Key words: Human thioredoxin 1; Prokaryotic expression; Recombinant protein; Polyclonal antibody; Endotoxemia; Rats

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是普遍存在于不同有机体的具有氧化还原活性的小分子蛋白,又称白细胞素-1样细胞因子、成人T细胞白血病衍化因子、早孕因子等,根据存在位置不同分为Trx-1(存在于细胞质和细胞核)和Trx-2(存在于线粒体)^[1]。Trx-1与硫氧还蛋白还原酶(TrxRI)和还原型辅酶Ⅱ

[收稿日期]2011-05-27;[修回日期]2011-07-05
[作者简介]赵海燕,女,硕士研究生。
[通信作者]陈红武,副教授。

(NADPH)共同构成一个重要的氧化还原调节系统(Trx系统),除了基本的氧化还原调节功能外,还有许多其他生物学活性,如促进细胞生长^[2]、参与炎症应答、抑制细胞凋亡^[3]等。内毒素血症中进入血液的内毒素激活机体免疫细胞,诱导释放出炎症分子,导致机体组织器官的损伤,除应用抗生素以及激素外,尚没有其他有效的治疗方法。因此从内毒素血症的发病机制寻找治疗的靶点已成为目前研究的重点。本研究拟通过构建 PET-28a-hTrx-1 原核表达载体,表达、纯化 hTrx-1,免疫大鼠获得高效价的多克隆抗体,对其特异性以及效价进行鉴定。并进一步探讨该纯化蛋白对内毒素新生 Sprague-Dawley (SD)大鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体与菌株 原核表达质粒 PET-28a、大肠埃希菌 DH5 α 和 BL21、胎肝细胞由中山大学热带病重点实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂与工具酶 TaKaRa Ex TaqTM 酶(含 dNTP)、Sal I、Sac I、DNA 标准(DL2000)(大连宝生物工程公司);T4 DNA 连接酶、异丙基硫代- β D-半乳糖苷(isopropylthio galacto-side,IPTG)(美国 Promega 公司);Ni-NTA Agarose(Cat. No. 30210)(德国 NOVEGN 公司);质粒提取试剂盒、蛋白质分子标准(广州东盛科技公司);DNA 凝胶回收试剂盒(广州铂尔生物科技有限公司);3,3-二氨基联苯胺显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、过硫酸胺等试剂(上海申友生物技术公司);弗氏完全、不完全佐剂为 Gibco 公司产品。

1.1.3 实验动物 实验用大鼠均购于中山大学北校区动物实验中心,年龄为 8~12 周的 SPF 级别雄性 SD 大鼠用于制备多克隆抗体;新生 7 d SD 大鼠用于蛋白保护作用研究。

1.2 方法

1.2.1 hTrx-1 cDNA 的获取及引物设计 用含 10% 胎牛血清常规培养人胎肝细胞,提取总 mRNA,反转录成 cDNA。从人的 cDNA 文库中筛选出 hTrx-1 基因,根据其编码序列,利用 DNAClub 和 PCRdesign 软件设计引物。上游引物:5'-AGAGAGCTCAT-GTCTTCAGGAAATGCTAAA-3',带 SacI 酶切位点并加入 AGA 保护性碱基;下游引物:5'-TTTGTGCAC-CTTCTGCTTGGAGAAATATTC-3',带 Sal I 酶切位点

和 TTT 保护性碱基(引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成)。以 cDNA 为模板,应用上述设计的特异引物,利用高保真的 DNA 聚合酶进行扩增,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 60 s,94 $^{\circ}$ C 45 s,循环 35 次,PCR 产物利用琼脂糖凝胶电泳鉴定回收。

1.2.2 重组原核表达载体的构建以及鉴定 PCR 鉴定回收产物和 PET-28a 载体分别用 Sal I 和 Sac I 双酶切、回收、连接后转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,卡那霉素筛选阳性克隆,提取的重组质粒进行双酶切和 PCR 鉴定,并进行重组质粒 DNA 测序鉴定(测序由英俊科技股份有限公司完成)。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达 提取 PET-28a-hTrx-1 重组质粒转化入大肠埃希菌 BL21 工程菌,卡那霉素筛选阳性克隆,挑取单菌落接种于含 Kan 的 LB 液体培养基中(空质粒 PET-28a 的 BL21 作为阴性对照),放入摇床振荡培养过夜,1% 转接后继续培养至 A600 约为 0.4~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 后继续诱导。诱导前和诱导后的样品离心收集菌体沉淀,处理样品后取上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 重组质粒的大量诱导和纯化 依据上述诱导表达方法确定最佳诱导时间,然后对阳性克隆进行大量的诱导表达,离心收集菌体,1 $\times$ 结合 Buffer 重悬后 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日解冻后于冰上超声裂解,分别取上清和沉淀样品处理后行 SDS-PAGE 判断重组蛋白的可溶性。因为蛋白在上清表达,参照 Ni-IDA Agarose 说明书进行过柱,收集洗脱液,SDS-PAGE 电泳分析何种浓度下洗脱下目的蛋白,再将洗脱的目的蛋白在 PBS 透析液(pH 7.4)中 4 $^{\circ}$ C 缓慢振摇透析 24 h,用考马斯亮兰 G250 测蛋白浓度,并于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 多克隆抗体的制备与鉴定 将制备好的抗原(即纯化的 hTrx-1)200 μ g 与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后,对 SPF 级别 8~12 周 SD 大鼠进行背部以及腹部皮下多点注射。第 2 周和第 4 周予以抗原 100 μ g 与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后进行皮下多点注射。每次免疫前后均断尾取血清,用间接 ELISA 法测定抗体滴度。当抗体滴度达到 1:25600 以上时处死,眼球取血制备纯化的 hTrx-1 多克隆抗体后以 Western blot 方法检测其可用性。

1.2.6 间接 ELISA 法检测抗血清效价 抗原用包被液稀释,在酶标板上各孔分别加 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗涤后,脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,洗涤后,免疫前血清和免疫后抗血清用 0.1% BSA 溶液按梯度稀释

(1:400~1:51200),37℃ 孵育 2 h,PBST 洗涤后,加辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 抗体(1:20000 稀释),37℃ 孵育 1 h 后,用 PBST 洗涤。再分别加入底物显色液四甲基联苯胺室温避光放置 20 min,2 M H₂SO₄ 终止酶促反应,用酶标仪在 450 nm 波长下行比色测定。OD 值大于等于阴性对照的 2.1 倍为阳性。

1.2.7 Western blot 分析多克隆抗体的可用性 用 hTrx-1 免疫 SD 大鼠血清以及正常大鼠血清与辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠 IgG 进行 Western blot,鉴定证明多克隆抗体的可用性。

1.2.8 对内毒素新生大鼠保护作用的初步观察 新生 SD 大鼠内毒素血症模型制作参照国外学者的方法^[4]。36 只新生 7 d 大鼠随机分为正常组、脂多糖组(LPS 组)和 hTrx-1 组(*n* = 12)。对照组腹腔注射 0.9% 生理盐水 0.1 mL;LPS 组腹腔注射 LPS 5 mg/kg(*E. Coli* O₅₅:B₅,Sigma 公司产品);hTrx-1 组于 LPS 注射前 30 min 腹腔注射 hTrx-1(10 mg/kg)。观察注射后 24 h 新生 SD 大鼠的死亡率。

2 结果

2.1 原核重组质粒的鉴定

将原核重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,产物行琼脂糖凝胶电泳。结果显示在 597 bp 左右有一清晰条带,与目的基因大小基本相符。此外,重组质粒的测序报告表明插入序列与理论序列一致,证明重组质粒构建成功(图 1)。

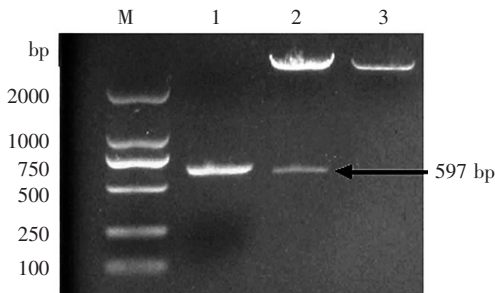


图 1 重组质粒的 PCR 和双酶切鉴定 M;DNA 标准(DL2000);1:PCR 产物;2:PET-28a-hTrx-1 重组质粒双酶切;3:PET-28a 质粒双酶切。重组质粒 PET-28a-hTrx-1 酶切后两片段分别与 PCR 产物及 PET-28a 分子量相等,证实重组质粒构建成功。

2.2 最佳诱导时间的确定

加入 IPTG 诱导剂后,目的蛋白表达增加,且随着时间的延长,蛋白表达量增多,但 4~5 h 未有明

显变化。从图 2 可以看出,目的蛋白的最佳表达时间为 4 h。

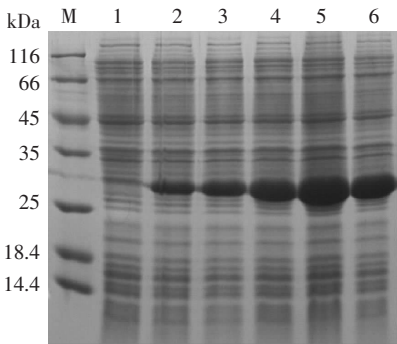


图 2 不同诱导时间蛋白表达 M:蛋白 Marker;1:PET-28a-hTrx-1 IPTG 未诱导;2~6:分别为 PET-28a-hTrx-1 IPTG 诱导 1 h、2 h、3 h、4 h 及 5 h。

2.3 蛋白表达以及纯化结果

将构建好的重组质粒转化到大肠埃希菌 BL21 中,SDS-PAGE 电泳分析结果见图 2 中第 5 泳道所示,在大约 27.9 kDa 处出现高效表达条带,与目的蛋白基本相符。蛋白主要存在于上清,经过柱后得到纯化蛋白,结果如图 3 中第 7 泳道所示,其位置与目的蛋白相符,证明目的蛋白纯化成功。

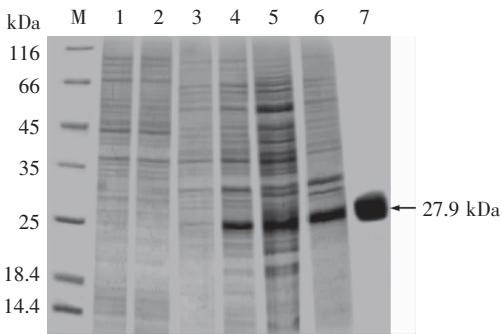


图 3 SDS-PAGE 分析 PET-28a-hTrx-1 在大肠埃希菌中的表达产物及其纯化产物 M:蛋白 Marker;1:PET-28a IPTG 未诱导;2:PET-28a IPTG 诱导;3:PET-28a-hTrx-1 IPTG 未诱导;4:PET-28a-hTrx-1 IPTG 诱导;5:PET-28a-hTrx-1 上清;6:PET-28a-hTrx-1 沉淀;7:PET-28a-hTrx-1 纯化蛋白。PET-28a 诱导前后都不表达 hTrx-1,重组载体 PET-28a-hTrx-1 经诱导后表达 hTrx-1,且在上清中可溶性表达。

2.4 间接 ELISA 法检测多克隆抗体效价

间接 ELISA 法检测结果表明,蛋白免疫 3 次后,第 6 周时效价达 1:51200(图 4)。同时检测到 IgG 亚类 IgG1 和 IgG2a 的存在。

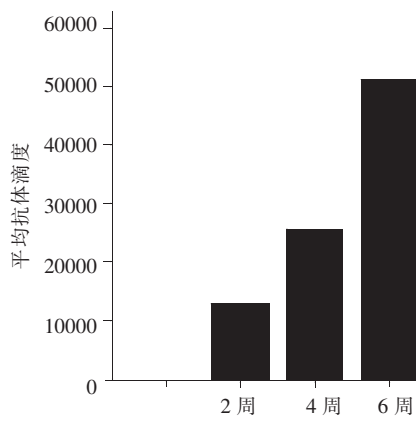


图4 抗体效价图

2.5 Western blot 法检测抗原抗体特异性结合

多克隆抗体对纯化蛋白的 Western blot 结果显示在 27.9 kDa 处呈现单一清晰条带,而正常大鼠血清对纯化蛋白未识别出条带,证明抗体特异性良好。见图 5。

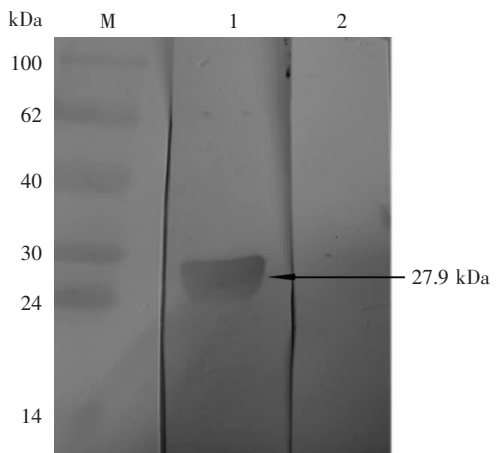


图5 多克隆抗体对纯化蛋白的 Western blot 检测结果 M:预染 Marker;1:多克隆抗体对纯化蛋白的反应结果;2:正常大鼠血清对纯化蛋白的反应结果。

2.6 新生 SD 大鼠 24 h 死亡率

对照组活动、饮食一切正常,没有死亡发生。LPS 组动物注入 LPS 1 h 后,表现出活动减少,离群,嗜睡,口周发绀,呼吸急促等全身炎症反应症状,濒死状态时表现为毛色青灰,呼吸浅表,24 h 死亡率为 67% (8/12)。hTrx-1 组动物症状不明显,24 h 死亡率为 17% (2/12)。3 组间死亡率差异有统计学意义($\chi^2 = 14.400, P = 0.001$)。

3 讨论

Trx 是目前逐渐被认识的具有非常重要而独特

功能的、在进化上相当保守的氧化还原蛋白,其中 Trx-1 由 105 个氨基酸组成,分子量约为 12 kDa,为胞内胞外均存在的多功能蛋白。某些刺激(如缺氧、病毒、氧气、过氧化氢、炎症等)都可上调 Trx 的表达^[5-6]。本研究将 hTrx-1 蛋白免疫大鼠后获得抗体,检测发现同时有 IgG1 和 IgG2a 亚类的存在,这提示此蛋白具有免疫原性,可对大鼠的免疫功能造成影响。

内毒素血症多因为机体革兰阴性细菌繁殖并释放内毒素引起,可进一步促发全身炎症反应综合征(SIRS)以及多器官功能不全综合征(MODS),甚至导致死亡。本研究发现,对内毒素血症新生大鼠腹腔注射 hTrx-1 后,死亡率明显降低,提示 Trx-1 对内毒素血症新生大鼠具有明显的保护作用。推测该重组蛋白可能是通过参与调控各种炎性介质的生成、影响炎性/抗炎介质间的平衡来实现其对 LPS 诱导的内毒素血症的保护作用。从细胞水平分析,其抗炎机制主要有:抑制中性粒细胞等的趋化、抑制趋化细胞在内皮的粘附、抑制补体活化、抑制 MIF(巨噬细胞游走抑制因子)等^[7]。从分子水平分析,在细胞内,Trx-1 主要定位于细胞质^[8],维持着细胞氧化还原内环境稳定和调节凋亡信号通路中某些重要的信号分子如凋亡信号调节激酶-1(ASK-1)^[9-11]。而在某些特殊环境下,可以进入细胞核。细胞核内的 Trx-1 可与多种转录因子作用,如 NF- κ B, AP-1 和 p53^[12-15],从而调节基因表达,二者与多种炎症因子如 TNF、IL-1、IL-6、IL-8 等表达相关。在应激状态下细胞可将 Trx-1 分泌到胞外^[16],外源性 Trx-1 也能进入细胞,但对于胞内 Trx-1 分泌至胞外,及胞外 Trx-1 将其信号传递到胞内的机制都尚不清楚,有待于进一步研究。

本研究成功构建了原核表达载体 PET-28a-hTrx-1,获得了高效表达,并且证明了 hTrx-1 蛋白具有生物活性,为以后更深层次地了解该蛋白功能的研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, 41(1): 261-295.
[2] Koc A, Mathews CK, Wheeler LJ, Gross MK, Merrill GF. Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase [J]. J Biol Chem, 2006, 281(22): 15058-15063.
[3] Andoh T, Chock PB, Chiueh CC. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(12): 9655-9660.
[4] Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue

distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia[J]. J Clin Invest, 1992, 90(3): 693-698.

[5] Nakamura H, Hoshinob Y, Okuyamac H, Matsuod Y, Yodoid J. Thioredoxin 1 delivery as new therapeutics[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61(4): 303-309.

[6] Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G. Cloning and sequencing of human thioredoxin reductase[J]. FEBS Lett, 1995, 373(1): 5-9.

[7] Matsuzawa A, Nishitoh H, Tobiume K, Takeda K, Ichijo H. Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress-and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis; advanced findings from ASK1 knockout mice[J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(3): 415-425.

[8] Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal regulating kinase (ASK) 1[J]. EMBO J, 1998, 17(9): 2596-2606.

[9] Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death[J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(3): 405-414.

[10] Galter D, Mihm S, Droge W. Distinct effects of glutathione disulfide on the nuclear transcription factors kappa B and the activator protein-1[J]. Eur J Biochem, 1994, 221(2): 639-648.

[11] Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro[J]. Science, 1990, 249(4973): 1157-1161.

[12] Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells; AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor[J]. EMBO J, 1993, 12(5): 2005-2015.

[13] Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(9): 440-450.

[14] Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 957: 189-199.

[15] 陈燕, 常立文, 刘伟, 李文斌, 汪鸿, 黄光焰, 等. 硫氧还蛋白在早产鼠高氧肺损伤中的动态表达及其临床意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(6): 410-411.

[16] Xu SZ, Sukumar P, Zeng F, Li J, Jairaman A, English A, et al. TRCP channel activation by extracellular thioredoxin[J]. Nature, 2008, 451(7174): 69-72.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

中国医师协会新生儿专业委员会第二次 全国新生儿科学术会议征文通知(首轮)

经中国工程师协会新生儿专业委员会研究决定,并报中国工程师协会学术会员部批准,第二次全国新生儿科学术会议定于2012年3月在北京召开。现开始征文,与新生儿各专业有关的论文(基础研究、临床研究、护理及管理)可投稿。请将论文电子版全文及800字以内的结构式摘要发至新生儿专业委员会学会办公定电子信箱:xinshengerwyh@126.com。

联系人:张倩,电话:010-84024716。

中国医师协会新生儿专业委员会
2011年7月5日