

# 皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 基因在毕赤酵母中的 表达及抗氧化活性研究

乔琨<sup>1</sup>, 方春华<sup>1,2</sup>, 陈贝<sup>1</sup>, 彭会<sup>3</sup>, 潘南<sup>1</sup>, 蔡水淋<sup>1</sup>,  
许旻<sup>1</sup>, 陈丽娇<sup>2</sup>, 郝华<sup>3</sup>, 刘智禹<sup>1</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013; 2. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002; 3. 厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 为研究皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai* Ino 硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX2) 蛋白的抗氧化活性, 将 *HdhTPX2* 基因克隆至 pPIC9K 载体, 通过电击转化至毕赤酵母 GS115 菌株中, 获得重组表达质粒 pPIC9K-*HdhTPX2*, 经甲醇诱导及亲和层析纯化得到重组 HdhTPX2 蛋白, 并进行质谱鉴定及体外抗氧化功能检测。结果表明: 本研究中成功构建了重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-*HdhTPX2*, 经表达条件的优化, 在 pH 为 7 的培养基中用 0.5% 甲醇诱导表达 72 h, 分泌表达上清液中得到相对分子质量约为 25 000 的稳定表达产物, 纯化后的蛋白经质谱鉴定为目的蛋白; 体外活性测定发现, 该蛋白清除羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 能力强于维生素 C, 并对  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起的细胞损伤具有一定的保护作用。研究表明, 皱纹盘鲍硫氧还蛋白过氧化物酶 HdhTPX2 在毕赤酵母表达系统中得到高效表达, 重组表达产物具有抗氧化活性功能。

**关键词:** 皱纹盘鲍; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 毕赤酵母; 抗氧化

**中图分类号:** Q786      **文献标志码:** A

海洋无脊椎动物尤其是海洋贝类处于复杂的水体环境中, 为避免氧化损伤引起机体的疾病及死亡, 进化出了更有效的抗氧化防御系统应对气候变化及病原菌的感染<sup>[1-3]</sup>。像高等动物一样, 海洋贝类拥有一套抗氧化酶系统清除各种自由基, 维持机体内环境平衡。在这些酶中, 硫氧还蛋白过氧化物酶 (Thioredoxin Peroxidase, TPX) 通常也被称为过氧化物还原酶 (Peroxiredoxins, PRX), 是一种重要的硫醇特异性抗氧化蛋白<sup>[4-5]</sup>。TPX 最早发现于酿酒酵母中<sup>[6]</sup>, 随后在细菌、植物和动物中相继被报道。哺乳动物 TPX 分为 6 类: TPX1 和 TPX2 主要分布在细胞质中; TPX3 位于线粒体; TPX4 存在于细胞外; TPX5 分布在线粒体和过氧化物酶体; TPX6 同样分布在细胞质中<sup>[7-9]</sup>。所有 TPX 的 N 端都含有保守的半胱氨酸残基, 基于半胱氨酸残基数量及 TPX 结构和功能的特性, 又将其分为 1-Cys TPX、典型 2-Cys TPX 和非典型 2-

Cys TPX<sup>[5]</sup>, 含有相同数量半胱氨酸残基 TPX 的同源性较高<sup>[4]</sup>。它们在调控细胞增殖与分化、细胞信号转导等众多生理生化反应中发挥重要作用<sup>[10-15]</sup>。TPX2 在哺乳动物中又称为 NKEF B、Calpromotin、Torin, 通过去除正常细胞代谢产生的过氧化物来保护细胞组分, 同时参与由细胞表面受体起始的  $\text{H}_2\text{O}_2$  信号调节<sup>[9]</sup>。

近年来, 软体动物硫氧还蛋白过氧化物酶受到越来越多的关注<sup>[16-21]</sup>, 大多数研究涉及相关基因的克隆、基因结构分析及表达差异分布等, 涉及蛋白水平功能的研究较少。皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai* Ino 因其具有较高的经济价值, 目前已成为中国重要的海水养殖贝类之一。尽管日本盘鲍 *Haliotis discus discus* 的硫氧还蛋白过氧化物酶基因 *AbTPX2* 有被克隆<sup>[19]</sup>, 但尚未见通过真核表达载体对该蛋白进行体外重组表达的研究。本研究中, 构建了皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 基因真核表达载体 pPIC9K-

收稿日期: 2018-10-18

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01041); 国家海洋公益性行业科研专项 (201405016); 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室开放课题 (2015fjscq04)

作者简介: 乔琨 (1983—), 女, 博士, 助理研究员。E-mail: qiaokun@xmu.edu.cn

通信作者: 刘智禹 (1972—), 男, 博士, 教授级高级工程师。E-mail: 13906008638@163.com

*HdhTPX2*, 在毕赤酵母菌株 GS115 中诱导表达获得重组蛋白, 通过亲和层析对获得的重组蛋白进行纯化, 并对其纯化产物进行了抗氧化功能及细胞水平安全性的评价, 旨在为开发 *HdhTPX2* 蛋白作为天然食品添加剂, 以及在药物制备和化妆品领域的应用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用毕赤酵母菌株 GS115、表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; 质粒克隆菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞购自 TIANGEN 公司; pPMD18-T 质粒、高保真酶购自 Transgen 公司; 限制性内切酶、D605A、DNA Ligation Kit 均购自 TaKaRa 公司; 人肝细胞 L02 购自中山大学; 小鼠成纤维细胞 L929 由闽南师范大学惠赠; 马血细胞购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 pPIC9K-*HdhTPX2* 载体的构建 皱纹盘鲍 pPIC9K-*HdhTPX2* 载体构建及表达的方法参考文献 [22-23]。首先根据 pPIC9K 载体多克隆位点, 设计皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 基因的特异性引物。然后在上游引物 F1 的 5' 端加 *SnaB* I 酶切位点: CATGTACGTAGCCCAAGTCGGAAACCTC, 下游引物 R1 的 5' 端加 *Not* I 酶切位点: ATGCCGGC-CGCTCA [ATGGTGATGGTGATG] ATGGTTGACCTTG-GAGAAG, 终止密码子前为 6 $\times$ His 标签 (如方框部分)。

皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 基因由福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室前期构建的转录组文库获得 (GenBank 登录号: MK257743)。以皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 重组 pMD18-T 阳性质粒 (本实验室保存) 为模板, 分别以 *HdhTPX2* F1 和 *HdhTPX2* R1 为上、下游引物扩增目的基因片段, 与 pPMD18-T 质粒连接, 获得含有 *HdhTPX2* 目的基因的重组阳性质粒, 再以该阳性质粒为扩增模板, 通过 TransStartFastPfu DNA Polymerase 高保真酶, 扩增目的基因片段。取 20  $\mu$ g 上述回收的皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 目的基因片段, 分别使用 *SnaB* I 和 *Not* I 限制性内切酶两次单酶切, 同时对 pPIC9K 载体质粒进行 *SnaB* I 和 *Not* I 二次酶切, 用核酸共沉剂 D605A 回收酶切后的目的基因片段及载体。采用 DNA Ligation Kit, 于 16  $^{\circ}$ C 下将具有 *SnaB* I 和 *Not*

I 黏性末端的 pPIC9K 载体与具有相同黏性末端的 *HdhTPX2* 基因片段连接, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于含有氨苄霉素的 LB 琼脂平板上培养。用 PCR 法鉴定阳性克隆菌, 交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 DNA 序列测定。

1.2.2 pPIC9K-*HdhTPX2* 载体的转化 将测序正确且含 pPIC9K-*HdhTPX2* 的菌株进行培养并提取质粒, 通过 *Sac* I 限制性内切酶对其线性化。用核酸共沉剂对酶切产物进行纯化, 并通过电击法将线性化的质粒转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中。将转化液涂布 MD 平板, 放入培养箱 (28  $^{\circ}$ C) 中培养 2~3 d。随机挑取 MD 平板上的单克隆菌落接种于 YPD 平板培养。

1.2.3 *HdhTPX2* 重组蛋白的表达和纯化 从 YPD 平板上挑取单菌落于 10 mL BMGY 培养基中, 并放入培养箱 (28  $^{\circ}$ C) 中, 以 230 r/min 摇菌至 OD<sub>600 nm</sub> 值为 2~6 时, 再转入 BMMY 培养基诱导表达。比较不同浓度甲醇 (0.5%、1.0%、2.0%、3.0%)、不同起始 pH (4、5、6、7、8) 和不同时间点 (0、6、12、24、48、72、96 h) 重组蛋白的表达量。利用 SDS-PAGE 对 *HdhTPX2* 重组蛋白的表达量进行分析。其余表达菌液的上清, 经透析缓冲液透析 3 次, 离心收集上清液并用 0.45  $\mu$ m 膜过滤后待上柱纯化。

利用重组表达载体上的 6 $\times$ His 标签对 *HdhTPX2* 重组蛋白进行亲和层析纯化。用 MilliQ 清洗镍柱, 用含 10 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液 (pH 8.5) 平衡镍柱, 将过滤后的发酵上清液以 2 mL/min 的流速上样, 用含 10 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液 (pH 8.5) 清洗未结合的杂蛋白, 用含 1 mol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液 (pH 8.5) 洗脱目的蛋白。收集洗脱峰, 进一步对其进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 重组表达蛋白抗氧化活性测定 使用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定 *HdhTPX2* 蛋白清除羟自由基 ( $\cdot$ OH) 的活性, 具体方法见试剂盒说明书 (货号 A018)。维生素 C (VC) 是已知的羟自由基清除剂, 试验同时测定 VC 对羟自由基的清除能力, 并作为阳性对照。

采用 MTS/PMS 法测定重组蛋白 *HdhTPX2* 对 L929 及 L02 细胞活性的影响, 具体方法参考文献 [22]。首先在 37  $^{\circ}$ C 下浓度为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养人肝细胞 L02 与鼠成纤维细胞 L929。然后选择不同浓度 (0、6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ g/mL) 的重组蛋白 *HdhTPX2* 对 L929 和 L02 细胞

处理 24 h, 加入 MTS/PMS 细胞增殖工作液避光孵育 0.75~2 h, 用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光值。

细胞氧化损伤试验采用 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 L02 与 L929 细胞, 加入不同浓度 (0、6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{g/mL}$ ) 重组蛋白 *HdhTPX2*, 用无  $\text{H}_2\text{O}_2$  和未添加蛋白的细胞作空白对照 (记为 CON), 置于 37  $^\circ\text{C}$  下浓度为 5% 的  $\text{CO}_2$  细胞培养箱培养 3 h 后, 加入 MTS/PMS 细胞增殖工作液, 避光孵育 0.75~2 h, 用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光值。

1.2.5 血细胞溶血试验 马血细胞溶血试验方法参考文献 [23], 首先配制 4% 马血细胞混悬液, 取不同浓度的重组蛋白 *HdhTPX2* 各 2 mL 至灭菌管中, 分别加入 1 mL 4% 的马血细胞, 轻柔混匀, 于 37  $^\circ\text{C}$  下浓度为 5% 的  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 2 h。再从各管中取出 1 mL 溶液放入新的离心管中, 并置于离心机上以 900  $g$  离心 5 min, 吸取 200  $\mu\text{L}$  上清液至 96 孔酶标板中测定  $\text{OD}_{500\text{nm}}$ 。试验中以等体积 MilliQ 水作为阴性对照, 1% TritonX-100 作为阳性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 pPIC9K-*HdhTPX2* 真核表达载体的构建与鉴定

试验用表达载体 pPIC9K N 端含有 AOX1 启动子, 利用酵母信号肽  $\alpha$ -factor 因子引导 *HdhTPX2* 分泌表达, 其 C 端加入 6 $\times$ His 标签, 可以通过亲和层析纯化目的蛋白, 真核表达载体的构建过程如图 1 所示。

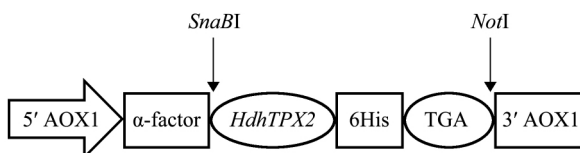
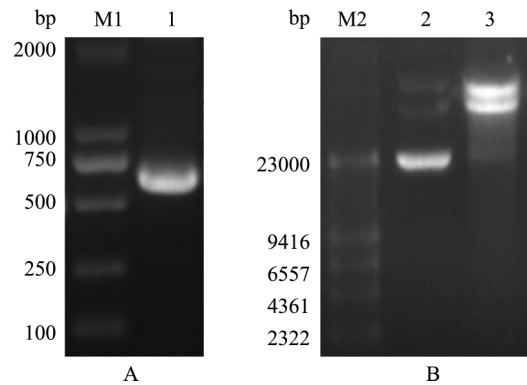


图 1 pPIC9K-*HdhTPX2* 重组质粒载体的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the expression vector of pPIC9K-*HdhTPX2*

经 PCR 扩增获得 *HdhTPX2* ORF 框的编码序列, 大小为 594 bp, 编码 198 个氨基酸 (图 2-A)。分别使用 *SnaB* I 和 *Not* I 对目的基因及 pPIC9K 载体进行酶切 (图 2-B), 将酶切后的载体与目的基因连接, 并转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 随机挑取部分阳性克隆培养并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。结果表明, pPIC9K-



注: M1 为 DL2000 DNA Marker; M2 为  $\lambda$ Hind III DNA Marker; 1 为 *HdhTPX2* 的 PCR 产物; 2 为酶切前 pPIC9K 载体; 3 为 pPIC9K 载体经 *SnaB* I 和 *Not* I 酶切后产物

Note: M1, DL2000 DNA Marker; M2,  $\lambda$ Hind III DNA Marker; 1, PCR amplification of *HdhTPX2* gene; 2, plasmid pPIC9K; 3, plasmid pPIC9K digested with *SnaB* I and *Not* I

图 2 *HdhTPX2* 基因 PCR 产物及 pPIC9K 质粒酶切后的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of expression pattern and digestion of plasmid pPIC9K vector of *HdhTPX2* fragment

*HdhTPX2* 载体序列正确。

### 2.2 *HdhTPX2* 蛋白诱导表达条件的优化

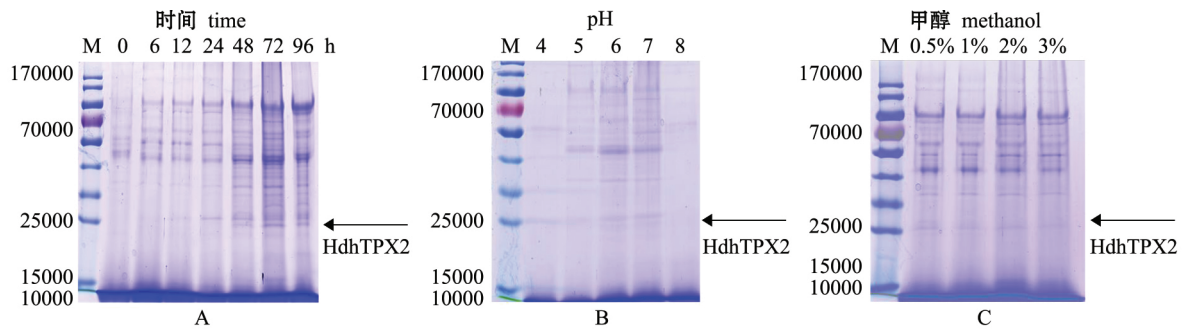
试验中比较了不同浓度甲醇 (0.5%、1.0%、2.0%、3.0%)、培养基不同起始 pH (4、5、6、7、8) 和诱导后不同时间点 (0、6、12、24、48、72、96 h) 条件下, 重组蛋白 *HdhTPX2* 的表达量。结果表明, pH 为 7 的培养基中加入 0.5% 甲醇诱导后, 在相对分子量约 25 000 的位置出现条带, 且在 72 h 时表达量最高 (图 3)。

### 2.3 重组蛋白 *HdhTPX2* 的纯化及鉴定

重组蛋白 *HdhTPX2* C 端带有 6 $\times$ His 标签, 可以与镍柱结合通过亲和层析将其纯化。将纯化得到的目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 并将其切胶酶解, 通过液相分离-基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪 (LC-MALDI-TOF-TOF) 鉴定, 确认该蛋白为 *HdhTPX2* (图 4)。

### 2.4 *HdhTPX2* 蛋白的抗氧化活性评价

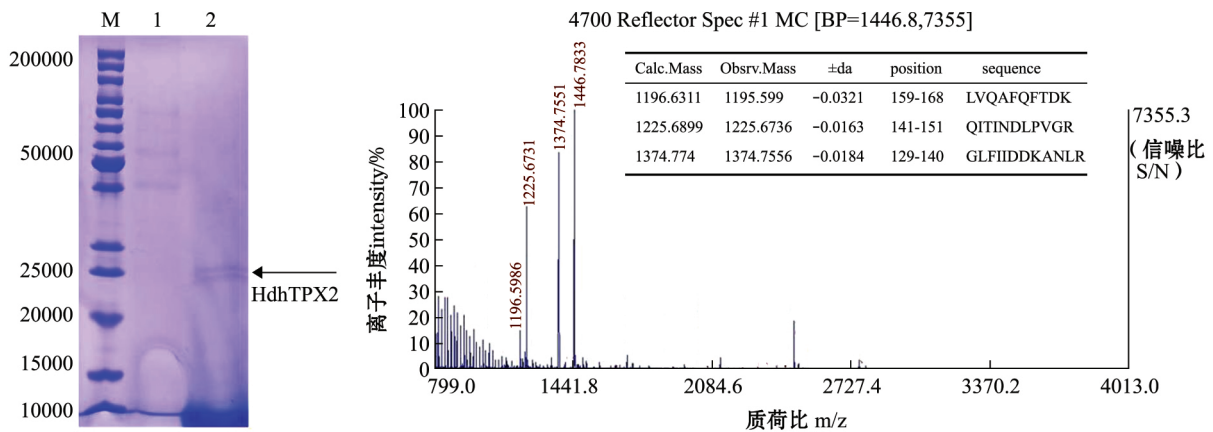
2.4.1 *HdhTPX2* 蛋白体外清除羟自由基的能力 如图 5 所示, 重组蛋白 *HdhTPX2* 清除羟自由基的能力随蛋白浓度的增加而增强, 其  $\text{IC}_{50}$  为 0.028 mg/mL。试验设置 VC 为阳性对照, 测得 VC 的  $\text{IC}_{50}$  为 0.25 mg/mL。这表明, 重组蛋白 *HdhTPX2* 具有较强的清除羟自由基能力。



注: M 为蛋白质 Marker (26616, Thermo Scientific); A 为不同诱导时间对重组蛋白 HdhTPX2 表达的影响; B 为不同起始 pH 对重组蛋白 HdhTPX2 表达的影响; C 为不同甲醇浓度对重组蛋白 HdhTPX2 表达的影响  
 Note: M, protein Marker (26616, Thermo Scientific); A, the effect of different induction time on the recombinant HdhTPX2 expression; B, the effect of initial pH on the expression of the recombinant HdhTPX2; C, the effect of methanol concentration on the expression of the recombinant HdhTPX2

图 3 重组蛋白 HdhTPX2 在毕赤酵母中表达条件的优化

Fig. 3 Optimization of conditions of recombinant HdhTPX2 expression in yeast *Pichia pastoris*



注: M 为蛋白质 Marker (26614, Thermo Scientific); 1 为 HdhTPX2 蛋白纯化前; 2 为 HdhTPX2 蛋白纯化后  
 Note: M, protein Marker (26614, Thermo Scientific); 1, TPX2 protein before purification; 2, TPX2 protein after purification

图 4 HdhTPX2 蛋白的纯化电泳及质谱鉴定图

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis and the MALDI-TOF MS spectrum of purified HdhTPX2 protein

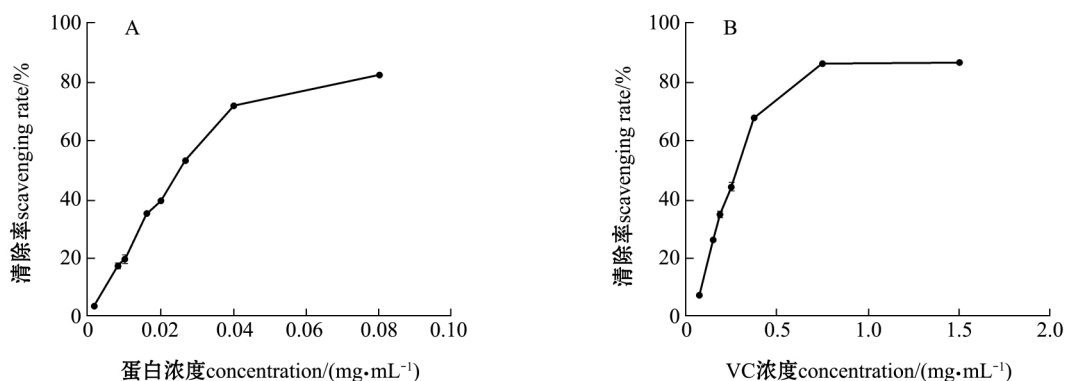


图 5 重组表达产物 HdhTPX2 及 VC 对羟自由基的清除能力

Fig. 5 Effect of recombinant expression product of HdhTPX2 and VC on scavenging hydroxyl free radicals

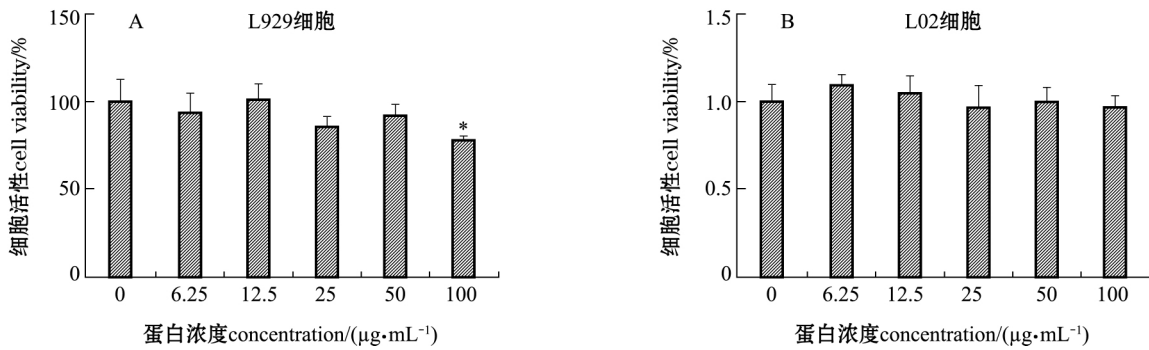
2.4.2 HdhTPX2 蛋白对 L929 和 L02 细胞活性的影响 将不同浓度的纯化后的 HdhTPX2 蛋白与 L929 和 L02 细胞培养 24 h 后, 浓度低于或等于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 HdhTPX2 蛋白对 L929 细胞活性均无显

著性影响 ( $P>0.05$ ), 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 HdhTPX2 蛋白组 L929 细胞活性较浓度为 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组显著下降 ( $P<0.05$ ); 浓度低于或等于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 HdhTPX2 蛋白对 L02 细胞活性均无显著性影响

( $P > 0.05$ ) (图 6)。

2.4.3 *HdhTPX2* 蛋白对  $H_2O_2$  引起的细胞损伤的保护作用 将不同浓度的 *HdhTPX2* 蛋白与  $H_2O_2$  共同孵育 L929 和 L02 细胞 3 h, 以未添加蛋白和  $H_2O_2$  的组作为空白对照 (CON)。从图 7 可见: 随着 *HdhTPX2* 蛋白浓度的增大, L929 细胞活性不断升高, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 *HdhTPX2* 蛋白组 L929

细胞活性显著高于蛋白浓度为 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的组 ( $P < 0.05$ ); *HdhTPX2* 蛋白同样对 L02 细胞也具抗氧化作用, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 *HdhTPX2* 蛋白与  $H_2O_2$  共同孵育 L02 细胞能够显著提高细胞活性 ( $P < 0.05$ ), 该试验证实, *HdhTPX2* 蛋白可以保护  $H_2O_2$  引起的 L929 及 L02 细胞过氧化损伤。



注: \* 表示与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白浓度组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同

Note: \* means significant difference compared with 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protein concentration group ( $P < 0.05$ ), et sequentia

图 6 重组表达产物 *HdhTPX2* 对 L929 及 L02 细胞活性的影响

Fig. 6 Effects of recombinant expression product *HdhTPX2* on L929 and L02 cell activity

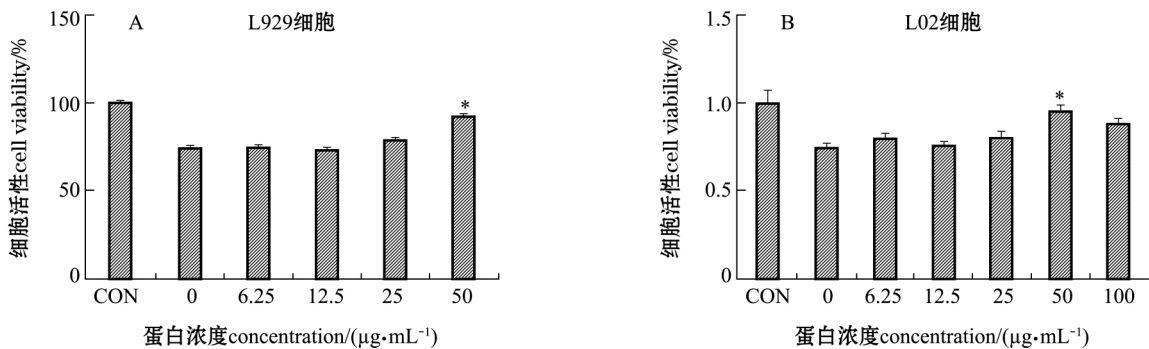


图 7 重组表达产物 *HdhTPX2* 对  $H_2O_2$  诱导 L929 与 L02 细胞损伤的保护作用

Fig. 7 Protection of L929 and L02 cells against  $H_2O_2$  injury by recombinant expression product *HdhTPX2*

2.4.4 *HdhTPX2* 对马血细胞溶血性作用评价 对重组表达产物的溶血试验结果表明, *HdhTPX2* 对马血细胞溶血的影响非常小, 在 *HdhTPX2* 蛋白最大浓度 720  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 溶血率均低于 5% (表 1)。

表 1 重组表达产物 *HdhTPX2* 对马血细胞溶血作用的评价  
Tab. 1 Effect of recombinant expression product *HdhTPX2* on hemolysis of horse blood cells

蛋白浓度 / ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) protein concentration	溶血率 / % hemolytic rate
5.625	0.260±0.740
11.250	0.733±1.310
22.500	-0.158±0.259
45.000	0.455±0.225
90.000	1.550±1.799
180.000	0.668±0.652
360.000	2.237±1.132
720.000	4.186±0.722

### 3 讨论

#### 3.1 *HdhTPX2* 重组蛋白表达

对于 TPX 蛋白功能的研究, 多数学者采用原核表达的方式获取该蛋白。如廖剑<sup>[23]</sup> 构建了青岛文昌鱼硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 的原核表达载体, 重组的青岛文昌鱼 TPX 以同源二聚体和单体混合的形式存在。李永光<sup>[24]</sup> 构建了猪带绦虫 TPX 的重组表达质粒 p GEX-4T-Tm TPX, 转化至大肠杆菌 BL-21 中, 经 IPTG 诱导获得约 43 000 的

融合蛋白, 用其纯化产物免疫家兔, 具有较好的免疫原性。毕赤酵母是一个优良的异源表达宿主, 能

对翻译后的蛋白进行更好的修饰,因此,获得的表达产物具有更高的活性,常被用于生物制药及工业酶的生产中<sup>[25-28]</sup>。本研究中,采用毕赤酵母 GS115 真核表达系统对皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 进行体外重组表达,经甲醇诱导,分别对诱导表达的时间、甲醇浓度、培养基 pH 等条件进行优化,最终获得了具有抗氧化活性的 *HdhTPX2* 真核表达菌株。*HdhTPX2* 蛋白由 198 个氨基酸组成,在 52 位和 173 位各有一个高度保守的半胱氨酸残基,是抗氧化活性关键部位。皱纹盘鲍 *HdhTPX2* 蛋白属于典型 2-Cys TPX,本研究中通过毕赤酵母表达系统获得相对分子质量约为 25 000 的蛋白,并通过肽指纹图谱鉴定为目标蛋白。

### 3.2 *HdhTPX2* 蛋白的活性评价

TPX 家族蛋白不含金属辅基,通过分解过氧化物或超氧化物去除代谢中的羟自由基,从而减少氧化应激对机体的损伤<sup>[29]</sup>。本研究中通过测定对羟自由基的清除能力来评估皱纹盘鲍 TPX2 真核表达产物抗氧化活性高低。通过与 VC 比较 50% 清除率的浓度发现,纯化后得到的 *HdhTPX2* 蛋白具有清除羟自由基的能力,并且对  $H_2O_2$  引起的 L929 和 L02 细胞损伤具有一定的保护作用。Kim 等<sup>[6]</sup>发现,酵母 TPX 具有清除过氧化氢和羟自由基的作用,在金属催化氧化系统中会产生羟自由基,从而引起 DNA 损伤。Pushpamali 等<sup>[19]</sup>将 AbTPX2 构建至 pMAL 表达载体中,通过 *E. coli* BL21 原核表达系统对该蛋白进行融合表达,经纯化得到相对分子质量为 64 500 的 AbTPX2 融合蛋白。该蛋白可以催化  $H_2O_2$  与叔丁基过氧化氢的还原反应,AbTPX2 可以保护超螺旋质粒不被切割。此外,一些研究还发现,硫氧还蛋白过氧化物酶除了可以抗氧化,还具有耐热、耐盐、抗旱和耐重金属等抗胁迫能力<sup>[30]</sup>。

本研究中重组表达产物在细胞水平的安全性应用进行了评价,分别测定其对鼠成纤维细胞 L929 与人肝细胞 L02 细胞活性影响,并进行了马血细胞溶血检测,发现 *HdhTPX2* 蛋白浓度低于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对两种细胞活性均无显著影响,也不会引起细胞溶血。本研究结果为进一步开发该重组产物作为天然抗氧化剂应用于医药食品及化妆品等领域提供了数据资料。

### 参考文献:

[1] Gao Xiaolong, Li Yong, Li Xian, et al. The response and osmotic pressure regulation mechanism of *Haliotis discus hannai* (Mollus-

ca, Gastropoda) to sudden salinity changes [J]. *Hydrobiologia*, 2017, 795(1): 181-198.

- [2] Kawagishi H, Finkel T. Unraveling the truth about antioxidants: ROS and disease: finding the right balance [J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(7): 711-713.
- [3] Zhang Hongkuan, Cheng Dewei, Liu Hongxing, et al. Differential responses of a thioredoxin-like protein gene to *Vibrio parahaemolyticus* challenge in the noble scallop *Chlamys nobilis* with different total carotenoids content [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 377-382.
- [4] Xia Xichao, Yu Ruixue, Li Mengbo, et al. Molecular cloning and characterization of two genes encoding peroxiredoxins from freshwater bivalve *Anodonta woodiana*: antioxidative effect and immune defense [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 476-491.
- [5] Wood Z A, Schröder E, Harris J R, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(1): 32-40.
- [6] Kim K, Kim I H, Lee K Y, et al. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/ $O_2$  mixed-function oxidation system [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(10): 4704-4711.
- [7] Wang Xiaobo, Hu Baoqing, Wen Chungen, et al. Molecular cloning, expression and antioxidative activity of 2-cys-peroxiredoxin from freshwater mussel *Cristaria plicata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 254-263.
- [8] Chen Jinwen, Dodia C, Feinstein S I, et al. 1-Cys peroxiredoxin a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase  $A_2$  activities [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(37): 28421-28427.
- [9] Rhee S G, Chae H Z, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 38(12): 1543-1552.
- [10] Low F M, Hampton M B, Winterbourn C C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10(9): 1621-1630.
- [11] Fisher A B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase  $A_2$  activities [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(3): 831-844.
- [12] Huh J Y, Kim Y, Jeong J, et al. Peroxiredoxin 3 is a key molecule regulating adipocyte oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and adipokine expression [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 16(3): 229-243.
- [13] Bae S H, Sung S H, Lee H E, et al. Peroxiredoxin III and sulfiredoxin together protect mice from pyrazole-induced oxidative liver injury [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(10): 1351-1361.
- [14] Perkins A, Poole L B, Karplus P A. Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(49): 7693-7705.
- [15] Winterbourn C C, Hampton M B. Redox biology: signaling via a peroxiredoxin sensor [J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(1): 5-6.

- [16] Park H, Ahn I Y, Kim H, et al. Analysis of ESTs and expression of two peroxiredoxins in the thermally stressed Antarctic bivalve *Laternula elliptica* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 550–559.
- [17] Cong Ming, Ni Duoqiao, Song Linsheng, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of peroxiredoxin in Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(6): 1451–1459.
- [18] Li Juan, Li Li, Zhang Shoudu, et al. Cloning, genomic structure, and expression analysis of peroxiredoxin V from bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 309–316.
- [19] Pushpamali W A, De Zoysa M, Kang H S, 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 Immunology*, 2008, 24(3): 294–307.
- [20] Green T J, Dixon T J, Devic E, et al. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(5): 799–810.
- [21] Nikapitiya C, De Zoysa M, Whang I, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 6 from disk abalone *Haliotis discus discus* and the antioxidant activity of its recombinant protein [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 239–249.
- [22] 方春华. 皱纹盘鲍抗氧化蛋白的制备与活性评价 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [23] 廖剑. 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 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29(7): 781–786.
- [24] 李永光. 多头带缘虫硫氧还蛋白过氧化物酶基因的克隆、表达及抗原性研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [25] Pan Nan. Studies on novel bioactive peptides and their precursors from the skin secretions of Australian Pelodyadinae frogs [D]. Belfast: Queen's University Belfast, 2011.
- [26] 彭会, 刘杰, 陈慧芸. 拟穴青蟹抗菌肽 SCY2 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性 [J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(2): 151–157.
- [27] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *Yeast*, 2005, 22(4): 249–270.
- [28] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5301–5317.
- [29] Netto L E S, Chae H Z, Kang S W, et al. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties TSA possesses thiol peroxidase activity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(26): 15315–15321.
- [30] 贺琳, 蒋丽丽, 王玉成. 柽柳硫氧还蛋白过氧化物酶 (*ThPrx1*) 基因转入酵母的抗逆能力分析 [J]. *东北林业大学学报*, 2011, 39(4): 101–104.

## Expression and antioxidant activity of *HdhTPX2* gene from disk abalone *Haliotis discus hannai* Ino in yeast *Pichia pastoris*

QIAO Kun<sup>1</sup>, FANG Chun-hua<sup>1,2</sup>, CHEN Bei<sup>1</sup>, PENG Hui<sup>3</sup>, PAN Nan<sup>1</sup>,  
CAI Shui-lin<sup>1</sup>, XU Min<sup>1</sup>, CHEN Li-jiao<sup>2</sup>, HAO Hua<sup>3</sup>, LIU Zhi-yu<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China; 2. School of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** *HdhTPX2* gene was cloned into pPIC9K vector and transformed into yeast *Pichia pastoris* GS115 strain by electroporation to obtain recombinant expression plasmid pPIC9K-*HdhTPX2* in order to study the antioxidant activity of *HdhTPX2* from disk abalone *Haliotis discus hannai* Ino. The recombinant product was induced by methanol, purified using immobilized metal affinity chromatography and confirmed using MS-fingerprinting to gain more information on its antioxidant function. The recombinant plasmid GS115/pPIC9K-*HdhTPX2* was shown to be constructed successfully, and the optimal expression was found under conditions of incubation with 0.5% methanol for 24 h at 28 °C and pH 6.0, with a stable expressed product with molecular weight of about 25 000, consistent with the calculated molecular weight of *HdhTPX2*. The mass spectrum analysis revealed that the recombinant *HdhTPX2* as purified recombinant protein showed stronger ability to scavenge hydroxyl radicals than VC and protect cells against the toxicity caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro antioxidant activity. The findings indicate that yeast *P. pastoris* is an effective expression system for producing large quantities of biological active *HdhTPX2*.

**Key words:** *Haliotis discus hannai* Ino; thioredoxin peroxidase; *Pichia pastoris*; antioxidant