

• 生物技术与方法 •

全长 SOD2 重组蛋白的可溶表达、纯化、稳定性与跨膜效应

潘剑茹¹, 陈莉娟¹, 何火聪², 苏颖², 王香玲¹, 李娴¹, 陈翠煌¹, 吴伦巧¹, 刘树滔¹

1 福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108

2 福建省科技厅转化医学重点实验室 福建医科大学附属肿瘤医院 福建省肿瘤医院放射生物学及肿瘤放射治疗学研究室, 福建 福州 350014

潘剑茹, 陈莉娟, 何火聪, 等. 全长 SOD2 重组蛋白的可溶表达、纯化、稳定性与跨膜效应. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1168–1177.

Pan JR, Chen LJ, He HC, et al. Expression, purification, stability and transduction efficiency of full-length SOD2 recombinant proteins. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1168–1177.

摘要: 超氧化物歧化酶 (SOD) 家族是保护细胞免受正常代谢过程中产生的活性氧 (ROS) 毒性所必需的, 含 Mn^{2+} 离子的超氧化物歧化酶 (Mn-SOD, SOD2) 是其中最重要的一种。本研究合成了人源 SOD2 全基因序列, 并将其插入带有 GST 的原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 成功构建了 GST-SOD2 融合蛋白表达质粒。然后, 将重组质粒 pGEX-4T-1-SOD2 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用 IPTG 在 25 °C 下诱导表达融合蛋白, 得到可溶性 GST-SOD2 融合蛋白, 经 GST 亲和树脂纯化得到比活为 1 788 U/mg 的纯蛋白, 分子量约为 46 kDa。利用凝血酶酶切去 GST 标签后经肝素亲和柱纯化得到了电泳纯的 SOD2 重组蛋白, 该蛋白分子量约为 25 kDa, 与 SOD2 全长序列的理论分子量相符, 比活为 2 000 U/mg。两种重组 SOD2 蛋白在生理条件下都具有良好的 SOD 活性, 且都具有显著的跨膜能力 ($P < 0.05$)。这些工作为深入研究两种全长重组 SOD2 蛋白的结构与生物效应建立了基础。

关键词: Mn 超氧化物歧化酶, 构建, 融合蛋白, 表达纯化, 稳定性, 跨膜效应

Received: January 7, 2017; **Accepted:** March 10, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81472907).

Corresponding author: Jianru Pan. Tel: +86-591-83732462; E-mail: panjr@fzu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81472907) 资助。

Expression, purification, stability and transduction efficiency of full-length SOD2 recombinant proteins

Jianru Pan¹, Lijuan Chen¹, Huocong He², Ying Su², Xiangling Wang¹, Xian Li¹, Cuihuang Chen¹, Lunqiao Wu¹, and Shutao Liu¹

¹ College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

² Laboratory of Radiation Oncology and Radiobiology, Fujian Cancer Hospital & Fujian Medical University Cancer Hospital, Fujian Key Laboratory of Tumor Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China

Abstract: Superoxide dismutase (SOD) family is necessary to protect cells from the toxicity of reactive oxygen species produced during normal metabolism. Among SODs, manganese-containing superoxide dismutase (Mn-SOD, SOD2) is the most important one. The DNA fragment containing the full nucleotide of full-length human SOD2 was synthesized and inserted into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1 with tag GST. DNA construct was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and expression was induced with IPTG at 25 °C. The recombinant fusion protein GST-SOD2 (46 kDa) was purified from the bacterial lysate by GST resin column affinity chromatography. GST tag was cleaved with thrombin, and a crude SOD2 recombinant protein (25 kDa) was obtained and further purified by heparin affinity chromatography. Activities of the two SOD2 proteins were 1 788 and 2 000 U/mg, respectively. Both SOD2 proteins were stable under physiological condition and cell-penetrating ($P < 0.05$). Our findings open the possibility to study the structure and effects of two full-length recombinant SOD2 proteins.

Keywords: Mn-SOD, construction, fusion protein, expression and purification, stability, transduction efficiency

超氧化物歧化酶 (SOD) 家族是保护利用细胞免受正常代谢过程中产生的活性氧 (ROS) 毒性所必需的。除了保护性蛋白质, 这些酶也是调节细胞生理学信号通路的关键组件。SOD 催化反应, 然后用过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶除去过氧化氢。在哺乳动物细胞中存在 3 种已知形式的 SOD: 主要在细胞质和细胞核中发现的含铜和锌的超氧化物歧化酶 (Cu, Zn-SOD, SOD1), 在线粒体中发现的含锰超氧化物歧化酶 (Mn-SOD, SOD2) 和细胞外超氧化物歧化酶 (EC-SOD, SOD3)^[1]。定位在线粒体的 SOD2 被认为是 3 种 SOD 中最重要的一个, 因为线粒体是主要的 ROS 生产位点^[2]。Mn-SOD 不仅对所有需氧生物的存活都是必需的^[3], 还被证明是一种强大的保护和治疗剂, 可

用于抗氧化应激相关的疾病, 如肾损伤^[4]、关节炎^[5]、慢性炎症肺纤维化^[5]以及电离辐射所引起的辐射损伤^[6-8]。

Mn-SOD 在细胞中以带有线粒体靶向信号肽的前体形式合成, 通过其 2 kDa 的前导序列进入线粒体基质, 该肽随后被切割, 产生在线粒体内起关键作用的成熟和具有酶活性的蛋白质^[9]。对人脂肪肉瘤细胞 LSA 中发现的 30 kDa 的人源 SOD2 异构体 (LSA-type-Mn-SOD) 的系列研究结果表明, SOD2 的前导肽还具有介导蛋白进入细胞的能力^[10-14]。利用原核系统重组表达 SOD2 时, 为了得到可溶并具有酶活的蛋白, 通常会把 SOD2 的前导肽序列去掉, 直接表达单体成熟的蛋白, 如王峰等曾利用 pET15b 质粒在大肠杆菌 Rosetta-gami 菌株中表达得到 N 端 His 标

签的可溶 SOD2 重组蛋白, 比活为 1 890 U/mg^[15]。

然而, 这种方法虽然可得到成熟和具有酶活性的 SOD2, 但失去前导肽的 SOD2 却由于分子量的限制难以进入细胞发挥作用。因此, 上述 SOD2 的应用多是以转基因的形式进行, 这限制了 SOD2 重组蛋白的临床应用。

本研究合成了人源 SOD2 全长基因, 首次将其克隆至带有 GST 标签的 pGEX-4T-1 质粒, 构建重组质粒 pGEX-4T-1-SOD2, 转化后表达得到 GST-SOD2 融合蛋白, 并对表达得到的 GST-SOD2 融合蛋白以及酶切得到的全长 SOD2 重组蛋白进行纯化、鉴定及稳定性等研究。

1 材料与方法

1.1 材料

pGEX-4T-1 质粒、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 均为本实验室保存; *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 各种限制性内切酶购自 NEB 公司; GST 亲和柱购自生工生物工程上海 (股份) 有限公司; IPTG、考马斯亮蓝 R-250 购自 AMRESCO 公司; 蛋白 marker 购于 Fermentas 公司; DNA marker 购自北京天根生化科技有限公司; 基因合成与 DNA 测序由生工生物工程上海 (股份) 有限公司进行。SOD 和 GST 活力检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。牛凝血酶购自北京博尔西科技有限公司。BCA 蛋白含量检测试剂盒购自 Thermo Scientific (美国)。L-02 人正常肝细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 质粒的构建

全基因合成人源全长 SOD2 的基因序列,

在其上、下游分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 将其与 pGEX-4T-1 质粒均用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切并经胶回收纯化, 然后用 T4 DNA 连接酶将纯化的 SOD2 基因片段和 pGEX-4T-1 质粒片段于 4 °C 连接过夜, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单菌落培养后抽提质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 并将 *EcoR* I 和 *Xho* I 鉴定正确的阳性克隆进行 DNA 测序鉴定。

1.3 GST-SOD2 融合蛋白的诱导表达

将 DNA 测序正确的阳性克隆菌于 37 °C 培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$ 时, 分别加入 IPTG 和 $MnSO_4$, 诱导 GST-SOD2 融合蛋白表达, 同时探索了诱导条件对表达量的影响。取诱导后的菌液, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清收集菌体沉淀, 一部分菌体直接加入 SDS-PAGE 电泳样品处理液, 用于检测全菌蛋白; 另一部分加入 9 倍体积的缓冲液 1 (10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , 2.7 mmol/L KCl, pH 7.3), 冰浴超声破碎 30 min, 然后 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清电泳。

用 12.5% SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色, 比较不同条件下的菌体全蛋白与超声破碎上清中的蛋白比例, 分析融合蛋白在不同条件下的表达情况, 筛选较好的可溶表达条件。

1.4 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的纯化

在最佳诱导条件下诱导 GST-SOD2 融合蛋白的表达, 收集诱导后菌体超声破碎的上清液, 按照 GST 亲和树脂说明书进行层析, 分别收集亲和柱穿透峰和洗脱峰, 进行 12.5% 的 SDS-PAGE。

SOD2 重组蛋白纯化: 将 GST-SOD2 吸附到亲和树脂上, 用大量平衡缓冲液洗去杂质, 往

亲和树脂中加入牛凝血酶 (1 U/mg 融合蛋白), 22 °C 孵育 16 h, 放出洗脱峰 1。再用 1×PBS 冲洗柱子, 收集洗脱峰 2。将洗脱峰 1 和洗脱峰 2 合并, 加入肝素亲和树脂, 按照柱子说明书, 收集肝素亲和柱的穿透峰, 进行 12.5% 的 SDS-PAGE。

1.5 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 的鉴定

分别使用 SOD 和 GST 活力检测试剂盒测定蛋白的相应酶活力, 结合 SDS-PAGE 测定的蛋白分子量, 鉴定是否为目标蛋白。

1.6 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的稳定性

取 300 μL GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白, 分别置于 25 °C、37 °C、50 °C、60 °C、80 °C 的水浴中保温 30 min, 取出, 待回至室温, 取样分别测定残留酶活力, 分析融合蛋白的热稳定性。

取 300 μL GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白, 用广泛缓冲液分别调至 pH 4、5、6、7、8, 4 °C 下放置 30 min, 取出, 待回至室温, 取样分别测定残留酶活力, 分析融合蛋白的 pH 稳定性。

1.7 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的跨膜效应

参照文献[16], 分别用 FITC 标记 GST-SOD2 融合蛋白和 SOD2 重组蛋白。

取对数生长期的 L-02 细胞用含 15% 小牛血清的细胞培养液配成单个细胞悬液, 将其接种到 24 孔板, 每孔 40 000 个细胞, 培养 24 h。吸去培养液, 加 PBS 清洗 2 次, 往每孔中分别加入 400 μL 42 μg/mL 的 FITC-蛋白, 37 °C 作用 3 h。吸去蛋白液, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 250 μL 细胞裂解液 (0.5% Triton-X-100+0.1% SDS), 漩涡

振荡 2 min, 放置 4 °C 冰箱 15 min 后, 1 200 r/min 离心 5 min, 取 200 μL 上清液用荧光酶标仪检测, 并以 BCA 试剂盒测定上清液的蛋白含量。以每 μg 细胞蛋白所对应的荧光强度来比较两种融合蛋白的跨膜效率。

每组数据 3 个平行孔, 采用 Excel 软件进行统计处理, 作标准差计算、*t* 检验等。 $P > 0.05$ 为无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 pGEX-4T-1-SOD2 原核表达载体的构建

将合成的人源 SOD2 基因片段和 pGEX-4T-1 质粒均用 *EcoR* I 和 *Xho* I 内切酶进行双酶切, 胶回收纯化酶切后的 SOD2 基因片段和 pGEX-4T-1 质粒片段, 通过 T4 DNA 连接酶将 SOD2 基因定向插入到 pGEX-4T-1 质粒的多克隆位点中。挑单菌落培养后抽提质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切鉴定, 结果见图 1。重组子经酶切鉴定后得到

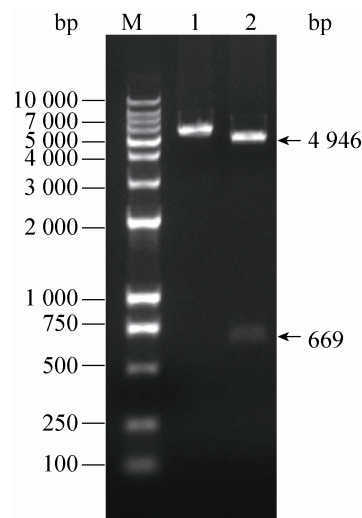


图 1 重组质粒 pGEX-4T-1-SOD2 的构建

Fig. 1 Construction of pGEX-4T-1-SOD2 recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: pGEX4T-1-SOD2 recombinant plasmid; 2: digestion identification of pGEX4T-1-SOD2 with *EcoR* I and *Xho* I.

两条目的带, 大约为 4 946 bp 和 669 bp, 分别与 pGEX-4T-1 质粒和 SOD2 预期分子量一致。将酶切鉴定正确的质粒进行 DNA 测序鉴定, 测序结果与预期的序列一致, 证明 SOD2 基因已经成功插入 pGEX-4T-1 载体, pGEX-4T-1-SOD2 重组质粒构建成功。

2.2 GST-SOD2 融合蛋白的诱导表达及可溶性分析

将重组质粒 pGEX-4T-1-SOD2 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 收集菌体进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2、图 3 和图 4 所示。

由图 2 可知, 与未诱导的菌体相比, 诱导温度为 20 °C 时, 当诱导时间超过 5 h 时, 菌体超声破碎液的上清中可溶融合蛋白的表达量变化不大。

由图 3 可知, 同样诱导 6 h, 不同的诱导温度对 GST-SOD2 融合蛋白的表达量与可溶表达

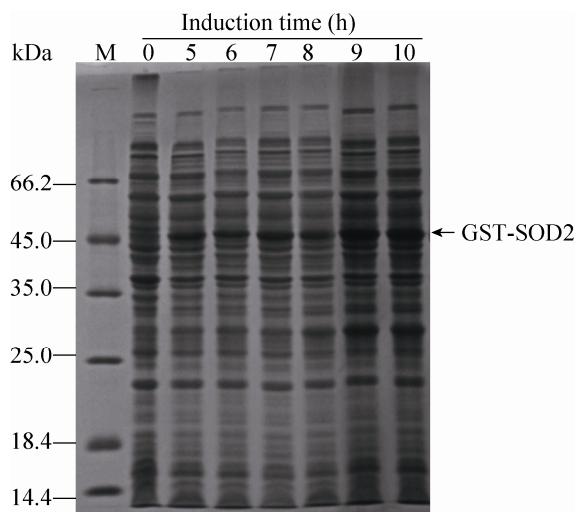


图 2 诱导时间对 GST-SOD2 融合蛋白可溶表达量的影响

Fig. 2 Effect of inducing time on the expression of GST-SOD2 fusion protein. M: protein weight marker.

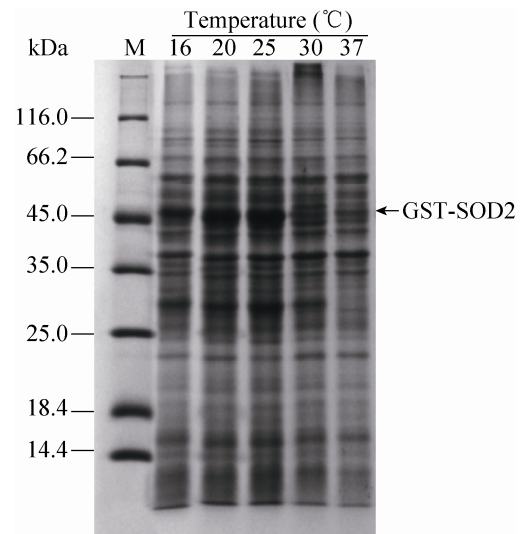


图 3 诱导温度对 GST-SOD2 融合蛋白可溶表达量的影响

Fig. 3 Effect of inducing temperature on the expression of GST-SOD2 fusion protein. M: protein weight marker.

有很大影响。诱导温度为 16 °C, 融合蛋白的表达量较低, 随着诱导温度的增加, 融合蛋白的表达量随之增加。但当诱导温度达到 37 °C 时, 菌体超声破碎液的上清中融合蛋白量开始降低, 这表明可能有部分融合蛋白形成了包涵体。由图 3 可知, 最佳诱导温度为 25 °C。

由图 4 可知, Mn^{2+} 浓度对 GST-SOD2 融合蛋白的可溶表达量影响不大 (图 4A), 但它会影响 GST-SOD2 融合蛋白的活性 (图 4B)。随着 Mn^{2+} 浓度的增加, GST-SOD2 融合蛋白的活性逐渐增加, 当 Mn^{2+} 浓度达到 1.5 mmol/L 时, 融合蛋白的活性达到最大值, 随着 Mn^{2+} 浓度的继续增加 (1.5–3.0 mmol/L), 融合蛋白的活性基本不变, 但当 Mn^{2+} 浓度继续加大时, 融合蛋白的活性反而随 Mn^{2+} 浓度的加大而减小。为此, 将最佳 Mn^{2+} 浓度定为 1.5 mmol/L。

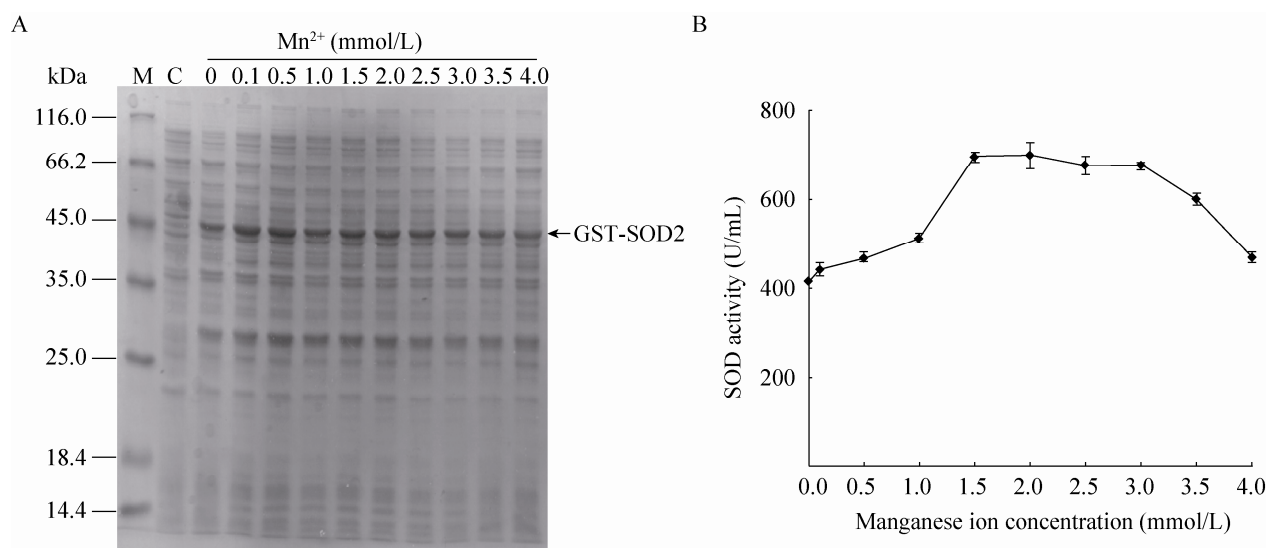


图 4 Mn^{2+} 浓度对 GST-SOD2 融合蛋白表达量和活性的影响

Fig. 4 Effect of the concentrations of Mn^{2+} on the expression (A) and SOD activity (B) of GST-SOD2 fusion protein. M: protein weight marker; C: pGEX-4T-1 vector control.

2.3 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的纯化与鉴定

GST-SOD2 表达菌超声破碎后, 收集上清, 使用 GST 亲和柱纯化后, 最终得到纯化的 GST-SOD2 融合蛋白, 将吸附在 GST 亲和柱上的 GST-SOD2 融合蛋白经牛凝血酶柱上酶切及肝素柱去凝血酶后, 得到纯化的 SOD2 重组蛋白, 结果如图 5 所示。

GST-SOD2 融合蛋白和 SOD2 重组蛋白的理论分子量分别为 51 kDa 和 25 kDa 左右, 图 5 中 GST-SOD2 融合蛋白和 SOD2 重组蛋白的实际分子量分别约为 46 kDa 和 25 kDa。由于 GST-SOD2 融合蛋白是由 SOD2 和 GST 两种抗氧化酶融合而得的独特蛋白, 同时具有 SOD 和 GST 活力, 因此我们进一步使用 SOD 和 GST 检测试剂盒分别测定了该蛋白的酶活力。结果表明, 纯化所得的 GST-SOD2 融合蛋白的 SOD 活力

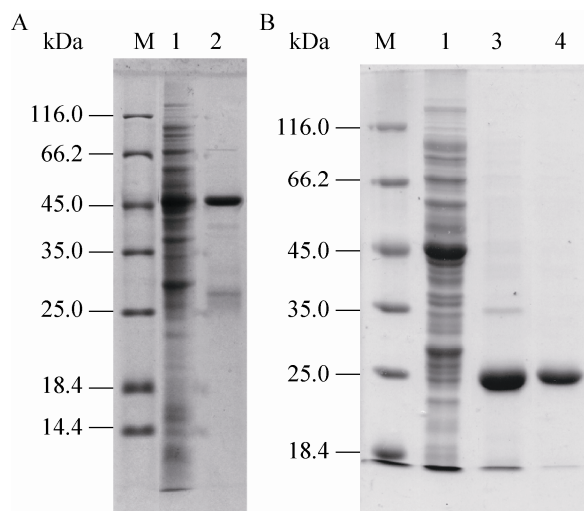


图 5 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的纯化

Fig. 5 Purification of GST-SOD2 fusion protein and SOD2 recombinant protein. M: protein marker; 1: lysate supernatant; 2: GST sepharose eluant (the purified GST-SOD2); 3: eluant following on-column thrombin cleavage; 4: Heparin column flow-through (the purified SOD2).

为 1 788 U/mg, GST 活力为 150 U/mg, 纯化所得的 SOD2 重组蛋白的 SOD 活力为 2 000 U/mg。综合分子量与活性分析的结果, 可确认 GST-SOD2 融合蛋白得到正确表达, 其酶切所得 SOD2 重组蛋白为预期的蛋白。

2.4 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的稳定性

由图 6-A 可以看出, 温度对两种蛋白的 SOD 活力影响都很大。随温度的升高, GST-SOD2 融合蛋白的 SOD 活力几乎是直线下降, 当热处理温度达到 60 °C 时, SOD 活力基本完全丧失。与 GST-SOD2 相比, SOD2 重组蛋白的热稳定性相对较高, 在热处理温度小于 40 °C 时, 其活性变化不大, 但当热处理温度超过 40 °C 时, 随温度的升高, SOD2 重组蛋白的酶活开始迅速下

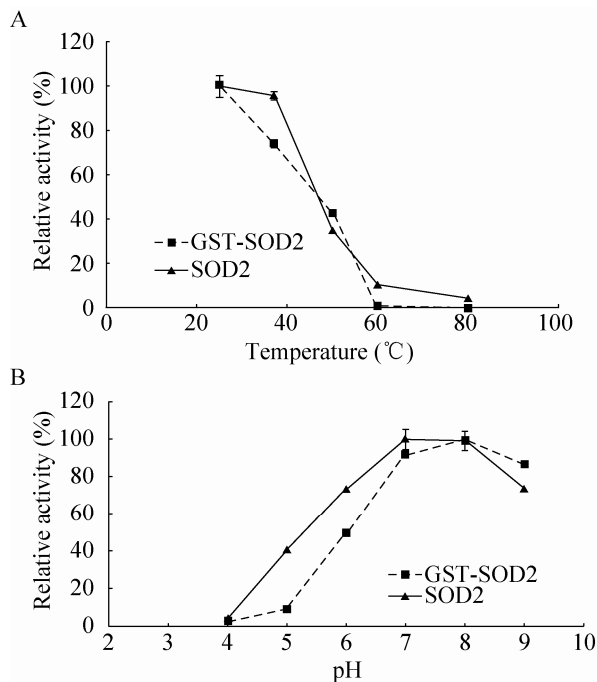


图 6 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的稳定性

Fig. 6 Thermal (A) and pH (B) stability of GST-SOD2 fusion protein and SOD2 recombinant protein.

降, 在 60 °C 水浴 30 min 后, 活力仅余约 9%, 在 80 °C 水浴 30 min 后, 活力接近于 0。

由图 6-B 可以看出, pH 对两种蛋白的酶活也有很大影响。GST-SOD2 融合蛋白的 SOD 活力在 pH ≤ 7 的范围内随 pH 的降低而降低, 在 pH 7-8 的范围内活力缓慢增加, 当 pH 超过 8 后, 活性随 pH 的升高而降低。pH 对 SOD2 重组蛋白酶活的影响趋势与 GST-SOD2 融合蛋白的相似, 但 SOD2 重组蛋白在 pH 7-8 的范围内活力基本不变, 且其整体的 pH 稳定性高于 GST-SOD2 融合蛋白。

2.5 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的跨膜效应

为检测两种蛋白是否能进入细胞, 将它们进行 FITC 标记后通过细胞内荧光强度的变化检测其对正常人肝细胞株 L-02 的跨膜效果, 结果如图 7 所示。由图 7 可知, 与正常对照相比,

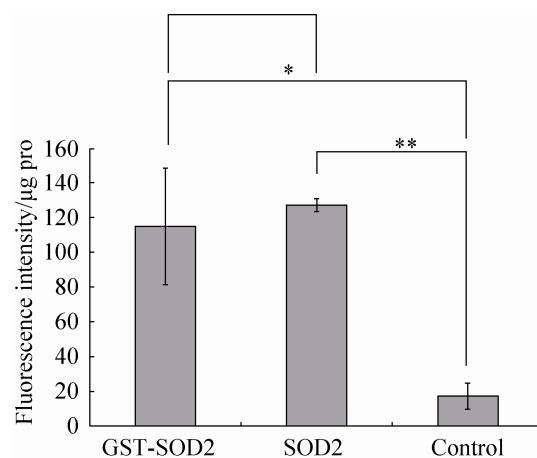


图 7 GST-SOD2 融合蛋白与 SOD2 重组蛋白的跨膜效应

Fig. 7 Transduction of GST-SOD2 fusion protein and SOD2 recombinant protein *in vitro*. Control: untreated cell. The bars indicate the $\bar{x} \pm s$. ($n=3$, compared with control group, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, compared with GST-SOD2 group, $P>0.05$).

两种融合蛋白都有显著的跨膜能力 ($P < 0.05$), 在 $42 \mu\text{g/mL}$ 的剂量下, SOD2 重组蛋白比 GST-SOD2 融合蛋白的跨膜效果略强一些, 约为后者的 1.1 倍, 但二者之间没有显著差异。

3 讨论

超氧阴离子是引起机体氧化损伤特别是放射副作用的主要原因之一, SOD 是唯一一种可以清除超氧阴离子的天然酶, 在抗氧化损伤方面具有重要应用价值。人源的 3 种 SOD 中, SOD2 最为重要, 因为其在 ROS 的发源地线粒体中发挥效用^[2], 该蛋白在细胞中以前体形式合成, 通过其信号肽进入线粒体基质后, 去除信号肽, 折叠成成熟蛋白质发挥功能^[9]。现有的体外重组人源 SOD2 基本都去除了前导肽片段以得到成熟有活性的酶, 但失去前导肽的 SOD2 是无法进入细胞发挥作用的, 故此, SOD2 功能研究虽多, 但多是以转基因的方式进行, 临床应用颇有不便。

本研究选用 pGEX-4T-1 质粒载体, 利用载体自带的 GST, 融合全长人源 SOD2, 构建得到 GST-SOD2 融合蛋白。实验结果表明, 在 N 端融合的 GST 的帮助下, GST-SOD2 融合蛋白实现了可溶表达, 其可溶表达量受诱导时间和诱导温度影响。经过诱导条件的优化, 最终确定在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 往培养基中添加 $1.5 \text{ mmol/L Mn}^{2+}$, 然后利用 IPTG 诱导得到可溶的 GST-SOD2 融合蛋白。经 GST 亲和树脂纯化得到的纯 GST-SOD2 融合蛋白比活为 $1\ 788 \text{ U/mg}$, 比王峰等所得到的重组成熟 SOD2 蛋白的活性^[15]略低一些。但其分子量几乎是 SOD2 蛋白的 2 倍, 因此, 在同样的摩尔浓度下, GST-SOD2 的酶活为重组成熟 SOD2 蛋白 2 倍左右。在此基础上, 我们进

一步通过超声破碎、GST 亲和柱吸附、凝血酶柱内酶切及肝素亲和柱去除凝血酶得到了电泳纯的 SOD2 重组蛋白, 该蛋白分子量与 SOD2 全长序列的理论分子量相符, 比活为 $2\ 000 \text{ U/mg}$, 比王峰等所得到的重组成熟 SOD2 蛋白的活性^[15]还略高一些。

在顺利得到两种具有酶活性的全长 SOD2 蛋白后, 本研究对两种蛋白的温度和 pH 稳定性进行了研究。结果表明, 温度和 pH 对两种蛋白都有比较大的影响, 但在生理条件 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0) 下, GST-SOD2 融合蛋白分别持有 73.7% 和 91.6% 的酶活性, 去除 GST 标签后, SOD2 重组蛋白的温度和 pH 稳定性均有所增强, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, 该蛋白具有 95.7% 酶活性, 在 pH 7-8 的范围内, 该蛋白基本保持 100% 酶活性。

GST 是一个高度可溶的蛋白, 可以利用它增加外源蛋白的可溶性及其在大肠杆菌中的表达量。作为常用的重组标签之一, GST 天然分子量为 26 kDa , 与 His 标签要大得多, 可能会对融合在一起的外源蛋白的结构和功能产生影响。本研究中两种蛋白稳定性的差异表明 GST 标签的融合对 SOD2 重组蛋白的结构产生了一定的影响, 这可能也是使 GST-SOD2 融合蛋白表观分子量和理论分子量有所差别以及两种具有全长序列的 SOD2 重组蛋白同时具有酶活性但比活又有差异的原因。

Mancini 等从人脂肪肉瘤细胞 LSA 中发现一种具有 SOD2 酶活性的蛋白 (LSA-type-Mn-SOD), 30 kDa 的 LSA-type-MnSOD 的序列与正常的人 SOD2 几乎完全相同, 但其 N 端带有完整的信号肽^[10-11]。已在大肠杆菌中生产得到该蛋白的重组蛋白, 并已证实这种形式的 SOD2 可通过 N 端信号肽的介导进入细胞, 其在清除内部和细

胞外自由基以及改善与增加的氧化应激相关的病理状况方面非常有效^[12-14]。本研究得到的 SOD2 重组蛋白, N 端带有完整的信号肽, 具有成熟 SOD2 的酶活性, 还有显著的跨膜能力, 与 LSA-type-MnSOD 十分相似, 可知其在防护氧化损伤方面具有很大的潜力。在 GST-SOD2 融合蛋白中, SOD2 的信号肽位于两种蛋白的中间, 具有成熟 SOD2 的酶活性, 也有显著的跨膜能力, 这表明该信号肽的介导跨膜能力可能像 TAT 穿膜肽一样, 不受其在蛋白中所处的位置影响, 这有待进一步的实验来证明。

GST 在增加重组蛋白的可溶性之余, 本身是一种在解毒过程中具有重要作用的转移酶, 具有抗氧化活性, 可催化亲核性的谷胱甘肽与自由基的结合反应, 起到解毒作用^[17-18]。

本所前期实验证实将 Cu、Zn-SOD (SOD1) 和 TAT 融合在一起后可以进入细胞, 预防细胞内的自由基过量导致的氧化损伤^[19]。由于造成细胞损伤的自由基通常不只 1 种, 我们进一步证实了将 GST、穿膜肽和 SOD1 融合在一起得到的 GST-TAT-SOD1 融合蛋白比 SOD1-TAT 融合蛋白具有更好的放射防护效果^[16], 可知复合抗氧化酶的应用潜力强于单功能抗氧化酶。

与 SOD2 重组蛋白相比, GST-SOD2 融合蛋白还具有 GST 活力, 属于可跨膜的复合抗氧化酶。二者的 SOD 比活相近, 但分子量相差近 1 倍, 在相同的摩尔浓度下后者的 SOD 活力比前者高出近 1 倍。因此, GST-SOD2 融合蛋白可能具有比 SOD2 重组蛋白更强的抗氧化损伤方面的潜力。未来将进一步对本研究中两种全长 SOD2 蛋白进行结构及生物效应的研究, 以揭示其结构与功能的关系。

REFERENCES

- [1] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem*, 1969, 244(22): 6049–6055.
- [2] Genova ML, Ventura B, Giuliano G, et al. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett*, 2001, 505(3): 364–368.
- [3] Gregory EM, Fridovich I. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J Bacteriol*, 1973, 114(3): 1193–1197.
- [4] Damiano S, Trepiccione F, Ciarcia R, et al. A new recombinant MnSOD prevents the cyclosporine A-induced renal impairment. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(8): 2066–2072.
- [5] Parizada B, Werber MM, Nimrod A. Protective effects of human recombinant mnsod in adjuvant arthritis and bleomycin-induced lung fibrosis. *Free Radic Res Commun*, 1991, 15(5): 297–301.
- [6] Epperly MW, Gretton JE, Sikora CA, et al. Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation-induced cellular damage. *Radiat Res*, 2003, 160(5): 568–578.
- [7] Robbins MEC, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol*, 2004, 80(4): 251–259.
- [8] Zhao W, Diz DI, Robbins ME. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *Br J Radiol*, 2007, 80 Spec No 1: S23–S31.
- [9] Del Maestro R, McDonald W. Subcellular localization of superoxide dismutases, glutathione peroxidase and catalase in developing rat cerebral cortex. *Mech Ageing Dev*, 1989, 48(1): 15–31.
- [10] Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, et al. Tumor suppressive activity of a variant isoform of manganese superoxide dismutase released by a human liposarcoma cell line. *Int J Cancer*, 2006, 119(4): 932–943.
- [11] Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, et al. Biophysical and biochemical characterization of a

- liposarcoma-derived recombinant MnSOD protein acting as an anticancer agent. *Int J Cancer*, 2008, 123(11): 2684–2695.
- [12] Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, et al. A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(1): 110–116.
- [13] Rahman NA, Mori K, Mizukami M, et al. Role of peroxynitrite and recombinant human manganese superoxide dismutase in reducing ischemia-reperfusion renal tissue injury. *Transplant Proc*, 2009, 41(9): 3603–3610.
- [14] Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, et al. The leader peptide of a human rec. MnSOD as molecular carrier which delivers high amounts of cisplatin into tumor cells inducing a fast apoptosis *in vitro*. *Int J Cancer*, 2011, 128(2): 453–459.
- [15] Wang F, Shao M, Yang WJ, et al. High-level soluble expression of recombinant human manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli*, and its effects on proliferation of the leukemia cell. *Protein Expr Purif*, 2011, 77(1): 46–52.
- [16] Pan JR, He HC, Su Y, et al. GST-TAT-SOD: cell permeable bifunctional antioxidant enzyme—a potential selective radioprotector. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5935080.
- [17] Douglas KT. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1987, 59: 103–167.
- [18] Leaver MJ, George SG. A piscine glutathione *S*-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Mar Environ Res*, 1998, 46(1/5): 71–74.
- [19] Pan JR, Su Y, Hou XJ, et al. Protective effect of recombinant protein SOD-TAT on radiation-induced lung injury in mice. *Life Sci*, 2012, 91(3/4): 89–93.

(本文责编 陈宏宇)