

重组胸腺素 $\alpha 1$ 的纯化及活性

石继红 张英起 赵宁 赵永同 颜真 韩苇

(第四军医大学生物技术中心 西安 710032)

摘要 将胸腺素 $\alpha 1$ 基因 4 串体克隆于 pThioHisA 融合表达载体(pThioHisA-T $\alpha 1$ ④)转化大肠杆菌 TOP10。在 IPTG 诱导下,融合蛋白得到了高效表达。SDS-PAGE 分析确定诱导表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 40%,且表达的融合蛋白主要以可溶形式存在。把用离子交换层析纯化出的目的蛋白进行 CNBr 化学裂解,经简单的离子交换层析可纯化出胸腺素 $\alpha 1$ 单体,HPLC 鉴定胸腺素 $\alpha 1$ 的纯度达 98%。利用³H-TdR 进行生物活性测定,证实融合蛋白和胸腺素 $\alpha 1$ 单体均具有在致有丝分裂原 ConA 存在的条件下,刺激小鼠脾淋巴细胞分裂增殖的能力,与化学合成的胸腺素 $\alpha 1$ 相比具有相似的生物活性。

关键词 胸腺素 $\alpha 1$ 融合表达 蛋白质纯化 生物活性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0731-04

胸腺素 $\alpha 1$ (Thymosin $\alpha 1$, T $\alpha 1$)是从胸腺素组分 5(TF5)中分离纯化出的由 28 个氨基酸残基组成的酸性多肽,其分子量为 3.108kD, pI 为 4.2^[1,2]。T $\alpha 1$ 能够增加 T 细胞在各种抗原或致有丝分裂原激活后产生 IFN^[3]、IL-2^[4]和 IL-3^[5]等淋巴因子的分泌,增加 T 细胞表面淋巴因子受体的水平;T $\alpha 1$ 还能影响 NK 前体细胞的募集,使其在暴露于淋巴因子后变得更有细胞毒性^[6,7];在活体内 T $\alpha 1$ 能增加 ConA 激活后的小鼠淋巴细胞增加分泌 IL-2 并增加 IL-2 受体的表达作用^[4,7],配伍其它细胞因子具有抗肿瘤作用^[8]。T $\alpha 1$ 临床用途广泛,已应用于治疗乙肝^[9]、丙肝^[10]、癌症^[8,11]及免疫缺陷^[12]等疾病的研究中,是一种针对 T 淋巴细胞的免疫增强剂。

目前国外化学合成的 T $\alpha 1$ 已临床应用,但价格昂贵。我们首次按照 *E. coli* 惯用密码子合成 T $\alpha 1$ 基因,开创性地采用串联体(本文为 4 串体—T $\alpha 1$ ④)的方式在 *E. coli* 中得到大量表达的融合蛋白(另文发表)。经简单的离子交换色谱,得到了纯度较高的融合蛋白,把融合蛋白进行裂解获得了高纯度的 T $\alpha 1$ 单体,且具有较高的生物活性。该研究旨在寻找简便易行、经济有效地纯化和生产 T $\alpha 1$ 的技术方案,为今后的大批量生产奠定切实可行的工艺流程基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌体的获得:由重组质粒 pThioHisA-T $\alpha 1$ ④转化 *E. coli* TOP10[基因型为 F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 801acZ Δ M15 Δ lacX74 deo-RrecAlaraD139 Δ (ara-leu)7697galUgalKrpsLend-AlnupG]。挑单克隆接种于 5mL LB 培养液,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6,按 5%接种于新鲜 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养到 OD₆₀₀ 为 0.5,加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,37 $^{\circ}$ C 继续培养 4h,离心收集菌体。

1.1.2 生化试剂:SP-SepharoseFF、DEAE-SepharoseFF 和 Q-SepharoseFF 购自 Pharmacia 公司;Tryptone、Yeast Extract 为 Oxide 公司产品,Tricine 和 IPTG 购自 Solon 公司,ConA 和 2-巯基乙醇购于 Sigma 公司,DTT 为 Serva 公司产品,CNBr 购于 Fruka 公司,1640 培养基为 Gibco 公司产品。其余均为国产分析纯试剂。

1.1.3 实验动物:BALB/c 纯种小鼠,由第四军医大学实验动物研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 裂菌:收集菌体 30g,用 150mL 7mol/L pH7.5 的盐酸胍 4 $^{\circ}$ C 搅拌裂解 3h,离心收集上清液。

1.2.2 透析:上清液用 2000mL 0.9% 的生理盐水透析 24h,中间换一次生理盐水。离心收集上清,用

2000mL 10mmol/L pH5.5 的 PB 透析 24h, 同样换一次 PB, 离心收集上清液。

1.2.3 融合蛋白的纯化: SP-Sepharose FF 阳离子柱用 10mmol/L pH5.5 的 PB 平衡, 上样时收集穿过峰液; DEAE-Sepharose FF 阴离子柱同样用上述缓冲液平衡, 上样后用 0~0.5mol/L NaCl 的 PB 缓冲液梯度洗脱, 收集主峰。用 H₂O 透析除盐, 测定蛋白浓度, 经冷冻干燥得融合蛋白。

1.2.4 融合蛋白的裂解: 按蛋白质:CNBr 为 1:3 的比率加入至 70% 的甲酸溶液中混匀, 避光室温裂解 24h。加 10 倍体积的纯水灭活 CNBr, 橱内充分排风 30min 后同上进行冷冻干燥。

1.2.5 T α 1 单体的纯化: SP-Sepharose FF 阳离子柱用 10mmol/L pH5.0 的 NaAc-HAc 缓冲液 (10mmol/L 乙酸钠, 1mmol/L 2-巯基乙醇和 0.1mmol/L DTT) 平衡。冻干样品加 50mL 缓冲液溶解, 4℃ 搅拌过夜, 离心上清过 SP-Sepharose FF 阳离子柱, 收集穿过峰液, 冷冻干燥后用 50mL 50mmol/L pH8.0 的 Tris·HCl 溶解后上 Q-Sepharose FF 阴离子柱, 用 0~0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集主峰, 测定蛋白浓度。

1.2.6 SDS-PAGE: 鉴定融合蛋白采用 Laemmli 不连续胶^[13]; 鉴定 T α 1 单体则采用 2L-Tricine-SDS-PAGE^[14]。

1.2.7 生物活性测定: 用³H-TdR 掺入法, 取小鼠脾脏在钢筛上研磨后用淋巴细胞分离液分离出单核细胞, 用 PBS 洗后, 悬于含 10% FCS 的 1640 培养液中, 向 96 孔培养板中加入 4 × 10⁵/孔的脾细胞和 12.5 μ g/孔的 ConA。CO₂ 孵箱中 37℃ 培养 6h, 再加入不同浓度的融合蛋白和 T α 1, 继续培养 72h, 每孔加入³H-TdR 18.5 × 10³GBq, 继续培养 6h, 收获细胞于玻璃纤维滤纸上, 晾干后测定 cpm 值, 按如下公式计算增殖率:

$$\text{增殖率}(\%) = \frac{\text{实验组 cpm 值} - \text{对照组 cpm 值}}{\text{对照组 cpm 值}} \times 100\%$$

2 结 果

2.1 融合蛋白的离子层析

裂菌后的融合蛋白以可溶形式存在, 用生理盐水和 PB 透析后, 经 SP-Sepharose FF 柱层析, 融合蛋白仅存在于穿过峰液中。再经 DEAE-Sepharose FF 柱层析, 融合蛋白在 0.19mol/L NaCl 时被洗脱 (Fig. 1), 收集洗脱峰作 SDS-PAGE 不连续电泳, 经考马斯亮蓝 R-250 染色呈单一条带, 纯度大于 95%

(Fig. 2), Lowry's 法测定洗脱主峰蛋白浓度为 1.937mg/mL, 融合蛋白的回收率为 1.5%。

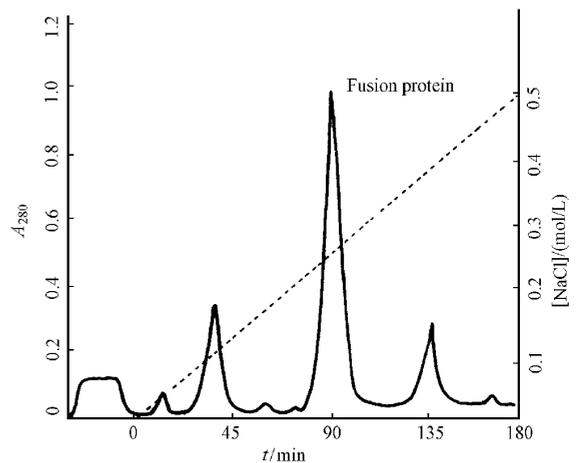


图 1 融合蛋白的 DEAE-Sepharose FF 柱层析图

Fig. 1 DEAE-Sepharose FF chromatography of fusion protein

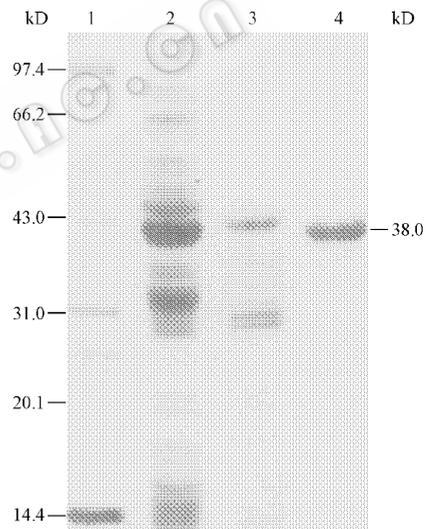


图 2 融合蛋白表达和纯化产物的 12% SDS-PAGE

Fig. 2 12% SDS-PAGE analysis of fusion protein

1. Molecular weight marker, 2. Total proteins of induced TOP 10, 3. Pass solution of SP-Sepharose FF column; 4. Purified fusion protein

2.2 融合蛋白的裂解

由于融合蛋白与 T α 1④间及 T α 1 间均为设计的 Met 连接, 选用 CNBr 能特异地裂解 Met 羧基形成的肽键。融合蛋白在含 CNBr 的 70% 甲酸溶液中室温 24h 能够裂解出 T α 1 单体。

2.3 T α 1 的离子层析

裂解后的融合蛋白经 SP-Sepharose FF 阳离子柱层析, T α 1 单体仅存在于穿过峰液中, 再经 Q-Sepharose FF 阴离子柱层析, 在 0.13mol/L NaCl 时被洗脱 (Fig. 3), 收集洗脱峰冷冻干燥, 经 Sephadex

G25 除盐作 Tricine-SDS-PAGE 分析经考马斯亮蓝 R-250 染色呈单一条带 (Fig. 4)。经 Lowry's 法测定蛋白浓度,得 $T\alpha 1$ 约为 98mg。经 HPLC 进行鉴定, $T\alpha 1$ 的 $t_R = 17.14$,其纯度大于 98% (Fig. 5)。

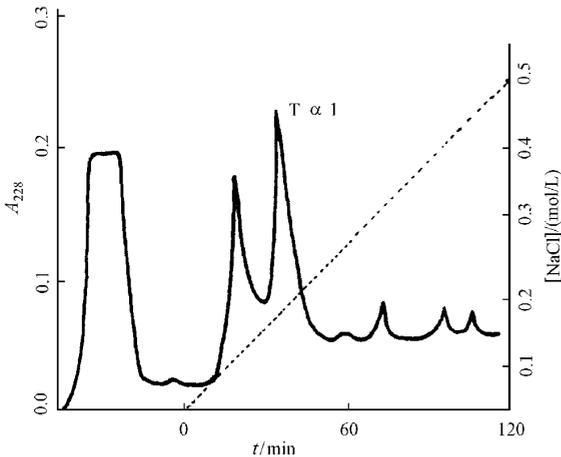


图3 $T\alpha 1$ 的 Q-Sepharose FF 柱层析图

Fig. 3 Q-Sepharose FF chromatography of $T\alpha 1$



图4 裂解产物及 $T\alpha 1$ 的 Tricine-SDS-PAGE

Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE analysis of cleavage product and $T\alpha 1$

1. Molecular weight marker
2. Cleavage of fusion protein ;
3. Pass solution of SP-Sepharose FF column ;
4. Purified $T\alpha 1$
5. $T\alpha 1$ standard

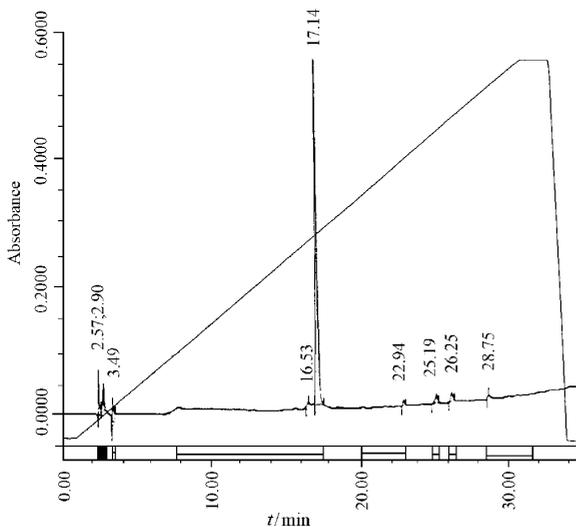


图5 $T\alpha 1$ 的 HPLC 纯度鉴定

Fig. 5 Identification of $T\alpha 1$ on HPLC RPC-18 Buffer A 0.1% TFA ; Buffer B 0.1% TFA 60% CH_3CN

2.4 融合蛋白和 $T\alpha 1$ 生物活性测定

加入不同浓度的融合蛋白和 $T\alpha 1$ 纯化产物,融合蛋白和 $T\alpha 1$ 与对照组相比具有极显著性差异,而与化学合成的 $T\alpha 1$ 相比则无差异 (Table 1)。

表1 融合蛋白和 $T\alpha 1$ 的生物活性 ($n = 5$)

Table 1 Activities of fusion protein and $T\alpha 1$ ($n = 5$)

	Concentration ($\mu g/mL$)	cpm ($X \pm SD$)	Proliferative ratio (%)
Synthetic $T\alpha 1$	1.56	9320 \pm 1563	100
	3.12	10584 \pm 148	127.2
	6.25	9111 \pm 1694	95.6
	12.5	9978 \pm 112	114.2
$T\alpha 1$	1.95	9008 \pm 1043	93.9
	3.9	10485 \pm 2225	125.1
	7.8	10188 \pm 1813	118.7
	15.6	8675 \pm 975	86.2
Fusion protein	1.95	8570 \pm 4425	94
	3.9	8926 \pm 3253	92
	7.8	9205 \pm 1462	97.6
	15.6	7969 \pm 2438	71
Control		4659 \pm 806	

3 讨论

$T\alpha 1$ 作为一种免疫增强剂,临床用途广泛^[8-12]。目前市场出售的 $T\alpha 1$ 均为全人工合成,成本高、污染环境。而组织提取又受到材料来源的限制,且产量极低^[1,2]。我们开创性地采用串联体的方式使 $T\alpha 1$ 在 *E. coli* 中得以大量表达,且分离纯化简单,比国外化学合成的 $T\alpha 1$ 成本大为降低;同时又具有操作工艺程序化、易于放大、取材不受限制和活性高等优点,为今后的大批量生产打下了坚实的基础。

用 pThioHisA 进行的融合表达中,融合蛋白获得了高效表达,约占菌体总蛋白的 40% (Fig. 2),而且是以可溶性形式表达,裂菌产物离心后,融合蛋白的表达量占上清蛋白的 70%,为今后的纯化带来了极大的方便。尽管这种融合蛋白带有 His 标签,但用金属螯合亲和层析的效果也不理想,经反复摸索终于找到了离子交换层析纯化融合蛋白及 $T\alpha 1$ 的简便方法,且在融合蛋白的纯化中阴阳离子柱采用相同的缓冲液,融合蛋白存在于 SP 阳离子柱穿过液,不经除盐和平衡而直接上样于 DEAE 阴离子柱,更为方便简单。

融合蛋白经 CNBr 裂解后纯化出的 $T\alpha 1$ 与天然 $T\alpha 1$ 存在一定的差别,即在 NH_2 -端缺少乙酰基,而 $COOH$ -端则多了一个同型丝氨酸内酯,因而纯化出

的 $T_{\alpha 1}$ 是天然 $T_{\alpha 1}$ 的一种衍生物。纯化的融合蛋白和 $T_{\alpha 1}$ 经生物活性测定,与国外化学合成的 $T_{\alpha 1}$ 有相当的效应,具有良好的免疫刺激活性。ConA 与淋巴细胞保温 6h 刺激,再加入待测的样品产生的

促增殖效应最佳;而将它们和丝裂原同时加入或先加入待测样品再加 ConA 刺激细胞时可产生抑制效果。有关 $T_{\alpha 1}$ 免疫调节机理及临床应用的探讨尚需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Goldstein A L, Low T L, McAdoo M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1977, **74**(2):725~729
- [2] Low T L, Goldstein A L. *J Biol Chem* ,1979 **254**(3)987~995
- [3] Weck R K, May L, Weck C J. *J Interferon Res* ,1983 **3**(1):121~128
- [4] Ershler W B, Moore A L, Roessner K *et al.* *Immunopharmacology* ,1985, **10**(1):11~17
- [5] Ohta Y, Tezuka E, Tamura S *et al.* *J Biol Response Med* ,1987 **6**(2):181~193
- [6] Faralli C, Mastino A, Jezzi T *et al.* *Int J Immunopharmacol* ,1989, **11**(5):443~450
- [7] Leichtling K D, Serrate S A, Sztejn M B. *Int J Immunopharmacol* ,1990, **12**(1):19~29
- [8] Salvati F, Rasi G, Portalone L *et al.* *Anticancer Res* ,1996, **16**(2):1001~1004
- [9] Tang J H, Yeh C T, Chen T C *et al.* *J Infect Dis* ,1998, **178**(3)866~869
- [10] Moscarella S, Buzzelli G, Romanelli R G *et al.* *Liver* ,1998, **18**(5):366~369
- [11] Pica F, Frascchetti M, Matteucci C *et al.* *Anticancer Res* ,1998, **18**(5A):3571~3578
- [12] Chen S J, Ko H S. *Clin Exp Immunol* ,1987, **70**(2):263~267
- [13] Laemmli UK. *Nature* ,1970 **227**(5259):680~685
- [14] 石继红, 赵永同, 王俊楼等. 第四军医大学学报, 2000, **21**(6):761~763

Purification of Recombinant Thymosin Alpha 1 in *Escherichia coli* and Its Activity

SHI Ji-Hong ZHANG Ying-Qi ZHAO Ning ZHAO Yong-Tong YAN Zhen HAN Wei

(Biotechnology centre, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract The tandem thymosin $\alpha 1$ gene of 4 repeats was constituted and was cloned into a fusion expression vector pThioHisA(pThioHisA-T $\alpha 1$ ④). After transforming into TOP10, higher levels of expression of fusion protein, with a molecular weight of about 38kD, was induced at 37°C by 1 mmol/L IPTG for 4 hours. SDS-PAGE analysis showed an induced expression products band which constituted 40% of the total bacterial proteins. The fusion protein was isolated and purified by simple ion exchange chromatography. After CNBr cleavage of the fusion protein in 70% formic acid, thymosin $\alpha 1$ was obtained by the ion exchange methods of SP-Sepharose Fast Flow and Q-Sepharose Fast Flow and proved by 2L-Tricine-SDS-PAGE analysis. HPLC showed the purity of thymosin $\alpha 1$ was 98%. Furthermore, their biological activity was analysed by ^3H -TdR incorporation. The results showed that the fusion protein and thymosin $\alpha 1$ have the similar biological activity to that of the synthetic thymosin $\alpha 1$. They could increase the proliferative responses of the mitogen ConA stimulated spleen lymphocytes. This method provided a reference method in preparation thymosin $\alpha 1$ in large scale.

Key words Thymosin alpha 1, fusion expression, purification, protein biological activity