

人胸腺素 $\alpha 1$ 在大肠杆菌中的融合表达

修朝阳 周穗菁 俞 瓊 陈常庆*

(中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心,上海 200233)

摘 要 利用基因工程表达的方法,在大肠杆菌中通过与 GST 蛋白融合的方式高效表达了胸腺素 $\alpha 1$ 前体基因,随后经亲和层析和 SP 强阳离子树脂纯化相结合的方式,得到了胸腺素前体肽段 31 肽和 N-端未经乙酰化修饰的 28 肽。融合蛋白表达量达到菌体总蛋白的 35%~40%,样品肽的产量也达到了约 200mg/L(肽/发酵液)的产量。经质谱测定,分子量分别为 3366 和 3066。BalB/C 小鼠脾脏淋巴细胞体外测活表明,所构建的 GST-T $\alpha 1$ 融合蛋白和纯化后的产物对于淋巴细胞具有比较明显的增殖作用,其中 N-端未经乙酰化的 28 肽产物与 31 肽产物活性相近,均对淋巴细胞具有明显的刺激增殖作用。

关键词 溴化氰降解,凝血酶加工,淋巴细胞测活, GST

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0541-05

胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$)是由动物或人胸腺组织分泌的一种多肽激素。它对于淋巴细胞的成熟、分化和免疫功能具有重要作用^[1]。由动物胸腺提取的胸腺肽混合物(又称胸腺肽第五组份)早已用于临床以提高免疫功能和抗病毒作用,特别是对于乙型肝炎的治疗具有一定的效果。T $\alpha 1$ 是胸腺肽混合物中最有效的组份^[2]。由于 T $\alpha 1$ 是一个 N-端被乙酰化的 28 肽,因而易于用化学方法合成,产物的纯度已达到 98% 以上。化学合成的人 T $\alpha 1$ 目前正用于对乙型肝炎和丙型肝炎的临床试验。有关人胸腺肽的药理学、药物动力学、临床效果和不良反应,以及使用方法和给药剂量可参阅最近的相关文献报道^[3-7]。

由于人胸腺肽 $\alpha 1$ 的肽链较短,因而用基因工程方法来生产 T $\alpha 1$ 不仅存在产量问题,而且还有基因工程产物的后加工特别是 N-端乙酰化问题。为了克服这一困难,颜真等人^[8]采用了四聚体 T $\alpha 1$ 串联表达方法,并证明串联表达的产物具有同样的生物学活性。我们实验室在完成了 T $\alpha 1$ 的化学合成之后,又研究了 T $\alpha 1$ 与谷胱甘肽巯基转移酶(GST)在大肠杆菌中的融合高效表达。由于表达系统本身在 GST 蛋白和融合位点之间提供了凝血酶识别位点,以初步分割宿主蛋白和产物蛋白,但是分割后的产物会在 N 端多余 2 个氨基酸,不利于正确表达完整的产物蛋白。因此,需要采用其他的后加工方法以

去除多余的氨基酸。由于胸腺素 α 序列中并不含有 Arg 与 Met 残基,利用这一特性分别在其 N-端引入了精氨酸(胰蛋白酶作用位点)或蛋氨酸(溴化氰化学裂解位点),相应的工程菌株分别被命名为 AT1 和 MT1。这样,既可以通过溴化氰裂解直接获得 N 端未经乙酰化修饰的 28 肽产物(MT1);也可以通过凝血酶对 AT1 的加工,获得 N 端多余 Gly-Ser-Arg 3 个氨基酸的 31 肽产物(AT1)。对于获得的 31 肽产物,可以通过修饰 Lys 残基的方式,封闭胸腺素 α 内部的胰酶位点,然后再经胰酶作用,去除多余的 3 个氨基酸的同时获得游离的 α -氨基,为今后利用化学修饰(酯酐修饰)方法获得正确的 28 肽产物创造条件。活性测定表明,无论是融合蛋白(GST-T $\alpha 1$)还是 31 肽前体或者 N-端未经乙酰化修饰的 28 肽,均具有与化学合成 T $\alpha 1$ 相近的生物学活性,本文即报道了这一研究结果。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:大肠杆菌 BL-21(supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB)F [traD36 proAB lacZ9 lacZ Δ M15])为本室保存, pGEX-4T-3 质粒购自 Pharmacia 公司。

1.1.2 酶类:Klenow 酶、T4DNA 连接酶、限制酶、Taq 酶购自宝灵曼公司,凝血酶购自 Sigma 公司。

*Bam*HI/*Xho*II 双酶切后,连接到经过同样处理的 pGEX-4T-3 融合表达载体中,转染 BL21 宿主菌,分别涂布到 Amp 平板上进行培养。挑取平板上的阳性克隆 AT1 和 MT1 培养过夜。种子转接入新鲜的 LB 培

养基中,培养 4h 后,加入 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L 进行诱导表达,产物进行 PAGE 电泳分析(图 1B)。表达质粒进行 DNA 测序。结果完全正确。

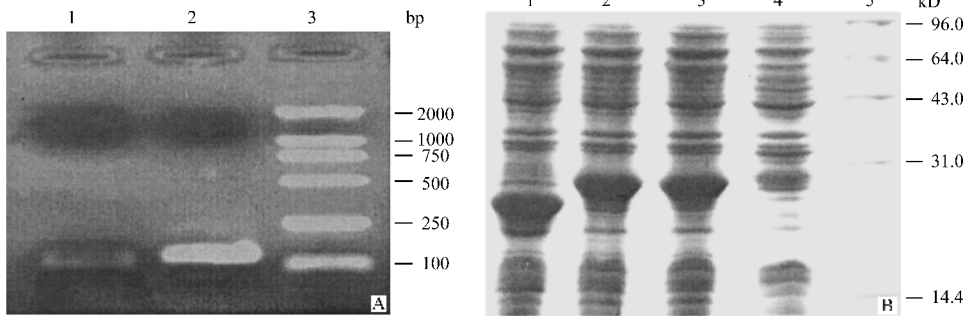


图 1 融合质粒 AT1 与 MT1 的核酸、蛋白分析

Fig.1 Analysis of fusion plasmid AT1 and MT1

A. PCR of thymosin $\alpha 1$ gene 1. PCR product of AT1 (Gly-Ser-Arg-T α 1); 2. PCR product of MT1 (Gly-Ser-Met-T α 1) 3. DNA molecular marker

B. Expression of fusion protein 1. BL21/pGEX expression product; 2. Expression product of AT1; 3. Expression product of MT1; 4. BL21 host contrast; 5. Protein marker

2.2 工程菌的高密度发酵

工程菌株 AT1 和 MT1 的发酵按照方法 1.2.2 进行,发酵体积约 3L。诱导 3h 后,发酵密度 OD_{600} 分别为 59 和 63。离心收集菌体,称重为 300g 和 320g 湿重。取样,蛋白电泳分析(见图 2)。

2.3 融合蛋白的消化

分别取 AT1 和 MT1 湿菌体 40g,超声波破碎,按照方法 1.2.3 纯化融合蛋白(纯度见图 2)。融合蛋白按照 Bradford 方法进行定量,分别得到了 1.5g 和 1.63g 的融合蛋白。

2.4 酶切与裂解

分别取 AT1 和 MT1 融合蛋白各 200mg,按照方法 1.2.4 分别对不同的融合蛋白进行凝血酶酶切(图 3A)和溴化氰裂解(图 3B)。电泳分析表明,溴化

氰裂解反应在 15h 后基本完成。

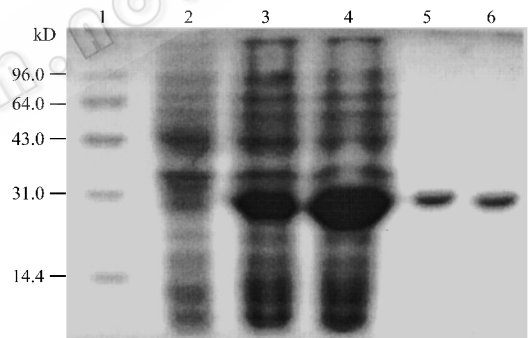


图 2 发酵产物的 PAGE 电泳分析

Fig.2 PAGE analysis of fermentation

1. Protein molecular marker; 2. Strains before induction; 3. Induction of AT1; 4. Induction of MT1; 5. Purification of AT1; 6. Purification of MT1

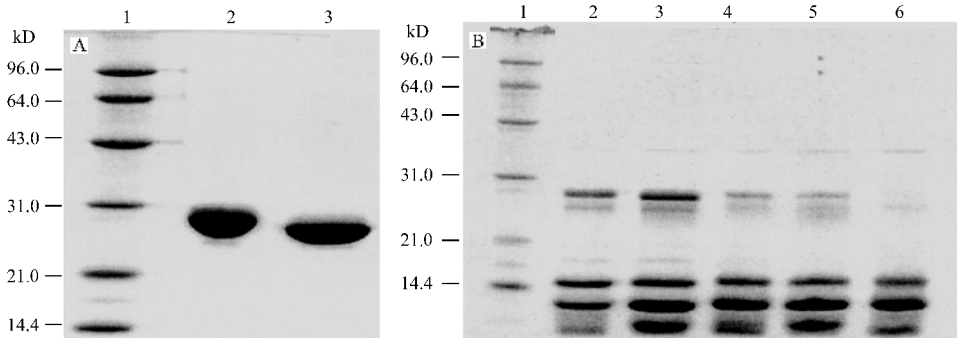


图 3 融合蛋白裂解过程的 PAGE 电泳跟踪分析

Fig.3 Analysis results after the process of thrombin and CNBr by PAGE

A. Thrombin process 1. Protein molecular marker; 2. Fusion protein before processing; 3. Protein after processing

B. CNBr process 1. Protein molecular marker; 2~6. Analysis of protein per three hours

2.5 分离纯化

按照方法 1.2.5,对反应后的产物进行纯化,产物 T α 1 出现在洗脱曲线的中部,约 0.2 ~ 0.25mol/L NaCl 浓度处。而大部分的杂蛋白包括酶切分离后的 GST 蛋白和化学裂解产生的大量杂蛋白组份都在梯度洗脱之前流出了。收集样品, C18 反相柱浓

缩样品,并除去样品中的尿素和盐分,冷冻干燥称重约 10mg 和 10.8mg。C18 反相柱具有一定的分离作用,胸腺素 α 约在 35% ~ 40% 的乙腈浓度处被洗脱下来,经脱盐的产物多肽电泳结果如图 4A,纯度分别达到了 90% 以上(图 4B)。

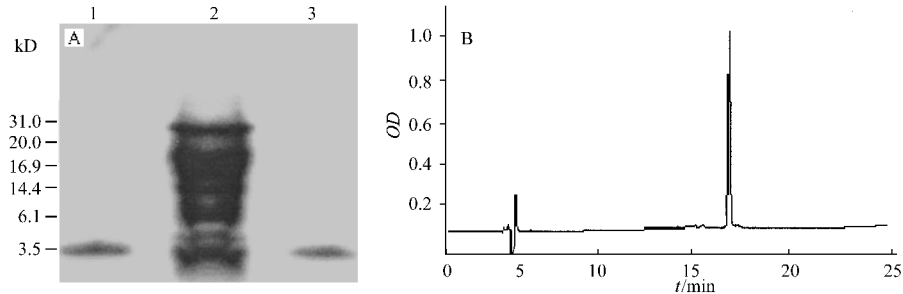


图 4 AT1 和 MT1 的鉴定

Fig.4 Identification of purified AT1 and MT1

A. PAGE pattern 1. Purified AT1 ;2. Peptide marker ;3. Purified MT1 ;
B. HPLC elution map of AT1 by C18 reverse phase

2.6 样品的鉴定

脱盐的样品首先进行质谱测定,结果分别为 3366 和 3066(图 5A、B)。按照方法 1.2.7 进行体外

细胞活性检测(表 1),结果表明融合表达的蛋白同样具有刺激淋巴细胞增殖的活性,而纯化的 AT1 31 肽和 MT1 28 肽则具有较高的活性。

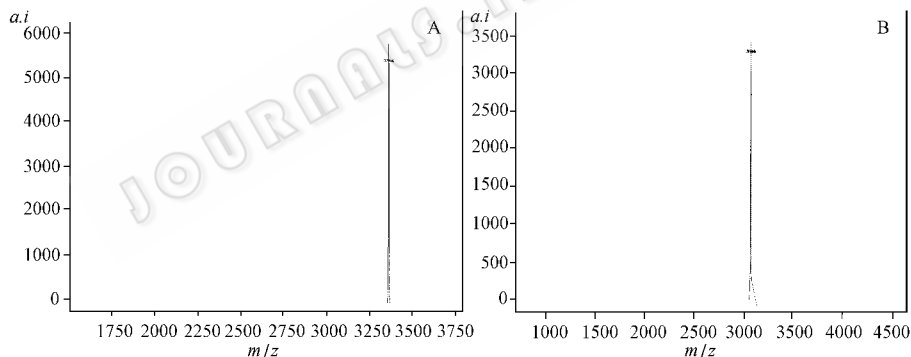


图 5 AT1 与 MT1 的质谱分析 A:AT1 的质谱分析 ;B:MT1 得质谱分析

Fig.5 MS of AT1 and MT1

A MS of AT1 ;B MS of MT1

3 讨 论

本实验采用基因工程的方法,将胸腺素 α 肽与谷胱甘肽巯基转移酶融合的方法进行表达,不仅获得了较高的表达量,提供了一种快速纯化方法,大大简化了纯化过程,而且避免了化学合成所造成的较高毒性和小分子量肽段单独表达后不利于检测、纯化等缺点。另外本实验由于采用了大肠杆菌自身偏好的密码子来构建肽基因,不仅使 mRNA 的翻译效率提高,而且也有效地避免了宿主菌蛋白酶的攻击,在宿主细胞内获得了较高的表达,经发酵后的表达

量达到了细胞总蛋白的 35% 左右,高于 GST 的平均表达水平约 50%。由于胸腺素 α 肽内部并不存在 Met 位点和 Arg 位点,因此可以考虑惯用的化学降解手段或者蛋白酶加工的方法,从而解决宿主蛋白与多肽的正确分离问题。

本结果证明胸腺素 α 1 的 N-端融合和延长 3 个氨基酸残基以及非乙酰化的 28 肽并不影响其生物学活性,二者均表现出了与化学合成 28 肽相近的生物学活性,因而非乙酰化的 31 肽和 28 肽均可用于临床或生物学活性研究。虽然胸腺素与 GST 的融合蛋白的活性较低,但考虑到其较大的分子量(与 28

肽分子量的比值约为 10:1),因此以摩尔比值来表示活性数据,则融合蛋白的活性下降并不明显。另外,方法提供的大量制备 31 肽的方法,为进一步研究通过化学方法得到 N-端正确加工和乙酰化修饰

的 T α 1 打下了坚实的基础。同时,考虑到此法在多肽表达方面的可操作性,因此同样可以应用于大量制备其他的相关活性多肽。

表 1 多肽与融合蛋白的活性检测

Table 1 Activity test of peptides and fusion protein

Rate of dilution		ATI	MTI	T α 1	GST-ATI	GST-MTI
5 ⁷	OD value	0.198	0.244	0.220	0.189	0.183
	Rate of increase	36.45%	68.60%	51.66%	30.30%	26.20%
5 ⁸	OD value	0.241	0.256	0.213	0.328	0.220
	Rate of increase	66.30%	76.90%	47.23%	126.60%	51.40%
5 ⁹	OD value	0.267	0.321	0.224	0.192	0.184
	Rate of increase	84.13%	121.40%	54.61%	32.40%	26.70%
5 ¹⁰	OD value	0.343	0.432	0.242	0.187	0.160
	Rate of increase	136.32%	197.90%	67.14%	29%	10%
5 ¹¹	OD value	0.256	0.210	0.301	0.190	0.161
	Rate of increase	76.90%	45.10%	108.12%	31%	11.20%
5 ¹²	OD value	0.193	0.173	0.207		
	Rate of increase	33.21%	19.51%	42.8%		
Control				0.145		

REFERENCES (参考文献)

- [1] White A, Goldstein A L. The endocrine role of the thymus and its hormone thymosin in the regulation of the growth and maturation of host immunological competence. *Adv Metab Dis*, 1975, **8**: 359 ~ 374
- [2] Goldstein A L, Low T L K, Thurman G B *et al.* Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Progr Horm Res*, 1981, **37**: 369 ~ 415
- [3] Ancell C D, Phipps J, Young L. Thymosin Alpha-1. *Am J Health Syst Pharm*, 2001, **58**(10): 879 ~ 885, quiz 886 ~ 888
- [4] Body B, Body B Jr, Siegel S E *et al.* Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment. *Int J Immunopharmacol*, 2000, **22**(4): 261 ~ 273
- [5] Garaci E, Pica F, Rasi G *et al.* Thymosin $\alpha 1$ in the treatment of cancer: from basic research to clinical application. *Int J Immunopharmacol*, 2000, **22**(12): 1067 ~ 1076
- [6] Kullavanuaya P, Treeprasertuk S, Thohg-Sgam D *et al.* The combined treatment of interferon α -2a and thymosin $\alpha 1$ for chronic hepatitis C: the 48 weeks and treatment results. *J Med Assoc Thai*, 2000, **84** suppl 1: s462 ~ 468
- [7] Andreone P, Cursaro C, Gramenzia A *et al.* In vitro effect of thymosin alpha-1 and interferon-alpha on th1 and th2 cytokine synthesis in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2001, **8**(3): 194 ~ 301
- [8] YAN X (颜真), ZHANG Y (张英起), LI M (李民) *et al.* High cell density fermentation of human thymosin $\alpha 1$. *Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology*(中国生化药物杂志), 2001, **7**(4): 209 ~ 212
- [9] LI M (李民), XIU Z Y (修朝阳), CHEN C (陈常庆). High density Fermentation of Prolyl Endopeptides. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(2): 183 ~ 187
- [10] Kim J, Park J M, Lee B J. High level expression and efficient purification of the antimicrobial peptide egaegurin 4 in *E. coli*. *Protein Peptide Lett*, 1997, **4**(6): 391 ~ 396
- [11] YU X (俞超), QIU X D (邱秀梯), ZHOU G M (周国明) *et al.* Synthesis of thymosin $\alpha 1$ and its biological activity. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 1998, **5**(2): 103

Fusion Expression of Human Thymosin $\alpha 1$ in *Escherichia coli*

XIU Zhao-Yang YU Ying CHEN Chang-Qing*

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

Abstract Engineering *E. coli* strain, BL21 (DE3)pGEX-4T-human Thymosin $\alpha 1$, was constructed by oligonucleotide annealing and PCR amplifying the target gene, then ligating it with pGEX-4T-3 vector and transferring into BL21 host. The yield of fusion protein of GST-Thymosin $\alpha 1$ expressed from BL21(DE3)pGEX-4T-thymosin $\alpha 1$ is about 35% ~ 40% of total protein after fermentation. Following the simple cut of thrombin or CNBr, about 0.2g/L thymosin $\alpha 1$ can be harvested. The product is checked by MS and activity test, which indicates that the recombinant product has full biological activity of native thymosin $\alpha 1$.

Key words Thymosin $\alpha 1$, fusion expression, CNBr, Thrombin cut