

研究报告

胸腺素 $\alpha 1$ 与复合 α 干扰素融合蛋白的表达及其生物学活性

刘先俊¹, 刘方欣¹, 黎波², 周辉云³, 王琴琴¹

1 重庆医科大学, 重庆 400016

2 重庆百萃生物科技有限公司, 重庆 400060

3 重庆康尔威药业股份有限公司, 重庆 401122

摘要: 实验旨在获得具有双重生物学活性的重组胸腺素 $\alpha 1$ (Thymosin $\alpha 1$, TM- $\alpha 1$)与复合 α 干扰素(IFN α -con)融合蛋白。选择大肠杆菌偏爱的密码子, 将合成的 TM- $\alpha 1$ 与 IFN α -con 编码序列构成的融和基因克隆至大肠杆菌表达载体 pET-22b(+), 在宿主菌 BL21(DE3)-Codon plus-RP-X 中成功表达了可溶性融合蛋白(TM- $\alpha 1$ -IFN-con)。表达量占总蛋白的 20%以上。通过硫酸铵沉淀、疏水层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析、分子筛层析后, 产品纯度达到 96%以上。采用细胞病变抑制法测定融合蛋白的抗病毒活性, 采用细胞增殖实验检测融合蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。结果表明, 融合蛋白的抗病毒活性优于市售的 IFN $\alpha 1b$ 和 IFN $\alpha 2a$ 。对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响与市售的合成胸腺素 $\alpha 1$ 相同。已有研究证实, 该融合蛋白具有良好的体外抗 HBV 作用, 其体外抗 HBV 活性比联合应用 TM- $\alpha 1$ 和干扰素 α 强, 且细胞毒性明显低于联合应用 TM- $\alpha 1$ 和干扰素 α 。以上结果表明, 通过大肠杆菌表达的可溶性融合蛋白(TM- $\alpha 1$ -IFN-con), 既具有良好的干扰素 α 抗病毒作用, 也具有胸腺素 $\alpha 1$ 促淋巴细胞增殖作用。

关键词: 复合 α 干扰素, 胸腺素 $\alpha 1$, 融合蛋白, 重组, 活性

Expression and Activity Analysis of Interferon α -con and Thymosin- $\alpha 1$

Xianjun Liu¹, Fangxin Liu¹, Bo Li², Huiyun Zhou³, and Qinqin Wang

1 Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Chongqing Biotree Biological Science and Technology LTD, Chongqing 400060, China

3 Chongqing K.E.W. Pharmaceutical Co. LTD, Chongqing 401122, China

Abstract: This study aimed to obtain recombinant fusion protein of thymosin $\alpha 1$ (TM- $\alpha 1$) and consensus IFN α (IFN α -con) which have both TM- $\alpha 1$ and IFN α -con activities. The DNA sequence for the fusion protein was cloned into expression vector of pET-22b (+) and expressed in BL21 (DE3)-Codon plus-RP-X. The expressed product (TM- $\alpha 1$ -IFN-con) was soluble, and amounted to more than 20% in total proteins of *E. coli*. By precipitation of $(NH_4)_2SO_4$, hydrophobic interaction chromatography (HIC, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow), anion-exchange chromatography (Q Sepharose Fast Flow), cation-exchange chromatography (SP Sepharose Fast Flow) and gel filtration (Sephadex G-75), it was purified to more than 96% purity. The activity of fusion protein for antiviral was tested by cytopathic-effect inhibition assay and activity for promoting lymphocyte proliferation was tested by cell proliferative assay. The activity for antiviral was higher than commercial IFN $\alpha 1b$ and IFN $\alpha 2a$ and activity for promoting lymphocyte proliferation was similar to commercial TM- $\alpha 1$. The fusion protein had better effect for anti-HBV *in vitro*, its effect was stronger than combination

Received: December 4, 2007; Accepted: January 16, 2008

Corresponding author: Xianjun Liu. Tel: +86-23-68485398; E-mail: lxj6422@yahoo.com.cn

of IFN α and TM- $\alpha 1$ and cell toxicity was less than combination of IFN α and TM- $\alpha 1$. The above results show that it has effect bath antivirus of IFN α and promoting lymphocyte proliferation of the soluble fusion protein expressed in *E. coli*.

Keywords: IFN α -con, TM- $\alpha 1$, fusion protein, recombinant, activity

干扰素(Interferon, IFN)是一类由单链分子组成的蛋白多肽,临床上已广泛用于治疗病毒性疾病、肿瘤和多发性硬皮病等疾病。但干扰素也存在抗病毒比活性低、大剂量使用时副作用较大等缺点。1983年,Amgen公司首先根据已报道的13种 α 型干扰素的基因序列同源性设计出的一个全新的干扰素分子即复合 α 干扰素(Consensus IFN α , IFN α -con),其抗病毒比活性是天然干扰素的10倍以上,具有疗效显著,副作用更小等优点。

胸腺素 $\alpha 1$ (Thymosin $\alpha 1$, TM- $\alpha 1$)是从胸腺组织中分离出的、含28个氨基酸残基组成的小分子多肽。作为一种免疫反应的调节因子,临床上已广泛用于治疗免疫系统受抑制或被破坏的疾病如慢性乙肝、丙型肝炎、癌症、爱滋病等。由于TM- $\alpha 1$ 肽链较短,基因工程生产非常困难。因此,主要通过化学合成法进行生产,使TM- $\alpha 1$ 产品产量低、价格昂贵。

已有资料证实^[1],将干扰素与胸腺素 $\alpha 1$ 联合应用,可明显增强干扰素的抗病毒效果。我们将复合干扰素与胸腺素 $\alpha 1$ 的编码基因构成融合基因,通过选用大肠杆菌偏爱的密码子,在大肠杆菌中实现了该融合蛋白(TM- $\alpha 1$ -IFN-con)的高效表达。体外实验表明,该融合蛋白不仅有明显的抗病毒作用,也具有胸腺素 $\alpha 1$ 的增强免疫性作用。

1 材料与方法

1.1 材料

离心机(BECKMAN COULTER AvantiTM J-20),超声波细胞破碎机(宁波新芝科学仪器研究所),纯化仪(Pharmacia ÄKTA Primer),DNM-9602酶标检测仪(北京普朗新技术有限公司),凝胶图像分析仪(GelDocXR凝胶成像系统, Bio-Rad)等。

pET-22b(+), BL21(DE3)-Codon plus-RP-X 购自 Qiagen, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow、Q Sepharose Fast Flow、SP Sepharose Fast Flow、Superdex 75 购自 Amersham Pharmacia Biotech, IPTG、³H-TdR、ConA 购自 Sigma, 蛋白质分子量标准购自上海西巴

斯生物技术有限公司, WISH 细胞(人羊膜细胞)、VSV(水泡性口炎病毒)购自上海生化与细胞生物所, IFN $\alpha 1b$ (赛若金)购自深圳科兴生物公司、IFN $\alpha 2a$ (福康泰)购自长春生物制品研究所, *Nde* I、*Bam*H I 和 DNA 分子量标准购自上海生工。TM- $\alpha 1$ (日达仙)购自意大利法玛西亚普强(Pharmacia & Upjohn S.P.A), 小牛血清、1640 培养基购自北方同正公司等。

LB 液体培养基: 2%胰蛋白胨(Tryptone, Oxoid)、1%酵母提取物(Yeast Extract, Oxoid)和 2% NaCl。

昆明种小鼠购自重庆中药研究院实验动物研究室(批准文号: 医动字第 310101001)。

1.2 融和基因的设计

根据已报道的 IFN α -con 与 TM- $\alpha 1$ 的编码序列, 选用大肠杆菌偏爱的密码子, 将 TM- $\alpha 1$ 置于融和蛋白的 N 端, IFN α -con 置于融和蛋白的 C 端, 中间用一段包含十个氨基酸残基的连接肽将 2 者连接起来。同时, 在 TM- $\alpha 1$ 基因 5'端添加起始密码 ATG 和克隆用限制性内切酶 *Nde* I 识别序列, 在 IFN-con 基因片段末端添加串联终止密码 TAATAG 和限制性内切酶 *Bam*H I 识别序列(图 1)。上述序列由上海生工合成。

1.3 融合基因的克隆与表达

将上述合成的融合基因质粒经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后回收小片段, 将带 T7 启动子的原核表达质粒 pET-22b(+), 经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后回收大片段。通过 T4 DNA 连接酶连接(图 2), 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选重组子。经酶切鉴定和序列分析确证后的重组质粒命名为 pET-TIN。将 pET-TIN 转化 BL21(DE3)-Codon plus-RP-X 宿主菌。LB 培养, 筛选含有重组质粒的菌株。为了优化诱导表达条件, 分别在 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 诱导表达 2 h 与 4 h, 离心收集菌体, 超声波细胞破碎机破碎, 离心分别收集上清液与沉淀。将沉淀用 0.9% NaCl 洗涤 3 次后, 收集沉淀, 加入 2% SDS, 煮沸 5~10 min, 短暂离心后取上清, 与上述样品同时进行 15% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。

从 LB 平板上挑取单菌落, 接种至含有 100 μ g/mL

氨苄青霉素的 10 mL LB 培养基中(50 mL 培养三角瓶), 37°C 220 r/min 振荡培养 12 h(菌密度为 OD_{600} 0.1 左右), 1%转接至 1 L LB 培养基中, 37°C, 220 r/min 培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度 0.5~1.0 mmol/L 诱导表达, 继续培养 4 h 后, 离心收集菌体, 备分离纯化用。

```

atgtctgacg ctgctgtga caccctctct gaaatcacca ccaaagacct gaaagaaaaa aaagaagtig 70
MS DA A VD TSS E I T TK DL K E KK EVV

ttgaagaagc tgaagaacgt ggtggtgtgt ctggagggtg tgggtgttgc gacctgcgc aaaccacag 140
E E AE N GG GGS GG GGG C DL P Q TH S

cctgggtaac cgtcgtgcc tgatctctgt ggcacaaatg cgtcgtatct ctccttctc ctgtctgaa 210
L GN RR AL I L LA Q MRR IS P FS CL K

gaccgtcacg acttcggtt cccgcaggag gagtttgatg gcaaccagt cagaaggct caagccatct 280
D RH D FGF P Q EE FDG N QFQ K AQ AI S

ctgtctcca tgagatgac cagcagacct tcaacctctt cagcacaaa gattctctg ctgttggga 350
V LH EM I Q QT FN LF S T KD SS AA WD

cgagtcctcg ctggagaat tctacacga actctaccag cagctgaacg acctggaagc ctgtgtgac 420
E SL L E KF YT E LY Q QL ND L EA C VI

caggaggtcg gttgtgaaga aaccccgctg atgaatgctg actccatctt ggtgtggaag aaatacttc 490
Q EV G VE E T P LMNV D S IL A VK KYFQ

agcgtatcac tctctatctg acagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg gaggtgttgc gtgcagaat 560
RI T LYL T E KKY S PC AW E VVR A E I

catgcttcc ttctctctgt ccaaccaact gcaggaacgt ctgcgtgta aggaataatag 621
MRS FS L ST N LQ E R LRR K E(termination code)
  
```

图 1 融合蛋白的基因序列与对应的氨基酸序列

Fig. 1 Sequence for fusion protein of gene and amino acid

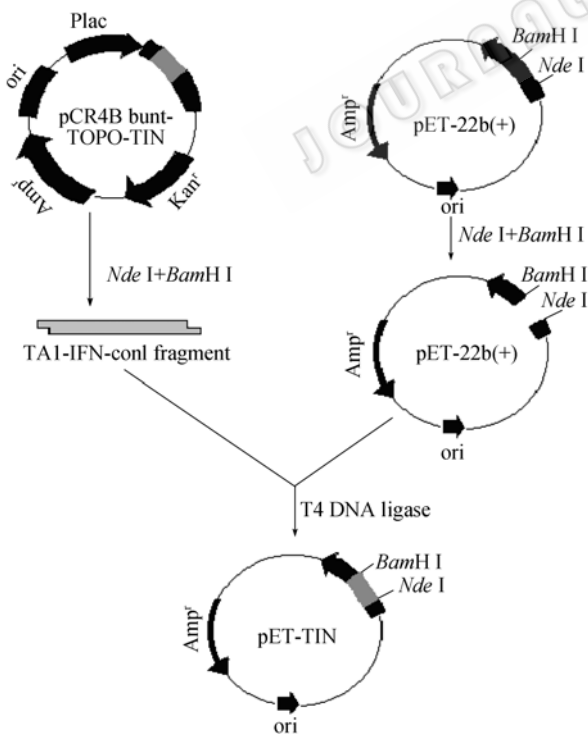


图 2 重组质粒(pET-TIN)构建示意图

Fig. 2 Schematic diagram for construction of pET-TIN

1.4 融合蛋白的分离纯化

将离心收集的菌体用超声波细胞破碎机破碎(300 W、30 s×3 次)后, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 硫酸铵沉淀后, 参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的层析条件, 依次进行疏水层析(Phenyl Sepharose 6 Fast Flow)、阴离子交换层析(Q Sepharose Fast Flow)、阳离子交换层析(SP Sepharose Fast Flow), 15% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色检测纯化结果, 最后通过凝胶过滤层析(Superdex 75)获得纯化后的重组复合干扰素与胸腺素 $\alpha 1$ 的融合蛋白(TM- $\alpha 1$ -IFN α -con), 15% SDS-PAGE、凝胶成像系统分析纯度以及 Lorry 法测定蛋白质浓度。

1.5 融合蛋白的抗病毒活性分析^[2]

采用细胞病变抑制法测定融合蛋白的抗病毒活性。将 WISH 细胞(人羊膜细胞)悬液接种于 96 孔板, 每孔 3.5×10^4 cell/100 μ L, 37°C, 5% CO_2 条件下培养 4~6 h, 取融合蛋白纯化后样品, 做系列稀释后每孔加入 100 μ L, 37°C 培养 24 h。吸弃上清, 用含 3% 牛血清的 DMEM 培养基稀释 VSV(水泡性口炎病毒)至工作浓度, 每孔加入 100 μ L, 感染细胞, 37°C, 5% CO_2 继续培养 24 h, 每样做 3 个复孔。结晶紫染色, 测定每孔的 $A_{578 \text{ nm}}$ 光吸收值, 分别计算各试验样品的半效稀释倍数, 即从样品溶液至相当于标准品 50%最大效应点的稀释倍数, 并按下式计算试验结果:

待检样品效价=标准品效价×(待检样品预稀释倍数/标准品预稀释倍数)×(待检样品半效稀释倍数/标准品半效稀释倍数)

1.6 融合蛋白的免疫学活性分析^[3]

采用细胞增殖实验检测融合蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。用 3H -TdR 掺入法, 取新鲜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% 小牛血清的 1640 培养液中, 向 96 孔板中加入 5×10^5 /孔的脾细胞和 5 μ g/mL 的 ConA。 CO_2 孵箱中 37°C 培养 6 h, 再加入不同浓度的融合蛋白和合成 TM- $\alpha 1$ 标准品, 继续培养 72 h, 每孔加入 3H -TdR 2 μ Ci 培养 6 h, 收获细胞于玻璃纤维滤纸上, 晾干后测定 cpm 值, 按下式计算增殖率:

增殖率(%)=[(实验组 cpm 值-对照组 cpm 值)/对照组 cpm 值]×100%

测定结果(cpm 值)用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 应用 SPSS10.0 for Windows 统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 融和基因克隆后的酶切鉴定

将融和基因克隆至原核表达质粒 pET-22b(+)中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选重组子后分离提取重组质粒, 经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 1%琼脂糖凝胶显示, 在分子量约为 650 bp 附近可清楚地观察到酶切出 DNA 条带(图 3), 表明已将融合基因(643 bp)成功克隆至原核表达质粒 pET-22b(+)中。

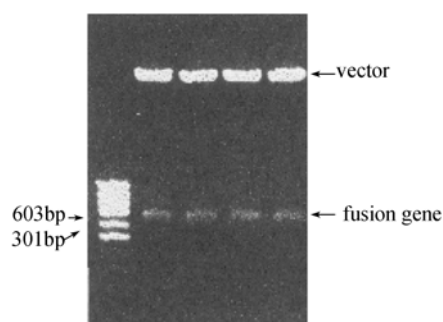


图 3 pET-TIN 的双酶切结果

Fig. 3 Electropherogram of double digestion for pET-TIN

2.2 融和蛋白的诱导表达

将重组质粒转化 BL21(DE3)-Codon plus-RP-X 宿主菌、筛选后, 在 LB 培养中、在 IPTG 诱导后, 15% SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色后, 可见明显的表达蛋白条带, 其分子量大小与理论预计值符合(图 4)。对可溶性表达情况分析表明, 融和蛋白以胞内可溶性表达和包含体表达 2 种形式, 但以可溶性胞内表达为主(图 4)。优化表达条件证实, 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h 为最佳(图 4)。在该表达条件下, 其胞内可溶性表达占大肠杆菌菌内可溶性蛋白的 20%以上(SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色、凝胶成像系统分析)。

2.3 融和蛋白的分离纯化

2.3.1 疏水柱层析(HIC)^[4]

将菌体破碎、硫酸铵沉淀后的样品通过 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水柱层析、梯度洗脱、分部收集。将样品、上样穿过峰、洗涤峰以及梯度洗脱中分部收集的样品同时进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色。结果表明, 虽在上样穿过峰(图 5, 泳道 2)、

洗涤峰中可能有少量融和蛋白丢失(图 5, 泳道 3), 但经梯度洗脱后, 可除去较多杂蛋白(图 5, 泳道 5、6、7、8、9)。

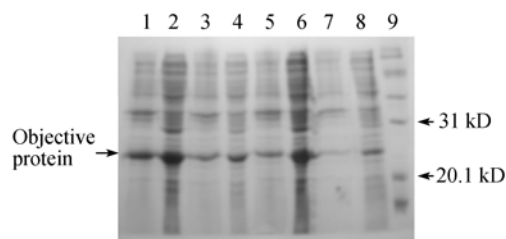


图 4 融合蛋白表达的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE for fusion protein expressed

1: inclusion body induced in 30 $^{\circ}$ C 4 h in bacteria broken; 2: supernatant induced in 30 $^{\circ}$ C 4 h in bacteria broken; 3: inclusion body induced in 30 $^{\circ}$ C 2 h in bacteria broken; 4: supernatant induced in 30 $^{\circ}$ C 2 h in bacteria broken; 5: inclusion body induced in 25 $^{\circ}$ C 4 h in bacteria broken; 6: supernatant induced in 25 $^{\circ}$ C 4 h in bacteria broken; 7: inclusion body induced in 25 $^{\circ}$ C 2 h in bacteria broken; 8: supernatant induced in 25 $^{\circ}$ C 2 h in bacteria broken; 9: MW marker for proteins



图 5 HIC 纯化融合蛋白的结果

Fig. 5 Electropherogram of HIC for fusion protein purification

1: sample; 2: passing peak; 3: washing peak; 4~9: fraction collection for gradient eluting peak; 10: MW marker for proteins

2.3.2 阴离子交换柱层析(Q 柱)^[4]

合并 HIC 柱层析经梯度洗脱、分部收集的样品, 通过阴离子交换柱层析(Q Sepharose Fast Flow), 经上样、洗涤、梯度洗脱、分部收集。将样品、上样穿过峰、洗涤峰以及梯度洗脱中分部收集的样品同时进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色。结果表明, 通过阴离子交换柱层析(Q 柱)对样品进一步纯化后, 样品中杂蛋白也越来越少且主要是目的蛋白即融合蛋白(图 6, 泳道 5、6、7、8)。

2.3.3 阳离子交换柱层析(SP 柱)

将 Q 柱层析分部收集的样品, 通过阳离子交换柱层析(SP Sepharose Fast Flow), 经上样、洗涤、梯度洗脱、分部收集。将样品、上样穿过峰、洗涤峰

以及梯度洗脱中分部收集的样品同时进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色, 结果见图 7。收集 6、7 管之洗脱收集液, 便于下一步纯化。

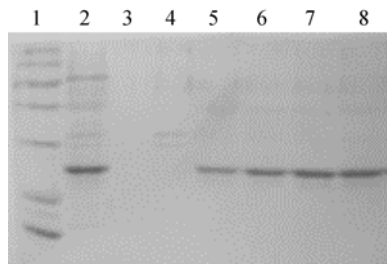


图 6 阴离子交换层析纯化融合蛋白的结果

Fig. 6 Electrophorogram of anion-exchange chromatography for fusion protein purification

1: MW marker for proteins; 2: sample; 3: passing peak; 4: washing peak; 5~8: fraction collection for gradient eluting peak

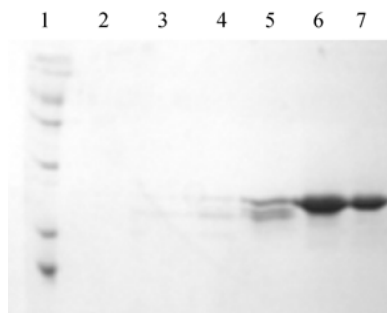


图 7 阳离子交换层析纯化融合蛋白的结果

Fig. 7 Electrophorogram of cation-exchange chromatography for fusion protein purification

1: MW marker for proteins; 2: passing peak; 3: washing peak; 4~7: fraction collection for gradient eluting peak

2.3.4 分子筛层析

将上述 SP 柱纯化分部收集之 6、7 管混和液, 通过分子筛层析(Sephadex G-75)进行最后的分离纯化, 分部收集流出峰, SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色, 结果见图 8。结果表明, 所纯化后的融合蛋白呈单一条带, 经凝胶成像系统分析显示, 融合蛋白纯度达到 96.4%。

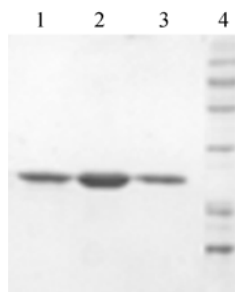


图 8 分子筛层次纯化融合蛋白的结果

Fig. 8 Electrophorogram of molecular exclusion chromatography for fusion protein purification

1~3: fraction collection for eluting peak; 4: MW marker for proteins

2.4 融合蛋白的抗病毒活性

采用细胞病变抑制法测定融合蛋白的对水泡性口炎病毒(VSV)的抑制活性, 并以市售 IFN- α 1b 和 IFN- α 2a 作为对照, 分别计算其比活性(u/mg), 结果表明, 融合蛋白的体外抗病毒活性优于 IFN-2a 或 IFN- α 1b(表 1)。因此, 通过大肠杆菌表达的融合蛋白具有很好的体外抗病毒活性。

表 1 融合蛋白的抗病毒活性

Table 1 Effect for antiviral of TM- α 1-IFN α -con

Sample	Specific activities(u/mg)
IFN- α 1b	0.9×10^7
IFN- α 2a	2.5×10^8
Fusion protein	4×10^8

2.5 融合蛋白的促小鼠脾淋巴细胞增殖活性

采用 ^3H -TdR 掺入法检测融合蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响, 通过与市售的合成 TM- α 1 对比, 计算小鼠脾淋巴细胞的增殖率。结果表明(表 2), 加入不同浓度的合成 TM- α 1 和融合蛋白, 在实验范围之内两组相比没有显著性差异($P>0.05$), 而与阴性对照组(生理盐水)相比均有显著差异($P<0.01$)。表明, 融合蛋白具有与合成 TM- α 1 相似的促小鼠脾淋巴细胞增殖活性。

表 2 融合蛋白的促淋巴细胞增殖活性

Table 2 Effect for promoting lymphocyte proliferation of TM- α 1-IFN α -con

Sample	concentration (mg/L)	Cpm ($\bar{X} \pm S$)	proliferation rate (%)	P
Synthetic TM- α 1	12.5	$29,3701 \pm 1,0562$	99	>0.05
	25	$30,6307 \pm 1,3825$	108	
	50	$31,6844 \pm 1,7896$	115	
	100	$28,7925 \pm 9682$	95	
Fusion protein	12.5	$29,7750 \pm 1,3825$	102	>0.05
	25	$33,6692 \pm 1,1485$	128	
	50	$31,0508 \pm 2,9036$	110	
	100	$29,4380 \pm 1,7253$	100	
saline		$14,7463 \pm 4681$		

3 讨论

将 2 种功能相同或相近的蛋白质或多肽以融合蛋白(fusion protein)的形式构成新的蛋白质, 近年来已有较多的研究报道^[5,6]。已经证明, 2 种蛋白质或多

肽中间通过连接肽(Linker)连接起来后,只要不影响或几乎不影响其各自的空间结构形成,即能各自发挥其生物学作用且具有协同作用的效力。TM- $\alpha 1$ 在水溶液中一般不表现出固定的结构,IFN- α 分子N端和C端都伸展在分子外部,TM- $\alpha 1$ 通过一亲水而又柔性的连接肽无论与IFN- α 融合N端或C端融合都不会导致两者在构象上的显著变化,但有关干扰素融合蛋白的文献证明,将一短肽融合于干扰素分子的N端更有利于其抗病毒活性的保留,同时由于融合蛋白的二硫键不再处于N端第一氨基酸位置,十分有利于二硫键的形成和稳定。对于TM- $\alpha 1$ 分子而言,融合于N端后与其前体胸腺素 α 原N端结构一致,一方面有利于其免疫学活性的保留,延长TM- $\alpha 1$ 分子的半衰期,另一方面由于其在水溶液中不表现出固定的结构,免疫原性也很弱。因此TM- $\alpha 1$ 与IFN融合优选方式为N端是TM- $\alpha 1$,C端为复合干扰素,中间通过连接肽连接而构成的融和蛋白。通过选择大肠杆菌偏爱的密码子,实现了在大肠杆菌表达系统中的可溶性高表达(可溶性表达量占细菌蛋白质的20%以上)。经过非亲和层析手段(包括疏水层析、离子交换层析、分子筛层析等)的应用,可使融合蛋白的纯度达到96%以上。经体外生物学活性分析表明,该融合蛋白的抗病毒活性优于市售的 α 干扰素(包括IFN $\alpha 1b$ 、IFN $\alpha 2a$),并具有与合成TM- $\alpha 1$ (日达仙)相同的促细胞增值活性。表明,所构建的融合蛋白具有双重的生物学活性。已有研究资料进一步证实,该融合蛋白具有良好的体外抗HBV作用,其体外抗HBV活性比联合应用TM- $\alpha 1$ 和干扰素 α 强,且细胞毒性明显低于联合应用TM- $\alpha 1$ 和干扰素 α ^[7,8]。基于该融合蛋白的上述特性,有望开发为新一代的有较好前景的抗病毒药物,进

一步的工作是研究其体内应用的效果。

REFERENCES

- [1] Saruc M, Yuceyar H, Kucukmetin N, *et al.* Combination thymosin-alpha 1 and interferon-alpha 2b in the treatment of anti-HBe-positive chronic hepatitis B in Turkey. *Hepato-gastroenterology*, 2002, **49**(45): 798-802.
- [2] Belaid A, Aouni M, Khelifa R, Trabelsi A, Jemmali M, Hani K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of Medical Virology*, 2002, **66**(2): 229-234.
- [3] Fu DX, Li DL, Li DJ, *et al.* The effect of Leptin on the proliferation of human circulating T lymphocytes. *Chinese Journal of Immunology*, 2006, **22**(7): 604-606, 611.
富东旭, 李大林, 李殿俊, 等. 瘦素对人类外周血T淋巴细胞增殖作用的影响. *中华免疫学杂志*, 2006, **22**(7): 604-606, 611.
- [4] Liu XJ, Liu FX, Qi HB. Experimental study on the purification of human Leptin. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, **9**(6): 162-164.
- [5] Scappaticci FA, Contreras A, Smith R, *et al.* Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis*, 2001, **4**(4): 263-268.
- [6] Huang Y, Rao Y, Feng C, *et al.* High-level expression and purification of Tat-haFGF(19-154). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **77**(5): 1015-1022.
- [7] Lu NF, Huang AL, Zheng RQ, *et al.* Anti-HBV effect of fusion protein (TA1-IFN) *in vitro*. *Chin J Hepatol*, 2005, **13**(4): 252-254.
卢年芳, 黄爱龙, 郑瑞强, 等. 融合蛋白胸腺素 $\alpha 1$ -干扰素 α 抗乙型肝炎病毒活性的实验研究. *中华肝脏病杂志*, 2005, **13**(4): 252-254.
- [8] Lu NF, Huang AL, Tang N, *et al.* The effect for expression of antigen in 2.2.15 cell of fusion of TM- $\alpha 1$ and IFN α -con. *Chin J Infect Dis*, 2006, **24**(3): 199-202.
卢年芳, 黄爱龙, 唐霓, 等. 融合蛋白胸腺素 $\alpha 1$ -干扰素 α 与干扰素 α 对2.2.15细胞抗原表达的影响. *中华传染病杂志*, 2006, **24**(3): 199-202.

更正

本刊第24卷第4期547页刊登的张莹莹, 朱恒奇, 等作者的文章“小鼠泛素结合酶UBE2W的抗体制备及组织表达谱分析”一文, 作者需作如下更正:

原通讯作者为“周晓巍”, 现改为“周晓巍, 黄培堂”二人共同为通讯作者。