

重组胸腺素 1 的表达、纯化和生物学活性

苗红, 郭葆玉*, 张冉, 张莉

(第二军医大学药学院生化药教研室, 上海 200433)

摘要 为获得重组人胸腺素 1 (recombinant thymosin 1, T1), 采用融合表达方式表达 T1 基因, 重组融合表达载体 T1/pGEX-4T1 转化大肠杆菌 DE3 (lys) 构建工程菌. 对工程菌进行补料分批培养并诱导表达, 得到目的蛋白的可溶性表达. 亲和层析纯化融合蛋白 GST-T1, 经凝血酶裂解融合蛋白, 亲和层析除去 GST, SourceQ 离子交换, 得到 T1 单体, 得率为 30 mg/L 发酵液. 生物学活性分析显示, 重组 T1 能显著促进小鼠脾细胞增殖 ($P < 0.01$), 其活性与天然 T1 相似.

关键词 胸腺素 1, 融合表达, 纯化, 生物学活性

中图分类号 Q78, Q253

Expression, Purification and Bioactivity of Recombinant Thymosin 1

MIAO Hong, GUO Bao-yu*, ZHANG Ran, ZHANG Li

(Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract In order to produce recombinant thymosin 1 (T1), the recombinant plasmid T1/pGEX-4T1 was transformed into *E. coli* DE3 (lys) and high-level expression of soluble target protein was obtained by fed-batch culture. The fusion protein was purified by affinity chromatography. T1 was released after thrombin cleavage of the fusion protein. GST protein was removed by affinity chromatography, then T1 was purified by ion exchange chromatography. The recovery rate of the final product was about 30 mg/L fermentation volume. Biological activity assay showed that purified T1 could stimulate the proliferation of mice spleen cells with similar bioactivity to synthetic T1.

Key words Thymosin 1, fusion expression, purification, bioactivity

胸腺素 1 (thymosin 1, T1) 是由 28 个氨基酸组成的酸性多肽, 等电点 4.2, 相对分子量 3 108, 其氨基酸序列为: N-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-C^[1]. T1 具有免疫增强活性, 可以促进 T 淋巴细胞的成熟和分化^[2], 促进成熟的 T 细胞、NK 细胞分泌 IL-2、INF 等^[3]. 此外, T1 还具有刺激血管内皮细胞迁移, 促进血管生成和伤口愈合^[4]等作用. 目前 T1 已用于乙型肝炎、丙型肝炎^[5]、恶性肿瘤^[6]及免疫缺陷疾病^[7]等的临床治疗和研究中.

小分子肽的表达通常比较困难, 我们采取融合表达方式, 构建了 pGEX-T1 融合表达载体. 在此基础上, 我们将重组质粒转入大肠杆菌 DE3, 对工程菌进行发酵培养并进行 T1 的分离纯化和生物学活性研究, 为利用基因工程方法生产 T1 探索新的工艺流程.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体与菌株 融合表达载体 T1/pGEX-4T1 由本室构建和保存, 宿主菌 *E. coli* DE3 (lys) 由本室保存, 其基因型为 *hsdSgal* (*cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1*).

1.1.2 仪器及试剂 AKIA explorer 蛋白纯化仪、Gutathione-Sepharose 4B、SourceQ (Pharmacia 公司), NBS-MICROS15L. T. D. R 生物反应器 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC LTD). 酵母提取物、胰化蛋白胨 (OXID 公司), 凝血酶 (Sigma 公司), 日达仙 (合

收稿日期: 2002-11-20, 接受日期: 2003-01-09

* 联系人: Tel: 021-25070398, E-mail: byguo163@163.net

苗红, 女, 1968 年 8 月生, 硕士, 讲师

Received: November 20, 2002; Accepted: January 9, 2003

* Corresponding author Tel: 021-25070398, E-mail: byguo163@163.net

成 T₁ (Sciclone 公司),其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验动物 BALB/c 小鼠,由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白 GST-T₁ 的表达 表达载体 T₁/pGEX-4T-1 转化 DE3 (lys) 构建工程菌,37℃ 摇菌培养至 A_{600} 0.5~0.6,加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导 5 h, SDS-PAGE 分析目的蛋白表达结果。

1.2.2 工程菌的发酵培养 采用补料分批培养,发酵体积为 5 L, 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h。

1.2.3 融合蛋白 GST-T₁ 的分离纯化 菌体按每克湿菌 10 ml 的比例加入 PBS,涡旋混匀,冰浴中超声破碎菌体,离心 10 000 r/min, 15 min,取上清液上 Gutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱,PBS 洗至基线,以 50 mmol/L Tris (pH 8.0)、10 mmol/L GSH 洗脱,收集洗脱峰。

1.2.4 融合蛋白的裂解和 T₁ 的分离纯化 融合蛋白 GST-T₁ 对 PBS 透析,加入凝血酶,28℃ 酶切 4 h.裂解液过 Gutathione-Sepharose 4B 亲和柱,收集流出峰.流出液对 50 mmol/L Tris (pH 7.5) 脱盐,上 SourceQ 阴离子交换柱,0~0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱,130 mmol/L NaCl 收集洗脱峰。

1.2.5 纯化产品的鉴定 采用 Laemmli 不连续 SDS-PAGE,17% 分离胶,考马斯亮蓝染色。

1.2.6 细胞增殖实验^[8] 取小鼠脾脏,用无菌注射器芯将脾脏挤压过 200 目的钢丝网,得到单个细胞.用含 10% 小牛血清的 1 640 培养液将脾细胞配成 5×10^6 个细胞/ml,将细胞悬液以 200 μ l/孔铺 96 孔板,每孔加 5 μ l 不同浓度的纯化 T₁ 及合成 T₁,复 3 孔,并设对照.37℃,5% CO₂ 温箱中培养 72 h, MTT 法测定。

2 结果

2.1 融合蛋白的诱导表达

工程菌 *E. coli*DE3/pGEX-T₁ 诱导表达的 SDS-PAGE 分析见 Fig. 1. 与未诱导相比,IPTG 诱导后,在分子量约 3.1×10^4 处出现明显的表达条带。

2.2 工程菌的发酵培养

1 mmol/L IPTG 诱导 4 h,最终菌体密度 A_{600} 约为 25,融合蛋白的表达量占菌体总蛋白 20%。

2.3 GST-T₁ 融合蛋白的纯化

诱导后收集菌体,按每克湿菌加入 10 ml PBS,冰浴中超声破碎菌体细胞,离心后,取上清过 Gutathione-Sepharose 4B 柱,弃去穿过峰,用含 10

mmol/L 还原型谷胱甘肽的缓冲液洗脱,收集洗脱峰,得 GST-T₁ 融合蛋白 (Fig 3),得率为 0.4 g/L 发酵液。

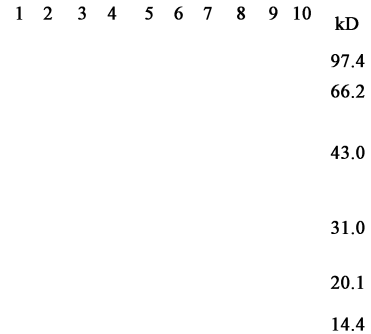


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of GST-T₁ expression

1,7:Control (uninduced); 2-6,8,9:Clone induced with IPTG; 10:Protein standard marker

2.4 GST-T₁ 融合蛋白的酶切及 T₁ 的纯化

融合蛋白的 GST 与 T₁ 间设计有凝血酶酶切位点,凝血酶酶切后可释放出 T₁ 单体. GST-T₁ 融合蛋白对 PBS 透析,调整蛋白浓度为 2 mg/ml,按每单位凝血酶酶切 100 μ g 融合蛋白的比例加入凝血酶,28℃ 反应 4 h,在此条件下酶切较完全 (Fig. 3). 酶切裂解液过 Gutathione-Sepharose 4B 柱,收集含 T₁ 的穿过峰,并对 50 mmol/L Tris (pH 7.5) 换液,上 SourceQ 阴离子交换柱,用 0~0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱,在 130 mmol/L NaCl 处收集洗脱峰,得 T₁ 单体,约 30 mg/L 发酵液.纯化 T₁ 进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色呈单一条带 (Fig. 4)。

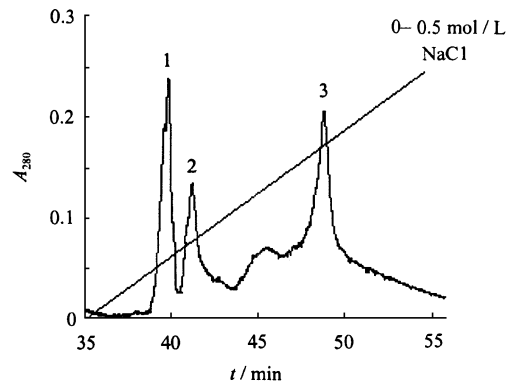


Fig. 2 Anion ion exchange chromatography for T₁ purification

Peak 1: T₁; Peak 2 and Peak 3:Impurities

2.5 脾细胞增值实验

与对照相比,纯化的 T₁ 在 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} mol/L 浓度均对小鼠脾细胞增殖具有显著促进

作用 ($P < 0.01$), 其活性与进口合成 T₁ 制剂相似 (Table 1).

kD	1	2	3	4	5
97.4					
66.2					
43.0					
31.0					
20.1					
14.4					

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified GST-T₁ and T₁

1: Standard molecular marker; 2: Purified T₁; 3: Flowthrough of affinity chromatography after thrombin cleavage; 4: Fusion protein cleaved with thrombin; 5: GST-T₁ fusion protein

kD	1	2	3
97.4			
66.2			
43.0			
31.0			
20.1			
14.4			

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified T₁

1: Standard molecular marker; 2: Synthetic T₁; 3: Purified T₁

Table 1 Effect of T₁ on the proliferation of mice spleen cells

c/mol L ⁻¹	A ₆₃₀	
	Purified T ₁	Synthetic T ₁
10 ⁻⁷	0.185 ± 0.021 ¹⁾ , ²⁾	0.153 ± 0.012 ¹⁾
10 ⁻⁸	0.160 ± 0.020 ¹⁾	0.167 ± 0.000 ¹⁾
10 ⁻⁹	0.177 ± 0.019 ¹⁾	0.178 ± 0.016 ¹⁾
10 ⁻¹⁰	0.146 ± 0.001 ¹⁾	0.146 ± 0.002 ¹⁾
10 ⁻¹¹	0.121 ± 0.000	0.118 ± 0.015
10 ⁻¹²	0.122 ± 0.011	0.109 ± 0.005
Control	0.123 ± 0.012	

$n = 6$, ¹⁾ $P < 0.01$, compared with control;

²⁾ $P < 0.01$, compared with synthetic T₁

3 讨论

T₁ 作为一种免疫增强剂, 临床应用广泛, 目前

国内临床所用的 T₁ 单体均为进口化学合成制剂, 价格昂贵. 利用基因工程方法生产胸腺素 1 的研究也在进行中, 主要采用融合表达串联 T₁ 拷贝的方法^[9-11]. 本研究与已报道的重组 T₁ 的制备方法相比具有以下优点: 一是采用 GST 融合表达系统, 构建的工程菌 DE3/pGEX-T₁ 以可溶形式表达融合蛋白, 超声破碎菌体细胞后可从直接上清中提取融合蛋白, 无需使用变性剂如盐酸胍等溶解细菌细胞, 避免了处理包涵体所需的变性及复性过程, 操作简便, 也有利于保持蛋白的生物学活性; 二是在纯化中采用了两次亲和层析, 首先是亲和层析纯化融合蛋白, 由于特异性高, 蛋白纯度好, 有利于酶切后的纯化. 我们采用与亲和层析的平衡液相同的酶切缓冲液, 酶切后无需换液直接进行第二次亲和层析, T₁ 不再与 Gutathione-Sepharose 4B 结合而存在于流出液中, 而酶切产生的 GST 则被吸附在亲和柱上, 这样就可将酶切后产生的最主要的杂蛋白除去, 使目的蛋白的纯度大大提高, 为后续纯化减轻了压力, 再通过一步离子交换层析, 便可得到较纯的 T₁. 三是 T₁ 单体的释放采用凝血酶裂解, 避免了化学裂解法可能造成的环境污染、操作人员损伤以及有害化合物残留的不利影响. 四是天然 T₁ 的 N 端为乙酰化, 本研究制备的重组产物的 N 端未乙酰化, 是天然 T₁ 的衍生物, 一般来说, N-乙酰化可增加 T₁ 在体内的稳定性, 未乙酰化 T₁ 的体内稳定性有待进一步研究. 对未乙酰化的重组产物, 可尝试改变剂型和/或给药途径以促进疗效, 这对于创新药物的研发具有较好的前景.

我们采用 GST 融合表达系统在大肠杆菌表达小分子肽 T₁, 工程菌经诱导培养后获得了 T₁ 的可溶性表达, 表达水平较好. 下游分离和纯化程序简便, 易于放大, 为基因工程方法大规模生产 T₁ 打下了基础.

参考文献 (References)

- Goldstein A L, Low T L, McAdoo M, McClure J, Thurman G B, Rossio J, Lai C Y, Chang D, Wang S S, Harvey C, Ramel A H, Meienhofer J. Thymosin alpha 1: isolation and sequence analysis of an immunological active thymic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(2): 725 ~ 729
- Knutsen A P, Freeman J J, Mueller K R, Roodman S T, Bouhasin J D. Thymosin-alpha1 stimulates maturation of CD34⁺ stem cells into CD3⁺ 4⁺ cells in an *in vitro* thymic epithelia organ coculture model. *Int J Immunopharmacol*, 1999, **21**(1): 15 ~ 26
- Weck R K, May L, Weck C J. Gamma interferon production by different populations of human splenic lymphocytes. *J Interferon Res*, 1983, **3**(1): 121 ~ 128

- 4 Malinda KM, Sidhu GS, Banaudha K K, Gaddipati J P, Maheshwari R K, Goldstein A L, Kleinman H K. Thymosin alpha 1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis, and wound healing. *J Immunol*, 1998, **160**(2): 1001 ~ 1006
- 5 Ancel C D, Phipps J, Young L. Thymosin alpha 1. *Am J Health Syst Pharm*, 2001, **58**: 879 ~ 885
- 6 Salvati F, Rasi G, Portalone L, Antilli A, Garaci E. Combined treatment with thymosin-alpha1 and low-dose interferon-alpha after ifosfamide in non-small cell lung cancer: a phase-II controlled trial. *Anticancer Res*, 1996, **16**(2): 1001 ~ 1004
- 7 Ramachandran R, Katzenstein D A, Winters M A, Kundu S K, Merigan T C. Polyethylene glycol-modified interleukin-2 and thymosin alpha 1 in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 1996, **173**(4): 1005 ~ 1008
- 8 邱磊, 郭葆玉, 苗红, 道书艳, 张冉, 杨旭. 重组人胸腺素原 生物活性的体外研究. 中国药学杂志 (Qiu L, Guo B Y, Miao H, Dao S Y, Zhang R, Yang X. Study on the biological activity of recombinant human prothymosin *in vitro*. *Chin Pharm J*), 2002, **37**(4): 307 ~ 309
- 9 赵永同, 石继红, 赵宁, 王俊楼, 颜真, 韩苇, 张英起. 胸腺素 1-硫氧还蛋白融合蛋白基因的表达及其生物学功能的初步研究. 药物生物技术 (Zhao Y T, Shi J H, Zhao N, Wang J L, Yan Z, Han W, Zhang Y Q. Expression and biological activities of thymosin alpha 1-thioredoxin fusion protein. *Pharm Biotechnol*), 2001, **8**(2): 67 ~ 71
- 10 石继红, 张英起, 赵永同, 赵宁, 朱宝娥, 颜真, 韩苇. 胸腺素 1 基因的克隆表达及其生物学活性. 中国生物化学与分子生物学报 (Shi J H, Zhang Y Q, Zhao Y T, Zhao N, Zhu B E, Yan Z, Han W. Cloning expression of thymosin alpha 1 gene in *E. coli* and its purification and characterization. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17**(3): 344 ~ 349
- 11 胡学军, 张志超, 包永明, 杨青, 安利佳. 小肽多拷贝基因表达载体的构建及其高效表达. 中国生物化学与分子生物学报 (Hu X J, Zhang Z C, Bao Y M, Yang Q, An L J. A series of pEF-derived vectors for high-level expression of the gene of multiple copies smaller peptide in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2002, **18**(3): 287 ~ 292

血中 ADMA 浓度可预报子痫前期的发生

研究者发现,在发生子痫前期以及发生妊娠晚期并发症的某些孕妇中,有一种使血管收缩的天然化合物含量过多.测试这种化合物可帮助医生在孕妇发生高血压或其他症状之前确定其发生子痫前期的危险性.今年早期时候鉴定了一种蛋白质,可引起子痫前期,现在发现的该化合物可能与这种蛋白质一样在引起子痫前期中起作用.新研究所发现的天然化合物称为不对称二甲基精氨酸(ADMA),其作用是抑制血管扩张剂—氧化氮的产生.子宫内的血管必须扩张才能给胎儿供应足够的氧和营养.医生诊断子痫前期的根据通常是孕妇有高血压,同时有面部、手足水肿、以及尿中蛋白增加.在最严重的病例中,子痫前期发展为子痫,孕妇表现为高热、抽搐和昏迷.子痫使全球每年有50 000名孕妇死亡.由于怀疑子痫前期的高血压与ADMA有关,研究者以无并发症的、妊娠中期的孕妇中收集血样.医生用超声测定每位孕妇手臂的血流来测量全身血管的缩窄情况.研究者认为,该测量法可代表胎盘的血流情况,胎盘是母亲与胎儿的接触界面.科学家从测量的孕妇中挑选出43个有正常血流的孕妇和43个有缩窄血管血流情况的孕妇.血样测定的结果显示,有缩窄血管血流情况的孕妇,其ADMA浓度比正常血流的孕妇平均高出3倍.所有正常血流的孕妇经历正常的妊娠与正常的生育.其余孕妇中稍过一半的人产生并发症,43名有缩窄血管血流的孕妇中,有10人最后诊断为子痫前期,另有14人发生子宫内生长限制的并发症,即胎儿小于一般尺寸.在最后发展为子痫前期的10位孕妇中,其血样中ADMA的量与其血管较严重的缩窄有关.除此10名孕妇以外,孕妇血中ADMA量与血管较严重的缩窄的关系不太清楚.研究者指出,在发生子痫前期前约10个星期便有ADMA浓度升高,提示高浓度ADMA可能是子痫前期的早期警示信号,甚至是子痫前期的病因.研究者在2003年5月3日的*Lancet*上报道了该发现.同时测试血流情况与ADMA浓度,在预报子痫前期上,比单独测试其中之一为佳.目前,治疗子痫前期唯一是使孕妇能生育,尽管卧床休息、控制血压和抗惊厥药物都能延长妊娠期.这样的治疗对于处在子痫前期高危险性的孕妇来说,是在婴儿分娩前稍多争取一点时间.该研究也有助于科学家了解子宫血流与妊娠并发症的关系,而结果必将引起研究者来研究缺乏血管衬里细胞所制造的氧化氮是否会引起妊娠疾患.

(李潇 摘译自 N. Seppa: *Science News*, Vol. 163, May 10, 2003, p. 293)