

徐亚维,李福新,薛建,等.重组人胸腺肽 $\alpha$ 原在单一蛋白生产系统中的高效表达[J].江苏农业科学,2017,45(22):38-40.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.009

# 重组人胸腺肽 $\alpha$ 原在单一蛋白生产系统中的高效表达

徐亚维,李福新,薛建,王霞

(吉林农业科技学院生物工程学院,吉林吉林 132101)

**摘要:**利用冷休克表达载体构建含有人胸腺肽 $\alpha$ 原(proT $\alpha$ )编码基因的质粒并在大肠杆菌单一蛋白生产(SPP)系统中表达单一的可溶性蛋白。以 proT $\alpha$  mRNA 基因序列为模板敲出 ACA 序列,设计并合成 proT $\alpha$ -lessACA 目的基因片段后,直接克隆到原核冷休克表达载体 pCold II(sp-4)上,将 pCold II(sp-4)-proT $\alpha$ -lessACA 质粒转化到 *Escherichia coli* BL21 感受态细胞中,筛选阳性克隆后采用 *Nde* I 和 *Hind* III 限制性内切酶双酶切鉴定。共转 pMazF 质粒后,采用冷休克方法表达 proT $\alpha$  并采用 SDS-PAGE 检测鉴定。结果成功构建重组表达质粒 pCold II(sp-4)-proT $\alpha$ -lessACA,经冷休克表达后在 *E. coli* BL21(DE3)菌中获得大量单一的 proT $\alpha$ 。原核表达质粒 pCold II(sp-4)-proT $\alpha$ -lessACA 构建和单一 proT $\alpha$  在 SPP 系统中表达的成功,为进一步研究 proT $\alpha$  结构和生理功能提供帮助。

**关键词:**人胸腺肽 $\alpha$ 原;单一蛋白生产系统;冷休克表达

**中图分类号:** Q786

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2017)22-0038-02

胸腺肽(thymosin)是一组由胸腺组织分泌的具有调节和增强人体细胞免疫功能的生物活性肽,能促使有丝分裂原激活后的外周血中的 T 淋巴细胞成熟,主要包括胸腺五肽、胸腺肽 $\alpha$ 和胸腺肽 $\beta$ 等<sup>[1]</sup>。其中由 Goldstein 等在 1977 年首次分离获得具有 28 个氨基酸组成的胸腺肽 $\alpha$ 1(thymosin alpha 1, T $\alpha$ 1),效果尤为显著<sup>[2]</sup>,主要分布于胸腺上皮细胞,也存在于淋巴、脑、脾、肺、肾等组织细胞中<sup>[3]</sup>。T $\alpha$ 1 在机体免疫应答中发挥重要作用,可以促进干扰素及各种淋巴介素的分泌,增强自然杀伤细胞介导的细胞毒性,是一种强效的细胞免疫增强剂<sup>[4]</sup>,广泛应用于治疗抗生素不能有效控制的严重感染,恶性肿瘤所致的免疫功能低下,乙型肝炎、丙型肝炎及其并发症等<sup>[5]</sup>。T $\alpha$ 1 最初从动物胸腺中提取,这种制备方法由于原料来源有限、含量极低、纯化工艺复杂等原因逐渐被淘汰。目前临床上所用的 T $\alpha$ 1 均为人工化学合成制备,但化学合成生产成本较高,合成的杂质较多,不易纯化,还会造成环境污染<sup>[6]</sup>。因此,采用基因工程方法制备 T $\alpha$ 1 势在必行。目前, T $\alpha$ 1 虽然通过细菌或酵母菌表达成功<sup>[7]</sup>,但一直未能真正实现产业化,其主要原因是 T $\alpha$ 1 分子量太小,难于大量表达和纯化。现有研究表明胸腺肽 $\alpha$ 原(prothymosin alpha, proT $\alpha$ )在体内被修饰后具有与 T $\alpha$ 1 相同的作用<sup>[8]</sup>,故而可以考虑表达分子量较大的 proT $\alpha$  作为新的目的蛋白。

单一蛋白生产(single protein production, SPP)系统是近几年以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)为宿主开发的一种可高效生产单一蛋白的表达系统<sup>[9]</sup>。该系统含有一种核糖

核酸内切酶 MazF,可专一性地识别菌体 mRNA 中 ACA 序列并将其切断,将菌体内所有含有 ACA 序列的 mRNA 降解,剔除目的基因中的 ACA 序列全部,而不改变氨基酸序列,其转录的 mRNA 则不能被 MazF 所降解。这样在 SPP 系统中就可以单一地表达目的蛋白,而没有明显的背景细胞蛋白合成。本研究利用冷休克载体 pCold II(sp-4)构建含有 proT $\alpha$  基因的质粒,并将其与 pMazF 质粒共转于 *E. coli* BL21(DE3)菌株中,实现单一 proT $\alpha$  的高效表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

pMzaF 和 pColdII(sp-4)购于宝生物工程(大连)有限公司。*E. coli* BL21(DE3)由笔者所在实验室保留。

### 1.2 试剂

胰蛋白酶、酵母粉购于 Oxiod 公司,质粒提取试剂盒(*E. Z. N. A.*® Plasmid Mini Kit I)购于 OMEGA 公司,限制性内切酶购于宝生物工程(大连)有限公司;SYBR® Green I 购于 Invitrogen 公司,蛋白质分子量标准购于 GE 有限公司,10 kb GeneRuler DNA Ladder Mix 购于 Fermentas 公司,其他化学试剂均购于北京化工厂。

### 1.3 主要仪器

DYY-5 型电泳仪(北京市六一电子仪器厂),Universal Hood II 型凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司),HZQ-X100 型恒温振荡培养箱(黑龙江哈尔滨东联电子技术开发公司),JY99-2D 型超声波细胞破碎仪(浙江宁波新芝生物科技股份有限公司)。

### 1.4 试验方法

**1.4.1 pCold II(sp-4)-proT $\alpha$ -lessACA 质粒的构建** 根据人源 proT $\alpha$  的 mRNA 序列(GenBank:M14794.1)设计在 SPP 系统中表达的 proT $\alpha$  基因序列,采用 *E. coli* 通用密码子将 T $\alpha$  原中的 ACA 碱基序列敲除并由上海海捷瑞生物科技有限公司合成 pGH-proT $\alpha$ -lessACA 质粒。将 pGH-proT $\alpha$ -lessACA

收稿日期:2016-05-11

基金项目:吉林省教育厅“十二五”社会科学研究项目(编号:吉教科合字[2014]第 390 号);吉林农业科技学院重点学科培育项目(编号:吉农院合字[2013]第 X004 号);大学生创新项目(编号:[2013]第 152 号);模块化实验教学体系构建与实验室建设项目。

作者简介:徐亚维(1974—),女,吉林吉林人,博士,副教授,从事生物工程研究。Tel:(0432)63509075;E-mail:xuyaweilucky@163.com。

质粒与 pColdⅢ (sp-4) 质粒用 *Nde* I 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后凝胶回收目的基因与载体基因,再用 T4 DNA 连接酶进行连接。双酶切体系: pGH-proTα-lessACA 与 pColdⅢ (sp-4) 10 μL, 10 × Buffer 2 μL, *Nde* I 1 μL, *Hind* Ⅲ 1 μL, H<sub>2</sub>O 6 μL, 37 °C 温育 4 h。连接体系: 双酶切后的 proTα-lessACA 基因 4.5 μL, 双酶切后的 pColdⅢ (sp-4) 1.5 μL, H<sub>2</sub>O 1.5 μL, 10 × 连接缓冲液 1 μL, T4 DNA 连接酶 0.5 μL, 16 °C 连接 16 h 后凝胶回收 pColdⅢ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒。最后将 pColdⅢ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒经 CaCl<sub>2</sub> 法转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株中,再经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定和酶切鉴定。其表达的 proTα 的氨基酸序列为 MSDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEE AENGRDAPANGNANEENGEQADNEVDDEEEEGGEEEEEE GDGEEEDGDEDEEAESATGK。

1.4.2 proTα 在 SPP 系统中的表达与鉴定 将 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。经氨苄青霉素筛选后,再将 pMzF 质粒转入已含有 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,氯霉素筛选后获得共转细胞。采用冷体

克表达方法。挑取阳性克隆,接种于 5 mL LB 培养基 (含 100 μg/mL Amp 和 34 μg/mL Cm) 中,37 °C 振荡培养至  $D_{600\text{nm}}$  为 0.5 左右,接种于 100 mL LB (含 100 μg/mL Amp 和 34 μg/mL Cm) 液体培养基中,37 °C 振荡培养至  $D_{600\text{nm}}$  为 0.4 左右,加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L),16 °C 诱导表达 5 d。在表达 0、8、16、24、48、72、96、120 h 时,6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,50 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 缓冲液洗菌体后离心收集,加入 4 倍体积 50 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 缓冲液重悬超声后的破碎菌体,12 000 r/min 离心 30 min,上清用 0.45 mm 滤膜过滤,采用 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 Tα1 的表达<sup>[10]</sup>。采用考马斯亮蓝法测蛋白表达量,用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作为标准<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒基因的设计

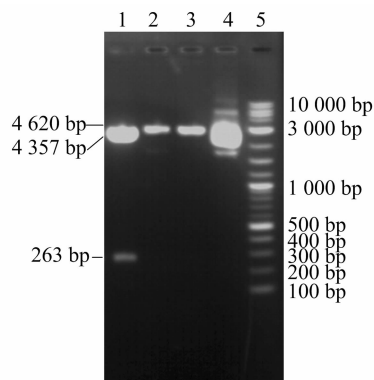
设计适于在 SPP 系统中表达的 proTα 基因序列,采用 *E. coli* 通用密码子将 proTα 中的 ACA 碱基序列全部敲除,其基因序列见图 1。

proTα mRNA	ATGTCAGACGCAGCCGTAGACACCAGCTCCGAAATCACCACCAAGGACTT	50
proTα-lessACA mRNA	ATGTCAGACGCAGCCGTAGATACCAGCTCCGAAATCACCACCAAGGACTT	50
proTα mRNA	AAAGGAGAAGAAGGAAGTTGTGGAAGAGGCAGAAAATGGAAGAGACGCCCC	100
proTα-lessACA mRNA	AAAGGAGAAGAAGGAAGTTGTGGAAGAGGCAGAAAATGGAAGAGACGCCCC	100
proTα mRNA	CTGCTAACGGGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAGCAGGAGGCTGACAAT	150
proTα-lessACA mRNA	CTGCTAACGGGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAGCAGGAGGCTGATAAT	150
proTα mRNA	GAGGTAGACGAAGAAGAGGAAGAAGGTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAAGA	200
proTα-lessACA mRNA	GAGGTAGACGAAGAAGAGGAAGAAGGTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAAGA	200
proTα mRNA	AGAAGGTGATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATGAAGATGAGGAAGCTGAGT	250
proTα-lessACA mRNA	AGAAGGTGATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATGAAGATGAGGAAGCTGAGT	250
proTα mRNA	CAGCTACGGGCAAG	264
proTα-lessACA mRNA	CAGCTACGGGCAAG	264

图1 敲出ACA序列前后proTα基因序列比对

### 2.2 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒的鉴定

构建的 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* Ⅲ 单/双酶切后由 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果说明质粒构建成功 (图 2)。



1—10 kb GeneRuler DNA Ladder, 2—pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA, 3—pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA+Nde I, 4—pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA+Hind Ⅲ, 5—pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA+Nde I +Hind Ⅲ

图2 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒限制性内切酶单/双酶切电泳

### 2.3 proTα 的冷体克表达与鉴定

共转化 pCold Ⅱ (sp-4)-proTα-lessACA 质粒和 pMzF 质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 受到 IPTG 诱导后开始表达 Tα1。

分别收集 0、8、16、24、48、72、96、120 h 的可溶性蛋白,理论上即为 SPP 系统表达的纯蛋白,Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定结果见图 3。结果显示,在表达的第 2 天即可表达较纯的可溶性蛋白,说明 Tα1 可以在 SPP 系统成功表达。在诱导 120 h 后,在上清液中的可溶性蛋白的最终产率为  $16.27 \pm 0.94$  mg/L (BSA 标准曲线为  $y = 0.00526x + 0.07003$ ,  $r^2 = 0.9998$ )。人源性 proTα 的理论分子量为 9.45 ku,而在 SPP 系统中所表达的 proTα 由于在其 N 端增加了转录增强元件 (transcription enhancer element, TEE) 和 6 × His 标签共 11 个氨基酸,因此其理论分子量增加至 10.97 ku。

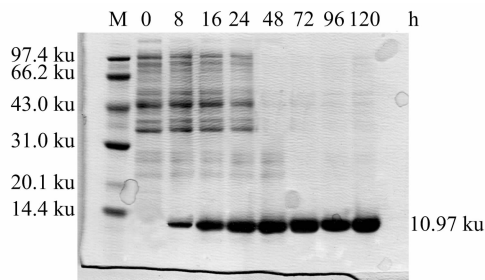


图3 Tα1 在 SPP 系统中表达的 Tricine-SDS-PAGE 电泳

## 3 结论

采用共转化法建立的 SPP 表达系统能够在 *E. coli* 中正确高效表达 proTα,其产量可达 16 mg/L。通过 SPP 系统表达最

李晓刚,李 慧,杨青松,等. 杜梨 bHLH 转录因子家族两成员的序列特征及对非生物胁迫的转录响应[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):40-45. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.010

# 杜梨 bHLH 转录因子家族两成员的序列特征 及对非生物胁迫的转录响应

李晓刚,李 慧,杨青松,蔺 经,常有宏

(江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

**摘要:**为探索杜梨(*Pyrus betulaefolia* Bunge)bHLH 转录因子家族的序列特征及表达特点,以 8 叶期杜梨幼苗为材料,克隆获得 2 个 bHLH 转录因子 bHLH122-1 和 bHLH122-2,采用 qPCR 方法研究它们在非生物胁迫下的表达情况。结果表明,bHLH122-1 和 bHLH122-2 开放阅读框为 1 302 bp 和 1 251 bp,编码的蛋白分别含 433 个和 416 个氨基酸残基,分别与苹果的 MdbHLH122 的同源性最高(83.49% 和 93.51%)。bHLH122-1 和 bHLH122-2 主要在叶中表达,盐、干旱以及渗透胁迫均能诱导 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 的表达,但它们对 ABA 处理并无转录响应。此外,PbbHLH122-2 对上述逆境的应答要早于 PbbHLH122-1,而 PbbHLH122-1 的表达量大于 PbbHLH122-2。综上所述,bHLH122-1 和 bHLH122-2 均参与杜梨叶片对非生物胁迫的防御机制,该机制不受 ABA 信号调控,并且 PbbHLH122-1 和 PbbHLH122-2 在逆境条件下发挥的作用可能略有不同。

**关键词:**杜梨;bHLH122 转录因子;非生物胁迫;表达特征

**中图分类号:**S661.201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)22-0040-06

bHLH(basic Helix-Loop-Helix,碱性-螺旋-环-螺旋)转录因子是真核生物中广泛存在的一大类转录因子,通

收稿日期:2017-04-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31372051);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)5018]。

作者简介:李晓刚(1976—),男,江苏睢宁人,博士,副研究员,主要从事果树栽培与育种工作。E-mail:xiaogangli@aliyun.com。

通信作者:常有宏,研究员,主要从事果树栽培与育种工作。

E-mail:cyh@njau.edu.cn。

终制备获得了大量的 proTα,可以省去纯化蛋白的步骤,大大节省了纯化所需的人力、物力和时间。采用 SPP 系统表达的 proTα 经 RP-HPLC 分析,纯度可达 97% 以上。采用 SPP 系统冷休克表达 proTα 工艺简单,整个过程约在 1 周内完成,不需要纯化过程即可获得纯度较高的产品,为利用基因工程方法大量制备 proTα 提供了一种简便而又切实可行的方法。

## 参考文献:

- [1] Zhang W, Zhang C, Lv Z, et al. Molecular characterization, tissue distribution, subcellular localization and actin-sequestering function of a thymosin protein from silkworm [J]. PLoS One, 2012, 7(2):e31040.
- [2] Goldstein A L, Low T L, McAdoo M, et al. Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(2):725-729.
- [3] Li C, Bo L, Liu Q, et al. Thymosin alpha1 based immunomodulatory therapy for sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Infect Dis, 2015, 33(C):90-96.
- [4] Serafino A, Pierimarchi P, Pica F, et al. Thymosin α1 as a stimulatory agent of innate cell-mediated immune response[J]. Ann N Y Acad

Sci, 2012, 1270(1):13-20.

过特定的氨基酸残基与靶基因相互作用,进而调节相关基因的表达<sup>[1]</sup>。bHLH 转录因子家族成员在植物中数量众多,为仅次于 MYB 类转录因子的第二大基因家族<sup>[2]</sup>。例如,bHLH 转录因子在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中为 147 个<sup>[3-4]</sup>,在水稻(*Oryza sativa*)中有 167 个<sup>[5]</sup>,菜豆中为 155 个<sup>[6]</sup>。bHLH 转录因子广泛参与植物叶片花青素合成<sup>[7]</sup>、光周期对花期的调控<sup>[8]</sup>、果实的发育成熟<sup>[9-10]</sup>,以及缺铁条件下根的应激反应<sup>[1,11]</sup>等多种生命活动。除此之外,研究表明 bHLH 基因家族中部分成员在植物适应逆境过程中发挥重要

- [5] Tuthill C, Rios I, McBeath R. Thymosin alpha 1: past clinical experience and future promise[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1194(1):130-135.
- [6] Billich A. Thymosin alpha1. SciClone pharmaceuticals[J]. Current Opinion in Investigational Drugs, 2002, 3(5):698-707.
- [7] Li J, Liu C H, Wang F S. Thymosin alpha 1: biological activities, applications and genetic engineering production[J]. Peptides, 2010, 31(11):2151-2158.
- [8] Ioannou K, Samara P, Livanou E, et al. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy[J]. Cancer Immunol Immunother. 2012, 61(5):599-614.
- [9] Suzuki M, Zhang J, Liu M, et al. Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase[J]. Mol Cell, 2005, 18(2):253-261.
- [10] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1):16-22.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(S1/S2):248-254.