

# 重组胸腺素 $\alpha 1$ pMAL-C2x- T $\alpha 1$ /TB1 工程菌的构建与表达

刘中禄<sup>1</sup>, 陶翠兰<sup>1</sup>, 莘旭妮<sup>2</sup>, 李树民<sup>2</sup>

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心, 重庆 400042;

2. 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062)

**【摘要】 目的** 构建表达重组胸腺素  $\alpha 1$  (T $\alpha 1$ ) 的 pMAL- C2x - T $\alpha 1$ /TB1 工程菌。**方法** 将人工合成的 T $\alpha 1$  序列进行 PCR 扩增, 将扩增的片段和 pMAL- C2x 质粒载体分别经 BamHI 和 EcoR I 双酶切后, 用 T4 DNA 快速连接酶连接构建 pMAL- C2x - T $\alpha 1$  融合表达质粒, 再经测序正确后, 将重组体转化至大肠埃希菌 TB1 菌中, pMAL- C2x - T $\alpha 1$ /TB1 菌在 LB 液体培养基中培养, 经 IPTG 诱导表达麦芽糖结合蛋白与 T $\alpha 1$  的融合蛋白 (MBP- T $\alpha 1$ ), 采用 Western blot 对 MBP- T $\alpha 1$  进行鉴定。**结果** pMAL- C2x - T $\alpha 1$ /TB1 工程菌能有效表达 MBP- T $\alpha 1$ , 融合蛋白占菌体蛋白的 33.6%, 分子量约为  $45 \times 10^3$ 。**结论** 工程菌的成功构建和表达为重组 T $\alpha 1$  的纯化、生物学活性等研究奠定了基础。

**【关键词】** 重组胸腺素  $\alpha 1$ ; 基因克隆; 质粒 pMAL- C2x; 融合表达

**【中图分类号】** S859; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0013-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.004

## Construction and Expression of Recombinant T $\alpha 1$ pMAL-C2x-T $\alpha 1$ /TB1 Engineering Strain

LIU Zhong-lu<sup>1</sup>, TAO Cui-lan<sup>1</sup>, SHEN Xu-ni<sup>2</sup>, LI Shu-min<sup>2</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Institute of Animal Science, The Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China)

**【Abstract】 Objective** To construct an engineering strain of pMAL- C2x - T $\alpha 1$ /TB1 which can express Thymosin  $\alpha 1$  (T $\alpha 1$ ). **Methods** T $\alpha 1$  gene was synthesized and amplified by PCR, PCR product and pMAL- C2x vector were digested with restriction endonuclease BamHI and EcoR I respectively, and were linked with T4 DNA ligase to construct pMAL- C2x - T $\alpha 1$ . After being sequenced, pMAL- C2x - T $\alpha 1$  vector was transformed into *E. coli* TB1 for fusion expression under induction of IPTG. The expressed product was identified by Western blot. **Results** The DNA sequence of the synthesized T $\alpha 1$  gene was identical to the original design. The constructed recombinant plasmid pMAL- C2x - T $\alpha 1$  was highly expressed in *E. coli* TB1. The BMP - T $\alpha 1$  fusion protein was about 33.6% of the total bacteria protein and the relative molecular weight of BMP - T $\alpha 1$  fusion protein was about  $45 \times 10^3$ . **Conclusion** The successful construction and expression of pMAL- C2x - T $\alpha 1$ /TB1 laid a foundation for the research of purification and biological activity of recombinant T $\alpha 1$ .

**【Key words】** Recombinant T $\alpha 1$ ; Gene clone; Plasmid pMAL- C2x; Fusion expression

**【基金项目】** 重庆市科技攻关计划项目 (30111-14281)。

**【作者简介】** 刘中禄 (1966 -), 副教授, 硕士, 从事实验动物教学科研工作。

**【通讯作者】** 李树民 (1968 -), 研究员, 博士, 研究方向: 兽药研发。E-mail: creatrun@yahoo.com.cn。

胸腺素  $\alpha 1$  (thymosin  $\alpha 1$ , T $\alpha 1$ ) 是最早从小牛胸腺中提取的胸腺素组分 5 (TF5) 中分离出来的一种多肽, 由 28 个氨基酸组成, pI 值为 4.2, 相对分子质量为  $3108 \times 10^3$ , 是一种重要的免疫调节剂和增强剂, 能促进 T 淋巴细胞的增殖<sup>[1]</sup>, 提高淋巴细胞产生干扰素和 IL-2 等细胞因子的能力, 提高机体抗菌和抗感染的能力。目前 T $\alpha 1$  已用于乙型肝炎、丙型肝炎<sup>[2]</sup>、恶性肿瘤<sup>[3]</sup> 及免疫缺陷疾病<sup>[4]</sup> 等的临床治疗。

市场在售的 T $\alpha 1$  主要是由化学合成, 成本高, 价格昂贵, 限制其在兽药领域的应用。由于该蛋白质的编码序列过短, 难于用基因工程的方法直接获得, 因此, 主要采用融合表达及串联拷贝法进行表达。薛晓畅等<sup>[5]</sup> 获得了序列正确的三串体基因, 成功地实现原核表达; 石继红等<sup>[6,7]</sup> 将 T $\alpha 1$  串体与硫氧还蛋白融合, 获得高效表达的可溶性融合蛋白; 苗红等<sup>[8]</sup>、修朝阳等<sup>[9]</sup> 和谢琦等<sup>[10]</sup> 研究了 T $\alpha 1$  与谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 在大肠埃希菌中的融合表达。本试验拟采用原核表达载体 pMAL-C2x, 表达麦芽糖结合蛋白 (MBP) 与 T $\alpha 1$  的融合蛋白, 克服了小分子肽难于表达的困难, 为进一步研究重组胸腺素  $\alpha 1$  纯化与生物学活性及在兽药领域开发应用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株, 由本实验室保存; *E. coli* TB1 菌株、pUC57、pMAL-C2x 购自 New England Biolabs 公司; T $\alpha 1$  基因片段: 5' GAA TTC TCT GAT GCT GCT GTT GAT ACT TCT TCT GAG ATT ACT ACT AAA GAT CTT AA G GAG AAG AAG GAA GTT GTC GAA GAG GCT GAG AACTAG GGA TCC 3'。引物: P1 (5' to 3'): GCGCGGATCC TCGGA TCGGCGCCG TGGATACC, P2 (5' to 3'): GCGCGAATTCTCATTAATTTCCGCCTC。T $\alpha 1$  基因片段及 PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 主要试剂

质粒小量快速提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; IPTG 和 SDS 购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶及酵母提取物购于英国 Oxid 公司; 限制性内切酶 BamHI、EcoRI 和 Bgl II, T4 DNA 快速连接酶、DL2000 DNA

Marker 购自 Takara 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

### 1.3 pMAL-C2x-T $\alpha 1$ 融合表达质粒的构建

#### 1.3.1 T $\alpha 1$ 基因的获得

以 PCR 法扩增人工合成的 T $\alpha 1$  基因片段, 含 BamHI (GGATCC) 和 EcoRI (GAATTC) 酶切位点、终止密码子 TAG。PCR 反应参数: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 10 s, 52℃ 10 s, 72℃ 20 s, 30 个循环。72℃ 10 min。反应结束后, 取 10  $\mu$ L PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定检测结果。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切取目的条带, 用试剂盒进行纯化回收, 经 BamHI 和 EcoRI 酶切后备用。

#### 1.3.2 重组体 pMAL-C2x-T $\alpha 1$ 的构建

以 BamHI 和 EcoRI 双酶切 pMAL-C2x 质粒 DNA, 用 DNA 快速连接试剂盒将同样双酶切后的 T $\alpha 1$  PCR 产物进行连接。连接体系 (10  $\mu$ L): 2  $\times$  T4 DNA 快速连接酶 buffer, 5  $\mu$ L; T4 DNA 快速连接酶, 0.5  $\mu$ L; 大片段 pMAL-C2x, 1  $\mu$ L; 小片段 T $\alpha 1$ , 3.5  $\mu$ L。连接产物转化感受态大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ , 挑取固体平板上的单个菌落, 液体 LB 增菌抽提质粒后, 以 BglII 和 EcoRI 酶进行重组体的双酶切鉴定。将鉴定为阳性的重组质粒 pMAL-C2x-T $\alpha 1$  送 Takara 公司测序。

### 1.4 重组 T $\alpha 1$ 在大肠埃希菌 TB1 中的诱导表达

将鉴定为阳性的重组质粒 pMAL-C2x-T $\alpha 1$  转化感受态 *E. coli* TB1 中, 取菌液涂布于含 Amp 的 LB 筛选平板上, 37℃ 培养 16 h 后筛选阳性单菌落, LB 液体培养 37℃ 振荡 (200 r/min) 培养 12 ~ 14 h。取培养好的菌液 100  $\mu$ L 加入到含氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/mL) 10 mL 的 LB 液体培养基, 37℃ 振荡 (200 r/min) 培养至 OD600 达到 0.5 ~ 0.6 后, 加入 0.05 mmol/L IPTG 诱导, 继续振荡培养 3 h。分别取诱导前和诱导 3 h 后菌液, 离心, 收集菌体去上清, 常规进行 12% SDS-PAGE 电泳。AlphaEase 凝胶电泳图像分析系统分析样品中所含 MBP 融合蛋白的比例。

### 1.5 pMAL-C2x-T $\alpha 1$ /TB1 工程菌表达的鉴定-免疫印记 (Western blot)

蛋白质免疫印迹按常规方法进行, 表达菌 SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 经 20 g/L BSA 封闭液封闭后, 与小鼠抗 His-Taq 单克隆抗体结合, 经酶标二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG) 及显色获得阳性结果。

## 2 结果

### 2.1 T $\alpha$ 1 基因的获得

如图 1 所示,扩增 DNA 片段 2% 琼脂糖凝胶电泳,显示大小为 100 bp 的目的片段。T $\alpha$ 1 基因的 PCR 鉴定结果为阳性。

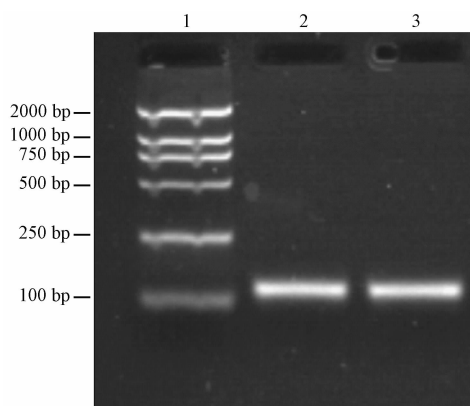


图 1 T $\alpha$ 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Amplification of T $\alpha$ 1 DNA fragment by PCR

注:1. DL2000 DNA 标记;2,3. T $\alpha$ 1 PCR 产物

Note: 1. DL2000 DNA Marker; 2,3. T $\alpha$ 1 PCR product

### 2.2 重组体 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1 的构建

少量制备 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1 重组体质粒,以 Bgl II 和 EcoR I 酶切后,2% 琼脂糖凝胶电泳显示在 800 bp 处出现阳性条带,鉴定结果为阳性(图 2)。测序结果为阳性重组质粒 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1。

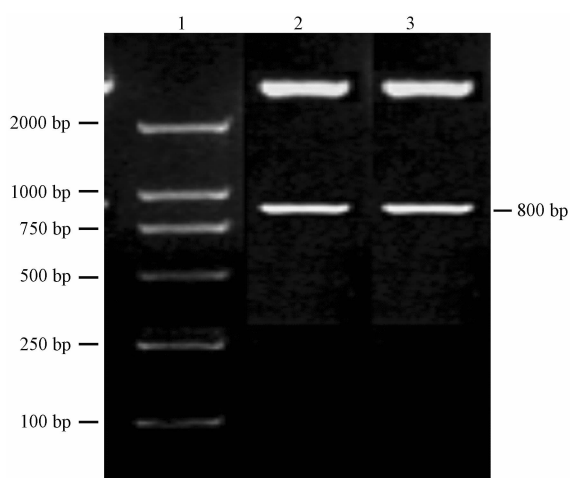


图 2 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1 重组体的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction map of recombinant expression vector

注:1. DL2000 DNA 标记;2,3. 用 BglII 和 EcoRI 双酶切

的 pMAL-c2x-T $\alpha$ 1 重组体

Note: 1. DL2000 DNA Marker; 2,3. pMAL-C2x-T $\alpha$ 1 vector was digested with restriction endonuclease Bgl II and EcoR I

### 2.3 重组 T $\alpha$ 1 在大肠埃希菌 TB1 中的诱导表达

将目的片段连入表达载体,经酶切鉴定的阳性菌株,在 IPTG 诱导下,能稳定表达 MBP-T $\alpha$ 1 融合蛋白,表达产物的 12% SDS-PAGE 电泳结果显示,重组 T $\alpha$ 1 在大肠埃希菌 TB1 中以可溶性方式表达(如图 3),重组诱导表达菌在分子量约  $45 \times 10^3$  处有明显特异性条带出现,与预期分子量大小相符,而诱导前空菌未出现相应蛋白条带。AlphaEase 凝胶电泳图像分析系统分析样品中所含 BMP 融合蛋白的占总菌体蛋白的 33.6%。

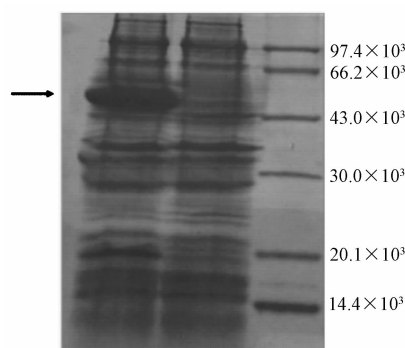


图 3 表达产物的 12% SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 12% SDS-PAGE analysis of expressed products

注:1. 菌体诱导后 3h,→融合蛋白;

2. 菌体诱导前;3. 蛋白分子量 marker

Note: 1. After induced with IPTG, →BMP-T $\alpha$ 1 fusion protein;

2. Before induced with IPTG; 3. Protein marker

### 2.4 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1/ TB1 融合蛋白工程菌表达的鉴定结果-免疫印记

如图 4 显示,在与左一半电泳胶(诱导表达菌在分子量约  $45 \times 10^3$ )上分子量相应的考马斯亮兰 R-250 染色区带的相应位置,显现单一条带明显的

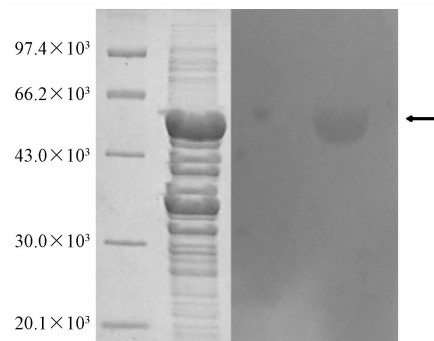


图 4 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1/ TB1 融合蛋白免疫印迹分析

Fig. 4 Western blotting analysis of BMP-T $\alpha$ 1

注:1. 蛋白分子量 marker;2. 融合表达产物;3. 免疫印迹

Note: 1. Protein marker; 2. BMP-T $\alpha$ 1 fusion protein;

3. Western blotting analysis of BMP-T $\alpha$ 1

免疫印迹,表明融合蛋白与单抗有特异结合能力。

### 3 讨论

应用基因重组技术将人工合成的基因导入大肠埃希菌进行原核表达,是制备多肽药物的有效方法。本研究以人工方法合成 T $\alpha$ 1DNA,以 PCR 扩增 T $\alpha$ 1 基因,并在其首尾两端分别加上在所用载体多克隆位点(MCS)中都存在的且方向相符的 BamHI 和 EcoRI 酶切位点、终止密码子(TAG),便于以后的克隆和表达操作。这种利用人工合成寡核苷酸进行基因重组的方法可以避免在目的序列中插入外源序列,从而产生完整的蛋白/多肽产物。

由于 T $\alpha$ 1 的编码基因序列过短,难于直接表达,因此,我们一方面采用大肠埃希菌偏好密码子构建肽基因,不仅提高了 T $\alpha$ 1 mRNA 的翻译效率,也有效避免了来自宿主菌蛋白酶的攻击,在宿主细胞内获得较高的表达,另一方面利用 pMAL-C2x 原核表达载体上的 TAC 启动子,使 T $\alpha$ 1 与麦芽糖结合蛋白进行融合表达,表达产物可用凝血酶酶切后进行分离。通过 IPTG 诱导和 12% SDS-PAGE 电泳,发现在相对分子质量  $45 \times 10^3$  处出现一条特异性条带,正好是标签蛋白-MBP(相对分子质量 42500)与 T $\alpha$ 1(相对分子质量 3108)的总和,与预期融合蛋白的相对分子量相符。通过特异性的免疫印记分析,出现了表达产物的特异带,进一步证实表达蛋白的正确性。

本研究结果表明,构建的重组胸腺素  $\alpha$ 1 pMAL-C2x-T $\alpha$ 1/TB1 工程菌可以高效融合表达,BMP 融合蛋白占菌体总量的 33.6%。影响融合表达的因素很多,我们将对影响融合表达量的因素以及融合蛋

白的分离纯化等做进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Knutsen AP, Freeman JJ, Mueller KR, *et al.* Thymosin- $\alpha$ 1 stimulates maturation of CD34<sup>+</sup> stem cells into CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup> cells in an in vitro thymic epithelia organ coculture model [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1999, 21(1):15-26.
- [2] Ancel CD, Phipps J, Young L. Thymosin  $\alpha$ 1 [M]. *Am J Health-Syst-Pharm*, 2001, 58:879-885.
- [3] Salvati F, Rasi G, Portalone L, *et al.* Combined treatment with thymosin- $\alpha$ 1 and low-dose interferon- $\alpha$  after ifosfamide in non-small cell lung cancer: a phase-II controlled trial [J]. *Anticancer-Res*, 1996, 16(2):1001-1004.
- [4] Ramachandran R, Katzenstein DA, Winters MA, *et al.* Polyethylene glycol-modified interleukin-2 and thymosin  $\alpha$ 1 in human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(4):1005-1008.
- [5] 薛晓畅,颜真,石继红,等. 重组胸腺素  $\alpha$ 1 的克隆、表达与纯化[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(3):227-229.
- [6] 石继红,张英起,赵永同,等. 胸腺素  $\alpha$ 1 基因的克隆表达及其生物学活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(3):344-349.
- [7] 石继红,韩苇,颜真,等. 天然胸腺素  $\alpha$ 1 基因的克隆及其在大肠埃希菌中的表达[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2):55-57.
- [8] 苗红,郭葆玉,张冉,等. 重组胸腺素  $\alpha$ 1 的表达、纯化和生物学活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(5):636-639.
- [9] 修朝阳,周穗菁,俞璿,等. 人胸腺素  $\alpha$ 1 大肠埃希菌中的融合表达[J]. 生物工程学报, 2002, 18(5):541-545.
- [10] 谢琦,李娟,王凤山,等. 胸腺素  $\alpha$ 1-胸腺五肽在大肠埃希菌中的表达及表达条件优化[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4):265-268.

[修回日期]2012-07-05