

鸡胸腺肽 $\beta 4$ 、 $\beta 15$ 基因的原核表达及其生物学活性测定

张 澍, 王燕华, 郭保党, 冀 君, 吕慧芳, 胡小敏, 姚伦广*

(南阳师范学院 中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室/河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南 南阳 473061)

摘要: 为获得具有生物学活性的鸡胸腺肽 $\beta 4$ 、 $\beta 15$, 根据大肠杆菌密码子偏爱性, 设计合成鸡胸腺肽 $T\beta 4$ 、 $T\beta 15$ 基因片段, 采用重叠 PCR 获得完整的 $T\beta 4$ 、 $T\beta 15$ 基因, 将其连接到 pET-28 a(+) 载体上, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 进行诱导表达, 经 SDS-PAGE 鉴定, 应用镍柱亲和层析纯化蛋白质, 采用 E 玫瑰花环试验测定其生物学活性。结果显示, 成功构建大肠杆菌表达载体 pET28a- $T\beta 4$ 和 pET28a- $T\beta 15$, 目的蛋白在大肠杆菌中大量可溶性表达, 蛋白质分子量大小均为 6 kD, 镍柱亲和层析获得了纯化的蛋白质。E 玫瑰花环试验结果显示, 重组 $T\beta 4$ 的活力为 35.5%, $T\beta 15$ 的活力为 18.7%, 均能够明显增强 T 淋巴细胞的活性。表明 $T\beta 4$ 和 $T\beta 15$ 基因得到成功表达和纯化, 并具有良好的生物学活性。

关键词: 胸腺肽 $\beta 4$ 基因; 胸腺肽 $\beta 15$ 基因; 表达; 纯化; E 玫瑰花环试验

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)12-0140-04

Studies on the Expressions of Chicken Thymosin $\beta 4$ and $\beta 15$ in *E. coli* and Their Biological Activities

ZHANG Shu, WANG Yan-hua, GUO Bao-dang, JI Jun, LÜ Hui-fang,
HU Xiao-min, YAO Lun-guang*

(Rothamsted Research Joint Laboratory of Insect Biology, Nanyang Normal University/Henan Provincial
Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang 473061, China)

Abstract: This study aimed to get chicken thymosin $\beta 4$ and $\beta 15$. According to *E. coli* codon preference, chicken thymosin $\beta 4$ and $\beta 15$ cDNA sequences were designed and synthesized. Two full length genes were amplified by overlap PCR technique. Then the $T\beta 4$ 、 $T\beta 15$ genes were cloned into vector pET-28a(+) respectively. The recombinant plasmids were transferred into *E. coli* BL21(DE3) for expression. The two proteins were purified by Ni^{2+} affinity chromatography after analysis by SDS-PAGE, and then their activities were detected by E rosette test. The results showed that two expression plasmids pET28a- $T\beta 4$ and pET28a- $T\beta 15$ were constructed successfully and proteins were expressed efficiently in soluble form. The molecular of two proteins were all 6 kD. The two purified proteins were obtained by Ni^{2+} affinity chromatography. The E rosette test demonstrated that the activity of $T\beta 4$ was 35.5%, and which of $T\beta 15$ was 18.7%. These results indicated that the protein $T\beta 4$ and $T\beta 15$ could significantly enhance the activity of T cells. In conclusion, the soluble proteins $T\beta 4$ and $T\beta 15$ were highly expressed in *E. coli* and displayed high level of biological activity.

Key words: thymosin $\beta 4$ gene; thymosin $\beta 15$ gene; expression; purification; E rosette test

收稿日期: 2014-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372381)

作者简介: 张 澍(1989-), 女, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物制药与基因工程疫苗。

E-mail: 327637545@qq.com

* 通讯作者: 姚伦广(1974-), 男, 湖南洞口人, 教授, 主要从事杆状病毒分子生物学研究。E-mail: lunguang@163.com

胸腺肽 (thymosin) 是从小牛胸腺中分离得到的小分子多肽, 根据等电点的不同分为 α 、 β 和 γ 3 类^[1]。 β -胸腺肽是高度保守的酸性蛋白质。 $\beta 4$ -胸腺肽 ($T\beta 4$)、 $\beta 10$ -胸腺肽 ($T\beta 10$) 和 $\beta 15$ -胸腺肽 ($T\beta 15$) 能够与 G-肌动蛋白单体结合, 阻断其聚合^[2-5]。 β -胸腺肽还具有促进皮肤创伤愈合和血管生成、促进角膜修复、抑制炎症、调控肿瘤细胞转移等功能^[6]。胸腺肽的临床应用始于 20 世纪 70 年代, 主要用于治疗各种原发性和继发性免疫缺陷症、自身免疫性疾病、感染性疾病等多种疾病^[7-12]。近年来, 胸腺肽逐渐应用于畜牧业, 在治疗犊牛腹泻、鸡新城疫、禽流感等疾病中疗效良好^[13-15]。此外, 在畜牧业尤其是养禽业生产中推广胸腺肽代替抗生素, 可在一定程度上控制抗生素滥用, 为食品安全提供保障。然而, 目前临床上使用的胸腺肽多来源于动物组织, 价格昂贵, 限制了胸腺肽在畜牧业生产中的应用。为此, 本研究利用基因工程手段, 设计合成鸡 $T\beta 4$ 和 $T\beta 15$ 基因, 在大肠杆菌表达系统中表达, 对其蛋白进行分离纯化, 并进行生物学活性测定, 以期降低其生产成本, 为其在畜牧业生产中广泛应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 30 日龄 SPF 鸡由南阳师范学院动物中心提供。

1.1.2 菌株、试剂 质粒 pET-28 a(+), 大肠杆菌 Top10、BL21(DE3), 绵羊红细胞悬液由本实验室保存; 胸腺肽 $T\beta 4$ 、 $T\beta 15$ 引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成; PCR 试剂、限制性内切酶、DNA 连接酶等购自大连 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司; His 标记蛋白质纯化试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司; 鸡淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中鸡胸腺肽 $\beta 4$ (NP_001001315.1; GI: 47604946)、 $\beta 15$ (ACN24619.1; GI: 223929922) 氨基酸序列, 选用大肠杆菌偏爱密码子, 分段设计重叠 PCR 扩增引物 (表 1、2), 上、下游引物分别引入 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点 (下划线部分)。

表 1 $T\beta 4$ 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
$T\beta 4$ -1	AAGGATCCATATGAGCGATAAGCCGATATGGCCGA
$T\beta 4$ -2	CAGTTTGCTCTTATCGAATTTTCAATTTCGGCCATATCCGGCTT
$T\beta 4$ -3	TGAAAAATTCGATAAGAGCAAACCTGAAGAAAACCGAGACCCAGGA
$T\beta 4$ -4	TTTCTTTGCTCGGCAGCGGATTTTCTCCTGGGTCTCGGTTTTCT
$T\beta 4$ -5	CGCTGCCGAGCAAAGAAACCATTGAACAGGAAAAACAGGCGGGTG
$T\beta 4$ -6	CATGTCGACTTATTTGCTTTCACCCGCTGTTTTTCCT

表 2 $T\beta 15$ 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
$T\beta 15$ -1	AAGGATCCATATGTGCGATAAACCCGATCTGA
$T\beta 15$ -2	CTTTTATCGAATTTTCCACTTCGCTCAGATCCGGTTTATCGCAC
$T\beta 15$ -3	CGAAGTGGAATAATTCGATAAAAAAGAAGCTGAAAAAGACGAACACC
$T\beta 15$ -4	TGCTCGGCAGGGTATTCTTTTCTTCGGTGTTCTGCTTTTTCAGCTT
$T\beta 15$ -5	AGAATACCTGCCGAGCAAAGAAACCATTGAACAGGAGAAAGAATG
$T\beta 15$ -6	ATGTCGACTTAGCTGCTTTTCACGCATTCTTTCTCTGTTCAATGGT

1.3 重组质粒构建

采用重叠 PCR 方法, $T\beta 4$ -1 和 $T\beta 4$ -2 延伸补平得到 cDNA 片段 a; 然后以 a 为模板, $T\beta 4$ -1 和 $T\beta 4$ -3 为引物扩增出 cDNA 片段 b; 再以 b 为模板, $T\beta 4$ -1 和 $T\beta 4$ -4 为引物扩增出 cDNA 片段 c, 依次类推, 全基因合成 $T\beta 4$ 基因 (135 bp), 同理合成 $T\beta 15$ 基

因 (135 bp)。扩增体系为: cDNA 片段 0.5 μ L, Prime STAR Q 3 μ L, 5 \times Prime STAR Buffer 6 μ L, dNTP 2.4 μ L, 上、下游引物各 0.6 μ L, dd H₂O 补加至 30 μ L。序列扩增条件均为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳, 回收 PCR 产物,

分别用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切获得的基因片段,并与同样双酶切回收的 pET-28 a(+) 连接。构建好的质粒经测序鉴定正确后分别命名为 pET28a-T β 4、pET28a-T β 15。

1.4 重组胸腺肽 β 4、 β 15 的诱导表达

将构建好的质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 内,挑取 PCR 鉴定为阳性的 BL21(DE3) 菌株接种于 10 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中过夜培养。将新鲜的菌液接种于 500 mL 含 Kan 的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 37 °C 诱导培养 4 h。离心收集菌体,取少量菌体通过 SDS-PAGE 检测表达情况,用 BandScan 软件进行灰度扫描,分析其表达量占菌体总蛋白质的百分比。

1.5 重组胸腺肽 β 4、 β 15 的纯化

用 20 mmol/L Tris(pH 值 7.4) 缓冲液重悬离心获得的菌体,以工作时间 5 s、停歇 5 s 的条件超声破碎 30 min,取少量菌液离心,上清和沉淀进行 SDS-PAGE,检测表达的蛋白质是否以可溶形式存在。以可溶形式存在的蛋白质在 4 °C、12 000 r/min 下离心 30 min,上清用镍柱纯化,依次用 100、200、500 mmol/L 咪唑进行梯度洗脱,收集流出液进行 SDS-PAGE 检测,灰度扫描分析其纯化效果。将含目的蛋白的流出液透析去除咪唑,冷冻干燥,稀释后用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。

1.6 生物活性检测

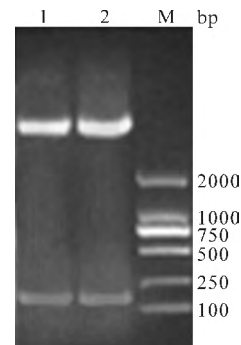
采用 E 玫瑰花环试验测定制备的重组 T β 4 和 T β 15 的生物学活性。按常规方法,取小鸡胸腺,制备淋巴细胞悬液,45 °C 水浴 30 min 脱去 E 受体(稀释计数,终浓度为 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL)。分别置于 EP 管中,每管 0.2 mL,加入 0.1 mL 稀释为 0.2 mg/mL 的胸腺肽样品,对照加入 0.1 mL Hank's 液,37 °C 保温 1 h,加入 0.2 mL 绵羊红细胞悬液(计数,终浓度为脱 E 受体 T 淋巴细胞悬液的 10 倍),摇匀,500 r/min 离心 3 min,放入 4 °C 冰箱过夜。次日取出,弃上清,每管各加 1 滴固定液,轻轻摇匀,静置 10 min,加入 2 滴姬姆萨染色液并摇匀,静置 15 min 后开始计数,显微镜视野中淡蓝色的较大的细胞为淋巴细胞,共计数 16 个大方格上所有淋巴细胞的个数(不少于 200 个),统计其中形成 E 玫瑰花结的细胞数(结合 3 个或 3 个以上绵羊红细胞的淋巴细胞为 1 个花结),求得花结百分率,取平均值。样品活力 = 供试品测定管 E 玫瑰花结百分率 - 对照管 E 玫瑰花结百分率。样品

活力大于 10% 为合格。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET28a-T β 4、pET28a-T β 15 的酶切鉴定及测序

以 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切重组质粒,切出约 135 bp 大小的目的片段(图 1),与预期相符。挑取酶切鉴定正确的阳性克隆进行测序,测序结果表明,重组质粒中的基因序列正确。

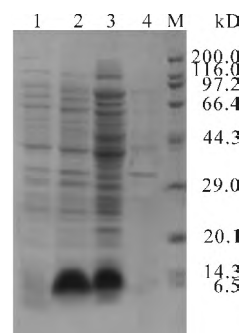


1. pET28a-T β 4; 2. pET28a-T β 15; M. DNA Marker

图 1 重组质粒的酶切鉴定结果

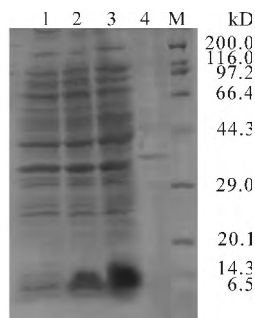
2.2 T β 4、T β 15 的表达及纯化结果

由图 2、3 可以看出,重组 T β 4 和 T β 15 均以可溶形式表达,重组诱导表达菌均在约 6 kD 处有明显特异性条带,与预期的蛋白质分子量 6 kD 大小相符。经 BandScan 软件灰度扫描结果显示,T β 4 表达量占菌体总蛋白质的 75%,T β 15 表达量占菌体总蛋白质的 43%。经镍柱亲和层析纯化,得到较纯的重组蛋白(图 4),灰度扫描结果显示,T β 4 纯度达 90%,T β 15 纯度达 77%。考马斯亮蓝法测蛋白质含量,经计算 500 mL 培养基能得到 1.067 mg T β 4、2.222 mg T β 15。



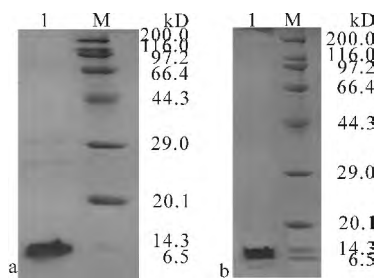
1. 重组 pET28a-T β 4 诱导表达前; 2. 重组 pET28a-T β 4 诱导表达 4 h; 3. 重组 pET28a-T β 4 诱导表达后菌体经超声破碎后的上清; 4. 重组 pET28a-T β 4 诱导表达后菌体经超声破碎后的沉淀; M. 蛋白质分子量标准(宽)

图 2 重组 T β 4 的 SDS-PAGE 分析



1. 重组 pET28a-T $\beta 15$ 诱导表达前; 2. 重组 pET28a-T $\beta 15$ 诱导表达 4 h; 3. 重组 pET28a-T $\beta 15$ 诱导表达后菌体经超声破碎后的上清; 4. 重组 pET28a-T $\beta 15$ 诱导表达后菌体经超声破碎后的沉淀; M. 蛋白质分子量标准(宽)

图 3 重组 T $\beta 15$ 的 SDS-PAGE 分析



a. 1. 纯化后的 T $\beta 4$; M. 蛋白质分子量标准(宽)。
b. 1. 纯化后的 T $\beta 15$; M. 蛋白质分子量标准(宽)

图 4 重组蛋白经镍柱纯化后的 SDS-PAGE 分析

2.3 T $\beta 4$ 、T $\beta 15$ 生物学活性的测定结果

由图 5 可知,空白对照的 E 玫瑰花结百分率为 11.4%,T $\beta 4$ 的为 46.9%,T $\beta 15$ 的为 30.1%。经计算,T $\beta 4$ 的活力为 35.5%,T $\beta 15$ 的活力为 18.7%。说明表达的重组蛋白具有较好的生物活性。

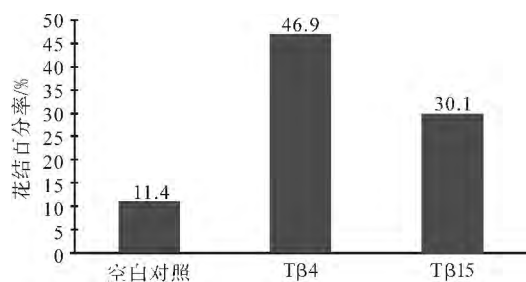


图 5 E 玫瑰花环试验结果

3 讨论

真核基因在大肠杆菌表达系统中表达,往往会因为真核基因具有很多大肠杆菌稀有密码子而导致蛋白表达量低,甚至不表达,本研究根据鸡胸腺肽 $\beta 4$ 、 $\beta 15$ 的氨基酸序列,选用大肠杆菌偏爱密码子优化了鸡胸腺肽 $\beta 4$ 、 $\beta 15$ 的基因序列,使其在大肠杆菌系统中得到大量高效表达。本研究使用了 pET-28a 表达载体,表达的融合蛋白具有 6 个组氨酸标签,能高度

亲和镍离子,便于蛋白质纯化,且组氨酸标签空间构象小,在 pH 值为 8.0 时不带电荷,无免疫原性,对蛋白质的分泌、折叠及功能没有影响,可以不对融合蛋白进行切割,降低了生产成本。本研究中,表达产物的 SDS-PAGE 电泳图显示,在目的条带下面有一条淡淡的带,经纯化后该条带仍然存在,其原因可能是表达或提取过程中内部降解或 C 端氨基酸缺失,但并不影响目的蛋白的活性,可以允许其存在。本研究使用 E 玫瑰花环试验分别检测得到的胸腺肽 $\beta 4$ 和 $\beta 15$ 蛋白的生物学活性,结果表明,得到的 2 种胸腺肽活性均较好,均高于陈妍柯等^[16]、马凤龙等^[17] 研究表达的胸腺肽活性,为研究胸腺肽 $\beta 4$ 和 $\beta 15$ 的生物学功能及其应用开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Low T L, Thurman G B, McAdoo M, *et al.* The chemistry and biology of thymosin. I. Isolation, characterization, and biological activities of thymosin alpha1 and polypeptide beta1 from calf thymus[J]. *Biol Chem*, 1979, 254(3):981-986.
- [2] Choe J, Sun W, Yoon S Y, *et al.* Effect of thymosin beta15 on the branching of developing neurons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1):43-49.
- [3] Koutrafouris V, Leondiadis L, Ferderigos N, *et al.* Synthesis and angiogenic activity in the chick chorioallantoic membrane model of thymosin beta-15[J]. *Peptides*, 2003, 24(1):107-115.
- [4] Huff T, Müller C S, Otto A M, *et al.* Beta-thymosins, small acidic peptides with multiple functions[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 33(1):205-220.
- [5] Eadie J S, Kim S W, Allen P G, *et al.* C-terminal variations in beta-thymosin family members specify functional differences in actin-binding properties[J]. *Cell Biochem*, 2000, 77(2):77-87.
- [6] 司信喜, 方宏清, 陈惠鹏. 胸腺肽 $\beta 4$ 研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(4):580-583.
- [7] 陈世灵. 胸腺肽制剂在肿瘤治疗中的应用[J]. *中国医药导报*, 2010, 7(15):9-10.
- [8] 储黎, 刘希, 许青. 胸腺肽与抗肿瘤中药组合疗法对肿瘤患者外周血免疫学指标的影响[J]. *同济大学学报:医学版*, 2012, 33(1):75-78.
- [9] 黄斌琼, 吴雪梅. 胸腺肽在化学-免疫联合治疗中的应用[J]. *海峡药学*, 2003, 15(2):98-99.
- [10] 刘加军, 潘祥林, 伍新尧. 大剂量胸腺肽对急性白血病医院感染的干预作用及其对细胞免疫功能的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2003, 13(9):817-819.
- [11] 李洁, 王晓杰, 邹素兰. 胸腺肽的临床应用与研究进展[J]. *中国药房*, 2008, 19(14):1108-1109.
- [12] 陈适, 马本良, 穆荣, 等. 胸腺肽辅助治疗系统性红斑狼疮的临床观察[J]. *中国医院药学杂志*, 2001, 21(10):617-618.
- [13] 王国卿, Devrshov D A, 崔明. 胸腺素预防和治疗犊牛腹泻的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006, 15(4):54-55.
- [14] 王志强, 张斌, 陆宏, 等. 人工合成胸腺五肽对雏鸡免疫功能的影响[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(6):555-560.
- [15] 杨玲媛, 王巧, 谢青梅, 等. 胸腺肽 $\alpha 1$ 对 H5 亚型禽流感疫苗的免疫增强作用[J]. *湖南农业科学*, 2013, 16(1):111-114.
- [16] 陈妍柯, 杨辉, 路凡, 等. 人胸腺肽 $\beta 4$ 基因的克隆表达及活性检测[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2002, 34(4):502-505.
- [17] 马凤龙, 崔雪志, 刘焕珍, 等. 重组胸腺肽 $\alpha 1$ 在大肠杆菌中的表达及免疫活性检测[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(10):1448-1451.