

网络出版时间:2012-12-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1728.007.html>

大鲵胸腺素 β -4 全长基因的分离与表达研究

艾 闽^{1,2}, 杨 辉^{1,2}, 胡 伟^{1,2}, 李锋刚^{1,2}, 刘小林^{1,2}, 王立新^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 水产科学系, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对大鲵胸腺素 β 4 基因进行生物信息学分析和原核表达载体构建, 为大鲵胸腺素 β -4 蛋白生理活性的深入研究奠定基础。**【方法】**从大鲵皮肤 cDNA 文库中分离获得了大鲵胸腺素 β 4 基因全长序列, 采用多种生物软件对其进行生物信息学分析, 用定量 PCR 研究胸腺素 β 4 基因在不同组织的表达情况, 并以 pET32a 为载体构建该基因原核表达载体。**【结果】**胸腺素 β 4 基因全长共 699 bp, 其中开放阅读框 135 bp, 5'-UTR 87 bp, 3'-UTR 为 474 bp, 该基因编码 45 个氨基酸, 表达蛋白的理论分子质量为 5 141.59 u, 等电点为 5.34; 结构分析发现, 大鲵胸腺素 β -4 蛋白氨基酸序列的第 7~43 位处有“THY”特征模体, 没有跨膜螺旋区、细胞膜外在跨膜结构域。氨基酸序列进化关系表明, 大鲵与人、大鼠、牛、猩猩、鸡、倭蛙等动物亲缘关系较近, 氨基酸同源性高于 85%; 与猪和爪蟾的亲缘关系次之, 氨基酸同源性均为 83%; 而与虹鳟、大菱鲆、斑马鱼等鱼类的亲缘关系较远, 氨基酸同源性低于 80%。荧光定量 PCR 检测结果表明, 胸腺素 β 4 基因在大鲵肺中的相对表达量最高。SDS-PAGE 电泳结果表明, 构建的大鲵胸腺素 β 4 原核表达重组菌株 pET32a-T β 4, 在 37 °C 条件下, 用终浓度 1.0 mmol/mL IPTG 诱导 4 h 后, 大鲵胸腺素 β 4 基因获得了较高的表达。**【结论】**分离获得了大鲵胸腺素 β 4 基因全长 cDNA 序列, 该基因氨基酸序列与人等高等动物的同源性最高, 能在大鲵肺中及大肠杆菌中获得高效表达。

【关键词】 大鲵; 胸腺素 β 4 基因; 分离与表达

【中图分类号】 Q786; S917

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)01-0001-08

Isolation and expression analysis of thymosin β -4 in *Andrias davidianus*

AI Min^{1,2}, YANG Hui^{1,2}, HU Wei^{1,2}, LI Feng-gang^{1,2},
LIU Xiao-lin^{1,2}, WANG Li-xin^{1,2}

(1 Department of Fishery, College of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Bioinformatics analysis and prokaryotic expression vector construction were conducted for investigating the physiological activity of Chinese giant salamander's thymosin β -4 gene. **【Method】**In this case, the thymosin β 4 cDNA sequence was isolated and identified from skin cDNA library of Chinese giant salamander, and a variety of biological softwares were used to analyze the bioinformatics of Chinese giant salamander' thymosin β 4 gene. Then the real-time PCR was applied to study the expression in various tissues, and the prokaryotic expression vector was reconstructed with pET32a. **【Result】**The full-length of thymosin β 4 gene of Chinese giant salamander was 699 bp, among which the ORF, 5'-UTR, and 3'-UTR were 135 bp(88—223 bp), 87 bp, and 474 bp, respectively. The gene code 45 contained amino acids

【收稿日期】 2012-04-18

【基金项目】 陕西省农业科技攻关项目(2012K01-18); 西北农林科技大学基本科研业务费专项(QN2011062); 西北农林科技大学后稷学者专项(Z11021007)

【作者简介】 艾 闽(1987—), 女, 湖北宜昌人, 在读硕士, 主要从事水产动物功能基因组学研究。E-mail: 370926588@qq.com

【通信作者】 王立新(1968—), 男, 陕西南郑人, 副教授, 主要从事水产动物遗传育种与资源保护研究。

E-mail: fisherwanglx@163.com

with a deduced molecular weight of 5 141.59 u and an isoelectric point of 5.34. The results of structure analysis showed that the thymosin β -4 protein contained a “THY” specific motif, but neither transmembrane helix nor transmembrane domain existed. The analysis of genetic relationship with amino acids of thymosin β -4 showed that Chinese giant salamander was close to human, rat, cattle, Pongo satyrus, chicken and frog (the amino acids homology was higher than 85%), followed by swine and xenopus laevis (the amino acids homology was higher than 83%), while far away from rainbow, turbot and zebrafish (the amino acids homology was under 80%). The result of fluorescent quantitation PCR indicated that the highest-expression of thymosin β -4 gene was in the lungs of Chinese giant salamander. SDS-PAGE showed the recombinant thymosin β -4 protein of Chinese giant salamander was highly expressed by the reconstruct bacterial strain pET32a-T β 4 induced by 1.0 mmol/mL IPTG at 37 °C for 4 h. 【Conclusion】 In this study, the full-length cDNA sequence of thymosin β -4 gene was isolated and identified from the skin cDNA library of Chinese giant salamander. The detected amino acids sequence has highest homology to that of higher animals. This gene was highly expressed in both lungs of Chinese giant salamander and *E. coli* BL21 *in vitro*.

Key words: *Andrias davidianus*; thymosin β -4 gene; isolation and expression analysis

大鲵(*Andrias davidianus*)是我国特有珍稀两栖动物,隶属两栖纲,有尾目,隐鳃鲵科。主要产于我国长江、黄河及珠江中下游支流的深山峡谷溪流之中,是现存两栖类中最大的种类,属于由水生脊椎动物向陆生脊椎动物过渡的类群,其在研究动物进化和地理分布等方面有着重大的科学价值^[1-2]。同时,大鲵皮肤分泌物含有丰富的生物活性物质,是可供人类利用的生物资源宝库^[3]。

胸腺素(Thymosins)主要是由胸腺产生的一种淋巴细胞生长因子,普遍存在于各种组织细胞当中^[4]。根据等电点(pI)可将胸腺素分为 α 、 β 、 γ 3个家族,其中 pI 在 5.0~7.0 的称为 β 族胸腺素(β -thymosins, T β),其结构高度保守,由 40~44 个氨基酸组成,分子质量约为 5.0 ku^[5]。胸腺素 β -4(T β -4)是从胸腺素组分 5 中分离得到的,由 43 个氨基酸组成,分子质量约为 5.0 ku, pI 为 5.1, N 端丝氨酸被乙酰化。胸腺素 β -4 是生物体内丰度最高并且高度保守的一种 β 族胸腺素,广泛分布于哺乳动物和其他脊椎动物多种组织及有核细胞中。胸腺素 β -4 是肌动蛋白分离剂,参与多种重要的生理和病理活动。胸腺素 β -4 被认为是主要的球形肌动蛋白(G-肌动蛋白)结合肽,能与 G-肌动蛋白单体结合从而阻断其聚合^[6]。此外,胸腺素 β -4 还具促进血管生成^[7]、愈合创伤^[8]、修复角膜^[9]、抑制炎症^[10]以及调控肿瘤转移等多种生理功能^[11]。因此,胸腺素 β -4 基因可能在人类疾病治疗方面产生深远的影响^[12]。

大鲵胸腺素 β -4 基因是西北农林科技大学水生生物学实验室从构建的大鲵 cDNA 文库中筛选得

到的全长基因,为进一步研究该基因在大鲵免疫系统的功能和作用,本试验拟对大鲵胸腺素 β -4 基因的生物信息学和表达特性进行研究,并构建了体外原核表达系统,以期对胸腺素 β -4 基因功能的研究及其产物的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大鲵皮肤 cDNA 文库由西北农林科技大学水生生物学实验室构建并保存。3 尾大鲵均购自陕西汉中天利大鲵养殖场,体长(62.25±5.74)cm,体质量(1 979.67±321.54)g。在超净工作台,用灭菌的解剖刀、剪、镊等工具,取大鲵肠、肌肉、皮肤、胃、肾、肺、肝脏 7 个组织的样品,用锡箔纸包好,液氮冷冻后于-80 °C 保存。

主要化学试剂:Trizol 购自 Invitrogen 公司, dNTP 购自 Roche 公司,核酸染料购自 Biotek 公司, Taq 酶购自 Fermentas 公司, PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq TM、氨苄青霉素、IPTG、DL2000 DNA MARKER 均购自 TaKaRa 公司,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成, pET 32a 载体及 *E. coli* BL21 菌株分别由王在照及刘小林教授惠赠。其他常规试剂均为国产分析纯。

主要仪器设备:凝胶电泳系统(北京六一公司)、高速冷冻离心机(Heraeus 公司)、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)、PCR 仪(Bio-Rad 公司)、荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)及核酸浓度测定仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 大鲵胸腺素 β -4 基因的生物信息学分析

用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 中的 BLASTN 和 BLASTX 进行序列相似性分析及基因注释。用 ScanSite pI/Mw 分析蛋白质性质;用 singalP 4.0 软件查找信号肽;用 ProtScale 软件分析疏水结构;用 TMHMM 软件预测跨膜结构,再用 SMART 软件进行蛋白质特征模式检测,用 Tmpred 软件预测跨膜螺旋;用 SPOMA 软件预测二级结构,用 Phyre 进行验证;用 Swiss-model 进行三级结构预测,用 Swiss-Pdb Viewer 查看蛋白模型^[13]。从 NCBI 获取爪蟾 (*Xenopus laevis*) 等 13 个陆生动物和水生生物的胸腺素 β -4 氨基酸序列,用 MEGA 4.0 软件进行氨基酸序列比对;用 UPGMA 方法构建系统进化树,空位视为信息缺失,同时采用 Bootstrap1000 检验系统进化树中各分支的置信度。

1.3 胸腺素 β -4 基因在大鲵不同组织中的表达

分别提取大鲵肠、肌肉、皮肤、胃、肾、肺、肝脏 7 个组织的总 RNA,并检测总 RNA 浓度。依据大鲵胸腺素 β -4 序列设计荧光定量 PCR 引物,上游引物序列为:5'-TGTCTGGCTCAGTGCTGGTGG-3';下游引物序列为:5'-AGCTCAGTCGCCTTGTGTCG-3',该引物对扩增出的目的片段长度为 206 bp。以大鲵 β -actin 作为内参基因,并设计引物,上游引物序列为:5'-GTTATGCCCTGCCTCACG-3';下游引物序列为:5'-GCACAATTTCCCTTTCGG-3'。使用 RT reagent Kit 进行反转录获得 cDNA 模板。实时定量 PCR 反应按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒进行,反应体系为:2×SYBR Green Mix 10 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L,上、下游引物 (20 pmol/L) 各 1.0 μ L,补充 ddH₂O 至总体积 20 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s;60 $^{\circ}$ C 30 s;40 个循环。反应完成后进行溶解曲线分析,前提是目的基因和内参基因扩增率一致^[14]。各样品设 3 个重复,计算平均 CT (Threshold cycle number) 值和 Δ CT 值 (Δ CT = CT_{样本} - CT_{对照}),计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,其数值表示目的样本表达值相对于参照样本表达值的相对倍数^[15]。数据统计采用 SPSS Statistic V 17.0 分析。

1.4 胸腺素 β -4 基因原核表达载体的构建

1.4.1 目的片段的获得 根据大鲵核苷酸开放阅读框序列,用 singleP 4.0 对大鲵胸腺素 β -4 蛋白进行在线分析,依据分析获得的成熟肽序列,对其进行稀有氨基酸密码子分析和改造,并依据内切酶分析

结果,在基因两端添加 *Eco*R I、*Xho* I 酶切位点和保护碱基。将改造的大鲵胸腺素 β -4 基因成熟肽序列送上海旭冠生物科技发展有限公司进行全基因合成,并根据目的片段序列,设计用于大量扩增和检测目的基因的引物,上游引物 F1 序列为:5'-GCGAA-TTCGACAAACCGGAT-3',下游引物 F2 序列为:5'-GCGCTCGAGGGACGCA-3'。将合成的目的基因于 37 $^{\circ}$ C 用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切过夜,酶切产物用 PCR clean up kit 纯化后,用 10 g/L 凝胶电泳检测后备用。

1.4.2 原核表达载体的构建 本试验采用 pET32a 为表达载体。首先挑取含 pET32a 空载体的单菌落,接种于 3 mL 含有氨苄的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后,用质粒提取试剂盒提取质粒,取 1 μ L 质粒进行 10 g/L 凝胶电泳检测。取 10 μ L 质粒,于 37 $^{\circ}$ C 用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切 2.5 h,将酶切产物用 PCR clean up kit 纯化后,用 10 g/L 凝胶电泳检测,并估计 DNA 浓度。根据外源 DNA 和表达载体的估计浓度,将基因与载体按 1.5 : 1 的体积比,于 16 $^{\circ}$ C 连接 3~4 h,4 $^{\circ}$ C 过夜,最后 65 $^{\circ}$ C 条件下温浴 10 min,灭活连接酶。

1.4.3 重组质粒的转化 在无菌条件下将 1.4.2 得到的 200 μ L 连接产物与 100 μ L *E. coli* BL21 菌株的新鲜感受态细胞混合,上下倒转混匀,冰浴 30 min 后,转入 42 $^{\circ}$ C 水浴,热激 90 s,然后迅速将其置于冰上 2~3 min 后,加入无抗生素的 LB 液体培养基 300 μ L,枪头混匀,37 $^{\circ}$ C、150 r/min 温和振荡 45~60 min。

1.4.4 阳性克隆的筛选 取 1.4.3 中 200 μ L 转化好的菌液,用铺菌器涂于含 50 μ g/mL 氨苄的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜,待长出明显的单克隆菌株后,随机挑取 12 个单克隆接种于 3 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 后,用 1.4.1 的引物进行 PCR 检测,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。PCR 产物用 10 g/L 凝胶电泳检测,将 PCR 扩增片段清晰且大小相符的克隆送宝生物公司测序验证。

1.4.5 重组蛋白的诱导表达 将经测序鉴定完全正确的克隆命名为 pET32a-T β 4,并接种于含 50 μ g/mL 氨苄的液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 3~4 h,待 OD 值为 0.4~0.5 时,用终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导。收集 IPTG 诱导 4 h 的菌液 2 mL,进行 SDS-PAGE 电泳,检测重组蛋白的表达情况。

2.1.4 不同动物胸腺素 β -4 氨基酸序列比对及进化分析 用 MEGA 4.0 软件对不同动物胸腺素 β -4 氨基酸序列进行同源性比对,并构建系统进化树,结果如图 2 和表 1 所示。胸腺素 β -4 氨基酸序列同源性比对结果(表 1)显示,大鲵胸腺素 β -4 蛋白与人、苏门答腊猩猩(*Pongo abelii*)、大鼠(*Rattus norveg-*

icus)、牛(*Bos taurus*)等的同源性最高,均为 87%;与鸡(*Gallus gallus*)、倭蛙(*Nanorana yunnanensis*)的同源性次之,均为 85%;与猪(*Sus scrofa*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)的同源性均为 83%;与大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)的同源性为 80%;与虹鳟

(*Oncorhynchus mykiss*)、椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)的同源性均为 72%;与文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)的同源性为 70%;与斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性为 61%。

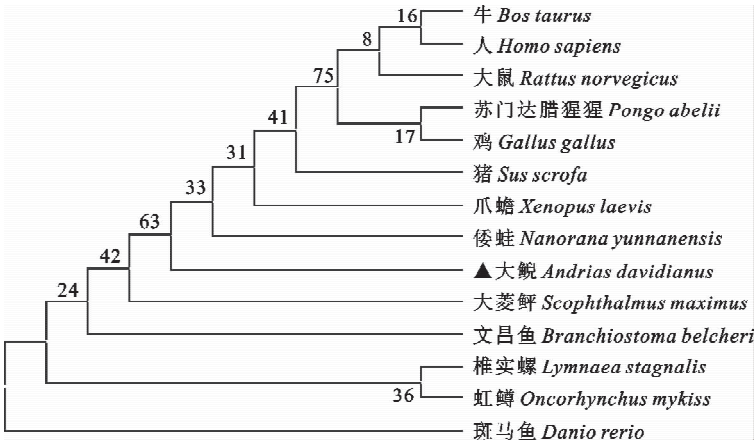


图 2 基于胸腺素 β -4 蛋白氨基酸序列构建的大鲵与其他 13 种动物的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of Thymosin β -4 protein of *A. davidianus* and 13 other animals

表 1 大鲵与其他 13 种动物胸腺素 β -4 蛋白氨基酸序列的同源性

Table 1 Homology of Thymosin β -4 protein of *A. davidianus* and 13 other animals %

品种	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri</i>	椎实螺 <i>Lymnaea stagnalis</i>	大菱鲂 <i>Scophthalmus maximus</i>	大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	倭蛙 <i>Nanorana yunnanensis</i>	猪 <i>Sus scrofa</i>	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	牛 <i>Bos taurus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	鸡 <i>Gallus gallus</i>	苏门达腊猩猩 <i>Pongo abelii</i>
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	100	74	56	59	67	61	70	70	67	70	70	70	70	70
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>		100	67	78	74	72	74	78	74	76	76	76	74	76
文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri</i>			100	67	70	70	72	72	70	74	74	74	74	74
椎实螺 <i>Lymnaea stagnalis</i>				100	72	72	70	72	67	72	72	72	70	72
大菱鲂 <i>Scophthalmus maximus</i>					100	80	78	80	78	83	83	83	80	83
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>						100	83	85	83	87	87	87	85	87
爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>							100	93	89	93	93	93	91	93
倭蛙 <i>Nanorana yunnanensis</i>								100	89	93	93	93	91	93
猪 <i>Sus scrofa</i>									100	96	96	96	93	96
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>										100	100	100	98	100
牛 <i>Bos taurus</i>											100	100	98	100
人 <i>Homo sapiens</i>												100	98	100
鸡 <i>Gallus gallus</i>													100	98
苏门达腊猩猩 <i>Pongo abelii</i>														100

2.2 大鲵胸腺素 β -4 基因在不同组织中的表达分析

对大鲵胸腺素 β -4 基因在肠、肌肉、皮肤、胃、

肾、肺、肝脏等组织中的表达情况进行荧光定量 PCR 检测,结果(图 3)表明,胸腺素 β -4 基因在 7 种组织中均有表达,相对表达量由高到低依次为肺>

胃>肌肉>肠>肾>皮肤>肝脏,可知其在肺中表达水平最高,在皮肤和肝脏中表达水平较低。

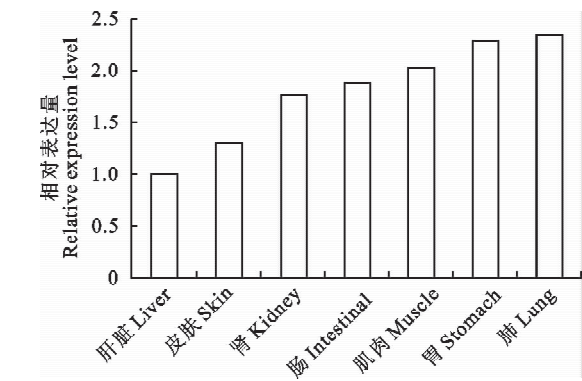


图 3 胸腺素 β 4 基因在大鲵 7 种组织中表达的
荧光定量 PCR 检测结果

Fig. 3 qRT-PCR results of Thymosin β 4 gene's expression in 7 tissues of *A. davidianus*

2.3 大鲵胸腺素 β 4 基因的原核表达

将人工合成的大鲵胸腺素 β 4 目的片段,经基因重组并连接到载体 pET32a 后,转化大肠杆菌 *E. coli* BL21,获得多个阳性克隆。经 PCR 及测序验证,获得了大鲵胸腺素 β 4 原核表达载体 pET32a-T β 4 重组菌。该菌株经 IPTG 诱导后可获得分子质量约为 25 ku 的目的蛋白,该目的蛋白是由 5.14 ku 的目的基因成熟肽部分与 pET32a 载体上 20.4 ku 标签蛋白共同组成的(图 4)。

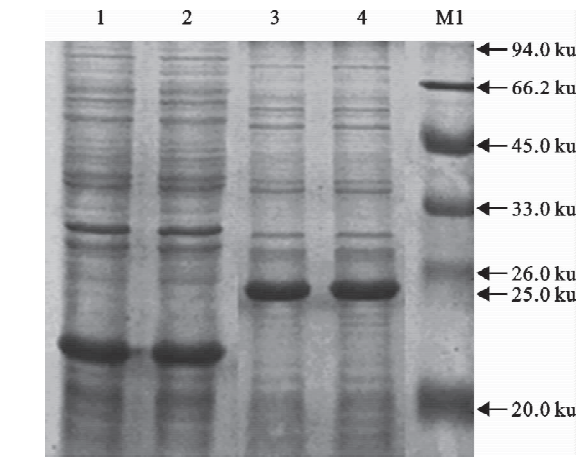


图 4 大鲵胸腺素 β 4 重组蛋白 SDS-PAGE
电泳检测结果

1,2. 空载体 pET32a;3,4. IPTG 诱导 4 h 的
重组表达载体 pET32a-T β 4

Fig. 4 Recombination of Thymosin β 4 gene
of *A. davidianus* examined by SDS-PAGE

1,2. Empty vector pET32a;3,4. pET32a-T β 4
transformation induced by IPTG for 4 h

3 讨 论

3.1 大鲵胸腺素 β 4 基因的生物信息学分析及其组织表达

胸腺素 β 4 在胸腺素 β 家族中丰度最高,且广泛分布于各组织、器官和细胞中,在免疫、神经发育、再生修复、肿瘤控制等方面具有重要的生物学功能^[7-10]。本研究从大鲵皮肤 cDNA 文库中分离获得了一段序列,经分析,该基因核苷酸序列与人的相似度为 85%, E 值为 $1e^{-56}$,包含有胸腺素 β 4 基因完整的开放阅读框,该基因编码的氨基酸序列与哺乳动物、鸟类、两栖类及鱼类等都有很高的同源性,编码的氨基酸长度为 45,胸腺素 β 4 蛋白分子质量为 5 141.59 u, pI 为 5.34。结构分析表明,该基因表达的蛋白在 N 端具有胸腺素 β 家族的保守 α -螺旋,该结构是所有 T β /WH2 结构域中与 actin 作用最强的区域,其余部分为无规则卷曲。胸腺素 β 4 N 端的 α -螺旋结构对其功能至关重要,通过突变分析发现, α -螺旋结构不完整或者其到中间模体的距离不正确,都将导致结合活性降低^[16]。综上所述,本试验分离获得的序列为大鲵胸腺素 β 4 全长基因序列。

胸腺肽的主要功能是促进 T 细胞的成熟,同时参与神经内分泌系统和免疫系统的交互作用,激活细胞免疫^[17]。本研究发现,胸腺素 β 4 在大鲵肺和胃中的表达水平均较高,在肌肉和肠中的表达水平次之,在皮肤和肝脏中表达水平均较低。这与 Randelli 等^[18]在海鲷各组织中的研究结果相似。胸腺素 β 4 基因在肺和胃组织中表达水平均较高,可能与这 2 种组织直接与外界相通且经常接触微生物或发生损伤有关。有研究表明,胸腺素 β 4 基因在对先天性免疫有重要影响的单核吞噬细胞和粒细胞中高效表达^[19];也有研究认为,胸腺素 β 4 基因的表达为激活应答式表达,是树突状表皮 T 细胞和其他上皮内淋巴细胞抑制局部炎症的一种机制^[20]。另外,胸腺素 β 4 基因在大鲵胃、肌肉和肠中的表达量较高,可能与这些组织中存在 G-actin 的调控机制有关^[21-22]。将大鲵胸腺素 β 4 基因编码的氨基酸序列与其他动物进行同源性分析发现,大鲵与人、苏门达腊猩猩、大鼠、牛等哺乳动物的同源性均最高,与鸡和倭蛙的同源性次之,与大菱鲆等鱼类的同源性较低。由构建的系统进化树可知,大鲵与陆生高等动物亲缘关系更近,说明大鲵在进化上高于两栖动物中的蛙类。这与彭亮跃等^[23]的研究结果一致。

3.2 大鲵胸腺素 β -4 基因的原核表达分析

目前胸腺素 β -4 在临床上已有广泛的应用,且在老年聋^[23]、创伤愈合^[24]、血管形成^[25]以及干眼症等疾病的治疗上取得了良好效果。但目前胸腺素 β -4 的来源主要为化学合成,价格昂贵。因此,体外高效表达胸腺素 β -4 一直是研究的热点,但由于胸腺素 β -4 是小分子多肽,致使其难于直接在大肠杆菌中获得高表达^[26]。近年来有关胸腺素 β -4 基因体外表达的研究已有报道。李一凡等^[27]克隆获得了鸡胸腺素 β -4 基因,构建了 pET-32a 2 串联体表达载体,获得的纯化蛋白能提高淋巴细胞的增殖力^[28];司信喜等^[29]将人胸腺素 β -4 基因与核糖体亚基蛋白 L12 融合表达,并在连接处引入 1 个半胱氨酸,用于 2 个蛋白的切割分离,获得了融合表达和切割纯化的人胸腺素 β -4 蛋白;张珍等^[26]采用密码子改造,构建了胸腺素 β -4 二串联体表达载体,经检测,表达纯化的胸腺素 β -4 蛋白具有生理活性;陈妍柯等^[30]发现,在胸腺肽 β -4 的 N 端融合 5 个氨基酸 (HKCDI),可以使胸腺肽 β -4 基因在大肠杆菌中得到高效表达,表达的蛋白质占细菌总蛋白质的 30%,而且融合的 5 个氨基酸并不影响胸腺肽 β -4 蛋白的生物学活性。

本研究在构建大鲵胸腺素 β -4 原核表达载体时,采用人工合成的方法,将大鲵胸腺素 β -4 基因中 Arg、Gly、Leu 等 11 个氨基酸稀有密码子改造为大肠杆菌偏爱的密码子,并将合成的大鲵胸腺素 β -4 的成熟肽与 pET32a 载体上的硫氧化还原蛋白、HisTag 融合表达,蛋白质电泳检测表明,重组菌在 IPTG 诱导 4 h 后,在接近 25 ku 处获得融合表达蛋白,该蛋白在除去融合表达的硫氧化还原蛋白、HisTag 后,分子质量约为 5 ku,与预期的目标蛋白大小一致。表明大鲵胸腺素 β -4 原核表达载体构建成功,将为进一步研究胸腺素 β -4 基因对大鲵的各项生理调节机制奠定基础。

[参考文献]

[1] 姚俊杰,张红星. 贵州省大鲵养殖产业化发展前景 [J]. 现代渔业信息,2010(7):64-65.
Yao J J,Zhang H X. Prospect on aquaculture industrialization of Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* in Guizhou Province [J]. Modern Fisheries Information, 2010(7): 64-65. (in Chinese)

[2] 牟洪民,李 媛,姚俊杰,等. 大鲵生物学研究的新进展 [J]. 水产科学,2011,30(8):513-516.
Mu H M,Li Y,Yao J J. A review:Current research on biology

of Chinese giant salamander [J]. Fisheries Science, 2011, 30 (8):513-516. (in Chinese)

[3] 赖 仞,赵 宇,刘 衡,等. 两栖类动物皮肤活性物质的利用兼论中国两栖类资源开发的策略 [J]. 动物学研究,2002(1): 29-31.
Lai R,Zhao Y,Liu H. Bioactive substance of amphibian skin and a study on exploitation and utilization of Chinese amphibian resources [J]. Zoological Research,2002(1):29-31. (in Chinese)

[4] Goldstein A L,Slater F D,White A. Preparation assay and partial purification of a thymic-lymphocytopoietic factor (thymosin) [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1966,56(3):1010-1017.

[5] Hooper J A,McDaniel M C,Thurman G B,et al. Purification and properties of bovine thymosin [J]. Ann N Y Acad Sci, 1975,249:125-144.

[6] Wang W S,Chen P M,Hsiao H L,et al. Over expression of the thymosin beta 4 gene is associated with increased invasion of SW480 colon carcinoma cells and the distant metastasis of human colorectalcarcinoma [J]. Oncogene, 2004, 23 (39): 6666-6671.

[7] Cha H J,Jeong M J,Kleinman H K. Role of thymosin β 4 in tumor metastasis and angiogenesis [J]. J Natl Cancer Inst,2003,95: 1674-1680.

[8] Blain E J,Mason D J,Duance V C. The effect of thymosin β 4 on articular cartilage chondrocyte matrix metalloproteinase expression [J]. Biochem Soc Trans,2002,30(6):879-882.

[9] Sosne G,Xu L,Prach L. Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta [J]. Exp Cell Res,2004, 293(1):175-183.

[10] Young J D,Lawrence A J,Maclean A G,et al. Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the precence of gluco corticoids [J]. Nat Med,1999,5 (1):1424-1427.

[11] Vigneswaran N,Wu J,Sacks P,er al. Microarray gene expression profiling of cell lines from primary and metastatic tongue squamous cell carcinoma, possible insights from emerging technology [J]. J Oral Pathol Med,2005,34(2):77-86.

[12] 李 艳,王 冠,于 虎,等. 胸腺素 β 4 促进创伤愈合过程中对多种生长因子及新生细胞迁移的作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(11):2143-2147.
Li Y,Wang G,Yu H. Effect of thymosin beta 4 on various growth factors and cell migration during wound healing [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2008, 12(11):2143-2147. (in Chinese)

[13] Schwede T,Kopp J,Guex N,et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. Nucleic Acids Research,2003,31(13):3381-3385.

[14] Myers M D,Sosinowski T,Dragone L L,et al. Src-like adaptor protein regulates TCR expression on thymocytes by linking the ubiquitin ligase c-Cbl to the TCR complex [J]. Nat Immunol,2006,7(1):57-66.

[15] Krakow D,Sebald E T,Pogue R,et al. Analysis of clones

- from a human cartilage cDNA library provides insight into chondrocyte gene, expression and identifies novel candidate genes for the osteochondrodysplasias [J]. *Molecular Genetic Metabolism*, 2003, 79(1): 34-42.
- [16] 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, 4(20): 580-583.
Si X X, Fang H Q, Chen H P. Recent advances of thymosin $\beta 4$ [J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 4(20): 580-583. (in Chinese)
- [17] 刘茗飞, 张丽萍. 胸腺肽制备与纯化方法的研究 [J]. *农产品加工: 学刊*, 2008(3): 37-39.
Liu M F, Zhang L P. Study on the preparation and purification of the thymosin [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2008(3): 37-39. (in Chinese)
- [18] Randelli E, Scala V, Casani D, et al. T cell receptor beta chain from sea bream (*Sparus aurata*): Molecular cloning, expression and modelling of the complexes with MHC class I [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(7): 2017-2027.
- [19] Badamchian M, Damavandy A A, Damavandy H, et al. Identification and quantification of thymosin beta 4 in human saliva and tears [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1112: 458-465.
- [20] Wise T, Ford J. Effects of the thymic peptide thymulin on in vitro and in vivo testicular steroid concentrations in White Composite and Meishan boars [J]. *J Anim Sci*, 1999, 77: 2240-2251.
- [21] Safer D, Elzinga M, Nachmias V T. Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(7): 4029-4032.
- [22] 翟晓梅, 聂兴举, 秦泽莲. 胸腺素 $\beta 4$ 基因片断 mRNA 在人瘢痕及皮肤组织中的表达定位 [J]. *中国微创外科杂志*, 2007, 12(7): 1217-1220.
Zhai X M, Nie X J, Qin Z L. Location of thymosin $\beta 4$ mRNA expression in scars and skins [J]. *Chinese Journal of Minimally Invasive Surgery*, 2007, 12(7): 1217-1220. (in Chinese)
- [23] 彭亮跃, 肖亚梅, 骆 剑, 等. 中国大鲵不同组织同工酶的比较研究 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 915-919.
Peng L Y, Xiao Y M, Luo J. Studies on the isozymes of different tissues in Chinese giant salamander [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(6): 915-919. (in Chinese)
- [24] Sosne G, Chan C C, Thai K, et al. Thymosin $\beta 4$ promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators *in vivo* [J]. *Exp Eye Res*, 2001, 72(5): 605-608.
- [25] Smart N, Risebro C A, Melville A A, et al. Thymosin $\beta 4$ is essential for coronary vessel development and promotes neovascularisation via adult epicardium [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1112: 171-188.
- [26] 张 珍, 游颜杰, 李维娜, 等. 重组人胸腺素 $\beta 4$ 基因的克隆、表达、纯化、鉴定及活性检测 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(16): 1451-1453.
Zhang Z, You Y J, Li W N. Cloning, expression, purification, identification and biological activity of recombinant human thymosin beta 4 [J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2008, 29(16): 1451-1453. (in Chinese)
- [27] 李一凡, 张 丹, 樊 萌, 等. 鸡胸腺素 $\beta 4$ 基因的克隆与原核表达 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010, 12(23): 22-24.
Li Y F, Zhang D, Fan M. Cloning and prokaryotic expression of gallus thymosin $\beta 4$ in *Gallus gallus* [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2010, 12(23): 22-24. (in Chinese)
- [28] 王国卿, 郭弄潮, 刘 丽. 鸡胸腺素 $\beta 4$ 串联体的原核表达、纯化与活性 [J]. *东北大学学报: 自然科学版*, 2011, 32(10): 1517-1520.
Wang G Q, Guo N C, Liu L. Prokaryotic expression, purification and bioactivity of chicken thymosin $\beta 4$ concatemer [J]. *Journal of Northeastern University: Natural Science*, 2011, 32(10): 1517-1520. (in Chinese)
- [29] 司信喜, 戴红梅, 方宏清, 等. 化学切割重组融合蛋白制备人胸腺肽 $\beta 4$ [J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(5): 677-679.
Si X X, Dai H M, Fang H Q. Chemical cleavage of recombinant fusion protein to prepare human thymosin $\beta 4$ [J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(5): 677-679. (in Chinese)
- [30] 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, 3(4): 502-505.
Chen Y K, Yang H, Lu F. Cloning expression in *E. coli* and biological activity of human thymosin $\beta 4$ [J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2002, 3(4): 502-505. (in Chinese)