



论文

通过染色体整合表达古菌乙酰化酶合成 N-末端乙酰化胸腺肽 β 4

曹赛^{①②†}, 戴红梅^{①†}, 孙旭^{①③}, 颢孙丹丹^{①②}, 和金周^{①③}, 司信喜^①, 李树龙^{①*}, 方宏清^{①*}, 陈惠鹏^①, 谢达平^②, 周长林^③

① 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;

② 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410128;

③ 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: fredsl1@126.com; fanghongqing@vip.sina.com

收稿日期: 2011-07-16; 接受日期: 2011-08-17

国家自然科学基金(批准号: 30780049)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CBA00801)资助项目

doi: 10.1360/052011-565

摘要 胸腺肽 β 4(T β 4)是 N-末端乙酰化的 43 肽, 具有多种重要生物学功能. 其生物合成存在两大难点, 即乙酰化修饰和小分子肽的表达. 本研究发现来自古菌 *Sulfolobus solfataricus* 的乙酰化酶 ssArd1 可以催化 T β 4 的 N-末端乙酰化修饰. 利用 Red 同源重组技术将 ssArd1 基因表达盒整合至 *E. coli* BL21(DE3)染色体的 *lpxM* 位点上, 构建了可以实现 T β 4 N-末端乙酰化修饰的新型宿主 *E. coli* BDA. 将 T β 4 编码基因融合在改造的微型 *Spl* DnaX Intein 的 N 端, 并在 Intein 的 C 端添加 His 标签, 构建了表达载体 pET-T β 4-Intein. 在 *E. coli* BDA 中表达的融合蛋白, 经镍亲和层析纯化后用 β -巯基乙醇诱导融合蛋白切割释放小分子多肽, 获得了具有 N-末端乙酰化的 T β 4.

关键词

胸腺肽 β 4

乙酰化酶

N-末端乙酰化

Intein

胸腺肽 β 4(T β 4)是具有 N-末端乙酰化修饰的 43 肽, 是人体内最主要的肌动蛋白调节分子之一, 具有多种生物学功能, 在组织再生、重塑、创伤愈合、维持肌动蛋白平衡、肿瘤发病与转移、细胞凋亡、炎症、血管生成、毛囊发育等生理和病理过程中扮演着极为重要的角色, 是一种极具潜力的治疗用药^[1,2].

因多肽化学合成成本高, 人们尝试用生物合成方法制备 T β 4^[3]. 大肠杆菌是最常用的表达宿主, 在大肠杆菌中表达 T β 4 存在两大难题, 即 N-末端乙酰化修饰和小分子多肽的表达. 乙酰化修饰能影响许

多蛋白质功能, 如酶活性、稳定性、DNA 结合、蛋白质与其他分子相互作用以及受体识别等^[4]. 乙酰化修饰在大肠杆菌中极少发生, 至今只发现 RimL, RimJ 和 RimI 3 种乙酰转移酶, 分别负责修饰 L12, S5 和 S18^[5]. 研究表明, 大肠杆菌内 RimJ 能修饰 T α 1 融合蛋白, 并且与 RimJ 共表达能获得完全乙酰化修饰的 T α 1^[6], 根据这一发现我们建立了 T α 1 的生物制备方法. 但 RimJ 不能修饰 T β 4, 说明大肠杆菌的乙酰化酶具有严格的底物特异性. 2007 年 Mackay 等人^[7]发现一种来自嗜盐古生菌硫叶菌属

英文引用格式: Cao S, Dai H M, Sun X, et al. Biosynthesis of N^ε-acetylated thymosin β 4 by co-expressing an archaeal acetylase integrated in chromosome of *Escherichia coli*. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 1008–1015, doi: 10.1360/052011-565

(*Sulfolobus solfataricus*)的保守蛋白 ssArd1, 体外能修饰 N 末端为 Ser 和 Ala 的蛋白质, 并且具有较广的底物催化特性, 推测 ssArd1 具有真核 NatA 类似的功能.

本研究通过体外实验证明 ssArd1 可以修饰 T β 4 的 N-末端 6 肽, 然后利用 Red 同源重组技术将合成该酶基因整合到 *E. coli* BL21 (DE3)染色体上构建了新型宿主 *E. coli* BL21 (DE3) lpxM:Kan-Ard1 (简称 *E. coli* BDA). 为表达 T β 4, 将其编码基因融合在一种分子量极小的 *Spl* DnaX Intein (136 个氨基酸残基, 来源于 *Spirulina platensis*)的 N 端^[8], 同时在 Intein 的 C 端添加 His 标签, 构建融合表达载体 pET-T β 4-Intein, 在宿主 *E. coli* BDA 表达. 由于该 Intein 的 C 末端残基 Asn 突变为残基 Ala, 阻断了剪接反应, 在体外用巯基乙醇诱导融合蛋白发生 N 端切割释放目标小分子多肽 T β 4. 质谱分子量测定及 N-端测序结果表明, 其结构与天然 T β 4 一致, 具有 N-末端乙酰化修饰, 为进一步研究 T β 4 的功能和应用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. coli DH5 α , *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术公司; 质粒 pET22b 购自 Novagen 公司, 乙酰化酶表达质粒 pET-RimJ 和 pET-ssArd1, Red 重组辅助质粒 pKDS^[9]由本实验室保存.

1.2 酶和主要试剂

TransHiFi DNA 聚合酶和 Easytaq DNA 聚合酶购自全式金生物技术有限公司; DNA Marker, Pyrobest DNA 聚合酶, T4 DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪有限公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京博大泰恒基因技术公司; 低分子量蛋白质标准购自 GE Healthcare 公司; 巯基乙醇、DTT 和 ATP 购自 AMRESCO 公司; HPLC 色谱纯乙腈购自天津彪仕奇科技发展有限公司; 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成.

1.3 乙酰化酶 RimJ 和 Ard1 的底物特异性研究

pET-RimJ 和 pET-ssArd1 分别用来表达乙酰化酶

RimJ 和 ssArd1, 镍亲和层析后将蛋白质溶液进行透析脱盐处理, 然后与甘油以 1:1 混合, -20℃ 保存. 使用前用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度. 乙酰化酶的底物特异性分析参考文献方法实施^[5,10]. 选择 8 种蛋白质的 N 末端六肽作为两种乙酰化酶的底物, 实验组反应体系包括 80 nmol/L RimJ 或者 ssArd1, 50 μ mol/L 5,5'-DTNB, 六肽底物 50 μ mol/L, 50 μ mol/L AcCoA, 补充 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液至 1 mL. AcCoA 背景对照组不添加酶和六肽底物, 其他组分浓度与实验组一致. 酶背景对照组不添加 RimJ 或 ssArd1, 其他组分浓度与实验组一致. 将各反应组置于 25℃ 孵育 30 min, 待充分反应后, 紫外分光光度计检测各样品在 421 nm 下的吸光值, 以磷酸盐缓冲液作为空白对照, 根据吸光值的变化分析两种酶分别可以催化哪些 N 末端六肽底物.

1.4 构建染色体整合表达 ssArd1 宿主 *E. coli* BDA

染色体整合表达乙酰化酶 ssArd1 宿主 *E. coli* BDA 的构建过程如图 1(A)所示. 打靶质粒 pBRSS-LPLR-Kan-Ard1 骨架上含有四环素抗性基因和枯草杆菌 *sacB* 基因(可作为反向筛选标记); 在同源臂 lpxm-L 和 lpxm-R 两侧各有一个 I-Sce I 识别位点, 中间为卡那霉素抗性基因和 T7 启动子控制表达的 ssArd1 编码基因. 同源臂为 lpxM 基因两侧序列. 辅助质粒 pKDS 为温敏复制型质粒^[9], 含有阿拉伯糖启动子控制表达 Red 重组酶基因和 I-Sce I 酶基因. 将辅助质粒 pKDS 和打靶质粒 pBRSS-LPLR-Kan-Ard1 共同电转化至 BL21(DE3), 涂布含有卡那霉素和氯霉素的 LB 固体平板. 挑选单菌落至同样抗性的 LB 液体培养基中, 过夜培养. 次日取菌液接种到含有氯霉素抗性的 LB 液体培养基中, 200 r/min 30℃ 培养到 $A_{600} \approx 0.4$. 加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导 Red 重组酶和 I-Sce I 酶表达, 5 h 后, 取菌液 200 μ L, 涂布含卡那霉素和蔗糖的平板. 37℃ 过夜培养. 挑取单菌落到 LB 无抗培养基中, 培养 4~5 h 后, 以基因组上同源臂外侧序列 LU(5'-AGACATTAAGACTGCGGCGT-3')和 LD(5'-ACTCTCCTGGACATTAACCG-3')为引物, 菌液 PCR 筛选阳性重组子, 并经测序验证后再剔除辅助质粒 pKDS, 得到目的菌株 BL21 (DE3) lpxM:Kan-Ard1, 简称 *E. coli* BDA.

1.5 构建融合蛋白表达载体 pET-Tβ4-Intein

根据 *Spl* DnaX Intein 的氨基酸序列, 并考虑便于和其他基因融合, 设计了编码基因序列. 该序列含有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 便于与 pET22b 连接; 含有 *Afl* II 和 *Sph* I 酶切位点, 便于与其他多肽编码基因融合. 为了引入 *Afl* II 酶切位点, 将 Intein 的 N 端第 3 个残基 Thr 突变为 Ser 残基; 将 C 端 Asn 残基置换为 Ala, 使 Intein 失去剪接活性, 但不影响 N 端切割功能^[11]. 合成序列, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切与 pET22b 连接, 获得 pET-S. 用 *Nde* I 和 *Afl* II 双酶切合成的 *Tβ4* 基因片段与 pET-S 连接, 得到表达 *Tβ4* 与 *Spl* DnaX Intein 融合蛋白(Tβ4-Intein)的重组载体 pET-Tβ4-Intein. 融合蛋白 Tβ4-Intein 的基因编码序列及氨基酸序列见图 2(A).

1.6 蛋白质表达、纯化和定量

将 pET-Tβ4-Intein 转化至 *E. coli* BDA, 于 LB 液体培养基(所用培养基均含 100 μg/mL 氨苄青霉素) 30℃ 振荡过夜活化, 次日转接至 FMG 培养基(7 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 2.5 g/L NaCl, 12 g/L 酵母粉, 15 g/L 蛋白胨, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L 葡萄糖) 30℃ 扩大培养 10 h, 最后 FML 培养基(12 g/L 酵母粉, 15 g/L 蛋白胨, 3 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 7 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2.5 g/L NaCl, 2 g/L 葡萄糖, 0.72

g/L 乳糖, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 37℃ 培养 8 h 诱导融合蛋白表达. 离心收集菌体, 用镍层析平衡液(50 mmol/L PB, 0.5 mol/L NaCl, 80 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 重悬并超声冰浴破菌. 离心, 取上清, 加入 1% Triton X-100, 漩涡混匀, 0.45 μm 滤膜过滤, 用 Ni-IDA 树脂亲和和层析纯化融合蛋白. 融合蛋白溶液中添加 300 mmol/L 巯基乙醇, 置于 42℃ 恒温水浴下诱导切割 12 h. 取出切割体系, 加入等体积的 2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 溶液, 使终浓度为 1 mol/L, 0.22 μm 滤膜过滤上样 STREAMLINE Phenyl, 目的小分子多肽存在于疏水穿过中, 未发生切割的融合蛋白和切割后余下的 Intein 部分挂柱. 穿过液上样 SORCE30RPC, 梯度洗脱进一步分离杂蛋白质. 含有目的蛋白质的样品用阴离子层析平衡液(10 mmol/L NH_4HCO_3 , pH 8.5) 稀释 1 倍, 0.5 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.5, 上样 Q Sepharose, 根据 214 nm 紫外吸收值收集洗脱液, 用 BCA 蛋白质定量试剂盒定量.

1.7 RP-HPLC 分析、质谱测定分子量及 N 端残基序列

取阴离子层析纯化后的目的蛋白质溶液 25 μL, 上样 Hypersil 300Å C18 柱, 1 mL/min 用 B 液(60% CH_3CN , 0.05% TFA)梯度洗脱 60 min, 214 nm 波长检测 Tβ4. 根据目的蛋白质峰面积占峰总面积的百分比计算纯度. 收集目的蛋白质洗脱峰, 冷冻真空干燥后

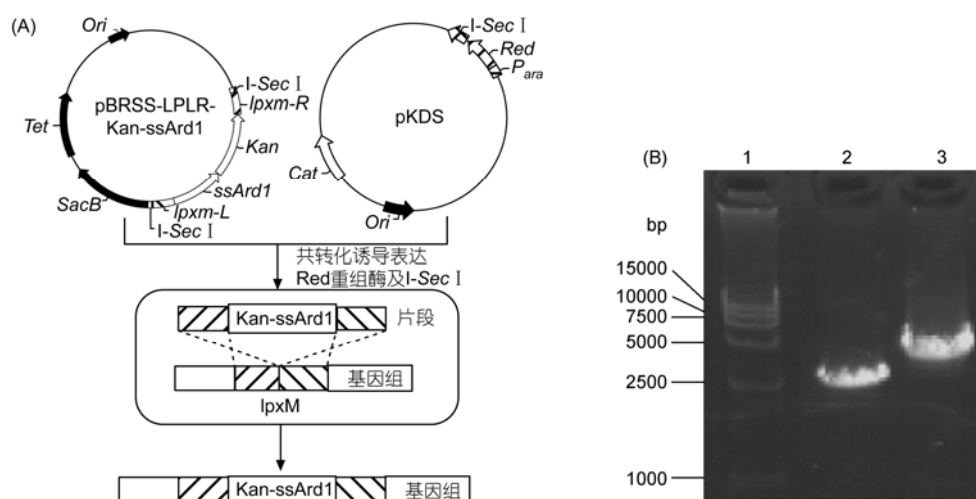


图 1 重组菌 *E. coli* BDA 的构建和 PCR 鉴定

(A) Red 同源重组染色体整合 ssArd1 策略; (B) PCR 鉴定 *E. coli* BDA. 1, DNA Marker DL15000 bp; 2, BL 21(DE3)的 PCR 产物; 3, BDA 的 PCR 产物

进行 ESI-Q-TOF-MS 测定精确分子量. 取阴离子层析纯化后稀释至 1 mg/mL 的 T β 4 溶液, 依照酶与蛋白质质量比 1:50 的比例在蛋白质溶液中加入胰蛋白酶, 37°C 孵育过夜, 用 C18-Ziptip 对酶切后的样品进行脱盐, 直接进样进行 ESI-Q-TOF-MS/MS 分析, 捕获 N 端 1-11 肽段进行测序.

2 结果

2.1 RimJ 和 ssArd1 的底物特异性

在乙酰化酶催化下, AcCoA 的乙酰基转移到 N-末端六肽底物上, 产生游离的 CoA-SH, 与 5,5'-DTNB 反应生成黄色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸, 通过紫外分光光度计测定 412 nm 吸光值的变化来分析乙酰化反应是否进行, 比较 RimJ 和 ssArd1 两种乙酰化酶的底物特异性(表 1). 结果表明, RimJ 可以乙酰化 T α 1, ESAT-6, S5 三种六肽, ssArd1 可以乙酰化 T α 1, T β 4, ESAT-6, S5, S18, L12, EF-Tu 七种六肽, 表明 ssArd1 具有更广泛的底物特异性.

2.2 E. coli BDA 的构建

利用 Red 同源重组将乙酰化酶 ssArd1 整合至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 产生新的表达菌株 E. coli BDA, 如图 1(A)所示. 以 BL21(DE3)作为阴性对照, PCR 鉴定目的菌株, 如图 1(B)所示. 阴性对照和目的重组菌 PCR 产物分别为 3000 和 4000 bp, 说明目的重组菌构建成功.

2.3 T β 4 的表达纯化

图 2(A)表示融合蛋白 T β 4-Intein 的基因编码序列及氨基酸序列. 工程菌 BDA/pET-T β 4-Intein 以可溶形式高效表达融合蛋白, 图 2(B)中约 15 kD Intein-his 表达条带很浅, 说明体内自切割较少. 融合蛋白溶液中添加 300 mmol/L 巯基乙醇置于 42°C 诱导

切割 12 h. 巯基试剂对硫酯键进行亲和攻击, 诱导 Intein 的 N 端肽键断裂, 从而释放目的蛋白, 接下来经过疏水、反相和阴离子交换层析获得 T β 4 纯品. 经定量, T β 4 得率约为 61 mg/L 培养液. 利用 RP-HPLC 对 T β 4 进行分析, 纯度为 96.7%.

2.4 乙酰化修饰鉴定

T β 4 乙酰化后的单同位素理论分子量为 4960.49 Da, 图 3(A)中 ESI-Q-TOF-MS 法测定 T β 4 样品加 H⁺后的精确分子量为 4961.50 Da, 减 H⁺后为 4960.49 Da, 与理论值一致, 并且图 3(A)无非乙酰化的 T β 4 峰出现, 说明制备的 T β 4 获得了充分的乙酰化修饰. 图 3(B)是利用 ESI-Q-TOF-MS/MS 方法测定 T β 4 样品经胰蛋白酶酶切后的 N 端 1-11 位氨基酸残基序列, 结果为 SDKPDMAEIEK, 与理论值一致. 该乙酰化肽段的理论分子量为 1303.59 Da, 加 H⁺后的肽段分子量为 1304.60 Da, 这与实测值 1304.72 Da 很接近. 图 3(B)结果还说明, N-末端第一位残基的分子量为 129.03 Da, 正好与乙酰化修饰 Ser 残基吻合(87.03+42.01)Da, 说明发生了 N-末端 Ser 残基发生了乙酰化修饰.

3 讨论

蛋白质要获得 N-末端乙酰化修饰至少需要具备 2 个条件: 一是适当的 N-末端序列, 二是合适的乙酰化酶^[12]. 大肠杆菌因其生长周期短、生产成本低、外源基因表达量高等突出优点成为遗传重组领域最广泛使用的宿主之一^[13], 但由于缺乏合适的乙酰化修饰系统, 外源蛋白表达后往往不能获得乙酰化修饰. 大肠杆菌 RimJ 和古菌 ssArd1 的体外催化实验结果表明, 前者的底物较为严格, 后者底物范围更广泛. 采用 Red 同源重组技术将 ssArd1 整合至大肠杆菌 BL21(DE3)染色体, 构建了可以实现 T β 4 的 N-末端乙酰化修饰的新型表达宿主 E. coli BDA. 根据表 1 的实

表 1 RimJ 和 ssArd1 体外乙酰化 N-末端六肽结果

分组	$A_{412\text{ nm}}$							
	T α 1 SDAAVD	T β 4 SDKPDM	ESAT-6 TEQQWN	S5 AHIEKQ	S18 ARYFRR	L12 SITKDQ	EF-Tu SKEKFE	Gd MEEVLS
酶对照	0.042	0.042	0.041	0.040	0.040	0.035	0.041	0.035
AcCoA 对照	0.038	0.038	0.039	0.038	0.041	0.044	0.034	0.036
RimJ 反应组	0.274	0.051	0.132	0.177	0.042	0.046	0.044	0.040
ssArd1 反应组	0.214	0.204	0.159	0.123	0.148	0.218	0.125	0.043

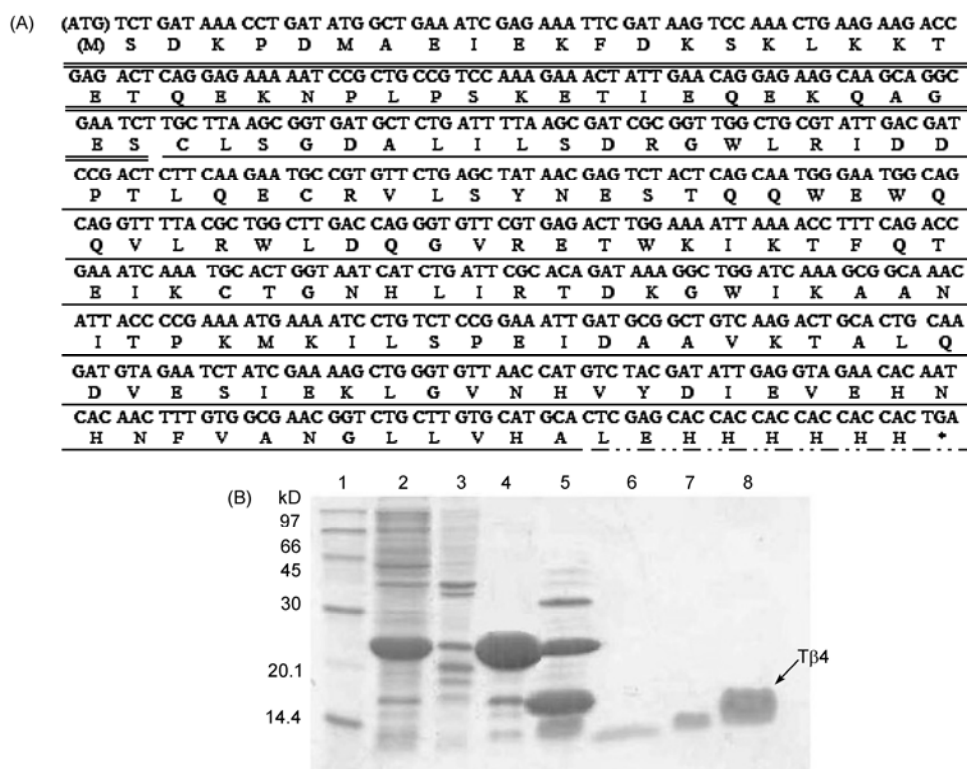


图2 融合蛋白的构建、表达及目的蛋白质纯化

(A) 融合蛋白Tβ4-Intein的基因编码序列及氨基酸序列示意图。Tβ4(双下画线)和His标签(点线)分别融合在*Spl* DnaX Intein(下画线)的N端和C端; (B) Tβ4纯化过程的SDS-PAGE分析。1, 蛋白质Marker; 2, 破菌上清; 3, 破菌沉淀; 4, 镍层析融合蛋白Tβ4-Intein; 5, 诱导切割后; 6, 疏水穿过; 7, 反相层析洗脱; 8, 阴离子交换层析洗脱

验结果, 可以推测, 该菌株也可以对其他一些蛋白质进行N-末端乙酰化修饰。

为实现低分子量多肽的表达, 将Tβ4与一种微型Intein融合^[11]。Intein可以分为两类: 一种为改变pH诱导发生C端切割的Intein, 另一种是用巯基试剂诱导N端或者C端切割的Intein^[14]。前者只需改变切割缓冲液pH便可诱导蛋白发生C端切割, 释放目的蛋白, 其最大的缺点是胞内表达过程中, 融合蛋白体内自切割现象比较严重, 这就导致目的蛋白胞内损失严重, 得率较低。与前者相比, 后者介导融合体内表达时体内自切割较少, 因此通常目的蛋白得率较高, 但是不适合纯化含有二硫键的目的蛋白。2007年, Li等人^[3]利用大肠杆菌表达融合蛋白Tβ4-intein-CBD, 他们采用DTT诱导融合蛋白切割

时, 制备出来的Tβ4C端多出了5个氨基酸残基, 且未经乙酰化修饰。由于他们选用的intein-CBD标签分子量达到27 kD, 因而Tβ4在融合蛋白中的所占比例较小, 他们最后制备得到的Tβ4得率为4 mg/L培养液。本研究所选择的*Spl* DnaX Intein分子量较小(约15.7 kD), 融合蛋白表达量高, 体内自切割少。由于目的蛋白Tβ4以及3个突变体都不含有二硫键, 融合蛋白纯化后, 通过添加巯基乙醇即可诱导发生N端切割释放目的蛋白。本研究摸索得到的培养条件以及切割、纯化等工艺较成熟且重复率高, 最后制备得到N-末端乙酰化修饰的Tβ4纯度达到96.7%, 产量为61 mg/L培养液。最终建立了一种大量生物制备天然Tβ4的方法, 得率高, 成本低, 具有实际应用前景。

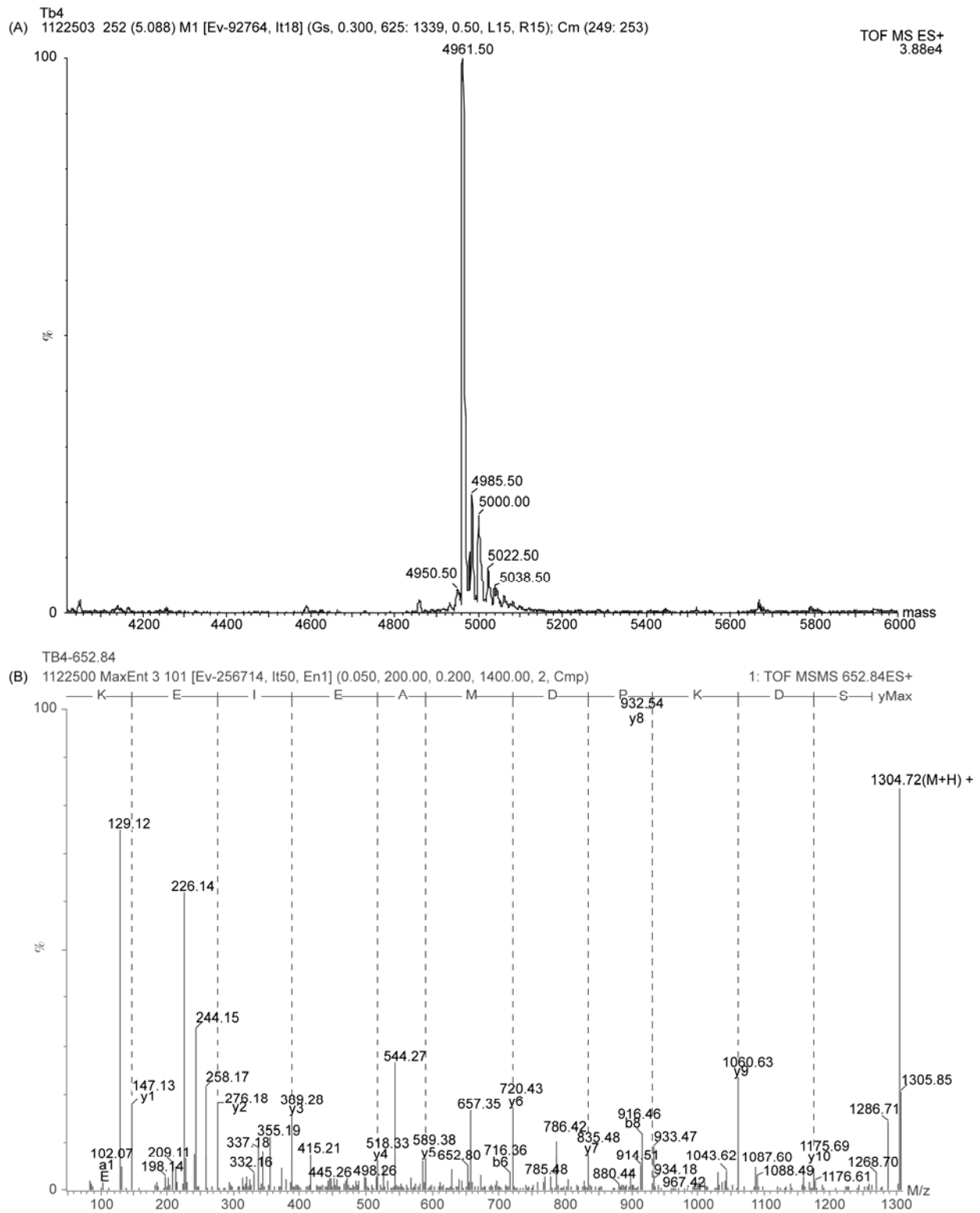


图 3 Tb4 样品的精确分子量和 N 端序列测定

(A) ESI-Q-TOF-MS 测定 Tb4 样品精确分子量; (B) ESI-Q-TOF-MS/MS 分析 Tb4 样品的 N 末端部分序列

参考文献

- 1 Crockford D, Turjman N, Allan C, et al. Thymosin β 4: structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1194: 179–189
- 2 Goldstein A L, Hannappel E, Kleinman H. Thymosin β 4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol Med*, 2005, 11: 421–429
- 3 Li X K, Zheng L S, Peng F W, et al. Recombinant thymosin beta 4 can promote full-thickness cutaneous wound healing. *Protein Exp Pur*, 2007, 56: 229–236
- 4 Perrier J, Durand A, Giardina T, et al. Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase. *Biochimie*, 2005, 87: 673–685
- 5 Vetting M W, Carvalho L P S, Roderick S L, et al. A Novel Dimeric structure of the RimL N^α-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 2005, 280: 22108–22114
- 6 Fang H Q, Zhang X, Shen L, et al. RimJ is responsible for N^α-acetylation of thymosin α 1 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84: 99–104
- 7 Mackay D T, Botting C H, Taylor G L, et al. An acetylase with relaxed specificity catalyses protein N-terminal acetylation in *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol*, 2007, 64: 1540–1548
- 8 Peter F B. InBase, the intein database. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 383–384
- 9 周军智, 邹永康, 戴红梅, 等. 大肠杆菌 *ptsHicrr* 操纵子的快速敲除及敲除菌生长性能测定. *微生物学通报*, 2010, 37: 1146–1152
- 10 Vetting M W, Barcich D C, Yu M, et al. Crystal structure of RimI from *Salmonella typhimurium* LT2, the GNAT responsible for N^α-acetylation of ribosomal protein S18. *Protein Sci*, 2008, 17: 1781–1790
- 11 Ren Y, Yao X, Dai H, et al. Production of N^α-acetylated thymosin α 1 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories*, 2011, 10: 26
- 12 Polevoda B, Sherman F. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for n-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol*, 2003, 325: 595–622
- 13 Gräslund S, Nordlund P. Protein production and purification. *Nat Meth*, 2008, 5: 135–146
- 14 Fong B A, Wu W Y, Wood D W. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 272–279

Biosynthesis of N^α -acetylated Thymosin β 4 by Co-expressing an Archaeal Acetylase Integrated in Chromosome of *Escherichia coli*

CAO Sai^{1,2}, DAI HongMei¹, SUN Xu^{1,3}, ZHUANSUN DanDan^{1,2}, HE JinZhou^{1,3}, SI XinXi¹, LI ShuLong¹, FANG HongQing¹, CHEN HuiPeng¹, XIE DaPing² & ZHOU ChangLin³

¹ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

² College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China;

³ School of Life Sciences and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Thymosin β 4 (T β 4), a 43-amino acid N^α -acetylated peptide, has multiple significant biological functions. There are two bottlenecks to its biosynthesis: the difficulties in obtaining N^α -acetylation and expressing small peptides. In this study we found that ssArd1, an archaeal acetylase from *Sulfolobus solfataricus* can acetylate the N-terminal residue Ser of T β 4. A modified *E. coli* BL21(DE3) with ssArd1-expressing cassette integrated in the locus of *lpxM* of chromosome by Red recombination was constructed and named as *E. coli* BDA for N^α -acetylation of proteins expressed in it. To obtain N^α -acetylated T β 4 efficiently, a fusion protein, T β 4-Intein, was constructed, in which T β 4 and a His tag were fused respectively to the N-terminus and the C-terminus of a smallest mini-intein, 136-amino acid *Spl* DnaX. After expression in *E. coli* BDA and purification by Ni-Sepharose affinity chromatography, the fusion protein was induced by β -mercaptoethanol to release N^α -acetylated T β 4 through intein-mediated N-terminal cleavage. Three mutants of T β 4 were prepared in the same way. All of T β 4 and its three mutants have the ability to bind actin. This study laid a foundation for further investigation of the function and application of T β 4.

thymosin β 4, acetylase, N^α -acetylation, intein, actin

doi: 10.1360/052011-565