

249个氨基酸的人胰岛素原融合蛋白的表达

唐建国 薛英姿 范贤彬 傅易欣

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

选Tac启动子, 构建了以牛凝乳酶原B前161个氨基酸的多肽基因与人胰岛素原基因的融合基因的表达质粒pJG202, 转化大肠杆菌JM105, 表达受IPTG及温度诱导。高表达时, 按电泳扫描计算, 表达的融合蛋白可占细胞总蛋白的20—35%。经CNBr裂解, S-磺酸解, 初步分离S-磺酸型的人胰岛素原后再使之重组, 可分离得人胰岛素原纯品, 其氨基酸组成、生物活性与人胰岛素原标准相同。

关键词 人胰岛素原; 基因表达

胰岛素用于临床糖尿病的医治已有近70年的历史。长期以来, 其来源仅仅是从动物的胰脏中提取, 而动物的胰岛素由于与人的胰岛素在氨基酸组成上有一定的差异, 长期注射人体时, 人体会产生自身的免疫反应, 影响治疗。随着70年代末遗传工程的兴起, 人们已可能用生物技术的方法生产人胰岛素。国外人胰岛素的基因工程生产一般采用了两种方式^[1-3]。80年代初, 我国科学工作者也开始了人胰岛素基因工程表达工作, 但所采用的各种体系均有一定的问题, 故一直没有突破性的进展, 连人胰岛素原的纯品都很难拿到^[4,5]。张渝英等^[6]已报道了大肠杆菌体系中, 在Tac启动子的启动下高效表达牛凝乳酶原B的结果。本文以部分牛凝乳酶原B的基因与人胰岛素原的基因进行融合, 表达出合适大小的融合蛋白, 并将融合蛋白进行加工, 得到了具有天然活性的人胰岛素原纯品。

材料与 方法

(一) 材料

1. 菌种培养与质粒: *E. coli* JM105

在LB上培养。pTaAc'由中国科学院微生物所杨开宇教授赠送, 为pTaAc'用EcoRI去掉牛凝乳酶原B一段基因, 再自身环化, 含有Tac启动子及牛凝乳酶原BN端161个氨基酸的多肽基因^[6]。pBCA由中国科学院生物物理所申同健教授赠送, 由吴瑞实验室合成, 含有人工合成的人胰岛素原基因^[7]。pUC19购自华美生物工程公司。

2. 酶和试剂: 限制酶, T4 DNA连接酶, IPTG购自华美生物工程公司; CNBr购自Sigma公司。人胰岛素原标准由中国科学院生物物理所邹承鲁教授赠送, 系美国Lilly公司基因工程产品。人胎盘膜按文献制备^[8], 胰岛素放射免疫试剂盒购自北京西苑生物技术中心。

(二) 方法

1. 表达质粒的构建: 参考 Sambrook等方法^[9]。

2. SDS-PAGE: 参见Sambrook等

本文于1992年1月29日收到。

作者衷心感谢顾孝诚教授、陈章良教授、潘乃燧教授对本工作的大力支持, 感谢袁洪生老师协助完成氨基酸组成分析, 胡美浩教授对论文所提的宝贵意见。作者还要感谢杨开宇教授, 申同健教授、邹承鲁教授对本工作的关心与鼓励。

方法^[9]，用10%胶浓度，考马斯亮蓝染色后用薄层扫描仪进行光密度扫描。

3. CNBr裂解、S-磺酸解、反相HPLC、氨基酸组成分析：参考Tang等^[10,11]和Sephadex G50 (fine, 2.5 × 100cm)柱以50mmol/L NH₄HCO₃为流动相。S-磺酸型人胰岛素原粗品在变性剂中还原后，透析除去变性剂及多余的还原剂，参照Steiner和Clark^[12]方法进

行氧化，可得重组粗产物。

4. 受体结合分析：参见Tang等^[11]，放免分析参见试剂盒说明，略加修改。

结果与讨论

(一)表达质粒pJG202的构建及鉴定

图1显示了表达质粒pJG202的构

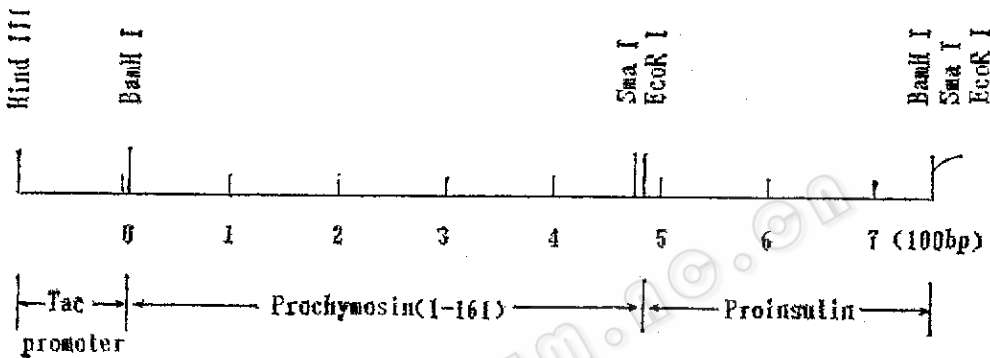


图 1 质粒pJG202中的Tac启动子及融合蛋白基因的物理图谱(含pUC19多酶接头处)

Fig.1 Physical map of the fu-ion gene including Tac promoter, fusion protein gene and part of pUC19 polylinker of pJG2c2

建。pTaAc'经HindIII及EcoRI双酶切，可得Tac启动子及牛凝乳酶原B(1—161)

的基因，pBCA经EcoRI及BamHI双酶切，可得人胰岛素原的基因，再将pUC19用HindIII及BamHI切开，将上述两段基因定向克隆进去，即得表达质粒pJG202。

图2给出了pJG202酶切鉴定结果，与设计相符。在pJG202中，融合基因的起始密码前有两个SD序列，与之相距分别3个和10个bp，这一因素为基因的高效表达创造了良好的条件。在牛凝乳酶原片段与人胰岛素原基因的连接处，读码框架未发生移位，在两者融合的连接处，有两个氨基酸，即Arg(162)，Met(163)，通过CNBr裂解，可在Met(163)处释放出N端正确的胰岛素原。在整个249个氨基酸大小的融合蛋白中，胰岛素原约占其三分之一的量，较利于CNBr的裂解及后加工。

(二)pJG202的表达

我们所采用的表达条件基本同文献

建。pTaAc'经HindIII及EcoRI双酶切，可得Tac启动子及牛凝乳酶原B(1—161)

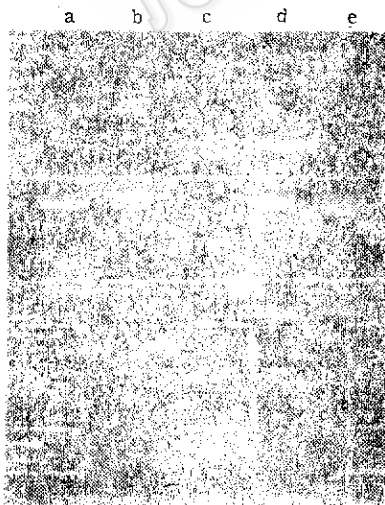


图 2 质粒pJG202的酶切鉴定电泳图谱

Fig.2 Restriction map of pJG202

a, BamHI, b, EcoRI, c, λ DNA digested by Hind III, d, SmaI, e, Hind III/EcoRI

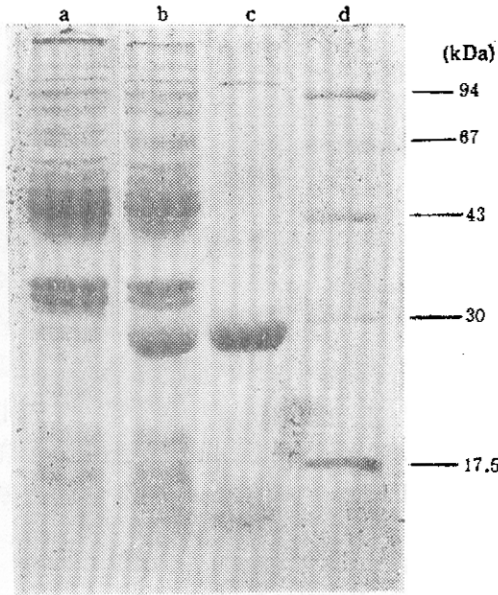


图 3 质粒pJG202表达产物的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression product of pJG202

a.Total protein of *E.coli* JM105 transformed with pUC19, b.As(a)transformed with pJG202, c.Purified protein by sonication and centrifugation from (b), d.Molecular weight marker (from big to small), Phosphorylase b, albumin, actin, carbonic anhydrase, TMV coat protein

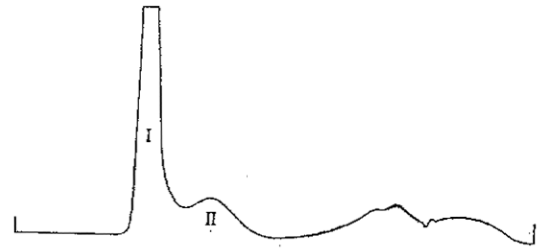


图 4 Sephadex G50分离经CNBr裂解及S-磺酸解后的表达产物

Fig.4 Sephadex G50 separation of the purified inclusion bodies of pJG202 after CNBr cleavage and sulfitolysis. Fraction II is the crude S-sulfonated human proinsulin

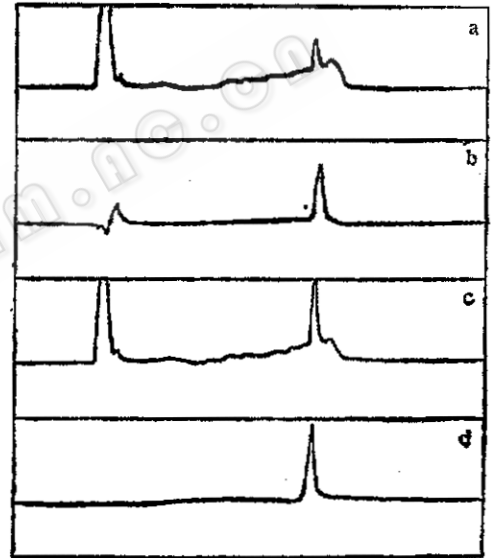


图 5 重组产物的HPLC分析

Fig.5 HPLC analysis of the oxidation products of partially purified S-sulfonated recombinant human proinsulin

a. The oxidation products alone, b. Recombinant human proinsulin standard, c.As(a)with the addition of (b), d.Purified recombinant human proinsulin

通过对包含体蛋白的CNBr裂解及S-磺酸解,再经过Sephadex G50柱,可得S-磺酸型人胰岛素原粗品,图4显示了Sephadex G50柱的结果,由图中可见透过峰仍较大,表明CNBr裂解尚不彻底,

[6], 所得菌体按1:10 (w/v) 悬浮于STET缓冲液中, 进行超声波破碎细胞, 离心沉淀包含体。图3显示了pJG202表达产物的SDS-PAGE分析结果, 我们看到, 表达量是比较高的, 通过包含体一步纯化, 纯度已相当高。所表达的融合蛋白分子量接近30kDa的标准而略小, 与设想的28kDa相符。通过对电泳胶的薄层扫描, 可知融合蛋白表达量占总蛋白的35%, 通过超声波处理及离心分离纯化, 所得包含体的纯度可高达81%, 这为我们下面的工作提供了方便。

(三)融合蛋白后处理成人胰岛素原

峰II即为粗品。我们以S-磺酸型人胰岛素原的粗品直接做还原重组^[12]，可得具有高生物活性的重组产物，图5显示了重组产物的反相HPLC分析，由图中可见有一主峰，其峰位与重组人胰岛素原标准相符，对此峰分离，得到的人胰岛素原在反相HPLC上显示单峰，见图5d，电泳性质也与人胰岛素原相同(结果未列出)。图5a、c中有较大的透过峰，含有盐份及部分未挂上柱的杂蛋白。表1显示了基因工程人胰岛素原的氨基酸组成分析，可见其组成与人胰岛素原的组成相符。

表 1 基因工程人胰岛素原的氨基酸组成分析

Table 1 Amino acid composition analysis of the recombinant human proinsulin

| | Expected | Found |
|-----|----------|-------|
| Asp | 4 | 5.5 |
| Thr | 3 | 3.3 |
| Ser | 5 | 4.3 |
| Glu | 15 | 14.7 |
| Pro | 3 | 3.3 |
| Gly | 11 | 11.0 |
| Ala | 4 | 5.1 |
| Val | 6 | 5.5 |
| Ile | 2 | 2.9 |
| Leu | 12 | 11.0 |
| Tyr | 4 | 3.3 |
| Phe | 3 | 3.0 |
| Lys | 2 | 2.0 |
| His | 2 | 1.9 |
| Arg | 4 | 4.3 |

(四) 基因工程的人胰岛素原的生物活性测定

对于基因工程的人胰岛素原，我们用光吸收测定浓度，进行了受体结合及放免测定，从不同角度观察其结构，结果见图6及图7，可见其与人胰岛素原标准具有等同的生物活力。

以上给出了基因工程人胰岛素原的制备过程，除选择了高效的表达载体外，很重要的一点是选择了这个合适大小的融合蛋白，这不仅利于表达，而且还利于

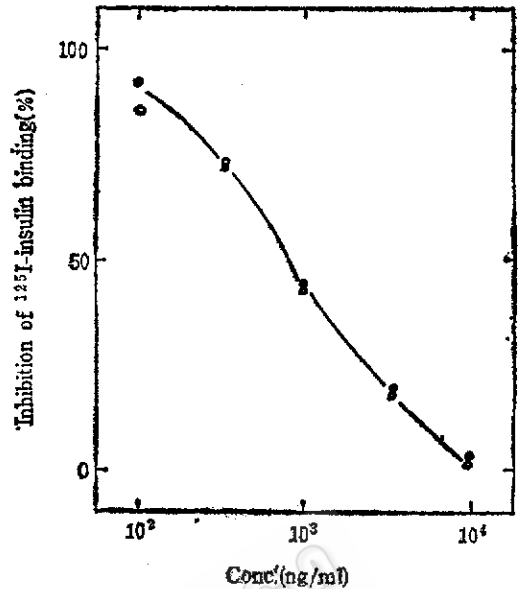


图 6 基因工程人胰岛素原的受体结合活性分析

Fig.6 Receptor binding assay of recombinant human proinsulin

○ human proinsulin standard, ● purified

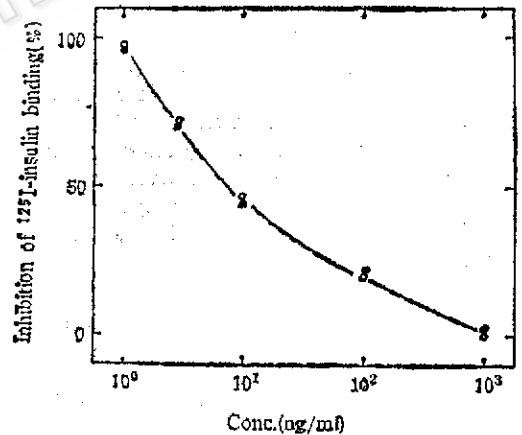


图 7 基因工程人胰岛素原的放射免疫活性分析

Fig.7 Radioimmuno assay of recombinant human proinsulin

○ human proinsulin standard, ● purified

CNBr裂解后的纯化。对于一个蛋白质分子，若设其分子内含有n个Met，由于CNBr裂解的不完全，裂解后可能的片段数m有下式： $m = (n+1)(n+2)/2$ ，含有羧端所需要蛋白的片段数及彻底裂解片段数p有下式： $p = n+1$ ，对于我们表达的

这个249个氨基酸的融合蛋白,有2个Met(124,163),所可能的裂解片段数为6个,含胰岛素原的片段数为3,若彻底裂解则有3个片段,较利于纯化。由于在蛋白质分子中Met是比较少的,我们比较了10个功能蛋白(牛凝乳酶原,牛胰核糖核酸酶,人胰岛素原,鸡溶菌酶,牛 β 乳球蛋白,菠菜铁氧还蛋白,烟草花叶病毒外壳蛋白,马细胞色素c,人碳酸酐酶,蚕丝心蛋白)的氨基酸组成,在总共1565个氨基酸中,有18个Met,即约80个氨基酸中就有一个Met。若取80个氨基酸就可能有一个Met,则随意选取一个240个氨基酸的融合蛋白,就可能有3个Met,裂解

后就可能有10个裂解片段,若选取更大的融合蛋白(640个氨基酸),就可能有更多的裂解产物(45个片段),给分离纯化造成麻烦。对于文献报道的表达质粒pWR450,pWR590,所用的 β -半乳糖苷酶的融合部分加上胰岛素原基因前ATG所编码的Met,分别有14及16个Met^[13],其裂解后可能的片段数分别为120及153,含胰岛素原的可能片段数分别为15及17,即使是彻底裂解,也分别含有15及17个片段,拿到胰岛素原的纯品自然就很困难^[4]。可以设想,若将牛凝乳酶原B(1—161)上的Met(124)突变掉,将更利于表达产物的后加工。

参 考 文 献

- [1] Chance,R.E.et al.,in Peptides,Synthesis,Structure and Function Proc.Am.Pept.symp.7th, Rich,D.H.and Gross,E.,eds,Pierce Chemical Co.,Rockford,pp.721—728,1981.
- [2] Frank,B.H.et al.,*ibid*,pp.729—738,1981.
- [3] Thim,L.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,83:6766—6770,1986.
- [4] 郭礼和等:生物工程学报,1(2):14—33,1985.
- [5] 申同健等:生物化学杂志,2:153—158,1987.
- [6] 张渝英等:生物工程学报,7(3):195—200,1991.
- [7] Brousseau,R.et al.,*Gene*,17:279—289,1982.
- [8] Fujita-Yamaguchi,Y.et al.,*J.Biol.Chem.*,258:5045—5049,1983.
- [9] Sambrook,J.et al.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold spring Hardbor Laboratory,New York,1989.
- [10] Tang,J.G.and Tsou,C.L.,*Biochem.J.*,268:429—435,1990.
- [11] Tang,J.G.et al.,*Biochem.J.*,255:451—455,1988.
- [12] Steiner,D.F.and Clark,J.L.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,60:622—629,1968.
- [13] Fowler,A.V.and Zabin,I.,*J.Biol.Chem.*,253:5521—5526,1978.

Expression of A Fusion Protein Containing Calf Prochymosin(1—161)and Human Proinsulin with 249 Amino Acids

Tang Jianguo Xue Yingzi Fan Xianbin Fu Yixin

(National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871)

The plasmid pJG202 containing Tac promoter, calf prochymosin B(1—161)gene and human proinsulin gene was constructed and transformed into *E. coli* JM105. The expression of the fusion protein was controlled by IPTG and temperature and the expressed protein was estimated to be 20—35% of the total cellular proteins by scanning of the SDS- PAGE gel stained by coomassie brilliant blue R250. After CNBr cleavage, sulfitolysis, partial separation of the S-sulfonated human proinsulin and recombination of the disulfied bonds human proinsulin with native property as evidenced by amino acid composition analysis, receptor binding and radio immuno assays could be obtained.

Key words Human proinsulin; gene expression