

人胰岛素原基因在大肠杆菌中的可溶性表达及分离纯化研究

沈加斌, 徐攀, 李鑫雨, 张立, 郑海燕, 雍彬*

(四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610101)

摘要: 根据 NCBI 中的人胰岛素原基因序列及大肠杆菌密码子偏爱性设计特异引物, PCR 扩增得到人胰岛素原基因, 构建该基因的原核表达质粒 pET32-PI, 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。对重组菌进行温度和 IPTG 浓度优化, 发现重组菌在 30 °C 和终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 条件下表达效果最好且没有包涵体, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测, 表达蛋白的相对分子质量与理论相对分子质量一致且具有胰岛素的免疫原性, 证明胰岛素原基因得到了正确表达。对重组菌进行流加发酵, 发酵液离心收集菌体, 破菌后上清液过亲和层析柱和离子交换柱分离纯化目的蛋白, 透析后的样品用肠激酶和羧肽酶酶切, 利用亲和柱去除融合蛋白与 His 标签, 最终分离胰岛素样品, 利用免疫酶标法, 1 mL 样品测得活性 92 μ IU, 证明实验所得样品具有人胰岛素活性。

关键词: 人胰岛素原; 大肠杆菌; 发酵; 分离纯化

中图分类号: Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)07—0721—07

Soluble Expression and Purification of Human Proinsulin in *Escherichia coli*.

SHEN Jiabin, XU Pan, LI Xinyu, ZHANG Li, ZHENG Haiyan, YONG Bin*

(College of Life Science Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China)

Abstract: The human proinsulin gene (PI) was cloned by PCR using specific primers designed according to the PI gene sequence in NCBI and codon in *Escherichia coli*. The expression plasmid pET32-PI was constructed to express fusion protein of PI in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant PI protein in *E. coli* exhibited the best expression at an optimized condition of 30 °C and 0.6 mmol/L Isopropyl β -D-Thiogalactoside (IPTG). The results of SDS-PAGE and Western blot analysis indicated that the PI protein was successfully expressed at the same molecular weight as the known PI protein. After the Fed-batch fermentation and centrifugation, this protein was purified to homogeneity using the Ni-NTA affinity chromatography and ion exchange chromatography, respectively. Proinsulin was converted to mature insulin through the digestion of enterokinase and carboxypeptidase. The digested product was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The enzyme activity of recombinant insulin was 92 μ IU/mL and the product was proved to possess the

收稿日期: 2015-01-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(21472132)

* 通信作者: 雍彬(1973—), 男, 四川南充人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物基因工程研究。

E-mail: binyong1225@163.com

activity of human insulin.

Keywords: proinsulin, *Escherichia coli*, ferment, separation and purification

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是由于体内胰岛素相对或绝对分泌不足,或因胰岛素的生物效应降低,而引起糖、脂肪和蛋白质代谢异常的一种慢性终身性疾病^[1-3]。20世纪80年代起重组DNA技术开始用于人胰岛素的生产,目前人胰岛素基因可在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链球菌、毕赤酵母及小鼠中表达,而主要的表达系统有两个:大肠杆菌表达系统和酵母表达系统^[4-10]。在酵母系统中胰岛素的产量较低且成本高昂,大肠杆菌中表达产物有时容易形成包涵体,但是通过密码子优化、降低培养温度、添加促溶标签及更换诱导剂等条件可以减少包涵体生成,而且其生产成本较低、背景清楚等优点使得大肠杆菌依然是胰岛素表达的理想宿主,因此对于胰岛素原基因序列及表达条件的优化对于胰岛素工业化生产具有重要的意义。作者对人胰岛素原基因进行密码子优化,合成人胰岛素原基因寡核苷酸片段,通过片段连接和PCR扩增得到人胰岛素原基因,将优化基因与原核表达载体pET32(a+)连接转化大肠杆菌BL21(DE3),重组菌经过培养温度和IPTG浓度的优化,明显降低了包涵体的产生,并通过亲和层析和离子交换层析分离得到目的蛋白,酶切和纯化后对得到的重组胰岛素活力进行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3):购自北京天根生物科技公司;质粒 pET32a(+):购自 Novagen 公司;质粒 pMD18-T:购自大连宝生物公司;LB 培养基(组分 g/L):NaCl 10 g,蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,pH 值 7.0。种子培养基(组分 g/L):蛋白胨 1 g,酵母粉 0.5 g, NaCl 1 g,氨苄青霉素 0.1 mg;发酵培养基(组分 g/L):蛋白胨 1 g,Yeast Extract 0.5 g,Na₂HPO₄·12H₂O 17.5 g,KH₂PO₄ 3 g,NaCl 0.5 g,NH₄Cl 1 g,葡萄糖 10 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,微量元素溶液 2.5 mL;补料培养基:葡萄糖 600 g,MgSO₄·7H₂O 17 g,微量元素溶液 2.5 mL;微量元素溶液:FeCl₃·6H₂O 27 g,ZnCl₂·4H₂O 2 g,CaCl₂·6H₂O 2 g,NaMoO₄·2H₂O 2 g,

CuSO₄·5H₂O 1.9 g,H₃BO₃ 0.5 g,CoCl₂·6H₂O 2 g,MnSO₄·H₂O 2.5 g。

1.1.2 主要仪器和试剂 5415D 离心机、5810R 冷冻离心机:购自德国 Eppendorf 公司;UV-250 IPC 分光光度计:购自日本岛津公司;凝胶成像系统:购自德国 UVP 公司;TC-25/H PCR 仪:购自杭州大和热磁电子有限公司;5L BIOFLO III 生物发酵罐:购自美国 NBS 公司;超声细胞粉碎器:购自美国 Heat Sys-Ultrasonics 公司;限制性核酸内切酶 Kpn I、EcoR I,DNA 聚合酶 rTaq,核酸相对分子质量 Marker DL2000:购自大连宝生生物公司;T4 Polynucleotide Kinase、T4 DNA Ligase:购自美国 NEB 公司;鼠抗 insulin 抗体:购自美国 NEB 公司;碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗及碱性磷酸酶显色底物:购自美国 KPL 公司;PVDF 膜:购自美国 Millipore 公司;质粒提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒:购自美国 Omega Bio-tek 公司;其他化学试剂(进口或国产分析纯)成都化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 Genbank 中公布的人胰岛素原基因的序列 (Accession number:BT006808)为模板,同时利用 Java Codon Adaptation Tool 软件^[13]中的大肠杆菌氨基酸密码子的偏嗜性对人胰岛素基因进行密码子优化,利用优化后的序列和 pET32a(+)载体序列进行引物设计,共合成 14 条引物用于该基因的合成(见表 1)。

1.2.2 引物磷酸化与连接反应 将合成的 14 条引物片段分别取 1 μL 加入 EP 管中,使用 T4 Polynucleotide Kinase 在 37 °C 温育 1.5 h 进行磷酸化反应,将以上磷酸化的引物片段用 PCR 纯化试剂盒纯化,纯化后的片段使用 T4 DNA Ligase 在 16 °C 下连接过夜并再次纯化,得到 DNA 连接片段。

1.2.3 人胰岛素原基因克隆 以连接后的片段为模板,根据该基因的序列设计引物,引物序列如下所示:PIF1E:5'-GTCGGTACCGACGACGACGACA AGTTCGTTAACCAGCACCTG-3',PIR7E:5'-TAAG AATTCTTATTAGTTGCAGTAGTTTCCAG-3'。通过 PCR 的方法进行人胰岛素原基因的扩增,PCR 反应

表 1 磷酸化反应所用引物

Table 1 Sequence of the primers used in phosphorylation reaction

引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
PIF1	GTCGGTACCGACGACGACGACAAGTTCGTAAAC	33
PIF2	CAGCACCTGTGCGGTTCTACCTGGTTGAAGCTCTGTACCTGG	43
PIF3	TTTGCGGTGAACGTGGTTTCTTCTACACCCCGAAAACCCGTCG	43
PIF4	TGAAGCTGAAGACCTGCAGGTTGGTCAGGTTGAAGTGGGTGGTCCG	49
PIF5	GGTGCTGGTTCTCTGCAGCCGCTGGCTCTGGAAGTTCTCTGC	43
PIF6	AGAAACGTGGTATCGTTGAACAGTGTGCACCTCTATCTGCTC	43
PIF7	TCTGTACCAGCTCGAAAACTACTGCAACTAATAAGAATTCTTAA	44
PIR1	GTGAGAACCGCACAGGTGCTGGTTAACGAACCTTGTCTGCTCGTCCGTACCGACA	55
PIR2	AGAAACCACGTTACCCGAAACCAGGTACAGAGCTTCAACCAG	43
PIR3	TGACCAACCTGCAGGTCTTCAGCTTCACGACGGGTTTTCGGGGTGTAGA	49
PIR4	CGGCTGCAGAGAACCAGCACCCGGACCACCACCCAGTTCAACC	43
PIR5	GTTCAACGATACCACGTTTCTGCAGAGAACCTTCCAGAGCCAG	43
PIR6	TAGTTTTCAGCTGCTACAGAGAGCAGATAGAGGTGCAGCACT	43
PIR7	TAAGAATTCTTATTAGTTGCAG	22

条件如下:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 25 s,72 ℃延伸 7 min,反应后放置于 4 ℃保存。将以上 PCR 反应后的产物,经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,琼脂糖凝胶回收 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,并使用氨苄抗性的 LB 平板进行筛选,挑取单菌落进行 PCR 与酶切验证,并送至北京六合华大基因公司进行测序,最终得到 pMD18-T-PI 质粒。

1.2.4 表达载体构建 pMD18-T-PI 与 pET32 (+) 载体分别用 KpnI 和 EcoR I 进行双酶切,37 ℃酶切 3~4 h,1 g/dL 琼脂糖电泳鉴定酶切产物,对目的基因片段和载体片段进行胶回收和纯化,使用 T4 DNA Ligase 对酶切后的 PI 基因片段和 pET32 (+) 载体片段进行连接,连接后的产物转化大肠杆菌 BL21 (DE3),获得转化子,对转化子进行菌液 PCR 验证。

1.2.5 人胰岛素原基因的诱导表达及 Western Blotting 验证 挑取阳性菌株 *E. coli* BL21/pET32-PI 接种于 2 mL 含有氨苄的 LB 液体培养基中,在 37 ℃、250 r/min 摇床中培养 12 h,将 500 μL 菌液接入含有 50 mL 液体 LB 培养基的三角瓶中,分别在 37、32、30、28 和 25 ℃等 5 个温度条件下进行培养,当 $A_{600\text{nm}}$ 为 0.6 左右时进行蛋白诱导表达,研究温度对 PI 基因表达的影响。在 30 ℃培养条件下,分别使用终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 的 IPTG (异丙基-β-D 硫代半乳糖苷)诱导,分析诱导剂浓度对

PI 基因表达的作用,确定最适诱导剂浓度。将 IPTG 诱导表达的菌体及破菌后上清和沉淀的样品经 SDS-PAGE 电泳转移至 PVDF 膜后,用鼠抗人胰岛素单克隆抗体作为一抗,磷酸酶(Ap)标记的羊抗豚鼠 IgG 作为二抗,进行 Western Blotting 印迹分析。

1.2.6 流加发酵 挑取阳性克隆菌落至 40 mL 种子培养基中培养,温度 37 ℃,振荡培养 12 h。然后再转接于 400 mL 种子培养基中,接种后培养直至 pH 和溶解氧均突然急剧上升,表示葡萄糖已耗尽,开始进入补料分批培养阶段,此时按指数流加模式流加补料培养基,然后将温度降到 30 ℃,加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导培养,补料速度以维持大肠杆菌的比生长速率为 0.1 h⁻¹ 左右为准。诱导 3~4 h 后离心收菌。使用美国 NBS 公司 BIOFLO III 5 L 工作体积发酵罐发酵。起始工作体积 4 L,温度:生长期为 37 ℃,诱导期为 30 ℃;自动流加体积分数 28%的氨水使 pH 值控制在 7.0;溶氧(DO)保持在 30%左右,补料速度按照下面公式估算^[14]

$$F=X_0 \times V \times \mu \times \exp(\mu t) / (S_0 \times Y_{XS})$$

其中 F 为补料速度(mL/h), X_0 为补料时细胞干重(g/L), V 为补料初期的体积(L), μ 为比生长速率(h⁻¹), t 为时间(h), S_0 为补料液中葡萄糖的质量浓度(g/L), Y_{XS} 为大肠杆菌对葡萄糖的产率(g/g)。通过试验,对于以上参数初始补料时约为 $X_0=2.6$ g/L, $V=3$ L, $S_0=0.5$ g/L, $Y_{XS}=0.36$ g/g, $\mu=0.3$ h⁻¹。

从发酵开始,每隔 1 h 取样,测定其 $A_{600\text{nm}}$,同时

用 GOD-POD 法测定葡萄糖浓度。另外无菌取样, 用灭菌的 LB 液体培养基做适当的稀释, 接种于不含氨苄的 LB 平板, 37 °C 培养过夜, 然后从上面随机挑取 100 个单克隆接种在含氨苄的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 记数菌落数, 按照下面公式计算质粒稳定性。质粒稳定性(%)=(含氨苄的 LB 平板菌落数/100)×100%

1.2.7 蛋白纯化 将 5 L 发酵罐发酵后收集的菌体取适量加入 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MDTT) 中, 分别用最高压力 45 MPa 破菌 6 次、最高压力 55 MPa 破菌 5 次和最高压力 65 MPa 破菌 4 次, 处理菌液, 将沉淀和上清一起进行 SDS-PAGE 电泳, 找出破菌的最合适的压力和次数。将破菌后的样品首先进行亲和层析, 用 5 倍以上柱体积起始缓冲液 (pH 7.8, 20 mmol/L Tris-HCl) 平衡层析柱, 以 1 mL/min 流速上样, 依次用 10、30、50、100 mmol/L 咪唑洗脱, 洗脱时

用紫外检测仪在线检测, 收集洗脱峰; 将亲和柱纯化后的样品液以 1 mL/min 的流速过离子交换柱, 连接紫外检测仪在线检测, 分别用含 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 作为洗脱缓冲液阶梯洗脱, 连接紫外检测仪在线检测, 收集洗脱峰。

1.2.8 成熟胰岛素制备及活力测定 酶切反应: 将酶切缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 1 mmol/L CaCl₂, 0.1 % Tween-20, 1 mmol/L DTT) 与经过透析后的样品液按 1:9 混合均匀, 按照测定的蛋白浓度加入 EK 酶和羧肽酶, 恒温 25 °C 酶切 12 h。将酶切后的样品先过亲和柱, 除去硫氧还蛋白和组氨酸标签, 收集穿透液过 sephadexG-50 凝胶层析, 分离胰岛素与连接肽, 流动相为去离子水, 流量为 1 mL/min, 检测波长 280 nm, 收集洗脱峰。收集得到的胰岛素样品送北京市德易临床检验所用免疫酶标法对胰岛素活性进行测定。

Native	TTT GTG AAC CAA CAC CTG TGC GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG
Optimized	TTC GTT AAC CAG CAC CTG TGC GGT TCT CAC CTG GTT GAA GCT CTG TAC CTG GTT TGC GGT
1	F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G
Native	GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG
Optimized	GAA CGT GGT TTC TTC TAC ACC CCG AAA ACC CGT CGT GAA GCT GAA GAC CTG CAG GTT GGT
21	E R G F F Y T P K T R R E A E D L Q V G
Native	CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG
Optimized	CAG GTT GAA CTG GGT GGT GGT CCG GGT GCT GGT TCT CTG CAG CCG CTG GCT CTG GAA GGT
41	Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L E G
Native	TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG
Optimized	TCT CTG CAG AAA CGT GGT ATC GTT GAA CAG TGC TGC ACC TCT ATC TGC TCT CTG TAC CAG
61	S L Q K R G I V E Q C C T S I C S L Y Q
Native	CTG GAG AAC TAC TGC AAC TAG
Optimized	CTG GAA AAC TAC TGC AAC TAA
81	L E N Y C N *

图 1 人胰岛素原基因序列与优化后序列的比较

Fig. 1 Comparison of native and optimized PI gene sequence

2 结果与讨论

2.1 基因克隆

首先将经密码子优化后 (如图 1 所示) 合成的胰岛素原基因引物片段进行磷酸化处理, 并使用 T4

DNA Ligase 连接, 经纯化后做为模板进行 PCR 扩增, 1 g/dL 琼脂糖电泳结果发现在 290 bp 处有清晰条带 (如图 2(a) 所示), 与预期扩增的基因大小基本相符。将扩增得到的基因片段首先连接到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 JM109, 构建得到 pMD18-PI

质粒。对该质粒进行双酶切(如图 2(b)所示),结果表明 PI 基因成功连接到 pMD18-T 载体上,将质粒送至华大基因公司进行测序。

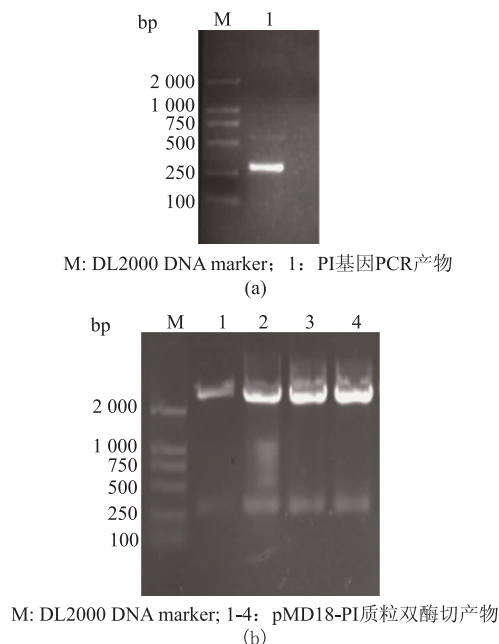


图 2 pMD18-PI 质粒构建的凝胶电泳

Fig. 2 Construction of replication plasmid pMD18-PI

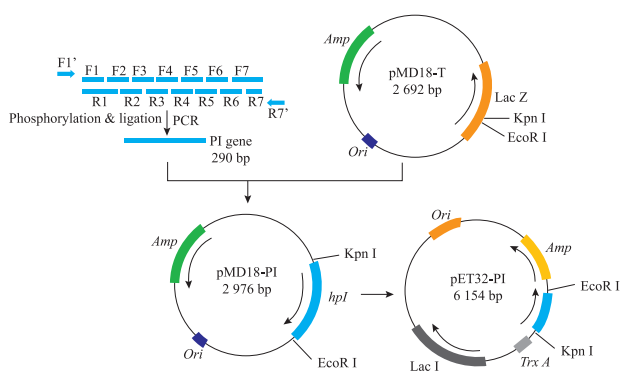


图 3 pET32-PI 表达载体的构建

Fig. 3 Construction of the expression vector pET32-PI

2.2 重组表达质粒的构建

对 pMD18-PI 和 pET32a(+) 分别使用 Kpn I 与 EcoR I 进行双酶切处理,胶回收片段大小为 290 bp 的 PI 基因片段以及 5 900 bp 的 pET32a(+) 线性片段,并使用 T4 DNA Ligase 过夜连接得到重组质粒(如图 3 所示),连接产物转化大肠杆菌 JM109,在抗性平板上挑取阳性克隆菌落,将提取得到的重组质粒进行 PCR(如图 4 所示)和测序鉴定,最终得到表达质粒 pET32-PI。

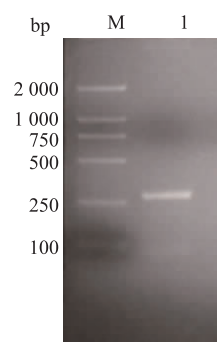
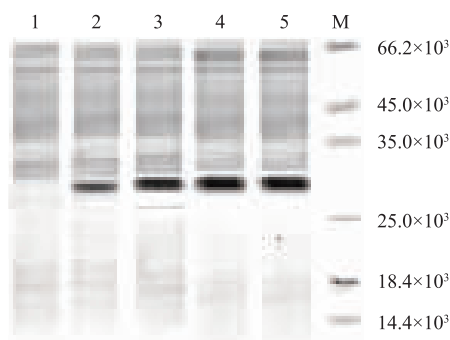


图 4 pET32-PI 质粒 PCR 验证结果

Fig. 4 PCR results of pET32-PI



1.诱导前;2. 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导;3. 0.4 mmol/L IPTG 诱导;4. 0.6 mmol/L IPTG 诱导;5. 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导;M. 蛋白质相对标准分子质量 Marker

图 5 不同浓度的 IPTG 诱导对目的蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of the different IPTG density on target protein expression

2.3 诱导表达

将表达质粒 pET32-PI 转入 BL21,挑取单菌落进行蛋白诱导表达,分别使用终质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,结果发现 IPTG 浓度从 0.2 mmol/L 到 0.6 mmol/L 蛋白表达量持续增加,而 0.6 mmol/L 与 0.8 mmol/L 时表达量相差不大,因此选择 0.6 mmol/L IPTG 作为诱导表达浓度(如图 5 所示)。重组菌使用 25、28、32、37 ℃ 进行温度梯度诱导表达(图 6(a)),结果发现在 25 ℃ 和 28 ℃ 诱导表达时融合蛋白存在于上清溶液中,而在 32 ℃ 条件下诱导表达时,表达产物有部分出现在沉淀中;在 37 ℃ 诱导表达时,表达的融合蛋白大部分出现在沉淀中。在 30 ℃ 条件下诱导表达,结果表达产物基本都出现在上清(图 6(b)),且表达量较高,因此选择 30 ℃ 为诱导温度。

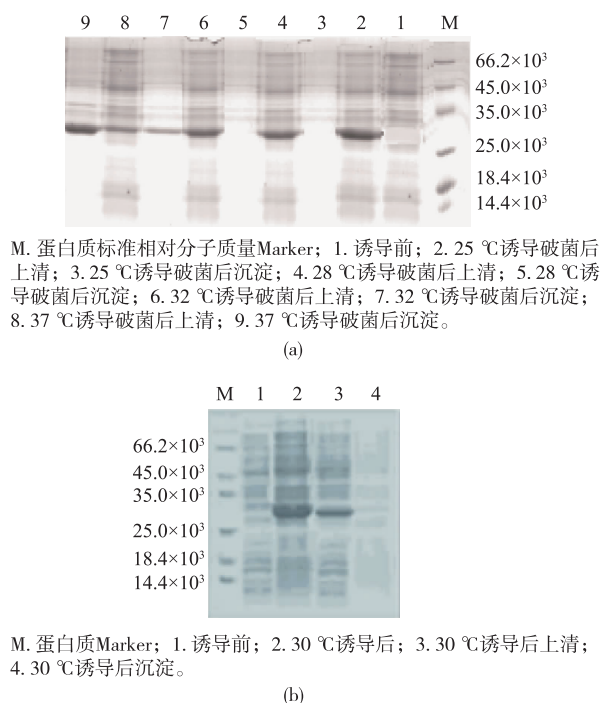


图 6 不同温度诱导对目的蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of different temperature on target protein expression

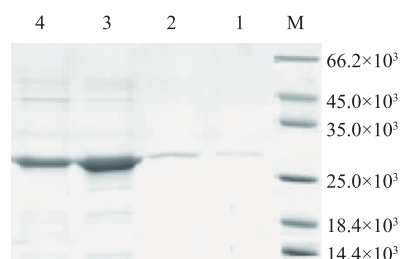
2.4 流加发酵

大肠杆菌首先在分批发酵的条件下生长 5.5 h, $A_{600\text{ nm}}$ 即达 28 左右, 此时加入诱导剂 IPTG 开始诱导, 并且控制 μ 为 0.25 左右, 4 h 后 $A_{600\text{ nm}}$ 达到 58 左右。通过对发酵液中菌体的质粒稳定性测试, 发现发酵 11 h 后质粒的稳定性为 95 %, 表明该表达质粒在大肠杆菌中保持了较高的稳定性。

2.5 蛋白纯化

作者用含 20 mmol/L NaCl、pH 7.8、1 mmol/L DTT、20 mmol/L Tris-HCl 作为缓冲液, 最高压力分别选择 450、550、650 MPa 进行破菌, 发现在最高压力为 650 MPa 破菌 4 次, 表达的融合蛋白完全在上清液中。破菌后的样品使用亲和柱纯化, 洗脱缓冲液分别用 10、30、50、100 mmol/L 咪唑洗脱, 收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 8 所示 10 mmol/L 咪唑洗脱时有部分目的蛋白被洗脱下来, 30 mmol/L 咪唑几乎全部洗下柱子上的目的蛋白, 50 与 100 mmol/L 咪唑洗脱时目的蛋白很难被洗下, 因此采用 30 mmol/L 咪唑进行洗脱。从电泳图来看, 经过亲和层析后的目的蛋白还含有少量杂质, 需进一步纯化处理。因此将亲和层析后的样品, 经过透析处理后使用离子交换柱再次纯化, 用不同浓度 NaCl

洗脱, 从 0.1 mol/L 开始阶段洗脱, 直到无洗脱峰出现。如图 9 所示, 以 0.2 mol/L 浓度 NaCl 洗脱时紫外吸收示数可达最高, 最高值为 0.8, 最终得到纯度较高的蛋白样品。



1. 10 mmol/L 咪唑洗脱; 2. 30 mmol/L 咪唑洗脱; 3. 50 mmol/L 咪唑洗脱; 4. 100 mmol/L 咪唑洗脱; M. 蛋白 Marker。

图 7 亲和柱阶段洗脱样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 Analysis of SDS-PAGE on step-wise affinity elution samples

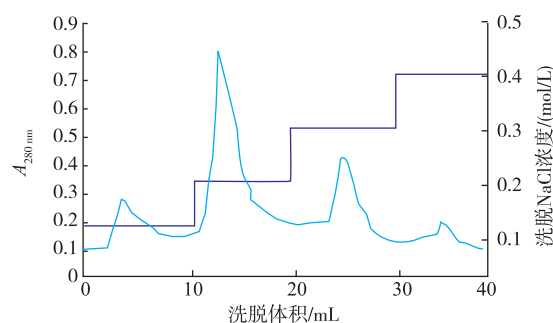


图 8 离子交换层析阶段洗脱曲线

Fig. 8 Step-wise elution curves of ion exchange

2.6 Western Blot 鉴定

将纯化后的胰岛素原蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳转移至 PVDF 膜后, 以鼠抗人胰岛素单克隆抗体作为一抗, 磷酸酶 (Ap) 标记的羊抗豚鼠 IgG 作为二抗进行 Western Blot 印迹分析。如图 9 所示, 蛋白质免疫印迹的 PVDF 膜的有明显的条带, 这表明重组 PI 蛋白可以与抗体杂交, 因此纯化得到的 PI 蛋白具有免疫活性。

2.7 酶活力测定

将纯化后的胰岛素原蛋白使用 EK 酶去除硫氧还蛋白和组氨酸标签, 用羧肽酶水解胰岛素原蛋白得到成熟胰岛素。洗脱图谱如图 10 所示, 凝胶层析出现两个洗脱峰, 收集第一个洗脱峰即为重组人胰岛素样品液, 最终得到纯化的胰岛素与连接肽。将分离纯化后的样品送北京市德易临床检验所用免疫酶标法对胰岛素活性进行测定, 检测结果为 1 mL

样品液中胰岛素活性为 92 μ IU,证明作者所制备的样品具有胰岛素活性。



图 9 Western Blot 检测重组 PI 蛋白

Fig. 9 Western Blot analysis of the recombinant PI

3 结 语

糖尿病的治疗药物有很多种,I 型糖尿病由于是体内胰岛素的绝对缺乏造成的,所以胰岛素类药物是治疗 I 型糖尿病的必需特效药物;II 型糖尿病患者出现胰岛素缺乏时,也需要胰岛素治疗^[15-16]。因此胰岛素在糖尿病的治疗中有着举足轻重的地位和广阔的开发前景。作者对人胰岛素原基因进行密

参考文献:

- [1] 蔺忆,高翠翠,陈立立,等. GABA 对高糖诱导氧化损伤的 RIN-m5f 细胞的保护作用 and 机制 [J]. 食品与生物技术学报, 2015,34(2):195-200.
LIN Yi,GAO Cuicui,CHEN Lili,et al. Effect of GABA on RIN-m5f cells in high glucose-induced oxidative injury model[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(2):195-200. (in Chinese)
- [2] 舒向荣,王霆,程泽能,等. 肌醇类物质降血糖作用的研究进展[J]. 中南药学,2009,7(1):43-46.
SHU Xiangrong,WANG Ting,CHENG Zenen,et al. Advance research on the hypoglycemic mechanism of sequoyitol and inositol substances[J]. **Central South Pharmacy**,2009,7(1):43-46. (in Chinese)
- [3] DESHPANDA A D,HARRIS-HAYES M,SCHOOTMAN M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications[J]. **Physical Therapy**,2008,88(11):1254-1264.
- [4] PERLER F,EFSTRATIADIS A,LOMEDICO P,et al. The evolution of genes;the chicken preproinsulin gene [J]. **Cell**,1980,20(2):555-566.
- [5] BELL G I,PICTET R L,RUTTER W J,et al. Sequence of the human insulin gene[J]. **Nature**,1980,284(5751):26-32.
- [6] QIAN X,KRAFT J,NI Y,et al. Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice [J]. **Scientific Reports**,2014,4:6465.
- [7] STOLL R W,TOUBER J L,MENAHAN L A,et al. Clearance of porcine insulin,proinsulin,and connecting peptide by the isolated rat liver[J]. **Experimental Biology and Medicine**,1970,133(3):894-896.
- [8] 陈燕,李金照,夏令朝,等. 人胰岛素原基因在大肠杆菌中高效外分泌表达[J]. 生物化学杂志,1995,11(6):637-641.
CHEN Yan,LI Jinzhao,XIA Lingchao,et al. Secretive expression of human proinsulin gene at high level in *E. coli* [J]. **Chinese Biochemical Journal**,1994,11(6):636-641. (in Chinese)
- [9] COWLEY D J,MACKIN R B. Expression,purification and characterization of recombinant human proinsulin[J]. **FEBS Letters**,1997,402(2):124-130.
- [10] WINTER J,NEUBAUER P,GLOCKSHUBER R,et al. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA[J]. **Journal of Biotechnology**,2000,84(2):175-185.

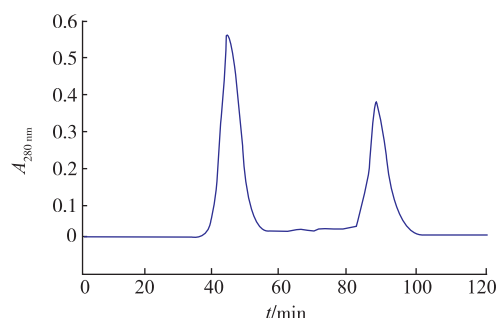


图 10 酶切后凝胶层析图谱

Fig. 10 Profile of Sephadex G-50 gel chromatography after enterokinase

码子优化,与 pET32a(+)质粒连接后实现了该基因在大肠杆菌 BL21 中的成功表达,作者对胰岛素原基因的诱导表达条件进行了探索,发现了诱导最适温度和诱导剂浓度,并通过亲和层析和离子交换层析成功得到了较纯的胰岛素原蛋白,酶切纯化后的胰岛素经活力测定具有一定的胰岛素活性。在样品制备过程中由于缓冲液条件与生理条件不同或者其他因素的影响,而导致样品中部分胰岛素生物活性的丧失,今后可以对胰岛素原及成熟胰岛素的纯化条件进一步探索以保证胰岛素的活性及稳定性。