

含短 C 肽人胰岛素原类似物 DesB³⁰ 在毕赤酵母中的表达及纯化

高剑坤¹⁾ 蔡绍哲^{1)*} 范开^{2,3)} 冯强³⁾ 陈海蓉³⁾ 张益³⁾ 胡伟³⁾ 杨应彬¹⁾

(¹⁾重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; ²⁾重庆工学院, 重庆 400050; ³⁾重庆富进生物医药公司, 重庆 400041)

摘要 合成含短 C 肽 AAK, 并去掉 B 链第 30 位苏氨酸(T)的人胰岛素原类似物: HMPIDesB³⁰ (human mini-proinsulin des B³⁰) 的 cDNA, 将其插入大肠杆菌和酵母菌的穿梭质粒 pPIC9K. 用电转移的方法将重组质粒 HMPIDesB³⁰/pPIC9K 转入甲醇酵母 *GS115*. 用含不同 G418 浓度的 YPD 平板筛选高拷贝重组子. 经优化条件下的高密度发酵, 发酵液用 SIPI-40 大孔树脂吸附, 大孔吸附树脂洗脱液经 SP 柱进一步纯化后, 再用 10~20 mmol/L Zn²⁺ 沉淀, 能得到纯度为 95% 的 HMPIDesB³⁰. 通过 16.5% Tricine SDS-PAGE、HPLC 和质谱分析, 表达产物分子质量与理论分子质量相符, 经高密度发酵, 表达量可达 1.0 g/L. 纯化回收率可达 60%. 说明人胰岛素原类似物 HMPIDesB³⁰ 能在甲醇酵母中高效分泌表达, 并能通过经济有效的方法纯化.

关键词 表达系统, 人胰岛素原, 甲醇酵母

学科分类号 Q51, Q78, R9

作为治疗糖尿病, 特别是胰岛素依赖型糖尿病的药物, 胰岛素至关重要.

胰岛素原是胰岛素的前身, 经过酶切去除 C 肽, 能成为有生物活性的胰岛素. Kjeldsen^[1] 在 *S. cerevisiae* 中表达人胰岛素原时, 最终不能有效地分泌胰岛素原或胰岛素, 但若在编码胰岛素原 cDNA 的分子中去除 B³⁰ 苏氨酸(T), 并使之与 *S. cerevisiae* 的前导肽 α 因子相连, 然后将人胰岛素原的 C 肽用短 C 肽代替或直接将 B²⁹ 赖氨酸(K)与 A¹ 甘氨酸(G)相连, 能有效提高单链胰岛素原类似物的分泌表达水平. Annibali 等^[2] 用巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分泌表达出短 C 肽人胰岛素原 B^(1~30)-Y1-Y2-A^(1~21), 其中 Y1、Y2 可以是赖氨酸(K)或精氨酸(R). 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 基因表达系统经过近 20 年的发展, 已成为比较完善的外源基因表达系统, 具有高表达, 能进行翻译后修饰等优点^[3].

本实验运用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达一种含短 C 肽 AAK 的人胰岛素原类似物: (B¹~B²⁹)-AAK- (A¹~A²¹), 命名为 HMPIDesB³⁰ (human mini-proinsulin des B³⁰), 并建立了这种人胰岛素原类似物的发酵和纯化方法, 使其无需复性, 经单次胰蛋白酶酶切就能形成具有正确构象的人胰岛素类似物, 这种人胰岛素类似物经脂肪酸修饰即形成目

前已运用于临床的地特胰岛素. 地特胰岛素 (insulin Detemir) 是将天然人胰岛素 B 链上排列在第 30 位的苏氨酸(T)去掉, 然后在第 29 位赖氨酸(K)上结合一个 14 碳游离脂肪酸 [lys(B²⁹)-tetradecanoyl, des(B³⁰)-human insulin] 而产生的长效胰岛素. 其长效机理是: 14 碳脂肪酸与血清白蛋白结合, 形成白蛋白结合体, 从而延长其作用时间^[4]. 去除 B³⁰ 位的原因是: 去除 B³⁰ 位后的脂肪酸修饰人胰岛素类似物, 与血清白蛋白的亲合力更强^[4].

1 材料与方法

1.1 重组质粒 HMPIDesB³⁰/pPIC9K 的构建

构建重组质粒所用的大肠杆菌 DH5 α , 质粒 pPIC9 和 pPIC9K 均由重庆富进生物医药有限公司保存. pPIC9K 是一个分泌表达载体, 分泌信号肽是酿酒酵母来源的, 由 89 个氨基酸组成的 α 因子, 它能够引导外源蛋白分泌到细胞外. 我们根据 HMPIDesB³⁰ 的氨基酸组成, 考虑酵母的偏爱密码^[5], 以 α 因子前导序列作为信号肽, 设计插入 pPIC9K 的

* 通讯联系人. Tel: 023-65112097, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

收稿日期: 2007-05-10, 接受日期: 2007-07-04

Xho I 和 *Not* I 酶切位点之间的核苷酸序列, 交由宝生物(大连)有限公司合成该序列, 插入pPMD18-T载体, 构建质粒HMPIDesB³⁰/pPMD18-T. 设计序列如图1.

```

5' CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TTC GTT AAC CAA CAC TTG
   (XhoI)                (B1)
TGT GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT
GAA AGA GGT TTC TTC TAC ACT CCA AAG GCT GCT AAG GGT ATC
               (B29) A- A- K- (A1)
GTT GAA CAA TGT TGT ACT TCC ATC TGT TCC TTG TAC CAA TTG
CAA AAC TAC TGT AAC TGA TAA GCGG CCGC 3'
                (A21)      (NotI)
  
```

Fig. 1 The sequence of HMPIDesB³⁰

由于pPIC9K上有2个*Xho* I 酶切位点 (分别位于1 193和5 710 bp), 妨碍了利用*Xho* I 和*Not* I 直接构建重组质粒. 因此, 需借助pPIC9载体来实现上述设想: 先利用*Xho* I 和*Not* I 双酶切pPIC9和HMPIDesB³⁰/pPMD18-T, 回收酶切pPIC9后约8 000 bp片段, HMPIDesB³⁰/pPMD18-T约200 bp的片段, 连接所回收的2个片段, 用LB+Amp平板筛选重组子, 然后用*Sal* I 和*Sac* I 切下经鉴定的HMPIDesB³⁰/pPIC9上约2 000 bp片段, 插入经相同酶切的pPIC9K上, 构建成重组质粒HMPIDesB³⁰/pPIC9K(图2), 经酶切鉴定后送宝生物(大连)有限公司测序.

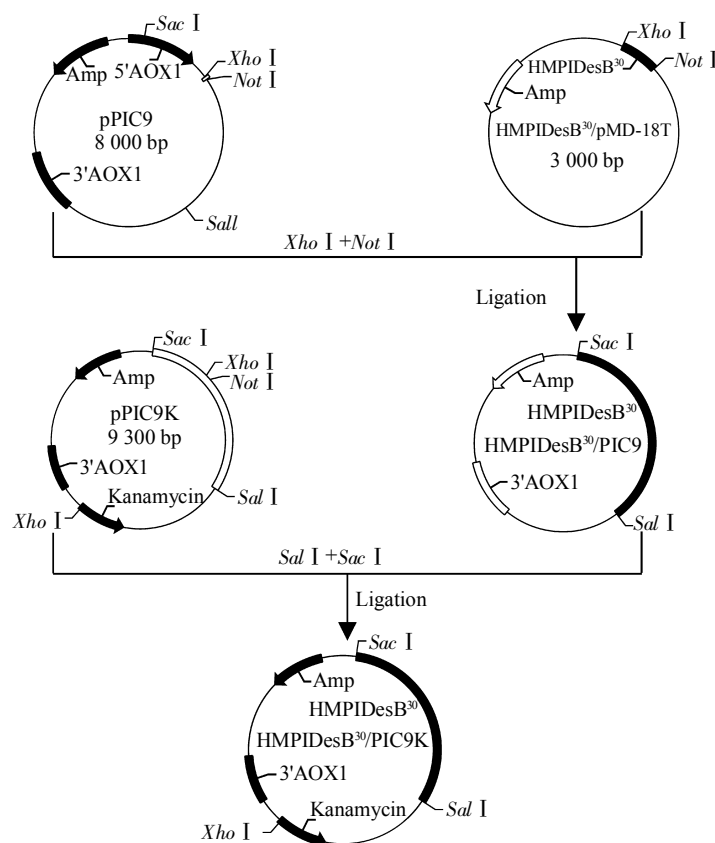


Fig. 2 Construction map of recombinant expression vector HMPIDesB³⁰/pPIC9K

1.2 电转化酵母及重组子的筛选

用*Sal* I 线性化测序正确的重组质粒HMPIDesB³⁰/pPIC9K, 通过电转化^[6]将其转入宿主菌*Pichia pastrois* GS115 (*his4 aox1*, 富进生物医药有限公司保存). pPIC9K载体带有Kanamycin抗性基因, 能使阳性转化子产生G418抗性, 并且所整合的外源基因的拷贝数与G418抗性大小之间有一定的计量依赖关系, 因此我们可以通过增加培养基

中G418的浓度来筛选高拷贝重组子.

1.2.1 PCR筛选重组子. 用Primer 5.0设计引物, 上游引物: P1 5' AAAAGA GAGGCTGAAG 3'; 下游引物: P2 5' TTATCAGTTACAGTAG 3'(大连宝生物公司合成). 将经过电转化的GS115涂布于MD平板30℃静置培养5~7天. 挑取MD平板上长出的重组子菌落接种到5 ml YPD培养液中, 30℃振荡培养过夜. 取过夜菌5 μl离心, 洗涤, 95℃, 10 min

作为模板, PCR (95℃, 5 min; 95℃, 30 s; 50℃, 30 s; 72℃, 1 min; 72℃, 10 min, 2~4步循环25次), PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 G418抗性筛选多拷贝. 将G418含量分别为0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L的YPD平板用记号笔划分成小格并编号. 用无菌牙签从MD平板上挑取微量重组子到G418含量不同的平板上. 30℃静置培养3~5天, 每日检查不同G418浓度的YPD平板上重组子的生长情况。

1.2.3 MD、MM平板筛选甲醇利用表型. 挑取稳定整合重组子, 在MM和MD平板上先后划线, 30℃静置培养48 h. 在2种平板上都能正常生长的菌株为Mut⁺(Methanol utilization plus)表型, 在MD平板上生长正常, 在MM平板上不生长或生长缓慢的菌株为Mut^s(Methanol utilization slow)表型。

1.3 重组子的诱导表达

1.3.1 摇瓶发酵. 分别挑取含3 g/L、4 g/L、5 g/L G418的YPD平板上长出的重组子菌落, 接种于3个含20 ml BMGY(2% 蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 1% 甘油)培养液的500 ml摇瓶中, 30℃摇床培养约16 h至 A_{600} 为2~6时加入BMMY(2% 蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 0.5% 甲醇)培养液80 ml, 使其 A_{600} 为1.0左右, 30℃继续培养24~96 h, 每隔24 h取样, 并按终浓度为0.5%补加甲醇. SDS-PAGE检测上清中HMPIDesB³⁰表达情况。

1.3.2 发酵罐发酵.

发酵培养基由BSM (85% H₃PO₄ 26.7 ml, CaSO₄ 0.93 g, K₂SO₄ 18.2 g, MgSO₄·7H₂O 14.9 g, KOH 4.13 g, 甘油 40.0 g), 酵母提取物(Yeast Extract)和PTM1 (CuSO₄·5H₂O 6 g, NaI 0.08 g, MnSO₄·H₂O 3.0 g, Na₆Mo₇O₂₄·2H₂O 0.2 g, H₃BO₃ 0.02 g, CoCl₂ 0.5 g, ZnCl₂ 20 g, FeSO₄·7H₂O 65 g, 生物素 0.2 g, 浓H₂SO₄ 5 ml)组成. BSM和1%酵母提取物经121℃高温灭菌30 min后, 用50%氨水将pH调至5.0, 再按4 ml/L加入经无菌过滤的PTM1。

用保存的菌种划YPD平板, 30℃温箱孵育24~36 h后挑菌落接种含50 ml YPG(1%酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2%甘油)的250 ml摇瓶, 30℃, 250 r/min, 培养24 h作为一级种子. 用一级种子液接种含500 ml YPG的2个1 L摇瓶, 30℃, 250 r/min, 培养18~20 h, 作为二级种子. 将1 L二级种子液注入含9 L 发酵培养基的30 L发酵罐(Biotech B. Braun Inc.)

中. 发酵起始参数设置为: 温度30℃, pH 5.0, 溶氧100%, 转速300 r/min, 通气量60 L/h. 发酵分为3步: 第1步, 发酵培养基培养约20 h; 第2步, 以终浓度为0.5%~0.9%流加含12 ml/L PTM1的50%甘油, 培养4~6 h. 第3步, 以终浓度为0.5%~1.0%流加含12 ml/L PTM1的甲醇, 诱导72 h. 为使诱导过程中的DO值不低于25%, 需调节甲醇流加速率, 菌液 A_{600} 达到300以上后下罐。

1.4 纯化

发酵液经高速冷冻离心机(湖南湘仪), 8 000 r/min连续流离心, 收集上清, 过滤, 上样大孔吸附树脂^[9](上海亚东核级树脂公司 SIPI-40). 25%乙醇(乙酸调pH值至3~4)清洗杂质, 60%乙醇(乙酸调pH至3~4)洗脱表达产物. 洗脱液用SP柱进一步纯化, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) 洗脱表达产物, 10~20 mmol/L ZnCl₂沉淀后溶解于含10~20 mmol/L EDTA的25 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)中。

1.5 重组子表达产物的鉴定

用16.5% Tricine SDS-PAGE、HPLC及质谱分析HMPIDesB³⁰的表达及分子质量。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建

重组质粒HMPIDesB³⁰/pPIC9K的酶切结果(图3)及大连宝生物公司序列测定结果表明: 所构建的重组质粒的序列与设计序列完全一致。

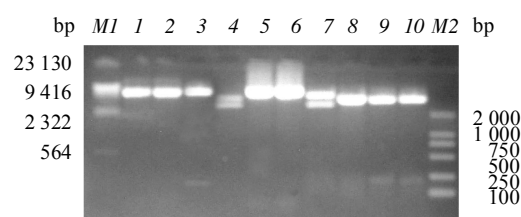


Fig. 3 Restriction enzyme digestion identification of recombinant plasmids HMPIDesB³⁰/pPIC9K

M1: λ -Hind III DNA marker; 1: Plasmid pPIC9; 2: Plasmid HMPIDesB³⁰/pPIC9; 3: Digestion of plasmids HMPIDesB³⁰/pPIC9 with *Xho* I + *Not* I; 4: Digestion of plasmids HMPIDesB³⁰/pPIC9 with *Sal* I + *Sac* I; 5: Plasmid pPIC9K; 6: Plasmid HMPIDesB³⁰/pPIC9K; 7: Digestion of plasmids HMPIDesB³⁰/pPIC9K with *Sal* I + *Sac* I; 8: Digestion of plasmids HMPIDesB³⁰/pPIC9K with *Xho* I; 9, 10: Digestion of plasmids HMPIDesB³⁰/pPIC9K with *Xho* I + *Not* I; M2: DL2000 DNA marker.

2.2 高拷贝重组子的筛选及表型鉴定

重组质粒HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115转化毕赤酵母后,在MD平板上形成多个重组子菌落,分别接种5 ml YPD培养液,30℃,250 r/min培养过夜,以过夜菌为模板,PCR扩增出的片段介于100~250 bp之间,与设计核苷酸序列大小一致(图4),说明目的基因已经整合到酵母染色体上.将这些重组子接种到不同浓度的G418-YPD平板上,30℃静置培养3~5天.含G418为3 g/L、4 g/L、5 g/L的YPD平板上生长的菌落数分别为:6,3,2个.1个拷贝重组子对应的G418抗性约为0.25 g/L,因此筛选出高拷贝重组子约含有16个以上的拷贝数.

从重组子在MD和MM平板上的生长情况来看,所有重组子的表型均为Mut⁺.

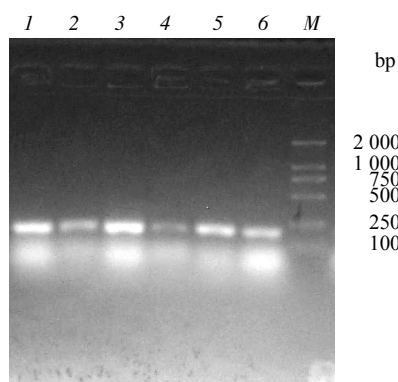


Fig. 4 PCR analysis of yeast transformants HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115

1~6: Different transformants of HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115; M: DL2000 DNA marker.

2.3 重组子的诱导表达

分别挑取3 g/L、4 g/L、5 g/L G418抗性的重组子进行摇瓶发酵,诱导24~96 h后取上清作SDS-PAGE(图5).可初步判断4 g/L G418抗性的重组子表达量最高.

选取摇瓶发酵中表达量最高的重组子,经过72 h的发酵罐发酵,菌液A₆₀₀达300或更高,经HPLC检测,HMPIDesB³⁰的表达量为1.0 g/L.

2.4 纯化

非极性大孔吸附树脂SIPI-40能除去部分杂质,使发酵液浓缩,并使发酵液电导率降低.进一步用

SP柱纯化,10~20 mmol/L ZnCl₂沉淀洗脱液,能得到纯度为95%的HMPIDesB³⁰.总回收率为60%.

16.5% SDS-PAGE (tricine)银染显示的纯化过程如图6所示.HPLC分析如表1和图7.

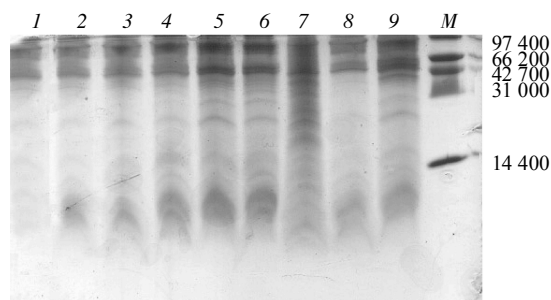


Fig. 5 16.5% SDS-PAGE (tricine) scanned for expression level of HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115

1: Uninduced HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115 with 5 g/L G418 resistance; 2: Induced HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115 with 3 g/L G418 resistance (72 h); 3~6: Induced HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115 with 4 g/L G418 resistance (24, 48, 72, 96 h, respectively); 7~9: Induced HMPIDesB³⁰/pPIC9K/GS115 with 5 g/L G418 resistance (24, 48, 72 h, respectively); M: Protein marker.

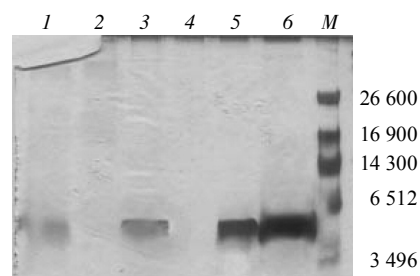


Fig. 6 16.5% SDS-PAGE (tricine) with silver staining scanned for HMPIDesB³⁰'s purification

1: Supernatant of the broth; 2: Flow through the macroporous resin column; 3: Elution of macroporous resin with 60%(v/v) ethanol; 4: Flow through the SP column; 5: Elution of SP column with 25 mmol/L Tris-HCl pH 9; 6: Being precipitated by ZnCl₂ then dissolved in 25 mmol/L Tris-HCl pH 9; M: Protein marker.

Table 1 The Recovery rate of purification

Step	Process	Recovery rate
1	Macroporous resin	80%
2	SP	85%
3	Zn ²⁺	90%

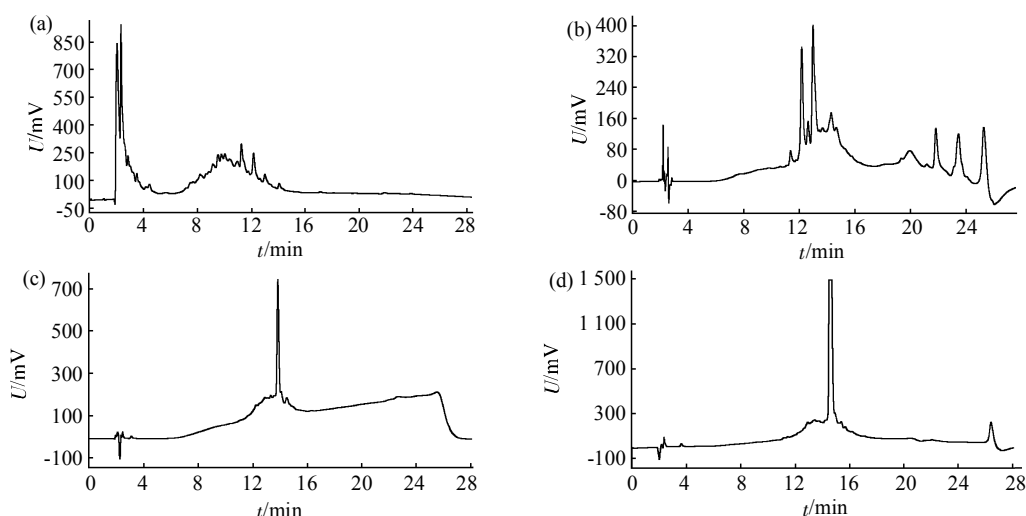


Fig. 7 HPLC analysis of purification

The absorbance peaks were detected about 14 min and was monitored at 214 nm. (a) Supernatant of the broth. (b) Elution of macroporous resin with 60% (v/v) ethanol. (c) Elution of SP with 25 mmol/L Tris-HCl pH 9. (d) Precipitated by ZnCl₂ and dissolved in 25 mmol/L Tris-HCl (contains EDTA) pH9.

2.5 HMPIDesB³⁰的分子质量鉴定

HMPIDesB³⁰的理论分子质量为5964.8. 用16.5% Tricine SDS-PAGE测定HMPIDesB³⁰的分子质量见图6. 质谱(Aglient Technologies公司LC/MSD SL质谱仪)测定HMPIDesB³⁰分子质量为5 965.23 (图8).

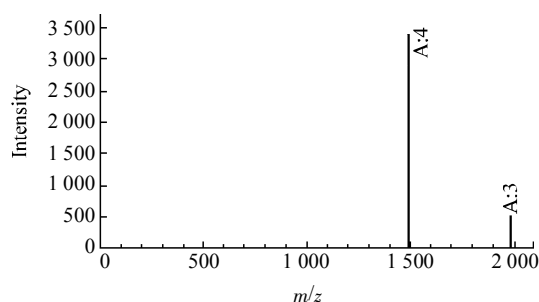


Fig. 8 Mass-spectrometric result of HMPIDesB³⁰

3 讨 论

影响外源基因在*Pichia pastoris*中表达的因素很多: 如外源基因的特性、表达框的染色体整合位点和方式、宿主菌的甲醇利用表型、基因剂量、分泌信号、产物稳定性和翻译后修饰等等^[7]关于基因剂量对表达的影响, 目前的看法是, 合适的拷贝数是需要, 实验中5 g/L G418抗性(约32个拷贝)的重组子比4 g/L G418抗性(约16个拷贝)的重组子蛋白表达量略低, 说明有些情况下随着拷贝数的增加表

达产物量不一定会相应增加, 甚至在个别情况下拷贝数增加对产量也会产生负效应^[7]. 高拷贝不能获得高表达, 可能是由于在表达框较长的情况下, 外源mRNA的翻译效率降低, 对分泌途径形成负反馈抑制, 或由于拷贝数过高, 使蛋白质通过内质网时不能正确折叠造成的.

*GS115*的2个醇氧化酶基因AOX1和AOX2都未突变, 在甲醇培养基中生长为野生型, 即Mut⁺型. 用Sal I 线性化HMPIDesB³⁰/pPIC9K转化*GS115*, 通常获得Mut⁺重组子, 但由于质粒上存在AOX1序列, 与酵母染色体整合时, 如果重组发生在酵母染色体的AOX1基因上, 则破坏了AOX1基因结构, 产生Mut⁻重组子, 所以需要对Mut表型进行鉴定. 很难预测某种蛋白质在哪种Mut表型的菌株中表达水平更高. 一般认为, 对于分泌表达的蛋白质, 培养基上清中表达产物的浓度与菌体密度有正相关关系, Mut⁺表型菌株因利用甲醇能力强, 生长快速, 菌体密度高, 表达及分泌的外源蛋白含量较高.

我们在对筛选出的4 g/L G418抗性, Mut⁺表型的重组子进行发酵研究中发现, 用常规的低盐培养基(BSM)菌体生长较慢, 通过在低盐培养基中添加1%的酵母提取物才使菌体正常生长. 说明所筛选出的工程菌需要过剩的氮源才能生长良好. Païs-Chanfrau等^[8]的研究表明还可用酪蛋白水解物(casein hydrolysate)、蛋白胨(peptone)或硫酸铵来替代酵母提取物.

SIPI-40属于非极性大孔吸附树脂。非极性吸附树脂是由偶极矩很小的单体聚合而得, 不含任何功能基团, 孔表的疏水性较强, 可通过与小分子内疏水部分的作用吸附溶液中的有机物, 比较适合用于分泌表达、体积较大、电导较高的发酵液的浓缩和初步纯化。

本实验利用毕赤酵母表达系统分泌表达出含短C肽AAK的人胰岛素原类似物HMPIDesB³⁰, 优化了发酵培养基的组成及发酵条件, 建立了经济有效的纯化方法。用AAK代替C肽的目的是方便下一步的胰蛋白酶酶切, 这种胰岛素原类似物经单次胰蛋白酶酶切, 并经脂肪酸修饰后可成为一种已运用于临床的长效人胰岛素类似物Detemir。

致谢 衷心感谢富进生物医药公司的张继兰工程师和胡春兰工程师在SDS-PAGE和HPLC中提供的帮助。

参 考 文 献

1 Kjeldsen T. Yeast secretory expression of insulin precursors. Appl

Microbiol Biotechnol, 2000, **54** (3): 277~286

2 Annibali, Nestor. US Patent, B1, 7091032. 2006-08-15

3 Hermansen K, Madsbad S, Perrild H, *et al.* Comparison of the soluble basal insulin analog insulin detemir with NPH insulin: a randomized open crossover trial in type 1 diabetic subjects on basal-bolus therapy. Diabetes Care, 2001, **24** (2): 296~301

4 Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, *et al.* Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect *in vivo*. Biochemistry, 1995, **312** (3): 725~731

5 Sinclair G, Choy F Y. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. 2002, **26** (1): 96~105

6 Wang Y, Liang Z H, Zhang Y S, *et al.* Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. Biotechnology and Bioengineering, 2001, **73** (1): 74~79

7 Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp Dale Keith E, *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene, 1997, **190** (1): 55~62

8 País-Chanfrau J M, García Y, Licor L, *et al.* Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters, 2004, **26** (16): 1269~1272

Expression of Human Mini-proinsulin DesB³⁰ in *Pichia pastoris* and Procedure for Purifying The Expression Product

GAO Jian-Kun¹⁾, CAI Shao-Xi^{1)*}, FAN Kai²⁾, FENG Qiang³⁾,
CHEN Hai-Rong³⁾, ZHANG Yi³⁾, HU Wei³⁾, YANG Ying-Bin¹⁾

¹⁾ Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China;

²⁾ Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China;

³⁾ Chongqing Fagen Biomedical Inc., Chongqing 400041, China)

Abstract The cDNA of a human Mini-proinsulin (B¹-B²⁹)-AAK-(A¹-A²¹) which named HMPIDesB³⁰ (human mini-proinsulin des B³⁰) was synthesized and inserted into the *Escherichia coli*-yeast shuttle vector pPIC9K. The constructed plasmid, HMPIDesB³⁰/pPIC9K was transformed into the *GS115* cells of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, using electrotransformation. A transformant with a high copy number of the gene integrated into the chromosome was obtained by YPD plates which contains increasing concentrations of G418. After fed-batch fermentation, the protein was purified by macroporous resin, ion-exchange chromatography and precipitated with 10~20 mmol/L Zn²⁺. The purity of HMPIDesB³⁰ is 95%, the expression level reached 1.0 g/L, and the recovery rate of purification is about 60%. The purified protein was characterized by 16.5% Tricine SDS-PAGE, HPLC, and mass spectrometry, and the molecular mass of the expressed products is in accordance with the cumulated value. HMPIDesB³⁰ can be secretorily expressed by *Pichia pastrois*. The composition of the fermentation medium, the optimal condition of the fermentation and an effective method to purify the expression products from the culture were established.

Key words expression system, human insulin precursor, methylotrophic yeast

* Corresponding author. Tel: 86-23-65112097, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

Received: May 10, 2007 Accepted: July 4, 2007