

研究报告

人胰岛素突变体的分离纯化及性质研究

陈来同 唐建国 胡美浩*

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 将人胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu) 基因重组到 pBV220 表达载体上, 在 *E. coli* 系统中得到高效表达. 表达产物经 Sephadex G-50 柱层析分离以及胰蛋白酶和羧肽酶 B 的酶促转化等步骤, 可得到纯的人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu), 其氨基酸组成与预期值相符, 其受体结合活性及生物活性与标准猪胰岛素的基本相同.

关键词 人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu), 受体结合活性, 基因表达

梁栋材等人^[1]提出的胰岛素分子与其受体结合的作用模型认为结合相互作用是发生在胰岛素分子的一个两性表面上, 其中部是由许多疏水残基构成的面积约为 $150 \text{ \AA}^2$ 的疏水表面, 而一些带电荷的基团和极性基团在其周围构成亲水带区. 人胰岛素 A 链第四位的谷氨酸 (A4Glu) 就是上述带电荷的基团之一. 为了研究 A4Glu 在人胰岛素与其受体结合中的作用, 我们利用定点突变方法, 将人胰岛素原基因中的 A4Glu 改变为 A4Leu (亮氨酸), 使其侧链基团不带电荷^[2]. 在国内外, 尚未见有关修饰 A4Glu 的报导. 将此人胰岛素原突变基因 (A4Glu→Leu) 重组于表达载体 pBV220 的 P_{RPL} 启动子之后, 在 *E. coli* 中进行温度诱导下的高密度发酵. 表达产物经分离纯化后, 转成人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu). 我们测定了此突变体的受体结合活性及生物活性, 发现人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的受体结合活性与标准猪胰岛素的基本相同, 其生物活性也基本上没有改变.

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

含人胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu) 基因

的质粒 pUC-BCA2 为本实验室构建^[2]. *E. coli* DH5 α 菌株 (SupE44 Δ lacU169 (Φ 80Laz Δ M15) *hsR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) 的感受态细胞购自 BRL 公司. pBV220 质粒为中国预防医科院病毒所侯云德教授赠送.

1.2 酶及试剂

胰蛋白酶 (EC. 3. 4. 21. 4) 购自 Sigma 公司 (比活 $10000 \times 10^3 \text{ U/g}$). 羧肽酶 B (EC. 3. 4. 17. 2) 为茹炳根教授赠送 (比活 $170 \times 10^3 \text{ U/g}$). 限制性内切酶及连接酶等购自 New England Biolabs 公司及华美公司. 人胎盘膜胰岛素受体按文献 [3] 制备. 胰岛素放免试剂盒购自北京西苑生物技术公司. 标准猪胰岛素购自徐州生物化学制药厂. 其它试剂为国产分析纯试剂.

1.3 实验方法

1.3.1 表达质粒 pBV-BCA2 的构建 按照文献 [4] 进行. 从 pUC-BCA2 质粒 DNA 上用 EcoR I 及 BamH I 切出人胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu) 基因片段 (BCA2). 将它与表达

* 联系人.

收稿日期: 1994-01-11, 修回日期: 1994-05-16

质粒 pBV 220 进行重组, 然后转化 *E. coli* DH5 α 菌株。

1.3.2 高密度发酵 参照文献[5]进行。将含 pBV-BCA2 的菌株在 37℃ 条件下, 于 3ml LB Amp 培养基中振荡培养 7—8h, 再转入 300ml 培养基中, 在 30℃ 振荡培养至对数期, 然后转 3L 培养液, 于发酵罐中在 30℃, pH7.2 条件下培养。至 A_{600} 值达 20—30 时, 升温至 42℃, 再培养 2h 后收获菌体。

1.3.3 表达产物的分离纯化 参照文献[5]进行。

1.3.4 用酶促法将人胰岛素原突变体转化为人胰岛素突变体 基本按文献[6]进行。只是转化产物经 DEAE-Sephadex A-25 柱分离后, 用 CNBr 再进行 N 端 Met 的裂解。8ml 蛋白质溶液中加入 24ml 甲酸 (88%), 再加 40mg CNBr, 室温反应过夜。蒸干甲酸, 用 0.1mol/L NH_4HCO_3 溶解胰岛素产物, 再经 Sephadex G-25 柱脱盐, 冻干, 得胰岛素突变体干粉。

1.3.5 氨基酸组成分析 在 Beckman 121MB 氨基酸自动分析仪上进行。

1.3.6 受体结合活性测定 将分离的组分及猪胰岛素标准品按文献[3]进行受体结合活性测定。

1.3.7 生物活性测定 按 1990 年药典规定, 由北京市药检所用小白鼠血糖法测定。

2 结果与讨论

2.1 表达质粒 (pBV-BCA2) 的构建及其表达

按方法 1.3.1 构建的表达质粒, 经酶切图谱鉴定证明重组正确 (数据未列出)。BCA2 基因即人胰岛素原突变体基因, 其 A4 位的密码子由 GAG 突变为 CTG, 即表达后的 A4Glu 突变成 Leu。而 B30 位的突变由于改变的是密码子的第三位碱基, 因此未影响人胰岛素的氨基酸组成^[2]。

按照 1.3.2 方法, 温度诱导高密度发酵, 表达产物的 SDS-PAGE 分析见图 1。紫外扫描分析表明表达产物占菌体总蛋白量的 23%。



图 1 高密度发酵表达产物的 15%SDS-PAGE 分析 A: 蛋白质分子量标准。B: Sephadex-G50 柱峰 I 收集物。C: 含 pBV220 质粒的细胞总蛋白。D: 高压均质机处理的含 pBV-BCA2 的细胞, 其沉淀中所含的蛋白。E: 含 pBV-BCA2 质粒的细胞总蛋白。

2.2 表达产物的分离纯化

表达产物的分离纯化参照文献[5]进行。图 2 是 Sephadex G-50 柱层析分离人胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu) 的图谱。收集第 II 峰, 并进行 SDS-PAGE 分析 (图 1B 行) 及氨基酸组成分析 (表 1)。从以上结果可看出, 表达产物经变、复性后, 直接用 Sephadex G-50 柱层

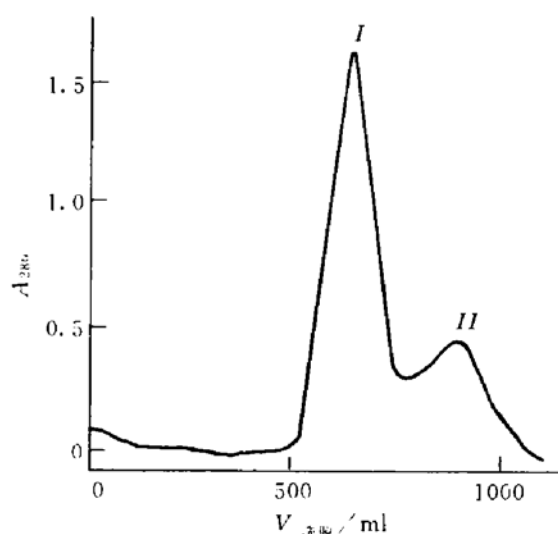


图 2 人胰岛素原突变基因 (A4Glu→Leu) 表达产物的 Sephadex-G50 柱层析图 柱 (3cm×100cm), 流速: 0.8ml/min, 峰 II 为胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu)。

表 1 人胰岛素原及胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的氨基酸组成分析

氨基酸	胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu)	胰岛素突变体 (A4Glu→Leu)
Asx	4.6 (4)	3.4 (3)
Thr	3.7 (3)	3.3 (3)
Ser	4.8 (5)	3.4 (3)
Glx	13.8 (14)	6.2 (6)
Pro	3.4 (3)	1.6 (1)
Gly	10.4 (11)	5.1 (4)
Ala	4.2 (4)	1.1 (1)
Val	5.6 (6)	3.6 (4)
Met	0.7 (1)	0
Ile	3.0 (2)	1.6 (2)
Leu	12.8 (13)	7.5 (7)
Tyr	3.9 (4)	4.0 (4)
Phe	3.5 (3)	3.4 (3)
Lys	2.1 (2)	0.9 (1)
His	1.8 (2)	1.9 (2)
Arg	4.0 (4)	0.9 (1)

注: () 代表预期值。

析分离, 所得人胰岛素原突变体纯度约达 90% 以上。氨基酸组成与预期值基本一致, 其中 Met 氨基酸的存在说明, 从 *E. coli* 中表达的人胰岛素原产物的 N 端 Met 没有被加工掉。

2.3 人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的制备

按照 1.3.4 方法, 将人胰岛素原突变体在胰蛋白酶及羧肽酶 B 的作用下转化为人胰岛素突变体, 经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分

离, 收集第 III 峰 (图 3)。按 1.3.4 方法去 Met, 并脱盐。冻干产品经 15% PAGE 分析 (图 4) 及氨基酸组成分析 (表 1)。表 1 结果说明基因工程生产的人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的氨基酸组成正确, 其纯度在 PAGE 上表现为一条带。由于人胰岛素突变体较之猪胰岛素减少一负电荷, 因此突变体在 PAGE 上的迁移较胰岛素慢。

A B C D E



图 4 人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的 15% PAGE 分析

A, E: 人胰岛素原突变体 (A4Glu→Leu), B, D: 人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu), C: 标准猪胰岛素。

2.4 人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的受体结合活性及生物活性测定

从图 5 可看出人胰岛素突变体 (A4Glu→

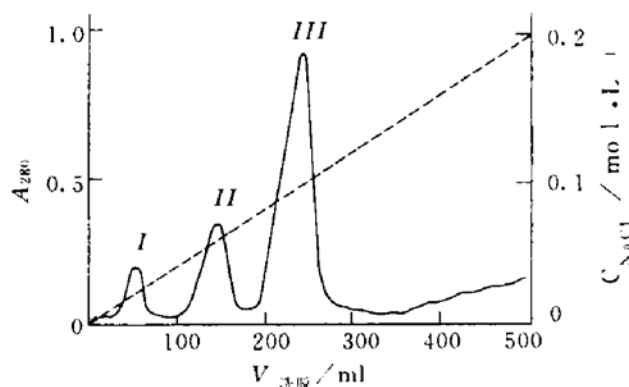


图 3 人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图谱

柱 (1.5cm×18cm), 洗脱梯度: 0—0.2mol/L NaCl, 流速: 0.4ml/min.

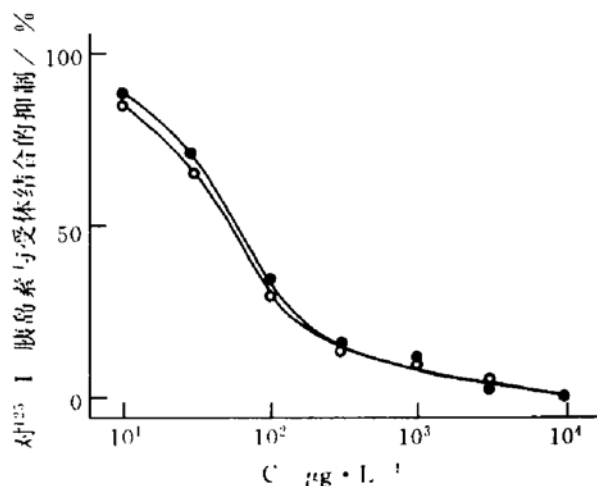


图 5 重组人胰岛素突变体 (A4Glu→Leu) 的受体结合活性分析

●-●: 猪胰岛素; ○-○: 人胰岛素突变体。

Leu) 的受体结合活性与猪胰岛素的基本相同, 其受体结合活性是猪胰岛素的 107%。产物的生物活性为 25.6 IU/mg。这个测定结果与标准猪胰岛素生物活性也基本相同。这初步说明人胰岛素中带电荷的 A4Glu 被非极性的亮氨酸取代后, 与受体间的相互作用及其生物活性基本上都没有受到影响。胰岛素分子与受体相互作用的两性表面周围的带电荷基团和极性基团主要有 A1Gly 的 α 氨基, A4Glu, A5Gln, A18Asn, A21Asn, B9Ser, B10His, B13Glu, B21Glu, B22Arg 等残基的侧链基团以及 B 链羧端的羧基。我们将 A4Glu 改变成 A4Leu, 虽然这样会减少了一个负电荷基团, 使原有 A4 侧链羧基与 A1 α 氨基之间的盐键受到破坏, 从而使 A4 的侧链有可能更靠近疏水表面, 但由此引起的构象变化还不足以影响胰岛素分子与受体的相互作用。最近 Hua 的 NMR 工作^[7,8] 认为 A 链的 A2 与 A3 对受体识别是重要的。A3Val $\rightarrow$ Leu insulin Wakayama 突变体, 表现了 A3 的突变引起胰岛素生物活性的降低, 但却没有提到 A4Glu 残基在受体结合中的作用。

参 考 文 献

- 1 梁栋材, 常文瑞, 张季平等. 中国科学 (B 辑), 1991; 7: 715
- 2 吴凯瑾, 胡美浩. 生物化学杂志, 1989; 5: 515
- 3 Tang J G, Wang C C, Tsou C L. Biochem J, 1988; 255: 451
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning;

A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; 1: 53—1. 67

- 5 Tang J G, Hu M H. Biotechnology letters, 1993; 15: 661
- 6 Kemmler W S, Peterson J D, Steiner D F. J Bio Chem, 1971; 246: 6786
- 7 Hua Q X, Shoelson S E, Kochoyan M *et al.* Nature, 1991; 354: 238
- 8 Hua Q X, Shoelson S E, Inouye K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 1

Purification and Characterization of the Mutant of Recombinant Human Insulin (A4Glu $\rightarrow$ Leu). Chen Laitong, Tang Jianguo, Hu Meihao (*College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China*).

Abstract The mutant of human proinsulin gene (A4Glu $\rightarrow$ Leu) was recombined to the expression vector and expressed in *E. coli* with high level. The expression product was purified by Sephadex G-50 gel filtration and converted to the mutant of human insulin by trypsin and carboxypeptidase B. The insulin mutant, purified by DEAE-Sephadex A-25, has an expected amino acid composition. The receptor binding activity and biological activity of this mutant are the same with that of standard porcine insulin.

Key words mutant of human insulin (A4Glu $\rightarrow$ Leu), receptor binding activity, gene expression

铀标记抗癌胚抗原单克隆抗体 C₁₇ 的研究和应用*

赵启仁 张福华 刘洁 林汉 李美佳 庄湘莲 陈艾 胡璧

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192)

摘要 用合成的 N'-(对-异硫氰基苄基)-二乙三胺-N¹, N², N³, N³-四乙酸铀钠为螯合剂。用 Sephadex G-50 凝胶柱层析分离标记 C₁₇ 和过量试剂。分部收集的层析物的光密度图和荧光强度图完全一致。蛋白峰处两管标记 C₁₇ 的比活性分别为 5.2 和 8.9 Eu³⁺ 离子每 C₁₇ 分子, 而且 C₁₇ 的标记回收率为 64%。标