

重组人胰岛素的体外复性纯化

陈 阳 陈劲春*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 对大肠杆菌表达的重组人胰岛素原包涵体蛋白的变性复性条件进行了优化。考察了变性液中 DTT 的浓度,复性液的 pH 值,还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)的物质的量比,甘氨酸(Gly)浓度对复性的影响。结果表明,在变性液中加入 60 mmol/L DTT,复性液 pH9.5,GSH 与 GSSG 物质的量比为 5:1,Gly 浓度为 50 mmol/L 条件下复性率最高。复性后的重组人胰岛素原过 DEAE-Sepharose FF 柱,经过 TPCK-胰蛋白酶和羧肽酶 B 酶切后,再过 Sephadex G-25 柱,得到纯度较高的重组人胰岛素。目的蛋白收率为 96 mg/g 干菌体。

关键词: 重组人胰岛素原; 变性; 复性; 酶切

中图分类号: Q578

引 言

胰岛素是治疗糖尿病的重要药物。用于临床已有 80 多年,过去医用胰岛素都是从猪和牛的胰腺提取,DNA 重组技术的出现为胰岛素的生产开创了新的途径^[1]。

大肠杆菌表达系统在重组人胰岛素的生产中已显示出了它的优越性,国内外已展开了广泛的研究和应用,尤其是对大肠杆菌表达策略的研究越来越多^[2-3],从不同角度改进和完善了胰岛素的大肠杆菌表达系统。另外由于大肠杆菌表达的融合蛋白往往以包涵体的形式表达,表达的产物必须经过复性和纯化才能得到具有生物活性的产物,往往复性效率很低,降低了胰岛素的最终收率。变性蛋白在复性过程中由于二硫键的错配会形成许多异构物和多聚体,可以通过加入氧化还原试剂将错配的二硫键还原后重新氧化,恢复正确构象,复性体系中的 pH 和二硫苏糖醇(DTT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)以及甘氨酸(Gly)的添加对复性结果也有一定的影响^[4-6]。

本文主要研究了不同变性复性条件对重组人胰岛素原复性效率的影响,选择最佳变性复性工艺。最终得到的重组人胰岛素可以达到 96 mg/g 干菌

体,收率明显高于以往的文献报道^[7]。

1 材料和方法

1.1 菌种

pET₂₈₍₊₎_a *E. coli* Rosetta 菌株由本实验室构建并保存。

1.2 实验试剂及仪器

GSH、GSSG、Gly,欣经科公司;羧肽酶 B, Sigma 公司;TPCK-胰蛋白酶,上海国源生物技术有限公司;其余试剂为国产分析纯。

TGL-16G 台式离心机、GL-20G- II 冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;JY98-3D 超声波细胞破碎仪,宁波新芝科器研究所;DEAE-Sepharose FF,北京欣经科生物技术有限公司;Sephadex G-25, Pharmacia 公司;液相色谱仪(包括 LC-10AT 泵,CTO-10A 柱温箱,SPD-10A 检测器,色谱数据处理软件),日本岛津公司。

1.3 基因工程菌的诱导表达

将大肠杆菌基因工程菌接种于 LB 培养基中,37℃,160 r/min 培养过夜,转接到 2×YT 培养基中,37℃,160 r/min 振荡培养 2 h,加入 IPTG 诱导 6~8 h 停止发酵,离心收集菌体。培养基配方见文献^[8]。

1.4 包涵体的收集与洗涤

菌体细胞用细胞洗液(100 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,pH 8.0)洗涤 2 次。超声破碎,5 s×50 次,间隔 10 s,超声功率 600 W。4℃离心弃上清,用含有 2 mol/L 尿素和 100

收稿日期: 2008-03-28

第一作者: 女,1982 年生,硕士生

* 通讯联系人

E-mail: jingchunchen@hotmail.com

mmol/L Tris-HCl 的包涵体洗液洗涤包涵 3 次。水洗 1 次。SDS-PAGE 电泳分析。

1.5 融合蛋白的体外变性与 CNBr 裂解

洗涤后的包涵体用含有不同浓度 DTT 的变性液(6 mol/L 盐酸胍, 30 mmol/L Tris-HCl)溶解。变性液用甲酸调节至 pH 至 1.5~1.7, 用 70% 乙酸溶解 CNBr, 与变性液混合, 搅拌 24 h, 于阳光下通风, 除去未分解的 CNBr, 调节变性液至 pH 8 左右。

1.6 融合蛋白的复性

配制 GSH 与 GSSG 物质的量比不同的复性缓冲液, 分别调节为不同的 pH 值。采用脉冲稀释法复性, 将变性液每隔 30 min 分 5 次加入到复性缓冲液中, 变性液与复性液体积比为 1:10, 放置 24 h。在研究 pH 对复性影响效果的同时分别添加不同浓度的 Gly 研究其对复性的影响。重复实验 3 次。

1.7 重组人胰岛素原的纯化

收集折叠正确的重组人胰岛素原, 用 pH 8 的 Tris 缓冲液透析平衡, 再转到 pH 值 6.5 的磷酸缓冲体系中。DEAE-Sepharose FF 柱用 pH 值 6.5 的 PBS 缓冲液平衡, 复性液上柱, 用合适的 NaCl 梯度进行洗脱, 紫外检测仪在线检测, 收集 280 nm 吸收峰。

1.8 酶切转化及重组人胰岛素的纯化

将纯化得到的重组人胰岛素原用 TPCK-胰蛋白酶酶切 30 ℃, 1 h。10% TFA 终止反应。再加入羧肽酶 B, 37 ℃, 酶切 30 min。将重组人胰岛素粗品过 Sephadex G-25 柱^[9], 层析柱的平衡液和洗脱液均为 pH 7 的 5 mmol/L 的磷酸缓冲液, 280 nm, 收集峰, SDS-PAGE 电泳分析, HPLC 分析。

2 结果与讨论

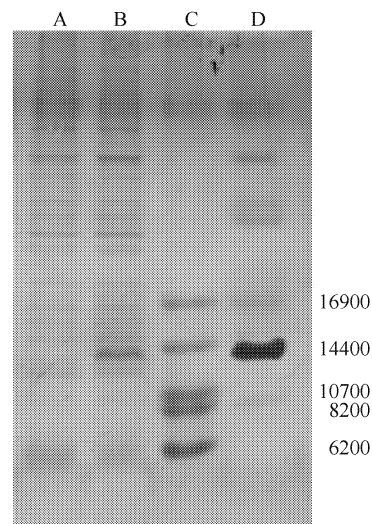
2.1 包涵体的 SDS-PAGE 电泳分析

收集得到包涵体 3.4 g, SDS-PAGE 电泳图谱如图 1 所示, 14000 处有目的蛋白条带, 与理论值相符。经过 3 次洗涤的包涵体, 杂蛋白明显减少, 目的蛋白占包涵体蛋白中的 70% 以上, 说明包涵体洗涤中的尿素将部分杂蛋白溶解, 3 次洗涤对目的蛋白的纯化也起到粗分的作用, 再增加洗涤的次数, 会造成目的蛋白的洗涤损失。

2.2 DTT 浓度对复性的影响

将加入不同浓度 DTT 的 CNBr 切后变性液用 HPLC 分析如图 2 所示, 可以看出, 峰 1 是杂蛋白和折叠错误的蛋白, 峰 2 是折叠正确的重组人胰岛素

原单体, 随着 DTT 浓度的增加, 正确折叠的重组人胰岛素原单体明显增加, 在总蛋白中的比例也增大, 说明 DTT 的加入有助于包涵体的重折叠。故选用含有 60 mmol/L DTT 的变性液溶解包涵体。



A—基因工程菌加入诱导剂前全菌蛋白; B—基因工程菌诱导后全菌蛋白; C—标准蛋白质; D—洗涤后的包涵体

图 1 基因工程菌与包涵体的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis for gene engineering bacteria and inclusion body

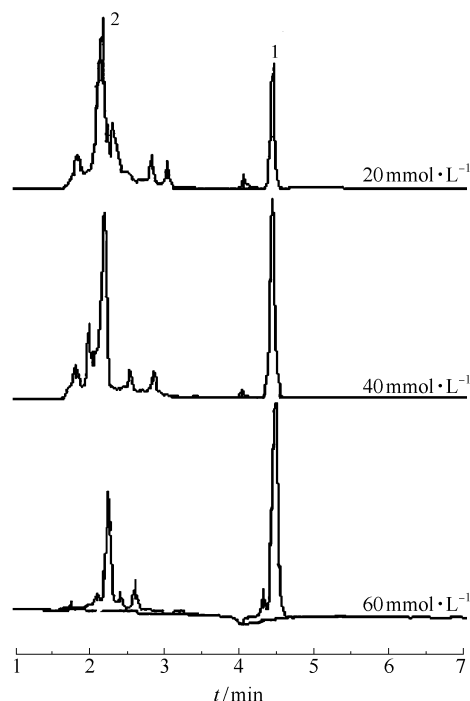


图 2 DTT 对蛋白质折叠影响的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC traces showing the effect of DTT on protein folding

2.3 重组人胰岛素原复性的影响条件

在蛋白质量浓度为 $0.4 \sim 0.8 \text{ mg/mL}$ 条件下复性时,蛋白很少聚集,且复性率较高,故复性操作均控制蛋白浓度在该范围内。

2.3.1 pH 值及 GSH 与 GSSG 物质的量比对复性的影响

pH 值在 7.0 以上,可以防止自由硫醇的质子化作用影响正确配对的二硫键的形成,过高过低都会降低复性率。复性液中氧化还原系统对蛋白质的复性具有较大的影响。氧化性试剂能够促进二硫键的形成,而还原剂能够催化错误配对的二硫键进行重排,其浓度和比例应该有合适的范围。才能有助提高目的蛋白的正确折叠率。在基础复性液(100 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L 尿素)中 GSSG 浓度固定为 0.3 mmol/L ,改变复性液中 GSH 与 GSSG 物质的量比为 $2:1, 5:1, 10:1$,改变 pH 值 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5。HPLC 分析正确折叠的重组人胰岛素原含量,平均 3 次实验结果,如图 3 所示,当 pH 为 9.5, $n(\text{GSH})/n(\text{GSSG})$ 为 $10:1$ 与 $5:1$ 差别不太大,考虑成本问题,故选用 pH 为 9.5, $n(\text{GSH})/n(\text{GSSG})$ 为 $5:1$,即 GSH 浓度为 1.5 mmol/L , GSSG 为 0.3 mmol/L 。

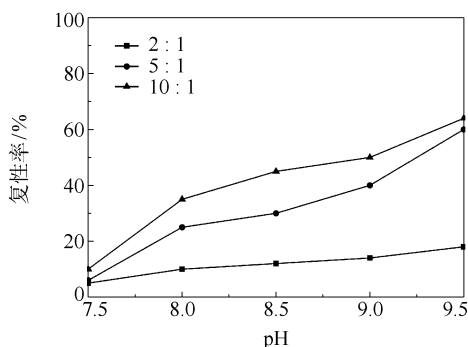


图 3 pH 值及 GSH 与 GSSG 物质的量比对复性的影响

Fig. 3 Influence of pH and the ratio of GSH to GSSG on renaturation

2.3.2 Gly 浓度对复性的影响

当复性液中加入适量的 Gly 时,可明显提高复性率,原因在于 Gly 的加入有助于增加复性中间产物的溶解度。3 次实验结果表明,当复性液中 $n(\text{GSH}):n(\text{GSSG})$ 为 $5:1$,加入适量的 Gly 时,复性过程中不会形成肉眼可见的沉淀,且正确折叠的重组人胰岛素原含量明显增高。从图 4 可以看出,当 pH 为 9.5, Gly 浓度为 50 mmol/L 时,重组人胰岛素原的复性率最高,可达到 70% 以上。

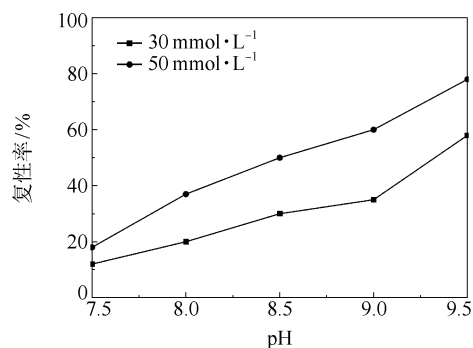
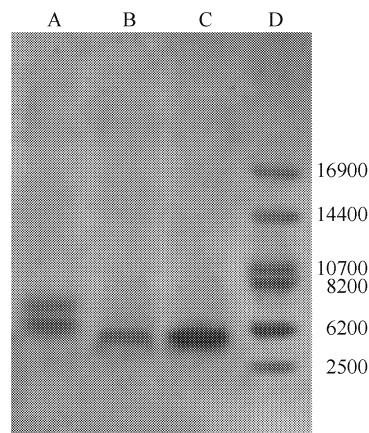


图 4 Gly 浓度对复性的影响

Fig. 4 Effect of Gly concentration on renaturation

2.4 重组人胰岛素原的纯化及酶切

复性液用 DEAE-Sephrose FF 柱分离, NaCl 浓度 0.05 mol/L 可以洗脱下一些杂蛋白,在 0.1 mol/L 时,有分子量 6000 左右的两条带被洗脱下来,此条带即为目的蛋白。将收集的目的蛋白透析冷干,干燥后的粉末溶于 Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5。按照酶与蛋白质量比 $1:500$ 加入 TPCK-胰蛋白酶, 30°C , 酶切 1 h。10% TFA 终止反应。按照酶与蛋白质量比 $1:1000$ 加入羧肽酶 B, 37°C 酶切 30 min。SDS-PAGE 电泳如图 5 所示,经过 TPCK-胰蛋白酶和羧肽酶 B 酶切后得到的重组人胰岛素与人胰岛素标准品位置平行,分子量 5800 左右。先在 30°C 条件下酶解是为了降低 TPCK-胰蛋白酶的活性,以免切掉部分氨基酸序列。本实验中所选用的酶切条件准确有效地将重组人胰岛素原转化为重组人胰岛素。



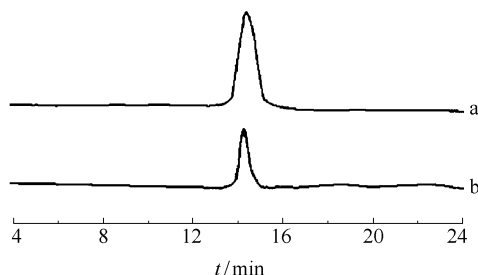
A—重组人胰岛素原; B—酶切后重组人胰岛素; C—重组人胰岛素标准品; D—标准蛋白质

图 5 酶切后 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis after cleavage

2.5 胰岛素的纯化

经过 Sephadex G-25 柱的分离纯化,收集的第一个峰即为胰岛素,HPLC 分析结果如图 6 显示,保留时间 14.253 min,与标准品保留时间 14.390 min 基本一致。以优化的最佳变性复性条件进行 3 次重复实验,3 次得率分别为 97.44,95.59,100.20 mg/g 干菌体。可以看出,优化后复性率和收率大幅提高。



a—人胰岛素标准品;b—Sephadex G-25 柱纯化后的重组人胰岛素

图 6 重组人胰岛素 HPLC 分析

Fig.6 HPLC analysis of recombinant human insulin

3 结论

变性液中加入 60 mmol/L DTT,复性液 pH 9.5,GSH 与 GSSG 物质的量比为 5:1,Gly 浓度为 50 mmol/L 条件下,重组人胰岛素原的复性率达到 70% 以上,经过 TPCK-胰蛋白酶和羧肽酶 B 酶切后得到胰岛素最终收率达 96 mg/g 干菌体。

参考文献:

- [1] Frost T, Rave K, Pfuetszner A, et al. Effects of C-peptide on glucose metabolism in patients with type 1 diabetes[J]. Diabetes Care, 2002, 25(6): 1096 – 1097.
- [2] Tang J G, Hu M H. Production of human proinsulin in *E. coli* in a non-fusion form[J]. Biotechnology Letters, 1993, 15(7): 661 – 666.
- [3] 陈来同,姚蒙. B₂₃-Gly-B₂₄人胰岛素的分离纯化及性质研究[J]. 药物生物技术, 2002, 9(5): 270 – 273.
- [4] Ruoppolo M, Freedman R B. Refolding by disulfide isomerization: the mixed disulfide between ribonuclease T₁ and glutathione as a model refolding substrate[J]. Biochemistry, 1995, 34(4): 9380 – 9388.
- [5] 张婷婷,叶波平. 包涵体蛋白质的复性研究进展[J]. 药物生物技术, 2007, 14(4): 306 – 309.
- [6] Xie Y, Wetlaufer D B. Control of aggregation in protein refolding: The temperature-leap tactic[J]. Protein Science, 1996, 5(3): 517 – 523.
- [7] 李晓红,朱惠玲,余蓉,等. 重组人胰岛素制备工艺[J]. 四川大学学报, 2007, 39(4): 79 – 83.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 冷雪,陈劲春,董鹏. 重组人胰岛素及 C 肽的分离纯化[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2006, 33(5): 30 – 32.

Refolding of recombinant human insulin

CHEN Yang CHEN JinChun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 10029, China)

Abstract: Optimization of the renaturation conditions for recombinant human proinsulin inclusion bodies expressed in *E. coli* has been studied. The influence of varying the denaturing concentration of 1,4-dithiothreitol (DTT), the renaturing pH, the ratio of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) reagents and the glycine (Gly) concentration on renaturation have been investigated. The results indicate that the optimal conditions are 60 mmol/L denaturing concentration of DTT, a renaturing pH of 9.5, ratio of GSH to GSSG of 5:1, and Gly concentration of 50 mmol/L. The yield of recombinant human insulin can be as high as 96 mg/g dry thalli after isolation by DEAE-Sepharose FF and cleavage by N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)-trypsinase and carboxypeptidase B following purification by Sephadex G-25.

Key words: recombinant human proinsulin; denaturation; renaturation; cleavage