



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160103

## 重组人胰岛素原在大肠杆菌中的可溶性表达

吕丹, 闫亚丽, 景丽芳, 张秋荣, 常莉, 刁爱坡, 李玉银  
(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 目前重组胰岛素主要用于糖尿病的治疗. 通过大肠杆菌(*E. coli*)密码子优化, 设计人胰岛素原基因, 建立利用大肠杆菌表达可溶性重组胰岛素原的技术方法. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示, 重组质粒 pHis-NusA-insulin 诱导表达的大肠杆菌可溶性表达融合蛋白 His-NusA-insulin. 重组蛋白 His-NusA-insulin 可溶性表达的最适条件为 0.1 mmol/L IPTG 作用下 37 °C 诱导 4 h, 重组蛋白产物经过 Ni 柱纯化、500 mmol/L 咪唑洗脱, 得到纯度较高的 1.059 μg/μL 的重组蛋白 His-NusA-insulin, 重组蛋白 His-NusA-insulin 经烟草蚀纹病毒蛋白酶(TEV)酶切作用后, 获得可溶的人胰岛素原.

**关键词:** 人胰岛素原; 重组蛋白; NusA

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2017)06-0021-05

### Soluble Expression of Recombinant Human Proinsulin in *E. coli*

LÜ Dan, YAN Yali, JING Lifang, ZHANG Qiurong, CHANG Li, DIAO Aipo, LI Yuyin  
(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Recombinant insulin is used to treat diabetes at present. A human proinsulin gene was designed using optimized *E. coli* codons. A method of expressing soluble recombinant proinsulin in *E. coli* was established. The SDS-PAGE results indicated that the recombinant fusion protein His-NusA-insulin was solubly expressed in *E. coli*, which was inducibly expressed by recombinant plasmid pHis-NusA-insulin. The optimum protein expression conditions are 0.1 mmol/L IPTG induction at 37 °C for 4 h. The recombinant protein product was purified with Ni column, and eluted by 500 mmol/L imidazole. The concentration of high purity His-NusA-insulin is 1.059 μg/μL. Tobacco etch virus protease (TEV) was used to cleave His-NusA-insulin to produce the soluble recombinant proinsulin.

**Key words:** human proinsulin; recombinant protein; NusA

糖尿病是由遗传和环境因素相互作用而引起的常见病, 它是一种由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍所致的以高血糖为特征的慢性代谢性疾病<sup>[1]</sup>. 胰岛素是体内唯一能够降低血糖的激素, 是胰岛β细胞在外源性或者内源性物质刺激下分泌的蛋白质激素. 目前胰岛素作为治疗糖尿病最有效的药物之一, 对于糖尿病的治疗起着至关重要的作用<sup>[2-3]</sup>.

不同来源的胰岛素氨基酸序列略有差异, 但是功能类似<sup>[4]</sup>. 胰岛素是由 A 链和 B 链构成的仅有 51 个

氨基酸的多肽, 相对分子质量为 5 784<sup>[5-6]</sup>. 胰岛素中存在 3 个二硫键, 即 2 个肽链间二硫键和 1 个肽链内二硫键, 肽链间二硫键存在于 A7-B7 以及 A20-B19, 肽链内二硫键存在于 A 链(A6-A11).

目前应用于重组胰岛素生产的工艺主要为大肠杆菌(*E. coli*)中的包涵体表达和酵母中的胞外表达, 其中大肠杆菌表达的重组胰岛素包涵体涉及蛋白变性与复性等一系列复杂工艺<sup>[7-9]</sup>, 而酵母的生产成本较大肠杆菌高<sup>[10-11]</sup>. 利用酵母生产重组胰岛素工艺

收稿日期: 2016-03-23; 修回日期: 2016-05-31

基金项目: 大学生创新创业训练计划资助项目(201510057058); 天津科技大学大学生实验室创新基金资助项目(1504A302X)

作者简介: 吕丹(1990—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 李玉银, 助理研究员, liyuyin@tust.edu.cn

数字出版日期: 2017-07-05; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20170705.1453.004.html>

中的重组人胰岛素原氨基酸序列为 EEAEAEAEPK-B 链-AAK-A 链<sup>[12]</sup>, 包含信号肽和截断的 C 链共 64 个氨基酸. 本实验以酵母生产重组胰岛素工艺中的重组人胰岛素原为研究对象, 探索研究通过表达融合蛋白增加重组胰岛素原在大肠杆菌中的可溶性表达, 为降低重组胰岛素的制备成本提供基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

大肠杆菌 (*E. coli*) 表达菌株 BL21、转化菌株 Top10、表达载体 pHis-NusA 为本实验室保存.

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 连接酶, Fermentas 公司; Hi Trap Ni FF 纯化柱, GE 公司; 烟草蚀纹病毒蛋白酶 (tobacco etch virus protease, TEV) 为本实验室保存.

### 1.2 表达载体的构建

设计编码胰岛素原基因片段, 引入 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点, 由上海捷瑞生物工程公司合成和构建 pGH-insulin 载体, 再亚克隆到 pHis-NusA 表达载体上, 然后转化到大肠杆菌 Top10, 经过酶切和 DNA 测序鉴定, 得到重组质粒 pHis-NusA-insulin.

### 1.3 重组人胰岛素表达菌株的培养和表达条件的优化

#### 1.3.1 诱导温度的优化

挑取阳性克隆单菌落接种到三角瓶中, 经 37 °C 放大培养至  $A_{600}$  值达到 0.6 ~ 0.8, 添加 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 分别于 16 °C 诱导过夜, 25 °C 诱导 8 h, 30 °C 诱导 5 h, 37 °C 诱导 4 h. 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 得到菌体. 菌体经过终质量浓度为 0.5 mg/mL 溶菌酶处理, 置于冰上 30 min 后超声破碎, 进行 SDS-PAGE 电泳分析.

#### 1.3.2 IPTG 浓度的优化

挑取阳性克隆单菌落接种到摇瓶中, 经 37 °C 放大培养至  $A_{600}$  值达到 0.6 ~ 0.8, 分别添加 IPTG 终浓度为 0.02、0.1、0.5 mmol/L. 37 °C 诱导 4 h. 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 得到菌体. 菌体经过终质量浓度为 0.5 mg/mL 溶菌酶处理, 置于冰上 30 min 后超声破碎, 进行 SDS-PAGE 电泳分析.

### 1.4 重组人胰岛素原的表达与纯化

添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 于 37 °C 诱导 4 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 经过溶菌酶处理和超声破碎, 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min, 获取上清液, 通过 Ni 柱纯化, 得到重组人胰岛素原.

### 1.5 重组人胰岛素原蛋白浓度测定

按照 Bradford 法对重组人胰岛素原进行定量<sup>[13]</sup>, 利用已知质量浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 测定其吸光度, 绘制标准曲线. 根据重组人胰岛素原的吸光度计算重组人胰岛素原的含量. 由标准曲线得回归方程  $y = 0.0756x + 0.6208$  ( $R^2 = 0.9949$ ).

### 1.6 TEV 蛋白酶酶切重组蛋白 His-NusA-insulin 的检测

#### 1.6.1 酶切检测

采用以下体系, 在 30 °C 作用 2 h 条件下对 His-NusA-insulin 蛋白进行酶切实验: (1) 30  $\mu$ L His-NusA-insulin + 5  $\mu$ L 缓冲液; (2) 30  $\mu$ L His-NusA-insulin + 1  $\mu$ L TEV + 4  $\mu$ L 缓冲液; (3) 30  $\mu$ L His-NusA-insulin + 2  $\mu$ L TEV + 3  $\mu$ L 缓冲液; (4) 30  $\mu$ L His-NusA-insulin + 4  $\mu$ L TEV + 1  $\mu$ L 缓冲液; (5) 4  $\mu$ L TEV + 31  $\mu$ L 缓冲液. His-NusA-insulin 蛋白质量浓度为 1.059  $\mu$ g/ $\mu$ L, TEV 蛋白酶质量浓度为 0.66  $\mu$ g/ $\mu$ L, 缓冲液为含有 50 mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 8.0)、0.3 mol/L NaCl 的磷酸钠缓冲液. 反应结束后, 各体系加入 4  $\mu$ L 5 $\times$  SDS 上样缓冲液, 95 °C 煮沸 5 min, 漩涡震荡器混匀, 10 000 r/min 离心 30 s. 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测.

#### 1.6.2 酶切蛋白溶解性检测

His-NusA-insulin 在 30 °C 作用 2 h 进行酶切反应后, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液加入 5 $\times$  SDS 上样缓冲液中, 95 °C 煮沸 5 min, 漩涡震荡器混匀, 10 000 r/min 离心 30 s. 另外, 向沉淀中加入 5 $\times$  SDS 上样缓冲液, 95 °C 煮沸 5 min, 漩涡震荡器混匀, 10 000 r/min 离心 30 s, 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测.

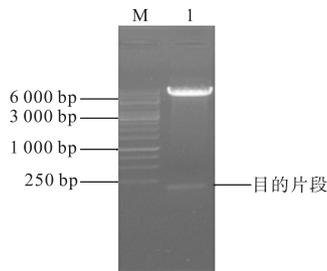
## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒 pHis-NusA-insulin 的构建

pGH-insulin 载体和 pHis-NusA 表达载体分别经限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切后, 回收和纯化获得编码胰岛素原和 pHis-NusA DNA 片段. 经连接后转化到大肠杆菌感受态细胞 Top10 中, 挑取转化子提取质粒并进行双酶切验证, 编码胰岛素原 DNA 片段大小为 210 bp, 双酶切结果与预期相符 (图 1).

将酶切验证的阳性克隆质粒进行 DNA 测序, 测序结果与设计胰岛素原基因序列比对分析, 二者的碱

基序列完全相同,说明 pHis-NusA-insulin 重组质粒构建成功。



M. DNA marker; 1. pHis-NusA-insulin 质粒酶切验证

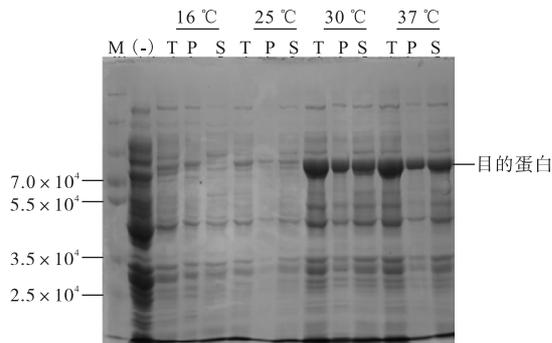
图1 pHis-NusA-insulin 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid of pHis-NusA-insulin

## 2.2 重组蛋白 His-NusA-insulin 表达条件的优化

### 2.2.1 诱导温度的优化

降低诱导温度能够减缓蛋白的表达速度,有利于蛋白的正确折叠. 重组蛋白 His-NusA-insulin 在不同温度下的表达结果如图 2 所示. NusA 融合蛋白相对分子质量约为  $5.4 \times 10^4$ , 胰岛素原相对分子质量约为  $8 \times 10^3$ , 表达 His-NusA-insulin 蛋白的相对分子质量约为  $7 \times 10^4$ , 与预期表达蛋白相对分子质量一致. His-NusA-insulin 蛋白在 16、25 °C 表达量较低, 而在 30、37 °C 表达量较高, 并且大约有 50% 表达蛋白是可溶的。



M. protein marker; (-). 未加入 IPTG 诱导; T. 全菌体破碎; P. 破碎后的沉淀; S. 破碎后的上清液

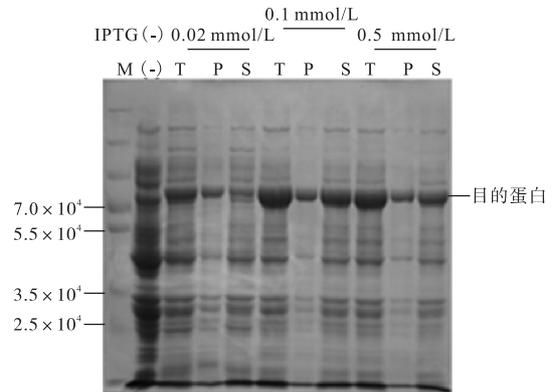
图2 重组蛋白 His-NusA-insulin 在不同温度下的表达结果

Fig. 2 Expression assays of His-NusA-insulin protein at different temperature

### 2.2.2 IPTG 诱导浓度的优化

重组蛋白 His-NusA-insulin 在 37 °C 条件下表达, 大部分蛋白存在于上清液中, 但也有部分以包涵体形式存在, 因此尝试降低 IPTG 的浓度, 使重组蛋白缓慢表达, 以增加蛋白的溶解性. 重组蛋白 His-NusA-insulin 在不同 IPTG 浓度下的表达情况如图 3

所示. IPTG 浓度为 0.02 mmol/L 时, His-NusA-insulin 蛋白诱导表达量较低; 而 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L 时, His-NusA-insulin 蛋白诱导表达量较高并且基本相同. 因此, 后续实验采用 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 进行重组蛋白诱导表达。



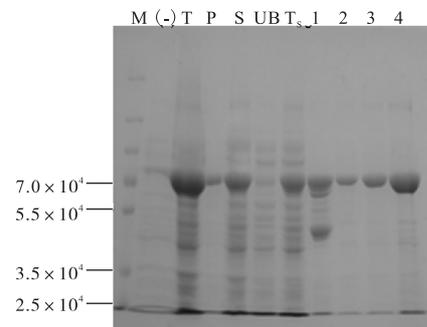
M. protein marker; (-). 未加入 IPTG 诱导; T. 全菌体破碎; P. 破碎后的沉淀; S. 破碎后的上清液

图3 重组蛋白 His-NusA-insulin 在不同 IPTG 浓度下的表达情况

Fig. 3 Expression assays of His-NusA-insulin protein with different concentration of IPTG

## 2.3 重组蛋白 His-NusA-insulin 的纯化

利用 AKTA 蛋白纯化系统进行 His-NusA-insulin 蛋白的纯化, 采用不同浓度咪唑进行梯度洗脱, 结果如图 4 所示. 在咪唑浓度为 500 mmol/L 时收集得到纯度较高的 His-NusA-insulin 蛋白. 利用 Bradford 法测定蛋白含量, 绘制标准曲线, 根据得到的回归方程  $y = 0.0756x + 0.6208 (R^2 = 0.9949)$ , 计算纯化后 His-NusA-insulin 蛋白的质量浓度为  $1.059 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 用于后续实验。



M. protein marker; (-). 未加入 IPTG 诱导; T. 全菌体破碎; P. 破碎后的沉淀; S. 破碎后的上清液; UB. 未结合 Ni 柱的流穿液; T<sub>5</sub>. 纯化前的上清液; 1. 50 mmol/L 咪唑洗脱液; 2. 100 mmol/L 咪唑洗脱液; 3. 150 mmol/L 咪唑洗脱液; 4. 500 mmol/L 咪唑洗脱液

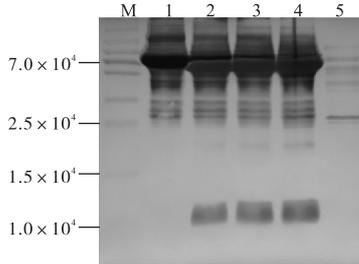
图4 重组蛋白 His-NusA-insulin 的纯化

Fig. 4 Purification of His-NusA-insulin

## 2.4 TEV 蛋白酶酶切重组蛋白 His-NusA-insulin 的检测

### 2.4.1 TEV 蛋白酶酶切检测

利用 TEV 蛋白酶酶切 His-NusA-insulin 蛋白, 结果如图 5 所示. 随着 TEV 蛋白酶添加量的增加, His-NusA-insulin 蛋白被有效酶切, 在  $1 \times 10^4$  大小检测到蛋白条带. 其中, 30  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 0.66  $\mu\text{g}$  TEV 的酶切条件, 即重组蛋白与蛋白酶的质量比为 45 : 1 时, 酶切所产生的重组胰岛素原量较高, 并且杂蛋白较少, 为较适合的酶切反应条件.



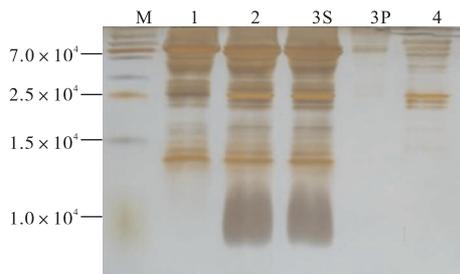
M. protein marker; 1. 30  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin; 2. 30  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 0.66  $\mu\text{g}$  TEV; 3. 30  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 1.3  $\mu\text{g}$  TEV; 4. 30  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 2.6  $\mu\text{g}$  TEV; 5. 2.6  $\mu\text{g}$  TEV

图 5 重组蛋白 His-NusA-insulin TEV 蛋白酶酶切检测

Fig. 5 Detection of His-NusA-insulin protein digested by TEV protease

### 2.4.2 酶切蛋白溶解性检测

重组蛋白 His-NusA-insulin 酶切蛋白溶解性结果如图 6 所示, 酶切所产生的重组胰岛素原溶解性较好, 可以用于后续重组胰岛素的制备.



M. protein marker; 1. 15  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin; 2. 15  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 0.33  $\mu\text{g}$  TEV; 3S. 15  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 0.33  $\mu\text{g}$  TEV, 上清液; 3P. 15  $\mu\text{g}$  His-NusA-insulin 加入 0.33  $\mu\text{g}$  TEV, 沉淀; 4. 0.33  $\mu\text{g}$  TEV

图 6 重组蛋白 His-NusA-insulin 酶切蛋白溶解性检测

Fig. 6 Detection of the solubility of TEV protease digested by His-NusA-insulin protein

## 3 讨论

胰岛素具有促进脂肪、糖原、蛋白质合成, 降低

血糖的作用, 是用于治疗糖尿病的主要药品之一. 目前利用大肠杆菌表达生产重组胰岛素的过程中, 表达产物常会以包涵体的形式出现, 要得到具有活性的胰岛素涉及到蛋白变性和复性过程, 这会大大降低胰岛素的最终产量, 使得生产成本增加. NusA 蛋白是分子伴侣 GroEL 的必需底物, GroEL 与其共同作用因子 GroES 是大肠杆菌在生长条件下唯一的必需分子伴侣系统, NusA 融合蛋白标签系统能显著提高多种不同来源蛋白可溶性表达<sup>[14]</sup>. 利用大肠杆菌表达带有融合蛋白 NusA 标签的胰岛素原, 可以实现重组蛋白 His-NusA-insulin 的可溶性表达.

本实验室成功构建重组质粒 pHis-NusA-insulin, 通过调节诱导温度和 IPTG 浓度, 优化重组蛋白 His-NusA-insulin 的可溶性表达条件, 确定重组蛋白的最适表达条件为在 0.1 mmol/L IPTG 作用下 37  $^{\circ}\text{C}$  诱导 4 h, 通过 Ni 柱亲和层析纯化获得重组蛋白 His-NusA-insulin, 再经 TEV 蛋白酶酶切 His-NusA-insulin 得到可溶的人胰岛素原, 为后续制备胰岛素提供基础.

## 参考文献:

- [1] 陆菊明. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)更新要点的解读[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(10): 865-869.
- [2] Owens D R, Zinman B, Bolli G B. Insulins today and beyond[J]. Lancet, 2001, 358(9283): 739-746.
- [3] Rotella C M, Pala L, Mannucci E. Role of insulin in the type 2 diabetes therapy: Past, present and future[J]. International Journal of Endocrinology & Metabolism, 2013, 11(3): 137-144.
- [4] 叶蕴华. 浅谈胰岛素的结构与生物活性[J]. 大学化学, 2010(4): 19-23.
- [5] Kurapkat G, Wolf E D, Grotzinger J, et al. Inactive conformation of an insulin despite its wild-type sequence [J]. Protein Science, 1997, 6(3): 580-587.
- [6] Csorba T R. Proinsulin: Biosynthesis, conversion, assay methods and clinical studies[J]. Clinical Biochemistry, 1991, 24(6): 447-454.
- [7] Swartz J R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12(2): 195-201.
- [8] 王伟刚, 曹韞旭, 文良柱. 一种重组人胰岛素的制备方法: 中国, 101173006[P]. 2011-12-21.
- [9] Kim C K, Lee S B, Son Y J. Large-scale refolding and

- enzyme reaction of human preproinsulin for production of human insulin[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(10): 1742–1750.
- [10] Gary W. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2005, 67(2): 151–159.
- [11] Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, et al. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(10): 1598–1605.
- [12] 刘海峰. 重组胰岛素前体转化成人胰岛素和地特胰岛素的工艺研究[D]. 上海:华东理工大学, 2014.
- [13] 甘淋, 李娟, 何涛, 等. 几种蛋白质含量测定方法的比较研究[J]. *泸州医学院学报*, 2004, 27(6): 500–502.
- [14] Wu S, Zhu Y, Chen S, et al. Progress in fusion tags and its applications in protein soluble expression[J]. *Chemical Industry & Engineering Progress*, 2014, 33(4): 993–998.

责任编辑: 郎婧

(上接第20页)

- [6] Wang J, Huang J, Shi J M, et al. Fermentation characterization of an *L*-tryptophan producing *Escherichia coli* strain with inactivated phosphotransacetylase[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1219–1224.
- [7] 周丽, 田康明, 左志锐, 等. 大肠杆菌琥珀酸和乙酸合成途径的删除及其重组菌株的 *D*-乳酸发酵[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 31–40.
- [8] Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, et al. Cloning, characterization and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(10): 2878–2886.
- [9] 黄静, 史建明, 刘倩, 等. *pta* 基因敲除对 *L*-色氨酸发酵的影响[J]. *微生物学报*, 2011, 51(4): 480–487.
- [10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [11] Zhao C G, Cheng L K, Wang J, et al. Impact of deletion of the genes encoding acetate kinase on production of *L*-tryptophan by *Escherichia coli*[J]. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(1): 261–269.
- [12] Castaño-Cerezo S, Pastor J M, Renilla S, et al. An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(1): 1–19.
- [13] Dodge T C, Gerstner J M. Optimization of the glucose feed rate profile for the production of tryptophan from recombinant *E. coli*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002, 77(11): 1238–1245.

责任编辑: 郎婧