

# 用胰酶转肽的方法使人胰岛素原转成人胰岛素

唐建国

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

在猪胰岛素胰酶转肽成人胰岛素的相似条件下, 基因工程生产的人胰岛素原可以50%的产率转成人胰岛素, 所得人胰岛素的氨基酸组成与理论值相符, 并具有天然活力。

**关键词** 人胰岛素原; 人胰岛素; 胰酶转肽

猪胰岛素与人胰岛素在一级结构上非常相似, 仅B链羧端最后一个氨基酸不同, 猪胰岛素为B 30 Ala, 而人胰岛素为Thr。由于猪胰岛素分子中只有B链有两个碱性氨基酸B 22 Arg及B 29 Lys, 通过胰酶水解, 可得去8肽的胰岛素及去B 30的胰岛素, 再通过胰酶合成肽键, 分别接上一个8肽和1个Thr, 都可得到人胰岛素<sup>[1,2]</sup>。八十年代初, 几家实验室又报道了猪胰岛素直接经胰酶转肽成人胰岛素的方法<sup>[3,4]</sup>, 此法较易控制, 成本低廉, 所得产品已投放市场。这种方法同样也适用于将基因工程的人胰岛素前体加工成人胰岛素<sup>[5]</sup>。

对于人胰岛素的基因工程生产, 直接表达出其前体的方法较为简单, 为国际上普遍使用。将人胰岛素原前体加工成人胰岛素的方法, 大致有两种。Kemmer等<sup>[6]</sup>在70年代初就创立了一个在基础理论上可行的方法, 即在特殊的条件下用胰酶切割胰岛素原, 得到B链31位多一个Arg的胰岛素, 再通过羧肽酶B的帮助, 切去B 31 Arg而得胰岛素。由于此法较为苛刻, 胰岛素中的B 22 Arg, B 29 Lys易被切开, 且羧肽酶B来源不易, 故此法应用价值不大。而胰酶转肽的方法则为人们接受。前文已报道了基因工程人胰岛素

原纯品的生产<sup>[7]</sup>, 在将猪胰岛素胰酶转肽成人胰岛素的相同的条件下, 本文报道将人胰岛素原转成人胰岛素, 并报道其理化性质和生物学性质。

## 材料与 方法

### (一) 材料

胰酶为Sigma产品, I型, 来自牛胰脏, 比活10000u/mg蛋白; L-Thr购自华美生物工程公司; 猪胰岛素为徐州生物化学制药厂产品, 比活26 u/mg蛋白; 人胎盘膜按文献[8]制备; 胰岛素放免试剂盒购自北京西苑生物技术中心。

### (二) 方法

1. L-Thr衍生物的制备: 参见黄惟德和陈常庆方法<sup>[9]</sup>。L-Thr衍生物用纸层析及硅胶薄板层析鉴定, 层析液分别为正丁醇:吡啶:乙醇:水=5:1:1:1及正己烷:正丁醇:吡啶=75:15:15, 用茚三酮显色。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 采用10%胶浓度, 浓缩胶、分离胶及电泳缓冲液的

本文于1992年1月29日收到。

作者衷心感谢顾孝诚教授、陈章良教授、潘乃璁教授对本工作的大力支持, 感谢袁洪生老师协助完成氨基酸组成分析, 感谢北京大学化学系叶蕴华教授对氨基酸衍生物合成提出的有益建议。

pH分别为6.8、8.8及8.3。

3. 转肽反应：在有机-水溶液中进行，参见文献[5]。体系中溶剂为二甲基亚砜，含21%的水，胰岛素物质浓度为9mmol/L，胰酶为0.2mmol/L，CaCl<sub>2</sub>为7mmol/L，醋酸为2mol/L，L-Thr酯约为1mol/L，反应在12℃下进行24h。人胰岛素酯用三氟乙酸处理，脱去叔丁基，即可得人胰岛素。

4. 反相高压液相色谱分析、氨基酸组成分析及受体结合分析见文献[10]，放射免疫分析参见试剂盒说明，略加修改。

## 结 果 与 讨 论

### (一) L-Thr衍生物的制备

在猪胰岛素转化人胰岛素的方法中，

人们普遍采用了两种底物，一种为L-Thr叔丁酯，另一种为叔丁基-L-Thr叔丁酯<sup>[2,3]</sup>。在我们所使用的制备方法中，得到的是这两种衍生物的混合物。图1给出了所制备的衍生物的纸层析及硅胶薄板层析分析结果，纸层析显示了所制衍生物的纯度极好，硅胶薄板层析显示所制衍生物有两个组分，*R<sub>f</sub>*值为0.8和0.5，分别为叔丁基-L-Thr叔丁酯和L-Thr叔丁酯，与文献报道相同<sup>[3]</sup>。对于另一产物，叔丁基-L-Thr，可在分离纯化的过程中除去。

### (二) 转肽产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

图2显示了猪胰岛素及人胰岛素原转肽成人胰岛素酯，及人胰岛素酯脱酯成人胰岛素的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。我们看

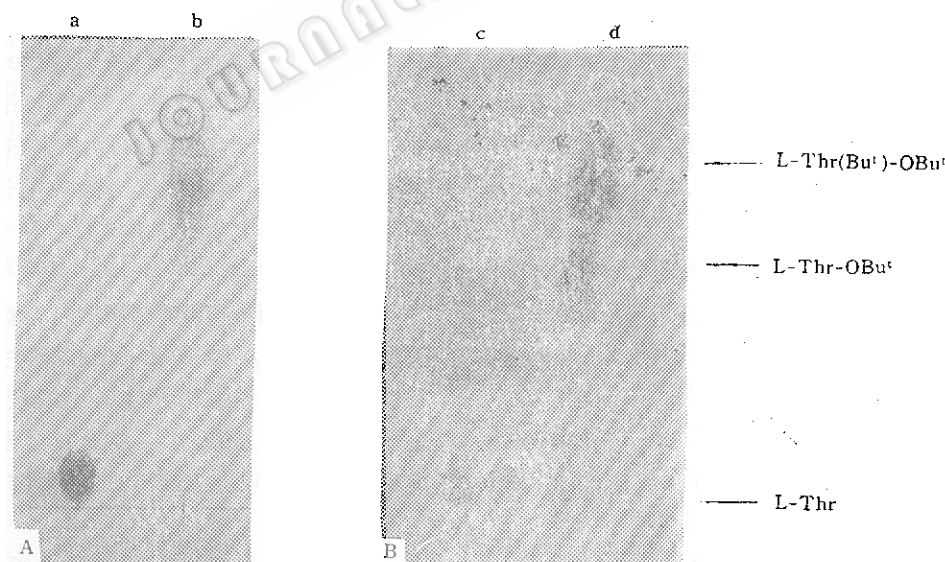


图1 L-苏氨酸衍生物的纸层析及硅胶薄板层析分析

Fig. 1 Paper and silica gel thin layer chromatography of L-threonine derivatives

(A) Paper chromatography: (a) L-Thr; (b) mixture of L-Thr-OBu<sup>t</sup> and L-Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>;  
(B) Silica gel thin layer chromatography: (c) L-Thr; (d) mixture of L-Thr-OBu<sup>t</sup> and L-Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

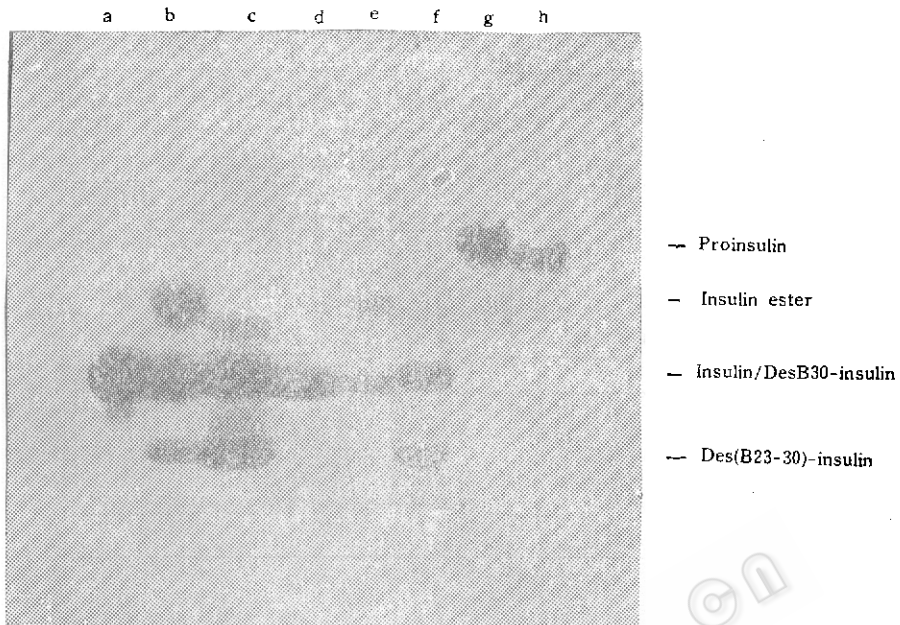


图 2 胰酶转肽结果的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig. 2 Analysis of tryptic transpeptidation of porcine insulin and human proinsulin to human insulin on PAGE

(a) Porcine insulin; (b) Human insulin esters from porcine insulin; (c) Human insulin from porcine insulin; (d) Purified human insulin from human proinsulin; (e) Human insulin esters from human proinsulin; (f) Human insulin from human proinsulin; (g) Purified human proinsulin; (h) Human proinsulin standard.

到, 无论是从猪胰岛素, 还是从人胰岛素原, 我们都能得到人胰岛素酯, 并且通过脱酯, 都能得到人胰岛素, 这些现象均与文献报道相同<sup>[2]</sup>。由于叔丁基-L-Thr 叔丁酯的人胰岛素酯所带的电荷与 L-Thr 叔丁酯的人胰岛素酯所带的电荷相同, 从聚丙烯酰胺凝胶电泳上无法分离, 两者显一条条带。

### (三) 转肽产物的反相高压液相色谱分析及分离

图 3 显示了猪胰岛素及人胰岛素原转肽生成人胰岛素酯, 以及整个混合物脱酯生成人胰岛素的反相高压液相色谱分析。其中峰 1 为去 8 肽胰岛素, 峰 2 为胰岛素 (与去 B 30 胰岛素有一定的重合), 峰 3 为 L-Thr 叔丁酯所生成的人胰岛素酯, 峰 4 为叔丁基-L-Thr 叔丁酯所生成的人胰

岛素酯, 由于叔丁基-L-Thr 叔丁酯比 L-Thr 叔丁酯更疏水, 以致在反相柱上比前者保留时间更长。这两个人胰岛素酯可经反相高压液相色谱分离, 都可分别脱酯生成人胰岛素 (结果未列出), 分离得到的人胰岛素为高压液相色谱纯。从图 3 a 中可看出, 在合适条件下猪胰岛素转成人胰岛素酯 (峰 3 及峰 4) 的产率可达 80%, 由于脱酯率可达 90% 以上, 总转肽率高达 70%。转肽反应中的副产物: 去 8 肽胰岛素, 去 B 30 胰岛素及可能未完全反应的猪胰岛素可通过反相高压液相色谱很好地与人胰岛素分离。从图 3 c 中还可看出, 人胰岛素原转成人胰岛素酯 (峰 3 及峰 4) 的产率达 60%, 总产率可达 50%, 峰 4 后面的峰较图 3 a 中的大, 可能为双分子产物。图 3 b、d 中在峰 1 前都有一个大峰, 为脱酯

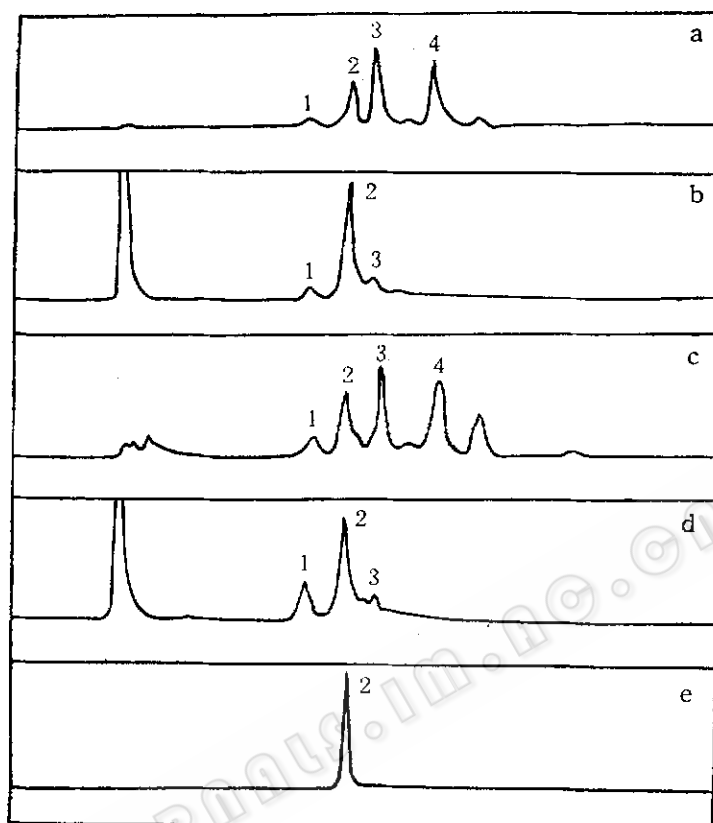


图 3 胰酶转肽结果的反相高压液相色谱分析

Fig. 3 HPLC analysis of tryptic transpeptidation products of porcine insulin and human proinsulin to human insulin

(a) Shows the formation of human insulin esters from porcine insulin; (b) Formation of human insulin from products of (a); (c) Human insulin esters from human proinsulin; (d) Human insulin from products of (c); (e) Purified human insulin.

后的溶剂峰。

在转肽反应中, 转肽产率是较高的, 但若条件控制不好, 往往也会有较多的副产物。实验中我们选择了在低水浓度的有机相内进行酶促反应, 并且反应体系的 pH 为弱酸性, 这不仅利于转肽反应, 而且阻止了弱碱性条件下胰酶的水解活性。在严格控制下, 可以大大降低去 8 肽胰岛素的生成, 这种可控机制主要可能是由于 B 22Arg 上的胍基能与 A 21 Asn 上的羧基形成一对离子键, 其稳定性能影响胰酶

的水解。

#### (四) 基因工程人胰岛素产品的氨基酸组成分析及生物活性测定

对于高压液相色谱纯的人胰岛素基因工程产品, 我们进行了氨基酸组成分析, 其结果见表 1, 测得的值与理论值相符。图 4 及图 5 显示了基因工程人胰岛素产品的受体结合及放射免疫活性分析, 所得的人胰岛素具有天然活性。我们选择了猪胰岛素为标准, 因它和人胰岛素的生物活性是相同的。

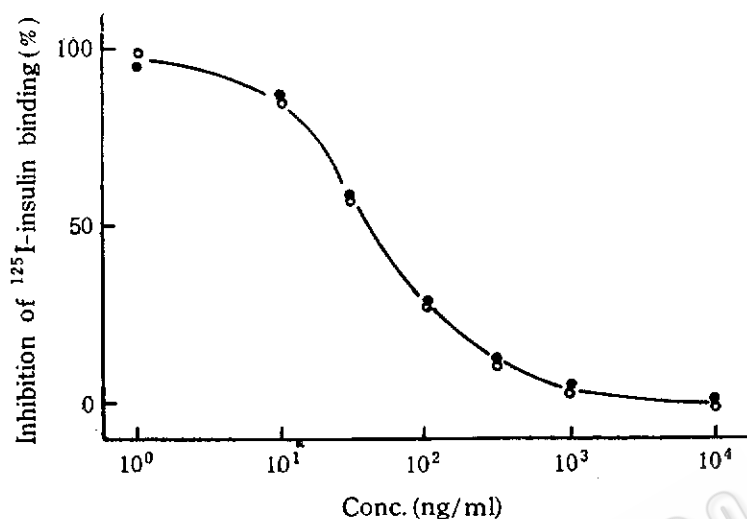


图 4 基因工程人胰岛素的受体结合活性分析

Fig. 4 Receptor binding assay of recombinant human insulin

○ Porcine insulin; ● Recombinant human insulin

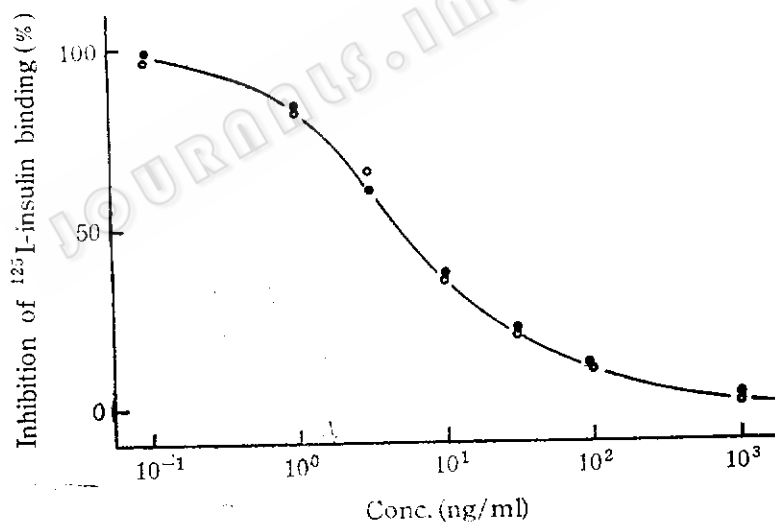


图 5 基因工程人胰岛素的放射免疫活性分析

Fig. 5 Radioimmuno assay of recombinant human insulin

○ Porcine insulin; ● Recombinant human insulin

表 1 基因工程人胰岛素的氨基酸组成分析

Table 1. Amino acid composition analysis of the human insulin produced by recombinant DNA technique

	Expected	Found
Asp	3	2.8
Thr	3	2.9
Ser	3	3.1

续表 1

Glu	7	7.3
Pro	1	1.1
Gly	4	4.0
Ala	1	1.3
Val	4	3.5
Ile	2	1.8
Leu	6	6.6
Tyr	4	4.1
Phe	3	2.9
Lys	1	1.1
His	2	2.0
Arg	1	1.1

## 参 考 文 献

- [1] Inouye, K. et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 101:751—752, 1979.  
 [2] Morihara, K. et al., *Nature*, 280:412—413, 1979.  
 [3] Jonzyk, A. and Gattner, H. G., *Hoppe Seyler's Z Physiol. chem.* 362:1591—1598, 1981.  
 [4] Markussen, J. and Schaumburg, K., in *Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, 387—394, 1982.  
 [5] Markussen, J. et al., in *Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, pp. 189—194, 1986.  
 [6] Kemmer, W. et al., *J. Biol. Chem.*, 246:6788—6791, 1971.  
 [7] 唐建国等. 生物工程学报, 9(2):101—106, 1993.  
 [8] Fujita-Yamaguchi, Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 258:5045—5049, 1983.  
 [9] 黄惟德, 陈常庆, 多肽合成, 科学出版社, 1985.  
 [10] Tang, J. G. et al., *Biochem. J.*, 255:451—455, 1988.

## Transformation of Human Proinsulin to Insulin by Trypsin Catalyzed Transpeptidation

Tang Jianguo

(National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,  
Peking University, Beijing 100871)

Human insulin was obtained from the recombinant human proinsulin by trypsin catalyzed transpeptidation under the same condition for the transformation of porcine insulin to human insulin with the yield of up to 50%. The recombinant human insulin had the expected amino acid composition and it also showed native biological activities as shown by receptor binding assay and radioimmuno assay.

**Key words** Human proinsulin, human insulin, trypsin catalyzed transpeptidation