

Exendin-4 类似物的克隆、表达与体内生物活性检测

李泰明, 谷春娇, 葛晓宇, 李哲哲, 王丹, 马艳红, 刘涛, 张美由, 李丽, 刘景晶

中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

李泰明, 谷春娇, 葛晓宇, 等. Exendin-4 类似物的克隆、表达与体内生物活性检测. 生物工程学报, 2012, 28(7): 877-886.
Li TM, Gu CJ, Ge XY, et al. Cloning, expressing of Exendin-4 analogue and bioactivity analysis *in vivo*. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 877-886.

摘要: 为研究 Exendin-4 类似物的克隆, 融合表达及在体内的生物活性, 在 pED 载体融合伴侣序列中插入利于下游分离纯化的序列成为 5# 载体, 将 Exendin-4 类似物基因与 5# 载体中的融合伴侣基因通过酸水解位点连接, 转化至 *E. coli* BL21 中并诱导表达融合蛋白, 酸水解将目的肽与融合伴侣分开后, 经阴离子交换树脂分离得到目的肽。6 周~8 周正常雄性 ICR 小鼠皮下注射 Exendin-4 类似物后, 口服糖耐量实验检测在不同时间段小鼠血液中葡萄糖及胰岛素含量的变化。结果表明: 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 40%, Exendin-4 类似物纯度达 91.8%。Exendin-4 类似物的活性与对照组相比, 具有显著的降低血糖和显著促进胰岛素分泌的活性 ($P < 0.01$)。

关键词: Exendin-4 类似物, 生物活性, 血糖, 胰岛素

Cloning, expressing of Exendin-4 analogue and bioactivity analysis *in vivo*

Taiming Li, Chunjiao Gu, Xiaoyu Ge, Zhezhe Li, Dan Wang, Yanhong Ma, Tao Liu, Meiyu Zhang, Li Li, and Jingjing Liu

State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: To construct, express and purify Exendin-4 analogue and detect its biological activity *in vivo*. Insert gene sequence

Received: December 27, 2011; **Accepted:** April 20, 2012

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA217031-2), National Natural Science Foundation (No. 30270298), Jiangsu Municipal Natural Science Foundation (Nos. BK95092309, BG2001011), National Found for Fostering Talents of Basic Science (NFFTBS) (No. J0630858).

Corresponding author: Taiming Li. Tel: +86-25-83271346; E-mail: taimingli@163.com

Chunjiao Gu. Tel: +86-25-83271346; E-mail: guchunjiao@126.com

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2202AA217031-2), 国家自然科学基金 (No. 30270298), 江苏省自然科学基金 (Nos. BK95092309, BG2001011), 国家基础科学人才培养基金 (No. J0630858) 资助。

into fusion partner of pED plasmid which is helped to purification, entitled the new recombinant plasmid 5 #Exendin-4 analogue polypeptide gene and fusion partner gene was linked by acid hydrolysis gene, transformed to *E. coli* BL21 and the fusion protein was induced by lactose. after acid hydrolysis, the Exendin-4 analogue polypeptide separated from fusion chaperon. Anion charge chromatography were used to further purification. 6 to 8 week-old ICR mice were injected(s.c) with Exendin-4 analogue, blood glucose and plasma insulin level was detected in different period after oral glucose tolerance test. The results show that high expression of inclusion body was induced by lactose, which accounted for 40% of germ proteins, the Exendin-4 analogue was obtained with the purity of 91.8% after being purified by anion charge chromatography. Bioactivity assay showed that the level of blood glucose of mouse which treated with exendin-4 analogue was obviously decreased to normal($P<0.01$), and the level of plasma insulin was increased obviously ($P<0.01$).

Keywords: Exendin-4 analogue, bioactivity, blood glucose, plasma insulin

Exendin-4 是从希拉毒蜥唾液中分离到的一种含有 39 个氨基酸的多肽, 与人胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 有 53% 的同源性^[1]。作为 GLP-1 受体激动剂, Exendin-4 具有促进葡萄糖依赖性的胰岛素分泌^[2], 刺激胰岛 β 细胞再生^[3], 抑制餐后胰高血糖素的产生、延迟胃排空、抑制食欲等作用^[4-5], 并且其半衰期远远长于 GLP-1^[6]。Exendin-4 的这些生理功能使其在 2 型糖尿病的治疗中显示了广阔的前景。

化学合成的 Exendin-4 的酰胺化修饰类似物已于 2005 年在美国 FDA 批准上市 (商品名 Byta)^[7], 但化学合成的 Exendin-4 类似物存在成本较高, 价格昂贵, 步骤多, 收率低, 过程涉及有害化学物质等缺点^[8]。现有的基因工程方法合成的 Exendin-4 常出现表达量较低的情况^[9-11], 一方面可能是由于天然 Exendin-4 C 端 36-39 位氨基酸存在 PPPS 的刚性结构, 有研究表明^[12-13], Exendin-4 C 端的 31-39 位氨基酸形成的色氨酸笼子在与 GLP-1 受体的结合方面作用很小, 截去了 PPPS 对活性影响不大, 所以本实验优选了截短型的 Exendin-4^[14], 并在截短型的 Exendin-4 的 N 端添加 2 个脯氨酸与融合伴侣 C 端的天冬

氨酸形成酸水解位点; 另一方面是由于小分子多肽在大肠杆菌表达系统中容易降解^[15], 本实验室将 Exendin-4 类似物与一含有 132 个氨基酸的融合伴侣通过酸水解位点连接, 在大肠杆菌中实现了融合蛋白的高表达, 不需要使用较为昂贵的肠激酶等^[16-17], 在盐酸作用下即可将融合伴侣与目的肽分离, 根据目的肽与融合伴侣等电点的差异, 通过离子交换层析分离得到 Exendin-4 类似物, 获得的目的肽中不含有二硫键, 通过 <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py> 网站在线预测其二级结构为线性, 与 Exendin-4 的二级结构相似, 包涵体经处理后不需要复性等步骤, 分离纯化方法简便。健康雄性 ICR 小鼠口服糖耐量实验初步验证 Exendin-4 类似物的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

分子克隆工具酶及 T4 DNA 连接酶 (Fermentas 公司); 质粒抽提试剂盒 (南京天为生物科技有限公司); PCR 胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司); 分子量截留量 2 000 Da 的透析袋、考马

斯亮蓝蛋白测定试剂盒(上海生工生物工程有限公司); 引物合成 (GeneScript Corporation 公司); DNA 测序 (南京金思瑞生物技术有限公司); Sephadex A-50 阴离子交换树脂 (GE health); GLP-1 标准品为中国药科大学药化实验室赠与; 胰岛素注射液 (40 U/mL) 购自江苏万邦公司; 血糖测试仪和血糖试纸 (北京怡成生物电子技术有限公司); 小鼠胰岛素测定试剂盒 (瑞典 Mercodia 公司); 其余试剂均属国产分析纯。

1.1.2 质粒、菌株与动物

重组质粒 pED^[18]及重组质粒 5# 由本实验室构建保存, 菌株 *E. coli* BL21 由本实验室保存。清洁级 6~8 周龄, 雄性 ICR 小鼠购自扬州大学实验动物中心 [合格证号: SCXK(苏)2007-0001]。

1.2 方法

1.2.1 Exendin-4 类似物基因的克隆

构建过程见图 1, 构建所需引物见表 1。PCR 反应以 pED 质粒中的 Pro-Pro-Exendin-4-Asp 基因为模板, M1 及 M2 分别为上下游引物, 反应参数为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C, 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收。

1.2.2 融合伴侣基因的改造

根据 铰链区 (-CPPCPAP-) 和 八肽 (-KRKRKKS-) 的氨基酸序列, 选用大肠杆菌偏爱密码子转化成核苷酸序列, 插入 pED 载体融合伴侣 C-端的苏氨酸的核苷酸序列之后, 并在融合伴侣 5'端增设 *Nco* I 酶切位点, 3'端增设 *Bam*H I 酶切位点, 在计算机辅助分析后, PCR 反应以 pED 质粒中融合伴侣基因为模板, P1 及 P2 分别为上下游引物, 反应参数为: 94 °C 5 min;

94 °C 0.5 min, 55 °C 0.5 min, 72 °C 1 min, 28 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳后回收纯化。

PCR 产物经 *Nco* I、*Bam*H I 37 °C 双酶切 2 h, 纯化酶切产物 I。pED 质粒经 *Nco* I、*Bam*H I 于 37 °C 双酶切 2 h, 纯化酶切产物 II。T4 DNA 连接酶 16 °C 连接酶切产物 I、II。将连接产物转化 *E. coli* BL21 感受态细胞后涂布于含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养, 挑取阳性单克隆进行菌落 PCR 鉴定后测序, 将测序正确的重组的 pED 质粒命名为 5# 质粒。

1.2.3 Exendin-4 类似物基因表达载体的构建

Exendin-4 类似物基因的 PCR 产物经 *Bam*H I、*Hind* III 37 °C 双酶切 2 h, 纯化酶切产物 I。5# 质粒经 *Bam*H I、*Hind* III 37 °C 双酶

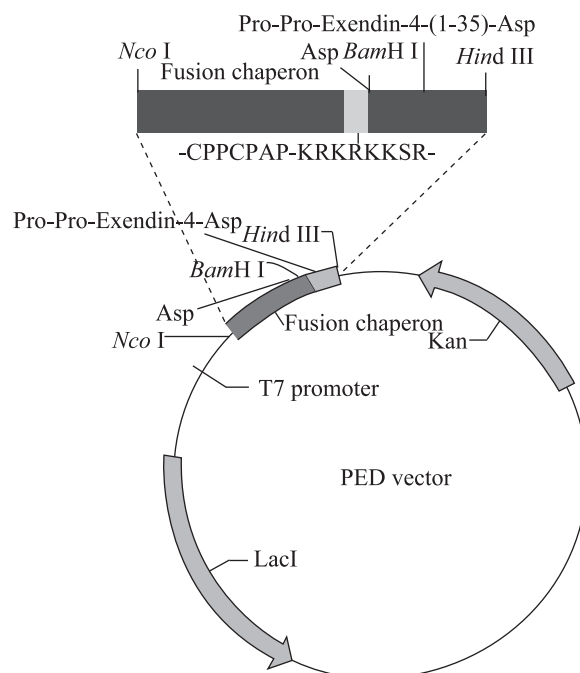


图 1 5#重组质粒构建过程示意图

Fig. 1 Construction of 5# recombinant plasmid.

表 1 引物 DNA 序列

Table 1 DNA sequence of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
M1	AAAGGATCC GCCGCATGGCGAAGGC	<i>Bam</i> H I
M2	AAAAAGCTT AATCTGCACCAGAAGACGGACCAC	<i>Hind</i> III
P1	ACTTTAAGAAGGAGATATACCA	
P2	TTCGGATCC GCACGGCTTTTTTTACGTTTACGTTT CGGTGCAGGGCACGGCGGGC	<i>Bam</i> H I

The bold sequences indicate restriction enzyme sites.

切 2 h, 纯化酶切产物 II。T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接酶切产物 I、II。将连接产物转化 *E. coli* BL21 感受态细胞后涂布于含 100 µg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养, 挑取阳性单克隆进行菌落 PCR 鉴定后测序。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达及分离纯化

测序正确后, 在摇瓶实验的基础上采用优化后的培养条件, 以 1% 接种量在 LB 培养基中 37 °C、220 r/min 振荡培养 8~10 h 后, 5% 的接种量转接于 6.5 L 玉米浆发酵液中, 添加 1% 色拉油作为消泡剂, 搅拌转速为 560 r/min, 上罐后 3.5 h 后 OD_{600} 达到 1.4, 加入终浓度为 5 mmol/L 的乳糖诱导, 8 h 后收集发酵液, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达情况。

分离纯化过程与文献[19]相似。将收集到的菌体按 4 mL/g 的体积加入菌体裂解缓冲液 (0.02% 溶菌酶, 0.75% TritonX-100, 50 mmol/L Tris-HCL, 1 mmol/L EDTA) 37 °C、220 r/min 振荡培养, 裂解至溶液不粘滞时, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。每克裂解后的菌体沉淀加入 10 mL 包涵体洗涤液 1 (0.2% TritonX-100, 50 mmol/L Tris-HCL), 将包涵体悬浮于洗涤液 1 中剧烈振荡 2 h 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min

收集沉淀。将沉淀加入适量蒸馏水中重悬洗涤, 洗涤后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。得到的包涵体在包涵体洗涤液 2 (2 mol/L 尿素, 10% TritonX-100) 中洗涤 2 次, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集洗涤后的包涵体。每克包涵体加入 8 mL 包涵体溶解液 (8 mol/L 尿素, 50 µmol/L Tris-HCL), 混匀, 4 °C 搅拌过夜, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。将得到的上清进行乙醇分级沉淀, 首先加入 0.5 倍体积的 -20 °C 预冷的无水乙醇, 边加边轻轻搅拌以沉淀杂蛋白, -20 °C 放置 20 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。在离心后上清中加入 1 倍体积的预冷的无水乙醇沉淀融合蛋白, -20 °C 放置 20 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。向离心后上清中加入 3 倍体积的预冷的无水乙醇沉淀融合蛋白, -20 °C 放置 2 h, 12 000 r/min 离心 20 min 后收集沉淀, 得到融合蛋白。

1.2.5 融合蛋白的酸水解

融合蛋白中加入 50 mmol/L 盐酸溶液 (融合蛋白含量为 5%), 置于 48 °C 水浴锅水解 48 h, 将酸水解后的溶液 pH 分别调至 7.6、9.3, 进行等电点沉淀, 4 °C 放置 2 h 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 离心, 去除沉淀中的杂蛋白, 得到目的肽含量丰富的上清。

1.2.6 Exendin-4 类似物的分离纯化

将等电点沉淀离心后的上清液在 0.02 mol/L 乙酸铵 (pH 5.6) 中透析 48 h, 上样于 0.02 mol/L 乙酸铵(pH 5.6) 平衡好的 QAE Sephadex A-50 离子交换柱, 使用含 0.05、0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl 的乙酸铵 (pH 5.6) 溶液进行阶段洗脱, 280 nm 波长处检测吸收。收集样品, Tris-Tricine-PAGE 电泳分析蛋白纯度, 透析除盐并冻干。送至中国药科大学分析测试中心进行电喷雾质谱 (ESI-MS) 测定 Exendin-4 类似物相对分子质量。

1.2.7 Exendin-4 类似物的体内生物活性测定

清洁级 6~8 周龄的健康雄性 ICR 小鼠, 每笼 7 只, 自由饮水摄食, 适应环境 1 周后随机分 8 组, 分别为空白对照组, 胰岛素组, GLP-1 低剂量给药组, GLP-1 中剂量给药组, GLP-1 高剂量给药组, Exendin-4 低剂量给药组, Exendin-4 中剂量给药组, Exendin-4 高剂量给药组, 每组 7 只, 称重并编号, 实验前禁食 12 h, 仅给予饮水。胰岛素组皮下注射给予 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 胰岛素, GLP-1 低、中、高剂量给药组及 Exendin-4 类似物低、中、高剂量给药组分别皮下注射给予 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样品 (上述样品均溶于 pH 7.0 的灭菌磷酸盐缓冲液后经 0.22 μm 滤膜过滤除菌); 空白对照组小鼠皮下给予等量磷酸盐缓冲液。各组小鼠分别于给药后 15 min, 灌胃 2.0 g/kg 葡萄糖, 并于葡萄糖负荷后 0、10、20、40、60、80、100、120 min 对小鼠进行尾静脉取血, 血糖仪测定血糖。给予葡萄糖 10~20 min 后断尾取血 100 μL 于含 20 μL 、0.1 mol/L EDTA 的灭菌 EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 30 s, 取上清, 小鼠胰岛素含量测定试剂盒检测小鼠血浆

中胰岛素含量, 所有实验数据均以平均数 \pm 标准差表示, 采用 t 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 Exendin-4 类似物基因表达载体的构建

PCR 扩增产物经电泳后在约 131 bp 处有明亮条带, 与已知 Exendin-4 类似物基因大小 (131 bp) 相吻合, 见图 2。成功将 pED 质粒的融合伴侣改造为 5# 质粒具有的融合伴侣, 以重组 5# 质粒为模板, M3、M2 分别为上下游引物进行融合蛋白基因的 PCR 扩增, PCR 产物在约 531 bp 出现条带 (图 3), 与预期结果相符。测序结果表明, Exendin-4 类似物基因成功插入 5# 载体的 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点之间, 序列比对后与预期结果完全一致。

2.2 融合蛋白的表达及 Exendin-4 类似物的纯化

乳糖诱导表达的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析, 融合蛋白以包涵体形式存在。与未经乳

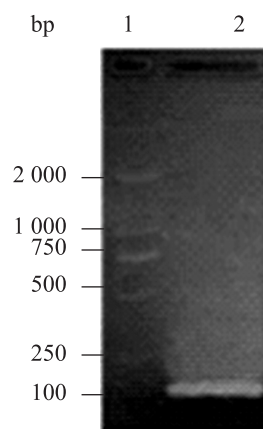


图 2 Exendin-4 类似物基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Application results of Exendin-4 analogue gene by PCR. 1: DNA molecular marker; 2: product of PCR.

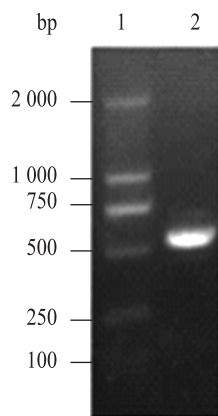


图3 重组质粒的PCR验证

Fig. 3 PCR identification of recombinant plasmid. 1: DNA molecular marker; 2: product of recombinant plasmid.

糖诱导组相比,在相对分子量约 22.11 kDa 处可见融合蛋白的表达条带,大小与预期相符,经过 BandScan 软件分析,表达量约占菌体总蛋白的 40% (图 4)。离子交换层析分离 Exendin-4 类似物过程中,0.3 mol/L NaCl 洗脱时可以收集到样品峰,经 Tris-Tricine-PAGE 电泳后,BandScan 软件分析目的肽的纯度为 91.8% (图 5),透析并冻干,于-20℃保存。电喷雾质谱给出的一组峰分子量都相差 22,是加了不同个数的钠离子峰。如: m/z 4139 是 $[M+Na]^+$, m/z 4161 是 $[M+2Na-H]^+$, m/z 4183 是 $[M+3Na-2H]^+$ 等等,由此分析出目的肽相对分子质量为 4 116.4 Da,与理论推算值 4 115.95 Da 基本一致 (图 6)。

2.3 Exendin-4 类似物的降血糖活性检测

结果见表 2。Exendin-4 各组给药后,给予 2.0 g/kg 葡萄糖,在葡萄糖负荷后,Exendin-4 各剂量组随着剂量的增加,存在剂量依赖关系。Exendin-4 各剂量组与空白对照组相比能够显著

降低血糖浓度 ($P<0.01$),与 GLP-1 各剂量组相比降糖作用较为显著 ($P<0.01$),与胰岛素组相比并未引起低血糖效应。

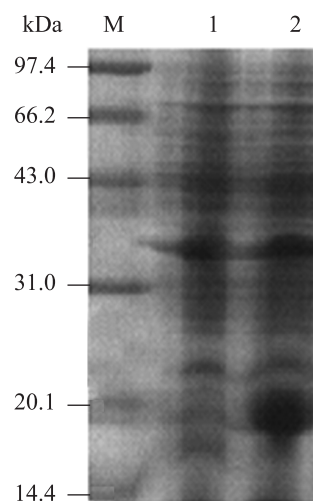


图4 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白表达情况

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of fusion protein. M: protein molecular marker; 1: non-inducing expression of fusion protein; 2: lactose-induced expression of fusion protein.

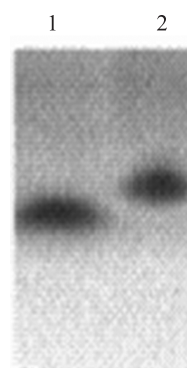


图5 Tris-Tricine-PAGE 电泳检测 Exendin-4 类似物纯度

Fig. 5 The purity analysis of Exendin-4 analogue by Tris-Tricine-PAGE. 1: Exendin-4 analogue; 2: insulin.

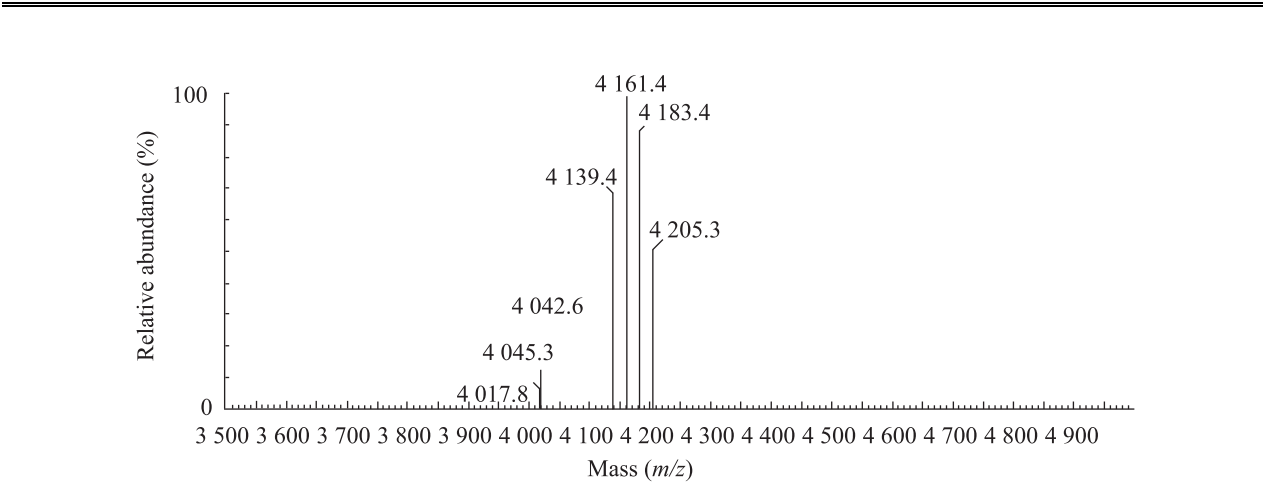


图 6 Exendin-4 类似物的电喷雾质谱分析
Fig. 6 ESI-MS analysis of Exendin-4 analogue.

表 2 Exendin-4 类似物的降血糖活性 (与空白对照组比较 **P*<0.05,***P*<0.01; 与 GLP-1 组比较 #*P*<0.05, ##*P*<0.01)

Table 2 The activity of Exendin-4 analogue in decrease hypoglycaemia (Compare with control **P*<0.05, ***P*<0.01; compare with GLP-1 #*P*<0.05, ##*P*<0.01)

Time (min)	Blood glucose level (mmol/L)							
	Control	Insulin (20 μg/kg)	GLP-1 (20 μg/kg)	GLP-1 (80 μg/kg)	GLP-1 (140 μg/kg)	Exendin-4 analogue (20 μg/kg)	Exendin-4 analogue (80 μg/kg)	Exendin-4 analogue (140 μg/kg)
0	3.67±0.74	3.59±0.70	4.09±0.45	3.96±0.73	4.01±0.59	4.00±0.70	3.74±0.85	4.19±0.69
10	19.17±1.49	9.46±2.49	18.46±1.19	17.86±1.05	15.87±1.78*	18.89±1.22	16.46±0.54**#	10.74±1.28***
20	16.69±3.33	3.36±0.86	10.84±1.02	14.66±1.17	13.24±1.57	10.84±2.34*##	10.10±1.25**	7.44±0.98**#
40	12.37±1.61	2.53±0.68	5.74±1.25**	8.54±1.19**	9.06±2.01**	9.04±0.99##	9.27±2.46**	6.43±0.65**
60	10.04±1.97	3.34±1.65	5.49±1.99**	6.97±2.27	7.20±1.26*	6.21±1.29**	7.37±0.80**	7.29±0.99
80	8.61±0.97	3.17±1.37	5.54±1.55**	5.97±1.22**	6.03±0.82**	6.11±1.41**	6.36±0.61**	6.00±1.35**
100	8.14±0.76	2.46±0.68	7.57±2.40	6.54±0.98*	5.13±1.15**	5.66±0.89**	5.81±0.32**#	4.96±1.35**#
120	7.70±0.53	2.71±0.67	6.39±1.55*	5.54±0.61**	4.83±0.67**	5.19±0.68**	5.13±0.56**	4.76±0.52**#

2.4 Exendin-4 类似物的促进胰岛素分泌活性检测

从图 7 可以看出, Exendin-4 各给药组小鼠在葡萄糖负荷后, 其血清胰岛素水平均有升高趋势, 并呈剂量依赖性, 与空白组相比,

Exendin-4 类似物的低、中、高剂量均能显著升高血浆胰岛素浓度 (*P*<0.01); Exendin-4 类似物的低、中、高剂量组与 GLP-1 各剂量组相比亦能显著性地升高血浆胰岛素浓度 (*P*<0.01)。

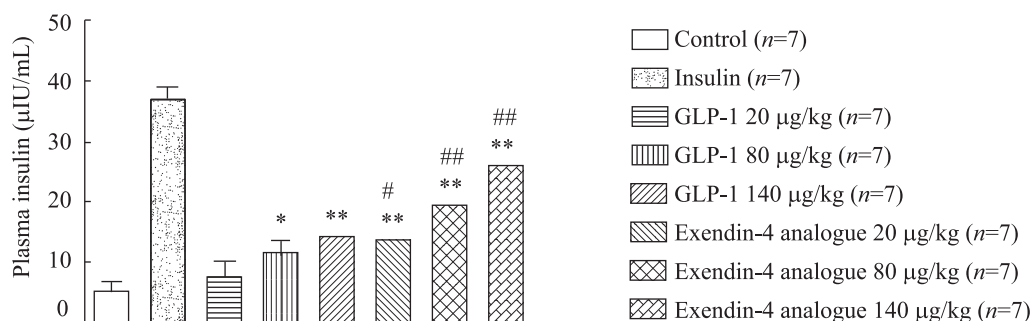


图7 Exendin-4 类似物对血液胰岛素浓度影响 (与空白对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 GLP-1 组比较# $P<0.05$, ## $P<0.01$)

Fig. 7 The activity of Exendin-4 analogue in plasma insulin. Compare with control * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compare with GLP-1 # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

3 讨论

目前通过基因工程方法获得 Exendin-4 及其类似物的表达系统共有两类:一类是真核表达系统,如张红绪等^[20]报道了 Exendin-4 基因在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达,表达量较低;王晖等^[21]同样在巴斯德毕赤酵母中实现了 Exendin-4 类似物基因串联体的分泌表达,表达量较高,但出现了前导序列切割不完全的情况,由于是以肠激酶识别序列连接 Exendin-4 类似物的串联体,重组蛋白在纯化过程中产生严重降解,即使经离子交换和亲和层析,仍不能去除可能存在的蛋白酶,抑制目的蛋白的降解。另一类是大肠杆菌表达系统,有文献^[22]在大肠杆菌中成功分泌表达 Exendin-4,表达量较低,为了便于后续分离纯化,其将组氨酸标签与目的肽相连而无法除去,这在一定程度上影响了 Exendin-4 的活性;本研究中所采用的是大肠杆菌表达系统,融合蛋白以包涵体的形式表达,避免了分泌表达造成的信号肽切割不完全,表达量较低,目的蛋白以肠激酶切割容易降解等缺点,融合蛋白酸水解后在

Exendin-4 类似物 N 端残留的脯氨酸在进入体内后,被体内的二肽基肽酶 (DPPIV) 水解,不会影响活性;此外, Exendin-4 类似物为线性肽,不需要复性等繁琐步骤。

前人曾利用 pED 载体表达 Exendin-4 类似物,表达量不高,形成的包涵体结构松散,融合伴侣与目的肽等电点相近,酸水解过程中产生与目的肽分子量相近的杂多肽无法利用等电点沉淀除去,利用分子筛层析无法将目的肽有效分离。本研究 pED 载体融合伴侣基因区域增添了 CPPCPA 肽段及 KRKRKKS 肽段的基因,从而成为 5# 载体。CPPCPAP 肽段富含的半胱氨酸使融合蛋白之间以相互交织的二硫键相连,所形成的包涵体结构致密;KRKRKKS 肽段富含的碱性氨基酸使融合伴侣的等电点由 5.15 升为 9.30,与 Exendin-4 类似物的等电点 4.59 差距较大,便于等电点沉淀除去杂蛋白及离子交换层析分离纯化目的肽。

由实验结果可以初步判定此种 Exendin-4 类似物具有促进胰岛素的分泌及调节血糖作用,并

且这种作用是葡萄糖浓度依赖性的。本课题组计划在后续的研究中建立 2 型糖尿病动物模型, 长效实验进一步验证其是否具有促进胰岛 β 细胞增殖及降低糖化血红蛋白 (HbA1c) 水平的作用及其体内药代动力学各相关指标。

REFERENCES

- [1] Gedulin BR, Nikoulina SE, Smith PA, et al. Exenatide (Exendin-4) improves insulin sensitivity and β -Cell mass in insulin-resistant obese *fa/fa* Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 2069–2076.
- [2] Parkes DG, Pittner R, Jodka C, et al. Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 *in vivo* and *in vitro*. *Metabolism*, 2001, 50(5): 583–589.
- [3] Turrel C, Bailbé D, Meile MJ, et al. Glucagon-like peptide-1 and Exendin-4 stimulate β -Cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes*, 2001, 50(7): 1562–1570.
- [4] Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, et al. Synthetic Exendin-4 (Exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(7): 3082–3089.
- [5] Mank CM, Moore CX, Jodka CM, et al. Antiobesity action of peripheral exenatide (exendin-4) in rodents: effects on food intake, body weight, metabolic status and side-effect measures. *Int J Obes*, 2006, 30(9): 1332–1340.
- [6] Hansen KB, Vilsbøll T, Knop FK. Incretin mimetics: a novel therapeutic option for patients with type 2 diabetes—a review. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2010, 3: 155–163.
- [7] Akkati S, Sam KG, Tungha G. Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(6): 796–804.
- [8] Li TM, Liu T, Zhang MY, et al. Construction and expression of human glucagon-like peptide-2 analog multimers in prokaryotic cells. *Pharm Biotech*, 2011, 18(2): 100–105.
- [9] Wang XC, Zu XY, Chen HG, et al. Preparation and purification Exendin-4 from *Escherichia coli*: China, 200810049811.5. 2009-11-25.
- [10] Yi L, Yin XP, Wei DZ, et al. Expression and purification of Exendin-4 dimer in *Escherichia coli* and its interaction with GLP-1 receptor *in vitro*. *Protein Pept Lett*, 2006, 13(8): 823–827.
- [11] Yan R, Ding Y, Yang ZY, et al. New method for preparing and expression recombinant Exendin-4: CN, 201010513310.5. 2011-03-30.
- [12] Runge S, Schimmer S, Oschmann J, et al. Differential structural properties of GLP-1 and Exendin-4 determine their relative affinity for the GLP-1 receptor N-Terminal extracellular domain. *Biochemistry*, 2007, 46(19): 5830–5840.
- [13] Doyle ME, Theodorakis MJ, Holloway HW, et al. The importance of the nine-amino acid C-terminal sequence of exendin-4 for binding to the GLP-1 receptor and for biological activity. *Regul Pept*, 2003, 114(2/3): 153–158.
- [14] Li TM, Gu CJ, Liu JJ, et al. An Exendin-4 analogue: China, 102260346A. 2011-11-30.
- [15] Deng Q, Wang CX, Lu JZ, et al. Gene cloning and plasmid construction of recombinant bovine lactoferricin. *J Anhui Agri Sci*, 2008, 36(11): 4442–4444, 4476.
- [16] Yan R, Ding Y, Yang ZY, et al. Expression of recombinant Exendin-4 and a new method of preparation: China, 201010513310.5. 2011-03-30.
- [17] Yin XP, Wei DZ, Yi LN, et al. Expression and purification of exendin-4, a GLP-1 receptor agonist in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2005, 41(2): 259–265.

- [18] Zhuang ZH, Shi XM, Wang CX, et al. Study on preparation and activity of a novel recombinant human parathyroid hormone analog Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro. *Pham Biotech*, 2008, 15(5): 337-342.
- 庄志华, 施小明, 王春晓, 等. 重组人甲状旁腺素相关肽 Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 的制备工艺及活性研究. *药物生物技术*, 2008, 15(5): 337-342.
- [19] Zhang HX, Zhang Y, Zhou QF, et al. Construction of Exendin-4 eukaryotic expression vector and its expression in *P. pastoris*. *China Pharm*, 2009, 20(22): 1707-1709.
- 张红绪, 张怡, 周庆峰, 等. Exendin-4 真核表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达. *中国药房*, 2009, 20(22): 1707-1709.
- [20] Zhang HX, Jia M, Zhou QF, et al. Construction of recombinant expression vector and secretion expression of Exendin-4 in *E. coli*. *J Henan Normal Univ: Nat Sci*, 2009, 37(2): 109-116.
- 张红绪, 贾孟, 周庆峰, 等. exendin-4 表达载体构建及其在大肠杆菌中分泌表达. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(2): 109-116.
- [21] Wang H, Qian JC, Zhuang YP, et al. Influence of copy number and spacer peptides on secretive expression of exendin-4 analog in *Pichia pastoris*. *J East China Univ Sci Techol: Nat Sci*, 2008, 34(1): 40-46.
- 王晖, 钱江潮, 庄英萍, 等. 不同拷贝数及间隔肽序列对毕赤酵母分泌表达 EXA 的影响. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(1): 40-46.
- [22] Malendowicz LK, Macchi C, Nussdorfer GG, et al. Effects of prolonged exendin-4 administration on entero-insular axis of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Med*, 2003, 11(6): 763-766.

关于启用新账号的通知

我编辑部自 2012 年 2 月 20 日起, 将正式启用新的银行账号, 新的账户信息如下:

账户名称: 中国科学院微生物研究所

开户行: 中国农业银行股份有限公司北京科学园分理处

账号: 11251101040000848

凡向本刊编辑部转账的单位及个人, 请自 2 月 20 日起按新账号转款。为了快速到账, 稿件审理费和发表费建议使用银行转账方式汇款, 汇款时请务必注明稿件编号, 感谢您的合作!

《生物工程学报》编辑部

2012-2-17