

重组胰高血糖素样肽-1 与人血清白蛋白融合蛋白的纯化及活性研究

陈家琪 高智慧 朱元元 杨文博 白 钢*

(南开大学 生命科学学院 天津 300071)

摘要 利用构建的重组菌株 *Pichia pastoris* GS115/GLP-1/HSA 在 10L 发酵罐中表达了胰高血糖素样肽-1 与人血清白蛋白融合蛋白(GLP-1/HSA), 表达量为 63.6mg/L。发酵液经中空纤维柱浓缩、疏水层析、阴离子交换层析和凝胶过滤分离纯化, 获得了较高纯度的 GLP-1/HSA。经 HPLC 分析纯度达 95.8%。进一步的体内活性分析结果表明, GLP-1/HSA 不仅具有天然 GLP-1 的生物活性, 而且在给药后 4 h 仍能发挥显著性降血糖作用。以上结果表明, 利用 *Pichia pastoris* 分泌型表达系统和建立的分离纯化方法, 能获得大量较高纯度的 GLP-1/HSA, 为进一步研究和开发能够用于糖尿病临床治疗的长效 GLP-1 类似物奠定了基础。

关键词 胰高血糖素样肽-1 人血清白蛋白 融合表达 纯化

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)05-0871-04

Purification and Characterization of Glucagon-Like Peptide-1 and Human Serum Albumin Fusion Protein Expressed in *Pichia pastoris*

CHEN Jia-Qi GAO Zhi-Hui ZHU Yuan-Yuan YANG Wen-Bo BAI Gang*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract A fusion protein of glucagons-like peptide-1 and human serum albumin (GLP-1/HSA) was expressed and secreted into the fermentation broth with recombinant *Pichia pastoris*. The productivity of expressed GLP-1/HSA could reach 63.6mg/L in 10L fermentor. After concentrated with hollow-fiber ultrafiltration membrane, GLP-1/HSA was purified from fermentation broth by hydrophobic chromatography, negative ion exchange chromatography and gel filtration chromatography in turn. The HPLC analysis showed that the purified GLP-1/HSA had an overall purity of 95.8%. Furthermore, the analysis of in vivo activity indicated that GLP-1/HSA had the bioactivity of native GLP-1, and could significantly reduce blood glucose level 4h after intraperitoneal administration. It was concluded that a great deal of GLP-1/HSA with higher purity could be harvested by *Pichia pastoris* expression system and the established purification methods. Preliminary studies show a new potential for developing the long-acting GLP-1 analogs for clinical applications.

Key words Glucagon-like peptide-1, Human serum albumin, Fusion expression, Purification

胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是肠道内 L 细胞分泌的一种肽类激素, 由胰高血糖素原转化而来^[1]。它不仅具有血糖依赖性促进胰岛素分泌作用, 而且能够抑制胰高血糖素分泌、抑制食欲和胃排空、促进胰岛 β 细胞的增殖, 对 II 型糖尿病的治疗具有较好的效果^[2~4]。但是, 由于 GLP-1 在体内容易被二肽基肽酶-IV(DPP-IV)迅速降解和肾脏的清除作用导致半衰期很短, 限制了其应用^[5]。因此, 通常通过个别位点氨基酸的替换产生具有 DPP-IV 抗性的 GLP-1 类似物^[6], 或将 GLP-1 与其它大分子连接以减缓肾脏的清除作用^[7, 8], 或

使用 DPP-IV 抑制剂减少 GLP-1 在体内的降解^[9]等方法开发长效 GLP-1 类似物成为目前研究的热点。

通过化学偶联的方法, 将具有较长体内半衰期的人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)或可溶性惰性聚合物聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)与半衰期较短的肽或小分子蛋白类药物结合, 能明显改善其体内药物动力学特征^[10, 11]。Liraglutide 和 CJC-1131 是两种化学修饰的 GLP-1 类似物, 它们在给药后能与体内的 HSA 形成非共价或共价的结合, 其体内降糖作用时间可达 10h 以上^[7, 12]。此外, Lee 等人对一种 PEG 化 GLP-1 类似物的体内、体外活性

* 通讯作者 Tel: 022-23508371, E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

收稿日期: 2006-12-22, 修回日期: 2007-03-26

研究表明,它不仅保持了天然 GLP-1 的生物学活性,而且体内半衰期得到了明显延长^[8]。

本实验利用分泌型 *Pichia pastoris* 表达系统融合表达了 GLP-1/HSA,发酵液经中空纤维柱浓缩、疏水层析、阴离子交换层析和凝胶过滤分离纯化了 GLP-1/HSA 融合蛋白且对其体内活性进行了考察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:GLP-1 和 HSA 标准品购自 Sigma 公司;中空纤维柱(截流分子量 6000,外压式)购自天津膜天膜工程技术有限公司;Phenyl-Sepharose CL-4B、Sephadex G-100 购自 Pharmacia 公司;DEAE cellulose-52 购自 Whatman 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG、邻苯二胺(OPD)购自灏洋生物制品公司;兔抗 HSA 血清由本实验室制备;葡萄糖检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.1.2 菌株:重组菌株 *Pichia pastoris* GS115/GLP-1/HSA 由本实验室构建。根据文献[13]将通过 PCR 扩增得到的 GLP-1/HSA 融合基因片段,连接到分泌型表达载体 pPIC9K 中构成重组表达载体 pPIC9K/GLP-1/HSA,转化 *Pichia pastoris* GS115 后经组氨酸营养缺陷型培养基和 G418 抗性筛选得到重组菌株。

1.1.3 培养基:种子和发酵培养基(BMGY):YNB 1.34%,蛋白胨 2%,酵母粉 1%,磷酸盐缓冲液 0.1mol/L(pH6.0),甘油 1%,生物素 4×10^{-5} %;诱导表达阶段补料流加成分:甲醇。

1.1.4 发酵罐:BIOTECH-10BGZ 自动玻璃发酵罐,购自上海保兴生物设备工程有限公司。

1.1.5 实验动物:7~8 周龄雌性昆明(KM)种小鼠,购自中国军事医学科学院实验动物中心。适应性饲养一周后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 GLP-1/HSA 的发酵表达:挑取 *Pichia pastoris* GS115/GLP-1/HSA 菌株单菌落接种于 5 mL BMGY 中,28℃ 200 r/min 振荡培养过夜,再转接于 500 mL BMGY 中,继续振荡培养 24 h,作为上罐种子液。在 10L 发酵罐中装入 5 L BMGY 培养基,灭菌后接入种子液进行菌体生长培养,设定条件为温度 28℃,搅拌 200 r/min,通气量 5 L/min,pH5.5。发酵 10 h 后,开始流加甲醇进行诱导表达(流加速率

0.2 mL/min),设定为温度 28℃,搅拌 250r/min,通气量 8 L/min,pH6.0,诱导 60 h 后,停止发酵。发酵液于 4℃ 5000 r/min 离心 15 min,得到含 GLP-1/HSA 融合蛋白的发酵上清液,于 4℃ 保存备用。

1.2.2 融合蛋白 GLP-1/HSA 的 ELISA 检测:采用测定 HSA 的方法分析融合蛋白的含量。取 2 μg/mL HSA 标准品 100 μL 包被酶标板作为固相抗原,5% 羊血清封闭后,分别加入系列稀释的 HSA 标准品或样品溶液 100 μL,再加入 100000 倍稀释的兔抗 HSA 血清 100 μL,37℃ 放置 1 h,PBST 充分洗涤后加入 2000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,37℃ 放置 1 h,PBST 充分洗涤后加入 OPD 底物显色,以 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应,并于 490 nm 处测定其吸光度值。根据 HSA 标准品的吸光度与浓度关系的标准曲线计算样品中 HSA 的浓度,并按 HSA 与融合蛋白的质量比(1:1.06),折算出 GLP-1/HSA 的含量。

1.2.3 GLP-1/HSA 的分离纯化:发酵上清液经中空纤维柱浓缩后,配成含 20% 硫酸铵的溶液,取 150 mL 上样于 20% 硫酸铵预平衡的 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱(1.5cm × 40cm),分别用平衡液和去离子水进行洗脱,收集洗脱液于 280 nm 测定吸光度并用 ELISA 法检测融合蛋白的活性。收集融合蛋白活性峰,经 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH5.7)透析后,上 DEAE cellulose-52 柱(1.5cm × 10cm),采用 0mol/L~0.3mol/L NaCl 的平衡液进行线性洗脱。收集融合蛋白活性峰,浓缩后用 Sephadex G-100 柱(1.5cm × 40cm)进行凝胶过滤,平衡液为 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)。收集融合蛋白活性峰,去离子水透析后冷冻干燥,-20℃ 保存备用。

1.2.4 GLP-1/HSA 的 SDS-PAGE 和 HPLC 分析:分离纯化过程中的洗脱峰用 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度 11%,浓缩胶浓度 5%,银染)分析。纯化的融合蛋白纯度用 HPLC 检测,色谱柱为 TSK-GEL G2000SWXL(30cm × 7.8mm),流动相为 0.15 mol/L NaCl,0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0),流速 0.8 mL/min,SPD-10AV 紫外检测器,检测波长 280 nm。

1.2.5 葡萄糖耐受实验:雌性 KM 小鼠禁食 16h~18h 后,进行葡萄糖耐受实验。经腹腔给药后,口服灌注葡萄糖(剂量 1.5 mg/g 体重),并分别于不同时间从尾静脉取血,采用葡萄糖检测试剂盒检测血糖。

2 结果

2.1 GLP-1/HSA 的发酵表达

重组 *Pichia pastoris* GS115/GLP-1/HSA 菌株 ,在装有 5L BMGY 培养基的 10L 发酵罐中经过菌体生长培养和甲醇诱导表达两个阶段。如图 1 所示 ,接种后即进入菌体生长阶段 ,随着菌体浓度不断增加 ,对氧的消耗也随之增加 ,表现为溶氧(DO)值逐渐下降。培养 10h 后 ,原发酵液中的甘油被耗尽 ,菌体生长受到抑制 ,DO 迅速回升。此时 ,开始流加甲醇进行诱导表达。诱导过程中菌体浓度基本稳定 ,GLP-1/HSA 的表达量随诱导时间逐渐增加 ,30h 后趋于平缓 ,60h 后达到最高值 63.6mg/L。发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳 ,结果显示在相对分子量约 70 kD 附近均有一明显的蛋白条带(图 2)。

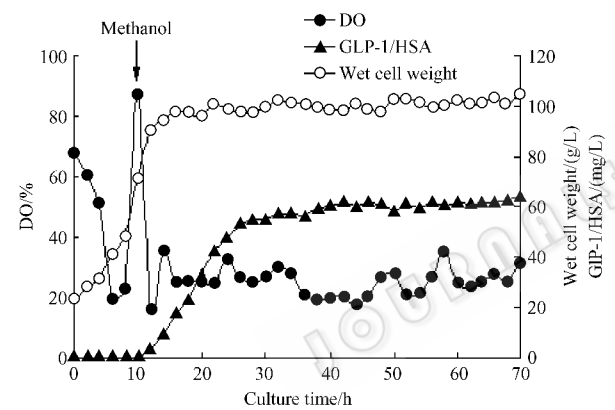


图 1 重组 *Pichia pastoris* GS115/GLP-1/HSA 发酵过程中细胞生长及蛋白表达曲线

2.2 GLP-1/HSA 的分离纯化

发酵上清液经过中空纤维柱处理后 ,体积浓缩了 3.7 倍 ,GLP-1/HSA 浓度提高了 3.3 倍 ,回收率为 89.5%。浓缩液经 Phenyl-Sepharose CL-4B 疏水层析 ,DEAE cellulose-52 阴离子交换 ,Sephadex G-100 凝胶过滤 ,整个纯化过程 GLP-1/HSA 的纯度提高了 69.1 倍 ,总的收率为 16.0%(表 1)。

2.3 纯化过程中 GLP-1/HSA 纯度鉴定

纯化过程中 GLP-1/HSA 含量变化 ,采用 SDS-PAGE 电泳检测 ,纯化后的 GLP-1/HSA 为单一条带(图 2)。融合蛋白纯度经 HPLC 分析为 95.8%(图 3)。表明发酵液中的 GLP-1/HSA 经过以上分离纯化过程 ,取得了较好的纯化效果。

表 1 *Pichia pastoris* 表达的 GLP-1/HSA 纯化结果

	Total protein (mg/L)	GLP-1/HSA (mg/L)	Purity (%)	Purification fold	Recovery (%)	
					Fractional	Total
Supernatant of broth	4615	63.6	1.4	1.0	100	100
Concentrate	14280	212.0	1.5	1.1	89.5	89.5
Phenyl-Sepharose CL-4B	1140	360.2	31.6	22.6	45.3	40.5
DEAE cellulose-52	269.9	180.8	67.0	47.8	50.2	20.4
Sephadex G-100	227.3	220.0	96.8	69.1	78.9	16.0

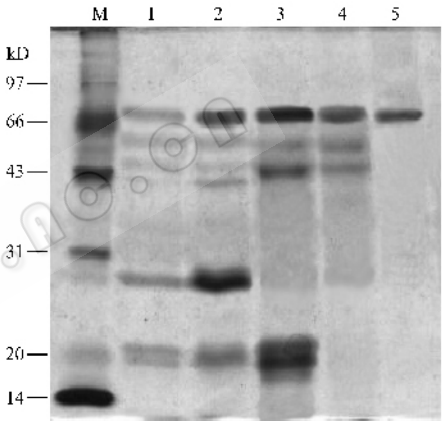


图 2 纯化过程中 GLP-1/HSA 的 SDS-PAGE 分析

M 标准分子量蛋白 ,1 发酵上清液 ,2 浓缩液 ,3 经 Phenyl-Sepharose CL-4B 纯化的 GLP-1/HSA ,4 经 DEAE cellulose-52 纯化的 GLP-1/HSA ,5 经 Sephadex G-100 纯化的 GLP-1/HSA

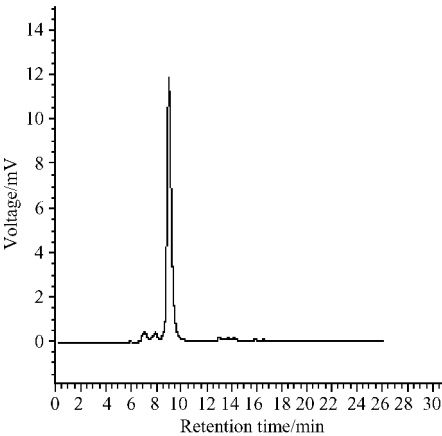


图 3 纯化的 GLP-1/HSA 的 HPLC 分析

2.4 GLP-1/HSA 的体内活性分析

为了考察 GLP-1/HSA 的降血糖效果 ,采用 KM 小鼠进行口服葡萄糖耐受实验。结果如图 4 所示 ,与空

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

白对照组相比 $0.01(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})\text{kg}$ 、 $0.1(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})\text{kg}$ 和 $1(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})\text{kg}$ 剂量的 GLP-1/HSA 经腹腔注射 1h 后能显著降低小鼠的血糖水平(显著性分别为: $P < 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。为进一步验证融合蛋白 GLP-1/HSA 有较好的长效作用,采用腹腔注射 $0.1(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})\text{kg}$ 剂量的 GLP-1 和 GLP-1/HSA 后,于不同时间测定口服葡萄糖的糖耐量。实验结果表明, GLP-1 给药后能立即发挥显著的降低血糖作用,但维持时间较短,1 h 后降血糖作用即消失。虽然 GLP-1/HSA 在给药后 1 h 才表现出明显的降低血糖作用,但在给药后 4 h 仍能发挥显著性降低血糖作用(图 5)。

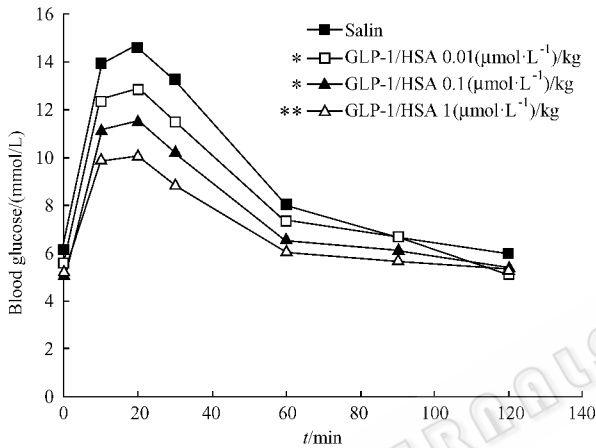


图4 腹腔注射 GLP-1/HSA 后 1h 口服葡萄糖耐受实验中 KM 小鼠血糖水平

所有数值均表示为 $\bar{x} \pm s$ ($n = 10$ 只/组), 显著性为 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

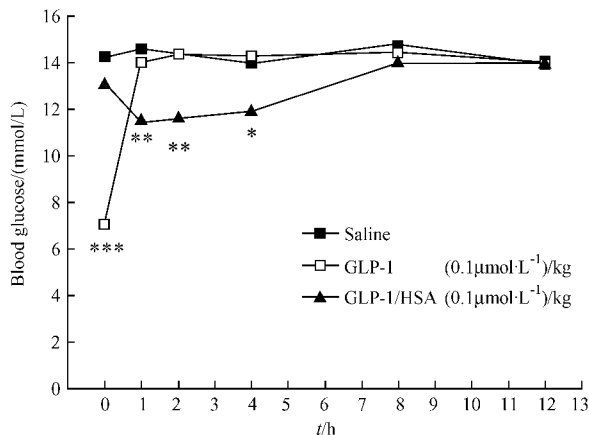


图5 腹腔注射 GLP-1 和 GLP-1/HSA 后不同时间口服葡萄糖耐受实验中 KM 小鼠血糖水平

图中显示的血糖值是灌注葡萄糖后 20 min 的血糖水平, 所有数值均表示为 $\bar{x} \pm s$ ($n = 10$ 只/组), 显著性为 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

张志珍等^[14]曾利用 GST 作为融合标签在大肠杆菌中表达了 GST/GLP-1 融合蛋白, 再经过 CNBr 化学裂解得到了具有生物活性的重组 GLP-1。然而, 直接表达具有生物活性的 GLP-1 融合蛋白的研究, 国内还未见报道。本研究利用构建的分泌型重组菌株 *Pichia pastoris* 表达系统, 在 10L 发酵罐水平成功表达了融合蛋白 GLP-1/HSA, 其表达量为 63.6mg/L 。但与表达的其它蛋白相比 ($10^2\text{mg/L} \sim 10^4\text{mg/L}$)^[15] 本研究的表达量并不高, 还有待经过条件优化或采用高密度发酵进一步提高其表达水平。

本研究采用中空纤维柱浓缩、疏水层析、阴离子交换层析和凝胶过滤的分离纯化方法, 有效地去除了发酵液中的色素和杂蛋白, 得到了较高纯度的 GLP-1/HSA。进一步的体内活性分析表明 GLP-1/HSA 具有天然 GLP-1 的生物活性, 虽然在给药后 1h 才发挥明显的降血糖作用, 但体内降血糖作用时间得到显著延长。为进一步研究和开发能够用于糖尿病临床治疗的长效 GLP-1 类似物奠定了基础。

参考文献

- [1] Holst JJ. Trends Endocrinol Metab, 1999, **10**: 229 ~ 235.
- [2] Vella A, Shah P, Basu R, et al. Diabetes, 2000, **49**: 611 ~ 617.
- [3] Flint A, Raben A, Astrup A, et al. J Clin Invest, 1998, **101**: 515 ~ 520.
- [4] Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, et al. Diabetes, 2000, **49**: 741 ~ 748.
- [5] Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. J Clin Endocrinol Metab, 1995, **80**: 952 ~ 957.
- [6] Gallwitz B, Ropeter T, Morys-Wortmann C, et al. Regul Pept, 2000, **86**: 103 ~ 111.
- [7] Kim JG, Baggio LL, Bridon DP, et al. Diabetes, 2003, **52**: 751 ~ 759.
- [8] Lee SH, Lee S, Youn YS, et al. Bioconjugate Chem, 2005, **6**: 377 ~ 382.
- [9] Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, et al. J Clin Endocrinol Metab, 2004, **89**: 2078 ~ 2084.
- [10] Koehler M, Zobel K, Beresini M, et al. Bioorg Med Chem Lett, 2002, **12**: 2883.
- [11] 姜忠义, 高 蓉, 王艳强. 药学报, 2002, **37**(5): 396.
- [12] Elbrond B, Jakobsen G, Larsen S, et al. Diabetes Care, 2002, **25**: 1398 ~ 1404.
- [13] Han X, Ye LB, Li BZ, et al. Protein Expression and Purification, 2006, **49**: 168 ~ 175.
- [14] 张志珍, 杨生, 毛积芳. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18**(1): 5 ~ 8.
- [15] 路 蓉. 临床和实验医学杂志, 2004, **3**(1): 43 ~ 47.