DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.007
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1714 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1714-03

人胰岛素原基因突变体的构建

兰丽珍[1],邓华聪[1],孙 辽[2],郑 丹[1],郑宏庭[1],刘东方[1],弓军胜[3] ([1]重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016;山西医科大学第一医院:[2]肾病科,[3]整形科,太原 030001)

提 要:目的 完成人胰岛素原基因的定点突变,使之能在普通细胞中被Furin蛋白酶识别去除C肽分泌成熟胰岛素。方法 采用PCR体外定点突变技术(PCR site-directed mutagenesis, PCR-SDM),设计4对引物,引入5个Furin识别的突变位点,通过重叠延伸法PCR扩增,使人胰岛素原编码基因B10密码子由CAC突变为GAC;C3密码子由GAA突变为AAA;C4密码子由GCT突变为CGT;C32密码子由CTT突变为CGT,将扩增片段克隆入T载体并测序。结果 DNA测序结果表明在预期位点突变符合要求。结论 应用PCR诱导突变技术,在体外能准确、简便有效的诱导胰岛素原基因突变,使体外应用非内分泌细胞构建高效分泌成熟胰岛素的细胞克隆成为可能。

关键词:人胰岛素原;PCR;定点突变
中图法分类号:R347.8;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Construction of a mutant human proinsulin gene

LAN Li-zhen[1], DENG Hua-cong[1], SUN Liao[2], ZHENG Dan[1], ZHENG Hong-ting[1], LIU Dong-fang[1], GONG Jun-sheng[3]
([1]Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [2]Department of Renal Diseases, [3]Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: **Objective** To construct a mutant of human proinsulin gene for the purpose of removal of C peptide in non-endocrine cells by Furin proteolytic enzyme to excrete mature insulin. **Methods** We used polymerase chain reaction (PCR) for the site-directed mutagenesis. Four sets of primers were designed according to the gene sequence of human proinsulin and mismatches were introduced into F02 for histidine (CAC) to aspartic acid (GAC) substitution at site B10, F03/R03 for glutamic acid (GAA) to lysine (AAC) substitution at site C3, alanine (GCT) to arginine (CGT) substitution at site C4, and F04/R02 for leucine (CTT) to arginine (CGT) substitution at site C32. Mutagenesis was performed in a two-step PCR and the amplified fragments from the second PCR containing the mutation sites were subcloned into the T vector and verified by sequencing analysis. **Results** The sequencing analysis showed that the mutation sites were correct, and the mutant of human proinsulin was constructed successfully. **Conclusion** A mutant human proinsulin, successfully constructed by PCR for the site-directed mutagenesis, is potential to construct a cell clone to efficiently excret mature insulin with non-endocrine cells *in vitro*.

Key words: proinsulin; PCR; site-directed mutagenesis

应用非内分泌细胞构建具有分泌胰岛素功能的目的细胞是1型糖尿病基因治疗的研究热点。由于非内分泌细胞中缺乏将胰岛素原转换为胰岛素的蛋白质前体转化酶2(proprotein convertase-2, PC2)和蛋白质转化酶3(proprotein convertase-3, PC3),无法表达具有生物活性的成熟胰岛素[1~2]。然而,在具有组成性分泌途径的普通细胞中的胞内普遍存在蛋白质前体加工酶Furin,能特异性识别Arg-X-Lys/Arg-Arg[3]序列。因此,本研究拟采用PCR体外突变技术(PCR site-directed mutagenesis, PCR-SDM)改造胰岛素原基因,使胰岛素原B-C和A-C连接处的氨基酸序列突变为可被Furin识别和切割的位点,以期能在普通细胞中表达成熟胰岛素。

1 材料和方法

1.1 生化试剂

pMD18-T载体、pfu及*Taq* DNA聚合酶、dNTP、限制性内切酶、DNA连接试剂盒、Pyrobest DNA Polymerase LA *Taq* DNA聚合酶、Marker购自大连TaKaRa公司;PCR产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自美国Omiga公司。其它生化及化学试剂为国产或进口分析纯。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070356)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070356)
作者简介:兰丽珍(1970-),女,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事糖尿病分子病因学及基因治疗方面的研究。电话:(0351)8161240
通信作者:邓华聪,电话:(023)68700611,E-mail:Deng-huacong@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-02-17;修回日期:2004-06-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　质粒及菌株

质粒 PHIL-D2-PIN, 由北京大学薛强博士惠赠, 含有编码人胰岛素原全长的 cDNA 序列、大肠杆菌 JM109 由本室保存。

1.3　PCR 引物设计

按照引物设计原则, 根据人胰岛素原基因序列设计 3 对引物 F02 和 R03, F03 和 R02, F04 和 R01, 另加 1 条 F01 用于引入酶切位点 NheⅠ、*Eco*RⅠ和 Kozak 序列以及信号肽。F01 和 F02, R03 和 F03, R02 和 F04 部分序列互补, F02 带有 1 个突变位点, 即在第 121 位(B10)组氨酸编码区用编码天冬氨酸的密码 GAC 来置换 CAC; R03 和 F03 有 3 个突变位点, 即在第 190、193、194 位(C3 和 C4)处的谷氨酸和丙氨酸编码区用编码赖氨酸和精氨酸的密码 AAA 和 CGT 置换 GAA 和 GCT, 顺序由精氨酸-精氨酸-谷氨酸-丙氨酸(RREA)变为精氨酸-精氨酸-赖氨酸-精氨酸(RRKR); R02 和 F04 有 1 个突变位点, 即在第 279 位(C32)处的氨基酸用编码精氨酸的 CGT 来置换亮氨酸 CTT, 顺序由亮氨酸-谷氨酰胺-赖氨酸-精氨酸(LQKR)变为精氨酸-谷氨酰胺-赖氨酸-精氨酸(RQKR), R01 引入 *Bam*HⅠ和 *Not*Ⅰ的酶切位点。7 条引物分别是: F01: 5′-CTA GCT AGC GAA TTC GCC ACC ATG GCC CTG TGG ATG CGC CTC CTG CCC CTG CTG GCG CTG CTG GCC CTC T-3′(70 base); F02: 5′-GCT GGC GCT GCT GGC CCT CTG GGG ACC TGA CCC AGC CGC AGC CTT TGT CAA TCA GCA CCT TTG TGG TTC TGA CCT GG-3′(77 base); F03: 5′- ACC CGT CGT AAA CGT GAA GAC CTT C-3′(25 base); F04: 5′- AGG GAT CAC GTC AAA AGC GTG GC-3′(23 base); R01: 5′- TTT TCC TTT TGC GGC CGC GGA TCC TCA GTT GCA GTA GTT CTC CAG-3′(45 base); R02: 5′- CCA CGC TTT TGA CGT GAT CCC TCG AG-3′(26 base); R03: 5′- TCT TCA CGT TTA CGA CGG GTC TTG GGT G -3′(28 base), 引物由 TaKaRa 合成。

1.4　PCR 扩增条件

按照 PCR 体外定点突变重叠延伸法, 需进行两次 PCR 扩增。

以 PHIL-D2-PIN 质粒为模板, 分别以 F02/R03, F03/R02, F04/R01 为引物进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 ℃ 1 min 后 98 ℃ 10 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 10 s, 共 30 个循环, 末次循环后置 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物使用 TaKaRa PCR Fragment Recovery Kit 切胶回收, 溶于 10 μl 的 dH_2O 中, 取 1 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。再以上述 PCR1, PCR2, PCR3 产物为模板, 以 F01/R01 为引物进行全长基因 PCR 扩增。分两步: ①DNA 链延伸反应: 50 μl 体系中 PCR1, PCR2, PCR3 产物各 10 μl, 10× TaKaRa LA Buffer 5 μl, dNTP 8 μl, 94 ℃ 5 min, 在 10 min 内冷却至 55 ℃, 加入 TaKaRa LA *Taq* 酶 1 μl 后, 保温 5 min, 72 ℃ 5 min。此反应液为 DNA 延伸液。②PCR 反应: 用 DNA 延伸液进一步进行 PCR 反应, 反应条件为: 先 94 ℃ 1 min, 进入 30 个循环 98 ℃ 10 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 最后 72 ℃ 10 min 充分延伸。

1.5　人胰岛素原突变体的构建和序列分析

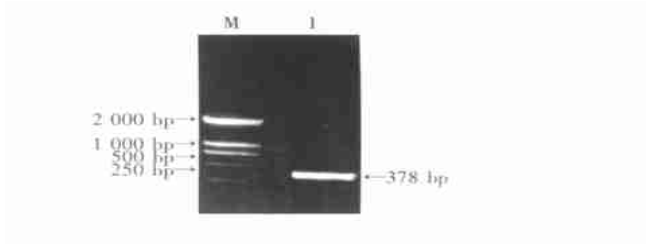
将切胶回收后的 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体, 其 DNA 的酶切、回收、连接、及质粒的转化及抽提, 琼脂糖凝胶电泳等按文献[4]提供的方法进行。DNA 序列分析用 PERKIN ELMER 自动测序仪测序。

2　结果

2.1　PCR 扩增

第 1 次 PCR 以质粒 PHIL-D2-PIN 为模板, 分别以 F02/R03, F03/R02, F04/R01 引物进行 PCR 扩增, 获得了部分序列互补的片段Ⅰ(150 bp)、片段Ⅱ(110 bp)和片段Ⅲ(110 bp), 三者都带有点突变, PCR 扩增产物使用 TaKaRa PCR Fragment Recovery Kit 切胶回收片段Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ, 第 2 次 PCR 以纯化的片段Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ为模板, 等比例加入, 以 F01/R01 为引物进行全长基因 PCR 扩增, 产生带有目的突变的基因片段(378 bp)。

PCR 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳如图 1 所示。



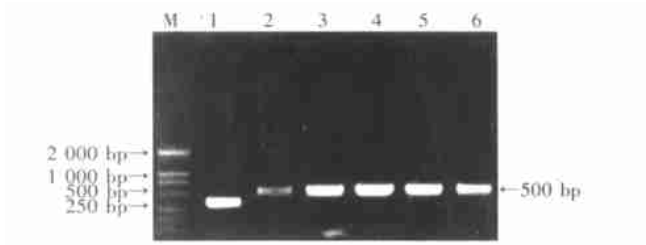
M: PCR marker DL2000; 1: Mutant human proinsulin gene

图 1　第 2 次 PCR 扩增的突变基因片段

Fig 1　PCR products of mutant human proinsulin gene

2.2　人胰岛素原基因突变体的构建和鉴定

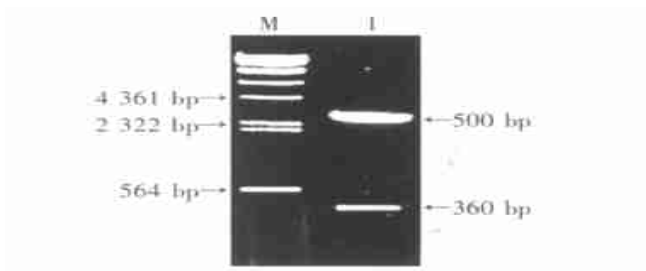
用 PCR 产物与 T 载体连接转化后, 转化平板上菌落用 M13-47/RV-M 引物进行 PCR 鉴定结果如图 2 所示; 重组质粒用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ双酶切鉴定结果如图 3 所示。



M1: DNA marker DL 2000; 1— 6: PCR products (about 500 bp) show 2— 6 lanes are recombinant plasmids

图 2　转化菌落的 PCR 鉴定图谱

Fig 2　Photograph of electrophoresis of colony PCR



M: DNA marker λ-*Hind* Ⅲ; 1: pMDT-18/*Eco*RⅠ + *Bam*HⅠ (2 692 bp, 360 bp)

图 3　重组质粒的酶切图谱

Fig 3　Restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmid

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 重组质粒测序结果

DNA序列分析表明：人胰岛素原基因 B^{10} 位密码子由 CAC 突变为 GAC；C^{3} 和 C^{4} 位密码子由 GAA 和 GCT 突变为 AAA 和 CGT；C^{32} 位密码子由 CTT 突变为 CGT，达到预期目的。具体序列如下：

ACGGCAAGTGGACGATTCTAGCTAGC*GAATTC*GCCACCATGGCCCT
GTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGAC
CTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTCAATCAGCACCTTTGTGGTTCT G
ACCTGGTGGAGGCTCTGTACCTGGTGTGTGGGGAACGTGGTTTCTTC
TACACACCCAAGACCCGTCGT A AA CG TGAAGACCTTCAAG
TGGGTCAAGTTGAACTTGGTGGGGGTCCTGGTGCGGGTTCTCTTCA
ACCTTTGGCTCTCGAGGGATCACGTCAAAGCGTGGCATTGTGGAG
CAGTGCTGCACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAACTGGAGAACTACT
GCAACTGAGGATCCGCGGCCGCAAAAGGAAATCTCCAGAGGATC
GCCGGGAACCGAGG 其中斜体划横线的为 *Eco*RI 和 *Bam*HI 的酶切位点，阴影部分为 Kozak 序列，框内的是突变的碱基。

3 讨论

在1型糖尿病胰岛素基因治疗的研究中，胰岛素原基因转染细胞能否稳定表达具有生物活性的胰岛素，是其成败的关键。目前，应用的胰岛素原基因转染细胞分两大类：一类为包括胰岛β细胞在内的神经内分泌细胞，尽管这些细胞含有激素前体转化酶 PC2 和 PC3，能将 C 肽切掉，加工成具有生物活性的胰岛素，但其来源困难，且为终末分化细胞，其应用前景受到限制。另一类为非内分泌细胞，这类细胞缺乏 PC2 和 PC3 酶，不能直接将胰岛素原加工成胰岛素，但在这类细胞普遍表达枯草杆菌蛋白酶的两个家族成员 Furin[5,6] 和 PACE4[7]，它们能特异识别 Arg-X-Lys/Arg-Arg 序列。因此，转染前将胰岛素原基因 C 肽与 A、B 链连接处诱变为含有 Furin 或 PACE4 识别位点的突变体，可以解决普通细胞不能加工胰岛素原的问题。

突变体的构建有多种方法，传统的体外突变技术多采用寡核苷酸引物介导的突变法，操作步骤繁琐，条件苛刻，且突变仅限于5′端。Clontech 公司提供的突变体试剂盒及其构建方案虽然有其优点，但需要用 T7 聚合酶来延伸合成突变链，且有非特异位点突变及不能保证高突变率的多位点同时突变等缺点。本研究采用 PCR 体外定点突变技术（PCR-SDM），诱导人胰岛素原基因目的位点突变，诱变过程中利用高保真酶的高保真性，以及第2次 PCR 扩增时纯化并加大片段Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ模板量，以防止其它位点随机突变的可能性。测序结果表明这种方法能保证多位点同时突变，且具有特异位点突变率高，随机突变可能性少等优点。

Groskreutz 等[8] 应用体外 PCR 诱变技术将人胰岛素原 cDNA 的 B-C、C-A 连接处诱变成 Furin 蛋白酶特异性识别位点，并将其转染到非内分泌细胞，结果表明转染细胞能稳定表达具有生物活性的成熟胰岛素。但实验中没能考虑信号肽的作用，这将会影响转染细胞分泌胰岛素的能力。另有研究证明胰岛素 B10 突变，即组氨酸代替天冬氨酸后的胰岛素其稳定性和活性均明显优于普通胰岛素[9]。基于上述研究结果，本研究应用体外 PCR 定点突变技术，将人胰岛素原基因的 B-C、C-A 连接处诱导成 Furin 裂解位点（Arg-X-Lys/Arg-Arg），以及在 B10 组氨酸诱变成天冬氨酸，同时为了增加突变体的表达以及胰岛素的分泌引入 Kozak 和信号肽序列。测序结果表明该方法诱变的胰岛素原突变体，所有目的位点准确突变，无随机突变发生。该研究为今后构建高效稳定表达具有高生物活性胰岛素的非内分泌细胞奠定了基础。

（致谢：感谢第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心对本研究的大力支持。）

参考文献：

[1] Quinn D, Orci L, Ravazzola M, *et al*. Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulins that fail to form hexamers[J]. J Cell Biol, 1991, 113(5): 987－996.

[2] Galloway J A, Hooper S A, Spradlin C T, *et al*. Biosynthetic human proinsulin. Review of chemistry, *in vitro* and *in vivo* receptor binding, animal and human pharmacology studies, and clinical trial experience[J]. Diabetes Care, 1992, 15(5): 666－692.

[3] Van de Ven W J, Roebroek A J, Van Duijnhoven H L. Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases[J]. Crit Rev Oncog, 1993, 4(2): 115－136.

[4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 金冬雁译. 分子克隆实验指南[M]. 北京：科学出版社, 1999. 35－40, 42－49, 56, 304－306.

[5] Fuller R S, Brake A J, Thorner J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease[J]. Science, 1989, 246(4929): 482－486.

[6] Barr P J, Mason O B, Landsberg K E, *et al*. cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues[J]. DNA Cell Biol, 1991, 10(5): 319－328.

[7] Kiefer M C, Tucker J E, Joh R, *et al*. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15[J]. DNA Cell Biol, 1991, 10(10): 757－769.

[8] Groskreutz D J, Sliwkowski M X, Gorman C M. Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin[J]. J Biol Chem, 1994, 269(8): 6241－6245.

[9] Brems D N, Brown P L, Bryant C, *et al*. Improved insulin stability through amino acid substitution[J]. Protein Eng, 1992, 5(6): 519－525.

（编辑 龙 亮）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net