

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/62

A61K 38/28



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 90101415.X

[45]授权公告日 1997年2月19日

[11] 授权公告号 CN 1034080C

[22]申请日 90.2.8 [24]颁证日 96.11.23

[21]申请号 90101415.X

[30]优先权

[32]89.2.9 [33]US[31]308,352

[32]89.8.4 [33]US[31]388,201

[73]专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 罗纳德·尤金·钱斯

理查德·丹尼斯·迪马奇

布鲁斯·希尔·弗兰克

詹姆斯·埃德温·希尔滋

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

审查员 周 莉

权利要求书 2 页 说明书 83 页 附图页数 20 页

[54]发明名称 胰岛素类似物的制备方法

[57]摘要

在 B 链的 29 位置和其它任选位置经修饰的人胰岛素类似物,它具有改进的生物化学和药物动力学性质,可用于治疗高血糖。

若有Y的话，Y是Glu或一种氨基酸顺序，该顺序含有所有或部分如下顺序：

Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg, 该顺序从氨基末端Glu开始；

所述方法包括如下三种制备方法：

(A) 使式(I)的A链肽与式(I)的B链所限定的肽混合，形成如式(I)所示的适当二硫键；或

(B) 使没有始于B23的肽顺序的式(I)化合物与具有顺序Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-B28-B29-Thr-X-Y-Z的肽偶联；或

(C)(i) 用编码式(I)胰岛素原的DNA转化宿主细胞，式(I)中X、Y和Z都有；

(ii) 培养重组宿主细胞，并分离由步骤(i)中的DNA编码的化合物；

(iii) 将上述化合物酶切除去X、Y和Z，生成胰岛素类似物。

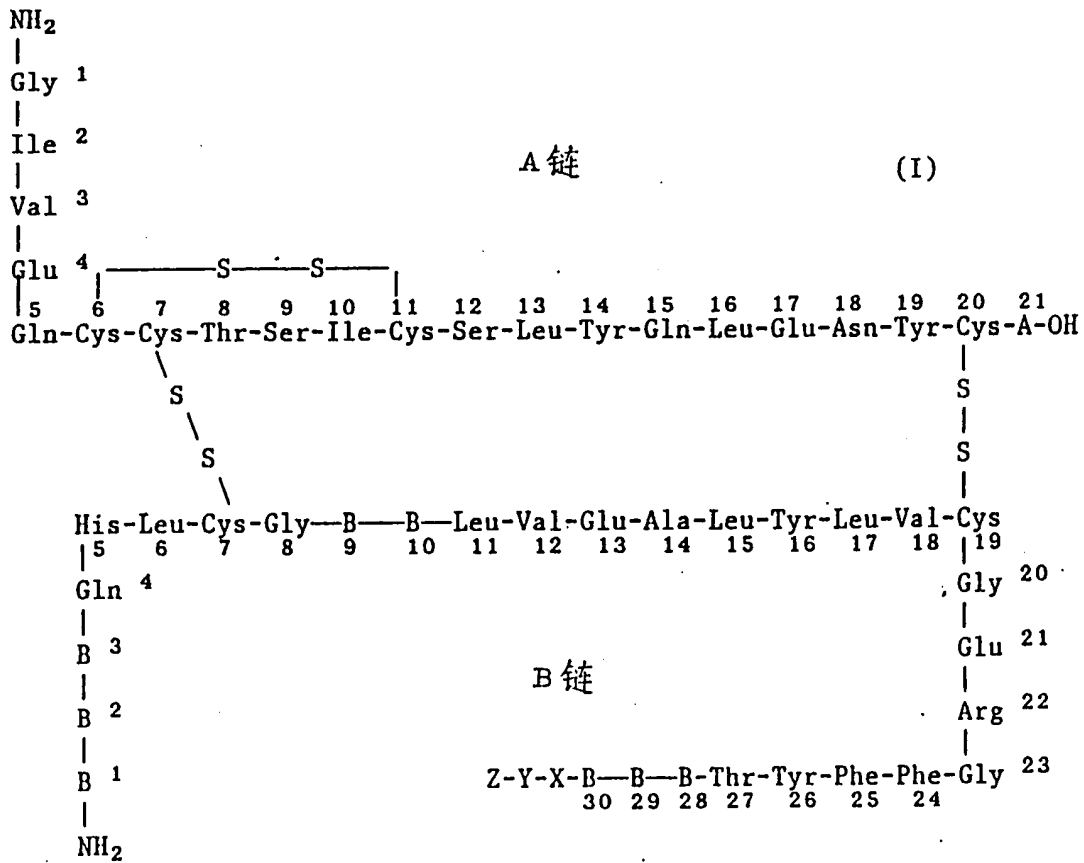
2. 按权利要求1的方法，其中A21是天冬酰胺，B1是苯丙氨酸，B2是缬氨酸，B3是天冬酰胺，B10是组氨酸，B28是赖氨酸，B29是L-脯氨酸，Z是-OH, X没有，Y没有。

说 明 书

胰岛素类似物的制备方法

本发明涉及经过在天然人胰岛素 B 链的第 29 位氨基酸和其他可选择位点的修改而得到的胰岛素类似物。所说的胰岛素类似物不易于聚合或自我联合成大分子形式，从而具有相对较快的活化作用，并且保留了天然人胰岛素的生物活性。

本发明提供了具如下结构式的胰岛素类似物



其中A 2 1是丙氨酸、天门冬酰胺、天门冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸或丝氨酸；B 1是苯丙氨酸、天门冬氨酸或者缺失；B 2是缬氨酸或在B 1不存在时缺失；B 3是天门冬酰胺或天门冬氨酸；B 9是丝氨酸或天门冬氨酸；B 1 0是组氨酸或天门冬氨酸；B 2 8是任一种氨基酸；B 2 9是L-脯氨酸、D-脯氨酸、D-羟脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-(N-甲基赖氨酸)、D-赖氨酸、L-(N-甲基精氨酸)或D-精氨酸；B 3 0是丙氨酸、苏氨酸或者缺失；Z是-OH、-NH₂、-OCH₃或-OCH₂CH₃；X是Arg、Arg-Arg、Lys、Lys-Lys、Arg-Lys、Lys-Arg或者缺失；而Y可以是只有当X存在时才存在，如果存在，则可以是谷氨酸，或者是一个含有下列全部或部分顺序的氨基酸顺序：-Glu-Ala-Glu-Asp-leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-，而且Y的顺序以上述顺序的N端谷氨酸为起点。

本文还公开和申请了一种治疗高血糖症的方法，该方法是在病人需要时给以有效量的结构I的胰岛素类似物。而且，本文还公开和申请了一些由有效量的结构I的胰岛素类似物和一种或多种医药上可接受的赋形剂组成的药物组合物。

本文所提供的附图没有按实际比例描绘。

图1是质粒p K C 2 8 3的切割位点和功能图。

图2是质粒p K C 2 8 3 P X的切割位点和功能图。

图3是质粒p K C 2 8 3 -L的切割位点和功能图。

图4是质粒p K C 2 8 3 -L B的切割位点和功能图。

图 5 是质粒 p_{KC283-PRS} 的切割位点和功能图。

图 6 是质粒 p_{L32} 的切割位点和功能图。

图 7 是质粒 p_{NM789} 的切割位点和功能图。

图 8 是质粒 120 的结构略图。

图 9 是质粒 p_{L47} 的切割位点和功能图。

图 10 是质粒 p_{PR12} 的切割位点和功能图。

图 11 是质粒 p_{PR12AR1} 的切割位点和功能图。

图 12 是质粒 p_{L110} 的切割位点和功能图。

图 13 是质粒 p_{L110C} 的结构略图。

图 14 是质粒 p_{CZR126S} 的切割位点和功能图。

图 15 是合成的人胰岛素原基因的核苷酸顺序。

图 16 是质粒 p_{RB145} 的切割位点和功能图。

图 17 是质粒 p_{RB164A} 的切割位点和功能图。

图 18 是质粒 p_{RB172} 的切割位点和功能图。

图 19 是质粒 p_{RB173} 的切割位点和功能图。

图 20 是质粒 p_{RB175} 的切割位点和功能图。

结构式 I 代表本发明胰岛素类似物的氨基酸顺序略图。氨基酸缩写字母具有下列常规含义：

缩写	氨基酸
A b a	α-氨基丁酸
A l a	丙氨酸
A r g	精氨酸
A s n	天门冬酰胺
A s p	天门冬氨酸

C y a	磺基丙氨酸
C y s	半胱氨酸
G l n	谷氨酰胺
G l u	谷氨酸
G l y	甘氨酸
H i s	组氨酸
I l e	异亮氨酸
L e u	亮氨酸
L y s	赖氨酸
M e t	蛋氨酸
N l e	正亮氨酸
N v a	正缬氨酸
O r n	鸟氨酸
P h e	苯丙氨酸
P r o	脯氨酸
S e r	丝氨酸
T h r	苏氨酸
T r p	色氨酸
T y r	酪氨酸
V a l	缬氨酸

B 2 8 可以是任何天然或非天然产生的氨基酸。所说的氨基酸最好是天门冬氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、脯氨酸、精氨酸、组氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸或甘氨酸。在上述氨基酸中，其中优选的亚组为天门冬氨酸、缬氨酸、亮

氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、脯氨酸、精氨酸、组氨酸、鸟氨酸或赖氨酸。赖氨酸是 B 2 8 的最佳氨基酸选择。B 2 9 最好是 L-脯氨酸、D-脯氨酸、D-羟脯氨酸或 L-羟脯氨酸。本发明的最佳胰岛素类似物是一种 B 2 8 是赖氨酸而 B 2 9 是脯氨酸的胰岛素类似物，也就是说，将天然人胰岛素 B 链氨基酸顺序中的 B28 和 B29 位点进行颠倒。

如上所述，另一种方案是，当 B 2 8 是 L-脯氨酸时，位点 B29 优选 L-(N-甲基赖氨酸)、D-赖氨酸、L-(N-甲基精氨酸) 或 D-精氨酸。这种方案的最佳胰岛素类似物中 B 2 8 是 L-脯氨酸而 B 2 9 是 L-(N-甲基赖氨酸) 或 D-赖氨酸。

下面还讨论了本发明胰岛素类似物的进一步修改，也就是说，在位点 B 2 8 和 B 2 9 以外的位点处对胰岛素类似物进行修改。尤其是希望用丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸或丝氨酸在 A 链的 2 1 位点处（也即羧端）随意地取代天冬酰胺残基，如果进行取代，最好用丙氨酸取代。同样，可在 B 链的位点 3 处用天冬氨酸取代天冬酰胺残基。这种可选择地取代可以有效地增加胰岛素类似物在 pH 极端状态下的稳定性，因为天冬酰胺在低 pH 和高 pH 下都特别易于脱酰胺和出现重排反应。熟练的技术人员也会认为，胰岛素类似物的谷氨酰胺基团同样易于脱酰胺和重排。因此，对谷氨酸进行取代也属本发明的范围。另外，对本发明胰岛素类似物的可选择修改还包括（可与其他任何修改相结合）用天冬氨酸在 B 1 0 位取代组氨酸；用天冬氨酸在 B 1 位取代苯丙氨酸；用丙氨酸在 B 3 0 位取代苏氨酸；用天冬氨酸在 B 9 位取代丝氨酸；单独使 B 1 位的氨基酸缺失（des-B 1）或同时使 B 2 位的氨基酸缺失（des-B 2）；和

B 3 0 位的苏氨酸缺失 (des - B 3 0)。

对本发明的胰岛素类似物的修改还可在 B 3 0 末端加上任何一种下列氨基酸或二肽: Arg、Arg-Arg、Lys、Lys-Lys、Arg-Lys 或 Lys-Arg。如果存在这些基团, 在结构式 I 中用 X 表示。进行这种延伸时, 最好是用 Arg-Arg。

另外, 如果进行上述 B 3 0 处的伸展, 还可以进一步对该类似物进行修改, 方法是在得到的 B 3 0 延伸后的末端加上谷氨酸或含有下列全部或部分顺序的氨基酸顺序: -Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-, 该顺序的 N 端以谷氨酸开始。如果加上这个氨基酸或顺序, 在结构式 I 中以 Y 基团表示。如果该顺序只是上述顺序的一部分, 它可以是以该顺序的 N 端为起点的任何部分, 也就是说以谷氨酸为起点。

在上述中, X 或 X 与 Y 的结合代表了存在于人胰岛素原中的全部或部分连接肽, 人胰岛素原是天然人胰岛素形成中的生物学前体。

Y 的优选顺序是:

-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-
Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-
Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-;
-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-
Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-
Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-;
-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-
Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-
Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-;

-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-
Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-
Leu-Glu-;
-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-
Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-;
和
-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-.

另外，不论 x 是单独还是与 y 同时存在或不存在，末端基团 z 可以是下列基团的任何一种： $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OCH_3$ 或 $-OCH_2CH_3$ 。最好是 $-OH$ 。

如上所述，本发明还包括胰岛素类似物的医药上可接受的盐。这些盐最好是它的锌盐、钠盐、钾盐、镁盐或钙盐。

可以采用任何一种公认的肽合成技术制备本发明的胰岛素类似物，这些技术包括古典方法（溶液法）、固相法、半合成法和最近出现的 DNA 重组法。

在固相方法中，氨基酸顺序的构建是从一个起始的、不溶性的、树脂支持的 C 端氨基酸依次进行的。对固相法的描述见 J. Stewart 等，《固相肽合成》，Freeman and Co., San Francisco, 1969。

一般情况下，在固相方法中，将与所需肽的 C 端氨基酸残基相对应的氨基酸固定于一个不溶的树脂支持物上，然后即可从树脂支持的 C 端氨基酸开始形成肽链。依次加上单个氨基酸直至得到所要求的氨基酸顺序。也可以制备小的肽片段，然后按照所需顺序加到肽链上。在整个合成过程中肽链保持固定于树脂上，而当肽链合成完成时，即将肽链从树脂上分离下来。

可以通过在C端部分的羧基与树脂基质上作为连接点的特定亚甲基之间形成酯键，将肽链连接到聚苯乙烯树脂上。

可用现有技术中的已知方法将氨基酸连接在一起以形成肽键。一种方法是，将氨基酸转化成一种衍生物，使得羧基更易于和肽片段的自由N端氨基发生反应。例如，可通过使保护的氨基酸与氯甲酸乙酯、氯甲酸苯酯、氯甲酸仲丁酯或氯甲酸异丁酯发生反应，而把氨基酸转化成一种混合酐。也可以把氨基酸转化成一种活性酯，如一种2, 4, 5-三氯苯酯、一种五氯苯酯、一种对硝基苯酯、一种N-羟基琥珀酰亚胺酯或一种由1-羟基苯并三唑形成的酯。

另外一种连接方法包括使用一种合适的连接剂，如N, N'-二环己基碳二亚胺(DCC)或N, N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)。其他合适的连接剂对于现有技术中的专业人员来说是显而易见的。见Schroder和Lubke, 《肽》, Academic Press, 1965, 第3章, 本文对此进行了参考。

应当指出, 在连接反应中必须对肽合成中所用的每个氨基酸的 α -氨基进行保护, 以防止出现涉及活性 α -氨基功能的副作用。还应当指出的是, 某些氨基酸含有活性的侧链功能团(如巯基、 ϵ -氨基、 β -和 γ -羧基、咪唑、胍基和羟基等), 而且在起始和依次连接步骤中必须对这些功能团进行保护。适宜的保护基团在现有技术中是已知的。例如, 参见《有机化学中的保护基团》, M. McOmie, editor, Plenum Press, N Y, 1973和US 4, 617, 149。本文对此进行了参考。

在选择某一特定保护基团时, 必须考虑到某些条件。一个 α -氨基保护基团(1)必须使得 α -氨基在发生连接反应的情况下不具备

功能活性，(2)必须在完成连接反应之后，在不去掉侧链保护基团和不改变肽片段结构的情况下易于去除，(3)必须排除在连接之前活化时的消旋可能性。一个侧链保护基团(1)必须使得侧链功能团在连接反应中不具备活性，(2)必须在去除 α -氨基保护基团的条件下处于稳定状态，(3)必须是在不改变肽链结构的反应条件下完成所需氨基酸顺序后易于去掉的。

已知可用于肽合成的这些保护基团对于去除它们时所用试剂的反应活性各不相同，这对于现有技术中的专业人员来说是显而易见的。例如，某些保护基团，象三苯甲基和2-(对-联苯基)异丙基氧羰基都非常不稳定，在轻度酸性条件下即可被切割下来。其他保护基团，象t-丁基氧羰基、t-戊基氧羰基、金刚烷基氧羰基和p-甲氧苄氧羰基都较稳定，需要稍强的酸，象三氟乙酸、盐酸或三氟化硼乙酸才能将它们去除。还有一些保护基团，象苄氧基羰基、卤苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、环烷氧基羰基和异丙基氧羰基甚至更稳定，要去除它们，需要更强的酸，象氟化氢、溴化氢或在三氟乙酸中的三氟乙酸硼。

当所需肽顺序合成完毕后，要将已保护的肽从树脂支持物上切割下来，并且去掉所有的保护基团。切割反应和保护基团的去除可以同时进行或逐步进行。如果树脂支持物是一种氯甲基化的聚苯乙烯树脂，将肽固定于该树脂上的键则是一种C端部分的自由羰基与树脂上存在的许多氯甲基中的一种之间形成的酯键。

应当指出，可以用已知能够切割酯键和能够透过树脂的试剂使固定键分离。一种尤其方便的方法是用液态的无水氟化氢进行处理。这种试剂不仅可以使肽从树脂上分离下来，而且还可以去掉所有的保护

基团。因此，使用这种试剂可以直接得到完全脱保护的肽。如果需要分离下肽而不去掉保护基团，可以将保护的肽—树脂进行甲醇分析，而得到C端羧基甲基化的被保护肽。然后可将甲酯在轻度碱性条件下进行水解，得到自由C端羧基。之后可用一种强酸如液态氟化氢进行处理，去掉肽链上的保护基团。一种尤为有用的甲醇分析法见G。

Moore 等人，《肽》，Proc. 5th Amer. Pept. Symp., M. Goodman 和 J. Meienhofer 编，John Wiley, NY, 1977, pp. 518—521，该方法是，在冠醚的存在下，用甲醇和氰化钾对已保护的肽—树脂进行处理。

另一种方法是通过氨解作用或通过用胍进行处理将已保护的肽从树脂上分离下来。如果需要，可以将得到的C端酰胺或胍水解成自由C端羧基，并且将保护基团按常规去掉。

还应当指出的是，最好在将保护的肽从树脂支持物上分离下的同时或之前，就把N端 α -氨基上的保护基团去掉。

也可以通过DNA重组技术制备本发明的胰岛素类似物的A和B链。在制备过程中，使用现有的常规合成技术制备可编码A或B链所需肽的核苷酸顺序。这些方法一般包括，制备一些可用于编码那些所需编码顺序的片段及其互补顺序的寡核苷酸。所设计的寡核苷酸能够将一个编码顺序的片段和两个互补顺序的片段进行重迭，并且反过来也这样。将寡核苷酸配对，并且连接在一起，最后制得所需基因顺序。

将该顺序插到一个克隆载体的某个位置以使它所编码的肽产物得以表达。一个合适的克隆载体至少含有一部分某种基因的表达控制顺序。

还可以使用DNA重组方法，用一种胰岛素原样前体制备本发明

胰岛素类似物的A和B链。见Frank等,《多肽:合成—结构—功能》,Proc. 7th Am. Pept. Symp., Eds. D. Rich和E. Gross编(1981),本文对此进行了参考。

将不管怎样制备的单个A链和B链结合在一起,可以采用Chance等人的方法,见Chance等,《多肽:合成,结构和功能:第七届美国肽专题论文集》,1981,本文对此进行了参考。

下列实例作为对本发明的解释,但不限制本发明。

实例1 Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

A. 用重组法制备A链

通过DNA重组法制备人胰岛素A链,即化学合成编码A链的基因并使其在大肠杆菌中表达。简单地说,就是通过磷酸酯片段法,用各种三核苷酸合成10—15核苷酸长度的合成片段以制备A链基因。这个基因具有EcoRI和BamHI限制性核酸内切酶的单链粘性末端。将它插到一个含有 β -半乳糖苷酶基因(β -gal)的适宜表达载体中,可得到一个使A链通过蛋氨酸密码连接到 β -半乳糖苷酶基因上的嵌合质粒。最好用色氨酸合成酶基因(trpLE')替代 β -半乳糖苷酶基因作为启动子以达到更高水平的表达。将嵌合质粒转移到大肠杆菌内以表达前体蛋白,即 β -gal-met-A链(或当使用色氨酸启动子系统时是trpLE'-met-A链)。在纯化后用溴化氰对该前体蛋白进行处理以切断蛋氨酸键,得到人胰岛素A链。通过氧化型亚硫酸解(sulfitolysis)可以得到S-磺化的A链,用它和下面所说的B链(S-磺化)进行结合。

有关人胰岛素A链基因化学合成的全部详细情况见Crea等人,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5765—5769, 1978 以及该文所引用的参考文献。本文参考了这些文献。有关人胰岛素 A 链的化学合成基因在大肠杆菌内表达的全部详细资料见 Goeddel 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 101—110, 1979 以及该文中所引用的参考文献。本文对此进行了参考。

B. 制备 B 链类似物 (Lys(B28), Pro(B29))

使用 Applied Biosystems 公司的 430 A 型肽合成仪 (包括软件转换 1.4) 来制备粗制肽基树脂。使用 0.5 毫摩尔 (mmol) 的起始固相树脂 (t-BOC-Thr(Bzl)OCH₂ Pam 树脂) (0.76 mmol/g × 0.658 g)。所使用的全部氨基酸用 BOC 进行保护, 而且除谷氨酸和组氨酸外, 所有氨基酸可以在买来后直接使用 (也就是 Applied Biosystems 公司的储存管, 每个储存管容有大约 2 mmol 的保护氨基酸)。从国际肽公司 (Peptides International Corporation) 得到谷氨酸和组氨酸, 并将它们转移到储存管中, 使每个储存管容有大约 2 mmol 的所需保护氨基酸。将粗制肽基树脂干燥 (在真空室温下过夜) 后, 测定其重量, 并与起始重量比较以确定合理的重量增值。取一小部分样本进行氨基酸分析, 以确保所要的氨基酸是以正确数量加入的。

通过在含有 10 份 (V/W) HF (含有 5% V/V 乙硫醇和 5% V/V 间甲酚) 和 1 份肽基树脂的溶液在 0 °C 下搅拌大约 1 小时, 将肽从肽基树脂上分离下来并去除对侧链的保护。利用真空将大部分 HF 去掉后在乙醚中使肽沉淀。用乙醚冲洗几次后进行真空过滤, 将肽溶于大约 200 ml 的含有 0.1 M Tris, 0.1 M

Na_2SO_3 和 $0.01\text{ M Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 的 7 M 去离子尿素中。用 5 N NaOH 将溶液 pH 调至 8.5 ，并在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下有力地搅拌过夜。

在室温下将得到的 S -碘化肽溶液置于一个 $5 \times 215\text{ cm}$ 的 Sephadex G-25 柱(细)上。用 50 mM 碳酸氢铵在室温下以 20 ml/分 的速度洗脱样品。在 276 nm 监测流出液。收集 20 ml 的组分，合并所需组分，如下面所述用高效液相层析(HPLC)进一步纯化。

将所需组分的合并液抽到 $2.5 \times 30\text{ cm DuPont C8, 9-12 }\mu\text{m HPLC}$ 的柱上，并在室温下用在 100 mM 碳酸氢铵中含有以线性梯度增加的乙腈的溶液洗脱(2.6 ml/min)。在 280 nm 波长下监测流出液。收集 25 ml 的组分。用分析型 HPLC 对选择组分进行分析，确定哪些组分需要保留。合并所需组分并冻干，以便在与上述制备的 A 链结合时使用。

C. 制备 Lys(B28) ， Pro(B29) 人胰岛素

用上述 Chance 等人的方法将 A 和 B 链进行结合。在环境温度下，分别将 700 mg 的 DNA 重组法制备的 A 链 S -碘化物和 140 mg 合成的 Lys(B28) ， Pro(B29) B 链 S -碘化物(二者都如上述得到)分别溶于 70 ml 和 14 ml 0.1 M 甘氨酸缓冲液中。用 5 N NaOH 将每个缓冲液调至 $\text{pH } 10.5$ ，然后冷却到 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 。在环境温度下，在 0.1 M 甘氨酸缓冲液中以 10.5 mg/ml 浓度制备 6 ml 的二硫苏糖醇(DTT)溶液，并用 5 N NaOH 调至 $\text{pH } 10.5$ ，然后冷却到 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 。

将 A 和 B 链溶液混合，然后快速加入 5.21 ml DTT 溶液($\text{SH/SSO}_3^- = 0.90$)。将反应液在敞开的 200 ml 玻璃

离心瓶中在 5 °C 下搅拌 2.5 小时。再加入 45 ml 冰乙酸并将该溶液在 5 °C 放置过夜。

将得到的沉淀混合物在 5 °C 下以 2000 rpm 离心 20 分钟。将上清液和沉淀物的 1 M 乙酸洗涤液混合，在 5 °C 下置于在 1 M 乙酸中的 5 × 200 cm Sephadex G-50 (超细) 柱上，靠重力洗脱。在三天内收集 20 分钟的组分。在 276 nm 波长下监测组分，有些则用分析型 HPLC 分析。将含有胰岛素类似物 Lys (B28)，Pro (B29) 顺序的组分合并，冻干后得到 125 mg 样品。通过反相 HPLC 将此样品进一步纯化 (使用 2.12 × 25 cm DuPont C8 柱，在室温下以 2.6 ml/分的速度，用 0.1 M NaH₂PO₄ 中含有以线性梯度增加的乙腈的 pH 2.2 溶液洗脱)。在 276 nm 波长下监测流出液。将选择的组分用分析型 HPLC 进行测定。合并所需组分，并用下述的 pH 7 的 HPLC 进一步纯化。

将低 pH HPLC 制备中的合并液用 0.1 M (NH₄)₂HPO₄ 在冰浴中稀释大约 2 倍。用冷却的 2 N NaOH 在冰浴中将 pH 调至 7。使用低 pH 制备中所用的相同条件，将该样品置于同样的 HPLC 柱上洗脱，只是洗脱缓冲液改为 0.1 M pH 7 (NH₄)₂HPO₄ / 乙腈。

将在 pH 7 HPLC 制备中的合并液在冰浴中冷却，并用 0.1 % 三氟乙酸水溶液 (TFA) 将其稀释 2 倍。加入 1 N HCl (冷的，将样品置于冰浴中) 使 pH 降至 3。将该样品置于 Vydac C4 或 DuPont C-8 HPLC 柱上 (2.12 × 25 cm)，并用乙腈浓度以线性梯度增加的 0.1 % TFA 水溶液洗脱。在 214 nm 波长下或 276 nm 波长下监测流出液。合并所需组分并冻干，经过反相

HPLC 纯化, 得到 41 mg 所需类似物, 纯度大于 97%。

实例 2 Lys(B28), Pro(B29) 人胰岛素

第二种制备 Lys(B28), Pro(B29) 人胰岛素的方法是使用酶促半合成法(反向蛋白水解法), 用一种合成的八肽与缺八肽胰岛素 (A_1-21-B_1-22) 结合。该缺八肽胰岛素可通过将天然猪或人胰岛素用胰蛋白酶消化而获得。有关描述见 Bromer 和 Chance “缺八肽胰岛素的制备和特征”, *Biochim. Biophys. Acta* 133: 219-223 (1967), 本文对此进行了参考。通过上述的自动固相合成方法可制备合成八肽, Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Lys-Pro-Thr。

将缺八肽胰岛素 (435 mg) 和 465 mg 合成的 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Lys-Pro-Thr 在 15 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1,4-丁二醇 (1,4-butanediol) 和 1 份 0.25 M pH 7.3 的 Tris 乙酸盐缓冲液的溶液中结合。通过在电炉上加热溶液使多肽完全溶解。然后在 37 °C 保温该溶液, 加入 90 mg 猪胰蛋白酶。在 37 °C 下不时地搅拌该溶液 90 分钟。向溶液中加入 135 ml 0.05 N HCl 以终止该反应。

将含有类似物的酸化溶液置于一个 2.5 × 2.5 cm C8 Zorbax HPLC 柱上, 用乙腈浓度呈线性梯度增加的 0.1M 磷酸二氢钠 pH 2.2 缓冲液洗脱, 以纯化本实例的胰岛素类似物。在 276 nm 波长下监测流出液。合并所需组分, 用水稀释 2 倍, 然后置于 1 × 2.5 cm C8 Ultrasphere HPLC 柱上。用乙腈浓度呈线性增加的 0.5% TFA 水溶液洗脱胰岛素类似物。在 276 nm

波长下监测流出物。再合并所需组分并冻干，得到 125 mg 的纯胰岛素类似物。通过氨基酸分析（表 I）和质谱分析（MS）来验证其结构。

MS: 5809.2 (理论值: 5808.7)

用 VG-ZAB-25E 双聚焦质谱仪在大约 1500 的分辨率下进行快速原子轰击——质谱分析测定。将人胰岛素类似物溶于由甘油和含草酸的硫甘油组成的混合溶液中。用碘化铯进行从 m/z 5300 到 m/z 6500 的磁扫描以校准该仪器。所测得数据以平均值 + 1 表示。

实例3 Aba(B28), Pro(B29)人胰岛素

在含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的 13 ml 溶液中, 在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (384 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Aba-Pro-Thr (362 mg) 结合。加入猪胰蛋白酶 75 mg。充分混合该溶液, 并于 37 °C 下不时地搅拌 120 分钟。

此时将该混合液加到 137 ml 0.05 N HCl 中终止该反应。将全部溶液抽到 21 × 250 mm C8 Zorbax 柱子上, 并用含有低 (shallow) 乙腈梯度的 0.1 M 磷酸二氢钠 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的适当的组分, 用水稀释 2 倍, 然后抽到 25 × 300 mm C-18 Vydac 柱子上。用含有乙腈梯度的 0.5% 三氟乙酸溶液从该柱子中对脱盐蛋白进行洗脱。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干, 得到 59 mg 胰岛素类似物。通过

氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)来验证其结构。

MS: 5765.7 (理论值: 5765.6)

实例4 Ala(B28), Pro(B29)人胰岛素

在10ml含有1份二甲亚砜、2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH7.3缓冲液的溶液中,在37℃下使猪缺八肽胰岛素(290mg)和合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Ala-Pro-Thr(310mg)结合。加入猪胰蛋白酶60mg。将该溶液充分混合,并在37℃下不时地搅拌60分钟。

此时将该反应液加到90ml 0.05N HCl中终止该反应。将全部溶液抽到21×250mm C-8 Zorbax柱子上,并用含有低乙腈梯度的0.1M磷酸二氢钠pH2缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC确定的合适的组分,用水稀释2倍,然后抽到10×250mm C-8 Ultrasphere柱子上,用含有乙腈梯度的0.5%三氟乙酸溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯胰岛素类似物的组分并冻干得到43mg。通过氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5752.3 (理论值: 5751.6)

实例5 Arg(B28), Pro(B29)人胰岛素

在10ml含有1份二甲亚砜、2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH7.3缓冲液的溶液中,于37℃下使猪缺八肽胰岛素(290mg)和合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Arg-Pro-Thr(310mg)结合。加入猪胰蛋白酶(60mg)。将

该溶液充分混合，并在37℃下不时地搅拌60分钟。

此时将该混合液加到90 ml 0.05 N HCl 中终止该反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax 柱子上，并用含有低乙腈梯度的0.1 M 磷酸二氢钠 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分，用水稀释2倍，然后抽到10×250 mm C-8 Ultrasphere 柱子上。用含有乙腈梯度的0.5% 三氟乙酸溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯胰岛素类似物的组分并冻干得到103 mg。通过氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)来验证其结构。

MS: 5836.1 (理论值: 5836.7)

实例6 Asn (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在14ml含有1份二甲亚砷、2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中，在37℃下使猪缺八肽胰岛素(409 mg)和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Asn-Pro-Thr (398 mg) 结合。加入猪胰蛋白酶81 mg。将该溶液充分混合并在37℃下不时地搅拌120分钟。

此时把该混合溶液加到136 ml 0.05 N HCl 中终止该反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax 柱子上，用含有低乙腈梯度的0.1 M 磷酸二氢钠 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分，用水稀释2倍，然后抽到25×300 mm C-18 Vydac 柱子上。用含有乙腈梯度的0.5% 三氟乙酸溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到56 mg。通过氨基酸分析(表I)和质

谱分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5794.7 (理论值: 5794.6)

实例7 Asp (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在13ml含有1份二甲亚砜, 2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中, 在37℃下使猪缺八肽胰岛素 (400 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Asp-Pro-Thr (388 mg) 结合。加入猪胰蛋白酶78 mg。将该溶液充分混合并在37℃不时地搅拌120分钟。

此时把该混合溶液加到137 ml 0.05 N HCl 中终止其反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax 柱子上, 并用含有低乙腈梯度的0.1 M 磷酸二氢钠 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的适当的组分, 用水稀释4倍, 然后抽到25×300 mm C-18 Vydac 柱子上。用含有乙腈梯度的0.1% 三氟乙酸溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到85 mg。通过氨基酸分析 (表I) 和质谱分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5795.7 (理论值5795.6)

实例8 Asp (B10), Lys (B28), Pro (B29) 人胰岛素

A. 制备 Asp (B10), Lys (B28), Pro (B29) 人胰岛素 B链

使用 Applied Biosystems 公司的430 A型肽合成仪 (包括软件转换1.4) 来制备粗制肽基树脂。使用0.5 mmol 的

起始固相树脂 ($t\text{-BOC-Thr(Bzl)OCH}_2$ Pam 树脂) ($0.72 \text{ mmol/g} \times 0.705 \text{ g}$)。所用全部氨基酸用 BOC 保护, 除谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸外, 所有氨基酸可以在买来后直接使用 (也即 Applied Biosystems 公司的储存管; 每个储存管含有大约 2 mmol 的保护氨基酸)。从商业上得到谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸, 并转移到储存管中, 使每个储存管含有大约 2 mmol 的所需保护氨基酸。将粗制肽基树脂在真空室温下干燥过夜, 并将其重量与起始重量加以比较以确定合理的重量增值。取一小部分样品进行氨基酸分析以保证所需氨基酸是以正确比例加上的。

通过将 10 份 (V/W) HF (含有 5% V/V 对硫甲酚和 5% V/V 间甲酚) 和 1 份肽基树脂一起在 0°C 下搅拌约 1 小时, 把肽从肽基树脂上分离下来, 并去除对侧链的保护。通过真空将大部分 HF 去除后使肽在乙醚中沉淀。用乙醚冲洗几次后经真空过滤, 然后将肽溶于大约 120 ml 含有 0.1 M Tris , $35 \text{ mg/ml Na}_2\text{SO}_3$ 和 $25 \text{ mg/ml Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 的 8 M 盐酸胍 $\text{pH } 11$ 溶液中。用 5 N NaOH 将该溶液调至 $\text{pH } 8.8$, 并在室温下有力地搅拌 3 小时。

将得到的 S-磺化肽溶液在室温下置于 $5 \times 215 \text{ cm}$ 的 Sephadex G-25 柱子上 (中等)。用 50 mM 碳酸氢铵在室温下以 21 ml/分 的速度洗脱该样品。在 276 nm 波长下监测流出液。收集每 25 ml 一份的组分, 将所需组分汇集在一起用下述高效液相色谱分析 (HPLC) 进一步纯化。

把收集的所需组分抽到 $2.5 \times 30 \text{ cm}$ DuPont C8, 9-12 μ HPLC 柱子上, 并且用乙腈以线性梯度增加的 100 mM 碳酸氢铵在室温下洗脱 (2.6 ml/分)。在 280 nm 下监测流

出液。收集 25 ml 一份的组分。对所选择的组分进行分析型 HPLC 分析以确定哪部分需要保留。将所需组分合并在一起并冻干，以用于下一步与 A 链的结合。

B. 使 Asp (B10), Lys (B28), Pro (B29) 人胰岛素 B 链和人胰岛素 A 链结合

用上述 Chance 等人的方法进行 A 和 B 链的结合。在环境温度下将 2 g 的 DNA 重组法得到的 A 链 S-碘化物和 400 mg 合成的 Asp (B10), Lys (B28), Pro (B29) B 链 S-碘化物分别溶于 200 ml 和 40 ml 的 0.1 M 甘氨酸缓冲液中，用 5 N NaOH 将每个溶液调至 pH 10.5，然后冷却至 5℃。在环境温度下用 0.1 M 甘氨酸缓冲液制备浓度为 15.5 mg/ml 的 DTT 溶液，用 5 N NaOH 调至 pH 10.5，然后冷却至 5℃。

将 A 和 B 链溶液进行结合，然后快速加入 15.9 ml DTT 溶液 ($SH/SSO_3^- = 1.0$)。在 4℃ 下于一个散开的 200 ml 玻璃离心瓶中将该溶液搅拌 19.6 小时。加入冰乙酸 (129 ml)，并将该溶液在 4℃ 下放置 1 小时。

将得到的沉淀混合物在 4℃ 下以 2000 rpm 离心 30 分钟。取上清液与 292 ml 的 milli-Q 水和 73 ml 乙腈混合，并通过反相 HPLC (用 2.5 × 30 cm Vydac C18 柱子，在室温下用 0.1 M NaH_2PO_4 中乙腈以线性梯度增加的 pH 2.1 的溶液以 2.6 ml/分的速度洗脱) 进一步纯化。在 280 nm 下监测流出液。用分析型 HPLC 对所选择组分进行测定，合并所需组分，用 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液稀释 2 倍，然后置于 Ultrasphere octyl HPLC 柱 (1.0 × 25 cm)，用含乙腈线性梯度增加的 0.1% TFA 水溶液洗脱，在 280 nm 下监测流出液。用分析型 HPLC 对所选择组分进行测定，合并所需组分，

用上述同样的柱子和条件，只是乙腈的梯度略有不同，进行再纯化。合并合适的组分并冻干，得到65mg胰岛素类似物，通过反相HPLC得到的纯度大于93%。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5786.1(理论值5786.7)

实例9 Cya(B28), Pro(B29)人胰岛素

用过甲酸氧化将八肽中的半胱氨酸转化成磺基丙氨酸。在一个冰冷却的瓶子中，将合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Cys-Pro-Thr(363mg)溶于36ml新制备的过甲酸中，并轻轻搅拌1小时。用水将氧化物稀释10倍并冻干。该冻干物用于半合成过程。

在37℃下将缺八肽猪胰岛素(222mg)和合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Cya-Pro-Thr(225mg)在18ml含有1份二甲亚砜，2份1,4-丁二醇和1份0.25M Tris pH 7.3缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶45mg。充分混合该溶液，并在37℃下不时地搅拌120分钟。

将该反应液加到242ml 0.05N HCl中以终止该反应。把全部溶液置于一个21×250mm C-8 Zorbax柱子上，用0.1M磷酸二氢钠pH 2缓冲液中含有低乙腈梯度的溶液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC确定的适当的组分，用水稀释2倍，然后抽到25×300mm C-18 Vydac柱子上。用0.5%三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到16mg。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5831.5(理论值5831.7)

实例 10 Gln (B 2 8), Pro (B 2 9) 人胰岛素

在 3 7 °C 下使猪缺八肽胰岛素 (2 9 0 m g) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Gln-Pro-Thr (3 1 0 m g) 在 1 0 m l 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0. 2 5 M Tris pH 7. 3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 (6 0 m g)。充分混匀该溶液并在 3 7 °C 下不时搅拌 6 0 分钟。

把反应液加到 9 0 m l 0. 0 5 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到 2 1 × 2 5 0 m m C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0. 1 M 磷酸二氢钠 pH 2 缓冲液中含有低乙腈梯度的溶液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 用水稀释 2 倍, 然后抽到 1 0 × 2 5 0 m m C-8 Ultrasphere 柱子上。用 0. 5 % 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 8 7 m g。用氨基酸分析 (表 I) 和质谱分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5 8 0 9. 4 (理论值 5 8 0 8. 6)

实例 1 1 Glu (B 2 8), Pro (B 2 9) 人胰岛素

在 3 7 °C 下使缺八肽猪胰岛素 (4 0 2 m g) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Glu-Pro-Thr (3 9 8 m g) 在 1 4 m l 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0. 2 5 M Tris pH 7. 3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 (8 0 m g)。充分混匀该溶液并在 3 7 °C 下不时搅拌 1 2 0 分钟。

将反应液加到 1 3 6 m l 0. 0 5 N HCl 中以终止该反应。把全部溶液抽到 2 1 × 2 5 0 m m C-8 Zorbax 柱子上, 并用

0. 1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分，用水稀释 4 倍，然后抽到 25 × 300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 59 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5809.6 (理论值: 5809.6)

实例 12 Gly (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素(412 mg)和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Gly-Pro-Thr (376 mg) 在 13 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1,4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶(79 mg)。充分混匀该溶液, 并在 37 °C 下不时地搅拌 180 分钟。

将该反应液加到 147 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。把全部溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 用水稀释 4 倍, 然后抽到 25 × 300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.1% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子上洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 11 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5737.2 (理论值 5737.6)

实例 13 His (B 2 8), Pro (B 2 9) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (4 0 0 m g) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-His-Pro-Thr (3 9 8 m g) 在 1 3 m l 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4 - 丁二醇和 1 份 0. 2 5 M Tris p H 7. 3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 (7 9 m g)。充分混合该溶液并在 37 °C 下不时地搅拌 1 2 0 分钟。

此时将该反应液加到 2 3 7 m l 0. 0 5 N HCl 中以终止该反应。把全部溶液抽到 2 1 × 2 5 0 m m C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0. 1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 p H 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 H P L C 确定的合适的组分, 用水稀释 4 倍, 并抽到 2 5 × 3 0 0 m m C-1 8 Vydac 柱子上。用 0. 1 % 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 7 9 m g。用氨基酸 (表 I) 和质谱分析 (M S) 验证其结构。

M S: 5 8 1 6. 9 (理论值 5 8 1 7. 7)

实例 1 4 Ile (B 2 8), Pro (B 2 9) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (4 0 9 m g) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Ile-Pro-Thr (3 9 8 m g) 在 1 3 m l 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4 - 丁二醇和 1 份 0. 2 5 M Tris p H 7. 3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 (8 1 m g)。充分混合该溶液并在 37 °C 下不时地搅拌 1 2 0 分钟。

此时把该反应液加到 1 3 6 m l 0. 0 5 N HCl 中以终止该

反应。将全部溶液抽到 21×250 mm C8 Zorbax 柱子上。并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分，用水稀释 2 倍，然后抽到 25×300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 57 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5793.7 (理论值 5793.7)

实例 15 Leu(B28), Pro(B29)人胰岛素

在 37°C 下将猪缺八肽胰岛素(418 mg)和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Leu-Pro-Thr(410 mg)在 14 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合, 加入猪胰蛋白酶(83 mg)。充分混合该溶液并在 37°C 下不时地搅拌 120 分钟。

此时把该反应液加到 136 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到 21×250 mm C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 并抽到 25×300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 74 mg, 用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5793.8 (理论值 5793.7)

实例 16 Nle (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (290 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Nle-Pro-Thr (310 mg) 在 10 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 (60 mg)。充分混合该溶液, 并在 37 °C 下不时地搅拌 60 分钟。

此时将该反应液加到 90 ml 0.05 N HCl 中以终止反应。把整个溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 用水稀释 2 倍, 并抽到 10 × 250 mm C-8 Ultrasphere 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分得到 54 mg。用氨基酸分析 (表 I) 和质谱分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5794.6 (理论值 5793.7)

实例 17 D-Lys (B29) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (392 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-D-Lys-Thr (387 mg) 在 13.5 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 78 mg。充分混合该溶液并在 37 °C 不时地搅拌 120 分钟。

此时把反应液加到 136.5 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将整个溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上，并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分，用水稀释 4 倍，并抽到 25 × 300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 94 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5809.0 (理论值 5808.7)

实例 18 Met (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (350 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Met-Pro-Thr (366 mg) 在 12 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1,4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 71 mg。充分混合该溶液并在 37 °C 下不时搅拌 120 分钟。

此时将反应液加到 118 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上。并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分，用水稀释 4 倍，并抽到 25 × 300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.1% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 72 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱

分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5811.8 (理论值 5811.7)

实例 19 Orn (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在 37 °C 将猪缺八肽胰岛素 (290 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Orn-Pro-Thr (310 mg) 在 10 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 60 mg。充分混合该溶液并在 37 °C 下不时地搅拌 90 分钟。

此时把该反应液加到 90 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将整个溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 用水稀释 2 倍, 并抽到 10 × 250 mm C-8 Ultrasphere 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 89 mg。用氨基酸分析 (表 I) 和质谱分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5795.2 (理论值 5794.7)

实例 20 Phe (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (290 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Phe-Pro-Thr (310 mg) 在 10 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 60 mg。充分混合该

溶液并在37℃下不时地搅拌80分钟。

此时把该反应液加到90 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax 柱子上,并用0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC 确定的合适的组分,用水稀释4倍,并抽到25×300 mm C-18 Vydac 柱子上。用0.1% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到17 mg。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS) 验证其结构。

MS: 5827.9 (理论值 5827.7)

实例21 Pro(B29)人胰岛素

在37℃下将猪缺八肽胰岛素(339 mg)和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Pro-Thr (363 mg) 在9 ml 含有1份二甲亚砜,2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶(70 mg)。充分混合该溶液并在37℃下不时地搅拌80分钟。

此时把该反应液加到108 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到10×250 mm C-8 Zorbax 柱子上,并用0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC 确定的合适的组分,用水稀释2倍,并抽到10×250 mm C-8 Ultrasphere 柱子上。用0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯

化胰岛素类似物的组分并冻干得到97 mg。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5778.6 (理论值5777.6)

实例22 Ser(B28), Pro(B29)人胰岛素

在37℃下将猪缺八肽胰岛素(412 mg)和合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Ser-Pro-Thr(390 mg)在13 ml含有1份二甲亚砜,2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH 7.3缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶80 mg。充分混合该溶液并在37℃下不时地搅拌120分钟。

此时把该反应液加到137 ml 0.05 N HCl中以终止该反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax柱子上,并用0.1 M磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的pH 2缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC确定的合适的组分,用水稀释2倍,并抽到25×300 mm C-18 Vydac柱子上。用0.5%三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到37 mg。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5768.1 (理论值5767.6)

实例23 Thr(B28), Pro(B29)人胰岛素

在37℃下将猪缺八肽胰岛素(437 mg)和合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Thr-Pro-Thr(420 mg)在14.5

m l含有1份二甲亚砷,2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH 7.3缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶86 mg。充分混合该溶液并在37℃下不时地搅拌120分钟。

此时把该反应液加到135.5 ml 0.05 N HCl中以终止该反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax柱子上,并用0.1 M磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的pH 2缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC确定的合适的组分,用水稀释2倍,并抽到25×300 mm C-18 Vydac柱子上。用一种0.5%三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到78 mg。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5781.9 (理论值 5781.6)

实例24 Trp(B28), Pro(B29)人胰岛素

在37℃下将猪缺八肽胰岛素(310 mg)和合成八肽Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Trp-Pro-Thr(325 mg)在10.5 ml含有1份二甲亚砷,2份1,4-丁二醇和1份0.25 M Tris pH 7.3缓冲液的溶液中结合,加入猪胰蛋白酶64 mg。充分混合该溶液并在37℃下不时地搅拌120分钟。

此时把反应液加到140 ml 0.05 N HCl中以终止该反应。将全部溶液抽到21×250 mm C-8 Zorbax柱子上,并用0.1 M磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的pH 2缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC确定的合适的组分,用水稀释2倍,并抽

到 $25 \times 300 \text{ mm}$ C-18 Vydac 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 47 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5866.2 (理论值 5866.7)

实例 25 Tyr(B28), Pro(B29)人胰岛素

在 37°C 下将猪缺八肽胰岛素(391 mg)和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Tyr-Pro-Thr(400 mg)在 13 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 79 mg。充分混合该溶液并在 37°C 下不时地搅拌 120 分钟。

此时将该反应液加到 137 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到 $21 \times 250 \text{ mm}$ C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 用水稀释 2 倍, 并抽到 $25 \times 300 \text{ mm}$ C-18 Vydac 柱子上。用 0.5% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 30 mg。用氨基酸分析(表 I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5843.7 (理论值 5843.7)

实例 26 Val(B28), Pro(B29)人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽胰岛素 (400 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Val-Pro-Thr (383 mg) 在 12 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 78 mg。充分混合该溶液并在 37 °C 下不时地搅拌 120 分钟。

此时把该反应液加到 238 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上, 并用 0.1 M 磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的 pH 2 缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型 HPLC 确定的合适的组分, 用水稀释 4 倍, 并抽到 25 × 300 mm C-18 Vydac 柱子上。用 0.1% 三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到 74 mg。用氨基酸分析 (表 I) 和质谱分析 (MS) 验证其结构。

MS: 5780.0 (理论值 5779.6)

实例 27 Nva (B28), Pro (B29) 人胰岛素

在 37 °C 下将猪缺八肽猪胰岛素 (292 mg) 和合成八肽 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Nva-Pro-Thr (279 mg) 在 10 ml 含有 1 份二甲亚砜, 2 份 1, 4-丁二醇和 1 份 0.25 M Tris pH 7.3 缓冲液的溶液中结合。加入猪胰蛋白酶 57 mg。充分混合该溶液并在 37 °C 不时地搅拌 120 分钟。

此时把该反应液加到 240 ml 0.05 N HCl 中以终止该反应。将全部溶液抽到 21 × 250 mm C-8 Zorbax 柱子上,

并用0.1 M磷酸二氢钠中含有低乙腈梯度的pH 2缓冲液洗脱该产物。

合并用分析型HPLC确定的合适的组分，用水稀释2倍，并抽到25×300 mm C-18 Vydac柱子上。用0.5%三氟乙酸中含有乙腈梯度的溶液从柱子中洗脱去盐蛋白。合并含有纯化胰岛素类似物的组分并冻干得到51 mg。用氨基酸分析(表I)和质谱分析(MS)验证其结构。

MS: 5780.0 (理论值(5779.6))

实例28

用前面所述方法，制备下列其他胰岛素类似物：

(a) Asp(B1), Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

(b) 脱(Phe-B1), Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

(c) 脱(Phe-B1), Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

(d) 脱(Phe-B1, Val-B2), Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

(e) 脱(Phe-B1, Val-B2), Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

(f) Gly(A21), Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素

(g) Ala(A21), Asp(B10), Lys(B28),

Pro (B 2 9) 人胰岛素

(h) 脱 (Thr - B 3 0), Lys (B 2 8), Pro (B 2 9)
人胰岛素

(i) Asp (B 1 0), Arg (B 2 8), Pro (B 2 9)
人胰岛素

(j) Ala (A 2 1), Arg (B 2 8), Pro (B 2 9)
人胰岛素

(k) Asp (B 1), Arg (B 2 8), Pro (B 2 9) 人
胰岛素

实例 2 9 Lys (B 2 8), Pro (B 2 9) 人胰岛素

重组载体和宿主的构建

A. 质粒 p C Z R 1 2 6 S 的构建

1. 分离质粒 p K C 2 8 3

以保藏号 N R R L - B 1 5 8 3 0 从 Peoria , Illinois
6 1 6 0 4 , 北部地区研究室得到大肠杆菌 K 1 2 B E 1 2 0 1 /
p K C 2 8 3 的亲液胶体。将该亲液胶体倒入含有 1 0 m l L B 基
质 (1 0 g Bacto - 胰蛋白胨, 5 g Bacto - 酵母膏和 1 0 g
NaCl / 升; 调至 PH 7 . 5) 的试管中, 并在 3 2 ° C 下保温 2 小时,
此时在培养液中加入 5 0 μ g / m l 氨苄青霉素, 然后在 3 2 ° C 下保
温过夜。因为大肠杆菌 K 1 2 B E 1 2 0 1 / p K C 2 8 3 细胞中含
有一个整合在细胞 DNA 中的温度敏感型 c I 阻遏物基因, 将该细胞
在 3 2 ° C 下进行培养。如果在此质粒分离过程中使用含有野 生型 λ p L 阻
遏物基因或不含有 λ p L 启动子的细胞, 则如下面的实例所述, 保温

温度是37℃。

取一小部分过夜的培养液，将它置于含有50 μg/ml 氨苄青霉素的LB—琼脂（带有15 g/l Bacto—琼脂的LB基质）平板上，以得到大肠杆菌K12BE1201/pKC283的单菌落分离物。将得到的单菌落接种到10 ml含有50 μg/ml 氨苄青霉素的LB基质中，并在32℃有力震动下保温过夜。将10 ml过夜培养物接种到500 ml含有50 μg/ml 氨苄青霉素的LB基质中，并在32℃有力震动下保温直至该培养物达到稳定期。

下述方法是Maniatis 等的修改方法（1982, Molecular Cloning, 冷泉港实验室）。

在4℃下以4000 g离心10分钟以收集细胞，并去除上清液。将细胞沉淀物在100 ml冰冷的STE缓冲液（0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA）中洗涤。洗涤之后，将细胞沉淀物再悬浮于10 ml含有5 mg/ml 溶菌酶的溶液1（50 mM葡萄糖；25 mM Tris-HCl pH 8.0, 和10 mM EDTA）中，并于室温下放置10分钟。然后将20 ml溶液2（0.2 N NaOH 和1% SDS）加到溶菌酶处理过的细胞溶液中，并通过倒置轻轻地混合该溶液。将该混合液在冰上保温10分钟。

将15 ml冰冷的5 M乙酸钾 pH 4.8 加到溶解细胞的混合液中，并通过倒置混合该溶液。把该溶液置于冰上保温10分钟。将11.5 ml冰乙酸加到28.5 ml水和60 ml 5 M乙酸钾中，以制备5 M乙酸钾溶液；所得到的溶液有3 M的钾和5 M乙酸。

将溶解细胞混合液用Beckman SW 27（或其等同物）在

4℃以20,000 rpm离心20分钟。细胞DNA和碎片在试管的底部形成沉淀。回收到36 ml上清液,加入0.6体积的异丙醇,混匀,将所得到的溶液置于室温下15分钟。通过在室温下以12,000 g离心30分钟收集质粒DNA。去除上清液,用70%乙醇在室温下洗涤该DNA沉淀。倾析乙醇冲洗物,并将沉淀在真空干燥器中进行干燥。再将沉淀悬浮于8 ml TE缓冲液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)中。

将8 g氯化铯(CsCl)加到DNA溶液中。在每10 ml CsCl-DNA溶液中加入约0.8 ml 10 mg/ml的溴化乙锭水溶液。该溶液最终浓度是大约1.55 g/ml,而溴化乙锭的浓度大约是600 μg/ml。将该溶液转移到Beckman Type 50的离心管中,用石蜡油装满,密封,在20℃以45,000 rpm离心24小时。离心之后,在正常光线下可看到两个DNA带。去掉离心管的盖,用带21号皮下注射针头的注射器插入离心管的侧壁取出下面的DNA带。

用水饱和的丁醇经过几次提取去除溴化乙锭。通过TE缓冲液透析去除氯化铯。用缓冲酚提取后,再用氯仿提取,然后用70%乙醇沉淀和洗涤,并干燥。得到大约1 mg的质粒pKC283,然后以大约1 μg/μl的浓度在4℃下储存于TE缓冲液中。附图1给出了质粒pKC283的切割位点和功能图。

2. 构建质粒pKC283PX

将大约10 μl实例1中制备的质粒pKC283 DNA与20 μl 10 X基质盐限制缓冲液(500 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM MgCl₂; 和10 mM

DTT), 20 μ l 1 mg/ml BSA, 5 μ l 限制酶 Pvu II (~50 单位, 由 Bethesda Research Laboratories (BRL) 定义, 这里所用的全部限制酶都来自该公司) 和 145 μ l 水混合。将所得到的反应液在 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 小时。通过常规的酚和氯仿提取终止这里所说的限制酶反应, 接着使 DNA 沉淀, 用乙醇冲洗, 然后再将 DNA 悬浮于 TE 缓冲液中。如上所说的 Pvu II 消化终止之后, 使 Pvu II 消化的质粒 pKC283 DNA 沉淀, 并将它再悬浮于 5 μ l 的 TE 缓冲液中。

在含有 10 μ l 5 \times 激酶缓冲液 (300 mM Tris-HCl, pH 7.8; 50 mM MgCl₂ 和 25 mM DTT), 5 μ l 5 mM ATP, 24 μ l 水, 0.5 μ l 的 T4 多核苷酸激酶 (按 P-L Biochemicals 公司的规定大约为 2.5 单位), 5 μ l 1 mg/ml BSA, 和 5 μ l 10 mM 亚精胺的混合液中, 通过在 37 $^{\circ}$ C 下使该混合液与大约 600 微微 (10⁻¹²) 摩尔 (pM) 的 Xho I 人工接头 (5'-CCTCGAGG-3') 保温 30 分钟 而使之激活。

将大约 12.5 μ l 激活的 Xho I 人工接头加到 5 μ l Pvu II 消化的质粒 pKC283 DNA 中, 然后向 DNA 中加入 2.5 μ l 10 \times 连接酶缓冲液 (300 mM Tris-HCl, pH 7.6; 100 mM MgCl₂; 和 50 mM DTT), 2.5 μ l 1 mg/ml BSA, 7 μ l 5 mM ATP, 2.5 μ l (按 P-L Biochemicals 公司的定义大约为 2.5 单位) T4 DNA 连接酶, 2.5 μ l 10 mM 亚精胺, 和 3 μ l 水。所产生的连接反应液在 4 $^{\circ}$ C 下保温过夜。连接反应之后, 调节反应混合液使之具有高

盐缓冲液的成分(0.1 M NaCl; 0.05 M Tris-HCl pH 7.5; 10.0 mM MgCl₂; 和 1 mM DTT)。将大约 10 μl (100 单位) 限制酶 Xho I 加到混合液中, 然后使得到的反应液在 37 °C 下保温 2 小时。

终止该反应, 如上所述使 Xho I 消化的 DNA 沉淀, 再悬浮和连接, 只是不向连接混合液中加入 Xho I 人工接头。连接的 DNA 构成了所需要的质粒 pKC283PX。附图 2 给出了质粒 pKC283PX 的切割位点和功能图。

3. 构建大肠杆菌 K12MO(λ⁺)/pKC283PX

以保藏号 NRRL B-15993 从北部地区研究室可得到冻干形式的大肠杆菌 K12MO(λ⁺)。大肠杆菌 K12MO(λ⁺) 中含有野生型 λ PL cI 阻遏物基因, 因此在大肠杆菌 K12MO(λ⁺) 细胞中不会发生来自本发明杂交 pL-1pp 启动子的转录。重新构造亲液胶体, 分离 MO(λ⁺) 的单个菌落, 用基本上与实例 29A1 一致的方法制备 10 ml MO(λ⁺) 细胞的过夜培养物, 不同的只是保温温度是 37 °C, 以及在生长培养基中没有使用氨基青霉素。

用 50 μl 的过夜培养液接种 5 ml 也含有 10 mM MgSO₄ 和 10 mM MgCl₂ 的 LB 培养基。将培养物在 37 °C 有力震动下保温过夜。第二天早晨, 用含有 10 mM MgSO₄ 和 10 mM MgCl₂ 的 LB 基质将培养物稀释到 200 ml。将稀释的培养物在 37 °C 并有力震动下进行保温, 直至 550 nm (A₅₅₀) 下的吸收率大约是 0.5 为止, 此时表明细胞密度为大约 1 × 10⁸ 个细胞/ml。在冰水浴中将培养物冷却 10 分钟, 然后在 4 °C 下以

4000 g 离心10分钟收集细胞。将细胞沉淀物再悬浮于100 ml 的冷却10 mM MgSO₄ 中，并立即通过离心使之再沉淀。将该细胞沉淀物再悬浮于100 ml 的30 mM CaCl₂ 中并在冰上保温20分钟。

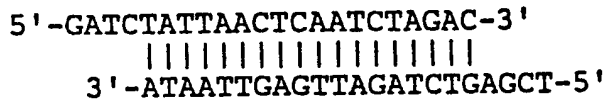
通过离心再次收集细胞，并再悬浮于10 ml 的30 mM CaCl₂ 中。将0.5 ml 等分的细胞加到实例29A2中制备的连接DNA中；而该DNA已制备成30 mM CaCl₂ 的浓度。将细胞—DNA混合液在冰上保温1小时，在42℃下加热震荡90秒，然后在冰上冷却大约2分钟。将细胞—DNA混合液在125 ml 瓶子中稀释于10 ml LB基质中，并在37℃下保温1小时。取100 μl 等分的培养液置于含有氨苄青霉素的LB琼脂平板上，在37℃下保温直至菌落出现。

将这些菌落单个进行培养，通过限制酶分析和凝胶电泳对单个菌落的质粒DNA进行检查。用实例29A1的方法在较小水平上进行质粒DNA分离，但省去氯化铯梯度步骤，直至识别出所需的大肠杆菌K12M0(λ⁺)/pKC283PX转化体。附图2给出了质粒pKC283PX的切割位点和功能图。

4. 构建大肠杆菌K12M0(λ⁺)/pKC283-L

将10 μg 实例29A1的方法制备的质粒pKC283PX DNA溶于20 μl 10X高盐缓冲液，20 μl 1 mg/ml BSA，5 μl (~50单位)限制酶Bgl II，5 μl (~50单位)限制酶Xho I和150 μl 水当中。将所产生的反应液在37℃保温2小时。终止该反应，使Bgl II—Xho I消化的DNA沉淀，再将DNA悬浮于5 μl 的TE缓冲液中。

合成一个带有 Bgl II 和 Xho I 限制酶切割特征的单链 DNA 末端的 DNA 人工接头, 并使之激活。用与实例 29 A 2 基本一致的方法激活该人工接头。该 DNA 人工接头具有下面的结构:



用现有技术中已知的方法从单链脱氧低聚核苷酸合成上述人工接头。可以用市售可得的仪器合成单链脱氧寡核苷酸, 如由 Applied Biosystems 公司出售的 380 A 型合成仪 (850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404), 它利用了氨基磷酸化学的机理。其他一些 DNA 合成法在现有技术中也是已知的。对于用常规修改的磷酸酯方法合成单链 DNA 的描述见 Itakura 等, 1977, Science 198: 1056 和 Crea 等, 1978, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 5765。另外一种优选合成 DNA 的方法见 Hsiung 等, 1983, Nucleic Acid Research 11: 3227 和 Narang 等, 1980, Methods in Enzymology 68: 90。

用基本上与实例 29 A 2 一致的方法将人工接头和 Bgl II—Xho I 消化的质粒 pKC283PX 进行连接。连接的 DNA 构成所需要的质粒 pKC283—L。附图 3 给出了质粒 pKC283—L 的切割位点和功能图。用质粒 pKC283—L DNA 来转化大肠杆菌 K12MO⁻(λ⁺), 并用与实例 29 A 3 基本一致的方法识别所得到的大肠杆菌 K12MO(λ⁺)/pKC283—L 转化体。

5. 大肠杆菌 K12MO(λ⁺)/pKC283—LB 的构建

将基本上按实例 29 A 1 方法制备的约 $10 \mu\text{g}$ 质粒 p K C 283 — L DNA 溶于 $20 \mu\text{l}$ $10 \times$ 高盐缓冲液, $20 \mu\text{l}$ $1 \text{ mg}/\text{ml}$ BSA, $5 \mu\text{l}$ (~ 50 单位) 限制性内切酶 Xho I 和 $155 \mu\text{l}$ H_2O 中, 得到的反应液在 37°C 保温 2 小时。然后加入 3 倍体积的 95% 乙醇和 $1/10$ 体积的 3 M 乙酸钠, 从该反应混合物中沉淀 Xho I 消化的质粒 p K C 283 — L DNA, 在干冰—乙醇浴中保温 5 分钟, 离心分离。用 70% 的乙醇洗涤得到的 DNA 沉淀, 干燥后再悬浮在 $2 \mu\text{l}$ $10 \times$ 缺口转译缓冲液 (0.5 M Tris—HCl pH 7.2; 0.1 M MgSO_4 ; 1 mM DTT), $1 \mu\text{l}$ 脱氧核苷三磷酸各为 2 mM 的溶液, $15 \mu\text{l}$ H_2O , $1 \mu\text{l}$ (~ 6 个 P—L Biochemicals 公司定义的单位) Klenow (大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段) 以及 $1 \mu\text{l}$ 的 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ BSA 中。得到的反应液在 25°C 保温 30 分钟; 再在 70°C 保温该溶液 5 分钟以停止反应。

使 Bam HI 人工接头 ($5' - \text{CGGGATCCCG} - 3'$) 激活, 基本上按实例 29 A 2 的方法与 Xho I 消化并经 Klenow 处理的质粒 p K C 283 — L DNA 相连接。连接反应后, 在 37°C , 在高盐缓冲液中, 用约 100 单位 Bam HI 消化 DNA 约 2 小时。Bam HI 消化后, 制备基本上按实例 29 A 2 方法连接用的 DNA。

基本上按实例 29 A 2 和 29 A 3 的方法, 通过连接并转化至大肠杆菌 K12 MO (λ^+) 中, 使 $\sim 5.9 \text{ Kb}$ Bam HI 限制性片段环化。鉴定大肠杆菌 K12 MO (λ^+) / p K C 283 — LB 转化体, 然后基本上按实例 29 A 1 的方法制备质粒 p K C 283 — LB DNA。质粒 p K C 283 — LB 的限制性位点和功能图如附图 4

所示。

6. 大肠杆菌K12MO(λ^+)/pL32的构建

在高盐缓冲液中，用限制性内切酶Sal I消化约10 μ g质粒pKC283PX，用Klenow处理，基本上按实例29A5的方法与EcoRI人工接头(5'-GAGGAATTCCTC-3')连接，只是所用的起始质粒、限制性内切酶和人工接头不同。用限制性内切酶EcoRI消化以切下~2.1 Kb的DNA，通过连接使~4.0 Kb EcoRI限制性片段环化以产生质粒pKC283PRS。基本上按实例29A3的方法将连接的DNA用于转化大肠杆菌K12MO(λ^+)。鉴别出大肠杆菌K12MO(λ^+)/pKC283PRS转化体以后，基本上按实例29A1的方法制备质粒pKC283PRS DNA。质粒pKC283PRS的限制性位点和功能图如附图5所示。

在含限制性内切酶Pst I和Sph I各50单位的200 μ l高盐缓冲液中消化约10 μ g质粒pKC283PRS。在37 $^{\circ}$ C保温反应液约2小时，然后在~130 V、~75 mA，在Tris-乙酸盐缓冲液中，使反应混合物在0.6%低胶凝温度琼脂糖(FMC Corporation, Marine Colloids Division, Rockland, Maine 04841)中电泳2-3小时。

在溴化乙锭稀溶液中使凝胶染色，用长波紫外光检测构成~0.85 Kb Pst I-Sph I限制性片段的DNA带，并将其从凝胶中切下。由该切段的重量和密度测出该切段的体积，将等体积pH 7.6的10 mM Tris-HCl加到含有该切段的管中。然后在72 $^{\circ}$ C保温使该切段熔化。可制得体积为100 μ l，约1 μ g质

粒 pK C 2 8 3 P R S 的 ~ 0.85 K b Pst I—Sph I 限制性片段。用类似的方法，用限制性内切酶 Pst I 和 Sph I 消化质粒 pK C 2 8 3—L B，通过琼脂糖凝胶电泳分离得到 ~ 3.0 K b 限制性片段，并制备用于连接的产物。

基本上按实例 2 9 A 2 的方法将质粒 pK C 2 8 3 P R S 的 ~ 0.85 K b Pst I—Sph I 限制性片段与质粒 pK C 2 8 3—L B 的 ~ 3.0 K b Pst I—Sph I 限制性片段相连接。连接的 DNA 构成所要的质粒 p L 3 2。质粒 p L 3 2 的限制性位点和功能图如附图 6 所示。基本上按实例 2 9 A 3 的方法将质粒 p L 3 2 转化至大肠杆菌 K 1 2 M O (λ^+) 细胞中。基本上按实例 2 9 A 1 的方法，由大肠杆菌 K 1 2 M O (λ^+) / p L 3 2 转化体制备质粒 p L 3 2 DNA。质粒 p L 3 2 DNA 的分析结果证明，有多个 Eco R I 人工接头与 Klenow 处理的质粒 pK C 2 8 3 P X 的 Sal I 端相连接。多个 Eco R I 人工接头的存在不会影响质粒 p L 3 2 的效用或质粒 p L 3 2 的衍生物，并可通过 Xho I 限制性位点的存在（每当 2 个 Eco R I 人工接头连在一起时就产生该位点）而进行检测。另一种方法是，按构建质粒 pK C 2 8 3—L B 实例的第一段进行 Sal I—Eco R I 切除和连接，也可构建质粒 p L 3 2。

7. 大肠杆菌 K 1 2 M O (λ^+) / p L 4 7 的构建

从北方地区研究室得到经冷冻干燥的大肠杆菌 K 1 2 R V 3 0 8 / p N M 7 8 9（保藏号为 N R R L B—1 8 2 1 6）。p N M 7 8 9 的限制性位点和功能图如附图 7 所示。基本上按实例 1 的方法从培养物中提取质粒 DNA，所不同的是保温温度为 37°C 。将 $10\ \mu\text{g}$ p N M 7 8 9 悬浮在 $200\ \mu\text{l}$ Pvu II 缓冲液（ $50\ \text{mM}$

Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NaCl 和 6 mM MgCl₂) 中。加入 1 单位 Pvu II, 在 37 °C 使反应混合物保温 5 分钟。在 65 °C 加热 10 分钟使该酶失活。再加入 30 μl 10 X Bam HI 缓冲液 (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl 和 70 mM MgCl₂), 70 μl H₂O 和 10 单位的 Bam HI, 在 37 °C 使反应液保温 1 小时。随后向该反应液加入 5 单位碱性磷酸酶并于 65 °C 保温 1 小时。在 1% 琼脂糖凝胶中分离 DNA 片段, 纯化大小为单切割片段的 DNA 片段 (图 8)。

基本上按实例 29 A 4 的方法合成具有平端和 Bam HI 端的 DNA 人工接头。该人工接头 (如图 8 中的 118 所示) 具有下列结构:



基本上按实例 29 A 2 的方法使该人工接头激活并与 Bam HI - Pvu II 消化的质粒 pNM789 连接。用该连接混合物转化大肠杆菌 K12 RV308 细胞, 基本上按实例 29 A 3 的方法使这些转化体进行质粒分离。选择到好几个含有合适大小 Pvu II 片段 (494 bp) 和 Xba I - Bam HI 片段 (628 bp) 的质粒。通过 Bam HI 位点到单一 Sma I 位点的测序至少测定了这些质粒中二个的顺序, 并选择一个具有所需顺序的克隆。这中间质粒被称为质粒 120。该方法的框图以及质粒 120 的限制性位点和功能图如附图 8 所示。

为了分离编码 EK-BGH 的 DNA, 在含限制性内切酶 Xba I 和 Bam HI 各 50 单位的 200 μl 高盐缓冲液中消化约 10 μg 质粒 120。通过琼脂糖凝胶电泳分离消化产物, 并分离和制备

编码E K—B G H的~0.6 Kb Xba I—Bam H I限制性片段，用于基本上按实例29 A 6的方法连接。

也用限制性内切酶Xba I和Bam H I消化质粒p L 3 2，并分离和制备用于连接的~3.9 Kb限制性片段。基本上按实例29 A 2的方法使质粒p L 3 2的~3.9 Kb Xba I—Bam H I限制性片段与质粒1 2 0的~0.6 Kb Xba I—Bam H I限制性片段相连接以产生质粒p L 4 7。质粒p L 4 7的限制性位点和功能图如附图9所示。基本上按实例29 A 3的方法将质粒p L 4 7转化至大肠杆菌K 1 2 M 0 (λ^+)中，鉴定大肠杆菌K 1 2 M 0 (λ^+) / p L 4 7转化体。基本上按实例29 A 1的方法由该转化体制备质粒p L 4 7 DNA。

8. 大肠杆菌K 1 2 R V 3 0 8 / p P R 1 2 A R 1的构建

质粒p P R 1 2含有温度敏感型p L阻遏物基因c I 8 5 7，质粒p B R 3 2 2具有抗四环素基因。在US 4 4 3 6 8 1 5 (1984. 3. 13批准)中已公开质粒p P R 1 2。质粒p P R 1 2的限制性位点和功能图如附图10所示。

在200 μ l高盐缓冲液中，在37 $^{\circ}$ C，用约50单位的限制性内切酶Eco R I消化约10 μ g质粒p P R 1 2 2小时，基本上按实例29 A 5的方法沉淀Eco R I消化的质粒p P R 1 2 DNA，并用Klenow处理。Klenow反应后，基本上按实例29 A 2的方法进行连接使Eco R I消化的和Klenow处理的质粒p P R 1 2 DNA再环化。连接的DNA构成所要的质粒p P R 1 2 Δ R 1，它可用于基本上按实例29 A 3的方法(所不同的是选择物基于抗5 μ g / m l四环素而不是抗氨基青霉素)转化大肠杆菌K 1 2 R V 3 0 8。

大肠杆菌K12RV308可从NRRL得到(保藏号为NRRLB-15624)。鉴定大肠杆菌K12RV308/pPR12△R1转化体以后,基本上按实例29A11的方法由该转化体制备质粒pPR12△R1 DNA。

在200 μl中盐缓冲液中,在37℃,用约50单位的限制性内切酶Ava I消化约10 μg质粒pPR12△R1 2小时。基本上按实例29A5的方法沉淀Ava I消化的质粒pPR12△R1 DNA,并用Klenow处理。Klenow反应以后,基本上按实例29A2的方法将Ava I消化的、经Klenow处理的质粒pPR12△R1 DNA与EcoRI人工接头(5'-GAGGAATTCTC-3')连接。人工接头连接后,沉淀该DNA,然后再悬浮在约含50单位限制性内切酶EcoRI的约200 μl高盐缓冲液中。在37℃保温所得到的反应液约2小时。EcoRI消化以后,使反应混合物加在琼脂糖凝胶上,基本上按实例29A6的方法纯化~5.1 kb EcoRI限制性片段。基本上按实例29A2的方法进行连接使~5.1 kb EcoRI限制性片段再环化。连接的DNA构成所要的质粒pPR12AR1。基本上按实例29A3的方法(除选择基于抗四环素而不是抗氨基青霉素外)使质粒pPR12AR1 DNA转化至大肠杆菌K12RV308中。鉴定大肠杆菌K12RV308/pPR12AR1转化体后,基本上按实例29A1的方法制备质粒pPR12AR1 DNA。质粒pPR12AR1的限制性位点和功能图如附图11所示。

9. 大肠杆菌K12RV308/pL110的构建

将约10 μg质粒pPR12AR1 DNA悬浮在含限制性内

切酶 Pst I 和 Eco R I 各 50 单位的约 200 ml 高盐缓冲液中，在 37 °C 保温消化反应液约 2 小时。然后将反应混合物加在琼脂糖凝胶上，基本上按实例 29 A 6 的方法分离和制备用于连接的质粒 p P R 1 2 A R 1 的 ~2.9 Kb Pst I—Eco R I 限制性片段。

在 200 μl 高盐缓冲液中，在 37 °C，用限制性内切酶 Pst I 和 Bam H I 消化约 10 μg 质粒 p L 4 7 2 小时。将 Pst I—Bam H I 消化的 DNA 加在琼脂糖凝胶上，基本上按实例 29 A 6 的方法分离和制备用于连接的 ~2.7 Kb Pst I—Bam H I 限制性片段，该片段含有复制原点和抗氨苄青霉素基因。在分离反应中，在 200 μl 高盐缓冲液中，在 37 °C，用限制性内切酶 Eco R I 和 Bam H I 消化约 10 μg 质粒 p L 4 7 DNA 2 小时，基本上按实例 29 A 6 的方法分离和制备用于连接的 ~1.03 Kb Eco R I—Bam H I 限制性片段，该片段含有新的转录和转译活化顺序和 EK—BGH 编码 DNA。所得到的 ~2 μg ~1.03 Kb Eco R I—Bam H I 限制性片段可用于构建质粒 p L 1 1 0。

将质粒 p L 4 7 的 ~2.7 Kb Pst I—Bam H I 和 ~1.03 Kb Eco R I—Bam H I 限制性片段与质粒 p P R 1 2 A R 1 的 ~2.9 Kb Pst I—Eco R I 限制性片段相连接以构成质粒 p L 1 1 0，基本上按实例 29 A 2 和 A 3 的方法（除基于抗四环素而不是抗氨苄青霉素选择转化体外）用连接的 DNA 转化大肠杆菌 K 1 2 R V 3 0 8。

在 EK—BGH 编码区存在二个 Pst I 限制性内切酶识别位点（附图的限制性位点和功能图中未标出）。质粒 p L 1 1 0 的限制性位点和功能图如附图 1 2 所示。

10. 大肠杆菌K12 RV308 / pL110C的构建

a. 大肠杆菌K12 RV308 / pL110A的构建

在总体积为20 μ l含2 μ l 10X高盐缓冲液(1.0 M NaCl; 0.50 M Tris-HCl pH 7.5; 0.10 M MgCl₂; 和10 mM二硫苏糖醇)和3单位Nde I酶的溶液中, 在37 $^{\circ}$ C, 用限制性内切酶Nde I消化约1 μ g质粒pL110 DNA 1小时。用苯酚/氯仿提取反应混合物, 用乙醇沉淀DNA。将Nde I消化的质粒pL110 DNA溶于50 μ l 1X Klenow缓冲液(40 mM KPO₄ pH=7.5; 6.6 mM MgCl₂; 1.0 mM 2-巯基乙醇; 33 μ M dATP; 33 μ M dCTP; 33 μ M dGTP; 33 μ M TTP)中。加入2 μ l (~10单位, New England Biolabs)大肠杆菌DNA聚合酶I的大片段即Klenow, 与该DNA混合, 并在16 $^{\circ}$ C保温所得到的反应液1小时。通过苯酚提取终止该反应, DNA按常规纯化。然后在4 $^{\circ}$ C使Nde I消化的, 经Klenow处理的DNA用T4 DNA连接酶连接16小时。将所得到的DNA用于常规的大肠杆菌K12菌株RV308 (NRRL B-15624)转化。在含有100 μ g/ml氨苄青霉素的L琼脂平板上选择转化体, 按Birnboim和Doly所述的快速碱性提取法从抗性菌落中分离质粒。选择没有Nde I位点的质粒(图13中的pL110A)。

b. 通过位点特异性诱变构建噬菌体pL110B

通过位点特异性诱变消除抗四环素基因中的Bam HI位点所用的方法如附图13的右边所示。

b(1) 噬菌体M13Tc3的构建

用质粒 pL110 作抗四环素基因的来源。将 50 μ l TE 缓冲液中的约 50 μ g 质粒 pL110 加到 25 μ l 10 X Hind III 缓冲液和 170 μ l H₂O 中。将约 5 μ l (~50 单位) 的限制性内切酶 Hind III 加到质粒 pL110 DNA 的溶液中, 在 37 $^{\circ}$ C 使反应液保温 2 小时。将约 13 μ l 2 M Tris-HCl, pH 7.4 和 5 μ l (~50 单位) 的限制性内切酶 Eco RI 加到 Hind III 消化的质粒 pL110 DNA 中, 在 37 $^{\circ}$ C 使反应液再保温 2 小时。用 TE 饱和的苯酚提取该反应混合物以使反应停止; 用氯仿提取以除去苯酚。然后经过沉淀和离心分离收集 Eco RI-Hind III 消化的质粒 pL110 DNA, 加在 1% 琼脂糖凝胶上, 分离和纯化大的 ~4.3 Kb Eco RI-Hind III 限制性片段。

将约 5 μ g 噬菌体 m13mp18 (New England Biolabs) 溶于 50 μ l TE 缓冲液中, 然后按上述方法用 Hind III 和 Eco RI 消化。按上述 pL110 的方法 (除分离和纯化 ~7.25 Kb 限制性片段以外) 纯化 Hind III-Eco RI 切割的噬菌体 M13mp18 DNA。

将质粒 pL110 的 ~4.3 Kb Hind III-Eco RI 片段约 100 毫微克与约 100 毫微克噬菌体 M13mp18 的 ~7.25 Kb Hind III-Eco RI 片段, 2 μ l 10 X 连接酶缓冲液, 1 μ l (~100 单位) 的 T4 DNA 连接酶和 14 μ l H₂O 相混合。在 15 $^{\circ}$ C 保温连接反应液 1.5 小时; 连接的 DNA 构成所要的噬菌体 m13Tc3 DNA。噬菌体 m13Tc3 的限制性位点和功能图如附图 13 所示。

用 1 ml 的大肠杆菌 K12JM1.09 (可用从 New

England Biolabs 买到的大肠杆菌 K12JM101 代替大肠杆菌 K12JM109) 的过夜培养物接种 50 ml L-肉汤, 在 37 °C 通气保温得到的培养液直到 $O.D._{600}$ 为 0.3 ~ 0.4。将这些细胞再悬浮在 25 ml 10 mM NaCl 中, 在冰上保温 10 分钟, 通过离心分离而收集。再将这些细胞悬浮在 1.25 ml 的 75 mM CaCl₂ 中; 取出 200 μ l 该细胞, 加到 10 μ l 上述制备的连接的 DNA 中, 在冰中保温约 40 分钟。然后在 42 °C 保温该细胞-DNA 混合物 2 分钟, 取出不同的等分试样 (即 1, 10 和 100 μ l), 加到 3 ml 高级琼脂 (top agar) (L-肉汤, 含有 0.5% 在 45 °C 熔融的琼脂) 中, 该琼脂还含有 50 μ l 2% X-Gal, 50 μ l 100 mM IPTG 和 200 μ l 对数生长期的大肠杆菌 K12JM109。然后将该细胞-高级琼脂混合物涂在 L-琼脂平板上, 该平板含有 40 μ g/ml X-Gal (5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-硫代半乳糖苷) 和 0.1 mM IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷), 在 37 °C 保温平板过夜。

第二天早晨, 分别用几个澄清的 (与蓝色相对比) 的噬斑接种 2 ml L 肉汤, 在 37 °C 通气保温培养液 2 小时。缺少蓝色表示已发生所要的 DNA 插入。然后, 使该培养液离心, 将得到的 200 μ l 上清液加到在 37 °C 通气生长的 10 ml 大肠杆菌 K12JM109 培养液 ($O.D._{600} = 0.5$) 中。在 37 °C 使这些培养液再保温 30 分钟; 然后, 通过离心使该细胞沉淀, 用于制备它们所含的复制型重组噬菌体。用实例 1 所述并按比例缩小方法从该细胞中分离双链复制型噬菌体 DNA。通过噬菌体 DNA 的限制性内切酶分析鉴定含噬菌

体 m13 Tc3 DNA 的转化体。

b (ii) 单链噬菌体 m13 Tc3 DNA 的制备

离心 1.5 ml 大肠杆菌 K12 JM109 / m13 Tc3 的过夜培养液，用 100 μ l 含噬菌体 m13 Tc3 的上清液接种 25 ml OD₆₀₀ 约为 0.4—0.5 的大肠杆菌 JM109 的培养液。在 37 °C 通气保温该培养液 6 小时，离心该培养液，将得到的 20 ml 上清液移入新的管中。将约 2 ml 含 20% 聚乙二醇 (PEG) 6000 和 14.6% NaCl 的溶液加到该上清液中，然后在冰中保温 20 分钟。

以 7000 rpm 离心该上清液 25 分钟，将所得到的含单链噬菌体 m13 Tc3 DNA 的沉淀再悬浮在 500 μ l TE 缓冲液中。用 TE 饱和的苯酚提取该 DNA 溶液 2 次，再用氯仿提取 2 次。然后用 NaOAc 和乙醇沉淀该单链 DNA，离心分离。用 70% 乙醇洗涤得到的沉淀，干燥，然后溶于 60 μ l H₂O 中。

b (iii) 诱变

在自动操纵的 DNA 合成仪中合成诱变用的单链 DNA 片段。该片段具有顺序 5'—CCCGTCCTGTGGATACTCTACGCCGA—3'，它类似于质粒 pBR322 抗四环素基因中 BamHI 位点 (5'—GGATCC—3') 周围的区域，所不同的是在质粒 pBR322 中 5' 端的第二个残基 (或 3' 端的第三个残基) 是 C。这种变化不会改变抗四环素蛋白质的氨基酸组成，但能消除 BamHI 位点。

用在 20 μ l 的 1X 激酶缓冲液 (60 mM Tris-HCl pH 7.8; 15 mM 2-巯基乙醇; 10 mM MgCl₂; 0.4 I

μM ATP)中的10单位(BRL)T₄多核苷酸激酶,在37℃
℃分别处理约10微微摩尔的诱变引物和M13普通引物
(Bethesda Research Laboratories (BRL), P.
O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20760)30
分钟。将经激酶处理的DNA用于下述的诱变步骤中。

将300 ng (1.2 μl)单链噬菌体M13Tc3, 1微微
摩尔(2 μl)普通引物, 1微微摩尔(2 μl)诱变引物, 2 μl
10 X退火缓冲液(100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM
EDTA; 500 mM NaCl)以及12.8 μl H₂O混合在一
起,以进行退火反应。使该反应在80℃保温2分钟,在50℃保温
5分钟,然后冷至室温。

在退火的DNA混合物中加入5 μl 10 X伸展缓冲液(500
mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 120 mM
MgCl₂); 5 μl 2 mM dATP; 1 μl dGTP、dTTP、
和dCTP均为6 mM的溶液; 1 μl (~2单位, Pharmacia
P-L Biochemicals, 800 Centennial Avenue,
Piscataway, NJ 08854)Klenow酶; 1 μl (100
单位)T₄ DNA连接酶; 和17 μl H₂O以进行伸展反应。在
室温下保温该伸展反应1小时,然后在37℃保温2.5小时,然后
在4℃过夜。

先用TE饱和的苯酚提取2次以停止反应,再用CHCl₃提取2
次。用乙醇和NaOAc沉淀该DNA。通过离心收集该DNA,再悬
浮在50 μl H₂O中,然后在DNA溶液中加入6 μl 10 X S1
缓冲液。

将该DNA溶液平均分入3个管中。在2个管中加入约200单位(Miles Laboratories)S1核酸酶。一种S1反应液在室温下保温5分钟,其他反应液保温10分钟。用TE饱和的苯酚提取反应混合物2次以停止反应。该苯酚提取物再用氯仿提取2次;然后用NaOAc和乙醇从反应混合物中沉淀该DNA。用未经处理的DNA样品作对照。所有经S1处理的样品在其他步骤中都彼此分开,但都得到类似的结果。

将该DNA沉淀再悬浮在20 μ l H₂O中,按构建噬菌体m13Tc3时所用的方法(除无IPTG或X-Gal加到平板上外),用10 μ l得到的溶液转化大肠杆菌K12JM109(也可用大肠杆菌K12JM101)。

按上述方法分离来自约48个噬斑的双链复制型DNA,并筛选出有BamHI限制性位点的。按上述方法制备单链DNA,再选择没有BamHI位点的分离物。用双脱氧测序法(J. H. Smith, 1980; Methods in Enzymology 65:560—580)测定单链DNA顺序。所要的分离物称为pL110CB(图13)。

C. 质粒pL110C的构建

在含~50单位的NheI限制性内切酶的250 μ l 1X NheI缓冲液(50mM NaCl; 6mM Tris-HCl pH 7.5; 6mM MgCl₂和6mM β -巯基乙醇)中,在37 $^{\circ}$ C,消化约50 μ g复制型噬菌体pL110B DNA 2小时。然后在NheI消化的噬菌体pL110B DNA中加入5 μ l 5M NaCl,接着加入5 μ l (~50单位)SalI限制性内切酶。在37 $^{\circ}$ C继

续消化2小时。然后按公知的一般方法从丙烯酰胺凝胶中分离具有抗四环素基因突变区的所要的 ~ 422 bp *Nhe*I—*Sal*I片段。

在相同的条件下，用*Nhe*I和*Sal*I消化质粒pL110A DNA，所不同的是用质粒pL110A代替噬菌体pL110B。从琼脂糖中纯化质粒pL110A的 ~ 6.1 Kb *Nhe*I—*Sal*I限制性片段。

用普通方法将pL110A (~ 6.1 Kb)和pL110B (~ 422 bp)的*Nhe*I—*Sal*I片段各100毫微克连接在一起以构建所要的质粒pL110C。质粒pL110C的限制性位点和功能图如附图13所示。所要的质粒pL110C使大肠杆菌具有 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素抗性，但在抗四环素基因中缺少*Bam*HI位点。

11. 质粒pCZR111的构建

质粒pL110C含有单一的*Cla*I限制位点，该位点可通过下列反应除去。基本上按实例29A2的方法(除采用限制性内切酶*Cla*I和10X*Cla*I缓冲液(500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.9和100 mM MgCl_2)外)用*Cla*I消化约 $1 \mu\text{g}$ 质粒pL110C。然后，基本上按实例29A5的方法(所不同的是只加入dCTP，而不是加入所有4种dNTP)用Klenow处理*Cla*I消化的DNA。

然后沉淀该DNA，再悬浮在 $50 \mu\text{l}$ Mung Bean 核酸酶缓冲液(50 mM NaOAc pH 5.0, 30 mM NaCl和1mM ZnSO_4)中。加入1单位的Mung Bean 核酸酶(从New England Biolabs 可买到)，在 30°C 保温该反应30分钟。

然后将试管放在冰中，加入 NaCl 至 0.2 M，该混合物用苯酚/氯仿提取，用乙醇沉淀，再悬浮在 10 mM Tris-HCl pH 8.0 中。然后基本上按实例 29A3 和 29A4 的方法使该 DNA 自身连接并转化至大肠杆菌细胞中。得到的质粒称为质粒 pCZR111。

12. 质粒 pCZR126S 的构建

按下述方法用 Xba I 消化约 26 μ g 的质粒 pCZR111。10X Xba I 缓冲液含有 600 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1 M NaCl 和 10 mM 2-巯基乙醇, pH 为 7.5 (在 37 °C)。将 50 μ l 的 10X Xba I 缓冲液, 15 μ l Xba I (10 U/ μ l) 和 185 μ l H₂O 加到约含 25 μ g 质粒 pL110 的 250 μ l 水中。在 37 °C 消化 1 小时。然后用苯酚提取 Xba I 消化的 pL110, 加入 1/10 体积的 3 M CH₃COO-Na, 加入 3 体积的乙醇; 该混合物在干冰-乙醇浴中保温 5 分钟, 然后离心分离。将沉淀的 DNA 再悬浮在 50 μ l H₂O 中。

按下述方法用 BamHI 消化经 Xba I 消化的质粒 pCZR111。在得到的 50 μ l 经 Xba I 消化的 pL110 中加入 0.2 μ l BamHI (10 U/ μ l), 10 μ l BamHI 缓冲液 (100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 1 M NaCl 和 10 mM 2-巯基乙醇, pH 为 8.0, 在 37 °C) 以及 90 μ l 水。在 37 °C 消化 5 分钟。用苯酚提取消化的 pCZR111, 加入 1/10 体积的 CH₃COONa, 接着加入 3 体积乙醇。将沉淀的 DNA 再悬浮在 50 μ l 的 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 为 8.0 的缓冲液中。

然后将 Xba I 和 BamHI 消化的 pCZR111 加在琼脂糖凝

胶上, 分离约 5.8 Kb 的 DNA 带。将 pCZR111 的 ~5.8 Kb 片段与 Xba I—Nde I 人工接头和编码 EK—牛生长激素的合成基因 (在它的 5' 端含有 Nde I 位点, 在它的 3' 端含有 Bam HI 位点) 连接, 从而产生质粒 pCZR126S。用普通的寡核苷酸测序法可得到 Xba I—Nde I 顺序, 该顺序包括如下顺序:

```
5' CTAGAGGGTATTAATAATGTATATTGATTTTAATAAGGAGGAATAATCA 3'
|||||
TCCATAATTATTACATATAACTAAATTTATTCCTCCTTATTAGTAT 5'
```

上述顺序是通过两条链的化学合成, 然后混合以使其杂交而构建的。编码 EK b G H 的基因是由单链 DNA 的 16 个化学合成片段构建的, 这些片段长为 71—83 核苷酸, 它含有整个基因的两条互补链。用 Applied Biosystems (ABS) 公司的仪器进行合成, 合成物包括如下顺序:

```
5' TATGTTCCATTGGATGATGATGATAAGTTCCAGCCATGTCCTT
|||||
ACAAGGGTAACCTACTACTACTATTCAAGGGTCGGTACAGGAA

GTCCGGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCATCAGCTGGCTGCTGA
|||||
CAGCCGGACAAACGGTTGCGACACGAGGCCCGAGTCGTGGACGTAGTCGACCGACT

CACCTTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCCAGAA
|||||
GTGGAAGTTTCTCAAACCTCGCGTGGATGTAGGGCCTCCCTGTCTCTATGAGGTAGGTCTT

CACCCAGGTTGCCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGC
|||||
GTGGGTCCAACGGAAGACGAAGAGACTTTGGTAGGGCCGGGGGTGCCCGTCTTACTCCG

CCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTCATCCAGTCGTGGCT
|||||
GGTGCCTTTAGTCTGAACCTCGACGAAGCGTAGAGTGACGAGGAGTAGGTCAGCACCGA
```

```

TGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCTTGGTGTGGCACCTCGGA
|||||
ACCCGGGGACGTCAAGGAGTCGTCTCAGAAGTGGTTGTGCAACCACAAACCGTGGAGCCT

CCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGAGCT
|||||
GGCACAGATACTCTTCGACTTCCTGGACCTCCTTCCGTAGGACCGGGACTACGCCCTCGA

GGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC
|||||
CCTTCTACCGTGGGGGGCCCGACCCGTCTAGGAGTTCGTCTGGATACTGTTTAAACTGTG

AAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAA
|||||
TTGTACGCGTCACTGCTGCGGACGAGTTCTTGATGCCAGACGAGAGGACGAAGGCCTT

GGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGC
|||||
CCTGGACGTATTCTGCCTCTGCATGGACTCCAGTACTTCACGGCGGCGAAGCCCCCTCCG

CAGCTGTGCCTTCTAG 3'
|||||
GTCGACACGGAAGATCCTAG 5'

```

通过连接下列组分可完成质粒 p C Z R 1 2 6 S 的构建：总体积为 2 μ l 的 ~ 0.28 μ g 5.8 Kb 片段（用 Xba I 完全消化和用 Bam H I 部分消化质粒 p L 1 1 0 而得到），总体积为 2.5 μ l 的 0.18 μ g 编码牛生长因子衍生物的合成基因（其 5' 端对应于 Xba I 位点，3' 端对应于 Bam H I 位点），8.75 微微摩尔的 1 μ l 化学合成的 Xba I - Nde I 人工接头。将质粒成分加到 6 μ l 5 X 连接缓冲液中，该缓冲液含有 250 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% V/V 聚乙二醇 8000, pH 7.6, 2 μ l 连接酶, 16.5 μ l H₂O。在 16 $^{\circ}$ C 使该连接混合物保温过夜。然后基本上按实例 29 A3 的方法用环化质粒 p C Z R 1 2 6 S 转化大肠杆菌 R V 3 0 8 细

胞。质粒 p C Z R 1 2 6 S 的限制性位点和功能图如附图 1 4 所示。

B. 人胰岛素原表达质粒 p R B 1 7 2 的构建

1. 质粒 p R B 1 4 5 的构建

通常首先合成人胰岛素原基因并克隆入 p U C 1 8 质粒中(从 B R L 买到)。用一般方法合成该基因,它具有如下顺序:

```
HindIII  NdeI                               DraIII
5' |AGCTTCAT|ATGTATTTTGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCACCTG|GTGGAAGCTCT
    AGTA TACATAAAACAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTGGAC CACCTTCGAGA

GTACCTGGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTCTACACCCGAAGACCCGCCGTGAGGCA
CATGGACCACACGCCACTTGCACCGAAGAAGATGTGGGGCTTCTGGGCGGCACCTCCGT
AvaII                               XmaI
GAG|GACCTGCAGGTGGGTGAGGTGGAGCTGGGCGGTGGC|CCGGGTGCAGGCAGCCTGC
CTC CTGGACGTCCACCCAGTCCACCTCGACCCGCCACCG GGCCACGTCCGTCCGACG

AGCCGCTGGCCCTGGAGGGTTCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTAC
TCGGCGACCGGGACCTCCCAAGGGACGTCTTCGCACCGTAACACCTTGTTACGACATG
                               BamHI
CAGCATCTGCTCCCTGTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG|GATCCG           3'
GTCGTAGACGAGGGACATGGTTCGACCTCTTGATGACGTTGATC CTAGGCTTAA|   5'
                               EcoRI
```

选择具有正确顺序的一个克隆以用于产生氯化铯纯化的 D N A。用一般方法分离该质粒(参见例如, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1982, ed. by Maniatis, T; Fritsch, E. F. and Sambrook, J., Cold Spring Harbour Laboratory Publications, New York, 该文的全部方法作为本文的参考文献)。将约 6 μ l.

(20 μ g) 质粒 DNA 加到 20 μ l 10X Nde I 缓冲液 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-巯基乙醇, 100 μ g/ml BSA), 5 μ l Nde I 限制性内切酶 (~40 单位) 和 169 μ l 水中。混合后, 使该反应在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。加入 0.3 M NaOAc 和 3 体积乙醇使 DNA 沉淀, 混合并冷至 -70 $^{\circ}$ C, 离心分离。用 70% 乙醇 (1 ml) 洗涤 DNA 沉淀物, 干燥并溶于 20 μ l 10X BamHI 缓冲液 (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA), 2 μ l BamHI 限制性内切酶 (40 单位) 和 178 μ l 水中。慢慢混合后, 使该反应在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。按上述方法再用 3 体积的乙醇沉淀该 DNA, 在 1% 低熔点琼脂糖凝胶 (FMC, Sea Plaque 琼脂糖) 中电泳。从该凝胶中切下相当于约 270 bp 的所要的 DNA 片段, 然后通过熔融该琼脂糖而回收 DNA, 按厂商推荐的方法使 DNA 通过 Elutip-d 柱 (Schleicher & Schuell, Keene, N. H.)。沉淀后干燥, 将 DNA 贮藏在 pH 为 8.0 的 30 μ l 10 mM Tris-HCl 中。

将约 15 μ g 质粒 pCZR126S (来自实例 29A12) 悬浮在 20 μ l 10X Nde I 缓冲液, 5 μ l Nde I 限制性内切酶 (40 单位) 和 175 μ l 水中, 慢慢混合并在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。保温后, 按上述方法用 3 体积的乙醇沉淀 DNA, 干燥, 然后再悬浮在 20 μ l 10X BamHI 缓冲液, 2 μ l BamHI 限制性内切酶 (40 单位) 和 178 μ l 水中。慢慢混合后, 使该反应在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。再用 3 体积的乙醇沉淀 DNA, 在 1% 低熔点琼脂糖凝

胶中电泳。从凝胶中切下对应于载体DNA的大片段，用上述的Elutip-d柱方法回收该DNA。沉淀后，干燥，将载体DNA贮藏在pH 8.0的35 μ l 10 mM Tris-HCl中。

将约2.5 μ l载体DNA与上述12 μ l纯化的人胰岛素基因片段，4 μ l 10 mM ATP，0.5 μ l 1 M二硫苏糖醇，5 μ l 10 X连接酶缓冲液(500 mM Tris-HCl pH 7.6和100 mM MgCl₂)，26 μ l水和0.5 μ l T4 DNA连接酶(Pharmacia, 3.5单位)相混合。该反应在4 $^{\circ}$ C保温16小时。用50 μ l 10 mM Tris-HCl pH 7.6和3 μ l 1 M CaCl₂稀释连接混合物，然后基本上按实例29A3的方法转化至大肠杆菌K12 RV308中。将细胞涂在加有5 μ g/ml四环素的TY平板上，然后在32 $^{\circ}$ C保温过夜。

用快速碱性提取法(如Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1982, ed. by Maniatis, T.; Fritsch, E. F., and Sambrook, J. Cold Spring Harbour Publications, New York, P 368—369)，从抗四环素菌落中分离3 ml培养液中的质粒。按微量筛选法用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析Xba I/Bam HI消化的片段，从而发现了正确的人胰岛素原基因片段的的存在。选择具有正确大小(约315 bp)插段的质粒以用于扩增和纯化。含有人胰岛素原基因的质粒是pRB145。质粒pRB145的限制性位点和功能图如附图16所示。

2. 质粒pRB164A的构建

将约30 μ g质粒pRB145悬浮在20 μ l的10 X

Nde I 缓冲液, 5 μ l Nde I 限制性内切酶 (New England Biolabs, 40 单位) 和 175 μ l 水中, 慢慢混合, 在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。然后将 2 μ l 的 Bam HI 限制性内切酶 (New England Biolabs, 40 单位) 加到该反应混合物中, 在 37 $^{\circ}$ C 再继续保温 2 小时。用 3 体积的乙醇和 0.3 M NaOAc 沉淀该 DNA, 在 1% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳。从该凝胶中切下编码人胰岛素原基因的较小 (约 270 bp) 的 Nde I / Bam HI 限制性片段, 按上述方法通过 Elutip-d 柱回收该 DNA。沉淀后干燥, 将该 DNA 贮藏在 pH 8.0 的 30 μ l 10 mM Tris 中。

然后在 该 DNA (30 μ l) 中, 加入 20 μ l 的 10 X Ava II 缓冲液 (50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 6 mM 2-巯基乙醇, 100 μ g/ml BSA), 5 μ l 的 Ava II 限制性内切酶 (New England Biolabs, 20 单位) 和 175 μ l 水。慢慢混合后, 该反应在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。用 3 体积乙醇和 3 M NaOAc (20 μ l) 沉淀该 DNA, 然后在 1.2% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳。从该凝胶中切下较大的 Ava II / Bam HI 限制性片段 (约 156 bp), 然后按上述方法通过 Elutip-d 柱回收 DNA。沉淀后干燥, 将 DNA 贮藏在 pH 8.0 的 30 μ l 10 mM Tris 中。

用合成方法制备相应于人胰岛素原基因的 Nde I / Ava II 限制性片段的 DNA (~115 bp)。第一步包括用 DNA 合成仪 (Applied Biosystems, Model 380 B) 合成 4 个单链脱氧寡核苷酸。这 4 个寡核苷酸的核苷顺序为

1. TATGCGTATGTTTGTAAACCAACACCTGTGCGGCTCCACCTG
GTGGAAGCTCTGTACCT (60 聚体)
2. GGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTCTACACCAAGCCGACC
CGCCGTGAGGCAGAG (55 聚体)
3. CACCAGGTACAGAGCTTCCACCAGGTGGGAGCC
GCACAGGTGTTGGTTAACAAACATACGCA (62 聚体)
4. GTCCTCTGCCTCACGGCGGGTCGGCTTGGTGTAGAA
GAAGCCACGTTACCGCA (54 聚体)

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化每个寡核苷酸后, 按 Brown, E. L., Belagaje, R., Ryan, M. J. 和 Khorana, H. G. (1979) 教导的方法 (Methods in Enzymology, Ed. by Wu, R., Academic Press, N. Y. 68: 109—151, 整个公开列入本文参考文献中), 使寡核苷酸 2 和 3 磷酸化。然后使磷酸化的寡核苷酸 2 和 3 (各为~7.15 微微摩尔) 与寡核苷酸 1 和 2 (~860 微微摩尔) 相混合, 在含 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 50 μM ATP 和 20 单位 T4 DNA 连接酶 (Pharmacia) 的缓冲液 (200 μl) 中在 4℃ 退火并连接 16 小时。在 15% 聚丙烯酰胺凝胶中纯化连接产物。从凝胶切片中电泳回收 DNA, 接着在 Sephadex G-50 柱中脱盐。得到所要的连接产物是 485 微微摩尔。

按 Brown, E. L. 等人, 1979, Methods in

Enzymology 68: 109—151所述方法(列入本文参考文献), 在含50 mM Tris pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT和ATP的缓冲液(50 μl)中使约100微微摩尔DNA磷酸化。通过Sephadex G—50柱过滤后, 将DNA贮藏在50 μl 10 mM Tris pH 8.0中。

使约2.5 μl载体DNA(Nde I—Bam HI消化的pCZR 126S)与18 μl质粒pRB145的Ava II/Bam HI限制性片段和10 μl(10微微摩尔)Nde I/Ava II合成人工接头(在含有50 mM Tris pH 7.6; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 800 μl ATP和3.5单位T4 DNA连接酶的50 μl缓冲液中刚构建的)相混合。该反应液在4℃保温过夜, 然后按实例29A3的方法转化至大肠杆菌K12RV308中。通过分析其质粒DNA鉴定所要的转化体大肠杆菌K12RV308/pRB164A。使合适的转化体在30℃, 在含有5 μg/ml四环素的TY介质中生长至OD₅₅₀约为0.2, 即早对数期, 然后移至42℃3—3.5小时以诱导合成人胰岛素原。使细胞离心沉淀, 加入样品缓冲液(0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 30%甘油, 1 M 2—巯基乙醇, 6 M尿素)使其溶解。在97℃加热样品2分钟, 然后加在丙烯酰胺凝胶上。用考马斯亮蓝染色很容易检测这些带。用扫描凝胶密度计测定细胞蛋白质的百分量。质粒pRB164A的限制性位点和功能图如附图17所示。

3. 质粒pRB172的构建

将约25 μg质粒pRB145悬浮在15 μl 10 X Dra III缓冲液(200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5,

10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 μg/ml BSA), 6 μl Dra III 限制性内切酶 (Boehringer Mannheim, 27 单位) 和 129 μl 水中, 慢慢混合, 在 37 °C 保温 6 小时。保温后沉淀该 DNA, 干燥并再悬浮在 10 μl 10X Xba I 缓冲液 (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 7 mM 2-巯基乙醇, 100 μg/ml BSA), 3 μl Xba I 限制性内切酶 (Boehringer Mannheim, 36 单位) 和 77 μl 水中。慢慢混合该反应液, 在 37 °C 保温 4 小时。再用 3 体积乙醇和 NaOAc 沉淀该 DNA, 在 1% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳。从该凝胶中切下对应于人胰岛素原基因的约 85bp Xba I / Dra III 限制性片段的低带, 用 Elutip-d 柱方法回收 DNA。沉淀后干燥, 将 DNA 贮藏在 pH 为 8.0 的 30 μl 的 10 mM Tris 中。

按上述方法, 用限制性内切酶 Dra III 和 Xba I 切割约 15 μg 质粒 pRB164A。用 Elutip-d 柱方法从琼脂糖凝胶中分离对应于 Xba I / Dra III 载体片断的上层带。沉淀后干燥, 将 DNA 贮藏在 pH 为 8.0 的 30 μl 10 mM Tris 中。

将约 5 μl Xba I / Dra III 消化的 pRB164A 载体 DNA 与在缓冲液 (50 μl, 含 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 800 μM ATP 和 6 单位 T4 DNA 连接酶) 中的质粒 pRB145 的 5 μl Xba I / Dra III 限制性片段相混合。该反应在 4 °C 保温过夜, 用于转化 CaCl₂ 处理的感受态大肠杆菌 K12 / RV308 细胞。

在含 5 μg/ml 四环素的 TY 琼脂平板上选择转化体。用快速

碱性提取法从抗四环素菌落中分离质粒，通过用 Xba I 和 Bam H I 限制性内切酶消化以进行分析。用顺序分析系统 (U. S. Biochemicals) 测定来自阳性克隆的 DNA 顺序。选择所要的具有正确顺序的质粒用于扩增和纯化。这样可分离到大肠杆菌 K 1 2 R V 3 0 8 / p R B 1 7 2 转化体。在 15% 聚丙烯酰胺基质中电泳分离后，通过测定总细胞蛋白质而分析质粒的人胰岛素原的表达和积聚情况。质粒 p R B 1 7 2 的限制性位点和功能图如附图 1 8 所示。

C. 大肠杆菌 R V 3 0 8 / p R B 1 7 3 和 p R B 1 7 4 的构建

将约 20 μ g 质粒 p R B 1 7 2 或 p R B 1 4 5 悬浮在 20 μ l 10 X Xba I 缓冲液 (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 7 mM 2-巯基乙醇, 100 μ g/ml BSA) 中，加入 2 μ l Xba I 限制性内切酶 (Boehringer Mannheim, 24 单位)，慢慢混合，并在 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时。保温后，沉淀该 DNA，干燥，再悬浮在 10 μ l 10 X Bam H I 缓冲液 (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-巯基乙醇, 100 μ g/ml BSA)，5 μ l Bam H I 限制性内切酶 (Boehringer Mannheim, 40 单位) 和 75 μ l 水中，使该反应液慢慢混合，在 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时。再用乙醇和 NaOAc 沉淀 DNA，在 1% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳，用 Elutip-d 柱方法从凝胶中分离对应于人胰岛素原基因的约 320 bp Xba I / Bam H I 限制性片段。沉淀后干燥，将 DNA 再悬浮在 20 μ l 10 X Xma I 缓冲液 (25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-巯基乙醇, 100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA), $10\ \mu\text{l}$ Xma I 限制性内切酶 (New England Biolabs, 10 单位) 和 $170\ \mu\text{l}$ 水中。使该反应液慢慢混合, 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 保温 4 小时。保温后, 用乙醇和 NaOAc 沉淀 DNA, 在 1% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳。从凝胶中切下对应于约 $200\ \text{bp}$ Xba I 限制性片段的大 DNA, 按上述方法通过 Elutip-d 回收 DNA。将 DNA 贮藏在 $30\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ Tris pH 8.0 中。

按下述合成法构建对应于人胰岛素原基因的 Xma I / Bam H I 限制性片段的 $51\ \text{bp}$ DNA。在合适的 Applied Biosystems 公司的 DNA 合成仪中 (380 B 型) 合成 2 个单链脱氧寡核苷酸:

CCGGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCGCTGGCCCTGGAGGGTTCCTGCAGTAG (51 聚体) 和
GATCCTACTGCAGGGAACCCTCCAGGGCCAGCGGCTGCAGGCTGCCTGCAC (51 聚体)

在有 $7\ \text{M}$ 尿素的情况下, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化。分离后, 按 Brown, E. L., Belagaje, R., Ryan, M. J., 和 Khorana, H. G. (1979) Methods in Enzymology, ed. by Wu, R., Academic Press, N. Y. 68: 109—151 中的教导使 2 个寡核苷酸磷酸化, 并退火以形成所要的人工接头。

将约 $10\ \mu\text{g}$ 质粒 pCZR126S (来自实例 29A12) 悬浮在 $20\ \mu\text{l}$ $10\times$ Xba I 缓冲液 ($150\ \text{mM}$ NaCl, $6\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7.9, $6\ \text{mM}$ MgCl_2 , $7\ \text{mM}$ 2-巯基乙醇, $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ BSA), $2\ \mu\text{l}$ Xba I 限制性内切酶

(Boehringer Mannheim, 24 单位) 和 $178 \mu\text{l}$ 水中。慢慢混合该反应液, 在 37°C 保温 2 小时。保温后, 加入 $4 \mu\text{l}$ 5 M NaCl 和 $2 \mu\text{l}$ BamHI 限制性内切酶 (New England Biolabs, 20 单位), 在 37°C 继续保温 2 小时。然后用一般方法, 用乙醇和 NaOAc 沉淀 DNA, 在 1% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳。用 Elutip-d 柱分离对应于 XbaI/BamHI 载体 DNA 的上层带。沉淀后干燥, 将该 DNA 贮藏在 pH 为 8.0 的 $30 \mu\text{l}$ 10 mM Tris 中。

在含 $50 \mu\text{M Tris}$ pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT , $800 \mu\text{M ATP}$ 和 6 单位 T4 DNA 连接酶的 $50 \mu\text{l}$ 缓冲液中, 将约 $5 \mu\text{l}$ XbaI/BamHI 消化的 pCZR 126S 载体 DNA 与 $10 \mu\text{l}$ 来自 pRB145 或 pRB172 的 XbaI/XmaI 限制性片段和上述制得的 $4 \mu\text{l}$ 激活的 XmaI/BamHI 人工接头相混合。该反应液在 4°C 保温过夜, 用于按实例 29A3 的方法转化大肠杆菌 K12RV308 菌株。在 42°C 保温前和保温后通过分析其质粒 DNA 和蛋白质产物而鉴定所要的转化体大肠杆菌 K12RV308/pRB173 (若由 pRB172 载体片段组成的话) 和大肠杆菌 K12RV308/pRB174 (若由 pRB145 载体片段组成的话)。质粒 pRB173 的限制性位点和功能图如附图 19 所示。

将得自微量制备的约 200 ng 质粒 DNA 也转化至大肠杆菌 L201 细胞中, 在含有 $15 \mu\text{g/ml}$ 四环素的 2XTY 琼脂平板上选择转化体。分析该转化体表达的蛋白质, 由它们产生人胰岛素原的能力确定所要的转化体。由此分离大肠杆菌 L201/pRB173

和大肠杆菌L201/pRB174。

D. 大肠杆菌K12RV308/pRB175、pRB176、

pRB177和pRB178的构建

将约12 μ g质粒pRB172悬浮在15 μ l 10X Nde I 缓冲液(100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100 μ g/ml BSA), 2.5 μ l Nde I限制性内切酶(20单位)和133 μ l水中。慢慢混合该反应液, 在37 $^{\circ}$ C保温过夜。保温后, 用一般方法用乙醇和NaOAc沉淀该DNA, 干燥, 再悬浮在15 μ l 10X Dra III缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT), 5 μ l Dra III限制性内切酶(20单位)和130 μ l水中。慢慢混合后, 该反应液在37 $^{\circ}$ C保温过夜。再按上述方法用乙醇和NaOAc沉淀该DNA, 在1%低熔琼脂糖中电泳。从该凝胶中切下所要的大限制性片段, 用Elutip-d柱方法回收DNA, 将DNA贮藏在pH为8.0的30 μ l 10mM Tris HCl中。

用Applied Biosystems的DNA合成仪(380B型)化学合成下列DNA人工接头:

(i) 5' TATGTACGACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATGCTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' 用于 pRB175

(ii) 5' TATGTACGACGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATGCTGCAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' 用于 pRB176

(iii) 5' TATGTATAACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' 用于 pRB177

(iv) 5' TATGTACGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATGCAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' 用于 pRB178

用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化每个低聚核苷酸后，按上述方法使其磷酸化，并退火以便连接和构建人胰岛素原基因（该基因可模拟编码DNA片段）。用人工接头（i）—（iv）分别构建质粒 pRB 175、pRB 176、pRB 177 和 pRB 178。

在含 50 μ M Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 800 μ M ATP 和 6 单位 T4 DNA 连接酶的缓冲液 (50 μ l) 中，使约 3 μ l Nde I / Dra III 消化的 pRB 172 载体 DNA 片段与激活的人工接头 (i—iv) 各 4 μ l 相混合。该反应液在 4 $^{\circ}$ C 保温过夜，按实例 29 A 3 的方法用该混合物转化大肠杆菌 K12 RV308 细胞。在 42 $^{\circ}$ C 诱导该细胞前后，通过分析它们的质粒 DNA 和蛋白质的产生以鉴定所要的转化体大肠杆菌 K12 RV308 / pRB 175、大肠杆菌 K12 RV308 / pRB 176、大肠杆菌 RV308 / pRB 177 和大肠杆菌 K12 RV308 / pRB 178。质粒 pRB 175 的限制性位点和功能图如附图 20 所示。

表 I 人胰岛素原类似物

类 似 物	质 粒	%蛋白质
Met-Tyr-Human Proinsulin (HPI)	pRB145	11.3
Met-Arg-Met-[Lys(B28),Pro(B29)HPI]	pRB164A	10.5
Met-Tyr-[Lys(B28),Pro(B29)HPI]	pRB172	7.3
Met-Tyr[Lys(B28),Pro(B29)B-chain]-Q*	pRB173	ND
Met-Tyr-[B-chain]-Q*	pRB174	ND
Met-Tyr-[Des(B1),Des(B2),Asp(B3), Lys(B28),Pro(B29)HPI]	pRB175	8.5
Met-Tyr-[Asp(B1),Lys(B28), Pro(B29)HPI]	pRB176	9.3
Met-Tyr-[Des(B1),Des(B2),Lys(B28), Pro(B29)HPI]	pRB177	9.4
Met-Tyr-[Des(B1),Lys(B28), Pro(B29)HPI]	pRB178	8.5

*Q = -Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-
Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-
Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-;

E. 按下列方法使大肠杆菌 K 1 2 R V 3 0 8 / p R B 1 7 2 的贮备培养物变成永久性贮备培养物

将分离的菌落点在下列表型平板上: L—琼脂+5 μg/ml Tc (四环素), L—琼脂+S m (链霉素硫酸盐), M—9 琼脂介质(含 MgSO₄、硫胺素、HYC A S E 和葡萄糖的盐基介质)和不含葡萄糖而含乳糖的 M—9 琼脂介质。一块 L—琼脂/Tc 平板在 42 °C 保温, 其余的平板在 30 °C 保温 24 小时。从 30 °C L—琼脂/Tc 平板中选择表型正确的菌落, 用于接种含 50 ml L—肉汤

(含胰蛋白酶、酵母膏、NaCl 和葡萄糖)加 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Tc 介质的培养瓶。该培养瓶在 30°C 震荡保温 7 小时。将瓶中物质 (1.2 ml) 放入生物冷冻瓶中, 在液氮的蒸气相中冷冻。然后使该物质解冻, 用 1 ml 接种在含 50 ml L-肉汤加 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Tc 的瓶中。该瓶在 30°C 震荡保温 4 小时。再各用 1 ml 上述物质接种 2 个含有 500 ml BG-7 介质 (含 MgSO_4 、硫胺素、葡萄糖、Tc 和微量盐) 的培养瓶。在 30°C 使这二个培养瓶震荡保温 9 小时。

将 1 升上述 BG-7 介质液体培养基接种在 150 升发酵罐内, 该罐含有 80 升介质 (该介质含有柠檬酸、硫酸亚铁铵、 K_2HPO_4 、 NH_4Cl 、 NaH_2PO_4 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、葡萄糖和微量无机盐)。在 30°C 操作该发酵罐直到二氧化碳排放速率达到 $1.0 \text{ mM}/\text{L}/\text{分}$ 为止。此时, 将 50 升液体培养基转移到发酵罐中以提供细胞接种物。

在 30°C 操作含 1500 升介质 (与 150 升发酵罐中所用介质相同) 的 2500 升发酵罐, 直到二氧化碳排放率达到 $1.0 \text{ mM}/\text{L}/\text{分}$, 然后将温度升至 40°C , 继续运行 8 小时。然后在 61°C 使液体培养基热失活 7 分钟, 由该热失活的液体培养基可得到下列产率数据: 细胞产量为 $13.1 \text{ g}/\text{L}$ (干重); 生产力为 $273 \mu\text{g}$ 脱甲酰化产物/ ml 液体培养基; 比活 (即每克产物/克细胞) 为 2.1% ; 甲酰化产物百分数为 13% 。

将发酵的液体培养基转入不锈钢储料罐中保持温度为 $2-8^\circ\text{C}$ 。然后使整个液体培养基离心或过滤以收集大肠杆菌细胞, 得到干重约 $15-20\%$ 的固体。将收集的细胞固体再添于加工水中以使其成浆料。然后用高压均化法或其他合适的方法使细胞分裂, 结果 $90-$

99%的细胞分解。用加工水稀释均化的浆料以达到5%干重。加入NaOH使稀释的分解细胞浆液的pH调至7—10。通过差分离心从细胞碎片中分离内含体(颗粒)。所得到的固体浓度为15—20%。

在半胱氨酸和尿素的情况下,在碱性pH中溶解内含体。为了从大量颗粒物中分辨混合的胰岛素原类似物的二硫化物,在SP Sepharose中,使溶解的颗粒进行超流阳离子交换层析。

通过与组织蛋白酶C、二肽氨肽酶保温以除去胰岛素原类似物氨基端的甲硫氨酰基酪氨酸伸展。用pH8.8的连四硫酸钾和半胱氨酸通过亚硫酸分解终止组织蛋白酶的分裂反应。通过Sephadex G—25进行溶剂交换后,在pH为10.6时,在有半胱氨酸情况下保温使得到的胰岛素原类似物的S—磺酸盐折叠。通过将pH调至2.4以终止折叠过程。在SP20SS树脂中用疏水作用层析从不合适的折叠物以及由组织蛋白酶C分裂步骤留下的污染物中分离出正确折叠的胰岛素原类似物。由于此分离过程是通过丙酮梯度进行的,因此在进一步加工前,必须通过蒸发从主流池中除去有机溶剂。

有机溶剂蒸发后,使正确折叠的胰岛素原类似物与胰蛋白酶和羧肽酶B保温。这些酶可切割胰岛素原类似物的C肽,产生Lys(B28), Pro(B29)人胰岛素。然后在S—Sepharose中进行阳离子交换层析,再在10 μ m C—8树脂中进行高效反相层析以进一步纯化胰岛素类似物。通过Sephadex G—25进行溶剂交换从反相主流中除去乙腈,用螺旋绕制的超过滤系统浓缩所得的物质。在Sephadex G—50树脂中对浓缩的物质进行大小排阻层析,并冷冻干燥。

下列表II提供了上述实例中化合物的氨基酸分析。

表 II

人胰岛素类似物 1, 2 中氨基酸分析

实例号	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<u>氨基酸残基</u>									
Asp	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	3.00(3)	3.00(3)
Thr	2.82(3)	2.81(3)	2.64(3)	2.80(3)	2.80(3)	2.94(3)	2.81(3)	2.71(3)	2.73(3)
Ser	2.76(3)	2.73(3)	2.70(3)	2.75(3)	2.71(3)	2.46(3)	2.71(3)	2.74(3)	2.72(3)
Glu	7.16(7)	7.05(7)	6.93(7)	7.08(7)	7.01(7)	6.69(7)	7.18(7)	6.99(7)	7.94(8)
Pro	1.02(1)	1.11(1)	0.92(1)	0.98(1)	1.01(1)	0.98(1)	1.02(1)	1.09(1)	0.98(1)
Gly	3.93(4)	4.00(4)	3.85(4)	3.99(4)	4.02(4)	3.97(4)	4.01(4)	3.95(4)	3.90(4)
Ala	1.01(1)	1.04(1)	1.93(2)	1.02(1)	1.05(1)	1.05(1)	1.03(1)	1.03(1)	1.02(1)
Cys(1/2)	5.13(6)	- (6) ³	5.13(6)	5.17(6)	5.32(6)	4.91(6)	5.53(6)	5.23(6)	5.33(6)
Val	3.45(4)	3.44(4)	3.49(4)	3.51(4)	3.41(4)	3.67(4)	3.54(4)	3.45(4)	3.48(4)
Ile	1.47(2)	1.47(2)	1.49(2)	1.58(2)	1.44(2)	1.65(2)	1.68(2)	1.48(2)	1.47(2)
Leu	6.04(6)	6.01(6)	5.86(6)	6.19(6)	6.06(6)	5.67(6)	5.99(6)	6.02(6)	5.98(6)
Tyr	3.83(4)	3.74(4)	3.52(4)	4.19(4)	3.90(4)	3.55(4)	3.82(4)	3.73(4)	3.58(4)
Phe	2.84(3)	2.85(3)	2.64(3)	2.85(3)	2.84(3)	3.02(3)	2.86(3)	2.72(3)	2.73(3)
His	2.35(2)	2.10(2)	2.02(2)	2.14(2)	1.60(2)	2.09(2)	1.07(1)	2.02(2)	2.10(2)
Lys	0.97(1)						0.97(1)		
Arg	0.99(1)	0.90(1)	0.88(1)	1.96(2)	0.91(1)	0.81(1)	0.91(1)	0.89(1)	0.98(1)
Aba								0.90(1)	
Cya									
Nle									
Orn									
Nva									
Met									
Trp									

1 摩尔单位以天冬氨酸计

2 括号中的数表示理论上的氨基酸含量

3 半胱氨酸加氨基丁酸总共为 6.49

表 II (续)

人胰岛素类似物 1, 2 中氨基酸分析

实例号	1 1	1 2	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9
氨基酸残基									
Asp	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)
Thr	2.76(3)	3.59(3)	2.80(3)	2.80(3)	2.70(3)	2.83(3)	2.85(3)	3.03(3)	2.80(3)
Ser	2.69(3)	2.64(3)	2.43(3)	2.78(3)	2.87(3)	2.78(3)	2.97(3)	2.68(3)	2.72(3)
Glu	8.04(8)	6.84(7)	6.89(7)	7.09(7)	7.04(7)	7.08(7)	6.94(7)	6.99(7)	7.01(7)
Pro	1.11(1)	1.48(1)	1.09(1)	1.12(1)	0.93(1)	1.16(1)	1.10(1)	1.14(1)	1.02(1)
Gly	4.04(4)	5.70(5)	3.89(4)	4.03(4)	3.98(4)	4.00(4)	4.12(4)	4.08(4)	3.92(4)
Ala	1.05(1)	1.14(1)	1.04(1)	1.05(1)	1.08(1)	1.04(1)	1.09(1)	1.07(1)	1.03(1)
Cys(1/2)	5.26(6)	4.54(6)	4.57(6)	5.19(6)	5.00(6)	4.75(6)	5.20(6)	4.82(6)	5.30(6)
Val	3.60(4)	3.52(4)	3.58(4)	3.43(4)	3.41(4)	3.51(4)	3.49(4)	3.63(4)	3.51(4)
Ile	1.62(2)	1.82(2)	1.70(2)	2.36(3)	1.44(2)	1.51(2)	1.52(2)	1.75(2)	1.55(2)
Leu	5.99(6)	5.79(6)	5.95(6)	5.98(6)	6.89(7)	6.10(6)	5.95(6)	5.98(6)	6.11(6)
Tyr	3.73(4)	3.89(4)	3.75(4)	3.74(4)	3.64(4)	3.86(4)	3.74(4)	3.80(4)	3.84(4)
Phe	2.88(3)	3.47(3)	3.01(3)	2.85(3)	2.71(3)	2.86(3)	2.87(3)	3.13(3)	2.89(3)
His	2.08(2)	2.24(2)	3.39(3)	2.07(2)	2.30(2)	2.48(2)	2.20(2)	2.29(2)	2.10(2)
Lys	0.91(1)	0.80(1)	0.95(1)	0.89(1)	0.86(1)	1.00(1)	0.87(1)	0.80(1)	1.03(1)
Arg									
Aba									
Cya						0.93(1)			0.96(1)
Nle									
Orn									
Nva								0.98(1)	
Met									
Trp									

表 II (续)

人胰岛素类似物 1, 2 中氨基酸分析

实例号	2 0	2 1	2 2	2 3	2 4	2 5	2 6	2 7
<u>氨基酸残基</u>								
Asp	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)	3.00(3)
Thr	2.51(3)	3.04(3)	2.76(3)	3.73(4)	2.70(3)	2.80(3)	3.16(3)	2.75(3)
Ser	2.55(3)	2.69(3)	3.60(4)	2.74(3)	2.76(3)	2.78(3)	2.75(3)	2.63(3)
Glu	7.25(7)	7.06(7)	6.99(7)	7.07(7)	7.01(7)	7.04(7)	6.98(7)	7.02(7)
Pro	0.93(1)	2.20(2)	0.95(1)	1.00(1)	0.95(1)	1.11(1)	1.22(1)	1.16(1)
Gly	3.92(4)	3.93(4)	3.91(4)	3.97(4)	3.94(4)	3.97(4)	4.26(4)	3.98(4)
Ala	1.09(1)	1.02(1)	1.07(1)	1.03(1)	1.08(1)	1.04(1)	1.14(1)	1.03(1)
Cys(1/2)	4.53(6)	5.57(6)	4.31(6)	5.01(6)	4.05(6)	5.17(6)	4.81(6)	5.16(6)
Val	3.72(4)	3.61(4)	3.37(4)	3.42(4)	3.41(4)	3.43(4)	4.80(5)	3.59(4)
Ile	1.72(2)	1.56(2)	1.42(2)	1.48(2)	1.44(2)	1.48(2)	1.67(2)	1.59(2)
Leu	6.01(6)	6.09(6)	5.95(6)	6.02(6)	6.01(6)	5.98(6)	5.96(6)	5.99(6)
Tyr	3.55(4)	3.93(4)	3.60(4)	3.72(4)	3.78(4)	4.67(5)	3.77(4)	3.75(4)
Phe	3.59(4)	3.13(3)	2.76(3)	2.85(3)	2.74(3)	2.83(3)	3.28(3)	2.87(3)
His	2.14(2)	2.10(2)	2.55(2)	2.32(2)	2.82(2)	2.08(2)	2.25(2)	2.02(2)
Lys	0.87(1)	1.02(1)	0.85(1)	0.92(1)	1.05(1)	0.86(1)	1.02(1)	0.87(1)
Arg								
Aba								
Cya								
Nle								
Orn								
Nva								0.98(1)
Met					0.89(1)			
Trp								

下列的体内检测系统可显示本发明胰岛素类似物的生理作用。

用取自 Charles River Laboratories (Portage, MI) 的普通雄性 Sprague Dawley 大鼠作试验动物。这些动物重量为 160—180 g, 在 75°F 控制光照 (在上午 7:00 至下午 7:00 有光, 下午 7:00 至上午 7:00 无光) 的动物饲养室内饲养一周。给这些动物随意饲喂 Purina 大鼠饲料 5001。在使用前使用于每一检测的鼠饥饿 16 小时。它们在最初使用时重约 200 g。饥饿动物的重量达到 275 g (在三周以内) 后便不再使用。每天用 10 只一组的雄性大鼠作各种化合物试验 (即生物合成人胰岛素、猪胰岛素和人胰岛素类似物)。每周中各组均只用一次。将 10 个鼠分成 2 组, 每组 5 个鼠。用一组作对照, 只在皮下注射载体, 另一组的 5 个鼠注射待测化合物。将蛋白质溶于 0.05 N HCl (pH 1.6) 中以制备 100 μ g/ml 的贮备液。用普通盐水稀释该贮备液, 皮下注入鼠中。施药后在 0、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时和 4 小时从每个鼠的尾静脉中取出 100 μ l 血样。用葡萄糖氧化酶法 (Sigma Chemical Co.) 比色测定葡萄糖。计算每个鼠从 0 时起血液中葡萄糖 % 数的变化, 试验组中的平均 % 变化值 \pm SEM (经那天对照组中的平均变化值校正后) 可表示最终结果。

在给定时间内 (通常为注射蛋白质后 1 或 2 小时), 由 4—7 个不同浓度的测试化合物的最大反应特色画出剂量—反应特性曲线。由该曲线, 测定 ED₅₀ 的值, 从而给出最大低血糖反应的 1/2 蛋白质皮下剂量 (μ g/kg)。结果如下表 III 所示。

表 IIIa

化 合 物	最大作用 (%)	E D ₅₀ ^b	生物活性 ^c
人胰岛素 (HI) ^d	66	7.95	100
猪胰岛素	60	7.70	103
Lys(B28), Pro(B29)HI	66	6.8	117
Ala(B28), Pro(B29)HI	71	15.0	53
Asp(B28), Pro(B29)HI	64	10.2	78
Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29)HI	53	10.7	74
Gln(B28), Pro(B29)HI	69	6.6	120
Gly(B28), Pro(B29)HI	58	10.5	76
Met(B28), Pro(B29)HI	51	14.6	54
Nle(B28), Pro(B29)HI	54	7.0	114
Orn(B28), Pro(B29)HI	60	12.7	63
Pro(B29)HI	63	8.7	91
Phe(B28), Pro(B29)HI	57	9.7	82
Val(B28), Pro(B29)HI	53	8.7	91

a. 所有的数值均表示注射所示化合物后 1 小时取出的血样的分析结果

b. 表示皮下剂量 $\mu\text{g}/\text{kg}$

c. 相对于人胰岛素

d. 生物合成人胰岛素

如上所述, 本发明的胰岛素类似物聚合成二聚物的倾向小, 或换句话说不会自联成高分子量形式。因此施用一种或多种该类似物后,

很快达到活性。根据病人需要施用有效量的结构式 I 的胰岛素类似物，则本发明的胰岛素类似物可有效地治疗高血糖。本文所用的“有效量”是指治疗或预防高血糖时降低或保持血糖含量所需的本发明一种或多种胰岛素类似物的量。该量一般为每天约 10—60 单位或更多（或如果每 mg 有 29 单位，则为约 0.3—2 mg）。但是，应该明白，实际施用的胰岛素类似物的量是由医生根据有关情况决定的，这些情况包括治疗条件（即高血糖的起因）、待施用的特定类似物、所选用的肠胃外施用途径、每个病人的年龄、体重及反应以及病人症状的严重程度等。因此，不能以任何方式，用上述剂量限定本发明的范围。

借助于含有效量的至少一种结构式 I 的胰岛素类似物的药物组合物与一种或多种医药上可接受的赋形剂或载体相混合，可根据病人需要（即患高血糖的病人）施用本发明的胰岛素类似物。在这些情况下，一般配制的药物组合物每 ml 含 100 单位或含有效量的胰岛素类似物的类似浓度。这些组合物一般（但不是必须的）不口服，可用现有技术中公知的肠胃外产物的普通赋形剂或载体，用不同的方法制得。参见例如列入本文参考文献的 Remington's Pharmaceutical Sciences 17th edition, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985)。例如将所需量的至少一种结构式 I 的胰岛素类似物悬浮或溶于适用于注射的无毒液体载体如一种含水介质中，并使该悬浮液或溶液消毒，可制备肠胃外施用的药剂。另一种方法是，将一定量的化合物放在药瓶中，使药瓶和它的内含物消毒并密封。为便于施用前混合，可再提供一个附加药瓶或载体。适用于肠胃外施用的药物组合物所使用的稀释剂、赋形剂和载体例如水和水可溶混的有机溶剂如丙三醇、芝麻油、花生油、

含水丙二醇、N, N' - 二甲基甲酰胺等。这些药物组合物的例子包括结构式 I 的胰岛素类似物的无菌、等渗的盐水溶液，它能用医药上可接受的缓冲剂缓冲，它是无热原的。另一种肠胃外药物配方含有防腐剂，例如间甲酚或调节最终 pH 的其他试剂如 NaOH 或 HCl。

也可将本发明胰岛素类似物制成适于鼻内给药的药物组合物。该组合物在 EP0200383A3 (已列入本文参考文献) 中已详细公开。简单地说，该组合物是用下列试剂配制的：一种或多种医药上可接受的稀释剂、医药上可接受量的碱金属盐、铵盐或实质上无锌胰岛素的游离酸，以及任意的增加吸收量的至少一种吸收增加剂，该吸收增加剂可选自下列化合物：(1) 油酸或其酯或盐，(2) 液态山梨聚糖脂肪酸酯，(3) 山梨聚糖脂肪酸酯的液体聚氧乙烯衍生物，(4) 液体羟基聚乙烯—聚氧丙烯—聚氧乙烯共聚物。

为证明鼻内给药胰岛素类似物 Lys (B28), Pro (B29) 人胰岛素 (与人胰岛素钠相比) 的效果，进行了下列试验。与试验过程中和试验前，在良好的自然条件下饲养重 10—12 Kg 的雄性警犬。使狗饥饿 16 小时，但使其饮水以确保胰岛素浓度稳定变化。整个试验过程中，用戊巴比妥钠麻醉该狗，用加热垫片保持它们的体温以减少葡萄糖的变化。将胰岛素试验样品 (即 Lys (B28), Pro (B29) 人胰岛素和人胰岛素钠) 溶于蒸馏水中，用 NaOH 调节溶液 pH 为 7.5。最终的胰岛素浓度为每 ml 170 单位。对 8 条狗施用的 Lys (B28), Pro (B29) 人胰岛素的剂量均为每 Kg 0.8 单位胰岛素，同样对 4 条狗施用的人胰岛素钠剂量均为每 Kg 0.8 单位。用剂量测量喷雾器和改进的鼻腔施药器通过鼻腔一次喷雾将所有剂量施入鼻腔内。在施药前 30、15 和 0 分钟及施药后

10、20、30、45、60、90、120、180和240分钟从颈静脉中取出血液样品，用于测定血液葡萄糖的减少。试验结果如表IV所示。

用上述方法，通过鼻内给药Lys(B28),Pro(B29)人胰岛素后血液葡萄糖减少情况与静脉和皮下施用该类似物的结果比较如下：静脉施药时，含Lys(B28),Pro(B29)人胰岛素类似物的胰岛素溶液都是用大丸剂注射(bolus injection)每Kg 0.1单位)注入4条狗的隐静脉(Saphenous Vein)中，在注射前30、15和0分钟和注射后5、10、15、20、30、45、60、90、120、180和240分钟取出血液样品。皮下施药时，将含Lys(B28),Pro(B29)人胰岛素类似物的胰岛素溶液从6条狗的肋外边表皮下方注入(每Kg 0.2单位)。按上述从鼻腔施药的相同方法取出血样。比较试验的结果如表V所示。

表 IV^a

时间 (分)	Lys(B28), Pro(B29) 人胰岛素(开始时的%)	人胰岛素钠 (开始时的%)
-30	95.4 ± 2.5	101.6 ± 2.4
-15	98.2 ± 2.8	102.4 ± 2.9
0	100	100
10	95.4 ± 2.1	100.8 ± 1.9
20	83.5 ± 3.3	96.0 ± 2.1
30	72.2 ± 4.5	91.6 ± 2.8
45	61.6 ± 6.9	89.1 ± 2.3
60	60.0 ± 6.0	93.6 ± 4.5
90	71.6 ± 4.6	92.2 ± 1.6
120	76.1 ± 3.7	91.3 ± 2.8
180	91.2 ± 1.8	93.8 ± 1.8
240	85.4 ± 2.7	90.7 ± 2.8

a 血葡萄糖含量：平均±S. E. M.

表 va

时间 (分)	I. V. (开始时的%)	S. C. (开始时的%)	鼻腔 (开始时的%)
-30	96.6 ± 6.5	95.6 ± 2.1	95.4 ± 2.5
-15	101.3 ± 1.5	98.7 ± 2.7	98.2 ± 2.8
0	100	100	100
5	99.9 ± 2.5	-	-
10	84.8 ± 4.0	99.2 ± 4.8	95.4 ± 2.1
15	68.1 ± 2.7	-	-
20	54.5 ± 3.3	91.9 ± 2.4	83.5 ± 3.3
30	43.3 ± 2.8	81.6 ± 3.0	72.2 ± 4.5
45	-	55.8 ± 3.5	61.6 ± 6.9
60	55.3 ± 3.1	35.3 ± 3.1	60.6 ± 6.0
90	77.2 ± 6.4	39.5 ± 3.4	71.6 ± 4.6
120	85.2 ± 4.7	36.1 ± 2.6	76.1 ± 3.7
180	97.1 ± 6.4	64.5 ± 7.0	91.2 ± 1.8
240	100.0 ± 9.6	81.3 ± 2.4	85.4 ± 2.7

a 血液葡萄糖浓度: 平均 ± S. E. M.

说明书附图

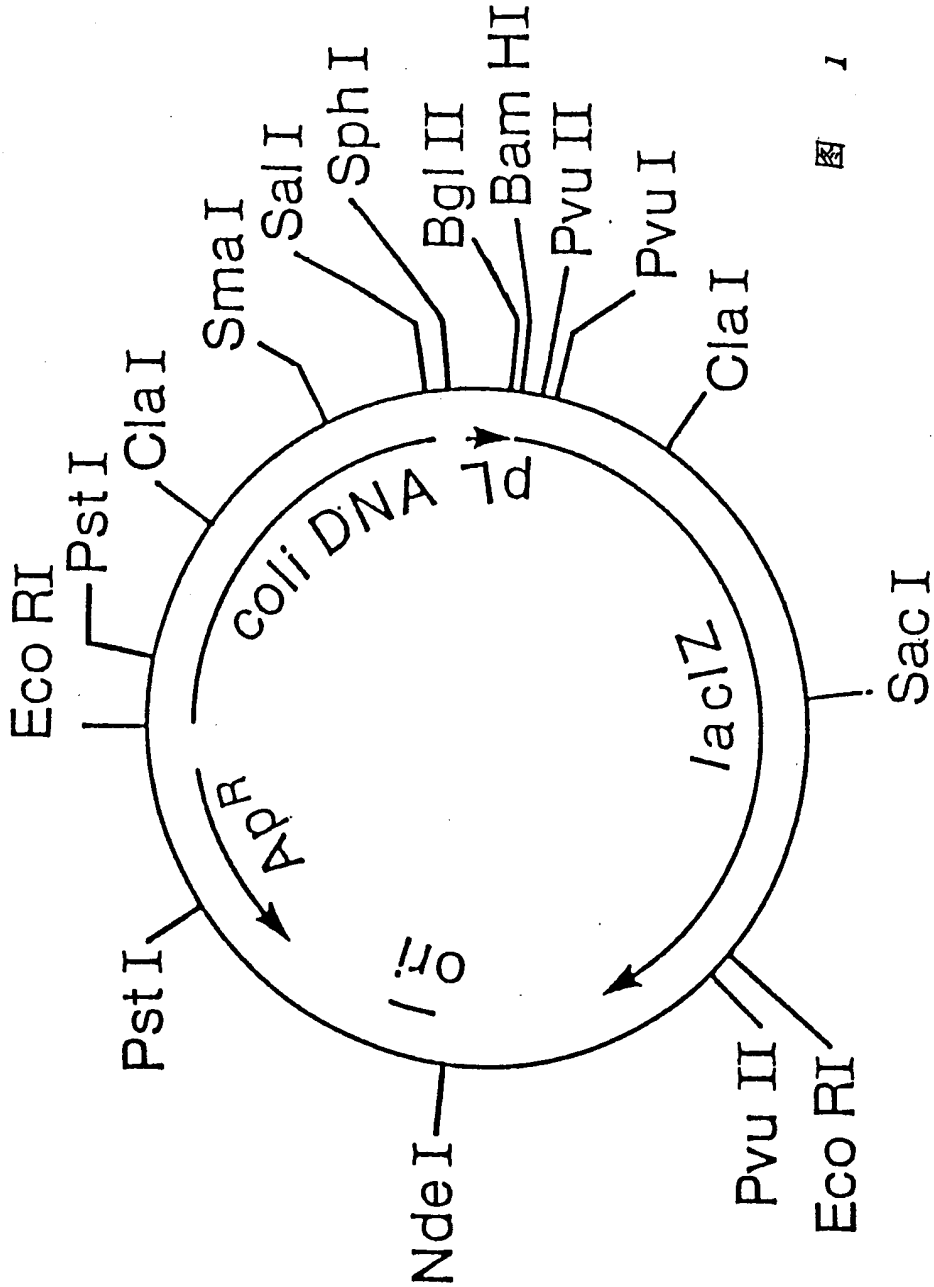
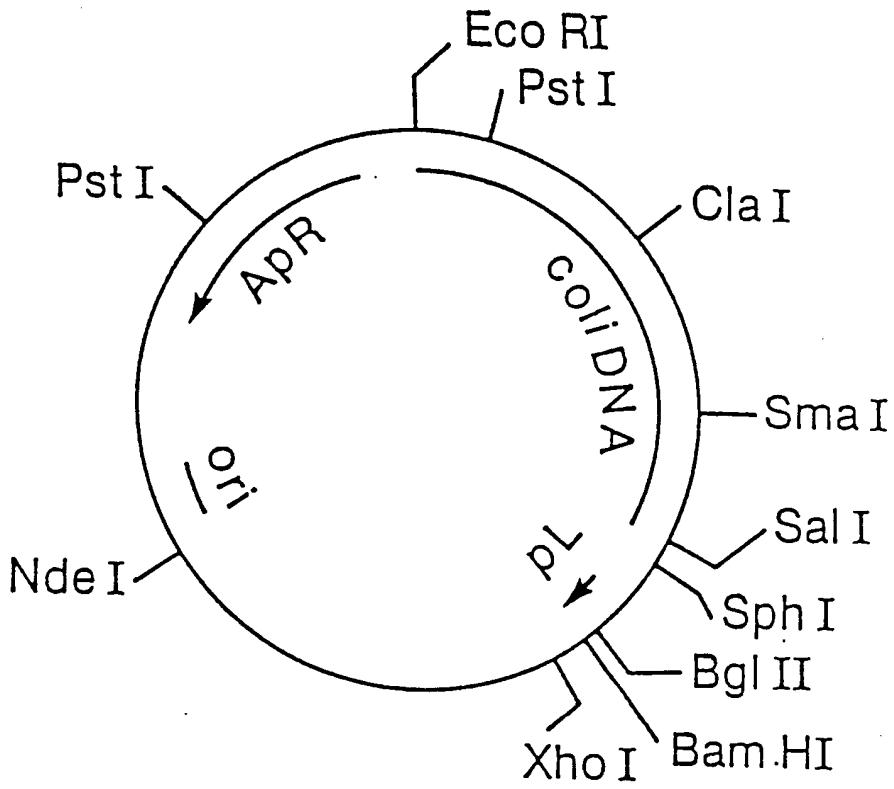


图 1

质粒PKC283 (~9.1kb)的切割位点和功能图

图 2



质粒PKC283 PX (~6.1kb)的切割位点和功能图

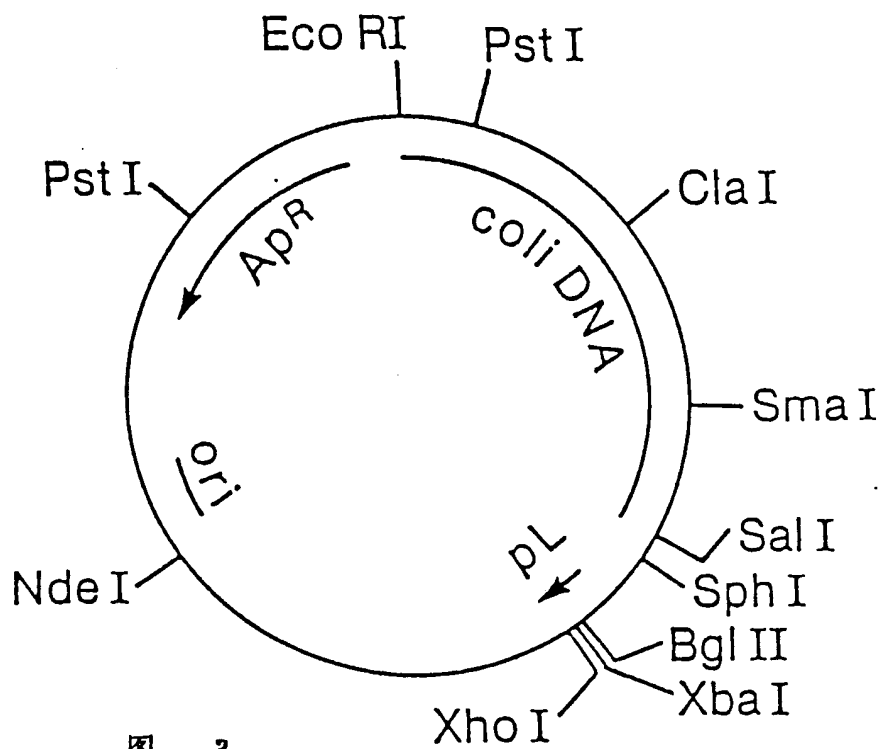
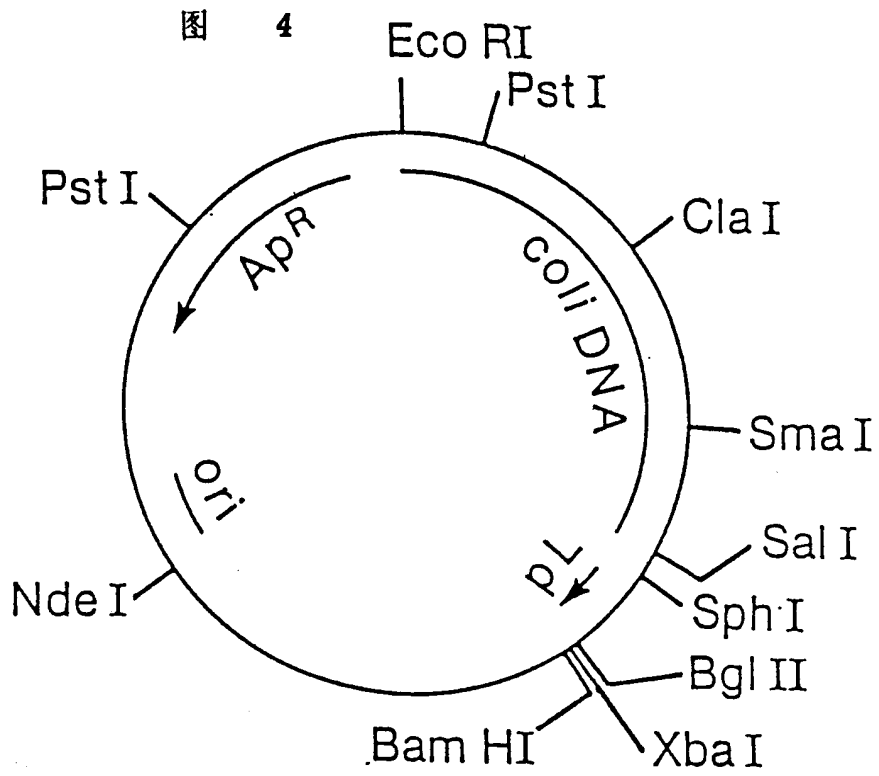


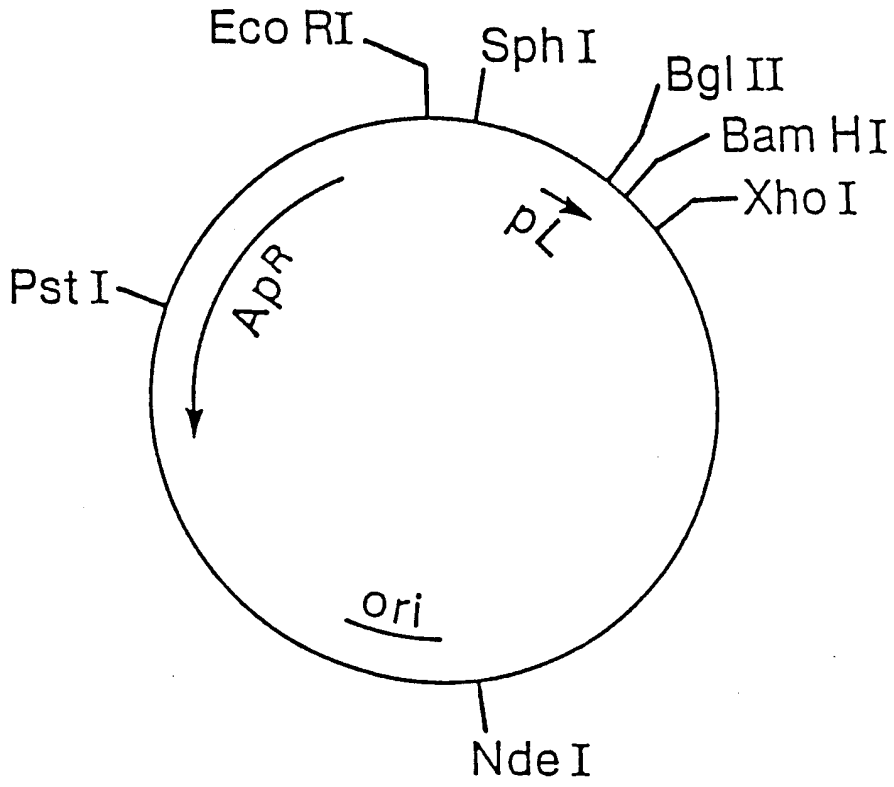
图 3

质粒PKC283-L(~5.9kb)的切割位点和功能图



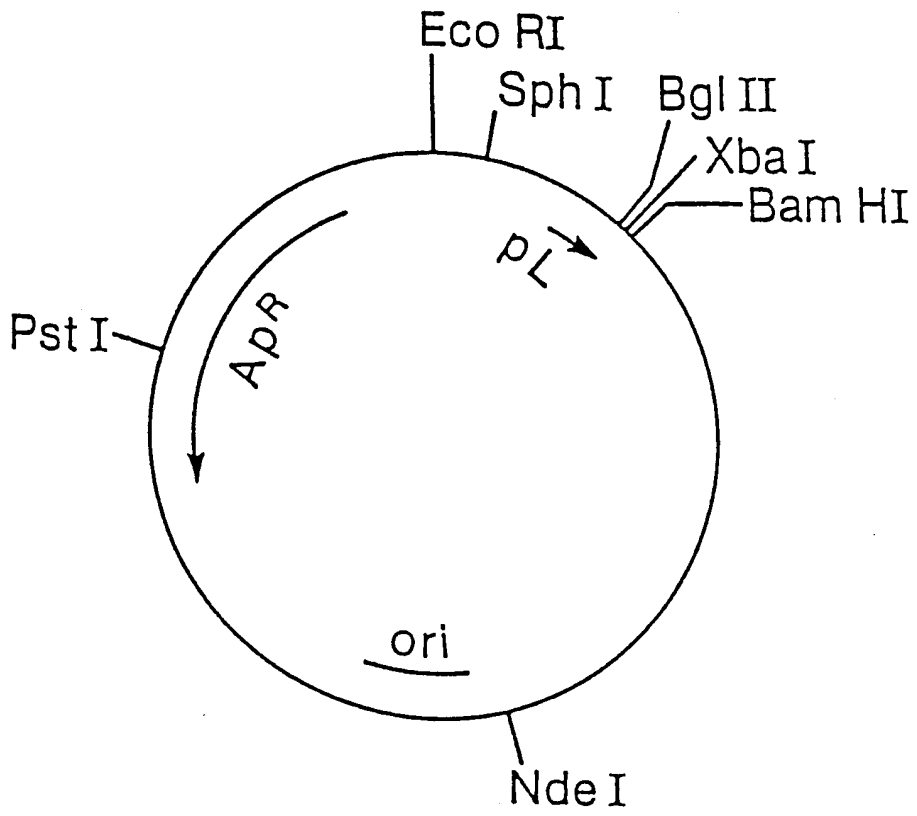
质粒PKC283-LB (~5.9kb)的切割位点和功能图

图 5



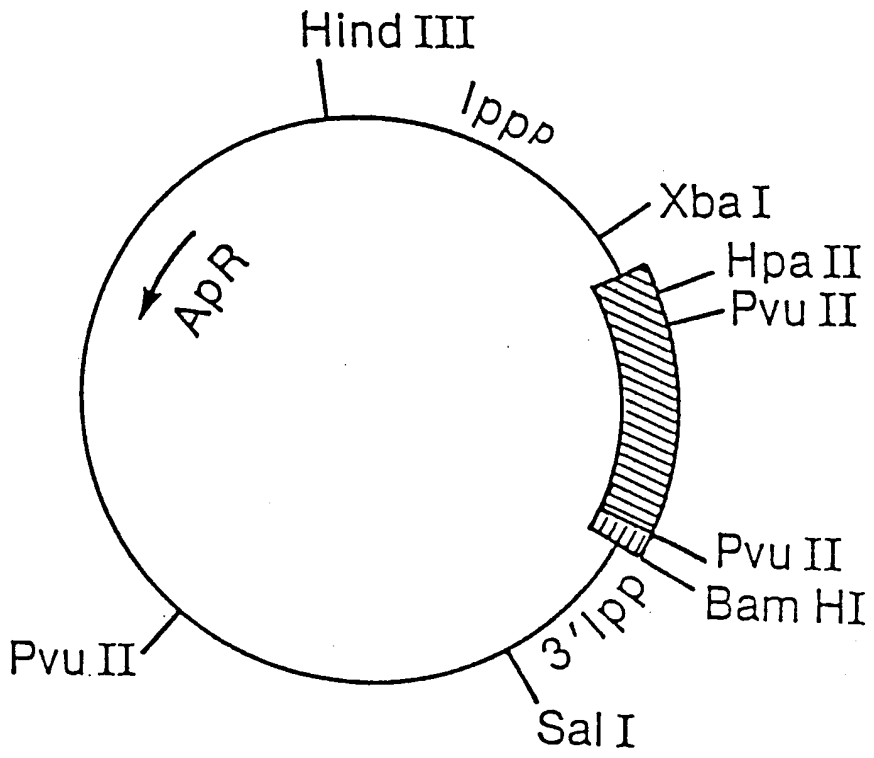
质粒PKC283PRS (~4.0kb)的切割位点和功能图

图 6



质粒PL 32 (~3.9kb)的切割位点和功能图

图 7



质粒pNM789的切割位点和功能图

图 8

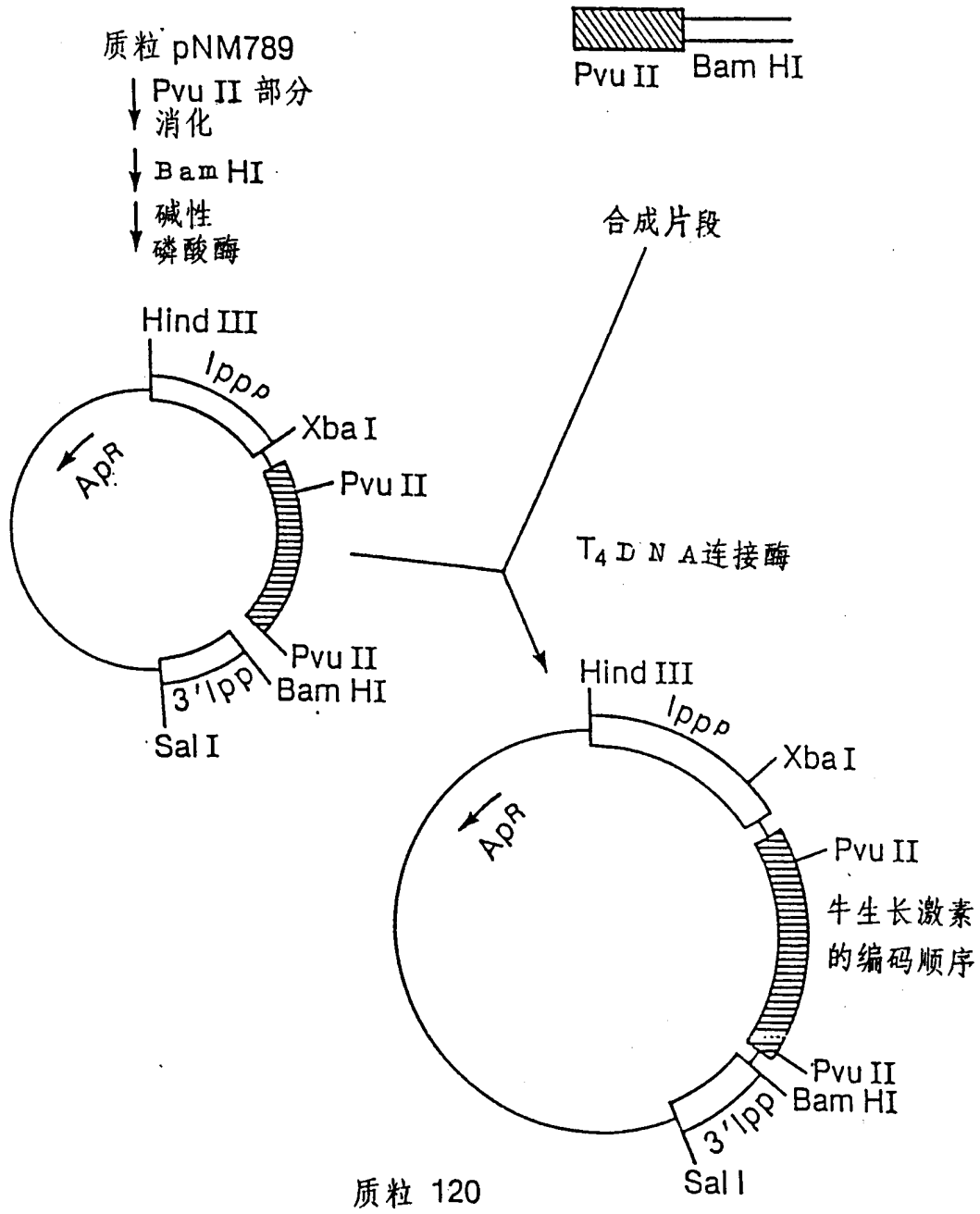
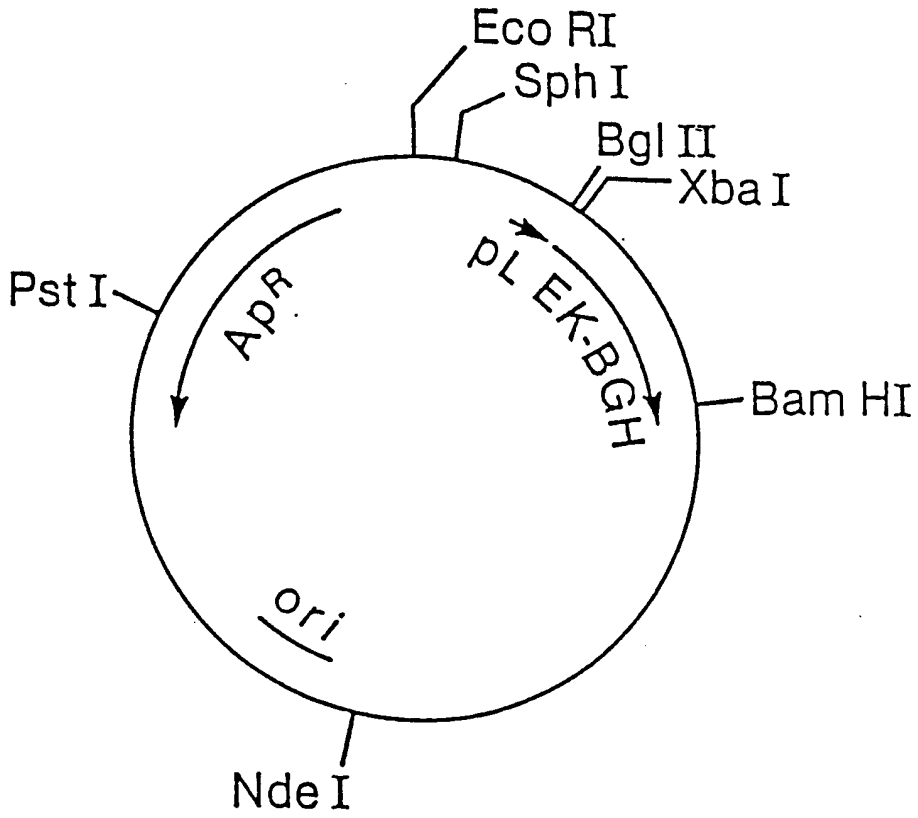
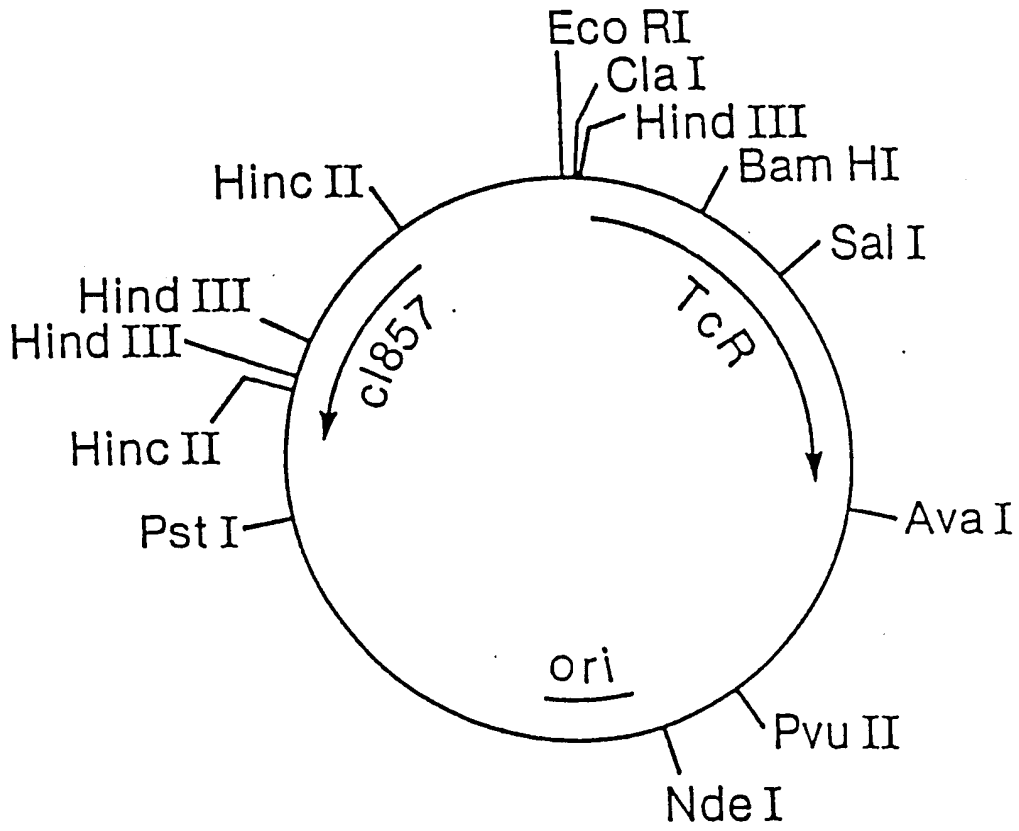


图 9



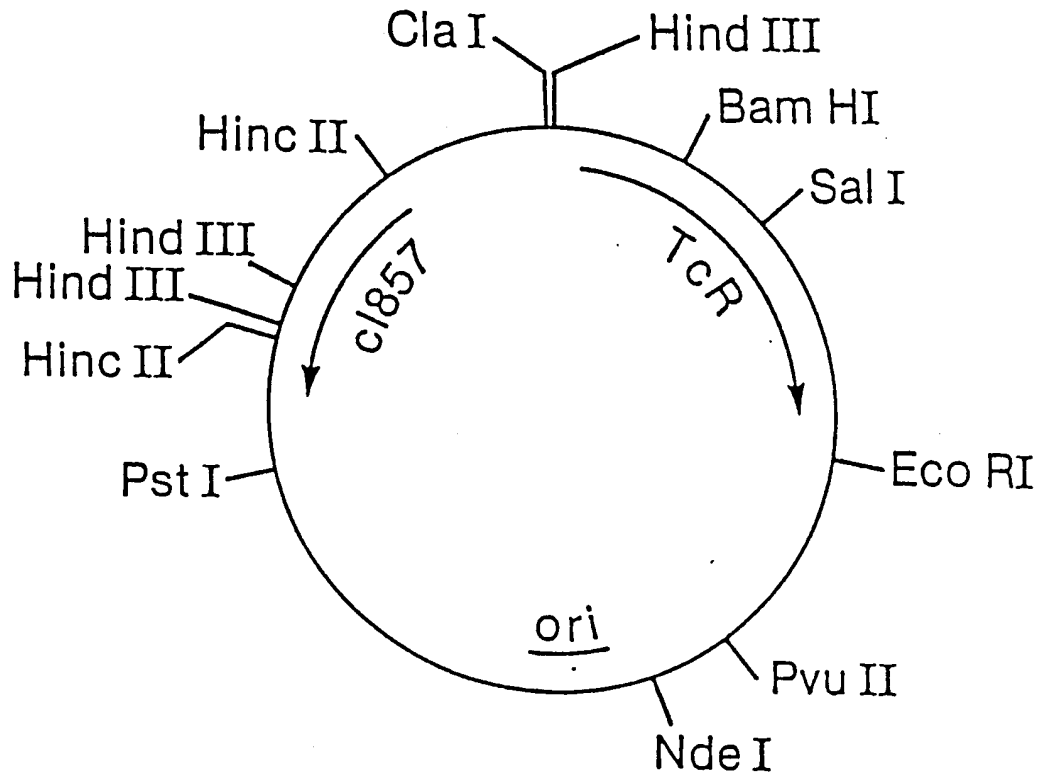
质粒pL 47 (~4.5kb)的切割位点和功能图

图 10



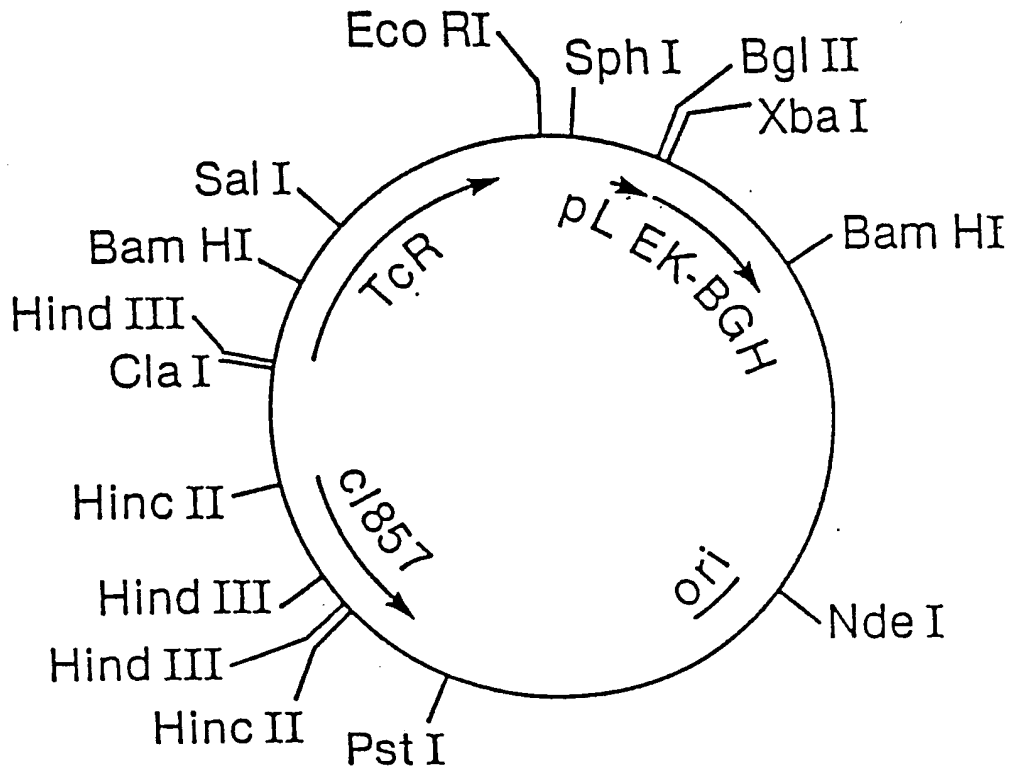
质粒pPR 12(~5.1kb)的切割位点和功能图

图 11



质粒pPR12AR1 (~5.1kb)的切割位点和功能图

图 12



质粒pL110 (~6.6kb)的切割位点和功能图

图 13

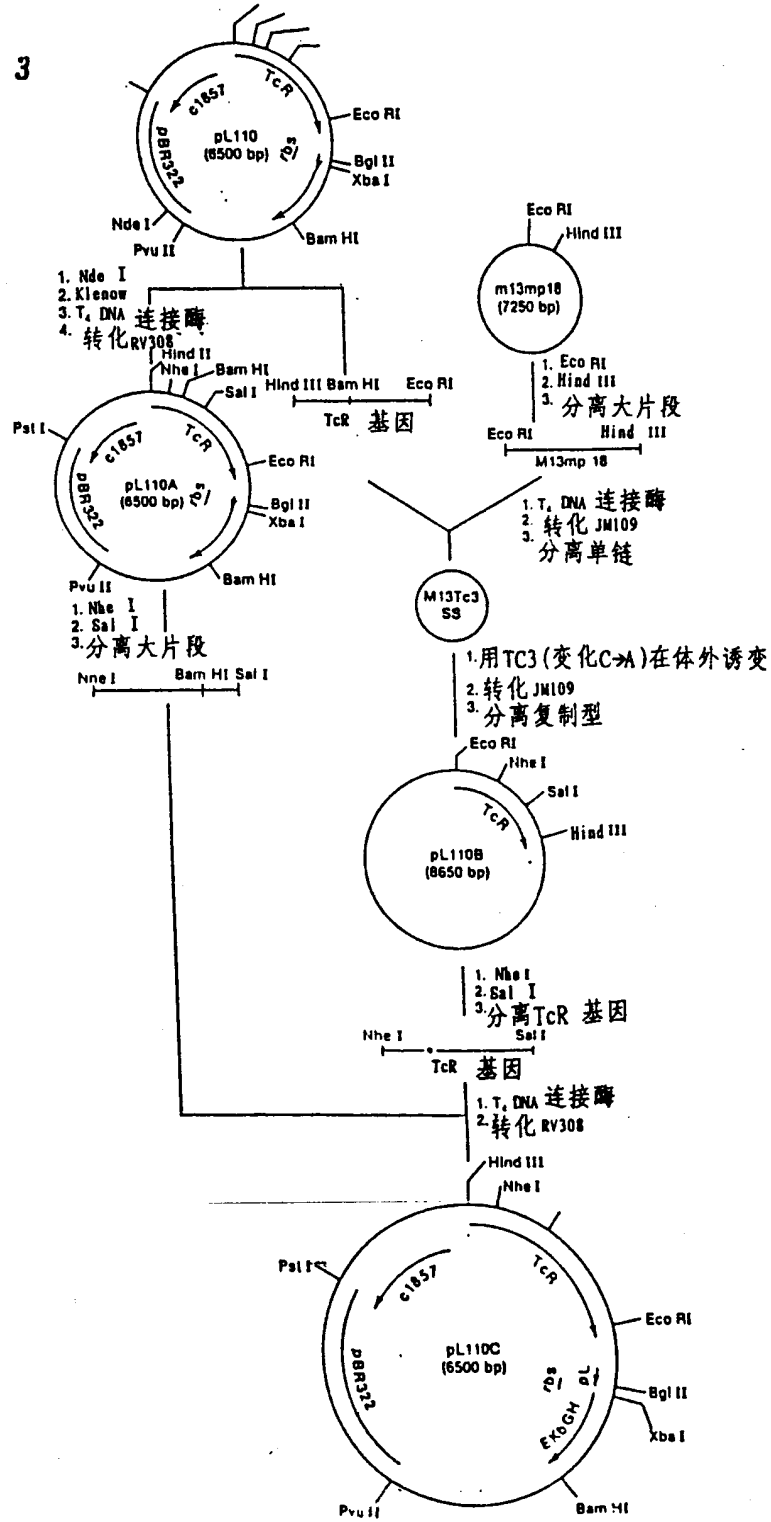
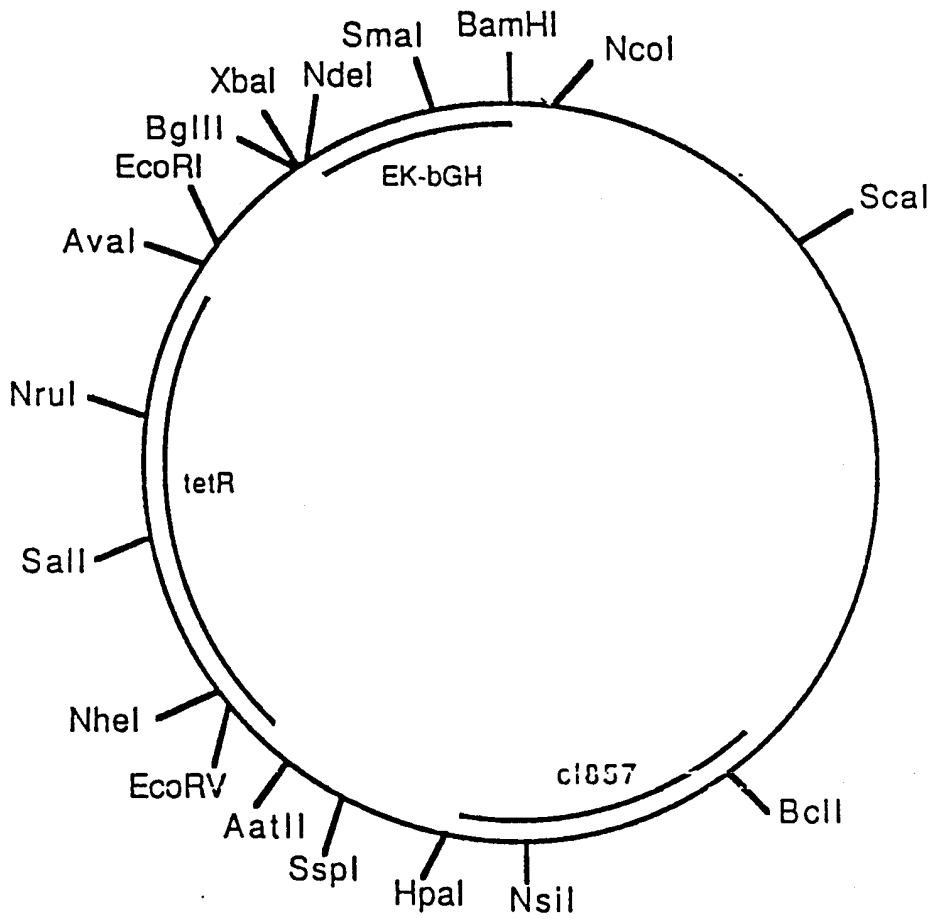


图 14 质粒pCZR126S的切割位点和功能图



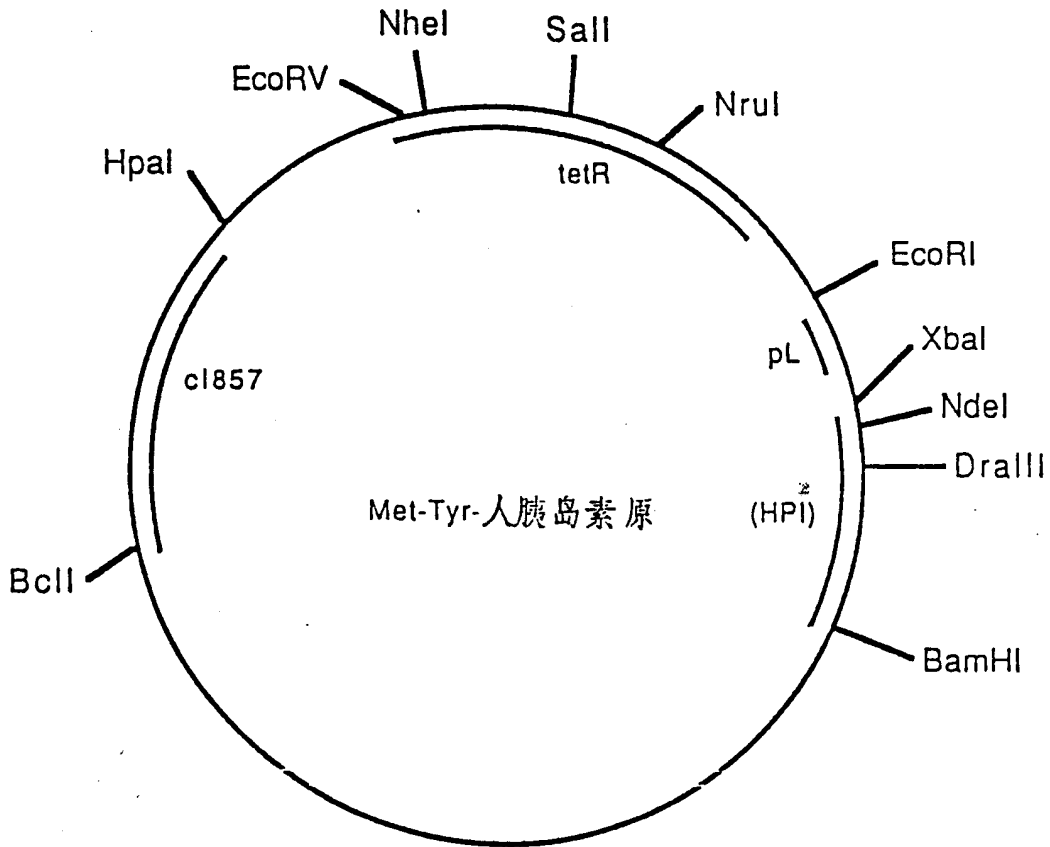
pCZR126S

图 15

HindIII NdeI
5' |AGCTTCAT|ATGTATTTTGTAAACCAACACCTGTGCGGCTCCACCTG|GTGGAAGCTCT
AGTA TACATAAAACAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTGGAC CACCTTCGAGA
DraIII

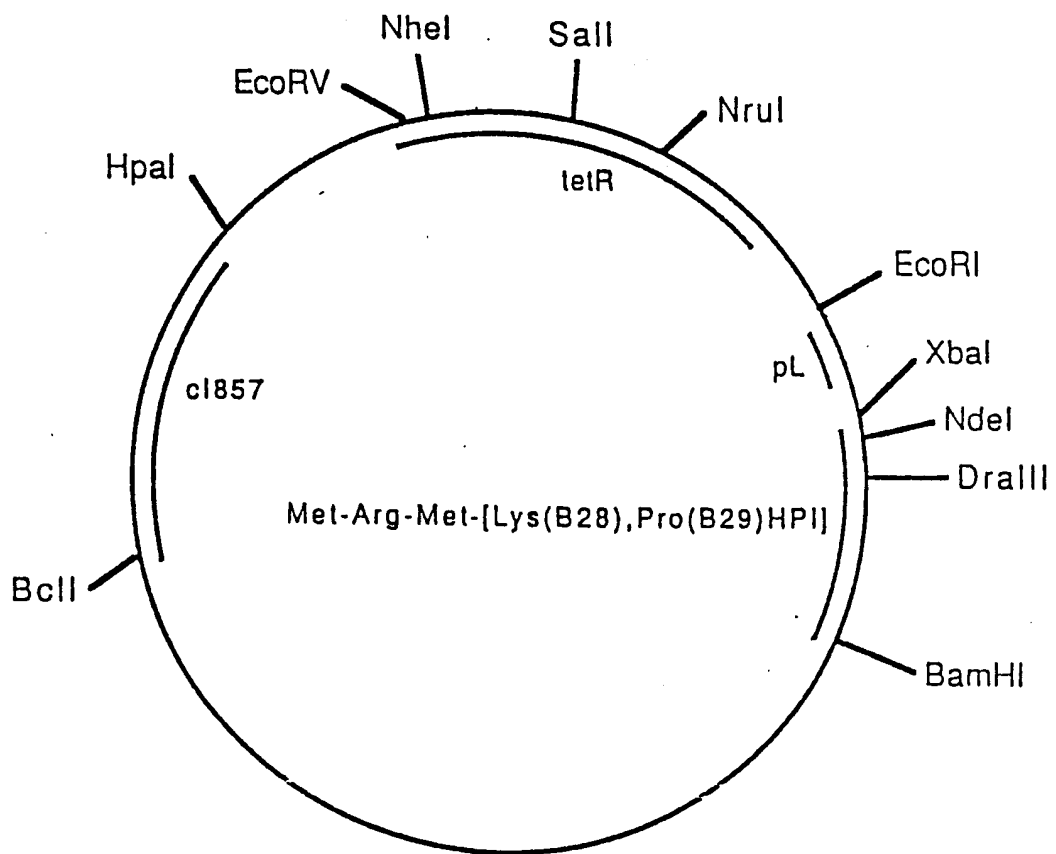
GTACCTGGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTCTACACCCCGAAGACCCGCCGTGAGGCA
CATGGACCACAGCCACTTGCACCGAAGAAGATGTGGGGCTTCTGGGCGGCACTCCGT
AvaII XmaI
GAG|GACCTGCAGGTGGGTGAGGTGGAGCTGGGCGGTGGC|CCGGGTGCAGGCAGCCTGC
CTC CTGGACGTCCACCCAGTCCACCTCGACCCGCCACCG GGCCACGTCCGTCCGACG
AGCCGCTGGCCCTGGAGGGTTCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTAC
TCGGCGACCGGGACCTCCAAGGGACGTCTTCGCACCGTAACACCTTGTACGACATG
BamHI
CAGCATCTGCTCCCTGTACCAGCTGGAGAAGTACTGCAACTAG|GATCCG 3'
GTCGTAGACGAGGGACATGGTGCACCTCTTGATGACGTTGATC CTAGGCTTAA| 5'
EcoRI

质粒pRB145的切割位点和功能图 图 16



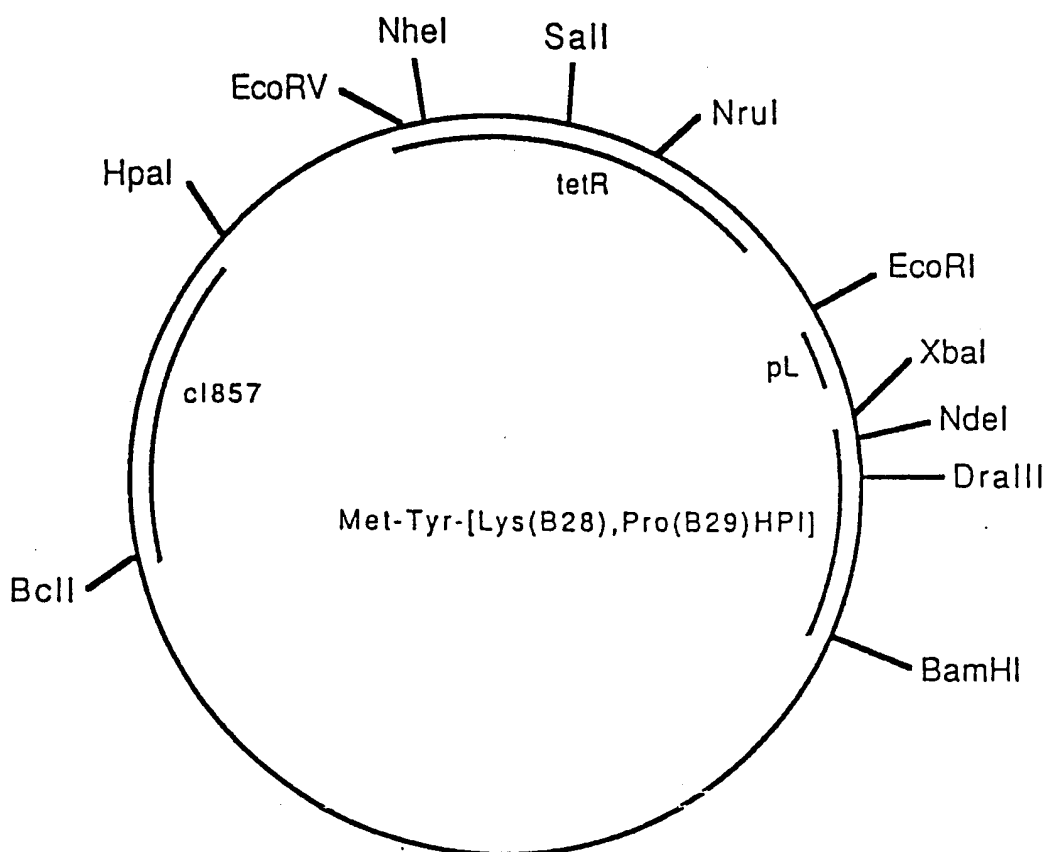
pRB145

质粒pRB164A 的切割位点和功能图 图 17



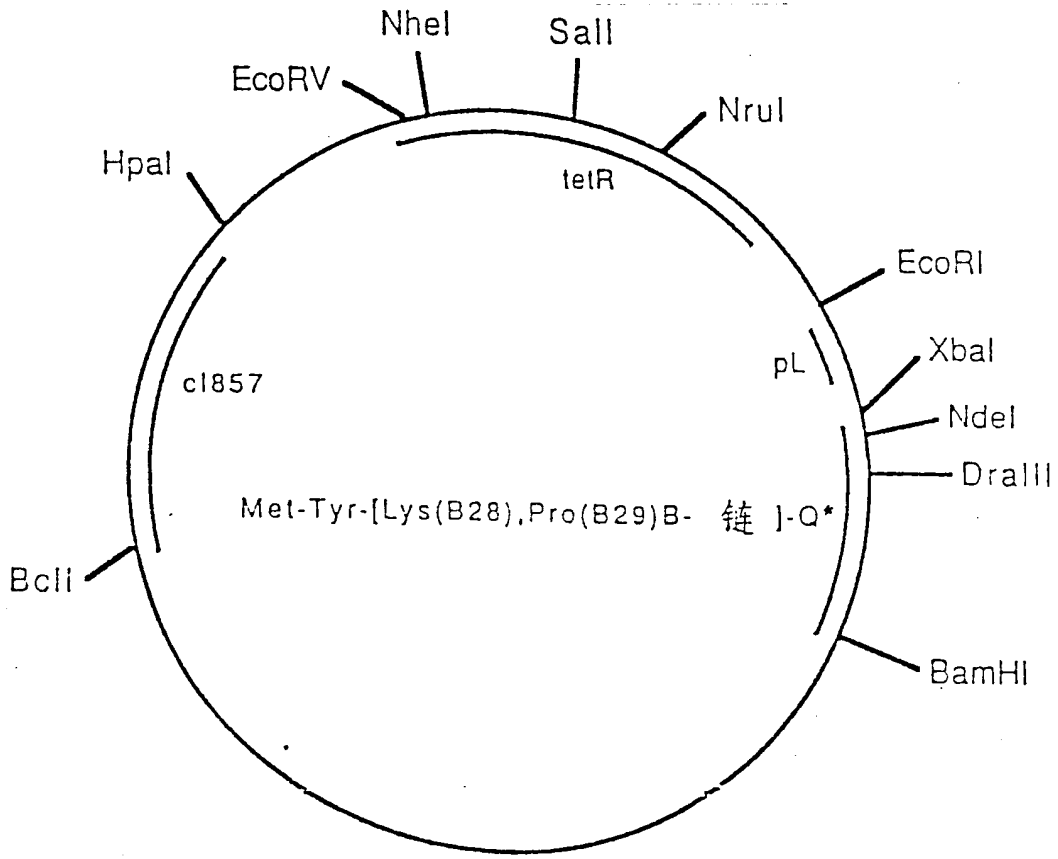
pRB164A

质粒pRB 172 的切割位点和功能图 图 18



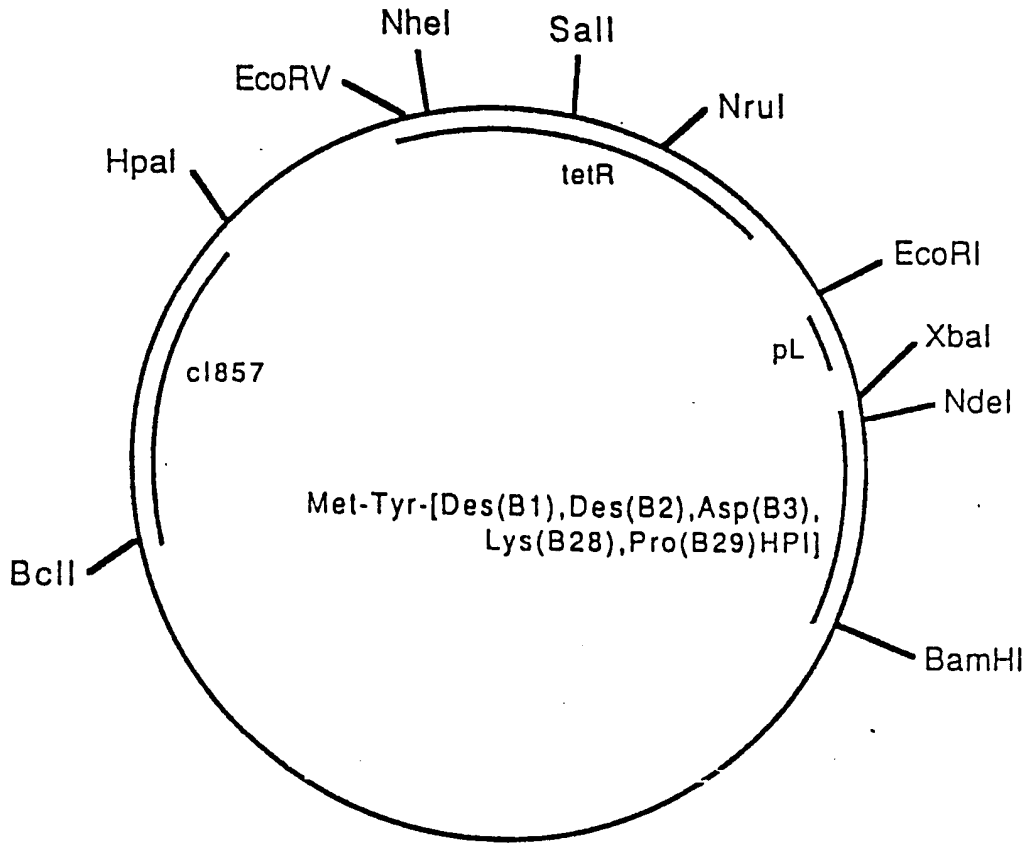
pRB172

质粒pRB173的切割位点和功能图 图 19



pRB173

质粒pRB175的切割位点和功能图 图 20



pRB175