

人胰岛素原密码子的优化及其在毕赤酵母中的表达

史莹飞, 敬科举*, 凌雪萍, 卢英华

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 依据毕赤酵母偏好密码子, 设计合成长效人胰岛素原(human proinsulin, HPI)基因序列, 所合成的 HPI 基因全长为 200 bp, 并在其 N 端添加信号肽(EEAEAEAEAPK)以提高目的蛋白表达。将改造后基因克隆到 pPIC9K 载体中, 构建分泌表达型载体 pPIC9K-HPI, 转化到毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115 中。用遗传霉素 G418 梯度筛选获得高拷贝菌株, 在甲醇诱导下表达分子质量为 7.87 ku 的 HPI, 利用金属螯合层析纯化蛋白质, 胰蛋白酶酶切后利用人胰岛素试剂盒测得生物活性, HPI 摇瓶最高产量可达 35.4 mg/L。该研究为获得大量长效胰岛素基因工程产品奠定研究基础。

关键词: 胰岛素原; 基因改造; 高拷贝; 毕赤酵母

中图分类号: Q 815

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)01-0101-06

胰岛素原是胰岛素的前身, 是由肽链连接胰岛素 A、B 链形成的单链蛋白质, 经过蛋白酶消化去除连接肽, 成为有生物活性的胰岛素。20 世纪 80 年代, 科学家发现连接肽的长短影响单链胰岛素原的分泌水平^[1]。Kjeldsen 等利用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达单链胰岛素原时, 用短肽代替原有较长的连接肽, 实现了以人胰岛素原(human proinsulin, HPI)目的蛋白的高效分泌表达, 同时发现, 在前导肽 α 因子与胰岛素原间插入信号肽(EEAEAEAEAPK), 能显著提高单链胰岛素原的表达水平^[2]。

地特胰岛素(insulin detemir)是一种长效基础胰岛素类似物, 是通过将天然人胰岛素 B 链上排列在第 30 位的苏氨酸(Thr)去掉, 在第 29 位赖氨酸(Lys)上结合一个 14C 游离脂肪酸形成的。通过其分子间强大的自身聚合以及脂肪酸侧链与血清白蛋白结合, 形成蛋白结合体, 实现长效作用^[3], 用于治疗 II 型糖尿病, 目前已批准在我国上市, 本实验所表达的 HPI 就是地特胰岛素的前体。

毕赤酵母作为外源基因表达系统具有培养成本低廉、生长快速、操作简单方便等特点, 在醇氧化酶启动子调控下能高效表达外源蛋白, 并进行蛋白翻译后修

饰^[4], 且不会过度糖基化^[5], 产物与原蛋白基本一致, 制剂生物活性高, 安全性好。毕赤酵母自身分泌的背景蛋白非常少, 后续纯化便利^[6-7], 同时其发酵工艺成熟, 易于扩大生产, 目前已在毕赤酵母中表达的胰岛素基因有: HPI^[8]、猪胰岛素原^[9]。

本实验构建了重组毕赤酵母菌株, 表达 HPI: (EEAEAEAEAPK)-(B1-B29)-AAK-(A1-A21)-(6 × His), 该 HPI 去除了 B 链上第 30 位的苏氨酸(Thr), 以 AAK 作为连接肽, 并在其 N 端加入信号肽(EEAEAEAEAPK), 以提高 HPI 产量, C 端加入组氨酸标签用于蛋白纯化。这种重组菌株表达的 HPI 通过胰蛋白酶作用于赖氨酸(K)的羧基侧^[10], 即可同时切除 N 端信号肽和短肽 AAK, 再经脂肪酸修饰即可形成已应用于糖尿病治疗的地特胰岛素, 为在我国实现高效表达长效胰岛素基因工程产品奠定了初步的研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 毕赤酵母 GS115, 质粒 pPIC9K 由本实验室保存; 限制性内切酶、T4 连接酶、胰蛋白酶购自 TAKARA 公司; 蛋白质 Marker、质粒提取试剂盒购自 BBI 公司; 离心超滤管购自 MILLIPORE 公司; 人胰岛素定量测定试剂盒购自北京北方生物技术有限公司;

MD、MM、YPD 固体培养基; LB 培养基; BMGY、BMMY 液体培养基。有关培养配方见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

收稿日期: 2010-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(3107488); 福建省自然科学基金项目(2011J01058)

* 通信作者: jkj@xmu.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pPIC9K-HPI 的构建

根据 HPI 的氨基酸组成,考虑毕赤酵母的偏好性^[11],进行密码子优化,并在编码 HPI 核苷酸序列的 5'端和 3'端分别添加编码短肽(EAEAEAEAPK)和 6×His 的核苷酸序列,设计如下:

GAATTC	GAG	GAA	GCT	GAG	GCT	GAA	GCT
(EcoRI)	E	E	A	E	A	E	A
	GAA	CCA	AAG	TTC	GTC	AAC	CAA
	E	P	K	F	V	N	Q
	CAC	TTG	TGT	GGT	TCC	CAC	TTG
	H	L	C	G	S	H	L
	GTC	GAA	GCT	TTG	TAC	TTG	GTC
	V	E	A	L	Y	L	V
	TGT	GGT	GAA	AGA	GGT	TTC	TTC
	C	G	E	R	G	F	F
	TAC	ACC	CCA	AAG	GCT	GCT	AAG
	Y	T	P	K	A	A	K
	GGT	ATC	GTC	GAA	CAA	TGT	TGT
	G	I	V	E	Q	C	C
	ACC	TCC	ATC	TGT	TCC	TTG	TAC
	T	S	I	C	S	L	Y
	CAA	TTG	GAA	AAC	TAC	TGT	AAC
	Q	L	E	N	Y	C	N
	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	TAA
	H	H	H	H	H	H	Stop

GCGGCCGC
(NotI)

将该序列交由上海捷瑞生物工程有限公司合成后,连入 pMD18-T 载体,构建质粒 pMD18T-HPI.

分别利用 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切 pPIC9K 和 pMD18T-HPI,回收约 9 300 和约 200 bp 的片段,并将这两个片段连接,构建分泌型重组质粒 pPIC9K-HPI(图 1).

用 CaCl_2 转化法^[12]将重组质粒 pPIC9K-HPI 转化入大肠杆菌 DH5 α ,利用 LB-Amp 平板筛选重组子.提取质粒经 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切鉴定后送上海美季生物技术有限公司测序.

1.2.2 重组质粒转化毕赤酵母

经 *SacI* 单酶切,使 pPIC9K-HPI 成线性重组质粒.通过电击转化法^[12](电击条件:1 500 kV,200 Ω ,25 μF)将其转入毕赤酵母 GS115 中,涂布于 MD 平

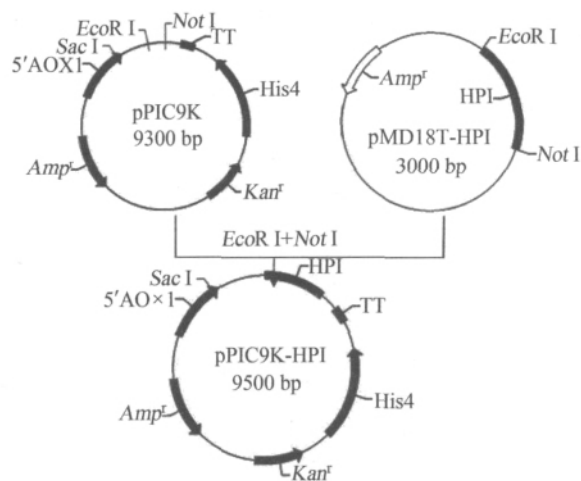


图 1 重组质粒 pPIC9K-HPI 构建示意图

Fig.1 Construction map of recombinant expression vector pPIC9K-HPI

板,30℃静置培养 2~3 d.

1.2.3 重组毕赤酵母基因组 PCR 鉴定

提取重组毕赤酵母基因组,根据目的基因序列,设计引物 Primer1: 5'-CAAGAATTCTTCGTCAAC-CAACACTTGTGTG-3'; Primer2: 5'-TATTGCGGC-CGCTTAATGATGATGATGATGATGGTTACAG-TAGTTTTCCA-3',退火温度 58℃,以 GS115 基因组及未加模板的体系为对照组,PCR 验证目的基因整合入酵母基因组中.

1.2.4 重组菌表型鉴定及多拷贝筛选

将所得转化子编号,用灭菌牙签分别点种到 MD、MM 平板上,30℃静置培养 3~5 d,观察相同编号菌株在两种平板上的生长情况,筛选甲醇利用表型重组菌.同时将转化子点种在遗传霉素(G418)质量浓度分别为 0.25,0.5,1,2,3 mg/mL 的 YPD 平板上,30℃培养 3~4 d,每日检查不同 G418 浓度的平板上菌落的生长情况,以筛选含不同拷贝数目的基因的转化子.

1.2.5 重组菌的诱导表达

挑取不同 G418 抗性的重组子及对照毕赤酵母 GS115 单菌落,接种于 25 mL BMGY 培养液中,30℃,300 r/min 培养约 16 h,至菌液 $OD_{600} = 2 \sim 6$ 时于 4℃、4 000 g 离心 5 min,收集菌体,用 25 mL BMMY 培养液重悬细胞,诱导培养.每 24 h,加入 100%(体积分数,下同)甲醇至与培养液体积比为 0.5%,并取样,4℃、12 000 g 离心 2 min,收集上清液,-20℃冻存待检测.

选择甲醇诱导 96 h 所得样品,通过 16.5%(体积分数,下同)Tricine SDS-PAGE 电泳(120 V,20 mA,5

h), 硝酸银染色, 分析上清液中目的蛋白表达情况。

1.2.6 HPI 相对分子质量的鉴定

同样选择甲醇诱导 96 h 所得样品, 用 10 ku 超滤管离心去除大分子蛋白质, 滤液用 Bruker MALDI-TOF 质谱仪分析蛋白质相对分子质量^[13]。

1.2.7 金属螯合层析法纯化 HPI

HPI 含有 His-Tag, 可以和 Ni^{2+} 产生螯合作用而被吸附, 选择 Amersham 公司的 His Trap HP 柱对 HPI 进行纯化。

用去离子水冲洗柱子直到基线平衡; 用 5 倍柱体积的 Binding Buffer (5.544 g/L Na_2HPO_4 , 0.705 3 g/L NaH_2PO_4 , 29.22 g/L NaCl, 1.37 g/L 咪唑) 平衡; 取 5 mL 摇瓶上清液进样, 进样结束且基线平衡后, 用 Elution Buffer (5.544 g/L Na_2HPO_4 , 0.705 3 g/L NaH_2PO_4 , 29.22 g/L NaCl, 34.44 g/L 咪唑) 洗脱, 并收集 HPI 洗脱峰。

1.2.8 HPI 生物活性鉴定

利用 3.5 ku 透析袋, 4 °C 透析 24 h 后, 取 HPI 与胰蛋白酶 (体积比为 500 : 1) 混合, 酶切 12 h, 用人胰岛素检测试剂盒鉴定酶切产物生物活性^[14]。

1.2.9 重组毕赤酵母诱导表达 HPI 摇瓶优化

以 BMGY 为生长培养基, BMMY 为诱导培养基, 分别考察诱导温度和甲醇浓度对蛋白表达的影响。选择诱导温度分别为 24, 26, 28, 30, 32 °C 进行优化; 分别在诱导过程中添加 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% 的甲醇, 诱导 120 h 取样纯化后测定 HPI 含量。

2 结果与讨论

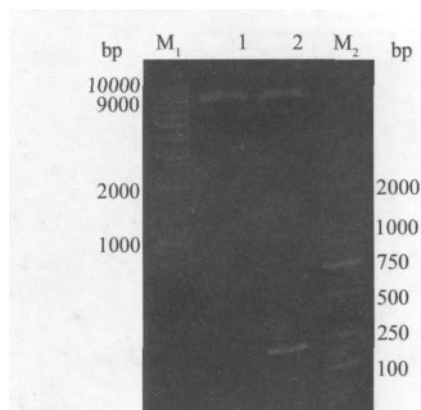
2.1 构建重组质粒 pPIC9K-HPI

电泳结果显示 (图 2), pPIC9K-HPI 双酶切产生了约 200 和 9 300 bp 两条片段, 其中长片段与 pPIC9K 双酶切所得片段大小一致, 证明重组质粒 pPIC9K-HPI 含有所设计的 HPI 编码基因。

实验构建的 pPIC9K-HPI 重组质粒的测序结果与设计的 HPI 编码基因序列完全一致, 表明 HPI 编码基因已经克隆到了载体 pPIC9K 上, 并处于分泌信号 α 因子下游。

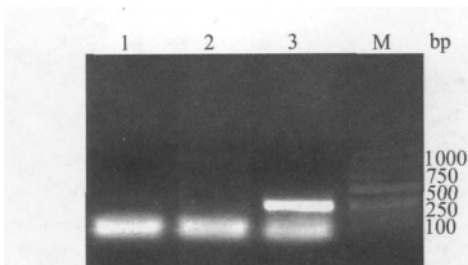
2.2 构建重组毕赤酵母 GS115

重组毕赤酵母基因组 PCR 结果电泳图 (图 3) 显示, 重组酵母基因可扩增得到大小为约 200 bp 的条带, 而 GS115 基因组扩增得到数条不清晰的杂条带,



M₁, 1 kb DNA Marker; 1. 用 *EcoR* I + *Not* I 酶切空白质粒 pPIC9K; 2. 用 *EcoR* I + *Not* I 酶切重组质粒 pPIC9K-HPI; M₂, DL500 DNA Marker.

图 2 重组质粒 pPIC9K-HPI 及 pPIC9K 双酶切鉴定
Fig. 2 Restriction enzyme digestion identification of recombinant plasmid pPIC9K-HPI and pPIC9K



1. PCR 空白对照; 2. 空质粒 GS115; 3. 重组质粒 GS115 (pPIC9K-HPI); M. DNA Marker.

图 3 重组毕赤酵母 GS115(pPIC9K-HPI) 的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis of recombinant GS115(pPIC9K-HPI)

不含扩增模板的对照组只出现了引物二聚体条带, 证明重组质粒 pPIC9K-HPI 整合进酵母基因组中, 实验成功构建了重组毕赤酵母 GS115(pPIC9K-HPI)。

2.3 筛选 Mut⁺ 及多拷贝编码 HPI 基因重组菌

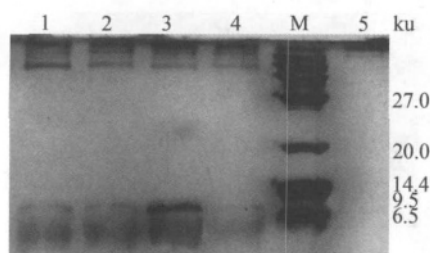
毕赤酵母 GS115 为组氨酸 (His) 缺陷型, 而重组质粒 pPIC9K-HPI 上含有编码组氨酸的基因 (His4), 当质粒 pPIC9K-HPI 整合到酵母基因组中时, 重组菌能在不含组氨酸的 MD 平板上生长, 同时, 能在甲醇为唯一碳源的 MM 平板上生长的转化子表型为 Mut⁺。Mut⁺ 表型菌株利用甲醇能力强, 菌体密度可以达到很高, 表达的外源蛋白含量较高。本实验中各菌株均能在 MD、MM 平板上生长, 证明实验所得重组菌均为 Mut⁺ 型菌株, 成功获得重组毕赤酵母 GS115 (pPIC9K-HPI)。

在一定范围内, 重组毕赤酵母整合多拷贝编码重组蛋白的基因会提高重组蛋白表达产量, pPIC9K-

HPI 带有 Kanamycin 抗性基因,能使阳性重组子产生 G418 抗性^[15],并且所整合的外源基因的拷贝数与 G418 抗性大小之间有一定的计量依赖关系,随 G418 耐受性增加,外源基因拷贝数增加.本实验利用含不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选,得到 G418 抗性为 0.25, 2, 3 mg/mL 的重组子各一株,命名为 GS115(HPI¹)、GS115(HPI⁸)、GS115(HPI¹²).

2.4 HPI 表达和金属螯合层析法纯化

HPI 的理论分子质量为 7.87 ku,对筛选得到的不同拷贝数重组毕赤酵母经甲醇诱导表达 HPI,经 16.5% Tricine SDS-PAGE 蛋白电泳检测,结果如图 4 所示.参照蛋白质 Marker,诱导 96 h 后重组毕赤酵母 GS115(HPI¹)、GS115(HPI⁸)、GS115(HPI¹²)摇瓶上清液在 8 ku 附近均有明显条带出现,对照菌株 GS115 和未诱导的 GS115(HPI¹)在相应位置均没有条带.



1~3. 诱导表达的 GS115(HPI¹), GS115(HPI⁸), GS115(HPI¹²); 4. 未诱导表达的 GS115(HPI¹); 5. 诱导表达的 GS115; M. 蛋白质 Marker.

图 4 HPI 诱导表达 16.5% Tricine SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 16.5% Tricine SDS-PAGE map of expression level of GS115(HPI)

为了进一步验证重组菌株所表达的 HPI 分子质量大小,实验通过质谱仪对表达的 HPI 进行检测,检测结果如图 5 所示,在分子质量为 7.89 ku 处有明显出峰,与实验设计 HPI 理论值 7.87 ku 接近.

经过金属螯合层析纯化,及透析处理后所得样品,以未纯化的摇瓶上清液为对照,利用 16.5% Tricine SDS-PAGE 蛋白电泳检测,结果如图 6 所示.

蛋白质电泳(图 4)及质谱鉴定结果(图 5)可以证明,重组毕赤酵母表达了 HPI,由于毕赤酵母的糖基化作用,所表达的 HPI 相对分子质量稍大于设计大小.其中 GS115(HPI¹²)表达能力最强,将该菌株所表达的蛋白质进行纯化、透析后,进行蛋白质电泳,结果(图 6)显示,杂蛋白条带减少, HPI 条带明显,实现了 HPI 的纯化.

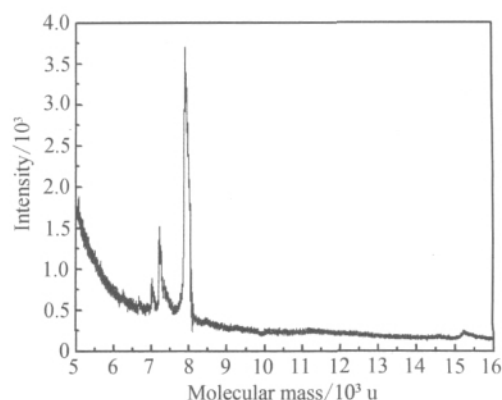
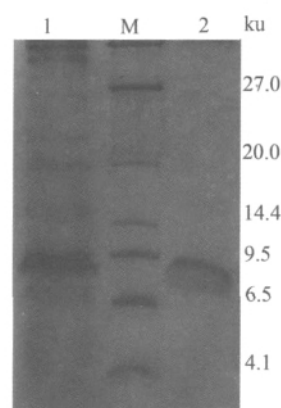


图 5 HPI 分子质量质谱鉴定

Fig. 5 Mass-spectrometric of HPI



M. 蛋白质 Marker; 1. 上清液中的 HPI; 2. 纯化后的 HPI.

图 6 纯化 HPI 的 Tricine SDS-PAGE

Fig. 6 Tricine SDS-PAGE of purified HPI

2.5 检测 HPI 生物活性

本实验还对 HPI 活性进行了初步检测,实验结果如表 1 所示,GS115(HPI¹²)所表达 HPI 纯化后,经胰蛋白酶消化 12 h,其生物活性较酶切前有明显提高,达到 170.46 μ IU/mL,证明实验所表达的胰岛素原经过蛋白酶处理后能形成正确的构型,具有生物活性.

2.6 重组毕赤酵母表达 HPI 诱导条件优化

以 HPI 表达量最高菌株 GS115(HPI¹²)为研究对象,进行摇瓶培养条件优化,其发酵产 HPI 曲线如图 7

表 1 重组蛋白 HPI 活性检测

Tab. 1 The bioassay of recombinant HPI

样品	活性/(μ IU $\cdot$ mL ⁻¹)
摇瓶上清液	64.37
纯化所得 HPI	119.70
蛋白酶消化后 HPI	170.46

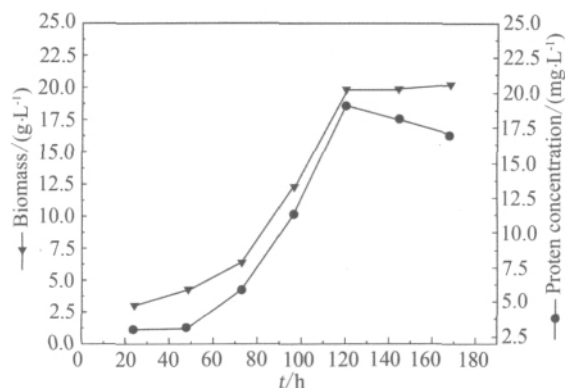


图 7 重组毕赤酵母在 BMMY 培养基中的产 HPI 曲线
Fig. 7 Time course of HPI production by recombinant *P. pastoris* on BMMY medium in shake flask culture

所示,在 30 ℃ 培养条件下,经 0.5% 甲醇诱导 120 h 后 HPI 表达量达到最高,为 19.0 mg/L,细胞干质量约 20.0 g/L。

温度是影响微生物生长和表达的最为关键因素之一。温度升高,有利于生长代谢和蛋白表达,但温度过高也会使菌体过早衰老,降低蛋白表达量。图 8 为诱导温度对重组毕赤酵母产 HPI 的影响。在 0.5% 甲醇诱导条件下,诱导温度为 28 ℃ 时 HPI 产量达到最大值 21.8 mg/L,细胞干质量 26 g/L 当温度达到 30 ℃ 时, HPI 的表达开始下降,诱导温度 32 ℃ 的时毕赤酵母生长缓慢, HPI 表达量明显降低。因此,确定重组毕赤酵母的最佳诱导温度为 28 ℃。

以甲醇作为外源蛋白表达的诱导剂,同时也是诱导过程中的碳源。在甲醇连续添加的情况下,可能造成积累,对菌体产生毒害作用,造成细胞死亡, HPI 表达量低;若添加量不足,又会影响菌体生长。通过优化甲醇添加浓度发现,在 28 ℃ 诱导温度下,当添加 2.0% 甲醇时, HPI 的表达量最高,在 120 h 时达到 35.4 mg/L,细胞干质量达为 29.5 g/L,如图 9 所示。

3 结 论

基因的特性对外源蛋白的表达量起着重要的影响,本实验结合毕赤酵母的密码子偏好性,以及 HPI cDNA 序列的 A+T 含量,对其进行了优化,同时在序列 5' 端加入信号肽序列,以提高外源蛋白表达量,构建了分泌型重组质粒 pPIC9K-HPI,转化入毕赤酵母 GS115 中,利用甲醇表型筛选、抗生素梯度筛选,获得含多拷贝 HPI 基因的重组毕赤酵母。

通过 Tricine SDS-PAGE、质谱检测证明,重组毕赤酵母能够表达相对分子质量正确的 HPI,利用金属

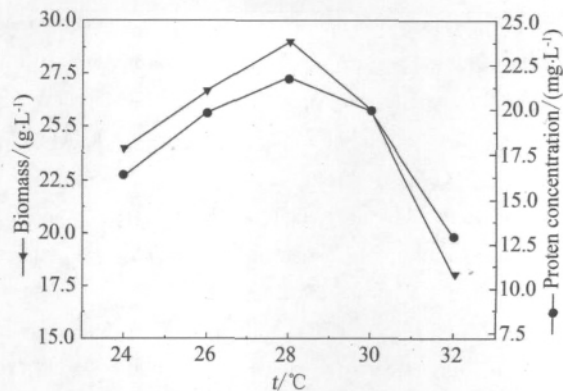


图 8 诱导温度对表达外源蛋白 HPI 的影响
Fig. 8 Effect of temperature on recombinant HPI expression

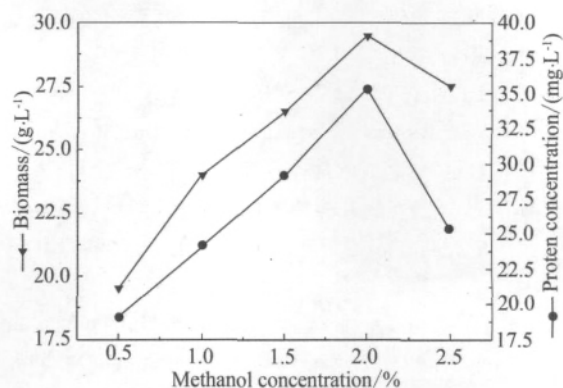


图 9 甲醇浓度对表达外源 HPI 的影响
Fig. 9 Effect of different methanol concentration on HPI expression

螯合层析技术将 HPI 纯化后,经过胰蛋白酶酶切,利用人胰岛素检测试剂盒测得生物活性,活性增强趋势明显,证明形成了正确的蛋白质构型。此外,对利用毕赤酵母诱导培养基 BMMY 对 HPI 的表达温度和甲醇诱导浓度进行简单的优化,结果表明:在 28 ℃ 条件下,2.0% 的甲醇添加量为 HPI 最适表达条件,纯化后测得, HPI 摇瓶最高产量可达到 35.4 mg/L。

本实验将在以后研究中对高效表达 HPI 重组蛋白进行进一步的发酵条件优化,以提高 HPI 表达量,对蛋白进行酶切修饰和正确折叠进行研究,以获得高纯度、高活性的长效胰岛素蛋白,为今后规模化生产长效胰岛素基因工程产品奠定基础。

参考文献:

- [1] Thim L, Hansen M T, Norris K, et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(18): 6766-6770.
- [2] Kjeldsen T, Morten H, Ludvigsen S, et al. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1999, 29: 78-86.

- [3] Hermansen K, Madsdab S, Perrild H, et al. Comparison of the soluble basal insulin analog insulin detemir with NPH insulin; a randomized open crossover trial in type 1 diabetic subjects on basal-bolus therapy [J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(2): 296-301.
- [4] Sue M P, Mariana L F, Brian M N, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *Yeast*, 2005, 22: 249-270.
- [5] Montesino R, Garcia R, Quintero O, et al. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous protein secreted by the methylotrophic yeast *pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 1998, 14(2): 197-207.
- [6] Hollenberg C P, Gellissen G. Production of recombinant protein by methylotrophic yeasts [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8(5): 554-560.
- [7] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology (N Y)*, 1993, 11(8): 905-910.
- [8] 郭永志, 沈孝宙. 人胰岛素原在甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 中的高效表达 [J]. *生物工程进展*, 1999, 19(6): 64-67.
- [9] Wang Y, Liang Z H, Zhang Y S, et al. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 73(1): 74-79.
- [10] Castellanos-Serra L R, Hardy E, Ubieta R, et al. Expression and folding of an interleukin-2-proinsulin fusion protein and its conversion into insulin by a single step enzymatic removal of the C-peptide and the N-terminal fused sequence [J]. *FEBS Lett*, 1996, 378(2): 171-176.
- [11] Sinclair G, Choy F Y. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2002, 26(1): 96-105.
- [12] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [13] 王家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [14] Dodson G, Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8(2): 189-194.
- [15] Rosenfeid S A. *Pichia express system manual* [M]. America: Invitrogen Life Technologies, 2002.

Codon Optimization of Human Proinsulin and Expression in *Pichia pastoris*

SHI Ying-fei, JING Ke-ju*, LING Xue-ping, LU Ying-hua

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: According to the preferential codon of *Pichia pastoris*, the cDNA of human proinsulin (HPI) with the full length of 200 bp was designed and synthesized. It contains the signal peptide (EEAEAEAEAPK) in N terminal in order to increase the protein expression level. The HPI was cloned into shuttle vector pPIC9K to construct recombinant expression plasmid pPIC9K-HPI. It was then transformed into the *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. A transformant with a high copy number of HPI gene was obtained by G418 concentration gradient screening, and then started to express HPI protein after induction with methanol in shake flasks for 120 h. The HPI was digested by trypsin at 4 °C for 12 h after being purified by metal chelate chromatography. The HPI reached 35.4 mg/L, and showed the biological activity detected by ELISA kit.

Key words: proinsulin; gene modified; high-copy; *Pichia pastoris*