



基于异源表达和甲基化修饰制备抗自切重组胰蛋白酶

于文娟, 许伟洲, 孙娜娜, 孙颖, 李玉强, 杨霁菡, 路福平, 王洪彬*

天津科技大学 生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

于文娟, 许伟洲, 孙娜娜, 孙颖, 李玉强, 杨霁菡, 路福平, 王洪彬. 基于异源表达和甲基化修饰制备抗自切重组胰蛋白酶[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3958-3967.

YU Wenjuan, XU Weizhou, SUN Nana, SUN Ying, LI Yuqiang, YANG Jihan, LU Fuping, WANG Hongbin. Preparation of an anti-autolysis recombinant trypsin based on heterologous expression and methylation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3958-3967.

摘要: 当前广泛应用的胰蛋白酶制剂, 其主要来源为动物胰脏提取, 具有原料受限、成本高和纯度低等缺点。此外, 胰蛋白酶的自切降解也影响了其在储存和应用中的稳定性。【目的】通过毕赤酵母异源表达和甲基化修饰制备新型抗自切重组胰蛋白酶。【方法】通过基因重组技术实现猪胰蛋白酶酶原在毕赤酵母中的异源表达; 通过单因素试验对酶原激活的温度、pH 和时间进行考察和优化; 通过探索甲基化修饰方法提高重组胰蛋白酶的抗自切性能。【结果】成功构建了胰蛋白酶酶原的毕赤酵母工程菌株, 优化了酶原的肠激酶激活条件, 考察了胰蛋白酶浓度、甲基化试剂添加量和反应时间对甲基化效果的影响, 在胰蛋白酶浓度 10 mg/mL, 甲基化试剂添加量 30 μ L, 反应时间 3 h 条件下, 所获甲基化酶在酶活损失仅 22% 情况下, 自切 6 h 酶活保留率提高达到了 79%, 相比对照提高了约 3.4 倍, 大幅提高了重组胰蛋白酶的抗自切性能。【结论】本研究基于异源表达和甲基化修饰成功制备了新型抗自切重组胰蛋白酶, 该成果有助于提高我国胰蛋白酶的生产 and 应用水平。

关键词: 胰蛋白酶; 甲基化; 抗自切

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100300); 国家自然科学基金(31871740)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100300) and the National Natural Science Foundation of China (31871740).

*Corresponding author. E-mail: whb@tust.edu.cn

Received: 2024-04-23; Accepted: 2024-05-28; Published online: 2024-05-29

Preparation of an anti-autolysis recombinant trypsin based on heterologous expression and methylation

YU Wenjuan, XU Weizhou, SUN Nana, SUN Ying, LI Yuqiang, YANG Jihan, LU Fuping, WANG Hongbin*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: The widely used trypsin is mainly extracted from animal pancreas, which has the disadvantages of limited raw materials, high costs, and low purity. In addition, the autolysis of trypsin affects its stability in storage and application. **[Objective]** To obtain an anti-autolysis recombinant trypsin by heterologous expression and methylation. **[Methods]** We employed gene recombination to realize the heterologous expression of porcine trypsinogen in *Pichia pastoris*. Furthermore, we conducted single factor experiments to investigate and optimize the temperature, pH, and time of enzyme activation and improved the anti-autolysis performance of the recombinant trypsin by methylation. **[Results]** The engineered strain of *P. pastoris* expressing trypsinogen was successfully constructed. Under the trypsin concentration of 10 mg/mL, methylation reagent addition of 30 μ L, and reaction time of 3 h, the methylated trypsin showed the activity loss of only 22% and the relative activity of 79% after autolysis for 6 h, which was about 3.4 times higher than that of the control, suggesting that the anti-autolysis performance of the recombinant trypsin was greatly improved. **[Conclusion]** This study successfully produced a novel anti-autolysis recombinant trypsin by heterologous expression and methylation, which can improve the production and application of trypsin in China.

Keywords: trypsin; methylation; anti-autolysis

胰蛋白酶具有较强的水解位点专一性,广泛应用于皮革加工、医药、科学研究、食品加工和洗涤剂^[1]等领域。在皮革加工中使用胰蛋白酶软化皮革对胶原蛋白破坏程度小,不易引起松面和烂面等质量问题^[2]。临床上使用胰蛋白酶进行人皮肤细胞培养可以用于治疗急性伤口及慢性不愈合伤口如静脉曲张^[3];用于治疗复发性阿弗他溃疡,促进溃疡愈合减少疼痛^[4];在不损伤或极小损伤组织的情况下稀释血块、脓液等加快伤口代谢、抗炎症^[5]。胰蛋白酶具有优异的水解位点特异性,作为首选的工具酶广泛应用于蛋白质组学研究^[6-7]。在食品加工领域,用于生产各种食

品原料的蛋白水解物^[8-10],如利用胰蛋白酶-糜蛋白酶从鱼糜洗涤水中回收蛋白肽营养物质,可作为营养保健品和功能食品的配料^[11]。

传统上多采用从动物胰脏中提取的方法生产胰蛋白酶,不仅步骤繁琐、原料来源易污染,而且成本高、产率低^[12-13]。随着基因工程技术的迅速发展,利用基因工程技术通过微生物发酵生产动植物来源酶制剂成为研究开发的热点。徐晓峰^[14]成功构建了生产胰蛋白酶的大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)工程菌,比酶活达到 10 526 U/mg。杨敏等^[15]以 *E. coli* BL21(DE3)为表达宿主,通过定点突变获得倾向于切割精氨

酸的突变酶, 比酶活达到 1 566.28 U/mg。Wang 等^[16]利用酿酒酵母可溶性表达了大鼠胰蛋白酶原, 并研究了二硫键 C191-C220 的作用。Shu 等^[17]利用毕赤酵母表达了猪胰蛋白酶, 蛋白产量为 0.48 mg/mL, 最大酶活性为 19.2 U/mL。此外还有研究利用毕赤酵母表达了冷适应鱼胰蛋白酶^[18]、牛胰蛋白酶原^[19]、虾类胰蛋白酶原^[20-21]等, 但表达量普遍较低。

胰蛋白酶存在明显的自溶现象, 影响了其稳定和水解效率。胰蛋白酶专一性识别和水解羧基端含有赖氨酸和精氨酸位点的肽键。理论上, 通过化学法修饰胰蛋白酶的赖氨酸和精氨酸位点, 可以阻碍其对这些自切位点的识别和切割, 进而提高抗自切能力。Treetharnmathurot 等^[22]利用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰胰蛋白酶, 与天然酶相比增加了其稳定性。Villalonga 等^[23]利用 β -环糊精-羧甲基纤维素对胰蛋白酶进行化学修饰, 修饰的酶孵育 3 h 后保留约 65% 的初始活性, 而天然酶孵育 90 min 活性完全丧失。Treetharnmathurot 等^[24]的研究结果表明, 糊精、PEG、semi-telechelic poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] (ST-HPMA) 修饰胰蛋白酶均可以增加其热稳定性和自溶稳定性。Promega 公司垄断了全球蛋白质组学研究领域对高品质胰蛋白酶的大部分需求, 其胰蛋白酶产品经过了甲基化修饰处理, 具有很强的抗自切稳定性。然而该公司并未公开其胰蛋白酶甲基化修饰的技术实现细节, 相关研究也缺乏公开报道。为摆脱对跨国公司抗自切胰蛋白酶的依赖, 本研究以猪胰蛋白酶为对象, 致力于通过基因重组技术和甲基化修饰实现新型抗自切重组胰蛋白酶的微生物异源表达。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

本研究所用的克隆宿主 *E. coli* JM109, 表达

宿主毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115, 均为实验室保存; 克隆载体 T-Vector pMD19 (Amp^r), TaKaRa 公司; 表达载体 pPIC9K (Kan^r, Amp^r), Invitrogen 公司。

1.2 培养基

MD、YPD、BMGY、BMMY 培养基参考文献[25]配制。

1.3 主要试剂和仪器

重组肠激酶, 上海雅心生物技术有限公司; 分子生物学操作酶制剂, TaKaRa 公司。

多功能微孔板读数仪和 PCR 热循环仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.4 重组菌株的构建

猪胰蛋白酶重组序列及其毕赤酵母重组质粒的构建如图 1 所示。猪胰蛋白酶原的基因原始序列需要经过密码子优化后才适合在 *P. pastoris* GS115 中表达, 优化后的基因序列见图 1A, 基因序列合成后, 将其连接到通用质粒 pUC57 上, 并命名为 pUC57-try。将基因克隆至 T 载体, 所得重组质粒命名为 T-try, 分别采用 *Sna*B I 和 *Not* I 对重组质粒 T-try 和 pPIC9K 进行双酶切处理, 并纯化回收 710 bp 的目的基因片段以及约 9.3 kb 的载体片段, 随后将目的基因与 pPIC9K 载体连接(图 1B), 12-16 h 后转化至 *E. coli* JM109, 挑取阳性转化子, 提取重组质粒, 并用 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切验证, 重组质粒命名为 pPIC9K-try。重组质粒使用 *Sal* I 酶线性化, 纯化后电转至 *P. pastoris* GS115 感受态中, 依次经 MD 板筛选、0.5 mg/mL 和 2 mg/mL 遗传霉素抗性平板筛选, 获得重组菌株 GS115-pPIC9K-try。YPD 培养基培养的菌液, 接种于 50 mL BMGY 培养基中, 30 °C 条件下培养至 OD_{600} 值达到 2.0-6.0 后, 通过离心洗涤更换培养基为 BMMY 培养基, 每 24 h 补加 500 μ L 甲醇, 诱导表达 108 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 通过 SDS-PAGE 分析胰蛋白酶原的表达情况。

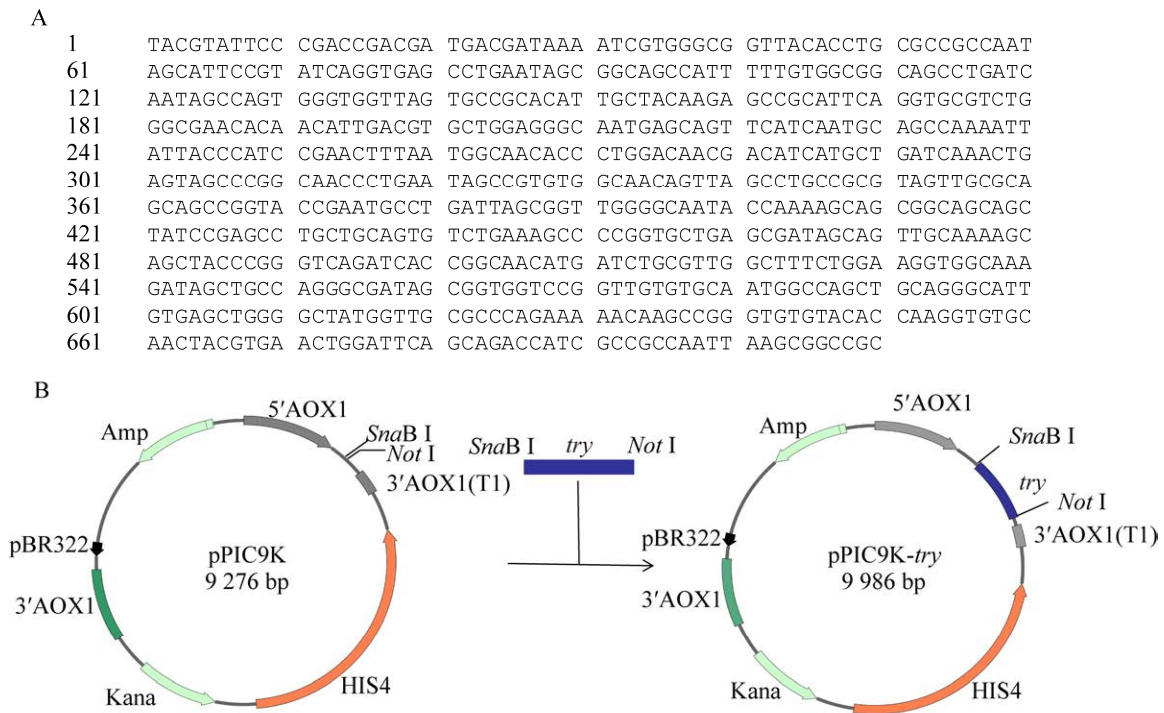


图 1 猪胰蛋白酶原重组序列及其 *Pichia pastoris* GS115 重组质粒的构建

Figure 1 Construction of the recombinant plasmid of trypsinogen in *Pichia pastoris* GS115. A: The codon-optimized gene sequences of trypsinogen. B: Recombinant plasmid pPIC9K-try construction.

1.5 重组胰蛋白酶原激活条件的优化

1.5.1 不同激活温度的比较

使用 3 mol/L HCl 或 NaOH 将发酵上清液 pH 调至 6.5, 向 1 mL 发酵液中加入 1 μ L 的 10 U/ μ L 的肠激酶和 100 μ L 肠激酶缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 分别于 20、25、30、37 和 42 $^{\circ}$ C 条件下孵育激活, 并于 0、12、24、36、48、60 和 72 h 取样测定胰蛋白酶酶活力。

1.5.2 不同激活 pH 值的比较

使用 3 mol/L HCl 或 NaOH 将发酵上清液 pH 分别调至 4.5、5.5、6.5、7.5 和 8.5, 向 1 mL 发酵液中加入 1 μ L 10 U/ μ L 的肠激酶和 100 μ L 肠激酶缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 于 37 $^{\circ}$ C 孵育激活, 并于 0、12、24、36、48、60 和 72 h 取样测定胰蛋白酶酶活力。

1.6 胰蛋白酶的甲基化修饰

使用含有 5 mmol/L CaCl_2 的 50 mmol/L 醋酸溶液 (pH 3.5) 配制一定蛋白浓度的胰蛋白酶溶液, 取 1 mL 加入一定体积的 1 mol/L 二甲胺硼烷 (dimethylamine borane, DMAB) 和 1 mol/L 甲醛溶液 (DMAB 和甲醛添加体积比为 1:2), 4 $^{\circ}$ C 避光振荡反应一定时间。对照不添加甲基化试剂。分别考察胰蛋白酶浓度、甲基化试剂添加量和反应时间对甲基化修饰效果的影响, 具体条件: 胰蛋白酶浓度 2.5、5、10、15 和 20 mg/mL; 甲基化试剂添加量 15、30、60、90 和 150 μ L; 甲基化反应时间 0、1、2、3 和 4 h。

1.7 胰蛋白酶酶活力测定

酶活力测定采用苯甲酰精氨酸乙酯 (benzoyl arginine ethyl ester, BAEE) 法^[26], 以 BAEE 为底

物, 在 pH 8.0 和 25 °C 条件下进行酶解反应, 测定 A_{253} 下吸光度的增加速率, 以 A_{253} 每分钟增加 0.001 为 1 个酶活单位。

1.8 甲基化酶酶活收率和 6 h 酶活保留率的测定

取甲基化酶样品, 用 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (pH 8.0) 稀释到蛋白酶浓度为 1 mg/mL, 并于 37 °C 自切孵育, 在 0 h 和 6 h 取样测定酶活力, 计算初始酶活收率和自切 6 h 酶活保留率, 见公式(1)和公式(2)。

$$\text{甲基化酶酶活收率} = (\text{甲基化酶酶活力} / \text{对照酶酶活力}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{自切 6 h 酶活保留率} = (\text{自切第 6 h 酶活力} / \text{自切第 0 h 酶活力}) \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 胰蛋白酶酶原重组表达菌株的构建

酶分子异源表达常用大肠杆菌工程菌株, 但动

物来源的胰蛋白酶在大肠杆菌里以包涵体的形式表达, 导致其复性和纯化困难^[14-15]。与之相比, 毕赤酵母工程菌株可以进行真核来源蛋白质的转录后加工修饰, 将异源蛋白可溶性表达, 并分泌至胞外, 便于分离纯化, 因此选择了毕赤酵母作为异源表达工程菌株。本研究构建了胰蛋白酶酶原的毕赤酵母重组表达工程菌株 GS115-pPIC9K-*try* (图 2)。重组质粒进行双酶切验证, 结果如图 2A 所示, 在 8 000–10 000 bp 和 500–750 bp 之间各存在一条清晰可见的条带, 其大小分别与质粒 pPIC9K 和 *try* 的大小相符, 表明重组质粒 pPIC9K-*try* 构建成功。重组菌株和对照菌株摇瓶发酵的上清液进行胞外蛋白 SDS-PAGE 检测, 结果如图 2B 所示, 重组菌株相比对照菌株表达了大小接近 25.0 kDa 的蛋白质, 与胰蛋白酶酶原的理论分子量 24.4 kDa 接近, 表明重组菌株成功表达了胰蛋白酶酶原, 表达水平约为 0.43 mg/mL。

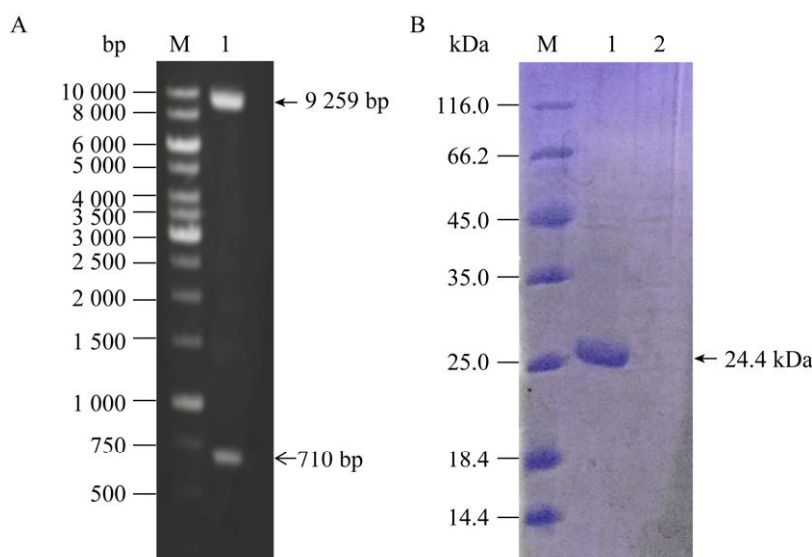


图 2 毕赤酵母异源表达胰蛋白酶酶原

Figure 2 Heterogeneous expression of trypsinogen gene in *Pichia Pastoris*. A: Double enzyme digestion verification of the recombinant plasmid pPIC9K-*try*. Lane M: 1 kb DNA Ladder; Lane 1: Double digestion verification with *Sna*B I and *Not* I. B: Detection of recombinant trypsinogen by SDS-PAGE. Lane M: Protein marker; Lane 1: GS115-PPIC9K-*try* fermentation solution; Lane 2: GS115-pPIC9K fermentation solution.

2.2 重组胰蛋白酶原的激活和自切失活

重组表达的胰蛋白酶原, 并无蛋白酶活性, 需要肠激酶切割前肽后才能激活^[27]。直接表达活性胰蛋白酶, 可能对细胞产生毒性, 并在发酵过程中因自切导致活力损失。表达非活性胰蛋白酶原, 也便于根据需求选择合适时间点进行激活。本研究考察和优化了肠激酶激活胰蛋白酶原的适合条件, 并通过 SDS-PAGE 和酶活力变化分析揭示了胰蛋白酶的自切失活过程, 结果如图 3 所示。由图 3A 可知, 温度对胰蛋

白酶原的激活速率有较大影响, 37 °C 条件下激活能够收获最高的比活力。酶活力随着激活时间的延长, 先升高后降低, 激活 48 h 能够获得最高的酶活力。激活达到最高酶活力之后, 推测失活速度超过了激活速度, 因此酶活力开始呈现下降趋势。由图 3B 可知, pH 同样对胰蛋白酶原的激活速率存在很大影响, pH 7.5 条件下激活能够收获最高的酶活力。综上所述, 胰蛋白酶原肠激酶激活的适合条件为 pH 7.5 和温度 37 °C 条件下激活 48 h。

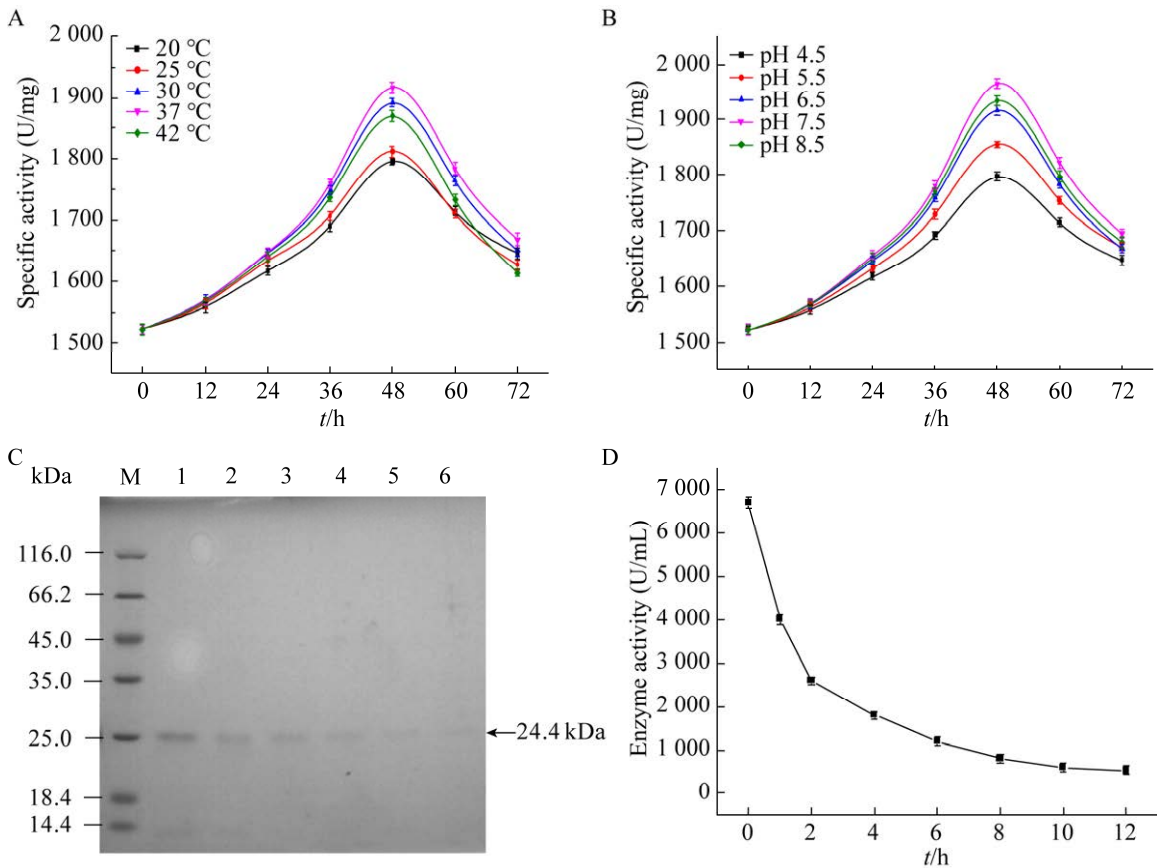


图 3 胰蛋白酶原的激活和胰蛋白酶的自切失活

Figure 3 The activation of trypsinogen and the autolysis of trypsin. A: The effect of different temperatures on activation. B: The effect of different pH on activation. C: Changes in enzyme activity during trypsin autolysis. Lane M: Protein marker; Lane 1: 2 h; Lane 2: 4 h; Lane 3: 6 h; Lane 4: 8 h; Lane 5: 10 h; Lane 6: 12 h. D: SDS-PAGE analysis of the trypsin autolysis process.

了解胰蛋白酶的自切过程和特点,有助于通过改造提高其抗自切稳定性。胰蛋白酶专一性识别和水解羧基端为赖氨酸和精氨酸的肽键,而胰蛋白酶分子本身含 4 个精氨酸和 11 个赖氨酸位点,因此理论上其会因为自切而不断失去活力。图 3C 的 SDS-PAGE 图直观地展示了胰蛋白酶 12 h 内的自降解过程,随着自切时间的延长,胰蛋白酶的条带逐渐变浅,第 12 h 条带近乎消失。图 3D 展示了胰蛋白酶活性因自切不断失活下降的过程,激活后的胰蛋白酶初始酶活力为 6 700 U/mL,但自切孵育 6 h 后酶活力降到了 1 200 U/mL,其自切 6 h 酶活保留率仅为 17.9%,说明胰蛋白酶的抗自切稳定性较差,需要通过改造提高其抗自切能力。

2.3 胰蛋白酶的甲基化修饰

胰蛋白酶特异性水解底物蛋白的赖氨酸和精氨酸位点,同样其自切失活也是通过对自身的赖氨酸和精氨酸位点选择性水解而实现。通过化学法修饰胰蛋白酶的赖氨酸和精氨酸位点,理论上可以阻碍胰蛋白酶对自切位点的识别和切割。研究表明,蛋白质中的赖氨酸可以选择性被甲基化修饰^[28]。占据市场主导地位的 Promega 公司的胰蛋白酶产品,正是通过甲基化修饰处理获得了优异的抗自切性能,但是其技术细节和条件并未公开。本研究选择 DMAB 和甲醛进行甲基化修饰,比较不同反应条件对甲基化胰蛋白酶酶活收率和抗自切稳定性的影响,结果如图 4 所示。甲基化反应前后的酶活收率,可以反映甲基化修饰对酶活力的损伤效果,而甲基化酶自切 6 h 后的酶活保留率,则能反映甲基化酶的抗自切能力,因此本研究选择甲基化酶活收率和甲基化酶自切 6 h 酶活保留率作为考察甲基化修饰条件的关键指标。两个指标可能存在冲突,需要通过对比实验和综

合考虑确定合适的甲基化条件。

2.3.1 胰蛋白酶蛋白浓度对甲基化修饰效果的影响

图 4A 为 2.5、5、10、15 和 20 mg/mL 胰蛋白酶样品分别进行甲基化修饰后的结果。其他甲基化条件:每毫升酶液加入 10 μ L 1 mol/L DMAB 溶液和 20 μ L 1 mol/L 甲醛溶液,4 $^{\circ}$ C 反应 2 h。由图 4 可知,甲基化酶的酶活收率随胰蛋白酶浓度的增加呈现先升高后下降的趋势,10 mg/mL 时酶活收率最大,蛋白浓度在 2.5–10 mg/mL 范围内获得的甲基化酶,其自切 6 h 酶活保留率无明显差异,但是当蛋白浓度高于 10 mg/mL 后,其获得甲基化酶自切 6 h 的酶活保留率开始下降。因此,甲基化修饰反应最佳的胰蛋白酶浓度为 10 mg/mL。

2.3.2 甲基化试剂添加量对甲基化修饰效果的影响

在 1 mL 的 10 mg/mL 胰蛋白酶溶液中分别添加 15、30、60、90 和 150 μ L 甲基化试剂(1 mol/L DMAB 溶液和 1 mol/L 甲醛溶液添加体积比 1:2),4 $^{\circ}$ C 避光振荡 2 h 进行甲基化修饰,其结果如图 4B 所示。由图 4 可知,甲基化试剂添加量的不断增加,导致甲基化酶的酶活收率呈下降趋势,反映了甲基化反应会对酶活力造成损伤,并且与甲基化试剂添加量呈正相关关系。当甲基化试剂添加 30 μ L 时,酶活收率达到 83%,添加 90 μ L 时酶活收率降为 71%,但甲基化酶的自切 6 h 酶活保留率则随着甲基化试剂添加量的增加呈现上升趋势,证明了甲基化程度的升高有助于提高甲基化酶的抗自切能力,其中甲基化试剂添加 30 μ L 时,自切 6 h 酶活保留率达到 70%,添加 90 μ L 时自切 6 h 酶活保留率进一步升高至 80%。综合考虑,每毫升酶液甲基化试剂的添加量选择为 30 μ L 为适宜量。

2.3.3 甲基化反应时间对甲基化修饰效果的影响

根据以上优化的胰蛋白酶蛋白浓度和甲基化试剂添加量条件,在 1 mL 10 mg/mL 的胰蛋白酶样品中加入 30 μ L 甲基化试剂, 4 $^{\circ}$ C 避光振荡反应, 分别在 0、1、2、3 和 4 h 测定甲基化酶酶活收率和自切 6 h 酶活保留率, 结果如图 4C 所示。由图 4C 可知, 随着甲基化时间的延长, 甲基化酶的酶活收率不断下降, 而其自切 6 h 的酶活保留率则不断升高。前者说明甲基化修饰反应对酶活力有损伤, 并且损伤大小与修饰程度呈相关关系, 后者表明甲基化修饰确实提高了胰蛋

白酶的抗自切稳定性, 并且抗自切性能的改善与修饰程度也呈现正相关关系。优化条件下甲基化修饰 3 h 时获得的甲基化酶, 酶活收率约为 78%, 而自切 6 h 的酶活保留率达到了 79%, 综合来看其在酶活收率和自切 6 h 酶活保留率两个指标方面更加平衡, 其在酶活力损失 22% 的情况下, 自切 6 h 酶活保留率相比对照未修饰酶提高了 3.4 倍(图 4D), 远高于文献报道的 β -环糊精-羧甲基纤维素修饰的胰蛋白酶, 后者自切 3 h 酶活保留率仅为 65%^[23], 可见甲基化修饰能够大幅提高重组胰蛋白酶的抗自切性能。

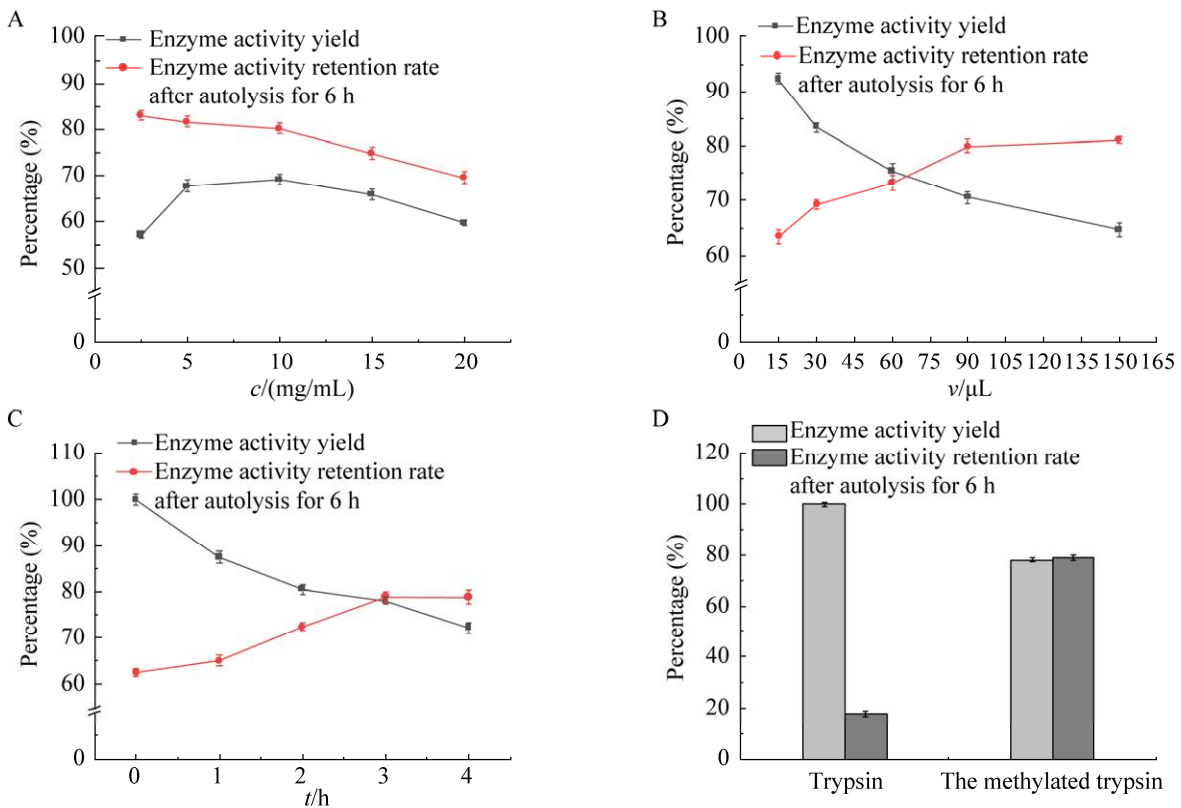


图 4 甲基化修饰条件对胰蛋白酶酶活收率和自切 6 h 酶活保留率的影响

Figure 4 Effects of methylation modification conditions on enzyme activity yield and activity retention rate after autolysis for 6 h. A: Different protein concentration conditions. B: Different methylation reagent addition amounts. C: Different methylation reactivity time. D: The enzyme activity yield and activity retention rate after autolysis for 6 h.

3 结论

本研究通过毕赤酵母异源表达和甲基化修饰成功制备了抗自切性能优异的重组胰蛋白酶。通过基因重组技术构建了猪胰蛋白酶酶原异源表达的毕赤酵母工程菌株 GS115-pPIC9K-*try*。对酶原激活的温度、pH 和时间进行考察,发现肠激酶激活胰蛋白酶酶原的适宜条件为 pH 7.5, 温度 37 °C, 激活时间 48 h。激活后的重组胰蛋白酶自切 6 h 酶活保留率仅为 17.9%, 自切稳定性较差。通过考察胰蛋白酶蛋白浓度、甲基化试剂添加量和甲基化反应时间对甲基化修饰效果的影响,发现胰蛋白酶浓度 10 mg/mL, 甲基化试剂添加量 30 μ L, 反应 3 h 条件下所获甲基化酶的综合性能较佳,在酶活损失仅 22% 情况下,自切 6 h 酶活保留率达到了 79%, 相比修饰前提高了约 3.4 倍,大幅提高了抗自切性能。本研究基于异源表达和甲基化修饰成功制备了新型抗自切重组胰蛋白酶,该成果有助于提高我国胰蛋白酶的生产和应用水平,摆脱我国对跨国公司抗自切胰蛋白酶的依赖。

参考文献

- [1] KTARI N, BEN KHALED H, NASRI R, JELLOULI K, GHORBEL S, NASRI M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterisation and potential application as a detergent additive[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(3): 467-474.
- [2] 鲜娇, 卜德懿, 田永鑫, 张春晓, 彭必雨, 龙忠珍. 不同来源胰蛋白酶的性能及软化效果[J]. *皮革科学与工程*, 2020, 30(3): 40-46.
XIAN J, BU DY, TIAN YX, ZHANG CX, PENG BY, LONG ZZ. Properties and bating effects of trypsins from different sources[J]. *Leather Science and Engineering*, 2020, 30(3): 40-46 (in Chinese).
- [3] MANIRA M, KHAIRUL ANUAR K, SEET WT, AHMAD IRFAN AW, NG MH, CHUA KH, MOHD HEIKAL MY, AMINUDDIN BS, RUSZYMAH BHI. Comparison of the effects between animal-derived trypsin and recombinant trypsin on human skin cells proliferation, gene and protein expression[J]. *Cell and Tissue Banking*, 2014, 15(1): 41-49.
- [4] 李彤彤, 王琼. 外用胰蛋白酶治疗复发性阿弗他溃疡的临床效果[J]. *临床合理用药*, 2024, 17(7): 110-112.
LI TT, WANG Q. Clinical effect of external trypsin on recurrent aphthous ulcer[J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2024, 17(7): 110-112 (in Chinese).
- [5] 何林曼. 耐碱胰蛋白酶的挖掘、异源表达和酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2023.
HE LM. Genome mining, heterologous expression and enzymatic properties characterization of trypsin[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [6] DAU T, GUPTA K, BERGER I, RAPPSILBER J. Sequential digestion with trypsin and elastase in cross-linking mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(7): 4472-4478.
- [7] TSIATSIANI L, HECK AJ. Proteomics beyond trypsin[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(14): 2612-2626.
- [8] KRISTINSSON HG, RASCO BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40(1): 43-81.
- [9] JESÚS-DELA CRUZ K, ÁLVAREZ-GONZÁLEZ CA, PEÑA E, MORALES-CONTRERAS JA, ÁVILA-FERNÁNDEZ Á. Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(4): 186.
- [10] VILLAMIL O, VÁQUIRO H, SOLANILLA JF. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties[J]. *Food Chemistry*, 2017, 224: 160-171.
- [11] DING HC, LI DF, WEI XY, HUANG YW, CUI S, XIE HJ, ZHOU T. Protein-peptide nutritional material prepared from surimi wash-water using immobilized chymotrypsin-trypsin[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(6): 1746-1752.
- [12] WANG ZK, LI XG, TIAN JW, CHU YW, TIAN YQ. Cloning, heterologous expression and characterization of a novel streptomyces trypsin in *Bacillus subtilis* SCK6[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 890-897.
- [13] TUBIO G, PICÓ GA, NERLI BB. Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2009, 877(3): 115-120.
- [14] 徐晓峰. 重组胰蛋白酶大肠杆菌的发酵与表达[D]. 徐州: 中国矿业大学硕士学位论文, 2016.
XU XF. Fermentation and expression of recombinant trypsin in *Escherichia coli*[D]. Xuzhou: Master's Thesis of China University of Mining and Technology, 2016 (in Chinese).
- [15] 杨敏, 黄潇, 张一唯, 平宪卿, 龙军, 曹荣月. 重组猪胰蛋白酶突变体基因在大肠杆菌中的克隆、表达与活性分析[J]. 药物生物技术, 2015, 22(4): 283-287.
YANG M, HUANG X, ZHANG YW, PING XQ, LONG J, CAO RY. Cloning and expression of porcine trypsin mutant gene in *Escherichia coli* and its activity analysis[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 22(4): 283-287 (in Chinese).
- [16] WANG EC, HUNG SH, CAHOON M, HEDSTROM L. The role of the Cys191-Cys220 disulfide bond in trypsin: new targets for engineering substrate specificity[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1997, 10(4): 405-411.
- [17] SHU M, SHEN W, WANG XJ, WANG F, MA LX, ZHAI C. Expression, activation and characterization of porcine trypsin in *Pichia pastoris* GS115[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 114: 149-155.
- [18] MACOUZET M, SIMPSON BK, LEE BH. Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*[J]. FEMS Yeast Research, 2005, 5(9): 851-857.
- [19] HANQUIER J, SORLET Y, DESPLANCQ D, BAROCHE L, EBTINGER M, LEFÈVRE JF, PATTUS F, HERSHBERGER CL, VERTÈS AA. A single mutation in the activation site of bovine trypsinogen enhances its accumulation in the fermentation broth of the yeast *Pichia pastoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1108-1113.
- [20] VIADER-SALVADÓ JM, FUENTES-GARIBAY JA, CASTILLO-GALVÁN M, IRACHETA-CÁRDENAS MM, GALÁN-WONG LJ, GUERRERO-OLAZARÁN M. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris* bioreactor cultures[J]. Biotechnology Progress, 2013, 29(1): 11-16.
- [21] GUERRERO-OLAZARÁN M, ESCAMILLA-TREVIÑO LL, CASTILLO-GALVÁN M, GALLEGOS-LÓPEZ JA, VIADER-SALVADÓ JM. Recombinant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Progress, 2009, 25(5): 1310-1316.
- [22] TREETHARNMATHUROT B, OVARTLARNPORN C, WUNGSINTAWEEKUL J, DUNCAN R, WIWATTANAPATAPEE R. Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 357(1/2): 252-259.
- [23] VILLALONGA ML, FERNÁNDEZ M, FRAGOSO A, CAO R, VILLALONGA R. Functional stabilization of trypsin by conjugation with beta-cyclodextrin-modified carboxymethylcellulose[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2003, 33(1): 53-66.
- [24] TREETHARNMATHUROT B, DIEUDONNÉ L, FERGUSON EL, SCHMALJOHANN D, DUNCAN R, WIWATTANAPATAPEE R. Dextrin-trypsin and ST-HPMA-trypsin conjugates: enzyme activity, autolysis and thermal stability[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 373(1/2): 68-76.
- [25] PEREZ-PINERA P, HAN N, CLETO S, CAO J, PURCELL O, SHAH KA, LEE K, RAM R, LU TK. Synthetic biology and microbioreactor platforms for programmable production of biologics at the point-of-care[J]. Nature communications, 2016, 7: 12211.
- [26] ZHANG Y, HUANG H, YAO X, DU G, CHEN J, KANG Z. High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in *Pichia pastoris*[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 81-87.
- [27] YUAN LD, HUA ZC. Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*[J]. Protein expression and purification, 2002, 25(2): 300-304.
- [28] LUO MK. Chemical and biochemical perspectives of protein lysine methylation[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(14): 6656-6705.