

肠激酶在毕赤酵母中的分泌表达优化

梁启星^{1,2}, 石竟成^{1,2}, 金学荣^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 康振^{1,2}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

梁启星, 石竟成, 金学荣, 等. 肠激酶在毕赤酵母中的分泌表达优化. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1689–1698.

Liang QX, Shi JC, Jin XR, et al. Optimization of enterokinase secretion in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1689–1698.

摘要: 肠激酶 (Enterokinase, EK) 是一类特异性识别切割 DDDDK 序列的丝氨酸蛋白酶, 作为一种工具酶广泛应用于生物医药领域。目前, EK 在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中的表达水平较低, 难以应用。本研究比较了 6 种不同的信号肽 SP1、SP2、SP3、SP4、SP7 和 SP8 对毕赤酵母分泌表达 EK 的影响。在摇瓶水平上, 与 α -factor 信号肽相比, SP1 信号肽显著提高了 EK 的分泌表达 (从 6.8 mg/L 提高至 14.3 mg/L), 酶活从 (2 390±212) U/mL 提高至 (4 995±378) U/mL。在此基础上, 通过共表达毕赤酵母内源蛋白 Kex2, EK 酶活提高至 (7 219±489) U/mL。另外, N 端融合 WLR 三个氨基酸进一步提高酶活至 (15 145±920) U/mL, 比酶活为 (1 174 600±53 100) U/mg。EK 在毕赤酵母中的高效分泌表达为未来应用奠定了基础。

关键词: 毕赤酵母, 肠激酶, 信号肽, 共表达, N 端改造

Optimization of enterokinase secretion in *Pichia pastoris*

Qixing Liang^{1,2}, Jingcheng Shi^{1,2}, Xuerong Jin^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, and Zhen Kang^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Enterokinase is a class of serine proteases that specifically recognize the cleavage DDDDK sequences. Therefore, enterokinase has been widely used as a tool enzyme in the field of biomedicine. Currently, the expression level of enterokinase in *Pichia pastoris* is low, which hinders related practical applications. In this study, the effects of six different signal peptides SP1, SP2, SP3, SP4, SP7 and SP8 on the secretory expression of enterokinase in *Pichia pastoris* were studied. Compared with α -factor, SP1 significantly increased the secretory expression of enterokinase (from 6.8 mg/L to 14.3 mg/L), and the enterokinase activity increased from (2 390±212) U/mL to (4 995±378) U/mL in shaking flask cultures. On this basis, the enterokinase activity was further enhanced to (7 219±489) U/mL by co-expressing the endogenous protein Kex2. Moreover,

Received: December 23, 2019; **Accepted:** March 3, 2020

Supported by: The Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51707A), the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-16).

Corresponding author: Zhen Kang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

江南大学自主科研计划重点项目 (No. JUSRP51707A), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-16) 资助。

the activity that the mutant strain with N-terminal fusion of three amino acids of WLR was increased to $(15\ 145\pm 920)$ U/mL with a high specific activity of $(1\ 174\ 600\pm 53\ 100)$ U/mg. The efficient secretory expression of enterokinase laid a foundation for its applications in near future.

Keywords: *Pichia pastoris*, enterokinase, signal peptide, co-expression, N-terminal modification

肠激酶 (EC 3.4.21.9, EK) 是一种丝氨酸蛋白水解酶, 广泛存在于哺乳动物的消化系统中, 作为体内部分酶原的激活剂。EK 由重链和轻链构成, 单独表达 EK 的轻链具有生物活性 (文中提到的 EK 均为轻链)。EK 特异性识别 DDDDK 序列, 作用于赖氨酸羧基末端的肽键, 产生的目标蛋白首位氨基酸忠实于天然蛋白^[1], 不会在其 N 端引入额外氨基酸残基。这种酶切特点使 EK 广泛应用于生物医药领域, 成为融合表达肽类药物下游纯化时的首选工具酶。天然纯化的牛源 EK 中掺杂其他蛋白水解酶, 利用基因工程生产的重组 EK 很好地避免了这一问题^[2]。

近年来, 巴斯德毕赤酵母作为异源蛋白表达的宿主非常流行, 已成功表达了 200 多种异源蛋白^[3]。与传统的原核表达系统相比, 巴斯德毕赤酵母具有翻译后修饰功能, 包括信号肽序列加工、促进二硫键形成、糖基化修饰等。以大肠杆菌为宿主表达的 EK 多以包涵体的形式存在, 需体外复性, 操作复杂^[4-6]。毕赤酵母可以直接表达具有活性的 EK, 这使毕赤酵母成为表达 EK 的最佳选择宿主^[7]。然而, EK 在毕赤酵母中存在着表达量低的问题, 据报道表达量一般不超过 10 mg/L, 这限制了 EK 的生产应用^[7-8]。

Ewelina 等从解脂耶氏酵母中找到了一些新的信号肽应用于外源蛋白的表达^[9]。利用这些信号肽, 改造酿酒酵母 α -factor 信号肽的 pre-region 区, 用 6 个不同的信号肽序列替换原来的 MRFPSIFTAVLFAASSALA 序列来提高 EK 的胞外分泌水平。在得到分泌能力较强的信号肽后, 又在此基础上分别共表达了毕赤酵母内源蛋白 BiP、PDI 和 Kex2。在相关报道中, BiP 作为内质网驻留蛋白, 有指导蛋白质折叠组装, 将错误折

叠的蛋白引向降解途径的作用^[10], BiP 蛋白的共表达增加了单链抗体片段在毕赤酵母中的表达水平^[11]。二硫键异构酶 (PDI) 有打开错配二硫键、促进新键形成的作用。Kex2 特异性识别 KR 这两个氨基酸, 对成熟的 α -factor 信号肽进行加工, Kex2 的共表达有效地切除 α -factor 信号肽序列, 有助于脂肪酶的胞外表达^[12]。Chun 等在大肠杆菌中将 EK 与 PDI 融合表达, 提高了 EK 的活性^[13]。Wang 等将 EK 第 64 位上的氨基酸由天冬酰胺突变成谷氨酰胺, EK 比酶活达到约 250 000 U/mg^[14]。张云丰等通过 N 端改造工程提高了胰蛋白酶的比酶活^[15]。考虑到 EK 和胰蛋白酶同属于丝氨酸蛋白酶家族, 据此, 本研究在 EK 的改造上, 从 N 端随机引入 3 个氨基酸序列, 提高了 EK 的比酶活, 成功地优化了 EK 在毕赤酵母中的分泌表达, 为未来相关的生产应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

实验中用到的菌株毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 以及质粒 pPIC9K、pGAPZ α A、pGAPZB 购于 Invitrogen 公司。*E. coli* JM109 作为克隆宿主, *P. pastoris* GS115 作为构建的出发菌株。

1.2 培养基组分

毕赤酵母重组菌在 YPD 中培养, 成分如下 (g/L): 酵母提取物 10、胰蛋白胨 20、葡萄糖 20。毕赤酵母筛选转化子时根据抗性不同可在 YPD 中添加相应抗生素 (博来霉素 100 μ g/mL 或潮霉素 B 200 μ g/mL) 混合。毕赤酵母组氨酸营养缺陷型的筛选用 MD 培养基, 成分如下 (g/L): 葡萄糖 20、YNB 13.4、生物素 0.000 4、琼脂糖 20。

大肠杆菌在带有抗生素的 LB 培养基中培养, 成分如下 (g/L): 酵母提取物 5、胰蛋白胨 10、氯化钠 10, 并将 pH 调至 7.4。根据抗性添加相应抗生素浓度为: 博来霉素 50 $\mu\text{g/mL}$ 或潮霉素 B 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3 菌株的构建

构建的菌株和质粒列于表 1 中, 用到的引物罗列在表 2 中。bEK_L 的基因序列 (GenBank 登录

号 282009) 由 GENEWIZ 合成并插入到载体 pGAPZ α A 表达框中得到 GPEK1 菌株。用 6 种不同的信号肽序列替换 α -factor 信号肽的 pre-region 区, 将构建好的质粒电转至 *P. pastoris* GS115 获得含有不同信号肽的重组毕赤酵母菌。以毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 基因组为模板, 扩增 3 种内源蛋白 *BiP*、*PDI* 和 *Kex2* 基因, 插入到质粒

表 1 文中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Description	References
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloned host	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Expression host	Invitrogen
GPEK1	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-bEK _L	This work
GKSP1	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-bEK _L	This work
GKSP2	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP2-bEK _L	This work
GKSP3	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP3-bEK _L	This work
GKSP4	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP4-bEK _L	This work
GKSP7	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP7-bEK _L	This work
GKSP8	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP8-bEK _L	This work
GP1KeK	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-bEK _L and pTEF7K- <i>Kex2</i>	This work
GP1PdK	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-bEK _L and pTEF7K- <i>PDI</i>	This work
GP1BiK	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-bEK _L and pTEF7K- <i>BiP</i>	This work
GP1KePd	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-bEK _L , pTEF7K- <i>Kex2</i> and pGZBH- <i>PDI</i>	This work
GP1EFM	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-EFM-bEK _L	This work
GP1RNL	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-RNL-bEK _L	This work
GP1LKR	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-LKR-bEK _L	This work
GP1WLR	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pGAPZ α A-SP1-WLR-bEK _L	This work
Plasmids		
pGAPZ α A	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, α -factor	Invitrogen
pGAPZB	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter	Invitrogen
pPIC9K	pUC ori, <i>KanR</i> , <i>AmpR</i> , AOX1 promoter, α -factor	Invitrogen
pTEF7K	pUC ori, <i>KanR</i> , TEF1 promoter	This work
pGZBH	pUC ori, <i>HygR</i> , GAP promoter	This work
pTEF7K- <i>PDI</i>	pUC ori, <i>KanR</i> , TEF1 promoter, containing <i>PDI</i>	This work
pTEF7K- <i>BiP</i>	pUC ori, <i>KanR</i> , TEF1 promoter, containing <i>BiP</i>	This work
pTEF7K- <i>Kex2</i>	pUC ori, <i>KanR</i> , TEF1 promoter, containing <i>Kex2</i>	This work
pGZBH- <i>PDI</i>	pUC ori, <i>HygR</i> , GAP promoter, containing <i>PDI</i>	This work
pGAPZ α A-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing α -factor and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP1-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP1 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP2-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP2 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP3-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP3 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP4-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP4 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP7-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP7 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP8-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP8 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP1-EFM-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP1 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP1-RNL-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP1 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP1-LKR-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP1 and bEK _L	This work
pGAPZ α A-SP1-WLR-bEK _L	pUC ori, <i>BleoR</i> , GAP promoter, containing SP1 and bEK _L	This work

表 2 菌株构建所用引物

Table 2 Primer used in this study

Name	Primer sequence (5'-3')
SP1(Z α A)-F	<u>GTTACCGCCGCGCTGGCCTCGTCCGCCATGGCCGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA</u>
SP1(Z α A)-R	<u>CAGCGCGGCGGTAACGGCAGCAAATGTGAACCTCATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATT</u>
SP2(Z α A)-F	<u>CTTCTGGCTCTGGCCCGCTCGCCACCGCCGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA</u>
SP2(Z α A)-R	<u>GGCCAGAGCCAGAAGGGCGGTGGAGAACTTCATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATT</u>
SP3(Z α A)-F	<u>GCTGTCGCTGCTGGCGGTCCCGGCCACCGCCGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA</u>
SP3(Z α A)-R	<u>GCCAGCAGCGACAGCAATAGAGATTCATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATT</u>
SP4(Z α A)-F	<u>ATCGCTGCTGCCCTGGCCTCGCTGGTGGCAGCAGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA</u>
SP4(Z α A)-R	<u>CAGGGCAGCAGCGATTGAGACCGCTGAGAACTTCATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATT</u>
SP7(Z α A)-F	<u>TTACCGCTTGTGCTACTCTGGCTCTCGCTCTGGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAG</u>
SP7(Z α A)-R	<u>TAGCACAAGCGGTAACAGAATGGTAGACAGCTTCATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATT</u>
SP8(Z α A)-F	<u>GTTACTGTCTGCTTTTCCGTTGCCTCGGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA</u>
SP8(Z α A)-R	<u>AAAGCAGACAGTAACCAGCAGGGCGAGCACCTTCATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATT</u>
pTEF7K-F	GCGGCCGGAATTAATTCGCCTTAGACA
pTEF7K-R	GAATTCTACGTATTAGATTAG
Kex2(7K)-F	<u>CTAATCTAATACGTAGAATTCATGTATTTGCCAGCACTTCGC</u>
Kex2(7K)-R	<u>TGTCTAAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTACAATGCCGCACGTTTGGGAT</u>
PDI(7K)-F	<u>GCAATCTAATCTAATACGTAGAATTCATGCAATTCAACTGGAATATTAATAAC</u>
PDI(7K)-R	<u>TGTCTAAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAAAGCTCGTCGTGAGCGT</u>
BiP(7K)-F	<u>GCAATCTAATCTAATACGTAGAATTCATGCTGTCGTTAAAACCATCTTG</u>
BiP(7K)-R	<u>TGTCTAAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTACAACCTCATCATGATCATAGTC</u>
pGZBH-F	GGTGGCCTCGTTTCGAAATAGT
pGZBH-R	CAGCTTGTTTTAGCCTTAGACATGAC
PDI(ZBH)-F	<u>ACTATTTTCGAAACGAGGCCACCATGCAATTCAACTGGAATATTAATAACTGTG</u>
PDI(ZBH)-R	<u>GTCATGTCTAAGGCTAAAACAAGCTGTTAAAGCTCGTCGTGAGCGTCT</u>
Forward	NNKNNKNNKATAGTTGGTGGTTCTGATTCC
Reverse	AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTC

Underlines represent the homologous segment.

pTEF7K (基于 pPIC9K 质粒, 该质粒除去了氨苄青霉素抗性, 并用组成型启动子 TEF1p 代替 AOX1p 启动子) 的表达框中。在 pGAPZB 质粒的基础上, 用潮霉素 B 代替了博来霉素的抗性基因, 得到了质粒 pGZBH。将 PDI 和 Kex2 分别插入 pTEF7K 和 pGZBH 载体中, 共同电转化到重组菌 GKSP1, 获得菌株 GP1KePd。在 EK 的 N 端改造中, 以 pGAPZ α A-SP1-bEK_L 为模板, 设计含有简并性碱基的上游引物 Forward (引物中 N 代表 A/T/C/G 四种碱基, K 代表 G/T 两种碱基), 下游引物 Reverse。经 PCR 反向扩增后, 磷酸化连接并克隆至 *E. coli* JM109, 转化培养后收集平板上全部菌体, 抽提质粒。将抽提好的质粒电转至 *P. pastoris* GS115, 得到的转化子逐个挑入 48 孔板

中, 培养 3 d 后测定上清液酶活, 选取酶活较高的菌株提取基因组作为模板, PCR 扩增目的片段后进行测序, 确定引入的氨基酸组合, 最终得到 N 端随机引入 3 个氨基酸的突变体菌株。

1.4 菌株的培养

从冷冻的甘油管中挑取菌液, YPD 平板上划线, 在 30 °C 条件下培养 3 d 后挑选平板上的单菌落于摇菌管中继续培养 24 h 后作为种子液, 将种子液接种至 250 mL 挡板摇瓶中发酵培养。

1.5 EK 的纯化及蛋白浓度测定

EK 采用镍柱纯化的方式, 平衡缓冲液: 20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 咪唑, 洗脱缓冲液: 20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L

氯化钠、250 mmol/L 咪唑。操作步骤参考 HisTrap™ FF 的使用说明书, 蛋白浓度的测定按照 Bradford 试剂盒说明进行操作。

1.6 EK 的酶活测定和底物动力学分析

EK 的底物 GD4K-β-Na 由南京肽业有限公司合成。0.25 mmol/L 的 GD4K-β-Na 溶解在底物缓冲液中 (含有 10% DMSO、25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 10 mmol/L CaCl₂ 的)。发酵上清液与底物缓冲液混合, 测定 37 °C 条件下 7 min 内的荧光变化率 ($\lambda_{\text{ex}}=337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=420 \text{ nm}$)^[16]。上述条件下, 将 1 min 内荧光值增加 1 (1 U=1 abs/min) 定义为 1 U^[14]。设定不同的底物浓度, 测定各底物浓度下 EK 的酶活, 并采用 Hanes-Woolf 作图法计算 K_m 值和 V_{max} 。测定 EK 的底物动力学。

1.7 SDS-PAGE 与 Western blotting

SDS-PAGE 所用的凝胶以及缓冲液购买于赛默飞世尔科技有限公司。纯化样品经预处理后加样, 设定电压 120 V 进行电泳。电泳完成后, 考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 洗脱液洗去背景色后成像。Western blotting 需要将凝胶上的蛋白质样转至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上, 用 20 mL 含有 5% (W/V) 脱脂牛奶的 TBST (10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl, pH 调至 7.5) 在室温下浸泡孵育膜 1 h, 随后将膜浸入用封闭溶液稀释的一抗 (购买于 Beyotime 的 His 抗体) 中, 4 °C 孵育过夜, 再用封闭溶液稀释的二抗 (稀释比为 1 : 5 000, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L)) 浸泡孵育 1 h, 最后显色。

1.8 信号肽的二级结构预测

对改造后信号肽的全长进行了二级结构预测 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsasopma.html>), 氨基酸序列及信号肽的二级结构信息仅展示了 pre-region 区 (图 1)。

1.9 蛋白质结构信息的预测

为分析突变体菌株对 EK 酶活性的影响, 蛋白质的空间结构预测在在线服务器上进行

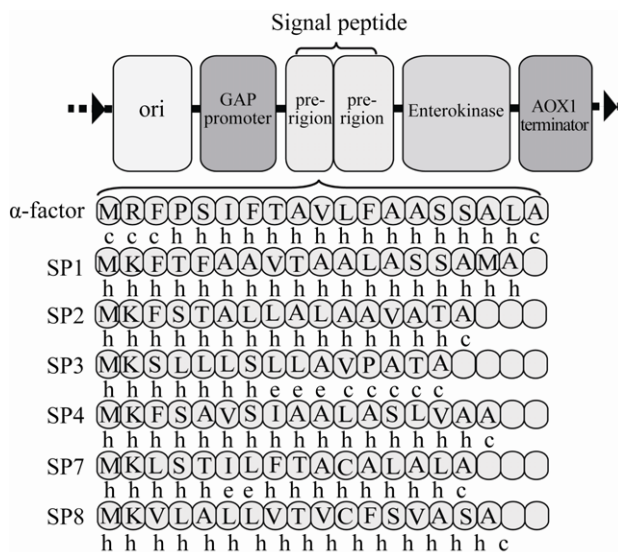


图 1 pre-region 区氨基酸序列与二级结构信息预测

Fig. 1 Prediction of amino acids sequence and secondary structure information of pre-region. c: coil; h: helix; e: sheet.

(<http://new.robetta.org/submit.php>), 将预测好的蛋白模型进行在线质量评估 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>), 根据评估的结果再进行相应的优化。在得到较为可信的蛋白结构后, 又比对分析了蛋白质的二级结构序列, 该过程由 ESPrict3.0 完成 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>)。

2 结果与分析

2.1 信号肽改造提高 EK 的表达

为提高毕赤酵母分泌表达 EK 的能力, 出发菌株 GPEK1 的 α-factor 信号肽的 pre-region 区被 6 个不同信号肽序列替换, 结果表明当 α-factor 信号肽改造成 SP1 和 SP2 时, 毕赤酵母胞外上清中 EK 的活性有显著提高 (图 2A), 对应的菌株 GKSP1 和 GKSP2 的酶活分别是 (5 235±389) U/mL 和 (5 173±333) U/mL。为比较 SP1 和 SP2 信号肽的分泌效率, 将胞外酶活与胞内酶活的比值作为分泌效率的指标, 测定单位 OD₆₀₀ 内菌体胞外和胞内的 EK 的酶活性, 结果如图 2B 所示, SP1 拥有更强的分泌能力, 分泌效率达到 41%, 将 EK 的酶活提高了 2.1 倍。在外源蛋白的分泌过程中,

信号肽引导外源蛋白通过共翻译转运途径或翻译后转运途径运输,具有分泌特征的信号肽引导新生肽定位于内质网,新生肽初步加工后再由内质网转运到高尔基体,最后由高尔基体分泌到胞外^[17-18]。信号肽的疏水性以及空间构象影响信号肽与信号肽识别颗粒 (SRP) 的结合^[19], SP1 信号肽可能与 SRP 有更好的识别结合作用, 引导更多的蛋白通过共翻译转运途径分泌到胞外, 进而提高了 EK 的分泌水平。SP3 信号肽序列疏水中心 α -螺旋结构被破坏, 这将导致信号肽失去其功能^[9,20], 影响外源蛋白的分泌表达。SDS-PAGE 结果见图 2C。EK 的理论相对分子量为 28 kDa, 由于毕赤酵母存在糖基化修饰, EK 的实际大小并不确定, Western

blotting 鉴定 EK 相对分子量 (图 2D)。结果表明, 毕赤酵母中 EK 的表达被糖基化修饰, 相对分子量大致集中在 38–62 kDa 间, 该范围内的条带呈现出弥散拖尾的特征。

2.2 毕赤酵母内源蛋白共表达提高 EK 的酶活
在菌株 GKSP1 的基础上, 为进一步提高 EK 的胞外酶活, 共表达了毕赤酵母中内源蛋白 BiP、PDI 和 Kex2, 从结果来看单独共表达 BiP 对 EK 的酶活并没有提高, 分别共表达 PDI 和 Kex2 可将 EK 酶活提高至 $(6\ 178\pm 432)$ U/mL 和 $(7\ 219\pm 489)$ U/mL。然而, 当 PDI 和 Kex2 组合一起同时共表达后, EK 的酶活并未再次提升, 酶活只有 $(5\ 616\pm 320)$ U/mL

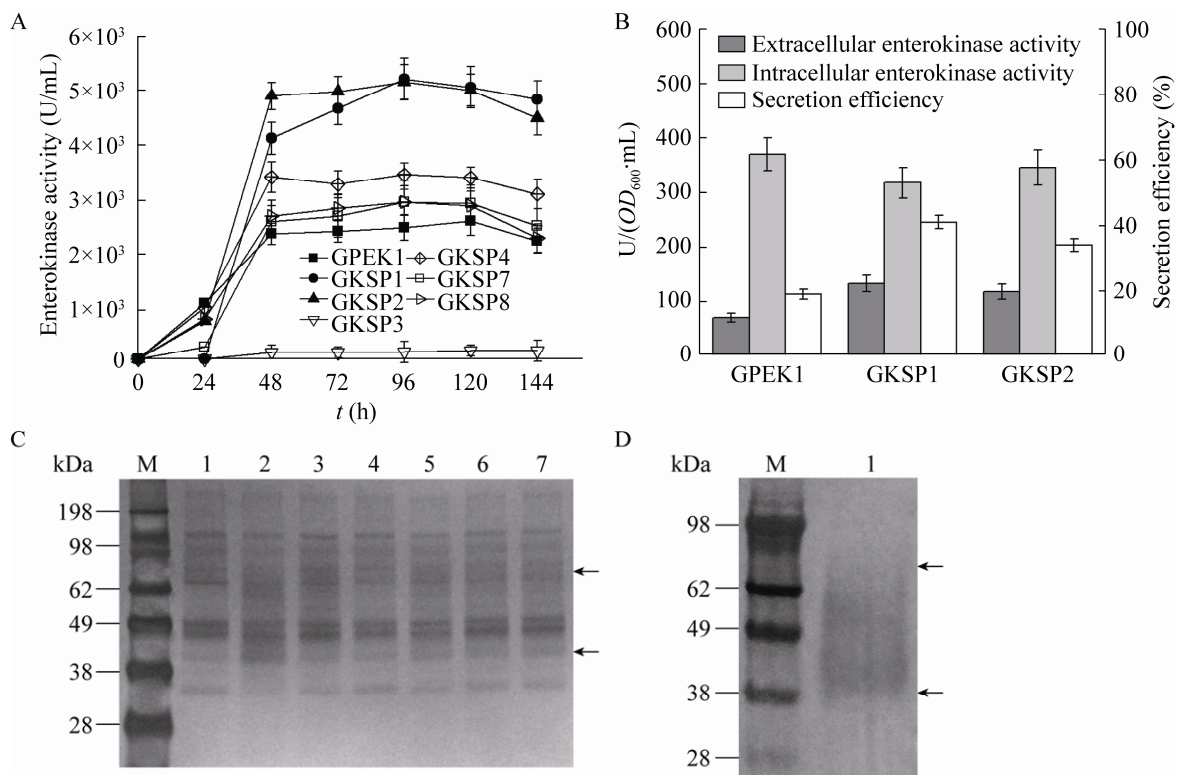


图 2 不同信号肽菌株 EK 的酶活测定及蛋白电泳结果

Fig. 2 Determination of enterokinase activity of strains with different signal peptides and results of SDS-PAGE. (A) Comparison of enterokinase activity among different strains. GPEK1 containing α -factor, GKSP1 containing SP1, GKSP2 containing SP2, GKSP3 containing SP3, GKSP4 containing SP4, GKSP7 containing SP7, GKSP8 containing SP8. (B) Comparison of secretory efficiency of signal peptides. (C) SDS-PAGE analysis of enterokinase secreted by different signal peptides. M: marker; 1: supernatant of GPEK1; 2: supernatant of GKSP1; 3: supernatant of GKSP2; 4: supernatant of GKSP3; 5: supernatant of GKSP4; 6: supernatant of GKSP7; 7: supernatant of GKSP8. (D) Western blotting analysis of enterokinase. M: marker; 1: supernatant of GKSP1.

(图 3A)。SDS-PAGE 结果见图 3B。内质网驻留蛋白 BiP 的共表达对毕酵母分泌外源蛋白的能力存在较大的差异,过表达 BiP 甚至可能对外源蛋白分泌造成负面影响^[21-22]。PDI 可以打开内质网上新生肽错配的二硫键,促进二硫键的再次形成^[23],错误折叠的蛋白或聚集体则通过内质网的响应系统进入相关的降解途径 (ERAD)^[24]。推测 PDI 的共表达减少错误折叠蛋白的形成,有利于 EK 的正确折叠,同时缓解了降解途径的代谢压力。信号肽将外源蛋白引导至内质网后,pre-region 区在内质网上移除,pro-region 区在高尔基体上被 Kex2 切除,至此,信号肽全长被完整除去。然而,毕赤酵母自身表达的 Kex2 可能不足,外源分泌蛋白的 N 端往往还含有未完全移除的信号肽^[25]。Kex2 酶的共表达有助于信号肽 pro-region 区的移除,利于外源蛋白的活性表达。另外,来不及移除 pro-region 区的 EK 很可能会影响到酶的最终空间构象。分析共表达 Kex2 后 GP1KeK 胞外上清与胞内 EK 的酶活发现 GP1KeK 菌株的分泌效率与 GKSP1 菌株相比并没有明显的差异 (数据未展示)。PDI 的氨基酸序列存在 Kex2 的识别位点

KR (这两个碱性氨基酸处于 Loop 环上),当同时共表达 PDI 和 Kex2 时,可能导致过表达的 Kex2 以 PDI 为底物进行了酶切,减弱了 Kex2 的作用。

2.3 N 端改造提高 EK 的比酶活

EK 的 N 端随机引入 3 个氨基酸组合,通过 48 孔板筛选最终得到了 4 个突变体菌株: GP1EFM、GP1RNL、GP1LKR 和 GP1WLR。摇瓶培养后测定上清液中酶活,随后蛋白纯化,测定纯化后蛋白样品活性,并用 Bradford 试剂盒检测纯化样品蛋白浓度,计算其比酶活 (图 4A)。纯化样品去糖基化分析和 SDS-PAGE 结果如图 4B。EK 的 N 端引入 EFM、RNL、LKR 和 WLR 这 4 种氨基酸组合后,与 GKSP1 菌株相比,引入 WLR 这 3 个氨基酸的 GP1WLR 菌株酶活有显著的提高,酶活可达(15 145±920) U/mL,比酶活为(1 174 600±53 100) U/mg,EK 的表达量为 12.9 mg/L。蛋白电泳结果显示 EK 的电泳条带与 Western blotting 鉴定结果一致,用 EndoH 酶去糖基化后,可得到单一的蛋白条带其大小在 33 kDa 附近,高于 EK 的理论相对分子量 28 kDa。这可能因为 EK 不仅存在 N-型糖基化,还存在 O-型糖基化的

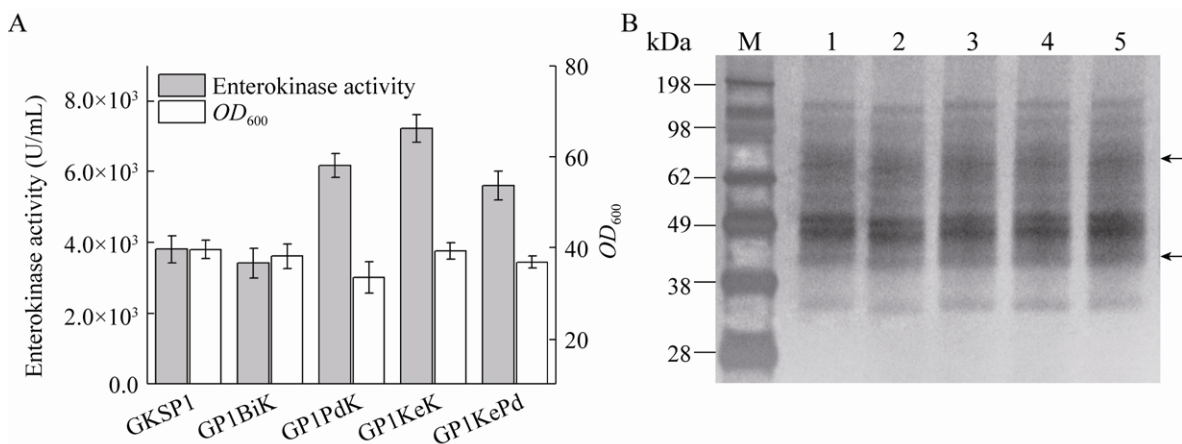


图 3 共表达内源蛋白 EK 的酶活测定及蛋白电泳结果

Fig. 3 Determination of enterokinase activity of co-expressed endogenous protein and results of SDS-PAGE. (A) Determination of enterokinase activity of co-expressing endogenous protein strains. (B) SDS-PAGE analysis of enterokinase by co-expressing endogenous protein. M: marker; 1: supernatant of GKSP1; 2: supernatant of GP1BiK; 3: supernatant of GP1PdK; 4: supernatant of GP1KeK; 5: supernatant of GP1KePd. The upper and lower arrows indicate the maximum and minimum values of EK relative molecular weight.

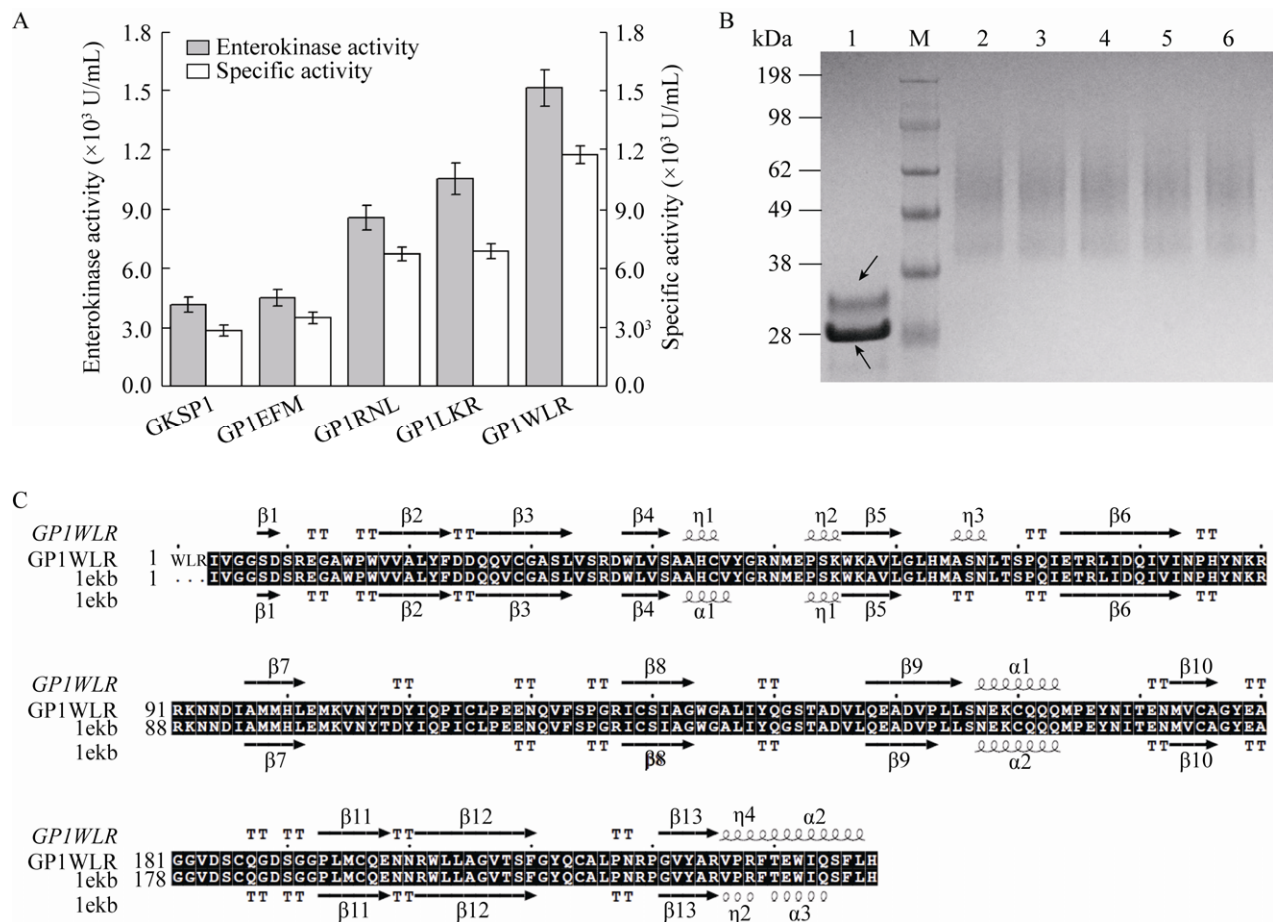


图 4 N端突变体 EK 的比酶活测定及蛋白纯化样品电泳结果

Fig. 4 Determination of enterokinase specific activity of N-terminal mutants and SDS-PAGE results of purified protein samples. (A) Determination of enterokinase activity and specific activity. (B) SDS-PAGE analysis of enterokinase purified. M: marker; 1: purified sample of de-glycosylated EK, upper black arrow indicates de-glycosylated EK, the black arrow below indicates the EndoH enzyme. 2: purified sample of GKSP1; 3: purified sample of GPIEFM; 4: purified sample of GPIRNL; 5: purified sample of GPILKR; 6: purified sample of GPIWLR. (C) Protein secondary structure alignment with ESPrpt 3.

结果，与 Wang 等结果一致^[14]。为分析 EK 的 N 端引入 WLR 这 3 个氨基酸后酶本身的结构变化，在线服务器上预测该突变体 EK 的空间构象，随后通过序列比对分析其二级结构的变化 (图 4C)。结果表明，与 EK (PDB ID: 1ekb) 的晶体结构相比，突变体 GPIWLR 具有以下变化：氨基酸 43–45 位从 α -螺旋变为 3_{10} -螺旋，氨基酸 65–67 位从 TT (β 转角) 变为 3_{10} -螺旋，氨基酸 109 位和 110 位从 Loop 环变为 TT，氨基酸 235–238 位从 Loop 环变

为 α -螺旋。推测这些结构的改变可能导致 EK 空间构象变化或表面的疏水性变化，进而影响 EK 的催化能力以及对底物的亲和能力。

2.4 突变体底物动力学分析

分析纯化后 EK 的底物动力学发现，EK 在 N 端引入的 3 个氨基酸后降低了对底物的亲和力： K_m 值升高。但在催化能力上突变体的 k_{cat} 值均有所提高 (表 3)。与 GKSP1 菌株相比，突变体 GPIWLR 菌株 k_{cat}/K_m 值提高 1.5 倍。

表 3 突变体动力学参数测定

Table 3 Kinetic parameters of mutants

Mutants	K_m ($\times 10^{-4}$, mol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/($\times 10^5$, mol·s))
GKSP1	0.97±0.03	27.78±3.1	2.86±0.11
GP1EFM	1.19±0.27	45.56±4.8	3.81±0.18
GP1LKR	2.67±0.21	88.33±7.3	3.31±0.18
GP1RNL	1.31±0.12	52.56±3.9	4.01±0.23
GP1WLR	2.62±0.19	111.13±8.6	4.24±0.17

3 结论

本研究通过对 α -factor 信号肽 pre-region 区序列的改造得到 SP1 信号肽提高了 EK 的分泌能力, 分泌效率提高 2.1 倍, 与出发菌株 GPEK1 相比, EK 表达量从 6.8 mg/L 提高至 14.3 mg/L。共表达毕赤酵母内源蛋白发现: Kex2 和 PDI 的共表达对 EK 的酶活都有明显的提高, Kex2 的共表达可将 EK 的酶活提高至 (7 219±489) U/mL。然而, 这两个内源蛋白同时共表达时效果减弱, 并未达到预期结果。在 EK 的 N 端改造方面, 引入 WLR 这 3 个氨基酸的突变体菌株 GP1WLR 与 GKSP1 菌株相比, 酶活提高了近 3 倍, 达到 (15 145±920) U/mL, 比酶活为 (1 174 600±53 100) U/mg, 远高于目前报道的 250 000 U/mg^[14]。以上研究为外源蛋白的表达优化提供一种思路, 同时也为 EK 的未来应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Matsushima M, Ichinose M, Yahagi N, et al. Structural characterization of porcine enteropeptidase. *J Biol Chem*, 1994, 269(31): 19976–19982.
- [2] Zhang XH, Tan SH, Li TM. Characterization of enterokinase and its research advances in genetic engineering. *Pharmaceuti Biotechnol*, 2005, 12(5): 347–350 (in Chinese).
张向辉, 谭树华, 李泰明. 肠激酶特点及其基因工程的研究进展. *药物生物技术*, 2005, 12(5): 347–350.
- [3] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98(12): 5301–5317.
- [4] Yuan LD, Hua ZC. Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Prot Express Purificat*, 2002, 25(2): 300–304.
- [5] Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, et al. Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Prot Expr Purificat*, 2003, 31(1): 133–139.
- [6] Huang L, Ruan H, Gu WY, et al. Functional expression and purification of bovine enterokinase light chain in recombinant *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol*, 2007, 37(3): 205–217.
- [7] Voza LA, Wittwer L, Higgins DR, et al. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechnology*, 1996, 14(1): 77–81.
- [8] Fang L, Sun QM, Hua ZC. Expression of recombinant Chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P. pastoris* and its purification and characterization. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36(7): 513–517.
- [9] Celińska E, Borkowska M, Bialas W, et al. Robust signal peptides for protein secretion in *Yarrowia lipolytica*: identification and characterization of novel secretory tags. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(12): 5221–5233.
- [10] Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, 2004, 71(5): 289–297.
- [11] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, et al. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(2): 381–389.
- [12] Takahashi S, Ueda M, Tanaka A. Effect of the truncation of the C-terminal region of Kex2

- endoprotease on processing of the recombinant *Rhizopus oryzae* lipase precursor in the co-expression system in yeast. *J Mol Catal B*, 2000, 10(1/3): 233–240.
- [13] Chun H, Joo K, Lee J, et al. Design and efficient production of bovine enterokinase light chain with higher specificity in *E. coli*. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(6): 1227–1232.
- [14] Wang ZY, Guo C, Liu L, et al. Effects of N-glycosylation on the biochemical properties of recombinant bEK_L expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2018, 114: 40–47.
- [15] Zhang YF, Huang H, Yao XH, et al. High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in *Pichia pastoris*. *Bioresour Technol*, 2018, 247: 81–87.
- [16] Grant DAW, Hermon-Taylor J. Hydrolysis of artificial substrates by enterokinase and trypsin and the development of a sensitive specific assay for enterokinase in serum. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Enzymol*, 1979, 567(1): 207–215.
- [17] Bowers K, Stevens TH. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*, 2005, 1744(3): 438–454.
- [18] Loureiro J, Lilley BN, Spooner E, et al. Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 2006, 441(7095): 18894–18897.
- [19] Matoba S, Ogrydziak DM. Another factor besides hydrophobicity can affect signal peptide interaction with signal recognition particle. *J Biol Chem*, 1998, 273(30): 18841–18847.
- [20] Yang J, Li CY, Wang YY, et al. Computational analysis of signal peptide-dependent secreted proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Sci China*, 2006, 5(3): 221–227.
- [21] Guan B, Jin J, Li HZ. Genetic engineering of *Pichia pastoris* expression system for improved secretion of heterologous proteins—a review. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(7): 851–857 (in Chinese).
关波, 金坚, 李华钟. 改良毕赤酵母分泌表达外源蛋白能力的研究进展. *微生物学报*, 2011, 51(7): 851–857.
- [22] van der Heide M, Hollenberg C, van der Klei I, et al. Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biot*, 2002, 58(4): 487–494.
- [23] Freedman RB. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell*, 1989, 57(7): 1069–1072.
- [24] Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res-Fundam Mol Mechan Mutagen*, 2005, 569(1/2): 29–63.
- [25] Elliott S, Giffin J, Suggs S, et al. Secretion of glycosylated human erythropoietin from yeast directed by the α -factor leader region. *Gene*, 1989, 79(1): 167–180.

(本文责编 陈宏宇)