

# 重组人肠激酶轻链的原核表达、纯化及活性分析

钮利喜<sup>1</sup> 李娇<sup>1</sup> 吉雪雪<sup>1</sup> 李霞<sup>2</sup> 李彦军<sup>3</sup> 杨斌盛<sup>1\*</sup>

(1. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西 太原 030006)

(2. 北京现代高达生物技术有限责任公司 北京 100176)

(3. 阿思克瑞普医药咨询(上海)有限公司 北京 100020)

**摘要:** 【目的】在原核表达系统中实现人肠激酶轻链(Human enterokinase light chain, hEK<sub>L</sub>)的表达和纯化。【方法】通过 PCR 扩增得到编码 hEK<sub>L</sub> 的基因片段, 利用基因重组技术构建原核表达质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub>, 在 *Escherichia coli* 中进行诱导表达, 菌体经超声破碎后利用 Amylose 亲和柱对目标蛋白进行纯化, 并利用 Tricine SDS-PAGE 检测酶的切割活性。【结果】目的基因能够以可溶形式表达, 每升发酵液可纯化得到 40 mg 纯度在 97% 以上的 MBP-hEK<sub>L</sub> 蛋白, 活性检测表明该酶可以对含有肠激酶识别序列的蛋白进行特异性切割, 酶活力达到  $6.0 \times 10^5$  U/ $\mu\text{mol}$ 。

**关键词:** 人肠激酶轻链, 融合表达, 亲和层析, 活性分析

## Expression, purification and activity analysis of human enterokinase light chain from *Escherichia coli*

NIU Li-Xi<sup>1</sup> LI Jiao<sup>1</sup> JI Xue-Xue<sup>1</sup> LI Xia<sup>2</sup> LI Yan-Jun<sup>3</sup> YANG Bin-Sheng<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

(2. Beijing Modern Gaoda Biotechnology Company, Limited, Beijing 100176, China)

(3. Asklep China Incorporated, Beijing 100020, China)

**Abstract:** [Objective] To express and purify human enterokinase light chain (hEK<sub>L</sub>) in pro-

基金项目: 山西省青年基金资助项目(No. 2011021035-5)

\*通讯作者: Tel: 86-351-7018268; 信箱: nlx@sxu.edu.cn

收稿日期: 2012-02-16; 接受日期: 2012-04-11

karyotic expression system and detecting its activity *in vitro*. **[Methods]** The fragment of hEK<sub>L</sub> gene was amplified by PCR and cloned into plasmid pMAL-s downstream to the gene of fusion partner MBP-tag. The recombinant plasmid pMAL-s-hEK<sub>L</sub> was transformed into *E. coli* BL21(DE3). After induced expression, affinity chromatography was amplified to purify the target protein and Tricine SDS-PAGE was used to analyze the enzymatic activity. **[Results]** Majority of the fusion protein MBP-hEK<sub>L</sub> was expressed in soluble form. 40 mg protein was obtained with a purity of more than 97% from 1 L fermentation broth. Activity analysis showed that MBP-hEK<sub>L</sub> could cleavage the fusion protein with enterokinase recognition site specially and the specific activity was reached to  $6.0 \times 10^5$  U/ $\mu$ mol.

**Keywords:** Human enterokinase light chain, Fusion expression, Affinity purification, Activity analysis

利用融合表达往往能实现目的蛋白的高效表达及分离纯化。但有时目的蛋白不能以融合蛋白的形式使用,因此在目的蛋白与标签蛋白之间设计特异的蛋白酶酶切位点,融合蛋白经过特异性的切割或断裂,才得到完整的目的蛋白。目前常见的工具蛋白酶有凝血酶、肠激酶和 Xa 因子等,其中肠激酶特异性最好<sup>[1]</sup>。

目前已经采用原核或真核表达系统成功得到了有生物活性的重组牛<sup>[2-4]</sup>、小鼠<sup>[5]</sup>等肠激酶轻链的相关报道,但很少见关于人<sup>[6-7]</sup>肠激酶轻链基因工程方面的研究。

肠激酶是哺乳动物十二指肠的一种异源二聚体丝氨酸蛋白酶,由一条重链(82-140 kD)和一条轻链(35-62 kD)组成<sup>[8]</sup>,通过一对二硫键连接,重链起锚定肠道细胞膜、识别蛋白质的作用,轻链则有全酶催化活性<sup>[2]</sup>。人肠激酶(Human Enterokinase, hEK)除了含有以上两个亚基外,还包括一个迷你小亚基,为异源三聚体<sup>[6]</sup>。主要特点是对 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-↓-X (↓表示切割位点, X 代表任意氨基酸)序列具有很高的识别和切割特异性。由于肠激酶酶切反应条件相对温和和宽泛,在 pH (4.5-9.5)及温度(4 °C-45 °C)均有良好酶切活性<sup>[7]</sup>,因此成为融合蛋白表达体系中常用的切割工具<sup>[8]</sup>。但是天然的人肠激酶不仅来源有限,

而且成本高、得率低,也容易被其他蛋白酶污染<sup>[9]</sup>,从而导致目的产物降解。因此运用基因工程的方法生产人肠激酶已成为趋势。

本研究尝试利用基因工程技术,将人肠激酶轻链基因克隆到 *E. coli* 原核表达系统,并对重组蛋白进行了表达、分离纯化和活性测定,为今后重组人肠激酶轻链蛋白在多肽药物加工以及人类肠激酶相关疾病的治疗或机制研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株及培养基:** 质粒 pMAL-s、菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3)均为本室保存。质粒 pMAL-s 由 pMAL-p2X (购于美国 NEB 公司)改造所得(将 Factor Xa 识别序列改为 PreScission Protease 识别序列)。含有人肠激酶基因的质粒 pRSS7 购自武汉三鹰生物技术有限公司。LB 培养基:胰蛋白胨 1.0%,酵母提取物 0.5%,NaCl 1.0%,pH 7.0,固体培养基添加 1.5%琼脂粉。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、DNA Marker DL5000 均为大连宝生物工程有限

公司产品; 酵母提取物, 胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司; 含有肠激酶识别序列的融合蛋白 GST-Melittin 为本室保存; 肠激酶标准品 EKMax™ 为 Invitrogen 公司的产品; 所有引物由北京赛百盛公司合成; 其他试剂均为国产或进口分析纯。Amylose 亲和柱、ÄKTA purifier 10 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 PCR 扩增人肠激酶轻链基因 hEK<sub>L</sub>:** 根据 GenBank 中公布的人肠激酶轻链基因序列 (U09860.1) 设计合成上下游引物: FW(hEK<sub>L</sub>): 5'-CGGGATCCATTGTTGGAGGAAGTAAT-3'; RV(hEK<sub>L</sub>): 5'-GCAAGCTTCTAATGTAGAAAATTG-3'; 在引物的 5'端和 3'端分别添加 BamH I 和 Hind III 酶切位点。以质粒 pRSS7 为模板, FW(hEK<sub>L</sub>)和 RV(hEK<sub>L</sub>)为 PCR 引物, 用 Prime STAR 高保真酶扩增 hEK<sub>L</sub> 基因, 扩增条件为: 98 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收。

**1.2.2 重组表达质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub> 的构建:** 将回收获得的目的基因 hEK<sub>L</sub> 片段, 于 37 °C 经 BamH I 和 Hind III 双酶切 4 h, 再与同样条件酶切的原核表达载体 pMAL-s 在 16 °C 过夜连接, 构建重组质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub>。次日将连接产物转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37 °C 过夜培养。菌落 PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒 DNA 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳初步验证构建质粒是否正确, 进一步由华大基因生物技术有限公司进行测序确认, 所有操作均按分子生物学手册进行。

**1.2.3 最佳诱导条件的确立:** 将上述构建好的重组质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub> 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞后得到工程菌 pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3), 接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的

LB 液体培养基中 37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6–0.8 时, 将菌液按 5 mL/支分装到预先灭菌的试管中, 然后分别加入不同浓度的 IPTG (终浓度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、5.0 mmol/L) 在 37 °C 继续培养 5 h, 在确立最佳诱导温度时则加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L 后分别在 16 °C、20 °C、25 °C、29 °C、33 °C、37 °C 进行诱导表达。在最适 IPTG 诱导浓度和最适诱导温度下, 分别在诱导表达后 2、3、4、5、6 h 进行取样检测, 上述各个表达样品全部通过 SDS-PAGE 进行检测分析。

**1.2.4 蛋白的表达与纯化:** 将重组质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub> 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 在 LB 平板上挑取单菌落接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, 37 °C 振荡过夜培养, 再按 2% 接种量转至 250 mL 新鲜的 LB 培养基中, 当 OD<sub>600</sub> 为 0.6–0.8 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 37 °C 继续振荡培养 5 h。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 20 mmol/L Tris-HCl (含 500 mmol/L NaCl, pH 8.0) 洗菌体 2 次, 再重悬于 25 mL 相同缓冲液中, 冰上超声破碎, 11 000 r/min、4 °C 离心 30 min。收集上清, 上样于预先用平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0) 平衡好的 Amylose 亲和层析柱, 冰浴振荡 2 h。用 30 mL 平衡缓冲液进行洗脱除去杂蛋白, 然后用 10 mL 洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Maltose, pH 8.0) 将目标蛋白洗脱下来。Bradford 法<sup>[13]</sup>测定蛋白浓度。用 PEG20000 浓缩目的蛋白至 3 g/L, 并将目的蛋白在透析缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20, pH 7.4) 中搅拌透析 24 h, 所有操作均在 4 °C 层析柜中进行。SDS-PAGE 检测纯化后蛋白的纯度。

**1.2.5 MBP-hEK<sub>L</sub> 的活性分析:** 以含有人肠激酶酶切位点的融合蛋白 GST-Melittin 为底物测定

重组人肠激酶的活性。在 1 mL Eppendorf 管中加入 90  $\mu$ L GST-Melittin 融合蛋白(浓度为 1 g/L, 纯度 >95%), 然后加入不同比例的 MBP-hEK<sub>L</sub>, 酶切缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、100 mmol/L NaCl, 置 25 °C 恒温水浴, 酶切 20 h 后 Tricine SDS-PAGE 检测。MBP-hEK<sub>L</sub> 活性单位标定: 以 Invirogen 公司的产品 EKMax™ (比活力为 2 000 U/mg, 浓度为 0.5 g/L) 为基准对纯化的 MBP-hEK<sub>L</sub> 活性进行标定, Tricine SDS-PAGE 图谱基本一致的稀释酶样其活性相当, 以此推算纯化的 MBP-hEK<sub>L</sub> 活性(U/mmol)。

## 2 结果

### 2.1 hEK<sub>L</sub> 基因扩增及重组质粒的构建

以人工合成的人肠激酶基因为模板扩增出一条约 705 bp 的 DNA 片段(图 1), 与人肠激酶轻链基因序列大小相符。对重组质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub> 进行单、双酶切验证, 结果如图 1 所示, 切出了与预期大小吻合的 DNA 片段 705 bp 和 pMAL-s 载体片段 6.7 kb。重组 pMAL-s-hEK<sub>L</sub> 质粒测序结果显示目的基因插入方向正确, 序列准确无误, 且接口处序列未发生移码, 读框正确, 表明重组质粒 pMAL-s-hEK<sub>L</sub> 构建成功。

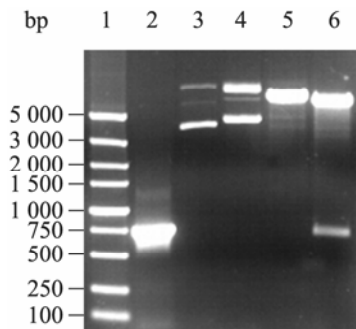


图 1 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by double digestion

Note: 1: DNA marker DL5000; 2: PCR products of hEK<sub>L</sub>; 3: pMAL-s; 4: pMAL-s-hEK<sub>L</sub>; 5: pMAL-s-hEK<sub>L</sub> digested by *Bam*H I; 6: pMAL-s-hEK<sub>L</sub> digested by *Bam*H I and *Hind* III.

### 2.2 诱导时间对 MBP-hEK<sub>L</sub> 在大肠杆菌中的表达影响

IPTG 诱导浓度梯度以及诱导温度梯度结果显示工程菌 pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3) 的最佳 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L, 最佳诱导温度为 37 °C (数据未列出)。在上述最佳诱导温度以及 IPTG 浓度诱导下, 分别在诱导 2、3、4、5、6 h 后取样, 收集菌体后进行超声破碎处理, 取上清样品经 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 所示, 诱导培养 2 h 就有一定量的目的蛋白表达, 随着诱导培养时间的延长表达量逐渐增加, 5 h 后达到最大表达量, 继续振荡培养, 表达量无明显变化。

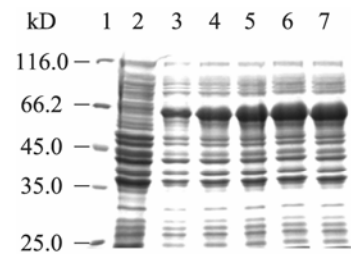


图 2 不同诱导时间 MBP-hEK<sub>L</sub> 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis for the expression of MBP-hEK<sub>L</sub> in *E. coli* with different induction durations

Note: 1: Protein marker; 2: pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3) uninduced; 3-7: pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3) induced with durations for 2, 3, 4, 5, 6 h, respectively.

### 2.3 MBP-hEK<sub>L</sub> 蛋白的表达和纯化

SDS-PAGE 分析表明工程菌 pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3) 在最适条件下经诱导培养后的主要表达产物分子量为 66 kD, 恰好是人肠激酶轻链分子量(26 kD)与麦芽糖结合蛋白(Maltose binding protein, MBP)标签(40 kD)的复合物(图 3)。250 mL 发酵液所得菌体经超声破碎后通过 Amylose 柱进行亲和层析以及浓缩透析, 最终可得到 10 mg 纯度在 97% 以上的 MBP-hEK<sub>L</sub> (浓度为 3 g/L) 融合蛋白(图 3, 泳道 8)。

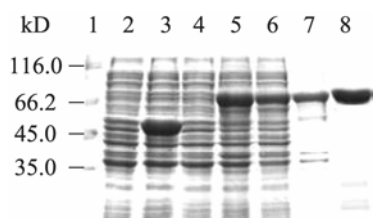


图3 MBP-hEK<sub>L</sub> 蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression and purification of MBP-hEK<sub>L</sub>

Note: 1: Protein marker; 2: pMAL-s/BL21(DE3) uninduced; 3: pMAL-s/BL21(DE3) induced; 4: pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3) uninduced; 5: pMAL-s-hEK<sub>L</sub>/BL21(DE3) induced; 6: Supernatant; 7: Pellets; 8: Purified MBP-hEK<sub>L</sub>.

#### 2.4 MBP-hEK<sub>L</sub> 的活性分析

将纯化的 MBP-hEK<sub>L</sub> 与 Invitrogen 公司的 EKMax<sup>TM</sup> 进行 GST-Melittin 融合蛋白酶切试验, 酶切产物的 Tricine SDS-PAGE 图谱(图 4)显示, MBP-hEK<sub>L</sub> 和底物以 1:1 000、1:3 000、1:5 000、1:7 000 的摩尔比进行切割, 当在 1:5 000 时, 融合蛋白仍然能够被完全酶解, 得到分子量分别为 26 kD (GST)和 2.8 kD (Melittin)的两条带。在 1:7 000 时, 融合蛋白的酶解率也在 90%以上, 与 EKMax<sup>TM</sup> 在 1:1 000 时酶切效果基本相当, 即纯化的 MBP-hEK<sub>L</sub> 比活力为 Invitrogen 公司同类产品的 7 倍。上述结果表明我们通过基因工程方法得到了具有生物活性的重组人肠激酶轻链蛋白, 酶活力达到  $6.0 \times 10^5$  U/ $\mu$ mol。



图4 MBP-hEK<sub>L</sub> 酶切 GST-melittin 的 Tricine SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Enzyme cleavage of GST-melittin on Tricine SDS-PAGE

Note: 1: Protein marker; 2: GST; 3: GST-melittin; 4-7: Corresponding to the molar ratio of MBP-hEK<sub>L</sub> to GST-melittin at 1:1 000, 1:3 000, 1:5 000 and 1:7 000; 8: Corresponding to the molar ratio of EKMax<sup>TM</sup> to GST-melittin at 1:1 000.

### 3 讨论

肠激酶是一种丝氨酸蛋白酶, 在肠道内激活胰蛋白酶原转化为胰蛋白酶, 因为肠激酶的催化活性中心有一个特殊的阳离子位点, 能与胰蛋白酶原上带有强大负电荷的 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列相结合, 正是由于这个特点, 使得肠激酶能高度特异性识别和切割 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列, 成为基因工程领域融合蛋白表达纯化的重要工具酶。而且有研究报道称, 重组的肠激酶轻链比天然异源二聚体肠激酶活性更高<sup>[9-10]</sup>。

国内外已有大量关于牛肠激酶研究的报道<sup>[3-4,10]</sup>, 但有关人肠激酶的研究还很少。有研究表明, 人肠激酶的  $K_{cat}/K_m$  值约为牛肠激酶的 10 倍<sup>[11]</sup>, 具有更高的切割效率。因此, 如果能利用基因工程方法得到重组人肠激酶, 其应用价值将比重组牛肠激酶更高。目前, 人肠激酶轻链在毕赤酵母中的重组表达为 3.8 mg/L, 活力为 EKMax<sup>TM</sup> 的 3 倍<sup>[12]</sup>, 而在大肠杆菌中的重组表达为包涵体, 经变复性处理后每升发酵液可纯化得到 10 mg 有活性的人肠激酶轻链蛋白, 活力为 EKMax<sup>TM</sup> 的 5 倍<sup>[11]</sup>。由于肠激酶轻链含有 9 个 Cys 残基, 其中形成 4 对二硫键, 只有一个游离的 Cys 残基未参加配对, 因此在重组表达时, 极易形成二硫键错配, 导致产物以包涵体形式出现<sup>[11]</sup>。MBP 已经被证实具有很强的助溶作用, 可增加在细菌中过量表达的融合蛋白溶解性, 尤其是真核蛋白<sup>[13]</sup>。这一特点尤其适用于本实验 hEK<sub>L</sub> 的表达与纯化。本文首次在大肠杆菌表达系统中得到了以可溶形式表达的人肠激酶轻链蛋白, 经亲和层析纯化后每升发酵液可以获得 40 mg 带有 MBP 标签的融合蛋白 MBP-hEK<sub>L</sub>, 活性检测表明其活力为 EKMax<sup>TM</sup> 的 7 倍, 达到  $6.0 \times 10^5$  U/ $\mu$ mol, 无论在表达量和活力都是目前已有报道中最高。另外我们在 MBP-tag 和目标蛋白之间还设计有人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切位点, 可以在需要

时将 MBP 标签除去,方便其在医药领域的应用。

以往对牛肠激酶轻链重组蛋白的多数研究表明,同不能进行糖基化修饰的大肠杆菌表达系统相比,利用有糖基化修饰系统的酵母作为宿主细胞所得到的重组牛肠激酶轻链蛋白活力要高很多<sup>[14-15]</sup>。目前重组牛肠激酶轻链蛋白活力最高的报道来自中山大学的徐安龙教授课题组<sup>[13]</sup>,他们利用酵母做为宿主细胞,每升发酵液可生产 150 mg 重组蛋白,活力达到 9 000 U/mg。而本文的结果显示肠激酶轻链蛋白的糖基化并非同其活性的高低存在必然的联系。

综上所述,本实验成功构建了 hEK<sub>L</sub> 基因工程菌,并以可溶形式表达和纯化得到了带有 MBP-tag 的目的蛋白,为今后重组 hEK<sub>L</sub> 应用于融合蛋白酶切以及人类肠激酶相关疾病的治疗提供了可靠的基础,促进了重组 hEK<sub>L</sub> 在生物工程领域的应用。

## 参 考 文 献

- [1] Shahravan SH, Qu X, Chan IS, et al. Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag[J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 59(2): 314-319.
- [2] Huang L, Ruan H, Gu W, et al. Functional expression and purification of bovine enterokinase light chain in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 37(3): 205-217.
- [3] Collins-Racie LA, McColgan JM, Grant KL, et al. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA[J]. *Nature Biotechnology*, 1995, 13(9): 982-987.
- [4] Kitamoto Y, Yuan X, Wu Q, et al. Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(16): 7588-7592.
- [5] 孙琳, 吴秀丽, 王燕媚, 等. 重组鼠源性肠激酶轻链在大肠杆菌中的表达[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2006, 32(3): 360-363.
- [6] Magee AI, Grant DA, Taylor JH. Further studies on the subunit structure and oligosaccharide moiety of human enterokinase[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1981, 115(3): 241-254.
- [7] Gasparian ME, Ostapchenko VG, Dolgikh DA, et al. Biochemical characterization of human enteropeptidase light chain[J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2006, 71(2): 113-119.
- [8] Mikhailova AG, Rumsh LD. Structural characteristics providing for high specificity of enteropeptidase[J]. *Biorganicheskaiia Khimiia*, 1998, 24(4): 282-287.
- [9] Voza LA, Wittwer L, Higgins DR, et al. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14 (1): 77-81.
- [10] LaVallie ER, Rehemtulla A, DiBlasio EA, et al. Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(31): 23311-23317.
- [11] Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, et al. Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 31(1): 133-139.
- [12] Pepeliaev S, Krahulec J, Černý Z, et al. High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(1): 67-75.
- [13] Kapust RB, Wang DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused[J]. *Protein Science*, 1999, 8(8): 1668-1674.
- [14] Peng LS, Zhong XF, Ou JX, et al. High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(2): 185-192.
- [15] 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.