重组牛肠激酶轻链的制备工艺考察

魏　笑[1,2]，王丹丹[3]，路建光[3]，吴　勇[3]，化浩举[3]，冯　军[2,3]*

（1. 浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心，浙江杭州 310014；2. 中国医药工业研究总院，上海 201203；
3. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：在重组多肽及蛋白质药物的制备过程中，牛肠激酶轻链是应用最广泛的工具酶之一。然而，较低的表达量导致其生产成本居高不下。本研究在已筛选得到的表达量较高的重组菌基础上，利用高密度发酵技术，获得胞外分泌表达的牛肠激酶轻链。并对工程菌的高密度发酵工艺进行了优化，目的蛋白的表达产量达到（478.47±1.70）mg/L。发酵液经过离心、微滤、超滤、离子交换柱色谱等分离提取步骤，使目的蛋白纯度达到（97.94±0.42）%。最后考察了重组牛肠激酶轻链的酶学性质。本研究打通了重组牛肠激酶轻链的小试制备工艺路线，为其作为工具酶在多肽药物生产领域的应用打下了良好的基础。

关键词：牛肠激酶轻链；重组；表达；高密度发酵；分离纯化

中图分类号：Q815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）07-0986-06

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.07.009

Investigation on Preparation Technology of Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain

WEI Xiao[1,2], WANG Dandan[3], LU Jianguang[3], WU Yong[3], HUA Haoju[3], FENG Jun[2,3]*

（*1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014; 2. China Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 3. Shanghai Duomirui Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203*）

ABSTRACT: In the preparation of recombinant polypeptide and protein drugs, the bovine enterokinase light chain is one of the most widely used tool enzymes. However, its low expression level leads to high production costs. This study used high-density fermentation technology to obtain the extracellular secretion and expression of the bovine enterokinase light chain based on a high-expressing recombinant bacteria screen. The high-density fermentation process of the engineered bacteria was optimized, and the expression yield of the target protein was increased to（478.47±1.70）mg/L. The target protein was separated and extracted from the fermentation liquid by centrifugation, microfiltration, ultrafiltration and ion-exchange chromatography, and the its purity reached（97.94±0.42）%. Finally, the enzymatic properties of the recombinant bovine enterokinase light chain were characterized. This study has opened up the small-scale preparation process route of recombinant bovine enterokinase light chain, paving the way for its application as a tool enzyme in peptide drug production.

Key Words: bovine enterokinase light chain; recombinant; expression; high density fermentation; separation and extraction

肠激酶（enterokinase，EK）是一种丝氨酸蛋白水解酶，广泛存在于哺乳动物十二指肠黏膜中[1]。它由1条重链和1条轻链构成，2条链通过一对分子间二硫键结合，以牛肠激酶为例，其重链和轻链的相对分子质量分别为115 000和35 000。其中，

收稿日期：2022-01-06

基金项目：上海市青年科技启明星计划项目（编号21QB1401500）

作者简介：魏　笑（1997—），硕士研究生，专业方向：重组蛋白和多肽药物。

通信作者：冯　军（1971—），研究员，从事蛋白质及多肽药物的研究与开发。

E-mail：fengjdmr@163.com

重链负责将催化亚基固定在小肠刷状缘膜上并引导自身向肠腔移动，轻链则为酶的催化活性部分，能够专一识别 DDDDK 氨基酸序列、并水解 K（Lys）后的肽键 [2]。

近年来融合蛋白表达系统被广泛用于低分子生物活性多肽药物的制备，该系统不仅可提高目的蛋白的表达量，同时可使多肽不易受到蛋白酶降解 [3]。牛肠激酶轻链（bovine enterokinase light chain，**1**）具有专一性强、水解效率高的特点，作为一种重要的特异性切割重组融合蛋白药物工具酶，被广泛地应用于基因工程产品的开发 [4]。

目前研究显示，毕赤酵母分泌表达 **1** 的产量低是其在工业应用中的主要缺陷，这也间接导致了市场上 **1** 价格相对昂贵（每毫克价格在 20 000 ～ 80 000 元），在药物生产成本中占比较高。本研究在已筛选得到的较高表达量的重组菌基础上，考察了重组 **1** 的制备工艺，其中包括发酵培养、纯化工艺以及酶学性质研究，并着重优化了高密度发酵工艺，最终获得了利用重组毕赤酵母高表达 **1** 的发酵工艺，且经过纯化得到了纯度大于 97%的重组 **1**，为今后重组 **1** 在多肽药物加工和基因产品生产中的应用提供基础。

1 仪器与试药

GBJS-10L C 型 5 L 发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；Avanti J-25 型离心机、Microfuge 20R 型离心机（美国 Beckman 有限公司）；PowerPac Basic 型垂直电泳仪（美国伯乐有限公司）；0.22 μm 水系微孔过滤膜（天津津腾实验设备有限公司）；PX-02001 型中空纤维过滤系统（日本旭化成有限公司）；Alliance 分析型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；SCG-100 型蛋白色谱系统（苏州赛谱科技有限公司）；PB-10 型 pH 指示计（德国赛多利斯有限公司）；LDZH-100KB 型立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；SHP-150 型生化培养箱（上海精宏实验设备有限公司）；超滤膜（材质为聚偏氟乙烯，截留分子量 3 000 和 6 000，德国 Merck 公司）。

PAGE 凝胶快速制备试剂盒（批号 02321060）、双色预染蛋白 Marker（10 000 ～ 250 000，批号 02351800）均购于上海雅酶生物技术有限公司；三氟乙酸（TFA，上海泰坦科技股份有限公司）；底物（R1-DDDDK-R2，其中 R1 和 R2 分别为两段不同的氨基酸序列）；EK（实验室自制，0.76 mg/ml，4 686 U/mg，批号 E03191001）；酵母抽提物（湖北安琪酵母股份有限公司，批号 2019022301B9）；其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1 重组毕赤酵母菌 DMR611（由本实验室构建）。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基（yeast extract peptone dextrose medium，YPD 培养基，固体）/g·L^{-1}：胰蛋白胨 20、酵母抽提物 10、葡萄糖 20、琼脂粉 20，115 ℃灭菌 15 min。

YPD 培养基（液体）/g·L^{-1}：胰蛋白胨 20、酵母抽提物 10、葡萄糖 20，115 ℃灭菌 15 min。

微量元素母液（PTM1）/g·L^{-1}：五水合硫酸铜 6、碘化钠 0.08、一水合硫酸锰 3、硼酸 0.02、氯化钴 0.5、氯化锌 20、七水合硫酸亚铁 65、生物素 0.2，含浓硫酸 5 ml/L，2 ～ 8 ℃冷藏放置。

发酵培养基 /g·L^{-1}：硫酸钙 0.93、硫酸钾 18.2、七水合硫酸镁 14.9、氢氧化钾 4.13、甘油 40，含 80%磷酸溶液 26.7 ml/L 和 PTM1 4.35 ml/L，121 ℃灭菌 30 min。

甘油补料培养基：含 PTM1 12 ml/L 的 75%甘油溶液，121 ℃灭菌 30 min。

甲醇补料培养基：含 PTM1 12 ml/L 的甲醇溶液。

酶切缓冲液 /mmol·L^{-1}：三羟甲基氨基甲烷 125、氯化钠 250、氯化钙 10，用 6 mol/L 盐酸调至 pH 8.0。

2.2 **1** 的酶活检测以及纯度检测

酶活检测方法：将底物 25 μl、酶切缓冲液 100 μl 和水 355 μl 混合后于 30 ℃保温 5 min，再加入合适浓度的酶样 20 μl，混合均匀后立即于 30 ℃反应 60 min，然后加入 10% TFA 溶液 30 μl 终止酶切反应，取样后离心（14 000×*g*）5 min，并采用 0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。采用外标法对产物进行定量分析。

酶活定义：在上述条件下，每分钟催化生成 1 μg 产物所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

HPLC 酶活分析色谱条件：色谱柱 YMC C_4 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液，B 为 0.1% TFA 乙腈溶液，梯度洗脱（洗脱程序见表 1）；流速 1 ml/min；柱温 37 ℃；检测波长 215 nm；进样量 20 μl。

表 1　梯度洗脱程序

Tab.1　Gradient Elution Procedure

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0	65	35
10	62	38
13	10	90
15	10	90
16	65	35
25	65	35

HPLC 纯度分析色谱条件：色谱柱 Symmetry 300^{TM} C_4 柱（150 mm×3.9 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液，B 为 0.1% TFA 乙腈溶液，梯度洗脱（洗脱程序见表 2）；流速 1 ml/min；柱温 37 ℃；检测波长 215 nm；进样量 50 μl。

表 2　梯度洗脱程序

Tab.2　Gradient Elution Procedure

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0	80	20
3	80	20
16	50	50
21	20	80
22	80	20
27	80	20

2.3　**1** 的高密度发酵工艺

2.3.1　种子培养

从本实验室菌种库中取出已构建的 **1** 重组毕赤酵母菌 DMR611，在无菌条件下从甘油管中蘸取菌液后于 YPD 固体平板上划线法活化种子，30 ℃培养 36 ～ 48 h；挑取圆润饱满的单菌落，加至装有 YPD 液体培养基 30 ml 的摇瓶中进行一级种子培养，培养条件为 30 ℃、220 r/min，培养 24 h。以体积分数为 4%的接种量转接至 YPD 液体培养基装量为 100 ml 的摇瓶中进行二级种子培养，培养条件为 30 ℃、220 r/min，培养 24 h。

2.3.2　发酵罐初始工艺

二级种子液以体积分数 10%的接种量接种至装有发酵培养基 2.5 L 的 5 L 发酵罐中进行发酵。控制培养温度为 30 ℃，通气量为 3 L/min，溶氧（DO）串级转速（DO=40%，转速 400 ～ 1 000 r/min），初始 pH 控制为 5.0；培养至 22 h 时以 12 ml·(h·L)$^{-1}$ 的速率流加甘油补料培养基，继续培养至菌体湿重达到质量分数约 20%时停止补料。碳源饥饿约 1.5 h 后流加甲醇补料培养基进行诱导，诱导温度为 28 ℃，诱导时长为 65 h。发酵液离心（5 000×*g*）20 min，收集上清液进行检测，结果显示 **1** 的产量为（173.16±1.35）mg/L（*n*=3）。

2.4　发酵条件的优化

2.4.1　诱导温度

甲醇诱导时，诱导温度分别设置为 22、25、28、30 ℃，其他发酵工艺条件如“**2.3.2**”项下所述，结果如图 1 所示。诱导温度为 25 ℃时，发酵上清液的单位酶活最高，最高单位酶活为（407 339±9 197）U/L（*n*=3）。因此选择的最适诱导温度为 25 ℃。

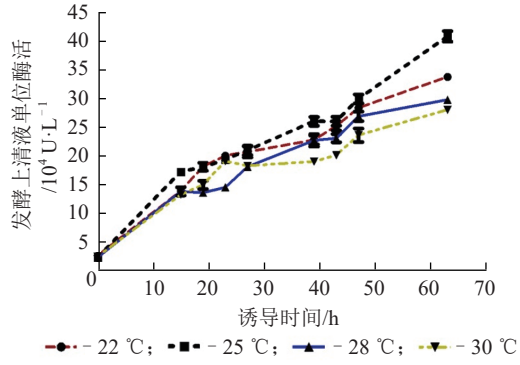


图 1　不同诱导温度下发酵上清液的酶活曲线图（*n*=3）

Fig.1　Enzyme Activity Curves of Fermentation Supernatant Obtained at Different Induction Temperature（*n*=3）

2.4.2　诱导 pH

甲醇诱导时，分别设置诱导 pH 为 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0，其他发酵工艺条件如“**2.3.2**”项下所述，结果如图 2 所示。诱导 pH 为 4.0 时，发酵上清液的单位酶活最高，最高单位酶活为（421 404±6 331）U/L

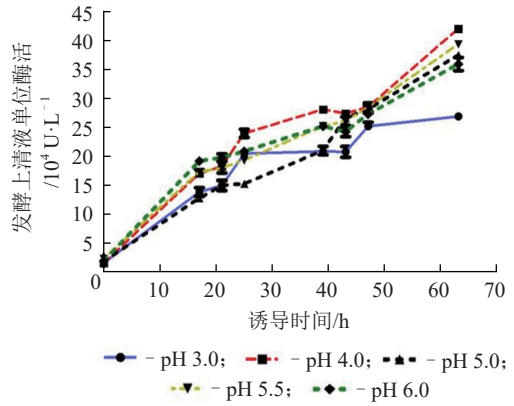


图 2 不同诱导 pH 下发酵上清液的酶活曲线图（*n*=3）

Fig.2 Enzyme Activity Curves of Fermentation Supernatant Obtained at Different Induction pH Values (*n*=3)

（*n*=3）。因此选择的最适诱导 pH 为 4.0。

2.4.3 诱导前菌体湿重

甲醇诱导时，分别设置诱导前菌体湿重的质量分数分别为 10%、20%、25%、30%、35%、40%（波动范围 ±3%），其他发酵工艺条件如“**2.3.2**”项下所述，结果如图 3 所示。随着诱导前菌体湿重的增加，发酵上清液的单位酶活逐渐增加，当诱导前湿重达 35% 及以上时，发酵上清液的单位酶活增加不明显，因此选择的诱导前菌体湿重为 35%～40%。

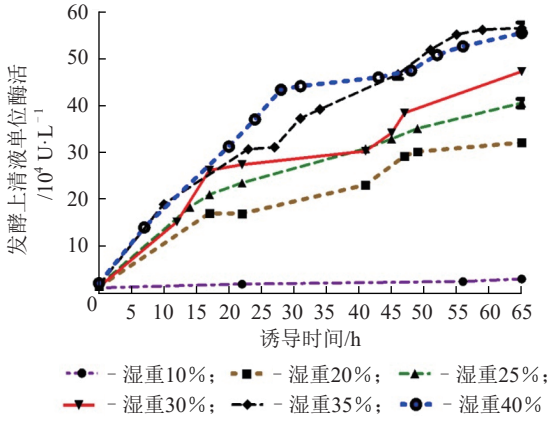


图 3 不同诱导前菌体湿重下发酵上清液的酶活曲线图（*n*=3）

Fig.3 Enzyme Activity Curves of Fermentation Supernatant Obtained at Different Wet Weights before Induction (*n*=3)

2.4.4 诱导时间

发酵工艺如“**2.3.2**”项下所述，诱导温度为 25 ℃、pH 为 4.0、诱导前菌体湿重为 35%～40%（离心条件：10 528×*g*，10 min），分别在甲醇诱导后的不同时间取样并测定酶活，绘制出诱导时间与酶活的关系图，结果如图 4 所示。诱导时间在 0～80 h 期间，随着诱导时间的增加，发酵上清液延长的单位酶活逐渐增加，但继续诱导时间，发酵上清液的单位酶活逐渐降低，因此最佳诱导时间选择为 80 h。

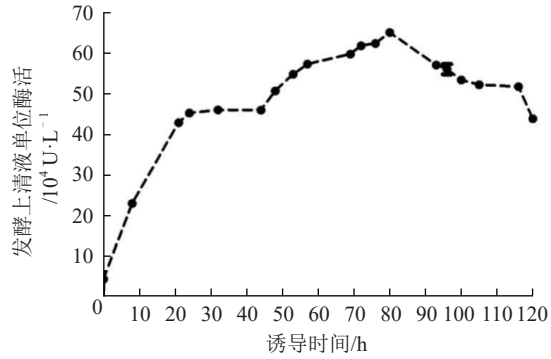


图 4 不同诱导时间下发酵上清液的酶活曲线图（*n*=3）

Fig.4 Enzyme Activity Curve of Fermentation Supernatant Obtained at Different Induction Time (*n*=3)

2.4.5 最佳诱导发酵条件的验证

通过上述发酵条件优化试验确定诱导温度为 25 ℃，诱导 pH 为 4.0，诱导前菌体湿重的质量分数为 35%～40%，诱导时间为 80 h，此时发酵上清液的单位酶活可达到较高水平。经 3 批次试验验证，优化后 **1** 的产量达到（478.47±1.70）mg/L，是优化前产量［(173.16±1.35) mg/L］的 2.76 倍。

2.5 1 的纯化工艺

2.5.1 纯化前预处理

取上述发酵液离心（14 000×*g*）20 min，取上清液通过 0.22 μm 滤膜过滤后用截留分子量为 6 000 的超滤膜进行超滤，当上清液浓缩 4～5 倍时，加入纯化水顶洗浓缩液至电导率小于 1 mS/cm，此步骤的收率为 93.07%。

2.5.2 纯化

采用阴离子交换树脂进一步纯化，条件如下：

阴离子交换色谱柱（Q FF 填料，柱体积 153 ml）；流动相 A 为 20 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），B 为 A+1 mol/L 氯化钠溶液（pH 8.0）；流速 20 ml/min。用流动相 A 平衡 3 个柱体积后进行洗脱，洗脱程序见表 3。洗脱液按“**2.2**”项下方法进行纯度检测，将纯度大于 95%的组分合并，纯化收率为 78.40%。经 12.5% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）检测，结果（图 5）显示纯化样品呈现单一条带；HPLC 测得其纯度为（97.94±0.42）%（n=3），色谱图如图 6 所示。

表 3　梯度洗脱程序

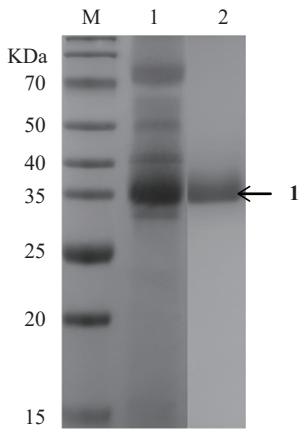
Tab.3　Gradient Elution Procedure

柱体积/CV	流动相A/%	流动相B/%
0	100	0
10	85	15
2	75	25
0	0	100
3	0	100

2.6　1 的酶学性质研究

2.6.1　热稳定性研究

将纯化后的 **1** 溶液分别在 4、30、40、50 ℃条件下放置 8 h，随后在 30 ℃下进行酶活测定，以未经过热处理的酶液作为空白对照，重复试验 3 次。结果如图 7 所示：**1** 在 4 ℃和 30 ℃时较为稳定，酶活损失小于 10%，而在 40 ℃时酶活损失 20%左右，50 ℃时酶活损失 50%左右。说明 **1** 在 30 ℃以下时较稳定，当超过 30 ℃时，酶活随温度升高而逐渐损失。



M－Marker；泳道 1－发酵上清液；泳道 2－纯化样品

图 5　纯化样品的 SDS-PAGE 分析

Fig.5　SDS-PAGE Analysis of the Purification Product

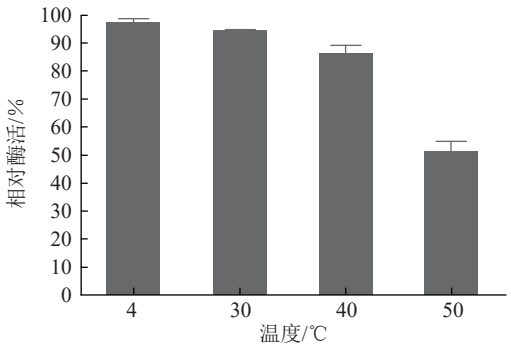
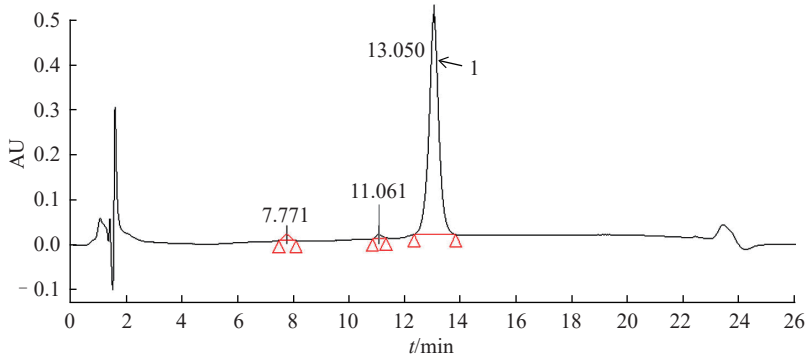


图 7　1 的热稳定性（n=3）

Fig.7　Thermal Stability of **1** (n=3)



1－纯化样品

图 6　纯化样品的色谱图

Fig.6　Chromatogram of the Purification Product

2.6.2 酸碱稳定性

分别配制不同 pH 的缓冲液，将缓冲液与酶按一定比例混合使其最终 pH 分别为 2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0，于 4 ℃放置 12 h 后检测其剩余酶活力，以最高酶活为 100%，重复试验 3 次。结果如图 8 所示，**1** 在 pH 4.0 ～ 9.0 内酶活保留 80%以上。说明 **1** 在较宽的 pH 范围内（pH 4.0 ～ 9.0）稳定性较好。

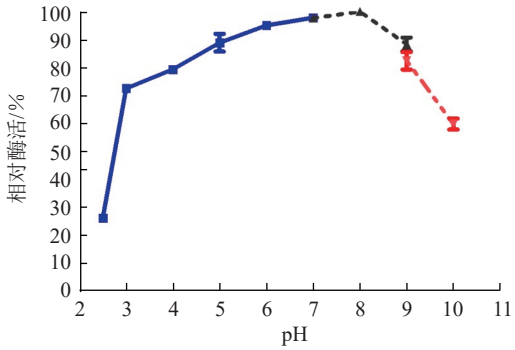


图 8 1 的酸碱稳定性（*n*=3）

Fig.8 Acid-base Stability of **1** (*n*=3)

2.6.3 金属离子对酶活力的影响

配制不同浓度的金属离子盐溶液，并按照一定比例加入到反应体系中，使金属离子终浓度分别达到 0.5、2.0、3.0、5.0、10.0 mmol/L，其中金属离子包括 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}，在 30 ℃条件下测定不同金属离子对重组 **1** 酶活力的影响，重复试验 3 次，以未添加金属离子的酶液作为空白对照。结果如图 9 所示：0.5 ～ 3.0 mmol/L 的 Ca^{2+} 对该酶具有促进作用，大于 3.0 mmol/L 时具有一定的抑制作用；Mg^{2+} 对于该酶酶活具有一定的促进作用；小于 3.0 mmol/L 的 Mn^{2+} 对该酶酶活抑制作用较小，但当浓度增加到 10 mmol/L 时，其相对酶活剩余 40%；Fe^{3+}，Zn^{2+}，Cu^{2+} 都对该酶酶活都具有明显的抑制作用，其中 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 在 5.0 mmol/L 时完全抑制，Cu^{2+} 在 10.0 mmol/L 时完全抑制。

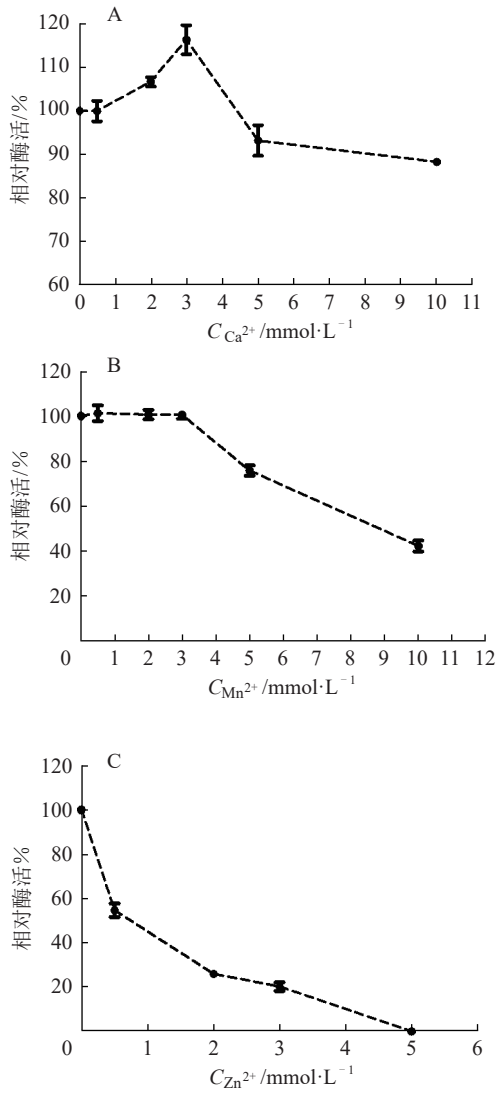


图 9 金属离子 Ca^{2+}(A)、Mg^{2+}(B)、Zn^{2+}(C) 对酶活力的影响（*n*=3）

Fig.9 Effect of Metal Ions Ca^{2+} (A), Mg^{2+} (B), Zn^{2+} (C) on Enzyme Activity (*n*=3)

3 讨论

VOZZA 等报道用 *Pichia pastoris* 制备 **1**，表达产量为 6.3 mg/L[5]；刘国强等报道了 **1** 在毕赤酵母中的组成型表达，表达产量为 20 mg/L[6]；FANG 等将 **1** 整合到 pA0815 质粒中，用甲醇诱导在宿主 *Pichia pastoris* GS115 中分泌表达，发酵上清液中得到有活性的 **1** 为 5.4 mg[7]。PENG 等利用甲醇酵母表达系统分泌表达 **1**，用甘油 / 甲醇培养基在 pH 6.0 条件下可使 **1** 的产量达 350 mg/L，最终纯度达到 95%[8]。本研究通过发酵工艺的优化，得到了一条高效表达 **1** 的发酵工艺路线，每升发酵上清液中表达量为（478.47±1.70）mg，高于目前文献报道的最

（下转第1026页）

al. Structural elucidation of rabeprazole sodium photodegradation products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, **46**(1): 88-93.

[5] 肖扬帆, 张　娜, 陈延祥, 等. HPLC法测定雷贝拉唑钠肠溶片的含量和有关物质[J]. 齐鲁药事, 2010, **29**(8): 472-474.

[6] 马　延, 王　媛, 畅瑞苗, 等. HPLC法测定雷贝拉唑钠肠溶微丸的有关物质[J]. 中国生化药物杂志, 2015, **35**(4): 165-168.

[7] 宋冬梅, 刘　路, 江文明, 等. 雷贝拉唑钠原料药中有关物质的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, **46**(9): 1013-1016.

[8] 宋冬梅, 刘　茜, 江文明, 等. 雷贝拉唑钠肠溶片中1-(1*H*-苯并咪唑-2-基)-3-甲基-4-氧代-1,4-二氢吡啶-2-羧酸钠的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(4): 559-563.

[9] RAJU T, KUMAR S R, RAO I M, *et al*. Development and validation of a stability indicating HPLC method for the estimation of rabeprazole impurities in pharmaceutical dosage forms by design of experiments [J]. *Asian J Pharm Clin Res*, 2013, **6**(4): 43-51.

(上接第991页)

高产量。通过超滤和阴离子交换柱色谱，可将**1**的纯度提高至 (97.94±0.42)%，收率为78.40%。另外，本研究还考察了**1**的主要酶学性质。综上所述，本研究得到了一种高产、工艺简单的**1**制备工艺，为其在重组多肽药物生产中应用奠定试验基础。

参考文献：

[1] 梁启星, 石竞成, 金学荣, 等. 肠激酶在毕赤酵母中的分泌表达优化[J]. 生物工程学报, 2020, **36**(8): 1689-1698.

[2] 李德华. 牛肠激酶基因工程菌的构建、高密度发酵、纯化及活性鉴定[D]. 重庆: 重庆师范大学硕士学位论文, 2007.

[3] 孙自勇, 陈均勇, 陈新园, 等. 牛肠激酶轻链在毕赤酵母中的分泌表达, 纯化和活性鉴定[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2004, **40**(1): 41-48.

[4] 姬秋彦, 毕研伟, 肖红剑, 等. 重组肠激酶催化亚基在毕氏酵母中的高密度发酵、纯化及活性鉴定[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2012, **34**(S2): 426-431.

[5] VOZZA L A, WITTWER L, HIGGINS D R, *et al*. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology*(N Y), 1996, **14**(1): 77-81.

[6] 刘国强, 林杨勇, 赵　林, 等. 肠激酶轻链在毕赤酵母中的组成型表达[J]. 生物技术, 2017, **27**(5): 446-451.

[7] FANG L, SUN Q M, HUA Z C. Expression of recombinant chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P.pastoris* and its purification and characterization [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*(Shanghai), 2004, **36**(7): 513-517.

[8] PENG L S, ZHONG X F, OU J X, *et al*. High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris* [J]. *J Biotechnol*, 2004, **108**(2): 185-192.