

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: K0526008

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

重组牛肠激酶酶学性质及动力学研究

The Study of Recombinant Bovine Enterokinase Properties and  
Dynamics

陈 小 兰

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 03 月 31 日

论文答辩时间: 2012 年 05 月 31 日

学位授予日期: 2012 年 月 日

答辩委员会主席: 黄河清 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2012 年 05 月 31 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2012 年 05 月 31 日

## 缩略语中英文对照

缩略词	英文	中文
GD <sub>4</sub> K-β-萘胺	Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-β-naphthylamide	甘氨酸-(天冬氨酸) <sub>4</sub> -赖氨酸-β 萘胺
EK	Enterokinase	肠激酶
rEK	recombinant Enterokinase	重组肠激酶
rBEKase	recombinant bovine Enterokinase	重组牛肠激酶
rEK <sub>LC</sub>	recombinant enterokinase light chain	重组肠激酶轻链
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳
Marker/LMW	Low molecular marker of protein	低分子量蛋白标准
U	Unit	酶活力单位
M	mol/L	摩尔浓度
IC <sub>50</sub>	The inhibitor concentrations leading to 50% activity lost	半抑制率浓度
K <sub>m</sub>	/	酶促反应的表观米氏常数
k <sub>+0</sub> , k <sub>-0</sub>	/	微观速率常数
k <sub>I</sub>	/	抑制平衡常数
V <sub>max</sub> (V <sub>m</sub> )	/	酶促反应的最大反应速度
Tris	Trihydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
HCl	Hydrochloricum acid	盐酸

缩略词	英文	中文
CPC	3-chloropivaloyl chloride 3-chloro-2,2-dimethylpropionyl chloride	3-氯-2,2-二甲基丙酰 氯
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
MBA	N`N`-Methylene-bis-Acrylamide	甲叉双丙烯酰胺
DTT	dithiothreitol	二硫苏糖醇
MeOH	Methyl alcohol	甲醇
HAc	Glacial acetic acid	冰醋酸
DTNB	5,5 - dithio-bis (2 - nitrobenzoic acid)	5,5-二硫代双(2- 硝基苯甲酸)
$\beta$ -ME	$\beta$ -mercaptoethanol	$\beta$ -巯基乙醇
DMSO	/	二甲基亚砷

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
<b>1 前言</b> .....	4
1.1 肠激酶简况.....	4
1.2 肠激酶的结构特点.....	4
1.3 肠激酶的酶学特点.....	5
1.4 肠激酶的生理特点.....	7
1.5 肠激酶轻链的基因工程研究进展.....	7
1.6 肠激酶研究情况总结和前景.....	10
1.7 本文研究肠激酶动力学的意义.....	12
<b>2 实验材料、仪器与方法</b> .....	12
2.1 实验材料.....	12
2.2 实验仪器.....	15
2.3 实验方法.....	16
2.3.1 酶活力和比活力测定（动态荧光法）.....	16
2.3.2 蛋白含量测定（Bradford 法）.....	16
2.3.3 纯度测定（HPLC-SEC 法）.....	16
2.3.4 分子量测定（SDS-PAGE 法）.....	16
2.3.5 紫外光谱扫描测定.....	17
2.3.6 rBEKase 水解 GD <sub>4</sub> K- $\beta$ -萘胺的动力学参数测定.....	17
2.3.7 酶的化学修饰.....	17
2.3.8 酶活性中心必需基团的定量分析.....	18
2.3.9 酶的修饰动力学研究.....	18
2.3.10 变性剂对 rBEKase 活力的影响.....	18
2.3.11 变性剂对 rBEKase 抑制机理的判断.....	18
2.3.12 变性剂对 rBEKase 抑制类型及抑制常数的测定.....	19

2.3.13 变性剂对 rBEKase 的动力学测定.....	19
<b>3 实验结果.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 重组牛肠激酶的酶学基本性质.....</b>	<b>19</b>
3.1.1 酶活力和比活力测定(动态荧光法).....	19
3.1.2 蛋白含量测定(Bradford 法).....	19
3.1.3 纯度测定(HPLC-SEC 法).....	20
3.1.4 分子量测定(SDS-PAGE 法).....	20
3.1.5 紫外光谱扫描测定.....	21
3.1.6 rBEKase 水解 GD4K- $\beta$ -萘胺的动力学参数测定.....	22
<b>3.2 酶活性中心必需基团的研究.....</b>	<b>23</b>
3.2.1 二硫键与酶活力的关系.....	23
3.2.2 巯基与酶活力的关系以及半胱氨酸残基数的测定.....	25
3.2.3 氨基与酶活力的关系.....	28
3.2.4 咪唑基与酶活力的关系.....	30
<b>3.3 DTNB 对酶活力的抑制动力学.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 DTNB 对酶活力的影响.....	31
3.3.2 DTNB 对酶的抑制过程.....	32
3.3.3 DTNB 对酶的抑制类型及抑制常数.....	33
3.3.4 DTNB 对酶的抑制动力学.....	34
3.3.5 DTNB 对酶的抑制动力学的微观速度常数测定.....	36
<b>3.4 蛋白变性剂对酶活力的影响和抑制动力学研究.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 盐酸胍对酶活力的影响和抑制动力学研究.....	42
3.4.2 硫脲对酶活力的影响和抑制动力学研究.....	45
3.4.3 尿素对酶活力的影响和抑制动力学研究.....	48
3.4.4 CPC 对酶的抑制动力学研究.....	51
<b>4 讨论.....</b>	<b>63</b>
4.1 酶的理化性质分析.....	64
4.2 催化 GD4K- $\beta$ -萘胺水解反应的动力学特征.....	65
4.3 酶活性必需基团的修饰及动力学研究.....	65

4.4 变性剂对酶的影响.....	67
5 结论.....	69
参考文献.....	70
发表论文.....	76
致谢.....	77

厦门大学博硕士论文摘要库



## Contents

<b>Chinese Abstract</b> .....	1
<b>English Abstract</b> .....	2
<b>1 Introduction</b> .....	4
<b>1.1 Review of Enterokinase</b> .....	4
<b>1.2 Structure characteristic of Enterokinase</b> .....	4
<b>1.3 Enzymology characteristic of Enterokinase</b> .....	5
<b>1.4 Physiology of Enterokinase</b> .....	7
<b>1.5 Introduction about the advances of Enterokinase in genetic engineering</b> ... ..	7
<b>1.6 Research summary and development prospects of Enterokinase</b> .....	10
<b>1.7 The significance of enterokinase dynamics research</b> .....	12
<b>2 Materials and Methods</b> .....	12
<b>2.1 Materials</b> .....	12
<b>2.2 Instruments</b> .....	15
<b>2.3 Methods</b> .....	16
2.3.1 Assay of the rBEKase activity. And specific activity (dynamic fluorescence method) .....	16
2.3.2 Assay of Protein Concentration (Bradford method) .....	16
2.3.3 Purification of the rBEKase (HPLC-SEC method) .....	16
2.3.4 Determination of the Molecular Weight (SDS-PAGE method) .....	16
2.3.5 Determination of Uv-absorption Spectra.....	17
2.3.6 The Value of Km for GD <sub>4</sub> K-β-NA Hydrolysis.....	17
2.3.7 Chemical Modification of rBEKase.....	17
2.3.8 Quantitative Assay of the Essential Groups.....	18
2.3.9 Modification dynamics.....	18
2.3.10 Effect of denaturant on rBEKase.....	18
2.3.11 Inhibitory Mechanism of denaturant on rBEKase.....	18
2.3.12 Inhibitory Type and Inhibition Constants of denaturant.....	19

2.3.13 dynamics of denaturant on rBEKase.....	19
<b>3 Results.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 rBEKase basic properties.....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Assay of the rBEKase activity. And specific activity (dynamic fluorescence method).....	19
3.1.2 Assay of Protein Concentration (Bradford method).....	19
3.1.3 Purification of the rBEKase (HPLC-SEC method).....	20
3.1.4 Determination of the Molecular Weight (SDS-PAGE method).....	20
3.1.5 Determination of Uv-absorption Spectra.....	21
3.1.6 The Value of Km for GD4K- $\beta$ -NA Hydrolysis.....	22
<b>3.2 Study on the Essential Groups of Enzyme Active Site.....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Effects of disulfide bond on rBEKase.....	23
3.2.2 Chemical Modification of rBEKase by $\beta$ -ME and Determination of cysteine residues.....	25
3.2.3 Chemical Modification of rBEKase by Amino Groups.....	28
3.2.4 Chemical Modification of rBEKase by histidine residue.....	30
<b>3.3 Inhibition Kinetics of DTNB on rBEKase.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 Effect of DTNB on rBEKase.....	31
3.3.2 Inhibition of DTNB.....	32
3.3.3 Inhibitory Type and Inhibition Constants of DTNB.....	33
3.3.4 Inhibition Kinetics Model of DTNB.....	34
3.3.5 Microscopic Inhibition Rate Constants of DTNB.....	36
<b>3.4 Effects of denaturants on rBEKase and Inhibitory Kinetics.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Effects of guanidine hydrochloride on rBEKase and Inhibition Kinetics ....	42
3.4.2 Effects of thiourea on rBEKase and Inhibition Kinetics.....	45
3.4.3 Effects of urea on rBEKase and Inhibition Kinetics.....	48
3.4.4 Inhibition Kinetics of CPC on rBEKase.....	51
<b>4 Discussion .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Analysis of physical and chemical properties of enzymes .....</b>	<b>64</b>

<b>4.2 GD4K-<math>\beta</math>-naphthylamine hydrolysis kinetic characteristics of rBEKase. . . .</b>	<b>65</b>
<b>4.3 Modification and Kinetics Essential Groups of Enzyme. . . . .</b>	<b>65</b>
<b>4.4 Effect on the enzyme by denaturant. . . . .</b>	<b>67</b>
<b>5 Conclusions. . . . .</b>	<b>69</b>
<b>References. . . . .</b>	<b>70</b>
<b>Papers. . . . .</b>	<b>76</b>
<b>Acknowledgements. . . . .</b>	<b>77</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 中文摘要

肠激酶 (EK, EC 3.4.21.9) 是一种在基因工程产品中广泛应用的工具酶, 是哺乳动物消化系统中最基础的丝氨酸蛋白水解酶之一, 由 1 条结构亚基(重链) 和 1 条催化亚基(轻链) 构成, 催化亚基可以特异性识别胰蛋白酶原中 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列并沿序列的羧基端切下, 将胰蛋白酶原活化为胰蛋白酶, 从而启动各种酶原活化的级联<sup>[1]</sup>。

本文研究的肠激酶是酵母表达的重组激酶, 其轻链接近电泳单一纯, 主要是通过催化荧光底物 Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- $\beta$ -naphthylamide (简称 GD<sub>4</sub>K- $\beta$ -萘胺) 水解跟踪法, 对该酶制剂的一些活性影响因素进行研究, 探讨了该酶的酶学特性、活力调控、催化作用机理, 从而填补国内在这方面的研究空白。

化学修饰研究表明: 半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基是酶的活性功能基团, 而根据  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME)、二硫苏糖醇 (DTT)、冰醋酸、甲醛等修饰剂的修饰反应, 表明二硫键、氨基不是维持酶活力的必需基团。并采用邹承鲁的底物反应动力学方法推算出酶分子中仅有一个半胱氨酸残基是酶活性所必需的, 该基团的修饰将导致酶活力的丧失。

根据 DTNB 对该酶的强烈抑制作用, 研究了其抑制动力学, DTNB 对酶的抑制作用是可逆过程。从直线的斜率求得其抑制常数  $K_1$  为 0.11 mmol/L。DTNB 在一定浓度下对酶的效应表现为慢可逆的抑制过程, 对酶的抑制作用属于非竞争性抑制作用, 同时建立动力学模型, 测定抑制剂与游离酶(E)和酶-底物络合物(ES) 结合的微观速率常数  $k_{+0}$  及  $k_{-0}$ 。

根据大规模生产中常用的变性剂种类, 选取了盐酸胍、CPC、硫脲、尿素进行动力学研究, 结果表明以上变性剂对该酶均具有较强的抑制活性, 其  $IC_{50}$  分别为 0.025 mol/L、0.32 mmol/L、0.080 mol/L、0.75 mol/L, 抑制常数  $K_1$  分别为 0.015 mol/L、0.26 mmol/L、0.060 mol/L、0.553 mol/L, 盐酸胍、硫脲、尿素对该酶的抑制作用均属于竞争性抑制作用, 而 CPC 对该酶则显非竞争性抑制作用。同时测得 CPC 对重组牛肠激酶的抑制速率常数  $k_{+0}$  及  $k_{-0}$ 。

关键词: 重组牛肠激酶; 动力学; 抑制作用

## Abstract

Enterokinase(EK, EC 3. 4. 21. 9) is a genetically engineered products in a widely used tool for the enzyme, it is one of the most basic mammalian digestive serine proteases,it was composed of a subunit structure(heavy chain) and a catalytic subunit(light chain), Subunit structure is responsible for the catalytic subunit structure fixed to the intestinal brush border membrane and guide it move to the intestinal cavity, can specifically recognize the Asp-Asp-Asp-Asp-Lys sequence of the trypsinogen and cut the sequence of the carboxyl group along the side, and activate the trypsinogen to trypsin, in order to start the cascade of a variety of proenzyme activation <sup>[1]</sup>.

The enterokinase investigated in this acticle is a recombinant kinase expression by yeast, and its light chain nearly a single band on SDS-PAGE.The main method in this study was to track the rate of catalyze hydrolysis the fluorescent substrate Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- $\beta$ -naphthylamide (abbreviated GD<sub>4</sub>K- $\beta$ -naphthylamine), studying the influence factor for the activity of the enzyme, exploring its enzymatic properties, activity control, catalyze mechanism, thus filling the domestic blank in this research.

The results of chemical modification show that the the cysteine sulfhydryl, histidine imidazole were essential for the enzyme catalytic activity. according to  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), dithiothreitol (DTT), glacial acetic acid, methyl alcohol modification reaction, indicating that the disulfide bonds, amino is not necessary to the enzyme catalytic activity. Only one cysteine residue was found to be essential by the kinetic method of the substrate reaction as Tsou described, the modification of the group will lead to complete loss of enzyme activity.

According DTNB strong inhibition of the enzyme to study the inhibition kinetics, the inhibition is reversible. The inhibition constant to the enzyme ( $K_I$ ) was 0.11 mmol /L by the slope. DTNB in a certain concentration showed the effects of slow reversible inhibition and noncompetitive inhibition to the enzyme. while establishing the dynamic model, study the microscopic rate constants  $k_{+0}$  and  $k_{-0}$ .

According the denaturant types commonly used in large-scale production, selected the guanidine hydrochloride,CPC,thiourea, urea to study the enzyme kinetics, the results show that the denaturant above all have a strong inhibition of enzyme activity,

the  $IC_{50}$  were 0.025 mol/L, 0.32 mmol/L, 0.080 mol/L, 0.75 mol / L; inhibition constant  $K_I$  were 0.015 mol/L, 0.26 mmol/L, 0.060 mol/L, 0.553 mol/L; the guanidine hydrochloride, thiourea, urea in a certain concentration showed the competitive inhibition to the enzyme, but CPC showed the noncompetitive inhibition to the enzyme. and established the dynamic model of CPC to recombinant bovine enterokinase.

**Key words:** recombinant bovine enterokinase; dynamics; inhibitory

# 1 前言

## 1.1 肠激酶简况

肠激酶 (enterokinase, EK) 原名肠蛋白酶, 是哺乳动物消化系统中最基础的丝氨酸蛋白水解酶之一, 近年于微生物、血液、昆虫、海星中也发现有类似物。脊椎动物人、猪、牛等胰液中的主要成分胰蛋白酶(Trypsin, EC 3. 4. 21. 4) 在分泌入肠时呈无活性的酶原状态, 需经肠激酶激活后才能分解成为有活性的胰蛋白酶<sup>[2]</sup>。肠激酶与胰蛋白酶同属丝氨酸蛋白酶家族, 只作用于碱性氨基酸C末端肽键, 堪称蛋白酶中特异性最严密的酶。丝氨酸蛋白酶是蛋白酶家族中的一大家族, 广泛存在于动物、植物、细菌、病毒、真菌中, 并且参与生命的各种反应如蛋白质翻译后加工、细胞分裂、病原体感染、组织降解、细胞凋亡等。该类酶因其活性中心具有一个独特易反应的丝氨酸残基而得名。肠激酶由结构亚基重链和催化亚基轻链组成, 两条链通过一对二硫键相连。肠激酶反应条件温和, 在pH值4.5~9.5, 温度4~45 °C范围内均可特异性水解蛋白底物<sup>[3]</sup>, 在很多去垢剂和变性剂存在的情况下, 能保持良好的活性。肠激酶具有识别特异性高、酶切条件宽、特异切割识别序列的C-末端而不会在目的蛋白的N-末端留下多余的氨基酸残基等优点, 因此在基因工程制药领域已经成为融合表达时下游纯化的首选工具酶。

## 1.2 肠激酶的结构特点

天然肠激酶<sup>[4]</sup> 分子质量为 150 kD, 由 1 条 115 kD 结构亚基重链(heavy chain, 重链) 和 1 条 35 kD 催化亚基(light chain, 轻链) 组成, 两者通过一个分子间二硫键结合, 结构亚基负责将催化亚基固定在小肠刷状缘膜上并引导它向肠腔移动, 催化亚基可以特异性识别 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列并沿序列的羧基端切下, 将胰蛋白酶原活化为胰蛋白酶, 从而启动各种酶原活化的级联。重组肠激酶的分子质量<sup>[5]</sup>通常为 26.3 kD, 具有 3 个糖基化位点, 属于 N-连接糖基化(N-linked glycosylation), 分别在 64、103、165 位的天冬酰胺(Asn) 上。其糖基化分子质量大约为 35 kD, 电泳表观分子量约为 43 kD。另外, 分子内含有 4 对二硫键。对于肠激酶酶切的高度特异性, Rumsh<sup>[6]</sup>认为是由于酶中钙离子的丧失使得酶自

切割，从而具备了激活其它酶的高度特异性。Janska<sup>[7]</sup>等研究氨基酸末端残基发现了肠激酶轻链的三维结构与类胰蛋白酶等的丝氨酸蛋白酶的结构具有同源性。Seong<sup>[8]</sup>等则发现将轻链氨基末端的异亮氨酸 (Ile) 突变为缬氨酸 (Val) 其酶活几乎不发生改变。有研究<sup>[9,10]</sup>发现肠激酶的重链强烈影响肠激酶对大分子底物的识别而对合成的融合蛋白或小分子底物的识别没有影响。

美国GI公司LaVallie等<sup>[1]</sup>于1993年应用BPTI-Sepharose亲和层析法分离出牛肠激酶，还原剂打开链间二硫键将大小亚基分开后，利用SDS-PAGE分别回收大小亚基并测定了氨基酸结构。牛肠激酶cDNA编码一条全长1035 aa的肽链，翻译后加工时断裂成两部分：表观分子量115,000道尔顿的大亚基(结构亚基)和表观分子量35,000道尔顿的小亚基(催化亚基)以一链间二硫键相连。催化亚基由801 aa开始至1035 aa共235个氨基酸残基，理论分子量26,262道尔顿，理论等电点(pI)5.1。结构亚基的链内没有可切割的信号序列，但N端有一明显的跨膜区(transmembrane domain)负责将催化亚基固定在肠壁细胞膜边缘，并引导它向肠内移动，然后二硫键打开释放出活性的催化亚基行使特异性切割功能。

### 1.3 肠激酶的酶学特点

肠激酶是小肠上的跨膜丝氨酸蛋白酶，在体内能激活胰蛋白酶原引起一系列酶的链接反应，这是由于肠激酶能够特异性地识别人和动物体内胰蛋白酶原氨基端的 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 的高度保守序列。由于肠激酶的轻链结构在人、牛和猪中保守，其识别序列 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 在脊椎动物中也有很强的保守性，且几乎所有被定序的胰蛋白酶原都具有4个天冬酰胺相连的特征，此序列在其他的天然蛋白质上又非常罕见，而肠激酶的活性中心有1个特殊的阳离子位点<sup>[11]</sup>，使得有强大负电的 (Asp)<sub>4</sub> 可以与此阳离子位点结合降低了这个位点胰蛋白酶原自切割的可能性，而行使上述特异性酶切功能，使其底物酶切位点序列具有高度的特异性，而且 P1' 位点的氨基酸对 EK 的专一性及活性影响甚微<sup>[12]</sup>，融合蛋白经 EK 催化水解获得的目标蛋白或多肽具有和野生型完全一致的氨基酸序列。因此 EK 目前广泛应用于切割融合蛋白中载体蛋白和目标蛋白之间的肽键<sup>[13]</sup>。

Vozza 等<sup>[5]</sup>发现，在体外重组肠激酶(recombinant Enterokinase,rEK)具有全酶



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库