

牛肠激酶催化亚基工程菌培养条件的探索与鉴定

张春香¹ 罗学刚² 童锦禄³ 蒋声海¹ 符玉梅¹ 张涛¹ 杨道文¹ 吉春花¹

(1 南京医科大学附属江宁医院药剂科 江苏 南京 211100 2 天津科技大学生物工程学院 天津 300457;

3 上海市仁济医院消化科 上海 200127)

摘要 目的 探索牛肠激酶催化亚基工程菌高效表达的培养条件。方法 牛肠激酶催化亚基基因的初步表达,筛选构建工程菌,从以下方面入手优化培养条件 培养基的组成、摇瓶发酵培养条件、培养基的 PH、种龄、接种量、培养时间等,并且通过 Western Blotting 和 SDS-PAGE 等鉴定不同条件下的实验结果,从而确定最佳培养条件。结果 通过鉴定实验结果,从不同种平行培养条件中选择产量最高的培养条件,作为最优培养条件。结论 成功地探索并鉴定了工程菌的适宜培养条件。

关键词 牛肠激酶催化亚基 工程菌 培养条件 探索 鉴定

中图分类号:Q814,TQ925 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1691-06

Exploration and Identification of Suitable Culture Conditions for Bovine Enterokinase Catalytic Subunit Engineering Bacteria

ZHANG Chun-xiang¹, LUO Xue-gang², TONG Jin-lu³, JIANG Sheng-hai¹, FU Yu-mei¹, ZHANG Tao¹, YANG Dao-wen¹, JI Chun-hua¹

(1 Dept. of Pharmacy, Nanjing Jiangning Hospital attached to Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China;

2 Bioengineering Institute of Tianjin Technological University, Tianjin 300457, China;

3 Dept. of Digest, Shanghai Renji Hospital, Shanghai 200127)

ABSTRACT Objective: To investigate the suitable cultivate condition of the high expression of bovine enterokinase catalytic subunit engineering bacteria. **Methods:** The bovine enterokinase catalytic subunit preliminary was expressed and the engineering bacteria was constructed. The cultivate condition was optimized from the following aspects: medium culture conditions of the optimal composition, wave bottle fermentation cultivation condition, culture medium PH, seed age, seed number, culture time. The Western Blotting and SDS-PAGE identification to grope the most appropriate culture condition. **Results:** The highest yield cultivative conditions were choice from the same parallel culture conditions as a optimal cultivation condition. **Conclusions:** The culture condition of bovine enterokinase catalytic subunit engineering bacteria had been optimized successfully.

Key words: Bovine enterokinase catalytic subunit; Engineering bacteria; Culture condition; Study; Identification

Chinese Library Classification(CLC): Q814, TQ925 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1691-06

前言

肠激酶存在于高等动物的十二指肠粘膜中,它是中肠上皮细胞分泌的能使胰蛋白酶原水解而成为活性胰蛋白酶的肽链内切酶(endo-peptidase)。由于肠激酶对识别位点的高度特异性,非常适合作为融合蛋白的切割试剂。牛肠激酶催化亚基具备全酶的活性,因此制备高产量牛肠激酶催化亚基工程菌,从中提取牛肠激酶催化亚基有着广阔的市场前景。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和常用试剂

(1) Yop10 菌种 Invitrogen (2) JM109 菌种 Invitrogen (3) E.coli AS1.357 菌种 Invitrogen; (4) pTASEK 质粒含 Tac 启动子、bEKL 基因和门冬酰胺酶信号肽 (5) ELC 蛋白质印迹检测试剂盒 Amersham; (6) LB 培养基 1.0%胰化蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1.0%氯化钠; (7) 冷冻离心机 SOVWALL SUPER T21

Kendro

1.2 方法及实验步骤

1.2.1 牛肠激酶催化亚基基因的初步表达 从平板保存的菌种挑取单菌落接入 LB 培养基(含氨苄青霉素 100mg/ml, 37℃、200-225rpm 震荡培养过夜,以 2%-5%的接种量转接入 50ml 的 LB(Amp 100mg/ml)发酵。然后取发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.2 工程菌的筛选构建 将已测序的重组质粒 pTASEK 用氯化钙法分别转化到宿主菌 E.coli AS1.357、JM109 和 Top10 菌株中,然后涂布 LB/Amp 平板培养,挑选抗性菌落,筛选阳性克隆。碱裂解法少量抽提质粒 DNA。提取的质粒 DNA 分别用 Hind 和 EcoR 酶切验证。将经酶切验证正确的菌株分别接入 2YT 培养基、麦芽汁培养基和玉米浆培养基, 37℃、200-225rpm 条件下摇瓶发酵培养 24h(种子液均以 2%的接种量接入发酵培养基),取发酵液测其在 600nm 的 OD 值。以 8000g、3min 离心发酵液,取上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.3 培养条件的优化 (1)培养基组成的确定 用正交实验法^[1],以麦芽汁(A)、胰化蛋白胨+酵母粉(B)和谷氨酸钠(C)为培养基组份,选择三个水平进行正交实验来摸索最佳的培养基组

作者简介 张春香,女,主管药师,硕士研究生。研究方向 临床药学。E-Mail luckyzcx@126.com

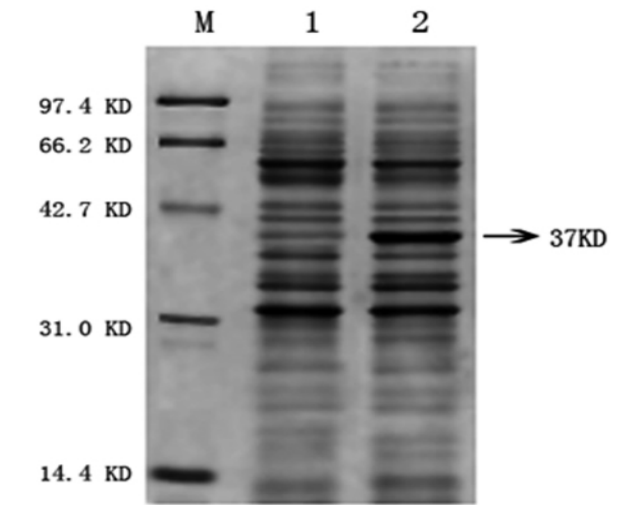
(收稿日期 2010-12-23 接受日期 2011-01-28)

成。(2)培养基 PH 值 采用优化的培养基 ,用 HCL 或 NaOH 调节发酵培养基的初始 PH 37℃、200-225rpm 条件下摇瓶发酵培养 24h ,测发酵液在 600nm 的 OD 值(2%种子液接种量)。(3)种龄、接种量和培养时间对产量的影响 :分别使用不同代的种子液接入发酵培养基 ,其余培养条件不变 ,到一定时间收集上清液测定 OD600。探索培养时间对产量的影响 固定其他培养条件 ,只更改培养时间 ,培养结束测定上清液 OD600。分别使用 1%、2%、3%、4%、5%浓度的种子液接入发酵培养基 ,固定其他培养条件 ,到一定时间收集发酵培养液上清 ,进行 SDS-PAGE 电泳 ,探索接种量对产量的影响。(4)Western Blotting 鉴定 [2-4] :Western Blotting 是用来检测蛋白水平的表达 ,在此用于检测目标产物是否表达成功。(5) 取发酵上清进行 SDS-PAGE 电泳 :电泳结束后 ,Bio-rad 电转装置 90V 恒压电转移 1h。电转移后 ,将 Hybond ECL membrane 置于封闭液中室温固定 1h。弃去封闭液 ,加入一抗 anti-6× his antibody(Invitrogen),于含 1%脱脂奶的 TBST 中室温孵育 1h,用 10ml 的含 1%牛奶 TBST 洗四次。加入二抗 - 辣根过氧化物酶标记的鼠抗 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse (Jackson Immunochemicals),于含 1%脱脂奶的 TBST 中室温孵育 1h ,重复 2.6 步骤对膜进行洗脱。用 ELC 蛋白质印迹检测试剂盒的试剂孵育膜 1h 后 ,在暗室经 X-ray 曝光 5-10min,然后进行显影和定影。

2 结果

2.1 牛肠激酶催化亚基初步表达的验证

将测序正确的阳性克隆 37℃培养过夜 ,以 2%的量进行转接 ,摇瓶培养 20h, 收集菌液离心 ,取发酵上清液进行 SDS-PAGE[5-7]电泳图 1,通过对比含 pTASEK 菌株与原空菌株的发酵上清的 SDS-PAGE 电泳图 ,发现 bEKL 在 37kDa 有表达 ,扫描 2 泳道的蛋白条带占整个泳道的 16.82%。说明重组质粒 pTASEK 成功转化 ,含目标基因的工程菌构建成功。



1. Fermentation supernatant fluid don't include restructuring plasmid pTASEK strain; 2 Fermentation supernatant fluid include restructuring plasmid pTASEK strain
1 不含重组质粒 pTASEK 菌株的发酵上清 2 含重组质粒 pTASEK 菌株的发酵上清

图 1 SDS-PAGE 电泳鉴定表达产物

Fig 1 SDS-PAGE identify of expression product

2.2 最适工程菌的构建

经双酶切验证 pTASEK 成功的转化到 E.coliAS1.357、JM109 和 Top10 菌株中。通过检测含重组质粒 pTASEK 菌株 E.coliAS1.357、JM109 和 Top10 菌株在 2YT 培养基、麦芽汁培养基和玉米浆培养基中的 OD₆₀₀ 的值(表 1),并综合各菌发酵上清液的 SDS-PAGE 电泳图 2 (bEKL 条带为 37KD),并确定合适 bEKL 表达的最适工程菌为 E.coliAS1.357 培养基为麦芽汁培养基。

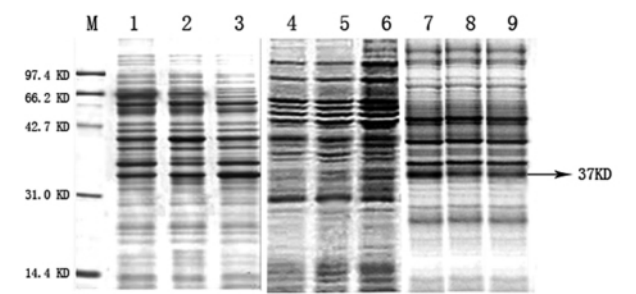


图 2 不同微生物在不同培养基中的 SDS-PAGE 图谱 :1、2、3 为分别含 pTASEK 重组质粒的 Top10 菌株在麦芽汁培养基、2YT 培养基和玉米浆培养基中的发酵上清 ;4、5、6 为分别含 pTASEK 重组质粒的 E.coliAS1.357 菌株在麦芽汁培养基、2YT 培养基和玉米浆培养基中的发酵上清 ;7、8、9 为含 pTASEK 重组质粒的 JM109 菌株在麦芽汁培养基、2YT 培养基和玉米浆培养基中的发酵上清

Fig 2 SDS-PAGE of culture supernatant of different bacteria in different culture :1, 2, 3 for pTASEK restructuring plasmid Top10 strains' fermentation supernatant fluid respective culturing on malt juice in the media, 2YT medium and corn pulp culture; 4, 5, 6 for pTASEK restructuring plasmid E.coliAS1.357 strains' fermentation supernatant fluid respective culturing on malt juice in the media, 2YT medium and corn pulp culture; 7, 8, 9 for pTASEK restructuring plasmid JM109 strains' fermentation supernatant fluid respective culturing on malt juice in the media, 2YT medium and corn pulp culture

表 1 不同菌株在不同培养基中培养的 OD₆₀₀ 值

Table 1 Strains in different media fermentation cultivation of OD₆₀₀

bacteria	culture	OD ₆₀₀
E.coliAS1.357	2YT culture	9.983/9.880
E.coliAS1.357/pTASEK	malt juice culture	9.690/10.380
	corn pulp culture	0.399/0.209
JM109	2YT culture	10.639/10.081
JM109/ pTASEK	malt juice culture	8.304/8.834
	corn pulp culture	0.365/0.349
Top10	2YT culture	10.104/9.460
Top10/pTASEK	malt juice culture	8.304/8.787
	corn pulp culture	0.229/0.112

2.3 培养条件的优化

2.3.1 培养基组成的正交实验 3 个 3 水平 ,采用有交互作用的正交表 L27(3¹³)^[8],结果见表 2。

A 麦芽汁选 10%、15%、20%三个水平。

B 胰化蛋白胨 + 酵母选 1g+0.5g、1.6g+1g、2g+0.5g 三个水平。C 谷氨酸钠选 2%、4%、8%三个水平。

表 2 培养基组成的正交实验
Table2 Orthogonal design tests of media

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	A	B	A× B	A× B	C	A× C	A× C	B× C			B× C			
Test	Walt	Tryptone(%)	Sodium											
		+	Glutamate											OD ₆₀₀
No	(%)	yeast	(%)											
	extract(%)													
1	1(10%)	1(1/0.5)	1	1	1(2%)	1	1	1	1	1	1	1	1	6.909
2	1(10%)	1(1/0.5)	1	2(4%)	2(4%)	2	2	2	2	2	2	2	2	12.38
3	1(10%)	1(1/0.5)	1	3(8%)	3(8%)	3	3	3	3	3	3	3	3	5.872
4	1(10%)	2(1.6/1)	2	2	1(2%)	1	1	2	2	2	3	3	3	10.218
5	1(10%)	2(1.6/1)	2	2	2(4%)	2	2	3	3	3	2	2	2	8.791
6	1(10%)	2(1.6/1)	2	2	3(8%)	3	3	1	1	1	2	2	2	10.133
7	1(10%)	3(2/0.5)	3	3	1(2%)	1	1	3	3	3	2	2	2	4.816
8	1(10%)	3(2/0.5)	3	3	2(4%)	2	2	1	1	1	2	2	2	7.015
9	1(10%)	3(2/0.5)	3	3	3(8%)	3	3	2	2	2	1	1	1	7.039
10	2(15%)	1(1/0.5)	2	3	1(2%)	2	3	1	2	3	1	2	3	5.672
11	2(15%)	1(1/0.5)	2	3	2(4%)	3	1	2	3	1	2	3	1	8.669
12	2(15%)	1(1/0.5)	2	3	3(8%)	1	2	3	1	2	3	1	2	7.429
13	2(15%)	2(1.6/1)	3	1	1(2%)	2	3	2	3	1	3	1	2	4.394
14	2(15%)	2(1.6/1)	3	1	2(4%)	3	1	3	1	2	1	2	3	4.765
15	2(15%)	2(1.6/1)	3	1	3(8%)	1	2	1	2	3	2	3	1	4.922
16	2(15%)	3(2/0.5)	1	2	1(2%)	2	3	3	1	2	2	3	1	8.392
17	2(15%)	3(2/0.5)	1	2	2(4%)	3	1	1	2	3	3	1	2	12.207
18	2(15%)	3(2/0.5)	1	2	3(8%)	1	2	2	3	1	1	2	3	5.116
19	3(20%)	1(1/0.5)	3	2	1(2%)	3	2	1	3	2	1	3	2	3.981
20	3(20%)	1(1/0.5)	3	2	2(4%)	1	3	2	1	3	2	1	3	5.854
21	3(20%)	1(1/0.5)	3	2	3(8%)	2	1	3	2	1	3	2	1	6.515
22	3(20%)	2(1.6/1)	1	3	1(2%)	3	2	2	1	3	3	2	1	7.933
23	3(20%)	2(1.6/1)	1	3	2(4%)	1	3	3	2	1	1	3	2	10.031
24	3(20%)	2(1.6/1)	1	3	3(8%)	2	1	1	3	2	2	1	3	6.371
25	3(20%)	3(2/0.5)	2	1	1(2%)	3	2	3	2	1	2	1	3	8.367
26	3(20%)	3(2/0.5)	2	1	2(4%)	1	3	1	3	2	3	2	1	9.81
27	3(20%)	3(2/0.5)	2	1	3(8%)	2	1	2	1	3	1	3	2	7.56
	K1	8.130	8.337	7.220	7.031	6.742	7.234	7.539	7.332	7.461	7.427	7.664	6.652	7.465
	K2	6.821	8.517	7.892	7.506	8.816	7.454	7.326	8.575	7.821	7.685	8.083	7.767	7.460
	K3	7.380	5.478	7.219	7.794	6.773	7.643	7.466	6.424	7.050	7.220	6.583	7.913	7.407
	R	1.310	3.039	0.672	0.762	2.073	0.031	0.213	2.150	0.771	0.465	1.500	1.261	0.053
	S	7.773	52.317	2.711	2.668	25.418	0.754	0.211	20.971	2.678	0.977	10.784	8.567	0.019

由表 2 的 R 值分析可得 B 因素对菌株产牛肠激酶催化亚基的影响较大 ,其次为 B× C 交互作用和 C 因素 ,由 S 值直观分析发现几个因素和交互作用对菌株产牛肠激酶催化亚基影响的先后顺序为 :B>B× C>C>A。正交实验结果方差分析 ,结果见表 3。

表 3 bEKL 产量的方差分析表
Table 3 Analysis of variance table of bEKL production

Source of Variance	Sum of Deviation square	Degrees of freedom	Evaluated variance	F	Fa	Significance
B	52.317	2	26.159	17.096	$F_{0.01}(2,14)=6.51$	Highly Significance
C	25.418	2	12.709	8.306	$F_{0.01}(2,14)=6.51$	Highly Significance
B× C	31.755	4	7.939	5.188	$F_{0.05}(4,14)=3.11$	Significance
A	7.773	2	3.887	1.270	$F_{0.05}(2,14)=3.74$	
SE	12.241	8	1.530			
Error	18.585	16	1.162			
Sum	135.848	26				

*In order to enhance the reliability of F-test,S3,S4,S6 and S7 were added to error term

从表 3 中可以看出 B 因素和 C 因素是影响工程菌 OD600 的高度显著因子 ,B× C 为显著因子 ,B 和 C 的交互作用效应分

表 4 B 因素和 C 因素的交互作用
Table 4 Effect of the interaction between the culture composition B and C

	B1	B2	B3
C1	7.745	8.086	4.397
C2	11.479	9.090	5.878
C3	5.786	8.374	6.159

综合方差分析和交互作用效应分析结果 ,本实验的较佳培养基组成为 :A1B1C2, 即麦芽汁 10%, 谷氨酸钠 4%, 蛋白胨 1.0%, 酵母 0.5%。

2.3.2 种子液浓度的优化 固定其他培养条件 ,分别接入不同浓度的种子液 ,培养结束后测定培养液上清 OD₆₀₀(图 3) ,结合 SDS-PAGE 电泳结果(图 4) ,确定种子液的浓度是 3%时 ,产量最高。

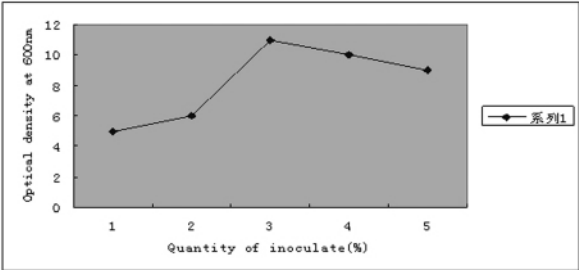


图 3 种子数量对 bEKL 的影响
Fig 3 Effect of seed number bEKL OD₆₀₀

2.3.3 种龄优化 固定其他实验条件 ,接入不同种龄的种子液 ,

培养结束后测定 OD₆₀₀ ,通过实验发现种龄为 14h 时 ,OD₆₀₀ 值最大(图 5) ,即产量最高。

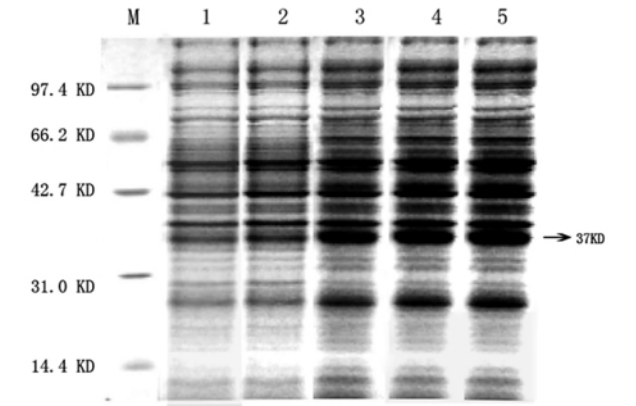


图 4 SDS-PAGE 电泳检测不同浓度种子液接入发酵培养基的培养液上清 :1-5 分别为 1%、2%、3%、4%和 5%的种子液接入发酵培养基后收集的上清液
Fig 4 SDS-PAGE of culture supernatant of different seed number :1-5 respectively for 1%, 2%, 3%, 4% and 5% of seed after fermentation liquid access the supernatant fluid collection

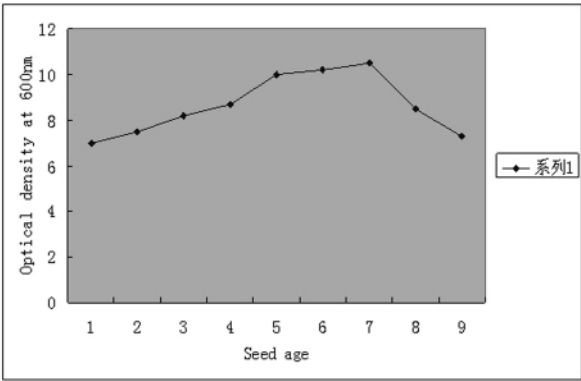


图 5 种龄对产量的影响
Fig 5 Effect of seed age on bEKL OD₆₀₀

2.3.4 培养基 PH 值优化 采用优化培养基,用 HCL 或 NaOH 调节发酵培养基的初始 PH 值,于 37℃、200-225rpm 震荡培养 24h 进行 SDS-PAGE 电泳图 6,分析得到最适 PH 值为 6.5。

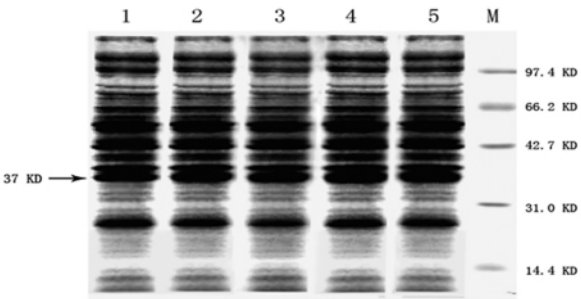


图 6 SDS-PAGE 电泳检测不同 PH 培养基的培养液上清 :1-5 为初始 PH 为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0 的发酵液上清
Fig 6 SDS-PAGE of culture supernatant of different PH in the culture :1-5 for the initial PH for 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 fermented supernatant

2.3.5 培养时间的影响 采用优化培养基,PH6.5,种龄 14h,接种量 3%,500ml 三角瓶装液量为 120ml,37℃、200-225rpm,同时 SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达,发现菌体的生长与蛋白的表达在 18-20h 时达到高峰,见图 7。

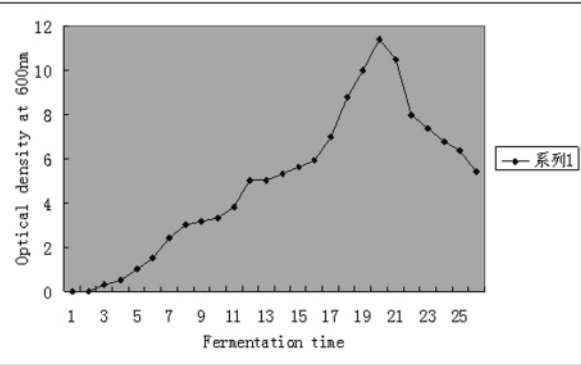


图 7 培养时间对产量的影响
Fig 7 Time course of cultivation of engineering bacteria producing bEKL in flask

2.4 Western Blotting 鉴定
经显影得到的结果见图 8,从 Western Blotting 结果可以很清晰地看到目标基因在 E.coliAS1.357 菌株中得到了成功的表达,从而有力的说明了工程菌构建实验的成功。

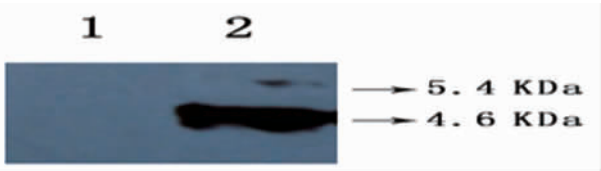


图 8 Western blotting 鉴定 bEKL :1 空白菌株(对照) 2 含 pTASEK 的菌株
Fig 8 Western blotting analysis of bEKL :1 blank strains(contrast) 2 strains contain pTASEK

3 讨论

实验发现用 E.coliAS1.357 菌株和 10%麦芽汁培养基更适合 bEKL 的表达,这可能是由于 E.coliAS1.357 菌株产门冬酰胺酶的量较高,利于分泌表达出的产物 bEKL 的加工。
SDS-PAGE 电泳发现牛肠激酶催化亚基的位置约在 37KD^[17,18]左右,而 bEKL 的理论分子量为 26.3KD,这可能是由于 3' 端引入了 His-tag,6 个连续的组氨酸带有较强的正电荷,从而降低了在 SDS-PAGE 中的泳动速率,因此导致了表观分子量增大。
在得到 bEKL 基因片段时应用加端 PCR 在 3' 端引入了 6 个 His-tag,因而在 Western blotting 中,加入的第一抗体就是 anti-6 his antibody。经显影检测初步认定基因在 E.coliAS1.357 菌株得到了成功的表达。

参考文献(References)

[1] 黄志宏.数理统计学方法[M].北京:人民卫生出版社,1987,210-216
Huang Zhi-Hong, Method of mathematical statistics, [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1987,210-216,256
[2] 张维铭. 现代分子生物学实验手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2003, 359-362
Zhang Wei-Ming, Modern Molecular Biology Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 2003,359-362
[3] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001,366-374
Li Yong-Mong, Zhao Yu-Qi . Practice Molecular Biology Methodological Manual[M]. Beijing: Science Press, 3001,366-374
[4] 夏其昌, 曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学 [M]. 北京: 科学出版社, 2007,80-90
Xia Qi-Chang, Zeng Rong et al. Protein Chemistry and Proteomics [M]. Beijing: Science Press, 2007,80-90
[5] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2005,498-608
Sambrook J. Molecular cloning [M]. Beijing: Science Press, 2005, 498-608
[6] 奥斯伯. 精编生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2007.323-465
Frederick M. Short Protocols in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 2007.323-465

- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1993: 234-287
Lu Sheng-Dong. Modern Molecular Biology Experimental Technique [M]. Beijing: Higher education Press, 1993:234-287
- [8] 中国现场统计研究会三次设计组, 全国总工会电教中心. 正交设计和三次设计[M]. 北京:科学出版社,1985:170-171
All-China Federation of Trade Unions' electrified education editor in chief, three times design team of Chinese field statistic research society. orthogonal design and three times design [M]. Science Press, 1985: 170-171
- [9] 汪全鑫. 数理统计[M]. 西安:西安交通大学出版社.1987,148-166
Wang Quan-Xin. Mathematical Statistics [M]. Xi'an: Xi'an jiaotong university Press,1987:148-166
- [10] 魏宗舒等编, 概率论与数理统计教程[M].北京:高等教育出版社 1987:450-469
Wei Zong-Shu et al. Theory of probability and mathematical statistics course[M]. Beijing:Higher education Press, 1987:148-166
- [11] 唐威华, 张景六. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产偏差的原因[J].植物生理学报, 2000,26(1):64-68
Tang Wei-Hua, Zhang Jing-Liu. Deviation reasons about SDS-PAGE method determining His-tag fusion protein formula weight [J]. Plant Journal of Physiology, 2000, 26(1):64-68
- [12] 黄鹤, 甘一如. 牛肠激酶轻链基因的克隆及其在大肠杆菌中的融合表达[J].遗传,2003,26(6):685-690
Huang He, Gan Yi-Ru. Bovine enterokinase light chain gene' clone and fusion expression in e.coli [J]. Hereditas, 2003,26(6):685-690
- [13] Huang L, Ruan H, Gu W, et al, Functional expression and purification of bovine enterokinase light chain in recombinant Escherichia coli[J]. Biochem Biotechnol, 2007, 37(3):205-217
- [14] Gasparian ME, Ostapchenko VG, Dolgikh DA, et al, Biochemical characterization of human enteropeptidase light chain[J]. Biomedical and Life Sciences, 2006, 71(2): 113-119
- [15] Colussi PA, Taron CH. Kluyveromyces lactis LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in K. lactis[J]. Appl Environ Microbiol, 2005,71(11):7092-7098
- [16] Fang L, Sun QM, Hua ZC. Expression of recombinant chinese bovine enterokinase catalytic subunit in P. pastoris and its purification and characterization[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2004, 36(7):513-517
- [17] Huang H, Zhao Y, Yi-ru G. Prokaryotic expression of Chinese bovine enterokinase catalytic subunit [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(2): 286-290
- [18] Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, et al. Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in Escherichia coli [J]. Protein Expr Purif, 2003, 31 (1): 133-139
- [19] Likhareva VV, Vas'kovskij BV, Shepel' NE, et al, New substrates for enteropeptidase. I. Biologically active hepta-nonapeptides [J]. Bioorg Khim, 2003, 29(2):129-134
- [20] Likhareva VV, Mikha ĭlova AG, Rumsh LD. Hydrolysis by enteropeptidase of nonspecific (model) peptide sequences and possible physiological role of this phenomenon [J].Vopr Med Khim, 2002,48 (6):561-569