不同类群动物胰蛋白酶结构特征与酶学性质关系

王军仁，姜国良，吴志强

（中国海洋大学海洋生命学院，山东青岛 266003）

摘要：选取 Genebank 中已知的完整胰蛋白酶（EC 3.4.21.4）序列，对昆虫胰蛋白酶（insect trypsin，I-TRY）、温热带甲壳动物胰蛋白酶（temperate and tropical zone crustacean trypsin，TTC-TRY）、冷水性鱼类胰蛋白酶（cold adapted fish trypsin，CAF-TRY）、温热带鱼类胰蛋白酶（temperate and tropical zone fish trypsin，TTF-TRY），以及高等脊椎动物胰蛋白酶（higher vertebrate trypsin，HV-TRY）的结构特征和酶学性质进行比较。结果表明：作为无脊椎动物和脊椎动物进化地位最高的 2 个类群，节肢动物和脊椎动物胰蛋白酶氨基酸数目、分子直径、结构多样性、酶功能多样性进化趋势存在差别。动物胰蛋白酶活性部位及附近大多数氨基酸侧链严格保守。由于外周和活性中心部位附近精氨酸（Arg）、谷氨酸（Glu）、天冬氨酸（Asp）、组氨酸（His）、半胱氨酸（Cys）、丙氨酸（Ala）、脯氨酸（Pro）、酪氨酸（Lyr）和甲硫氨酸（Met）的不同，不同类群动物胰蛋白酶的稳定性、柔性和反应耗能量差异显著，CAF-TRY，TTF-TRY 和 TTC-TRY 催化常数（K_{cat}）升高或米氏常数（K_m）降低，催化效率按下列顺序依次降低：CAF-TRY＞TTF-TRY＞TTC-TRY＞I-TRY，HV-TRY.

关键词：酶学；胰蛋白酶；结构特征；酶学性质

中图分类号：Q71　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2013)05-0443-12

Relationship of enzymologic properties with structure features of trypsin from different animal groups

WANG Junren，JIANG Guoliang，WU Zhiqiang

(*College of Marine Life Sciences，Ocean University of China，Qingdao，Shandong* 266003，*China*)

Abstract：The reported trypsin sequences (EC 3.4.21.4) in Genebank were selected，and relationship between the structure features and enzymologic properties in insect trypsin (I-TRY)，temperate and tropical zone crustacean trypsin (TTC-TRY)，cold adapted fish trypsin (CAF-TRY)，temperate and tropical zone fish trypsin (TTF-TRY) and higher vertebrate trypsin (HV-TRY) was comparied. It was found that，the evolutionary trend between the nummbers of amino acids，molecular diameter，diversity of molecular structure and fuction of arthropods and vertebrates trypsins were different in two groups with highest evolutionary position within invertebrates and chordates separately. The animal trypsin active centre and amino acid side chains round were strictly conservative. With differences of Arg，Glu，Asp，His，Cys，Pro，Ala，Tyr and Met around periphery and active centre，the stability，flexibility and peaction energy consumption of animal trypsin were significantly different. The K_{cat} of CAF-TRY，TTF-TRY and TTC-TRY was increased，while the K_m of them was reduced. The catalytic efficiency was the following order：CAF-TRY＞TTF-TRY＞TTC-TRY＞I-TRY and HV-TRY.

Key words：enzymology；trypsin；structure feature；enzymologic property

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金（201013001）；山东省自然科学基金（ZR2010DQ012）；国家自然科学基金（31101876）

作者简介：王军仁（1986—），男，硕士研究生，主要研究方向：海洋生物化学与分子生物学

通信联系人：吴志强，副教授，主要研究方向：海洋生物化学与分子生物学. E-mail：wuzhiqiang@ouc.edu.cn

0 引言

在生物体内，酶催化各种生理代谢过程中的生化反应，对生物的生长、发育和繁殖至关重要。根据温度对酶的活性及稳定性等的影响，将酶分成适冷酶（嗜冷生物）、中温酶（温热带生物）和高温酶（嗜热生物）。目前，已经从微生物中分离到多种适冷酶与中温酶，如 α-淀粉酶、纤维素酶、β-牛乳糖酶、蛋白酶、酯酶等[1]。微生物适冷酶与中温酶相比，具有最适酶活温度低、活化能低、热稳定性差、柔性高等特点，从而在低温下具有较高的催化效率[2]。

胰蛋白酶是一种主要的碱性丝氨酸蛋白酶，专一性水解 Lys 与 Arg 羧基形成的肽。昆虫和甲壳动物胰蛋白酶由中肠腺分泌，脊椎动物胰蛋白酶则由肝胰脏或胰脏分泌，在动物消化道中主要起蛋白消化及酶原激活作用，且在昆虫、甲壳动物蜕皮及增强免疫力过程中起着至关重要的作用[3]。目前，脊椎动物胰蛋白酶在医药、轻工业及畜牧业方面具有广泛的应用价值，也是基因工程和蛋白质工程的极好模型。

国内外学者对一些昆虫、温热带甲壳动物、冷水性鱼类、温热带鱼类以及高等脊椎动物胰蛋白酶酶学性质及其基因进行了较多研究[4~6]。冷水性鱼类胰蛋白酶稳定性略低于高等脊椎动物胰蛋白酶，但是催化效率较高。关于冷水性鱼类胰蛋白酶结构特征与酶性质关系也有若干研究[6]，但目前有关不同进化地位及生境动物胰蛋白酶蛋白结构与酶学性质关系的研究目前尚未有报道。

研究选取 Genebank 数据库中已报道的蛋白序列，比较昆虫、温热带甲壳动物、冷水性鱼类、温热带鱼类，以及高等脊椎动物胰蛋白酶的氨基酸组成、二级结构、结构域、分子结构模型等方面的差异，探讨蛋白结构与酶学性质之间的关系，为解释各类群动物胰蛋白酶生理生化现象，开发其在医药、工业及畜牧业的应用提供了理论依据。

1 材料与方法

从 Genebank 数据库中选取已报道的完整胰蛋白酶序列 112 条，分为 I-TRY，TTC-TRY，CAF-TRY，TTF-TRY 及 HV-TRY 5 个组（如表 1 所示）。利用 DNAStar 7.0 计算每组序列组成氨基酸数目（amount of amino acid，AmAA）及极性氨基酸（polar amino acid，PAA）、带电荷氨基酸（charged amino acid，CAA）、酸性氨基酸（acidic amino acid，AcAA）、碱性氨基酸（basic amino acid，BAA）、不带电极性氨基酸（uncharged polar amino acid，UPAA）、疏水性氨基酸（hydrophobic amino acid，HAA）及芳香族氨基酸（aromatic amino acid，ArAA）的含量平均值。

利用 DNAStar 7.0，MEGA 5.0，DAMBE 及 ClustalX 1.8 等软件进行多个序列比对分析。在 NCBI 上的蛋白质结构功能域分析网站对底物结合位点、催化中心的保守区域进行分析（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi），通过瑞士生物信息学研究所（Swiss Institute of Bioinformatics，SIB）提供的 Swiss-Model 软件分析蛋白二级结构域及三维结构（http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php）。

2 结果

2.1 氨基酸组成比较

各组动物胰蛋白酶的 AmAA，PAA，CAA，AcAA，BAA，UPAA，ArAA 及 HAA 含量如表 2 所示。由表 2 可知：I-TRY 及 TTC-TRY 比 CAF-TRY，TTF-TRY，HV-TRY 平均多 6～9 个氨基酸，甚至多 16 个氨基酸。TTC-TRY 的 CAA 含量（19.71%）、AcAA 含量（12.64%）均高于其他 4 类动物胰蛋白酶，而 BAA 含量（4.29%）、UPAA 含量（41.08%）则小于其他 4 类动物胰蛋白酶，其中 I-TRY 的 BAA 含量（6.81%）最高。TTC-TRY 的 HAA 含量（33.21%）略高于 CAF-TRY（29.93%），TTF-TRY（29.81%）及 HV-TRY（32.64%），低于 I-TRY（34.59%）. TTC-TRY 的

表 1 选取分析蛋白结构的物种及其胰蛋白酶序列

Tab. 1 Species and trypsin sequences seleted for protein structure analysis

组别	物种及其胰蛋白酶序列
I-TRY	TRY3_AEDAE（sp|P29786|），TRY5_AEDAE（sp|P29787|）from *Aedes aegypti*（埃及斑蚊）；TRY1_ANOGA（sp| P35035|），TRY2_ANOGA（sp|P35036|），TRY3_ANOGA（sp|P35037|），TRY4_ANOGA（sp|P35038|），TRY5_ANOGA（sp|P35039|），TRY6_ANOGA（sp|P35040|）and TRY7_ANOGA（sp|P35041|）from *Anopheles gambiae*（冈比亚按蚊）；TRYA_DROME（sp|P04814|），TRYB_DROME（sp|P35004|），TRYE_DROME（sp|P35005|），TRYDG_DROME（sp|P42276|），TRYT_DROME（sp|P42278|），TRYU_DROME（sp|P42279|），TRYZ_DROME（sp|P42280|）from *Drosophila melanogaster*（黑腹果蝇）；TRY_BOMMO（pir|S32794|）from *Bombyx mori*（家蚕）；TRYP_CHOFU（sp| P35042 |）from *Choristoneura fumiferana*（棕色卷蛾）；TRYA_MANSE（sp	P35045 |），TRYB_MANSE（sp| P35046|），TRYC_MANSE（sp|P35047|）from *Manduca sextac*（烟草天蛾）；TRY1_HELAR（emb|CAA72954.1|），TRY2_HELAR（emb|CAA72955.1|），TRY3_HELAR（emb|CAA72956.1|），TRY4_HELAR（emb|CAA72962.1|）from *Helicoverpa armigera*（棉铃虫）
TTC-TRY	TRY1a_LEPSA（gb|AAP55756.1|），TRY1b_LEPSA（gb|AAP55759.1|），TRY1c_LEPSA（gb|AAP55755.1|），TRY1_LEPSA（emb|CAH61461.1|），TRY2_LEPSA（emb|CAH61268.1|），TRY3_LEPSA（emb|CAH61269.1|），TRY4_LEPSA（emb|CAH61460.1|），TRY5_LEPSA（emb|CAH61271.1|），TRY6_LEPSA（emb|CAH61272.1|）from *Lepeophtheirus salmonis*（鲑鱼虱）；TRY_DAPPU（EFX80960.1）from *Daphnia pulex*（蚤状溞）；TRY1_FENCH（gb|ACQ45454.1|），TRY2_FENCH（gb	ACQ45455.1 |），TRY3_FENCH（gb	ACQ45456.1 |），TRY4_FENCH（gb|ACQ45457.1|）from *Fenneropenaeus chinensis*（中国明对虾）；TRY_MARJA（gb	ACE80257.1 |）from *Marsupenaeus japonicus*（日本囊对虾）；TRYP_ASTFL（sp|P00765|）from *Astacus astacus*（欧洲小龙虾）；TRY_PACLE（emb|CAA10915.1|）from *Pacifastacus leniusculus*（淡海蝲蛄）；TRY_PONLE（gb|AAX98287.1|）from *Pontastacus leptodactylus*（窄指虾）；TRY_LITVA（emb|CAA60129.1|）from *Litopenaeus vannamei*（凡纳滨对虾）；TRY1a_PANAR（gb|ADB66711.1|），TRY1b_PANAR（gb|ADB66712.1|），TRY2_PANAR（gb|ADB66713.1|），TRY3_PANAR（gb	ADB66714.1 |），TRY4_PANAR（gb	ADB66715.1 |）from *Panulirus argus*（眼斑龙虾）；TRY_PORPE（gb|ABM65758.1|）from *Portunus pelagicus*（远洋梭子蟹）
CAF-TRY	TRY_BORSA（dbj|BAI48043.1|）from *Boreogadus saida*（北极鳕）；TRY1_DISMA（gb|AAB57728.1|），TRY2_DISMA（gb|AAB57732.1|），TRY3_DISMA（gb|ABA41381.1|）from *Dissostichus mawsoni*（南极鳕）；TRYI_GADMO（emb|CAA54214.1|），TRYX_GADMO（emb|CAA54215.1|），TRYY_GADMO（emb|CAD30563.1|）from *Gadus morhua*（大西洋鳕）；TRY_PARMA（emb|CAA57701.1|）from *Paranotothenia magellanica*（副南极鱼）；TRY_ONCCH（dbj|BAG84558.2|）from *Oncorhynchus masou formosanus*（樱花钩吻鲑）；TRY1_SALSA（emb|CAA49680.1|），TRY2_SALSA（emb|CAA49678.1|），TRY3_SALSA（emb|CAA49679.1|）from *Salmo salar*（大西洋鲑）
TTF-TRY	TRYA1_PETMA（gb|AAB65411.1|），TRYA2_PETMA（gb|AAB69654.1|），TRYA3_PETMA（gb|AAB69655.1），TRYB1_PETMA（gb|AAB69656.1|），TRYB2_PETMA（gb|AAB69657.1|）from *Petromyzon marinus*（海七鳃鳗）；TRYP_SQUAC（sp|P00764|）from *Squalus acanthias*（白斑角鲨）；TRY_ANGJA（dbj|BAI59110.1|）from *Anguilla japonica*（日本鳗鲡）；TRY_ORYLA（ref	NP_001098370.1 |）from *Oryzias latipes*（青鳉）；TRY_DANRE（gb| AAO16212.1|）from *Danio rerio*（斑马鱼）；TRY1_ICTFU（gb|ADO28356.1|），TRY2_ICTFU（gb|ADO28894.1|），TRY3_ICTFU（ref|NP_001187619.1|）from *Ictalurus furcatus*（蓝叉尾鮰）；TRYI_ENGJA（dbj|BAB40329.1|），TRYII_ENGJA（dbj|BAB40330.1|）from *Engraulis japonicus*（日本鳀鱼）；TRY1a_EPICO（gb|ADZ76523.1|）from *Epinephelus coioides*（斜带石斑鱼）；TRY_SINCH（gb|ACH53602.1|）from *Siniperca chuati*（鳜鱼）；TRY1_PAROL（dbj|BAA82362.1|）from *Paralichthys olivaceus*（褐牙鲆）；TRY2_SOLSE（dbj|BAF76144.1|）from *Solea senegalensis*（塞内加尔鳎）；TRY2_TAKOB（gb	ACT15362.1 |）from *Takifugu obscurus*（暗纹东方鲀）；TRY1_TAKRU（gb| AAU06120.1|），TRY2_TAKRU（gb	AAU06121.1 |），TRY3_TAKRU（gb	AAA75001.1 |）from *Takifugu rubripes*（红鳍东方鲀）
HV-TRY	TRY1_XENLA（sp|P19799|）from *Xenopus laevis*（非洲爪蟾）；TRY1_XENTR（ref|NP_001011204.1|），TRY3_XENTR（ref|XP_002941080.1|），TRY10_XENTR（ref|NP_001011209.1|）from *Xenopus tropicalis*（热带爪蟾）；TRY1_CHICK（sp|Q90627|），TRY2_CHICK（sp|Q90628|），TRY3_CHICK（sp|Q90629|）from *Gallus gallus*（家鸡）；TRY_MONDO（refXP_001362475.1）from *Monodelphis domestica*（灰色短尾负鼠）；TRY_ORYCU（ref	XP_002721891.1|）from *Oryctolagus cuniculus*（穴兔）；TRY2_MOUSE（sp|P07146|），TRY3_MOUSE（gb|AAI41305.1|），TRY4_MOUSE（gb|AAH61135.1|），TRY10_MOUSE（ref|XP_489832.1|），TRY10A_MOUSE（ref|XP_489834.1|），TRY12_MOUSE（ref|XP_489833.1|），TRY16_MOUSE（gb|AAH94921.1|）from *Mus musculus*（小家鼠）；TRY1_RAT（sp|P00762|），TRY3_RAT（sp|P08426|），TRY4_RAT（sp|P12788|），TRYX_RAT（ref|NP_001004097.1|）from *Rattus norvegicus*（挪威大鼠）；TRY2_BOSTA（emb|CAA38513.1|）from *Bos Taurus*（黄牛）；TRY2_CANFA（sp|P06872|）from *Canis familiaris*（家狗）；TRY_EQUCA（ref|XP_001489596.2|）from *Equus caballus*（马）；TRYP_PIG（sp|P00761|）from *Sus scrofa*（野猪）；TRY1_HUMAN（gb|AAI28227.1|），RY2_HUMAN（sp|P07478|），TRY3_HUMAN（pir‖S12764|），TRY4_HUMAN（emb|CAA50484.1|from *Homo sapiens*（人）

表 2 不同类群动物胰蛋白酶氨基酸组成比较（%）

Tab. 2 Amino acid composition comparation of trypsins from different group animals (%)

组别	I-TRY	TTC-TRY	CAF-TRY	TTF-TRY	HV-TRY
AmAA	230.00±4.00	232.00±7.00	224.00±2.00	223.00±2.00	223.00±1.00
PAA	60.66±2.04	60.80±1.57	62.37±3.38	62.52±3.17	61.52±1.76
CAA	17.07±5.20	19.71±2.29	16.21±1.79	16.67±2.82	16.05±3.15
AcAA	8.02±3.93	12.64±1.31	8.27±1.41	8.13±1.93	7.96±2.14
BAA	6.81±1.63	4.29±1.48	5.23±1.36	5.86±1.65	6.09±1.41
UPAA	43.59±12.22	41.08±8.12	46.16±7.04	45.85±8.77	45.47±7.15
HAA	34.59±1.81	33.21±1.32	29.93±2.45	29.81±2.13	32.64±1.60
ArAA	8.25±0.95	9.17±1.17	9.46±1.21	9.16±1.63	8.24±1.00
Cys	2.86±0.36	3.69±0.59	5.30±0.28	5.37±0.05	5.18±0.45
Asp	4.46±1.67	7.14±1.18	4.17±0.94	4.29±1.16	4.17±1.08
Glu	3.56±2.45	5.50±0.76	4.09±1.04	3.84±1.09	3.79±1.48
Arg	4.80±2.02	1.18±0.97	2.17±0.90	2.99±1.06	2.11±0.63
His	2.25±0.78	2.78±0.64	2.72±0.83	2.68±0.73	2.01±0.64
Tyr	3.73±1.14	3.92±1.12	5.70±0.64	5.14±0.82	4.44±0.89
Ala	9.02±1.63	7.25±1.50	5.79±1.09	5.76±1.15	6.60±1.12
Ile	5.81±2.02	6.28±0.80	4.84±0.88	5.82±1.35	6.65±0.95
Leu	5.68±1.03	5.60±1.65	7.11±1.34	6.37±0.84	7.72±0.81
Val	9.56±1.69	8.83±0.98	8.43±0.90	7.85±0.62	7.86±0.74
Phe	2.26±0.94	3.57±1.03	1.71±0.36	1.73±0.77	1.84±0.77
Pro	3.60±1.10	4.89±0.70	4.91±1.44	5.00±1.01	4.79±0.72
Met	1.15±0.60	1.07±0.40	2.79±1.06	2.66±0.90	1.04±0.42

注：PAA 包括 Cys，Asp，Glu，Gly，His，Lys，Asn，Gln，Arg，Ser，Thr，Tyr；CAA 包括 Asp，Glu，His，Lys，Arg；AcAA 包括 Asp，Glu；BAA 包括 Lys，Arg；UPAA 包括 Cys，Gly，Asn，Gln，Ser，Thr，Tyr；HAA 包括 Ala，Ile，Leu，Val，Phe，Trp；ArAA 包括 Phe，Trp，Tyr

ArAA 含量（9.17%）与 CAF-TRY（9.46%），TTF-TRY（9.16%）相近，略高于 I-TRY（8.25%）及 HV-TRY（8.24%）.

PAA 中，TTC-TRY 的 Asp（7.14%）和 Glu（5.50%）含量高于其他 4 组动物胰蛋白酶。TTC-TRY 的 Arg 含量（1.18%）低于其他 4 组动物胰蛋白酶，其中 I-TRY 含量（4.80%）最高。TTC-TRY 的 Cys 含量（3.69%）高于 I-TRY（2.86%），低于 CAF-TRY（5.30%），TTF-TRY（5.37%）和 HV-TRY（5.18%）. TTC-TRY 的 His 含量（2.68%）与 CAF-TRY（2.72%），TTF-TRY（2.68%）相近，略高于 I-TRY（2.72%）及 HV-TRY（2.68%）. TTC-TRY 的 Lys 含量（3.92%）略高于 I-TRY（3.73%），而低于 CAF-TRY（5.70%），TTF-TRY（5.14%）和 HV-TRY（4.44%）.

UPAA 中，TTC-TRY 的 Ala 含量（7.25%）高于 CAF-TRY（5.79%），TTF-TRY（5.76%）和 HV-TRY（6.60%），而低于 I-TRY（9.02%）. TTC-TRY 的异亮氨酸（Ile）含量（6.28%）与 I-TRY（5.81%），TTF-TRY（5.82%）和 HV-TRY（6.65%）相近，均高于 CAF-TRY（4.84%）. TTC-TRY 的亮氨酸（Leu）含量（5.60%）最低，HV-TRY（7.72%）最高。TTC-TRY 的 Val 含量（8.83%）与 TTC-TRY 相近（8.43%），高于 CAF-TRY（7.85%）和 HV-TRY（7.86%），I-TRY 的 Val 含量（9.56%）最高。TTC-TRY 的苯丙氨酸（Phe）含量（3.57%）高于其他 4 组动物胰蛋白酶。TTC-TRY 的 Pro 含量（4.89%）与 CAF-TRY（4.91%），TTF-TRY（5.00%）和 HV-TRY（4.79%）相近，高于 I-TRY（3.60%）. TTC-TRY 的 Met 含量（1.07%）与 I-TRY（1.15%）和 HV-TRY（1.04%）相近，低于 CAF-TRY（2.79%）和 TTF-TRY（2.66%）.

2.2 胰蛋白酶结构特征比较

2.2.1 各组动物胰蛋白酶结构保守性

根据 KABSCH 等[7]的方法，胰蛋白酶蛋白序列片段包括：N-末端（N terminal，NT），N-末端环（N terminal loop，NTL），Nβ1，Nβ1-Nβ2，Nβ2，Nβ2-Nβ3，Nβ3，Nβ3-Nβ4 环，Nβ4，钙结合环（calcium binding loop，CBL），Nβ5，Nβ5- Nβ6 环，Nβ6，域间环（inter-domain loop，IL），Cβ1，自溶

环（autolysis loop，AL），Cβ2，Cβ2- Cα1，Cα1 螺旋，Cα1- Cβ3 环，Cβ3，C-末端环 1（loop 1，L1），底物结合域 1（specificity pocket 1，SP1），Cβ4，Cβ4- Cβ5，Cβ5，底物结合域 2（specificity pocket 2，SP2），C-末端环 2（loop 2，L2），Cβ6，Cβ6-Cα2 和 Cα2 螺旋等二、三级结构。

各组动物胰蛋白酶共选取 30 条序列进行序列比对分析，结果如图 1 所示。由图 1 可知：各动物胰

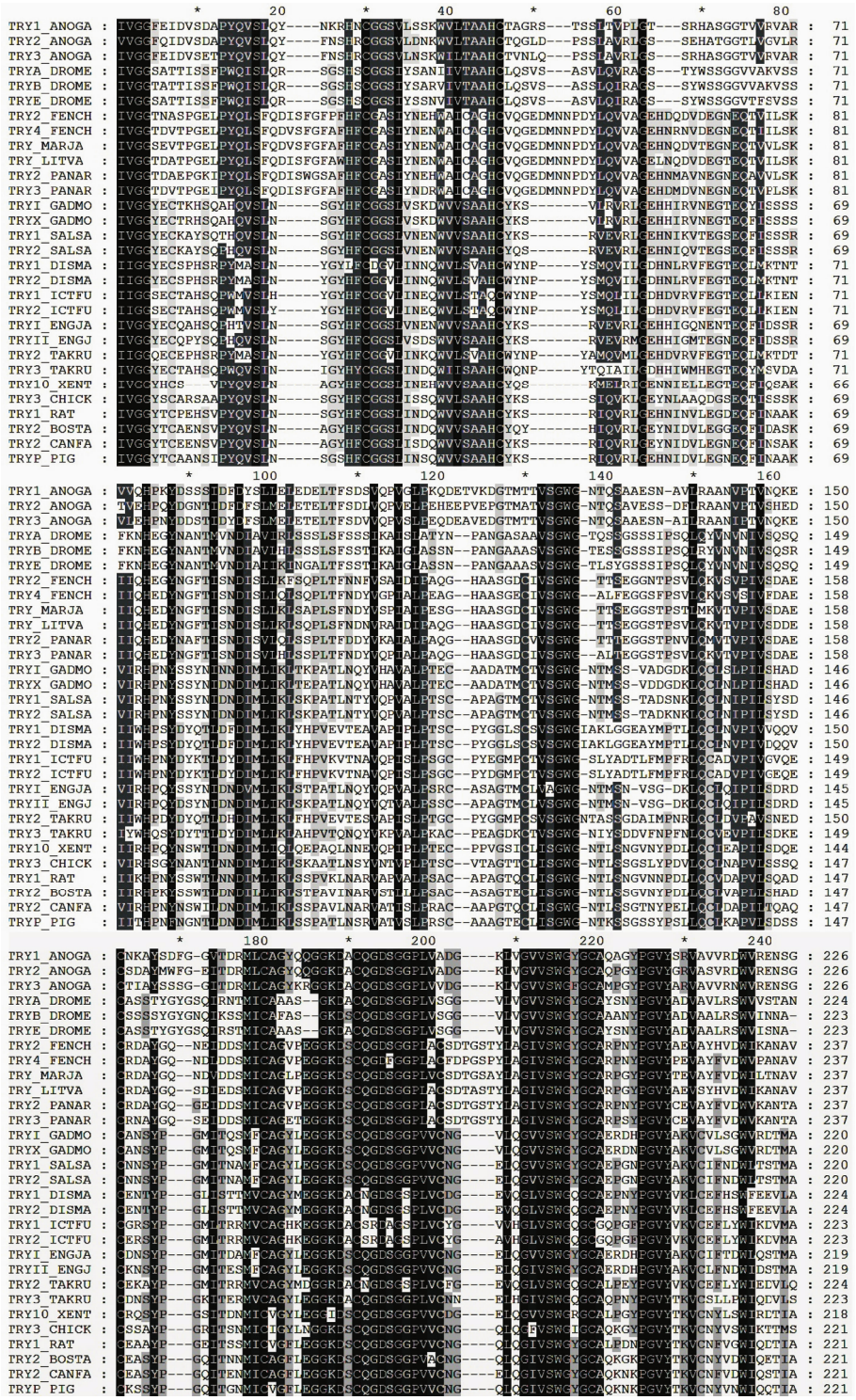


图 1 各组动物胰蛋白酶序列比对

Fig. 1 Comparison of trypsin sequences from different group animals

蛋白酶序列中，NT（$Ile_1Val_2Gly_3Gly_4$），Nβ1（Ser_{17}），Nβ2（His_{28}，$Cys_{30}Gly_{31}$），Nβ3（Trp_{39}），Nβ3-Nβ4 环（$His_{45}Cys_{46}$），CBL（Gly_{63}），Nβ5-Nβ6 环（His_{85}，Tyr_{88}，Asp_{96}），Cβ1（$Ser_{133}Gly_{134}$），AL（$Trp_{135}Gly_{136}$），Cβ2（Leu_{150}），Cα1 螺旋（Cys_{163}），Cα1-Cβ3 环（$Tyr_{167/168}$），Cβ3（Met_{178}，Cys_{180}，Ala_{181}），SP1（$Gly_{187}Lys_{188}Asp_{189}Cys_{191}$，$Asp_{194}Ser_{195}Gly_{196}$），Cβ4（$Pro_{198}$），Cβ5（$Gly_{211}$，$Ser_{214}Trp_{215}$），SP2（$Gly_{216}$, Gly_{218}，Cys_{219}，Ala_{220}），C-末端环 2（Pro_{225}），Cβ6（$Gly_{226}Val_{227}Tyr_{228}$），Cα2（$Trp_{237}$）共约 45 个氨基酸序列在绝大多数胰蛋白酶中保守。

由此可见，各组动物胰蛋白酶接触反应三联体（His_{45}-Asp_{96}-Ser_{195}）、底物结合位点 Asp_{189}（SP1）、盐键形成位点 Asp_{194}（SP1）、胰蛋白酶决定子 $Tyr_{167/168}$（Cα1-Cβ3 环）比较保守；二硫键形成位点 Cys_{30}（Nβ2），Cys_{46}（Nβ3-Nβ4 环），Cys_{130}（Cβ1，I-TRY 缺失），Cys_{163}（Cα1 螺旋），Cys_{180}（Cβ3），Cys_{191}（Cα1 螺旋），Cys_{201}（Cβ4，I-TRY 缺失），Cys_{219}（SP2）也较保守，形成 4 个二硫键（I-TRY 只有 3 个）。

此外，各动物胰蛋白酶序列中，包含 Nβ2（$Val/Ile/Leu_{34}$），Nβ3（$Val/Ile/Ala_{40}Leu/Val/Ile_{41}$），Nβ5-Nβ6 环（$Ile/Leu_{93}$），Nβ6（$Ile/Val/Leu_{99}$，$Leu/Ile_{100}$），IL（$Val/Ile_{112}$，$Val/Ile/Leu_{115}$，$Ile/Leu_{118}$），Cβ1（$Val/Ile_{132}$），Cα1 螺旋（$Val/Leu_{158}$），Cβ3（$Val/Ile/Leu_{174}$），Cβ4（$Leu/Val_{200}$），Cβ5（$Leu/Val_{209}$，$Val/Ile/Leu_{212}Val/Ile_{213}$），Cβ6-Cα2（$Val/Leu_{231}$），Cα2（$Val/Ile/Leu_{238}$）共约有 18 个位点，以 Val/Ile/Leu 形式的相对保守。

2.2.2 各组动物胰蛋白酶主要结构差异位点

各组动物胰蛋白酶间氨基酸序列不同的主要位点如表 3 所示。

表 3 各组动物胰蛋白酶间氨基酸序列不同的主要位点

Tab. 3 Different amino acid sequence sites of trypsin from different group animals

组别	I-TRY	TTC-TRY	CAF-TRY	TTF-TRY	HV-TRY
NTL（7）	Ile/Thr	Val/Ala	Cys	Cys	Cys
NTL（10）	Ser	Gly	His/Tyr	His/Tyr	Gln/Ser/His
NTL（11）	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser
Nβ2（35）	Leu	Tyr	Val	Ile	Ile
Nβ3（40）	Ile/Val	Ala	Val	Val	Ile/Val
Nβ3（42）	Thr	Cys	Ser	Ser	Ser
Nβ3-Nβ 环（47）	Ile/Leu/Thr	Val	Tyr	Tyr	Tyr
Nβ4（61）	Arg	Val	Arg	Arg	Arg
Nβ4（62）	Leu/Val	Ala	Leu	Leu	Leu
CBL（65）	—	His	His	His	His
CBL（69）	Ala/Ser	Val	Val	Val	Val
Nβ5- Nβ6 环（86）	Pro/Glu	Glu	Pro	Pro	Pro
IL（105）	Glu/Ser	Pro	Pro	Pro	Pro
Cβ1（130）	Gly/Thr/Ala	Cys	Cys	Cys	Cys
Cβ2（152）	Ala/Tyr	Lys/Met	Cys	Cys	Cys
Cα1（165）	Ser	Asp	Asn	Asn	Asn/Ser
Cα1（169）	—	Gly	Pro	Pro	Pro
Cα1-Cβ3 环（175）	Thr	Asp/Glu	Ser/Thr	Thr	Thr
L1（183）	Tyr	Leu/Val	Tyr	Tyr	Tyr
Cβ4（201）	Ser/Ala/Val	Cys	Cys	Cys	Cys
Cβ4（203）	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly
L2（221）	Gln	Arg	Glu/Gln	Glu/Gln	Glu/Gln
Cβ6（230）	Arg/Asp	Glu	Lys	Lys	Lys
Cβ6-Cα2（232）	Ala	Ala	Cys	Cys	Cys
C-末端（242）	Ala/Thr	Ala/Ser	Met	Met	Met

Arg：在胰蛋白酶结构外周的 Nβ4 区间 61 位点，其他 4 组动物胰蛋白酶比 TTC-TRY 多一个 Arg. 在位于胰蛋白酶 SP2 附近的环 2 区间 221 位点，TTC-TRY 比 I-TRY 多一个 Arg；Cβ6 区间 230 位点，部分 I-TRY 比其他动物胰蛋白酶多一个 Arg.

Asp 和 Glu：在胰蛋白酶结构外周的 NT 环区间 11 位点和 Nβ5-Nβ6 环区间的 86 位点，I-TRY 和 TTC-TRY 较脊椎动物胰蛋白酶多 2 个 Asp 或 Glu；在胰蛋白酶底物结合域附近的 Cβ6 区间 230 位点，TTC-TRY 和部分 I-TRY 较脊椎动物胰蛋白酶多 1 个 Asp；在胰蛋白酶结构外周 Cα1 区间的 165 位点和底物结合域附近 Cβ4 区间的 203 位点，TTC-TRY 分别较其他动物胰蛋白酶多 1 个 Asp.

His：TTC-TRY，CAF-TRY 和 TTF-TRY 的 CBL 区间 65 位点均为 His，I-TRY 为丝氨酸(Ser)，而 HV-TRY 则部分为 His，部分为 Lys 和谷氨酰胺（Gln）。CAF-TRY 和 TTF-TRY 的 NTL(10)大部分为 His. 此外，部分 CAF-TRY（如 TRYI_GADMO，TRYX_GADMO）和 TTF-TRY（如 TRYI_ENGJA，TRYII_ENGJA，TRY3_TAKRU）外周的 CBL(66）为 His；部分 CAF-TRY（如 TRYI_GADMO，TRYX_GADMO）和 HV-TRY（TRY2_BOSTA）SP1 附近的 Cα1 区间（160）为 His.

Cys：脊椎动物胰蛋白酶外周 NTL 区间 7 位点、Cβ2 区间 152 位点和 Cβ6-Cα2 区间 232 位点，均为 Cys；TTC-TRY 的 Nβ3 区间 42 位点为 Cys；除 I-TRY 外，其他动物胰蛋白酶 Cβ1 区间 130 位点和 Cβ4 区间 201 位点均为 Cys.

Ala：IL 区间（103～128），部分 I-TRY 有 6 个 Ala，TTC-TRY 有 3～5 个 Ala，CAF-TRY 有 4～6 个 Ala，TTF-TRY 有 1～4 个 Ala，HV-TRY 有 1～6 个 Ala. 部分 CAF-TRY（如 TRYI_GADMO，TRYX_GADMO）和 HV-TRY（如 TRY2_BOSTA）SP1 附近的 Cα1 区间（161）、Cα1- Cβ3 环区间（164）为 Ala；部分 TTF-TRY（如 TRY2_TAKRU）SP1 附近的 Cα1-Cβ3 环区间（166）为 Ala；部分 CAF-TRY（如 TRY1_SALSA，TRY2_SALSA）和 TTF-TRY（如 TRYI_ENGJA）SP1 附近的 L1 区间（177）为 Ala；部分 CAF-TRY（如 TRY1_DISMA，TRY2_DISMA）和 TTF-TRY（如 TRY2_TAKRU，TRY3_TAKRU）SP1 附近的 Cβ4（190）为 Ala. 此外，部分 CAF-TRY（如 TRY1_DISMA，TRY2_DISMA）和 TTF-TRY（如 TRY1_ICTFU，TRY2_ICTFU，TRY3_TAKRU）外周的 Nβ1 区间（61）为 Ile；部分 CAF-TRY（TRY1_DISMA，TRY2_DISMA）SP1 附近的 Cα1 区间（162）为 Val.

Pro：胰蛋白酶 2 个结构域外周，Nβ5-Nβ6 环区间 85 位点和 Cα1 区间 168 位点，脊椎动物胰蛋白酶为 Pro. TTC-TRY 和脊椎动物胰蛋白酶 IL 区间 105 位点为 Pro，有的在 IL 区间 103，114，116，124，125 位点有 1～4 个 Pro.

Met：在胰蛋白酶外周的 Cα2 区间 242 位点，CAF-TRY 和 TTF-TRY 均为 Met；部分 CAF-TRY（TRYY_GADMO）和 TTF-TRY（TRY2_TAKRU）外周的 Nβ1 区间（58）为 Met；部分 CAF-TRY（如 TRYI_GADMO，TRYX_GADMO，TRY3_DISMA）和 TTF-TRY（如 TRYI_ENGJA，TRYII_ENGJA）SP1 附近的 Cβ1 区间（129）和 AL 区间（140）为 Met；部分 CAF-TRY（如 TRY1_DISMA，TRY2_DISMA）和 TTF-TRY（如 TRY1_ICTFU，TRY2_ICTFU，TRY2_TAKRU）SP1 附近的 Cβ2 区间（146）为 Met；部分 CAF-TRY（TRYI_GADMO，TRYX_GADMO，TRY1_SALSA，TRY2_SALSA）和 TTF-TRY（TRY1_ICTFU，TRY2_ICTFU，TRYI_ENGJA，TRYII_ENGJA，TRY2_TAKRU）SP1 附近的 Cβ3（173）为 Met. 部分 CAF-TRY（如 TRY1_DISMA，TRY2_DISMA）和 TTF-TRY（如 TRY_DANRE，TRY2_TAKRU）SP1（184）为 Met.

2.2.3 各组动物胰蛋白酶高级结构差异

各组动物胰蛋白酶序列通过 Swiss Model 软件所得的建模成功的模板序列名称、模板分子直径与模板序列相似度等结果如表 4 所示。由表 4 可知：I-TRY 主要有 1hj8A（0.100 nm）和 1pq7A（0.080 nm）2 类型高级结构；而 TTC-TRY 只有 2f91A（0.120 nm）一种类型高级结构；CAF-TRY 有 2eekA（0.185 nm）（优势结构），1hj8A（0.100 nm）（优势结构），2zpsA（0.155 nm），1utmA（0.150 nm），

1a0jB（0.170 nm）和 2zprB（0.175 nm）等 6 种结构；TTF-TRY 有 1s83A（0.125 nm）（优势结构），2eekA（0.185 nm），1tgsZ（0.180 nm），1hj8A（0.100 nm）（优势结构），1utmA（0.150 nm），2zprB（0.175 nm），1a0jB（0.170 nm）和 1bitA（0.183 nm）等 8 种结构；HV-TRY 有 1hj8A（0.100 nm）（优势结构），3fp7E（0.146 nm）（优势结构），1tgsZ（0.180 nm），1s83A（0.125 nm）（优势结构）和 3p95A（0.130 nm）（优势结构）等 6 种结构。各组胰蛋白酶优势结构 1pq7A（0.080 nm），2f91A（0.120 nm），1hj8A（0.100 nm）和 3fp7E（0.146 nm）模型如图 2 所示。

表 4 各组动物胰蛋白酶同源蛋白建模结果

Tab. 4 Homologous protein modeling results of trypsins from different group animals

动物类群	比对序列	建模模板	模板直径/nm	与模板序列相似度/%
I-TRY	TRY5_AEDAE，TRY1_ANOGA，TRY2_ANOGA，TRY3_ANOGA，TRY4_ANOGA，TRY5_ANOGA，TRY6_ANOGA，TRY7_ANOGA，TRY3_AEDAE，TRYA_DROME，TRYB_DROME，TRYE_DROME，TRYDG_DROME，TRYT_DROME，TRYU_DROME，TRYZ_DROME，TRY_BOMMO，TRYP_CHOFU，TRYA_MANSE，TRYB_MANSE，TRYC_MANSE，TRY1_HELAR，TRY2_HELAR，TRY3_HELAR，TRY4_HELAR，TRY3_GLYDO	1pq7A	0.080	33.33～45.61
TTC-TRY	TRY1a_LEPSA，TRY1b_LEPSA，TRY1c_LEPSA，TRY1_LEPSA，TRY2_LEPSA，TRY3_LEPSA，TRY4_LEPSA，TRY5_LEPSA，TRY6_LEPSA，TRY_DAPPU，TRY1_FENCH，TRY2_FENCH，TRY3_FENCH，TRY4_FENCH，TRY_MARJA，TRY_LITVA，TRYP_ASTFL，TRY_PACLE，TRY_PONLE，TRY1a_PANAR，TRY1b_PANAR，TRY2_PANAR，TRY3_PANAR，TRY_PORPE	2f91A	0.120	36.78～99.58
CAF-TRY	TRY_BORSA，TRYI_GADMO，TRYX_GADMO	2eekA	0.185	64.29～100
	TRYY_GADMO，TRY1_DISMA，TRY2_DISMA，TRY1_SALSA，TRY2_SALSA	1hj8A	0.100	46.22～99.55
	TRY3_DISMA	2zpsA	0.155	87.78
	TRY_PARMA	1utmA	0.150	88.29
	TRY3_SALSA	1a0jB	0.170	100
	TRY_ONCCH	2zprB	0.175	99.55
TTF-TRY	TRYA1_PETMA，TRYA2_PETMA，TRYA3_PETMA，TRYB1_PETMA，TRYB2_PETMA	1s83A	0.125	70.22～71.11
	TRYP_SQUAC	2eekA	0.185	66.82
	TRY_DANRE	1tgsZ	0.180	75.47
	TRY_ANGJA，TRY1_ICTFU，TRY2_ICTFU，TRY3_ICTFU，TRY1_PAROL，TRY2_TAKRU，TRY3_TAKRU	1hj8A	0.100	50.00～86.94
	TRY_ORYLA，TRY1a_EPICO	1utmA	0.150	83.71～90.09
	TRYI_ENGJA，TRYII_ENGJA	2zprB	0.175	84.62～94.55
	TRY_SINCH，TRY2_SOLSE，TRY2_TAKOB	1a0jB	0.170	82.96～88.34
	TRY1_TAKRU	1bitA	0.183	88.74
HV-TRY	TRY1_XENLA，TRY1_XENTR，TRY3_XENTR	1hj8A	0.100	51.98～75.34
	TRY10_XENTR，TRY3_CHICK，TRY_MONDO，TRY_ORYCU，TRY2_MOUSE，TRY3_MOUSE，TRY4_MOUSE，TRY10_MOUSE，TRY10A_MOUSE，TRY12_MOUSE，TRY16_MOUSE，TRY1_RAT，TRYX_RAT，TRY2_BOSTA	3fp7E	0.146	68.61～97.31
	TRY1_CHICK，TRY2_CHICK	1tgsZ	0.180	74.67～75.11
	TRY3_RAT，TRY2_CANFA，TRYP_PIG	1s83A	0.125	82.51～100
	TRY1_HUMAN，TRY2_HUMAN，TRY3_HUMAN，TRY4_HUMAN，TRY_EQUCA	3p95A	0.130	82.14～99.11

相对于节肢动物，脊椎动物胰蛋白酶结构呈现多样化发展。其中，CAF-TRY 和 TTF-TRY 有 2eekA（0.185 nm），1hj8A（0.100 nm），1utmA（0.150 nm），1a0jB（0.170 nm）和 2zprB（0.175 nm）等 5 种共同结构；CAF-TRY 和 HV-TRY 有 1s83A（0.125 nm）和 1hj8A（0.100 nm）2 种共同结构；

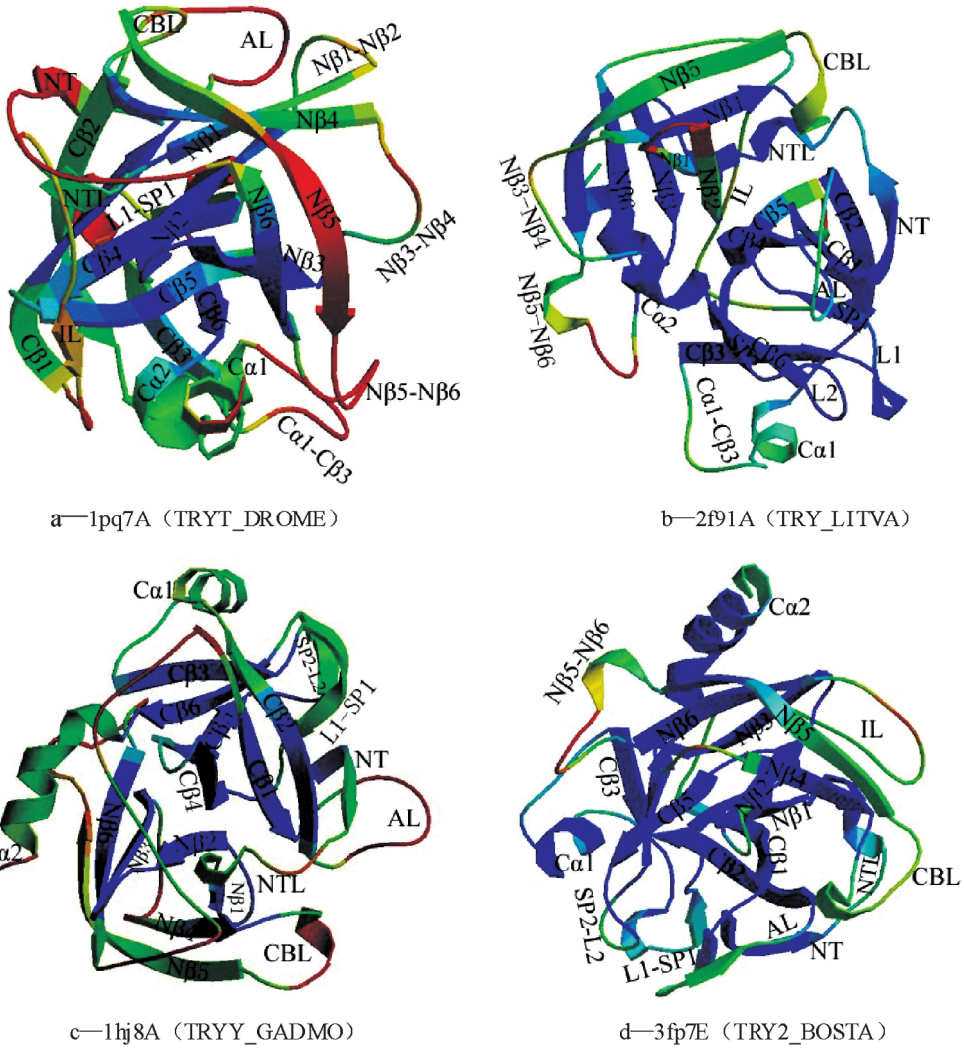


图 2 各组动物胰蛋白酶优势结构模型

Fig. 2 Major structure models of trypsins from different group animals

TTF-TRY 和 HV-TRY 有 1hj8A（0.100 nm）和 1tgsZ（0.180 nm）2 种共同结构；CAF-TRY，TTF-TRY 和 HV-TRY 有 1hj8A（0.100 nm）1 种共同结构，但是 HV-TRY 只有 1 种胰蛋白酶有这一结构。

2.3 动力学参数比较

目前，国内外学者对东亚飞蝗（*Locusta migratoria*）、美洲蟑螂（*Periplaneta americana*）、南极大磷虾（*Euphausia superba*）、日本新糠虾（*Neomysis japonica*）、太平洋磷虾（*Euphausia pacifica*）、凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）、东方扇虾（*Thenus orientalis*）、虹鳟鱼（*Oncorhynchus mykiss*）、大麻哈鱼（*Oncorhynchus keta*）、大西洋鳕鱼（*Gadus morhua*）、日本鳀鱼（*Engraulis japonica*）、远东拟沙丁鱼（*Sardinops melanostictus*）、蓝尖尾无须（*Macruronus novaezelandiae*）、菱形连鳍银鲈（*Diapterus rhombeus*）、短尾大眼鲷（*Pricanthus macracanthus*）、画眉笛鲷（*Lutjanus vitta*）、灰色扳机鱼（*Balistes capriscus*）、猪（*Sus scrofa domestica*）、牛（*Bos tarurs*）的胰蛋白酶的动力学参数 K_m，K_{cat}和催化效率（K_{cat}/K_m）值进行了研究，结果如表 5 所示。

表 5　各种动物胰蛋白酶动力学参数比较

Tab. 5　Comparison of kinetic parameter compsition of trypsins from different animals

胰蛋白酶来源	pH 值	温度/℃	K_m/(mmol/L)	K_{cat}/S^{-1}	K_{cat}/K_m/($mmol^{-1}\cdot L\cdot S^{-1}$)	生境
东亚飞蝗[4]TRY 1	8.0	25	0.470	—	—	温带
东亚飞蝗[4] TRY 2	8.0	25	0.260	—	—	温带
美洲蟑螂[8]	8.5	35	0.120	1.300	10.83	温带
南极大磷虾[9]TRY II	8.0	35	0.040	0.740	18.50	寒带
南极大磷虾[9]TRY III	8.0	35	0.040	0.450	11.30	寒带
日本新糠虾[10]	8.0	35	0.180	1.490	8.34	温带
太平洋磷虾[5]TRY I	8.0	35	0.088	0.840	9.54	温带
太平洋磷虾[5]TRY II	8.0	35	0.064	0.980	15.30	温带
凡纳滨对虾[11]	8.0	35	0.690	0.330	4.78	温热带
东方扇虾[12]	8.0	37	0.093	0.910	9.70	温热带
虹鳟鱼[13]	8.2	20	0.029	3.280	42.60	寒带
大麻哈鱼[14]	8.1	25	0.029	2.290	79.03	寒带
大麻哈鱼[15]ST-1	8.1	25	0.030	4.060	135.00	寒带
大麻哈鱼[15]ST-2	8.1	25	0.040	5.540	139.00	寒带
大麻哈鱼[15]ST-3	8.1	25	0.020	2.000	100.00	寒带
大麻哈鱼[15]ST-1	8.1	35	0.070	7.700	110.00	寒带
大麻哈鱼[15]ST-2	8.1	35	0.050	6.740	135.00	寒带
大麻哈鱼[15]ST-3	8.1	35	0.040	3.860	96.50	寒带
大西洋鳕鱼[16]	8.0	25	0.034	3.440	101.20	寒带
日本鳀鱼[17]	8.0	30	0.059	1.840	31.20	温带
远东拟沙丁鱼[18]	8.0	30	0.051	2.120	41.00	温带
蓝尖尾无须鳕[19]	8.0	25	0.060	0.330	5.50	温带
菱形连鳍银鲈[20]	8.0	25	0.266	0.930	3.48	温带
画眉笛鲷[21]	8.0	30	0.507	4.710	9.29	温带
短尾大眼鲷[22]	8.5	30	0.310	1.060	3.42	温热带
灰色扳机鱼[23]	10.5	25	0.068	2.760	40.59	亚热带
猪[15]	8.1	25	0.260	0.940	3.62	温带
猪[15]	8.1	35	0.440	2.430	5.52	温带
牛[13]	8.2	20	0.455	1.630	3.60	温带
牛[14]	8.1	25	0.261	0.938	3.59	温带

注：表中数据均以 BApNA（N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide）为底物

由表 5 可知：在 35℃条件下，温热带甲壳动物如日本新糠虾（0.180）、太平洋磷虾（0.640）胰蛋白酶 K_m 高于寒带南极大磷虾胰蛋白酶（0.040），而低于温热带的凡纳滨对虾（0.690）和东方扇虾（0.093）胰蛋白酶。尽管日本新糠虾（1.490）、太平洋磷虾（0.840 和 0.980）、东方扇虾（0.910）胰蛋白酶 K_{cat}高于南极大磷虾胰蛋白酶（0.740 和 0.450），但 K_m/K_{cat}仍然较低。大部分 TTC-TRY 的 K_m 比东亚飞蝗（0.260～0.470）和猪（0.440）胰蛋白酶低，但是高于冷水性鱼类大麻哈鱼（0.040～0.070）和大西洋鳕鱼（0.034）胰蛋白酶；K_{cat}低于大麻哈鱼（3.860～7.700）、大西洋鳕鱼（3.440）和猪（2.430）胰蛋白酶，但是 K_m/K_{cat}高于猪（5.520）胰蛋白酶，显著低于大麻哈鱼（96.50～110.00）和大西洋鳕鱼（101.200）胰蛋白酶。美洲蟑螂 K_m（0.120），K_{cat}（1.300）和 K_m/K_{cat}（10.830）与 TTC-TRY 的相近。

在 20～30℃，寒带的冷水性鱼类，如虹鳟鱼（0.029）、大麻哈鱼（0.029，0.030，0.040 和 0.020）、大西洋鳕鱼（0.034）胰蛋白酶的 K_m 略低于温带的日本鳀鱼（0.059）、远东拟沙丁鱼（0.051）、蓝尖尾无须鳕（0.060）、灰色扳机鱼（0.068）胰蛋白酶，显著低于菱形连鳍银鲈（0.266）、画眉笛鲷（0.507）和短尾大眼鲷（0.310）胰蛋白酶，以及如猪（0.260）和牛（0.455 和 0.260）等哺乳动物胰蛋白酶。冷水性鱼类，如大麻哈鱼（4.060 和 5.540）和大西洋鳕鱼（3.440）的胰蛋白酶 K_{cat}比日本鳀鱼（1.840）、远东拟沙丁鱼（2.120）、蓝尖尾无须鳕（0.330）、菱形连鳍银鲈（0.930）、短尾大眼鲷（1.060）和灰色扳机鱼（2.760）胰蛋白酶高 1.3～16.8 倍，比哺乳动物如猪（0.940）和牛（1.630 和 0.938）高

4.3～5.9 倍。因此，冷水性鱼类胰蛋白酶 K_m/K_{cat} 显著高于温热带鱼类和哺乳动物胰蛋白酶。

3 讨论与结论

3.1 不同类群动物胰蛋白酶进化趋势

根据上述结果可知，昆虫、温热带甲壳动物、冷水性鱼类、温热带鱼类以及高等脊椎动物胰蛋白酶在进化过程中产生了不同的进化趋势。总体而言，动物胰蛋白酶氨基酸数目随着进化逐渐减小，不同类群有各自含量较多的氨基酸类型。节肢动物胰蛋白酶分子直径较小，结构单一，但是酶功能多样；脊椎动物胰蛋白酶分子直径较节肢动物的增大，结构多样，但酶功能趋于单一。

3.2 胰蛋白酶结构特征与酶学性质关系

研究表明，Arg 在胰蛋白酶中易与其他氨基酸形成盐键及氢键，使蛋白结构稳定。Ca^{2+} 通过与胰蛋白酶特定位置的 Asp 或 Glu 结合，提高其稳定性及活性。His 具有质子化作用而使蛋白酶容易变性。Cys 能够形成二硫键，使蛋白结构稳定性增加，柔性降低。疏水性氨基酸能增加蛋白酶外部疏水性表面面积，从而使蛋白酶结构稳定，也能减少活性部位内部空间位阻，增加蛋白酶柔性。Pro 自身环结构的特殊性导致其弹性较低，故能增加酶的稳定性而降低活性部位柔性。而 Lys 则可与 Pro 形成碱基堆积，增强蛋白酶稳定性。Met 可能会降低酶的稳定性。在低温条件下，极性基团间相互作用，比如盐键、氢键及芳香基团间作用过程中放热，而疏水作用过程中吸热[6]。在常温条件下则反之。

胰蛋白酶活性部位所有参与催化的氨基酸侧链以及大多数指向催化中心的氨基酸侧链，均严格保守，总的催化机理和反应方式没有改变。

CAF-TRY、部分 TTF-TRY 和 TTC-TRY 催化腔有所变大，底物易于接近和进入，从而酶的底物特异性减弱或者酶对底物的结合变松[24]。这是由于在 CAF-TRY 及部分 TTF-TRY 中，维持蛋白分子稳定的因素减少或减弱，如离子对、芳香族相互作用和氢键的数量减少，HAA 数量减少，而蛋白内部活性中心附近的 His，Met，Ala，Val 数目较多的紧密性降低，降低了结构稳定性，焓变（ΔH）降低，增强了二级结构中链的柔性，熵变（ΔS）降低[25]。这些结构因素的改变，使酶分子的稳定性降低，柔性提高，催化效率提高；同时，酶分子的稳定性降低，使适冷酶对热非常敏感[26]。

因此，由于外周和活性中心部位附近 Arg，Glu，Asp，His，Cys，Ala，Pro，Lys 与 Met 的不同，CAF-TRY，TTF-TRY，TTC-TRY 与 I-TRY，HV-TRY 的稳定性、柔性和反应耗能量差异显著，CAF-TRY，TTF-TRY 和 TTC-TRY 的 K_{cat} 升高而 K_m 降低，催化效率为 CAF-TRY，TTF-TRY＞TTC-TRY＞I-TRY，HV-TRY.

通过定位突变胰蛋白酶基因并表达纯化，或对胰蛋白酶某些氨基酸进行专一性修饰，研究某些氨基酸残基对动物胰蛋白酶酶学性质的影响，可以进一步阐明动物胰蛋白酶结构特征与酶学性质之间的关系，更好地解释各类群动物胰蛋白酶生理生化现象，为开发其在医药、工业及畜牧业的应用提供理论依据。

[参考文献] (References)

[1] GERDAY C, AITTALEB M, BENTAHIR M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology[J]. Trends Biotechnol., 2000, 18(3): 103-107.

[2] FELLER G, GERDAY C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation[J]. Nat. Rev. Microbio., 2003, 1(3): 200-208.

[3] SEEAR P J, TARLING G A, BURNS G, et al. Differential gene expression during the moult cycle of antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 582-594.

[4] LAM W, COAST G M, RAYNE R C. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*[J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 2000, 30(1): 85-94.

[5] WU Z Q, JIANG G L, XIANG P, et al. Purification and characterization of trpsin-like enzymes from *Euphausia pacifica*[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(1): 67-72.

[6] LEIROS H K, WILLASSEN N P, SMALAS A O. Residue determinants and sequence analysis of cold-adapted trypsins[J]. Extremophiles, 1999, 3: 205-219.

[7] KABSCH W, SANDER C. Dictionary of protein dondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features[J]. Biopolymers, 1983, 22: 2577-2637.

[8] LOPES A R, TERRA W R. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (*Dictyoptera*) adults[J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 2003, 33(4): 407-415.

[9] OSNES K K, MOHR V. On the purification and characterization of three anionic serine-type peptide hydrolyses from antarctic krill, *Euphausia superba*[J]. Comp. Biochem. Physiol. B, 1985, 82(4): 607-619.

[10] WU Z Q, JIANG G L. Purification and characterization of trypsin-like enzymes from *Neomysis japonica* using BApNA as substrate[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2008, 14(2): 75-80.

[11] 翁凌，李腾，阴利华，等. 南美白对虾丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究[J]. 集美大学学报：自然科学版，2010，15 (4)：32-38.
WENG L, LI T, YIN L H, et al. Study on isolation, purification and properties of serine protease from *Penaeus vannamei* boone[J]. Jimei University Journal: Natural Science, 2010, 15(4): 32-38. (in Chinese)

[12] JOHNSTON D, HERMANS J M, YELLOWLEES D. Isolation and characterization of a trypsin from the slipper lobster, *Thenus orientalis* (Lund)[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 324(1): 35-40.

[13] KRISTJANSSON M M. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(10): 1738-1742.

[14] SEKIZAKI H, ITOH K, MURAKAMI M, et al. Anionic trypsin from chum salmon activity with p-amidinophenyl ester and comparison with bovine and *Streptomyces griseus* trypsins[J]. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 2000, 127(3): 337-346.

[15] TOYOTA E, IYAGUCHI D, SEKIZAKI H, et al. Kinetic properties of three isoforms of trypsin isolated from the pyloric caeca of chum salmon[J]. Biol. Pharm. Bull., 2007, 30(9): 1648-1652.

[16] STEFANSSON B, HELGADÓTTIR L, OLAFSDOTTIR S, et al. Characterization of cold-adapted atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I-Kinetic parameters, autolysis and thermal stability[J]. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 2010, 155(2): 186-194.

[17] HEU M S, KIM H R, PYEUN J H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*[J]. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 1995, 112(3): 557-567.

[18] CASTILLO-YÁNEZ F J, PACHECO-AGUILAR R, GARCIA-CARRENO F L, et al. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of *Monterey sardine sardinops sagax caerulea*[J]. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 2005, 140(1): 91-98.

[19] SHI C, MARSHALL S N, SIMPSON B K. Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus novaezealandiae*)[J]. Journal of Food Biochemistry, 2007, 31(6): 772-796.

[20] SILVA J F, ESPOSITO T S, MARCUSCHI M, et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*)[J]. Food Chemistry, 2011, 129 (3): 777-782.

[21] KHANTAPHANT S, BENJAKUL S. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*)[J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 658-664.

[22] van HAU P, BENJAKUL S. Purification and characterization of trypsin from *Pyloric caeca* of bigeye snapper (*Pricanthus Macracanthus*)[J]. Journal of Food Biochemistry, 2006, 30(4): 478-495.

[23] JELLOULI K, BOUGATEF A, DAASSI D, et al. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature purification and characterisation[J]. Food Chemistry, 2009, 116 (3): 644-650.

[24] SMALAS A O, LEIROS H K, OS V, et al. Cold adapted enzymes[J]. Biotechnol. Annu. Rev., 2000, 6: 1-57.

[25] WANG S, MAGOULAS C, HICKEY D. Concerted evolution within a trypsin gene cluster in *Drosophila*[J]. Mol. Biol. Evol., 1999, 16(9): 1117-1124.

[26] de VENDITTIS E, CASTELLANO I, COTUGNO R, et al. Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition[J]. J. Theor. Biol., 2008, 250(1): 156-171.