

TỐI ƯU BIỂU HIỆN VÀ TÍNH SẠCH LUMBROKINASE TRONG *PICHIA PASTORIS* X33

Vũ Thị Bích Ngọc, Đỗ Thị Tuyên, Lý Thị Bích Thủy, Quyền Đình Thi

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 07.8.2014

Ngày nhận đăng: 30.8.2014

TÓM TẮT

Lumbrokinase (LK) là một nhóm các enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ giun đất, có khối lượng phân tử ~25-40 kDa. Các enzyme này đã được chứng minh vừa có khả năng thủy phân trực tiếp fibrin, vừa có tác dụng hoạt hóa plasminogen thành plasmin-enzyme thủy phân fibrin của cơ thể. Vì vậy, lumbrokinase hiện nay đã được sử dụng rộng rãi để điều trị bệnh tắc nghẽn mạch. Trong nghiên cứu này, gene mã hóa lumbrokinase từ loài giun *Lumbricus rubellus* (mã số AF304199) trên GeneBank, đã được tối ưu codon và thiết kế bổ sung 1 trình tự có kích thước khoảng 120 bp, để biểu hiện ở *P. pastoris*, sau đó được tạo dòng trong vector pPICZαA và đưa vào hội nhập với bộ gene của tế bào chủ. Các dòng tái tổ hợp được sàng lọc dựa vào khả năng biểu hiện lumbrokinase. Các điều kiện nuôi cấy như môi trường, thời gian và nồng độ chất cảm ứng được khảo sát nhằm thu được hàm lượng và hoạt tính protein tái tổ hợp đạt cao nhất. Protein tái tổ hợp được tinh sạch qua cột resin có gắn nikel, kiểm tra bằng điện di trên SDS-PAGE và thử hoạt tính thủy phân fibrin. Kết quả cho thấy đã biểu hiện và tinh sạch được protein có kích thước khoảng 47 kDa, với hiệu suất tinh sạch 2,54%. Lumbrokinase tái tổ hợp tinh sạch đã được nhận dạng bằng kỹ thuật MALDI-chúng trăn máu não, tăng huyết áp, xơ cứng động mạch (Innerfield, 1960). Nguyên nhân chủ yếu là do xuất hiện cục máu đông gây tắc mạch và cản trở lưu thông máu. Do đó, việc làm tan cục máu đông đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh này. Vào khoảng những năm 1920, các nhà nghiên cứu tại Nhật Bản đã phát hiện được 1 enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ giun đất *Lumbricus rubellus*, bao gồm 6 izozyme được đặt tên chung là lumbrokinase (LK) (Mihara et al., 1991; Nakajima et al., 1993). Về phương diện lâm sàng, LK được xem là thuốc tan huyết khối đặc hiệu, sử dụng làm thuốc uống vì có thể được hấp thu từ ruột vào máu và hoạt hóa hệ thống fibrin nội sinh (Yan et al., 2010). Hiện nay, LK và các sản phẩm có chức năng tương tự đã được thương mại hóa toàn cầu nhưng các sản phẩm đều được tách chiết từ bột giun khô. Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về sản xuất LK tái tổ hợp dùng làm thuốc phòng chống tắc nghẽn mạch máu và những nguyên liệu làm thuốc phần lớn đều phải nhập khẩu. Với các ưu điểm nổi bật, hệ thống biểu hiện *P. pastoris* đã được chúng tôi chọn lựa để nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch, nhằm tiến tới xây dựng được quy trình công nghệ ổn định sản xuất LK tái tổ hợp.

Từ khóa: Biểu hiện, lumbrokinase, *Pichia pastoris* X33, tinh sạch

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật

Chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* X33 chứa vector biểu hiện pPICZαA/LK (X33/pZLK) đã tạo được từ các nghiên cứu trước (Vũ Thị Bích Ngọc et al., 2013).

Môi trường nuôi cấy

BMGY (1% cao nấm men; 2% peptone; 1,34% YNB; 100mM potassium phosphate pH 6,0; 4.10^{-5} biotin; 1% glycerol), BMMY (1% cao nấm men; 2% peptone; 1,34% YNB; 100mM potassium phosphate pH 6,0; 4.10^{-5} biotin; 0,5% methanol), YP (2% peptone; 1% cao nấm men), MMY (YP; 1,34%

YNB; 4.10^{-5} biotin; 0,5% methanol), MM (1,34% YNB; 4.10^{-5} biotin; 0,5% methanol), YPM (YP; 0,5% methanol), YPG (YP; 1% glycerol), YPTM (YPM; 0,01% Triton X 100), YPCTM (YPTM; 1% casaminoacid).

Nuôi cấy hoạt hóa nấm men

Các chủng X33/pZLK từ các ống giống được hoạt hóa lại trên môi trường YPD agar ở 28°C, từ 3-5 ngày.

Sàng lọc các dòng *P. pastoris* X33/ pZLK tái tổ hợp

Chủng tái tổ hợp X33/pZLK được hoạt hóa và tăng sinh trong 5 ml môi trường YPG bổ sung 100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ zeocin, lắc 200 vòng/ phút ở 30°C trong 14-16 giờ. Khi OD đạt từ 2-6, tiếp 2% giống vào 25 ml môi trường YPM, nuôi lắc 200 vòng/ phút ở 30°C . Cảm ứng bằng methanol nồng độ cuối 0,5% sau mỗi 24 giờ nuôi cấy. Sau 96 h cảm ứng, ly tâm thu dịch nuôi cấy và điện di SDS- PAGE để kiểm tra sự biểu hiện LK, đồng thời dịch nuôi cấy được nhỏ trên đĩa fibrin nhân tạo để sàng lọc hoạt tính.

Khảo sát điều kiện nuôi cấy biểu hiện LK tái tổ hợp

Chủng tái tổ hợp X33/pPLK được nuôi lắc để khảo sát các điều kiện biểu hiện rLK như môi trường, thời gian nuôi cấy và nồng độ chất cảm ứng methanol.

Tinh sạch protein tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp LK được tinh sạch qua cột resin có gắn nikel, kiểm tra bằng điện di trên SDS-PAGE và thử hoạt tính thủy phân fibrin trên đĩa fibrin nhân tạo.

Xác định hoạt tính thủy phân fibrin

Hoạt tính enzyme được xác định theo phương pháp đĩa fibrin của Astrup và Mullertz, sử dụng plasmin làm chuẩn (Astrup, Mullertz, 1952).

Phương pháp khối phổ nano LC-MS/MS

Phân tích thành phần peptide qua hệ thống sắc ký lỏng hai chiều

Bằng protein sau khi chạy trên gel polyacrylamid 12,5% được cắt ra, loại thuốc nhuộm và thủy phân bằng trypsin. Các thành phần peptide của dung dịch thủy phân được phân tách qua hệ thống sắc ký lỏng nano hai chiều (Perkins *et al.*, 1999a; Perkins *et al.*, 1999b; Mann *et al.*, 2001; Stensballe, Jensen, 2001; Nøgele *et al.*, 2003) trên cột sắc ký trao đổi cation (SCX) ở chiều thứ nhất và cột ngược pha C18 ở chiều thứ hai. Peptide ra khỏi cột SCX được cô đặc và loại muối trên cột trap C18 trước khi phân tách trên cột RP C18.

Hỗn hợp peptide sau đó được đẩy vào cột ngược pha C18 ID (75 μm x 15 cm). Pha lỏng động A (0,1% formic acid trong nước) và B (85% acetonitrile và 0,1% formic acid). Cột ngược pha C18 được gắn vào đầu đưa mẫu Emmiter Picotip (NewObjective) kết nối với máy khối phổ QSTAR XL (Applied Biosystem, MDX SCIEX, Toronto, Canada) bằng nguồn ESI

Phân tích sắc ký khối phổ ESI MS trên hệ thống khối phổ QSTAR XL

Máy khối phổ QSTAR XL được vận hành ở chế độ IDA (Information Dependence Acquisition) để thực hiện việc chuyển từ quét phổ MS đơn đối với các ion nằm trong dải khối từ 400 đến 1200 sang khối phổ liên tiếp trên 3 precursor có mật độ lớn hơn 15 cao nhất được xác định tự động nhờ phần mềm Analyst QS v1.1 (Applied Biosystems).

Phân tích phổ khối peptide bằng phần mềm Mascot

Phổ khối CID thu được từ LC-MS/MS của tất cả các phân đoạn được phân tích bằng phần mềm MASCOT v1.8, phần mềm có khả năng tìm phân tích dữ liệu phổ MS/MS mạnh và tốc độ cao được phát triển bởi MatrixScience (London, UK). Cơ sở dữ liệu được MASCOT dùng để tìm kiếm là NCBIr, đây là cơ sở dữ liệu các protein không đồng nhất và toàn diện của NCBI. Phần mềm MASCOT và cơ sở dữ liệu NCBIr được cài đặt trên một máy tính HP server Proliant.

Các thông số được đặt cho việc tìm kiếm bằng Mascot như sau: enzyme thủy phân trypsin, với sai số khối lượng peptide $\pm 0,3$ Da, sai số giá trị khối lượng mảnh ion trong MS/MS $\pm 0,3$ Da. Sửa đổi cố định là carbamidomethyl (C). Trạng thái điện tích của peptide precursor được chọn là 2+ (double charge) và 3+ (triple charge). Ngưỡng độ tin cậy được đặt mặc định là 99,5%. Với các thông số như trên thì kết quả sẽ cho các protein có tổng điểm số trên 31.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sàng lọc các dòng *P. pastoris* X33/ pZLK tái tổ hợp

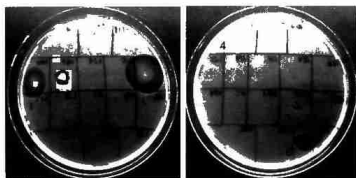
Để kiểm tra kết quả và mức độ biểu hiện rLK, 31 dòng tái tổ hợp có genome mang đoạn chèn (XpZLK) được nuôi biểu hiện trong môi trường YP bổ sung 0,5% methanol sau mỗi 24 giờ. Sau 96 giờ cảm ứng, ly tâm thu dịch nổi và thử hoạt tính trên đĩa fibrin, ủ đĩa 37°C trong 5 giờ và đo vòng hoạt tính.

Kết quả cho thấy 5 dòng biểu hiện có hoạt tính thủy phân fibrin là các dòng số 1, 2, 3, 5 và 6. Khi nhỏ dịch nổi sau biểu hiện 96 h từ các dòng này, trên đĩa fibrin xuất hiện vòng tròn thủy phân trong suốt. Trong khi đó, mẫu đối chứng âm (ĐCA) là dịch nổi của chủng *P. pastoris* X33/ pPIC2αA không chứa gene *lk* và các dòng khác không xuất hiện hoạt tính.

Trong các dòng có hoạt tính, dòng số 3 có hoạt tính cao nhất đạt 2, 47 U/mg (Hình 1). Dòng này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Biểu hiện *P. pastoris* X33/pZLK tái tổ hợp

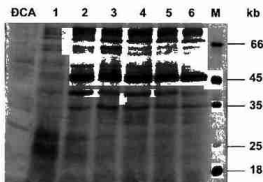
Để kiểm tra chính xác hơn sự tổng hợp protein LK, quan sát kích thước và mức độ biểu hiện của protein LK, mẫu protein ngoại bào thu được từ dịch nuôi cấy các dòng có hoạt tính thủy phân fibrin được biến tính và chạy điện di trên gel polyacrylamide



Hình 1. Đĩa thử hoạt tính thủy phân fibrin của dịch nổi thu từ các dòng *P. pastoris* X33/pZLK tái tổ hợp.

12%. Sau điện di, bản gel được nhuộm bạc để quan sát kết quả.

Kết quả điện di đồ ở hình 2 cho thấy, ở các giếng 2-6, xuất hiện một số băng protein kích thước trong khoảng 35- 50kDa khá đậm, các băng này không xuất hiện ở chủng *P. pastoris*/ pPICZα. Như vậy, có thể protein tái tổ hợp rLK đã được biểu hiện trong nấm men *P. pastoris* X33. Kích thước protein biểu hiện được cao hơn so với tính toán lý thuyết là do protein có thể bị glycosyl hóa bởi quá trình cải biến hậu dịch mã ở nấm men.



Hình 2. Điện di đồ protein ngoại bào thu được từ dịch nuôi cấy chủng nấm men tái tổ hợp. M: Thang protein chuẩn 14,4- 116 kDa, ĐCA *P. pastoris* X33/pPICZα; 2-6: *P. pastoris* X33/pPLK

Lựa chọn các điều kiện biểu hiện LK ở nấm men *P. pastoris* X33

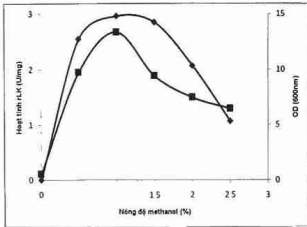
Lựa chọn môi trường biểu hiện

Để khảo sát mức độ biểu hiện rLK trên các môi trường khác nhau, chủng *P. pastoris* tái tổ hợp được nuôi trong các môi trường khác nhau có cảm ứng bằng 0,5% methanol sau mỗi 24 giờ. Sau 96 giờ cảm ứng, dịch nổi được thu nhờ ly tâm 12000 rpm/5 phút. Kết quả kiểm tra hoạt tính thủy phân fibrin cho

thấy môi trường YPTCM thích hợp nhất cho biểu hiện rLK (đạt 0,767 U/ ml) (Bảng 1). Kết quả này khác với kết quả khảo sát điều kiện môi trường biểu hiện rLK của Yan đồng tác giả (2005), các tác giả khi sử dụng 6 loại môi trường tương ứng cho kết quả biểu hiện ở môi trường YPM là cao nhất với hoạt tính dịch nổi đạt $2,5 \cdot 10^6$ U/L sau 96 giờ nuôi cấy (Hu et al., 2005). Như vậy, môi trường YPTCM được chúng tôi lựa chọn sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

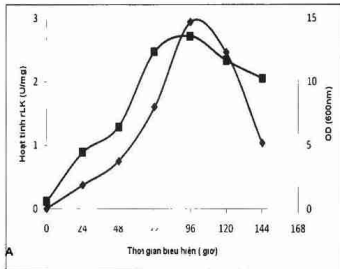
Bảng 1. Hoạt tính rLK ở các môi trường biểu hiện khác nhau.

MT	OD _{600nm}	HT rLK (U/ml)	HL (mg/ml)	protein	HT rLK (U/mg)
BMMY	9,755	0,112± 0,004	0,267± 0,007		0,419± 0,121
MMY	9,575	0,112±0,121	0,211±0,019		0,53± 0,155
MM	6,87	0,1006±0,061	0,178±0,006		0,565± 0,062
YPM	8,725	0,3105±0,045	0,259±0,002		1,198±0,090
YPTM	9,325	0,435±0,016	0,271±0,025		1,605± 0,049
YPTCM	9,64	0,767±0,053	0,289±0,004		2,654± 0,071



A

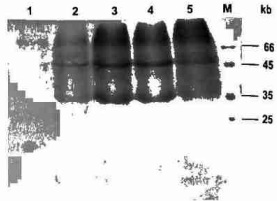
Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ MeOH cảm ứng lên mức độ biểu hiện rLK. A: Hoạt tính rLK (u) và động thái sinh trưởng (n) B: Điện di đồ protein ngoại bào từ dịch nuôi cấy chủng nấm men tái tổ hợp. 1-5 Protein từ dịch ngoại bào của chủng được nuôi ở các nồng độ MeOH: 0; 0,5; 1; 1,5, 2% MeOH, M: Protein chuẩn (Fermentas).



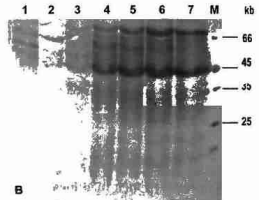
A

Lựa chọn nồng độ methanol

Trong quá trình biểu hiện, methanol được bổ sung với vai trò cảm ứng promoter AOX1 kiểm soát quá trình sinh tổng hợp enzyme. Mức độ biểu hiện rLK khác nhau khi được cảm ứng methanol ở các nồng độ khác nhau. Kết quả khảo sát dải nồng độ methanol từ 0- 2% cho thấy hoạt tính của rLK tăng dần và đạt cực đại khi cảm ứng 1% methanol (2,962 U/mg) sau mỗi 24 giờ. Hoạt tính còn lại 96,14% ở 1,5% methanol (Hình 3).



B



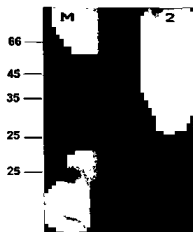
B

Hình 4 rLK được tổng hợp theo thời gian. A: Hoạt tính rLK (◆) và động thái sinh trưởng (■); B: Điện di đồ protein ngoại bào từ dịch nuôi cấy chủng nấm men tái tổ hợp. 1 *P. pastoris* X33/pPICZαA; 2: protein trước cảm ứng; 3-7: protein sau cảm ứng 24, 48, 72, 96, 120 giờ M: Protein chuẩn (Fermentas)

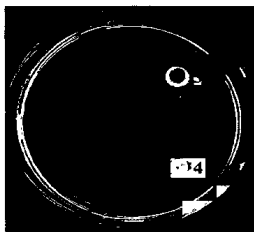
Lựa chọn thời gian biểu hiện

Dịch nuôi biểu hiện theo giờ được xác định sinh khối theo mật độ quang học tại bước sóng 600nm và xác định hoạt tính thủy phân fibrin.

Kết quả hình 4 cho thấy, theo thời gian, sinh khối tế bào và hàm lượng enzyme tái tổ hợp được biểu hiện tăng dần. Tuy nhiên, do giới hạn điều kiện môi trường, các vi sinh vật chỉ phát triển tới 1 mức độ nhất định, đồng thời biểu hiện đạt cực đại ở 1 thời điểm nhất định. Khi nuôi cấy tới 96 giờ, sinh khối và hoạt tính enzyme là cao nhất, đạt 2,94 U/mg. Sinh khối và hoạt tính bắt đầu giảm từ 120 giờ (Hình 4).



Hình 5 Điện di đồ sản phẩm tinh sạch rLK. 1: Dịch nổi chủng *P. pastoris* X33/ pPLK; 2: rLK tinh sạch; M: Protein chuẩn (Fermentas)



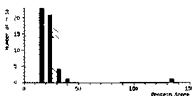
Hình 6. Hoạt tính thủy phân fibrin của rLK (1: rLK tinh sạch 2: plasmin chuẩn 2 U/mg; 3-4 dịch nổi chủng X33/pPIC2aA

(MATRIX SCIENCE) Mascot Search Results

Score: Mascot Daemon
 Search title: Project: Proteomics/Calibration and Peptide Spot Set: Proteomics/Calibration and Peptide/131218 BSA Series, Label: MS
 MS data file: C:\Proteomics Files\Proteomics\Calibration and Peptide\131218 BSA Series\pse_13692389506.pse
 Database: Uniprot/ Q114_porcine_ferment (1993501 sequences 975231628 words)
 Taxonomy: Metazoa (Animalia) (3703983 sequences)
 Timestamp: 30 Jan 2014 at 07:13:29 GMT
 Protein hits: 100% tr|Q114|PorcineFerment 7332 s=1 Tax_id=990 (Eisenia foetida)

Mascot Score Histogram

low score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed matches a random event.
 Individual line scores > 10 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$)
 Protein scores are derived from line scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits



Hình 7 Nhận dạng rLK bằng kỹ thuật MALDI- ToF.

Tinh sạch rLK

Protein tái tổ hợp LK được tinh sạch qua cột resin gắn nikel có kích thước kích thước khoảng 47 kDa (Hình 5) và có hoạt tính thủy phân fibrin.

Để xác định hiệu suất tinh sạch qua cột resin, hàm lượng protein trong các dịch mẫu theo các bước tinh sạch được xác định theo phương pháp Bradford và xác định hoạt tính. Hiệu suất tinh sạch từ *P. pastoris* X33/ pZLK đạt 5,8% với độ sạch 1,236 lần, hoạt tính riêng rLK đạt 3,584 U/mg (Hình 6).

Kết quả nhận dạng rLK bằng kỹ thuật MALDI-TOF

Để xác định chính xác trình tự chuỗi polypeptide

của protein rLK biểu hiện được, sản phẩm rLK sau tinh sạch được nhận dạng trình tự bằng khối phổ MALDI- ToF. Sử dụng cơ sở dữ liệu để phân tích trình tự thu được, kết quả cho thấy protein rLK tinh sạch được có trình tự tương đồng chính xác 100% với trình tự LK từ loài giun đất *Eisenia foetida* đã được đăng kí trình tự trên Genebank với mã hiệu Q3HR18 (Hình 7).

KẾT LUẬN

Biểu hiện và tinh sạch thành công rLK ở nấm men *P. pastoris* X33 với hoạt tính riêng đạt 3,584 U/mg, đồng thời lựa chọn được các điều kiện nuôi cấy biểu hiện như sử dụng môi trường YPTCM, cảm

ứng 1% methanol trong 96 giờ cho hàm lượng protein thu được cao nhất đạt 0,289 mg/ml, với hoạt tính cao nhất đạt 2,94 U/mg. Sản phẩm rLK sau tinh sạch được nhận dạng trình tự bằng khối phổ Maldi-Tof. Kết quả cho thấy protein rLK tinh sạch được có trình tự tương đồng chính xác 100% với trình tự LK từ loài giun đất *Eisenia foetida* đã được đăng kí trình tự trên Genbank với mã hiệu Q3HR18.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với nguồn kinh phí hỗ trợ từ chương trình nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học, Bộ Khoa học và Công nghệ, "Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất lumbrokinase tái tổ hợp làm thuốc phòng chống tác nhân mạch máu". Giai đoạn 2012- 2014.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Astrup T, Mullertz S (1952) The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity Arch Biochem Biophys 40:346-351
- Hu Y, Meng XL, Xu JP, Lu W, Wang J (2005) Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM(246) in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 43:18-25
- Innerfield I (1960) Enzymes in clinical medicine. McGraw- Hill, New York
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annu Rev Biochem 70
- Mihara H, Sumi Y, Yoneta T (1991) A novel fibrinolytic

enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. Jpn J Physiol 41:461-472

Nakajima N, Mihara H, Sumi H (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci Biotechnol Biochem 57:1726-1730

Nogele E, Vollmer M, Hurth P (2003) Two-dimensional nano-liquid chromatography-mass spectrometry system for applications in proteomics. J Chromatography A 1009:197-205

Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999a) Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20:3551-3567

Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999b) Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20:3551-3567

Stensballe A, Jensen ON (2001) Simplified sample preparation method for protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: In gel digestion on the probe surface. Proteomics 1:955-966

Vũ Thị Bích Ngọc, Lý Thị Bích Thủy, Quynh Đình Thị (2013) Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa lumbrokinase ở *Pichia pastoris*. Hội nghị khoa học CNSH Toàn quốc năm 2013. Nxb Khoa học và Công nghệ, Hà Nội :152-156

Yan XM, Kim CH, Lee CK, Shin JS, Cho IH, Sohn UD (2010) Intestinal Absorption of Fibrinolytic and Proteolytic Lumbrokinase Extracted from Earthworm, *Eisenia andrei*. Korean J Physiol Pharmacol 14:71-75.

EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT LUMBROKINASE IN *PICHIA PASTORIS* X33

Vũ Thị Bích Ngọc, Đỗ Thị Tuyền, Lý Thị Bích Thủy, Quynh Đình Thị

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Lumbrokinase, as a group of potential fibrinolytic enzymes from earthworm, has molecular weights of 25 to 40 kDa. These enzyme was demonstrated capable of directly hydrolyze fibrin, by activating plasminogen into plasmin- the fibrinolytic enzyme of human body. So, lumbrokinase have now been widely using for the treatment of thrombosis. In this study, the gene encoding lumbrokinase from the earthworm *Lumbricus rubellus* (GeneBank Accession No. AF304199) was codon optimized for expression in *P. pastoris* X33 using an expression vector pPICZαA. The transformant expressing the highest level of the lumbrokinase (0,767 U/ml) was selected. The recombinant lumbrokinase was produced with the highest level in YPTCM medium after induction of 1.0% methanol for 96 h. The recombinant lumbrokinase showed a molecular mass of 47 kDa on SDS-PAGE, specific activity of 2.94 U/mg. The purified of protein was identified with Maldi-Tof mass spectrometry, which showed 100% identification to the corresponding peptides of the putative LK from Genbank (code: Q3HR18). The lumbrokinase was successfully expressed in *P. pastoris* X33.

Keywords: expression, lumbrokinase, *Pichia pastoris* X33, purification