

李婉玉, 李越, 翁凌, 等. 重组鲍鱼肌肉脯氨酰内肽酶的性质研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 129–135. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060196

LI Wanyu, LI Yue, WENG Ling, et al. Study on the Properties of Recombinant Prolyl Endopeptidase from Abalone (*Haliotis discus hannai*) Muscle[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 129–135. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060196

· 生物工程 ·

重组鲍鱼肌肉脯氨酰内肽酶的性质研究

李婉玉¹, 李 越¹, 翁 凌^{1,2}, 陈守峰¹, 陈玉磊^{1,2}, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2,*}

(1.集美大学食品与生物工程学院,福建厦门 361021;

2.海洋食品深加工协同创新中心,辽宁大连 116034)

摘要:为研究皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)中脯氨酰内肽酶(Prolyl endopeptidase, Hdh-PEP)的酶学特性与结构特性,利用基因工程技术重组并在大肠杆菌中高效表达了皱纹盘鲍PEP。原核表达的Hdh-PEP分子量为85 kDa,在pH2~6、温度20~60 °C条件下,Hdh-PEP的表面疏水性明显升高。氨基酸序列同源性分析结果表明,Hdh-PEP催化结构域中有三个高度保守的氨基酸序列:Seq 1: K-D-G-T-K/R-I-P、Seq 2: Y-G-Y-G-G-F和Seq 3: I-R-G-G-E-Y/F。酶动力学研究表明,Hdh-PEP的米氏常数K_m为5.32 μmol/L,催化常数k_{cat}值为15.7 s⁻¹。PEP的特异性抑制剂SUAM-14746和ZPP对Hdh-PEP酶活力具有强抑制作用,丝氨酸蛋白酶抑制(PMSF)对Hdh-PEP酶活力也有较大程度的抑制作用。本实验制备了高特异性抗Hdh-PEP多克隆抗体,可检测鲍鱼肌肉中天然PEP的存在情况。Hdh-PEP的体外高效表达和特异性多克隆抗体制备为后续深入研究Hdh-PEP的性质提供了重要参考。

关键词:脯氨酰内肽酶,皱纹盘鲍,表面疏水性,多克隆抗体

中图分类号:Q556+.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)07-0129-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060196

Study on the Properties of Recombinant Prolyl Endopeptidase from Abalone (*Haliotis discus hannai*) Muscle

LI Wanyu¹, LI Yue¹, WENG Ling^{1,2}, CHEN Shoufeng¹, CHEN Yulei^{1,2}, LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2,*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Collaborative Innovation Center of Marine Food Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: In order to study the enzymatic characteristics and structure of prolyl endopeptidase from *Haliotis discus hannai* (Hdh-PEP), recombinant PEP was cloned and highly expressed in *E.coli*. Hdh-PEP with molecular weight of 85 kDa was successfully purified and its surface hydrophobicity was greatly affected by pH at low value (pH2~6) and temperature (20~60 °C). Amino acid sequence homology analysis showed that there were three highly conserved sequences in the catalytic domain of Hdh-PEP: Seq 1: K-D-G-T-K/R-I-P, Seq 2: Y-G-Y-G-G-F and Seq 3: I-R-G-G-E-Y/F. Kinetic study revealed that the K_m and k_{cat} of Hdh-PEP were 5.32 μmol/L and 15.7 s⁻¹, respectively. Specific inhibitors SUAM-14746 and ZPP of PEP had strong inhibition on Hdh-PEP activity, and serine protease inhibitor (PMSF) also exhibited inhibition. A high specific polyclonal antibody toward Hdh-PEP was prepared which could be applied for the detection of native PEP in abalone muscle. The successful *in vitro* expression of Hdh-PEP and preparation of a specific polyclonal antibody against Hdh-PEP provided an important reference for subsequent investigation on Hdh-PEP.

Key words: prolyl endopeptidase; *Haliotis discus hannai*; surface hydrophobicity; polyclonal antibody

我国是鲍鱼生产大国,皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是国产鲍鱼中产量最高的一个品种^[1]。鲍鱼

的可食用部分(腹足肌肉)富含多种人体必需氨基酸、呈味氨基酸及牛磺酸,深受消费者的青睐^[2]。

收稿日期: 2020-06-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901004);国家自然科学基金(31772049)。

作者简介: 李婉玉(1993-),女,硕士研究生,研究方向:水产加工,E-mail: 810457794@qq.com。

*通信作者: 曹敏杰(1964-),男,博士,教授,研究方向:水产加工、蛋白质化学,E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

脯氨酰内肽酶(Prolyl endopeptidase, PEP)广泛存在于动物、植物和微生物体中,是一种高度保守的丝氨酸蛋白酶^[3],能特异性水解含有脯氨酸残基的小肽(<33个氨基酸)^[4]。在人体中,PEP通过切割含有脯氨酸残基的神经小肽、激素和各种细胞因子等物质参与多种生理疾病,从而在医学领域引起广泛的关注^[5~10]。此外,微生物PEP也被广泛研究并应用于食品的生产和加工领域中^[11~13]。近年来,一些学者发现硬骨鱼的各组织中均有PEP存在,并相继从草鱼^[14]、鲤鱼^[15]、罗非鱼^[16]等肌肉组织中分离纯化出了天然PEP。研究表明,PEP在鱼死后胶原蛋白肽的降解中具有重要作用^[17~19]。本课题组在前期研究中发现,鲍鱼PEP(Hdh-PEP)在性腺组织中具有较高酶活。然而,Hdh-PEP作为一种重要的内源酶,其生理功能尚不清楚。Hdh-PEP的结构特征、组织分布及酶学性质等的研究以及对其生理功能的研究十分必要。但由于天然PEP在鲍鱼肌肉中含量极低,分离纯化难度大。因此,本文利用基因工程技术构建了Hdh-PEP表达菌株^[22]。将菌株接种至含有50 μg/mL Kana⁺的Luria-Bertani液体培养基(1 L),在37 °C恒温培养箱中,转速200 r/min下培养6 h至OD₆₀₀值为0.6后,加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG诱导剂进行低温低转速(16 °C, 100 r/min, 15 h)诱导表达。将诱导后的菌液离心收集(8000 r/min, 4 °C, 20 min),弃去上清液后,使用20 mL菌体裂解液(20 mmol/L PBS, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L β-巯基乙醇, pH6.0)重悬细菌沉淀。将重悬均匀的细菌悬浮液在冰浴中使用超声波细胞破碎仪进行破碎,然后将全菌液离心(8000 r/min, 4 °C, 25 min),取上清。用0.2 μm的聚醚砜膜对上清过滤后,以1 mL/min的流速上样于已用平衡缓冲液(20 mmol/L PBS, 10 mmol/L 咪唑, pH6.0)处理的Ni-NTA柱。完成上样后,使用洗脱缓冲液(20 mmol/L PBS, 50 mmol/L 咪唑, pH6.0)流洗3 h以除去杂蛋白。换用洗脱缓冲液(20 mmol/L PBS, 250 mmol/L 咪唑, pH6.0)进行目的蛋白洗脱,使用自动收集器以每管2.5 mL进行收集。纯化得到Hdh-PEP溶液经20 mmol/L PBS(pH6.0)透析以去除咪唑,纯化及透析过程在低温(4 °C)下进行。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本实验所用皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)平均重量约60 g,购买于厦门市集美菜市场;底物Suc-Gly-Pro-MCA、抑制剂SUAM-14746、ZPP日本Peptide Institute公司;酵母粉、蛋白胨英国Oxoid公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、E-64、苯甲脒(Benzamidine)、亮抑蛋白酶肽(Leupeptin)、卡那霉素(Kana⁺)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)美国Sigma公司;蛋白质标准分子量立陶宛Fermentas。

PT2100组织捣碎机 瑞典Kinematica; Protein A Sepharose亲和层析(BTR202Q-Y1) 中国博尔西; Ni-NTA柱 北京TransGen; FP-8200荧光分光光度计 日本Jasco; 荧光定量PCR仪 美国ABI; Avanti JA-26.5高速冷冻离心机 美国Beckman; 超声波细胞破碎仪 美国SCONICS; 化学发光荧光成像仪 美国AlphaInnotech; 微量蛋白核酸测定仪德国NanoDrop公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鲍鱼不同组织中Hdh-PEP酶活力检测 采用荧光底物法检测不同组织中Hdh-PEP酶活力^[20~21]。反应体系:取新鲜鲍鱼的腹足触角、肝胰腺、腹足肌肉、鳃、外套膜、性腺和血液各5 g,将各种组织用剪刀剪碎后放入4倍体积的20 mmol/L磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)(pH6.0)进行组织捣碎,8000 r/min,20 min离心后取100 μL上清溶液与850 μL 20 mmol/L PBS(pH6.0)混匀后再加入50 μL浓度为10 μmol/L的底物(Suc-Gly-Pro-MCA),在其

最适温度20 °C^[22]下孵育30 min后,加入1.5 mL终止液(甲醇:异丙醇:超纯水,35:30:35(v/v/v))终止反应。空白实验用蒸馏水代替反应体系中的酶液。用荧光分光光度计(FP-8200)在激发波长380 nm和发射波长450 nm下,分别测定反应体系和空白体系的荧光强度I_{反应}和I_{空白},Hdh-PEP酶活力用ΔI=I_{反应}-I_{空白}表示。

1.2.2 Hdh-PEP的重组表达及纯化 由于天然PEP在鲍鱼组织中含量极低,且分离纯化难度大^[23]。因此,利用基因工程技术构建了Hdh-PEP表达菌株^[22]。将菌株接种至含有50 μg/mL Kana⁺的Luria-Bertani液体培养基(1 L),在37 °C恒温培养箱中,转速200 r/min下培养6 h至OD₆₀₀值为0.6后,加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG诱导剂进行低温低转速(16 °C, 100 r/min, 15 h)诱导表达。将诱导后的菌液离心收集(8000 r/min, 4 °C, 20 min),弃去上清液后,使用20 mL菌体裂解液(20 mmol/L PBS, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L β-巯基乙醇, pH6.0)重悬细菌沉淀。将重悬均匀的细菌悬浮液在冰浴中使用超声波细胞破碎仪进行破碎,然后将全菌液离心(8000 r/min, 4 °C, 25 min),取上清。用0.2 μm的聚醚砜膜对上清过滤后,以1 mL/min的流速上样于已用平衡缓冲液(20 mmol/L PBS, 10 mmol/L 咪唑, pH6.0)处理的Ni-NTA柱。完成上样后,使用洗脱缓冲液(20 mmol/L PBS, 50 mmol/L 咪唑, pH6.0)流洗3 h以除去杂蛋白。换用洗脱缓冲液(20 mmol/L PBS, 250 mmol/L 咪唑, pH6.0)进行目的蛋白洗脱,使用自动收集器以每管2.5 mL进行收集。纯化得到Hdh-PEP溶液经20 mmol/L PBS(pH6.0)透析以去除咪唑,纯化及透析过程在低温(4 °C)下进行。

1.2.3 Hdh-PEP纯度及浓度测定 取10 μL Hdh-PEP(1.0 mg/mL)溶液及3 μL蛋白质标准分子量(Marker, 26~130 kDa)上样于12%的凝胶进行SDS-PAGE分析,以确定Hdh-PEP的分子量及纯度。Hdh-PEP浓度采用Bradford法进行检测,用PBS缓冲液(pH6.0)配制不同浓度的牛血清白蛋白溶液(100~500 μg/mL),以蛋白浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.4 Hdh-PEP酶活力测定 按照1.2.1中荧光底物法检测重组的Hdh-PEP酶活力。

1.2.5 PEP二级结构分析 在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得不同物种的PEP氨基酸序列,下载其FASTA格式文件,登录ClustalW在线服务器(<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)进行氨基酸序列比对^[24]。使用ESPrint 3.0在线服务器(<http://esprint.ibcp.fr/ESPrint/ESPrint/>)对ClustalW分析产生的序列比对结果进行二级结构对比分析^[25]。

1.2.6 酶动力学参数测定 将50 μL不同浓度的底物(Suc-Gly-Pro-MCA)和50 μL Hdh-PEP(2.5 mg/mL)

加入到 900 μL 磷酸缓冲液(25 mmol/L, pH6.0)中混合均匀后, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min, 加入 1.5 mL 终止液终止反应, 按照 1.2.1 方法对酶活力进行测定。以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/v$ 为纵坐标, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图^[10], 并计算 Hdh-PEP 酶动力学参数: 米氏常数 K_m 、最大反应速度 V_{\max} 和催化常数 k_{cat} 。

1.2.7 表面疏水性的测定 通过 1-苯胺基-8-萘磺酸(1-anilino-8-naphthalenesulfonic acid, ANS)荧光探针法分析不同 pH 和温度对酶的表面疏水性的影响。蛋白质的表面疏水性取决于其三级结构中疏水性氨基酸的暴露程度, ANS 荧光探针能够高亲和性结合蛋白疏水区, 结合后荧光增强^[26], 因此, 用荧光强度的变化反映蛋白表面疏水性的变化。在 96 孔酶标板中, 向 5 排反应孔中加入 200 μL Hdh-PEP(0.1 mg/mL, pH6.0), 再加入 4 μL ANS 溶液(8 mmol/L), 混合均匀后分别在 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 20 min。在另一个 96 孔酶标板中, 向 6 排反应孔中加入 4 μL ANS 溶液(8 mmol/L)和 200 μL 用不同 pH(2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0)缓冲液配制的 Hdh-PEP(0.1 mg/mL)后, 混合均匀, 于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 20 min。使用酶标仪对反应液进行全波长扫描(激发波长: 390 nm, 发射波长: 425~600 nm)以获得荧光光谱值。

1.2.8 抑制剂对 Hdh-PEP 酶活力的影响 反应体系: 将 890 μL 25 mmol/L 的 PBS(pH6.0)中、50 μL Hdh-PEP(2.5 mg/mL)及 10 μL 不同种类的抑制剂(SUAM-14746、ZPP、PMSF、EDTA、EGTA、E-64、Benzamidine、Leupeptin), 抑制剂终浓度分别为 5、5、5、2、5、5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ 。在室温下孵育 30 min 后, 加入 50 μL 底物(Suc-Gly-Pro-MCA, 10 $\mu\text{mol/L}$), 20 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min 后立即加入 1.5 mL 终止液终止反应, 检测剩余酶活力。空白组样品以蒸馏水代替抑制剂。

1.2.9 兔抗 Hdh-PEP 多克隆抗体的制备

1.2.9.1 免疫 将纯化后的 Hdh-PEP 浓度调整至 1.0 mg/mL, 取 200 μL Hdh-PEP(0.2 mg)与等体积的弗氏完全佐剂充分混合后对成年雄兔进行初次免疫, 采用皮下多点注射方式^[27]。每间隔一周进行三次加强免疫, 免疫过程委托厦门大学实验动物中心完成。免疫完成后取少量兔子耳朵动脉血清检测其效价及特异性, 达标后进行颈动脉取全血。取得的全血在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静止 4 h 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 下离心 15 min, 收集上层血清。

1.2.9.2 多克隆抗体 IgG 的纯化 采用 Protein A Sepharose 亲和层析柱对血清中的抗 Hdh-PEP 多克隆抗体 IgG 进行纯化^[16]。用 0.1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液对层析柱进行平衡, 取血清与等体积的 0.1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液混匀后, 上样于亲和层析柱。用 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)进行洗涤, 直至流洗液 $A_{280} < 0.05$, 以除去杂蛋白。然后, 用 0.1 mol/L Glycine-HCl(pH3.0)缓冲液进行洗脱, 将

纯化得到的 IgG 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.9.3 多克隆抗体的特异性分析 采用 Western blotting 方法对鲍鱼腹足肌肉中的 Hdh-PEP 进行检测。取 5 g 新鲜鲍鱼腹足肌肉, 加 10 倍体积的 10 mmol/L PBS(pH6.0)进行组织捣碎, 10000 r/min 离心 30 min, 取上清。经 SDS 化后上样于 12% 的电泳胶, 电泳完成后, 将蛋白条带转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上。用 5% 脱脂奶对 NC 膜进行封闭, 随后进行三次 Tris-HCl-吐温-20 洗涤缓冲液(TBST)洗膜, 每次间隔 5 min。用 TBST 将纯化得到的 IgG 稀释(1:100000)后作为一抗, 与 NC 膜在室温下轻摇 45 min。孵育完成后, 用 TBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min。将 NC 膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体共孵育 45 min 后, 用 TBST 溶液充分洗净。将 NC 膜与 ECL 显影液反应 2 min, 使用化学发光荧光成像仪显示结果。

1.3 数据处理

本文中所有数据均为三次重复的平均值, 采用 Excel2010 对数据进行处理并进行误差分析。制图及排版在 WPS 2019 PowerPoint 和 Adobe Illustrator CS5 上完成。

2 结果与分析

2.1 Hdh-PEP 在鲍鱼各组织中的酶活分布情况

为了检测鲍鱼各组织中 Hdh-PEP 的酶活力情况, 以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 检测鲍鱼 7 个主要组织(腹足触角、肝胰腺、腹足肌肉、鳃、外套膜、性腺和血液)中 Hdh-PEP 的酶活。如图 1 所示, 在鲍鱼性腺中 Hdh-PEP 酶活性最高, 肝胰腺、腹足肌肉次之, 血液中的酶活力最低。据 Ohta 等^[28]报道, 小鼠在发情期子宫和卵巢中的 PEP 酶活性有显著增加的变化趋势, 揭示了卵巢激素循环水平与 PEP 的活性密切相关。此外, 据 Yoshida 等^[29]报道, PEP 的特异性抑制剂能抑制鲱鱼精子激活蛋白的酶活力和精子活力。这些研究表明, PEP 除了与人的神经退行性疾病相关, 也参与其他生物的生殖繁育过程。目前, PEP 在贝类动物鲍鱼中的作用尚不清楚, 但其在鲍鱼性腺组织中具有较高酶活, 因此推测 PEP 在鲍鱼的

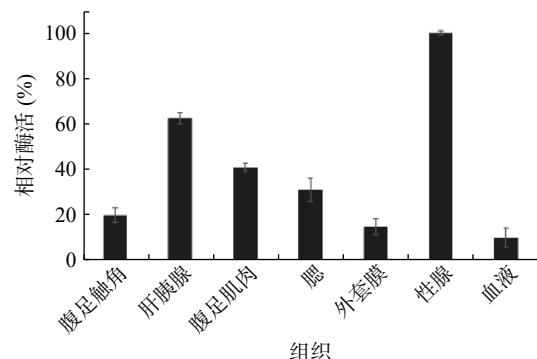


图 1 Hdh-PEP 在鲍鱼不同组织中的相对酶活

Fig.1 Relative enzymatic activity of Hdh-PEP in different tissues

生殖繁育过程中发挥重要作用。

2.2 Hdh-PEP 的体外重组表达及纯化

SDS-PAGE 分析显示, Hdh-PEP 表达菌株经低温培养和诱导表达后, 在全菌液中出现了一条明显的蛋白条带(约 85 kDa), 表明产生了大量重组 Hdh-PEP(图 2, 池道 1), 其中一部分以可溶状态存在于上清液中(图 2, 池道 2), 将上清液上样于 Ni-NT 柱进行纯化后得到单一条带(图 2, 池道 3), 表明重组 Hdh-PEP 的纯度达到 95% 以上。从 1 L 培养液中可纯化得到 Hdh-PEP 4.06 mg, 总活力 26.47 U, 比活力为 6.52 U/mg。

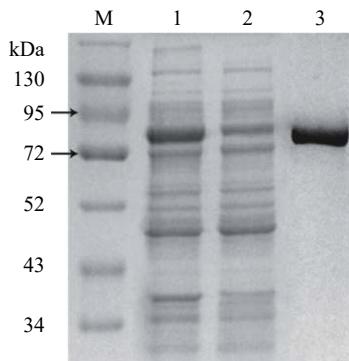


图 2 纯化 Hdh-PEP 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified Hdh-PEP

注: M, 标准蛋白; 1, 表达菌株的全菌液; 2, 表达菌株的上清液; 3, 纯化的 Hdh-PEP。

2.3 二级结构差异性分析

为了解不同来源 PEP 二级结构的差异性, 本文中选择了纹缘盔孢伞(*Galerina marginata*, Gm-PEP)、猪(Porcine, Pc-PEP)、人(*Homo sapiens*, Hm-PEP)、黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*, Mx-PEP)四个物种的 PEP 与 Hdh-PEP 的氨基酸序列及二级结构进行比较分析。结果如图 3 所示, 在 β -螺旋桨结构域(蓝色虚线)中, 只有少数氨基酸(红色突出显示)是相同的, 而在催化结构域(蓝色实线)中相同的氨基酸数量占比明显较多。其中, 在催化结构域中发现三个高度保守的 PEP 特异性氨基酸序列: Seq 1: K-D-G-T-K/R-I-P、Seq 2: Y-G-Y-G-G-F、Seq 3: I-R-G-G-E-Y/F。这表明, PEP 的催化结构域比 β -螺旋桨结构域更保守。另外, 通过 DNAMAN 软件计算得到 Hdh-PEP 与其它 4 种 PEP 的氨基酸序列同源性分别为 63.80%、63.24%、22.95% 和 36.12%。图 3 中 10 个 α -螺旋结构(以黑色线圈表示)分布在催化区域中, 28 个 β -折叠结构(以黑色箭头表示)分布在 β -螺旋桨结构域中。尽管它们的氨基酸序列相似性存在较大差异, 但二级结构特征是非常相似的。

2.4 Hdh-PEP 酶动力学分析

以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 通过动力学方法测定酶分解底物的米氏常数和催化常数。固定酶浓度, 选取不同浓度的 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 测定

酶催化底物水解的反应初速率。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 得到图 4。由此得出, Hdh-PEP 分解该底物的米氏常数 K_m 为 5.32 $\mu\text{mol/L}$, 其催化常数 k_{cat} 值为 15.7 s^{-1} 。

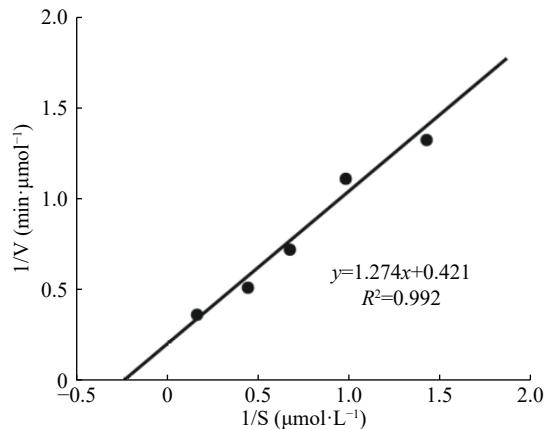


图 4 Hdh-PEP 的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.4 Lineweaver-Burk double reciprocal of Hdh-PEP

2.5 Hdh-PEP 表面疏水性分析

蛋白质的表面疏水性取决于其三级结构中疏水性氨基酸的暴露程度, 因此疏水性的变化可以用来反映蛋白质三级结构的变化。pH 和温度是影响蛋白酶催化活性的重要因素之一, 因此通过 ANS 疏水荧光探针法检测了 pH 和温度对 Hdh-PEP 表面疏水性的影响, 以了解 Hdh-PEP 的结构稳定性。

如图 5A 显示, Hdh-PEP 在 490 nm 处出现最大吸收峰, 随着 pH 升高, Hdh-PEP 的荧光强度逐渐下降。表明 pH 越高, Hdh-PEP 的表面疏水性越弱。为了进一步研究 pH 对 Hdh-PEP 疏水性的影响, 检测了不同质量浓度的 Hdh-PEP 荧光强度的变化(激发波长: 390 nm, 发射波长: 470 nm)。以 Hdh-PEP 的蛋白浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标进行作图, 获得在不同 pH 下 Hdh-PEP 的疏水指数(斜率)(图 5B)。结果显示, pH<6 时, Hdh-PEP 的疏水指数较大, 而 pH>6 时, Hdh-PEP 的疏水指数较小, 表明 Hdh-PEP 表面疏水性易受低酸性环境(pH<6)的影响, 即当 pH<6 时 Hdh-PEP 的空间稳定性较差。

如图 5C 所示, 随着温度逐渐升高, 荧光强度逐渐增强。这可能是高温引起 Hdh-PEP 三级结构发生变化, 更多疏水性氨基酸残基暴露的原因。为了进一步确定温度对 Hdh-PEP 疏水性的影响, 检测了 0.01~1.00 mg/mL 浓度范围内 Hdh-PEP 在不同温度下荧光强度的变化。如图 5D 所示, 随着温度的升高, Hdh-PEP 的疏水性指数(斜率)逐渐变大, 表明温度越高, Hdh-PEP 的表面疏水性增加, 即空间结构越不稳定。

2.6 不同蛋白酶抑制剂对 Hdh-PEP 酶活力的影响

将纯化后的重组 Hdh-PEP 与不同的蛋白酶抑制剂于 20 °C 共孵育 30 min 后, 测定重组 Hdh-PEP 的剩余酶活力, 以分析不同蛋白酶抑制剂对

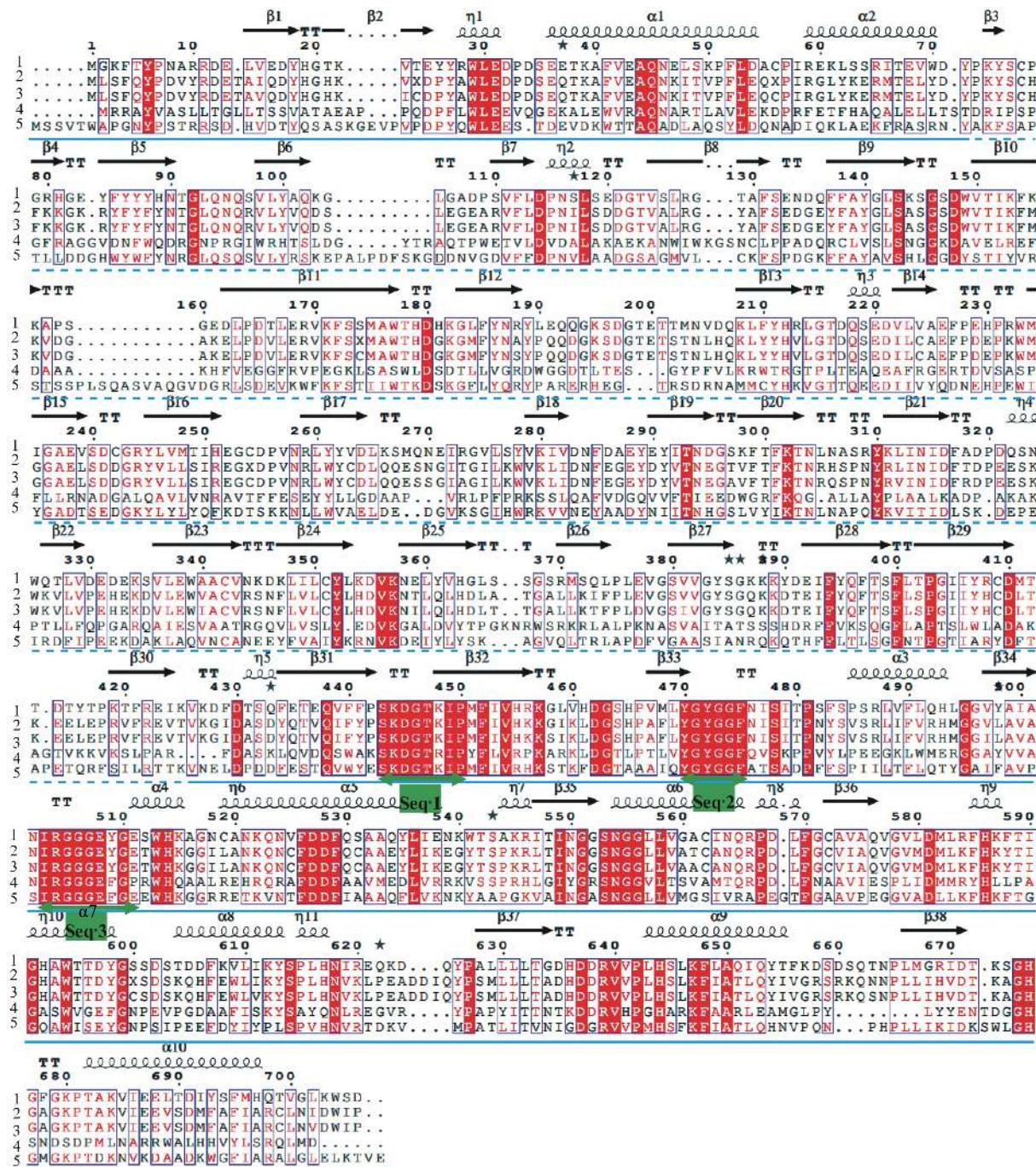


图 3 PEP 的氨基酸序列和二级结构比对

Fig.3 Amino acid sequence and secondary structure comparison of PEPs

注: 1, Hdh-PEP; 2, Gm-PEP; 3, Pc-PEP; 4, Hm-PEP; 5, Mx-PEP; 蓝色实线, 催化结构域;
蓝色虚线, β -螺旋桨结构域; 红色, 保守的氨基酸序列。

Hdh-PEP 酶活力的影响。结果如表 1 所示。

由表 1 可知, SUAM-14746 和 ZPP 作为 PEP 的特异性抑制剂对 Hdh-PEP 酶活力具有较好的抑制作用, 抑制率分别为 94.3% 和 93.1%。PMSF 是丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂, 其对 Hdh-PEP 酶活力具有一定程度的影响, 但抑制率只有 41.5%, 相对较弱。而其它丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Benzamidine 和 Leupeptin) 对酶活力几乎无抑制作用。此外, EDTA、EGTA 等金属蛋白酶抑制剂以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 对 Hdh-PEP 酶活力同样几乎无抑制作用。

用。Hdh-PEP 与草鱼 PEP、鲤鱼 PEP 相似, 均能被丝氨酸蛋白酶抑制剂不同程度地抑制^[14, 30]。

2.7 Hdh-PEP 多克隆抗体的制备及检测

为了获得特异性及效价良好的 Hdh-PEP 多克隆抗体, 本文制备了兔抗 Hdh-PEP 多克隆抗体。SDS-PAGE 分析表明, 经过纯化后的兔血清溶液中显示出 50 和 25 kDa 两个条带(图 6A), 即 IgG 抗体的重链和轻链。为了检测该多克隆抗体的特异性, 将纯化后的 IgG 作为一抗对鲍鱼腹足肌肉中的天然 Hdh-PEP 进行 Western blotting 分析。结果如图 6B

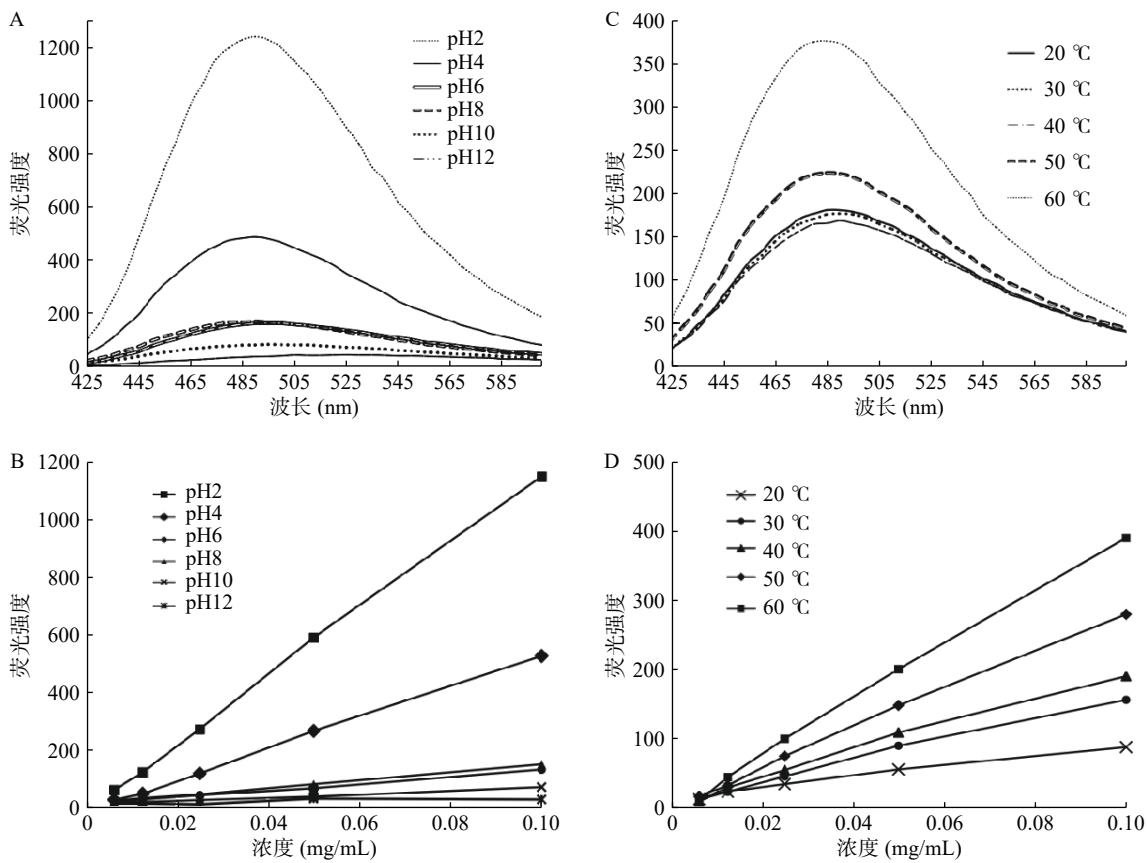


图 5 pH 和温度对 Hdh-PEP 表面疏水性的影响

Fig.5 Effect of pH and temperature on the surface hydrophobicity of Hdh-PEP

注: A、C, pH 和温度对荧光强度的影响; B、D, pH 和温度对疏水指数的影响。

表 1 蛋白酶抑制剂对 Hdh-PEP 的作用

Table 1 Effect of proteinase inhibitors on the activity of Hdh-PEP

抑制剂	终浓度(μmol/L)	相对酶活(%)
对照组	0	100.0
SUAM-14746	5	5.7
ZPP	5	6.9
PMSF	5	58.5
EDTA	2	86.9
EGTA	5	98.2
E-64	5	89.5
Benzamidine	1	96.7
Leupeptin	5	94.1

所示,在 72~95 kDa 范围内检测到一条清晰的蛋白条带,与 Hdh-PEP 分子量(85 kDa)接近。该结果表明,兔抗 Hdh-PEP 多克隆抗体能在鲍鱼肌肉组织粗蛋白上清液中与天然 Hdh-PEP 特异结合。

3 结论

皱纹盘鲍脯氨酰内肽酶(Hdh-PEP)分布于鲍鱼各组织中,在性腺中酶活力最高,这表明 Hdh-PEP 与鲍鱼生殖、免疫等生理活动密切相关。重组 Hdh-PEP 分子质量为 85 kDa,比活力为 6.52 U/mg。Hdh-PEP 与纹缘盔孢伞、猪、人、黄色粘球菌 PEP 的序列同源性分别为 63.80%、63.24%、22.95% 和 36.12%。从二级结构比对分析结果发现,Hdh-

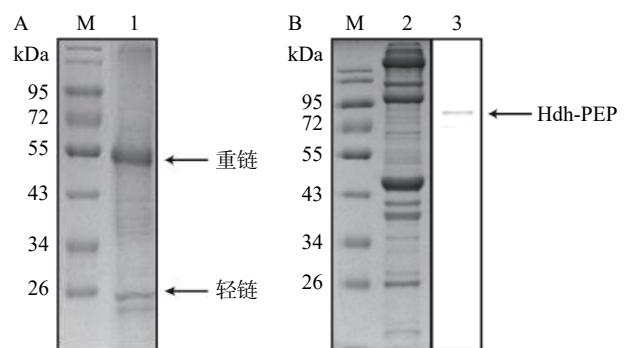


图 6 Hdh-PEP 多克隆抗体的 SDS-PAGE 分析和 Hdh-PEP 的 Western blotting 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of Hdh-PEP polyclonal antibody and western blotting analysis of Hdh-PEP

注: A, Hdh-PEP 多克隆抗体的 SDS-PAGE; B, Hdh-PEP 的 Western blotting 分析。泳道 M, 标准蛋白; 1, Hdh-PEP 多克隆抗体; 2, 鲍鱼肌肉蛋白; 3, 天然 Hdh-PEP 的 Western blotting 分析。

PEP 的催化结构域比 β -螺旋桨结构域更保守。Hdh-PEP 的表面疏水性与 pH、温度密切相关,随着 pH 下降、温度升高,表面疏水性增加,空间结构稳定性下降。与鱼类 PEP 相似,PEP 特异性抑制剂对 SUAM、ZPP 对 Hdh-PEP 酶活力抑制率分别为 94.3% 和 93.1%。兔抗 Hdh-PEP 多克隆抗体可特异检测鲍鱼肌肉蛋白中天然 Hdh-PEP 的存在,为后续从蛋白水平研究 Hdh-PEP 提供了条件。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编. 中国渔业统计年鉴-2019[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [2] 朱蓓薇. 海珍品加工理论与技术的研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 152-158.
- [3] Yadav P, Goyal V D, Gaur N K, et al. Carboxypeptidase in prolyl oligopeptidase family: Unique enzyme activation and substrate-screening mechanisms[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(1): 89-100.
- [4] Babkova K, Korabecny J, Soukup O, et al. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: Attention to the most promising and clinically relevant inhibitors[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2017, 9(10): 1015-1038.
- [5] Männistö P T, García-Horsman J A. Mechanism of action of prolyl oligopeptidase (PREP) in degenerative brain diseases: Has peptidase activity only a modulatory role on the interactions of PREP with proteins? [J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2017, 9: 27.
- [6] García-Horsman J A, Männistö P T, Venäläinen J I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease[J]. *Neuropeptides*, 2007, 41(1): 1-24.
- [7] Myöhänen T T, Pyykkö E, Männistö P T, et al. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and in ovarian and colorectal tumors[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2012, 60(9): 706-715.
- [8] Venditti M, Aniello F, Santillo A, et al. Study on PREP localization in mouse seminal vesicles and its possible involvement during regulated exocytosis[J]. *Zygote (Cambridge, England)*, 2019, 27(3): 160-165.
- [9] Campbell D J. Neprilysin inhibitors and bradykinin[J]. *Frontiers in Medicine*, 2018, 5: 257.
- [10] Prades R, Munarriz-Cueza E, Uríguen L, et al. IPR-166: A potent and selective prolyl oligopeptidase inhibitor ameliorates cognitive symptoms associated to schizophrenia after oral administration[J]. *European Neuropsychopharmacology*, 2019, 29: S244.
- [11] Colgrave M L, Byrne K, Howitt C A. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis reveals hydrolyzed gluten in beers crafted to remove gluten[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(44): 9715-9725.
- [12] Luoto S, Jiang Z Q, Brinck O, et al. Malt hydrolysates for gluten-free applications: Autolytic and proline endopeptidase assisted removal of prolamins from wheat, barley and rye[J]. *Journal of Cereal Science*, 2012, 56(2): 504-509.
- [13] Walter T, Wieser H, Koehler P. Production of gluten-free wheat starch by peptidase treatment[J]. *Journal of Cereal Science*, 2014, 60(1): 202-209.
- [14] 翁凌, 林韵, 张玲, 等. 草鱼肌肉脯氨酸内肽酶的研究 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 23-31.
- [15] 王梦想. 鲤鱼肌肉脯氨酸内肽酶的分离纯化及性质分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- [16] 肖琳琳. 罗非鱼和鲈鱼骨骼肌脯氨酸内肽酶的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2017.
- [17] 唐俊, 颜龙杰, 翁凌, 等. 蓝圆鲹骨骼肌脯氨酸内肽酶的分离纯化及其对胶原肽的作用 [J]. 现代食品科技, 2016, 32(6): 122-129.
- [18] 颜龙杰. 刺参 (*Stichopus japonicas*) 胶原蛋白及自溶相关蛋白酶的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2019.
- [19] 郑杰, 宋志远, 于笛, 等. 水产动物自溶研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 397-400.
- [20] 谢雪琼. 鲑鱼肌肉脯氨酸内肽酶及抑制肽的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2019.
- [21] 肖琳琳, 翁凌, 钟婵, 等. 罗非鱼脯氨酸内肽酶的分离及抑制剂对其的作用机制 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2017, 22(1): 10-20.
- [22] Li W Y, Li Y, Chen Y L, et al. Characterization and crystal structure of prolyl endopeptidase from abalone (*Haliotis discus hawaii*) [J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127452.
- [23] 李越. 皱纹盘鲍脯氨酸内肽酶的分子克隆、体外表达及相关性质分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2018.
- [24] 杨阳. 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 肌浆蛋白过敏原的致敏性研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2018.
- [25] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [26] Kato A, Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 1980, 624(1): 13-20.
- [27] 邹睿. 贝类副肌球蛋白的分离纯化、性质研究与分子克隆 [D]. 厦门: 集美大学, 2019.
- [28] Ohta N, Takahashi T, Mori T K, et al. Hormonal modulation of prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activities in the mouse uterus and ovary[J]. *Acta Endocrinologica*, 1992, 127(3): 262-266.
- [29] Yoshida K, Inaba K, Ohtake H, et al. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from the Pacific herring, *Clupea pallasi*, and its role in the activation of sperm motility[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 1999, 41(2): 217-225.
- [30] Wang M X, Zhong C, Cai Q F, et al. Study on a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2211-2218.