

# 罗非鱼脯氨酸内肽酶的分离及抑制剂对其的作用机制

肖琳琳<sup>1</sup>, 翁 凌<sup>1,2</sup>, 钟 婵<sup>1</sup>, 刘光明<sup>1,2</sup>, 曹敏杰<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 采用硫酸铵盐析及柱层析技术, 从罗非鱼肌肉中分离纯化得到分子质量约为 85 ku 的脯氨酸内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP)。通过肽质量指纹质谱分析, 获得 13 个肽片段, 含 128 个氨基酸残基, 结果显示, 与伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*) 的 PEP 完全一致。该酶特异分解荧光底物 Suc-Gly-Pro-MCA 和 Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA, PEP 特异性抑制剂 SUAM-14746 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 可以抑制该酶的活性。PEP 催化 Suc-Gly-Pro-MCA 水解反应的活化能 ( $E_a$ ) 为 47.42 kJ/mol。SUAM-14746 对 PEP 表现为竞争性抑制作用, 抑制常数 ( $K_i$ ) 为 1.91  $\mu\text{mol/L}$ 。金属离子  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  对 PEP 的抑制类型均为混合型抑制, 其中对游离酶的抑制常数 ( $K_i$ ) 分别为 1.80 mmol/L 和 0.07 mmol/L, 对酶-底物络合物的抑制常数 ( $K_{is}$ ) 分别为 2.33 mmol/L 和 1.17 mmol/L。

**[关键词]** 罗非鱼; 脯氨酸内肽酶; 纯化; 抑制机理

**[中图分类号]** Q 51; S 917.4

## Purification of a Prolyl Endopeptidase from the Skeletal Muscle of Tilapia (*Oreochromis* spp) and Its Inhibitory Mechanism

XIAO Linlin<sup>1</sup>, WENG Ling<sup>1,2</sup>, ZHONG Chan<sup>1</sup>, LIU Guangming<sup>1,2</sup>, CAO Minjie<sup>1,2</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. National and Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** A PEP was purified from the skeletal muscle of tilapia (*Oreochromis spp*) by ammonium sulfate fractionation and a series of column chromatographies. PEP was in homogeneity with molecular weight of approximately 85 ku on SDS-PAGE. Peptide mass fingerprinting (PMF) of PEP obtained 13 fragments including 128 amino acid residues which was identical to a PEP from *Haplochromis burtoni*, suggesting this enzyme is a prolyl endopeptidase. The enzyme specifically hydrolyzed fluorescent substrates Suc-Gly-Pro-MCA and Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA. Using Suc-Gly-Pro-MCA as substrate, the effect of proteinase inhibitors on PEP was investigated. The results showed that SUAM-14746, a specific inhibitor of prolyl endopeptidase could strongly inhibit its activity while other proteinase inhibitors did not show any effects. Activation energy ( $E_a$ ) of the enzyme was 47.42 kJ/mol. SUAM-14746 competitively inhibited its activity with  $K_i$  of 1.91  $\mu\text{mol/L}$ . Metal ions  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  both revealed mixed inhibition to PEP, and their inhibition constants ( $K_i$ ) were 1.80 mmol/L and 0.07 mmol/L, while enzyme-substrate complexes ( $K_{is}$ ) were 2.33 mmol/L and 1.17 mmol/L, respectively.

**[收稿日期]** 2016-10-31

**[修回日期]** 2016-12-14

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (31471640); 厦门南方海洋研究中心项目 (14ZP030HJ04)

**[作者简介]** 肖琳琳 (1989—), 女, 硕士生, 主要从事食品生物技术研究。通信作者: 曹敏杰 (1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质化学及水产品深加工研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

**Keywords:** tilapia; prolyl endopeptidase (PEP); purification; dynamic analysis

## 0 引言

脯氨酸内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP, EC 3.4.21.26), 也称脯氨酰寡肽酶, 属于特殊的丝氨酸蛋白酶家族中的一类水解酶, 广泛存在于植物、哺乳动物、细菌和真菌等生物体内。由于 PEP 能特异性水解多肽中含有脯氨酸残基或少数疏水性氨基酸残基的肽键, 其在食品工业中的应用受到了广泛关注<sup>[1-2]</sup>。在生物活性肽的制备中, 酶法制备因安全性高、生产条件温和、水解过程易控制, 成为获得食品级生物活性肽的常用方法<sup>[3]</sup>。PEP 因其特有的酶切位点, 可在其他蛋白酶酶解后继续作用, 产生功能独特的肽段或实现其他蛋白酶无法达到的酶解效果。如酪蛋白在酶解过程中的产物多数含有苦味, 酪蛋白富含疏水性氨基酸尤其是脯氨酸, 而水解羧基末端的脯氨酸残基可以减少苦味<sup>[4]</sup>。Maruyama 等<sup>[5]</sup>用胰蛋白酶水解酪蛋白得到具有血管紧张素转换酶 (angiotensin I-converting enzyme, ACE) 抑制活性的肽 AHP12, 经 PEP 继续水解可得到 AHP5 肽, 其 ACE 抑制活性是 AHP12 的 13 倍。此外, 对 PEP 研究报道较多的还有其在医药领域的应用。PEP 活性的异常与一些疾病的发生如老年性记忆障碍、抑郁症、精神分裂症等有密切的关系<sup>[6]</sup>。因此 PEP 已成为一个新的药物靶点, PEP 抑制剂可以通过阻断内源性神经肽的分解代谢而改善记忆。

然而, 不同生物体内的 PEP 在功能上存在着较大的差异, 即使在同一生物体内, 来源于不同器官的 PEP 发挥的作用机理也不尽相同。有研究显示<sup>[7-8]</sup>, PEP 参与细胞介导的免疫反应、自身免疫、炎症反应和新陈代谢等生理反应, 但对 PEP 的其他功能研究较少。在前期的工作中, 文献 [9] 从海水鱼蓝圆鲈肌肉中分离纯化了 PEP, 并对其酶学性质特别是对胶原肽的降解情况作了详细研究。本文以我国高产的罗非鱼为研究对象, 从其肌肉中分离纯化出 PEP, 并详细研究了抑制剂对其的影响及机理, 以期阐明 PEP 的生理功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜活罗非鱼, 每条质量约 400 g, 购于厦门市集美菜市场。

DEAE-Sephrose、Sephacryl S-300、Phenyl Sepharose 等层析树脂, 美国 GE Healthcare 公司; Suc-Gly-Pro-MCA 等荧光底物, 日本 Peptide Institute 公司; EDTA、EGTA、Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 美国 Sigma 公司; E-64, 美国 Amresco 公司; Pefabloc SC 和 Leupeptin, 德国 Roche 公司; LBTI, Worthington Biochemical Corporation 公司; 胶原蛋白小肽由合肥赛曼诺生物有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验仪器

组织捣碎机 (PT-2100, Kinematica, 瑞士), 高速冷冻离心机 (Avanti JA-25, Beckman, 美国), 紫外分光光度计 (Lamda 35, Perkin Elmer, 美国), 凝胶成像仪 (G-BOX, Syngene, 英国), 荧光分光光度计 (FP-6200, Jasco, 日本), 高效液相色谱仪 (Agilent, 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 蛋白质浓度测定

酶纯化过程中, 用紫外分光光度计在 280 nm 下测定吸光度值以算出蛋白质含量, 或用 Lowry 法测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

#### 1.3.2 PEP 的活力测定

PEP 活力测定参考 Yoshida 等的<sup>[10]</sup>方法, 具体如下: 以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 在 850  $\mu$ L 的 25 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=6.0) 中, 依次加入 100  $\mu$ L 酶液和 50  $\mu$ L 浓度为 10  $\mu$ mol/L 的荧光合成底物充分混合, 在 35  $^{\circ}$ C 反应 30 min 后加入 1.5 mL 终止液终止反应。用荧光分光光度计在激发

波长 380 nm 和发射波长 450 nm 下,测定反应后释放的 7-氨基-4-甲基香豆素(7-amino-4-methylcoumarin, AMC)的荧光强度。活力单位(U)定义为每分钟释放 1 nmol AMC 需要的酶量。

### 1.3.3 PEP 的分离纯化

将鲜活罗非鱼敲击头部致死,放血,去除内脏、皮、骨后洗净,收集骨骼肌并切碎。将 800 g 鱼肉放入 4 倍体积的缓冲液 A (含 4 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH = 7.5) 中,用组织捣碎机捣碎,10 000 g 下离心 15 min,取上清液用饱和度为 60 % ~ 80 % 的硫酸铵进行分级沉淀。沉淀以少量的缓冲液 A 溶解,用相同缓冲液充分透析。将透析后的酶液依次上样于 DEAE-Sephrose 阴离子交换层析柱(2.5 cm × 15 cm)、凝胶过滤柱 Sephacryl S-300 HR (1.5 cm × 98 cm)、Phenyl Sepharose 疏水层析柱(5 mL)及 DEAE Sepharose-Fast Flow 阴离子交换层析预装柱(5 mL),测定  $A_{280}$  值和酶活力,收集活性部分进行纯度检测。

### 1.3.4 蛋白酶纯度的测定

参照 Laemmli 法<sup>[11]</sup>,使用质量分数 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、银染色法分析脯氨酸内肽酶的纯度,用标准蛋白质(116.0 ~ 14.4 ku)作对照。

### 1.3.5 PEP 的肽质量指纹图谱分析

纯化的 PEP 经 SDS-PAGE 后,将目的蛋白条带切下,委托中科院上海生科院蛋白质组研究分析中心进行样品分析。

### 1.3.6 PEP 酶学性质分析

#### 1.3.6.1 温度对酶活力的影响

按酶活性测定方法,在 15 ~ 65 °C 范围内确定酶最适作用温度。热稳定性试验是将酶在上述不同温度下孵育 30 min 后,立即冷却到 4 °C,35 °C 下测其剩余的酶活力。

#### 1.3.6.2 pH 值对酶活力的影响

在 pH = 3 ~ 9 范围内确定最适 pH 值。所用缓冲液为 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲溶液(pH = 3.0 ~ 5.0)、0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 6.0 ~ 7.5)和 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.0 ~ 9.0)。pH 值稳定性是将酶置于各不同 pH 值缓冲液中 4 °C 孵育 6 h 后,在 35 °C 下测其剩余活力。

#### 1.3.6.3 活化能

测定不同温度(20 ~ 37 °C)下酶催化 Suc-Gly-Pro-MCA 水解的最大反应速率  $V_{\max}$  值,根据 Arrhenius 公式,以最大速率的对数( $\lg V_{\max}$ )对  $1/T$  作图,从直线斜率求出酶催化 Suc-Gly-Pro-MCA 水解反应的活化能( $E_a$ )。

### 1.3.7 PEP 对胶原蛋白小肽的降解

将 0.03 U 纯化的酶与三段质量浓度为 2 g/L 的胶原小肽在 35 °C 下反应 1 h,经高效液相色谱分离。胶原蛋白小肽的序列分别为 GEVGPQGARG、GAMGPRGLPGERGRAG 和 QGPVGATGPKGAR-GAAGPPGATGF。

### 1.3.8 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响及作用机理

#### 1.3.8.1 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响

在 25 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH = 6.0)中,将 PEP 与不同的蛋白酶抑制剂混合均匀,在 4 °C 下孵育 30 min,35 °C 下测定剩余酶活力。对照样品不加任何抑制剂,其他反应条件一致。所用抑制剂有 SUAM-14746、Pefabloc SC、PMSF、LBTI、Leupeptin、E-64、EDTA 和 EGTA。

#### 1.3.8.2 SUAM-14746 对 PEP 抑制机理及类型

在含有不同浓度蛋白酶抑制剂的测酶活性体系中,固定底物浓度,改变酶浓度,测定反应初速率,以酶浓度对反应速率作图,判断抑制类型。再固定酶浓度,改变底物浓度,测定酶促反应的初速率,依照 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,判断 SUAM-14746 对 PEP 抑制的作用机理。

### 1.3.9 金属离子对酶活力的影响及作用机理

在含适量酶的 25 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH = 6.0) 中, 加入终浓度分别为 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L 的二价金属离子, 在室温下孵育 30 min, 对照组不加金属离子, 其他反应条件与实验组一致, 测定酶活力, 并计算相对酶活力。根据测定蛋白酶抑制剂对酶的作用机理相似方法, 研究金属离子对酶的抑制机理。

2 结果与分析

2.1 PEP 的分离纯化

罗非鱼肌肉水溶性蛋白质经硫酸铵盐析后, 再经过 DEAE - Sepharose 阴离子交换层析的结果见图 1a。由图 1a 可知, 未吸附部分出现一个大的杂蛋白峰, 而酶活峰出现在吸附部分, 该步骤有效去除了杂蛋白质。收集活性部分, 超滤膜浓缩后上样于 Sephacryl S - 300 凝胶过滤柱, 去除部分杂蛋白质 (见图 1b)。经 Phenyl - Sepharose 疏水层析, 大部分杂蛋白质被去除。目的蛋白峰出现在 0.9 ~ 0.8 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 梯度洗脱处 (见图 1c)。收集活性部分, 透析后上样于 DEAE - Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱, 目的蛋白在含 0.1 mol / L NaCl 的缓冲溶液 A 中被洗脱下来。经 SDS - PAGE 后得到单一条带, 分子质量约为 85 ku (见图 1d)。从 800 g 罗非鱼肌肉中纯化得到 0.8 mg 的 PEP, 得率为 0.3%, 纯化倍数为 953.6 (见表 1), 这与蓝圆鲂肌肉 PEP 的回收率 (0.5%) 基本一致<sup>[9]</sup>, 但低于人脑 PEP (1.2%)<sup>[12]</sup> 和猪肌肉 PEP 的回收率 (26.3%)<sup>[13]</sup>。

迄今为止, 已报道的来源于不同物种的 PEP 分子质量均不相同, 如从牛脑<sup>[14]</sup>中分离出的 PEP 为 76 ku, 人脑中分离的 PEP 为 80 ku。Szwajcer - Dey 等<sup>[15]</sup>从黄单胞菌 (*Xanthomonassp*) 获得的 PEP 的分子质量则为 75 ku。Yoshida 等<sup>[10]</sup>从太平洋鲱鱼 (*Pandalus borealis*) 精液中纯化到的脯氨酸内肽酶分子质量为 79 ku。

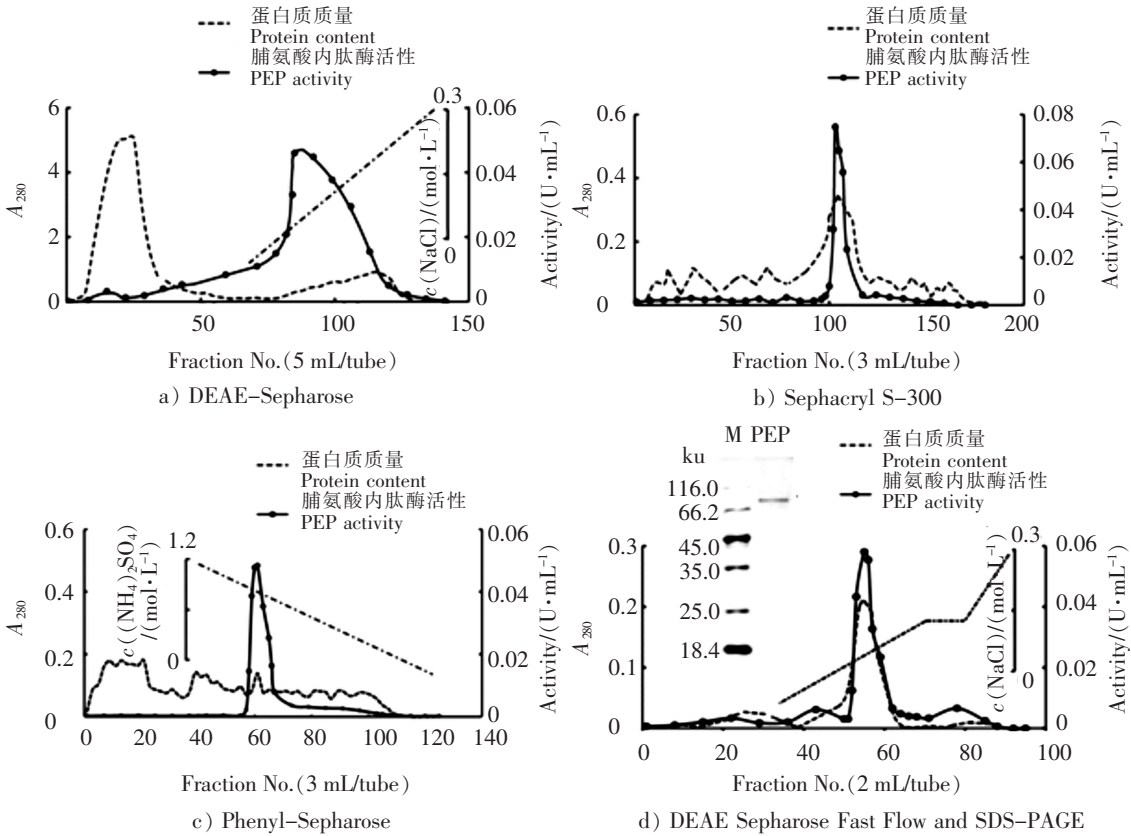


图 1 PEP 纯化层析图

Fig.1 Chromatographic purification of PEP

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

表 1 罗非鱼 PEP 的纯化结果  
Tab.1 Summary of purification of tilapia PEP

纯化过程 Purification step	总蛋白质量 Total protein/mg	总酶活 Total activity/U	比活力 Specific activity/(U · g <sup>-1</sup> )	得率 Yield /%	纯化倍数 Purification fold
Crude extract	29232.00	24.9	0.8	100.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15721.00	16.5	1.1	66.2	1.2
DEAE – Sepharose	2961.00	3.8	1.3	15.3	1.5
Sephacryl S – 300	12.52	0.5	39.2	1.9	45.9
Phenyl – Sepharose	1.00	0.9	929.8	3.8	1091.3
DEAE – FF	0.80	0.6	812.5	0.3	953.6

2.2 PEP 的 MS/MS 肽质量指纹谱分析

图 2 是 PEP 的肽质量指纹一级图谱，图中的每个峰代表一种肽段。将得到的肽片段的质量指纹图谱数据在 NCBI nr 数据库中进行序列检索，获得 13 个片段，共 128 个氨基酸残基。结果表明，PEP 肽段序列与伯氏朴丽鱼 PEP (*Haplochromis burtoni*, XM\_005921603.2)、斑马鱼 PEP (*Maylandia zebra*, XM\_004568776.1) 及尼罗罗非鱼 PEP (*Oreochromis niloticus*, XM\_003458233.4) 一致性均为 100%，与坦鲷女王燕尾 PEP (*Neolamprologus brichardi*, XM\_006792515.1) 一致性为 98.43%，比对结果如图 3 所示，证明纯化蛋白质为 PEP，且 PEP 是一种保守性极高的酶类。

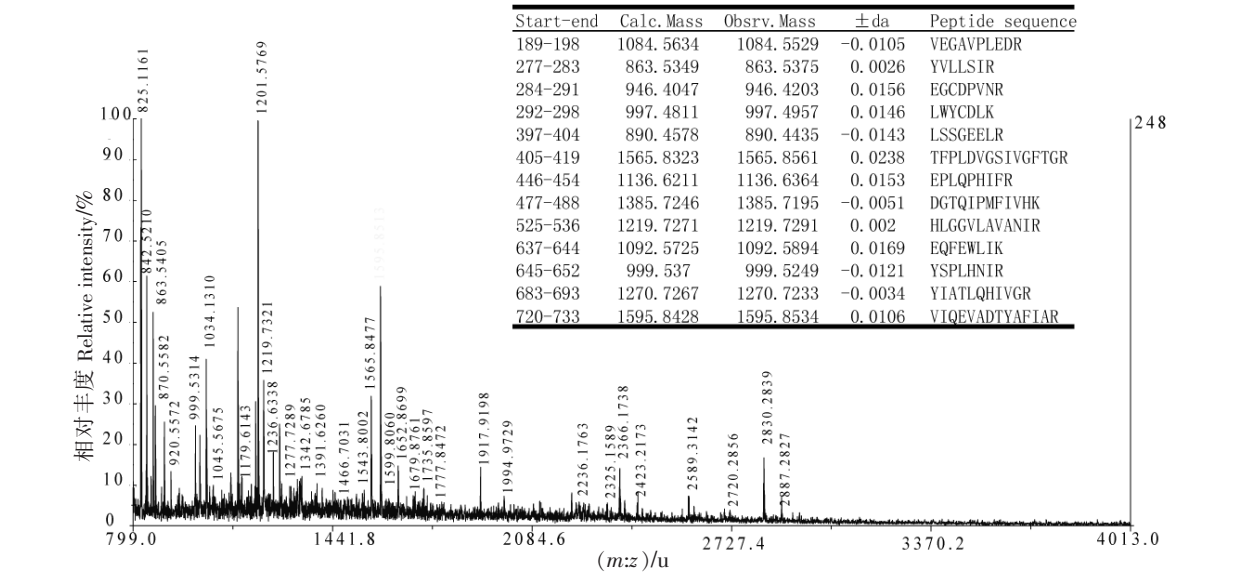


图 2 罗非鱼 PEP 肽质量指纹一级图谱

Fig.2 PMF of the purified endopeptidase as digested by trypsin

2.3 PEP 酶学性质分析

2.3.1 酶的最适温度和热稳定性

在 pH = 6.0 的 25 mmol/L PBS 缓冲溶液中，以 Suc - Gly - Pro - MCA 为底物，测定不同温度下酶的相对活力，结果如图 4 所示，可见，PEP 的最适温度为 35 ℃，当温度高于 40 ℃时，PEP 的活性会迅速下降，但是即使在 15 ℃的低温下仍能够保持较高的酶活力。PEP 的热稳定结果如图 4 所示，当酶在 25 ℃和 35 ℃下孵育 30 min，能较好地保持酶活力；但温度高于 45 ℃时，酶活力迅速下降直至完全丧失，这说明酶的热稳定性较差。

2.3.2 酶的最适 pH 值和 pH 值稳定性

在 35 ℃下，改变酶催化反应体系的 pH 值，测定不同 pH 值下酶催化 Suc - Gly - Pro - MCA 水解反应的相对活力与相应 pH 值，结果如图 5 所示，PEP 反应的最适 pH 值为 6.5，当 pH 值高于 7.5 或

<i>Haplochromis burtoni</i>	LYDYPKYSCPFRRGSRVHFYNTGLQNSVMYVQENLDAEPTVFLDPNTFSEDGTVLRGYAFSEDEGYLAYGTSASGSDWWEIRFLRVEGAVPLEDRLE	200
<i>Maylandia zebra</i>	LYDYPKYSCPFRRGSRVHFYNTGLQNSVMYVQENLDAEPTVFLDPNTFSEDGTVLRGYAFSEDEGYLAYGTSASGSDWWEIRFLRVEGAVPLEDRLE	200
<i>Neolamprologus brichard</i>	LYDYPKYSCPFRRGSRVHFYNTGLQNSVMYVQENLDAEPTVFLDPNTFSEDGTVLRGYAFSEDEGYLAYGTSASGSDWWEIRFLRVEGAVPLEDRLE	200
<i>Oreochromis niloticus</i>	LYDYPKYSCPFRRGSRVHFYNTGLQNSVMYVQENLDAEPTVFLDPNTFSEDGTVLRGYAFSEDEGYLAYGTSASGSDWWEIRFLRVEGAVPLEDRLE	200
Tilapia	.....VEGAVPLEDR.....	10
<i>Haplochromis burtoni</i>	RVKFSKCSWTHDGKGLFYNSYPDQEGKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTPQSEDLVCAEFPDHPKMWGAEVSEDDGRVLLSIREGCDPVNRLWYCDLKT	300
<i>Maylandia zebra</i>	RVKFSKCSWTHDGKGLFYNSYPDQEGKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTPQSEDLVCAEFPDHPKMWGAEVSEDDGRVLLSIREGCDPVNRLWYCDLKT	300
<i>Neolamprologus brichard</i>	RVKFSKCSWTHDGKGLFYNSYPDQEGKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTPQSEDLVCAEFPDHPKMWGAEVSEDDGRVLLSIREGCDPVNRLWYCDLKT	300
<i>Oreochromis niloticus</i>	RVKFSKCSWTHDGKGLFYNSYPDQEGKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTPQSEDLVCAEFPDHPKMWGAEVSEDDGRVLLSIREGCDPVNRLWYCDLKT	300
Tilapia	.....VLLSIREGCDPVNRLWYCDLKT.....	32
<i>Haplochromis burtoni</i>	PQGITGLLPWKLLDNFDAEYEVYVTEGTLFTFKTNLDAPRYRLINIDFASPEQSSWKELLPQHEKDVI VFATCTYSSYLFVCFLHDVKVNLKMYHLSSG	400
<i>Maylandia zebra</i>	PQGITGLLPWKLLDNFDAEYEVYVTEGTLFTFKTNLDAPRYRLINIDFASPEQSSWKELLPQHEKDVI VFATCTYSSYLFVCFLHDVKVNLKMYHLSSG	400
<i>Neolamprologus brichard</i>	PQGITGLLPWKLLDNFDAEYEVYVTEGTLFTFKTNLDAPRYRLINIDFASPEQSSWKELLPQHEKDVI VFATCTYSSYLFVCFLHDVKVNLKMYHLSSG	400
<i>Oreochromis niloticus</i>	PQGITGLLPWKLLDNFDAEYEVYVTEGTLFTFKTNLDAPRYRLINIDFASPEQSSWKELLPQHEKDVI VFATCTYSSYLFVCFLHDVKVNLKMYHLSSG	400
Tilapia	.....LSSG.....	36
<i>Haplochromis burtoni</i>	EELRTFPLDVGSIVGFTGRKRDEIFYYFTSFLSPAIYHCDLTKPELQPHIFREVTVKGFNPSDYQTTQIFFPSKDGQTQIPMFIVHKKGIKMGDSHPGF	500
<i>Maylandia zebra</i>	EELRTFPLDVGSIVGFTGRKRDEIFYYFTSFLSPAIYHCDLTKPELQPHIFREVTVKGFNPSDYQTTQIFFPSKDGQTQIPMFIVHKKGIKMGDSHPGF	500
<i>Neolamprologus brichard</i>	EELRTFPLDVGSIVGFTGRKRDEIFYYFTSFLSPAIYHCDLTKPELQPHIFREVTVKGFNPSDYQTTQIFFPSKDGQTQIPMFIVHKKGIKMGDSHPGF	500
<i>Oreochromis niloticus</i>	EELRTFPLDVGSIVGFTGRKRDEIFYYFTSFLSPAIYHCDLTKPELQPHIFREVTVKGFNPSDYQTTQIFFPSKDGQTQIPMFIVHKKGIKMGDSHPGF	500
Tilapia	EELRTFPLDVGSIVGFTGR.....EPLQPHIFR.....DGQTQIPMFIVHKL.....	76
<i>Haplochromis burtoni</i>	LYGYGGFNISITPSYSVSRLIFVRLHGGVLAVANIRGGGEYGETWHKAGMLANKQNCFTDFQCAAEYLKEGYTSPSKLTINGSGNGLLVAACVNPERPE	600
<i>Maylandia zebra</i>	LYGYGGFNISITPSYSVSRLIFVRLHGGVLAVANIRGGGEYGETWHKAGMLANKQNCFTDFQCAAEYLKEGYTSPSKLTINGSGNGLLVAACVNPERPE	600
<i>Neolamprologus brichard</i>	LYGYGGFNISITPSYSVSRLIFVRLHGGVLAVANIRGGGEYGETWHKAGMLANKQNCFTDFQCAAEYLKEGYTSPSKLTINGSGNGLLVAACVNPERPE	600
<i>Oreochromis niloticus</i>	LYGYGGFNISITPSYSVSRLIFVRLHGGVLAVANIRGGGEYGETWHKAGMLANKQNCFTDFQCAAEYLKEGYTSPSKLTINGSGNGLLVAACVNPERPE	600
Tilapia	.....HLGGVLAVANIR.....	88
<i>Haplochromis burtoni</i>	LFGCAVAQGVGMDMLKFHKFTIGHAWTTDFGCSDEKKEQFEWLIKYSPLHNIRVPEGNVQYPAVLLLTGDHDDRVPVHLSHLYIATLQHI VGRSPKQTNP	700
<i>Maylandia zebra</i>	LFGCAVAQGVGMDMLKFHKFTIGHAWTTDFGCSDEKKEQFEWLIKYSPLHNIRVPEGNVQYPAVLLLTGDHDDRVPVHLSHLYIATLQHI VGRSPKQTNP	700
<i>Neolamprologus brichard</i>	LFGCAVAQGVGMDMLKFHKFTIGHAWTTDFGCSDEKKEQFEWLIKYSPLHNIRVPEGNVQYPAVLLLTGDHDDRVPVHLSHLYIATLQHI VGRSPKQTNP	700
<i>Oreochromis niloticus</i>	LFGCAVAQGVGMDMLKFHKFTIGHAWTTDFGCSDEKKEQFEWLIKYSPLHNIRVPEGNVQYPAVLLLTGDHDDRVPVHLSHLYIATLQHI VGRSPKQTNP	700
Tilapia	.....EQFEWLIKYSPLHNIR.....YIATLQHI VGR.....	115
<i>Haplochromis burtoni</i>	LFILVDTKSGHGAGKPTSNVIQEVADTYAFIARCLNISWV	740
<i>Maylandia zebra</i>	LFILVDTKSGHGAGKPTSNVIQEVADTYAFIARCLNISWV	740
<i>Neolamprologus brichard</i>	LFILVDTKSGHGAGKPTSNVIQEVADTYAFIARCLNISWV	740
<i>Oreochromis niloticus</i>	LFILVDTKSGHGAGKPTSNVIQEVADTYAFIARCLNISWV	740
Tilapia	.....VIQEVADTYAFIAR.....	129

图 3 罗非鱼 PEP 与其他鱼类 PEP 的序列比对

Fig.3 Alignment of peptide fragments of PEP with that of other fish

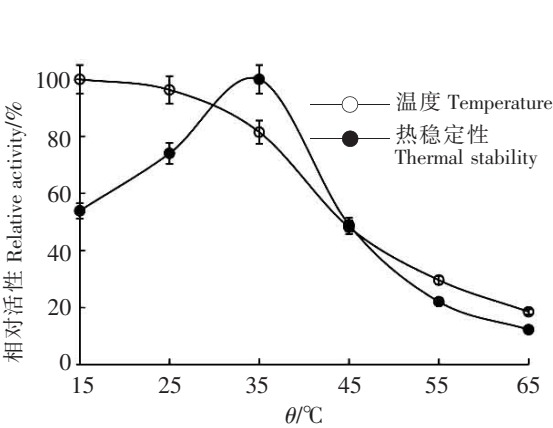


图 4 PEP 的最适温度和热稳定性

Fig.4 Optimal temperature and thermal stability of PEP

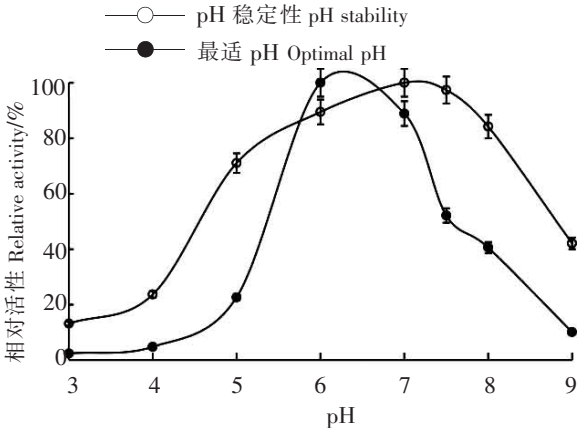


图 5 PEP 的最适 pH 值和 pH 值稳定性

Fig.5 The optimal pH and pH stability of PEP

低于 5.5 时, 显示较低的酶活性, 说明 PEP 在中性偏酸条件下酶活性较高。另外, 由图 5 可知, pH 值在 5.5 ~ 8.0 之间, 酶活性能够很好保持, 而当 pH 值低于 5.5 或者高于 8.0 时, 酶活力会快速下降。文献 [9] 报道蓝圆鲈肌肉中纯化出的 PEP 最适 pH 值为 6.0, pH 值在 5.0 ~ 7.5 之间, 酶活性能够很好保持, 这与本研究结果相似。但是不同于先前研究报道<sup>[15]</sup> 的哺乳动物和细菌来源的脯氨酸内肽酶最适 pH 值都是 7.5 的结果, 都属于中性偏碱性酶, 两者的最适温度差异不大, 都在 35 ~ 40 °C 之间, 属于中温酶。这可能是由于不同物种之间酶的分子构象和表位构象不同, 从而发挥作用的 pH 值区域也不尽相同, 导致酶最适 pH 值的差异。



2.3.3 活化能

在不同温度下（20、25、30、37 ℃）测定 PEP 催化 Suc - Gly - Pro - MCA 水解的最大反应速率  $V_{\max}$ 。根据 Arrhenius 公式，酶促反应的最大速率的对数（ $\lg V_{\max}$ ）与反应的活化能（ $E_a$ ）关系为：

$$\lg V_{\max} = \text{Const} - E_a / (2.303R) \times 1/T,$$

式中  $R$  为气体常数，其值为  $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K}^{-1})$ 。

从直线斜率求出酶催化 Suc - Gly - Pro - MCA 水解反应的活化能（ $E_a$ ），从图 6 可知罗非鱼 PEP 的活化能（ $E_a$ ）为  $47.42 \text{ kJ/mol}$ 。

2.4 PEP 对胶原蛋白小肽的作用

鱼类死后，胶原蛋白的降解是导致肌肉弹性下降的主要原因。研究发现，内源性蛋白酶如丝氨酸蛋白酶<sup>[16]</sup>、金属蛋白酶<sup>[17]</sup>、半胱氨酸蛋白酶<sup>[18]</sup>等在其中发挥主要作用，尤其是内源性基质金属蛋白酶（MMP）对胶原蛋白的降解直接导致肌肉的弹性下降。Xu 等<sup>[19]</sup>从鲤鱼肌肉中分离纯化出 MMP - 2，该酶在 37 ℃ 和 4 ℃ 下均能有效地分解 I 型和 V 型胶原蛋白。而胶原蛋白富含脯氨酸残基，因此，作为能够特异性切割脯氨酸残基的内源性蛋白酶，PEP 在鱼胶原蛋白的新陈代谢过程中的作用值得探究。本研究对来源于罗非鱼的 PEP 分解胶原小肽的特异性进行了深入研究，结果如图 7a 所示，第一

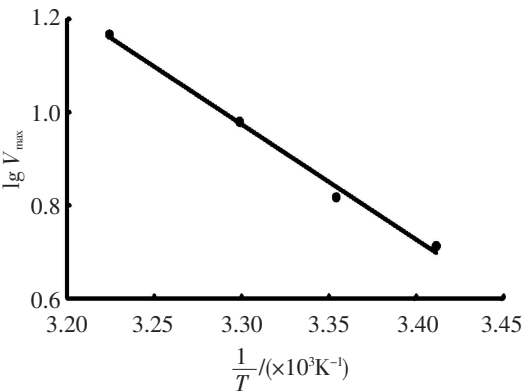


图 6 PEP 催化 Suc-Gly-Pro-MCA 水解的 Arrhenius 关系图

Fig.6 Arrhenius plot of the degradation of Suc-Gly-Pro-MCA by PEP

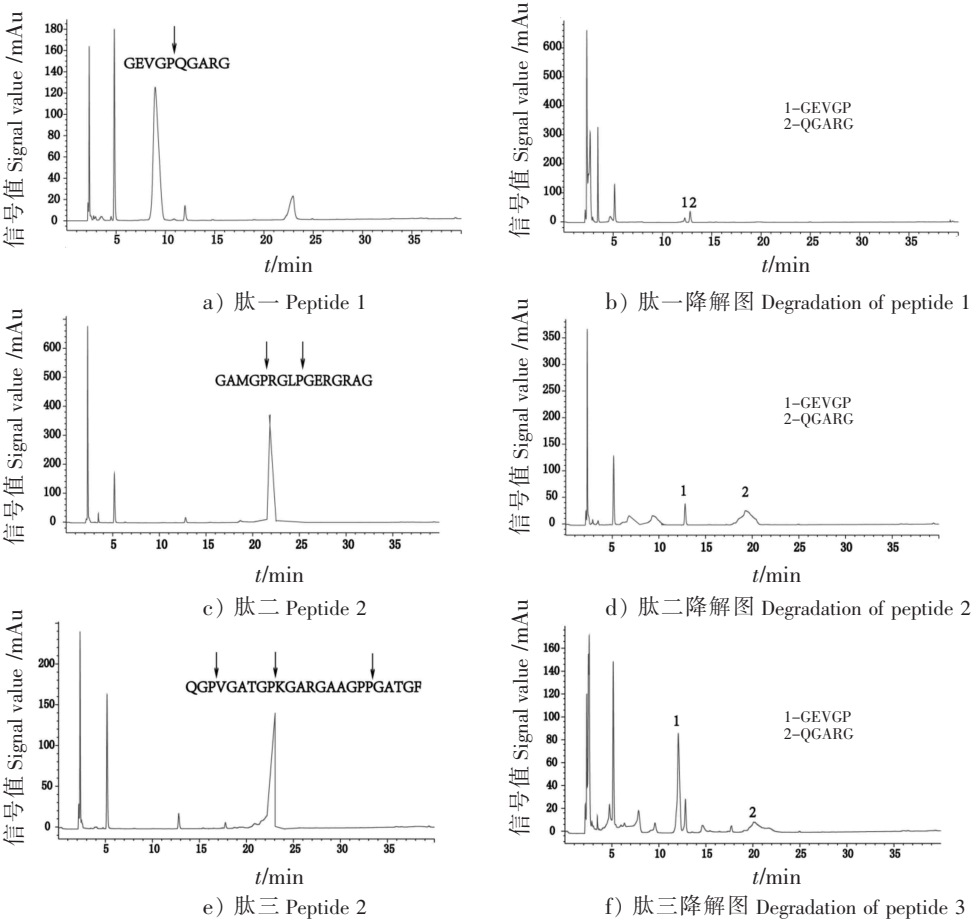


图 7 PEP 降解胶原小肽的高效液相色谱图

Fig.7 HPLC analysis of collagen peptides hydrolyzed by PEP

段胶原蛋白小肽的序列为 GEVGPQGARG, 小肽的原始峰出现在第 9 min, 与 PEP 反应后, 原始峰消失, 取而代之的是两个新的小峰, 说明该小肽能够被 PEP 降解 (见 7b)。图 7c、图 7d 和图 7e、图 7f 表示第二段和第三段小肽序列分别为 GAMGPRGLPGERGRAG 和 QGPVGATGPKGARGAAGPPGATGF, 相同结果表明, PEP 能专一性水解多肽中脯氨酸残基的羧基端肽键, 但 PEP 对长度超过 30 个氨基酸的小肽不产生分解。因此, 在肌肉的新陈代谢中, PEP 需要在金属蛋白酶等内源性蛋白酶将大分子胶原蛋白水解成短肽后再发挥其特异的降解作用。

2.5 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响及机理

2.5.1 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响

如表 2 所示, 以 Suc - Gly - Pro - MCA 为底物, PEP 的特异性抑制剂 SUAM - 14746 能够完全抑制 PEP 的活性, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 和 Pefabloc SC 对 PEP 也具有一定的抑制作用。该结果与许多已报道的丝氨酸蛋白酶抑制剂脱氧磷酸酯 (DFP) 及 PMSF 能够抑制 PEP 的活性相一致<sup>[10]</sup>, 表明 PEP 属于丝氨酸蛋白酶。而其他丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Leupeptin、LBTI)、金属蛋白酶抑制剂 (EDTA、EGTA)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (E - 64) 则没有明显的抑制作用。值得注意的是, 脯氨酰内肽酶的保守序列也是丝氨酸蛋白酶家族的 G - X - S - X - G/A 高度保守序列, 但典型丝氨酸蛋白酶抑制剂对该酶活性影响较小或几乎没有影响<sup>[10]</sup>, 这说明 PEP 是一类特殊的丝氨酸蛋白酶。

表 2 蛋白酶抑制剂对 PEP 的作用  
Tab.2 Effects of proteinase inhibitors on PEP activity

抑制剂 Inhibitor	浓度 Concentration/( mmol · L <sup>-1</sup> )	剩余活力 Residual activity/%
对照 Contrast	0	100.0
SUAM - 14746	0.000 5	0
PMSF	5	41.6
Pefabloc SC	2	78.7
E - 64	0.01	99.6
Leupeptin	0.1	100.1
EGTA	5	100.2
EDTA	5	100.5
LBTI	2	104.1

2.5.2 SUAM - 14746 对 PEP 抑制机理及抑制类型

在含不同浓度 SUAM - 14746 测活体系中, PEP 浓度与酶活的关系为一组通过原点的直线, 说明 SUAM - 14746 对酶的抑制是可逆抑制, SUAM - 14746 与酶通过非共价键结合而引起酶的活力下降。通过固定 PEP 浓度, 改变底物 Suc - Gly - Pro - MCA 浓度, 在不同浓度 SUAM - 14746 作用下, 测定酶反应速率与底物浓度的关系。通过双倒数作图得到图 8。由图 8 可知, 得到一系列纵轴截距不变的直线,  $V_{\max}$  值不变, 而  $K_m$  随着 SUAM - 14746 浓度的增大而增大, 说明 SUAM - 14746 对酶的抑制属于竞争性抑制, 通过 SUAM - 14746 与底物共同竞争 PEP 的活性中心来抑制酶促反应进程, 其抑制常数  $K_i$  为  $1.91 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 8 内插图)。

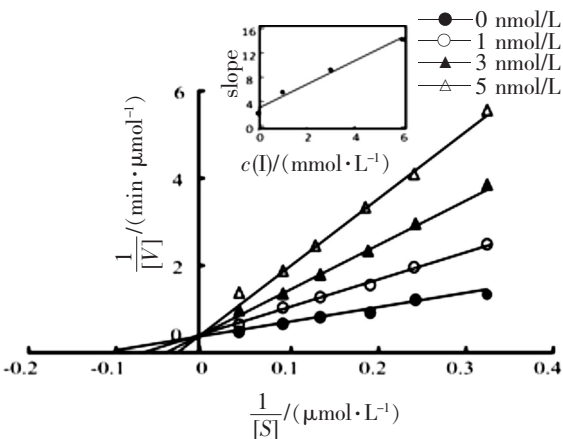


图 8 SUAM-14746 对 PEP 的抑制类型和抑制常数测定

Fig.8 The inhibition type of SUAM-14746 to prolyl endopeptidase



2.6 金属离子对 PEP 活性的影响及机理

2.6.1 二价金属离子对 PEP 活性的影响

研究  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  8 种金属离子对 PEP 活性的影响，结果见图 9。由图 9 可知， $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  在浓度为 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L 时，均强烈抑制 PEP 的活性， $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  在 1 mmol/L 时有部分抑制作用。这与已报道的来源于人脑的 PEP<sup>[13]</sup> 能够被  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  所抑制相一致。而  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  则没有任何影响。

2.6.2  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  对 PEP 抑制机理

在含不同浓度  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的体系中，PEP 浓度与酶活的关系为一组通过原点的直线，说明  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  对酶是可逆抑制作用。它们的存在并没有减少有效酶量，只是导致酶活力被抑制。进一步固定 PEP 浓度，改变底物 Suc - Gly - Pro - MCA 浓度，并增加抑制剂浓度，通过双倒数作图分析，结果如图 10 所示。以  $1/[V]$  和  $1/[S]$  作图为一组相交于第二象限的直线，横轴截距和纵轴截距都因抑制剂浓度的变化而改变， $K_{\text{max}}$  随着抑制剂浓度的增大而增大，最大反应速率随着抑制剂浓度的增大而减小，如表 3 所示，说明这两种金属离子抑制剂对 PEP 的抑制作用均为混合型效应。增加抑制剂浓度导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制，催化效率降低，而不是通过减少有效酶量导致酶活力下降。

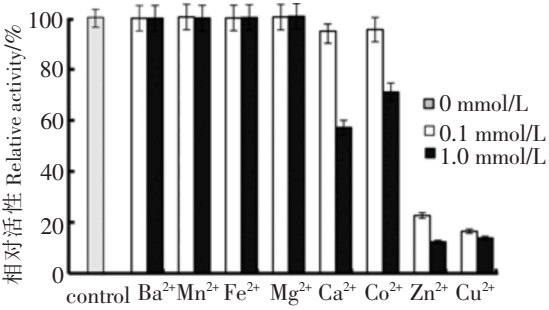
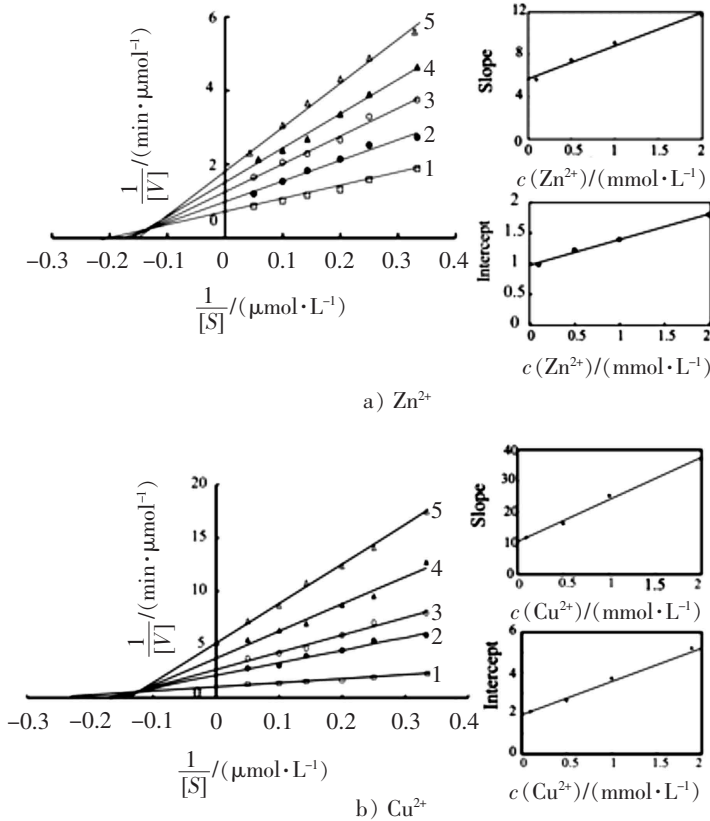


图 9 金属离子对 PEP 的作用

Fig.9 Effect of metal ions on the activity of prolyl endopeptidase



说明 Notes: 1—0 mmol/L; 2—0.1 mmol/L; 3—0.5 mmol/L; 4—1 mmol/L; 5—2 mmol/L。

图 10  $\text{Zn}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 对 PEP 的抑制类型和抑制常数测定

Fig.10 The inhibition type and concentration of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$

表 3 Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 浓度对  $K_{\max}$  和  $V_{\max}$  值的影响  
Tab.3 Effect of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> concentrations on  $K_{\max}$  and  $V_{\max}$  values

金属离子 Metal ion	浓度 Concentration /(mmol · L <sup>-1</sup> )	$K_m$ /(mmol · L <sup>-1</sup> )	$V_{\max}$ /(μmol · min <sup>-1</sup> )
Zn <sup>2+</sup>	0.0	5.52	1.38
	0.1	5.72	1.02
	0.5	6.13	0.82
	1.0	6.55	0.72
	2.0	6.57	0.56
Cu <sup>2+</sup>	0.0	5.44	0.55
	0.1	5.69	0.48
	0.5	6.19	0.38
	1.0	6.83	0.27
	2.0	7.06	0.19

Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 作为重金属离子, 高浓度会使蛋白酶空间构象改变导致蛋白质变性, 它们的抑制可能是由于能够对活性中心进行干扰所致。以斜率和纵轴截距分别再对抑制剂浓度作图, 可求得抑制剂 Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对游离酶的抑制常数 ( $K_I$ ) 分别为 1.80 mmol/L 和 0.07 mmol/L, 说明 Cu<sup>2+</sup> 对酶的抑制作用强于 Zn<sup>2+</sup>。对酶-底物络合物的抑制常数 ( $K_{IS}$ ) 为 2.33 mmol/L 和 1.17 mmol/L。 $K_{IS}$  反映抑制剂与酶-底物络合物结合能力的一个常数。因为 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 对酶是混合性抑制, 所以它们与酶的结合能力比与酶-底物络合物的结合能力更强。

3 结论

本文从罗非鱼肌肉中分离纯化得到分子质量约为 85 ku 的 PEP, 并详细研究了其酶学性质, 得到:

1) 最适温度为 35 ℃, 热稳定性差; 最适 pH 值为 6.5, 在 pH 值为 5.5 ~ 8.0 时, 酶活性稳定; PEP 的活化能为 47.42 kJ/mol; PEP 能专一性水解多肽中脯氨酸残基的羧基端肽键, 但 PEP 对长度超过 30 个氨基酸的小肽不产生分解。

2) PEP 专一性抑制剂 SUAM-14746 完全抑制该酶的活性, 对 PEP 表现为竞争性抑制作用。金属离子 Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 强烈抑制该酶活性且对 PEP 的抑制类型均为混合型抑制。

3) 胶原小肽降解结果提示, PEP 通过特异分解胶原蛋白小肽脯氨酸残基从而参与鱼胶原蛋白的新陈代谢。

[ 参考文献 ]

[1] LUOTO S, JIANG Z, 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: 504-509. DOI:10.1016/j.jcs.2012.06.004.

[2] CAPIRALLA H, HIROI T, HIROKAWA T, et al. Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from Halobacteriumhalobium S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2002, 38(4): 571-579. DOI:10.1016/S0032-9592(02)00180-2.

[3] PHELAN M, AHERNE A, FITZGERALD R J, et al. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status [J]. International Dairy Journal, 2009, 19(11): 643-654. DOI:10.1016/j.idairyj.2009.06.001.

[4] 康超. 新型食品级脯氨酰内肽酶生产菌筛选、异源表达及分子改造研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015.

[5] MARUYAMA S, NAKAGOMI K, TOMIZUKA N. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein [J]. Agriculture Biology Chemistry, 1985, 49(5): 1405-1409. DOI:10.1271/bbb1961.49.2809.

- [6] ROSENBLUM J S, KOZARICH J W. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(4): 496-594. DOI:10.1016/S1367-5931(03)00084-X.
- [7] ARENTZ-HANSEN H, FLECKENSTEIN B, JUNG G. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(3): 803-809. DOI:10.1053/gast.2002.35381.
- [8] POLGAR L. Structure-function of prolyl oligopeptidase and its role in neurological disorders [J]. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 2002, 2(4): 251-257. DOI:10.2174/1568015023357860.
- [9] 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.
- [10] YOSHIDA K, INABA K, OHTAKE H, et al. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from the Pacific herring, *Clupea pallasii*, and its role in the activation of sperm motility [J]. *Development Growth & Differentiation*, 1999, 41(2): 217-225. DOI:10.1046/j.1440-169x.1999.00424.x.
- [11] LAEMMLI U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [12] KALWANT S, PORTER A G. Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase [J]. *Biochemical Journal*, 1991, 276(1): 237-244. DOI:10.1042/bj2760237.
- [13] MORIYAMA A, NAKANISHI M, SASAKI M. Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1988, 17(20): 4139-4144.
- [14] YOSHIMOTO T, NISHIMURA T, KITA T, et al. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain [J]. *Journal of Biochemistry*, 1983, 94(4): 1179-1190.
- [15] SZWAJECER-DEY E, RASMUSSEN J, MELDAL M, et al. Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* sp [J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(8): 2454-2459.
- [16] WU G P, CHEN S H, LIU G M, et al. Purification and characterization of a collagenolytic serine proteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010, 155B(3): 281-287.
- [17] 曹敏杰, 张玲, 王慈. 鱼类基质金属蛋白酶研究进展 [J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2014, 19(5): 321-329.
- [18] LADRAT C, VERREZ-BAGNIS V, NOEL J, et al. Milli-calpain from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activity and activation in vitro [J]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(1): 51-62. DOI:10.1007/s1012601-0075-5.
- [19] XU C, WANG C, CAI Q F, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) plays a critical role in the softening of common carp muscle during chilled storage by degradation of type I and V collagens [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(51): 10948-10956. DOI:10.1021/acs.jafc.5b03893.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)