

皱纹盘鲍亮氨酸氨肽酶基因 cDNA 克隆及表达分析

胡健健¹, 陈玉磊¹, 段雪昆¹, 李越¹, 张凌晶^{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. 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] 利用 PCR 和 RACE 技术从皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 肌肉中克隆亮氨酸氨肽酶基因 cDNA 序列, 并对其结构进行分析。皱纹盘鲍亮氨酸氨肽酶 (*Haliotis discus hannai* leucine aminopeptidase, Hdh-LAP) cDNA 全长共 3251 bp, 包含 5' 非编码区 (5'UTR) 56 bp, 3' 非编码区 (3'UTR) 651 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 2544 bp, 共编码 847 个氨基酸残基。多序列比对结果显示, 该氨基酸序列与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、霸王莲花青螺 (*Lottia gigantea*)、囊舌虫 (*Saccoglossus kowalevskii*) 的亮氨酸氨肽酶序列相似性分别为 85%、68% 和 61%。预测 Hdh-LAP 基因编码蛋白质的相对分子质量为 95.09 ku, 理论等电点为 5.16。Hdh-LAP 蛋白质的二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 其中 α -螺旋占 38.02%, 无规则卷曲占 30.11%, β -折叠占 22.43%, β -转角占 9.45%。Hdh-LAP 主要分布在细胞质 (59.2%)、线粒体 (10.0%) 和溶酶体 (10%) 中, 推测其可能在能量代谢和辅因子的生物合成过程中发挥信号转导和转录因子调控的作用。系统发育关系分析结果显示, Hdh-LAP 与牡蛎亮氨酸氨肽酶关系最近。荧光定量 PCR 结果表明, Hdh-LAP 基因在鲍肌肉、肝胰腺、性腺、血淋巴细胞、腮、外套膜等 6 个组织中均有表达, 在血淋巴细胞中表达量最高, 肌肉次之, 性腺最少。

[关键词] 皱纹盘鲍; 亮氨酸氨肽酶; cDNA 克隆; 生物信息学

[中图分类号] Q 785; S 917.4

Full-length cDNA Cloning and Expression Analysis of a Leucine Aminopeptidase from *Haliotis discus hannai*

HU Jianjian¹, CHEN Yulei¹, DUAN Xuekun¹, LI Yue¹, ZHANG Lingjing^{1,2},
LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2}

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

2. National and Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: The full-length cDNA of a leucine aminopeptidase from abalone (*Haliotis discus hannai*) (Hdh-LAP) was cloned by PCR and RACE technology. The full length of Hdh-LAP gene was 3251 bp, which included a 5' untranslated region (UTR) of 56 bp, a 3'UTR of 651 bp and an open reading frame(ORF) of 2544 bp coding 847 amino acid residues with an estimated molecular weight of 95.09 ku and a theoretical isoelectric point of 5.16. Interestingly, the amino acid sequences of Hdh-LAP showed a high degree of identity (85%) to those of *Crassostrea gigas* and lower degree of identities(68% and 61%) to those of *Lottia gigantea* and *Saccoglossus kowalevskii*.

[收稿日期] 2017-06-15

[修回日期] 2017-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31471640); 海洋公益性行业科研专项项目 (201305015); 厦门南方海洋研究中心项目 (14CZP030HJ04)

[作者简介] 胡健健 (1989—), 男, 硕士生, 从事水生动物先天免疫研究。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。

The secondary structure of Hdh-LAP was mainly composed of α -helices(38.02%) and random coil(30.11%). Sub-cellular localization analysis revealed that Hdh-LAP was mainly distributed in the cytoplasm(59.2%), mitochondria (10%) and lysosome(10%), indicating that Hdh-LAP may play a role in signal transduction and transcriptional regulation in the energy metabolism and cofactor biosynthesis. Phylogenetic analysis exhibited that Hdh-LAP was closely related to LAP from *Crassostrea gigas*. Quantitative real-time PCR (qPCR) showed that LAP gene was expressed in all tissues, with highest expression levels in the hemocytes and muscle, while barely detectable in the hepatopancreas, gills, mantle and gonad.

Keywords: *Halotis discus hannai*; leucine aminopeptidase; cDNA cloning; bioinformatics

0 引言

氨肽酶 (aminopeptidase) 属于 M1 肽酶家族 (peptidase family M1), 是一类从蛋白质或肽链的 N 端选择性切割氨基酸残基的锌离子依赖型外肽酶^[1]。氨肽酶分子含有一个跨膜结构, 以同源二聚体形式存在于细胞膜上^[2]。根据氨肽酶水解 N 端氨基酸残基专一性程度的不同, 可将氨肽酶分为 2 类: 一类氨肽酶具有严格的底物专一性, 只能对一种或几种氨基酸残基特异性地水解; 另一类氨肽酶对肽链末端氨基酸残基的专一性低, 可以水解几乎所有的氨基酸残基^[3]。

亮氨酸氨肽酶 (leucine aminopeptidase, LAP) 是一类对蛋白质或多肽链 N 端氨基酸残基切割效率最高的氨肽酶。它是一种锌离子依赖型金属外肽酶, 通常具有较为广泛的底物特异性, 其 N 端具有一个催化口袋结构, 使氨基酸残基从肽链的 N 端依次被水解释放出来, 且偏好水解中性氨基酸残基^[4]。由于其具有水解蛋白质的高效性、底物的广泛性、结构的特异性等特点, LAP 是氨肽酶家族最具有代表性的成员之一^[5]。氨肽酶水解出的游离氨基酸是动物性食品中主要的呈味物质, 因此在食品加工中也已成为重要的研究对象^[6-8]。在前期的研究中发现, 皱纹盘鲍 (*Halotis discus hannai*) 肌肉中富含胶原蛋白^[9], 而且克隆出了特异分解胶原蛋白的基质金属蛋白酶-1 基因^[10]。一般地, 参与动物肌肉新陈代谢的基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶等内切酶只能将高分子质量的蛋白质降解为低分子质量的小肽, 而进一步将小肽降解为游离氨基酸则需要氨肽酶的参与。目前, 关于水产动物氨肽酶的研究主要集中在鱼类, 如: 阿拉斯加鳕 (*Theragra chalcogramma*)^[11]、黄鳍金枪鱼 (*Thunnus albacares*)^[12] 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[13] 中的氨肽酶已被成功分离纯化; 太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的氨肽酶基因被克隆^[14]。这些研究为进一步深入了解氨肽酶特性及其功能奠定了基础。但是, 关于重要经济贝类鲍鱼肌肉中是否存在氨肽酶的研究尚未见报道。随着营养学和水产加工研究的不断发展, 使用分子生物学的方法研究水产动物蛋白质代谢机理已成为重要的手段。本文拟以我国高产的皱纹盘鲍为对象, 克隆 LAP 基因全序列, 对其生物功能和结构特性进行分析。进一步利用实时荧光定量 PCR 对 LAP 基因在皱纹盘鲍不同组织中的表达水平进行研究, 并初步预测影响 LAP 底物特异性的关键位点, 为了解皱纹盘鲍氨肽酶的结构和功能提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜活皱纹盘鲍购于福建厦门集美市场, 选取质量 (38.0 ± 2.0) g、长度 (58.22 ± 2.71) mm 的皱纹盘鲍, 饲养于集美大学水产养殖基地。

基因克隆的材料取自于皱纹盘鲍肌肉组织; 荧光定量的材料取自于皱纹盘鲍肌肉、肝胰腺、性腺、血淋巴细胞、鳃、外套膜。

1.2 主要试剂

总 RNA 试剂购自 Roche; PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA 合成试剂、RACE 试剂盒、rTaq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、T₄ DNA 连接酶、DL2000 DNA Marker、限制性内切酶 *Nde* I、*Eco*R I 等均购自

宝生物(大连)有限公司;质粒小提试剂盒和 Universal DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;大肠杆菌 Top10、TransScript[®]All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (one-step gDNA removal) 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1) 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 按 cDNA 合成试剂盒提供的方法提取各组织(肌肉、肝胰腺、血淋巴细胞、鳃、性腺、外套膜)的总 RNA。使用质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物的完整性,使用 NanoDrop ND1000 紫外分光光度计检测纯度。利用全式金 TransScript[®]试剂盒合成用于荧光定量 PCR 的 cDNA。用于 5'RACE 和 3'RACE 的 cDNA 模板依据 SMART[™]RACE cDNA Amplification Kit 的说明进行合成。

2) 皱纹盘鲍 Hdh-LAP 基因克隆 通过比对太平洋牡蛎(*C. gigas*, XP_011456155.1)、霸王莲花青螺(*Lottia gigantea*, XP_009061355.1)、囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*, NP_001171778.1)和安水金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis*, XP_016324005.1)的 LAP 基因序列,找到 LAP 基因同源保守区域。用 Primer 5.0 软件在 LAP 基因保守区域内设计 PCR 引物(见表 1),以皱纹盘鲍肌肉 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增反应体系(25 μL): ddH₂O 17.2 μL, 10 × buffer 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL, LAP-F 1.0 μL, LAP-R 1.0 μL, 模板 cDNA 1.0 μL, Taq 酶 0.3 μL。PCR 扩增条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 30 次;最后 72 ℃ 延伸 7 min。反应完成后,将 5 μL 扩增产物上样于质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶,并进行电泳检测(100 V)。扩增产物经纯化回收后,送上海英潍捷基生物公司测序。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Usage
LAP-F	CAAAGAATACTTTGGCATTCCGTA	中间片段 Middle fragments
LAP-R	TCCTCCTTTGTATCTTTTCGTGTAGC	中间片段 Middle fragments
LAP-5'-RACE-outer	AAGTCTGCAAGAGCAATAAGATCCA	5'-RACE
LAP-5'-RACE-inner	AACTGTGTCCGAATGTCAAACCTCT	5'-RACE
LAP-3'-RACE-outer	AACTGTTCAAGGCAGAGAACTC	3'-RACE
LAP-3'-RACE-inner	AAAAGGTTCGAAAATCACGTGTCAG	3'-RACE
LAP-qPCR-F	AAACTCCCAACTCACTCGCTTATTC	荧光定量 Fluorescence quantitative
LAP-qPCR-R	TTTACAAATGCCTGTTTATTGGTGC	荧光定量 Fluorescence quantitative
EF1α-F	GTTGGTGAGTTTGAAGCTGGTA	内参基因 Reference gene
EF1α-R	AAATCGTGCCTCAGAGTATGGT	内参基因 Reference gene

3) cDNA 末端快速扩增(RACE) 采用巢式 PCR 进行 3'和 5'末端序列的扩增。扩增反应体系(25 μL): ddH₂O 17.2 μL, 10 × buffer 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL, LAP-F 1.0 μL, LAP-R 1.0 μL, 模板 cDNA 1.0 μL, Taq 酶 0.3 μL。PCR 扩增条件如下: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 30 次;最后 72 ℃ 延伸 7 min。产物经琼脂糖凝胶电泳验证后,利用 DNA 回收试剂盒纯化回收并与 pMD18-T 载体连接,后转化大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性菌落,使用 PCR 验证并送上海英潍捷基生物公司测序。

4) 序列分析 使用 DNASTar 5.0 拼接测序结果,得到 Hdh-LAP 基因的 cDNA 全长,并预测基因的开放阅读框(ORF)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)。通过 PortParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析氨基酸序列的理化性质,通过 ExPASy (<http://web.expasy.org/protscale/>)分析蛋白质的疏水性。使用 UCL (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)预测蛋白质的二级结构,利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)分析蛋白质的三级结构,通过 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析蛋白质的信号肽。通过 <http://psort.hgc.jp/form.html> 预测蛋白质的亚细胞定位,使用 Mega 6.0 软件(Neighbor-Joining 法)构建系统进化树。

Server 软件分析, Hdh-LAP 基因编码的氨基酸序列不存在信号肽。结构域分析结果表明, 该蛋白质包含 N 端胞浆区域、跨膜区域、催化口袋区域和 C 端 α 区域, 具有 LAP 的典型特征。

2.2 Hdh-LAP 蛋白质特性和结构分析

根据 ProtParam tool 预测 Hdh-LAP 基因编码蛋白质的相对分子质量为 95.09 ku, 理论等电点为 5.16。运用 softberry 在线预测其二级结构, 结果表明, Hdh-LAP 蛋白质主要由 4 种二级结构元件组成, 其中 α -螺旋占 38.02%, 无规则卷曲占 30.11%, β -折叠占 22.43%, β -转角占 9.45%。运用 PortSoale 软件分析 Hdh-LAP 蛋白质疏水性, 结果显示, 该蛋白质疏水值 (grandaverage of hydrophobicity) 为 -0.291, 所以 Hdh-LAP 是亲水性蛋白质 (见图 2)。

利用同源建模法 SWISS-MODEL 对 Hdh-LAP 进行结构建模 (见图 3a), 选取 PDB 数据库中 与目的蛋白序列一致性为 32.81% 的猪 LAP (PDB: 4 hom) 作为建模模板, 模拟 Hdh-LAP 酶原的三级结构, 根据该蛋白质三级结构确定其锌离子结合区 (见图 3b)、C 端 α 区域 (见图 3c) 和催化口袋区域 (见图 3d)。

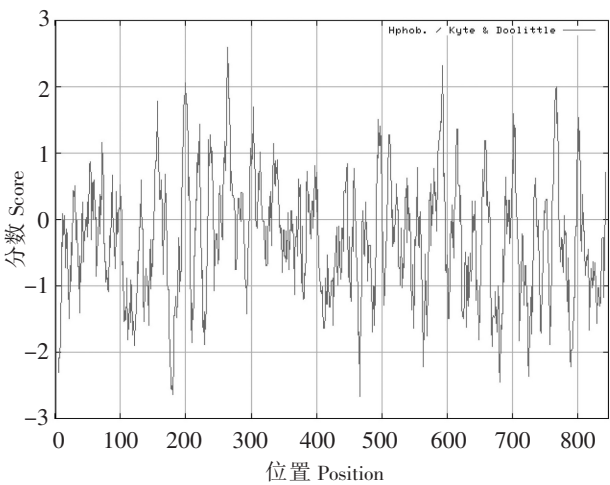


图 2 Hdh-LAP 的疏水性预测
Fig.2 Hydrophobicity analysis of Hdh-LAP

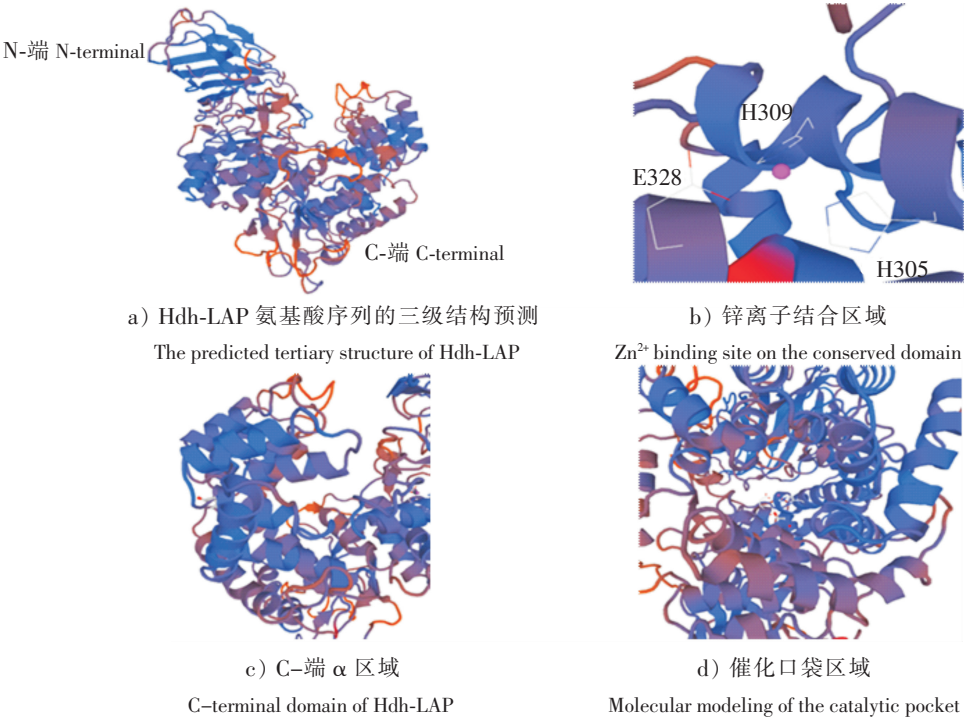
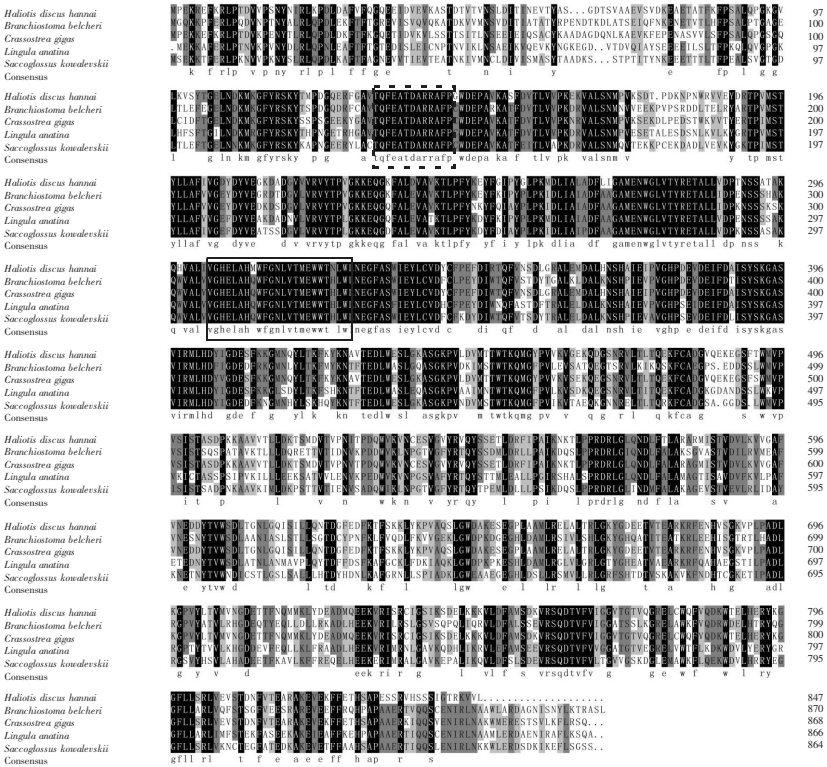


图 3 Hdh-LAP 的三级结构预测

Fig.3 The predicted tertiary structure of leucine aminopeptidase in *Haliotis discus hannai*

2.3 Hdh-LAP 氨基酸序列比对及序列相似性分析

使用 DNAMAN 4.0 软件对不同物种 Hdh-LAP 的氨基酸序列进行比对, 结果表明, Hdh-LAP 与太平洋牡蛎、霸王莲花青螺和囊舌虫的 LAP 序列相似性分别为 85%、68% 和 61%。在几种无脊椎软体动物间, LAP 的氨基酸序列在催化区与锌离子结合区具有很高的保守性 (见图 4)。



说明：虚线方框所示为催化区活性中心，实线方框所示为锌离子结合区。不同物种 LAP 的多序列比对：皱纹盘鲍(A-PA21554.1)、文昌鱼(XP_019614237.1)、太平洋牡蛎(XP_019917982.1)、舌形贝(XP_013406992.1)、囊舌虫(NP_001171778.1)。

Notes:The catalytic active site was shown by dotted box; Zn^{2+} binding site on conserved domain was shown by box. GenBank accession number of sequences used for alignment: *Haliotis discus hannai* (APA21554.1), *Branchiostoma belcheri* (XP_019614237.1), *Crassostrea gigas* (XP_019917982.1), *Lingula anatina*(XP_013406992.1),*Saccoglossus kowalevskii*(NP_001171778.1).

图 4 Hdh-LAP 氨基酸序列与其他动物 LAP 的多序列比对

Fig.4 The multiple sequence alignment of LAP from abalone with those from other mollusks

2.4 Hdh-LAP 的进化分析

使用 Mega 6.0 软件对不同物种 LAP 的氨基酸序列进行聚类分析，并建立系统进化树（见图 5）。结果显示，进化树主要分为 3 个大支，其中：安水金线鲃（*Sinocyclocheilus anshuiensis*）和犀角金线鲃（*Sinocyclocheilus rhinoceros*）为一个亚支，单峰骆驼（*Camelus dromedarius*）和金钱豹（*Panthera pardus*）为一个亚支，绒毛丝鼠（*Chinchilla lanigera*）、星鼻鼹鼠（*Condylura cristata*）和安乐蜥

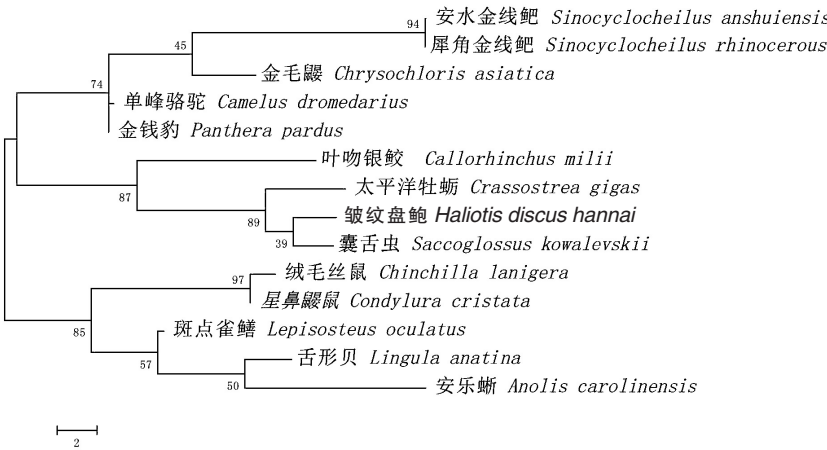


图 5 皱纹盘鲍 LAP 与其他物种 LAP 的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree depicting the relationship of HP-LAP with those from other species

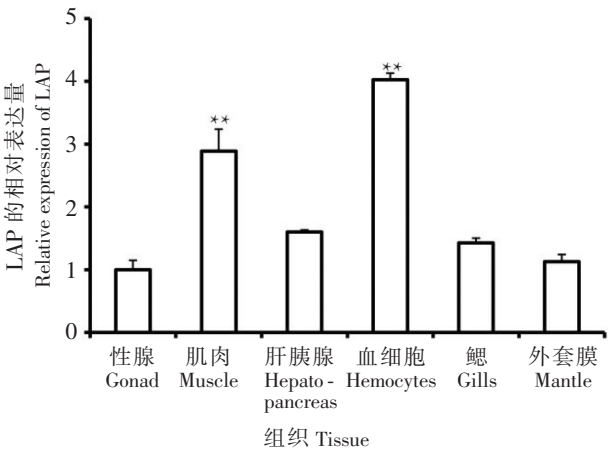
(*Anolis carolinensis*) , 舌形贝 (*Lingula anatina*) 和斑点雀鳢 (*Lepisosteus oculatus*) 为一个亚支; 太平洋牡蛎、皱纹盘鲍和囊舌虫为一个亚支; 叶吻银鲛 (*Callorhynchus milii*) 单独为一个亚支。而皱纹盘鲍、太平洋牡蛎和囊舌虫都属于软体动物, 这与传统的分类结果相吻合。

2.5 Hdh-LAP 基因在不同组织中的相对表达量分析

对基因进行组织定量检测是研究基因功能的一种重要手段。利用荧光定量 PCR 检测 Hdh-LAP 基因在皱纹盘鲍肌肉、性腺、肝胰腺、血细胞、外套膜和鳃组织中的相对表达量。结果表明, Hdh-LAP 基因在所有组织中均有表达, 在血细胞中的相对表达量最高, 其次是肌肉, 而性腺中的相对表达量最低 (见图 6)。血细胞中最高的 LAP 基因表达可能与该酶参与皱纹盘鲍先天性免疫有关, 肌肉中较高的该基因表达可能与其呈味有关。

2.6 突变位点的确定

通过对 Hdh-LAP 的三级结构分析, 显示催化口袋区域是该蛋白质分子的核心及主要催化区域, 推测与该酶的底物特异性有关。因此, 探讨了催化口袋结构域中可能决定 LAP 催化活性的氨基酸残基。Ogawa 等^[15]通过模拟催化口袋及定点突变的方式, 确定了 Gln169 和 Asp406 位点是决定人氨肽酶 B (APB) 切割碱性氨基酸偏好性的关键位点。Hattorid 等^[16]确定 M1 家族中内质网氨肽酶 1 (ER-API) 的 Gln181 位点赋予酶对碱性氨基酸的偏好性。对 LAP 催化区三级结构分析发现, Gln132 和 Asp265 是该酶口袋催化区的关键位点 (见图 7)。为进一步验证这 2 个氨基酸残基是不是关键位点以及突变后对酶活力的影响, 今后拟将原核表达克隆得到 LAP 催化区域, 并对 Gln132 和 Asp265 进行定点突变。LAP 对各种氨肽酶荧光底物均有不同程度水解, 而对 Leu 水解效率最高, 其次是 Phe 和 Lys^[17]。通过定点突变改变 LAP 水解底物的偏好性和特异性, 有望提高重组表达 Hdh-LAP 对其他氨基酸特别是呈味氨基酸的水解效率。



说明: “*”表示差异显著 ($P<0.05$); “**”表示差异极显著 ($P<0.05$)。Notes: “*”indicated significant difference; “**”indicated extremely significant difference.

图 6 Hdh-LAP 基因在皱纹盘鲍不同组织中的相对表达量

Fig.6 Expression analysis of Hdh-LAP gene in different tissues of abalone

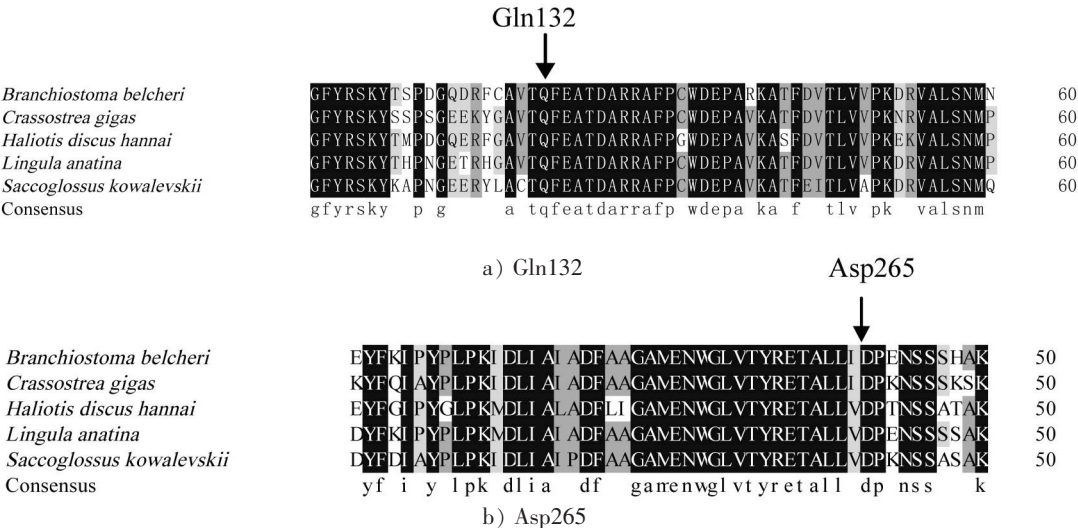


图 7 Hdh-LAP 与氨肽酶 M1 家族的关键位点 Gln132 和 Asp265 比对

Fig.7 Alignment of sequences around Gln132 and Asp265 of Hdh-LAP with other mollusks of the M1 family of aminopeptidases

3 讨论

通过对已报道的与皱纹盘鲍亲缘关系较近物种的 LAP 基因序列进行多序列比对, 找到较为保守的区域并设计兼并引物。使用 PCR 和 RACE 技术从皱纹盘鲍肌肉组织中克隆得到 LAP 基因 cDNA 全长共 3251 bp, 包含 5'UTR 56 bp, 3'UTR 651 bp, 开放阅读框 (ORF) 2544 bp, 共编码 847 个氨基酸残基。此外, 对 Hdh-LAP 序列特征及功能进行了初步分析。通过氨基酸多序列比对和系统进化树分析, 结果表明, 皱纹盘鲍与太平洋牡蛎亲缘关系最近。此外, Hdh-LAP 是一种亲水性蛋白酶, 具有锌离子结合域和较广泛的底物特异性。

氨肽酶是膜型金属酶, 能在 N 末端水解肽、酰胺或芳酰胺而释放出氨基酸。氨肽酶蛋白质主要由 4 个结构域组成, 分别是 N 端 β -区域、催化区域、中间的 β -区域和 C 端 α 区域。在催化区域, 有一段在 M1 家族中高度保守的锌离子螯合氨基酸序列 HEXXH (X)₁₈E^[18], 这段序列由 6~7 个外显子编码, 从而确保氨肽酶的活性。在氨肽酶活性中心, His298 和 His305 的 N 原子, Glu319 的羧基 O 原子以及一个水分子, 与锌离子螯合形成四面体结构^[19]。这些结构组成了 LAP 的完整三级结构, 并决定了 LAP 的生物活性。在蛋白质 N 端氨基酸残基水解过程中, 与锌离子配位的第一个水分子作为底物的亲核试剂, 通过与氨肽酶 Glu281 位点形成氢键, 从而增强其亲核性。当反应物形成 Michaelis 复合物后, 这个水分子便会对底物的肽键羰基碳进行亲核的进攻, 从而引发水解反应^[20]。

肌肉组织包括多种细胞内降解机制, 主要包括泛素-蛋白酶体途径、溶酶体途径和钙激活蛋白酶途径等^[21]。皱纹盘鲍死后, 内切酶、羧肽酶、氨肽酶等共同参与肌肉组织的分解。为了探究 Hdh-LAP 基因在皱纹盘鲍中的生物学功能, 利用荧光定量 PCR 技术对 Hdh-LAP 基因在肌肉、肝胰腺、鳃、外套膜、血淋巴细胞、性腺等组织中的相对表达量进行定量分析。结果显示, Hdh-LAP 基因在血淋巴细胞中的表达量最高, 肌肉次之, 在性腺中的表达量最低。推测该酶与皱纹盘鲍的免疫调控有密切关系。

尽管 LAP 在其他水产动物特别是鱼类中已有较多研究, 但对重要贝类皱纹盘鲍 LAP 的研究未见报道。本文克隆得到 LAP 基因全长, 通过生物信息学分析和荧光定量 PCR 技术, 对其生理功能、结构特点及其在生物体内催化蛋白质降解的分子机理进行了初步研究。今后拟通过定点突变实验, 检测 Gln132 和 Asp265 位点是否为影响 Hdh-LAP 底物特异性的关键位点, 为进一步深入了解皱纹盘鲍中氨肽酶的生理功能奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] SANZ Y. Aminopeptidases [M]. Amsterdam: Springer Netherlands, 2007: 243-260.
- [2] WONG A H, ZHOU D, RINI J M. The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(44): 36804-36816. DOI:10.1074/jbc.M112.398842.
- [3] TAYLOR A. Aminopeptidases: towards a mechanism of action [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1993, 18(5): 167.
- [4] MATSUI M, FOWLER J H, WALLING L L. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function [J]. Biological Chemistry, 2006, 387(12): 1535-1544. DOI:10.1515/BC.2006.191.
- [5] NISHIMURA T, OKITANI A, RHYU M R, et al. Survey of neutral aminopeptidases in bovine, porcine, and chicken skeletal muscles [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 2014, 54(11): 2769-2775. DOI:10.1271/abb1961.54.2769.
- [6] TOLDRA F, FLORES M. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1998, 38(4): 331-352. DOI: 10.1080/10408699891274237.

- [7] CADEL S, DARMON C, PERNIER J, et al. The M1 family of vertebrate aminopeptidases: role of evolutionarily conserved tyrosines in the enzymatic mechanism of aminopeptidase B [J]. *Biochimie*, 2015, 109: 67-77. DOI:10.1016/j.biochi.2014.12.009.
- [8] CHEN X, WU G P, CAI Q F, et al. Biochemical characterization of an aminopeptidase with highest preference for lysine from Japanese flounder skeletal muscle [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130: 679-686. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.07.109.
- [9] 游银川, 麻金花, 段雪昆, 等. 皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白的性质研究及抗体制备 [J]. *水产学报*, 2016, 40(2): 123-133.
- [10] 段雪昆, 杜翠红, 胡健健, 等. 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 基质金属蛋白酶-1 基因 cDNA 的克隆及原核表达 [J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2016, 21(5): 321-329.
- [11] CHIOU T K, MATSUI T, KONOSU S. Purification and properties of an aminopeptidase from Alaska pollack, *Theragra chalcogramma*, roe [J]. *Journal of Biochemistry*, 1989, 105(4): 505-509. DOI:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122696.
- [12] HAJJOU M, LE G Y. Purification and characterization of an aminopeptidase from tuna (*Thunnus albacares*) pyloric caeca [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1204(1): 1-13. DOI:10.1016/0167-4838(94)90025-6.
- [13] 刘冰心, 曹敏杰, 蔡秋凤, 等. 草鱼肌肉亮氨酸氨肽酶的分离纯化与性质研究 [J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2008, 13(1): 24-29.
- [14] WHARAM S D, WARDILL T J, GODDARD V, et al. A leucine aminopeptidase gene of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exhibits an unusually high level of sequence variation, predicted to affect structure, and hence activity, of the enzyme [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2009, 27:1143-1154. DOI:10.2983/0730-8000-27.5.1143.
- [15] OGAWA Y, OHNISHI A, GOTO Y, et al. Role of glutamine-169 in the substrate recognition of human aminopeptidase B [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(6): 1872-1881. DOI:10.1016/j.bbagen.2014.01.002.
- [16] HATTORI A. Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1 [J]. *Biochemical Journal*, 2008, 416(1): 109-116. DOI:10.1042/BJ20080965.
- [17] 孙莎. 皱纹盘鲍肌肉氨肽酶的酶学特性及呈味作用研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2016.
- [18] ITO K, NAKAJIMA Y, ONOHARA Y, et al. Crystal structure of aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from *Escherichia coli* and conformational change of methionine 260 involved in substrate recognition [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(44): 33664-33676. DOI:10.1074/jbc.M605203200.
- [19] JIANG W, BOND J S. Families of metalloendopeptidases and their relationships [J]. *FEBS Letters*, 1992, 312(2/3): 110. DOI:10.1016/0014-5793(92)80916-5.
- [20] HOOPER N M. Families of zinc metalloproteases [J]. *FEBS Letters*, 1994, 354(1): 1-6. DOI:10.1016/0014-5793(94)01079-X.
- [21] POLGE C, ATTAIX D, TAILLANDIER D. Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy [J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6:59. DOI:10.3389/fphys.2015.00059.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)