

# 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

唐俊<sup>1</sup>, 颜龙杰<sup>1</sup>, 翁凌<sup>1,2</sup>, 孙乐常<sup>1,2</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. 福建省水产品深加工工程研究中心, 福建厦门 361021)

**摘要:** 以蓝圆鲹为研究对象, 探讨脯氨酸内肽酶 (Prolyl endopeptidase, PEP) 对鱼类肌肉胶原蛋白的作用及其机理。通过硫酸铵分级盐析, DEAE-Sephacel 阴离子交换, Phenyl-Sepharose 疏水层析和 Q-Sepharose 阴离子交换, 从蓝圆鲹骨骼肌中分离纯化得到一种脯氨酸内肽酶。SDS-PAGE 结果显示, PEP 的分子量为 82 ku, 肽质量指纹图谱分析得到 16 个肽片段, 共 169 个氨基酸残基。片段序列与墨西哥鲷鱼 (*Neolamprologus brichardi*) PEP 的同源性达 98.8%, 证明纯化得到的酶是 PEP。PEP 的最适温度为 35 °C, 但热稳定性较差; 最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0~7.5 之间有较好的稳定性。将 PEP 与合成的鱼胶原蛋白小肽反应, 利用反相高效液相色谱对产物进行分离, 电喷雾质谱分析结果显示 PEP 的水解位点在脯氨酸残基的羧基端。以上结果表明, 鱼类肌肉中的 PEP 能够协同金属蛋白酶, 通过切割脯氨酸残基进一步降解胶原小肽从而参与到鱼肌肉胶原蛋白的新陈代谢中, 是鱼死后参与胶原蛋白降解的重要酶类。

**关键词:** 蓝圆鲹; 骨骼肌; 脯氨酸内肽酶; 纯化; 胶原蛋白小肽; 液相色谱-电喷雾质谱联用法

文章编号: 1673-9078(2016)6-122-129

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.020

## Purification and Characterization of a Prolyl Endopeptidase from Round Scad (*Decapterus maruadsi*) Skeletal Muscle and Its Role in Collagen Degradation

TANG Jun<sup>1</sup>, YAN Long-jie<sup>1</sup>, WENG Ling<sup>1,2</sup>, SUN Le-chang<sup>1,2</sup>, LIU Guang-ming<sup>1,2</sup>, CAO Min-jie<sup>1,2</sup>

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

(2.Engineering Research Center for Aquatic Products Processing of Fujian Province, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The action and mechanism of a prolyl endopeptidase (PEP) isolated from round scad was explored. The PEP was obtained from the skeletal muscle of blue scad via separation and purification by ammonium sulfate fractionation and a series of column chromatographies, including anion-exchange chromatography using a DEAE-Sephacel column, hydrophobic interaction chromatography using a Phenyl-Sepharose column, and anion-exchange chromatography using a Q-Sepharose column. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) results showed that the molecular weight of the PEP was 82 kDa. Peptide mass fingerprinting revealed that there were 16 peptide fragments, including a total of 169 amino acid residues. The sequence homology between the obtained peptide fragment and PEP from *Neolamprologus brichardi* was 98.8%, suggesting the purified enzyme was indeed a PEP. The PEP had an optimal temperature of 35 °C, but showed poor thermal stability. The optimal pH of the purified enzyme was 6.0, and good stability was observed in the pH range of 5.0 to 7.5. Purified PEP was allowed to react with three synthetic fish collagen peptides, then the degraded peptides were further separated by reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) results showed that the PEP hydrolysis site was at the carboxyl terminus of prolyl residues. The results indicate that PEP in fish muscle can collaborate with matrix metalloproteinases to further degrade collagen peptides by cleaving peptide bonds at the carboxyl side of prolyl residues, thus participating in the metabolism of fish muscle collagen. PEP is an important enzyme that participates in post-mortem fish collagen degradation.

**Key words:** round scad; skeletal muscle; prolyl endopeptidase; purification; collagen peptide; liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS)

收稿日期: 2015-08-14

基金项目: 国家自然科学基金 (31471640, 31071519); 国家科技支撑计划 (2012BAD38B09)

作者简介: 唐俊(1989-), 男, 研究生, 主要从事鱼类酶学研究; 通讯作者: 曹敏杰(1964-), 男, 教授, 研究方向为蛋白质化学、酶学、水产品深加工

脯氨酸内肽酶 [EC 3.4.21. 26] (Prolyl endopeptidase, PEP) 是丝氨酸蛋白酶家族的重要成员之一, 广泛存在于各种动物、植物和微生物等生物有机体内。PEP 是一种内切酶, 能从多肽链的羧基端特异性的水解脯氨酸残基。PEP 在生物机体中参与对一些重要蛋白质的关键肽段的加工, 具有多种生物学功能, 例如许多作为神经递质的神经肽类物质均含有脯氨酸残基, 因此, PEP 活性的异常会导致一系列神经系统障碍, 例如阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's)、健忘症 (Amnesia)、抑郁症 (Depression) 等<sup>[1]</sup>。

鱼类肌肉的软化与内源性蛋白酶的作用密切相关<sup>[2]</sup>。已有研究证明, 丝氨酸蛋白酶<sup>[3]</sup>、金属蛋白酶<sup>[4]</sup>、组织蛋白酶 L<sup>[5]</sup> 等内源性蛋白酶可以引起肌原纤维蛋白和胶原蛋白的降解。特别是内源性基质金属蛋白酶 (MMP) 对胶原蛋白的降解直接关系到肌肉的弹性下降。但是, MMP 降解胶原蛋白后产生的小肽在机体中如何进一步降解成为更小的片段从而参与新陈代谢尚未有文献作详细报道。由于胶原蛋白中富含脯氨酸残基, 因此, 作为能够特异性切割脯氨酸残基的内源性蛋白酶, PEP 在鱼肌肉生理变化过程中的作用, 特别是其是否参与到胶原蛋白的降解中, 值得探究。

在前期的研究中, 我们从淡水鲤鱼肌肉中分离了脯氨酸内肽酶并对其酶动力学等进行了研究, 但对其底物特异性, 尤其是对胶原小肽如何进行分解的探讨还不够深入<sup>[6]</sup>。由于胶原蛋白小肽对动物有较好的抗氧化活性<sup>[7]</sup>, 能够作用于胶原蛋白产生小肽的蛋白酶值得研究。但是, 海水鱼肌肉中是否存在类似 PEP 的酶, 迄今为止, 尚未有报道。

因此, 本研究拟从海水鱼蓝圆鲀肌肉中分离纯化脯氨酸内肽酶并对其相关性质进行分析, 通过反相高压液相色谱和电喷雾质谱联用技术研究其对鱼体胶原蛋白小肽降解情况和作用位点, 以期今后深入研究 PEP 在鱼类中的生理生化功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

蓝圆鲀 (*Decapterus maruadsi*) 购自厦门集美菜市场, 平均体重 30 g。经鲜度测定, 原料蓝圆鲀的 K 值为  $17.1 \pm 1.2\%$ , 新鲜度良好; 层析树脂 DEAE-Sephacel、Phenyl-Sepharose、Q-Sepharose 购自美国 GE Healthcare 公司; SDS-PAGE 用标准蛋白购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光底物 Suc-Gly-Pro-MCA 等购自日本 Peptide Institute 公司; 草鱼胶原蛋白小肽由合肥赛曼诺生物有限公司合成。

### 1.2 主要仪器设备

Avanti J-25 高速冷冻离心机 (Beckman, 美国); PT 2100 组织捣碎机 (Kinematica, 瑞典); Lambda 35 型紫外分光光度计 (Perkin Elmer, 美国); Box 凝胶成像仪 (Syngene, 美国); 蛋白质电泳装置 (Bio-Rad, 美国); FP-6200 荧光分光光度计 (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

酶在柱层析纯化过程中, 各组分的蛋白含量测定用紫外分光光度计测定其在 280 nm 处的吸光值, 根据吸光值的大小来确定蛋白的浓度, 以牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 为对照。

#### 1.3.2 PEP 活性测定

酶活性测定以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 参照 Yoshida 等<sup>[8]</sup>方法并略做修改。具体方法如下: 适当稀释的酶液 (100  $\mu\text{L}$ ) 加入至 850  $\mu\text{L}$  的 25 mmol/L 磷酸缓冲溶液中 (pH 6.0), 再加入浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的荧光合成底物 50  $\mu\text{L}$ , 在 35  $^{\circ}\text{C}$  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, 测定的激发波长和发射波长分别为 380 nm、450 nm。以不加荧光底物的样品为对照。酶活力单位 (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

将新鲜的蓝圆鲀去头, 去皮, 去内脏后, 收集其骨骼肌并切碎。切碎的骨骼肌 700 g 加入 4 倍体积的缓冲液 A (含 4 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.5) 中, 用组织捣碎机捣碎, 10,000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀取上清液, 即为粗酶液。粗酶液经 60%~80% 硫酸铵盐析后, 所得沉淀用少量的缓冲液 A 溶解, 并用相同缓冲液透析。透析后的样品上样于 DEAE-Sephacel 阴离子交换层析, 上样结束后, 用缓冲液 A 充分洗去未吸附的杂蛋白。待洗脱液的  $A_{280}$  低于 0.05 后, 用含 0~0.3 mol/L NaCl 的缓冲液 A 作线性洗脱, 以每管 5 mL 进行收集。测定洗脱样品的  $A_{280}$  和酶活力。收集酶活力较高的组分加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至终浓度 1.2 mol/L 后上样于 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱, 上样结束后用含 1.2 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的缓冲液 A 以除去杂蛋白, 然后以 1.2~0 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱, 每管收集 4 mL 洗脱样品。分别测定每管样品的蛋白含量

和酶活力,将活性部分合并,用缓冲液 A 充分透析。透析后的样品上样于 Q-Sepharose 阴离子交换柱,上样结束后用缓冲液 A 洗去未吸附蛋白,然后用含 0~0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 A 作线性梯度洗脱,每管收集 2 mL。测定各管的蛋白含量和酶活力值,得到的活性部分用 SDS-PAGE 进行纯度鉴定。

### 1.3.4 PEP 的性质分析

#### 1.3.4.1 SDS-PAGE 分析

纯化的 PEP 用浓度为 10% 的凝胶进行 SDS-PAGE 电泳分析,确定目的蛋白的分子量及纯度。

#### 1.3.4.2 肽指纹质量图谱鉴定蛋白质

纯化的 PEP 经 SDS-PAGE 电泳后,在凝胶上将蛋白条带切下,委托中科院上海生科院蛋白质组研究中心进行肽质量指纹图谱分析。将得到的数据在 NCBI nr 数据库中进行肽段序列检索,并进行蛋白质评分。

#### 1.3.4.3 最适温度和热稳定性

最适温度的测定是将酶液放置在不同温度下 (5~55 °C) 下,按照上述酶活力测定方法,不改变加酶量 (100  $\mu$ L)、底物量 (50  $\mu$ L)、底物浓度 (10  $\mu$ mol/L) 及缓冲液的 pH 值 (6.0),测定 PEP 在不同温度下的活性,从而确定其最适温度。

热稳定性的测定是将酶液加入测酶活缓冲液中,分别在 5 °C、15 °C、25 °C、35 °C、45 °C 和 55 °C 下恒温加热 30 min 后立即冷却到 4 °C,再在 35 °C 下测定其剩余活性,以此来检验酶的热稳定性。

#### 1.3.4.4 最适 pH 和 pH 稳定性

最适 pH 的测定是将酶液放置在 0.1 mol/L 的不同 pH 值缓冲液中进行酶活力测定,保持其他测定条件不变,包括加酶量 (100  $\mu$ L)、底物量 (50  $\mu$ L)、底物浓度 (10  $\mu$ mol/L) 以及反应温度 (35 °C)。

pH 稳定性的测定是将酶液放置在 0.1 mol/L 的不同 pH 值缓冲液中 4 °C 下孵育 6 h,再取出 100  $\mu$ L 酶液,加入到 900  $\mu$ L 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中,在 35 °C 下测定其剩余酶活力。

其中,不同 pH 值缓冲液为乙酸钠缓冲液 (pH 4.0~5.5)、磷酸盐缓冲液 (pH 6.0~7.5)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0~8.5) 和碳酸钠缓冲液 (pH 9.0~9.5)。

#### 1.3.4.5 酶的底物特异性

以不同类型的荧光底物为目标分解物,酶活力测定的其他条件不变,测定相应的酶活力。以 Suc-Gly-Pro-MCA 荧光底物为对照。

### 1.3.5 高效液相色谱与电喷雾质谱联用分析 PEP 对胶原蛋白小肽的降解

将 50  $\mu$ L 纯化的 PEP (0.125 U/mL) 与 50  $\mu$ L 2

mg/mL 的胶原蛋白小肽共同加入到 200  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液体系中,在 35 °C 反应 2 h 后立即在 95 °C 高温下灭活。随后,将 10  $\mu$ L 反应液注入高效液相色谱 ZORBAX SB-C18 反相柱,以 5~40% 的乙腈进行线性洗脱,洗脱时间为 40 min,流速为 1 mL/min,并在 220 nm 下检测吸收峰。对照组的 PEP 先经过高温灭活,其他条件不变。通过检测紫外吸收峰,观察原始胶原小肽的吸收峰是否消失并出现新的吸收峰,来判断鱼胶原蛋白小肽是否被 PEP 降解。

收集降解产物的吸收峰,委托合肥赛曼诺生物科技有限公司进行电喷雾质谱分析。通过 ESI-MS 可以测得由 RP-HPLC 显示的每个吸收峰对应的降解产物的分子量,由此与小肽氨基酸组合的理论分子量作对比,来判断出酶对小肽的切割位点。

### 1.3.6 数据统计分析

实验数据均为 3 次平行实验结果的平均值,采用 Excel 2007 及 SPSS 13.0 软件处理,计算数值以均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PEP 的分离纯化

通过 60~80% 的硫酸铵分级沉淀,使含有目的蛋白的酶液高度浓缩的同时有效去除杂蛋白。随后将沉淀用缓冲液溶解并透析后上样于 DEAE-Sephacel 阴离子交换层析。由图 1 可知,大量杂蛋白在未吸附部分被除去,在 0.15~0.2 mol/L NaCl 的梯度洗脱部分,有一个单一的酶活性峰,收集此活性峰,进行下一步的纯化。

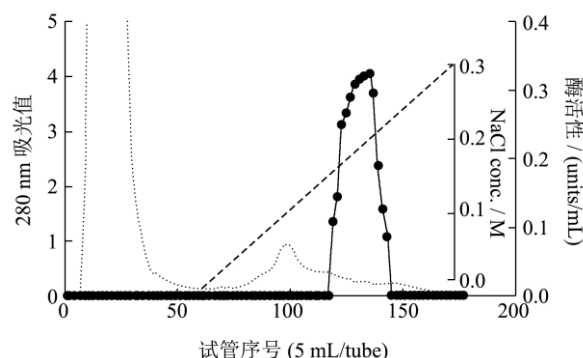


图 1 PEP 的 DEAE-Sephacel 纯化柱层析图

Fig.1 DEAE-Sephacel chromatographic purification of PEP

注: 280 nm 吸光值 (---), 酶活性 (●)。

将经过 DEAE-Sephacel 阴离子层析柱分离的样品加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至终浓度为 1.2 mol/L 后,上样于疏水层析柱。由图 2 可知,在未吸附部分去除了一些杂蛋白,在 0.8~0.6 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  梯度洗脱部分,有一

个单一的酶活性峰并与蛋白峰偏离,说明此纯化步骤进一步去除了一些杂蛋白。

经 Q-Sepharose 阴离子交换层析后的结果如图 3 所示,在 0.2 mol/L NaCl 梯度洗脱部分,酶活峰与蛋白峰重叠,且在 SDS-PAGE 电泳中显示为单一条带(图 3 泳道 1),说明 PEP 得到了高度纯化。

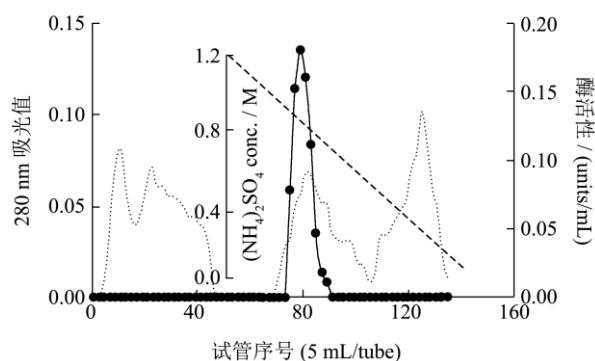


图 2 PEP 的 Phenyl Sepharose I 纯化柱层析图

Fig.2 Phenyl Sepharose chromatographic purification of PEP

注: 280 nm 吸光值 (-), 酶活性 (●)。

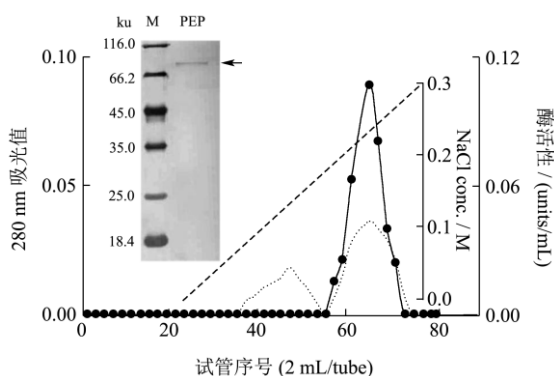


图 3 PEP 的 Q-Sepharose 纯化柱层析图与纯化 PEP 的电泳图

Fig.3 Q-Sepharose chromatographic purification and SDS-PAGE pattern of PEP

注: 280 nm 吸光值 (-), 酶活性 (●), M, 标准蛋白; PEP, 纯化的 PEP。

## 2.2 PEP 的性质分析

### 2.2.1 PEP 的肽质量指纹图谱

将纯化的 PEP 进行 SDS-PAGE, 切下蛋白条带先经胰蛋白酶酶解, 得到的肽段混合物经基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱分析。选取一级质谱中信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱 (MS/MS) 分析, 一共获得 16 个肽片段共 169 个氨基酸残基。

将得到的肽片段的质量指纹图谱数据在 NCBI nr 数据库中进行肽段序列检索。经过数据匹配, 发现得分最高的是墨西哥鲷鱼 (*Neolamprologus brichardi*) 的 PEP (gi: 583994882)。如图 4 所示, 16 条肽段 169 个氨基酸残基中的 167 氨基酸残基与墨西哥鲷鱼 PEP

完全一致, 同源性达到 98.8%, 证明得到的酶为 PEP。

### 2.2.2 PEP 的最适温度与热稳定性

以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 在 pH 6.0 的缓冲液 A 中, 按照酶活测定方法测定不同温度下蓝圆鲷 PEP 的酶活力, 作温度—酶促反应相对活力曲线。结果如图 5 所示, PEP 催化底物水解反应的最适温度是 35 °C, 当温度高于 45 °C 以后其活性迅速下降, 但 PEP 在低温下仍能表现出较高的活性, 即使在 5 °C, 仍然能表现出 30% 左右的酶活力。说明鱼肉在低温贮藏阶段, 该酶也能发挥其作用。

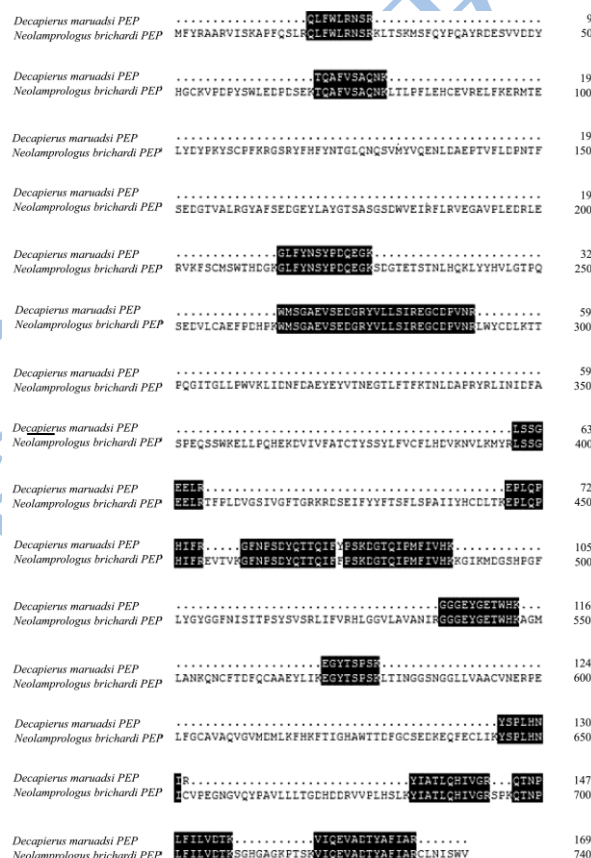


图 4 蓝圆鲷 PEP 与墨西哥鲷鱼 PEP 的同源性比较

Fig.4 Alignment of PEP tryptic peptide fragment sequences with the *Neolamprologus brichardi* PEP sequence

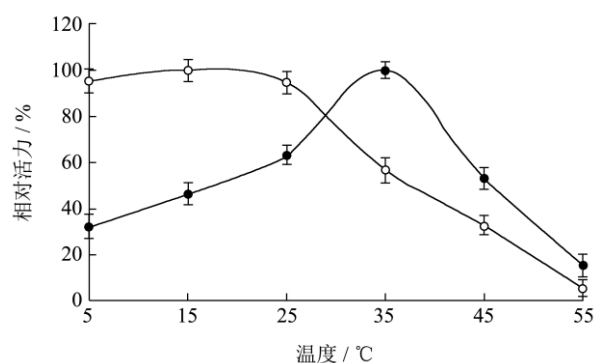


图 5 PEP 的最适温度 (●) 和热稳定性 (○)

Fig.5 Optimal temperature (●) and thermal stability (○) of PEP

PEP的热稳定性如图5所示,在25℃下放置30 min后,其活力基本保持不变。随着温度的升高,其热稳定性不断下降,在55℃下放置30 min后,酶活力几乎全部丧失,证明其热稳定性较差。

### 2.2.3 PEP的最适pH与pH稳定性

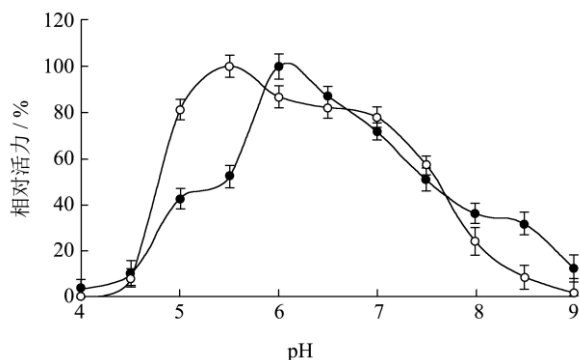


图6 PEP的最适pH(●)和pH稳定性(○)

Fig.6 Optimal pH (●) and pH stability (○) of PEP

由图6可知,PEP催化Suc-Gly-Pro-MCA水解反应的最适pH为6.0,而当pH高于7.5或者低于5时,酶活力下降显著,表明PEP为中性或者弱酸性酶。

此外,在pH 5.0~7.5之间,酶活性能够很好的保持,但当pH低于5.0或者高于7.5时,酶活力会迅速下降直至完全丧失。

### 2.2.4 PEP的底物特异性

以不同的荧光合成底物测定PEP的底物特异性,结果如表1所示,该酶最易分解在羧基端包含脯氨酸残基的底物Suc-Gly-Pro-MCA和Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA。而其他如胰蛋白酶底物Boc-Val-Pro-Arg-MCA、胰凝乳蛋白酶底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA、组织蛋白酶底物Z-Phe-Arg-MCA,氨肽酶底物Pro-MCA均不被PEP分解,表明其是一种能够特异性切割脯氨酸残基的内切酶。

表1 PEP的底物特异性

Table 1 PEP substrate specificity

底物	相对活力/%
Suc-Gly-Pro-MCA	100
Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA	167.5
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0
Z-Phe-Arg-MCA	0
Pro-MCA	0

## 2.3 高效液相色谱与电喷雾质谱联用分析

### PEP对胶原蛋白小肽的作用

PEP与胶原蛋白之间的关系近年来越来越成为科

学研究者特别是病理研究中关注的热点问题。已有的研究表明,PEP会与小鼠机体中的金属蛋白酶共同作用降解胶原蛋白,产生细胞化学引诱物PGP(Proline-glycine-proline),导致肺气肿<sup>[9]</sup>。同样,在慢性嗜中性细胞炎症病人的血液中也发现了PGP这种物质<sup>[10]</sup>,证明也是由PEP与金属蛋白酶共同作用于胶原蛋白产生的。由此可见,PEP与金属蛋白酶协同作用于胶原蛋白会产生对生物体生理机能产生重要影响的物质。

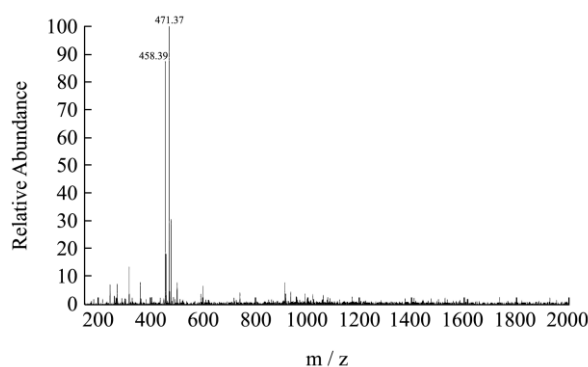
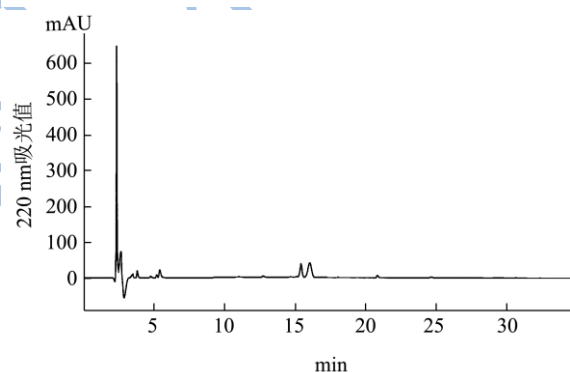
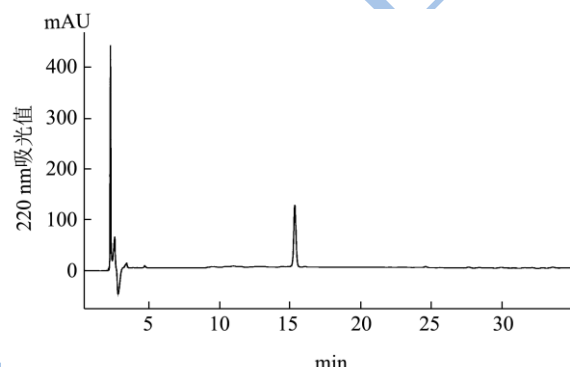


图7 PEP降解胶原小肽1的高效液相色谱与电喷雾质谱联用分析

Fig.7 HPLC-ESI-MS-based peptidomics of collagen peptide 1 after PEP degradation

注: a, 小肽GEVGPQGARG的RP-HPLC图; b, 小肽经PEP降解后的RP-HPLC图; c, 分解产物的ESI-MS谱图。

在先前的研究中,我们发现海水真鲷肌肉中存在一种基质金属蛋白酶,该酶即便在低温(4℃)下也能够降解胶原蛋白<sup>[11]</sup>。脯氨酸含量高是胶原蛋白的重

要特征。PEP 作为特异性切割脯氨酸残基的内切酶，推测其在鱼肌肉胶原蛋白的生理变化过程中起到重要作用。

小峰，说明该小肽能够被 PEP 降解。通过电喷雾质谱 ESI-MS 测得降解产物的相对分子质量分别为 458.39 u 与 471.37 u，与 GEVGP 和 QGARG 两个肽片段的理论分子质量 456.47 u 和 486.5 u 相近。证明 PEP 是从脯氨酸位点“P”羧基端切开，切割位点为 Pro-Gln，来完成对该小肽的降解。

第二个胶原蛋白小肽的序列为 GAMGPRGLPGERGRAG。由图 8 可知，该小肽的原始峰出现在第 20 min，与 PEP 反应后该峰消失并出现新的吸收峰。ESI-MS 分析得出产物的相对分子质量为 442.43 u 与 432.25 u，这两个数值与 RGLP 和 GAMGP 的理论分子质量 441.65 u 和 431.69 u 相近，说明其降解的切割位点为 Pro-Arg 和 Pro-Gly。

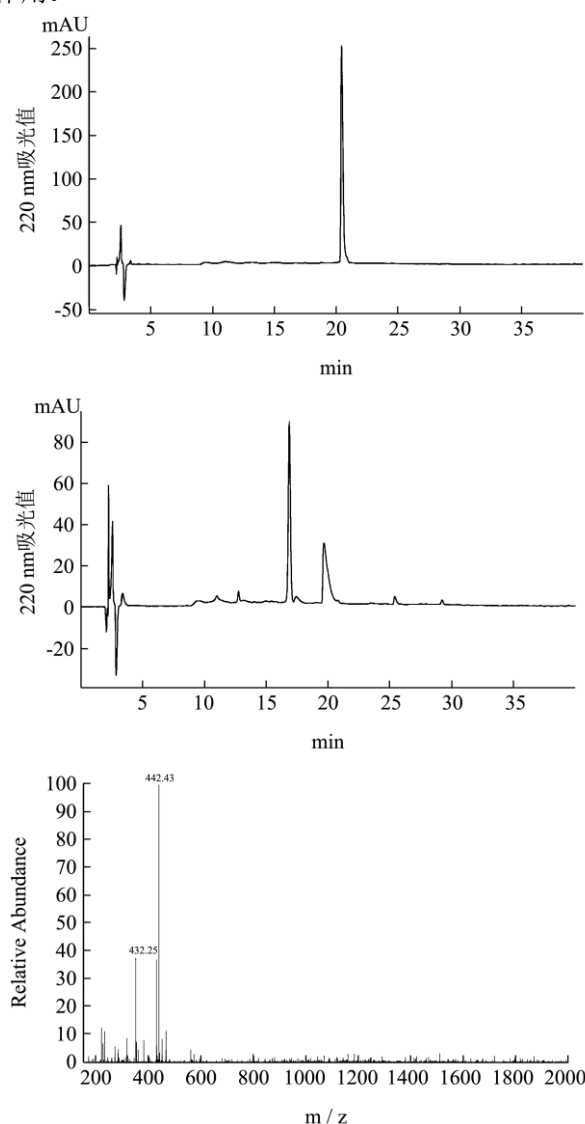


图 8 PEP 降解胶原小肽 2 的高效液相色谱与电喷雾质谱联用分析

Fig.8 HPLC-ESI-MS-based peptidomics of collagen peptide 2 after PEP degradation

注：a，小肽GAMGPRGLPGERGRAG的RP-HPLC图；b，小肽经PEP降解后的RP-HPLC图；c，分解产物的ESI-MS谱图。

在 PEP 对胶原蛋白的分解研究中，由于蓝圆鲂胶原蛋白的基因序列尚未被克隆，难于合成其小肽。考虑到鱼类胶原蛋白的同源性高，本研究参考淡水草鱼胶原蛋白基因序列合成小肽。用纯化的蓝圆鲂 PEP 来分析其对三段不同长度的草鱼胶原蛋白小肽的降解情况。第一段胶原蛋白小肽的序列为 GEVGPQGARG，图 7 是其与 PEP 反应前后的高效液相色谱与电喷雾质谱联用分析图。小肽的原始峰出现在第 15 min，而在与 PEP 反应后，原始峰消失，取而代之的是两个新的

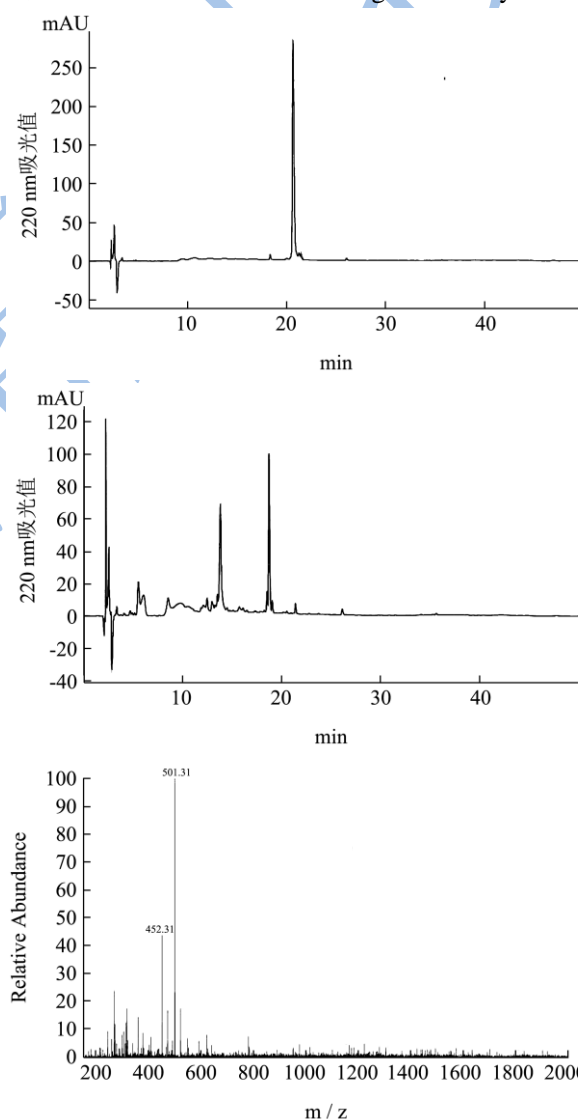


图 9 PEP 降解胶原小肽 3 的高效液相色谱与电喷雾质谱联用分析

Fig.9 HPLC-ESI-MS-based peptidomics of collagen peptide 3 after PEP degradation

注：a，小肽 QGPVGATGPKGARGAAGPPGATGF 的

RP-HPLC图; b, 小肽经PEP降解后的RP-HPLC图; c, 分解产物的ESI-MS谱图。

第三个胶原蛋白小肽的序列为 QGPVGATGPKGARGAAGPPGATGF。如图 9 所示, 其高效液相色谱图的原始峰出现在 20 min, 加入 PEP 后同样消失并产生新的峰, 电喷雾质谱分析测得 2 个降解产物小肽的相对分子质量分别为 501.31 u 和 452.31 u。这两个数值与 VGATGP 和 GATGF 的理论分子质量 499.54 u 和 450.47 u 相近, 说明其降解的切割位点同样是脯氨酸残基的 C 端, 即位于 Pro-Lys 和 Pro-Gly 键。

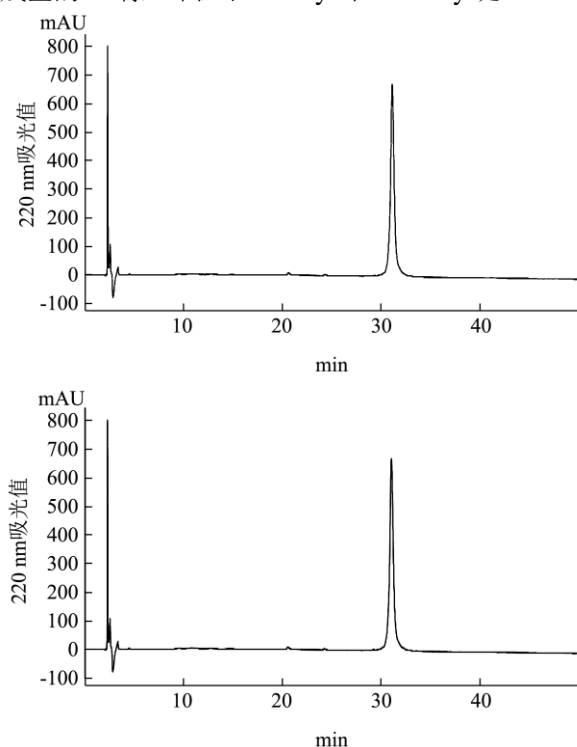


图 10 PEP 降解 45 AA 小肽的高效液相色谱图

Fig.10 HPLC chromatograms of the 45 AA peptide cleaved by PEP

注: a, 小肽的RP-HPLC图; b, 小肽经PEP降解后的RP-HPLC图。

Lu 等<sup>[12]</sup>的研究发现, 三种来源于细菌的 PEP 均能够降解含有脯氨酸残基的底物, 分别是肽链较短的显色底物 (Suc-Ala-Pro-pNA)、长度居中的小肽 (13 个氨基酸) 和稍长一些小肽 (33 个氨基酸)。这与本实验中蓝圆鲟肌肉 PEP 对荧光底物特异性以及对鱼胶原蛋白小肽降解的实验结果相吻合。此外, 在第三个胶原小肽 (QGPVGATGPKGARGAAGPPGATGF) 的降解结果中我们发现, 当有两个脯氨酸残基相邻的情况下, 切割位点是在第二个脯氨酸残基 C 端。Banbula 等<sup>[13]</sup>对一种来源于微生物 (*Porphyromonas gingivalis*) 的脯氨酸内切酶对 I 型胶原蛋白片段的降解进行了分析, 结果发现在任意一段肽段

(NH<sub>2</sub>-Xaa-Xaa-Pro-Yaa-(Xaa)<sub>n</sub>) 被 PEP 降解的过程中, 当切割位点位于 Pro-↓Yaa-的情况下, Xaa 可以是任意一种氨基酸, 但是 Yaa 只能是除了脯氨酸以外的任一氨基酸, 这也说明当两个脯氨酸毗邻的时候切割位点一定是在靠后的脯氨酸 C 端。在本研究中, 我们发现, 蓝圆鲟 PEP 可对两个脯氨酸残基同时分解 (图 9)。

由此可以确定, 在鱼体死后, 金属蛋白酶等内源性蛋白酶将胶原蛋白降解成为小肽片段, 脯氨酸内肽酶通过切割脯氨酸残基的羧基端水解这些胶原蛋白小肽, 将其变为更小片段的肽。这些小片段的肽段将会在各种特异性的外切氨肽酶的作用下变为各种游离氨基酸, 如精氨酸氨肽酶可以将这些小片段肽中 N 端的 Arg 切下产生游离的精氨酸。值得注意的是, PEP 对小肽的切割是有链长限制的, 一般不切割 30 个氨基酸以上的小肽。在 Lu<sup>[12]</sup>等的研究中, 相比含有 33 个氨基酸残基的底物, PEP 更易降解长度为 13 个氨基酸残基的底物。根据 Fulop<sup>[14]</sup>对脯氨酸内肽酶晶体结构的研究结果, PEP 的非催化区域中特殊的“β-螺旋桨”会控制大分子底物的进入, 使得大分子底物无法进入 PEP 中包含着三联体结构中的催化区域, 因此其只能与小分子底物反应。为了证实在鱼类中 PEP 也存在着这样的限制机制, 我们将蓝圆鲟 PEP 与长度为 45 个氨基酸且含 6 个脯氨酸残基的小肽反应。结果如图 10 所示, 该小肽在 30 min 左右出现原始峰, 加入 PEP 后该原始峰保持不变, 说明 PEP 未能降解该小肽, 也即鱼肌肉 PEP 作用同样受到底物链长的限制。因此, 在鱼肌肉蛋白的生理代谢过程中, PEP 需要在其他内源性蛋白酶将大分子底物水解成短肽之后再发挥其作用。

### 3 结论

从蓝圆鲟骨骼肌中分离纯化出脯氨酸内肽酶 (PEP), 并通过肽质量指纹图谱和同源性分析证明纯化得到的酶为 PEP。其最适温度为 35 °C, 并且在 5~15 °C 的低温下也表现出较高的活性, 但随着温度升高热稳定性不断下降, 在 55 °C 下放置 30 min 后即丧失酶活性; 最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0~7.5 的范围内较稳定。PEP 通过切割胶原蛋白小肽脯氨酸残基的羧基端进而继续水解胶原小肽, 参与到鱼肌肉蛋白的降解过程中。本研究为今后深入探讨 PEP 的酶学性质及其对鱼肌肉新陈代谢的影响提供了理论基础。

### 参考文献

- [1] 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
- [2] Caballero M J, Betancor M, Escrig J, et al. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage [J]. *Aquaculture*, 2009, 291(3): 210-216
- [3] 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 B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(3): 281-287
- [4] Wu J L, Ge S Y, Cai Z X, et al. Purification and characterization of a gelatinolytic matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(15): 632-638
- [5] Zhong C, Cai Q F, Liu G M, et al. Purification and characterization of cathepsin L from the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*) and comparison of its role with myofibril-bound serine proteinase in the degradation of myofibrillar proteins [J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(4): 1560-1568
- [6] 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
- [7] 刘晨晨,赵玉勤,杨最素,等. 鳕鱼皮胶原蛋白肽对小鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 18-24  
LIU Chen-chen, ZHAO Yue-qing, YANG Zui-su, et al. Protective effect of cod skin collagen peptide on acute liver injury in mice [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(7): 18-24
- [8] 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 and Differentiation*, 1999, 41(2): 217-225
- [9] Braber S, Koelink P J, Henricks P A, et al. Cigarette smoke-induced lung emphysema in mice is associated with prolyl endopeptidase, an enzyme involved in collagen breakdown [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2011, 300(2): L255-265
- [10] O'Reilly P J, Hardison M T, Jackson P L, et al. Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic peptide, PGP, from collagen [J]. *Journal of Neuroimmune*, 2009, 217(1-2): 51-54
- [11] Wu G P, Chen S H, Cao M J. Purification and characterization of a gelatinolytic metalloproteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(9): 5730-5736
- [12] Lu S, Marti T, Sollid L M, et al. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue [J]. *Biochemical Journal*, 2004, 383(2): 311-318
- [13] Banbula A, Mak P, Bugno M, et al. Prolyl tripeptidyl peptidase from *Porphyromonas gingivalis*. A novel enzyme with possible pathological implications for the development of periodontitis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(14): 9246-9252
- [14] Fulop V, Bocskei Z, Polgar L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis [J]. *Cell*, 1998, 94(2): 161-170