

建鲤组织蛋白酶L的克隆表达、纯化及活性特征鉴定

李冉, 陈治光, 蒋然然, 陈秀华, 李树红*, 李新, 钟海霞, 但静

(四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014)

摘要:首先采用TA克隆技术克隆建鲤组织蛋白酶L(Cathepsin L, CAT L)成熟肽基因片段并进行双酶切鉴定,进而构建表达载体CAT L-pET-30a并转入宿主菌*E.coli* BL21,经1 mmol/L异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)在37 °C诱导2 h表达重组CAT L蛋白。而后经尿素梯度洗涤和镍离子亲和层析纯化目的蛋白,并利用SDS-PAGE检测诱导效果和纯化过程。最后以荧光合成肽底物(Z-Phe-Arg-MCA)测活法鉴定建鲤重组CAT L的热稳定性、pH稳定性,以及鱼糜生产和冻藏中常用添加剂对其活性稳定性的影响。双酶切鉴定结果表明成功克隆了目的基因片段,与鲤鱼CAT L基因序列相似性为99.11%。SDS-PAGE分析表明经诱导、尿素梯度洗涤及亲和层析后,成功获得高度纯化目的蛋白,分子量约28 ku。活性鉴定结果表明重组CAT L在20~50 °C及pH3.0~6.5范围内稳定;氯化钠、焦磷酸钠对重组CAT L活性的抑制作用呈现剂量依赖关系,而各浓度蔗糖、山梨醇则对其活性无明显作用。本研究成功克隆、表达和纯化了建鲤CAT L,并阐明了热、pH及鱼糜生产和冻藏中常用添加剂对该酶稳定性的不同影响。

关键词:建鲤,组织蛋白酶L,克隆表达,纯化,活性特征

Clone, expression, purification and activity characterization of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) Cathepsin L

LI Ran, CHEN Zhi-guang, JIANG Ran-ran, CHEN Xiu-hua, LI Shu-hong*, LI Xin, ZHONG Hai-xia, DAN Jing

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: CAT L gene fragment which encoded mature peptide of Jian carp was cloned using TA clone and characterized by double enzyme cutting firstly, prokaryotic expression vector CAT L-pET-30a was constructed and transformed into *E.coli* BL21 subsequently. Recombinant CAT L was expressed after induced by 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 2 h. And the objective protein was gradiently washed by urea and purified by Ni²⁺-NTA agarose affinity chromatography, SDS-PAGE was conducted to examine the results of expression and purification. Activity assay (Z-Phe-Arg-MCA as a substrate) was finally used to characterize the pH and thermal stability of CAT L, and illustrated the effects of common additives used in surimi product and frozen storage on its activity stability. The results of double enzyme cutting indicated that CAT L gene fragment was successfully cloned, and shared 99.11% sequence identities with the CAT L of common carp. The analysis of SDS-PAGE illustrated that the recombinant CAT L with the molecular weight of 28 ku was highly purified. Activity assay revealed that CAT L was stable ranging from 20 °C to 50 °C and pH 3.0 to 6.5, the activity of CAT L was inhibited by NaCl and Na₄P₂O₇ and appeared dose-dependence, while sucrose and sorbitol had no effects on the activity of CAT L. CAT L of Jian carp was successfully cloned, expressed and purified, and effects of heat, pH, additives on the activity stability of CAT L was illustrated.

Key words: Jian carp; Cathepsin L; clone and expression; purification; activity characterization

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0233-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.038

组织蛋白酶(Cathepsins, CATs)是一类溶酶体蛋白酶,其中CAT L是半胱氨酸蛋白酶家族中CAT L亚家族(其成员包括Papain、CAT L、CAT S、CAT K、CAT

O、CAT W)的典型代表,具有强烈的内肽酶活性^[1]。CAT L的适宜反应pH在3.0~6.5范围内,其在中性和碱性环境下,非常不稳定,易失活^[2]。

收稿日期: 2015-01-16

作者简介: 李冉(1991-),男,硕士研究生,研究方向:水产品加工理论技术, E-mail: venn2017@163.com。

* 通讯作者: 李树红(1975-),女,博士,副教授,研究方向:水产品加工理论与技术, E-mail: xiaoshu928@126.com。

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0003);四川省教育厅自然科学基金重点项目(10ZA052)。

在食品领域,已知CAT L不仅在畜禽类屠宰后肉的成熟^[3]、嫩化^[4]中发挥重要作用,而且还与肉类加工制品品质相关^[5]。目前对鱼类CAT L的研究表明,其能够破坏肌肉蛋白结构完整性,加速宰后鱼肉片的软化^[6],此外,因其水解鱼糜凝胶的关键结构蛋白—肌球蛋白,是导致鱼糜制品品质劣变的主要原因之一^[7]。同时,也有研究表明内源性CAT L活性与腊鱼^[8]的特有质地、颜色及挥发性风味的形成有关,其酶活的降低限制了腌干鲢鱼^[9]风味物质生成。

建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)是我国主要淡水经济鱼类—鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的主导品种,具有生长快,产量高,肉质优等特点,以建鲤为原料,开发鱼糜等各种水产加工制品的前景十分广阔。鉴于上述CAT L在鱼类加工制品中潜在作用,获得建鲤CAT L并研究其生物活性特征,是分析其与鱼肉及其制品品质关系,并依此改善品质的必要前提。此外,还可根据CAT L酶解活性特性,将其应用于动物水解蛋白或活性小肽^[10-11]等的生产。

近年来有学者对鱼类CATs克隆表达进行了研究,然而目前尚未见建鲤CAT L的相关报道。而对重组CAT L的研究,可为探索天然CAT L的性质,提供科学的信息及参考依据。为此,本研究首次进行了建鲤CAT L的克隆和原核表达,以及鱼糜制品加工相关条件(加热、pH、盐、糖、醇)下,CAT L的活性变化的研究,以期在实际生产中,合理利用该活性特征,提高鱼糜制品品质,提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)(约500 g/尾,鲜活健康)购于四川雅安农贸市场;表达质粒pET-30a、感受态大肠杆菌*E.coli* DH5 α 、大肠杆菌*E.coli* BL21(DE3)均由四川农业大学食品学院水产品加工理论与技术实验室制备保存;动物组织RNA提取试剂盒成都百菲特生物科技有限公司;PrimeScript[®] RT reagent Kit试剂盒、pMD[®] 19-T Vector试剂盒、限制性内切酶*Nde* I/*Xho* I日本宝生物工程有限公司;质粒小提试剂盒、通用型DNA纯化回收试剂盒、DNA Marker(III、IV)北京天根生化科技有限公司;5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)美国Sigma-Aldrich公司;异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)默克化工技术(上海)有限公司;镍离子亲和层析填料德国Qiagen公司;中分子质量蛋白Marker(14.4~94 ku)北京天根生化科技有限公司;荧光合成肽(Z-Phe-Arg-MCA)底物美国Sigma公司;氯化钠、焦磷酸钠、蔗糖、山梨醇(食品级)成都益新食品科技有限公司;洗涤液Buffer A(含0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA的50 mmol/L Tris-HCl, pH8.5)、裂解液(含1 mmol/L PMSF、0.5% Triton X-100的buffer A)、透析液Buffer B(含0.5 mol/L NaCl, 1 mol/L 尿素的50 mmol/L Tris-HCl, pH8.5)、Buffer C(含5%甘油的Buffer B)、Buffer D(含0.5 mol/L咪唑的Buffer C)由四川农业大学食品学院水产品加工理论与技术实验室配制。

ABI9700 PCR反应仪 美国ABI公司;Mini Sub-Cell GT水平电泳槽、Mini Protein3垂直电泳槽、PowerPac3000电泳电源、Gel Doc2000凝胶成像系统、Biologic Duo Flow全自动中高压层析系统 美国Bio-Rad公司;Varioskan全波长荧光/比色扫描读数仪美国Thermo Scientific公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CAT L基因引物设计 根据Tsunemoto等^[12]发表的鲤鱼(*Cyprinus carpio*)相关序列(GenBank登录号:AB128161.1),设计克隆建鲤CAT L成熟肽链基因序列的特异性上下游引物,上游引物为:CGCATATG GTCCAAACAG,下划线部分为*Nde* I酶切位点;下游引物为:ATCTCGAG GACGAGAGGGTAGCTAGCAG,下划线部分为*Xho* I酶切位点。

1.2.2 CAT L基因序列的分子克隆 提取建鲤肌肉总RNA,进行RT-PCR反转录。以获得的建鲤肌肉cDNA为模板,利用CAT L上下游引物,经PCR扩增(94 $^{\circ}$ C预变性3 min,94 $^{\circ}$ C变性40 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,进行35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min)获得目的基因片段,并进行1%的琼脂糖电泳检测。将纯化回收的目的基因片段,连接至克隆载体pMD19-T,得到重组质粒CAT L-pMD19-T,转化至感受态*E.coli* DH5 α ,经蓝白斑筛选和*Nde* I/*Xho* I双酶切鉴定检测,将阳性克隆送Invitrogen生物公司进行测序(以T7引物扩增、双向全长测序)。采用DNAMAN 8.0软件对该基因序列及推导的氨基酸序列进行同源性分析。

1.2.3 表达载体CAT L-pET-30a的构建及重组菌的表达 重组质粒CAT L-pMD19-T和表达质粒pET-30a,分别用双酶切后,回收目的基因片段和载体片段,16 $^{\circ}$ C连接16 h。连接产物转化至感受态*E.coli* DH5 α ,进行阳性筛选,并以CAT L成熟肽序列引物进行菌液PCR检测,鉴定表达载体的构建。

将成功转入CAT L-pET-30a的*E.coli* BL21(DE3)重组菌株,接种在LB液体培养基(含50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C,200 r/min过夜振荡培养12 h。次日将菌液按1:50接入LB液体培养基(含50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C,200 r/min培养3 h。当OD₆₀₀为0.6时,加入1 mmol/L的IPTG,37 $^{\circ}$ C诱导培养2 h。离心收集菌体,经洗涤液Buffer A,吹打混匀、洗涤离心后,按30 mL/g菌体加入裂解液,重悬沉淀,反复冻融3次,按0.3 mg/mL比例加入溶菌酶(100 mg/mL),37 $^{\circ}$ C反应30 min。超声破碎菌体,8000 \times g离心10 min,收集包涵体沉淀用于纯化。

1.2.4 重组CAT L的纯化和鉴定 使用0.5、1.8 mol/L的尿素溶液依次梯度洗涤包涵体,将最终溶解于8 mol/L的尿素的上清液使用Buffer B进行透析。而后经Ni²⁺-NTA亲和柱(1.6 cm \times 10 cm)层析纯化,Buffer C洗去不吸附的杂蛋白,Buffer D进行梯度洗脱,流速0.5 mL/min,收集目的蛋白。纯化后的CAT L经20 mmol/L磷酸缓冲液(PBS)(pH7.4)透析、浓缩,-80 $^{\circ}$ C冻藏备用。分别取诱导前后、尿素梯度洗涤、纯化后的样品,进行SDS-PAGE鉴定^[13](胶浓度14%)。

1.2.5 重组CAT L的活性稳定性测定 参考Li等^[14]的方法测定重组CAT L的热稳定性和pH稳定性。将CAT L酶液在pH5.5条件下,于20~80 ℃范围内,每10 ℃为一个间隔,放置60 min,用冰水冷却至4 ℃,测定其残余酶活。将CAT L酶液在20 ℃下,于pH3.0~8.0的范围内,每0.5个pH单位为一个间隔,放置60 min,然后将pH调回至反应pH5.5,测定其残余酶活。酶活测定参考Barrett等^[15]的方法,以荧光合成肽Z-Phe-Arg-MCA为底物,pH5.5,40 ℃反应10 min,激发波长为380 nm,发射波长为460 nm。

1.2.6 盐、糖、醇对重组CAT L活性稳定性的影响 根据加盐鱼糜或鱼糜擂溃时常用盐浓度,以及鱼糜抗冷冻变性剂的常用浓度,分别设置了不同浓度的氯化钠(0.5%、1%、2%)^[16]、焦磷酸钠(0.2%、0.5%)^[17-18]、蔗糖(1%、2%、4%)^[19]、山梨醇(2%、4%、8%)^[20],测定其对CAT L酶活性的影响,活性测定方法同1.2.5,重复测定三次。

1.2.7 数据处理及统计分析 采用SPSS 19.0数学软件进行统计分析,计算各指标的平均值和标准差,采用One-Way ANOVA法进行差异显著性分析。 $p>0.05$ 表示差异不显著, $0.01<p<0.05$ 表示差异显著, $p<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 建鲤CAT L基因序列的扩增

成功提取建鲤肌肉总RNA,结果如图1所示。

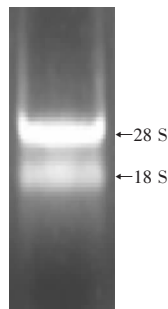


图1 建鲤总RNA电泳图

Fig.1 Electrophoresis results of total RNA in Jian carp

将建鲤总RNA反转录为单链cDNA,以此为模板进行引物扩增,所得片段在琼脂糖电泳上呈现约665 bp的亮带(图2)。该扩增片段长度与已报道的鲤鱼CAT L

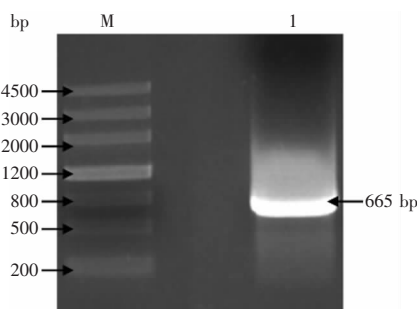


图2 建鲤CAT L PCR电泳图

Fig.2 Electrophoresis results of Jian carp CAT L PCR amplification

注:M:DNA分子量标准(Marker III);I:CAT L扩增结果。

(Genebank登录号:AB128161.1)成熟肽基因片段长度相符。

2.2 建鲤CAT L基因的克隆及测序结果

将重组质粒CAT L-pMD19-T经双酶切鉴定,结果如图3所示,酶切后的CAT L片段大小为665 bp,同CAT L基因序列的扩增结果一致。pMD19-T片段为2692 bp,也与预期结果一致。以上鉴定结果说明成功扩增并克隆了建鲤CAT L基因片段。

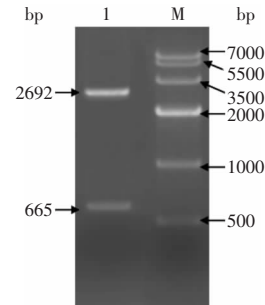


图3 重组质粒CAT L-pMD19-T双酶切检测图

Fig.3 Double digestion identification of recombinant plasmid CAT L-pMD19-T

注:M:DNA分子量标准(Marker IV);I:CAT L-pMD19-T双酶切产物。

对克隆的建鲤CAT L基因片段进行测序,得到的DNA序列及推测的氨基酸序列见图4。将该测序结果与对应的鲤鱼CAT L的成熟肽基因序列进行相似性对比,结果相似度为99.11%,且推测的氨基酸序列相似度为100%。

```

1  ATGGTCCAAACAGTTTGGACTGGAGGGAAAAGGGATAOCTGACTCCCGTAAAGATCAG
1  M V P N S L D W R E K G Y V T P V K D Q
61  GGTGAGTGTGGTCTCTGCTGGGCTTCAGCACTACTGGAGCCATGGAGGTCAGATGTT
21  G E C G S C W A F S T I G A M E G Q M F
121  AGGAAGACCGAAAACCTGGTGTCTCTGAGTGAGCAGAACCTGGTGAAGTCTCCCGCCCT
41  R K T G K L V S L S E Q N L V D C S R P
181  GAAGGCAACGAGGGCTGTAATGGAGGTCTAATGGACCAAGGCTTTCAGTACATCAAGGAC
61  E G N E G C N G L M D Q A F Q Y I K D
241  CAGAACGGTCTGGACTCAGAGGAGTCTACCCCTATTGGGAAGTGAATGATCAGCCCTGC
81  Q N G L D S E E S Y P Y L G T D D Q P C
301  CATTATGATCCCAATAACAGCGCAGCTAATGACACTGGATTCGTTGACATTCACAGTGA
101  H Y D P K Y S A A N D T G F V D I P S G
361  AAGGAACATGCAGTGAAGGCTATAGCTGCTGGGGCCAGTGTCTGTGGCTATTGAC
121  K E H A L M K A I A A V G P V S V A I D
421  GCGGACACGAGTCTTCCAGTCTACCACTCAGGACATCTACTATGAGAAAGAAATGCAGC
141  A G H E S F Q F Y Q S G I Y Y E K E C S
481  AGTGAAGGAGTATGATGATGTTGCTGCTGGGTTGATGTTTGGAGGTTGAGGATGTT
161  S E E L D H G V L A V G Y G F E G E D V
541  GATGAAAGAAAGTATTGATTGTCAAGAACAGCTGGAGTGAAGATGGGGTGATAAAGGT
181  D G K K Y W I V K N S W S E N W G D K G
601  TATGCTCATAGGCCAAGGACAGACACAACCACTGTGGTATTGCTACAGCTGTAGCTAC
201  Y V Y M A K D R H N H C G I A T A A S Y
661  CCTCTGTC
221  P L V
    
```

图4 建鲤CAT L基因序列及推测的氨基酸序列

Fig.4 The nucleotide and deduced amino acid sequences of CAT L

2.3 表达载体CAT L-pET-30a的构建及CAT L的表达纯化

对成功转入CAT L-pET-30a的阳性菌株进行PCR检测,结果见图5,PCR扩增的目的片段大小约为665 bp,与克隆的CAT L基因片段长度一致,说明成功构建了表达载体。

将成功转入CAT L-pET-30a的重组菌株*E.coli* BL21,进行诱导表达,表达产物经尿素溶液梯度洗涤

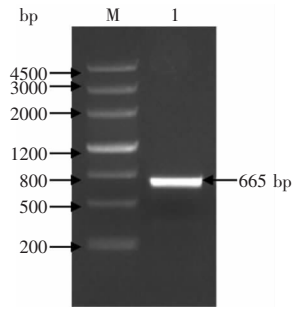


图5 重组质粒CAT L-pET-30a菌液PCR电泳图

Fig.5 Electrophoresis results of PCR identification of the recombinant plasmid CAT L-pET-30a

注: M: DNA分子量标准 (Marker III); 1: 菌液PCR扩增产物。

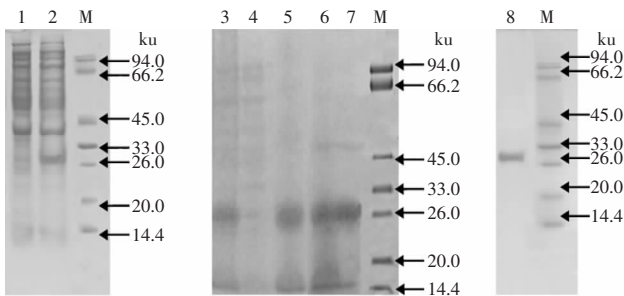


图6 重组CAT L诱导表达及纯化过程的电泳检测

Fig.6 Detection of expression and purification of CAT L by SDS-PAGE

注: M: 蛋白分子量标准 (中分子量蛋白Marker, 14.4~94 ku); 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 0.5 mol/L尿素洗涤前溶解物; 4: 0.5 mol/L尿素洗涤上清; 5: 1 mol/L尿素洗涤前溶解物; 6: 8 mol/L尿素洗涤前溶解物; 7: 8 mol/L尿素溶解上清; 8: Ni²⁺-NTA柱纯化后CAT L。

后, 上镍柱亲和层析进行纯化, 获得目的蛋白。SDS-PAGE对上述各步骤结果进行鉴定, 如图6所示, 经IPTG诱导的重组菌体裂解物在26.0~33.0 ku间有明显的表达条带; 经尿素溶液梯度洗涤去除了大部分杂蛋白, 最终溶解在8 mol/L尿素中的上清液, 杂带明显减少; 经镍柱亲和层析纯化后得到高纯度的重组CAT L蛋白, 条带单一, 分子量约为28 ku。Hu等^[21]纯化了鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 背肌中的CAT L, SDS-PAGE测定分子量为36 ku, 这可能是其纯化的CAT L为前体形式或酶-抑制剂复合物^[22-23], 如Whang等^[24]克隆了条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) CAT L全长序列, 其前体形式分子量为38 ku; Benjakul等^[25]纯化了太平洋鲑鱼 (*Gadus macrocephalus*) 54.2 ku的CAT L, 是由37 ku形成的CAT L与15 ku的抑制剂组成的复合物。而Tsunemoto等^[12]及Aranishi等^[26]从鲤鱼肝胰腺纯化得到的CAT L与本研究中分子量一致, 均为28 ku。

2.4 CAT L热稳定性和pH稳定性

重组建鲤CAT L的热稳定性的测定结果(图7)表明, CAT L具有较强的耐热性, 在20~50 °C内稳定, 尤其50 °C放置1 h后, 仍然残留了约45%活性, 60~70 °C才开始逐渐失活。这与Hu等^[21]的研究中, 将纯化后鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) CAT L在50 °C下孵育1 h后活性残留约50%基本一致。而Liu等^[27]纯化了30 ku的鲢鱼

CAT L, 其残余活性在50 °C仅约10%, 说明鲤科不同鱼种间CAT L热稳定性存在较大差异。

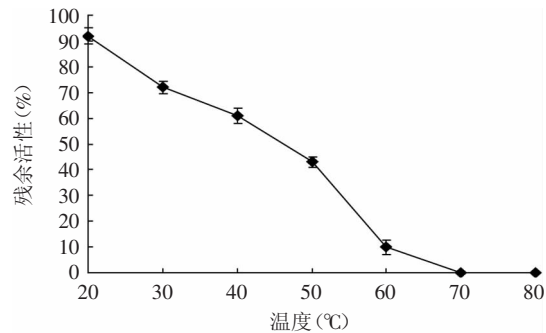


图7 重组CAT L的热稳定性

Fig.7 Profile of pH stability of CAT L

有研究表明, 漂洗后的鱼糜中仍残留部分CAT L活性^[28], 且鲤鱼鱼糜在(50~70 °C)易发生热诱导鱼糜凝胶软化(modori)^[29]。尽管目前未见建鲤鱼糜中CAT L活性情况的报道, 但建鲤CAT L在50 °C时仍可保持较高的活性, 因此, 推测此温度下, 建鲤CAT L能够水解鱼糜凝胶中的主要结构蛋白—肌球蛋白, 破坏凝胶网络结构, 最终导致鱼糜制品凝胶劣化^[7]。

重组建鲤CAT L的pH稳定性测定结果(图8)表明, CAT L具有较强的酸稳定性, 在pH3.0~6.5范围内稳定, pH5.5稳定性最强, pH7.0时开始失活, 尤其在pH3.0及6.5下放置30 min后, 仍然分别保持了约50%和40%的残余活性。生产中通常将鱼肉糜的pH调节到6.5~7.0, 以获得最大的凝胶形成能力, 而建鲤CAT L在pH6.5时仍可保持较高的活性, 说明其是建鲤鱼糜制品品质形成的不利因素。

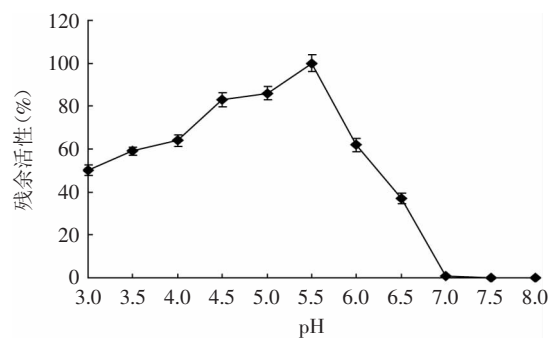


图8 重组CAT L的pH稳定性

Fig.8 Profile of pH stability of CAT L

2.5 盐、糖、醇对CAT L活性的影响

测定不同浓度的盐、糖、醇对重组CAT L活性的影响, 结果见表1。从表1发现, 浓度1%以下的氯化钠对CAT L活性几乎无影响, 而1%及2%的氯化钠对CAT L活性有极显著的抑制作用 ($p < 0.01$), 且呈现剂量依赖模式。浓度0.2%及0.5%的焦磷酸盐, 均十分有效地抑制了CAT L活性。不同质量浓度的蔗糖和山梨醇, 对CAT L活性几乎无影响。

鱼糜制品生产中, 通常要加入2%~3%的食盐进行擂溃, 可促进盐溶性蛋白—肌原纤维蛋白的溶出,

进而增加鱼糜凝胶网络结构的形成^[6]。此外,鱼肉蛋白在低温条件下稳定性差,容易变性^[30],因此通常在冷冻鱼糜加工中,加入抗冷冻变性剂,如0.2%~0.3%焦磷酸盐、2%~4%蔗糖、4%山梨醇。这些糖、醇、磷酸盐等可稳定临界水从而减少冰晶的形成^[18,31],因此可以减轻蛋白的冷冻变性。

而在鱼肉贮藏过程中,研究表明鲤鱼背肌肉块冰藏4 d后CAT L残留86.25%活性^[32],于-20℃冻藏6周后CAT L仍残留79.99%的活性^[33]。对鲤鱼鱼糜的研究表明,鱼糜中添加CAT L后鱼糜凝胶强度显著下降了24.33%^[23]。鉴于上述CAT L在鱼肉中的强残留性及其对鱼糜加工的不利影响,研究常用盐及其浓度及鱼糜抗冷冻变性剂对CAT L活性的影响,对于分析和合理控制鱼肉、鱼糜加工及冷冻过程中CAT L活性残留,具有一定的参考和指导意义。

表1 不同浓度盐、糖、醇对重组CAT L活性的影响
Table 1 Effect of different salt ions, sugar, and alcohol on activity of CAT L

添加剂	终浓度(%)	残余活性(%)
对照		100
氯化钠	0.5	94±3.81
	1	77±2.65**
	2	61±1.92**
焦磷酸盐	0.2	15±1.07**
	0.5	0**
蔗糖	1	103±5.31
	2	107±4.67
	4	107±5.18
山梨醇	2	108±3.73
	4	108±3.43
	8	108±4.57

注:与对照组相比,同列数据肩标*表示差异显著(0.01<p<0.05),**表示差异极显著(p<0.01)。

3 结论

成功克隆了建鲤CAT L成熟肽链基因片段,长度为665 bp,与鲤鱼CAT L成熟肽链的碱基序列同源率为99.11%;成功构建表达载体CAT L-pET-30a,并获得重组菌株*E.coli* BL21,其经1 mmol/L IPTG在37℃诱导2 h成功表达重组CAT L蛋白。经尿素梯度洗涤和Ni²⁺-NTA亲和层析纯化后,获得高度纯化目的蛋白,分子量约28 ku。活性特征鉴定表明,重组CAT L在20~50℃及pH3.0~6.5范围内稳定;1%、2%的氯化钠及0.2%、0.5%的焦磷酸盐对CAT L活性起到极显著(p<0.01)的抑制作用,而不同浓度的蔗糖、山梨醇则对其活性无明显影响。

参考文献

[1] Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities[J]. EMBO Journal, 2001, 20(17):4629-4633.
[2] Dufour E, Dive V, Toma F. Delineation of chicken cathepsin L secondary structure: relationship between pH dependence activity

and helix content[J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 955(1):58-64.

[3] 陈琳,唐玮,徐幸莲,等. 溶酶体中的组织蛋白酶及其在肌肉成熟中的作用[J]. 江西农业学报, 2008, 20(2):72-75.
[4] 陈琳,徐幸莲,周光宏. 应用于肉品嫩化的组织蛋白酶的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(1):271-274.
[5] Garcí'a-Garrido J A, Quiles-Zafra R, Tapiador J, et al. Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish drycured ham of normal and defective texture[J]. Meat Science, 2000, 56:1-6.
[6] Godiksen H, Morzel M, Hyldig G, et al. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4):889-896.
[7] Liu H, Yin L J, Zhang N, et al. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening [J]. Food Chemistry, 2008, 110:310-318.
[8] 李敏. 腊鱼腌制过程中内源蛋白酶的变化及其对品质的影响[D]. 武汉:华中农业大学, 2014.
[9] 高瑞昌,苏丽,黄星奕,等. 腌干鲢鱼组织蛋白酶B、L活力变化的响应面法预测研究[J]. 食品科学, 2012, 33(17):136-140.
[10] 王龙,叶克难. 水产蛋白资源的酶解利用研究现状与展望[J]. 食品科学, 2006, 27(12):807-812.
[11] 李诚,余霞,付刚,等. 猪皮胶原蛋白酶解及其酶解产物的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(23):147-151.
[12] Tsunemoto K, Osatomi K, Nozaki Y, et al. Molecular characterization of cathepsin L from hepatopancreas of the carp *Cyprinus carpio* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2004, 137:107-114.
[13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259):680-685.
[14] Li S H, Zhou X Q, Zhang N, et al. Purification and characterization of cathepsin L2 from dorsal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Food Chemistry, 2008, 111:879-886.
[15] Barrett A J, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L[J]. Methods in Enzymology, 1981, 80(41):535-561.
[16] 袁春红,陈舜胜,程裕东. 鱼糜加工技术及其研究进展[J]. 渔业现代化, 2001, 5:35-39.
[17] 汪学荣,周维禄. 复合磷酸盐对鱼糜制品的保水效果研究[J]. 食品科技, 2002, 9:50-51.
[18] 张松,彭增起,周光宏. 漂洗和抗冻剂在冷冻鱼糜生产中的应用研究[J]. 肉类研究, 2007, 1:29-33.
[19] 段传胜,单杨. 淡水鱼鱼糜加工的研究进展与关键性技术探讨[J]. 农产品加工, 2007, 7:52-59.
[20] 韦振雷,韦海涛,黄发通. 甘露醇/山梨醇结晶性物质及在鱼糜中的应用优势[J]. 广西轻工业, 2006, 22(4):21-22.
[21] Hu Y, Ji R, Jiang H, et al. Participation of cathepsin L in modori phenomenon in carp (*Cyprinus carpio*) surimi gel [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4):2014-2020.
[22] Mason R W, Gal S, Gottesman M M. The identification of

28.89 mg/g。

史红梅等对葡萄藤茎中的多酚物质进行提取,在提取时间1 h、固液比1:15条件下,得到提取量仅为14.43 mg/g^[13]。而王玮在提取时间30 min下,得到葡萄籽多酚提取量仅为10.02 mg/g^[20]。因此相对于传统有机溶剂提取,用快速萃取仪来提取多酚物质,能缩短提取时间,提高提取产量。

参考文献

- [1] 丁燕,赵新节. 酚类物质的结构与性质及其与葡萄及葡萄酒的关系[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2003(1):13-16.
- [2] Gonzalez-Centeno M R, Jourdes M, Femenis A, et al. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012(48):11850-11858.
- [3] 李华,沈洁. 超声波法从葡萄籽中提取多酚的研究[J]. 酿酒科技,2005(5):89-91.
- [4] 唐传核,彭志英. 葡萄多酚类化合物以及生理功能[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2000(2):12-15.
- [5] 李双石,李晓燕,苑函,等. 葡萄酒渣提取多酚化合物研究进展[J]. 酿酒科技,2012(12):17-21.
- [6] 卢晓霞,王田田,王军. 响应面法优化葡萄籽多酚提取工艺[J]. 食品工业科技,2013(24):279-283.
- [7] 赵亮,景浩. 不同品种葡萄皮、籽提取物多酚含量及抗氧化能力的比较研究[J]. 食品工业科技,2009(10):154-157.
- [8] 张振文,王华,房玉林,等. 优质抗病酿酒葡萄新品种‘媚丽’[J]. 园艺学报,2013(40):1611-1612.
- [9] Cassazza A A, Aliakbarian B, Sannita E. High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins

[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012(47):399-405.

- [10] 刘静. ASE快速溶剂萃取:解决半固体样品前处理的新技术[J]. 现代科学仪器,2002(3):59-61.
- [11] Divan K, Darwish R. Accelerated Sample Extraction (ASE (R)) for the food industry—Khalil Divan and Rana Darwish describe a technique that gives faster extraction times, reduces solvent consumption and addresses the need for automation[J]. Food Science Technology—Information Quarterly of the Institute of Food Science and Techn, 2005(19):29-31.
- [12] Farid C, Ying L, Valérie T, et al. Optimization of procedures for in-line extraction of lipids and polyphenols from grape seeds[J]. Food Analytical Methods, 2014(7):459-464.
- [13] 史红梅,孙玉霞,蒋锡龙,等. 正交实验法优化葡萄藤茎中多酚活性物质提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2012(2):287-290.
- [14] 朱素英. 正交实验法优化芦笋嫩茎多酚的提取工艺[J]. 食品工业科技,2013(21):224-227.
- [15] 尹莲. 超生法提取茶多酚的实验研究[J]. 食品工艺,1999(3):10-11.
- [16] 袁琳,胡立志,杨晓雁,等. 快速溶剂萃取仪提取葡萄籽中原花色苷条件优化[J]. 2013(34):157-162.
- [17] 郭雄飞,倪慧,卿德刚,等. 葡萄籽中多酚类物质的提取和纯化工艺[J]. 西北农业学报,2009(4):41-44.
- [18] 王华. 葡萄酒分析检测[M]. 北京:中国农业出版社,2010:154.
- [19] 李华,王蔚新,袁春龙. 葡萄籽多酚提取物的提取工艺研究[J]. 食品研究与开发,2005(26):69-72.
- [20] 王玮. 葡萄籽多酚类物质的提取工艺优化[J]. 中国保健营养,2014(3):1166-1167.

(上接第237页)

the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L[J]. Biochemical Journal, 1987, 248:449-454.

- [23] An H, Peters M Y, Seymour T A, et al. Isolation and activation of cathepsin L-inhibitor complexes from Pacific whiting (*Merluccius productus*) [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1995, 43:327-330.
- [24] Whang I, Mahanama D Z, Chamilani N. Molecular characterization and expression analysis of Cathepsin B and L cysteine proteases from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30:763-772.
- [25] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, et al. Proteinase in Pacific whiting surimi wash water: Identification and characterization [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(6):1165-1170.
- [26] Aranishi F, Ogata H, Hara K, et al. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* [J]. Comparative Biochemistry Physiology, 1997, 118B(5):531-537.
- [27] Liu H, Yin L J, Zhang N, et al. Purification and

Characterization of Cathepsin L from the Muscle of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(25):9584-9591.

- [28] 李树红,张楠,刘欢,等. 鲢鱼背肌肌原纤维蛋白自溶与内源组织蛋白酶B、L、H的关系[J]. 中国农业大学学报,2004,9(5):71-75.
- [29] 李海萍,陈海华. 漂洗工艺和热处理对鲤鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品与发酵工业,2009,35(3):109-113.
- [30] 何芸,姚开,贾冬英,等. 抗鱼肉蛋白冷冻变性机理的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2007,29(2):36-39.
- [31] Wakamatsu T, Saito Y. Further study on the effect of sucrose and sodium chloride on gelatin and unfreezable water of egg yolk during freezing [J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1980, 54:951-957.
- [32] Hu Y Q, Morioka K, Chen S G, et al. Effect of iced-storage on the activity of cathepsin L and trypsin-like protease in carp dorsal muscle [J]. LWT—Food Science and Technology, 2015, 60(2):1249-1253.
- [33] 侯鲁娜,陈学云,聂小华,等. 鲤鱼组织蛋白酶L活性的影响因素研究[J]. 食品工业科技,2010,31(11):75-77.