

鲢鱼背肌组织蛋白酶 L 的初步分离及蛋白层析纯化方法

王 谦^{1,3}, 焦熙栋^{1,3}, 闫博文^{1,3}, 孟令璐^{1,3}, 曹洪伟^{1,3}, 黄建联^{2,4,5},
赵建新^{1,3}, 张 灏^{1,3}, 陈 卫^{1,3}, 范大明^{1,2,3*}

¹江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏无锡 214122

²农业农村部冷冻与调理水产品加工重点实验室 福建厦门 361022

³江南大学食品学院 江苏无锡 214122

⁴福建省冷冻调理水产品加工重点实验室 福建厦门 361022

⁵福建安井食品股份有限公司 福建厦门 361022)

摘要 研究鲢鱼背肌中组织蛋白酶 L 的初步分离和纯化方法,重点研究初步分离过程中酸化处理条件、硫酸铵饱和度和透析袋分子质量对粗酶液中组织蛋白酶 L 活性的影响,以及纯化过程中不同类型离子交换层析柱和离子交换平衡缓冲液 pH 值对蛋白层析纯化的影响。结果表明:盐析最佳硫酸铵饱和度范围 55%~90%,酸处理最优条件 pH 3.0,40 °C 热处理 10 min 后 pH 值回调至 6.0,透析袋最佳分子质量 7 000 u。采用弱阴离子交换和分子筛两步层析法,选取 20 mmol/L、pH 6.0 磷酸盐缓冲液作为弱阴离子柱的平衡缓冲液,可得到 45 ku 电泳纯组织蛋白酶 L,其纯化倍数为 487,回收率为 22 mg/1 000 g。本法可最大限度地去除杂蛋白且操作简便、回收率高,为探究鱼糜凝胶劣化现象的有效抑制方法奠定了良好的基础。

关键词 鲢鱼; 组织蛋白酶 L; 初步分离; 蛋白层析

文章编号 1009-7848(2022)03-0111-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.014

中国淡水鲢鱼资源丰富,以鲢鱼肌肉为原料加工的鱼糜制品因高蛋白和低脂肪等特点而消费前景看好。在鱼糜加工过程中大多出现凝胶劣化现象,鱼肉被内源性蛋白酶降解,导致鱼糜凝胶强度低、口感差等问题^[1],其中淡水鱼糜制品的凝胶劣化现象相较于海水鱼更为严重^[2]。大多数研究认为肌纤维结合性蛋白酶是鱼糜凝胶劣化现象的主要诱因,因为其与蛋白结合紧密,在鱼糜加工过程中不易去除^[3]。其中,组织蛋白酶 L(EC 3.4.22.15)因水洗后残留活性高、热稳定性强、抗冻性强和具有广泛的底物特异性等特征而备受关注^[4-6]。目前研究大多通过分子克隆手段获得组织蛋白酶 L,

此方法难度较大,尤其是异源蛋白的表达受多种因素影响,从而间接影响酶的活性和结构^[7]。市售组织蛋白酶 L 大多来源于哺乳动物,而鱼类与哺乳动物组织蛋白酶 L 的同源性较差,白鲢组织蛋白酶 L 的基因片段尚未被鉴定,针对鲢鱼组织蛋白酶 L 的分子克隆研究极少。有必要对白鲢的内源性组织蛋白酶 L 进行分离纯化,为研究抑制鱼糜凝胶劣化方法提供依据。

由于组织蛋白酶 L 含量较少且其和肌肉结合紧密性强,现有的纯化方法大多采用阴离子交换层析、分子筛层析、阳离子交换层析和染料亲和层析组合的多步层析法来保证其纯度,然而此法步骤繁杂,耗时长且回收率低^[8]。本文在现有组织蛋白酶 L 分离纯化方法的基础上,优化酸处理、盐析和透析等分离步骤,建立弱阴离子交换和分子筛两步层析法,作为一种分离纯化鲢鱼组织蛋白酶 L 的新型方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

活白鲢(每条 1 500~2 000 g),购买于附近超市,击晕宰杀后装冰速运至实验室待用;蛋白纯化

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2019YFD0902000);国家自然科学基金项目(31822038);厦门市第二批重大科技项目(3502Z20201032);食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180102);“江苏省食品安全与质量控制协同创新中心”项目

作者简介: 王谦(1996—),女,硕士生

通信作者: 范大明 E-mail: fandm@jiangnan.edu.cn

层析柱 HiTrap SP HP、HiTrap Q HP、HiTrap DEAE FF (1.6 cm×2.5 cm) 和 HiLoad16/600 Superdex 75 pg (1.6 cm×60 cm) Cytiva (思拓凡), 原通用电气医疗生命科学事业部; 荧光合成底物 Z-Phe-Arg-MCA 和 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC), 美国 sigma-aldrich 西格玛奥德里奇公司; Bradford 蛋白测定试剂盒, 上海碧云天有限公司; 快速银染试剂盒, 上海生工生物工程股份有限公司; 三氯乙酸、乙酸、乙醇、十二烷基磺酸钠、氯化钠、醋酸钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等其它试剂均为国产分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

真空斩拌乳化混合多功能一体机, 德国 Stephan 公司; AKTA pure 蛋白层析系统, 瑞典通用电气医疗集团 (GE Healthcare); F-7000 荧光光谱仪, 日本日立 (Hitachi) 公司; 高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; 79480-3 冷冻干燥机, 美国 CONCO 公司; 蛋白电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 粗酶的分离 宰杀后的新鲜白鲢取其背部肌肉放入真空斩拌锅低速斩拌至碎肉状, 加入 4 倍体积 4℃预冷的 25 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (含 5 mmol/L L-Cys、0.3 mmol/L PMSF, pH 5.0) 于 4℃匀浆 20 min 后 12 000×g 离心 20 min 取上清液, 上清液用四层纱布过滤后即为粗酶分离液。

1.3.2 酸处理 用 1 mol/L 盐酸分别调整粗酶分离液的 pH 值至 3.0 和 4.0, 于 30℃分别反应 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 后用 1 mol/L 氢氧化钠回调 pH 值至 5.8~6.0, 立即 12 000×g 离心 20 min 取上清液测酶活, 此上清液即为酸化级分。

1.3.3 硫酸铵盐析 对酸化级分用 40%~90% 的硫酸铵分级沉淀, 充分盐析后 12 000×g 离心 20 min, 分别收集沉淀和上清液, 测其蛋白浓度和酶活。收集到的沉淀部分即为硫酸铵级分。

1.3.4 透析超滤浓缩 对硫酸铵级分用含有 5 mmol/L L-Cys, pH 值为 6.0 的 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液溶解, 选用分子质量分别为 3 500, 7 000, 14 000 u 的透析膜于 4℃下透析 24 h。透析级分通过超滤浓缩即为浓缩粗酶液。

1.3.5 离子交换层析 将浓缩粗酶液用 0.45 μm

微孔滤膜过滤后分别上样到 HiTrap DEAE FF (1.6 cm×2.5 cm)、HiTrap Q HP (1.6 cm×2.5 cm)、HiTrap SP HP (1.6 cm×2.5 cm) 离子交换柱, 流动相 A 分别为 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (含 5 mmol/L L-Cys, pH 值为 6.0, 7.0)、50 mmol/L 的乙酸钠缓冲液 (含 5 mmol/L L-Cys, pH 值为 4.5), 以 0~1 mol/L 氯化钠梯度洗脱, 收集活性峰后透析、超滤浓缩, 即为离子交换级分。流速 1 mL/min, 每管收集 4 mL。

1.3.6 HiLoad16/600 Superdex 75 pg 凝胶过滤层析 将离子交换级分上样于 HiLoad16/600 Superdex 75 pg (1.6 cm×60 cm) 凝胶柱, 用含 0.2 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (含 5 mmol/L L-Cys, pH 值为 6.0) 平衡和洗脱, 流速为 1 mL/min, 收集活性峰, 每管 4 mL, 透析超滤浓缩冻干存于 -80℃备用。

1.3.7 组织蛋白酶 L 活力测定 参照 Yamashita 等^[9]的方法, 将组织蛋白酶 L 的特异性底物 Z-Phe-Arg-MCA 浓度配制成 0.1 mol/L, 将含有 20 mmol/L 新制备的半胱氨酸的 0.5 mL 4 mmol/L EDTA-0.4 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.5) 加入到 0.9 mL 样品中。混合溶液在 25℃下预热, 同时快速加入 0.5 mL 0.1 mmol/L 合成底物开始反应。在 25℃下反应 30 min 后, 通过添加 3.0 mL 0.1 mol/L 三氯乙酸 0.1 mol/L 乙酸缓冲液 (pH 4.5) 终止反应。在激发波长 370 nm 和发射波长 460 nm 处测量了反应体系中 AMC 的荧光值。采用标准 AMC 样品作为标准曲线。在 25℃下, 按照 1 个酶活单位为释放 1 nmol AMC 计算组织蛋白酶 L 的活性。

1.3.8 蛋白质浓度测定 参考考马斯亮蓝法, 采用去垢剂兼容型 Bradford 蛋白定量试剂盒, 以牛血清蛋白为标准品。样品组每根离心管加入 100 μL 样品稀释液, 迅速加入 1 mL Bradford 工作液混匀, 室温 15~30℃反应 10 min 后在分光光度计上测 595 nm 处吸收值。

1.3.9 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳-银染法 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法制备样品凝胶, 电泳完成后采用银染法监测凝胶中低丰度蛋白质^[10]。

1.4 数据处理

试验中随机抽取样本, 每组样品至少平行测定 3 次。试验数据均用平均值±标准误差表示。测

定样品的平均值进行显著性分析($P < 0.05$)。图表用 OriginPro 2017 软件绘制。

2 结果与讨论

2.1 初步分离条件的优化

目前已有较多研究从多种生物的肌肉或者内脏中分离纯化出组织蛋白酶 L, 包括从鲤鱼背部白肌^[11]、耗牛肉^[12]、牛胰脏^[6]、鲑鱼肝脏^[13]等, 主要采用硫酸铵盐析和蛋白柱层析等多种蛋白纯化方法相结合的手段。为了除去杂蛋白, 提高酶的比活, 本研究在初步提取阶段对酸化、盐析、透析 3 个步骤进行条件优化。

2.1.1 酸处理条件的优化 因为组织蛋白酶 L 具有较高的热稳定性和酸稳定性, 通常会对粗酶液进行先酸化保温后回调 pH 值的酸处理手段来提高回收率^[15]。不同的酸处理条件下粗酶液中组织蛋白酶 L 的活性变化如图 1 所示, 粗酶液经过 pH 3.0, 40 °C 热处理 10 min 后, 其中组织蛋白酶 L 比活增加最多, 是粗酶液的 37 倍, 故选取 pH 3.0, 40 °C 热处理 10 min 后回调至 pH 6.0 作为酸处理最优条件。

2.1.2 盐析条件的优化 硫酸铵盐析法可以从大量粗酶液中浓缩和部分纯化蛋白质, 还可以除去脂类等杂质^[14]。粗酶液的盐析曲线如图 2 所示, 可以看出随着硫酸铵饱和度的增加, 组织蛋白酶 L 在 30%~40% 的蛋白沉淀中比活相对较少, 只有 1 U/mg 左右, 而在 55% 的硫酸铵中开始大量沉降, 当硫酸铵饱和度达到 55%, 70%, 80%, 90% 时, 比活分别达到 2.40, 2.63, 2.08, 1.91 U/mg, 因此选用 55%~90% 的硫酸铵饱和度可以最大限度回收目的蛋白。

2.1.3 透析条件的优化 对用 3 种透析袋分离得到的不同分子质量的组分进行组织蛋白酶 L 活性测定, 测定结果见表 1。由表 1 可知, 通过 7 000 u 透析袋透析得到的组分中组织蛋白酶 L 的比活最高, 通过 14 000 u 透析袋的组同比活最低, 表明粗酶液在 7 000~14 000 u 分子质量范围内存有活性的组织蛋白酶 L 中间体。这与前人的报道^[16-17]一致, 组织蛋白酶 L 的分子质量在 30~45 ku 范围内, 但在机体内组织蛋白酶 L 存在多种形式, 包括酶-内源抑制剂形式、无活性且低活性的前体形式

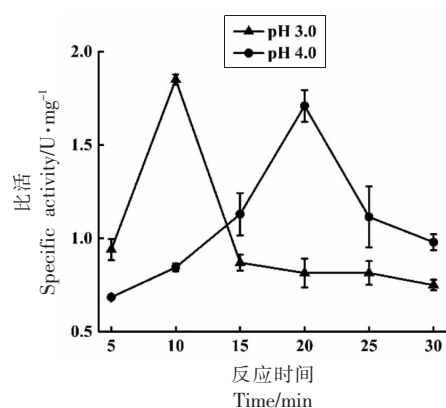


图 1 不同酸处理条件对组织蛋白酶 L 活性的影响
Fig.1 Effect of acid condition on cathepsin L activity

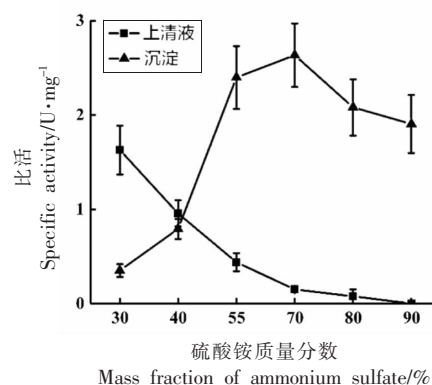


图 2 组织蛋白酶 L 的盐析曲线

Fig.2 Salting out curve of cathepsin L

表 1 不同分子质量透析袋对组织蛋白酶 L 活性的影响
Table 1 Effects of molecular weight of dialysis bags on cathepsin L activity

分子质量范围	比活/U·mg ⁻¹
3 500	6.32 ± 0.32
7 000	7.47 ± 0.40
14 000	5.45 ± 0.29

和有活性的成熟单体形式, 同时在酸化处理过程中会形成各种分子质量形式的活性中间体和低分子质量的成熟体, 所以实际得到的产物是组织蛋白酶 L 各种活性形式的混合物。因此为了最大限度回收具有活性的组织蛋白酶 L, 本法选取 7 000 u 的透析袋进行粗分离。

2.2 蛋白纯化条件的优化

2.2.1 离子交换层析柱的选择 Liu等^[18]采用离子交换层析、分子筛层析、阳离子交换层析和亲和层析四步纯化出鲢鱼背肌中的组织蛋白酶L;Hu等^[19]采用一步离子交换色谱法从鲤鱼背肌中纯化得到组织蛋白酶L;Cui等^[6]和Ogata等^[20]的纯化结果表明强阳离子交换可以大幅提高组织蛋白酶L的比活,表明阳离子交换柱对组织蛋白酶L具有很好的分离效果。为了选取适合的蛋白纯化层析柱,试验中采用强阳离子(HiTrap SP HP)、强阴离子(HiTrap Q HP)和弱阴离子(HiTrap DEAE FF)3种离子交换柱对粗酶液中的组织蛋白酶L进行分离,通过组织蛋白酶L比活来筛选合适的离子交换柱,结果如图3所示。

粗酶液经弱阴离子柱交换层析(图3a)后,在40~80 mL的洗脱体积范围内得到最高活力为236 U/L的组织蛋白酶L活性部分;经强阴离子柱交换层析(图3b)后,在15~30 mL的洗脱体积范围内得到最高活力为181 U/L的组织蛋白酶L活性部分;而经强阳离子柱交换层析(图3c)后,仅在50~60 mL的洗脱体积范围内得到最高活力为113 U/L的组织蛋白酶L活性部分。阴离子柱分离得到的蛋白峰分离度更好,分辨率更高,且目的蛋白峰紫外强度在16 mAU左右,而阳离子柱分离得到的蛋白峰数量多且粘连,其目的蛋白峰紫外强度在2 mAU左右,说明阴离子交换柱能有效吸附鲢鱼组织蛋白酶L,且有效分离杂蛋白。此结果与前人的研究结果类似^[18,19,21]。

对比图3a和图3b,可以看出经弱阴离子柱分离得到的目的蛋白峰宽更大,且其洗脱得到的活性蛋白溶液中组织蛋白酶L活力更高,是强阴离子柱的1.3倍。该结果可能是因为强阴离子柱的适用pH值范围在2~12,弱阴离子柱的适用pH值在2~9,故对于酸性蛋白酶(结果见图8)的组织蛋白酶L分离,弱阴离子柱的分辨率要高于强阴离子。因此根据试验结果选取弱阴离子柱(HiTrap DEAE FF)作为组织蛋白酶L分离纯化的离子柱。

2.2.2 流动相A的pH值选择 离子交换层析的基本反应过程是填料与待分离物质以及缓冲液中离子间的交换,所以在离子交换层析中平衡缓冲

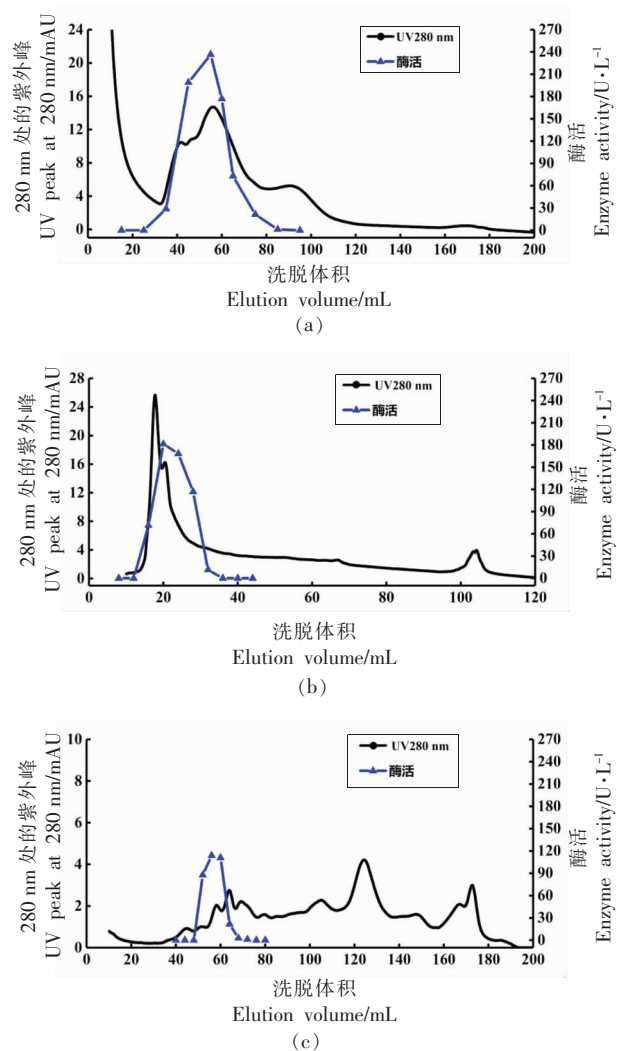


图3 采用不同离子交换层析柱——HiTrap DEAE FF(a)、HiTrap Q HP(b)、HiTrap SP HP(c)对组织蛋白酶L纯化效果影响

Fig.3 Effect of ion exchange chromatography column on purification of cathepsin L HiTrap DEAE FF (a), HiTrap Q HP (b), HiTrap SP HP (c)

液和洗脱缓冲液的离子强度和pH值的选择对于分离效果有很大的影响。平衡缓冲液的离子强度和pH值的选择首先要保证待分离蛋白的稳定,并尽量使目的蛋白和杂质与离子交换填料的结合有较大的差别,使目的蛋白与离子交换填料有稳定的结合,而尽量使杂质与离子交换填料结合不稳定,因此选择合适的平衡缓冲液就可以去除大量的杂蛋白^[22]。大部分研究选取20 mmol/L、pH 6.0磷酸盐缓冲液作为平衡缓冲液,也有选取

20 mmol/L、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液作为弱阴离子柱的平衡缓冲液^[13]。由于本试验选取的弱阴离子柱填料有所改进,为了确定其最佳平衡缓冲液 pH 值,分别选取 pH 6.0 和 pH 7.0 的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液对组织蛋白酶 L 分离,蛋白层析曲线结果如图 4 所示。通过对比可以看出在 pH 6.0 条件下此弱阴离子柱对组织蛋白酶 L 的分离度更好,且其最高酶活(236 U/L)是 pH 7.0 条件下(180 U/L)的 1.31 倍。pH 6.0 条件下在 280 nm 处检测到的目的蛋白峰强度为 4~15 mAU,比 pH 7.0 条件下的 2~7 mAU 高,故选取 20 mmol/L、pH 6.0 磷酸盐缓冲液作为此弱阴离子柱的平衡缓冲液。该结果可能是因为 pH 6.0 更接近组织蛋白酶 L 的等电点^[7,23],目的蛋白在其等电点处更容易保留。虽然根据等电点原理,目的蛋白在 pH 7.0 的离子化程度更大,更容易被洗脱,然而试验结果在 pH 7.0 时不好的原因可能是体系的离子强度大导致磷酸根和样品会竞争填料上的弱碱性阴离子基团,从而导致洗脱后目的蛋白峰面积较小。

2.2.3 分子筛层析 为了进一步纯化组织蛋白酶 L,将经弱阴离子柱交换后的活性部分收集浓缩加到平衡好的 Superdex 75 pg 分子筛层析柱,所得层析洗脱曲线如图 5 所示,可以看出在 40~50 mL 洗脱体积处有蛋白组分 I 和组分 II,在 50~70 mL 洗脱体积处有一组紫外信号较弱的蛋白组分 III,在 100~120 mL 洗脱体积处有紫外信号较强的蛋白组分 IV,通过酶活测定表明蛋白组分 III 为组织蛋白酶 L,同时也表明分子筛层析柱能够将组织蛋白酶 L 与其它杂蛋白进一步分离。

2.3 组织蛋白酶 L 初步分离及纯化方法的评价

2.3.1 SDS-PAGE 电泳法鉴定纯度 将具有组织蛋白酶 L 活性的洗脱部分收集浓缩后通过 SDS-PAGE 电泳银染色法鉴定其纯度,结果如图 6 所示。泳道 2 显示粗酶液通过弱阴离子交换层析后大分子质量杂蛋白已经得到有效去除,但仍有部分杂蛋白保留。泳道 3 显示通过分子筛层析柱的组织蛋白酶 L 活性部分在 45 ku 处出现单一条带,表明上述两步组合层析法可获得电泳纯的组织蛋白酶 L。其它研究从鲤鱼中获得的组织蛋白酶 L 分子质量为 36 ku^[19],从蓝园鲡中纯化的组织蛋白酶 L 分子质量为 30 ku^[21],Li 等^[8]证明鲢鱼的

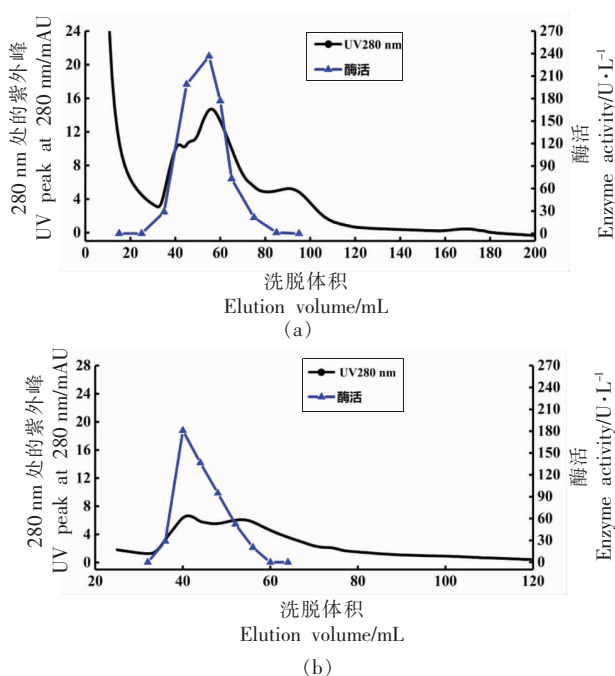


图4 采用不同 pH 值平衡缓冲液——pH 6.0(a)、pH 7.0(b)对组织蛋白酶 L 纯化效果影响

Fig.4 Effect of different pH balance buffer on the purification of cathepsin L pH 6.0 (a), pH 7.0 (b)

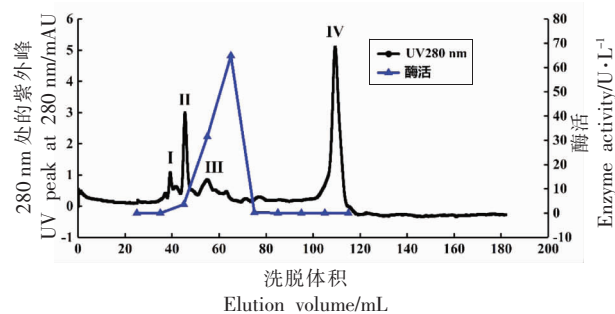
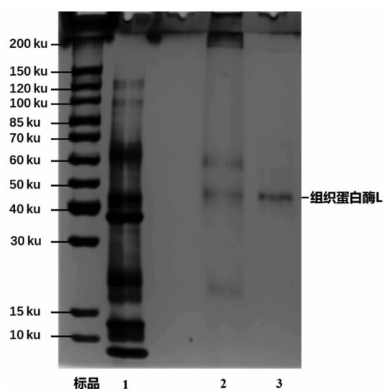


图5 组织蛋白酶 L 的 Superdex 75 pg 分子筛层析洗脱曲线

Fig.5 Superdex 75 pg molecular sieve elution curve of cathepsin L

组织蛋白酶 L 前体的分子质量为 78 ku,而组织蛋白酶 L 之间分子质量的差异可以归因于使用的鱼类种类和试验条件的不同。由于本研究中纯化的组织蛋白酶 L 分子质量为 45 ku,低于组织蛋白酶 L 前体的分子质量(78 ku),故推测本研究中纯化的组织蛋白酶 L 为成熟形态。

2.3.2 粗分离及纯化结果表征 粗分离各步及层析过程中组织蛋白酶 L 的比活和纯化倍数结果见



注:泳道 1:粗酶级分;泳道 2:弱阴离子级分;泳道 3:分子筛级分。

图 6 鲢鱼背肌组织蛋白酶 L 的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of cathepsin L in silver carp dorsal muscle

表 2, 经过两步层析法最终纯化倍数为 487 倍, 从 1 000 g 鲢鱼肌肉中分离纯化的组织蛋白酶 L 约 22 mg。结果显示粗分离步骤的纯化效率一般, 经弱阴离子交换层析后纯化倍数相较于粗酶液提高了近 3 倍, 分子筛层析一步的纯化倍数相比阴离子层析提高不显著, 说明阴离子交换柱已去除大部分杂蛋白。Hu 等^[19]采用一步离子交换色谱法从 1 000 g 鱼中纯化出 4.35 mg 组织蛋白酶 L, 纯化倍数为 18 倍。Li 等^[8]采用离子交换、凝胶过滤和亲和层析四步法从 1 000 g 鱼肉中纯化出 0.32 mg 组织蛋白酶 L, 纯化倍数为 2 130 倍。不同的纯化结果与鱼的种类有关^[24], 此外使用的层析步骤越多, 其纯化倍数越高, 回收率越低。综上所述, 本试验中采用的弱阴离子交换和分子筛两步层析法纯化倍数和回收率均较高且简单省时。

表 2 鲢鱼背肌组织蛋白酶 L 纯化结果表

Table 2 Purification result of cathepsin L from silver carp dorsal muscle

分离步骤	蛋白质量浓度/mg·mL ⁻¹	酶活/U·mL ⁻¹	比活/U·mg ⁻¹	纯化倍数
匀浆粗提酶液	3.06	0.17	0.05	1.00
酸处理后上清液	1.40	2.59	1.85	33.91
盐析	0.88	2.34	2.67	48.93
透析	0.69	5.17	7.47	137.10
浓缩粗酶液	0.83	6.56	7.88	144.57
DEAE 阴离子交换级分	0.32	7.09	22.16	443.2
Superdex 75 pg 分子筛级分	0.09	1.95	24.38	487.6

2.4 组织蛋白酶 L 的基本酶学性质

2.4.1 最适反应温度和热稳定性 由图 7 可知, 随着反应温度增加, 白鲢组织蛋白酶 L 的活性先增加后急剧下降, 其最适反应温度为 55 °C, 与大部分研究报道的 45~55 °C 结果吻合^[11, 13, 25]。且组织蛋白酶 L 的热稳定性随温度升高急剧下降, 在 50 °C 保温 1 h 时活性仍保留 50% 以上, 而 78 °C 下保温 1 h 后几乎无活性, 该结果表明组织蛋白酶 L 有一定的耐热性。

2.4.2 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性 由图 8 可知, 鲢鱼组织蛋白酶 L 的最适反应 pH 值为 5~5.5。酸性条件下其活性有所保持, 其中 pH 3.0 时仍然保持了 45% 的活性。碱性条件下此酶的活性急剧下降, 在 pH 7.0 时仍有 20% 左右的活性, 在 pH 8.0 时几乎失活, 表明此酶是偏酸性蛋白酶。

2.4.3 底物专一性和反应动力学常数 经测定, 白鲢的组织蛋白酶 L 对其专一性荧光底物 Z-Phe-Arg-MCA 有较强的水解活性, 对组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 H 的专一性荧光底物几乎没有水解活性, 由其反应动力学曲线(图 9)和米氏方程双倒数曲线(图 10)可知其最大反应初速度达到 130 U/mg, K_m 值为 49 μ mol/L。

3 结论

本研究对白鲢中组织蛋白酶 L 的粗分离和纯化方法进行了优化, 重点研究了初步提取过程中硫酸铵饱和度、酸处理条件和透析袋分子质量对粗酶液中组织蛋白酶 L 活性的影响, 以及纯化过程中不同类型离子交换层析柱和离子交换平衡缓冲液 pH 值对蛋白层析纯化结果的影响。结果表

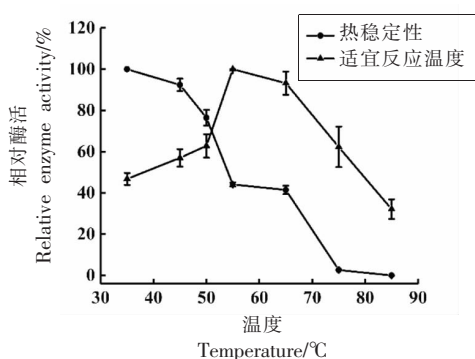


图 7 组织蛋白酶 L 的温度-相对酶活曲线

Fig.7 Temperature - relative enzyme activity curve of cathepsin L

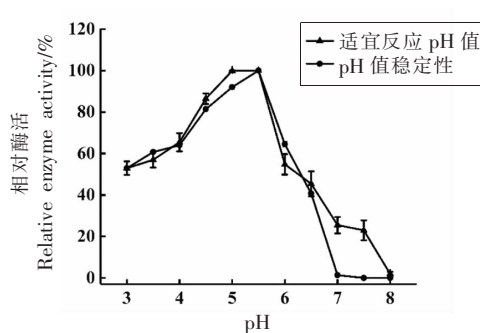


图 8 组织蛋白酶 L 的 pH-相对酶活曲线

Fig.8 pH - relative enzyme activity curve of cathepsin L

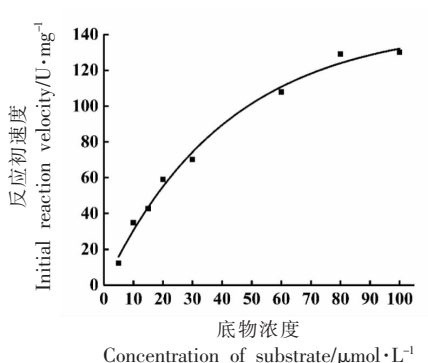


图 9 组织蛋白酶 L 水解 Z-Phe-Arg-MCA 的反应动力学曲线

Fig.9 Kinetic curves of the hydrolysis of Z-Phe-Arg-MCA by cathepsin L

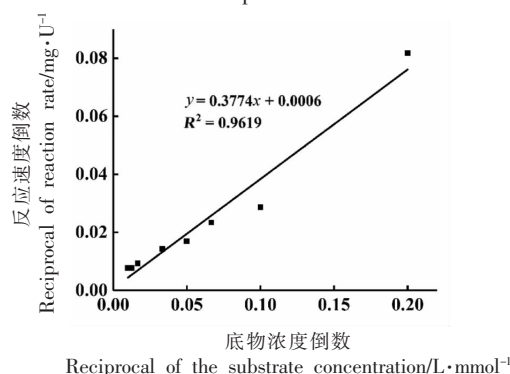


图 10 组织蛋白酶 L 水解 Z-Phe-Arg-MCA 的双倒数曲线

Fig.10 Double reciprocal curve of hydrolyzing Z-Phe-Arg-MCA by cathepsin L

明, 盐析最佳硫酸铵饱和度范围是 55%~90%、酸处理最优条件为 pH 3.0, 40 °C 热处理 10 min 后回调至 pH 6.0、透析袋最佳分子质量为 7 000 u, 以上试验条件可以最大限度回收目的蛋白。采用弱阴离子交换和分子筛两步层析法, 选取 20 mmol/L、pH 6.0 磷酸盐缓冲液作为弱阴离子柱的平衡缓冲液可得到 45 ku 电泳纯组织蛋白酶, 其纯化倍数为 487, 回收率为 22 mg/1 000 g。两步层析法较一步离子交换层析法纯化倍数更高, 较四步组合层析法回收率更高且简单省时。本法的建立为探究鱼糜凝胶劣化现象的有效抑制方法奠定了良好的基础。

参 考 文 献

[1] LUO Y K, SHEN H X, PAN D D, et al. Gel

properties of surimi from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) as affected by heat treatment and soy protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(8): 1513-1519.

- [2] LUO Y K, KUWAHARA R, KANENIWA M, et al. Comparison of gel properties of surimi from Alaska pollock and three freshwater fish species: Effects of thermal processing and protein concentration[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(4): 548-554.
- [3] UEKI N, MATSUOKA Y, WAN J, et al. The effects of endogenous proteases within abdominal muscle parts on the rheological properties of thermally induced gels from white croaker (*Pennahia argentata*) [J]. Food Chemistry, 2018, 268: 498-503.
- [4] HU Y Q, MORIOKA K, ITOHY. Hydrolysis of surimi paste from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) by cysteine proteinase cathepsin L and effect of the proteinase inhibitor (E-64) on

- gelation[J]. Food Chemistry, 2007, 104(2): 702–708.
- [5] JIANG S T, LEE B L, TSAO C Y, et al. Mackerel cathepsins B and L effects on thermal degradation of surimi[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(2): 310–315.
- [6] CUI Y Q, WANG F L, CUI B W, et al. Purification and characterization of Cathepsin L from bovine pancreas[J]. Food Science, 2015, 36(15): 142–146.
- [7] 顾燕, 汤伟, 王悦, 等. 耐高温 α -淀粉酶分子结构与异源表达研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1589–1599.
- GU Y, TANG W, WANG Y, et al. Advances in study on structure–function relationship of thermostable α -amylase and its heterologous expression[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1589–1599.
- [8] LI S H, ZHOU X Q, ZHANG N, et al. Purification and characterisation of cathepsin L2 from dorsal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Food Chemistry, 2008, 11(4): 879–886.
- [9] YAMASHITA M, KONAGAYA S. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*[J]. Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, 1990, 96(2): 247–52.
- [10] 高东, 杜飞, 朱有勇. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法[J]. 遗传, 2009, 31(6): 668–672.
- GAO D, DU F, ZHU Y Y. Low–background and high–resolution contracted silver–stained method in polyacrylamide gels electrophoresis [J]. Hereditas, 2009, 31(6): 668–672.
- [11] HOU L N, NIE X H, YU H L, et al. Isolation and characterization of cathepsin L from carp *Cyprinus carpio*[J]. Food Science and Technology, 2011, 36(2): 9–12.
- [12] 王文婷, 刘昕, 余群力, 等. 牦牛肉组织蛋白酶 L 提取工艺的优化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 225–230.
- WANG W T, LIU X, YU Q L, et al. Optimization of the technology for extracting cathepsin L from yak meat[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(1): 225–230.
- [13] 田元勇, 宋扬, 郑尧, 等. 鲑鱼肝脏蛋白酶的鉴定及组织蛋白酶 L 的分离纯化[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 28–33.
- TIAN Y Y, SONG Y, ZHENG R, et al. Identification of proteases and purification of cathepsin L from squid liver[J]. Food Science, 2017, 38(24): 28–33.
- [14] 何俊燕, 李来好, 郝淑贤, 等. 硫酸铵盐析法分离罗非鱼肌红蛋白的研究[J]. 南方水产, 2009, 5(2): 17–22.
- HE J Y, LI L H, HAO S X, et al. Separation of myoglobin from tilapia by ammonium sulfate salting–out[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(2): 17–22.
- [15] VISESSANGUAN W, BENJAKUL S, AN H J. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B–Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 134(3): 477–487.
- [16] AOKI T, YOKONO M, UENO R. A cathepsin B–like enzyme from mackerel white muscle is a precursor of cathepsin B[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B–Biochemistry & Molecular Biology, 2002, 133(3): 307–316.
- [17] SANDERSON S J, POLLOCK K G J, HILLEY J D, et al. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*[J]. Biochemical Journal, 2000, 347(2): 383–388.
- [18] 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.
- [19] HU Y Q, 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.
- [20] OGATA H, ARANISHI F, HARA K, et al. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 76(4): 499–504.
- [21] ZHONG C, CAI Q F, LIU G M, et al. Purification and characterisation 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.
- [22] 何传波, 魏好程, 熊何健, 等. 枇杷叶多糖酶法提

- 取工艺优化及其离子交换层析纯化[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 45-50.
- HE C B, WEI H C, XIONG H J, et al. Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from loquat leaves and purification by ion exchange chromatography[J]. Food Science, 2016, 37(8): 45-50.
- [23] 潘光照, 张奎, 李重阳, 等. 家蚕组织蛋白酶L (BmCathepsin L)基因鉴定、表达及其功能分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(16): 3236-3246.
- PAN G Z, ZHANG K, LI C Y, et al. Identification, expression, and functional analysis of cathepsin L in silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(16): 3236-3246.
- [24] GODIKSEN H, NIELSEN H H. New method to discriminate between cathepsin B and cathepsin L in crude extracts from fish muscle based on a simple acidification procedure [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42(1): 102-106.
- [25] 罗华彬, 林露, 高星, 等. 电子束辐照对带鱼鱼糜内源性蛋白酶活性及其构象单元的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 23-28.
- LUO H B, LIN L, GAO X, et al. Effect of electron beam irradiation on the activity and conformational unit of endogenous proteases from hairtail surimi[J]. Food Science, 2019, 40(9): 23-28.

Preliminary Isolation and Purification by Protein Chromatography of Cathepsin L from Silver Carp Dorsal Muscle

Wang Qian^{1,3}, Jiao Xidong^{1,3}, Yan Bowen^{1,3}, Meng Linglu^{1,3}, Cao Hongwei^{1,3}, Huang Jianlian^{2,4,5}, Zhao Jianxin^{1,3}, Zhang Hao^{1,3}, Chen Wei^{1,3}, Fan Daming^{1,2,3*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Key Laboratory of Refrigeration and Conditioning Aquatic Products Processing,

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361022, Fujian

³School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

⁴Fujian Provincial Key Laboratory of Refrigeration and Conditioning Aquatic Products Processing, Xiamen 361022, Fujian

⁵Fujian Anjoyfood Share Co., Ltd., Xiamen 361022, Fujian)

Abstract The preliminary isolation and purification by protein chromatography of cathepsin L from silver carp dorsal muscle were studied. The influence of ammonium sulfate saturation, acid treatment and dialysis bag of molecular weight during preliminary isolation on the activity of cathepsin L were mainly studied, as well as the influence of different types of ion exchange column chromatography and ion exchange equilibrium buffer pH during purification process on protein chromatography purification results were studied. The results showed that the optimal salting out ammonium sulfate saturation range was 55%-90%, the optimal acid treatment condition was pH 3.0 and the heat treatment was at 40 °C for 10 min, the optimal molecular weight of dialysis bag was 7 000 u. As a result, 45 ku electrophoresis pure cathepsin L was obtained by combining weak anion exchange chromatography and molecular sieve chromatography and using 20 mmol/L, pH 6.0 phosphate buffer as the equilibrium buffer of weak anion column. Moreover, the purification fold was 487 and the recovery rate was 22 mg/1 000 g. This method has the advantages of simple operation and high recovery rate, which lays a good foundation for exploring the effective method of inhibiting the deterioration of surimi gel.

Keywords silver carp; cathepsin L; preliminary isolation; protein chromatography