



皱纹盘鲍脯氨酰内肽酶的分离纯化及性质

陈守峰¹, 杨汝晴¹, 陈玉磊^{1,2}, 孙乐常^{1,2},
张凌晶^{1,2}, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2*}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 海洋食品深加工协同创新中心, 辽宁 大连 116034)

摘要: 为探究脯氨酰内肽酶 (PEP) 在皱纹盘鲍性腺发育过程中的作用, 实验采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析皱纹盘鲍不同组织中 PEP 的表达情况。通过硫酸铵分级沉淀和连续柱层析, 从皱纹盘鲍性腺中分离纯化得到高纯度天然 PEP。利用液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 鉴定肽片段序列, 以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物分析 PEP 的酶学性质。利用圆二色谱分析温度对 PEP 结构的影响; 采用免疫印迹 (Western blot) 和 qRT-PCR 分析鲍性腺在不同发育时期 PEP 的蛋白和基因表达水平。结果显示, 皱纹盘鲍的性腺中, PEP 基因表达量和酶活性最高。利用硫酸铵分级沉淀和连续柱层析, 从性腺中分离纯化得到分子量约为 82 ku, 等电点约为 5.5 的 PEP, LC-MS/MS 分析得到 502 个氨基酸残基, 与 NCBI 中皱纹盘鲍脯氨酰内肽酶 (KY214290) 一致。PEP 的最适温度和最适 pH 分别为 25 °C 和 6.0, 在 15~25 °C 和 pH 5~8 条件下能够保持较高的活性。随着温度升高, PEP 的二级结构有明显的改变, 拟合热变性温度为 (51.4±0.2) °C。PEP 在雄性和雌性性腺的各个生长期均能被检出, 在雄性性腺的成熟中期和雌性性腺的成熟后期表达量最高。研究表明, PEP 在鲍性腺不同发育时期表达量的差异表明其可能参与性腺发育的过程。

关键词: 皱纹盘鲍; 脯氨酰内肽酶; 纯化; 性质分析; 性腺发育

中图分类号: Q 786; TS 254.4

文献标志码: A

脯氨酰内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP EC3.4.21.26) 广泛分布于动植物和微生物中, 其作用底物为长度小于 30 个氨基酸并含有脯氨酸残基的寡肽^[1]。PEP 通过特异性降解含脯氨酸残基的肽激素和神经肽, 在许多生理过程, 例如学习和记忆、细胞分化和信号转导中发挥作用^[2-3]。PEP 已经在多种哺乳动物组织, 如羊肾脏^[4]、人大脑^[5]、猪肝脏中被发现^[6]。在水产动物 PEP 研究方面, 本研究室相继从罗非鱼 (*Oreochromis spp.*)^[7]、蓝圆鲂 (*Decapterus maruadsi*)^[8]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9] 等鱼类肌肉中分离纯化得到 PEP, 推测其可能通

过降解含脯氨酸残基的胶原小肽而与鱼类胶原蛋白的新陈代谢以及死后软化自溶相关。

有研究认为, PEP 可能参与哺乳动物的生殖过程, 因为在哺乳动物的生殖器官睾丸和卵巢中检测出较高的酶活性^[10-11]。对小鼠 (*Mus musculus*) 精子产生过程中不同时期 PEP 定位的研究发现, PEP 全程参与小鼠精子发生, 其通过参与精原细胞的分化从而在小鼠精母细胞减数分裂和精细胞分化过程中发挥重要作用^[12]。利用基因敲除技术研究发现, 野生型大鼠 (*Rattus norvegicus*) 睾丸的精子活力、精子总数和正常形态的精子数量均高

收稿日期: 2020-12-27 修回日期: 2021-03-24

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901004); 国家自然科学基金 (31772049); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-49)

第一作者: 陈守峰 (照片), 从事水产加工与蛋白质化学研究, E-mail: 201811832015@jmu.edu.cn

通信作者: 曹敏杰, 从事水产加工与蛋白质化学研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn



于 PEP 基因敲除组, 表明 PEP 可能是发挥正常生殖功能所必需的^[13]。PEP 也可能参与调节精浆中促甲状腺素释放激素类似物的水平, 从而调控精子细胞的凋亡^[14]。另一方面, PEP 也与卵子的发育相关, PEP 在猪卵巢卵泡颗粒细胞层的表达比在大卵泡的颗粒细胞层中表达更为明显, 表明其在卵泡发育早期的重要性^[15]。在水产动物的研究方面, PEP 被认为与水产动物的繁殖相关。Yokosawa 等^[16]从真海鞘 (*Halocynthia roretzi*) 精子中纯化了 PEP, 对其进行生化表征, 发现 PEP 特异性抑制剂 (Z-Gly-Pro-氯甲酮) 可以抑制海鞘受精过程, 推测其可能参与受精过程。Yoshida 等^[17]从太平洋鲱 (*Clupea pallasii*) 精巢中分离出 PEP, 发现 PEP 存在于精子尾部表面, 并与鲱精子激活蛋白相互作用。对金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 下丘脑用雌二醇激素进行体内和体外刺激, 发现 PEP 基因表达水平出现明显下调, 这表明 PEP 可能通过降解 GnRH 调控性腺类固醇类激素的释放, 从而在生殖调控中发挥重要作用^[18]。

与哺乳动物相比, 国内外对软体动物 PEP 的研究相对匮乏。虽然在前期的研究中本团队克隆得到皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) PEP 的基因, 成功实现了该蛋白的体外高效表达并分析了其晶体结构^[19], 但天然 PEP 的纯化及酶学性质分析以及其在鲍体内的作用仍未见报道。

本研究拟从皱纹盘鲍性腺中分离纯化得到 PEP, 分析其酶学性质及二级结构。进一步研究鲍 PEP 在性腺发育过程中表达水平的变化, 为深入研究 PEP 在鲍性腺发育过程中的功能提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

实验所用的皱纹盘鲍购自厦门夏商国际水产交易中心, 鲜活鲍平均体质量 40 g, 取其组织和性腺用于后续实验。

DEAE-Sepharose、Sephacryl S-200、Phenyl Sepharose 等层析树脂 (GE Healthcare, 美国), Suc-Gly-Pro-MCA 等荧光底物 (Peptide Institute, 日本), SUAM-14746、EDTA、Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, 美国), E-64 (Amresco, 美国), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (青岛福林生物化学公司, 中国), 双向电泳 IPG 胶条、十二烷基硫酸钠、丙烯酰胺 (Bio-Rad, 美国), 考马斯亮蓝 R-250 和过硫酸铵 (APS) 为美国 Sanland-chem 公司

产品。重组皱纹盘鲍 PEP 多克隆抗体委托厦门大学医学院制备; β -actin 抗体购于美国圣克鲁斯生物技术有限公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体、ECL 显色液为美国 Pierce 公司产品。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。Eastep[®] 总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。Evo M-MLV 反转录试剂盒购自艾科瑞生物工程有限公司。其他分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

皱纹盘鲍不同组织中 PEP mRNA 的表达量分析 从美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI) 中检索皱纹盘鲍 PEP 基因序列 (KY214 290), 根据全长序列设计荧光定量 PCR (qRT-PCR) 上下游引物, 选择 18S *rRNA* 作为内参基因, 引物及序列见表 1。取 6 只已明显能区分雌雄性别的鲍的不同组织: 外套膜、腹足、鳃、肌肉、肝脏、性腺。将同种组织混合, 用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 检测 RNA 浓度之后立即将其反转录为 cDNA, 得到的 cDNA 冻存于 -20°C 备用。以各个组织的 cDNA 为模板, 用 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 美国) 仪进行 qRT-PCR 扩增。反应体系和反应程序参照刘晓菲等^[20]的方法并做适当修改。目的基因和内参基因平行测定 3 次, 实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算出相对表达量。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage
PEP-F	CCTGCTGGTGGGTGCTTGAT	qRT-PCR
PEP-R	GAAGTCGTCGGTGCTGTCTGA	
18S-F	CCGAGGGTCTCACTAAACCATTTC	qRT-PCR
18S-R	TCCCAGTAAGCGTCAGTCATCAG	

皱纹盘鲍 PEP 在各组织中的酶活性分析 取 6 只已能明显区分雌雄性别的鲍的不同组织, 将相同组织混合, 加入少量 25 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH 7.5) 后, 用组织捣碎机捣碎, 4°C , $15\ 000\times g$ 离心 30 min, 取上清液即为粗酶液。用蛋白浓度测定试剂盒测定后, 将各粗酶液的蛋白浓度调至相同浓度, 在 25°C 下, 按照下述方法测定其相对酶活性。

PEP 活性测定方法 参考 Yoshida 等^[17]的方法并做部分改进。具体方法: 以 Suc-Gly-Pro-

MCA为荧光底物,将50 μL浓度为10 μmol/L的荧光底物加入到850 μL的25 mmol/L PBS (pH 6.0)中,再加入100 μL酶液,在25 °C反应30 min后,立即加入1.5 mL终止液(甲醇:异丙醇:蒸馏水=35:30:35,体积比)终止反应。用荧光分光光度仪测定在380 nm激发波长和450 nm发射波长下反应产生的产物7-氨基-4-甲基香豆素(7-amino-4-methylcoumarin, AMC)的荧光强度。

蛋白浓度测定 在蛋白纯化过程中,通过紫外法测定样品在280 nm处的吸光值,确定蛋白质含量。

皱纹盘鲍 PEP 的纯化 取100 g性腺,加入4倍体积的缓冲液A(25 mmol/L PBS, pH 7.5,含4 mmol/L β-巯基乙醇),组织捣碎,于4 °C,15 000×g离心30 min,得上清液即为PEP粗酶。将所得的粗酶液用饱和度为60%~80%的硫酸铵分级沉淀。用少量的缓冲液A复溶沉淀充分透析。将透析液上样于用缓冲液A平衡的DEAE-Sephacryl S-200凝胶过滤柱(2.5 cm×15 cm)。经缓冲液A充分流洗后,用含0~0.5 mol/L NaCl的缓冲液A以1 mL/min进行线性洗脱,洗脱总体积500 mL。收集酶活性较高的组分进行超滤膜浓缩后,将其上样于Sephacryl S-200凝胶过滤柱,用含0.15 mol/L NaCl的缓冲液A进行流洗,收集酶活性较高的组分加入(NH₄)₂SO₄至终浓度为1.2 mol/L,搅拌均匀后,用0.22 μm膜过滤。将样品上样到用含有1.5 mol/L (NH₄)₂SO₄的缓冲液A平衡过的Phenyl Sepharose (5 mL)疏水层析柱进行纯化。用含有相同浓度(NH₄)₂SO₄的缓冲液A流洗至A₂₈₀<0.05,然后用1.5~0 mol/L (NH₄)₂SO₄的缓冲液进行线性洗脱。将活性部分收集进行电泳分析和酶学性质分析。

肽序列的液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析 纯化蛋白上样于聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳并染色后将目的条带从凝胶上切除,委托深圳市微纳菲生物技术有限公司进行LC-MS/MS分析。

双向电泳 双向电泳分析参照唐逸等^[21]的方法进行。将纯化后的PEP与水合液(7 mol/L尿素、2 mol/L 硫脲、2% CHAPS)、0.5%两性电解质、20 mmol/L DTT、少量溴酚蓝混合后与IPG胶条(10 cm, pH 3~10)加入到胶条槽,两侧各加入200 μL的矿物油后开始等电聚焦。等电聚焦结束后将胶条置于1% DTT的平衡缓冲液I和1.5% IAA的平衡缓冲液II中摇床振荡20 min。平衡结

束后,对胶条进行SDS-PAGE分析。

温度和pH对PEP的影响 按酶活性测定方法,在不同温度(15、20、25、30、35和40 °C)下测定酶活性,确定酶的最适作用温度。热稳定性是在上述不同温度下,将酶孵育20 min后,在最适温度下测其剩余酶活性。

最适pH值的测定 按照酶活性测定方法,在pH 4.0~10.0的缓冲液中测定酶活性。所用缓冲液为0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 3.0~5.0)、0.1 mol/L PBS (pH 6.0~7.5)、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0)和0.1 mol/L Gly-NaOH 缓冲液(pH 10.0)。pH稳定性分析是将酶置于不同pH值的缓冲液中,4 °C孵育30 min后,在最适温度25 °C, pH 6.0下测其剩余酶活性。

蛋白酶抑制剂对PEP的影响 研究不同蛋白酶抑制剂对PEP活性的影响。在4 °C下,将溶于25 mmol/L PBS (pH 6.0)的PEP与不同浓度抑制剂孵育30 min,然后测定剩余酶活性,对照组不添加抑制剂。蛋白酶抑制剂有PEP的特异性抑制剂(SUAM-14746)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(STI和PMSF)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Leupeptin和E-64)、金属蛋白酶抑制剂(EDTA和EGTA)。

底物特异性分析 在以上实验确定最适pH值和温度后,以不同种类的荧光底物为对象,进行酶活性测定,将PEP特异性荧光底物Suc-Gly-Pro-MCA的酶活性设为100%,据此计算出其他底物的相对活性。

圆二色谱(CD)分析PEP的二级结构和热变性温度 参照杨汝晴等^[22]的方法,将纯化PEP从25 °C加热到95 °C,然后从95 °C降温到25 °C,测定其在温度变化过程中二级结构的变化情况。温度变化速率为1 °C/min,测定波长为190~260 nm。通过Global 3软件模拟出PEP的热变性温度。

性腺不同发育时期时PEP的表达量分析

参照董茂礼^[23]的实验方法,通过肉眼观察,将不同发育阶段的鲍性腺分为初期、前期、中期和后期。将性腺用少量缓冲液A溶解后组织捣碎,4 °C,15 000×g离心30 min,取上清液,用蛋白浓度测定试剂盒测定上清液蛋白浓度,上样量40 μg,以β-actin作为内参蛋白。实验步骤参照苏国茂等^[24]的方法并做适当修改,SDS-PAGE后,采用半干转法转膜、封闭液(含5%脱脂奶的TBST)室温封闭2 h; TBST洗涤3次,每次5 min; 用兔抗重组皱纹盘鲍PEP(1:5000,体积比)1次抗体,在室温下孵育1 h; TBST洗涤5次,每次5 min;

用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二次抗体在室温下孵育 1 h; TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min; 加入显色液进行 ECL 显色。ImageJ 软件分析蛋白条带含量。

2 结果

2.1 PEP 在鲍组织中的活性及 mRNA 水平分析

为了解 PEP 在鲍组织中的分布情况, 将鲍的不同组织在 25 mmol/L PBS (pH 7.5) 中组织捣碎, 调节各组织的粗蛋白浓度至一致, 在最适温度下检测酶活性, PEP 在性腺中的酶活性最高, 在肌肉、腹足和外套膜中也检测到酶活性, 肝脏和鳃组织中的酶活性最低 (图 1-a)。qRT-PCR 结果显示, 在 mRNA 水平上, 同样是性腺中的水平最高, 其次是肌肉, 其他 4 种组织中的表达水平较低 (图 1-b), 这与相对酶活性的结果相似。PEP 在性腺中的酶活性以及 mRNA 表达水平均最高, 推测其与性腺的生长发育密切相关。

2.2 PEP 的分离纯化

为了探究皱纹盘鲍 PEP 的性质, 通过柱层析方法从性腺中分离纯化得到 PEP。图 2 为鲍性腺 PEP 分离纯化的柱层析图谱。性腺经过前处理和 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱之后, 去除了大量杂蛋白, 用含 0~0.5 mol/L NaCl 的 25 mmol/L PBS (pH=7.5) 进行线性洗脱, 发现目的蛋白在 0.2 mol/L NaCl 下被洗脱下来 (图 2-a)。收集有活性的

组分进行浓缩后, 上样于 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱, 结果如图 2-b 所示。收集酶活性较高的组分, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 1.5 mol/L, 上样于 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱。经疏水层析柱后, 大量的杂蛋白被除去, 目的蛋白被 1.2~1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 洗脱下来 (图 2-c), 经 SDS-PAGE 分析得到单一条带, 分子量约为 82 ku (图 2-d)。

从 100 g 皱纹盘鲍性腺中纯化得到 0.6 mg 的 PEP, 得率为 0.9%, 纯化倍数 139.1 倍 (表 2)。

2.3 质谱鉴定和双向电泳分析

对经 SDS-PAGE 分析后的 PEP 进行切胶处理, 经过胰蛋白酶酶解后进行 LC-MS/MS 分析, 得到 502 个氨基酸残基, 共 182 个肽段。通过与 NCBI 库中的 PEP 比较, 结果如图 3-a 所示, 得到的肽段与皱纹盘鲍脯氨酰内肽酶 (KY214290) 序列完全一致, 表明纯化得到的蛋白是 PEP。

双向电泳 (2-DE) 是等电聚焦和 SDS-PAGE 的组合, 先按照蛋白等电点进行分离, 然后按照分子量大小进行分离, 能测定蛋白质的等电点和分子量。由 PEP 的双向电泳结果可知, 该蛋白得到高度纯化 (图 3-b), 相对分子质量与 SDS-PAGE 结果相同 (图 2-d), 等电点约为 5.5。

2.4 PEP 的酶学性质分析

温度和 pH 对 PEP 活性的影响 以 Suc-Gly-Pro-MCA 为底物, 测定不同温度下 PEP 的相对酶活性。皱纹盘鲍 PEP 的最适温度为 25 °C,

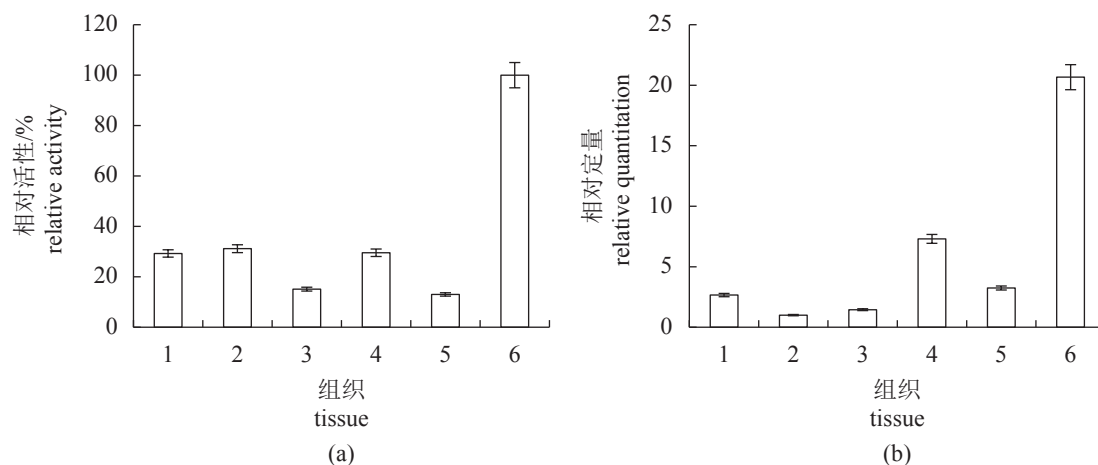


图 1 皱纹盘鲍不同组织中 PEP 的分析

(a) 不同组织中 PEP 相对酶活性, (b) 不同组织中 PEP mRNA 的相对表达量; 1. 外套膜, 2. 腹足, 3. 肝脏, 4. 肌肉, 5. 鳃, 6. 性腺

Fig. 1 Analysis of PEP in different tissues of *H. discus hannai*

(a) relative activity of PEP in different tissues of *H. discus hannai*, (b) relative mRNA expression level of PEP in different tissues of *H. discus hannai*; 1. mantle, 2. gastropod, 3. liver, 4. muscle, 5. gill, 6. gonad

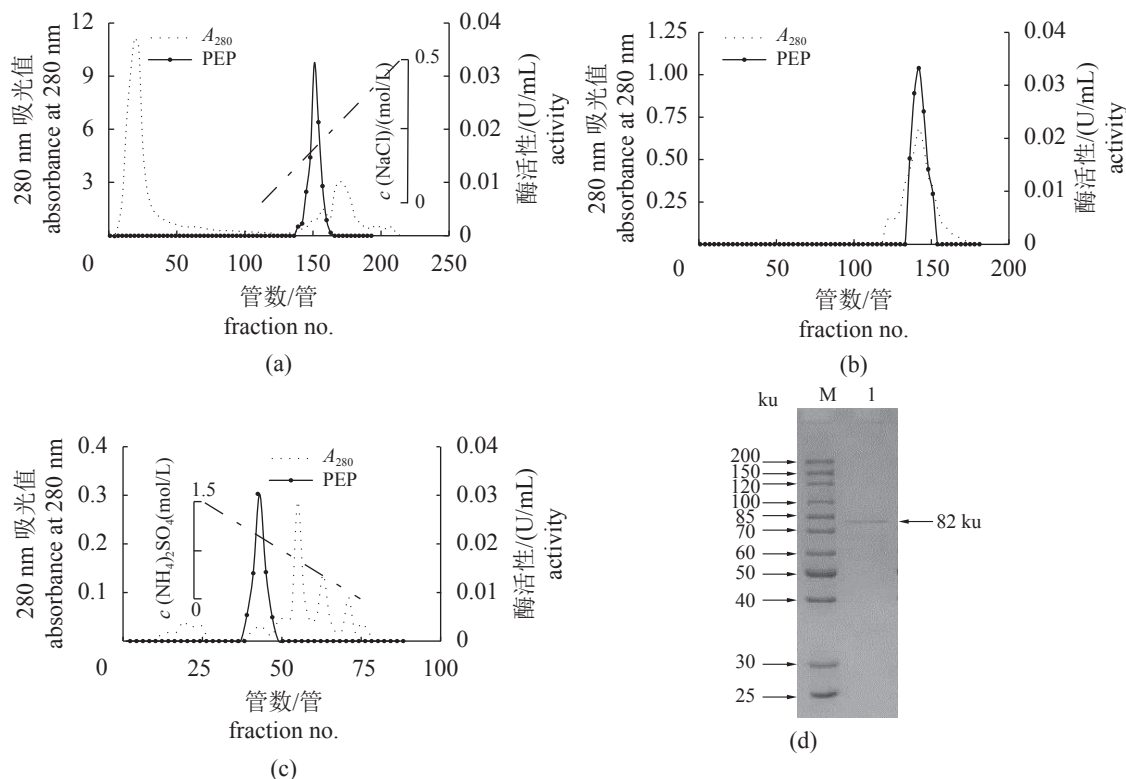


图 2 PEP 的柱层析纯化及 SDS-PAGE

(a) DEAE-Sepharose, 5 mL/管, (b) Sephacryl S-200, 2 mL/管, (c) phenyl-Sepharose, 2 mL/管, (d) SDS-PAGE。M. 标准蛋白, 1. 纯化的 PEP

Fig. 2 Column chromatography purification of PEP and SDS-PAGE

(a) DEAE-Sepharose, 5 mL/tube, (b) Sephacryl S-200, 2 mL/tube, (c) phenyl-Sepharose, 2 mL/tube, (d) SDS-PAGE; M. standard proteins, 1. purified of PEP

表 2 皱纹盘鲍 PEP 的纯化结果

Tab. 2 Summary of purification of PEP from *H. discus hannai*

纯化过程 purification process	总蛋白/mg total protein	酶活性/U enzyme activity	比活力/(U/g) specific activity	得率/% yield	纯化倍数 fold
粗酶 crude enzyme	8723.5	60.9	6.9	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	3798	30.6	8.1	50.2	1.2
DEAE-Sepharose	28.0	2.5	89.3	4.1	12.9
Sephacryl S-200	5.5	0.7	127.2	1.1	18.4
Phenyl-Sepharose	0.6	0.6	960.0	0.9	139.1

当温度高于 35 °C, 酶活性急剧下降 (图 4-a), 表明该酶对温度敏感, 属于低温酶。热稳定分析中, 在 15~25 °C 温度范围内孵育 30 min, 该酶能够保持较高的稳定性, 当温度高于 35 °C, 其稳定性急剧下降, 说明该酶的热稳定性较差。

分析皱纹盘鲍 PEP 在 pH 4~10 的活性及其稳定性, 发现该酶的最适 pH 值为 6.0。当 pH 值 <5 或 >7 时, 活性较低 (图 4-b), 说明该酶在中性偏酸的环境下能发挥最大活性。从酶的 pH 稳定性可知, 该酶在 pH 值 5~8 时能保持较高的稳定性, 当 pH 值 >8 或 <5 时, 酶的稳定性下降明显。

底物特异性分析 以 PEP 的特异性底物 Suc-Gly-Pro-MCA 为参照, 对其底物特异性进行分析。PEP 对底物 Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA 的水解能力最强, 而对丝氨酸蛋白酶底物 Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA 和组织蛋白酶底物 Z-Arg-Arg-MCA 没有明显的水解作用 (表 3)。对含有脯氨酸残基的氨肽酶底物 Pro-MCA 也没有水解效果, 证实了 PEP 是从脯氨酸羧基端水解的一种内肽酶。

蛋白酶抑制剂对酶活性的影响 PEP 特异性抑制剂 SUAM-14746 能够完全抑制 PEP 的活性,

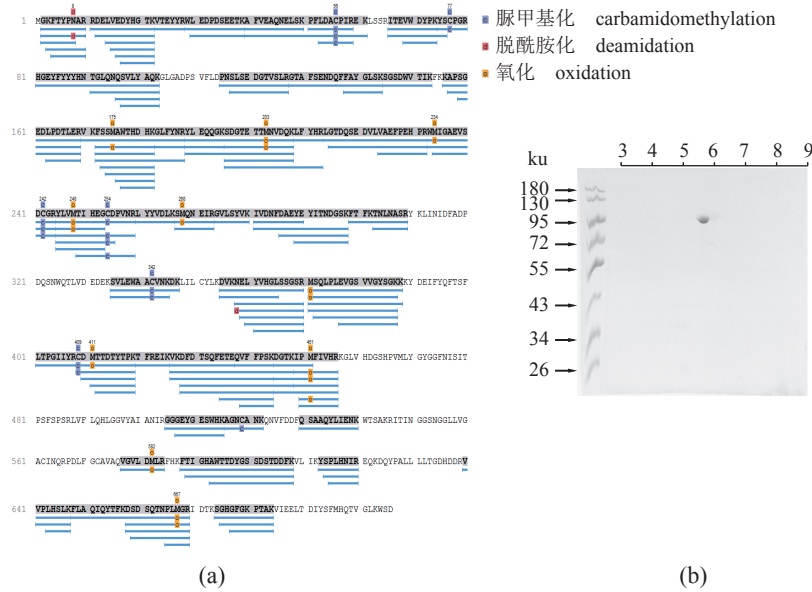


图 3 纯化 PEP 的 LC-MS/MS 和等电点分析

(a) 质谱分析, (b) 双向电泳分析

Fig. 3 LC-MS/MS and isoelectric point analysis of the purified PEP

(a) LC-MS/MS, (b) two-dimensional electrophoresis

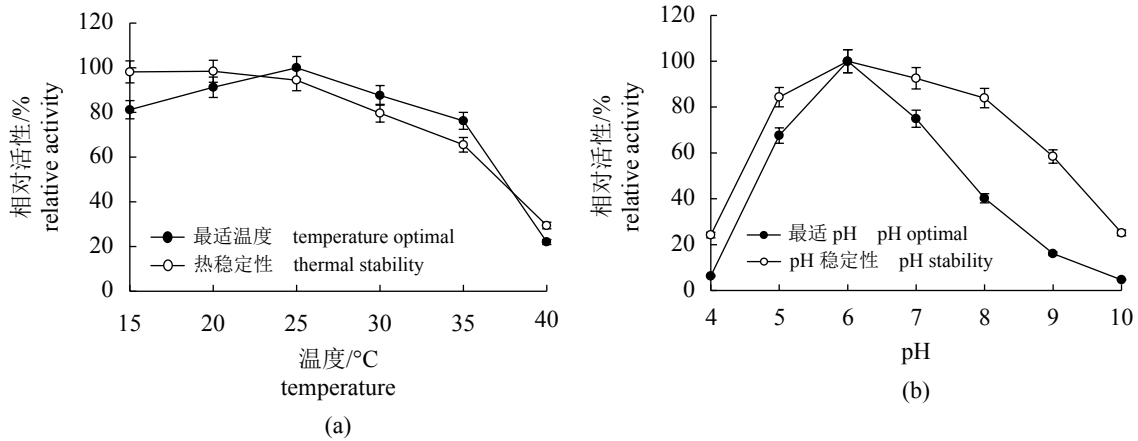


图 4 温度 (a) 和 pH(b) 对 PEP 活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature (a) and pH (b) on the activity of PEP

表 3 PEP 的底物特异性

Tab. 3 Substrate specificity of PEP

底物 substrate	相对活性/% relative activity
Suc-Gly-Pro-MCA	100.0
Suc-Gly-Pro-Leu- Gly-Pro-MCA	173.5
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	0
Boc-Gly-Ala-Arg-MCA	0
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	0
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0
Z-Arg-Arg-MCA	0
Pro-MCA	0
Met-MCA	0

丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 也能较大程度地抑制 PEP 的活性 (表 4), 表明 PEP 属于丝氨酸蛋白酶家族^[25]。其他丝氨酸蛋白酶抑制剂 (STI)、金属蛋白酶抑制剂 (EDTA、EGTA)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Leupeptin、E-64) 对 PEP 则没有抑制作用。

2.5 温度对 PEP 结构的影响

通过圆二色谱 (CD) 扫描, 研究温度对 PEP 二级结构的影响。当温度从 25 °C 升高至 50 °C 时, α-螺旋结构含量从 12.5% 减少到 11.2%, 无规则卷曲结构含量从 24.4% 上升到 25.1%。温度从 50 °C 升高至 55 °C 时, α-螺旋结构含量增加至 13%, β-

表4 蛋白酶抑制剂对 PEP 的作用

抑制剂 inhibitor	浓度/(mmol/L) concentration	剩余活性/% residual activity
对照 control	0	100.0
SUAM-14746	0.000 5	0
PMSF	5	37.0
STI	2	99.8
E-64	0.01	99.2
Leupeptin	0.1	111.3
EDTA	5	102.4
EGTA	5	107.5

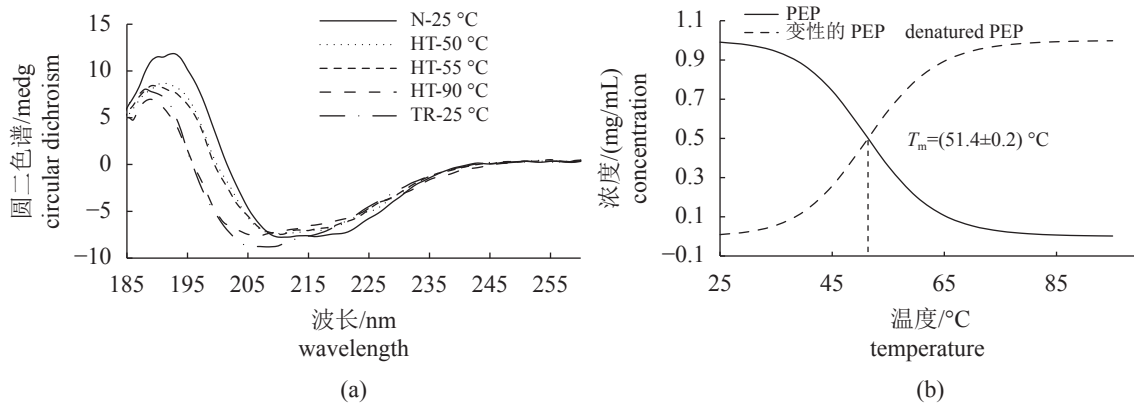


图5 温度对 PEP 结构的影响

(a) 温度对 PEP 结构影响的圆二色谱分析, (b) PEP 的热变性温度分析图谱; N. 室温, HT. 加热, TR. 降温

Fig. 5 Effect of temperature on the structure of PEP

(a) analysis of PEP structure at different temperatures by circular dichroism, (b) analysis of thermal denaturation temperature of PEP; N. room temperature, HT. heating, TR. cooling

表5 温度对 PEP 二级结构的影响

处理方式 process mode	α -螺旋 α -helix	β -折叠 β -fold	β -转角 β -turn	无规则卷曲 random coil
室温25 °C N-25 °C	12.5	53.8	19.4	24.4
加热至50 °C HT-50 °C	11.2	53.2	19.9	25.1
加热至55 °C HT-55 °C	13.0	52.1	20.0	25.1
加热至95 °C HT-95 °C	5.8	52.6	20.6	28.0
降温至25 °C TR-25 °C	11.5	49.2	20.9	26.8

2.6 PEP 在鲍性腺不同发育时期的表达量

为了探究 PEP 在鲍性腺中的表达情况, 参照董茂礼^[23]的方法, 将无法通过肉眼区分雌雄且性腺呈灰褐色的鲍性腺称为生长初期; 将有少量性腺、可区分雌雄(雄性腺为淡黄色, 雌性腺为绿色)的性腺称为前期; 将性腺隆起, 角状部外缘尖

折叠结构含量下降至 52.1%, 表明在升温过程中蛋白质的二级结构发生了改变。当温度从 55 °C 升高至 95 °C 时, α -螺旋结构含量从 13% 下降至 5.8%, 无规则卷曲结构含量则从 25.1% 增加至 28.0% (图 5, 表 5)。将温度从 95 °C 降回其最适温度 (25 °C) 时, 与温度初始时的二级结构含量相比, α -螺旋结构含量下降了 1%、 β -折叠结构含量下降了 4.6%、 β -转角和无规则卷曲结构含量分别增加了 1.5% 和 2.4%, 二级结构不能复原, 说明 PEP 的热变性是不可逆的。为了解其热变性温度, 将所得数据通过 Global 3 软件模拟, 计算得到 PEP 的热变性的温度为 (51.4±0.2) °C。

突的性腺称为中期; 性腺饱满, 角状部外缘变得钝圆的性腺称为后期。通过 Western blot 检测 PEP 在不同发育时期的蛋白表达量。在鲍性腺发育的不同阶段, PEP 均能被检出 (图 6)。对哺乳动物 PEP 的研究发现, 在性腺发育初期, PEP 主要与卵泡和精原细胞发育有关^[26]。随着雌鲍性腺的成熟, PEP 的表达量逐渐增加 (图 6-a)。与雌鲍不同, 雄鲍在性腺发育过程中, PEP 表达量在生长中期达到最大值, 且表达水平明显高于雌鲍性腺 (图 6-b)。PEP 在性腺不同发育时期表达量的差异证明其与鲍性腺的发育密切相关, 而雄性与雌性在相同生长期 PEP 表达量的差异提示其可能在性腺发育过程中发挥不同功能。

3 讨论

PEP 作为特异性酶切脯氨酸基端的蛋白酶,

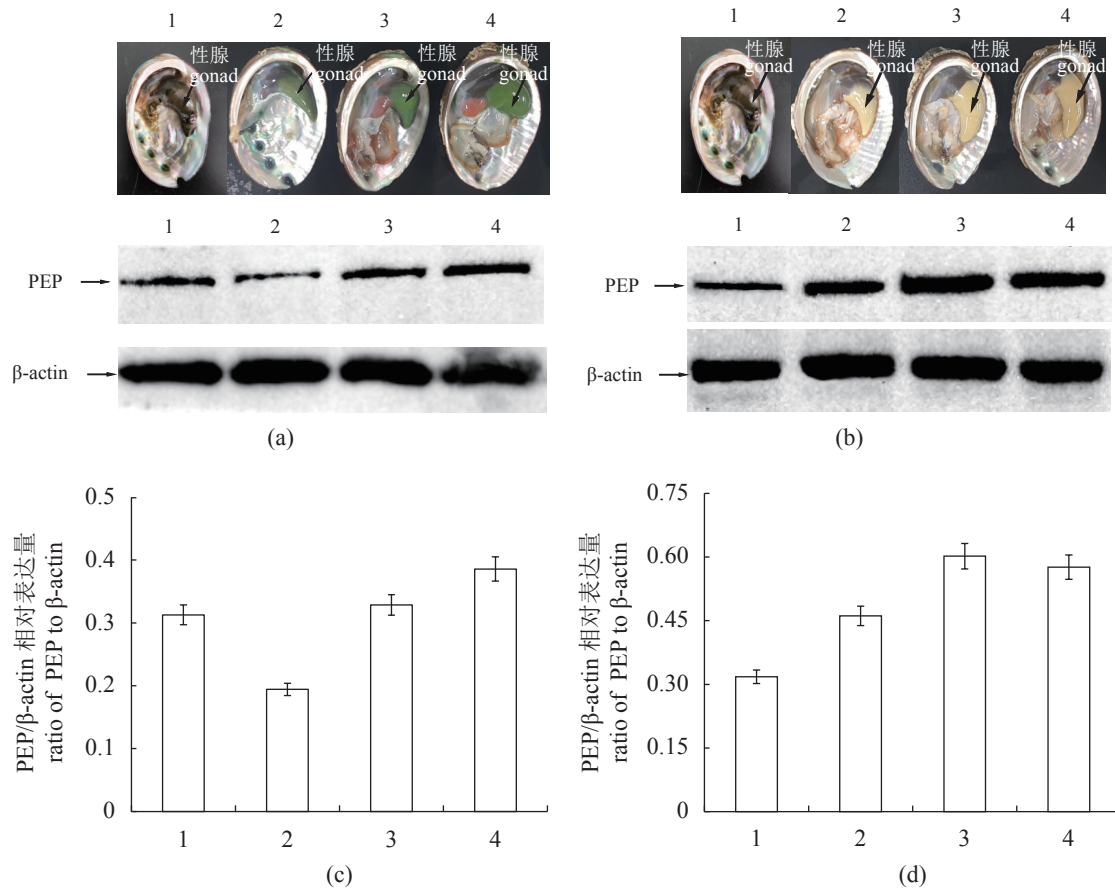


图 6 皱纹盘鲍性腺不同发育时期 PEP 表达水平的 Western blot 分析

(a) 雌鲍性腺发育不同时期 PEP 表达量, (b) 雄鲍性腺发育不同时期 PEP 表达量, (c) 雌鲍性腺 PEP 蛋白相对 β -actin 蛋白条带的灰度值, (d) 雄鲍性腺 PEP 蛋白相对 β -actin 蛋白条带的灰度值; 1. 初期, 2. 前期, 3. 中期, 4. 后期

Fig. 6 Western blot analysis of PEP expression levels at different developmental stages of *H. discus hannai*

(a) PEP expression in female abalone at different stages of gonadal development, (b) PEP expression in male abalone at different stages of gonadal development, (c) gray value of PEP in female abalone compared with β -actin band, (d) gray value of PEP in male abalone compared with β -actin band; 1. preliminary stage, 2. earlier stage, 3. middle stage, 4. later stage

通过酶切长度小于 30 个氨基酸残基的寡肽参与一些生理和病理过程, 如葡萄糖代谢、乳糜泻、细胞发育、增殖、分化和死亡^[27]。最初, PEP 是从人类 (*Homo sapiens*) 子宫中发现的一种催产素裂解酶^[28], 后又被证明参与雄性配子的形成^[12]。在小鼠中, PEP 通过调节 Ca^{2+} 水平, 促进囊泡分泌, 在小鼠精囊的生理过程中起着关键作用^[29]。因此, PEP 在哺乳动物的繁殖发育过程中至关重要。

尽管近年对鱼类 PEP 参与生殖发育的研究已有一些进展^[18], 但 PEP 是否参与贝类的生长繁殖尚未有报道。本研究首次从皱纹盘鲍性腺中纯化得到分子量约为 82 ku 的天然 PEP。对其酶学性质研究发现, 天然 PEP 比重组 PEP 的最适温度高 5 °C。双向电泳结果分析得到鲍 PEP 的等电点为 5.5, 与李越^[30] 预测皱纹盘鲍 PEP 的等电点相似 ($pI=5.55$), 但比来自真菌类黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中 PEP

的等电点高^[31], 表明不同物种的 PEP 尽管在分子量上较为相似, 但在等电点上有较大差异。通过测定鲍不同组织中的酶活性并结合 qRT-PCR 分析, 显示在性腺中 PEP 活性最高, 且基因表达量也最高, 表明 PEP 可能与鲍性腺发育相关。

通过将鲍性腺发育分为不同时期, 分析 PEP 在性腺发育不同时期的蛋白表达水平, 结果表明在鲍未区分性别的性腺中, 也能检测到 PEP, 表明 PEP 可能参与早期性腺发育。有文献报道在猪卵泡发育过程中, 小卵泡液中的 PEP 酶活性高于大卵泡^[15]。在小鼠精子形成初期, PEP 与微管蛋白共定位于精原细胞中^[12], 表明 PEP 在性腺发育初期发挥着重要功能。迄今为止, 关于软体动物在不同生长期 PEP 含量的变化未见相关报道。本研究利用高特异性的兔抗重组皱纹盘鲍 PEP 多克隆抗体, 采用 Western blot 法从蛋白水平上测定了

鲍性腺发育不同阶段 PEP 的表达水平变化。在雌鲍性腺的发育过程中, PEP 蛋白表达量逐渐上升, 在生长后期表达量最高。与雌鲍不同, PEP 在雄鲍性腺发育前期即有较高的表达水平, 在中期达到最高值并维持至发育后期。鲍雌雄性腺在发育不同时期 PEP 蛋白表达量的不同, 表明其参与形成卵子和精子的过程存在差异, 可能与不同时期性腺激素水平相关^[32]。另一方面, PEP 通过参与 GnRH 的调节, 控制激素的生理分泌, 这些激素通常在刺激下丘脑-垂体-性腺时释放, 例如促黄体生成激素 (LH)、促卵泡激素 (FSH) 和最终的睾酮^[33]。因此, PEP 也可能通过调节外分泌和内分泌促性腺激素水平来控制生殖细胞的发育。

与哺乳动物受精方式不同, 鲍通过将精子和卵子排出体外从而完成受精^[34]。所以在鲍性腺发育成熟时, PEP 可能通过参与细胞内钙的释放和吸收从而驱动精子和卵子的排放, 参与调节精子和卵子的运动过程。

本研究通过对皱纹盘鲍不同组织中 PEP 酶活性分析以及 qRT-PCR 对基因表达水平的测定, 明确 PEP 在性腺中表达量最高。利用柱层析技术从性腺中纯化得到高纯度天然 PEP。进一步利用 Western blot 检测雌鲍和雄鲍在不同生长时期 PEP 的蛋白表达水平。PEP 在鲍不同发育时期均有在雄性中的表达量高于雌性的结果, 表明其对雄鲍性腺生殖调控作用更为重要。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Li M, Chen C, Davies D R, *et al.* Induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(28): 21487-21495.
- [2] Garcia-Horsman J A, Mannisto P T, Venalainen J I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*, 2007, 41: 1-24.
- [3] Maruyama Y, Matsubara S, Kimura A P. Mouse prolyl oligopeptidase plays a role in trophoblast stem cell differentiation into trophoblast giant cell and spongiotrophoblast[J]. *Placenta*, 2017, 53: 8-15.
- [4] Koida M, Walter R. Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1976, 251(23): 7593-7599.
- [5] Kalwant S, Porter A G. Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase[J]. *Biochemical Journal*, 1991, 276(1): 237-244.
- [6] Moriyama A, Sasaki M. Porcine liver succinyltrialanine *p*-nitroanilide hydrolytic enzyme. Its purification and characterization as a post-proline cleaving enzyme[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1983, 94(5): 1387-1397.
- [7] 肖琳琳. 罗非鱼和鲈鱼骨骼肌脯氨酸内肽酶的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2017.
Xiao L L. Study on Prolyl Endopeptidases in skeletal muscle of Tilapia (*Oreochromis* spp.) and sea bass (*Lateolabrax japonicus*) [D]. Xiamen: JiMei University, 2017 (in Chinese).
- [8] 钟婵, 谢雪琼, 孙乐常, 等. 蓝圆鲷骨骼肌内源性脯氨酸内肽酶抑制剂的纯化及其抑制机理[J]. *食品科学*, 2019, 40(24): 15-20.
Zhong C, Xie X Q, Sun L C, *et al.* Purification and mechanism of action of a prolyl endopeptidase inhibitor from the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*) [J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 15-20 (in Chinese).
- [9] 王梦想. 鲤鱼肌肉脯氨酸内肽酶的分离纯化及性质分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2012.
Wang M X Purification and characterization of a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) [D]. Xiamen: JiMei University, 2012 (in Chinese).
- [10] Kimura A, Matsui H, Takahashi T. Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility[J]. *Zoological Science*, 2002, 19(1): 93-102.
- [11] Xu P, Bao R Q, Zhang Y Q, *et al.* Prolyl oligopeptidase regulates progesterone secretion via the ERK signaling pathway in murine luteal cells[J]. *Molecular Reproduction Development*, 2019, 86(6): 714-726.
- [12] Venditti M, Minucci S. Subcellular localization of prolyl endopeptidase during the first wave of rat spermatogenesis and in rat and human sperm[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2019, 67(4): 229-243.
- [13] Dotolo R, Kim J D, Pariante P, *et al.* Prolyl Endopeptidase (PREP) is associated with male reproductive functions and gamete physiology in mice[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, 231(3): 551-557.
- [14] Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, *et al.* Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia[J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 122(2): 79-84.
- [15] Kimura A, Ohnishi J, Okimura H, *et al.* Localization of prolyl endopeptidase mRNA in small growing follicles of porcine ovary[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 50(2): 121-127.

- [16] Yokosawa H, Miyata M, Sawada H, *et al.* Isolation and characterization of a post-proline cleaving enzyme and its inhibitor from sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1983, 94(4): 1067-1076.
- [17] 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.
- [18] Deng S P, Jiang D N, Liu J Y, *et al.* Thimet oligopeptidase and prolyl endopeptidase of spotted scat *Scatophagus argus*: characterization, tissue distribution, expression at different ovarian stages and down-regulation by estradiol[J]. *Fisheries Science*, 2018, 84(5): 825-835.
- [19] Li W Y, Li Y, Chen Y L, *et al.* Characterization and crystal structure of prolyl endopeptidase from abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127452.
- [20] 刘晓菲, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆高温胁迫应答主效QTL候选基因的表达特性分析[J]. *水产学报*, 2019, 43(6): 1407-1415.
Liu X F, Ma A J, Huang Z H, *et al.* Expression characteristics analysis of major QTL candidate genes in response to high temperature stress in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(6): 1407-1415 (in Chinese).
- [21] 唐逸, 颜龙杰, 钟婵, 等. 褶牡蛎氨肽酶B的分离纯化和性质研究[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(1): 35-42.
Tang Y, Yan L J, Zhong C, *et al.* Purification and characterization of aminopeptidase B from oysters (*Alectryonella plicatula*)[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 35(1): 35-42 (in Chinese).
- [22] 杨汝晴, 陈守峰, 肖琳琳, 等. 鲈鱼脯氨酰内肽酶的分离纯化、性质分析及分子克隆 [EB/OL]. *食品科学*, 2021, 42(14): 78-85.
Yang R Q, Chen S F, Xiao L L, *et al.* Prolyl endopeptidase from sea bass (*Lateolabrax japonicus*): purification, characterization and molecular cloning[EB/OL]. *Food Science*, 2021, 42(14): 78-85 (in Chinese).
- [23] 董茂礼. 九孔鲍繁殖期性腺的组织学观察[J]. *福建水产*, 2008(2): 25-29.
Dong M L. The histological research on the gonad of the *Haliotis diversicolor aquatilis*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2008(2): 25-29 (in Chinese).
- [24] 苏国茂, 秦真东, 李嘉波, 等. 罗非鱼湖病毒核蛋白的克隆表达、抗体制备及其组织分布[J]. *水产学报*, 2020, 44(2): 276-288.
Su G M, Qin Z D, Li J B, *et al.* Cloning, expression, antibody preparation and tissue distribution of tilapia lake virus nucleoprotein[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(2): 276-288 (in Chinese).
- [25] Liu J Y, Yoshida A, Gao Y L, *et al.* Purification and characterization of a sarcoplasmic serine proteinase from threadfin bream *Nemipterus virgatus* muscle[J]. *Food Chemistry*, 2019, 284: 198-204.
- [26] Myöhänen T T, Pyykkö E, Männistö P T, *et al.* Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and in ovarian and colorectal tumors[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2012, 60(9): 706-715.
- [27] Gass J, Khosla C. Prolyl endopeptidases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(3): 345-355.
- [28] Walter R, Shlank H, Glass J D, *et al.* Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme[J]. *Science*, 1971, 173(3999): 827-829.
- [29] Venditti M, Aniello F, Santillo A, *et al.* Study on PREP localization in mouse seminal vesicles and its possible involvement during regulated exocytosis[J]. *Zygote*, 2019, 27(3): 160-165.
- [30] 李越. 皱纹盘鲍脯氨酰内肽酶的分子克隆、体外表达及相关性质分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2018.
Li Y. Molecular cloning, expression and analysis of a prolyl endopeptidase from *Haliotis discus hannai*[D]. Xiamen: JiMei University, 2018 (in Chinese).
- [31] 杨迪, 高艳玲, 路福平, 等. 黑曲霉脯氨酸蛋白内肽酶基因的克隆与序列分析[J]. *生物技术通报*, 2008(3): 123-127.
Yang D, Gao Y L, Lu F P, *et al.* Cloning and sequence analysis of *Aspergillus niger* proline specific endopeptidase gene[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(3): 123-127 (in Chinese).
- [32] Picut C A, Remick A K, De Rijk E P C T, *et al.* Post-natal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters[J]. *Toxicologic Pathology*, 2015, 43(3): 326-342.
- [33] Venditti M, Chemek M, Minucci S, *et al.* Cadmium-induced toxicity increases prolyl endopeptidase (PREP) expression in the rat testis[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2020, 87(5): 565-573.
- [34] Boulais M, Demoy-Schneider M, Alavi S M H, *et al.* Spermatozoa motility in bivalves: signaling, flagellar beating behavior, and energetics[J]. *Theriogenology*, 2019, 136: 15-27.

Purification and characterization of a prolyl endopeptidase from *Haliotis discus hannai*

CHEN Shoufeng¹, YANG Ruqing¹, CHEN Yulei^{1,2}, SUN Lechang^{1,2},
ZHANG Lingjing^{1,2}, LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2*}

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

2. Collaborative Innovation Center of Marine Food Deep Processing, Dalian 116034, China)

Abstract: Prolyl endopeptidase (PEP) is a serine protease which has been implicated in many biological processes, such as learning and memory, cell proliferation and differentiation, and glucose metabolism. A small number of reports have also suggested PEP participates in mammalian reproductive process by specifically degrading peptide hormones and gonadal hormones containing proline residues. Compared with mammals, research on PEP of molluscs is relatively scarce at home and abroad. This observation led us to investigate PEP and whether it is related to reproductive development of mollusk. We analyzed the natural PEP of *Haliotis discus hannai* and the protein expression level changes during gonad development. Fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and enzyme activity analysis were used to detect the expression of the PEP in tissues of *H. discus hannai*. The enzyme activity and the expression level of PEP were the highest in *H. discus hannai* gonad, followed by the muscle. PEP was purified from the gonad by column chromatography with a molecular weight of 82 ku. The isoelectric point of PEP was determined to be 5.5 by two dimensional electrophoresis, and it was similar to the isoelectric point of predicted PEP of abalone. The 182 peptides were obtained by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis, which were consistent with the *H. discus hannai* prolyl endopeptidase of NCBI (KY214290). The analysis of enzymatic properties showed that the optimum temperature and pH of PEP were 25 °C and 6.0, respectively, and high enzyme activity can be maintained at 15-25 °C and pH 5-8. Circular dichroism was used to analyze the effect of temperature on structure of PEP. The results showed that the secondary structure of PEP changed significantly as the temperature increased. When the temperature increases from 25 °C to 95 °C, the content of α -helix structure decreases from 12.5% to 5.8%, and the random coil increases from 24.4% to 28.0%. When the temperature was lowered from 95 °C to its optimum temperature (25 °C), the content of α -helical structure decreased by 1%, β -folding decreased by 4.6%, β -turn and random coiling structure increased by 1.5% and 2.4%, respectively, compared with the initial secondary structure at the same temperature. The secondary structure could not be restored, indicating that the thermal denaturing of PEP was irreversible. The fitting thermal denaturation temperature was (51.4±0.2) °C. In order to further analyze the protein and gene expression level of PEP in the development of *H. discus hannai* gonad, we divided abalone gonad development into different growth stages (preliminary, early, middle and late growth stages), and the results of Western blot and qRT-PCR analysis showed that PEP could be detected in all stages of male and female. The expression level was the highest in the middle stage of maturity of male gonad and the late stage of maturity of female gonad. These results indicated that the difference of PEP at developmental stages of *H. discus hannai* gonad demonstrated that it may be involved in the process of gonad development. The current study analyzed PEP of mollusks and speculated that PEP is associated with gonad development in *H. discus hannai*. It provides a theoretical reference for further research of the function of PEP in *H. discus hannai* gonad development.

Key words: *Haliotis discus hannai*; prolyl endopeptidase; purification; property analysis; gonad development

Corresponding author: CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901004); National Natural Science Foundation of China (31772049); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-49)