

皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白的性质研究及抗体制备

游银川¹, 麻金花¹, 段雪昆¹, 章 骞²,
沈建东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. 福建省水产品深加工工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 针对加工副产物鲍鱼外套膜利用率低的现象, 对鲍鱼腹足和外套膜胶原蛋白相关性质进行比较研究, 以期对鲍鱼的综合加工提供一定的理论依据。本研究以皱纹盘鲍为原料分别提取得到腹足酶促溶性胶原蛋白(pepsin-soluble collagen of abalone adductor, PSC1)和外套膜酶促溶性胶原蛋白(pepsin-soluble collagen of abalone mantle, PSC2), 对PSC1和PSC2相关特性进行比较分析, 并利用PSC1制备得到兔抗鲍鱼胶原蛋白多克隆抗体。SDS-PAGE显示, PSC1和PSC2分子组成均为 $(\alpha_1)_3$, 且 α_1 的分子量为140 ku, 与水产无脊椎动物I型胶原蛋白特征相似。对PSC1进行肽指纹图谱分析, 获得6个肽段、含75个氨基酸残基, 与盘鲍螺的胶原蛋白前肽 α 链和欧洲鲍螺的纤维状胶原一致性分别达100%和88%, 证明纯化的PSC1为胶原蛋白。氨基酸组成分析表明, PSC1和PSC2的组成基本一致, 但脯氨酸和羟脯氨酸含量均低于牛磺酸溶性胶原蛋白。圆二色谱分析结果显示, PSC1和PSC2溶液均在220和197 nm分别有一正、负峰, 具有典型胶原蛋白三股螺旋结构特征。FTIR光谱分析结果提示PSC1和PSC2具有相似的三螺旋结构。利用兔抗皱纹盘鲍PSC1多克隆抗体对皱纹盘鲍、尼罗罗非鱼、鲤和仿刺参胶原蛋白进行免疫印迹分析发现, 该抗体只与皱纹盘鲍PSC1和PSC2的 α 、 β 和 γ 链产生反应, 表明该抗体具有良好的特异性。

关键词: 皱纹盘鲍; 酶促溶性胶原蛋白; 圆二色谱; 多克隆抗体

中图分类号: Q 493; S 966.2

文献标志码: A

鲍鱼隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae)、鲍属(*Haliotis*), 全世界各海区已命名的鲍鱼有216种, 常见种类约30种, 在中国沿海分布主要有7种^[1]。鲍鱼以其独特的风味、口感和丰富的营养价值, 越来越受到广大消费者的青睐。据农业部渔业局2014年的数据统计, 2013年我国鲍鱼产量达到110 380 t^[2]。

据分析, 鲍鱼腹足中蛋白质含量达50.8%^[3], 主要由胶原蛋白和肌原纤维蛋白构成。Olaechea等^[4]研究指出, 鲍鱼肌肉中胶原蛋白的

含量直接影响其嫩度。Hatae等^[5]通过对鲍鱼热处理发现, 肌肉硬度会随着胶原蛋白的流失而下降, 且二者呈线性关系。此外, 鲍鱼腹足胶原蛋白含量会随着季节变化而不同, 冬季鲍鱼腹足中的胶原蛋白含量较高, 占总蛋白含量的30%~50%^[6]。

目前, 我国鲍鱼加工主要以干制品和罐头制品为主。在鲍鱼制品的加工过程中, 会产生大量的外套膜副产物, 这些副产物尚未有理想的加工方法, 有时甚至被直接丢弃, 造成资源浪费和环境污染。因此, 对鲍鱼腹足和外套膜胶

原蛋白相关性质的比较研究,可为鲍鱼的综合加工提供一定的理论依据。

本研究以皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)为原料,用胃蛋白酶分别提取了其腹足酶促溶性胶原蛋白(PSC1)和外套膜酶促溶性胶原蛋白(PSC2),测定了PSC1和PSC2的氨基酸组成,利用圆二色谱比较分析了它们的热稳定性。进一步采用FTIR傅立叶红外光谱对二者结构进行对比,为解明鲍鱼胶原蛋白的特点提供了参考。进一步以提取的PSC1为抗原制备了多克隆抗体,为今后利用免疫组织化学研究胶原蛋白的分布提供了方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲜活皱纹盘鲍,2015年2月购于福建厦门高崎水产市场,平均体质量(72.0±4.0)g,即杀后分别取其腹足和外套膜,立即使用或冻存于-70℃待用。

Protein A琼脂糖凝胶亲和层析柱、硝酸纤维素膜(NC膜),美国GE Healthcare公司;蛋白质标准分子质量,美国Bio-Rad公司;HRP标记的羊抗兔IgG,Dako公司;ECL底物,Pierce公司;标准蛋白,立陶宛Fermentas公司;胃蛋白酶(1 247 U/mg)、氢氧化钠、氯化钠和乙酸等,分析纯;尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和刺参(*Stichopus japonicas*)胶原蛋白均由本实验室制备。

1.2 实验仪器与设备

PT-2100组织捣碎机,瑞士Kinematica公司;Avanti JA-25高速冷冻离心机,美国Beckman公司;蛋白质电泳装置,美国Bio-Rad公司;Box凝胶成像仪,英国Syngene公司;Chirascan圆二色谱仪,英国Applied Photophysics公司;化学发光凝胶成像系统,美国Alpha Innotech公司;高效液相色谱仪,日本岛津公司;VERTEX70红外光谱仪,德国Bruker公司;5800MALDI-TOF/TOF质谱仪,美国AB SCIEX公司。

1.3 皱纹盘鲍腹足和外套膜酶促溶性胶原蛋白的提取

参照Saito等^[7]的方法加以改进,皱纹盘鲍腹足洗净、切碎(大小约为3 mm×3 mm×2 mm),用

其质量10倍体积的去离子水匀浆后搅拌30 min,纱布过滤,弃上清液,重复2次。沉淀用4倍体积的0.5 mol/L NaCl溶液洗涤12 h,5708 r/min离心10 min,弃上清液,重复洗涤2次。所得沉淀加入25倍体积0.1 mol/L NaOH溶液搅拌72 h,以除去非胶原物质,9887 r/min离心30 min,留沉淀,去离子水洗沉淀至上清液为中性。向所得沉淀中加入10倍体积0.5 mol/L乙酸搅拌24 h,9887 r/min离心30 min,弃上清液。随后沉淀中加入4倍体积0.5 mol/L乙酸,用胃蛋白酶酶解48 h(酶与底物的质量比为1:200),9887 r/min离心30 min,弃沉淀,上清液中加入经磨细的NaCl,使其终浓度为0.8 mol/L,搅拌30 min,静置2 h,8843 r/min离心20 min,弃上清液。沉淀用适量的0.5 mol/L乙酸溶解,再用0.02 mol/L Na₂HPO₄(pH 8.0)溶液透析24 h以使胃蛋白酶失活,4980 r/min离心10 min,弃上清液;沉淀先复溶于0.5 mol/L乙酸,再用0.1 mol/L乙酸充分透析,溶液冷冻干燥即得鲍鱼腹足酶促溶性胶原蛋白(PSC1)。将原料改为鲍鱼外套膜,重复以上实验过程,即可得到鲍鱼外套膜酶促溶性胶原蛋白(PSC2)。以上步骤如无特殊说明,均在4℃下操作。

1.4 SDS-PAGE电泳

SDS-PAGE电泳主要参考Laemmli^[8]的方法,浓缩胶浓度为5%,采用浓度为12%的分离胶对皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白多克隆抗体的纯化效果进行分析,对其余样品分析均采用浓度为7.5%的分离胶。电泳结束后,以考马斯亮蓝对凝胶染色,脱色至条带清晰后,用凝胶成像仪记录结果。

1.5 PSC1的肽质量指纹图谱分析

取纯化的PSC1进行7.5% SDS-PAGE电泳。电泳结束后,经考马斯亮蓝染色,脱色至条带清晰,切胶回收胶原蛋白的 α 链,经猪胰蛋白酶充分酶解后,抽提酶解液中的肽段,经过ZipTip脱盐柱脱盐,进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测。用Mascot软件对获得的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)数据进行分析,在NCBI数据库检索,进行肽段序列比对。

1.6 兔抗鲍鱼PSC1多克隆抗体的制备及纯化

成年新西兰雄兔适应性饲养1周后进行免疫

实验。第一次基础免疫采用纯化的PSC1(1 mg/mL)与等体积的弗氏完全佐剂混合,充分乳化后进行皮下多点注射。初次免疫2周后,用PSC1与等体积的不完全佐剂混合乳化后进行皮下注射加强免疫,每次间隔2周,共加强免疫3次。免疫结束1周后,颈动脉采全血,4 °C下静置4 h,4980 r/min离心15 min,收集上清液。

用Protein A Sepharose亲和层析柱对血清中的抗皱纹盘鲍PSC1多克隆抗体进行纯化。取适量的血清与等体积的0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液混合均匀,上样于预先用0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液平衡的Protein A Sepharose亲和层析柱。上样结束后,依次用0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液和0.01 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液冲洗,至 A_{280} 小于0.05时,采用0.1 mol/L Glycine-HCl(pH 3.0)缓冲液阶段洗脱。由此获得纯化的IgG。

1.7 Western blot分析

Western blot分析依照Towbin等^[9]的方法。取抗原进行7.5%的SDS-PAGE电泳。电泳结束后,采用半干转移法将目的蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上,用5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h,用TBST洗膜3次,每次5 min,以1:10 000稀释的兔抗鲍鱼PSC1多克隆抗体室温孵育1.5 h, TBST洗膜5次,每次5 min,以1:20 000稀释的HRP标记的羊抗兔二抗室温孵育1.5 h, TBST洗膜5次,每次5 min,以ECL为底物,反应2 min,最后在化学发光凝胶成像系统(Fluor Chem Q)上记录实验结果。

1.8 PSC1和PSC2的氨基酸分析

取胶原蛋白冻干样品5 mg溶于1 mL 6 mol/L盐酸中,在110 °C下水解24 h。反应结束后,用6 mol/L氢氧化钠将其pH值调至7.0,并定容至10 mL。将制备好的样品上样于高效液相色谱,采用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生化法进行测定。色谱条件:色谱柱采用锂型氨基酸专用分析柱(Shim-pack Amino-Li,100 mm×6.0 mm I.D.,日本岛津)和锂型捕氨柱(Shim-pack ISC-30/S0504 Li,50 mm×4.0 mm I.D.,日本岛津);柱温39 °C;进样量10 μL;流动相流速0.6 mL/min;采用RF-10AXL荧光检测器检测(波长:Ex=350 nm,Em=450 nm)。

1.9 PSC1和PSC2的热稳定性分析

用0.1 mol/L的乙酸配制浓度为0.02%(W/V)的

蛋白溶液,吸取80 μL样品于0.1 cm石英样品池进行圆二色谱扫描,波长范围185~260 nm,步长1 nm,每一波长扫描0.6 s,温度范围10~80 °C,升温速率0.5 °C/min,以0.1 mol/L乙酸作为空白对照。

1.10 PSC1和PSC2的傅立叶红外光谱分析

取适量胶原蛋白干粉与KBr混匀,在红外灯下研成粉末。在15 MPa真空条件下,将样品放入769 YP-15A粉末压片机中压片后,置于傅立叶红外光谱仪中进行扫描。扫描区间4000~600 cm^{-1} ,分辨率设置为4 cm^{-1} ,用Opus分析软件除去背景值。

2 结果与讨论

2.1 皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白的纯化结果

将皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白(PSC1)提取和纯化后进行SDS-PAGE电泳,从泳道1可知,PSC1得到较高程度纯化,其主要肽链 α 链含量最高,二倍体 β 链含量较低,三倍体 γ 链含量最少(图1)。 α_1 链的分子量约为140 ku,未见 α_2 链,因此推测PSC1的分子组成可能为 $(\alpha_1)_3$ 。据Nordwig等^[10]报道, $(\alpha_1)_3$ 亚基结构广泛存在于非脊椎动物胶原蛋白中。这一研究结果与白色霞水母(*Cyanea nozakii*)和海参(*Holothuria parva*)酶促溶性胶原蛋白的 α 链亚基结构相一致^[11-12];而不同于Yoneda等^[13]对盘鲍螺(*Haliotis discus*)肌肉中酶促溶性胶原蛋白的研究结果。Dong等^[14]通过对皱纹盘鲍肌肉边缘部分酶促溶性胶原蛋白的研究指出,不同产地的鲍鱼或同一种鲍鱼的不同组织可能含有不同类型的胶原蛋白。因此,本研究又从皱纹盘鲍外套膜中提取出酶促溶性胶原蛋白,结果如图1泳道2所示。PSC1和PSC2肽链组成相似,均由3条肽链组成,且相对应的肽链分子量大小无显著差异。

2.2 PSC1的肽质量指纹图谱分析

PSC1经过SDS-PAGE电泳,切胶回收,用胰蛋白酶酶解之后,进行MALDI-TOF/TOF质谱分析。本次质谱分析获得6个肽段,共75个氨基酸残基(表1)。对肽段GERGEVGPSPAGLTGQR的一级结构特点分析表明,PSC1具有典型的胶原蛋白多肽链区段重复序列:Gly-Pro-y和Gly-x-y。

PSC1肽段序列比对结果如图2所示。由图可知,与欧洲鲍螺(*H. tuberculata*)的纤维状胶原和盘鲍螺的胶原蛋白前肽 α 链一致性分别达88%和100%,证明纯化的蛋白确为一种胶原蛋白。

2.3 皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白抗体的纯化结果

以PSC1为抗原制备多克隆抗体,将抗体纯化后进行SDS-PAGE分析,从泳道1可以看出,经过Protein A Sepharose亲和层析柱纯化后,得到的目的蛋白IgG在还原条件下主要显示为50 ku左右的重链和25 ku左右的轻链,表明得到了较高纯度的兔抗皱纹盘鲍PSC1多克隆抗体(图3)。

2.4 免疫印迹法对不同来源胶原蛋白的分析

为检测纯化的抗PSC1多克隆抗体的特异性,将4种水产动物胶原蛋白经SDS-PAGE电泳,转印至NC膜,进行免疫印迹分析。兔抗PSC1多克隆抗体只与皱纹盘鲍PSC1和PSC2产生免疫反应,而与尼罗罗非鱼、鲤和仿刺参胶原蛋白未产生免疫反应,表明该多克隆抗体特异性良好(图4)。前期研究中,潘冰青^[15]发现,兔抗罗非鱼胶原蛋白多克隆抗体能与鲤胶原蛋白产生免疫反应。经NCBI数据库检索并对同源性进行比对发现,盘鲍螺胶原蛋白前肽 α 链的氨基酸序列(AB017601)与罗非鱼I型胶原蛋白 α_1 链(AB603656)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)I型胶原蛋白 α_1 链(HM363526)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)I型胶原蛋白 α_2 链(JHB19070)的氨基酸序列同源性分别为32.53%、45.88%和34.24%。而尼罗罗非鱼I型胶原蛋白 α_1 链氨基酸序列与草鱼I型胶原蛋白 α_1 链氨基酸序列的同源性高达87.65%。因此,不同种水产动物胶原蛋白能否产生免疫交叉反应与其氨基酸序列同源性高低密切相关。

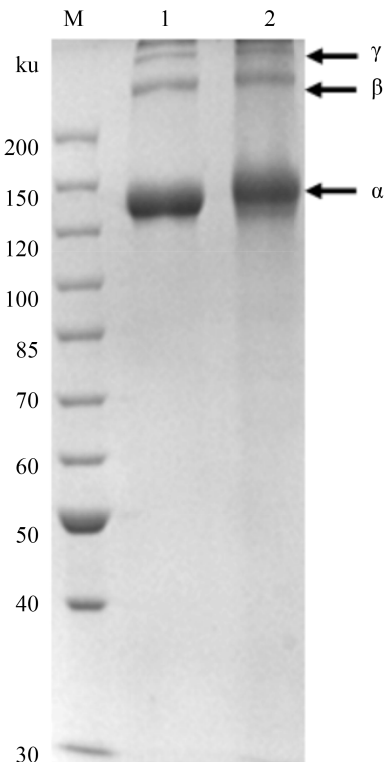


图1 皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白的SDS-PAGE图

M. 标准蛋白; 1. 皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白; 2. 皱纹盘鲍外套膜酶促溶性胶原蛋白

Fig. 1 Analysis of PSC1 and PSC2 by SDS-PAGE

M. protein marker; 1. pepsin-soluble collagen of *H. discus hannai* adductor(PSC1); 2. pepsin-soluble collagen of *H. discus hannai* mantle(PSC2)

关。

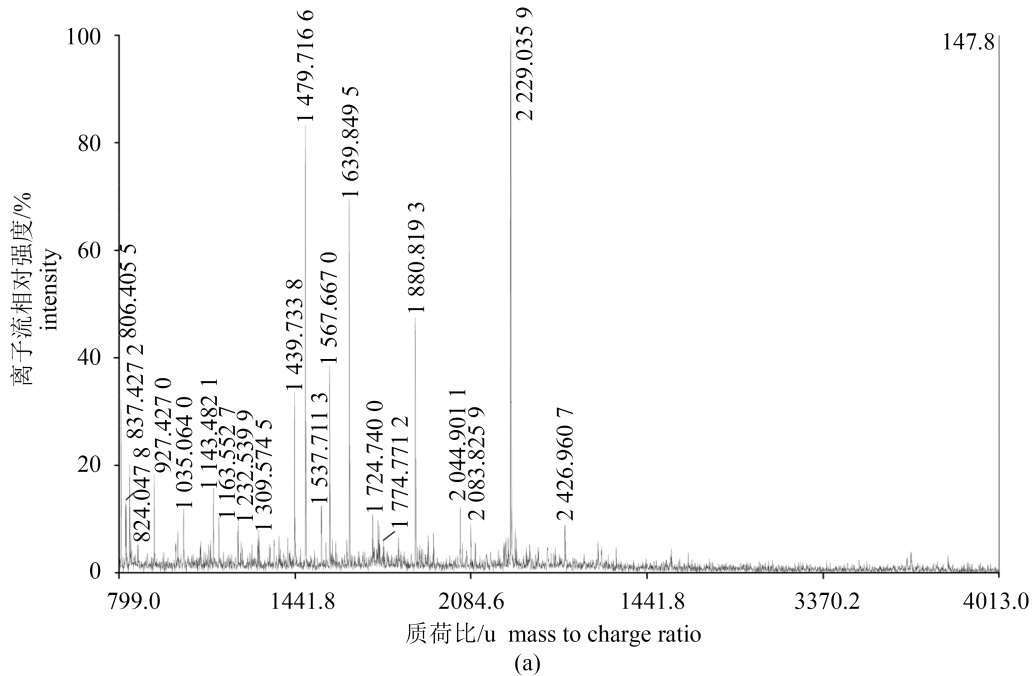
2.5 皱纹盘鲍腹足和外套膜酶促溶性胶原蛋白氨基酸残基分析

皱纹盘鲍PSC1和PSC2的氨基酸组成相似,甘氨酸的含量最丰富,分别占总氨基酸残基的35.1%和34.6%,符合胶原蛋白的氨基酸组成特征(表2)。此外,与陆生哺乳动物牛皮和猪皮的酶

表1 皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白(PSC1) α 链质谱分析获得的肽段序列

Tab. 1 The peptide sequences of PSC1 according to the method of peptide mass fingerprinting

起止序列	start-end sequence	理论值	calculated mass	观测值	observed mass	肽段氨基酸序列	sequence of peptide
616-633		1639.8147		1639.8503		GAPGEVGVSGSRGAPGER	
1003-1020		1724.8674		1724.7429		GERGEVGPSGPAAGLTGQR	
1232-1237		837.4577		837.4294		ITEYRR	
1240-1257		2083.9431		2083.8337		WTKDSTSGQYFMSDVFGK	
1243-1259		1927.8566		1927.7023		DSTSGQYFMSDVFGKMK	
1269-1281		1537.7792		1537.7145		QMKVLQFDSQSAR	



<i>Haliotis discus</i>	PGAEGE I GAAGRPGEGQGF QGLP GP AGP PGEAGRPGP VGESG I PGEPCASGERGERGAPGEVGVSGSRGAPGERGSPGSG	640
<i>Haliotis tuberculata</i>	PGAEGE I GAAGRPGEGQGF QGLP GP AGP PGEAGRPGP PGEAG I PGEVGS SGERGERGAPGEVGVAGSRCAPGERGSPGSG	179
<i>Haliotis discus hannai</i> GAPGEVGVSGSRGAPGER.....	18
Consensus	gapgevgv gsrgapger	
<i>Haliotis discus</i>	EVGQAGPPGPAGARGDAGAQLI GMP GERGP I GRNGPQGNRGLTGERGQDGEPRPGEAGAPGSPGQPGPSGLVSAKGR	720
<i>Haliotis tuberculata</i>	EVGQSGPPGPAGARGDAGAQLI GMP GERGP I GRP GPSGNRGLTGERGQDGEPRPGEAGAPGSPGQPGPSGLVAAKGR	259
<i>Haliotis discus hannai</i>	18
Consensus		
<i>Haliotis discus</i>	GEAGPAGEPGPPGSSCQRGPGAQAQPGQPTGLSGPTGEMGQTS DKGDKAKGDTGARGYPGEAGPI GAPGNEGREGRKGS	800
<i>Haliotis tuberculata</i>	GETGSPGEPGPPGSSCQRGCGAQAQPGQPTGLAGPTGEMGQPGDDGQTKAKGDTGARGYPGEAGPI GAPGNEGREGRKGN	339
<i>Haliotis discus hannai</i>	18
Consensus		
<i>Haliotis discus</i>	RCSGG I PGNSGTPGDPGRAGP PGSGAQAQPPGPGAGATGLSGDGGERGE TGP PGRSGEPGAPGMPGLDGAQGERGSPGLNG	880
<i>Haliotis tuberculata</i>	RCSGG I PGNSGTPGDPGRAGP PGSGAQAQPPGPGAGATGLAGDSGERGE TGP PGRAGEAGSPGLPGLDGAQGERGSPGLNG	419
<i>Haliotis discus hannai</i>	18
Consensus		
<i>Haliotis discus</i>	PSGPPGPVGPQGERGANGFP GSQGEAGAAGPPGSAGEPGLRGENGNDGAPGQAGPPGPTGPAAGYGETGQPGSPGKDGPL	960
<i>Haliotis tuberculata</i>	PSGPPGPVGPQGERGANGFP GAQGEAGAAGPPGSAGEPGLRGENGNDGAPGQAGPPGPTGPAAGYGETGQPGSPGKDGPL	499
<i>Haliotis discus hannai</i>	18
Consensus		
<i>Haliotis discus</i>	GPVGRS GAKGARPGAASGPPGLNPGVAGP GNSGPPGPSGERGERGEVGPSGPAGLTGQRGPAAGARGLQDKGKESGWDGA	1040
<i>Haliotis tuberculata</i>	GPVGRS GAKGNRGAAGATGPPGLNPGVAGP GNSGPAAGPQGERGERGEVGS GPAGLTGQRGPAAGARGLQDKGKESGWDGA	579
<i>Haliotis discus hannai</i> GERGEVGPSGPAGLTGQR.....	36
Consensus	gergevgv sgpaglgtgqr	
<i>Haliotis discus</i>	KGDKGWPMPGPGQGP PGP LGSNGDPGPPGPGVAGQNGKSGS RGRPGRSGSPGQQGPAGPACARGP SGDDGLTGPAGP SG	1120
<i>Haliotis tuberculata</i>	KGDKGWPMPGPGQGP PGP LGSNGDPGPPGPGVAGQNGKAGS RGRPGRSGNAGQQGP PGP SGARGP SGDDGLNGPKGP PG	659
<i>Haliotis discus hannai</i>	36
Consensus		
<i>Haliotis discus</i>	PPGPPGPPGYGPPVYSPQPSWNKGPDP. . YQYDEPEGGMAYENLNRVREAI VRVGHSRLGSRTPSGKNCRD I KLSNPDFK	1198
<i>Haliotis tuberculata</i>	PPGPPGPPGYGPPVYSPQPNWNKGPDPYQYQYDEPEGGMAYENLNRVREAI VRIGGTRLSRTPSGKNCRD I KLSNPDFK	739
<i>Haliotis discus hannai</i>	36
Consensus		
<i>Haliotis discus</i>	DGEYW IDPNGDSALDALKVFCRMELETIC I KPK I TEYRRDRWTKDSTS GCYFMSDVFSGKMKF KYDI DVKQMKVLFQDSQ	1278
<i>Haliotis tuberculata</i>	DGDYW IDPNGDSALDAVKVFCRMELETICVKPKFI EYRRDRWTKDSTS GCYFMYDVFSGKVKQF KYDI DAYQLKVLQFDSQ	819
<i>Haliotis discus hannai</i> I TEYRR. . WTKDSTS GCYFMSDVFSGKVK. QMKVLFQFDSQ	72
Consensus	eyrr wtkd tsgyqf mdv fgk k q kv lqfidsq	
<i>Haliotis discus</i>	SARQGVVYHCLNSHTYGRF I TDAGDELDSAEGRFKRSTYI DI LEGXCETVSSKDNQMHNRNRYEVRTNKS ELLPLVDVLL	1358
<i>Haliotis tuberculata</i>	AARQGVVYHCLNSHTYGRF I TDSGDELDSAEGRFKRSTYI DI LEGECENVS KDNQMHNRNRYEVRTNKS ELLPLVDVLL	899
<i>Haliotis discus hannai</i>	SAR.....	75
Consensus	ar	

图 2 PSC1肽质量指纹图谱

(a) 皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白(PSC1)一级质谱图; (b) PSC1序列与欧洲鲍螺和盘鲍螺胶原蛋白的比对结果

Fig. 2 Peptide mass fingerprinting of PSC1

(a) peptide mass fingerprinting(PMF)of PSC1; (b) results of PSC1 peptide sequences compared with collagens from *H. tuberculata* and *H. discus*

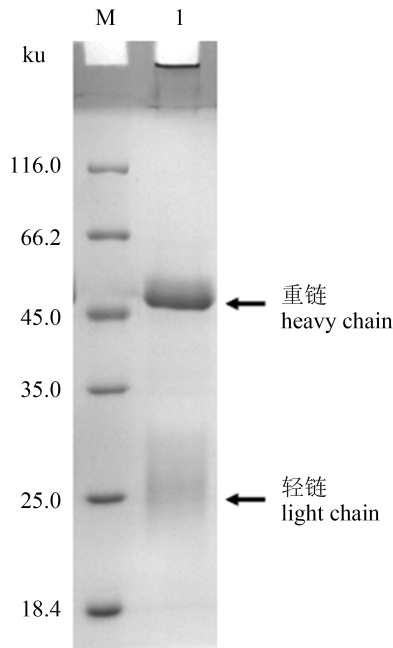


图3 抗皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白多克隆抗体的SDS-PAGE图

M. 标准蛋白; 1. 抗皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白多克隆抗体

Fig. 3 SDS-PAGE of a polyclonal antibody prepared against PSC1

M. protein marker; 1. purified IgG of PSC1 from *H. discus hannai* adductor

促溶性胶原蛋白相比, PSC1和PSC2的酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、丝氨酸、甘氨酸和蛋氨酸的含量相对较高, 脯氨酸、羟脯氨酸、丙氨酸

和赖氨酸含量相对较低。同时, 在2种胶原蛋白中均未检测到半胱氨酸。此结果与Abedin等^[16]从*Stichopus vastus*提取的酶促溶性胶原蛋白的氨基酸分析结果相似。以上结果表明, 来源于皱纹盘鲍腹足和外套膜的PSC1和PSC2均为I型胶原蛋白, 二者的氨基酸组成无显著差异。

2.6 皱纹盘鲍腹足和外套膜酶促溶性胶原蛋白热稳定性分析

采用圆二色谱研究PSC1和PSC2的二级结构特征和热变性温度, 非变性PSC1在219 nm有一处正峰, 在197 nm处出现一负峰, 非变性PSC2在221 nm处存在一正峰, 在197 nm处出现一负峰, 它们具有典型胶原蛋白三股螺旋结构的特征圆二色谱峰型; PSC1和PSC2正峰随着温度的升高而降低直至完全消失, 而负峰会明显红移, 这是由于胶原蛋白的三螺旋结构遭到破坏所致(图5-a, c)。PSC1和PSC2的热变性温度分别为27.3和27.0 °C。胶原蛋白受热时, 三螺旋结构逐渐解离, 向无规卷曲转变而变性。由于亚氨基酸能够稳定胶原蛋白的三螺旋结构, 因而能够提高其热稳定性。因此, 相比于PSC2, 亚氨基酸含量高的PSC1具有较高的热变性温度(图5-b, d)。汪海波等^[17]采用圆二色谱扫描法测得了草鱼鱼鳞酶促溶性胶原蛋白的热变性温度为35.2 °C, 高于本次实验测得的皱纹盘鲍酶促溶性

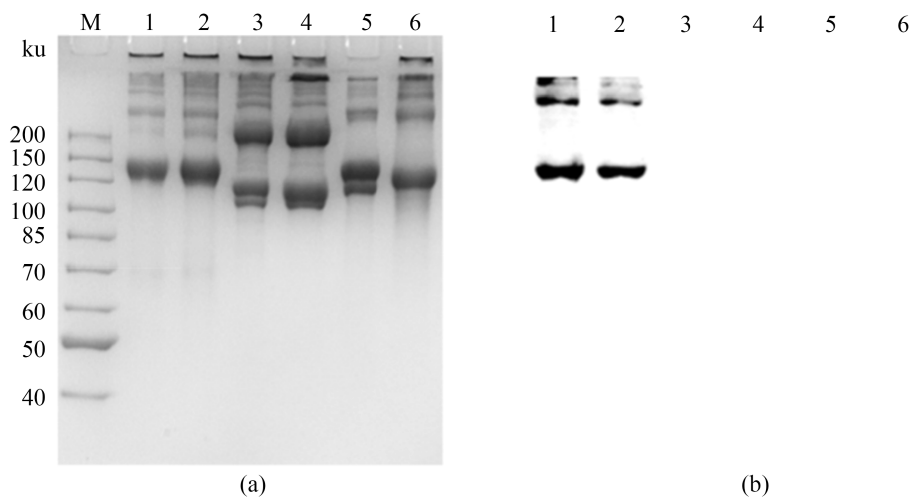


图4 4种水产动物胶原蛋白的SDS-PAGE(a)及Western blot(b)分析-PAGE图

M. 标准蛋白; 1. 皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白; 2. 皱纹盘鲍外套膜酶促溶性胶原蛋白; 3. 尼罗罗非鱼鱼皮酸溶性胶原蛋白(I型); 4. 鲤肌肉酸溶性胶原蛋白(I型); 5. 鲤肌肉酸溶性胶原蛋白(V型); 6. 仿刺参酶促溶性胶原蛋白(I型)

Fig. 4 Analysis of the collagen in four kinds of aquatic animals by SDS-PAGE(a) and Western blot(b)

M. protein marker; 1. PSC1; 2. PSC2; 3. acid-soluble type I collagen from *O. niloticus* skin; 4. acid-soluble type I collagen from *C. carpio* muscle; 5. acid-soluble type V collagen from *C. carpio* muscle; 6. pepsin-soluble type I collagen from *S. japonicas*

表 2 皱纹盘鲍腹足和外套膜酶促溶性胶原蛋白氨基酸组分表(残基/1000个氨基酸总残基)

Tab. 2 Amino acid compositions of PSC1 and PSC2 (residues per 1000 residues)

氨基酸	鲍鱼腹足胶原蛋白	鲍鱼外套膜胶原蛋白	牛皮胶原蛋白	猪皮胶原蛋白
amino acid	PSC1	PSC2	calf skin collagen	pig skin collagen
天冬氨酸 aspartic acid	53	54	45	44
羟脯氨酸 hydroxyproline	75	74	94	97
苏氨酸 threonine	17	17	18	16
丝氨酸 serine	55	56	39	33
谷氨酸 glutamine acid	100	102	75	72
脯氨酸 proline	90	88	121	123
甘氨酸 glycine	351	346	330	341
丙氨酸 alanine	96	95	119	115
缬氨酸 valine	18	19	21	22
蛋氨酸 methionine	11	11	6	6
异亮氨酸 isoleucine	11	12	11	10
亮氨酸 leucine	26	28	23	22
酪氨酸 tyrosine	8	7	3	1
苯丙氨酸 phenylalanine	7	8	3	12
组氨酸 histidine	1	1	5	5
羟赖氨酸 hydroxylysine	13	13	0	0
赖氨酸 lysine	8	8	26	27
乙醇胺 ethanolamine	5	6	0	0
精氨酸 arginine	55	55	50	48
亚氨基酸 imino acid	165	162	215	220
合计 total	1000	1000	1000	1000

胶原蛋白热变性温度。与此对应的是, 草鱼的栖息水温(25~32 °C)高于皱纹盘鲍(15~25 °C), 由此表明, 水产动物胶原蛋白的热变性温度可能与其栖息的环境温度有关。

Ikoma等^[18]报道, 胶原蛋白的热稳定性不仅和亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)含量有关, 而且和羟化氨基酸(羟脯氨酸和羟赖氨酸)的羟化程度有关, 推测原因可能是由于亚氨基酸的吡咯烷基环能够限制多肽链的构象和加强三螺旋结构, 而羟脯氨酸和羟赖氨酸中的氢键对螺旋结构的维持起到一定作用。本研究中PSC1和PSC2的亚氨基酸残基分别占总氨基酸残基的16.5%和16.2%, 其含量均低于猪皮胶原蛋白^[18](C1, 22.0%)和牛皮胶原蛋白^[19](C2, 21.5%), 与

海洋生物胶原蛋白的亚氨基酸含量一般都低于哺乳动物相一致。PSC1和PSC2氨基酸的羟化程度(羟化氨基酸残基占羟化氨基酸、脯氨酸和赖氨酸残基总和的百分比)分别达到47.31%和47.54%, 均高于C1(39.27%)和C2(39.0%)。同样, PSC1和PSC2的热稳定性也明显低于C1和C2。Wang等^[20]的研究指出, 胶原蛋白的热稳定性还与其氨基酸序列和分子构象有关。以上结果表明, 生长在低温环境的皱纹盘鲍, 其胶原蛋白组成中, 低含量的亚氨基酸残基、高含量的羟化氨基酸残基和不同的氨基酸一级结构序列是造成PSC1和PSC2热稳定性低于猪皮和牛皮胶原蛋白热稳定性的主要原因。

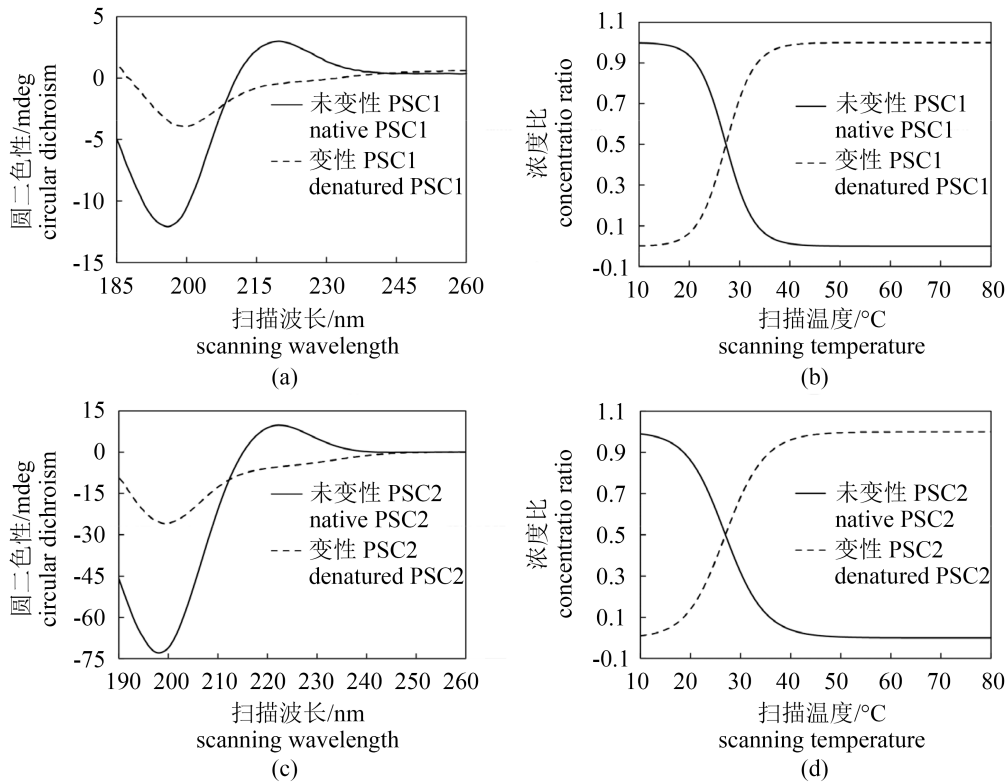


图5 圆二色谱分析温度对皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白二级结构的影响

(a) 温度对PSC1的影响; (b) PSC1热变性温度的测定; (c) 温度对PSC2的影响; (d) PSC2热变性温度的测定

Fig. 5 Effect of temperature on the secondary structure of collagens as detected by CD spectra

(a) the effect of temperature on PSC1; (b) determination of the T_m of PSC1; (c) the effect of temperature on PSC2; (d) determination of the T_m of PSC2

2.7 皱纹盘鲍腹足和外套膜酶促溶性胶原蛋白傅立叶红外光谱分析

皱纹盘鲍PSC1和PSC2的酰胺A带的出峰位置分别在波数3431.90和3437.36 cm^{-1} (图6, 表3)。由于发生N-H伸缩振动的波数范围通常在3400~3440 cm^{-1} , 说明二者分子内存在N-H伸缩振动。酰胺B带的出现是由于烯烃C-H和 NH_3^+ 不对称伸缩振动引起的, PSC1和PSC2酰胺B的出峰波数分别在2925.05和2926.08 cm^{-1} , 与文献报道的僧伽罗尾枪乌贼 (*Doryteuthis singhalensis*) 皮胶原蛋白结果相一致^[21]。

酰胺I带主要是由蛋白质多肽骨架的C=O键伸缩振动产生, 其特征频率在1600~1700 cm^{-1} , 且常被用来分析蛋白质的二级结构。PSC1和PSC2酰胺I带的出峰波数分别为1639.38和1639.35 cm^{-1} , 符合酰胺I带的出峰位置。酰胺II带是由于N-H键的弯曲振动和C-N键的伸缩振

动产生的, 而酰胺III带的形成是因为C-N键的伸缩振动(图6)。本研究中, PSC1和PSC2酰胺II带的出峰波数分别为1551.48和1552.39 cm^{-1} , 与Ramasamy等^[22]报道的莱氏拟乌贼 (*Sepioteuthis lessoniana*) 皮酶促溶性胶原蛋白结果相一致; PSC1和PSC2酰胺III带的出峰波数分别为1397.33和1398.06 cm^{-1} , 与Li等^[23]报道的牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 皮酶促溶性胶原蛋白酰胺III带出峰波数在1236~1452 cm^{-1} 相吻合。综上, 傅立叶红外图谱分析结果表明, PSC1和PSC2具有相似的三螺旋结构。

3 结论

本研究通过分离纯化得到皱纹盘鲍腹足酶促溶性胶原蛋白(PSC1)和外套膜酶促溶性胶原蛋白(PSC2)。氨基酸分析结果显示, 这2种胶原蛋白的氨基酸组成相似, 且符合I型胶原蛋白的特

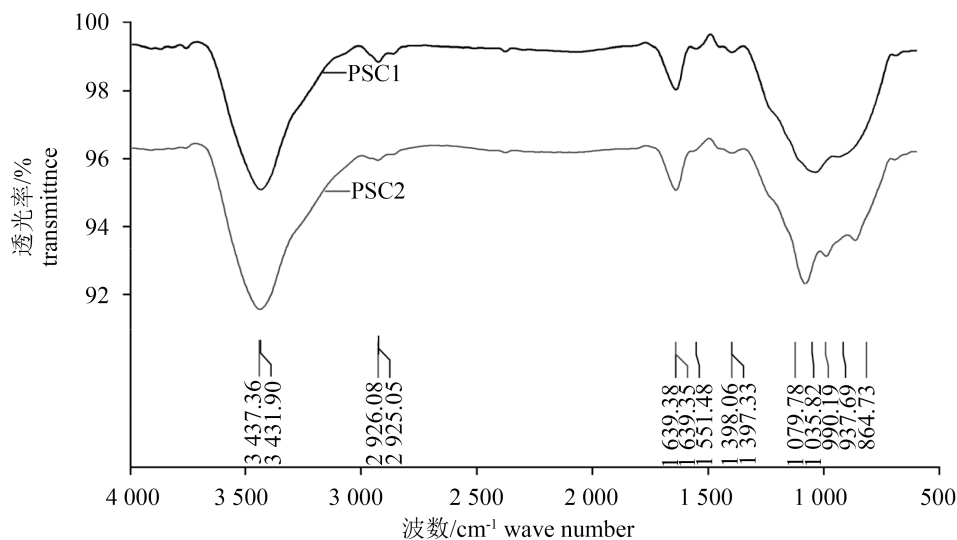


图 6 PSC1和PSC2的傅立叶红外扫描图谱

Fig. 6 FTIR spectrum of PSC1 and PSC2

表 3 皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白傅立叶红外光谱特征吸收峰位置及说明

Tab. 3 General peak assignment of the FTIR spectra consisting of PSC1 and PSC2

	波数/cm ⁻¹ wave number		说明 illustration
	腹足胶原蛋白 PSC1	外套膜胶原蛋白 PSC2	
酰胺 A amide A	3431.90	3437.36	N-H 伸缩振动 N-H stretch
酰胺 B amide B	2925.05	2926.08	烯炔C-H 和 NH ₃ ⁺ 的非对称伸展 C-H stretch and NH ₃ ⁺ asymmetric stretch
酰胺 I amide I	1639.38	1639.35	C=O 伸缩振动, 与二级结构相关 C=O stretch associated with secondary structure
酰胺 II amide II	1551.48	1552.39	N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩共振 N-H bend vibration coupled with C-N stretch
酰胺 III amide III	1397.33	1398.06	C-N 伸缩共振吸收, 与三螺旋结构完整性相关 C-N stretch vibration associated with tertiary structure

征。SDS-PAGE、圆二色谱及傅立叶红外光谱分析的结果表明, PSC1和PSC2具有相似的结构, PSC1和PSC2的热变性温度分别为27.3和27.0 °C。皱纹盘鲍PSC1与PSC2的生物化学特性和热稳定性极其相似。以PSC1为抗原制备得到了兔抗鲍鱼胶原蛋白多克隆抗体, 该抗体能与PSC1和PSC2发生特异性反应。本研究为以鲍鱼加工副产物为原料制备胶原蛋白提供了理论参考。

参考文献:

- [1] 张亚琦. 鲍鱼的物性学研究及加工工艺探讨[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
Zhang Y Q. Study on the processing methods of abalone and its rheological characteristic[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008 (in Chinese).
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中

国农业出版社, 2014: 215.

The People's Republic of China Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. China Fisheries Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 215 (in Chinese).

- [3] 李太武, 苏秀榕, 丁明进. 皱纹盘鲍中几种营养成分的测定[J]. 中国海洋药物, 1995(1): 47-49.
Li T W, Su X R, Ding M J. The determination of some nutritional elements in abalone *Haliotis discus hannai* ino[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 1995(1): 47-49 (in Chinese).
- [4] Olaechea P R, Ushio H, Watabe S, *et al.* Toughness and collagen content of abalone muscles[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(1): 6-11.
- [5] Hatae K, Nakai H, Tanaka C, *et al.* Taste and texture of abalone meat after extended cooking[J]. Fisheries Science, 1996, 62(4): 643-647.

- [6] Hatae K, Nakai H, Shimada A, *et al.* Abalone (*Haliotis discus*): Seasonal variations in chemical composition and textural properties[J]. *Journal of Food Science*, 1995, 60(1): 32-35.
- [7] Saito M, Kunisaki N, Urano N, *et al.* Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*)[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(4): 1319-1322.
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [9] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [10] Nordwig A, Nowack H, Hieber R E. Sea anemone collagen: Further evidence for the existence of only one α -chain type[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1973, 2(2-3): 175-180.
- [11] Zhang J J, Duan R, Huang L, *et al.* Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye)[J]. *Food Chemistry*, 2014, 150: 22-26.
- [12] Adibzadeh N, Aminzadeh S, Jamili S, *et al.* Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin of sea cucumber *Holothuria parva*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(1): 143-154.
- [13] Yoneda C, Hirayama Y, Nakaya M, *et al.* The occurrence of two types of collagen pro- α -chain in the abalone *Haliotis discus* muscle[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 261(3): 714-721.
- [14] Dong X P, Yuan Q X, Qi H, *et al.* Isolation and characterization of pepsin-soluble collagen from abalone (*Haliotis discus hannai*) gastropod muscle part II[J]. *Food Science and Technology Research*, 2012, 18(2): 271-278.
- [15] 潘冰青. 鱼类胶原蛋白的分离纯化及其过敏原性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- Pan B Q. Study on the allergenicity of fish collagen[D]. Xiamen: Jimei University, 2011 (in Chinese).
- [16] Abedin M Z, Karim A A, Latiff A A, *et al.* Physicochemical and biochemical properties of pepsin-solubilized collagen isolated from the integument of sea cucumber (*Stichopus vastus*)[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2014, 38(4): 2027-2036.
- [17] 汪海波, 梁艳萍, 汪海婴, 等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能[J]. *水产学报*, 2012, 36(4): 553-561.
- Wang H B, Liang Y P, Wang H Y, *et al.* Isolation and partial biological properties of scale collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 553-561 (in Chinese).
- [18] Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, *et al.* Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 32(3-5): 199-204.
- [19] Giraud G M M, Besseau L, Chopin C, *et al.* Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(9): 899-906.
- [20] Wang L, Liang Q F, Chen T T, *et al.* Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38: 104-109.
- [21] Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, *et al.* Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 43: 708-716.
- [22] Ramasamy P, Subhapradha N, Shanmugam V, *et al.* Isolation and structural characterisation of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830)[J]. *Natural Product Research*, 2014, 28(11): 838-842.
- [23] Li H, Liu B L, Gao L Z, *et al.* Studies on bullfrog skin collagen[J]. *Food Chemistry*, 2004, 84(1): 65-69.

Isolation and characterization of pepsin-soluble collagen from abalone (*Haliotis discus hannai*) and preparation of a polyclonal antibody

YOU Yinchuan¹, MA Jinhua¹, DUAN Xuekun¹, ZHANG Qian²,
SHEN Jiandong², LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2*}

(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: Abalone mantle is the main by-product from abalone industry which is at a low utilization rate. The characterization of collagen from the abalone adductor and mantle was studied, for providing a theoretical foundation for processing of abalone. Purification and characterization of pepsin-soluble collagen from adductor (PSC1) and mantle (PSC2) of abalone (*Haliotis discus hannai*) were conducted. A polyclonal antibody was prepared against pepsin-soluble collagen from abalone adductor (PSC1). The results of SDS-PAGE suggested that the structures of PSC1 and PSC2 were $(\alpha_1)_3$ and the molecular weight of α_1 chain was approximately 140 ku, which was the characteristic of type I collagen from aquatic invertebrates. Peptide mass fingerprinting (PMF) of PSC1 analysis obtained 6 peptide fragments including 75 amino acid residues which were identical with collagens from *H. discus* with 100% identity and *H. tuberculata* with 88% identity, suggesting PSC1 is collagen. Amino acid composition analysis showed that PSC1 and PSC2 had similar composition, while the amino acid content of them were lower than calf skin collagen by acid extraction. Circular dichroism (CD) spectrum analysis demonstrated a rotatory maximum at 220 nm and a negative peak at 197 nm of PSC1 and PSC2 solution, which were typical characteristics of the collagen triple helix structure. FTIR spectra further confirmed that both PSC1 and PSC2 have similar triple helical structure. According to Western blot analysis of collagens from 4 kinds of aquatic animals, the polyclonal antibody only positively reacted with α , β and γ chains of PSC1 and PSC2 from abalone, whereas no reactivity against collagens from *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio* and *Stichopus japonicas* was identified, indicating high specificity of the polyclonal antibody.

Key words: *Haliotis discus hannai*; pepsin-soluble collagen; circular dichroism; polyclonal antibody

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

Funding projects: National Natural Scientific Foundation of China (31471640); National Key Technology R&D Program of China (2012BAD38B09)