

# 麻鸭HSP90 $\alpha$ 基因的原核表达、纯化及磷脂结合活性的鉴定

张玉梅<sup>1,2</sup>, 李鹏鹏<sup>1,\*</sup>, 张牧烱<sup>1</sup>, 王晶晶<sup>1,2</sup>, 王道营<sup>1</sup>, 徐为民<sup>1,2,3</sup>

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014;

2.南京农业大学 肉品加工与质量控制教育部重点实验室, 江苏 南京 210095;

3.江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:**为研究麻鸭(*Anas platyrhynchos*)热休克蛋白HSP90 $\alpha$ 结合肌内磷脂及抑制磷脂水解的作用机制,采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术,以麻鸭骨骼肌细胞cDNA为模板扩增HSP90 $\alpha$ 基因,构建重组表达质粒在大肠杆菌中诱导表达,镍柱亲和层析和凝胶层析纯化可溶性重组蛋白。结果表明,获得的HSP90 $\alpha$ 开放阅读框全长为2 187 bp,编码728个氨基酸,预测的理论等电点约为5。构建的原核表达载体pCold1-HSP90 $\alpha$ 在大肠杆菌中成功可溶性表达了麻鸭HSP90 $\alpha$ ,并获得了高纯度的重组HSP90 $\alpha$ 蛋白。运用薄层层析证明该重组蛋白具有稳定结合磷脂酰胆碱的活性,并且该蛋白能显著削弱磷脂酶A<sub>2</sub>对磷脂的水解作用。该研究成功克隆并建立了麻鸭HSP90 $\alpha$ 基因的原核表达体系,制备了具有磷脂结合活性的重组蛋白,为进一步研究HSP90 $\alpha$ 与磷脂的相互作用及对肉品加工中磷脂的保护效应提供了理论支持。

**关键词:**麻鸭; HSP90 $\alpha$ ; 原核表达; 纯化; 磷脂结合

## Prokaryotic Expression, Purification and Identification of Phospholipid Binding Activity of *Anas platyrhynchos* HSP90 $\alpha$

ZHANG Yumei<sup>1,2</sup>, LI Pengpeng<sup>1,\*</sup>, ZHANG Muhan<sup>1</sup>, WANG Jingjing<sup>1,2</sup>, WANG Daoying<sup>1</sup>, XU Weimin<sup>1,2,3</sup>

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing,

Quality and Safety Control, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The present study was conducted to express and purify the heat shock protein 90 alpha (HSP90 $\alpha$ ) of *Anas platyrhynchos* in prokaryotic expression system for further study of the mechanism of interaction between HSP90 $\alpha$  and phospholipids and inhibition of phospholipid hydrolysis by HSP90 $\alpha$ . The HSP90 $\alpha$  gene was cloned from *A. platyrhynchos* skeletal muscle cDNA by RT-PCR. The gene sequence and its amino acid sequence were analyzed with bioinformatic tools. An inducible expression vector was constructed by enzyme digestion-ligation reactions and transformed into *Escherichia coli* for expression using isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as an inducer. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and gel chromatography. As results, the open reading frame of HSP90 $\alpha$  was 2 187 bp in length, and the deduced protein was composed of 728 amino acids with 5 glycosylation sites and 67 phosphorylation sites; its predicted isoelectric point was about 5. The *E. coli* vector pCold1-HSP90 $\alpha$  successfully expressed the recombinant HSP90 $\alpha$  protein in the supernatant of bacterial lysate. Thin-layer chromatography demonstrated that the recombinant HSP90 $\alpha$  could stably bind to phosphatidylcholine. Lipolysis assay showed that HSP90 $\alpha$  significantly restrained the hydrolysis of phospholipid. In conclusion, this study may provide a foundation for further study of the interaction between HSP90 $\alpha$  and phospholipids and the potential of HSP90 $\alpha$  to protect phospholipids in processed meat.

**Keywords:** *Anas platyrhynchos*; HSP90 $\alpha$ ; prokaryotic expression; purification; phospholipid binding

收稿日期: 2017-01-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31701532; 31401560); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20161378); 江苏省农业科学院农产品加工研究所基金项目(JG201702)

第一作者简介: 张玉梅(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉品加工与质量控制。E-mail: zhangyumei0608@163.com

\*通信作者简介: 李鹏鹏(1986—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为肉品加工与质量控制。E-mail: lipp0514@gmail.com

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802016

中图分类号: Q816

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 02-0099-06

引文格式:

张玉梅, 李鹏鹏, 张牧烺, 等. 麻鸭HSP90 $\alpha$ 基因的原核表达、纯化及磷脂结合活性的鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 99-104. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802016. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Yumei, LI Pengpeng, ZHANG Muhan, et al. Prokaryotic expression, purification and identification of phospholipid binding activity of *Anas platyrhynchos* HSP90 $\alpha$ [J]. Food Science, 2018, 39(2): 99-104. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802016. <http://www.spkx.net.cn>

肌内脂类物质中不饱和脂肪酸的解离、氧化是肉制品挥发性风味品质变化的主因, 其中磷脂因富含长链多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA), 对肉制品的风味具有更为重要的影响<sup>[1]</sup>。研究显示, 磷脂含量在鲜肉贮藏及腌腊肉制品加工过程中显著下降<sup>[2-5]</sup>, 同时游离脂肪酸 (free fat acid, FFA) 的含量随之增加, 但是甘油三酯的含量变化却很小。产生的FFA中富含长链PUFA, 这些长链PUFA可能来自磷脂的水解。所以肌内磷脂被认为是肉制品中脂肪水解的主要底物<sup>[6-7]</sup>。肌内磷脂水解产生的大量FFA会进一步发生氧化反应生成小分子的挥发性风味物质, 这些物质一方面成为腌香风味的主要来源<sup>[8]</sup>, 另一方面也会导致肉品酸败和风味劣变<sup>[9]</sup>。因此研究脂质水解氧化过程及其影响因素, 对肉类风味品质控制具有重要的理论和实践意义。

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 是生物界具有高度保守性的一类热应激蛋白质<sup>[10]</sup>。根据分子质量的大小可分为小分子HSP (sHSP)、HSP60、HSP70、HSP90和HSP110<sup>[11]</sup>。正常机体细胞内的HSP主要作为分子伴侣, 帮助蛋白质正确折叠和参与跨膜转运等<sup>[12]</sup>。当机体受到环境压力时, HSP会被大量合成并与细胞内各组分如生物膜、蛋白质、细胞骨架元件等相互作用, 维持细胞的稳定和正常的生理功能<sup>[12-13]</sup>。HSP对细胞膜的流动性、渗透性和完整性具有调控作用。酵母HSP12通过结合在细胞膜外部, 帮助细胞膜维持完整性<sup>[14]</sup>。乳酸菌sHSP参与维持膜脂的结构和状态<sup>[15]</sup>。

磷脂和HSP都是细胞尤其是细胞膜的重要组分, 两者间关系密切。已有研究证实, 磷脂能与HSP70蛋白及sHSP结合<sup>[16-17]</sup>。此外, Su等<sup>[18]</sup>的结果显示, HSP通过抑制磷脂酶A<sub>2</sub>的活性保护磷脂, 减少心肌细胞中膜的脂质过氧化。本课题组前期研究表明, HSP可以显著抑制磷脂酶A<sub>2</sub>对磷脂的水解作用, 对磷脂水解以及肉品风味品质具有显著影响<sup>[7-8, 19]</sup>。

本研究从麻鸭中克隆HSP90 $\alpha$ 基因并构建原核表达载体, 在大肠杆菌中可溶性表达并提取纯化HSP90 $\alpha$ 重组蛋白, 测定其与磷脂结合及抑制磷脂水解的活性。旨在为解析HSP90 $\alpha$ 与磷脂绑定的特点提供工作基础, 并为利用

HSP90 $\alpha$ 绑定磷脂的性质、研究抑制肉品肌内磷脂水解和延缓脂质过氧化的新方法提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

麻鸭由江苏南京孝陵卫集贸市场提供, 宰后采集组织, -80 °C保存。

酵母提取物、胰蛋白胨 美国Oxoid公司; 琼脂粉 南京奥多福尼生物科技有限公司; 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒 天根生化科技 (北京) 有限公司; 琼脂糖 南京生兴生物技术有限公司; 大肠杆菌*Trans5 $\alpha$* 、*Transetta2* 北京全式金生物技术有限公司; LB培养基 青岛海博生物技术有限公司; 异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、氨苄青霉素 上海生工生物股份有限公司; *Taq* DNA聚合酶、pMD19-T载体、反转录试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA连接酶等 日本TaKaRa公司; 抗体 美国Bioworld Technology公司; 磷脂酰胆碱 美国Avanti Polar Lipids公司。

### 1.2 仪器与设备

TP600梯度升降温功能聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 上海天呈医流科技股份有限公司; AKTA蛋白纯化系统 美国GE Healthcare公司; LDZX-30KBS立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; SPX-250B-Z生化培养箱 上海博讯实业有限公司; PHS-3C pH计 上海雷磁仪器有限公司; UV-6100型分光光度计 上海美普达仪器有限公司; Synergy2多功能酶标仪 美国BioTek公司; Scientz-IID超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技有限公司; DYCP-31DN琼脂糖水平电泳仪电泳槽 北京六一仪器厂; JS-680C全自动凝胶成像分析仪 上海培清科技有限公司; VD-650超净工作台 苏州江东精密仪器有限公司; Mini-PROTEAN Tetra Cell电泳仪 美国Bio-Rad公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 引物设计与合成

根据NCBI公布的北京鸭的基因组Hsp90 $\alpha$

基因预测序列, 筛选到该基因的CDS序列, 运用Primer 5.0设计基因的特异性引物。上游引物(F): 5'-CTCGGATCCATGCCTGAGGCTGT-3' (下划线是BamH I 酶切位点); 下游引物(R): 5'-TACGTCGACATCCACCTCTCCAT-3' (下划线是Sal I 酶切位点)。引物由南京擎科生物科技有限公司合成。

### 1.3.2 麻鸭总RNA提取及cDNA合成

麻鸭总RNA的提取按照TaKaRa公司的TRIzol说明书进行操作。取胸肌100 mg, 提取总RNA, 总RNA经电泳检测, Eppendorf公司核酸定量分析仪测定OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>比值及浓度, 以1 μg总RNA为模板, 按照cDNA合成试剂盒说明书进行反转录。反转录程序: 37 °C 15 min, 85 °C 5 min, 4 °C 保存, 长期保存应放于-20 °C。

### 1.3.3 目的基因的获得

以cDNA为模板进行PCR扩增, 反应体系为10 μL, 其中template 0.5 μL, Taq DNA聚合酶5 μL, 上、下游引物各0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 3.5 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 20 s; 56 °C 20 s; 72 °C 2 min, 进行25个循环; 72 °C 延伸5 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物纯化回收后连接至pMD19-T载体, 转化至DH5α感受态细胞, 将菌液涂在含氨苄青霉素的固体培养基上, 37 °C 培养过夜, 然后挑取阳性单菌落进行培养, 经菌落PCR、酶切和PCR鉴定, 连接正确的重组基因质粒送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

### 1.3.4 序列分析

测序结果用LaserGene软件进行序列分析, 鸭HSP90α基因克隆结果用NCBI数据库中的BLAST进行同源性比对。利用protparam分析蛋白质的基本理化性质。

### 1.3.5 重组表达载体的构建

在37 °C 条件下用BamH I 和Sal I 双酶切pMD19T-HSP90α及原核表达载体pCold1 2 h, 将酶切产物分别进行切胶纯化回收后, 用T4连接酶连接(22 °C, 2 h), 将重组质粒转化至DH5α后进行菌液PCR及双酶切鉴定重组质粒是否构建成功, 筛选出阳性重组质粒并送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

### 1.3.6 融合蛋白原核表达及可溶性分析

将鉴定正确的重组质粒转化至大肠杆菌Transtetta2感受态细胞, 挑取单菌落接种至5 mL含100 μg/mL氨苄的LB培养基中, 37 °C、200 r/min振荡培养, 当菌液OD<sub>600 nm</sub>值为0.6~0.8时, 加入IPTG至终浓度为0.25 mmol/L, 22 °C、200 r/min诱导过夜。离心收集沉淀, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)重悬菌体, 于超声波细胞破碎仪上破碎5 min, 12 000 r/min离心5 min, 分别取出上清液、沉淀, 加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上样缓冲液, 95 °C加热

10 min, 用12% SDS-PAGE检测融合蛋白是否为可溶性蛋白, 设置不加IPTG诱导的菌液作对照。

### 1.3.7 重组融合蛋白的诱导表达及纯化

将上述鉴定能可溶性表达HSP90α的菌落接种于500 mL含LB培养基中进行诱导表达。离心(4 500 r/min, 15 min)收集菌体, 用Binding Buffer(50 mmol/L的磷酸盐, pH 7.6, 150 mmol/L的NaCl, 5 mmol/L的咪唑)重悬菌体, 冰浴条件下超声破碎20 min(功率20%, 超声1 s, 间停3 s), 再离心(12 000 r/min, 30 min, 4 °C)收集上清液, 弃菌体沉淀。将上清液加入镍亲和层析柱中, 用不同浓度的咪唑洗脱液洗脱并收集, 初步纯化蛋白, 取样液加入SDS-PAGE上样缓冲液, 加热(95 °C, 10 min), 用12% SDS-PAGE检测重组蛋白的表达情况。将较纯的样品用10 kDa的超滤管离心浓缩(4 °C, 4 000 r/min, 10 min/次), 再用Superdex G200进一步纯化, 然后再次用SDS-PAGE检测纯化的产物并离心浓缩。用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 分装后置于-80 °C保存。

### 1.3.8 表达产物的Western blot鉴定

纯化后的目的蛋白经SDS-PAGE检测后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 用5%的脱脂牛奶封闭1 h, 用Tris-HCl吐温缓冲液(tris buffered saline with Tween 20, TBST)洗3~5次, 每次10 min, 加入含His标签的多克隆抗体, 稀释倍数1:1 000, 4 °C 孵育过夜, 用TBST洗3~5次, 每次10 min, 加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗, 稀释倍数1:5 000, 37 °C 孵育2 h, 再次用TBST洗3~5次, 每次10 min, 加入电化学发光(electro-chemiluminescence, ECL)液进行发光拍照。

### 1.3.9 薄层层析法鉴定与磷脂结合活性测定<sup>[20]</sup>

层析用的硅胶板在105 °C活化1 h后取出放置于干燥器中冷却待用。将纯化得到的HSP90α蛋白与磷脂溶液混合并在室温孵育30 min。孵育结束后向体系中加入2倍体积的氯仿, 振荡混匀, 12 000 r/min离心5 min后取下层液体。将活化的硅胶板取出放在点样台上, 在距底端1.5 cm左右点样, 各点样点保持一定的距离, 点样后常温下风干。将硅胶板放入已平衡好的展开剂甲醇-水-氯仿-三乙胺(5:0.6:13:0.04, V/V)中展开。待展开剂扩散至距硅胶板顶端2 cm处, 取出硅胶板在通风橱中吹干。用溴百里香酚蓝染液(0.08 g溴百里香酚蓝, 加入0.01 mol/L NaOH溶液200 mL)染色, 染色20 s后, 取出并用滤纸吸干残留的染液, 自然晾干形成斑点并拍照。

### 1.3.10 HSP90α对磷脂水解的抑制

使用EnzChek Phospholipase A<sub>2</sub> Assay Kit, 先将10 μL HSP90α(稀释到不同浓度)与50 μL磷脂的脂质体底物在25 °C共孵育30 min, 然后加入含有磷脂酶A<sub>2</sub>的反应缓冲液, 室温反应10 min后, 设定多功能酶标仪的

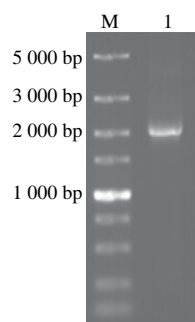


激发光波长为470 nm, 发射光波长为515 nm, 读取荧光强度, 水解产物越多荧光强度越强。用Excel进行数据处理, 3次重复, 取平均值和标准差, 然后采用统计学软件SPSS 18.0 (IBM) 对数据进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 麻鸭HSP90 $\alpha$ 基因的全长克隆及序列分析

以麻鸭骨骼肌细胞cDNA为模板, PCR扩增获得HSP90 $\alpha$ 开放阅读框全长为2 187 bp (图1), 扩增条带大小符合预期。预测HSP90 $\alpha$ 编码728个氨基酸, 分子质量为84.12 kDa, 理论等电点为5.0。以人的HSP90 $\alpha$ 三级结构(PDB号: 5FWK)为参考结构, 预测鸭HSP90 $\alpha$ 的二级结构, 显示有36%的氨基酸可能形成 $\alpha$ 螺旋, 15%的氨基酸可能形成 $\beta$ 折叠。

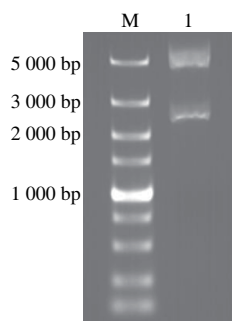


M. DL5000 DNA分子质量标准; 1. HSP90 $\alpha$ 基因PCR扩增产物。

图1 HSP90 $\alpha$ 的PCR扩增

Fig. 1 PCR product of HSP90 $\alpha$

### 2.2 HSP90 $\alpha$ 基因原核表达载体的构建



M. DL5000 DNA分子质量标准; 1. BamHI和SalI双酶切鉴定结果。

图2 重组表达质粒酶切鉴定结果

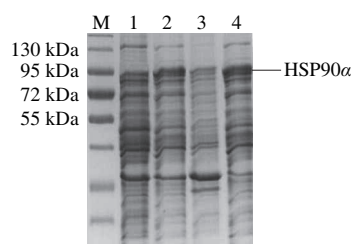
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pCold1-HSP90 $\alpha$  by enzymatic digestion

使用限制性内切酶BamHI和SalI对表达载体pCold1和PCR获得的HSP90 $\alpha$ 基因进行酶切和连接, 获得重组质粒。重组质粒经BamHI和SalI双酶切鉴定(图2), 获得4 500 bp的大片段和约2 000 bp的小片段, 分别与pCold1和HSP90 $\alpha$ 基因大小相符。进一步测序结果证实, 插入位置、阅读框及重组基因序列均准确无误,

表明目的基因已成功克隆至表达载体pCold1中, 重组表达质粒构建成功, 命名为pCold1-HSP90 $\alpha$ 。

### 2.3 麻鸭HSP90 $\alpha$ 重组蛋白诱导表达及可溶性检测结果

将重组表达质粒转化到Transtetta2感受态细胞, 经0.25 mmol/L IPTG在22 °C小量诱导表达12 h。离心收集菌体, 超声破碎细胞。为探究融合蛋白的可溶性, 将破碎后的菌体上清液、沉淀分别进行12%的SDS-PAGE, 同时设置未加诱导剂的重组质粒菌液作为对照。结果如图3所示, 对比泳道1和泳道2、3、4, 发现利用该系统可以重组表达鸭HSP90 $\alpha$ , 蛋白大小约90 kDa (带有His-tag) 与预期大小一致, 未加IPTG诱导剂的重组菌在预期大小的条带处没有明显的表达条带出现。另外, 泳道4和泳道3对比, 可以明显看出在22 °C诱导条件下, 大肠杆菌可以大量可溶性表达麻鸭HSP90 $\alpha$ 蛋白。



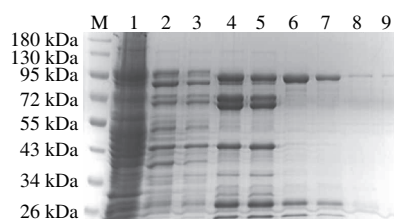
M. 蛋白分子质量标准; 1. 未经IPTG诱导表达的pCold1-HSP90 $\alpha$ 重组菌体蛋白; 2. IPTG诱导表达的pCold1-HSP90 $\alpha$ 重组菌体总蛋白; 3. IPTG诱导表达的pCold1-HSP90 $\alpha$ 重组菌体细胞裂解液沉淀; 4. IPTG诱导表达的pCold1-HSP90 $\alpha$ 重组菌体细胞裂解液上清液。

图3 重组鸭HSP90 $\alpha$ 在大肠杆菌中的表达产物的SDS-PAGE分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant duck HSP90 $\alpha$  protein

### 2.4 重组蛋白的纯化

#### 2.4.1 HSP90 $\alpha$ 重组蛋白的初步纯化



M. 蛋白分子质量标准; 1. 透过滤膜; 2、3. 20 mmol/L咪唑缓冲液洗脱蛋白; 4、5. 50 mmol/L咪唑缓冲液洗脱蛋白; 6、7. 100 mmol/L咪唑缓冲液洗脱蛋白; 8、9. 250 mmol/L咪唑缓冲液洗脱蛋白。

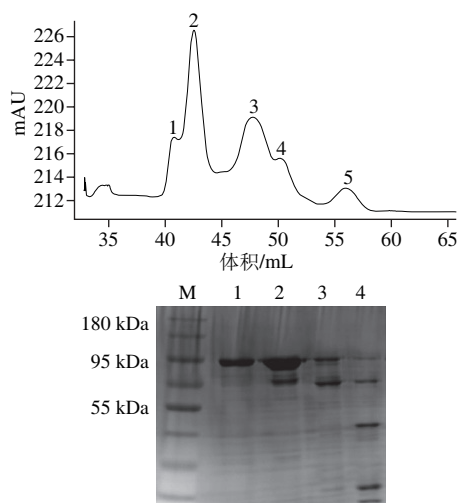
图4 HSP90 $\alpha$ 蛋白Ni-NTA亲和层析后SDS-PAGE检测图谱

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of HSP90 $\alpha$  obtained from Ni-NTA spin column

由于原核表达的目的蛋白HSP90 $\alpha$ 在N-端带有His标签, 首先采用Ni-NTA进行亲和层析纯化。收集不同咪唑浓度缓冲液洗脱得到的组分, 进行SDS-PAGE检测(图4)。结果显示, 20 mmol/L咪唑洗脱可去除较多杂蛋白, 50 mmol/L咪唑洗脱可进一步去除杂蛋白, 100 mmol/L和250 mmol/L的咪唑洗脱可得到较纯的HSP90 $\alpha$ 重组蛋白, 表明通过此方法可以有效地纯化出大

肠杆菌表达的HSP90 $\alpha$ 。收集100 mmol/L和250 mmol/L咪唑洗脱得到的蛋白用截留分子质量为10 kDa的超滤管进行浓缩,为下一步凝胶层析做准备。

#### 2.4.2 HSP90 $\alpha$ 重组蛋白的凝胶过滤结果



M: 蛋白分子质量标准; 泳道1~4对应洗脱峰1~4。

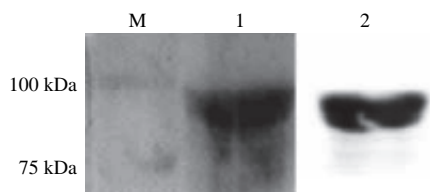
图5 HSP90 $\alpha$ 凝胶过滤层析图谱及SDS-PAGE检测图谱

Fig. 5 Size exclusion chromatogram and SDS-PAGE analysis of recombinant HSP90 $\alpha$  protein

如图5所示,样品经过Superdex G200层析柱纯化后得到5个洗脱峰,将不同的洗脱峰收集起来并用12% SDS-PAGE检测。结果显示,纯化后的融合蛋白条带比较单一,杂带消失,可去除大分子蛋白和部分小分子蛋白。图中1号洗脱峰为高纯度的目的蛋白HSP90 $\alpha$ ,将该洗脱峰收集起来浓缩后用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,分装后放-80℃保存待用。

#### 2.5 纯化融合蛋白的Western blot鉴定结果

将分子筛纯化后的融合蛋白用组氨酸标签单克隆抗体进行Western blot鉴定,结果如图6所示,在预期目标蛋白处出现非常单一的条带,并且大小与预期也一样,说明纯化得到的蛋白是预期的重组蛋白。



M: 蛋白分子质量标准; 1. HSP90 $\alpha$  SDS-PAGE结果; 2. HSP90 $\alpha$  ECL发光结果。

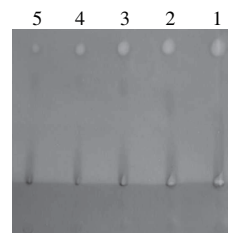
图6 重组HSP90 $\alpha$ 蛋白的Western blot分析

Fig. 6 Western blot analysis of recombinant HSP90 $\alpha$  protein by using anti-His monoclonal antibody

#### 2.6 薄层析法鉴定HSP90 $\alpha$ 与磷脂的结合活性

磷脂的薄层析实验通过磷脂混合物的不同组分在展开剂中的移动速率的差异,将磷脂混合物各组分分开。

HSP90 $\alpha$ 与磷脂结合的薄层析结果显示(图7),与对照组相比,随着在磷脂酰胆碱和HSP90 $\alpha$ 共孵育体系中加入的HSP90 $\alpha$ 量的增加,在展开剂中迁移的磷脂酰胆碱显色形成的斑点面积逐渐变小,其中加入15  $\mu$ g HSP90 $\alpha$ 的实验组比对照组磷脂酰胆碱显色斑点的面积减小了约90%,变化显著。这表明HSP90 $\alpha$ 与磷脂结合,形成的稳定体显著抑制了磷脂在展开剂中的迁移。



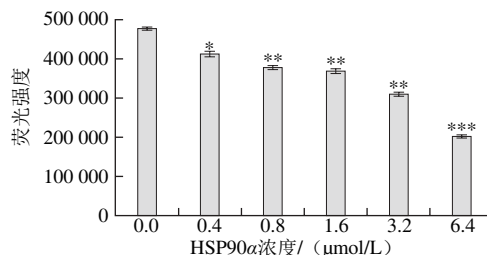
1. 对照; 2. 1  $\mu$ g HSP90 $\alpha$ ; 3. 5  $\mu$ g HSP90 $\alpha$ ; 4. 10  $\mu$ g HSP90 $\alpha$ ; 5. 15  $\mu$ g HSP90 $\alpha$ 。

图7 薄层色谱图

Fig. 7 Thin layer chromatography

#### 2.7 HSP90 $\alpha$ 对磷脂水解的抑制

磷脂酶A<sub>2</sub>在磷脂的sn-2位水解磷脂形成游离脂肪酸和溶血卵磷脂。HSP90 $\alpha$ 与磷脂结合形成磷脂结合体,可能影响磷脂酶A<sub>2</sub>对磷脂的水解。因此利用荧光分光光度法测定了HSP90 $\alpha$ 对磷脂酶A<sub>2</sub>水解磷脂活性的影响。由图8可知,随着反应中HSP90 $\alpha$ 浓度的增加,检测到的磷脂水解产物的荧光强度逐渐降低,与不含HSP90 $\alpha$ 的对照组相比,当HSP90 $\alpha$ 浓度为0.4  $\mu$ mol/L时,磷脂水解产物明显减少(约13%);当HSP90 $\alpha$ 浓度为6.4  $\mu$ mol/L时,磷脂水解产物减少了约70%。这表明HSP90 $\alpha$ 与磷脂的结合使磷脂水解产物减少,HSP90 $\alpha$ 显著抑制了磷脂酶A<sub>2</sub>对磷脂的水解作用,可能是由于HSP90 $\alpha$ 与磷脂结合,使磷脂酶A<sub>2</sub>无法识别和攻击磷脂sn-2位的酯键,对磷脂起到了保护作用。



与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图8 HSP90 $\alpha$ 对磷脂水解的影响

Fig. 8 Effects of different HSP90 $\alpha$  concentrations on phospholipid lipolysis

### 3 讨论和结论

随着人们生活水平的不断提高,动物性食品在膳食中的比重持续增加,近十年来围绕肉类食品风味品质及其形成机理的研究,受到越来越多的重视。肌内磷脂

占肉品肌肉脂肪的比重达50%以上<sup>[7,21]</sup>。磷脂富含长链PUFA,其水解产生的PUFA极易氧化产生挥发性呈味物质,既能形成肉制品的腌香风味<sup>[22]</sup>,又可能导致肉品风味劣变<sup>[23]</sup>;因此肌肉磷脂的水解是肉品风味的重要来源,如何控制磷脂水解、利用其水解氧化对肉品风味产生的双重效应调控肉品品质成为了肉品加工贮藏的研究热点<sup>[24-25]</sup>。细胞膜磷脂与HSP的关系极为密切,在生物体内,两者相互作用维护细胞膜的完整性等<sup>[12-14]</sup>。此外,有研究显示,HSP可以干扰磷脂酶A<sub>2</sub>的激活途径<sup>[26]</sup>,并能抑制磷脂酶A<sub>2</sub>的活性从而保护磷脂,减少膜磷脂的过氧化<sup>[27]</sup>。本实验室前期研究证实,从鸭胸肉中提取的HSP90 $\alpha$ 可绑定磷脂并显著削弱磷脂酶A<sub>2</sub>对磷脂的水解作用<sup>[19]</sup>,进一步研究表明HSP90 $\alpha$ 与磷脂间稳定的相互作用可能发生在磷脂的极性头端和非极性侧链上<sup>[28]</sup>,但是磷脂在HSP90 $\alpha$ 上的结合位点及两者相互作用的影响因素仍有待研究。开展以上研究需要大量高纯度的HSP90 $\alpha$ 蛋白,然而直接从鸭胸肉中提取HSP90 $\alpha$ ,工作量大,操作繁琐,实验周期长,耗材较多且提取量少<sup>[29]</sup>。利用大肠杆菌进行体外重组表达目标蛋白,因具有操作简便、成本低、表达效率高、产物稳定且易鉴定等优点,在食品领域有较大的发展空间,在基因表达技术中占有重要的地位,是生物技术研究中的重要工具<sup>[30]</sup>。

本研究运用基因重组技术将麻鸭HSP90 $\alpha$ 基因克隆到表达载体pCold1,并导入到大肠杆菌中进行诱导表达,成功构建了pCold1-HSP90 $\alpha$ 的大肠杆菌表达体系;通过Ni-NTA亲和层析和凝胶过滤层析,最终获得了高纯度的HSP90 $\alpha$ ;采用薄层析法鉴定了HSP90 $\alpha$ 重组蛋白与磷脂结合的活性,并验证了HSP90 $\alpha$ 与磷脂的结合可显著抑制磷脂水解,为研究HSP90 $\alpha$ 与磷脂的相互作用及深入研究HSP90 $\alpha$ 与磷脂结合对肉品风味的影响建立了工作基础。

#### 参考文献:

- PÉREZPALACIOS T, RUIZ J, DEWETTINCK K, et al. Muscle individual phospholipid classes throughout the processing of dry-cured ham: influence of pre-cure freezing[J]. Meat Science, 2010, 84(3): 431-436. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.09.012.
- YANG H, MA C, QIAO F, et al. Lipolysis in intramuscular lipids during processing of traditional Xuanwei ham[J]. Meat Science, 2005, 71(4): 670-675. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.05.019.
- SAMPELS S, PICKOVA J, WIKLUND E. Fatty acids, antioxidants and oxidation stability of processed reindeer meat[J]. Meat Science, 2004, 67(3): 523-532. DOI:10.1016/j.meatsci.2003.12.006.
- 余兴军, 董群义. 金华火腿加工过程中肌肉内脂的水解变化研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 139-142. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2005.01.037.
- WANG D Y, XU W M, XU X L, et al. Changes of phospholipids and free fatty acids contents in intramuscular lipids during the processing of Nanjing dry-cured ducks[J]. Journal of Fujian Agriculture & Forestry University, 2008, 27(37): 320-323.
- 徐为民, 王道营, 诸永志, 等. 肌肉磷脂在腌腊肉制品风味形成中的作用机制研究进展[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 204-207. DOI:10.3969/j.issn.1000-4440.2010.01.038.
- XU W, XU X, ZHOU G, et al. Changes of intramuscular phospholipids and free fatty acids during the processing of Nanjing dry-cured duck[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 279-284. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.11.044.
- 张牧焱, 王道营, 刘芳, 等. 热休克蛋白与肌肉磷脂的关系[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(3): 673-676. DOI:10.3969/j.issn.1000-4440.2012.03.041.
- 杨红菊, 乔发东, 马长伟, 等. 脂肪氧化和美拉德反应与肉品风味质量的关系[J]. 肉类研究, 2004, 18(1): 25-28. DOI:10.3969/j.issn.1001-8123.2004.01.012.
- 张道伟, 陈静, 郭玉双. 白背飞虱HSP90全cDNA的克隆与特性分析[J]. 黑龙江农业科学, 2012, 34(6): 13-18. DOI:10.3969/j.issn.1002-2767.2012.06.005.
- GUPTA R S. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species[J]. Molecular Biology & Evolution, 1995, 12(6): 1063-1073. DOI:10.1109/ICBBE.2009.5162514.
- BUCKLEY B A, OWEN M E, HOFMANN G E. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history[J]. Journal of Experimental Biology, 2001, 204(20): 3571-3579. DOI:10.1002/0471142905.
- 曲凌云, 孙修勤, 相建海, 等. 热休克蛋白研究进展[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(3): 385-391. DOI:10.3969/j.issn.1671-6647.2004.03.019.
- SALES K, BRANDT W, RUMBALAK E, et al. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects *Membranes against* desiccation and ethanol-induced stress[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1463(2): 267-278. DOI:10.1016/S0005-2736(99)00215-1.
- COUCHENY F, GAL L, BENEY L, et al. A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1720(1/2): 92-98. DOI:10.1016/j.bbmem.2005.11.017.
- ARISPE N, DOH M, DE M A. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70[J]. Cell Stress & Chaperones, 2002, 7(4): 330-338.
- TSVETKOVA N M, HORVÁTH I, TÖRÖK Z, et al. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(21): 13504-13509. DOI:10.1073/pnas.192468399.
- SU C Y, CHONG K Y, EDELSTEIN K, et al. Constitutive hsp70 attenuates hydrogen peroxide-induced membrane lipid peroxidation[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1999, 265(2): 279-284. DOI:10.1006/bbrc.1999.1649.
- WANG D Y, ZHANG M H, LIU F, et al. Purification and characterisation of a phosphatidylcholine-binding protein from duck Biceps femoris muscle[J]. Animal Production Science, 2014, 54(2): 194. DOI:10.1071/AN12321.
- 徐为民, 卞欢, 王道营, 等. 鸭肉肌肉磷脂酶反应条件优化及其产物鉴定[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1130-1134.
- GANDEMER G. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products[J]. Meat Science, 2002, 62(3): 309-321.
- STORRUSTLØKKEN L, DEVLE H M, HASETH T T, et al. Lipid degradation and sensory characteristics of *M. biceps femoris* in dry-cured hams from Duroc using three different processing methods[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2014, 50(2): 522-531.
- LIU L, BARTKE N, VAN D H, et al. Higher efficacy of dietary DHA provided as a phospholipid than as a triglyceride for brain DHA accretion in neonatal piglets[J]. Journal of Lipid Research, 2014, 55(3): 531.
- WANG D Y, ZHANG M H, BIAN H, et al. Changes of phospholipase A<sub>2</sub> and C activities during dry-cured duck processing and their relationship with intramuscular phospholipid degradation[J]. Food Chemistry, 2014, 145(7): 997-1001.
- CASADO V, MARTÍN D, TORRES C, et al. Phospholipases in food industry: a review[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 861: 495.
- JÄÄTTELÄ M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A<sub>2</sub>[J]. Journal of Immunology, 1993, 151(8): 4286-4294.
- SNOECKX L H E H, CORNELUSSEN R N, VAN NIEUWENHOVEN F A, et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology[J]. Physiological Reviews, 2001, 81(4): 1461-1497.
- 张牧焱, 张森, 孙冲, 等. 磷脂与Hsp90相互作用的荧光和红外光谱[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 922-926.
- 张露娟. 一种鸭肉磷脂酶的分离纯化和酶学性质研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2011. DOI:10.7666/d.y2049771.
- 尹长城, 黄华. 大肠杆菌表达系统[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2002: 166-168.