

蓝圆鲹骨骼肌内源性脯氨酸内肽酶抑制剂的纯化及其抑制机理

钟 婵¹, 谢雪琼¹, 孙乐常^{1,2}, 张凌晶^{1,2}, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2,*}

(1.集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2.水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘 要: 对蓝圆鲹 (*Decapterus maruadsi*) 骨骼肌采用热处理、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephacryl S-200 HR凝胶过滤层析和HiTrap Q HP强阴离子交换柱层析相结合方法, 分离、纯化出一种内源性脯氨酸内肽酶抑制剂 (prolyl endopeptidase inhibitor, PEPI)。研究了PEPI对脯氨酸内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP) 活性的影响及抑制机理。Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明纯化的PEPI分子质量约为10 kDa, 具有较强的热稳定性和酸碱耐受性, 其为丝氨酸蛋白酶类PEP的专一性、可逆竞争型抑制剂, 抑制常数 K_i 为0.34 $\mu\text{mol/L}$ 。PEPI与PEP形成复合物后, α -螺旋、无规卷曲比例增加, β -折叠比例减少, PEP活性中心构象的改变是酶活力被抑制的主要原因。

关键词: 蓝圆鲹; 脯氨酸内肽酶; 内源性抑制剂; 抑制动力学; 二级结构

Purification and Mechanism of Action of a Prolyl Endopeptidase Inhibitor from the Skeletal Muscle of Blue Scad (*Decapterus maruadsi*)

ZHONG Chan¹, XIE Xueqiong¹, SUN Lechang^{1,2}, ZHANG Lingjing^{1,2}, LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2,*}

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

2. National and Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: In the present study, an endogenous prolyl endopeptidase inhibitor (PEPI) was purified from the skeletal muscle of the marine fish blue scad (*Decapterus maruadsi*) by thermal precipitation, ammonium sulfate fractionation and a series of column chromatographies on DEAE-Sephacryl S-200 HR and HiTrap Q HP. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) showed that the molecular mass of PEPI was about 10 kDa. It was thermally stable and displayed tolerance to pH change. PEPI was a specific inhibitor to serine proteinase PEP and it worked in a reversible competitive manner with an inhibitory constant (K_i) of 0.34 $\mu\text{mol/L}$. A significant increase in α -helix and random coil and decrease in β -sheet were detected after formation of the PEP-PEPI complex. Quite possibly, the conformational change of PEP was the major reason for enzymatic activity inhibition.

Keywords: blue scad; prolyl endopeptidase; endogenous inhibitor; inhibitory kinetics; secondary structure

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181210-117

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 24-0015-06

引文格式:

钟婵, 谢雪琼, 孙乐常, 等. 蓝圆鲹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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181210-117. <http://www.spkx.net.cn>

ZHONG Chan, XIE Xueqiong, SUN Lechang, 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 with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181210-117. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772049; 31471640); 福建省科技计划项目 (2017N5011)

第一作者简介: 钟婵 (1986—) (ORCID: 0000-0001-8737-9161), 女, 博士, 研究方向为水产品加工。

E-mail: zhongchan@jmu.edu.cn

*通信作者简介: 曹敏杰 (1964—) (ORCID: 0000-0002-5774-7610), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品深加工与蛋白质化学。E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

脯氨酸内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP, EC 3.4.21.26) 是一类能够特异水解长度小于30个氨基酸多肽链脯氨酸残基的丝氨酸蛋白酶。在人和其他哺乳动物中, PEP参与胶原蛋白的代谢和细胞生长中脯氨酸的再循环过程^[1]。在水产动物中, Wang Mengxiang等^[2]发现淡水鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 肌肉中存在与哺乳动物酶学性质相似的PEP, 推测它可能参与鱼体死后胶原蛋白的降解。此后, 从草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[3]和罗非鱼 (*Oreochromis spp.*)^[4]肌肉中也发现性质相似的PEP。唐俊等^[5]对海水鱼蓝圆鲈 (*Decapterus maruadsi*) 肌肉中PEP的研究发现, PEP可以与基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 等内源性蛋白酶协同作用, 进一步水解由MMP分解产生的胶原肽的脯氨酸残基, 生成分子质量更小的胶原肽。MMP等内源性蛋白酶对I型和V型胶原蛋白的水解被认为是鱼体肌肉软化的主要原因^[6-8]。目前, 对于鱼类肌肉中的蛋白酶研究多关注于组织蛋白酶、MMP等与蛋白降解直接相关的内源性蛋白酶^[9-10], 而对于PEP及其内源性抑制剂的研究相对较少。虽然一些人工合成的化合物^[11-12]和小肽^[13-14]具有PEP抑制活性, 但是脯氨酸内肽酶抑制剂 (prolyl endopeptidase inhibitor, PEPI) 的分离及其抑制机理鲜见有报道。本研究以蓝圆鲈为原料分离内源性PEPI, 分析其与PEP的相互作用及抑制机理, 以期为鱼类PEP的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝圆鲈购自厦门高崎中埔水产品批发市场, K 值为 $(15.1 \pm 1.2)\%$, 新鲜, 平均体质量300 g。

DEAE-Sephacryl S-200 HR、HiTrap Q HP 层析树脂 美国GE Healthcare公司; Suc-Gly-Pro-MCA 荧光合成底物 日本Peptide Institute公司; 电泳标准分子质量蛋白及相关试剂 美国Bio-Rad公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Avanti J-26.5高速冷冻离心机 美国Beckman公司; PT 2100组织捣碎机 瑞士Kinematica公司; BioPhotometer紫外分光光度计 德国Eppendorf公司; FP-6200荧光分光光度计 日本Jasco公司; Chirascan圆二色谱仪 英国Applied Photophysics公司; G:Box凝胶成像仪 英国Syngene公司; WB-14恒温水浴锅 德国Mettler公司。

1.3 方法

1.3.1 PEPI的分离纯化

参照Wang Mengxiang等^[2]建立的方法, 纯化具有高活性的PEP。蓝圆鲈去头、去内脏和去皮后, 取800 g骨

骼肌, 加入4倍体积的20 mmol/L三羧甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl缓冲液, pH 8.5) 进行组织捣碎, 10 000×g离心20 min后, 将上清液在70℃水浴加热20 min。加热后的液体经冰水充分冷却后, 10 000×g离心20 min, 取上清液, 加硫酸铵至饱和度70%后盐析, 10 000×g离心10 min后沉淀用少量的Tris-HCl缓冲液复溶透析除盐。将透析后的样品上样于DEAE-Sephacryl S-200 HR (2.5 cm×15 cm), 用含0~0.5 mol/L氯化钠的缓冲液进行线性洗脱, 收集对PEP有抑制效果的活性峰。样品用3 kDa截留膜超滤浓缩后, 上样于Sephacryl S-200 HR (2.5 cm×100 cm) 凝胶过滤层析柱, 收集活性峰, 用缓冲液透析后, 上样于HiTrapQ HP (1 mL) 强阴离子交换层析柱进一步分离PEPI, 收集活性峰, 检测纯度和抑制活力。

1.3.2 PEPI抑制活性测定

PEPI抑制活性通过抑制PEP活力表示。测定时, 参照Wang Mengxiang等^[2]建立的方法, 在850 μL的50 mmol/L磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中, 将适量PEP和抑制剂样品各50 μL充分混合。4℃孵育30 min后, 加入50 μL的10 μmol/L的Suc-Gly-Pro-MCA荧光底物, 充分混合后在37℃水浴反应30 min, 加入1.5 mL甲醇-异丙醇-蒸馏水 (35:30:35, V/V) 溶液终止反应。在激发波长380 nm和发射波长450 nm条件下测定荧光底物释放的7-氨基-4-甲基香豆素 (7-amino-4-methylcoumarin, AMC) 的荧光强度。以相同条件下, 未添加PEPI时的PEP活力为对照组。PEPI的抑制活力单位定义为减少1个PEP活力单位所需要的抑制剂量。PEP活力单位定义为每分钟释放1 nmol AMC所需要的酶量。

1.3.3 蛋白质含量测定

PEPI分离纯化过程中, 用紫外分光光度计检测280 nm波长处吸光度, 进行蛋白质含量测定。其他蛋白含量采用Lowry法试剂盒测定^[15]。

1.3.4 PEPI的稳定性分析

按1.3.2节方法, 以未经处理的样品相对抑制活力为100%, 进行稳定性分析。

缓冲液分别为甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.0~3.0); 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 4.0~5.0); 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 6.0~7.0); Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0~9.0); 碳酸钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.0~11.0); 氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (pH 12.0)。

1.3.4.1 热稳定性分析

在0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中, 将PEPI在不同温度 (40~100℃) 下孵育30 min后, 立即冷却到室温。测定经加热处理后的PEPI对PEP的抑制活力。

1.3.4.2 pH值稳定性分析

将PEPI与0.1 mol/L (pH 2.0~12.0) 缓冲液以1:1

(V/V) 的比例混合, 4 °C 孵育 60 min 后, 取 50 μ L 样品, 测定不同 pH 值缓冲液处理后 PEPI 的抑制活力。

1.3.5 PEPI 抑制特异性分析

对 PEPI 抑制特异性分析选用半胱氨酸蛋白酶类的木瓜蛋白酶、外肽酶类的精氨酸氨肽酶以及丝氨酸蛋白酶类的胰蛋白酶和蓝圆鲐 PEP。除木瓜蛋白酶购于 Sigma 公司外, 其他酶均为实验室制备。

以 Z-Phe-Arg-MCA 为底物, 在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中测定木瓜蛋白酶活力; 以 Arg-MCA 为底物, 在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中测定精氨酸氨肽酶活力; 以 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 为底物, 在 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中测定胰蛋白酶活力。为减少酶活性差异对 PEPI 抑制效果的影响, 将不同蛋白酶调至相同的酶活力后测定 PEPI 抑制特异性。

1.3.6 PEPI 对 PEP 的作用类型分析

在含有不同浓度 PEPI 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 体系中, 固定底物 (Suc-Gly-Pro-MCA) 浓度, 测定不同 PEP 浓度下酶促反应的初速率, 以 PEP 浓度对反应速率作图; 固定 PEP 浓度, 测定不同底物浓度下酶促反应的初速率, 以双倒数法作图判断 PEPI 的抑制作用机理和类型。

1.3.7 PEPI 对 PEP 二级结构的影响

利用圆二色谱仪对蛋白质二级结构进行分析, 将蛋白浓度相同的 PEPI 和 PEP 各 100 μ L 混合后置于 0.05 cm 石英样品池中分析。扫描条件: 波长范围 185~260 nm, 扫描时间 0.6 s/nm, 温度 25 °C。以 5 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 为空白组, PEP 为对照组。利用 CDNN 软件计算样品的二级结构含量。

1.3.8 PEPI 对 PEP 热变性的影响

利用圆二色谱测定 PEPI 存在下 PEP 热变性温度的改变。扫描条件: 波长范围 185~260 nm, 温度范围 20~60 °C, 升温速度 0.5 °C/min, 其他条件与 1.3.7 节相同。利用 Global 3 软件分析数据。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS 17.0 软件分析数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验重复 3 次。

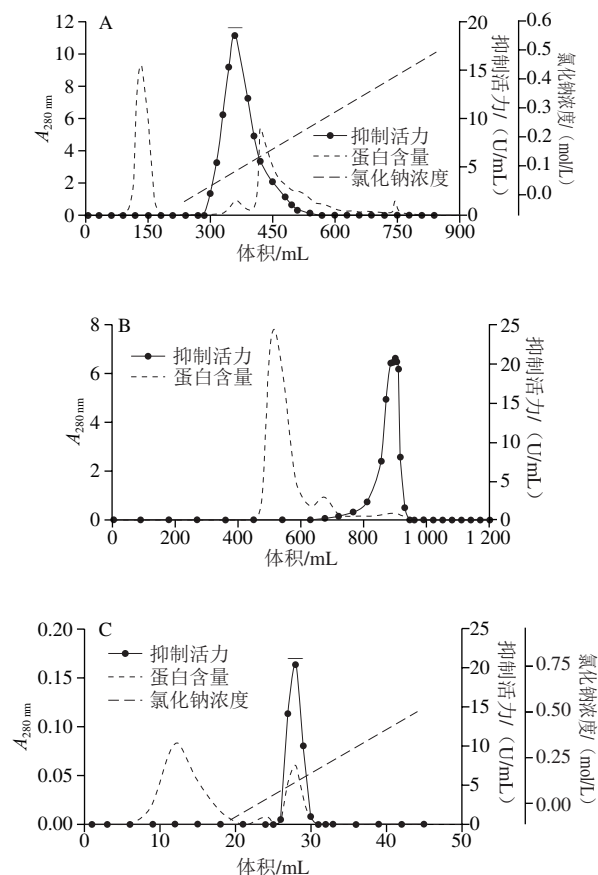
2 结果与分析

2.1 PEPI 的分离纯化

蓝圆鲐骨骼肌粗蛋白液样品经过 70 °C 热处理及硫酸铵盐析后, 上样于 DEAE-Sephacryl S-200 弱阴离子交换层析柱。由图 1A 可知, 目的蛋白有效地吸附于该层析柱, 且与未吸附部分的大量杂蛋白有效分离。目标蛋

白在 0.05~0.1 mol/L 氯化钠浓度下被洗脱。将 DEAE-Sephacryl S-200 吸附部分的活性峰浓缩后上样于 Sephacryl S-200 HR (图 1B), 目标蛋白与大分子质量杂蛋白分离。收集活性峰上样于 HiTrap Q HP 强阴离子层析柱 (图 1C), 用浓度为 0~0.5 mol/L 的氯化钠盐缓冲液洗脱, 目的蛋白在浓度 0.06~0.12 mol/L 氯化钠下被洗脱。收集活性峰经 Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 结果显示, 纯化得到蓝圆鲐 PEPI 的分子质量约为 10 kDa 蛋白条带 (图 2), 与鱼类肌肉中其他丝氨酸蛋白酶抑制剂有明显的差异。例如, 鱼类肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶抑制剂的分子质量分别为: 白姑鱼 (*Argyrosomus argentatus*) 55 kDa^[16], 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 120 kDa^[17], 蓝圆鲐 (*D. maruadsi*) 56 kDa^[18]。蓝圆鲐 PEPI 的分子质量约为 10 kDa, 与从树蛙 *Phyllomedusa sauvagii* 皮分离的分子质量为 6.6 kDa 的 PEPI^[19] 相似, 均属于低分子质量蛋白酶抑制剂。

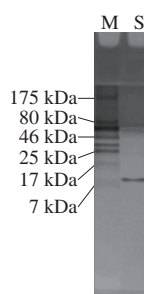
由表 1 可知, 从 800 g 蓝圆鲐肌肉中可纯化得到 0.5 mg PEPI, 得率约为 0.6 %, 纯化倍数为 43.7。



A. DEAE-Sephacryl S-200 阴离子交换柱层析; B. Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤柱层析; C. HiTrap Q HP 强阴离子交换柱层析。

图 1 蓝圆鲐 PEPI 纯化柱层析图谱

Fig. 1 Chromatographic purification of PEPI



M.标准蛋白; S.纯化的PEPI。

图2 蓝圆鲈PEPI的Tricine-SDS-PAGE图谱

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE of PEPI

表1 蓝圆鲈PEPI的纯化效果

Table 1 Summary of purification of PEPI

纯化步骤	总蛋白/ mg	总活 力/U	比活力/ (U/mg)	得率/%	纯化 倍数
粗酶液	39 742.50	37 129.17	0.93	100.00	1.00
70 °C 热处理	13 106.40	28 720.00	2.19	77.35	2.35
70%硫酸铵盐析	1 370.40	8 175.00	5.97	22.02	6.39
DEAE-Sepharose	25.51	222.94	8.74	0.60	9.35
Sephacryl S-200 HR	5.85	65.03	11.12	0.18	11.90
HiTrap Q HP	0.5	20.43	40.85	0.6	43.73

2.2 温度和pH值对PEPI活力的影响

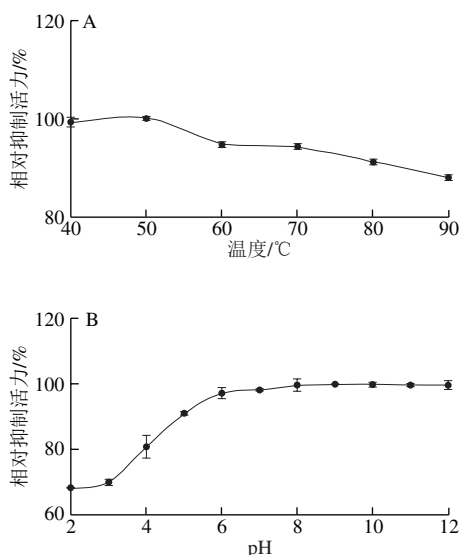


图3 温度(A)及pH值(B)对PEPI稳定性的影响

Fig. 3 Thermal (A) and pH (B) stability of PEPI

如图3所示, 蓝圆鲈肌肉内源性PEPI具有较好的热稳定性和pH值耐受性。在40~90 °C温度下孵育30 min后, PEPI的抑制活力基本一致, 90 °C时还具有90%的相对抑制活性(图3A); 在中性偏碱的环境(pH 6.0~12.0)下, 其抑制活性基本相同, pH 2.0时, 其相对抑制活性仍然有70%左右(图3B), 显示所获PEPI是一种对热和pH值稳定性强的抑制剂。

2.3 PEPI的抑制特异性

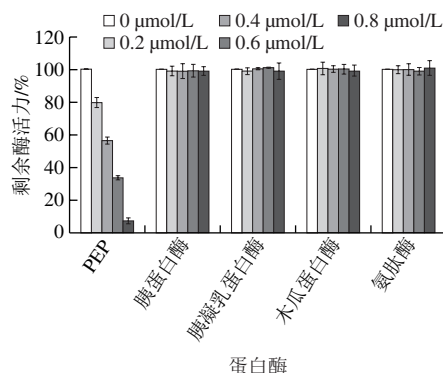


图4 PEPI对不同蛋白酶活力的影响

Fig. 4 Effect of PEPI on the activity of different proteinases

为进一步明确PEPI的抑制特异性, 将PEPI与不同类型的蛋白酶孵育, 分析抑制效果。如图4所示, PEPI对丝氨酸蛋白酶的PEP表现明显抑制作用, 抑制关系呈现典型的浓度依赖性, 当浓度增加至0.8 μmol/L, PEP的剩余活力低于10%。而PEPI对其他类型的丝氨酸蛋白酶并未表现出抑制效果, 即便当PEPI浓度增加至0.8 μmol/L时, 胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性仍未出现下降。此外, PEPI对半胱氨酸蛋白酶类的木瓜蛋白酶和外肽酶类的氨肽酶也未有明显的抑制。与鱼类肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶的內源性抑制剂类似^[16-18], 內源性PEPI是蛋白类抑制剂, 其特异性抑制效果与合成化合物类丝氨酸蛋白酶抑制剂的抑制特性是不同的。以上结果说明本研究纯化的抑制剂属于PEP的內源性专一抑制剂, 对PEP的生理活性调控起重要作用因此, 今后有必要通过蛋白分析或分子克隆技术获得PEPI的结构信息, 为研究其与PEP的作用机理提供可靠的依据。

2.4 PEPI对PEP的抑制类型

固定Suc-Gly-Pro-MCA荧光底物浓度, 在不同浓度PEPI (0.1、0.2、0.3 μmol/L) 作用下, 以PEP浓度S对酶促反应初速率V作图。如图5A所示, 是一组通过原点的直线, 且直线斜率随着PEPI浓度的增大而降低, 说明PEPI对PEP的抑制作用是可逆的。

固定PEP浓度, 改变底物Suc-Gly-Pro-MCA的浓度, 以底物浓度对酶促反应初速率双倒数作图。如图5B所示, 米氏常数 K_m 值随着PEPI浓度的增大而减小, 而酶的最大反应速率 V_{max} 值则维持不变(a、b), 说明PEPI可能在结构上与PEP的底物相似, 通过竞争的方式结合到PEP活性中心, 阻止其与底物结合进而抑制酶促反应。由双倒数作图可知, 蓝圆鲈肌肉中內源性PEPI的抑制常数 K_i 为0.34 μmol/L(图5B内置图)。

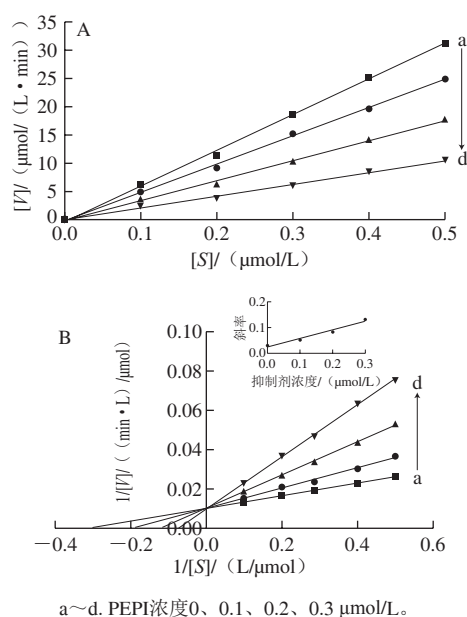


图5 PEPI对PEP的抑制作用(A)及抑制常数分析(B)

Fig. 5 Inhibitory mechanism (A) and inhibition constant (B) of PEPI on PEP

2.5 PEPI对PEP二级结构的影响

蛋白质的二级结构对于维持酶的稳定性和活性至关重要,特别是活性中心区域的构象^[20-23]。如表2所示,天然状态下蓝圆鲷PEP的二级结构由 α -螺旋(26.23%)、 β -折叠(28.43%)、 β -转角(18.60%)和无规卷曲(31.57%)组成,该结果与猪PEP的二级结构有一定差异,后者由 α -螺旋(22%)、 β -折叠(29%)、转角(22%)和无规卷曲(26%)组成^[24]。推测这是由于这两种动物在分类上差异大,PEP的同源性不高(73%)导致的。PEP属于典型的 α/β -折叠酶,其中 α/β -折叠结构由8个 β -折叠通过5个 α -螺旋连接组成,为酶活性位点提供一个稳定的支架^[25]。当PEP中 α -螺旋和 β -折叠含量发生变化时,酶活性中心的构象发生变化,酶促反应被抑制^[26]。

表2 PEPI对PEP二级结构的影响

Table 2 Secondary structure contents of PEP in the absence and presence of PEPI

样品	二级结构含量/%				PEP活性/%
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲	
PEP	26.23±0.15	28.43±0.21	18.60±0.30	31.57±0.25	100
PEP+PEPI	27.20±0.10*	25.67±0.40*	18.40±0.10	33.50±0.17*	9.32±0.43*

注: *.该列数据组间有显著性差异($P<0.05$)。

如表2所示,PEPI存在时,PEP的二级结构中 α -螺旋含量增加了3.70%(从26.23%增至27.20%),无规卷曲增加了6.11%(从31.57%增至33.50%),而 β -折叠含量下降了9.71%(从28.43%降至25.67%),($\alpha+\beta$)结构总含量下降了3.27%(从54.66%降至52.87%),PEP活性下降

90.68%(从100%降至9.32%),表明PEP活性的下降可能与其二级结构的改变有关。这种二级结构的改变与已报道竞争型抑制剂对其他 α/β -折叠酶的二级结构影响相似。研究表明,当非竞争型抑制剂与 α -葡萄糖苷酶结合时, α -螺旋含量显著降低, β -折叠含量基本稳定,而 β -转角和无规卷曲的含量呈上升趋势;但当竞争型抑制剂与其结合时, α -螺旋含量增加, β -折叠含量下降,且两者的总量呈下降的趋势, β -转角和无规卷曲的含量呈上升趋势^[27]。因此,PEP-PEPI复合物形成后,通过竞争的方式发生 α -螺旋和无规卷曲结构增加和 β -折叠结构降低的二级结构改变,影响PEP活性位点的构象进而抑制酶促反应,该结果也与图5竞争型抑制类型的结果相吻合。

2.6 PEPI对PEP热变性的影响

蛋白质溶液在逐渐加热到临界温度以上时,其构象从天然状态到变性状态有一个显著的转变,这个转变的中心温度称为熔化温度(T_m)^[28]。当抑制剂存在时,酶-抑制剂复合物会提高酶的 T_m 值, T_m 改变越大表明两者间的亲和力越大。因此, T_m 的改变常用来评价抑制剂和酶的结合能力^[29-30]。

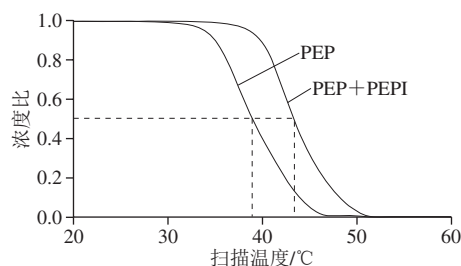


图6 PEPI对PEP热变性的影响

Fig. 6 T_m values of PEP in the absence and presence of PEPI

如图6所示,天然状态下PEP的 T_m 约为39.0 °C,PEPI存在时, T_m 增加至43.5 °C,PEP-PEPI复合物的形成显著提高了PEP的 T_m 值。这是由于PEP-PEPI复合物形成后,需要更多的能量解离复合物^[29-30]。另一方面,在蛋白质中, α -螺旋结构对于稳定空间结构至关重要^[20]。如表2所示,PEPI存在时PEP二级结构中 α -螺旋结构增加,可能是其 T_m 值增加的另一个原因。PEPI存在时,PEP热变性的改变表明,PEP-PEPI复合物有利于PEP蛋白质在热转变过程中稳定它的构象。

3 结论

从蓝圆鲷骨骼肌中分离纯化出一种分子质量约为10 kDa的内源性PEPI,为丝氨酸蛋白酶类PEP的专一性抑制剂。抑制动力学和二级结构分析表明,PEPI是可逆竞争型抑制剂,其抑制常数 K_i 为0.34 $\mu\text{mol/L}$ 。其抑制机理为PEPI存在时,PEP的 α -螺旋和无规卷曲组分增加, β -折

叠组分降低,影响活性位点的构象,进而抑制PEP促反应。PEP-PEPI复合物的形成不仅改变PEP的二级结构,而且提高PEP在热转变过程中的熔化温度(T_m)。

参考文献:

- [1] 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. DOI:10.1002/jcp.25178.
- [2] WANG M X, ZHONG C, CAI Q F, et al. Study on a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2211-2218. DOI:10.1016/j.procbio.2012.08.016.
- [3] 翁凌, 林韵, 张玲, 等. 草鱼肌肉脯氨酸内肽酶的研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 23-31. DOI:10.16429/j.1009-7848.2015.09.004.
- [4] 肖琳琳, 翁凌, 钟婵, 等. 罗非鱼脯氨酸内肽酶的分离及抑制剂对其的作用机制[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2017, 22(1): 10-20. DOI:10.3969/j.issn.1007-7405.2017.01.002.
- [5] 唐俊, 颜龙杰, 翁凌, 等. 蓝圆鲹骨骼肌脯氨酸内肽酶的分离纯化及其对胶原肽的作用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(6): 122-129. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.020.
- [6] BOUDIDA Y, GAGAOUA M, BECILA S, et al. Serine protease inhibitors as good predictors of meat tenderness: which are they and what are their functions?[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(6): 957-972. DOI:10.1080/10408398.2012.741630.
- [7] XU C, WANG C, CAI Q F, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) plays a critical role in the softening of common carp muscle during chilled storage by degradation of type I and V collagens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(51): 10948-10956. DOI:10.1021/acs.jafc.5b03893.
- [8] 贡雯玉, 卞欢, 吴海虹, 等. 高效液相色谱法检测鲫鱼不同组织中的胶原蛋白含量[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 65-69. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201514013.
- [9] WU J L, WANG S, SUN X Y, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of a matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) with collagen degradation activity[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(7): 854-864. DOI:10.1016/j.procbio.2016.04.004.
- [10] AHMED Z, DONKOR O, STREET W A, et al. Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: impact on structural softening and release of bioactive peptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 45(1): 130-146. DOI:10.1016/j.tifs.2015.04.002.
- [11] TARRAGEO T, KICHIK N, SEGUI J, et al. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor[J]. ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery, 2007, 2(3): 354-359. DOI:10.1002/cmdc.200600303.
- [12] KRUPINA N A, BOGDANOVA N G, KHEBNIKOVA N N, et al. Benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine, a prolyl endopeptidase inhibitor, modulates depression-like behavior of rats in forced swimming test and activities of proline-specific peptidases in the brain structures[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2013, 154(5): 606-609. DOI:10.1007/s10517-013-2010-y.
- [13] HSIEH C H, WANG T Y, HUNG C C, et al. Isolation of prolyl endopeptidase inhibitory peptides from a sodium caseinate hydrolysate[J]. Food & Function, 2016, 7(1): 565-73. DOI:10.1039/c5fo01262g.
- [14] LAFARGA T, O'CONNOR P, HAYES M. In silico methods to identify meat-derived prolyl endopeptidase inhibitors[J]. Food Chemistry, 2015, 175: 337-343. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.150.
- [15] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 256-275.
- [16] CAO M J, OSATOMI K, MATSUDA R, et al. Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 272(2): 485-489. DOI:10.1006/bbrc.2000.2803.
- [17] SUN L C, ZHOU L G, DU C H, et al. Glucose-6-phosphate isomerase is an endogenous inhibitor to myofibril-bound serine proteinase of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12): 5549-5555. DOI:10.1021/jf9004669.
- [18] 张超群, 钟婵, 王诚, 等. 蓝圆鲹骨骼肌GPI的纯化及其对肌原纤维降解的抑制[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2012, 17(6): 414-420. DOI:10.19715/j.jmzr.2012.06.003.
- [19] GEBHARD L G, CARRIZO F U, STERN A L, et al. A kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa Sauvagii*[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(11): 2117-2126. DOI:10.1111/j.1432-1033.2004.04127.x.
- [20] XIONG Z Q, LIU W, ZHOU L, et al. Mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase inhibited by apigenin: multi-spectroscopic analyses and computational docking simulation[J]. Food Chemistry, 2016, 203: 430-439. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.02.045.
- [21] GAO Y M, WANG X J, ZHANG J, et al. Borrelidin, a potent antifungal agent: insight into the antifungal mechanism against phytophthora sojae[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(39): 9874-9881. DOI:10.1021/jf302857x.
- [22] HAO G F, WANG F, LI H, et al. Computational discovery of picomolar Q (o) site inhibitors of cytochrome bc (1) complex[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(27): 11168-11176. DOI:10.1021/ja3001908.
- [23] 吕艳芳, 杨铭铎. 曲酸对南美白对虾酚氧化酶活性和结构的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 22-28. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718004.
- [24] JUHÁSZ T, SZELTNER Z, FÜLÖP V, et al. Unclosed β -propellers display stable structures: implications for substrate access to the active site of prolyl oligopeptidase[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 346(3): 907-917. DOI:10.1016/j.jmb.2004.12.014.
- [25] GOOSSENS F, DEMEESTER I, VANHOOF G, et al. The purification, characterization and analysis of primary and secondary-structure of prolyl oligopeptidase from human lymphocytes[J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 233(2): 432-441. DOI:10.1111/j.1432-1033.1995.432_2.x.
- [26] NARDINIM, DIJKSTRAB W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1999, 9(6): 732-737. DOI:10.1016/S0959-440X(99)00037-8.
- [27] 沈琼, 黄滨, 邵嘉亮, 等. 运用圆二色谱研究酶与化合物相互作用的机理[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(4): 62-64. DOI:10.3321/j.issn:0529-6579.2006.04.015.
- [28] MARTIN S R, SCHILSTRA M J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules[J]. Methods in Cell Biology, 2008, 84: 263-293. DOI:10.1016/S0091-679X(07)84010-6.
- [29] MAYHOOD T W, WINDSOR W T. Ligand binding affinity determined by temperature-dependent circular dichroism: cyclin-dependent kinase 2 inhibitors[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 345(2): 187-197. DOI:10.1016/j.ab.2005.07.032.
- [30] AYALA Y M, VINDIGNI A, NAYAL M, et al. Thermodynamic investigation of hirudin binding to the slow and fast forms of thrombin: evidence for folding transitions in the inhibitor and protease coupled to binding[J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 253(5): 787-798. DOI:10.1006/jmbi.1995.0591.