

鲫鱼 MBSP 的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备

李 婷^{1,2}, 李 欢^{1,2}, 陈海英^{1,2}, 杜翠红^{*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: 构建鲫鱼肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶 (MBSP) 的原核表达菌株 *Rosetta* (pET28a-MBSP), 获得重组 MBSP, 以制备 MBSP 多克隆抗体。将鲫鱼 MBSP 全长基因 (MBSP) 借助表达载体 pET-28a 构建重组表达菌株 *Rosetta*(pET28a-MBSP), 并进行诱导表达后获得重组 MBSP。利用 Ni-NTA agarose 亲和层析柱纯化重组蛋白并进行质谱鉴定。以纯化后的重组 MBSP 作为抗原免疫新西兰兔, 获得 MBSP 多克隆抗体。分别采用 ELISA 和 Western blot 技术测定其效价和特异性。诱导表达的重组蛋白经 SDS-PAGE 分析、Western blot 检测及质谱鉴定, 结果表明该蛋白质为重组 MBSP, 其相对分子质量约为 28×10^3 , 与天然 MBSP 大小一致, 主要以包涵体形式存在。将其免疫兔子后, 从血清中获得了与 MBSP 发生特异性反应的高效价多克隆抗体。本研究中成功表达和纯化了重组 MBSP 蛋白, 制备了高效价的特异性 MBSP 多克隆抗体, 为 MBSP 的相关研究奠定基础。

关键词: 肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶; 原核表达; 蛋白纯化; Western blot; 多克隆抗体

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)08-0877-07

Prokaryotic Expression, Purification of Myofibril-Bound Serine Proteinase from Crucian Carp (*Carassius auratus*) and Preparation of Its Polyclonal Antibody

LI Ting^{1,2}, LI Huan^{1,2}, CHEN Haiying^{1,2}, DU Cuihong^{*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: An *E. coli* expression strain *Rosetta* (pET-28a-MBSP) of myofibril-bound serine proteinase (MBSP) from crucian carp (*Carassius auratus*) was constructed. The recombinant MBSP (rMBSP) was expressed and purified in order to prepare its polyclonal antibody, which would lay a foundation for further studies on the MBSP. The MBSP gene was transformed into *Rosetta* by sub-cloning it into pET-28a vector to construct the strain *Rosetta*(pET-28a-MBSP). The recombinant strain was induced to express MBSP by lactose. The recombinant protein was purified by Ni-NTA agarose affinity column chromatography, MALDI-TOF-MS identification, and then use as the

收稿日期: 2015-07-03

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2010J01212); 厦门市海洋渔业局项目(14CZP03HJ04)。

* 通信作者: 杜翠红(1967—), 女, 江西临川人, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事分子生物学研究。E-mail: cuihongdu@jmu.edu.cn

引用本文: 李婷, 李欢, 陈海英, 等. 鲫鱼 MBSP 的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(08): 877-883.

antigen to immune the rabbits to prepare polyclonal antibody. Antibody titer was assayed by ELISA and specificity was detected by western blot. SDS-PAGE, western blot and MALDI-TOF-MS analysis showed that the recombinant protein was the recombinant MBSP (rMBSP) with molecular weight of approximately 28×10^3 , which was similar to native MBSP from the skeletal muscle of crucian carp. And the rMBSP was expressed in prokaryotic expression system in mainly inclusion body. The serum with a high titer and specificity was obtained from immunized rabbit. The recombinant MBSP was expressed and purified successfully. The MBSP's polyclonal antibody with a high titer and specificity was obtained by immunization using the purified MBSP.

Keywords: myofibril-bound serine proteinase, prokaryotic expression, protein purification, western blot, polyclonal antibody

肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(MBSP)是一种碱性蛋白酶,属于丝氨酸蛋白酶家族中的一员,因其与肌原纤维蛋白紧密结合而得名。有关鱼类MBSP的报道已经证实,鱼类MBSP可降解肌原纤维蛋白,从而造成鱼糜制品凝胶劣化,降低其商业价值^[1-3],因此,有必要对鱼类MBSP进行深入研究,并开发其酶抑制剂。关于鱼类MBSP的分离纯化目前已有报道:如Osatomi等^[4]在1997年获得鲤鱼肌肉的MBSP;随后Cao等分别从狗母鱼^[5-6]、白鲢鱼^[7]、白鲢鱼^[8]和鲫鱼^[9]等鱼类肌肉中也纯化了MBSP。同时文献报道^[5-11],鱼类MBSP具有与胰蛋白酶相似的底物特异性,而其热稳定较高,有望开发为一种蛋白质谱鉴定中的新型工具酶。但天然MBSP在有些鱼类中含量很低、不易检测,从而影响对其分离纯化和深入研究,因此,MBSP基因的克隆和重组表达受到研发人员的关注。目前已通过RACE技术克隆到了鲫鱼^[9]、鲤鱼^[12]和鲢鱼的MBSP基因序列,从而为鱼类MBSP的重组表达及其多克隆抗体的制备提供了前提保证。本文中采用基因重组技术在原核表达系统中获得了重组鲫鱼MBSP蛋白,并用该蛋白质制备了特异性多克隆抗体,为进一步研究MBSP的性质和功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I, *Taq* DNA 聚合酶, T4 连接酶, λ -Hind III DNA Marker, 2000 DNA marker, Protein Marker; 购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒, DNA 片段回收试剂盒; 购自上海天根生物有限公司; 蛋白胨, 酵母提取

物, IPTG, 丙烯酰胺, 氯化钠及过硫酸铵等; 购自上海生工生物有限公司; Ni-NTA agarose; 购自Pharmacia公司; HRP 标记的羊抗兔; 购自泰京生物有限公司; NC 膜; 购自美国 Millipore 公司; 完全佐剂和不完全佐剂; 购自德国 Sigma 公司。其他化学试剂均为分析纯。

1.1.2 实验动物 3 只新西兰大白兔, 每只体重约 2.5 kg, 购自松江区松联实验动物场。

1.1.3 菌株与载体 大肠杆菌菌株 DH5 α 和 Rosetta、表达载体 pET-28a 均由本实验室保存, 其中菌株 DH5 α 为克隆宿主, 菌株 Rosetta 为表达宿主; 重组克隆质粒 pMD19-T-MBSP 由本实验室构建。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计及鲫鱼 MBSP 基因(MBSP)的 PCR 扩增 参照 GenBank (DQ872434) 中报道的鲫鱼 MBSP 的 cDNA 序列设计特异性引物, 其核苷酸序列分别为:

F: 5'-TAGAATTC (*EcoR* I) ATCATTGTTGGTTAC GAGTGTAGG -3'

R: 5'-TAGCGGCCGC (*Not* I) TTAGTTACTAGCTAT GGTGG-3'

以上引物交由上海 Invitrogen 公司合成。

以重组克隆质粒 pMD19-T-MBSP 为模板, 利用以上设计的特异性引物进行 PCR 扩增, 以获得带有限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 的鲫鱼 MBSP 基因(MBSP)片段。PCR 条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。采用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 利用 DNA 片段回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。

1.2.2 重组表达质粒 pET-28a-MBSP 的构建 将质粒 pET-28a 和 1.2.1 中获得的 PCR 产物 (即: MBSP 基因片段) 同时进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳进行分离, DNA 片段回收试剂盒进行回收, 使用 T4 连接酶 16 ℃ 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 通过含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板筛选转化子, 于 37 ℃, 200 r/min 震荡培养后提取质粒, 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切验证得到阳性转化子, 送至上海 Invitrogen 公司进行测序, 进一步确认重组质粒 pET-28a-MBSP 中目的基因序列及其阅读框架的正确性。

1.2.3 重组表达菌株 Rosetta(pET-28a-MBSP) 的构建及其诱导表达 质粒提取试剂盒提取测序正确的重组质粒 pET28a-MBSP, 42 ℃ 热激转化 Rosetta 感受态细胞, 挑取 LB (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 平板筛选的阳性转化子进行扩大培养, 提取质粒进行 PCR 验证 (反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min), 从而获得重组表达菌株 Rosetta (pET-28a-MBSP)。

将重组表达菌株 Rosetta (pET-28a-MBSP) 接种至 10 mL LB 培养基中进行活化, 按体积分数 1% 接种量转接 50 mL LB 培养基中, 37 ℃, 200 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ 为 1.5, 加入乳糖至终质量浓度为 4 mg/L, 诱导表达 8 h, 以未加诱导剂的细菌培养物为阴性对照, 重复 3 次。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测及 Western blot 鉴定 收集诱导表达的菌体进行超声波破碎, 冷冻离心, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 检测, 并用 (His)6 标签的多克隆抗体 (稀释倍数 1:2 000) 进行 Western blot 鉴定, 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG (稀释倍数 1:20 000), 以确定重组蛋白的相对分子质量及其表达方式, 具体步骤参照刘西之等^[13]报道的方法。

1.2.5 重组 MBSP 的纯化和质谱鉴定 对重组表达菌株 Rosetta (pET-28a-MBSP) 进行大量诱导表达, 离心收集菌体, 用破菌缓冲液 (0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.15 mol/L NaCl) 重悬菌体, 超声波破菌, 离心收集包涵体沉淀, 用溶菌缓冲液 (0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mol/L NaH₂PO₄, 8 mol/L 尿素) 搅拌使之充分溶解, 离心收集上清液。将上清液与经平衡缓冲液 A1 (0.05 mol/L Na₂HPO₄, 0.015 mol/L

L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素) 处理过的 Ni-NTA agarose 充分结合, 缓冲液 A2 (0.05 mol/L Na₂HPO₄, 0.03 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素) 洗去杂蛋白质, 洗脱液 (0.05 mol/L Na₂HPO₄, 0.3 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素) 洗脱目的蛋白质, 即获得纯化的含 (His)6 标签的重组蛋白, 分别进行 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定。将 SDS-PAGE 电泳分离的 MBSP 目的条带切下, 送至上海中科新生命生物科技有限公司进行 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定。

1.2.6 MBSP 多克隆抗体的制备及其检测 将纯化后的重组 MBSP (质量浓度为 1.0 mg/mL) 与等体积弗氏完全佐剂混匀并充分乳化后, 分散 15 个点对新西兰兔脊柱两侧进行皮下免疫注射 (每次 200 μ g 的重组 MBSP)。初次免疫后, 每间隔两周加强免疫, 剂量如前, 共免疫 4 次。第 1 次用弗氏完全佐剂, 其余用弗氏不完全佐剂。免疫完成后取血测效价, 效价达到理想值后再进行兔颈动脉取血, 5 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 于 -80 ℃ 保存。采用 ELISA 法, 以纯化的重组 MBSP 作为包被抗原, 一抗为免疫兔血清, 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 一抗的稀释梯度分别: 1/50、1/50²、1/50³、1/50⁴、1/50⁵、1/50⁶、1/50⁷, TMB 显色后, 在 $\lambda=450$ nm 处测定光密度值。确定抗体效价后, 采用 Western blot 的方法检测免疫兔血清的特异性, 具体步骤参考 1.2.4。

2 实验结果

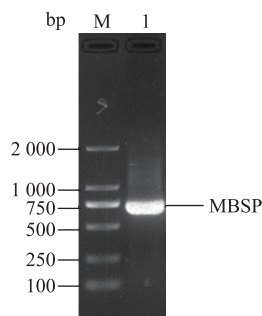
2.1 重组表达质粒 pET-28a-MBSP 的构建

以重组克隆质粒 pMD19-T-MBSP 为模板, 采用 PCR 技术扩增鲫鱼 MBSP 基因片段, PCR 产物为 700 bp 左右 (图 1), 与预期大小相符。将表达载体 pET-28a 和 MBSP 基因片段进行双酶切, 采用 T4 连接酶将二者连接后成功转入感受态 DH5 α , 提取重组质粒, 双酶切获得约 700 bp 的目的基因片段和 5 000 bp 左右的载体 pET-28a 线性片段 (图 2), DNA 测序结果证实目的基因大小为 669 bp, 其基因序列和阅读框架均正确, 重组表达质粒 pET-28a-MBSP 构建成功。

2.2 重组表达菌株 Rosetta (pET-28a-MBSP) 的构建及其诱导表达

重组表达质粒 pET-28a-MBSP 转入到大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞后, 进行菌落 PCR 验证 (图

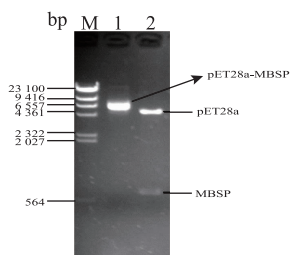
3),结果显示表达菌株 *Rosetta*(pET-28a-MBSP)构建成功。



M:DL 2000 DNA Marker; 1:PCR 产物

图 1 MBSP 基因的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

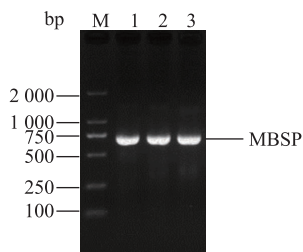
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product of MBSP



M:λ-Hind III DNA Marker; 1: 重组质粒 pET-28a-MBSP; 2: 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切的重组质粒

图 2 重组质粒 pET-28a-MBSP 的双酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pET-28a-MBSP(*EcoR* I and *Not* I)



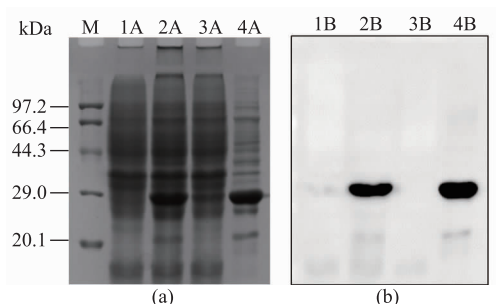
M:DL 2000 DNA Marker; 1—3: 不同 *Rosetta* (pET-28a-MBSP) 单克隆的 PCR 结果

图 3 重组质粒 pET-28a-MBSP 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pET-28a-MBSP

表达菌株 *Rosetta*(pET-28a-MBSP)经乳糖诱导表达,超声波破碎,分别取全菌、上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 检测及 Western bolt 鉴定(图 4)。结果显示,诱导表达的菌液中出现一条相对分子质量为

28×10^3 左右的蛋白质条带,该条带可以与 (His)6 标签的多克隆抗体进行免疫杂交反应,说明该蛋白质为重组蛋白。该重组蛋白与天然鲫鱼 MBSP 的相对分子质量一致,且以包涵体形式存在。



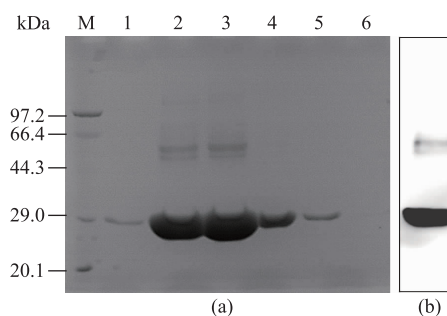
M:Protein Marker; 1A, 1B: 未诱导; 2A, 2B: 经乳糖诱导表达的细菌的全菌蛋白; 3A, 3B: 经乳糖诱导表达的细菌裂解上清; 4A, 4B: 经乳糖诱导的细菌裂解沉淀,其中,Western blot 采用 (His)6 标签的多克隆抗体为一抗

图 4 MBSP 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测及 Western blot 鉴定结果

Fig. 4 SDS -PAGE and Western blot analysis of recombinant MBSP

2.3 重组 MBSP 的纯化和质谱鉴定

将诱导表达后得到的包涵体用 8 mol/L 尿素溶解后,采用 Ni-NTA agarose 亲和层析对其进行纯化,通过 SDS-PAGE 检测和 Western blot 鉴定 (图 5),得到电泳级纯度为 85% 以上的重组 MBSP。将纯化后的 MBSP 进行 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定 (图 6),结果显示纯化后的产物确定为鲫鱼 MBSP,可用来制备多克隆抗体。



M:Protein Marker; 1-6:Ni-NTA agarose 亲和层析过程洗脱峰中的重组 MBSP

图 5 纯化的重组 MBSP 的 SDS-PAGE 检测和 Western blot 鉴定结果

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified recombinant MBSP

SAAHCNFQODRLSVRLGRHNLVTAENTEQRIEAE
KMIPFPKYNDPRPHNNDIMLIKLPATLNRYVKPI
PLPNKCPSAGERCLVTGWGRGTADGIASLTQCLKL
PVLSEKVCKTAYGSIITRNMFCAFGIRGGKDSCQG
DSGGPVVCKGQLKGVVSFGNGCAKPKYPGVYAE
VCRYTRWIKSTIASN

注:粗体下划线标注的为 trypsin 酶解后质谱鉴定到的肽段

图 6 鲫鱼 MBSP 的氨基酸序列及重组 MBSP 质谱鉴定肽段序列覆盖图

Fig. 6 Amino acid sequence of crucian carp MBSP and fragments of recombinant MBSP mature peptides digested by trypsin

2.4 多克隆抗体的制备及检测

用纯化的重组 MBSP 免疫新西兰兔获得血清,采用 ELISA 法检测其效价,结果显示其抗体效价达到 $1:50^3$ 倍(图 7)。

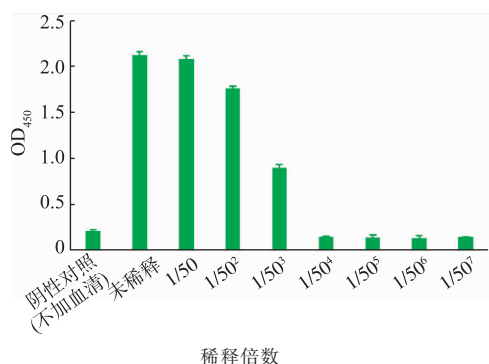


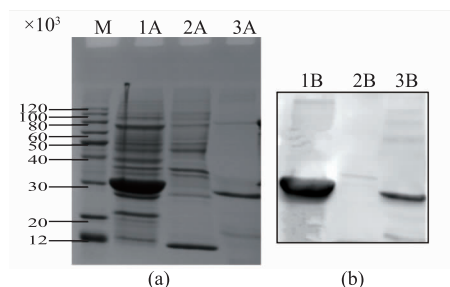
图 7 ELISA 检测 MBSP 多克隆抗体效价

Fig. 7 ELISA detection of the MBSP polyclonal antibody titer

以 MBSP 的多克隆抗体为一抗,带 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blot 验证(图 8),结果表明,阴性对照(未经诱导的菌液)没有特异性条带(图 8(b),lane 2B),而大肠杆菌表达的重组 MBSP(图 8(b),lane 1B)和毕赤酵母表达的重组 MBSP(图 8(b),lane 3B)均出现特异性条带,表明 MBSP 的多克隆抗体制备成功。其中,毕赤酵母表达的重组 MBSP 由本研究室提供,实验结果有待发表。

3 讨论

鱼类的 MBSP 在鱼糜制品生产过程中被认为是导致凝胶劣化的主要因素^[1]。因此,有必要对不同鱼类 MBSP 的进行分离纯化及其酶学性质研究,以开发其酶抑制剂。另一方面,MBSP 是一种与胰蛋白酶性质相似的丝氨酸蛋白酶,但其热稳定性优于哺



M:Protein Marker;1A:菌株 *Rosetta*(pET-28a-MBSP)诱导表达的重组 MBSP;2A: 阴性对照(未诱导);3A: 酵母菌株 GS115(pICZα-MBSP)诱导表达的重组 MBSP(本研究室构建并表达);图 8B 为 Western blot 鉴定结果(其中,采用本文所制备的 MBSP 多克隆抗体作为一抗),其加样顺序同图 8(a)

图 8 MBSP 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

Fig. 8 Western blotting analysis of MBSP polyclonal antibody

乳动物的胰蛋白酶^[5-11]。而在蛋白质的质谱鉴定中,常用胰蛋白酶或蛋白内切酶 Lys-C 作为工具酶对蛋白质进行降解以生成小肽^[14-15]。但胰蛋白酶的热稳定性差,而内切酶 Lys-C 价格偏高,影响了其实际使用。因此,将 MBSP 开发为蛋白质质谱鉴定中的工具酶,具有很好的应用前景和商业价值。然而,天然 MBSP 在有些鱼类体内含量极低,常常检测不到该酶的存在,从而造成其分离纯化困难,因此,有必要通过基因重组技术获得大量的重组 MBSP。一方面通过制备多克隆抗体以提高检测 MBSP 的灵敏度;另一方面也有利于研究其酶学性质及其应用开发。

本文作者利用 GenBank 数据库中已报道的鲫鱼 MBSP 的 cDNA 序列设计特异性引物,采用 RT-PCR 技术获得编码鲫鱼 MBSP 成熟蛋白的基因序列,将其与表达载体 pET-28a 连接,转入大肠杆菌表达宿主 *Rosetta* 中进行诱导表达,获得了重组鲫鱼 MBSP 的包涵体蛋白(图 4)。同时本研究室还利用毕赤酵母表达系统对该蛋白质进行重组表达,获得了重组 MBSP(实验结果有待发表)。其中,原核系统表达的重组 MBSP 的主要为包涵体蛋白,虽然其不具有生物学活性,但其表达量较高(图 8)、且带有 (His)₆ 标签(图 4(b))便于采用亲和层析技术进行纯化,以获得纯度较高的重组 MBSP,更适合用于多克隆抗体的制备;而真核系统表达的重组 MBSP,虽然表达量较低(图 8),但其具有生物学活性,可用于研究其酶学性质及其应用开发。

本研究采用 Ni-NTA agarose 亲和层析技术纯化得到了电泳级为 85% 以上的重组蛋白(图 5),通过质谱鉴定技术确定该蛋白为重组鲫鱼 MBSP (图 7)。将重组 MBSP 免疫新西兰兔,获得了高效价的抗 MBSP 的特异性多克隆抗体。因免疫印迹具有高灵敏性,能与含量极低的抗原发生特异性结合。因此本文获得的 MBSP 多克隆抗体可用于 MBSP 的检测。

亲和层析是利用生物分子间的特异性相互作用,通过将具有亲和力的 2 个分子中的 1 个固定在不溶性基质上,利用分子间亲和力的特异性和可逆性对另一个分子进行分离纯化的技术。如本文中采用 Ni-NTA agarose 亲和层析柱纯化带有 (His)6 标签的重组蛋白(图 5);另外重组蛋白也常含有 GST 标签,可采用谷胱甘肽亲和层析树脂进行纯化。这两种亲和层析树脂可成功纯化原核表达的重组蛋白^[16-18],但因天然蛋白不含 (His)6 标签和 GST 标签,使该层析柱无法应用到天然蛋白的纯化中。而本研究中所获得的 MBSP 特异性多克隆抗体可制备特

异性免疫亲和层析树脂,用来纯化天然 MBSP,以解决生物体内 MBSP 含量低、分离纯化步骤繁琐、回收率低等问题,为 MBSP 的进一步研究奠定基础。

4 结 语

利用 GenBank 数据库中已报道的鲫鱼 MBSP 的 cDNA 序列设计特异性引物,获得编码鲫鱼 MBSP 成熟蛋白的基因序列,成功构建重组 MBSP 的原核表达菌株 *Rosetta/pET-28a-MBSP*,并采用乳糖进行诱导表达,结果表明,重组蛋白在原核表达系统内以包涵体形式成功表达。

采用 Ni-NTA agarose 亲和层析技术对表达的包涵体蛋白进行纯化,得到了电泳级纯度为 85% 以上的重组蛋白,通过质谱鉴定技术确定该蛋白质为重组鲫鱼 MBSP。

将重组 MBSP 免疫新西兰兔,获得了高效价的抗 MBSP 的特异性多克隆抗体,可用于后续毕赤酵母表达重组 MBSP 的检测。

参考文献:

- [1] TOYOHARA H, SAKATA T, YAMASHITA K, et al. Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar proteinase(s) [J]. *Journal of Food Science*, 1990, 52(2): 364-368.
- [2] 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.
- [3] QIU C J, XIA W S, JIANG Q X. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on myofibril-bound serine proteinases and myofibrillar protein in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Food research International*, 2013, 52(1): 199-205.
- [4] OSATAOMI K, SASAI H, CAI M J, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase (MBSP) from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 116(2): 183-190.
- [5] CAO M J, OSATOMI K, HARA K, et al. Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 125(2): 155-264.
- [6] OHKUBO M, MIYAGAWA K, OSATOMI K, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from lizard fish (*Saurida undosquamis*) muscle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137: 139-150.
- [7] CAO M J, WU L L, HARA K, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from the skeletal muscle of silver carp[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2005, 29(5): 533-546.
- [8] OHKUBO M, OSATOMI K, HARA K, et al. A novel type of myofibril-bound serine protease from white croaker (*Argyrosomus argentatus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 141(2): 231-236.
- [9] GUO C, CAO M J, LIU G M, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of a myofibril-bound serine proteinase from the skeletal muscle of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(4):

- 1510-1516.
- [10] CAO M J, OSATOMI K, PANGKEY H, et al. Cleavage specificity of a myofibril-bound serine proteinase from carp (*Cyprinus carpio*) muscle [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 1999, 123: 399-405.
- [11] DU Cuihong, CAO Minjie. Progress in research on myofibril-bound serine protease from fish [J]. **Food Science**, 2013, 34(9): 336-339(in Chinese).
- [12] GUO C, LIANG Y L, LIU G M, et al. Molecular cloning of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) from common carp (*Cyprinus carpio*) muscle[J]. **Journal of Fisheries of China**, 2007, 31(4): 423-430.
- [13] LIU Xizhi, QIU Xiaoyan, CAI Qiufeng, et al. Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from banded grouper (*Epinephelus awoara*) [J]. **Journal of Fisheries of China**, 2011, 35(11): 1736-1744(in Chinese).
- [14] RUAN M M, WU J M. Trypsin immobilized in sol-gel for high-throughput protein peptide mapping [J]. **Chin J Anal Chem**, 2006, 34(12): 1707-1710.
- [15] GADGIL H S, BONDARENKO P V, PIPES G D, et al. Identification of cysteinylolation of a free cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis [J]. **Anal Biochem**, 2006, 355(2): 165-174.
- [16] YE X, ZHANG L L, TIAN Y Y, et al. Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. 2010, 34(5): 501-509.
- [17] LOO G H, SUTTON D L, SCHULLER K A. Cloning and functional characterisation of a peroxiredoxin 1 (NKEF A) cDNA from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its expression in fish infected with *Neoparamoeba perurans* [J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2012, 32(6): 1074-1082.
- [18] LIU Z Y, WANG Y, LU G D, et al. Cloning, sequencing and prokaryotic expression of cDNAs for antifreeze protein family from beetle *Tenebrio molitor* [J]. **Frontiers of Biology in China**, 2006, 28(12): 1532-1540.

科 技 信 息

欧盟拟设定谷氨酸盐食品添加剂限额

2017 年 7 月 12 日, 欧洲食品安全局发表声明说, 该机构对谷氨酸和谷氨酸盐的安全性进行了重新评估, 认为消费者摄入这类食品添加剂的最大限额为每天每公斤体质量 30 毫克。

在欧盟, 谷氨酸和谷氨酸盐被允许作为食品添加剂使用, 以提高食物的鲜味。目前欧盟批准食品中添加谷氨酸盐的质量分数最高水平为 10 g/kg。

欧洲食品安全局说, 为保护消费者安全, 该机构对谷氨酸、谷氨酸钠、谷氨酸钾、谷氨酸钙、谷氨酸铵以及谷氨酸镁这些食品添加剂的每日允许摄入量进行了分析。根据对动物进行的毒性试验, 提出了不会产生不良反应的最高剂量标准。谷氨酸盐可能给人带来的不良反应包括头疼、血压增高以及胰岛素水平增加等。

据介绍, 欧洲食品安全局提出的这个标准还只是一个建议, 将递交给欧盟委员会以及欧盟各成员国负责食品监管的机构和人士。

谷氨酸是一种氨基酸, 西红柿、酱油以及某些奶酪等食品中存在天然形式的谷氨酸盐。在食品工业上, 谷氨酸及谷氨酸盐常被用作食品添加剂, 如味精的主要成分是谷氨酸钠, 谷氨酸钙可以保证食物鲜味的同时降低含盐量。

[信息来源] 厦门 WTO 工作站. 欧盟拟设定谷氨酸盐食品添加剂限额 [EB/OL]. (2017-7-13). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=54854>