

鲢鱼肝脏中高分子 CPIs 提取方法的建立及其鉴定

蒋然然, 钟海霞, 但 静, 陈治光, 李 冉, 蒋光阳, 杨 娟, 李美良, 李树红*

(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 研究了不同浓度的丝氨酸蛋白酶抑制剂(PMSF)、热处理条件及 pH 值对鲢鱼肝脏中高分子半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cysteine proteinase inhibitors, CPIs)提取过程中的作用, 根据其对 CPIs 在 TSK 液相上高分子质量部分的蛋白峰值和比活力(荧光合成肽底物法)的影响, 确定了最佳粗提条件为: 以含 5 mmol/L 的苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 100 mmol/L 的 Tris, 3 mmol/L 的 EDTA(pH 7.5)作为提取缓冲液, 而后在 pH 8.7 碱处理条件下经 90 °C 加热 5 min 后, 再回调到 pH 7.0。用该法制备的鲢鱼肝脏 CPIs 粗提物经制备型 Sephacryl S-200 分子筛层析, 分离得到的高分子活性部分, 进一步经过反相酶谱法鉴定得到一种高相对分子质量的活性 CPI, 推测其可能是与某些蛋白结合形成了复合物, 或是高分子 CPIs 的二聚体形式。

关键词: 鲢鱼肝脏; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 高分子; 提取

中图分类号: S 965.117 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)01-0020-07

Extraction and Characterization of High-Molecular-Weight CPIs from Silver Carp Liver

JIANG Ranran, ZHONG Haixia, DAN Jing, CHEN Zhiguang, LI Ran,
JIANG Guangyang, YANG Juan, LI Meiliang, Li Shuhong*

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In this study, different concentrations of the serine protease inhibitors phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF), different heat treatment and different pH were conducted to treat on the crude extraction of high-molecular-weight cysteine proteinase inhibitors (CPIs) from Silver carp liver, and we investigated their effect on the protein response values and specific activity of CPIs by HPLC with column of TSK-GEL G2000SW. The optimum extraction conditions were as follows: the condition of extraction buffer is containing 5 mmol/L PMSF, 100 mmol/L Tris, and 3 mmol/L EDTA at pH 7.5, followed by pH readjustment to 7.0 after alkali(pH 8.7) treatment at 90 °C for 5 min. Then, the high-molecular-weight active CPI was obtained by chromatography on a Sephacryl S-200 column, and it was identified as a high-molecular-weight CPI by the reverse zymography method. Therefore, it may be conjugated with other protein or a dimeric protein.

Keyword: silver carp liver, cysteine protease inhibitors, high-molecular, extraction

收稿日期: 2015-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101249); 四川省教育厅项目(14ZB0010)。

* 通信作者: 李树红(1975—), 女, 吉林蛟河人, 工学博士, 副教授, 主要从事水产品加工理论与技术研究。E-mail: lish@sicau.edu.cn

引用本文: 蒋然然, 钟海霞, 但静, 等. 鲢鱼肝脏中高分子 CPIs 提取方法的建立及其鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(01): 20-26.

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine proteinase inhibitors, CPIs), 最初被发现于 20 世纪 60 年代^[1], 而后其又被陆续发现广泛分布于生物体各组织中^[2]。根据其氨基酸长度、相对分子质量大小、二硫键的数目以及有无糖基化位点等分子结构特性, 可将半胱氨酸蛋白酶抑制剂划分为 3 个家族, 其中的家族 III 是 CPIs 超家族中蛋白相对分子质量最高的抑制剂, 即 Kininogens (相对分子质量约 $6 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$)^[3]。目前, 仅对哺乳动物和鸟类 CPIs 的研究相对透彻, 其中对哺乳动物 kininogen 的研究发现其不仅是一种半胱氨酸蛋白酶抑制因子, 还是一种多功能蛋白^[4]。kininogen 作为缓激肽的前体在凝血和抗凝血方面发挥作用^[5-6], 同时还参与肿瘤抑制^[7], 免疫调节^[8], 细胞凋亡^[9-10], 抑菌^[11-12]等多种生理和病理过程。目前关于鱼类 kininogen 的研究仅有从大西洋鲑鱼 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 皮^[13], 大西洋鳕鱼 Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) 皮和花狼鲷 Spotted wolffish (*Anarhichas minor*) 皮^[14]中得到了纯化。

研究发现, 哺乳动物 kininogen 主要在肝脏合成, 再进而分泌到血液等各组织, 而鱼类 kininogen 的表达模式与此相似, 其在七星鳗 lampreys (*Lampetra japonica*)^[15] 肝脏中的 mRNA 表达水平最高, 并且从鱼类肝脏中也检测到了 CPIs 活性^[16-17], 但目前尚未见从鱼类肝脏中具体纯化 kininogen 方法的相关报道。鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 作为中国四大家鱼之一, 其资源丰富^[18], 且在加工过程中产生大量废弃物, 如鱼皮、内脏等, 鉴于对鱼类多功能蛋白 kininogen 的研究十分有限, 作者选择 kininogen 含量丰富的鲢鱼肝脏为材料来源, 通过对其中高分子 CPIs 初步提取条件的系统筛选, 建立了最佳的粗提方法, 并通过分子筛层析和反相酶谱进一步验证, 以便为后续鲢鱼肝脏中 kininogen 的精细分离纯化和深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

取鲢鱼的新鲜肝脏组织, 用 4 ℃ 蒸馏水清洗除去表面血污, -80 ℃ 冻存, 用前 4 ℃ 解冻。

蓝色葡聚糖-2000 (2×10^5)、r-球蛋白 (1.5×10^5)、牛血清白蛋白 (6.6×10^5)、胃蛋白酶原 (4.3×10^4)、胰蛋白酶 (2.33×10^4)、细胞色素 C (1.3×10^4)、乳链菌肽 (3.35×10^3)、TYR-GLY-GLY-PHE-MET ($1.046 \times$

10^3)、ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE (573)、宽相对分子质量蛋白标品 ($6.5 \times 10^3 \sim 200 \times 10^3$): 日本 Takara 公司产品; 蛋白质浓度测试试剂盒: 南京建成生物工程研究所产品; 木瓜蛋白酶 (Papain)、荧光合成肽 (Z-Phe-Arg-MCA)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、明胶、过硫酸铵 (Aps)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、甲叉双丙烯酰胺 (Bis)、丙烯酰胺 (Acr) 牛血清白蛋白 (BSA): 美国 Sigma 公司产品; 分子筛 Sephacryl S-200: 美国 GE 公司产品。

1.2 仪器和设备

大容量高速冷冻离心机、全波长荧光/比色扫描读数仪: 美国 Thermo Electron 公司产品; Scientz-IID 超声波细胞粉碎机: 苏州江东精密仪器有限公司产品; TSK G2000 SWXL 凝胶过滤高效液相柱: 日本 TOSOH 公司产品; LC-2010C HT 高效液相色谱仪: 日本 SHIMADZU 产品; PowerPac 3000 电泳电源、Mini Protein 电泳槽、Biologic DouFlow 全自动中高压层析系统: 美国 Bio-Rad 公司产品; Ultra-8050 超滤杯: 美国 Millipore 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 鲢鱼肝脏中高分子 CPIs 的粗提取条件筛选

1) CPIs 粗提取缓冲液中丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 浓度筛选 4 等份鲢鱼肝脏 4 ℃ 解冻后于冰上用剪刀充分剪碎, 分别加入 4 倍体积的含 0 mmol/L (对照组)、1、3、5 mmol/L PMSF 的提取缓冲液 (100 mmol/L 的 Tris, 3 mmol/L 的 EDTA 的提取液, pH 7.5) 超声破碎 (功率 30 %, 4 ℃, 按工作 1 s 停 1 s 的时间程序超声至肝脏破碎均匀), 4 ℃ 离心 ($10\,000\text{ g}$, 20 min), 取上清液, 经 30×10^3 超滤膜浓缩 10 倍, 用于 TSK 凝胶过滤高效液相分析并回收高分子部分 (保留时间 $RT \leq 17\text{ min}$) 用于 CPIs 抑制活性测定。

2) CPIs 粗提取过程中热处理温度的筛选 3 等份鲢鱼肝脏, 按筛选的适宜 PMSF 浓度的提取缓冲液进行提取, 所得上清液用 4 层纱布过滤, 分为 3 组, 滤液分别经 70 ℃ (15 min)、80 ℃ (10 min)、90 ℃ (5 min) 水浴加热处理后 4 ℃ 离心 ($10\,000\text{ g}$, 20 min) 取上清液, 经 3.0×10^4 超滤膜浓缩 10 倍, 用于 TSK 凝胶过滤高效液相分析, 并回收高分子部分 (保留时间 $RT \leq 17\text{ min}$) 用于 CPIs 抑制活性测定。

3) CPIs 粗提取过程中酸碱处理条件的筛选 鲢鱼肝脏, 先按筛选的含适宜 PMSF 浓度的缓冲液

提取的鲢鱼肝脏 CPIs 粗提液,再经 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 8.7,然后经确定的适宜条件进行热处理,最后用 1 mol/L 的 HCl 回调 pH 至 7.0,经 4 °C 离心(10 000 g, 20 min)后取上清液,经 3.0×10^4 超滤膜浓缩 10 倍,用于 TSK 凝胶过滤高效液相分析,并回收高分子部分(保留时间 $RT \leq 17$ min)用于 CPIs 抑制活性的测定。

1.3.2 蛋白质浓度的测定 由 Bradford^[19]方法,按照南京建成生物工程研究所的蛋白质浓度试剂盒相关说明方法来测定提取液的蛋白质浓度。

1.3.3 CPIs 抑制活性的测定 以 Anastasi^[20]和 Barrett^[21]的方法作为参考,利用荧光合成肽底物法监测各条件下高分子 CPIs 收集液对木瓜蛋白酶的抑制活性,激发和发射波长分别为 360 nm 和 440 nm。把 40 °C、pH 6.8 的反应条件下,底物在 1 min 内被水解并释放 1 nmol 的 AMC 产物的酶活性量(1 nmol AMC/min)定义为 1 个酶活单位,相应的能够抑制 1 个酶活单位的活性被定义为一个抑制活性单位。

1.3.4 CPIs 粗提液的凝胶高效液相鉴定分析 先用缓冲液 A (含质量分数 0.05 % NaN_3 和 0.1 mol/L Na_2SO_4 的 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 6.7) 平衡 TSK 凝胶过滤高效液相柱 (7.8 mm $\times$ 30 cm, 5 μm)。将各条件下鲢鱼肝脏 CPIs 的粗提液用截留相对分子质量为 3×10^3 的透析袋在超纯水中透析除盐、经 0.22 μm 的微滤膜微滤后上样 100 μL , 之后以 0.5 mL/min 的流速进行洗脱并回收保留时间 $RT \leq 17$ min 的部分。先用蓝葡聚糖-2000 测定得到空体积 V_0 ,再分别测得标准蛋白 γ -球蛋白、牛血清白蛋白、胃蛋白酶原、胰蛋白酶、细胞色素 C、乳链菌肽、TYR-GLY-GLY-PHE-MET 和 ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE 在相同条件下的洗脱体积 V_e 。根据标准蛋白分子质量对数和 V_e 与 V_0 的比值求得标准曲线,最后由该标准曲线分析鲢鱼肝脏中 CPIs 相对分子质量的分布情况。

1.3.5 Sephacryl S-200 分子筛层析 根据 1.3.1 最终筛选确定的适宜方法,大量制备的鲢鱼肝脏 CPIs 粗提取液,经过浓缩(截留相对分子质量 3.0×10^4)、微滤(0.22 μm)后,由制备型 Sephacryl S-200 分子筛(2.5 cm $\times$ 90 cm)经行分离。以 0.44 mL/min 的流速,用含磷酸盐缓冲液(含 0.2 mol/L 的 NaCl, pH 6.0)洗脱,收集液 6.0 mL 每管。根据测定的每管收

集液中 CPIs 的抑制活性,得到其活性部分,经浓缩(截留相对分子质量 3.0×10^4 的超滤膜)后用于后续鉴定分析。

1.3.6 高分子 CPIs 的 SDS-PAGE 及明胶底物-SDS-反相酶谱鉴定 根据电泳试剂盒中电泳分离胶和浓缩胶的配制方法制备 12 g/dL 的分离胶,之后根据样品浓度上适宜量的样品,使之不超过每个孔道的最大上样量 20 μL ,电泳结束后经考马斯亮蓝 R-250 染色过夜,之后用脱色液脱色至背景颜色消失,条带清晰。之后根据适当改进的 Li 等^[22]的方法做明胶底物-SDS-反相酶谱鉴定,并以比样品浓度稍高的 BSA 做其明胶底物-SDS-反相酶谱鉴定的对照,也是在相同条件下先经行普通 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将凝胶复性,复性后的凝胶用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(含 0.4 mg/mL 的木瓜蛋白酶, pH 7.0)在 4 °C 的条件下反应 1 h,随后用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(含质量分数 1%明胶, pH 7.0)在 37 °C 的条件下反应 12 h,之后进行染色、脱色。

2 结果与分析

2.1 鲢鱼肝脏中 CPIs 的粗提取条件筛选结果

2.1.1 提取液中 PMSF 浓度筛选结果 CPIs 作为半胱氨酸蛋白酶的可逆抑制因子,不具有抑制丝氨酸蛋白酶的活性,同时考虑到鲢鱼肝脏腺中含有丰富的丝氨酸蛋白酶活性^[23-24],因此,有必要在提取缓冲液中加入丝氨酸蛋白酶的不可逆抑制剂 PMSF。当以含不同浓度 PMSF 提取缓冲液获得的鲢鱼肝脏 CPIs 粗提物进行 TSK 液相分析时,发现提取液中不添加 PMSF 的对照组(如图 1 所示)中的蛋白发生了明显的降解,随着提取液中 PMSF 浓度提高,水解现象被逐步抑制(如图 2、图 3 所示),特别是可能含有 kininogen 的高相对分子质量部分(TSK 上保留时间 $RT \leq 17$ min,对应相对分子质量 $\geq 5.0 \times 10^4$,如横杆所示)的蛋白峰响应值,含不同浓度 PMSF 的实验组均明显高于对照组,且尤以加 5 mmol/L PMSF 组最高(加 1 mmol/L PMSF 组的 TSK 液相分析图省略)。同时由各 PMSF 浓度下 CPIs 粗提取液的 TSK 高分子($RT \leq 17$ min)回收部分的抑制活性测定结果(表 1)可知,5 mmol/L PMSF 组抑制活性的总活和比活均最高。结合 TSK 液相分析和 CPIs 抑制活性分析结果,说明提取液中添加 5 mmol/L PMSF 能抑制部分鲢鱼肝脏中丝氨酸蛋白酶对 CPIs 的降解,这对于

尽可能最大限度地回收鲢鱼肝脏中高分子 CPIs 而言非常重要,因此选取提取过程中加入 5 mmol/L 的 PMSF 作为优化条件。

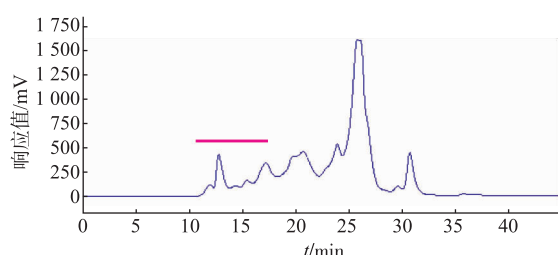


图 1 未加 PMSF 的鲢鱼肝脏 CPIs 的凝胶高效液相色谱分离
Fig. 1 Separation of Silver carp liver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW without PMSF

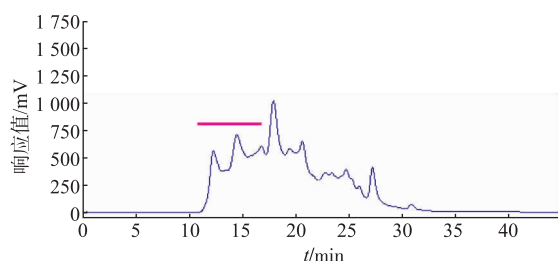


图 2 加入 3 mmol/L PMSF 的鲢鱼肝脏 CPIs 的凝胶高效液相色谱分离
Fig. 2 Separation of Silver carp liver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW with 3 mmol/L PMSF

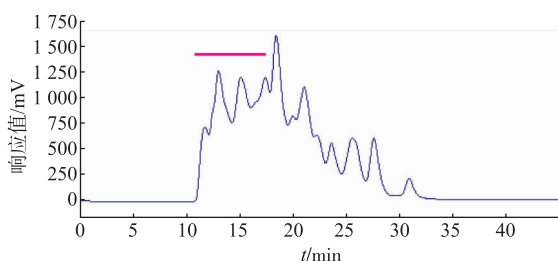


图 3 加入 5 mmol/L PMSF 的鲢鱼肝脏 CPIs 的凝胶高效液相色谱分离
Fig. 3 Separation of Silver carp liver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW with 5 mmol/L PMSF

2.1.2 CPIs 粗提取过程中热处理温度的筛选 由于 CPIs 具有良好的热稳定性^[3],同时一些热稳定的丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶)在 50 ℃加热的情况下仍然保持活性^[24],因此在提取过程中设计对样品进行热处理。以含 5 mmol/L PMSF 的缓冲液提取得到的鲢鱼肝脏中 CPIs 粗提液上清,分别经过 70 ℃加热 15 min、80 ℃加热 10 min 和 90 ℃加热 5 min 后,再

表 1 不同 PMSF 浓度条件下鲢鱼肝脏高分子 CPIs 粗提液的抑制活性分析

Table 1 Inhibitory activities of CPIs of the crude extracts from Silver carp liver with Z-Phe-Arg-MCA Under the condition of different PMSF concentration

提取液中 PMSF 浓度/(mmol/L)	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	总活性/mU	比活性/(U/mg)
0	0.61	1 040	1.70
1	0.82	1 525	1.86
3	1.52	2 888	1.90
5	2.67	6 061	2.27

进行 TSK 凝胶高效液相分析(图 4、图 5、图 6),由图可知,加热除去了鲢鱼肝脏粗提液中大量的热不稳定蛋白成分,特别是低相对分子质量部分(TSK 上保留时间 $RT > 17$ min,对应相对分子质量 $< 5.0 \times 10^4$)的杂蛋白,其中 90 ℃处理 5 min 组降低的最为明显,这十分有利于目的蛋白的纯化。同时 70 ℃加热 15 min 和 80 ℃加热 10 min 所得 CPIs 粗提液的高分子部分(TSK 上保留时间 $RT \leq 17$ min,对应相对分子质量 $\geq 5.0 \times 10^4$,如横杆所示)的蛋白峰响应值略高于 90 ℃处理 5 min 组,但从该部分的抑制活性测定结果(表 2)可知,90 ℃处理 5 min 组抑制活性的蛋白浓度最低,抑制比活性最高,对于目的蛋白纯化而言,是非常有利的。结合 TSK 液相分析和 CPIs 抑制活性分析结果,最终选取 90 ℃,5 min 为提取过程中适宜的热处理条件。

3 组总活性相对于第一步骤含 5 mmol/L PMSF 粗提液的总活(表 1)都有所下降,说明加热过程在除去鲢鱼肝脏粗提液中杂蛋白的同时,一定程度上也会损失高分子的 CPIs,但是三者相较而言,90 ℃加热条件下鲢鱼肝脏的高分子部分总活性损失量相对较小,比活最高,这可能主要与高分子 kininogen 比其他杂蛋白耐热性更强有关,该步骤迅速提高了高分子 CPIs 的抑制比活,可作为提取鲢鱼肝脏高分子 CPIs 的关键步骤。作者所在实验室早期对纯化的鲢鱼卵中 kininogen 的热稳定性研究发现,其在 70~80 ℃范围内均十分稳定^[25]。

另一方面,低分子杂蛋白部分,90 ℃加热组下降最快,可能与鲢鱼肝脏中低分子杂蛋白对热的敏感性较强有关。

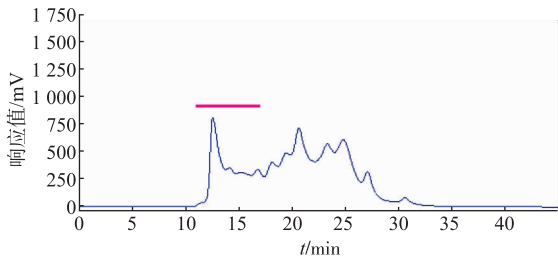


图 4 经 70 °C加热的鲢鱼肝脏 CPIs 的凝胶高效液相色谱分离

Fig. 4 Separation of Silver carpliver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW after heating treatment at 70 °C

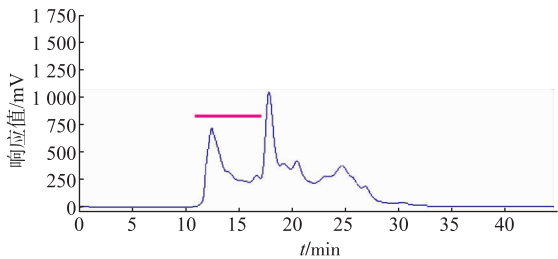


图 5 经 80 °C加热的鲢鱼肝脏 CPIs 的高效液相色谱分离

Fig. 5 Separation of Silver carpliver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW after heating treatment at 80 °C

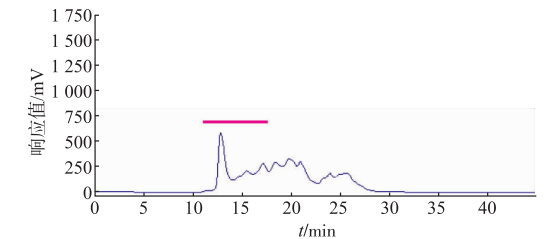


图 6 经 90 °C加热的鲢鱼肝脏 CPIs 的高效液相色谱分离

Fig. 6 Separation of Silver carpliver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW after heating treatment at 90 °C

表 2 不同温度条件下鲢鱼肝脏 CPIs 粗提液的抑制活性分析

Table 2 Inhibitory activities of CPIs of the crude extracts from Silver carpliver with Z-Phe-Arg-MCA Under the condition of different temperatures

热处理条件	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	总活性/mU	比活性/(U/mg)
70 °C加热 15 min	1.12	2 688	2.40
80 °C加热 10 min	1.02	2 662	2.61
90 °C加热 5 min	0.71	2 357	3.32

2.1.3 CPIs 粗提取过程中碱酸处理条件的筛选

由于 CPIs 具有良好的 pH 稳定性^[3],且根据 Matilde

^[27]对 CPI 的提取方法,在其基础上做适当改进,因此在提取过程中设计对样品进行适当的碱酸处理。即经 pH 8.7 碱处理后,90 °C加热 5 min 后,再酸回调到 pH 7.0,所得粗提液进行 TSK 凝胶高效液相分析(图 7),由图可知,CPIs 粗提液中高相对分子质量部分(TSK 上保留时间 $RT \leq 17$ min,对应相对分子质量 $\geq 5.0 \times 10^4$,如横杆所示)的蛋白峰响应值,低于 90 °C加热组(图 6),而 $RT > 17$ min 的小分子杂蛋白部分则与 90 °C加热组(图 6)相似,同时发现 $RT \leq 17$ min 部分的抑制活性比活明显上升(表 3),这可能是由于 90 °C高温和碱酸调节的协同作用下,去除了高分子部分的杂蛋白,而耐酸碱、且热稳定的高分子 CPIs 几乎没有受到影响。由此可以初步判断在 90 °C加热过程结合碱酸调节是可取的处理方式。

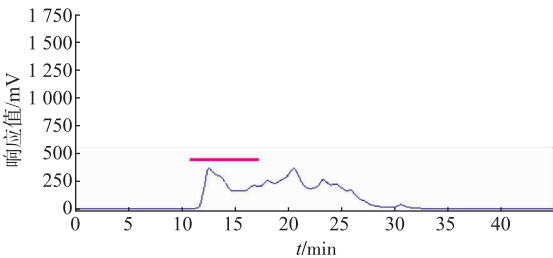


图 7 经酸碱处理后的鲢鱼肝脏 CPIs 的凝胶高效液相色谱分离

Fig. 7 Separation of Silver carpliver CPIs by HPLC of TSK-GEL G2000SW after alkali-acid treatment

表 3 加热结合碱酸处理后鲢鱼肝脏 CPIs 粗提液的抑制活性分析

Table 3 Inhibitory activities of CPIs of the crude extracts from Silver carpliver with Z-Phe-Arg-MCA after alkali-acid treatment

加热结合碱酸处理	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	总活性/mU	比活性/(U/mg)
pH 8.7, 90 °C, 5 min, 回调 pH 7.0	0.51	1 877	3.68

2.2 鲢鱼肝脏粗提 CPIs 的 Sephacryl S-200 分子筛层析

采用确定的最佳提取方案大量制备鲢鱼肝脏中的 CPIs 粗提液,经 3.0×10^3 超滤膜浓缩并透析后,上制备型 Sephacryl S-200 分子筛层析(图 8)。如图所示,在制备型的分子筛层析上,抑制活性峰主要体现在高相对分子质量部分(横杆所示),并且能够与低相对分子质量杂蛋白部分得到较好的区分。低相对分子质量部分的抑制活性峰很低,与作者采用的热处理方式和超滤截留有一定关系。

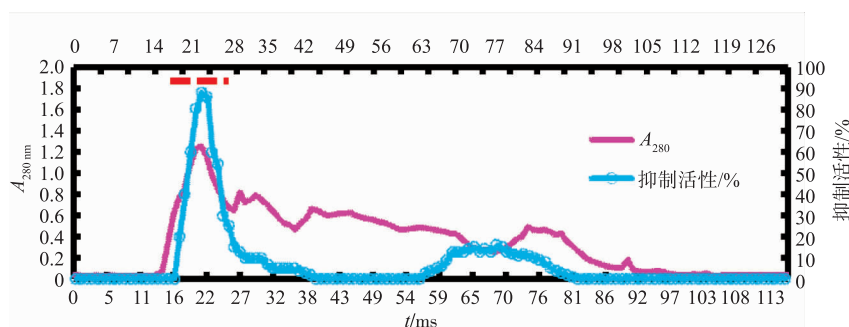


图 8 鲢鱼肝脏 CPIs 的 Sephacryl S-200 分子筛层析

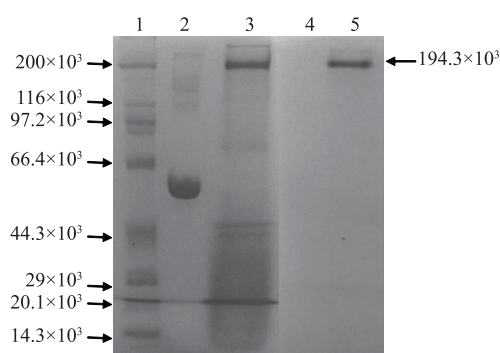
Fig. 8 Sephacryl S-200 chromatography of CPIs from Silver carp liver

2.3 鲢鱼肝脏中高分子 CPIs 的反相酶谱分析

将经过 Sephacryl S-200 分子筛层析后收集到的高分子活性峰的峰尖浓缩后,用反相酶谱法鉴定其抑制条带,图 9 为其鉴定结果,可见经木瓜蛋白酶水解作用,对照蛋白 BSA(泳道 2)和活性峰中的杂蛋白(泳道 3)被完全水解(泳道 4 和泳道 5 所示),而对木瓜蛋白酶具有抑制作用的蛋白质,在电泳上体现为抑制剂条带(泳道 5,箭头所示),经计算该蛋白质相对分子质量约为 1.94×10^5 , 因此推测鲢鱼肝脏中存在一种 1.94×10^5 的高相对分子质量形式的活性 CPI。但是由于属于家族 III 的高分子 CPIs 的相对分子质量约 $6.0 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$, 又有研究表明从鲤鱼卵膜中提取的半胱氨酸蛋白酶抑制剂以共轭键结合的方式与两种卵膜中的蛋白质形成了大于 6.0×10^4 且小于 2.0×10^5 的高分子的复合物。

3 结 语

由于鲢鱼肝脏中丝氨酸蛋白酶活性高,而其中含量丰富的高分子 CPIs 在提取和纯化过程中可能被降解,因此作者对鲢鱼肝脏中 CPIs 粗提条件进行了筛选,从提取缓冲液中 PMSF 浓度、加热处理条件



1: 宽相对分子质量蛋白质标准品 ($14.3 \times 10^3 \sim 200 \times 10^3$); 2: BSA; 3: 鲢鱼肝脏高分子 CPIs 收集液; 4: 反相酶谱处理后的 BSA; 5: 反相酶谱处理后的鲢鱼肝脏高分子 CPIs 收集液

图 9 鲢鱼肝脏高分子 CPIs 的反相酶谱分析

Fig. 9 Gelatin substrate-SDS-reverse zymography of CPIs from Silver carp liver

和酸碱处理 3 个方面来进行优化,最终确定以含 5 mmol/L PMSF 的提取液进行提取,而后经过 pH 8.7 碱处理,90 °C 加热 5 min 后再回调 pH 7.0,为适宜的粗提取方法。经活性测定和反相酶谱鉴定表明,所得到的 CPIs 粗提液中保留了明显的高分子 CPIs 抑制活性。

参考文献:

- [1] FOSSUM K, WHITAKER J R. Ficin and papain inhibitor from chicken egg white [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1968, 125(1): 367-375.
- [2] DUBIN G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors[J]. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62: 653-669.
- [3] OCHIENG J, CHAUDHURI G. Cystatin superfamily[J]. *J Health Care Poor Underserved*, 2010, 21: 51-70.
- [4] LALMANACH G, NNUDIN C, LECAILLE F, et al. Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors[J]. *Biochimie*, 2010, 92(11): 1568-1579.
- [5] ZHOU Liwei, MA Fei, LI Qingwei. Progress in the study on alternative splicing and functions of kininogen genes [J]. *Hereditas*, 2006, 28(12): 1649-1655. (in Chinese)
- [6] BAGLIA F A, BADELINO K O, LI C Q, et al. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI

- activation by thrombin[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007, 282(39):29067.
- [7] LIU Y, PIXLEY R, FUSARO M, et al. Cleaved high-molecular-weight kininogen and its domain 5 inhibit migration and invasion of human prostate cancer cells through the epidermal growth factor receptor pathway[J]. **Oncogene**, 2009, 28(30):2756-2765.
- [8] SCHARFSTEIN J, SCHMITZ V, SVENSJO E, et al. Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation [J]. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2007, 66(2-3):128-136.
- [9] SUN D, MCCRAE K. Endothelial-cell apoptosis induced by cleaved high-molecular-weight kininogen(HKa) is matrix dependent and requires the generation of reactive oxygen species[J]. **Blood**, 2006, 107:4714-4720.
- [10] XU Xiuyue, YANG Wei, WU Bin, et al. Effect of synthetic peptides derived from HKa D5 on proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells[J]. **Journal of China Medical University**, 2008, 37(4):494-499. (in Chinese)
- [11] NORDAHL E A, RYDENGARD V, MORGELIN M, et al. Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005, 280(10):34832-34839.
- [12] SONESSON A, NORDAHL E A, MALMSTEN M, et al. Antifungal activities of peptides derived from domain 5 of high-molecular-weight kininogen[J]. **International Journal of Peptides**, 2011.
- [13] YLONEN A, RINNE A, HERTTUAINEN J, et al. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin contains a novel kininogen and another cysteine proteinase inhibitor[J]. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, 1999, 266(3):1066-1072.
- [14] YLONEN A, HELIN J, BOQWALD J, et al. Purification and characterization of novel kininogens from spotted wolffish and Atlantic cod[J]. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, 2002, 269(11):2639-2646.
- [15] ZHOU L, LIU X, JIN P, et al. Cloning of the kininogen gene from *Lampetra japonica* provides insights into its phylogeny in vertebrates[J]. **Journal of Genetics and Genomics**, 2009, 36(2):109-115.
- [16] MICHIAKI Y, SHIRO K. A comparison of cystatin activity in the various tissues of chum salmon *Oncorhynchus keta* between feeding and spawning migrations[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 1991, 100(3):749-751.
- [17] LI Shuhong, REN Yangyang, LI Yanfang, et al. Comparative study on three electrophoresis methods for identifying silver carp CPIs[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(21):56-64. (in Chinese)
- [18] ZHANG Min, ZHANG Jun. A research review of low value freshwater fishes processing and their discards utilization [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006(5):115-120. (in Chinese)
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1-2):248-254.
- [20] ANASTASI A, BROWN M A, KEMBHAVI A A, et al. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum[J]. **Biochemical Journal**, 1983, 211(1):129-138.
- [21] BARRETT A J, KIRSCHKE H. Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L [J]. **Methods in Enzymology**, 1981, 80(41):535-561.
- [22] LI D K, LIN H, KIM S M. Purification and characterization of a cysteine protease inhibitor from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) plasma[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, 56(1):106-111.
- [23] CAO Minjie, LI Yan, WENG Ling, et al. Study on myofibril-bound serine proteinase in silver carp [J]. **Food Science**, 2005(1):91-94. (in Chinese)
- [24] UAN Shan, TANG Chengzheng, et al. Advances in researches of main endogenous proteases in surimi [J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2014(3):52-61. (in Chinese)
- [25] 刘玲. 鲢鱼卵中高分子 CPIs 的纯化鉴定及其对 Ishikawa 细胞影响的初探研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2014.