

JJJ 道学訳 JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

DOI: 10.11964/jfc.20220313394



# 大黄鱼肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶的克隆、表达及性质

刘海燕,杨汝晴,陈玉磊,张凌晶,
 孙乐常,刘光明,曹敏杰\*
 (集美大学海洋食品与生物工程学院,福建厦门 361021)

摘要:为探究大黄鱼肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶 (MBSP) 的性质,实验采用生物信息学方法对大黄鱼 MBSP 进行基因检索与筛选,通过分子克隆得到大黄鱼 MBSP 编码区全长 cDNA 并构建毕赤酵母表达系统得到重组蛋白质 (Lc-rMBSP),分析 Lc-rMBSP 的酶学性质 和二级结构并通过同源建模分析 Lc-MBSP 的三级结构。结果显示,大黄鱼肌原纤维蛋白 中存在 MBSP,在55°C 下活性最高。大黄鱼基因组中注释为类胰蛋白酶的基因有 16条,对这些基因与淡水鱼 MBSP 进行系统进化树分析和多序列比对,得到同源性较高的基因序列 (*Lc-MBSP*)。*Lc-MBSP* 编码区全长 735 bp,共编码 244 个氨基酸残基。通过毕赤酵母重 组表达,分离纯化得到分子量约 28 ku 的重组蛋白质 Lc-rMBSP。表达蛋白的最适温度和 pH 分别为 50°C 和 8.0。圆二色谱分析表明,温度对 Lc-rMBSP 二级结构具有较大的影响。 Lc-rMBSP 在较宽的温度范围内 (40~60°C)对 MHC 具有较高的水解活性。Lc-rMBSP 的最 适底物为 Boc-Leu-Lys-Arg-MCA,并且特异性切割羧基侧的精氨酸残基,而不分解赖氨酸 残基。通过同源建模得到 Lc-MBSP 的三维结构,催化三联体由保守的 His-61、Asp-105 和 Ser-198 构成,其底物结合口袋 (Ser-192、Gly-215 和 Ser-225) 与类胰蛋白酶的略有不同,这种差异可能是导致 Lc-rMBSP 与其他胰蛋白酶酶学性质不同的主要原因。本研究可为海 水鱼 MBSP 的研究提供理论参考。

关键词:大黄鱼; 肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶; 基因克隆; 性质分析; 圆二色谱; 同源 建模

中图分类号:Q785;TS254.4

丝氨酸蛋白酶在生物有机体内发挥着重要且 广泛的生理作用<sup>[1]</sup>。肌原纤维结合型丝氨酸蛋白 酶 (myofibril-bound serine proteinase, MBSP)是一 种与肌原纤维蛋白紧密结合的丝氨酸蛋白酶,其 酶学性质与胰蛋白酶相似,可以特异性水解蛋白 质中的赖氨酸和精氨酸残基的羧基端肽键,属于 胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,但其热稳定性要高于 哺乳动物胰蛋白酶<sup>[2]</sup>。MBSP 是在研究鱼糜制品发

#### 文献标志码:A

生凝胶劣化的过程中被发现<sup>[3]</sup>,最适温度为 50~ 55 °C,该酶可有效降解肌原纤维中的肌球蛋白重 链 (myosin heavy chain, MHC),对α-辅肌动蛋白、 肌动蛋白和原肌球蛋白也有不同程度的降解作 用<sup>[4]</sup>。因此,MBSP 也被认为是引起鱼糜凝胶劣化 的主要内源性蛋白酶之一。

研究发现, MBSP 普遍存在于动物肌肉组织中, 可能在肌原纤维蛋白的初始分解阶段和代谢

资助项目:国家重点研发计划 (2018YFD0901004);国家自然科学基金 (31772049)

第一作者:刘海燕(照片),从事食品生物技术研究, E-mail: 15216150335@163.com

通信作者: 曹敏杰, 从事水产加工、蛋白质化学研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn



收稿日期: 2022-03-22 修回日期: 2022-04-08

过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。1997年,Osatomi等<sup>[6]</sup>通 过高盐条件下酸处理鲤(*Cyprinus carpio*)肌肉,使 肌原纤维变性解离,首次纯化了天然 MBSP。采 用类似方法,目前已经在多种淡水鱼<sup>[7-11]</sup>、海水 鱼<sup>[12-14]</sup>,以及小鼠(*Mus musculus*)<sup>[15]</sup>和鸵鸟(*Struthio camelus*)<sup>[16]</sup>中发现 MBSP。鲤、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鲫(*Carassius auratus*)3种 淡水鱼 MBSP 的 cDNA 全长序列被成功克隆<sup>[10, 17]</sup>。 利用毕赤酵母高效表达的鲫 MBSP 在酶学性质上 与天然鲫 MBSP 相似<sup>[18]</sup>。

在海水鱼方面,Shimizu等<sup>[19]</sup>发现,经过多次漂洗的黄姑鱼(Nibea mitsukurii)肌原纤维蛋白,在55°C 孵育30 min 依然可以观察到其降解,而这种降解可被丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制,从而证实了MBSP的存在。尽管海水鱼MBSP的酶活性高,与淡水鱼MBSP相比,海水鱼肌肉中MBSP的含量更低,且蛋白水平分离纯化难度大。目前,仅报道了两种狗母鱼(Saurida wanieso, S. undosquamis)<sup>[12-13]</sup>、白姑鱼(Argyrosomus argentatus)MBSP<sup>[14]</sup>的分离,但对它们的基因序列尚未解析。

大黄鱼 (Larimichthys crocea) 是我国重要的海 洋经济养殖鱼类,深受消费者青睐。2020年,我 国海水养殖鱼类中,大黄鱼的产量居首位<sup>[20]</sup>。本 研究拟以大黄鱼为对象,利用生物信息学技术获 得 MBSP 的基因序列,通过体外重组表达获得具 有生物活性的蛋白酶,并对其酶学性质和结构进 行分析,旨在为海水鱼 MBSP 的研究提供一定的 理论参考。

1 材料与方法

#### 1.1 实验材料与试剂

新鲜大黄鱼,平均体质量约 500 g,购于福 建省厦门市夏商国际水产交易中心。

Tris (青岛福林生物化学公司,中国); SDS、 丙烯酰胺 (Bio-Rad,美国); 考马斯亮蓝 R-250、 过硫酸铵 (Sanland-chem,美国); 标准蛋白 Marker (TaKaRa,日本); PMSF、EDTA (Sigma,美国); E-64 (Amresco,美国); pepstatin (上海麦克林生化 科技有限公司,中国); 克隆载体 pMD19-T (Simple)、限制性内切酶 *Eco*R I、*Not* I和 *Sal* I、 T<sub>4</sub> 连接酶、Primer STAR Max DNA Polymerase (宝 生物工程有限公司,中国); 2×Pro *Taq* Master Mix (with dye)、*Evo M-MLV* RT 试剂盒和 DNA 凝胶回 收试剂盒 (厦门瑞真生物技术有限公司,中国); 总 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒 (上海天根 生化科技有限公司,中国); Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 等荧光底物 (Peptide Institute,日本);绿豆胰蛋白 酶抑制剂 (MBTI) 和大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI)由 本实验室制备;巴斯德毕赤酵母宿主菌株 GS115、 巴斯德毕赤酵母表达载体 pPIC9K 由自然资源部 第三海洋研究所金敏老师提供。其余分析纯试剂 购自国药集团化学试剂有限公司。

按照毕赤酵母表达试剂盒 (Invitrogen) 的说明 制备 YPD 液体培养基、甘油缓冲液培养基 (BMGY) 和甲醇缓冲液培养基 (BMMY)。

# 1.2 实验方法

肌原纤维蛋白的制备 参考 Cao 等<sup>[21]</sup>的 方法并稍做修改,取大黄鱼肌肉,切碎后加入4 倍体积预冷的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液, 组织捣碎后离心 (4°C, 8000×g, 20 min)取沉淀 上层,再重复用上述缓冲液清洗 3次。最后一次 得到的沉淀用预冷的含 0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液溶解,即为肌原 纤维蛋白。

SDS-PAGE 参考 Laemmli<sup>[22]</sup>的方法进行, 浓缩胶浓度为 5%,分离胶制备 10% 和 15% 两种 浓度。将样品与 4×SDS 缓冲液以 4 : 1 的比例混 合,在 95 ℃下加热 5 min,上样于 SDS-PAGE, 在恒定电压 120 V下进行电泳,结束后将凝胶浸 泡于考马斯亮蓝 R-250 染色液中进行染色,再使 用脱色液 (甲醇:乙酸:水=30:10:60, *V/V/V*) 脱色,直至条带清晰。

不同温度下肌原纤维蛋白的降解 将肌 原纤维蛋白用含 0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液溶解稀释成约 2 mg/mL,在不 同温度 (30、40、45、50、55、60 和 70 ℃)下孵 育 1 h,结束后进行 SDS-PAGE,分析蛋白的降解 情况。

抑制剂对肌原纤维蛋白自身降解的抑制作 用 将肌原纤维蛋白溶液与不同类型的蛋白酶 抑制剂混合,室温下孵育 30 min 后,在 55 ℃下 孵育 2 h,再进行 SDS-PAGE,分析抑制剂对肌原 纤维蛋白降解的抑制情况。蛋白酶抑制剂的种类 和终浓度为: E-64,0.1 mg/mL; pepstatin,0.01 mg/mL; EDTA, 10 mmol/L; PMSF, 5 mmol/L; MBTI, 1 mg/mL; STI, 1 mg/mL。 总 RNA 的提取和 RT-PCR 取大黄鱼肌 肉剪碎,在液氮中研磨,取约 50 mg 碾碎的肌肉 加入 1 mL Trizol 试剂进行组织匀浆,根据总 RNA 提取试剂盒的说明提取 RNA,再使用 *Evo M-MLV* RT 试剂盒反转录成 cDNA,作为基因序列扩 增的模板。

大黄鱼基因组的信息检索 MBSP 属于类 胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶家族。因此,在 NCBI 上对大黄鱼基因库中注释为类胰蛋白酶的基因进 行检索和筛选,并与淡水鱼鲢和鲫 MBSP,以及 犀角金线鲅 (*Sinocyclocheilus rhinocerous*) 类胰蛋 白酶序列进行生物进化树分析和多序列比对,再 与海水鱼狗母鱼 MBSP 的 N-端氨基酸序列进行同 源性比对,最终筛选出与 MBSP 序列同源性最高 的基因序列 *Lc-MBSP*。

*Lc-MBSP* 基因的克隆与毕赤酵母表达载体的构建 根据 *Lc-MBSP* 基因序列设计特异性引物,以大黄鱼 cDNA 为模板对 *Lc-MBSP* 基因进行 扩增。使用 T<sub>4</sub> 连接酶将扩增后的目的基因与克隆 载体 pMD19-T (Simple) 相连,连接成功后,使用 限制性内切酶 *Eco*R I和 *Not* I 对构建好的克隆载 体 (pMD19-T-*Lc-MBSP*) 以及酵母表达载体 pPIC9K 进行双酶切,以获得带有相同酶切位点黏性末端 的片段,再使用 T<sub>4</sub> 连接酶将酶切后的目的基因与 酵母表达载体进行连接,构建酵母表达载体 (pPIC9K-*Lc-MBSP*)。

Lc-MBSP 的毕赤酵母表达 参考李婷<sup>[23]</sup>的方法制备毕赤酵母感受态细胞。构建好的酵母表达载体 (pPIC9K-*Lc-MBSP*)经限制性内切酶 *Sal* I 线性化后,电转化至毕赤酵母感受态细胞 (*P. pastoris* GS115)中,经菌落 PCR 验证和测序成 功后,挑取阳性转化子 (*P. pastoris* GS115/pPIC9K-*Lc-MBSP*)于 YPD 液体培养基中活化,并以 1% 的 比例接种于 BMGY 液体培养基中进行扩大培养。 待菌液 OD<sub>600</sub> 达到 3.0~6.0 时,室温下 800×g 离心 5 min,弃上清液。菌体沉淀用少量 BMMY 培养 基重悬后,转入 BMMY 液体培养基中进行诱导表 达,诱导期间每隔 24 h补加 1次 1% 甲醇,培养 温度均为 30 °C。诱导 5 d 后,将菌液在 4 °C下, 15 000×g 离心 30 min,取发酵上清液。

Lc-rMBSP 的纯化与质谱鉴定 将发酵上 清液进行 30%~60% 饱和度硫酸铵盐析,所得沉淀 用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 透析液重悬并在 4°C 下进行透析。透析后的样品过 0.22 μm 滤膜后, 上样于 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析柱,充分 流洗后,用 0~0.5 mol/L 的 NaCl线性洗脱,收集 酶活性较高的部分进行 SDS-PAGE (15%分离胶, 上样量约 1 μg 蛋白质)分析,得到纯化的重组蛋 白 (Lc-rMBSP)。将电泳分离后的目的条带切下, 使用胰蛋白酶酶解,酶解后的样品上样于高效液 相色谱进行肽段分离,再作 LC/MS/MS 质谱鉴定。 该项工作由上海中科新生命生物科技有限公司完成。

Lc-rMBSP 酶活性的测定 将 50 µL LcrMBSP 与 900 µL 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的缓冲液混合,加入 50 µL 浓度为 10 µmol/L 的荧 光底物 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (BFSR-MCA), 37 °C 下孵育 30 min 后,立即加入 1.5 mL 终止液 (甲醇: 异丙醇:水=35:30:35,V/V/V)终止反应。使用 荧光分光光度计在激发波长  $E_x$ =380 nm,发射波 长  $E_m$ =450 nm 下测定产物 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 的荧光强度。

底物特异性分析 将 50 μL Lc-rMBSP 与 900 μL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液混合, 再加入 50 μL 浓度为 10 μmol/L 的不同荧光底物, 37 ℃下孵育 30 min 后,立即加入 1.5 mL 终止液 终止反应,测量其相对酶活性(以荧光底物 BFSR-MCA 所测得的酶活性为 100%)。

温度和 pH 对 Lc-rMBSP 活性的影响 将 Lc-rMBSP 与荧光底物 BFSR-MCA 混合后,置于 不同温度 (20、30、40、45、50、55、60、70°C) 下进行酶促反应,确定其最适温度。为测定酶的 热稳定性,将 50 µL Lc-rMBSP 与 900 µL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液混合后分别在不同温度下 预先孵育 30 min,在冰水中冷却至室温后,在 50°C 下测量其剩余酶活性。将 Lc-rMBSP 与不同 pH 值 (5.0~11.0)的缓冲液混合,加入底物后在 50°C 下孵育 30 min,确定其最适 pH。为测定酶 的 pH 稳定性,将 Lc-rMBSP 在不同 pH 缓冲液下 预先孵育 30 min,取 50 µL 样品置于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中,在 50°C 下测量其剩 余酶活性。

Lc-rMBSP 对肌原纤维蛋白的降解作用 取 90 μL 浓度约为 2 mg/mL 的肌原纤维蛋白溶液, 加入 10 μL Lc-rMBSP (0.02 U), 混合均匀后,分 别置于不同温度下(40、45、50、55、60、65 和 70°C) 孵育 1 h, 以未加 Lc-rMBSP 并在 70°C 加热 1 h 的样品作为加热对照组。反应结束后,加入 25 μL 4×SDS 缓冲液,95°C 下加热 5 min 后进行 SDS- PAGE,分析肌原纤维蛋白降解情况。

圆二色谱分析 为探究温度对 Lc-rMBSP 二级结构的影响,参考杨汝晴等<sup>[24]</sup>的实验方法, 采用圆二色谱法进行分析,扫描波长设置为 190~ 260 nm。将纯化后的 Lc-rMBSP 浓度调至 0.2 mg/mL,以1 ℃/min 的速率从 25 ℃升至 95 ℃, 再从 95 ℃降至 25 ℃。数据使用 Origin 2021 软件 对 202 nm 处 ( $\theta$  202 nm)的温度变化进行拟合,得 到 Lc-rMBSP 的热变性温度  $T_m$  值。

三级结构分析 利用同源建模技术对 Lc-MBSP 的三级结构进行预测。在 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/) 网站上寻找模板进行 建模,比较序列同源性,结合 GMQE 评分,选择 大西洋鲑 (Salmo salar) 胰蛋白酶晶体结构 (PDB ID: 1A0J) 为模板,将建模好的 PDB 文件在 PyMol 软件中进行分析。

2 结果

#### 2.1 大黄鱼肌原纤维蛋白的自身降解

为了验证大黄鱼肌原纤维蛋白的自身降解情况,将肌原纤维蛋白 (pH 8.0)在不同温度 (30、40、45、50、55、60 和 70 °C)下孵育 1 h。与未孵育的对照相比,在 50~60 °C 温度范围内,肌球蛋白 重链 (MHC)和原肌球蛋白 (tropomyosin, TM)降 解明显,但在 30、40 和 70 °C 下未发生明显降解 (图 1)。该结果表明,在大黄鱼肌原纤维中存在参 与 MHC 和 TM 降解的内源性蛋白酶。



# 图 1 不同温度下大黄鱼肌原纤维蛋白的自身降解 M.标准蛋白, 1.未孵育对照, 2.30 ℃, 3.40 ℃, 4.45 ℃, 5.50 ℃, 6.55 ℃, 7.60 ℃, 8.70 ℃

# Fig. 1 Self-degradation of myofibrillar proteins in *L. crocea* at different temperatures

M. protein marker, 1. non-incubated control, 2. 30 °C, 3. 40 °C, 4. 45 °C, 5. 50 °C, 6. 55 °C, 7. 60 °C, 8. 70 °C

# 2 直 / 190~ 制剂,观察它们对肌原纤维降解的抑制情况。丝 度调至 0.2 氨酸蛋白酶抑制剂 MBTI、STI和 PMSF 可以抑制

抑制作用

氨酸蛋白酶抑制剂 MB11、S11和 PMSF 可以抑制
MHC和 TM 的降解,而天冬氨酸蛋白酶抑制剂
pepstatin、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 和金属蛋
白酶抑制剂 EDTA 则没有表现出抑制效果(图 2),
说明导致肌原纤维蛋白自身降解的内源性蛋白酶
是一种丝氨酸蛋白酶。由于肌原纤维蛋白制备过
程中已多次漂洗,水溶性蛋白的残留量极少,因
此,大黄鱼肌原纤维中存在 MBSP 并参与了肌原
纤维蛋白的降解。

2.2 不同蛋白酶抑制剂对肌原纤维蛋白降解的

在肌原纤维蛋白中加入不同类型的蛋白酶抑

# 2.3 大黄鱼基因组信息检索

从 NCBI 大黄鱼基因组中检索到 16 条类胰蛋 白酶基因序列 (表 1)。运用 BLAST 序列比对检索 工具发现犀角金线鲃 trypsin-3-like 氨基酸序列与 鲢和鲫 MBSP 序列同源性高达 75.62%,因此也将 其与检索到的大黄鱼类胰蛋白酶序列进行系统进 化树分析和多序列比对。在大黄鱼的 trypsin-like 蛋白序列中,运用进化树最大简约法的分析结果 显示,序列号 2、14、3、15、4、1 和 16 与鲢和 鲫 MBSP 以及犀角金线鲅 trypsin-3-like 属于同一 分支 (图 3-a);使用 UPGMA 方法分析蛋白质序列 之间的亲缘性结果如图 3-b 所示,序列号 16、15、



# 图 2 不同蛋白酶抑制剂对肌原纤维蛋白在 55 °C 下降解的抑制作用

M. 标准蛋白, 1. 未孵育对照, 2. 孵育对照 (55 °C, 2 h), 3. pepstatin, 4. E-64, 5. MBTI, 6. STI, 7. EDTA, 8. PMSF

## Fig. 2 Inhibitory effect of proteinase inhibitors on the degradation of myofibrillar proteins at 55 °C

M. protein marker, 1. non-incubated control, 2. incubated control (55 °C, 2 h), 3. pepstatin, 4. E-64, 5. MBTI, 6. STI, 7. EDTA, 8. PMSF

# 表1 大黄鱼基因组的类胰蛋白酶序列

. . . . . . .

1 ad. 1	Protein sequences of trypsin-like
	proteases from <i>L. crocea</i>

序列号 series number	蛋白质编号 (NCBI) protein ID (NCBI)	蛋白质注释 protein annotation	长度/aa length
1	XP_010739969.2	trypsin-3	244
2	XP_010739698.1	trypsin	249
3	XP_010740568.1	trypsin-2	244
4	XP_010745891.2	trypsin	247
5	XP_010751696.2	anionic trypsin-2	259
6	XP_027144095.1	trypsin-3 isoform X1	283
7	XP_027144097.1	trypsin-3 isoform X3	253
8	XP_027144096.1	trypsin-3 isoform X2	266
9	XP_010753800.2	trypsin-3	250
10	XP_019127934.2	trypsin-3 isoform X1	257
11	XP_027146436.1	trypsin-3 isoform X2	257
12	XP_027134834.1	trypsin	265
13	XP_010753366.3	trypsin	315
14	XP_019122730.1	anionic trypsin-1	247
15	XP_027142150.1	trypsin-1	242
16	XP_027141788.1	trypsin-3	247

1、4和3 与鲢和鲫 MBSP 以及犀角金线鲅 trypsin-3-like 属于同一分支;通过最小进化法计算结果显 示序,序列号1、16、4、15、3、2和14 与鲢和 鲫以及犀角金线鲅的 trypsin-3-like 属于同一分支 (图 3-c)。3 种算法综合结果表明,序列号1、3、4、 15和16 与淡水鱼 MBSP 有较高的亲缘性,序列 号 2和14 次之。

将序列号1、3、4、15和16与鲢和鲫 MBSP 以及犀角金线鲃 trypsin-3-like 进行多序列比对, 发现序列号1、3和15与淡水鱼 MBSP 蛋白序列 同源性更高,在55%以上,而16和4次之(图 3-d)。 与狗母鱼 MBSP的N端氨基酸序列比对结果显示, 序列号1和16与狗母鱼 MBSP 同源性最高,为 72.7%,序列号4次之,而3和15与狗母鱼 MBSP 同源性较低(图 3-e)。综合两个序列比对结果,序 列号1与已报道的 MBSP的序列同源性最高 (57%),最可能为大黄鱼 MBSP 蛋白序列,将该蛋 白质序列所对应的基因序列命名为 Lc-MBSP。

#### 2.4 Lc-rMBSP 的表达纯化与鉴定

以大黄鱼 cDNA 为模板,设计特异性引物对目的基因 Lc-MBSP 进行扩增。将得到的 Lc-MBSP 进行扩增。将得到的 Lc-MBSP 进行酵母表达载体构建,再将构建好的表达菌株

经甲醇诱导 5 d 后,取发酵上清液,经过硫酸铵 盐析和 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析柱纯化得 到分子量约为 28 ku 的 Lc-rMBSP (图 4-a)。SDS-PAGE 后,切下目的条带,进行 LC/MS/MS 鉴定, 结果证实所表达纯化的蛋白质为 Lc-rMBSP (图 4-b)。

#### 2.5 Lc-rMBSP 的底物特异性

Lc-rMBSP的最适底物为Boc-Leu-Lys-Arg-MCA,对Boc-Gln-Arg-Arg-MCA也具有很强的水解活性。与典型的丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶)的底物特异性不同,Lc-rMBSP特异性水解羧基例P1位含有精氨酸残基的底物,而几乎不水解P1位置为赖氨酸残基的底物(Boc-Val-Leu-Lys-MCA和Boc-Glu-Lys-Lys-MCA)(表 2)。当底物羧基例P2为Lys或Arg时,水解效率更高。Lc-rMBSP对组织蛋白酶底物Z-Arg-Arg-MCA也具有一定的水解活性,而对于Z-Phe-Arg-MCA却不分解,对胰凝乳蛋白酶底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA和Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA不具有水解活性。

#### 2.6 温度和 pH 对 Lc-rMBSP 活性的影响

Lc-rMBSP的最适温度为 50 ℃ (图 5-a),与 肌原纤维蛋白的最适自身降解温度 50~55 ℃ (图 1) 基本一致。在 20~50 ℃,随着温度的升高,酶活 性逐渐提高,在 40~60 ℃下 Lc-rMBSP 具有较高 的活性,而当温度升高至 70 ℃时,活性显著降 低。在 20~60 ℃下孵育 30 min 后,Lc-rMBSP 仍 然保持 50% 以上的剩余酶活性。当温度高于 60 ℃ 时,活性逐渐降低,70 ℃下仅剩 30% 的酶活性, 以上结果表明,Lc-rMBSP 具有较好的热稳定性。

将 Lc-rMBSP 在不同 pH 的缓冲液中进行酶 促反应,当 pH 为 8.0 时 Lc-MBSP 表现出最大的 酶活性,在 pH 6.0~8.0 范围内,随着 pH 值的逐渐 升高,酶活性也逐渐增加(图 5-b)。pH 8.0~11.0 时, 酶活性随着 pH 的升高逐渐降低。Lc-rMBSP 在 pH 7.0~10.0 时比较稳定,可以保持 80% 以上的酶 活性,在 pH 6.0 以下酶活性较低且极其不稳定, 而在偏碱性的环境下则具有较高的稳定性,这说 明 Lc-rMBSP 属于碱性蛋白酶。

#### 2.7 Lc-rMBSP 对肌原纤维蛋白的降解作用

为了验证 Lc-rMBSP 对肌原纤维蛋白的降解 作用,将肌原纤维蛋白与 Lc-rMBSP 混合,在不同 温度下孵育 1h 后进行 SDS-PAGE 分析。Lc-rMBSP 优先降解肌球蛋白重链 MHC 和原肌球蛋白 TM, 7期





(a) 进化树最大简约法;(b) UPGMA法;(c) 最小进化法;(d) 多序列比对:红色,同源性为100%,黄色,同源性≥75%;(e) N 端氨基酸序列比对:阴影,与狗母鱼 MBSP N 端序列的同源性(狗母鱼 MBSP 的 N 端序列: UniProtKB/Swiss-Prot: P84478.1)

#### Fig. 3 Phylogenetic tree analysis and multiple sequence alignment

(a) maximum parsimony method; (b) UPGMA method; (c) minimum evolution; (d) multi-sequence alignment: red. 100% homology, yellow. the homology  $\geq$ 75%; (e) alignment of N-terminal amino acid sequences, shadow, homology with the N-terminal sequence of *S. undosquamis* MBSP (N-terminal sequence of *S. undosquamis* MBSP: UniProtKB/ Swiss-PROt: P84478.1)

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



#### 图 4 Lc-rMBSP 的表达纯化与鉴定

(a) 表达纯化后的 Lc-rMBSP, M. 标准蛋白, 1. 纯化的 Lc-rMBSP; (b) Lc-rMBSP 的质谱鉴定, 蓝色线条表示质谱鉴定到的肽段

#### Fig. 4 Purification and identification of Lc-rMBSP

(a) purification of Lc-rMBSP, M. protein marker, 1. purified Lc-rMBSP; (b) LC/MS/MS identification of Lc-rMBSP, blue line. peptides identified by mass spectrometry

#### 表 2 Lc-rMBSP 的底物特异性

Tab. 2 Substrate specificity of Lc-rMBSP

底物 substrates	相对活性/% relative activity
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	100
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	388
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	330
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	175
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	159
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	121
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	111
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA	109
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	21
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	0
Z-Arg-Arg-MCA	29
Z-Phe-Arg-MCA	0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0

在 50 ℃下具有最强的活性,且在 50~60 ℃ 范围 内水解活性较高,MHC 和 TM 几乎全部被降解, 而在其他温度下的水解活性则相对较低(图 6),该 结果与肌原纤维蛋白的自身降解(图 1)基本一致。

### 2.8 温度对 Lc-rMBSP 二级结构的影响

采用圆二色谱研究了温度对 Lc-rMBSP 二级 结构的影响。Lc-rMBSP 在室温 25 °C 下呈现典型 的β-折叠结构,在 216 nm 处出现负峰,在 192 nm 处出现正峰 (图 7-a)。当 Lc-rMBSP 被加热到 95 °C

https://www.china-fishery.cn

时,两个峰值发生偏移,表明二级结构发生变化, 当将温度降至 25 °C 时,Lc-rMBSP 结构不能恢复, 说明 Lc-rMBSP 的热变性是不可逆的。变性温度  $T_m$  是指蛋白构象变化一半时对应的温度。用 CD 光谱进行全波长的扫描后,发现在 202 nm 处变化 最大,因此,为了确定 Lc-rMBSP 的热变性温度, 选择对 202 nm 处的构象变化进行监测(图 7-b)。 通过 Origin 2021 软件进行拟合分析,得到 LcrMBSP 的热变性温度  $T_m$  为 (62.82±1.09) °C,表明 其具有较好的热稳定性。

#### 2.9 Lc-MBSP 的三级结构分析

以大西洋鲑胰蛋白酶晶体结构 (PDB ID: 1A0J) 为模板,运用 SWISS-MODEL 进行同源建模,得 到 Lc-MBSP 的三级结构 (图 8-a)。Lc-MBSP 主要 由两个互成角度的双平行 β 疏水桶结构域组成, His-61、Asp-105 和 Ser-198 代表酶催化三联体, 位于两个疏水桶结构域所形成的中间裂缝区域中。 Ser-192、Gly-215 和 Ser-225 代表特异性底物结合 口袋,该区域主要包埋于靠近 C 端的疏水桶结构 域中<sup>[25]</sup>。对比大西洋鲑胰蛋白酶结构可以发现,其 催化三联体 (His-55、Asp-99 和 Ser-191) 与 Lc-MBSP 相同,但底物结合口袋 (Asp-186、Gly-209 和 Gly-219) 与 Lc-MBSP (Ser-192、Gly-215 和 Ser-225) 存 在较大差异,大西洋鲑胰蛋白酶底物结合口袋两 边都为 Gly,口袋底部是 Asp,而 Lc-MBSP 口袋 的两侧是 Gly 和 Ser,底部则是 Ser (图 8-b)。



图 5 温度和 pH 对 Lc-rMBSP 活性的影响

Fig. 5 Effects of temperature and pH on the activity of Lc-rMBSP



图 6 不同温度下 Lc-rMBSP 对肌原纤维蛋白的降解 M.标准蛋白, 1.未孵育对照, 2.40 ℃, 3.45 ℃, 4.50 ℃, 5.55 ℃, 6.60 ℃, 7.65 ℃, 8.70 ℃, 9.加热对照

## Fig. 6 Degradation of myofibrillar proteins by Lc-rMBSP at different temperatures

M. protein marker, 1. non-incubated control, 2. 40 °C, 3. 45 °C, 4. 50 °C, 5. 55 °C, 6. 60 °C, 7. 65 °C, 8. 70 °C, 9. heating control 20 г

15

10

5

0

-5

圆二色谱/mdeg circular dichroism



鱼类 MBSP 最早在 20 世纪 60 年代研究鱼糜 凝胶劣化时被发现<sup>[3]</sup>,该酶与肌原纤维紧密结合, 在 50~60 °C 对肌原纤维具有很强的降解作用<sup>[21,26]</sup>。 陆益钡等<sup>[27]</sup>从大黄鱼肌原纤维中粗提出一种丝氨 酸蛋白酶,其最适温度为 50 °C,将该酶添加到肌 原纤维凝胶中,其凝胶特性被破坏。本研究将大 黄鱼肌原纤维蛋白置于不同的温度下进行孵育, 结果发现 MHC 和 TM 在 50~60 °C 下发生了较为 明显的降解,而在其他温度下降解作用则不明显。 添加丝氨酸蛋白酶抑制剂后能显著抑制这种降解, 表明大黄鱼肌肉中存在肌原纤维结合型丝氨酸蛋 白酶 MBSP,最适温度范围为 50~60 °C。



#### 图 7 温度对 Lc-rMBSP 二级结构的影响

(a) 不同温度下 Lc-rMBSP 的圆二色谱图, RT-25 ℃. 常温, HT-95 ℃. 加热至 95 ℃, TR-25 ℃. 温度恢复至 25 ℃; (b) Lc-rMBSP 的热变性温度 (*T*<sub>m</sub>) 拟合

#### Fig. 7 Effect of temperature on the secondary structure of Lc-rMBSP

(a) circular dichroism of Lc-rMBSP at different temperatures, RT-25 °C. room temperature, HT-95 °C. heated to 95 °C, TR-25 °C. temperature reduced to 25 °C; (b) fitting diagram of thermal denaturation temperature ( $T_{\rm m}$ ) of Lc-rMBSP



图 8 Lc-MBSP 与大西洋鲑胰蛋白酶的三级结构

(a) Lc-MBSP, 红色代表催化三联体, 绿色代表底物结合口袋; (b) 大西洋鲑胰蛋白酶, 红色代表催化三联体, 蓝色代表底物结合口袋

Fig. 8 Three-dimensional model of Lc-MBSP and trypsin from S. salar

(a) Lc-MBSP, red indicates catalyzed triplet, green indicates substrate binding pocket; (b) *S. salar* trypsin, red indicates catalyzed triplet, blue indicates substrate binding pocket

生物信息学分析已经广泛应用于生物基因序 列测序、基因的克隆、预测新基因等方面。通过 生物信息学筛选出所需要的基因并对其表达的蛋 白质进行研究是目前常用的一种手段。孙红梅[28] 利用生物学技术获得具有细胞毒性的槲寄生毒肽 基因并高效获得槲寄生蛋白;杨春利等<sup>[29]</sup>通过生 物信息学手段筛选出田鼠巴贝虫棒状体相关蛋白 的基因。由于 MBSP 在肌肉中丰度极低,纯化天 然蛋白难度极大。为研究大黄鱼 MBSP 的性质, 通过生物信息学分析,得到与已报道的鱼类 MBSP 氨基酸序列具有高度同源性的序列,并将其命名 为 Lc-MBSP。该序列编码区全长 735 bp, 共编码 244个氨基酸残基。利用酵母系统成功表达具有 生物活性的 Lc-rMBSP,其分子量约 28 ku,与报 道的鱼类 MBSP 分子量相似<sup>[6, 8-10, 12-13]</sup>。Lc-rMBSP 的最适温度为 50 ℃, 高于大多数胰蛋白酶的

40°C并具有较好的热稳定性。圆二色谱结果显示, 温度高于 50°C时二级结构开始发生较为明显的 变化 (图 7-b),此时酶活性逐渐下降,说明 LcrMBSP 的活性变化与二级结构的变化密切相关<sup>[30]</sup>。

Lc-rMBSP的最适底物为Boc-Leu-Lys-Arg-MCA, 仅特异性切割羧基侧的精氨酸残基,这与 狗母鱼 MBSP 底物特异性相似,白姑鱼 MBSP 也 同样对精氨酸残基具有很强的偏好性,只微弱降 解赖氨酸残基。此外,Lc-rMBSP 与这两种鱼类 的 MBSP 一样,对底物 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA 都 表现出很强的降解活性<sup>[13-14]</sup>。

丝氨酸蛋白酶具有非常保守的催化三联体, 决定它们底物特异性的是与底物结合的部位,即 底物结合口袋,胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的底物 结合口袋通常是由口袋边上的两个 Gly 残基和口 袋底部的 Asp 残基组成<sup>[31]</sup>,如大西洋鲑胰蛋白酶 (图 8-b)。Lc-MBSP 的底物结合口袋为 Ser-192、 Gly-215和 Ser-225,与常见的类胰蛋白酶不同, 这可能就是造成其底物特异性(特异性切割精氨酸 残基 C 端)和酶学性质与一般的类胰蛋白酶存在 较大差异的原因之一。

Lc-rMBSP 在 40~60 °C 的较宽温度范围内对 肌原纤维都具有较好的降解活性。生物体中,肌 原纤维蛋白和所有细胞内蛋白一样,处于不断降 解和重新合成的动态之中<sup>[5]</sup>。肌原纤维中的 MHC 包括重酶解肌球蛋白和轻酶解肌球蛋白两个结构 域,重酶解肌球蛋白具有 ATPase 活性以及与肌动 蛋白结合的能力<sup>[32-33]</sup>,而 TM 会与肌钙蛋白结合, 在肌肉收缩中具有重要的作用<sup>[34]</sup>。因此,推测在 生理条件下,鱼体肌肉中的 MBSP 主要通过降解 MHC 和 TM 参与肌原纤维蛋白的分解代谢。此外, 轻酶解肌球蛋白具有形成细丝的能力,在很大程 度上决定了鱼肌肉的质构特性<sup>[33,35]</sup>。

大黄鱼作为我国主要的海水养殖鱼类,其加 工方式仍较为单一,以传统的鲜销、干制和冷冻 品为主<sup>[36]</sup>。鱼糜制品具有高蛋白、低脂肪、食用 方便等特点,将养殖大黄鱼加工为高档鱼糜制品, 有望提高大黄鱼的商品价值。MBSP 对肌原纤维 蛋白的降解是引起鱼糜凝胶劣化的主要原因,进 而影响鱼糜的保水性和凝胶特性。因此,对 MBSP 酶学性质的研究可为鱼糜品质的质量控制 提供指导。

本研究通过生物信息学方法从大黄鱼基因组 中筛选出 MBSP,对其进行了克隆表达,得到分 子量约28 ku 的 Lc-rMBSP,为了进一步验证 MBSP 在肌肉中的存在,后期还需优化条件,纯化天然 MBSP 并比较它们在酶学性质上的差异,为研究 海水鱼 MBSP 的功能提供理论参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- Owen C A. Serine proteinases[M]//Encyclopedia of respiratory medicine. Boston: Academic Press, 2006: 1-10.
- [2] 杜翠红,曹敏杰.鱼类肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶 研究进展[J].食品科学, 2013, 34(9): 336-339.
  Du C H, Cao M J. Progress in research on myofibrilbound serine proteinase from fish[J]. Food Science, 2013, 34(9): 336-339 (in Chinese).
- [3] Toyohara H, Sakata T, Yamashita K, et al. Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar pro-中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

teinase(s)[J]. Journal of Food Science, 1990, 55(2): 364-368.

- [4] Liu J Y, Yoshida A, Gao Y L, et al. Identification of a modori-inducing proteinase in the threadfin bream: molecular cloning, tissue distribution and proteinase leakage from viscera during ice storage[J]. Food Chemistry, 2020, 330(3): 127246.
- [5] Sangorrín M P, Martone C B, Sánchez J J. Myofibrilbound serine protease and its endogenous inhibitor in mouse: extraction, partial characterization and effect on myofibrils[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B:Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 131(4): 713-723.
- [6] Osatomi K, Sasai H, Cao M J, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 116(2): 183-190.
- [7] Choi Y J, Park J W. Acid-aided protein recovery from enzyme-rich Pacific Whiting[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(8): 2962-2967.
- [8] Cao M J, Wu L L, Hara K, *et al.* Purification and characterization of a myofibril-bound serine proteinase from the skeletal muscle of silver carp[J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(5): 533-546.
- [9] Ohkubo M, Osatomi K, Hara K, *et al.* Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from crucian carp *Carassius giberio langsdorfi* muscle[J]. Fisheries Science, 2004, 70(6): 1183-1185.
- [10] 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.
- [11] 鲍晓瑾. 引起鳙鱼鱼糜凝胶劣化的丝氨酸蛋白酶及其抑制研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2007.
  Bao X J. Study on the myofibril-bound serine protease of *modori* and its inhibition in big-head fish surimi production[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2007 (in Chinese).
- [12] 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): 255-264.

- [13] 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(1): 139-150.
- [14] 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.
- [15] Sangorrín M P, Martone C B, Sánchez J J. Identification of a myofibril-bound serine protease and its endogenous inhibitor in mouse skeletal muscle[J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2000, 32(11-12): 1213-1222.
- [16] Tshidino S C, Krause J, Adebiyi A P, et al. Purification and partial characterization of a myofibril-bound serine protease from ostrich skeletal muscle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 154(2): 229-234.
- [17] 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.
- [18] Du C H, Han L, Cai Q F, et al. Secretory expression and characterization of the recombinant myofibril-bound serine proteinase of crucian carp (*Carassius auratus*) in *Pichia pastoris*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 164(3): 210-215.
- [19] Shimizu Y, Nomura A, Nishioka F. *Modori* (fish gel degradation occurring at around 60 °C)-inducing property of croaker myosin preparation[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986, 52(11): 2027-2032.
- [20] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站, 中国水产学会.中国渔业统计年鉴-2021[M].北京:中 国农业出版社, 2021: 22.

Affairs Fishery Administration of Ministry, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 22. 学报

水 产

- [21] Cao M J, Jiang X J, Zhong H C, *et al.* Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Food Chemistry, 2006, 94(1): 7-13.
- [22] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [23] 李婷. 鲫鱼 MBSP 重组表达系统的优化及其稳定性机 制研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2016.
  Li T. The optimization of recombinant expression system and study on mechanism responsible for the stability of MBSP from crucian carp[D]. Xiamen: JiMei University, 2016 (in Chinese).
- [24] 杨汝晴,陈守峰,肖琳琳,等. 鲈鱼脯氨酰内肽酶的分 离纯化、性质分析及分子克隆[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 78-85.

Yang R Q, Chen S F, Xiao L L, *et al.* Prolyl endopeptidase from sea bass (*Lateolabrax japonicus*): purification, characterization and molecular cloning[J]. Food Science, 2021, 42(14): 78-85 (in Chinese).

- [25] 令桢民. Streptomyces griseus 胰蛋白酶的分子改造
  [D]. 无锡: 江南大学, 2013.
  Ling Z M. Molecular engineering of Streptomyces griseus trypsin[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- [26] 曹敏杰, 李燕, 翁凌, 等. 鲢鱼肌原纤维结合型丝氨酸 蛋白酶的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 91-94.
  Cao M J, Li Y, Weng L, *et al.* Study on myofibril-bound serine proteinase in silver carp[J]. Food Science, 2005, 26(1): 91-94 (in Chinese).
- [27] 陆益钡, 吕春霞, 廖慧琦, 等. NaCl对添加丝氨酸蛋白酶的肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 78-86.
   Lu Y B, Lü C X, Liao H Q, *et al.* Effects of NaCl on gel

properties of myofibrillar protein supplemented with serine protease[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 78-86 (in Chinese).

- [28] 孙红梅. 槲寄生毒肽基因的筛选、克隆及功能的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2009.
   Sun H M. Mistletoe toxic peptide gene screening, cloning and functional research[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2009 (in Chinese).
- [29] 杨春利,蔡玉春,卢艳,等.田鼠巴贝虫棒状体相关蛋 白基因的筛选及生物信息学分析[J].中国病原生物学 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

杂志, 2017, 12(2): 110-114.

Yang C L, Cai Y C, Lu Y, *et al.* A search for and bioinformatic analysis of genes coding for rhoptry-associated proteins of *Babesia microti*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2017, 12(2): 110-114 (in Chinese).

- [30] Daniel R M, Peterson M E, Danson M J, et al. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity[J]. Biochemical Journal, 2009, 425(2): 353-360.
- [31] 倪逸声,张龙翔. 胰蛋白酶工程研究进展[J]. 生物工程 进展, 1992, 12(1): 2-8.
  Ni Y S, Zhang L X. Advances in trypsin engineering[J].
  Progress in Biotechnology, 1992, 12(1): 2-8 (in Chinese).
- [32] Szent-Györgyi A G, Cohen C, Philpott D E. Light meromyosin fraction I: a helical molecule from myosin[J]. Journal of Molecular Biology, 1960, 2(3): 133-142.
- [33] Sano T, Noguchi S F, Matsumoto J J, et al. Thermal gelation characteristics of myosin subfragments[J]. Journal of Food Science, 1990, 55(1): 55-58.

- [34] Borovikov Y S, Avrova S V, Karpicheva O E, et al. The effect of the dilated cardiomyopathy-causing Glu40Lys TPM1 mutation on actin-myosin interactions during the ATPase cycle[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 411(3): 496-500.
- [35] 王玲军,陶妍,党静,等.鲢鱼骨骼肌轻酶解肌球蛋白基因的cDNA克隆[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(4):609-616.
  Wang L J, Tao Y, Dang J, *et al.* cDNA cloning of silver carp fast skeletal light meromyosin genes[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2010, 29(4): 609-616 (in Chinese).
- [36] 秦影, 汤海青, 欧昌荣, 等. 超高压处理对大黄鱼鱼糜水分状态和蛋白质结构的影响[J]. 农业工程学报, 2015, 31(23): 246-252.
  Qin Y, Tang H Q, Ou C R, *et al.* Effect of ultra-high

yellow croaker surimi gel[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(23): 246-252 (in Chinese).

# Molecular cloning, expression and characterization of myofibril-bound serine proteinase from yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

LIU Haiyan, YANG Ruqing, CHEN Yulei, ZHANG Lingjing, SUN Lechang, LIU Guangming, CAO Minjie<sup>\*</sup>

(College of Marine Food and Biological Engineering, JiMei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Myofibril-bound serine proteinase (MBSP) is a serine proteinase which binds closely to myofibrillar proteins and is ubiquitous in animal muscle. MBSP is effective in the degradation of myofibrillar proteins, including myosin heavy chain (MHC),  $\alpha$ -actinin, actin, and tropomyosin (TM) and is thus regarded as an important proteinase responsible for the metabolism of fish muscle in vivo, and is also considered as one of the main endogenous proteases causing the modori phenomenon. However, most research on fish MBSP focused on freshwater fish, and the research on MBSP from marine fish is still quite limited. In this study, the gene of MBSP from yellow croaker (Larimichthys crocea) was predicted by bioinformatics. Recombinant protein (Lc-rMBSP) was obtained by gene cloning and construction of pichia pastoris expression system. Enzymatic properties of Lc-rMBSP including molecular weight, substrate specificity, optimum temperature and pH were analyzed and its secondary structure was detected by circular dichroism. The three-dimensional structure of Lc-MBSP was analyzed by homology modeling. Sixteen trypsin-like genes in the genome of yellow croaker were identified. Phylogenetic tree analysis and multi-sequence alignment were performed between these genes and MBSPs in freshwater fish. The highest homology (57%) gene sequence (Lc-MBSP) was thus obtained, which had an open reading frame of 735 bp encoding 244 amino acid residues. The molecular weight of the recombinant protein Lc-rMBSP was~28 ku, and its optimal temperature and pH were 50 °C and 8.0, respectively. Circular dichroism analysis showed that temperature had a great influence on its secondary structure, and the thermal denaturation was irreversible. The thermal denaturation temperature of Lc-rMBSP was (62.82±1.09) °C, suggesting it is a thermally stable proteinase. LcrMBSP showed high hydrolytic activity toward MHC and TM in a temperature range of 40~60 °C. Lc-rMBSP hydrolyzed substrate Boc-Leu-Lys-Arg-MCA most effectively, and it specifically cleaved substrates containing arginine residues on the carboxyl side, which was similar to MBSP from Saurida undosquamis. The three-dimensional structure of Lc-MBSP was obtained by homology modeling. Its catalytic triplet was His-61, Asp-105 and Ser-198; its substrate binding pocket (Ser-192, Gly-215 and Ser-225) was slightly different from common trypsinlike proteinases, which was quite possibly the main reason for the difference in substrate specificity between LcrMBSP and other trypsins. Our present work provides a theoretical reference for the investigation of MBSP from marine fish.

Key words: *Larimichthys crocea*; myofibril-binding serine protease; molecular cloning; property analysis; circular dichroism; homology modeling

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

**Funding projects**: National Key R & D Program of China (2018YFD0901004); National Natural Science Foundation of China (31772049)