

羧肽酶研究进展

吴静^{1,2}, 闵柔¹, 邬敏辰^{*1,2}, 陈伟^{1,2}

(1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 羧肽酶(Carboxypeptidase)是一类可水解肽链 C 末端氨基酸残基的蛋白酶, 广泛存在于高等植物、动物组织及真菌中, 主要分为丝氨酸羧肽酶(EC3. 4. 16. -)、金属羧肽酶(EC3. 4. 17. -)和半胱氨酸羧肽酶(EC3. 4. 18. -)3 个亚类。作者综述了羧肽酶的研究进展, 主要包括羧肽酶的应用、性质、来源分布、克隆表达及研究意义, 并对其研究前景进行了展望。

关键词: 羧肽酶; 应用; 来源分布; 性质

中图分类号: Q 556.3 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)08-0793-09

Research Progresses on the Carboxypeptidase

WU Jing^{1,2}, MIN Rou¹, WU Min-chen^{*1,2}, CHEN Wei^{1,2}

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Carboxypeptidase is a kind of protease that cleaves the peptide bond of an amino acid residue at the carboxy-terminal end. It is widely distributed in higher plants, animals, and fungi and be divided into three sub-classes: serine-type Carboxypeptidase (EC3. 4. 16 -), Metal-Carboxypeptidase (EC3. 4. 17. -), cysteine-type carboxypeptidase (EC3. 4. 18 -). This review summarized the progresses of carboxypeptidase application, distribution, characteristics, cloning and expression. Furthermore, the prospect of carboxypeptidase was also suggested.

Key words: carboxypeptidase, application, distribution, properties

羧肽酶(Carboxypeptidases, CPs)是一种专一性地从肽链的 C 端逐个降解、释放游离氨基酸的一类肽链外切酶。在动物、植物的组织器官中, 羧肽酶发挥着重要的生理功能, 如胰腺羧肽酶 A 和 B 可用于消化食物, 羧肽酶 M(CPM)选择性地参与肽类激素的加工, 羧肽酶 D(CPD)和羧肽酶 N(CPN)参与肽和蛋白质加工等。如表 1 所示, 羧肽酶广泛应用于医药、食品等工业领域。在医药领域, 由于羧肽酶广泛参与机体的生化反应, 可通过体内羧肽酶

的检测达到诊断和治疗疾病的目的; 此外, 在医药上还可用于体内不良物质(毒素等)的降解。在食品工业, 可用于制备高 F 值寡肽^[1]、食品和饲料中赭曲霉素的去除^[2]、用作脱苦味剂^[3]等。在生物技术领域, 羧肽酶可用于多肽的合成及多肽氨基酸序列测定^[4], 也可作为模式酶, 对其他酶的研究提供帮助。动物来源的羧肽酶主要存在于猪、牛等的胰腺中, 如羧肽酶 A/B(carboxypeptidase A/B), 其数量非常有限、价格昂贵、导致其应用受到限制; 微生物

收稿日期: 2012-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(项目 311012299); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP10929); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF200801)。

作者简介: 吴静(1981-), 女, 江苏盐城人, 工学博士, 副教授, 主要从事微生物制药研究。E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 邬敏辰(1962-), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程研究。E-mail: bioch@163.com

来源的羧肽酶存在于酵母、曲霉等真菌的液泡中, 具有广阔的应用前景。因此, 借助基因工程策略采用微生物为宿主大量生产重组羧肽酶, 有望克服羧肽酶生产过程所遇到的动植物原料来源限制等限制, 进一步降低生产成本、提高产品质量、深化酶学

性质研究、扩展应用范围。作者综述了羧肽酶的种类、特点以及羧肽酶基因工程表达策略, 主要包括羧肽酶的性质、来源分布、克隆表达, 并对其研究前景和热点进行了展望。

表 1 羧肽酶的用途

Tab. 1 Application of carboxypeptidases

羧肽酶用途	参考文献
医药领域	
羧肽酶 A、羧肽酶 G2 可用于抗体导向-酶前药疗法(antibody-directed enzyme-prodrug therapy), 甲氨蝶呤的解毒	PMID: 15067353 PMID: 16491483 PMID: 16290933
前列腺癌的治疗	PMID: 16491483
小家鼠(mus musculus)羧肽酶 A(mc-CPA)是中和体内毒性的效应分子	PMID: 17923505
早期胰腺癌的监测的血清标志	PMID: 17222396
可作为治疗感染的一条新途径	PMID: 18083112
凝血酶激活的 CPB 具有广泛的抗炎特征	PMID: 18706698
潜在的重要的药物靶点	PMID: 17311554
食品工业	
水解食品或饲料产品中的精曲霉素 A	PMID: 17653510
高 F 值(Fischer's ratio)寡肽的制备	PMID: 17002431
大豆蛋白水解液的脱苦	PMID: 16179984
生物技术	
用作锌蛋白酶特异性抑制剂设计的模式酶	PMID: 15320722
胰岛素生产	PMID: 9859140
多肽合成	PMID: 19124054
固定化的羧肽酶 B 可用于逐步消化细胞色素 C	PMID: 2552917
羧肽酶 E 可用于体外生产生物活性肽	PMID: 17540328

1 羧肽酶的种类及其特点

根据羧肽酶活性中心含有丝氨酸残基、金属离子和半胱氨酸残基的不同, 将羧肽酶分为丝氨酸羧肽酶(EC3. 4. 16. -)、金属羧肽酶(EC3. 4. 17. -)和半胱氨酸羧肽酶(EC3. 4. 18. -)。

1.1 丝氨酸羧肽酶

丝氨酸羧肽酶(Seine carboxypeptidases, SCP) 又称酸性羧肽酶, 是一类真核生物蛋白水解酶, 亚基相对分子质量 40 000-75 000, 广泛存在于真

菌^[5,6]、高等植物^[7]和动物组织中^[8]。在酸性环境下, 丝氨酸羧肽酶具有末端蛋白水解酶、酯酶和脱酰胺酶的活性, 可同时参与多肽和蛋白质的加工、修饰与降解^[9]。由于位切点不同, 丝氨酸羧肽酶又分为溶酶体 Pro-Xaa 羧肽酶(EC 3. 4. 16. 2 - lysosomal Pro-Xaa carboxypeptidase)、丝氨酸 D-Ala-D-Ala 羧肽酶(EC 3. 4. 16. 4 - serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase)、羧肽酶 C(EC 3. 4. 16. 5 - carboxypeptidase C)、羧肽酶 D(EC 3. 4. 16. 6 - carboxypeptidase D)。其中, 羧肽酶 C 因可水解所有具有羧基末端的氨基酸(羟脯氨酸除外), 已成为蛋

白质多肽链 C 末端分析中常用工具酶;此外羧肽酶 C 还可通过转肽反应将其它氨基酸衍生物或亲核物质以取代肽链末端的氨基酸残基从而形成新肽。在所有丝氨酸羧肽酶的活性位点中,含有 1 个由 Ser、Asp、His 按独特顺序构成的具有催化功能的结

构单元,其中 Ser 是亲核位点、Asp 是亲电子体、His 是基底。这一结构单元可被异氟磷(DFP)、甲苯磺酰丙氨酸和酮苯丙氨酸抑制^[10]。此外,丝氨酸羧肽酶活性被 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 等金属离子抑制, Mg^{2+} 则促进羧肽酶活性^[11]。

表 2 丝氨酸羧肽酶的主要催化反应

Tab. 2 Catalytic reactions by serine-type carboxypeptidase

底物	K_m /(mmol/L)	抑制剂	参考文献
EC 3. 4. 16. 2			
N-benzyloxycarbonyl-Pro-Phe	0. 77	Diisopropyl fluorophosphates (DFP) Pepstatin; Phenylmethyl sulfonyl fluoride	PMID:7341916
Angiotensin II	0. 34	EDTA; PCMB; Phenylmethylsulfonyl fluoride; Iodoacetamide; O-phenanthroline	PMID:7766028
Prekallikrein	$6. 7 \times 10^{-6}$	Angiotensin II; Antipain; Benzyloxycarbonyl-Pro-Pro-aldehyde dimethyl acetate	PMID:11830581
EC 3. 4. 16. 4			
glycyl-L-alpha-amino-epsilon-pimelyl-D-alanyl-D-alanine	0. 0079	3-(N-glycyl-L-cysteiny)-N-ethylpropionamide	PMID:15497971
EC 3. 4. 16. 5			
benzyloxycarbonyl-Glu-Phe	0. 053	Acetyl-D-Phe ethyl ester; Benzyloxycarbonyl-D-Phe; Dimethylformamide; Ethanol; L-Amino acids	PMID:237004
Benzoyl-L-Tyr-4-nitroanilide	0. 13	Acetyl-D-Phe; Ag^+ ; Ba^{2+} ; Cu^+ ; Hg^{2+}	PMID: 13269
Acetyl-Phe ethyl ester	1. 20	Acetyl-D-Phe; Ethyl ester; Benzyloxycarbonyl-D-Phe; Dimethylformamide; Ethanol; L-Amino acids	PMID:237004
EC 3. 4. 16. 6			
Dansyl-L-Ala-L-Arg	0. 063	1,10-phenanthroline; DL-2-mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid	PMID:15918796

1. 2 金属羧肽酶

金属羧肽酶是一类存在于细胞外,帮助蛋白质消化,在中性或弱碱性条件下具有极大活性的羧肽酶,包括:羧肽酶 A、B、赖氨酸羧肽酶 (EC 3. 4. 17. 3)、甘氨酸羧肽酶 (EC 3. 4. 17. 4) 和谷氨酸羧肽酶 (EC 3. 4. 17. 11) 等。其中,羧肽酶 A 能释放 C 末端氨基酸(除脯氨酸、羟脯氨酸、精氨酸和赖氨酸),对具有芳香族侧链和大脂肪侧链的羧基端氨基酸具有很强水解能力。相比较而言,羧肽酶 A 释放非极性氨基酸、组氨酸、苏氨酸、高丝氨酸等的速度比较快,但对天冬氨酸、丝氨酸、蛋氨酸以及赖氨酸等的释放速度则比较缓慢,但随着 pH 值的增加,对天冬氨酸、丝氨酸和蛋氨酸的作用速度也不断加快。羧肽酶 A 的催化需要锌离子参与^[12],它是第

一个被发现的金属酶和锌酶,正是因为如此,羧肽酶 A 是动力学、结构和光谱方法等方面研究最为清楚的水解酶,为其他锌酶的研究奠定了坚实的基础。羧肽酶 B 仅水解以碱性氨基酸(如精氨酸和赖氨酸)为 C 末端残基的肽键,大部分特性与羧肽酶 A 很相似,唯一不同点在于羧肽酶 B 对 C 末端是精氨酸和赖氨酸残基的肽键具有很高的水解活性,有时也能切断其它疏水性氨基酸残基。pH 8 时羧肽酶 B 活性达到最大值,偏酸性和偏碱性的条件都会降低酶活,当 $\text{pH} \geq 12$ 时,活性则完全丧失。赖氨酸羧肽酶能降解蛋白末端的基本氨基酸,因对赖氨酸具有很强的活性而被命名为赖氨酸羧肽酶,通常用于调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究。甘氨酸羧肽酶又名羧肽酶 S,能降解倒数第二个为

甘氨酸的肽, 如 Z-Gly-Leu。羧肽酶 E (3. 4. 17. 10)、羧肽酶 M (EC 3. 4. 17. 12)、羧肽酶 U (EC 3. 4. 17. 20) 和羧肽酶 B 类似, 主要降 C-末端为精氨酸和赖氨酸的肽。谷氨酸羧肽酶又名羧肽酶 G, 能作用于含 N-酰化底物的 C-末端, 释放谷氨酸, 用于甲氨蝶呤的解毒及抗体导向酶-前药疗法

(antibody-directed enzyme prodrug therapy, AD-EPT)。Cd²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Co²⁺ 都能不同程度地提高金属羧肽酶的活性^[13], 但 Cu²⁺、Hg²⁺、EDTA、3-Phenylpropionic acid、土豆羧肽酶抑制剂^[14] 等则抑制金属羧肽酶活性。

表 3 金属羧肽酶的主要催化反应

Tab. 3 Catalytic reactions by metallo-carboxypeptidase

底物	$K_m /$ (mmol/L)	抑制剂	参考文献
EC 3. 4. 17. 1			
N-trans-3-(-3-indoleacryloyl)-L-Phe	0. 05	3-Phenylpropionic acid; indole acetic acid	[15]
Methotrexate-alpha-phenylalanine	0. 004 3	Latexin; potato metallo-carboxypeptidase inhibitor	PMID: 8806703
Hippuryl-Phe	0. 41	3-Phenylpropionic acid; aminobenzylsuccinic acid; Potato carboxypeptidase inhibitor	PMID: 8013741
EC 3. 4. 17. 2			
Benzoyl-Gly-Arg	0. 71	EDTA; Hg ²⁺	PMID: 12381380
Hippuryl-Arg	0. 05	6-Amino-n-hexanoic acid; EDTA; SDS; Urea	PMID: 17398
EC 3. 4. 17. 3			
Benzoyl-Gly-Lys	6. 30	4-aminomethyl-cyclohexane carboxylic acid; Nal-pha-acetyl-Lys; 6-Aminohexanoic acid	PMID: 7061043
EC 3. 4. 17. 4			
Benzyloxycarbonyl-Gly-Leu	...	1,10-phenanthroline; Ag; Diisopropylphosphorofluoridat; EDTA; iodoacetamid; p-chloromer-curibenzoat	PMID: 4961236
EC 3. 4. 17. 11			
Methotrexate	...	Benzyloxycarbonyl-Glu; Gly-Glu	PMID: 5237864
EC 3. 4. 17. 12			
Benzoyl-Gly-argininic acid	...	2-Guanidinoethylmercaptosuccinic acid; 1, 10-phenanthroline	PMID: 18957287
EC 3. 4. 17. 20			
Fibrin	...	2-(2-guanidinoethylthio) succinic acid; anabaenopeptin-type cyclic peptide	PMID: 20466032

1. 3 半胱氨酸羧肽酶

半胱氨酸羧肽酶 (EC 3. 4. 18. 1) 又称组织蛋白酶 X (cathepsin X)、组织蛋白酶 Z (cathepsin Z)、酸性羧肽酶, 是一类由 Cys84、His233 和 Asn254 组成活性中心, 催化功能结构域中包含半胱氨酸 (Cys) 的羧肽酶。存在于牛 (*Bos taurus*)、鲤鱼

(*Cyprinus carpio*)、人 (*Homo sapiens*)、小家鼠 (*Mus musculus*)、褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 等动物的消化道、脑、眼、心脏、肝等组织的细胞液中^[16], 对 C-末端氨基酸具有广谱活性, 但对 C-末端 Pro 无活性作用, 内切酶活性很弱^[17]。

表 4 半胱氨酸羧肽酶的主要催化反应

Tab. 4 Catalytic reactions by cysteine-type carboxypeptidase

底物	K_m / (mmol/L)	抑制剂	参考文献
EC 3. 4. 18. 1			
Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin	...	1,10-phenanthroline; antipain; Aprotinin; chymostatin; EDTA; EGTA; NEM; Pepstatin A; PMSF; Leupeptin; E-64	PMID:18674630
(2,4-dinitrophenyl)-GFFW	0. 001	Chicken cystatin; Stefin A; GFG-semicarbazone; CA-074	PMID:10951198

2 羧肽酶的来源及分布

根据来源分类,羧肽酶可分为动物羧肽酶、植物羧肽酶和微生物羧肽酶。在哺乳动物的不同组织中含有一系列的金属羧肽酶,以执行相应的生理功能。如胰腺羧肽酶 A 和 B 主要帮助消化食物、羧肽酶 E 选择性地加工生物活性肽、羧肽酶 M 选择性地参与肽类激素的加工、羧肽酶 D(高尔基体中)和羧肽酶 N(血浆中)参与肽和蛋白质的加工。对动物源羧肽酶的研究,主要集中于人、猪、牛、小鼠等。其中对人源羧肽酶的研究是为了解析羧肽酶在人体内的作用机制,以进行疾病的诊断、治疗;而对小鼠羧肽酶的研究则是作为研究模型,以解析人源羧肽酶生理机制。动物源羧肽酶的另一主要研究领域是应用于胰岛素、多肽的工业化生产中。目前,已从大麦、小麦、拟南芥、水稻、番茄、绿

豆等多种植物中分离到丝氨酸羧肽酶(SCP)及丝氨酸羧肽酶类蛋白(SCPL)的基因和蛋白,除参与催化蛋白水解反应、植物损伤应答反应外,还在油菜素内酯、芥子酰基苹果酸等化合物的合成中发挥积极的作用。微生物羧肽酶包括微生物自身生产的羧肽酶及以微生物为宿主过量表达的羧肽酶。已有研究表明,酵母、假单胞杆菌(*Pseudomonas*)、曲霉等是微生物羧肽酶的主要来源,所生产的羧肽酶主要是丝氨酸羧肽酶,具有广泛的底物特异性。源于酵母细胞的羧肽酶 Y 是使用范围最为广泛的羧肽酶,用于将猪胰岛素 B 链末端的丙氨酰胺残基以苏氨酸残基取代,以半合成胰岛素(通过羧肽酶的转肽作用)^[18]、蛋白序列的测定^[19]等;而源于假单胞杆菌的羧肽酶 G 可用于甲氨蝶呤解毒、AD-EPT。此外,研究发现存在于米曲霉、构巢曲霉、黑曲霉等真核微生物液泡中的羧肽酶,可用于多肽脱苦、生物活性多肽的延长或特异性修饰等。

表 5 羧肽酶的来源及分布

Tab. 5 Sources and localizations of carboxypeptidase

典型生物	EC number	来源组织/分布	参考文献
动物			
<i>Homo sapiens</i>	3. 4. 17. 1 3. 4. 17. 2	直肠肥大细胞分泌颗粒,内质网和膜皱褶,胰液,肺,前列腺癌细胞系,细胞质,胞外,溶酶体,细胞膜	PMID:14760754 PMID:938622 PMID:16491483
<i>Bos taurus</i>	3. 4. 17. 1 3. 4. 17. 2	胰腺细胞胞外	[20]
<i>Sus scrofa</i>	3. 4. 17. 2	胰腺细胞胞外	[20]
<i>Mus musculus</i>	3. 4. 17. 2	细胞质溶液	PMID:19717511
植物			
<i>Arabidopsis sp</i>	3. 4. 16. 5	细胞悬液及幼苗液泡、细胞壁、胞外	PMID:15190181 PMID:16123046
<i>Citrus sp.</i>	3. 4. 16. 5	果实,叶,果皮	PMID:927201 PMID:13268 PMID:5140815

续表 5

典型生物	EC number	来源组织/分布	参考文献
<i>Oryza sativa</i>	3. 4. 16. 5 3. 4. 16. 2	根, 幼苗, 芽	PMID:16949956
<i>Pisum sativum</i>	3. 4. 16. 5	子叶	PMID:8654403
微生物			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3. 4. 17. 4 3. 4. 16. 5 3. 4. 16. 6	液泡, 膜, 高尔基体	PMID:17101773 PMID:18474590
<i>Pseudomonas sp</i>	3. 4. 17. 11	胞外	PMID:19780183
<i>Bacillus subtilis</i>	3. 4. 16. 4	细胞壁	PMID:14731276
<i>Streptomyces sp</i>	3. 4. 16. 4	细胞质, 胞外, 膜	PMID:12627955 PMID:1445284
<i>Aspergillus niger</i>	3. 4. 17. 1	液泡, 胞外分泌	PMID:17653510

3 羧肽酶的基因工程表达策略

目前, 商业应用的羧肽酶主要来源于猪胰腺, 价格比较昂贵, 且存在一定浓度的蛋白酶。因此, 研究人员将关注点转移到利用基因工程策略或方法在微生物宿主中异源表达和生产羧肽酶, 展现了良好的应用前景。采用基因工程策略过量表达动物源羧肽酶主要用于进行基因测序、机理研究。测序结果(GenBank: CAA47732. 1)表明, CPA 含 419 个氨基酸, 1-16 位为信号肽, 17-110 位为前肽, 111-419 位为成熟肽, Zn²⁺ 结合位点为第 114、117、248 位, 其催化位点及抑制剂结合位点均已测出。CPA 为单一的多肽链, 在体内首先合成出来的是无活性的羧肽酶 A (procarboxypeptidase A), 以亚基双聚体或三聚体形式存在。经分辨率为 0.2 nm 的 X 射线结构测定, 羧肽酶分子呈椭圆球形, 大小为 5.0 nm × 4.2 nm × 3.8 nm。羧肽酶 H 又称羧肽酶 E 是由 476 个氨基酸组成, 前 25 个氨基酸为信号肽 (NCBI Reference Sequence: NP_001864. 1), 向斌等人已构建人羧基肽酶 H (CPH) 的原核表达系统, 获得其重组蛋白, 并初步应用于人 CPH 自身抗体 (CPH-Ab) 的检测^[21]。人肥大细胞羧肽酶基因 (NP_001861. 2) 编码 417 个氨基酸, 与胰腺来源的羧肽酶同源性仅为 36.24%。大鼠羧肽酶 B 基因 (GenBank: AAA40872. 1) 序列大小为 1245 bp, 编码 415 个氨基酸, 与人羧肽酶 B (NM_001871. 2) 氨基酸序列的同源性为 75.78%。尽管已有多种植物

源羧肽酶基因被测序, 如拟南芥 (GenBank: AED93104. 1)、豌豆 (GenBank: CAA92216. 1)、莱茵衣藻 (GenBank: EDP07567. 1) 等。然而, 将植物源羧肽酶基因进行克隆表达并进行深入研究的案例很少。大量微生物源的羧肽酶基因已被测序, Yoshida 等成功克隆并测定了编码串珠镰孢菌羧肽酶基因的全长 cDNA, 将克隆所得基因序列与其他真菌羧肽酶序列比对, 得出了它们的进化关系^[22]; *A. niger* TCCC41013 脯氨酸内肽酶基因长 1581bp, 共编码 526 个氨基酸, 包括 22 个氨基酸的信号肽序列和 504 个氨基酸的成熟肽序列^[23]。羧肽酶基因序列的测定与分析, 有利于重组表达载体的构建及重组酶优化。

根据来源不同, 羧肽酶高效表达的宿主和载体完全不同。如动物源羧肽酶的表达宿主主要是大肠杆菌 BL21^[24]、毕赤酵母 GS115 及 COS-7 细胞, 载体则是 pGEx-4T-1、pPIC9K、pFLAG-CMV-1。而真菌羧肽酶则很容易在酿酒酵母 YPH250^[25]、构巢曲霉 (*A. nidulans*) A89^[26]、米曲霉^[27] 等宿主中得以高效表达, 表达载体分别为 pG-3、pIECS3、pU-CLTS1。总体而言, 羧肽酶在大肠杆菌等原核表达宿主中表达时, 多以包涵体的形式存在, 尽管纯化简单, 但需后续复性处理。而以毕赤酵母等真核微生物为表达宿主时, 则具有产量稳定性好、易于高密度培养、胞外产物和易于分离等优点。对以哺乳动物细胞为表达宿主, 则容易获得高活性的目标蛋白, 如以 pFLAG-CMV-1 为哺乳动物细胞分泌表达载体, 因携带胰蛋白酶信号肽基因, 很适合在 COS 细胞系中瞬时性高分表达目的基因, 且获得的目

标蛋白氨基端融合了 FLAG-tag(6 肽)标签,易于表达产物的检测。

表 6 羧肽酶的克隆表达

Tab. 6 Cloning and expression of carboxypeptidase

典型生物	基因长度	表达系统	表达载体	活性	参考文献
<i>Homo sapiens</i>	1 260 bp	<i>Escherichia coli</i> BL21/ <i>Pichia pastoris</i> / COS-7	pGEX-4T-1; pPIC9 K; pFLAG-CMV-1	MTT 测 CPA1 + MTX-Phe 对肿瘤细胞的杀伤力	[24][28][29]
<i>Homo sapiens</i>	1 254 bp	<i>Escherichia coli</i> / <i>Pichia pastoris</i>	pMAL-c2x; pPIC9K	以 <i>Pichia pastoris</i> 为表达系统表达的酶活较 <i>Escherichia coli</i> 高	PMID:14760754
<i>Helicoverpa zea</i>	1 290 bp	<i>Pichia pastoris</i>	pPIC9K	对赖氨酸残基有高选择性	PMID:16876708
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 572 bp	<i>Escherichia coli</i>	pET22b	活性为原始 <i>S cerevisiae</i> CPY 的 63%	PMID:11388806
<i>Paralichthys olivaceus</i>	1 262 bp	<i>Escherichia coli</i>	pGEX-4T-1	对 Z-Phe-Arg-AMC 酶活为 3457. 10 U/mg	PMID:18674630
<i>Aspergillus niger</i>	1 581 bp	<i>Pichia pastoris</i>	pPIC9K	对 Z-Gly-Pro-pNA 酶活为 2275. 4mU/mL, 是出发菌株的 5. 3 倍	[23]
<i>Aspergillus saitoi</i>	1 816 bp	<i>S. cerevisiae</i> YPH250	pG-3	对底物 Z-Tyr-Leu 酶活为 4. 1kat/kg	PMID:7772020
<i>Aspergillus oryzae</i>	1 816 bp	<i>A. nidulans</i> A89	pIECS3	对底物 Z-Glu-Tyr 酶活为 463. 0mkat/kg	PMID:20460731

4 展望

综上,目前在羧肽酶的应用、性质、来源分布、克隆表达等方面开展了大量的研究工作,然而,羧肽酶的研究还需要在以下方面开展工作:(1)获得大量的羧肽酶:由于从动物组织中提取的羧肽酶价格昂贵,如何通过借助基因重组技术和生化工程的高密度发酵技术,获得专一、纯度高的羧肽酶,对于拓展其应用领域,具有重要的现实意义;(2)解析羧

肽酶的生理作用:目前羧肽酶的应用范围主要集中在医药和食品加工中,由于酿酒酵母与人具有较高的同源性,如能以酿酒酵母为研究模型,解析羧肽酶在人体内生理作用,及如何影响疾病的发生发展过程,以对疾病进行预防和治疗;(3)优良性能的定向改造,拓展应用领域:从羧肽酶的基因序列入手,在阐释分子结构与功能之间的关系的基础上,借助蛋白质工程的方法和策略,增强羧肽酶的底物适应性、催化效率、提高酸碱耐受性以及拓宽最适作用温度范围等工业应用特性,以拓展应用领域。

参考文献(References):

- [1] Pedroche J, Yust Mdel M, Lqari H, et al. Production of Brassica carinata protein hydrolyzates with a high Fischer's ratio using immobilized proteases[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(20): 7621-7627. [2] Abrunhosa L, Venâncio A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(12): 1909-1914.
- [3] Liu F, Yasuda M. Debittering effect of Monascus carboxypeptidase during the hydrolysis of soybean protein[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(10): 487-489.
- [4] 高彦飞, 王红霞. 蛋白质及多肽 C 端测序的研究进展[J]. *分析化学评述与进展*, 2007, 35(12): 1820-1826. GAO Yan-fei, WANG Hong-xia. Development of protein and peptide C-terminal sequencing analysis[J]. *Chin j Anal*

- chem**, 2007, 35(12) : 1820—1826. (in Chinese)
- [5] Valls LA, Hunter CP, Rothman JH, et al. Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide[J]. **Cell**, 1987, 48(5) : 887—897.
- [6] Dal Degan F, Ribadeau—Dumas B, Breddam K, et al. Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and their use in C—terminal sequencing of proteins and peptide synthesis[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1992, 58(7) : 2144—2152.
- [7] Potokina E, Prasad M, Malysheva L, et al. Expression genetics and haplotype analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase I (Cxp1), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L) [J]. **Funct Integr Genomics**, 2006, 6(1) : 25—35.
- [8] Remington S J, Breddam K. Carboxypeptidases C and D [J]. **Methods Enzymol**, 1994, 244 : 231—248.
- [9] 冯英, 刘庆坡, 贾佳等. 拟南芥丝氨酸羧肽酶类蛋白家族的基因组学分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(8) : 864—873.
FENG Ying, LIU Qing-po, JIA Jia, et al. Genomic analysis of serine carboxypeptidase-like protein family of *Arabidopsis thaliana*[J]. **Acta Genetica Sin**, 2005, 32(8) : 864—873. (in Chinese)
- [10] Krishnan S, Vijayalakshmi MA. Purification and some properties of three serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* [J]. **J Chromatogr**, 1986, 370(2) : 315—326.
- [11] 付静, 杨媚, 李理, 等. 雅致放射毛霉 3. 2778 羧肽酶性质及其活性中心结构的研究[J]. 中国酿造, 2010, 216(3) : 30—33. FU Jing, YANG Mei, LI Li, et al. Enzymatic properties of carboxypeptidase from *Actinomucor elegans* 3. 2778[J]. **Chin Brew**, 2010, 216 (3) : 30—33. (in Chinese)
- [12] 王德解, 方宏清, 陈宏等. 羧肽酶 A/B 亚家族[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(1) : 55—58.
WANG De-jie, FANG Hong-qing, CHEN Hong, et al. Carboxypeptidase A/B subfamily[J]. **Chin J Biochem Pharm**, 2005, 26(1) : 55—58. (in Chinese)
- [13] Xu D, Guo H. Quantum mechanical/molecular mechanical and density functional theory studies of a prototypical zinc peptidase (carboxypeptidase A) suggest a general acid—general base mechanism[J]. **J Am Chem Soc**, 2009, 131(28) : 9780—9788.
- [14] 许大洲, 王树英, 金坚, 等. 在大肠杆菌中融合表达重组羧肽酶抑制剂[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6) : 119—124.
XU Da-zhou, WANG Shu-ying, JIN Jian, et al. Fusion expression of recombinant carboxypeptidase inhibitor in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(6) : 119—124. (in Chinese)
- [15] Petra P H. Bovine procarboxypeptidase and carboxypeptidase A[J]. **Methods Enzymol**, 1970, 19 : 460—503.
- [16] Ahn S J, Kim N Y, Jeon S J, et al. Molecular cloning, tissue distribution and enzymatic characterization of cathepsin X from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 2008, 151(2) : 203—212.
- [17] Kao C M, Huang F L. Cloning and expression of carp cathepsin Z: possible involvement in yolk metabolism[J]. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 2008, 149(4) : 541—551.
- [18] Breddam K, Johanse JT. Semisynthesis of human insulin utilizing chemically modified carboxypeptidase Y[J]. **Carlsberg Res. Commun**, 1984, (49) : 463—472.
- [19] 陈平, 梁宋平. 利用飞行时间质谱进行蛋白质和多肽 C 端序列测定[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2001, 24(1) : 58—61.
CHEN Ping, LIANG Song-ping. C-terminal sequencing of protein and peptide by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. **J Nat Sci Hunan Normal University**, 2001, 24(1) : 58—61. (in Chinese)
- [20] Aviles FX, Vendrell J. Carboxypeptidase B[M]. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, San Diego : Academic Press, 1998 : 831—833.
- [21] 向斌, 周智广, 黄干, 等. 人羧基肽酶 H 原核表达载体的构建及其应用[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(2) : 84—86.
XIANG Bin, ZHOU Zhi-guang, HUANG Gan, et al. Construction of prokaryotic expression vector for human carboxypeptidase H and its application[J]. **Chin J Diabetes**, 2007, 15(2) : 84—86. (in Chinese)
- [22] Yoshida H, Iizuka M, Norioka N, et al. Cloning and sequencing of cDNA and genomic DNA encoding serine carboxypeptidase of *Fusarium moniliforme* that was purified with phosphatase[J]. **J Biosci Bioeng**, 2007, 103(6) : 521—528.

- [23] 向先长, 杨迪, 路福平. 黑曲霉脯氨酸蛋白内肽酶基因的克隆及其在酵母中的表达[J]. 工业微生物, 2009, 39(2): 7-12.
XIANG Xian-chang, YANG Di, LU Fu-ping. Cloning of proline specific endoprotease gene of *Aspergillus niger* and expression in *Pichia pastoris*[J]. *Ind Microbiol*, 2009, 39(2): 7-12. (in Chinese)
- [24] 岳乔红, 苏明权, 郝晓柯等. 羧肽酶 A1 全酶及其活性中心基因的克隆及原核表达[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(6): 554-556.
YUE Qiao-hong, SU Ming-quan, HAO Xiao-ke, et al. Cloning and prokaryotic expression of carboxypeptidase A1 and the active center gene[J]. *Lett Biotechnol*, 2003, 14(6): 554-556. (in Chinese)
- [25] Chiba Y, Midorikawa T, Ichishima E. Cloning and expression of the carboxypeptidase gene from *Aspergillus saitoi* and determination of the catalytic residues by site-directed mutagenesis[J]. *Biochem J*, 1995, 308(2): 405-409.
- [26] Morita H, Morita H, Okamoto A, et al. Heterologous expression and characterization of CpI, OcpA, and novel serine-type carboxypeptidase OcpB from *Aspergillus oryzae* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85(2): 335-346.
- [27] Morita H, Kuriyama K, Akiyama N et al. Molecular cloning of ocpO encoding carboxypeptidase O of *Aspergillus oryzae* IAM2640[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(5): 1000-1006.
- [28] 易静, 郝晓柯, 苏明权等. 人羧肽酶 A1 活性中心的毕赤酵母可溶表达[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2007, 27(5): 389-391.
YI Jing, HAO Xiao-ke, SU Ming-quan, et al. Soluble expression of human carboxypeptidase A1 active center in *Pichia pastoris*[J]. *J xian Jiaotong University: Medi Sci*, 2007, 27(5): 389-391. (in Chinese)
- [29] 卢雪涛, 岳乔红, 刘家云等. 羧肽酶 A1 全酶及其肽段基因的克隆及分泌表达[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(16): 1441-1443.
LU Xu-tang, YUE Qiao-hong, LIU Jia-yun, et al. Cloning and secretion expression of human carboxypeptidase A1 and its peptide genes[J]. *J Fourth Mil Univ*, 2008, 29(16): 1441-1443. (in Chinese)

科技信息

新型玉米包装材料可使花菜的货架期延长两倍

据报道,近日英国一家包装公司 Sirane 宣布,其研制的生物性食品包装材料可以使花菜、西兰花等芸苔属植物的货架期延长两倍。

在试验过程中,花菜、西兰花和在货架上放置 1 天便会变质,然而经过 Sirane 公司玉米材料薄膜 Sira-Flex Resolve 包装后,花菜和西兰花在放置 5 天后仍可保持良好的品质。

Sirane 公司称,这种膜的独特材料结构使其对湿度保持渗透性,可在不同的情况下改变 O₂ 和 CO₂ 的含量,膜的渗透性根据温度变化,在储存温度发生变化的情况下使包装中的环境达到最优状态。

[信息来源] foodproduction daily. Sirane claims new corn-based packaging film doubles brassica shelf life[EB/OL]. (2012-7-27). <http://www.foodproductiondaily.com/Packaging/Sirane-claims-new-corn-based-packaging-film-doubles-brassica-shelf-life>

欧盟拟废除石蜡油在动植物产品中的最大残留限量

据欧盟食品安全局 EFSA 消息,7 月 23 日欧盟食品安全局提议,废除石蜡油(paraffin oil, CAS 64742-54-7)在动植物产品中的最大残留限量。

EFSA 认为,由于在欧盟地区,石蜡油已不允许出现在动植物商品中,而且希腊作为书记会员国(rapporteur Member State)也没有收到其它地区批准该物质用于动植物产品的通报,因此有必要废除它的最大残留限量。

[信息来源] EFSA. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for paraffin oil (CAS 64742-54-7) according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005[EB/OL]. (2012-7-23). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2841.pdf>.