

鸡氨基肽酶 H 在大肠杆菌中的表达、纯化与部分酶学性质分析

赖庆安¹, 刘树滔¹, 卢菀华¹, 陈莉¹, Toshihide NISHIMURA², 饶平凡¹

1 福州大学生物科学与工程学院, 生物工程研究所, 福州 350001

2 Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Japan

摘要: 氨基肽酶 H(Aminopeptidase H, APH)是生物组织内一种常见的氨基内肽酶, 但因为天然材料中含量很低, 基本无法深入研究其催化机理、功能与结构的关系及其在生物体内的确切功能。从鸡肝组织克隆了 APH 的全基因序列, 并把该序列亚克隆到载体 pET22b(+)上, 然后转化大肠杆菌 Rosetta(DE3), 构建了 APH 的表达菌株。该菌株经 IPTG 诱导, 在 SDS-PAGE 上明显出现一条与天然 APH 理论分子量一致的新增蛋白带, 该条带的浓度随着表达时间的延长逐渐加深; 6 h 基本达到平衡, 此时重组蛋白占总蛋白的 16.7%, 表达水平高达 94.7 mg/L。对表达产物进行了活性检测、纯化和酶学性质分析, 发现重组蛋白在亚基构成, 热稳定性, 最适 pH 等方面与天然 APH 基本相同, 据此可以确认表达产物确实是 APH, 发酵液总活力达到 1636 u/L。这些结果为 APH 的催化机理及其在生物体内的功能的阐明奠定了重要的物质基础。

关键词: 氨基肽酶 H(APH), 表达, 纯化, 酶活

Expression in *Escherichia coli*, Purification and Enzymatic Properties of Chicken Aminopeptidase H

Qingan Lai¹, Shutao Liu¹, Wanhua Lu¹, Li Chen¹, Toshihide Nishimura², and Pingfan Rao¹

1 The Institute of Biotechnology in Fuzhou University, Fuzhou 350001, China

2 Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Japan

Abstract: Aminopeptidase H (APH) is an universally distributed aminoendopeptidase in the tissue of many organism. However, it is hard to investigate its mechanism underlying the catalysis and the function in cell. In this paper, the full DNA sequence of this enzyme was cloned from chicken liver, then subcloned to the vector pET22 b(+). The recombined vector was transformed into *E. coli* Rosetta(DE3), and the APH gene was expressed by the induction of IPTG. It was found the recombinant protein exhibited same molecular weight as authentic APH on SDS-PAGE analysis; the expression level increased with induction time and approached maximum of 94.7mg/L till 6 hours, which contained 16.7% of the total protein. Moreover, this recombinant protein showed similar properties of subunit composition, thermal stability and optimum pH with native APH, based on the enzymatic assay, purification and analysis of enzymological properties. Therefore, it is confirmed that APH was expressed in this prokaryote system with a high-level of 1636 u/L aminopeptidase activity. These results would help to elucidate the catalysis mechanism and biological function of APH by providing enough material.

Keywords: aminopeptidase H(APH), expression, purification, enzymological properties

Received: March 26, 2007; **Accepted:** August 15, 2007

Supported by: Opening Foundation of Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University (No. NCU200403).

Corresponding author: Shutao Liu. Tel: +86-591-87893047; E-mail: stliu@fzu.edu.cn

南昌大学食品科学教育部重点实验室开放基金 (No. NCU200403)资助。

氨基酶 H(Aminopeptidase H, APH)是广泛分布在哺乳动物组织中的一种氨基内肽酶(aminoendopeptidase), 其重要特点是与组织蛋白酶 H(cathepsin H)一样同时具有氨基酶和肽链内切酶的活性。它最早发现于兔子骨骼肌中, 当时命名为水解酶 H(hydrolase H)^[1,2], 随后 Nishimura 等对其酶反应方式进行了研究(1983)^[3]。之后 Nishimura, Rhyu 等对猪肉、鸡肉和牛肉中氨基酶 H 的部分性质分别进行了表征^[4-6]。这些研究说明 APH 在动物肌肉中主要是作为肽链端解酶存在, 与其他水解酶协同作用, 水解各种小肽底物时起到互补的效果, 是影响宰后动物肌肉成熟过程中形成风味肽与自由氨基酸的主要水解酶之一^[4-6]。其他的研究推测 APH 对细胞内各种蛋白质的成熟与降解起到一定的作用, 所以对体内荷尔蒙水平的调节、细胞周期的控制等生理过程或者不可或缺^[7,8];同时作为一种组织蛋白酶, 氨基酶 H 还可能参与了细胞凋亡以及肿瘤等病理过程^[9,10]。对氨基酶的研究多在发现新来源、新蛋白上, 较少深入研究催化机理、功能与结构的关系及其在生物体内的确切功能。H Adachi 等对该酶基因进行了克隆并在 COS 细胞中进行了表达, 为朝这些方面的努力奠定了基础^[11], 但是表达水平极低, 无法最终满足要求。所以, 本文尝试在大肠杆菌中对该酶的基因进行表达, 并对表达产物进行纯化、表征。因为原核生物表达系统的表达量大大高于天然来源的材料, 容易获得大量的重组蛋白质, 可望为进一步认识该蛋白的各种理化性质, 了解蛋白质结构与功能的关系, 以及实际应用奠定良好的物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料

RNA 提取试剂 TRIzol Reagent (Invitrogen Cat No. 15596-026, Size 100mL), 载体系统 pGEM-T Easy Vector Systems I (Promega, A1380), 表达载体 pET22 b(+)和菌株 Rosetta(DE3)由本室保存, PCR 引物和序列测定由上海生工公司完成, 限制性核酸内切酶由相应试剂盒提供。氨基酶底物 LeuNap 和内切酶底物 BANA 为上海东风生物公司产品。凝胶色谱材料 Sephacryl S-200、Sephacryl S-300 为 PHARMA 公司产品, 离子交换色谱材料 DEAE 650C 为 Toyopearl 公司产品。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 氨基酶 H 的 cDNA 克隆和重组质粒构建

(1) 总 RNA 的分离提取: 采用 Invitrogen 公司的一步法总 RNA 提取试剂 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™] Cat No. 15596-026, Size 100mL), 并按说明书方法操作提取总 RNA。RNA 从红原鸡(Gallus gallus, Red junglefowl)的肝脏组织中提取获得。

下文所用引物根据数据库中 APH 的基因碱基序列设计(GenBank 登录号 AB001322)。RT 引物根据以上基因序列 1444-1456 位置碱基设计。PCR 引物 S1 根据 11-28 位置碱基设计, A1 根据 1404-1421 位置碱基设计; S2 根据 22-40 位置碱基设计, A2 根据 1374-1393 位置碱基设计。经过上述 PCR 最终可以得到包含起始密码子与终止密码子的完整目的基因片段, 并可以方便地与 pGEM[®]-T Easy 载体连接。

(2) cDNA 第一链的合成: 根据 TAKARA 5 -FU LL RACE Core Set 试剂盒的方法进行 APH 的全长 cDNA 序列克隆, RT 引物为 3 -ccagtgttgaa-5。

(3) cDNA 第二链的合成: APH 引物 A1 & S1 PCR 一次, 然后 A2 & S2 PCR 一次。

(4) PCR(第一次): 引物 A1 (5 -ggttgaccattaa-gaggc-3), 引物 S1 (5 -tttccggcaccatgaatg-3); 94°C, 5 min, {变性: 94°C, 30 s; 退火: 45°C, 30 s; 延伸: 72°C, 135 s, 25 轮循环}, 72°C, 10 min; 4°C。

(5) PCR(第二次): 模板 DNA 为第一次 PCR 产物。引物 A2(5 -gtagttcacttgctaaggc-3), 引物 S2 (5 -atgaatgccacggctca-3); 94°C, 5 min, {变性: 94°C, 30 s; 退火: 50°C, 30 s; 延伸: 72°C, 135 s, 25 轮循环}, 72°C, 10 min; 4°C。

(6) cDNA 亚克隆: 制备好的双链 cDNA 插入到载体系统 pGEM[®]-T Easy 上, 转化受体菌 XL1-Blue。再将 APH 基因亚克隆到 pET22b(+)的 *Nde* I 和 *Bam*H I 位点上, 然后转化表达菌大肠杆菌 Rosetta(DE3), 筛选阳性菌株。

1.2.2 氨基酶 H 的表达

将阳性菌 Rosetta(DE3)接种 20 mL LB 培养液(氨苄青霉素终浓度为 50 mg/L), 37°C 活化过夜, 按 1:50 接种量接种新鲜 LB 培养液 500 mL, 37°C 生长 2 h 后(菌体浓度 A_{600} 约为 0.8), 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37°C 诱导 6 h, 取 1 mL 诱导培养物离心, 回收的菌体加入 50 μ L 蒸馏水和同体积 SDS-

PAGE 样品处理液, 沸水浴加热 5 min, 12.5% SDS-PAGE。取 400 mL 诱导培养物用于 APH 的纯化。

1.2.3 重组氨肽酶 H 的分离纯化

来源于鸡的氨肽酶 H 基因通过基因重组在 Rosetta 菌株中表达, 经过以下六个步骤对表达产物进行分离纯化, 最终达到了电泳纯。纯化产物将用于进一步分析研究。整个纯化过程主要使用缓冲液 A, 组成为 10 mmol/L Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 mol/L NaCl, 0.02% NaN_3 , 1 mmol/L EDTA- Na_2 。

(1) 粗提取: 经诱导表达的宿主菌通过离心收集、清洗后用 0.1 mol/L NaCl 的缓冲液 A 重悬, 在冰水浴中用超声波破碎仪对菌体进行充分的破壁处理, 破碎液经 4000 r/min 20 min 离心去除菌体碎片, 再经过 12 000 r/min 20 min 离心去除不溶组分, 上清液即为粗酶液。

(2) 硫酸铵分级沉降: 粗酶液经硫酸铵分级沉降收集硫酸铵饱和度为 35%~45% 的组分, 每次加入硫酸铵充分溶解, 调 pH 8.0, 静置 1 h, 12 000 r/min 20 min 离心分离沉淀与可溶组分, 该阶段沉淀用缓冲液 A 溶解, 经 12 000 r/min 20 min 离心收集上清。

(3) Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱: 上清液应用于 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱(1.6 cm × 50 cm), 洗脱液为缓冲液 A(0.15 mol/L NaCl), 流速 30 mL/h, 收集第一个洗脱峰中的活性组分。

(4) Toyopearl DEAE 650C 离子交换色谱: 上一步收集的酶溶液应用于 Toyopearl DEAE 650C 离子交换柱(1.6 cm × 10 cm), 洗脱液为缓冲液 A(0.15~0.30 mol/L NaCl), 流速 120 mL/h, 采用阶段洗脱, 每阶段洗脱液体积三倍于柱体积, 收集 NaCl 浓度为 0.16~0.20 mol/L 阶段洗脱下的活性组分。

(5) 硫酸铵沉降富集浓缩: 将上一步的酶溶液用硫酸铵调节到饱和度 70%, 充分静置, 12000 r/min 20 min 离心收集沉淀, 沉淀用少量缓冲液 A 重新溶解, 离心收集上清, 达到快速富集浓缩的目的。

(6) Sephacryl S-300 凝胶过滤色谱: 上一步得到的上清液应用于 Sephacryl S-300 凝胶过滤柱(2.5 cm × 80 cm), 洗脱液为缓冲液 A(50 mmol/L Tris/HCl, pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl), 流速 60 mL/h, 收集含氨肽酶活力的组分。

1.2.4 酶活力检测

氨肽酶活力的检测根据 Matsutani 等人的方

法^[5]。底物为萘胺的氨基酸衍生物 L-亮氨酸- β -萘胺, 即 LeuNap。在 pH 8.0 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中(总体积 0.8 mL), 酶与 0.5 mmol/L 底物在 37°C 作用 20 min, 立即加入 0.8 mL 含 0.23 mol/L HCl 的乙醇充分混匀终止反应, 再加入 0.8 mL 0.06% 的 DMACA (二甲氨基肉桂醛)进行显色反应, 此时 DMACA 会与经过酶反应释放的游离 β -萘胺结合成红色物质, 30 min 后此红色物质可在 540 nm 用分光光度法检测。酶活力定义为: 每分钟增加 0.001 的 A_{540} 为 1 个活力单位, 1 u。在纯化过程中, 色谱分离收集的每管样品活力检测如下: 取 10 μL 酶溶液至 96 孔板微孔中, 加 70 μL 底物 37°C 反应 20 min, 80 μL 终止剂终止反应, 80 μL 显色剂显色, 酶联检测仪测定 A_{540} 。活力定义: 每分钟催化底物增加 0.001 A_{540} 为一个活力单位。内切酶活力检测方法: 以 BANA 为底物, 方法与外切酶活力检测方法相似, 底物由 BANA 取代 LeuNap。

1.2.5 蛋白质含量测定

280 nm 处的紫外吸收值用于色谱过程检测蛋白质洗脱峰。纯化各步骤的蛋白质浓度测定采用 Lowry 等人的 Folin-酚法, 牛血清白蛋白(BSA)作为定量标准。

1.2.6 SDS-PAGE

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳用于分析蛋白质的分子量, 分离胶浓度为 12.5%, 染色使用考马斯亮蓝 R-250。

1.2.7 酶的热稳定性

在 pH 8.0, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 酶在各种温度下保温 10 min, 然后检测残存活力。

1.2.8 最适 pH

以 LeuNap 和 BANA 为底物的酶活力检测在各种 pH 条件的缓冲液中进行, 温度均为 37°C。使用的缓冲液为广泛缓冲液。每个梯度相差 0.5 个 pH, 范围是 pH 6.0~10.0。

2 结果

2.1 APH 基因的克隆与表达质粒的构建

从鸡肝脏中提取的总 RNA 经过反转录得到了 cDNA, 再经过嵌套式 PCR 得到了目标基因片段(图 1), 经过 DNA 测序发现, 该基因片段尽管在克隆的 DNA 的第 242 个碱基有别于数据库资料 APH 的序

列(GenBank, 登录号 AB001322)——样品为 T, 资料中为 C, 但含有该碱基的三联密码子仍然编码丝氨酸, 故克隆的 DNA 所编码的氨基酸序列与数据库中资料比对完全一致(共编码 455 个氨基酸)。所以, 该 APH 基因接着被亚克隆到表达载体 pET22 b(+)的 *Nde* I 和 *Bam*H I 位点上, 然后转化进入大肠杆菌 Rosetta(DE3)进行表达。

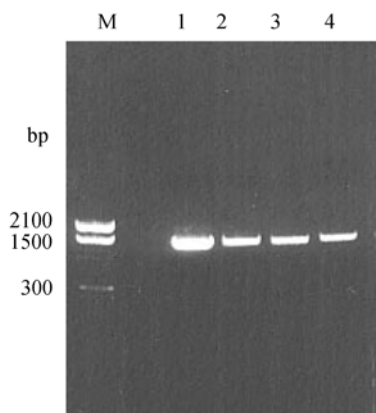


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoretic pattern of PCR product

M: ladder DNA marker; 1~3: nested PCR products;
4: second PCR product

2.2 APH 在大肠杆菌中的表达及表达产物的酶活力鉴定

含表达质粒的大肠杆菌 Rosetta(DE3), 在 37°C LB 培养基中(含氨苄青霉素终浓度 50 mg/L)培养 2 h(OD_{600} 为 0.8~1.0 h), 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 8 h, 每间隔 1 h 分别取样, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明, 经 IPTG 诱导后, 可见一分子量约为 52 kD 的明显的新增表达条带, 分子量与 APH 的理论计算值一致。根据表达条带的浓度变化趋势, 选择诱导培养 6 h 为最佳培养时间(图 2)。通过密度扫描, 重组蛋白占总蛋白的 16.7%, 表达水平约为 94.7 mg/L, 发酵液总活力达到 1636 u/L。这比 APH 在 COS 细胞中的表达状况明显改进^[11]。

诱导表达的培养物经离心收集菌体, 用磷酸盐缓冲液重悬, 超声波破壁处理, 低速离心 4000 r/min, 20 min 除去细胞碎片, 再 12 000 r/min, 20 min 离心, 上清为可溶性蛋白组分, 沉淀是不溶性蛋白组分。结果表明诱导产生的目的蛋白存在于上清中, 是可溶性蛋白(图 3)。于是对其酶活性进行检验, 以含无 APH 基因空白质粒的相同细菌培养物经同步处理得

到的上清作为对照。结果表明, 经过诱导后, 粗酶液上清的氨肽酶比活力得到很大提高, 为对照组的约 115 倍, 内切酶活性为对照组的 13 倍, 应为诱导表达产生的 APH 引起的(表 1)。

2.3 重组 APH 的分离纯化

重组 APH 的分离纯化结果见表 2, 以 400 mL 发酵液开始, APH 从粗酶液到最后纯化产物共纯化了 5.8 倍, 回收率为 19.4%, 共得到纯化产物 7.78 mg。酶活力是以 LeuNap 为底物的氨肽酶活性。最终纯化产物达到了电泳纯。各步骤组分电泳结果见图 3。

图 4 为纯化最后一步 Sephacryl S-300 凝胶过滤的色谱图。

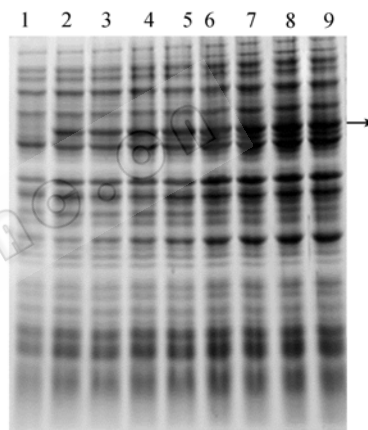


图 2 诱导表达产物浓度随时间变化的 SDS-PAGE 图
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression product during the induction period

1: total protein before IPTG induction; 2~9: total protein in 1~8 hours after IPTG induction

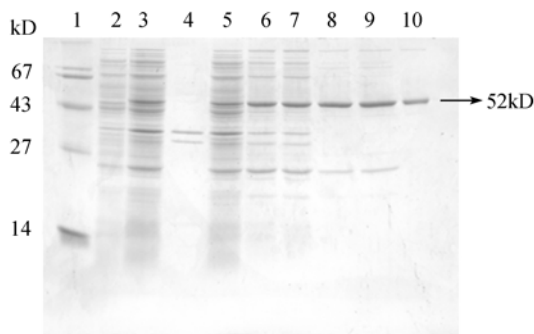


图 3 纯化各步骤 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purification products

1: marker; 2: total protein before IPTG induction; 3: total protein after IPTG induction; 4: insoluble protein; 5: soluble protein; 6: precipitate of 35%~45% Ammonium sulfate fractionation; 7: activity component in Sephacryl S-200 chromatography; 8: activity component in DEAE chromatography; 9: activity component concentrated by ammonium sulfate fractionation; 10: activity component in Sephacryl S-300 chromatography

表 1 粗酶液中的氨肽酶活性与内切酶活性

Table 1 Aminopeptidase activity and endopeptidase activity in the crude enzyme extract

Sample	Specific activity of aminopeptidase activity $A_{540}/(\text{min} \cdot \text{mg})$	Specific activity of endopeptidase activity $A_{540}/(\text{min} \cdot \text{mg})$
Experimental group	2.448	0.041
Control group	0.021	0.003

The strain in the experimental group is with APH gene inserted. The strain in the control group is without APH gene inserted.

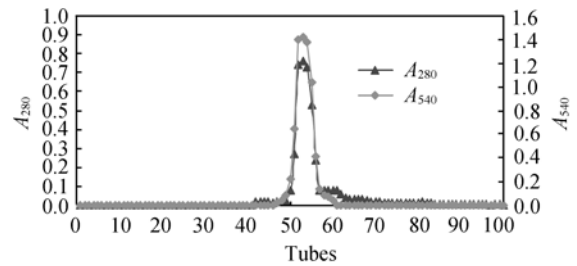


图 4 Sephacryl S-300 凝胶过滤色谱图

Fig. 4 Gel filtration chromatography of APH by Sephacryl S-300

Column $\Phi=2.5\text{cm} \times 80\text{ cm}$, 1.0 mL/min, 4 mL/fraction

表 2 重组 APH 的纯化各步骤

Table 2 Purification of recombinant aminopeptidase H from crude enzyme extract

Purification step	W(total protein)/mg	Total activity/u (A_{540}/min)	Specific activity $A_{540}/(\text{min} \cdot \text{mg})$	Purification fold	Yield/%
1. Crude enzyme extract	234.08	654.4	2.8	1	100.0
2. 35%~45% ammonium sulfate fractionation	80.89	567.2	7.0	2.5	86.7
3. Sephacryl S-200 gel filtration chromatography	50.74	339.8	6.7	2.4	51.9
4. DEAE ion exchange chromatography	13.32	194.4	14.6	5.2	29.7
5. 70% ammonium sulfate fractionation	10.94	166.6	15.2	5.4	25.4
6. Sephacryl S-300 gel filtration chromatography	7.78	126.8	16.3	5.8	19.4

2.4 APH 部分性质的表征

2.4.1 分子量

SDS-PAGE 表明, 新增条带分子量为 52 kD, 为单个亚基分子量, 与理论值 52 688 D 一致。重组 APH 在凝胶过滤色谱 Sephacryl S-200 中从洗脱穿透峰中洗出, Sephacryl S-200 的分离范围是 5~250 kD; 重组 APH 在凝胶过滤色谱 Sephacryl S-300 中后于洗脱穿透峰洗出, Sephacryl S-300 的分离范围是 10~1500 kD, 因此可以判断重组 APH 的实际分子量应介于 250 kD 和 1500 kD。进一步根据醛缩酶 (150 kD)、牛血清白蛋白(67 kD)、卵清蛋白(43 kD)、

溶菌酶(12.4 kD)在 Sephacryl S-300 上的洗脱体积对重组 APH 进行分子量标定表明其分子量大小为 369 kD, 而单体分子量为 52 kD, 可见其并非单体分子, 应为多亚基聚合物, 与天然 APH 的分子量 400 kD 相近^[5]。

2.4.2 酶的热稳定性

在 pH 8.0, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 酶在各种温度下保温 10 min, 然后检测残存活力 (LeuNap、BANA 底物)。结果表明直到 60 酶保持较好的稳定性, 但当温度升高到 65 时大部分酶活力丧失 (图 5A)。这一点与从鸡肉中分离纯化得到的 APH 一致^[5]。

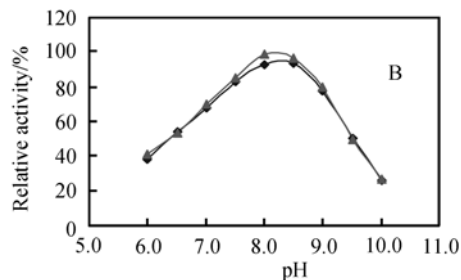
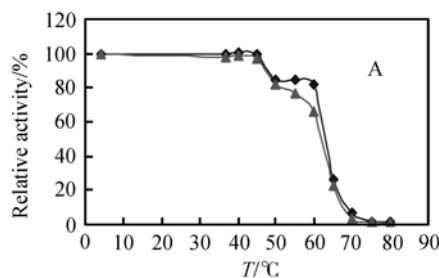


图 5 重组氨肽酶 H 的热稳定性(A)与最适 pH(B)曲线

Fig. 5 Heat and pH stability of recombinant APH

Aminopeptidase activity against substrate LeuNap; Endopeptidase activity against substrate BANA

2.4.3 最适 pH

以 LeuNap、BANA 为底物的酶活力检测在各种 pH 的缓冲液中进行, 温度均为 37 。结果表明最适 pH 为 pH 8.0~8.5(图 5B)。相对百分活力以酶在磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0, 37)中的活力值为 100%。最适 pH 比从鸡肉中分离纯化得到的 APH 高 0.5 个 pH, 后者最适 pH 为 8.0(磷酸盐缓冲液)^[5]。

3 讨论

氨基酶 H 作为一种氨基内肽酶广泛分布于各种哺乳动物组织中, 其重要特点是与组织蛋白酶 H 一样同时具有氨基酶和肽链内切酶的活性。氨基酶 H 在鸡骨骼肌中分离得到后, 有研究对氨基酶 H 基因进行克隆并在哺乳动物细胞 COS7 中进行了表达, 但表达水平较低。本文利用原核表达系统高水平地表达了重组氨基酶 H, 重组蛋白占总蛋白的 16.7%, 表达水平高达 94.7 mg/L, 发酵液氨基酶总活力达到 1636 u/L。

在本研究中, 氨基酶 H 基因被成功地克隆, 并以 pET22b(+)为载体进行了重组质粒的构建, 而后转化到了大肠杆菌 Rosetta(DE3)中。克隆的 DNA 所编码的氨基酸序列与数据库中资料比对完全一致。研究中选用的表达菌株 Rosetta(DE3)是 BL21 衍生菌, 能明显增强带有大肠杆菌稀有密码子的真核蛋白的表达, 实验结果显示, 表达的重组蛋白具有高度的可溶性, 在大量表达的情况下未出现包涵体。

本研究中进行了 APH 的重组表达, 由于表达获得的目的蛋白含量远远高于天然来源的材料, 可以很方便的从少量发酵液中纯化获得大量的目的蛋白, 节省了材料, 降低了纯化难度。为进一步研究 APH 结构、催化机制及生物学功能提供了物质来源, 并可以此为基础将其应用到需要多肽水解酶的场合。另外, 实验表明在纯化过程中使用蛋白酶抑制剂 EDTA 有利于减少 APH 的活性损失(APH 不受 EDTA 的抑制)。尽管在实验过程中使用了低温、蛋白酶抑制剂等手段尽量减少酶活力的损失, 但随着纯化流程的增加, 总的氨基酶活力损失也增大, 因此更快速有效的纯化方法将有利于获得更多高纯度的目的蛋白用于后续研究。

此次重组表达得到的 APH 和天然来源的 APH^[5] 在热稳定性和最适 pH 两种性质上基本保持一致。重

组 APH 的单体分子量与理论值一致, 通过凝胶过滤层析判断其实际分子量远大于单一亚基, 是多亚基聚合体, 这一点也与天然 APH 相符合。与天然来源分离得到的 APH 相同, 重组 APH 也同时具有氨基酶活性和内切酶活性。以上酶学特征表明具有酶活力的重组 APH 在大肠杆菌中成功得到了表达与纯化。基因重组制备的重组 APH 将进一步用于蛋白质分子结晶等分子结构与酶催化机制的研究。

REFERENCES

- [1] Okitani A, Nishimura T, Otsuka U, *et al.* Purification and properties of BANA hydrolase H of rabbit skeletal muscle, a new enzyme hydrolyzing α -N-benzoylarginine- β -naphthylamide. *Agric Biol Chem*, 1980, **44**: 1705-1708.
- [2] Okitani A, Nishimura T, Kato H. Characterization of hydrolase H, a new muscle protease possessing aminoen-dopeptidase activity. *Eur J Biochem*, 1981, **115**(22): 269-274.
- [3] Nishimura T, Okitani A, Katakai R, *et al.* Mode of action towards oligopeptides and proteins of hydrolase H, a high-molecular-weight aminoen-dopeptidase from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 1983, **137**(11): 23-27.
- [4] Nishimura T, Rhyu MR, Kato H. Purification and properties of aminopeptidase H from porcine skeletal muscle. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**: 1779-1786.
- [5] Khyu MR, Nishimura T, Kato Y, *et al.* Purification and properties of aminopeptidase H from chicken skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 1992, **208**: 53-59.
- [6] Nishimura T, Rhyu MR, Kato H, *et al.* Purification and properties of aminopeptidase H from bovine skeletal muscle. *J Agric Food Chem*, 1994, **46**: 2709-2712.
- [7] Botbol V, Scornik OA. Role of bestatin-sensitive exopeptidase in the intracellular degradation of hepatic proteins. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 13504-13509.
- [8] Nyberg F, Thornwall M, Hetta J. Aminopeptidase in human CSF which degrades delta-sleeping inducing peptide (DSIP). *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **167**: 1256-1262.
- [9] Matsuishi M, Saito G, Okitani A, *et al.* Purification and some properties of cathepsin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003, **35**: 474-485.
- [10] Zeng GZ, Tan NH, Jia RR, *et al.* Cathepsins: structures, functions and inhibitors. *Acta Botanica Yunnanica*, 2005, **27**(4): 337-354.
曾广智, 谭宁华, 贾锐锐, 等. 组织蛋白酶及其抑制剂研究进展. 云南植物研究, 2005, **27**(4): 337-354.
- [11] Adachi H, Tsujimoto M, Fukasawa M, *et al.* cDNA cloning and expression of chicken aminopeptidase H, possessing endopeptidase as well as aminopeptidase activity. *Eur J Biochem*, 1997, **245**: 283-288.