

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2020.04.008

文章编号:2095-6002(2020)04-0063-07

引用格式:易国富,张健,李赫,等.大豆肽对果蝇睡眠的影响[J].食品科学技术学报,2020,38(4):63-69.

YI Guofu, ZHANG Jian, LI He, et al. Effects of soybean peptide on sleep in *Drosophila* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(4): 63-69.

大豆肽对果蝇睡眠的影响

易国富¹, 张健¹, 李赫¹, 刘新旗^{1,*}, 尹利端²

(1.北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心/北京食品营养与人类健康高精尖创新中心/食品与健康学院,北京 100048; 2.烟台新时代健康产业有限公司,山东烟台 264006)

摘要:研究大豆肽(soybean peptides, SBP)对果蝇睡眠的影响。通过大豆分离蛋白酶解,制得SBP,选择20日的雄性果蝇,分为4组,无添加的培养基作为空白组,SBP分为2、4、8 mg/mL 额外添加到培养基作为3个实验模型组,通过VideoTrack动物行为分析系统监测果蝇睡眠时长,并检测SBP对果蝇脑部生物钟基因(*per*、*tim*、*clk*、*cyc*)与参与调控睡眠神经递质合成限速酶的基因(*gad*、*tph*、*gdh*、*hdc*)以及五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的影响。研究发现,在监测睡眠的第2日晚上,SBP对果蝇睡眠延长效果最好,并呈现剂量依赖性,又通过剥离取头,分析其生物钟基因(*per*、*tim*、*clk*、*cyc*)和神经递质合成限速酶基因(*gad*、*tph*、*gdh*、*hdc*),得到SBP是通过调节*tim*和*tph*的基因表达并提高5-HT在脑部的含量来延长果蝇的睡眠时长的结论。

关键词:大豆肽;果蝇;生物钟基因;神经递质合成酶基因;五羟色胺**中图分类号:** TS201.4**文献标志码:** A

人类三分之一的时间是在睡眠中度过的,睡眠是人体的一种主动过程,可以恢复精神和解除疲劳。充足的睡眠、均衡的饮食和适当的运动,是国际社会公认的健康标准。目前全球有三分之一的人患有睡眠障碍^[1]。据2019年3月21日“世界睡眠日”的报道,我国目前约有38.5%的人患有睡眠障碍,并且睡眠障碍人群中女性是男性的1.5~2.0倍,而40%~70%的老年人患有睡眠障碍^[2]。中国已经步入老龄化社会,研究报道老年人相较于年轻时候,其消化和吸收的蛋白酶下降了30%~50%^[3-4],而作为宏观营养素的蛋白质在人体承担着各种生理活性的调节作用,其摄入不足容易引起人体“负氮平衡”,最终导致各种常见的老年人健康问题,如睡眠障碍、记忆力下降、肌肉萎缩、免疫力下降等^[5-9]。

大豆蛋白质是优质蛋白质,其所含的必需氨基酸种类齐全、比例适当,经过蛋白酶水解或微生物发酵,再经过超滤膜分离和喷雾干燥等工艺处理得到肽的混合物,其平均分子量分布低于1 000 Da^[10]。大豆肽(soybean peptides, SBP)相较于大豆蛋白和游离氨基酸,在提供氨基酸方面具有吸收速度快、载体不饱和、易溶于水、无抗原性、生物活性高等特点^[11]。生物活性肽具有抗氧化、降血压、减脂、免疫调节、降糖、抗癌等功能特性,是目前研究的一个热点^[12-13]。

自Morgan首创性地在遗传学上研究果蝇^[14],如今,果蝇已成为遗传学研究的新宠。与其他模式生物相比,果蝇易繁殖、操作便捷、生命周期短(25℃,40~60 d),且果蝇的基因与人类的基因同源性高达80%^[15]。果蝇在20 d以后,表现出老年

收稿日期:2020-03-30

基金项目:“十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0400401)。

第一作者:易国富,男,博士研究生,研究方向为功能蛋白。

*通信作者:刘新旗,男,教授,主要从事功能性蛋白方面的研究。

人的睡眠特征^[16],因此,利用果蝇遗传学的优势,在20 d时研究果蝇的睡眠对老年人睡眠具有重要的参考意义。果蝇睡眠的调控是通过生物钟系统和神经递质系统协同作用完成的^[17]。目前,研究报道了果蝇的十多个生物钟基因,其中 *period* (*per*)、*timeless* (*tim*)、*clock* (*clk*)、*cycle* (*cyc*) 4 个为核心的钟基因^[18]。调控睡眠的神经递质,主要有促进睡眠的 γ -氨基丁酸 (GABA)、5-羟色胺 (5-HT), 促进觉醒的谷氨酸 (Glu) 和组胺 (His)^[19-21], 以及果蝇脑内 GABA 的限速酶——谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD)、5-HT 的限速酶——色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase, TPH)、Glu 的限速酶——谷氨酸脱氢酶 (glutamic dehydrogenase, GDH)、His 的限速酶——组氨酸脱羧酶 (histidine decarboxylase, HDC)^[22]。

本研究以果蝇为实验模型,采用动物行为分析系统监测 SBP 对 20 日龄雌性处女果蝇睡眠行为的影响,并检测 SBP 对生物钟基因 (*per*、*tim*、*clk*、*cyc*) 与参与调控睡眠神经递质合成限速酶的基因 (*gad*、*tph*、*gdh*、*hdc*) 的影响,旨在探索 SBP 对老年果蝇睡眠营养干预的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白,山东御馨生物科技有限公司;碱性蛋白酶(200 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg),上海源叶生物科技有限公司;野生型 Canton S 品系黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*),北京大学生命科学学院;TRIzol 试剂,美国 Life Technologies 公司;M-MLV 逆转录酶试剂盒,美国 Progema 公司;5-HT ELISA 试剂盒,中国江莱生物;SYBR Green Mix PCR 试剂盒,赛默飞世尔(中国)公司。

1.2 仪器与设备

人工气候培养箱,德国 Binder 公司;VideoTrack 动物行为分析系统,法国 Viewpoint 公司;Milli-Q Integral 5 型纯水仪,美国 Millipore 公司;Alpha1-2LD 型冷冻干燥机,德国 Christ 公司;LightCycler96 型 RT-qPCR 仪,瑞士 Roche 公司;LC20A 液相(色谱柱为 TSK-GEL G2000SWXL, (7.8 mm × 300 mm × 5 μ m)),日本 Shimadzu 公司;0.22 μ m 陶瓷微滤膜、2 000 Da 超滤膜,江苏久吾高科技股份有限公司;YXQ-LS-75S II 型高压灭菌器,上海博讯实业有

限公司;Infinite 200 Pro Nanoquant 型酶标仪,瑞士 Tecan 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SBP 的制备

配置 $w = 2\%$ 大豆分离蛋白 (soybean protein isolate, SPI) 水溶液,按照 4 000 U/g 的加酶量添加酶,分别添加碱性蛋白酶和中性蛋白酶,反应温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7、反应时间 4 h。然后在温度 85 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下灭活 15 min,用陶瓷微滤膜和超滤膜过滤,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、60 MPa 条件下过滤,得到的滤液在 -40 $^{\circ}\text{C}$ 、压强 12 Pa、时长 30 h 的条件下冷冻干燥,得到 SBP。SBP 的制备过程见图 1。

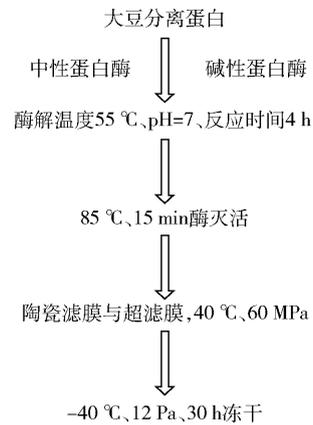


图1 大豆肽的制备流程

Fig. 1 Preparation process of soybean peptides

1.3.2 SBP 分子量分布的测定

通过凝胶过滤色谱法在 LC20A 上进行测量。使用的色谱柱为 TSK-GEL G2000SWXL (300 mm × 7.8 mm × 5 μ m)。制备的肽质量浓度为 1 mg/mL,所有用于测量分子量的标准品质量浓度均为 1 mg/mL。进样前,样品和标准品均通过 0.22 μ m 过滤器过滤。进样量为 20 μ L,流动相 $V(\text{水}):V(\text{乙腈}):V(\text{三氯乙酸}) = 80:20:0.1$,流速为 0.5 mL/min,检测波长为 220 nm。

1.3.3 果蝇基础培养基的配置

将培养瓶和指管清洗干净,与橡胶塞一同放入灭菌锅中灭菌,温度 120 $^{\circ}\text{C}$,时间 30 min。冷却后在紫外灯下照射 30 min。在 5 L 的电饭煲中首先加入蒸馏水 1.65 L,加入蔗糖 31.62 g、葡萄糖 63.24 g、酵母 32.19 g、琼脂 10.6 g,并不断搅拌升温煮沸,加入玉米粉 77.7 g,再煮 15 ~ 20 min,保温 15 min (保温 13 min 时加入山梨酸钾 2 g,无水氯化钙 0.726 g),充分搅匀,并将其通过食物注入枪注入指

管中,每个指管装 6.5 mL,在紫外灯下照射 30 min;注入培养瓶中,每个培养瓶 25 mL,在紫外灯下照射 30 min。然后盖上橡胶塞,并放在 4 ℃ 的冰箱中待用^[23]。

1.3.4 果蝇的睡眠监控

取 20 日龄雄性果蝇在二氧化碳麻醉台上麻醉后,分为 4 组,每组 32 只,其中一组为空白组,另外 3 组添加 2、4、8 mg/mL 的大豆低聚肽。剂量设定是根据成年人体重 70 kg 的每日蛋白质需求是 60 ~ 70 g 粗蛋白,作为优质蛋白源营养补充约每日需要 10 g/d 的量,优质蛋白补充系数为 1/7^[10]。培养基配方中蛋白质的含量约为 29 mg/mL,故大豆低聚肽作为优质蛋白源添加到培养基的量为 4 mg/mL 的剂量,在 4 mg/mL 的基础上试验添加了 2 mg/mL 和 8 mg/mL 浓度梯度进行研究^[24-25],分别为高剂量组 (8 mg/mL)、中剂量组 (4 mg/mL)、低剂量组 (2 mg/mL)。每个监测管中装 1 只果蝇,一端塞上能透气的海绵,另一端附上 0.5 cm 的培养基或额外添加 SBP 的培养基并用蜡封以防止失水风干。采用动物行为分析系统 VideoTrack,在 12/12 h 明暗的条件下监测果蝇睡眠,20 日龄 21:00 放入检测管中,先让果蝇适应 12 h,分析数据从第 21 日 9:00 至第 26 日 9:00 的睡眠数据,把监测玻璃管固定到检测板上,每 5 min 记录一次数据,如图 2。

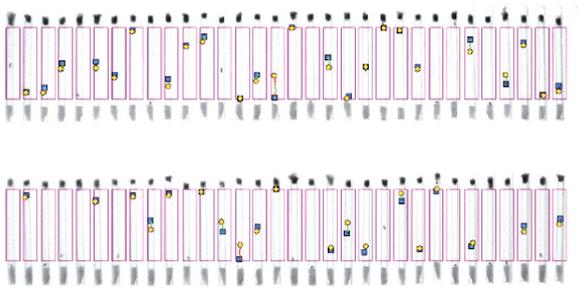


图 2 果蝇在动物行为分析系统中的睡眠监控图

Fig. 2 *Drosophila* sleep monitoring chart in animal behavior analysis system

1.3.5 果蝇头部取样

选取日龄 20 日龄雄性果蝇,在当日 21:00,在培养基中(共 4 个组:空白组和 SBP 的 3 个剂量组,每组 50 只)培养 48 h 后,即 22 日晚上 21:00,取待测果蝇通过二氧化碳麻醉,并装在冻存管,迅速放入液氮罐中,5 min 后取出迅速用力摇晃,使其充分破碎,倒入 40 目的实验室标准筛(筛子提前用液氮冷却),筛子截留的就是果蝇的躯体,筛子下方放白

纸,白纸上就是果蝇的头、腿、翅、触角,再将白纸上的样品倒入 20 目的筛子,筛子截留果蝇的头部。将果蝇头部置于冻存管中,放入液氮备用。

1.3.6 果蝇头部 RNA 提取和 RT-qPCR 测量

将收集的果蝇头部样品每组 30 只,使用液氮研磨,加入 TRIzol 试剂裂解样品并根据试剂盒说明书提取果蝇头部总 RNA。将 RNA 样品 1 μg 用 M-MLV 逆转录酶试剂盒反转录为 cDNA,进一步使用 SYBR Green Mix 试剂盒进行荧光定量 PCR,使用 RT-qPCR 仪检测目的基因 mRNA 表达水平。RT-qPCR 反应程序:95 ℃ 下预变性 10 min (1 个循环),在 95 ℃ 下 10 s,60 ℃ 下 1 min 条件下进行 40 个循环扩增,收集 Ct 值数据后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析^[26],使用 GAPDH 基因作为内参。表 1 为检测使用的引物信息^[27]。

表 1 果蝇基因引物序列

Tab. 1 *Drosophila* gene primer sequences

引物名称	引物序列
<i>per</i> 上游引物	5'-ACACCATCGCGTCTTTCAGG-3'
<i>per</i> 下游引物	5'-ATTCGCGTGTTCGGGCTCTG-3'
<i>tim</i> 上游引物	5'-CAACACTACCAACCCAACGTCC-3'
<i>tim</i> 下游引物	5'-GAGCGTGTGCCGAGGTGG-3'
<i>clk</i> 上游引物	5'-ACGAGAGCGACGACAAGGATG-3'
<i>clk</i> 下游引物	5'-GGCTATCGTGGACTTCAGGACC-3'
<i>eye</i> 上游引物	5'-GCGAAAGCTGGACAAAAGTACT-3'
<i>eye</i> 下游引物	5'-CCGTTGAATGGATGTAAGCTGC-3'
<i>gad</i> 上游引物	5'-ATGTCGCTGAATCCCAACGG-3'
<i>gad</i> 下游引物	5'-TCAGCAGAACTCCCGTCTC-3'
<i>tph</i> 上游引物	5'-CTTCGCGGATATGGTGTGGT-3'
<i>tph</i> 下游引物	5'-TTGAATCCTGGATGGTCCGGC-3'
<i>gdh</i> 上游引物	5'-GAACCTGAACCACGTCTCTGT-3'
<i>gdh</i> 下游引物	5'-TCCAGGGACTTTGAACGGA-3'
<i>hdc</i> 上游引物	5'-AACTCCATGCCTTCCCTAC-3'
<i>hdc</i> 下游引物	5'-CCCAGCCAGTTCATCACTA-3'
<i>gapdh</i> 上游引物	5'-GGTCCTTCGGCAAACCTG-3'
<i>gapdh</i> 下游引物	5'-CCTTAGCCTTGATCTCATCGTA-3'

1.3.7 果蝇头部 5-HT 的测量

从液氮罐中取出装有果蝇头的冻存管,每组 30 只,加入 0.5 mL 的生理盐水,匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清,使用 5-HT ELISA 试剂盒,每组 3 个平行,在酶标仪 450 nm 的波长下测量。

1.4 统计分析方法

所有实验重复3次,结果表示为平均值 \pm 标准偏差。使用SPSS 16软件通过单向方差分析所有数据。统计学分析时,认为 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为较显著差异, $P < 0.001$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 SBP的分子量分布

通过凝胶过滤色谱法测定SBP的分子量分布。见表2,观察到分子量186~1 000 Da的比例为84.58%,平均分子量约为722.37 Da,由约2~5个氨基酸组成。

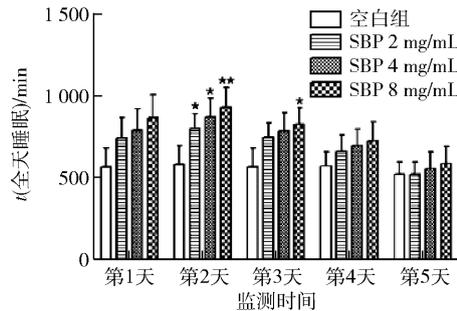
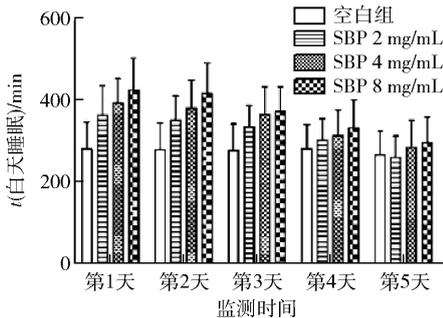
表2 大豆肽的分子质量分布

Tab.2 Molecular weight distribution of soybean peptides

分子质量/Da	积分面积/%	比例/%	平均分子质量/Da
>3 000	0.52		
1 500~3 000	1.19	14.93	
1 000~1 500	13.22		722.37
500~1 000	61.23		
186~500	23.25	84.58	
<186	0.59	0.58	

2.2 SBP对果蝇睡眠时长的影响

以没有添加SBP的培养基喂养的果蝇为空白



与空白组比较,*表示显著差异 $P < 0.05$,**表示较显著差异 $P < 0.01$ 。

图3 大豆肽对果蝇睡眠时长的影响

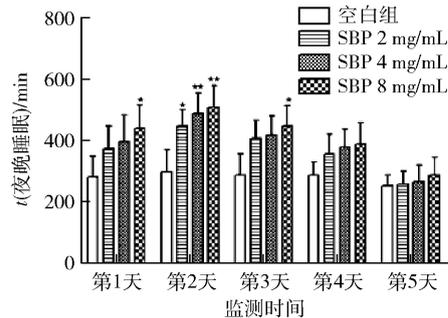
Fig.3 Effect of soybean peptides on sleep duration of *Drosophila*

组,在空白组中额外加入SBP(2、4、8 mg/mL),研究对雄性果蝇睡眠时长的影响,见图3。由图3a可知,与空白组相比,SBP的3个剂量组均能延长果蝇白天的睡眠时长且随剂量的升高而升延长,呈现浓度依赖性,尤其是高剂量组延长效果最好,但3个剂量组相对于空白组都无显著性差异。由图3b可知,与空白组相比,第2天,SBP的低、中、高三个剂量组均能显著($P < 0.05$)提高睡眠时长,中剂量、高剂量能较显著($P < 0.01$)提高睡眠时长。在第1天、第3天高剂量显著($P < 0.05$)提高睡眠时长。由图3c可知,果蝇全天睡眠的分析中,与空白组相比,SBP的低剂量和中剂量组显著($P < 0.05$)延长果蝇的睡眠时长,高剂量组较显著($P < 0.01$)延长了果蝇的睡眠时长,第3天高剂量组显著($P < 0.05$)延长了果蝇的睡眠时长。

在添加SBP之后的前3天中,第2天效果最显著能延长睡眠时长,随着时间的延长,到了第4天、第5天SBP不再延长果蝇的睡眠时长,这可能是由于SBP在潮湿的环境下已经变质,有文献报道肽类物质相较于蛋白质和氨基酸更易被微生物利用^[28]。因此,在20日额外添加SBP,睡眠时长延长,最佳时效是48~60 h,最佳剂量为8 mg/mL。

2.3 SBP对果蝇生物钟基因的营养调节

果蝇的睡眠4个核心钟基因(*per*、*tim*、*clk*、*cyc*)



和其他钟基因及其编码蛋白组成了互相转录-翻译反馈环路以驱动其昼夜节律,并且在果蝇和哺乳动物之间保持一致,见图4^[29]。图4显示,首先DNA结合异二聚体CLK/CYC(*clk*和*cyc*转录而来)与靶标启动子中的E-box序列(通常为CACGTG)结合以激活基因*per/tim*,并转录表达形成PER/TIM蛋白二聚体,在傍晚光线消失后开始大量转录形成,到午夜的时候,达到顶峰,随后,PER/TIM蛋白二聚体,慢慢解离,并进入细胞核中,通过CK2、SGG、PP2A、PPI,调节形成PER和TIM的磷酸化并与DBT结合抑制DNA结合CLK/CYC,并与靶标启动子中的E-box序列结合,抑制激活*per/tim*基因的转录。抑制CLK/CYC转录激活(白天)和抑制PER/TIM(夜晚),完成整个昼夜的睡眠/觉醒的调节循环^[29]。

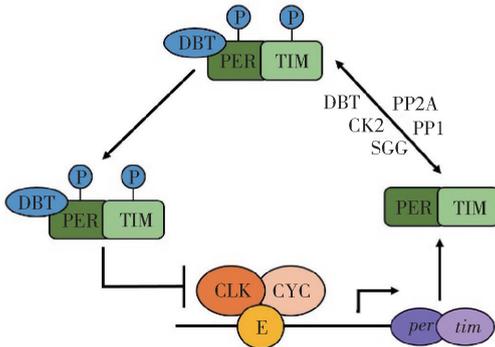


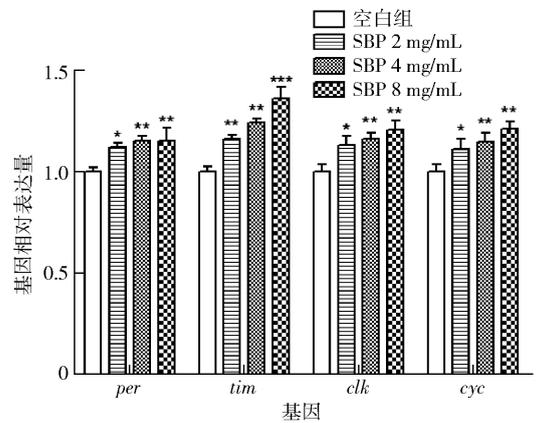
图4 *cyc/clk*和*per/tim*的调节反馈回路图

Fig. 4 Feedback loop of *cyc/clk* and *per/tim*

SBP对果蝇睡眠调控生物基因的影响见图5, SBP的3个剂量组均显著上调*per*、*tim*、*clk*、*cyc*基因的表达水平。SBP的中剂量组对果蝇的4个核心钟基因均较显著上调($P < 0.01$),低剂量组只对*tim*基因较显著上调($P < 0.01$),对*per*、*clk*、*cyc*这3个基因只是显著上调;相较于空白组,果蝇睡眠基因的影响尤其是*tim*基因上调效果最好,低剂量和中剂量SBP均较显著上调($P < 0.01$),尤其是高剂量SBP极显著上调了*tim*基因($P < 0.001$)。这说明SBP的摄入可能对果蝇的*tim*基因影响更敏感,从而促进PER/TIM蛋白二聚体的形成,以延长睡眠时长。

2.4 SBP对果蝇睡眠调控相关神经递质合成基因的营养调节

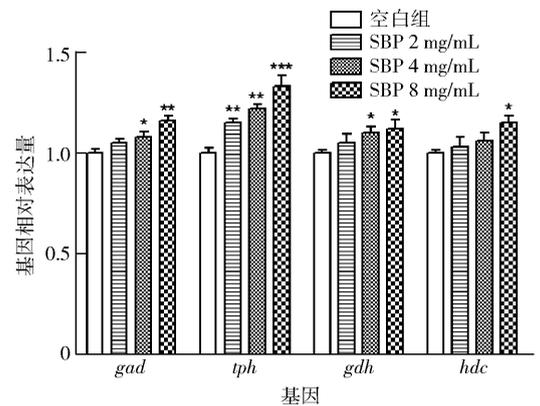
SBP对果蝇睡眠调控相关神经递质合成基因的影响见图6,相较于空白组,SBP的高剂量组对*gdh*和*hdc*的基因表达水平均显著上调($P < 0.05$),对*gad*的基因表达水平较显著上调($P < 0.01$),对*tph*的基因表达水平极显著上调($P < 0.001$)。



与空白组比较,*表示显著差异 $P < 0.05$,**表示较显著差异 $P < 0.01$,***表示极显著差异 $P < 0.001$ 。

图5 大豆肽对果蝇睡眠调控生物基因的影响

Fig. 5 Effect of soybean peptides on sleep-regulating biological genes of *Drosophila*

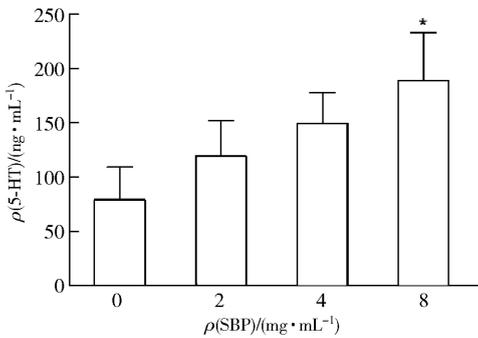


与空白组比较,*表示显著差异 $P < 0.05$,**表示较显著差异 $P < 0.01$,***表示极显著差异 $P < 0.001$ 。

图6 大豆肽对果蝇睡眠调控相关神经递质合成基因的影响

Fig. 6 Effect of soybean peptides on sleep regulation-related neurotransmitter synthesis genes of *Drosophila*

大豆肽对果蝇脑部五羟色胺含量的影响见图7,SBP的中剂量组对*gad*和*gdh*均显著上调($P < 0.05$),*tph*较显著($P < 0.01$)上调,而对*hdc*的影响无统计学意义。SBP的低剂量组只对*tph*基因上调较显著($P < 0.01$),其他3个基因影响无差异,结合图3b,第2天晚上SBP的低剂量组是显著性促进果蝇睡眠延的。因此,SBP对果蝇睡眠延长是通过上调*tph*基因的表达完成的。因此,为了进一步验证,测量了*tph*调节相关的神经递质五羟色胺的含量。由图7可知,相较于空白组,SBP高剂量组对果蝇的5-HT含量显著性升高($P < 0.05$),而低剂量和中剂



与空白组比较, *表示显著差异 $P < 0.05$ 。

图7 大豆肽对果蝇脑部五羟色胺含量的影响

Fig.7 Effect of soybean peptides on content of serotonin in *Drosophila* brain

量组对五羟色胺含量都有升高。SBP 在对小鼠睡眠延长实验中,促进了五羟色胺的分泌并显著提高了小鼠的褪黑素含量导致小鼠睡眠延长^[30],这与 SBP 对果蝇睡眠延长影响一致,又据文献报道,升高果蝇五羟色胺的含量可较大程度促进果蝇睡眠^[31-32]。故而,SBP 是通过上调果蝇脑内 5-HT 的限速酶 TPH 表达,进而提高 5-HT 含量来促进果蝇睡眠。

3 结论

在研究老年果蝇睡眠实验中,研究发现 SBP 的 3 个剂量组(2、4、8 mg/mL)对其睡眠时长上调最佳的时间为第 2 日的晚上,即加入 SBP 后的 48 ~ 60 h 之间,最佳剂量 8 mg/mL。通过核心钟基因(*per*、*tim*、*clk*、*cyc*)的测定,得到响应最强的是 *tim* 基因,因此,SBP 促进果蝇睡眠是上调了 *tim* 基因表达提高 PER/TIM 蛋白二聚体含量来促进果蝇夜晚睡眠的。SBP 对果蝇脑中 γ -氨基丁酸、五羟色胺、组胺和谷氨酸合酶基因 *gad*、*tph*、*gdh*、*hdc* 的表达水平的影响中,只有低剂量组显著上调了 *tph* 基因表达,进而又测定了 5-HT 的含量,研究表明,SBP 提高了果蝇脑内 5-HT 的含量。因此 SBP 是通过上调 *tim* 基因,提高转录形成 PER/TIM 蛋白二聚体,进而上调 TPH 的酶活,增加 5-HT 的含量来延长果蝇的睡眠。后续将 SBP 对果蝇的睡眠影响机制进行更深入的研究,为 SBP 对睡眠的影响提供更多的科学依据。

参考文献:

[1] XI L, PEDRO F, REINDER H, et al. Actigraphy-based sleep/wake detection for insomniacs[C]// IEEE Interna-

tional Conference on Wearable & Implantable Body Sensor Networks. Eindhoven, the Netherlands; IEEE, 2017.

[2] MINER B, KRYGER M H. Sleep in the aging population [J]. *Sleep Medicine Clinical*, 2017, 12(1): 31-38.

[3] MILAN A M, CAMERON-SMITH D. Digestion and post-prandial metabolism in the elderly [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2015, 76: 79-124.

[4] GREENBERG R E, HOLT P R. Influence of aging upon pancreatic digestive enzymes [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1986, 31(9): 970-977.

[5] COMAI S, OCHOA-SANCHEZ R, DOMINGUEZ-LOPEZ S, et al. Melancholic-like behaviors and circadian neurobiological abnormalities in melatonin MT1 receptor knock-out mice [J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2015, 18(3): 1-10.

[6] ANDERSON G, JACOB A, BELLIVIER F, et al. Bipolar disorder: the role of the kynurenine and melatonergic pathways [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, 22(8): 987-1012.

[7] KALUZNA-CZAPLINSKA J, GATAREK P, CHIRUM-BOLO S, et al. How important is tryptophan in human health? [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(1): 72-88.

[8] CHUANG H Y, HWANG J J, FANG C K. Psycho-oncologic effects of serotonin and melatonin: their functional role in plants, food, phytomedicine, and human health [M]// GOKARE A R, AKULA R. *Serotonin and Melatonin*. Florida: CRC Press, 2016: 47-56.

[9] VALENTINO R J, VOLKOW N D. Drugs, sleep, and the addicted brain [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(1): 3-5.

[10] 张健, 李雯晖, 赵博雅, 等. 大豆蛋白与大豆低聚肽对负氮平衡老年小鼠表皮创伤感染下的免疫调节作用 [J]. *食品科学*, 2018, 39(17): 145-151.
ZHANG J, LI W H, ZHAO B Y, et al. Immune modulation of soybean protein and soybean oligopeptides on epidermal trauma infection in aged mice with negative nitrogen balance [J]. *Food Science*, 2018, 39(17): 145-151.

[11] 吕育新, 梁金钟. 大豆低聚肽的研究进展 [J]. *大豆科技*, 2013(2): 37-39.
LÜ Y X, LIANG J Z. The research development of soybean oligopeptide [J]. *Soybean Science and Technology*, 2013(2): 37-39.

[12] 马文领, 秦铁军, 孙永华. 生物活性肽功能分类及研究进展 [J]. *中华损伤与修复杂志*, 2019, 14(2): 149-152.
MA W L, QIN T J, SUN Y H. The classification and advances of bioactive peptides [J]. *China Injury Repair*

- and Wound Healing, 2019, 14(2): 149–152.
- [13] ZHAO F, YU Y, LIU W, et al. Small molecular weight soybean protein-derived peptides nutriment attenuates rat burn injury-induced muscle atrophy by modulation of ubiquitin-proteasome system and autophagy signaling pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2724–2734.
- [14] 贾树彪, 李盛贤, 郭时杰. 摩尔根年谱: 果蝇遗传研究简评 [J]. 生物学杂志, 1999(3): 10–12.
- JIA S B, LI S X, GUO S J. Morgan chronicle: studies on fruit bat genetic [J]. Journal of Biology, 1999(3): 10–12.
- [15] LY S, PACK A I, NAIDOO N. The neurobiological basis of sleep: insights from *Drosophila* [J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2018, 87: 67–86.
- [16] KOH K, EVANS J M, HENDRICKS J C, et al. A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep: wake cycles [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(37): 13843–13847.
- [17] ALLADA R, CHUNG B Y. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila* [J]. Annual Review of Physiology, 2010, 72(1): 605–624.
- [18] KING A N, SEHGAL A. Molecular and circuit mechanisms mediating circadian clock output in the *Drosophila* brain [J]. European Journal of Neuroscience, 2020, 51(1): 268–281.
- [19] QIAN Y, CAO Y, DENG B, et al. Sleep homeostasis regulated by 5HT2b receptor in a small subset of neurons in the dorsal fan-shaped body of drosophila [J]. eLife, 2017(6): e26519.
- [20] SITARAMAN D, ASO Y, JIN X, et al. Propagation of homeostatic sleep signals by segregated synaptic microcircuits of the *Drosophila* mushroom body [J]. Current Biology, 2015, 25(22): 2915–2927.
- [21] CHAKRAVARTI L, MOSCATO E H, KAYSER M S. Unraveling the neurobiology of sleep and sleep disorders using *Drosophila* [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2016, 6(2): 221–253.
- [22] BECKWITH E J, FRENCH A S. Sleep in *Drosophila* and its context [J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 1–19.
- [23] 刘晓岩, 刘美玉, 卞宏生, 等. 酸枣仁皂苷 A 对果蝇睡眠影响的量效关系与时效关系研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(5): 905–907.
- LIU X Y, LIU M Y, BIAN H S, et al. Dose-effect and time-effect of jujuboside A in drosophila sleep [J]. Journal of Changchun University of Chinese Medicine, 2016, 32(5): 905–907.
- [24] 姬一兵, 朴建华, 杨晓光. 蛋白质和氨基酸参考摄入量的研究进展 [J]. 卫生研究, 2007(1): 120–124.
- JI Y B, PIAO J H, YANG X G. Advances on the level of reference nutrient intake of protein and amino acid [J]. Journal of Hygiene Research, 2007(1): 120–124.
- [25] 卞宏生. 基于果蝇模式生物的五味子醇甲改善睡眠作用及作用机制的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2011.
- BIAN H S. *Drosophila melanogaster* as a model organism for studying the effect and mechanism of schizandrin on improve sleeping [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2011.
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [27] 李志辉, 张紫燕, 张虹影, 等. 光照和周期性射频辐射对果蝇睡眠影响的研究 [J]. 军事医学, 2019, 43(5): 357–363.
- LI Z H, ZHANG Z Y, ZHANG H Y, et al. Effects of light and radiofrequency electromagnetic fields on sleep of *Drosophila melanogaster* [J]. Military Medical Sciences, 2019, 43(5): 357–363.
- [28] ERJAE Z, SHEKARFOROUSH S S, HOSSEINZADEH S. Identification of endophytic bacteria in medicinal plants and their antifungal activities against food spoilage fungi [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2019, 56(12): 5262–5270.
- [29] ALLADA R, CHUNG B Y. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila* [J]. Annual Review of Physiology, 2010, 72(1): 605–624.
- [30] YI G, SAFDAR B, ZHANG Y, et al. A study of the mechanism of small-molecule soybean-protein-derived peptide supplement to promote sleep in a mouse model [J]. RSC Advances, 2020, 10(19): 11264–11273.
- [31] 曹瑞, 张泽国, 徐富菊, 等. 四逆散对睡眠剥夺果蝇脑组织蛋白表达调节研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2015, 34(6): 20–22.
- CAO R, ZHANG Z G, XU F J, et al. Advance in the regulation on Si Ni San on brain tissue protein expressing of *Drosophila* with sleep deprivation [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2015, 34(6): 20–22.
- [32] LIU C, MENG Z, WIGGIN T D, et al. A serotonin-modulated circuit controls sleep architecture to regulate cognitive function independent of total sleep in *Drosophila* [J]. Current Biology, 2019, 29(21): 3635–3646.

Recombination Expression and Enzymatic Characteristics of Mono- and Diacylglycerol Lipase PrLip

LIU Xiaohui, LAN Dongming, WANG Yonghua*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Mono- and diacylglycerol lipase is broadly applied due to its unique substrate specificity. In this study, a putative mono- and diacylglycerol lipase gene *prlip* was identified from the genome of a food safety strain *Penicillium roqueforti*. The lipase PrLip was obtained by artificial synthesis strategy and constitutively expressed in *Pichia pastoris* X33. The lipolytic activity in the broth supernatant reached 22.26 U/mL after fermentation for 60 h at 30 °C. The lipase PrLip was purified by anion exchange chromatography with the purity greater than 90%. The optimal reaction temperature and pH of PrLip were 45 °C and 7.0, respectively, and its thermostable half-life at 40 °C was about 6 h. The lipase PrLip was characterized as a mono- and diacylglycerol lipase through hydrolysis and esterification. PrLip had a good tolerance against temperature and resistance to most surfactants, which is promising for potential application in industrial scale.

Keywords: mono- and diacylglycerol lipase; *Penicillium roqueforti*; constitutive expression; *Pichia pastoris*; enzymatic characteristic; temperature tolerance

(责任编辑:张逸群)

(上接第 69 页)

Effects of Soybean Peptide on Sleep in *Drosophila*

YI Guofu¹, ZHANG Jian¹, LI He¹, LIU Xinqi^{1,*}, YIN Liduan²

(1. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives/Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health/School of Food and Health,

Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. Yantai New Era Health Industry Co Ltd, Yantai 264006, China)

Abstract: To study the effect of soybean peptides (SBP) on sleep in *Drosophila*, SBP was prepared by proteolytic separation of soybean. 20 days-old male *Drosophila melanogaster* were selected and divided into 4 groups. The basic medium was used as a blank control group, and three experimental groups were cultured using basic medium containing 2, 4 and 8 mg/mL SBP, respectively. The sleep duration was detected by the VideoTrack animal behavior analysis system, and the effects of SBP on circadian clock genes (*per*, *tim*, *clk*, *cyc*) of *Drosophila* brain, sleep related genes of rate-limiting enzymes of neurotransmitter synthetase (*gad*, *tph*, *gdh*, *hdc*), and serotonin (5-HT) were analyzed. The results showed that SBP had the best effect on prolongation of sleep in a dose dependent manner on the second day of sleep monitoring. By stripping the head, the circadian clock genes (*per*, *tim*, *clk*, *cyc*) and neurotransmitter synthetase genes (*gad*, *tph*, *gdh*, *hdc*) were analyzed. It was found that SBP administration prolonged the sleep duration of *Drosophila melanogaster* by up-regulating the levels of *tim* and *tph* and increasing the secretion of 5-HT in the brain.

Keywords: soybean peptide; *Drosophila*; circadian clock gene; neurotransmitter synthetase gene; serotonin

(责任编辑:李 宁)