

大鵟消化系统蛋白水解酶种类和活性分析

牛红星 卜艳珍 王艳梅 姬生栋 余燕 卢全伟 徐存拴*

(河南师范大学生命科学院 新乡 453007)

摘要 采用蛋白水解酶复性电泳(G-PAGE)技术对大鵟(*Buteo hemilasius*)消化系统5种器官腺胃、胰脏、十二指肠、空肠、大肠蛋白水解酶的种类和性质进行了研究,以期研究野生鸟类的分类地位、系统演化提供基础资料。结果表明:①受pH值的影响和制约,大鵟消化系统蛋白水解酶的活性在碱性、中性与酸性条件下递减;②在酸性条件下,45 ku蛋白水解酶存在于除腺胃外的各受检器官;③pH 7.0时,腺胃、胰脏酶谱相似,均含有68、35、34、20 ku的蛋白水解酶;④pH 8.0时,空肠和十二指肠的蛋白水解酶种类最多、活性最强,分别检出8种和7种蛋白水解酶。总之,pH值对蛋白水解酶的活性有明显的制约作用,46、41 ku蛋白水解酶随着pH值的增高而失去活性,为酸性蛋白水解酶,250、206、45 ku蛋白水解酶随着pH值的增高活性逐渐增强,为碱性蛋白水解酶。十二指肠和空肠的蛋白水解酶种类多、活性强,可能为蛋白质消化的主要场所。

关键词:蛋白水解酶;活性电泳(G-PAGE);消化系统;大鵟

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)03-102-04

Analysis of Proteolytic Enzymes in Digestive System of *Buteo hemilasius*

NIU Hong-Xing BU Yan-Zhen WANG Yan-Mei JI Sheng-Dong

YU Yan LU Quan-Wei XU Cun-Shuan

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The proteolytic enzymes in glandular stomach, pancreases, duodenum, jejunum, and large intestine, in digestive system of *Buteo humiliasius* were studied with gelatine polyacrylamide gel-electrophoresis(G-PAGE) to provide basic information for studying wild birds. The activities of proteolytic enzymes became weaker with the decrease in pH. In acid environment, the 45 ku proteolytic enzyme existed in all organs examined except for glandular stomach. When the pH was 7.0, similar patterns of proteolytic enzymes existed in glandular stomach and pancreas, both showing 68, 35, 34, and 20 ku proteolytic enzymes. When pH was increased to 8.0, 8 and 7 kinds of proteolytic enzymes were observed in duodenum and jejunum respectively, and their proteolytic activities were the strongest. In summary, proteolytic enzymes in digestive organs varied evidently under different pH conditions and the proteolytic enzyme activity was affected by pH. With the pH increase, 46 and 41 ku proteolytic enzymes lose their activities, while 250, 206, and 45 ku proteolytic enzymes are alkaline proteolytic enzymes. Among the five organs in the digestive system of *B. hemilasius*, more proteolytic enzymes and high enzyme activities exist in duodenum and jejunum, where might be the main places of protein digestion.

Key words: Proteolytic enzymes; G-PAGE; Digestive system; *Buteo hemilasius*

蛋白水解酶在蛋白质水解过程中起决定作用,这一过程是生命活动必不可少的^[1]。同时蛋白水解酶不仅参与多种生理过程如细胞迁移、细胞之间相互作用、增殖和分化,还与炎症、肿瘤的浸润等病理过程密切相关^[2~4]。关于猕

基金项目:河南省自然科学基金(No. 0411032500),河南省动物学省级重点学科经费资助

*通讯作者;

第一作者介绍:牛红星,男,博士生,副教授,研究方向:鸟类学;E-mail: hongxingniu@henannu.edu.cn。

收稿日期:2005-06-25,修回日期:2006-01-21

猴、金鱼、大鲵、大鼠各器官蛋白水解酶的研究曾有报道^[5-8],但关于大鸮(*Buteo hemilasius*)消化系统蛋白水解酶的研究尚未见报道。因此,研究大鸮消化系统的蛋白水解酶,对了解大鸮的分类地位、系统演化、消化系统的功能等是十分必要的^[9]。本文采用活性电泳方法对大鸮消化系统蛋白水解酶的种类、活性、分布及 pH 依赖性进行了初步分析,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验用大鸮 2 只(冬季)来自新乡市林业局,为严重受伤个体,没有喂食,经抢救无效自然死亡,立即 4℃ 环境中取材,腺胃、胰脏、十二指肠、空肠、大肠,然后迅速放入液氮中备用。

1.2 主要化学药品 丙烯酰胺(Acrylamide,日本进口分装),甲叉丙烯酰胺(Bisacrylamide,Fluka 公司进口分装),N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED,Bio-Rad),明胶(Gelatin,Sigma),曲拉通(Triton X-100,Farco),十二烷基硫酸钠(SDS,Serva),牛血清白蛋白(BSA,Sigma),三羟甲基氨基甲烷(Tris-base,上海巴斯氏生物公司),标准分子量蛋白(Serva),考马斯亮蓝 R250(Coomassie Brilliant blue R250,Fluka 公司进口分装)。本实验所用的药品和试剂纯度为分析纯。

1.3 方 法

1.3.1 组织匀浆液制备 取大鸮消化系统的腺胃、十二指肠、空肠、大肠、胰脏各部分组织 1 g,分别加入 5 ml 样品提取液(0.9% NaCl 溶液)冰浴上匀浆,4℃ 离心(20 000 g,5 min),取上清液分装于 Eppendorf 管,保存于液氮中备用。

1.3.2 蛋白质浓度测定 采用 Neuhoff 等^[10]方法。

1.3.3 活性电泳(G-PAGE) 电泳前将样品制备液中加入 3 倍的样品缓冲液(78% 甘油 10 ml + 3.5 ml、0.5 mol、pH 6.8 的 Tris-HCl + 10 g SDS + 86.5 ml 双蒸水),电泳为 SDS 聚丙烯酰胺凝胶复性电泳(又称活性电泳),方法按徐存拴等^[11]改良的方法进行。采用 10% 分离胶、3% 浓缩胶,每槽加样 75 μg 蛋白质,4℃ 环境中恒压电泳,电泳时电流不超过 10 mA/板,样品在浓缩胶里时,电压 ≤ 50 V,样品进入分离胶后,

电压 ≤ 100 V。待前沿指示剂(1% 溴酚蓝)到达离胶板下缘 2 cm 处时,约 6 h 停止电泳,切除前沿指示剂以下部分后,将胶板放入 250 ml 胶板洗涤液(12 ml Triton X-100,3.03 g Tris-base,500 ml 双蒸水,pH 7.0)中洗涤 30 min,每 5 min 振荡 1 次,洗涤后,将胶板放入双蒸水中洗涤 3 次,每次 5 min,然后将胶板放入 37℃ 的孵育液(0.1 mol Glycin,5 mmol CaCl₂,pH 分别为 3.5 大多数酶失活的最低 pH 值;5.0 大多数酶酸性条件下活性的最强 pH 值;7.0 中性条件;8.0 大多数酶碱性条件下活性的最强 pH 值)中保温 24 h 后,按 Laemmli^[12]方法固定、染色、脱色、照相。相同方法重复电泳 3 次,结果基本一致。

1.3.4 相对分子量的确定 Laemmli^[12]方法中,蛋白质分子量(MW)的对数与其相对迁移率呈良好的线性关系,因此,以标准蛋白质的分子量相对迁移率做图,制出标准曲线。根据未知蛋白的迁移率,从标准曲线中查出其分子量。

2 结 果

2.1 pH 3.5 时消化系统蛋白水解酶的种类与活性 在 pH 3.5 时,腺胃、胰脏、十二指肠均检出 2 条酶带(图 1:A),活性弱或极弱,分别为 46、41 ku,206、45 ku,180、45 ku。空肠酶带最多,检出 250、45、46、32 ku 4 条活性极弱的酶带和 1 个 180~162 ku 的极强活性区。45 ku 酶带存在于除腺胃外的各受检器官,但活性均极弱。

2.2 pH 5.0 时消化系统蛋白水解酶的种类与活性 pH 5.0 时,250、45 ku 酶带广泛存在于胰脏、十二指肠、空肠、大肠中(图 1:B),其中 250 ku 酶带在空肠中活性强,其余均极弱;45 ku 酶带活性强,仅在大肠中极强。此外,胰脏和十二指肠分别检出 206、180 ku 活性极弱的酶带;空肠和大肠还检出 162 ku 活性极弱的酶带。空肠酶带最多,除上述酶带外还检出 1 条 32 ku 的强活性酶带。腺胃仅检出 1 条 66 ku 活性极弱的酶带。

2.3 pH 7.0 时消化系统蛋白水解酶的种类与活性 pH 7.0 时,45 ku 酶带在十二指肠、空肠、大肠中被检出(图 1:C),活性强或极强。腺胃

检出 1 条 68 ku 活性极弱的酶带和 35、34、20 ku 3 条弱活性酶带。胰脏检出 5 条酶带 ,75、68 ku 活性极弱 ;35、34 ku 活性弱 ;20 ku 活性强。除 45 ku 酶带外 ,十二指肠检出 250、68 ku 2 条活性极弱的酶带和 1 条 206 ku 的强活性酶带 ;空肠检出 1 条 250 ku 活性极弱的酶带和 180、32 ku 2 条强活性酶带 ;大肠还检出 1 条 32 ku 活性极弱的酶带和 1 条 18 ku 的强活性酶带。

2.4 pH 8.0 时消化系统各器官蛋白水解酶的种类与活性 pH 8.0 时 ,在胰脏、十二指肠、空肠、大肠中各受检器官中均检出 250、45 ku 的酶带(图 1 D) ,250 ku 酶带活性极弱 ,仅在胰脏中

活性弱 ;45 ku 酶带在空肠、大肠中活性极强 ,十二指肠中活性强 ,在胰脏中活性弱。腺胃检出 220、190、172、68、35 ku 5 条弱活性的酶带和 1 条 18 ku 活性极弱的酶带。空肠酶带最多 ,十二指肠次之 ,胰脏酶带最少 ,除 250、45 ku 酶带外 ,胰脏还检出 1 条 206 ku 弱活性的酶带 ,十二指肠检出 220、68 ku 2 条弱活性酶带和 1 个 190 ~ 102 ku 的极强活性区 ;空肠还检出 220 ku 的极弱活性酶带、32 ku 的强活性酶带和 1 个 190 ~ 90 ku 的极强活性区 ;大肠还检出 32、18 ku 2 条活性极弱的酶带。

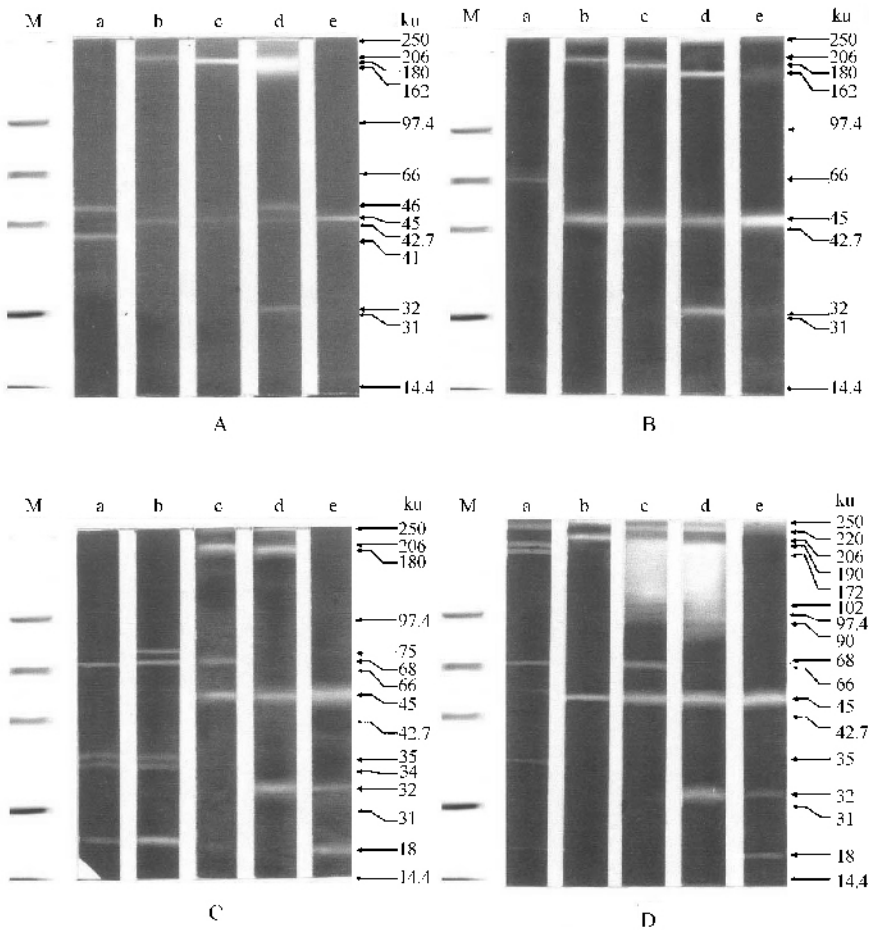


图 1 大鸮消化系统蛋白水解酶

A. pH=3.5 ; B. pH=5.0 ; C. pH=7.0 ; D. pH=8.0.

M 标准分子量蛋白 ; a 腺胃 ; b 胰脏 ; c 十二指肠 ; d 空肠 ; e 大肠。

3 讨 论

实验结果表明,大鸮消化系统 5 种器官的蛋白水解酶受 pH 条件的影响均发生了较大的变化。pH 3.5 时大部分蛋白水解酶活性较弱,种类较少,随着 pH 值的升高,酶活性明显增强,种类明显增多,至 pH 8.0 时酶活性最强,种类也最多。可见,大鸮消化系统蛋白水解酶的最适 pH 值为 8.0,酶活性在碱性、中性与酸性条件下递减。这一结果与李效宇对金鱼各组织器官的研究一致^[6]。

在相同 pH 条件下,大鸮消化系统各器官蛋白水解酶有其自身的特异性,都执行着对蛋白质降解的生理功能。各器官蛋白水解酶的种类和活性虽有明显的差异,但也具有相同的蛋白水解酶,活性也很相似。例如,45 ku 蛋白水解酶在 pH 3.5、5.0、8.0 时均存在于除腺胃外的各受检器官,在 pH 7.0 时存在于十二指肠、空肠、大肠中。250 ku 蛋白水解酶在 pH 5.0、8.0 时存在于胰脏、十二指肠、空肠、大肠中。这些蛋白水解酶在不同器官中的相似性,表明构成各个器官的基本成分及代谢所必需的蛋白水解酶及各种因子相似^[8]。同一系统中不同器官之间蛋白水解酶的种类和活性虽有不同,但同一系统中执行相同或相近生理功能的器官蛋白水解酶的种类和活性相似。十二指肠、空肠、大肠的主要功能都是对食物进行消化和吸收,其蛋白水解酶种类和活性的相似性,充分说明了结构、功能与生化基础的统一性。在 pH 8.0 时,十二指肠、空肠的蛋白水解酶不仅种类最多、活性也最强,表明十二指肠和空肠可能是蛋白质消化的主要场所。

在不同 pH 条件下,蛋白水解酶的种类和活性均发生了较大变化。46、41 ku 蛋白水解酶随着 pH 值的增高而失去活性,为酸性蛋白水解酶,250、206、45 ku 蛋白水解酶随着 pH 值的增高活性逐渐增强,为碱性蛋白水解酶,这表明 pH 值对蛋白水解酶的活性有着明显的制约作用,使消化系统各器官在不同 pH 条件下,都有不同的蛋白水解酶参与蛋白质降解,从而保证

了消化系统在不同的酸碱环境中充分发挥其消化功能。十二指肠和腺胃在酸性条件下蛋白水解酶的种类少、活性弱。随着 pH 升高,酶种类明显增多,pH 8.0 时,酶种类最多,活性最强。至于腺胃蛋白水解酶在中性、碱性条件下比酸性条件下种类多,活性强,这与对猕猴^[5]、小白鼠^[13]和大鼠^[7]的研究结果均不一致,其原因有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Vassalli J D, Pepper M S. Membraneproteasesinfocus. *Nature*, 1994, **370**: 1.
- [2] Baimbridge K G, Celio M R, Rogers J H. Calcium-binding protein in the nervous system. *TINS*, 1992, **15**(8): 303.
- [3] Teichert U, Mechler B, Muller H. Lysosomal(vacuolar) proteinases of yeast are essential for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem*, 1989, **264**(27): 37 ~ 45.
- [4] Monard D. Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite out growth. *TINS*, 1998, **11**(12): 541 ~ 544.
- [5] 吉爱玲, 李彦章, 向华等. 猕猴消化系统各器官蛋白水解酶种类和性质研究. *解剖学报*, 1999, **30**(3): 230 ~ 236.
- [6] 李效宇, 夏民, 李莉等. 金鱼不同组织器官及胚胎发育不同时期蛋白水解酶的种类和活性变化. *水生生物学报*, 2000, **24**(2): 128 ~ 136.
- [7] 乔志刚, 辛泽华, 李吉学等. 中国大鲵消化系统 13 种器官的蛋白水解酶种类和活性分析. *动物学报*, 2003, **49**(4): 537 ~ 539.
- [8] 付远志, 王晓涛, 李玉昌等. 大鼠十七种组织器官的蛋白图谱和它们的蛋白水解酶活性分析. *河南科学*, 2003, **21**(1): 45 ~ 50.
- [9] 王莹, 李效宇, 徐存拴等. 海带、裙带菜和紫菜蛋白酶谱的研究. *植物学报*, 1998, **40**(10): 939 ~ 946.
- [10] Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G, et al. A simple, versatile, sensitive and volume -independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*, 1979, **360**(4): 1 657 ~ 1 670.
- [11] 徐存拴, 吉爱玲, 夏民等. 用复性电泳技术研究溶酶体蛋白水解酶的性质和活性. *河南科学*, 1998, **16**(2): 185 ~ 192.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680 ~ 685.
- [13] 张新胜, 张顺利, 郭玫等. 小鼠发育过程中胃和大肠蛋白酶活性的变化. *动物学报*, 1999, **45**(3): 302 ~ 310.