

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*

乔志刚 辛泽华 李吉学 沈国民 徐存拴**

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002)

Analysis of the proteases activity in 13 organs of the doll fish (*Andrias davidianus*) digestive system*

QIAO Zhi-Gang XIN Ze-Hua LI Ji-Xue SHEN Guo-Min XU Cun-Shuan**

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian 453002, Henan, China)

Abstract Protease activity in 13 doll fish, *Andrias davidianus*, digestive organs: tongue, esophagus, cardia, stomach, pylorus, duodenum, jejunum, ileum, rectum, cloacal chamber, liver, pancreas, gall bladder were analysed with gelatine polyacrylamide gel-electrophoresis (G-PAGE). Compared to rats and rhesus monkeys (*Macaca mullatta tcheliensis*), protease activity in the *Andrias davidianus* digestive system was more varied and stronger. The activity of acid proteases > that of the neutral proteases > that of the alkaline proteases. The kinds and activities of neutral and alkaline proteases in the *Andrias davidianus* digestive system were very different, while the kinds of acid proteases in them were very similar, but their activities are different. Analysing the activities of proteases in these organs shows that protease activity in the duodenum > that in rectum > that in stomach > that in pancreas > that in liver. Experimental results suggest that the function of the rectum and liver in *Andrias davidianus* may be as important as that of the duodenum and pancreas in food degradation [Acta Zoologica Sinica 49(4): 537-539, 2003].

Key words Doll fish (*Andrias davidianus*), Digestive system, Proteases, Gelatine polyacrylamide gel-electrophoresis (G-PAGE)

关键词 大鲵 消化系统 蛋白酶 G-PAGE

蛋白水解对生命活动是必不可少的 (Vassali *et al.*, 1994), 蛋白质的酶解修饰 (Xu *et al.*, 1999) 细胞的迁移、组织再生与修复、消化系统对食物中蛋白质的消化等均与蛋白水解酶有关 (Baimbridge *et al.*, 1992), 许多病理过程也与蛋白水解酶功能失调有关 (Teichert *et al.*, 1989; Monard, 1988)。因此开展大鲵消化系统各器官的蛋白水解酶种类和性质的研究, 对了解大鲵消化系统各器官的功能、演化及大鲵的营养需求、食性、消化生理等是必要的。本文对大鲵消化系统各器官的蛋白水解酶特征进行了初步分析, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验动物取自河南师范大学大鲵养殖基地, 体重 2~2.5 kg, 雌雄各 3 只。

1.1.2 化学药品和试剂 丙烯酰胺 (USB) 甲叉双丙烯酰胺 (Fluka) 明胶 (Sigma) 过硫酸铵 (Bio-Rad) TEMED (Bio-Rad) SDS (Gibco) Tris (Gibco) 标准分子量蛋白 (上海东风生物技术有限公司) 考马斯亮蓝 R250 (Fluka 进口分装) 和甘氨酸和 Triton X-100 (Amresco) 等。实验所用的药品和试剂纯度为分析纯。

1.2 方法

2002-11-18 收稿, 2003-03-31 修回

* 国家自然科学基金 (No. 30250001) 资助 [This research was funded by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30250001)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: xucs@x263.net

第一作者简介 乔志刚, 男, 36 岁, 副教授。研究方向: 两栖动物育苗和养殖。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

1.2.1 样品制备 将大鲵置于4℃低温室,棒击头部处死,立即取材,将材料置于4℃ PBS中剪碎,匀浆,2 000 g离心15 min,取上清,分装于Eppendoff管中,-80℃保存备用。

1.2.2 蛋白质浓度测定和蛋白水解酶活性电泳 按 Neuhoff *et al.* (1979) 方法测定匀浆液的蛋白浓度。按徐存拴等 (1998) 方法进行蛋白水解酶活性电泳。电泳在4℃进行,分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为5%,每槽加50 μg总蛋白。胶板在37℃保温24 h。检测酸性蛋白水解酶活性时,保温液的pH值为4.5;检测中性和碱性蛋白水解酶活性时,保温液的pH值分别为7.0和9.5。

1.2.3 相对分子量的确定 Laemmli (1970) 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 4.5 时大鲵消化系统各器官的蛋白水解酶种类和活性

将电泳后复性的、含消化系统各器官蛋白水解酶的凝胶板放到pH 4.5的缓冲液里保温24 h,负染法分析蛋白水解酶活性。在酸性条件下,各器官均有61、55、54、41、38和37 kD的酶带,其中,十二指肠的酸性蛋白水解酶活性最强,肝脏、胰脏次之,舌、胃体、胆囊最弱。另外,十二指肠除含有32 kD的酸性蛋白水解酶外,还含有73~240 kD的酸性蛋白水解酶。33 kD的蛋白水解酶仅在胰脏中检出(图1:A)。

2.2 pH 7 时大鲵消化系统各器官的蛋白水解酶种类和活性

在中性条件下,各器官均有73、61、54、42、41和40 kD的酶带。其中,十二指肠的中性蛋白水解酶活性最强,直肠、肝脏、胰脏次之,舌和泄殖腔最弱。幽门、十二指肠和直肠等还含有100、23和22 kD的中性蛋白水解酶(图1:B)。

2.3 pH 9.5 时大鲵消化系统各器官的蛋白水解酶种类和活性

在碱性条件下,各器官都有37 kD的酶带。不过,此酶带在不同器官的活性差异很大,十二指肠中最强,幽门、直肠和胰脏中较强,胃体、空肠、回肠、肝脏和胆囊中较弱,其它器官很弱,舌、食管、贲门中未检出碱性蛋白水解酶活性。总的来

说,各器官的碱性蛋白水解酶的种类和活性差异较大。

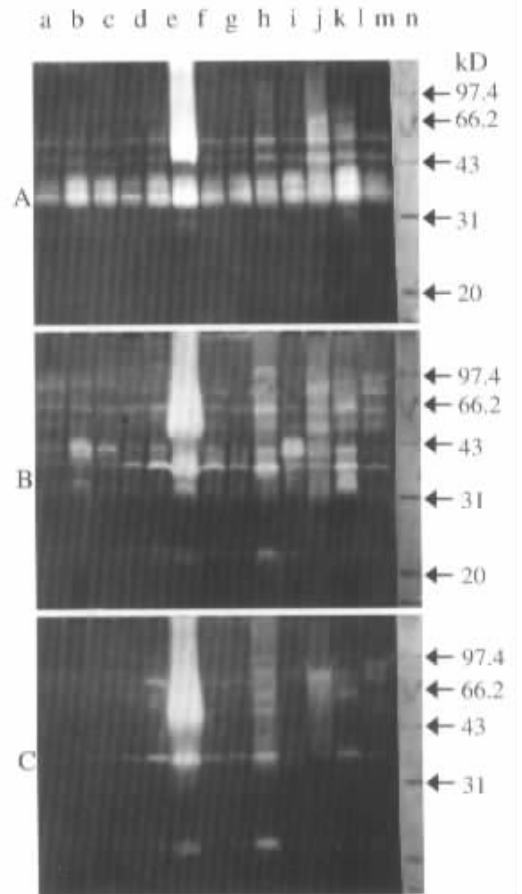


图1 大鲵消化系统十三种器官的蛋白水解酶谱

Fig. 1 Proteases in 13 organs of the *Andrias davidianus* digestive system

A. 酸性蛋白水解酶 (Acid proteases) B. 中性蛋白水解酶 (Neutral proteases) C. 碱性蛋白水解酶 (Alkaline proteases)

a: 舌 (Tongue) b: 食管 (Esophagus) c: 贲门 (Cardia) d: 胃体 (Stomach) e: 幽门 (Pylorus) f: 十二指肠 (Duodenum) g: 空肠 (Jejunum) h: 回肠 (Ileum) i: 直肠 (Rectum) j: 泄殖腔 (Cloaca) k: 肝脏 (Liver) l: 胰脏 (Pancreas) m: 胆囊 (Gall bladder) n: 分子量标记 (Molecular marker)

3 讨 论

本研究表明,大鲵十三种消化器官的蛋白水解酶活性表现出酸性>中性>碱性的趋势,可见,十三种器官蛋白水解酶活性的最适pH范围为酸性~

中性。在酸性条件下，大鲵胃（包括贲门、胃体和幽门）和大肠（包括空肠、回肠和直肠）的蛋白水解酶种类和活性相似，但在中性和碱性条件下，胃的蛋白水解酶活性比大肠弱，特别是在碱性条件下，大肠的蛋白水解酶活性比胃强的多。大鲵直肠的蛋白水解酶不仅种类多、活性强，而且 pH 范围广泛，表明其在食物消化和吸收中有特殊作用。

结果显示大鲵肝脏和胰脏的蛋白水解酶种类虽有一定差异，同一分子量和不同分子量的酶活性也有一定差异，但总的来说，两种器官的总蛋白水解酶活性相似，表明在食物消化方面，大鲵的肝脏和胰脏具有同等重要的作用。观察大鲵十二指肠的蛋白水解酶活性，并与其它器官的蛋白水解酶活性相比较，可见大鲵十二指肠的蛋白水解酶活性不仅适应较宽的 pH 范围，而且在十三种消化器官中其蛋白水解酶活性表现最强。推测十三种消化器官中十二指肠的消化作用可能更大。

与大鼠和猕猴消化系统各器官蛋白水解酶活性（吉爱玲等，1999；张新胜等，1999）进行比较，发现随着生物由低等向高等进化，消化系统各器官的消化功能有从整个系统向系统的上端器官（胃、十二指肠）和向消化腺（胰腺）集中的趋势，推测这样更有利于消化吸收的产物。

参考文献 (References)

- Baimbridge, K. G., M. R. Celio and J. H. Rogers 1992 Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* **15**(8): 303 ~ 308.
- Baimbridge, K. G., M. R. Celio and J. H. Rogers 1992 Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* **15**(8): 303 ~ 308.
- Ji, A. L., Y. Z. Li, H. Xiang, Y. Wu, Q. C. Feng and C. S. Xu 1999 Study on kinds and properties of proteolytic enzymes in digestive system of *macaca mulatta tcheliensis*. *Acta Anatomica Sinica* **30**(3): 230 ~ 236. [吉爱玲, 李彦章, 向华, 伍雁, 封青川, 徐存拴 1999 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 **30**(3): 230 ~ 236.]
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 ~ 685.
- Monard, D. 1988 Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. *TINS* **11**(12): 541 ~ 544.
- Neuhoff, V., K. Philipp and H. G. Zimmer 1979 A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**(4): 1657 ~ 1670.
- Teichert, U., B. Mechler and H. Muller 1989 Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.* **264**(27): 37 ~ 45.
- Vassalli, J. D. and M. S. Pepper 1994 Membrane proteases in focus. *Nature* **370**: 14 ~ 15.
- Xu, C. S., A. L. Ji and M. Xia 1998 Analysing activity and properties of lysosomal proteases by non-denatured electrophoresis. *Henan Sci.* **16**(2): 185 ~ 192. [徐存拴, 吉爱玲, 夏民 1998 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 **16**(2): 185 ~ 192.]
- Xu, C. S., W. M. Zhang, D. Techel, M. Meyer, Y. Z. Li and L. Rensing 1999 Heat shock induction of a 65 kDa ATP-binding proteinase in rat C6 glioma cells. *Cell Research* **9**: 135 ~ 144.
- Zhang, X. S., S. L. Zhang, M. Guo, W. X. Zhang and C. S. Xu 1999 Activity changes of the proteinase in stomach and large intestine during mouse development. *Acta Zool. Sin.* **45**(3): 302 ~ 310. [张新胜, 张顺利, 郭玫, 张文学, 徐存拴 1999 小白鼠发育过程中胃和大肠蛋白酶活性的变化. 动物学报 **45**(3): 302 ~ 310.]