

# 东北虎幼体消化系统蛋白水解酶的初步研究

牛红星<sup>1 2</sup> 卜艳珍<sup>1 2</sup> 余燕<sup>2 3</sup> 姬生栋<sup>2</sup> 王艳梅<sup>2</sup> 卢全伟<sup>2</sup> 刘敬泽<sup>1\*</sup>

( 1 河北师范大学生命科学学院, 石家庄, 050016 ) ( 2 河南师范大学生命科学学院, 新乡, 453007 )

( 3 河南科技学院动物科学系, 新乡, 453003 )

关键词: 东北虎幼体; 消化系统; 蛋白水解酶; 复性电泳

中图分类号: Q556.3

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 ( 2006 ) 01 - 0098 - 03

## Preliminary studies on proteolytic enzymes in the digestive system of Amur tiger cubs ( *Panthera tigris altaica* )

NIU Hongxing<sup>1 2</sup> BU Yanzhen<sup>1 2</sup> YU Yan<sup>2 3</sup> JI Shengdong<sup>2</sup> WANG Yanmei<sup>2</sup> LU Quanwei<sup>2</sup> LIU Jingze<sup>1\*</sup>

( 1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang, 050016, China )

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

( 3 Department of Animal Sciences, Henan Institute of Science Technology, Xinxian, 453003, China )

**Abstract :** The kinds and activities of proteolytic enzymes in the digestive systems ( tongue, esophagus, stomach, duodenum, liver, pancreas and large intestine ) of two Amur tiger cubs ( *Panthera tigris altaica* ) were investigated using protein detection and SDS-G-PAGE. The results showed : 1 ) the digestive system of Amur tiger cubs had 30 different kinds of proteolytic enzymes ; 2 ) the mostly optimal pH for these enzymes was a neutral environment , and an acid condition highly restrained their activity ; 3 ) the proteolytic enzymes in the tongue and esophagus were fewer than in other digestive organs and their activities were weak as well ; 4 ) the duodenum had the most kinds of proteolytic enzymes with the strongest activities under various pH conditions ; 5 ) the 16 kD enzyme bands always existed under neutral and alkaline pH conditions in all digestive organs except the tongue.

**Key words :** Digestive system ; *Panthera tigris altaica* ; Proteolytic enzymes ; SDS-G-PAGE

蛋白水解酶在许多生命活动中是必需的物质 ( Vassalli and Pepper , 1994 )。蛋白质的酶解修饰 ( Xu *et al.* , 1999 )、细胞迁移、组织再生与修复、消化系统对蛋白质的消化等均与蛋白水解酶有关 ( Baimbridge *et al.* , 1992 ) , 且蛋白水解酶功能失调会导致许多疾病 ( Teichert *et al.* , 1989 )。

东北虎 ( *Panthera tigris altaica* ) 隶属食肉目、猫科, 仅分布于中国东北部、俄罗斯远东地区和朝鲜, 数量极为稀少, 为中国 I 级保护动物, 世界野生动物基金会将东北虎列为十大濒危动物之首 ( 程会昌等, 2004 )。目前关于东北虎的人工饲养和繁育等研究已有报道 ( 赵云华等, 1992 ; 刘树光等, 2000 ) , 但对其消化系统蛋白水解酶的研究尚未见报导。本文采用蛋白质测定和复性电泳技术

对东北虎幼体消化系统各器官蛋白水解酶的种类、性质、分布及动态变化进行了研究, 以期研究东北虎的系统演化、消化器官的功能以及人工饲养等提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

初生东北虎幼体 2 只, 由河南省新乡市动物园提供, 因意外事故死亡。死亡 0.5 h 后于 4℃ 环境进行取材, 所取材料为舌、食道、胃、十二指肠、肝脏、胰脏、大肠, 然后放入液氮中保存备用。

### 1.2 蛋白质浓度的测定

采用 Neuhoff 等 ( 1979 ) 方法进行。

### 1.3 复性电泳 ( SDS-G-PAGE )

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 ( 0411032500 ) ; 河南省动物学省级重点学科经费资助

作者简介: 牛红星 ( 1962 - ), 男, 副教授, 博士研究生, 从事动物生理生态与资源生态学研究。

收稿日期: 2005 - 02 - 03 ; 修回日期: 2005 - 06 - 18

\* 通讯作者, correspondence author, E - mail : jaliu21@heinfo.net

### 1.3.1 电泳样品的制备

取东北虎幼体消化系统舌、食道、胃、十二指肠、肝脏、胰脏、大肠各部分组织 1 g，分别加入 5 ml 样品提取液（0.9% NaCl 溶液），冰浴匀浆，4℃ 条件下 16 000 r/min 离心 15 min，取上清液分装于 Eppendorf 管中，于 -20℃ 保存作为制备液备用。

### 1.3.2 复性电泳

电泳前向样品制备液中加入 3 倍的样品缓冲液（78% 甘油 10 ml + 3.5 ml、0.5 M、pH6.8 的 Tris-HCl + 10 g SDS + 86.5 ml 双蒸水），电泳方法按照徐存拴等（1998）方法进行。采用 10% 分离胶、3% 浓缩胶，每个加样孔均加入含 75 μg 蛋白质的样品制备液和样品缓冲液混合物，4℃ 环境中恒压电泳，电泳时电流不超过 10 mA/板，样品在浓缩胶中时，电压 ≤ 50 V，样品进入分离胶后，电压 ≤ 100 V。待指示剂（1% 溴酚蓝）到达离胶板下缘 2 cm 处时终止电泳，切除指示剂以下部分后，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，每间隔 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 M glycine，5 mM CaCl<sub>2</sub>，

pH 分别为 3.5、7.0、8.5）中保温 24 h 后，按 Laemmli（1970）方法固定、染色、脱色并拍照。相同方法重复电泳 3 次。

### 1.4 药品与试剂

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 97 ~ 14.4 kD（Serva），考马斯亮蓝 R<sub>250</sub>（Coomassie Brilliant blue R<sub>250</sub>，Fluka 公司进口分装）。

## 2 结果

### 2.1 酸性条件下检出的蛋白水解酶种类与活性

在酸性条件（pH3.5）下，蛋白水解酶的检出种类较少（图 1，A）。大肠仅检出 16 kD 和 15 kD 两条酶带，且活性极弱。十二指肠中检出 52 kD、40 kD、36 kD、35 kD、16 kD、15 kD 6 条酶带和 1 个 86 kD ~ 60 kD 的活性区域，其中 52 kD 和 40 kD 酶带活性强，15 kD 酶带活性弱，36 kD、35 kD、和 16 kD 酶带活性极弱。其余各消化器官均未检出酶带。

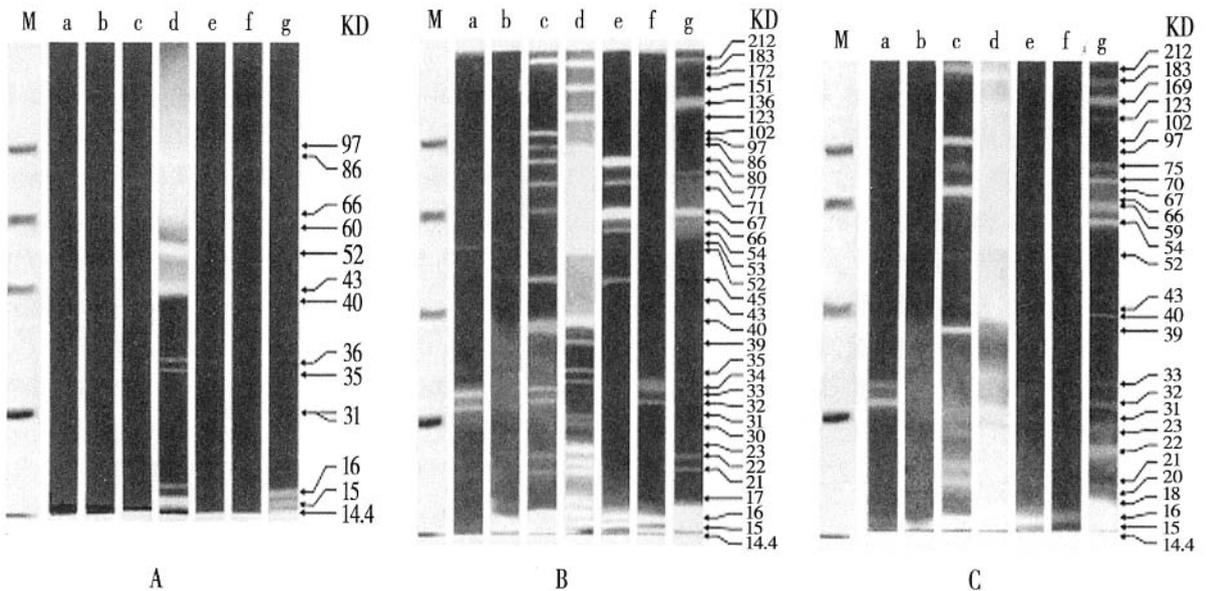


图 1 东北虎幼体消化系统蛋白水解酶

A. pH 3.5 时消化系统蛋白水解酶 B. pH 7.0 时消化系统蛋白水解酶 C. pH 8.5 时消化系统蛋白水解酶  
a: 舌; b: 食道; c: 胃; d: 十二指肠; e: 肝; f: 胰; g: 大肠

Fig. 1 Proteases in the digestive system of the baby *Panthera tigris altaica*. A. The digestive system proteolytic enzymes under the condition of pH 3.5; B. The digestive system proteolytic enzymes under the condition of pH 7.0; C. The digestive system proteolytic enzymes under the condition of pH 8.5. a: tongue; b: esophagus; c: stomach; d: duodenum; e: liver; f: pancreas; g: large intestine.

## 2.2 中性条件下检出的蛋白水解酶种类与活性

在中性条件 (pH7.0) 下, 各器官蛋白水解酶的检出种类明显增多、活性明显增强 (图 1, B), 其中十二指肠和胃内蛋白水解酶的种类最多, 十二指肠共检出 212 kD、151 kD、123 kD、40 kD、39 kD、35 kD、34 kD、31 kD、30 kD、23 kD、22 kD、21 kD、17 kD、16 kD 和 15 kD 15 条酶带和 1 个 86~52 kD 的强活性区域, 其中 212、151、123、23 kD 4 条酶带活性弱, 40 kD 活性强, 其余酶带活性极弱。胃中共检出 212、102、86、80、71、67、45、40、33、32、22、21 和 16 kD 13 条酶带, 其中 212、40 kD 活性弱, 16 kD 活性极强, 其余酶带活性极弱。舌、肝脏、胰脏、大肠内蛋白水解酶种类较少, 舌中仅检出 53、34、32 kD 3 条酶带, 且活性均极弱。肝脏和胰脏均检出 16、15 kD 2 条弱活性酶带, 此外, 肝脏还检出 80、67 kD 2 条强活性酶带和 77、54、45 kD 3 条活性极弱酶带, 胰脏还检出 34、32 kD 2 条活性极弱酶带。大肠共检出 212、136、77、67、22、21、16 kD 7 条酶带, 其中 16 kD 酶带活性极强, 其余酶带活性极弱。食道蛋白水解酶种类最少, 仅检出 16 kD 酶带, 但活性极强。

## 2.3 碱性条件下检出的蛋白水解酶种类与活性

在碱性条件 (pH8.5) 下, 大肠蛋白水解酶的检出种类显著增多 (图 1, C), 共检出 183、169、123、75、70、59、54、40、33、32、23、22 kD 12 条活性极弱酶带和 1 个 18~15 kD 强活性区域。其余各器官蛋白水解酶种类均有所减少, 胃内共检出 212、102、75、67、39、23、21、20、16 kD 9 条酶带, 其中 16 kD 活性极强, 102、67、39 kD 活性弱, 其余酶带活性极弱。十二指肠检出 212、169、33、32 kD 4 条活性极弱酶带和 123~40 kD 和 23~15 kD 2 个强活性区域。舌中检出 33、32 kD 2 条活性极弱酶带。食道、肝脏、胰脏中除 16 kD 酶带外未检出其它酶带。

## 3 讨论

东北虎幼体蛋白水解酶的总酶活依次表现为中性 > 碱性 > 酸性, 其消化系统最适 pH 为中性环境, 而酸性条件对蛋白水解酶抑制较强。这一结论与吉爱玲等 (1999) 对猕猴的研究结果相一致,

而与乔志刚等 (2003) 对大鲵的研究有所不同。可见不同种类的动物, 其消化系统蛋白水解酶的 pH 依赖性有明显差异。不同 pH 条件下, 十二指肠蛋白水解酶种类最多, 活性也最强, 是东北虎消化蛋白质的最重要器官。中性、碱性条件下, 16 kD 酶带普遍存在于除舌外的各消化器官中, 这说明 16 kD 酶带对东北虎是一条非常重要的酶带。同猕猴和大鲵相比, 东北虎消化系统蛋白水解酶的种类最多, 达 30 条, 而猕猴和大鲵最多时分别为 8 条和 5 条, 其原因在于东北虎为肉食性动物, 其食物中含有更多的蛋白质, 这就需要有更多的蛋白水解酶参与降解, 这是动物长期进化的结果。

## 参考文献:

- Baimbridge K G, Celio M R, Rogers J H. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS*, **15** (8): 303-308.
- Ji A L, Li Y Z, Xiang H, Wu Y, Feng Q C, Xu C S. 1999. Study on kinds and properties of proteolytic enzymes in digestive system of *Macaca mulatta tcheliensis*. *Acta Anatomica Sinica*. **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.
- Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G. 1979. A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem*, **360** (4): 1657-1670.
- Qiao Z G, Xin Z H, Li J X, Shen G M, Xu C S. 2003. Analysis of the proteases activity in 13 organs of the doll fish (*Andrias davidianus*) digestive system. *Acta Zoologica Sinica*. **49** (4): 537-539.
- Teichert U, Mechler B, Muller H. 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, Pepper M S. 1994. Membrane proteases in focus. *Nature*, **370**: 14-15.
- Xu C S, Ji A L, Xia M. 1998. Analysing activity and properties of lysosomal proteolytic enzymes by non-denatured electrophoresis. *Henan Science*, **16** (2): 185-192.
- Xu C S, Zhang W M, Techel D, Meyer M, Li Y Z, Rensing L. 1999. Heat shock induction of a 65 kDa ATP-binding proteinase in rat C6 glioma cells. *Cell Research*, **9**: 135-144.
- 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.
- 刘树光, 肖井贵, 杨守庄, 曹振池, 张爱生. 2000. 野生动物园东北虎繁殖行为初步观察. *野生动物*, **21** (3): 37.
- 乔志刚, 辛泽华, 李吉学, 沈国民, 徐存拴. 2003. 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*, **49** (4): 537-539.
- 赵云华, 刘永利, 曾得生. 1992. 人工饲养东北虎繁殖行为的观察. *野生动物*, **13** (3): 54-56.
- 徐存拴, 吉爱玲, 夏民. 1998. 用复性电泳技术研究溶酶体蛋白质水解酶的性质和活性. *河南科学*, **16** (2): 185-192.
- 程会昌, 霍军, 宋予震. 2004. 初生东北虎胃和肠的动脉分布. *中国兽医科技*, **34** (6): 78-80.