

东北虎幼体消化系统蛋白水解酶的初步研究

牛红星^{1 2} 卜艳珍^{1 2} 余燕^{2 3} 姬生栋² 王艳梅² 卢全伟² 刘敬泽^{1*}

(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^{1 2} BU Yanzhen^{1 2} YU Yan^{2 3} JI Shengdong² WANG Yanmei² LU Quanwei² LIU Jingze^{1*}

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

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

(3 Department of Animal Sciences, Henan Institute of Science Technology, Xinxiang, 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 CaCl₂,

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 R₂₅₀ (Coomassie Brilliant blue R₂₅₀, 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。

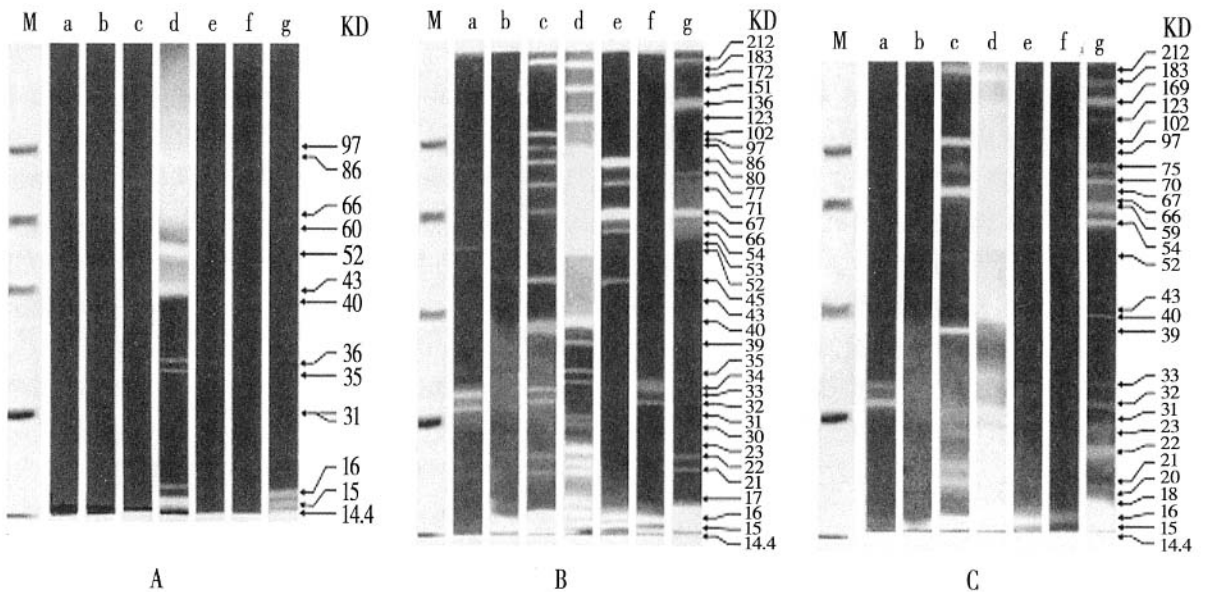


图 1 东北虎幼体消化系统蛋白水解酶

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.
- Teichoff 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.