

青石斑鱼胃蛋白酶原的分离纯化及酶学性质

刘西之^{1,2,3}, 邱晓燕^{1,2}, 蔡秋凤^{1,2,3}, 刘光明^{1,2}, 苏文金^{1,2}, 曹敏杰^{1,2*}

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 采用硫酸铵盐析、DEAE-Sephacel, DEAE-Sepharose 阴离子交换柱层析、SP-Sepharose 阳离子交换柱层析和 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析, 从青石斑鱼的胃中分离纯化到 3 种胃蛋白酶原 (PG-1、PG-2 和 PG-3), SDS-PAGE 结果显示, 它们的分子量分别为 35、36 和 37 ku。在 pH 2.0 下, 3 种胃蛋白酶原转化为有活性的胃蛋白酶 P-1、P-2 和 P-3, 分子量分别约为 33、33 和 34 ku。3 种酶的最适 pH 分别为 3.0、2.5 和 2.5, 最适温度均为 40 °C, 且均能被典型的天冬氨酸蛋白酶抑制剂 pepstatin A 有效抑制。免疫交叉反应结果表明, 3 种胃蛋白酶原能与大鼠抗黄鳍鲷 PG-I, PG-II, PG-3b, PG-3a, PG-4a 及 PG-4b 多克隆抗体发生不同程度的免疫交叉反应。动力学参数测定结果表明, P-1、P-2 和 P-3 对酸变性牛血红蛋白的 K_m 、 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值分别为 7.0×10^{-5} mol/L, 17.6 S^{-1} , 2.5×10^5 mol/(L · S); 5.5×10^{-5} mol/L, 22.8 S^{-1} , 4.1×10^5 mol/(L · S) 和 5.2×10^{-5} mol/L, 18.7 S^{-1} , 3.6×10^5 mol/(L · S)。

关键词: 青石斑鱼; 胃蛋白酶原; 胃蛋白酶; 纯化

中图分类号: Q 814.1; S 917.4

文献标志码: A

胃蛋白酶原 (pepsinogen) 是动物胃壁细胞分泌的胃蛋白酶 (EC 3.4.2.3.1-4) 的前体。当 pH 低于 5 时, 在胃酸的 H^+ 作用下, 胃蛋白酶原失去 N-末端部分序列, 激活为有活性的胃蛋白酶。胃蛋白酶是动物胃部主要的消化酶, 分子量约 33 ku, 属于天冬氨酸肽链内切酶^[1]。已激活的胃蛋白酶也具有催化胃蛋白酶原转变成有活性的胃蛋白酶的功能。胃蛋白酶适于在酸值较高的环境中消化蛋白质, 尤其是 pH 为 2 时^[2]。近年来国内外研究者对鱼类胃蛋白酶的关注越来越多, 已报道的鱼类有鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[3-4]、欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)^[5]、南极鳕鱼 (*Trematomus bernacchii*)^[6]、石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[7]、黄鳍鲷 (*Sparus latus*)^[8]、乌鳢 (*Channa argus*)^[9]、鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[10] 以及大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)^[11] 等。

青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 属鲈形目

(Perciformes), 鲷科 (Serranidae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 俗称青斑、青鳍、泥斑等, 为沿海暖水性中下层鱼类, 分布于北太平洋西部, 在我国主要产于南海及东海南部, 其中尤以南海各地海域较多。青石斑鱼肉质细嫩、味道鲜美, 营养价值极高。近几年, 其人工养殖在我国的广东、福建等南方沿海地区发展较快^[12]。作为鱼体内最基本的消化酶之一, 胃蛋白酶在鱼饲料蛋白消化中起着重要作用。本实验通过对青石斑鱼胃蛋白酶原分离纯化并对其酶学性质进行研究, 以为胃蛋白酶的基础研究提供理论依据, 同时也可对鱼饲料的合理配制及生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜活青石斑鱼购于厦门集美菜市场; DEAE-Sephacel, Sephacryl S-200 DEAE-Sepharose, SP-

收稿日期: 2011-05-26 修回日期: 2011-09-08

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31071519); 厦门市科技计划项目 (3502Z20111042)

通讯作者: 曹敏杰, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

Sepharose(瑞典 Amersham Biosciences 公司);牛血红蛋白(美国 Sigma 公司);大鼠抗黄鳍鲷多克隆抗体(六种)由日本长崎大学水产学部原研治教授提供;HRP 标记的兔抗大鼠 IgG 二次抗体(丹麦 DAKO 公司);丙烯酰胺, SDS(美国 Bio-Rad 公司); SDS-PAGE 标准蛋白(立陶宛 Fermentas 公司); Tris, Pepstatin A(德国 Roche 公司)。

1.2 方法

青石斑鱼胃蛋白酶原的分离纯化 青石斑鱼即杀后取胃、洗净、称取 25 g、切碎,加入 6 倍体积(W/V)冰冷的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),用组织捣碎机充分捣碎。在 4 °C, 10 000 × g 下离心 90 min,收集上清液,沉淀再加入 4 倍体积(W/V) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)进行二次均质,离心收集上清液。合并上清液即得胃蛋白酶原粗提液。

胃蛋白酶原粗提液加入硫酸铵至 20% 饱和度,4 °C 下静置 1 h, 10 000 × g, 离心 30 min, 弃沉淀。上清液继续加入硫酸铵至 60% 饱和度,4 °C 下静置 2 h, 离心收集沉淀。用少量 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解沉淀,并用相同缓冲液透析。离心取上清液,上样于用 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)平衡过的 DEAE-Sephacel 阴离子交换柱(2.5 cm × 15 cm),用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液线性梯度洗脱(含 0 ~ 0.5 mol/L NaCl),流速 0.8 mL/min,检测到三个活性峰,分别收集。第一个活性峰(PG-1)的样品用 20 mmol/L 的乙酸钠缓冲液(pH 5.5)透析后,上样于用相同缓冲液平衡过的 SP-Sepharose 阳离子交换层析柱,用 20 mmol/L 的乙酸钠缓冲液(pH 5.5)洗脱(含 0 ~ 0.3 mol/L NaCl),收集活性峰。第二个活性峰(PG-2)的样品用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)透析后,上样于用相同缓冲液平衡过的 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱(2.5 cm × 6 cm),用 pH 7.5 的 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(含 0 ~ 0.3 mol/L NaCl)洗脱,收集活性峰。第三个活性峰(PG-3)的样品经超滤浓缩后,上样于用含 0.15 mol/L NaCl 的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)平衡的 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析柱(1.8 cm × 96 cm),用同样的缓冲液洗脱,流速 0.5 mL/min,收集活性峰。

蛋白质浓度检测方法 柱层析过程中的蛋白质含量用紫外分光光度计测定样品在 280 nm

波长下吸光值。蛋白质含量按 LOWRY 法^[13] 进行测定。

酶活检测方法 酶活力的测定采用 ANSON^[14] 的方法,略有改进。

实验组: 50 μL 胃蛋白酶原与 350 μL 0.25 mol/L NaAc-HCl 缓冲液(pH 3.0)充分混合,室温放置 5 min,加入 100 μL 2% 酸变性牛血红蛋白并混匀,37 °C 孵育 30 min。加入 500 μL 终止液(8% 三氯乙酸, TCA)终止反应。反应液 8 000 × g 离心 10 min,取上清,测 280 nm 处的吸光值。

对照组: 50 μL 胃蛋白酶原与 350 μL 0.25 mol/L NaAc-HCl 缓冲液(pH 3.0)充分混合,室温放置 5 min,加入 500 μL 终止液(8% TCA)使酶失活,加入 100 μL 2% 酸变性牛血红蛋白混匀,37 °C 孵育 30 min,离心取上清,测 A₂₈₀。

实验组与对照组间的 A₂₈₀ 差值即为实际的酶活值。每组实验设 2 ~ 3 个平行。在酶活性测定反应体系中,胃蛋白酶在 30 min 内消化分解底物使其上清液在 280 nm 吸光值增加 1.0 定义为一个酶活单位。

蛋白质纯度及蛋白分子量的测定 参照 LAEMMLI 法^[15],使用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),考马斯亮蓝 R-250 染色来分析胃蛋白酶原和胃蛋白酶的分子量及纯化效果,以标准蛋白质(116.0 ~ 14.4 ku)作对照。用 7.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE),考马斯亮蓝 R-250 染色进一步分析胃蛋白酶原的纯化效果。

胃蛋白酶原激活过程的研究 胃蛋白酶原在酸性条件下(pH 2.0)分别酸化 0 s、10 s、30 s、1 min、2 min、4 min、10 min、20 min、30 min,立即加入终止液(8 μL 16% TCA 和 2 μL 10 mg/mL pepstatin A)终止反应。样品经 SDS 化后,进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝 R-250 染色。

pH 和温度对酶活力的影响 在 pH 为 1.0 ~ 6.0 范围内,测定不同 pH 下胃蛋白酶的活力。pH 1.0 ~ 4.0 所用缓冲液为 0.25 mol/L NaAc-HCl; pH 4.0 ~ 6.0 所用缓冲液为 0.25 mol/L 乙酸钠。在 10 ~ 65 °C 范围内,测定不同温度下胃蛋白酶的活力。

免疫交叉反应 参考 TOWBIN 等^[16] 方法。将 SDS-PAGE 凝胶上蛋白电转移至硝酸纤维素膜,于 1% 脱脂牛奶中封闭 1 h, TBS-T 洗涤,加入大鼠抗黄鳍鲷多克隆抗体作为一抗,室温孵育 2 h;

TBS-T 洗涤,加入 HRP 标记的兔抗大鼠 IgG 作为二抗,孵育 1 h,TBS-T 洗涤,荧光显色拍照。

动力学参数测定 采用 ANSON^[14] 的方法测定酶活,底物浓度为 $1.55 \sim 6.2 \times 10^{-8}$ mol/L,反应时间为 6 min,其他条件不变,计算不同底物浓度下酶催化反应的平均速率。按照米氏方程 $\nu = V_m[S]/K_m + [S]$ 和 Lineweaver-Burk 作图法 (V_m 为最大反应速率, $[S]$ 为底物浓度),计算动力学参数 K_m 和 k_{cat} 值。

统计学分析 实验过程中,酶活性均测定 3 个平行实验,数据的处理方式为 3 个平行实验的平均值 \pm 标准差。动力学参数 K_m 和 k_{cat} 由测定两组平行实验的平均值获得,组间误差 $<5\%$ 。

2 结果

2.1 青石斑鱼胃蛋白酶原的分离纯化

从图 1 可知,青石斑鱼胃蛋白酶原粗酶液上样于 DEAE-Sephacel 柱,经 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱得到 3 个活性峰。3 个活性峰经过透析或超滤浓缩后分别上样于 SP-Sephacel 阳离子交换柱、DEAE-Sephacel 阴离子交换柱以及 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析柱进行纯化(图 2)。分离得到的 3 种胃蛋白酶原,分别命名为 PG-1,PG-2 和 PG-3。纯化结果如表 1 所示,经硫酸铵分级沉淀和两次柱层析纯化得到的 PG-1 4.0 mg、PG-2 12.2 mg 和 PG-3 4.4 mg,其相应的纯化倍数分别为 12.8、13.0 和 18.7。

子交换柱、DEAE-Sephacel 阴离子交换柱以及 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析柱进行纯化(图 2)。分离得到的 3 种胃蛋白酶原,分别命名为 PG-1,PG-2 和 PG-3。纯化结果如表 1 所示,经硫酸铵分级沉淀和两次柱层析纯化得到的 PG-1 4.0 mg、PG-2 12.2 mg 和 PG-3 4.4 mg,其相应的纯化倍数分别为 12.8、13.0 和 18.7。

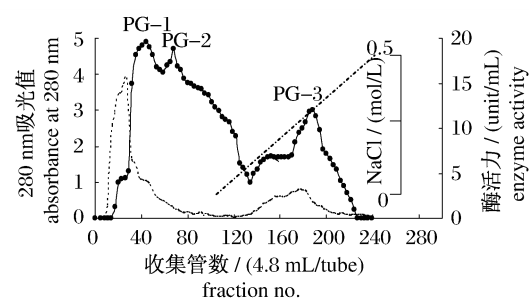


图 1 胃蛋白酶原的 DEAE-Sephacel 柱层析结果
(---) 280 nm 处吸光值; (•) 酶活力。

Fig. 1 DEAE-Sephacel chromatography of pepsinogens from *E. awoara*

(---) Absorbance at 280 nm; (•) Enzyme activity.

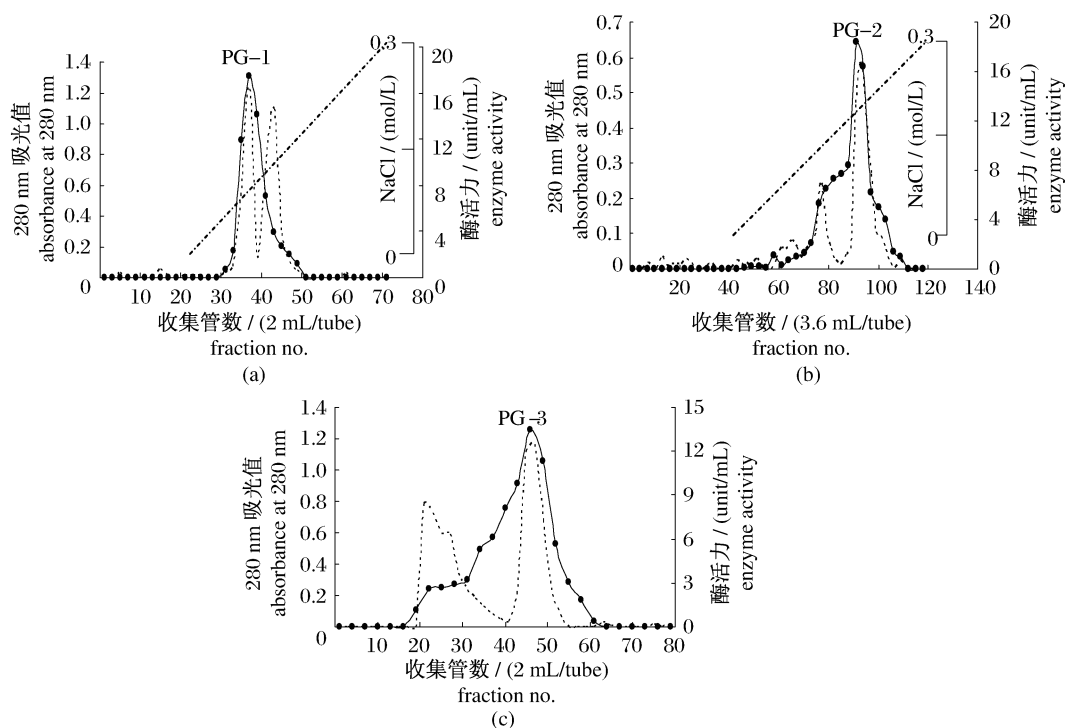


图 2 青石斑鱼胃蛋白酶原柱层析纯化结果

(a) PG-1 的 SP-Sephacel 柱层析结果; (b) PG-2 的 DEAE-Sephacel 柱层析结果; (c) PG-3 的 Sephacryl S-200 柱层析结果。
(---) 280 nm 处吸光值; (•) 酶活力。

Fig. 2 Column chromatography purification of pepsinogens from *E. awoara*

(a) SP-Sephacel chromatography of PG-1; (b) DEAE-Sephacel chromatography of PG-2; (c) Sephacryl S-200 chromatography of PG-3. (---) Absorbance at 280 nm; (•) Enzyme activity.

表 1 青石斑鱼胃蛋白酶原的纯化结果
Tab. 1 Summary of purification of PGs from *E. awoara*

步骤 procedure	总蛋白/mg total protein	总活力/U total activity	比活力/(U/mg) specific activity	纯化倍数 purification fold	得率/% yield
粗酶液 crude extract	1 196.1	6 924	5.8	1	100
硫酸铵盐析 ammonium sulfate	649.0	4 105.2	6.3	1.1	59.3
DEAE-Sephacel					
PG-1	32.2	1 000	31.1	5.4	14.4
PG-2	42.8	2 880	67.3	11.6	41.6
PG-3	48.0	1 800	37.5	6.5	26.0
SP-Sephrose (PG-1)	4.0	296.4	74.1	12.8	4.3
DEAE-Sephrose (PG-2)	12.2	916.9	75.2	13.0	13.2
Sephacryl S-200 (PG-3)	4.4	476.7	108.3	18.7	6.9

2.2 青石斑鱼胃蛋白酶原和胃蛋白酶的性质分析

纯化效果和分子量测定 SDS-PAGE 结果显示,纯化得到的 3 种青石斑鱼胃蛋白酶原(PG-1, PG-2 和 PG-3)的分子量分别约为 35、36 和 37 ku(图 3-a);而激活后的三种胃蛋白酶的分子量则分别约为 33、33 和 34 ku(图 3-a),并命名为 P-1、P-2 和 P-3。此结果与本实验室报道的鳎^[3]、欧洲鳎^[5]、黄鳍鲷^[8]、乌鳢^[9]以及鲈^[10]的胃蛋白酶原的分子量大小相近。

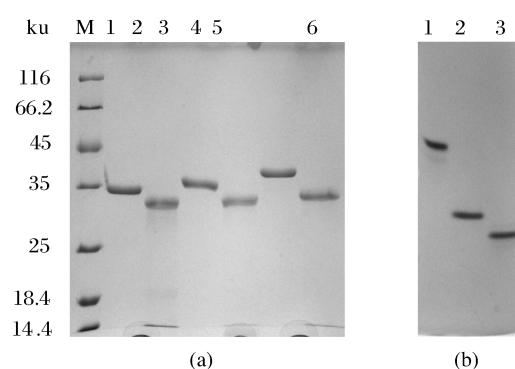


图 3 青石斑鱼胃蛋白酶原和胃蛋白酶的 SDS-PAGE (a) 和 Native-PAGE (b)

(a) M. 标准分子量蛋白; 1. PG-1; 2. P-1; 3. PG-2; 4. P-2; 5. PG-3; 6. P-3。 (b) 1. PG-1; 2. PG-2; 3. PG-3。

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Native-PAGE (B) of purified pepsinogens and pepsins from *E. awoara*

(a) M. Protein marker; 1. pepsinogen-1; 2. pepsin-1; 3. pepsinogen-2; 4. pepsin-2; 5. pepsinogen-3; 6. pepsin-3. (b) 1. pepsinogen-1; 2. pepsinogen-2; 3. pepsinogen-3.

Native-PAGE 结果(图 3-b)显示,3 种胃蛋白酶原均为单一电泳条带,表明纯化效果良好。图中所示的 3 种胃蛋白酶原的迁移率不同,PG-1 的迁移速率最慢,PG-3 的迁移速率最快,表明它们尽管分子量相似但属于不同类型的胃蛋白酶原。

胃蛋白酶原激活过程分析 胃蛋白酶原在酸性条件或者胃蛋白酶存在下,N-末端会发生 3~5 ku 小分子肽的断裂,从而活化成为胃蛋白酶。转化过程一般有两种不同的路径:一种是直接转化成具有活性的胃蛋白酶,另一种是通过中间体逐步转化成有活性的胃蛋白酶^[1,17-18]。图 4 显示了 3 种胃蛋白酶原转化为胃蛋白酶的过程,PG-1 直接转化成胃蛋白酶,而 PG-2 和 PG-3 都是通过中间体逐步转化为有活性的胃蛋白酶,这也进一步证明青石斑鱼的 3 种胃蛋白酶原为不同类型。

pH 和温度对青石斑鱼胃蛋白酶活力的影响 在 3 种胃蛋白酶中,P-1 的最适 pH 值为 3.0,P-2 和 P-3 的最适 pH 值为 2.5。在 pH 5.0 以上 3 种酶活力均较低(图 5)。P-1 和 P-3 两种酶在 0.25 mol/L KCl-HCl 缓冲液(pH 4.0)中的活力高于在 0.25 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.0)中的活力,说明缓冲液的种类对酶活力也有一定程度的影响。

P-1、P-2 和 P-3 3 种酶的最适温度均为 40 °C,在 20~45 °C 之间都有较高活力,而在 50 °C 以上时酶活力快速下降,表明酶的热稳定性较差(图 6)。

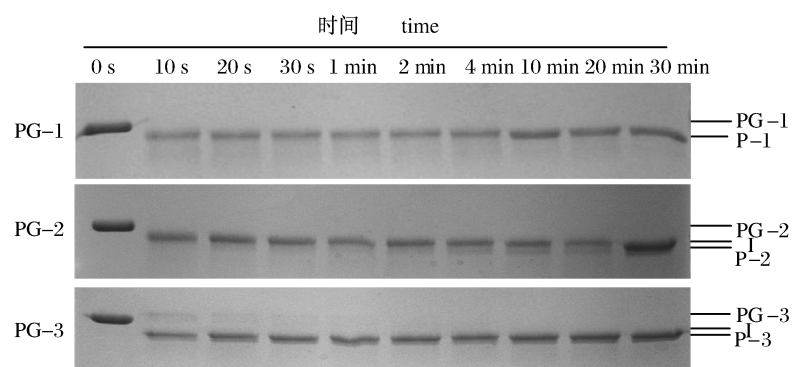


图4 青石斑鱼胃蛋白酶原转化为胃蛋白酶的过程

PG-1. 胃蛋白酶原-1; PG-2. 胃蛋白酶原-2; PG-3. 胃蛋白酶原-3; P-1. 胃蛋白酶-1; P-2. 胃蛋白酶-2; P-3. 胃蛋白酶-3; I. 中间体。

Fig. 4 Conversion of *E. awoara* pepsinogens to pepsins

PG-1. pepsinogen-1; PG-2. pepsinogen-2; PG-3. pepsinogen-3; P-1. pepsin-1; P-2. pepsin-2; P-3. pepsin-3; I. Intermediate form.

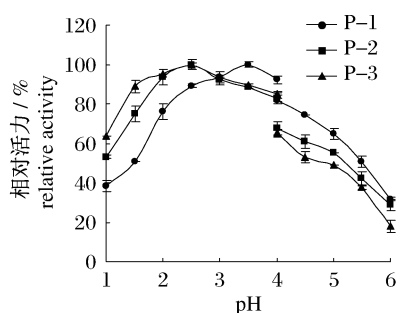


图5 pH对青石斑鱼胃蛋白酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activities of pepsins from *E. awoara*

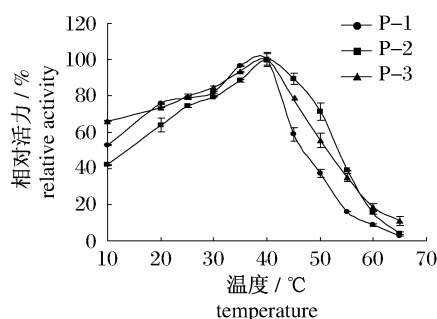


图6 温度对青石斑鱼胃蛋白酶活力的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the activity of pepsins from *E. awoara*

抑制剂对青石斑鱼胃蛋白酶活力的影响
不同浓度 pepstatin A 对胃蛋白酶的抑制效果显示, pepstatin A 对青石斑鱼胃蛋白酶 P-1、P-2 和 P-3 的有效抑制摩尔比分别为 8:1、6:1 和 4:1 (图 7)。

免疫交叉反应 青石斑鱼的 3 种胃蛋白酶原与 6 种大鼠抗黄鳍鲷多克隆抗体产生不同程度

的免疫交叉反应(图 8)。由图可知, PG-1 和 PG-2 能与大鼠抗黄鳍鲷多克隆抗体 PG-I、PG-II 和 PG-3b 有较强的免疫交叉反应, 而与抗 PG-3a、PG-4a 和 PG-4b 的免疫交叉反应很弱; P-3 与抗 PG-4b 多克隆抗体有较强的免疫交叉反应, 而与其余的多克隆抗体反应较弱。这些结果表明, PG-1 和 PG-2 两种胃蛋白酶在蛋白质一级结构上的同源性较高, 但它们与 PG-3 的同源性较低, 也可以说明它们与黄鳍鲷的胃蛋白酶原 PG-I 和 PG-II 的同源性较高。本研究结果以及已报道的研究结果均表明, 鱼胃中存在多种形式的胃蛋白酶原, 每种类型的酶原又有多种同工酶, 胃蛋白酶的多样性对鱼类本身消化各种食物非常有利^[8-9,19]。

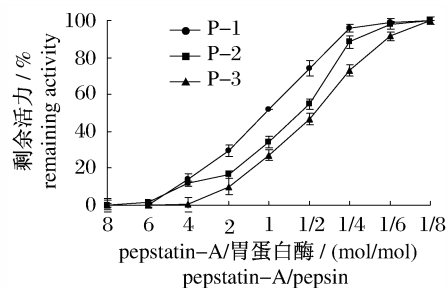


图7 Pepstatin-A对青石斑鱼胃蛋白酶的抑制效果

Fig. 7 Effect of pepstatin-A on pepsins from *E. awoara*

青石斑鱼胃蛋白酶动力学参数 在有胃鱼中, 食物蛋白的消化主要集中在胃中, 胃蛋白酶是其主要消化酶, 含量最高^[20]。当鱼类饲料进入鱼体后, 营养物质要首先在胃中进行消化, 因此, 胃蛋白酶的活性将影响到食物蛋白的消化速率, 进

而影响到鱼类的生长速度。

根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图,计算动力学参数米氏常数 K_m 和催化常数 k_{cat} 值,结果显示,P-1、P-2 和 P-3 3 种胃蛋白酶的 K_m 值分别为 7.0×10^{-5} 、 5.5×10^{-5} 和 5.2×10^{-5} mol/L。其中,P-3 的 K_m 值略低于其它两种胃蛋白酶,表明其对牛血红蛋白底物有更大的亲和力。3 种酶的 k_{cat} 值分别为 17.6、22.8 和 18.7 S^{-1} ,P-2 的 k_{cat} 值高于其它两种胃蛋白酶;特异性常数(k_{cat}/K_m)值

分别为 2.5×10^5 、 4.1×10^5 和 3.6×10^5 mol/(L · S),其中,P-2 的 k_{cat}/K_m 值高于其它两种胃蛋白酶,提示其在生理条件下的催化效率更高。青石斑鱼与其它鱼类,包括欧洲鳗鲡^[5]、乌鳢^[9]、鲈^[10]和大西洋鲑鱼^[11]的胃蛋白酶动力学参数比较结果见表 2。通过比较发现,青石斑鱼胃蛋白酶的催化常数 k_{cat} 值高于淡水乌鳢和海水鲈胃蛋白酶的 k_{cat} 值,其催化效率 k_{cat}/K_m 值也较高。

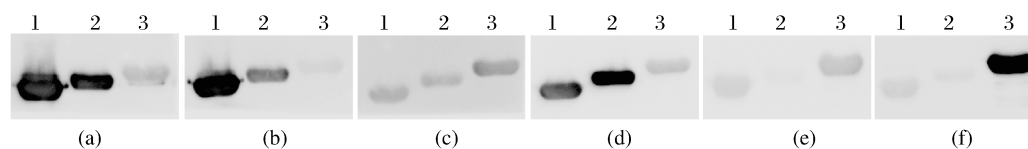


图 8 胃蛋白酶原的免疫交叉反应结果

(a) 与抗黄鳍鲷 PG- I 反应。(b) 与抗黄鳍鲷 PG- II 反应。(c) 与抗黄鳍鲷 PG-3a 反应。(d) 与抗黄鳍鲷 PG-3b 反应。(e) 与抗黄鳍鲷 PG-4a 反应。(f) 与抗黄鳍鲷 PG-4b 反应。M. 预染标准分子量蛋白; 1. PG-1; 2. PG-2; 3. PG-3。

Fig. 8 Western blot of pepsinogens using anti-sea bream polyclonal antibodies

(a) Reacted with anti-PG- I antibody. (b) Reacted with anti-PG- II antibody. (c) Reacted with anti-PG-3a antibody. (d) Reacted with anti-PG-3b antibody. (e) Reacted with anti-PG-4a antibody. (f) Reacted with anti-PG-4b antibody. M. Prestained protein marker; 1. PG-1; 2. PG-2; 3. PG-3.

表 2 鱼类胃蛋白酶动力学参数表
Tab. 2 Kinetic properties of pepsins from different species of fish

酶 enzyme	米氏常数/ (mol/L) K_m	催化常 数/ S^{-1} k_{cat}	特异性常数/ [mol/(L · S)] k_{cat}/K_m
胃蛋白酶-1/pepsin 1			
青石斑鱼	7.0×10^{-5}	17.6	2.5×10^5
乌鳢	9.8×10^{-5}	8.24	8.4×10^4
鲈	5.5×10^{-5}	22.8	1.3×10^5
胃蛋白酶-2/pepsin 2			
青石斑鱼	5.5×10^{-5}	7.34	4.1×10^5
乌鳢	6.0×10^{-5}	4.02	6.7×10^4
鲈	1.2×10^{-4}	7.04	5.9×10^4
胃蛋白酶-3/pepsin 3			
青石斑鱼	5.2×10^{-5}	18.7	3.6×10^5
乌鳢	1.4×10^{-4}	13.2	9.5×10^4
鲈	3.8×10^{-5}	3.09	8.1×10^4
胃蛋白酶-1/pepsin 1			
欧洲鳗鲡	8.8×10^{-5}	23.7	2.7×10^5
大西洋鲑鱼	1.56×10^{-4}	18	1.2×10^5
胃蛋白酶-2/pepsin 2			
欧洲鳗鲡	9.2×10^{-5}	19.4	2.1×10^5
大西洋鲑鱼	4.4×10^{-5}	33	2.8×10^5
胃蛋白酶-3/pepsin 3			
欧洲鳗鲡	7.0×10^{-5}	34.4	4.9×10^5

3 讨论

本研究采用硫酸铵盐析并结合柱层析技术,从青石斑鱼胃中纯化得到 3 种胃蛋白酶原。根据报道,胃蛋白酶原通常采用 3 次或更多次的柱层析才达到较好的纯化效果,如 YONEZAWA 等^[21]运用了 DEAE-cellulose、DEAE-Sepharose 和 Sephacryl S-200 3 次柱层析才从响尾蛇胃中得到胃蛋白酶原。本研究采用的分离纯化方法相对较简单,获得的胃蛋白酶种类多,且重复性好。SDS-PAGE 和 Native-PAGE 结果均表明 3 种酶得到了高度纯化。3 种胃蛋白酶原(PG-1、PG-2 和 PG-3)在 Native-PAGE 上的迁移率不同,其中 PG-1 的迁移速率明显的小于其余两种,PG-2 的迁移率也略小于 PG-3。证明了 3 种蛋白酶原是不同的类型。通过 SDS-PAGE,推测 3 种胃蛋白酶原的分子量分别约为 35、36 和 37 ku,激活后对应的胃蛋白酶的分子量则分别约为 33、33 和 34 ku。此结果与本实验室报道的黄鳢^[22]和欧洲鳗鲡^[5]、黄鳍鲷^[8]和鳊^[3]以及乌鳢^[9]和鲈^[10]等的胃蛋白酶原分子量相似。但小于金枪鱼^[23]、突吻鲈^[24]的胃蛋白酶原的分子量,而大于毛鳞鱼胃蛋白酶的分子量^[25]。由此可知,在不同鱼种中纯化得到的胃蛋白酶原的分子量以及

对应的胃蛋白酶活力存在一定差异。鱼类胃蛋白酶的这些差异,可能与它们有不同的摄食习惯与生活环境有关。

以牛血红蛋白为底物,测得 3 种胃蛋白酶的最适 pH 分别是 3.0、2.5、2.5;最适温度均为 40 ℃。本研究得到的青石斑鱼胃蛋白酶的最适 pH 和最适温度与本研究室已报道的鳊^[3]、欧洲鳗鲡^[5]、黄鳍鲷^[8]、乌鳢^[9]以及鲈^[10]的胃蛋白酶相近。

实验所用 3 种酶均能被天冬氨酸蛋白酶特异性抑制剂 pepstatin A 有效抑制,证明它们属于天冬氨酸蛋白酶家族。动力学研究表明,P-3 对牛血红蛋白底物有更强的亲和力,P-2 的催化效率高于其它两种胃蛋白酶,可能在食物蛋白的消化过程中起着更重要的作用。青石斑鱼与黄鳍鲷都属于海水硬骨鱼,鲈亚目。为了进一步确定从青石斑鱼胃中纯化的蛋白是胃蛋白酶原,本研究采用大鼠抗黄鳍鲷胃蛋白酶原抗体做免疫交叉反应。结果表明,青石斑鱼的 3 种 PG 均与大鼠抗黄鳍鲷 PG 抗体有不同程度的反应,且 PG-1 和 PG-2 的同源性较高,但它们与 PG-3 的同源性较低。该结果进一步证明,从青石斑鱼胃中分离纯化的目的蛋白为胃蛋白酶原,且这 3 种胃蛋白酶原是不同的类型。

在动力学方面,酶的特异性常数 k_{cat}/k_m 代表了其催化效率。其中,P2 最高,是 P3 的 1.14 倍,P1 的 1.64 倍,提示这 3 种酶的活性中心的立体结构有一定差异从而影响了它们的催化效率。鱼体内多种胃蛋白酶的存在推测可能有利于消化不同来源的食物蛋白。

对青石斑鱼胃蛋白酶的酶学性质研究,有助于了解海水鱼类胃蛋白酶的生理功能、消化特性等,同时也可作为鱼类配合饲料的研制及改良提供理论参考。

参考文献:

- [1] KAGEYAMA T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(2): 288-306.
- [2] 王镜岩,朱圣庚,徐长法,等. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社,2002;320-322,411-422.
- [3] ZHOU Q, LIU G M, HUANG Y Y, et al. Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(13): 5401-5406.
- [4] 吴雪峰,赵金良. 鳊胃蛋白酶原基因 cDNA 全长的克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 971-976.
- [5] WU T, SUN L C, YANG F, et al. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Food Chem, 2009, 115(1): 137-142.
- [6] BRIER S, MARIA G, CARGINALE V, et al. Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod (*Trematomus bernacchii*) [J]. FEBS J, 2007, 274(23): 6152-6166.
- [7] FENG S, LI W, LIN H. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 2008, 149(2): 275-284.
- [8] ZHOU Q, FU X P, ZHANG L J, et al. Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins [J]. Food Chem, 2007, 103(3): 795-801.
- [9] CHEN W Q, CAO M J, YOSHIDA A, et al. Study on pepsinogens and pepsins from snakehead [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(22): 10972-10978.
- [10] CAOM J, CHEN W Q, DU C H, et al. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 2011, 158(4): 259-265.
- [11] GILDBERG A, OLSEN R L, BJARNASON J B. Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 1990, 96(2): 323-330.
- [12] 陈波,罗海忠,付荣兵. 青石斑鱼生物学特性及其人工繁育技术[J]. 齐鲁渔业, 2007, 24(2): 36-38.
- [13] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [14] ANSON M L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and the cathepsin with hemoglobin [J]. J Gen Physiol, 1938, 22(1): 79-89.
- [15] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [16] TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J.

- Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1979,76(9):4350-4354.
- [17] KAGEYAMA T, TAKAHASHI K. Monkey pepsinogens and pepsins VI. One-step activation of Japanese monkey pepsinogen to pepsin [J]. J Biochem(Tokyo),1982,92(4):1179-1188.
- [18] KAGEYAMA T, TAKAHASHI K. Occurrence of two different pathways in the activation of porcine pepsinogen to pepsin[J]. J Biochem(Tokyo),1983,93(3):743-754.
- [19] KAGEYAMA T, TANABE K, KOIWAI O. Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development [J]. J Biol Chem, 1990, 265(28):17031-17038.
- [20] 袁勤生,赵健. 酶与酶工程[M]. 上海:华东理工大学出版社,2005:8.
- [21] YONEZAWA H, NONAKA T, UCHIKOBA T, *et al.* Isolation and characterization of pepsinogen from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake) [J]. J Biochem(Tokyo),2000,127(5):755-760.
- [22] WENG W Y, WU T, CHEN W Q, *et al.* Purification and characterization of pepsinogens2 and pepsins from the stomach of rice field eel(*Monopterus albus* Zuiew) [J]. Fish Physiol Biochem, 2011, 37: 543-552.
- [23] XU R A, WONG R J, ROGERS M L, *et al.* Purification and characterization of acidic proteases from the stomach of the deep water finfish orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) [J]. J Food Biochem,1996,20:31-48.
- [24] GILDBERG A, OLSEN R L, BJZMASON J B. Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Comp Biochem Physiol B,1990,96(2):323-330.
- [25] GILDBERG A, RAA J. Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*) [J]. Comp Biochem Physiol A,1983,75(3):337-342.

Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from banded grouper (*Epinephelus awoara*)

LIU Xi-zhi^{1,2,3}, QIU Xiao-yan^{1,2}, CAI Qiu-feng^{1,2,3},
LIU Guang-ming^{1,2}, SU Wen-jin^{1,2}, CAO Min-jie^{1,2*}

(1. College of Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Pepsin is a member of the large family of aspartic proteinases and plays a critical role in the digestion of food proteins. In the present study, three pepsinogens (PG-1, PG-2 and PG-3) were highly purified from the stomach of marine fish banded grouper (*Epinephelus awoara*) by ammonium sulfate fractionation and a series of column chromatographies. In the first anion exchange column DEAE-Sephacel, three peaks of hemoglobin-digesting activity were detected. These fractions were pooled respectively and applied to SP-Sepharose, DEAE-Sepharose or Sephacryl S-200 for further purification. As a result, 4.0 mg of PG-1, 12.2 mg of PG-2 and 4.4 mg of PG-3 were obtained with purification folds of 12.8, 13.0 and 18.7, respectively. The molecular mass of the three purified pepsinogens was estimated to be 35, 36 and 37 ku, respectively, by SDS-PAGE. Under acid conditions, pepsinogens converted into their active form pepsins (P-1, P-2 and P-3) with molecular masses of approximately 33, 33 and 34 ku, respectively. PG-1 converted into its active form by a one-step pathway while PG-2 and PG-3 converted into their active forms by a stepwise pathway. Native-PAGE analysis showed that all of the three purified pepsinogens reveal single band with different migration rates. The results indicated these three enzymes had different types of pepsinogens. To investigate the effect of pH or temperature on activity of pepsins, pepsinogens were first converted to pepsins at pH 2.0. They showed maximal activity at pH 3.0, 2.5 and 2.5, respectively and the optimal temperatures of all PGs were 40 °C, using acidic-denatured bovine hemoglobin as substrate. All of the enzymatic activity of the three pepsins decreased when the temperature is higher than 50 °C, suggesting their susceptibility to higher temperature. The activity of all three pepsins could be completely inhibited by a typical aspartic proteinase inhibitor pepstatin A and these pepsins exhibited different sensitivities to pepstatin A. When the molar ratios of pepstatin A to pepsins (P-1, P-2 and P-3) were 8:1, 6:1 and 4:1, respectively, the enzymatic activities could be completely inhibited. These results strongly indicated that the three purified pepsins purified in the present study are aspartic proteinases. Western blot analysis revealed that these pepsinogens had different cross reaction with anti-sea bream PG-I, PG-II, PG-3b, PG-3a, PG-4a and PG-4b polyclonal antibodies. These results further confirmed that PG-1 and PG-2 were closely related pepsinogens and share high identity with each other, whereas PG-3 was different. The results of the kinetic constants of different pepsins were determined by Lineweaver-Burk plots using acidic-denatured bovine hemoglobin as substrate. The kinetic constants of K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m of pepsins (P-1, P-2 and P-3) for acidic-denatured bovine hemoglobin were 7.0×10^{-5} mol/L, 17.6 S^{-1} , 2.5×10^5 mol/(L · S); 5.5×10^{-5} mol/L, 22.8 S^{-1} , 4.1×10^5 mol/(L · S) and 5.2×10^{-5} mol/L, 18.7 S^{-1} , 3.6×10^5 mol/(L · S), respectively. The specificity constant of P-2 was higher than those of the other two pepsins, suggesting that its catalytic efficiency is higher than those of the other two pepsins under physiological conditions.

Key words: *Epinephelus awoara*; pepsinogens; pepsins; purification

Corresponding author: CAO Min-jie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn