

# 日本鳗鲡胰蛋白酶的分离纯化及性质分析

李 辉<sup>1,2</sup>, 钟毅雪<sup>1,2</sup>, 翁 凌<sup>1,2</sup>, 张凌晶<sup>1,2</sup>, 章 骞<sup>1,2</sup>, 曹敏杰<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省水产品深加工工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 通过硫酸铵分级盐析、DEAE-Sephrose 阴离子交换柱层析、Phenyl-Sephrose 疏水柱层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析等方法, 从日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 肝胰腺中分离纯化得到胰蛋白酶, SDS-PAGE 显示其分子质量为 21.5 ku。以 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 为底物, 胰蛋白酶最适温度和最适 pH 值分别为 40 ℃ 和 8.5。动力学实验表明,  $K_m$  值和  $k_{cat}$  值分别为 3.1  $\mu\text{mol/L}$  和 59.9  $\text{s}^{-1}$ 。丝氨酸蛋白酶抑制剂 Pefabloc SC、PMSF、benzamidine、STI 等对其有特异抑制效果。底物特异性结果显示, 该酶特异分解 Arg 和 Lys 残基的 C 端。肽质量指纹图谱获得 5 个片段, 共 76 个氨基酸残基, 与基因文库中的日本鳗鲡胰蛋白酶氨基酸序列完全相同。说明本研究所纯化的蛋白质为胰蛋白酶。

[关键词] 日本鳗鲡; 胰蛋白酶; 纯化; 性质

[中图分类号] Q 556.3

## Purification and Characterization of a Trypsin from the Hepatopancreas of Japanese Eel (*Anguilla japonica*)

LI Hui<sup>1,2</sup>, ZHONG Yi-xue<sup>1,2</sup>, WENG Ling<sup>1,2</sup>, ZHANG Ling-jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Qian<sup>1,2</sup>, CAO Min-jie<sup>1,2</sup>

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

2. Fujian Engineering Research Center of Deep Processing of Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** A trypsin was purified to homogeneity from the hepatopancreas of Japanese eel (*Anguilla japonica*) by ammonium sulfate precipitation and column chromatographies of DEAE-Sephrose anion-exchange, Phenyl-Sephrose hydrophobic interaction and Sephacryl S-200 gel-filtration. SDS-PAGE revealed that the molecular weight of the trypsin is about 21.5 ku. Using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA as substrate, the optimal temperature and pH of trypsin were 40 ℃ and 8.5, respectively. Kinetic parameters of  $K_m$  and  $k_{cat}$  were 3.1  $\mu\text{mol/L}$  and 59.9  $\text{s}^{-1}$ , respectively. Serine proteinase inhibitors of Pefabloc SC, PMSF, benzamidine, and STI specifically inhibited the activity of the enzyme. Substrate specificity revealed that it specifically cleaved at the carboxyl sites of Arg and Lys residues. Peptide mass fingerprinting obtained 5 peptide fragments containing 76 amino acid residues which were identical to the sequence of a Japanese eel trypsin reported in the GenBank. All the above results strongly suggested that the purified protein is a trypsin.

**Keywords:** Japanese eel; trypsin; purification; characterization

[收稿日期] 2015-04-27

[修回日期] 2015-05-20

[基金项目] 十二五国家科技支撑计划项目 (2012BAD38B09); 国家自然科学基金资助项目 (31471640)

[作者简介] 李辉 (1989—), 男, 硕士生, 主要从事食品生物化学研究。通信作者: 曹敏杰 (1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质化学及水产品深加工研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

## 0 引言

水生生物的胰腺组织富含丝氨酸蛋白酶, 这些酶与食物蛋白质的消化密切相关, 具有重要的生理功能。通过对这类酶的结构和功能特性的研究可阐明其作用机制以及可能的应用途径<sup>[1]</sup>。丝氨酸蛋白酶家族中的胰蛋白酶能够特异性分解蛋白质中赖氨酸和精氨酸残基端的 C 端肽键。胰蛋白酶独特的酶学特性已经被广泛应用到蛋白质组学、质谱分析、食品生产加工等领域<sup>[2]</sup>。在水产动物胰蛋白酶研究方面, 国内外关于鱼类胰蛋白酶的研究已有大量报道, 包括海水的弹丸鱼 (*Balistes capriscus*)<sup>[3]</sup>、沙丁鱼 (*Sardina pilchardus*)<sup>[4]</sup>以及淡水的鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)<sup>[5]</sup>、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)<sup>[6]</sup>等。

鳗鲡作为主要的水产经济物种, 肉质味道鲜美, 营养价值高, 深受消费者青睐。2013 年, 淡水鳗鲡在我国养殖量已达到 20.6 万 t, 其中福建省的养殖量达到 8.1 万 t, 占全国总量的 39.3%<sup>[7]</sup>。日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 生性凶猛, 为肉食性动物, 胡庚东等报道了日本鳗鲡消化酶中蛋白酶活性明显高于欧洲鳗鲡和澳洲鳗鲡的蛋白酶活性<sup>[8]</sup>, 但仅限于对粗酶的研究。Yoshinaka 等<sup>[9]</sup>通过柱层析纯化得到日本鳗鲡的胰蛋白酶, 但对其分子质量及一级结构信息未作研究。胰蛋白酶作为重要的消化酶, 在饲料蛋白质的消化吸收中起重要作用。Krogdahl 等<sup>[10]</sup>报道了在大西洋鲑鱼的饲养过程中增加蛋白质投放量, 可以促进胰腺中胰蛋白酶分泌量的增加, 从而提高其消化能力。本文以日本鳗鲡为研究对象, 对其肝胰腺中的胰蛋白酶进行分离纯化, 旨在为揭示其酶学性质及与其他鱼类胰蛋白酶的性质比较提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

鲜活的日本鳗鲡 (每条质量约 700 ~ 800 g) 购自厦门集美菜市场。层析树脂 DEAE-Sephacrose、Phenyl-Sephacrose、Sephacryl S-200 购于 GE Healthcare 公司。荧光底物 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 以及其他荧光多肽合成底物 (MCA 底物) 为日本 Peptide Institute 公司产品。PMSF、1, 10-phenanthroline monohydrate 以及 benzamidine 购于美国 Sigma 公司。E-64 购于美国 Amresco 公司。Pepstatin、Pefabloc SC 购于德国 Roche 公司。LBTI 和 STI 由本实验室制备。SDS-PAGE 所用 Protein Marker 为美国 Bio-Rad 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

AvantiJ-26S XP 高速冷冻离心机 (Beckman, 美国); Lamda 35 型紫外可见分光光度计 (Perkin Elmer, 美国); FP-6200 荧光分光光度计 (Jasco, 日本); G: Box 凝胶成像仪 (Syngene, 英国); 组织捣碎机 (Kinematica, 瑞士); WB-14 恒温水浴锅 (Mettler, 德国); 蛋白质电泳装置 (Bio-Rad, 美国); 超滤膜浓缩装置 (Millipore, 美国)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蛋白质含量测定及纯度的鉴定

蛋白质含量按 Lowry 法<sup>[11]</sup>测定。柱层析过程中的蛋白质检测用紫外分光光度计在 280 nm 下进行测定。蛋白质纯度及纯化蛋白质的分子质量用质量分数 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)<sup>[12]</sup>进行分析, 以考马斯亮蓝 R-250 进行染色。Native-PAGE: 样品前处理过程中不加入 SDS 和任何还原剂, 样品不用加热, 整个电泳过程始终在 4 °C 条件下进行, 恒定电流 8 mA。其他操作与 SDS-PAGE 相同。

#### 1.2.2 酶活力的测定

参照文献 [6], 以 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 为底物, 反应体系为 900  $\mu$ L 20 mmol/L Tris-HCl (pH =

7.5) + 50  $\mu$ L 酶液 + 50  $\mu$ L 底物 (10  $\mu$ mol/L)。反应在 37  $^{\circ}$ C 下进行 10 min 后,立即加入 1.5 mL 终止液 ( $V$  (甲醇) :  $V$  (水) :  $V$  (异丙醇) = 35:30:35) 终止反应。反应释放的产物 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) 用荧光分光光度计在激发波长 380 nm 和发射波长 450 nm 下进行测定。一个酶活力单位 (U) 定义为每分钟释放 1  $\mu$ mol AMC 需要的酶量。

### 1.2.3 酶的分离纯化

酶的纯化方法参照文献 [6]。将鲜活日本鳗鲡宰杀后取肝胰腺 (20 g), 加入 4 倍体积的 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5) (缓冲液 A), 以组织捣碎机捣碎, 在 4  $^{\circ}$ C、8843 r/min 条件下离心 20 min, 经绢布过滤除去脂肪后得上清液, 上清液缓慢加入研碎的硫酸至饱和度为 60%, 搅拌 1 h 后静置 2 h, 在 4  $^{\circ}$ C、8843 r/min 条件下离心 20 min, 收集所得沉淀。将沉淀用最少体积的 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5) 溶解后置于 10 倍体积以上缓冲液 A 中充分透析。将透析好的样品上样于用缓冲液 A 平衡好的 DEAE-Sepharose (2.5 cm  $\times$  10 cm) 离子交换柱, 用相同缓冲液充分流洗到蛋白质含量达到基线, 吸附部分用 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 线性洗脱, 洗脱总体积为 600 mL。柱层析期间保持流速 1 mL/min, 每管收集样品体积为 5 mL, 同时测定样品的酶活力和 280 nm 处的吸光度值。

将吸附部分加入硫酸铵至终浓度为 1 mol/L, 然后上样于用含 1 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  缓冲液 A 平衡好的 Phenyl-Sepharose (1.5 cm  $\times$  7 cm) 疏水层析柱, 充分流洗以后, 先用 1 ~ 0 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  线性洗脱, 洗脱总体积为 200 mL, 接着用缓冲液 A 流洗, 此过程得到胰蛋白酶活性部分。柱层析期间保持流速为 1 mL/min, 每管收集样品体积为 3 mL。

收集胰蛋白酶活性部分, 经过 YM-10 超滤膜超滤浓缩后, 上样于用含 0.15 mol/L NaCl 缓冲液 A 平衡好的 Sephacryl S-200 HR (2.5 cm  $\times$  98 cm) 凝胶柱。此过程保持流速 0.8 mL/min, 每管收集的样品体积为 2.4 mL。经过凝胶过滤柱后, 得到高度纯化的胰蛋白酶。

### 1.2.4 酶的性质分析

1) 最适温度和热稳定性 将 50  $\mu$ L 酶液加入到 900  $\mu$ L 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5) 中, 再加入浓度为 10  $\mu$ mol/L 的底物 50  $\mu$ L, 在 20 ~ 70  $^{\circ}$ C 下加热 10 min, 测定酶活力, 得出酶的最适温度。热稳定性实验是将上述反应体系在 20 ~ 70  $^{\circ}$ C 下恒温放置 30 min, 而后迅速用冰水冷却, 然后在 37  $^{\circ}$ C 下测定剩余酶活性。实验各重复 3 次。

2) 最适 pH 值和 pH 值稳定性 最适 pH 值的测定是将合理稀释的酶液置于 NaAc-HAC (pH = 4.0 ~ 6.0)、PBS (pH = 6.5 ~ 7.0)、Tris-HCl (pH = 7.5 ~ 9.0)、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -NaHCO<sub>3</sub> (pH = 9.5 ~ 11.0) 缓冲液 (20 mmol/L) 中, 在 37  $^{\circ}$ C 条件下反应 10 min。pH 值稳定性的测定, 将合理稀释的酶液在上述不同的缓冲液中孵育 30 min, 然后按照酶活力的测定方法, 取 50  $\mu$ L 酶液在 pH = 8.5 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中测定其剩余活力。实验各重复 3 次。

3) 蛋白酶抑制剂对酶活性的作用 将酶液分别与不同类别的蛋白酶抑制剂在室温下孵育 30 min 后, 参照酶活力的测定方法, 测定其剩余活力, 实验重复 3 次。

4) 蛋白酶的底物特异性 不改变酶活力测定的其他条件, 只更换相应的荧光底物, 测定酶分解各种底物的活力, 以底物 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 为对照, 实验重复 3 次。

5) 酶动力学 按酶活力测定方法, 将胰蛋白酶 (0.05 mg/mL) 分别与不同浓度的底物 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 在 37  $^{\circ}$ C 反应 5 min。通过绘制双倒数曲线<sup>[13]</sup> ( $1/V = (K_m/V_{\max}) * 1/[S] + 1/V_{\max}$ ), 推算出动力学参数米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大速率 ( $V_{\max}$ )。催化常数  $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E]$ , 其中:  $[S]$  为底物浓度,  $[E]$  为总的酶浓度。

6) 蛋白酶的肽质量指纹图谱分析 为获取胰蛋白酶的一级结构信息, 将纯化的胰蛋白酶进行 SDS-PAGE, 然后将所得凝胶经过硝酸银显色后, 切下目标蛋白, 最后将样品寄往中科新生命生物科技公司 (上海) 进行质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 胰蛋白酶的分离纯化

2.1.1 DEAE-Sephrose 离子交换柱层析

样品上样于 DEAE-Sephrose 离子交换层析柱，用缓冲液 A 充分流洗以后，经过 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 线性洗脱，胰蛋白酶同时出现在吸附部分和未吸附部分（见图 1）。

2.1.2 Phenyl-Sephrose 疏水柱层析

收集 DEAE-Sephrose 吸附酶活性较高的部分，上样于 Phenyl-Sephrose 疏水层析柱，从图 2 可以看出，经过 1 ~ 0 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的线性洗脱和 0 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 充分流洗以后，得到胰蛋白酶活性部分。

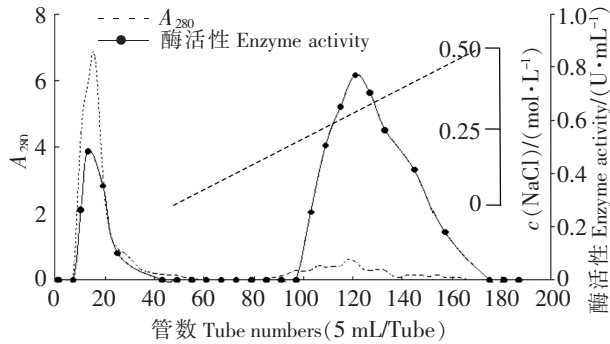


图 1 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱层析  
Fig.1 DEAE-Sephrose ion-exchange column chromatography

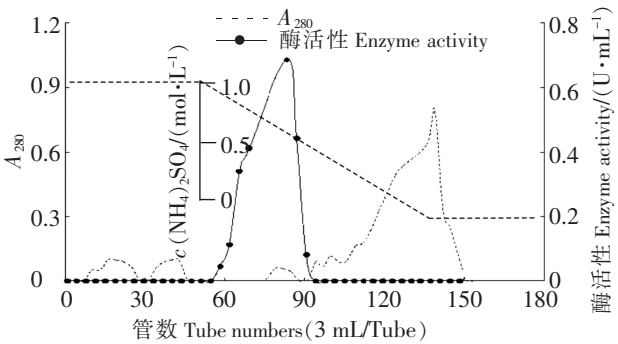


图 2 Phenyl-Sephrose 疏水层析  
Fig.2 Phenyl-Sephrose hydrophobic interaction chromatography

2.1.3 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析

收集 Phenyl-Sephrose 柱层析组分中胰蛋白酶活性较高的部分，经过 YM-10 超滤膜浓缩后，上样于 Sephacryl S-200 (2.5 cm × 98 cm) 凝胶过滤柱。结果如图 3 所示，经过凝胶柱的作用后，得到单一的胰蛋白酶活性峰，用电泳检测其纯度。

本实验通过硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephrose 阴离子交换、Phenyl-Sephrose 疏水层析以及 Sephacryl S-200 凝胶过滤等方法，从日本鳎鲷肝胰腺中得到纯化的胰蛋白酶。纯化结果如表 1 所示，胰蛋白酶的纯化倍数为 65.3 倍，得率为 4.6%。

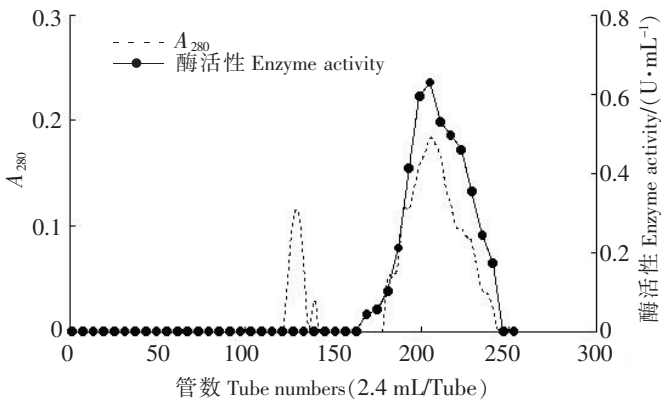


图 3 Sephacryl S-200 凝胶过滤  
Fig.3 Sephacryl S-200 gel filtration

表 1 日本鳎鲷胰蛋白酶的纯化结果

Tab.1 Purification of trypsin from the hepatopancreas of Japanese eel					
纯化步骤 Purification processes	总蛋白质 Total protein/mg	总活力 Total activity/U	比活力 Specific activity/(U · mg <sup>-1</sup> )	纯化倍数 Purification times	回收率 Recovery rate/%
粗酶 Crude enzyme	5142.1	984500.0	191.5	1.0	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Precipitation	695.5	257625.7	370.4	1.9	26.1
DEAE-Sephrose	76.3	158600.2	2078.6	10.9	16.1
Phenyl-Sephrose	14.2	58500.3	4119.7	21.5	5.9
Sephacryl S-200	3.6	45000.4	12500.1	65.3	4.6



2.2 胰蛋白酶的性质分析

2.2.1 电泳分析

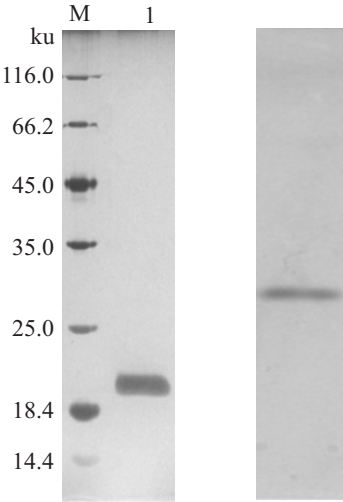
如图4所示, 胰蛋白酶在 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 均显示单一条带, 证明胰蛋白酶得到高度的纯化。胰蛋白酶分子质量为 21.5 ku。其分子质量与来自鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)<sup>[14]</sup>、乌鳢 (*Channa argus*)<sup>[15]</sup> 以及罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*)<sup>[16]</sup> 的胰蛋白酶分子质量大小相似。

2.2.2 胰蛋白酶的最适温度和热稳定性

如图5所示, 胰蛋白酶的最适温度为 40 ℃, 在 20 ~ 50 ℃ 的范围内, 保持 60% 以上的剩余活力。鳗鲡胰蛋白酶的最适温度与鲈鱼<sup>[6]183</sup>和鳕鱼 (*Gadus ogac*)<sup>[17]</sup> 的一致, 但低于南美白对虾丝氨酸蛋白酶的 (28 ku)<sup>[18]</sup>。热稳定性方面, 在 20 ~ 50 ℃, 胰蛋白酶较为稳定, 有 90% 以上的相对活力, 温度高于 50 ℃ 时, 活力急剧下降, 在 70 ℃ 下孵育 30 min 后, 仅能保持 24% 的相对活力。文献 [19] 报道来自罗非鱼的胰蛋白酶即使在 80 ℃ 的条件下孵育 30 min 仍能维持 100% 的相对活力。因此, 日本鳗鲡胰蛋白酶的热稳定性相对较差, 这可能与它生活的水温较低有关。

2.2.3 胰蛋白酶的最适 pH 值和 pH 值稳定性

如图6所示, 胰蛋白酶的最适 pH 值为 8.5, 比鲈鱼<sup>[6]183</sup>的胰蛋白酶低, 与日本鳗鲡<sup>[9]5</sup>的胰蛋白酶一致。当 pH 值低于 5.0 时, 胰蛋白酶没有活性。胰蛋白酶在低 pH 值下失去活力的原因可能是: 在酸性条件下, 蛋白酶发生了不可逆的变性, 或者蛋白酶表面的电荷发生了改变, 导致其不能有效地结合底物<sup>[20]</sup>。pH 稳定性方面, 在 pH = 7.0 ~ 11.0 的范围内, 胰蛋白酶表现出 80% 以上的相对活力, 但在 pH 值低于 6.0 的条件下不稳定。该结果与来自鳀鱼 (*Engraulis japonica*)<sup>[21]</sup> 和比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[22]</sup> 的胰蛋白酶一致。



a. SDS-PAGE      b. Native-PAGE  
说明: M-Protein Marker;泳道 1-纯化的胰蛋白酶。  
Notes: M-Protein Marker; lane 1-purified trypsin.

图4 日本鳗鲡胰蛋白酶的 SDS-PAGE 和 Native-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE and Native-PAGE of purified trypsin from Japanese eel

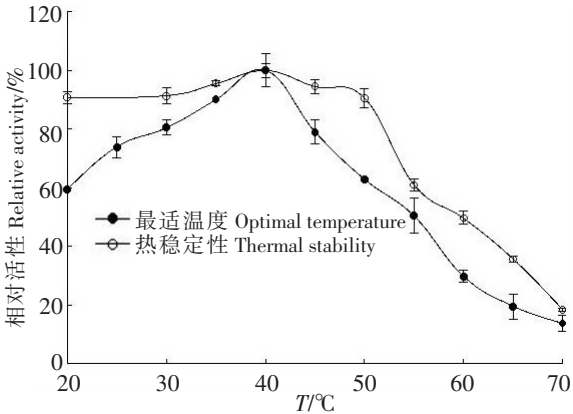


图5 日本鳗鲡胰蛋白酶的最适温度和热稳定性

Fig.5 Optimal temperature and thermal stability of the trypsin from Japanese eel

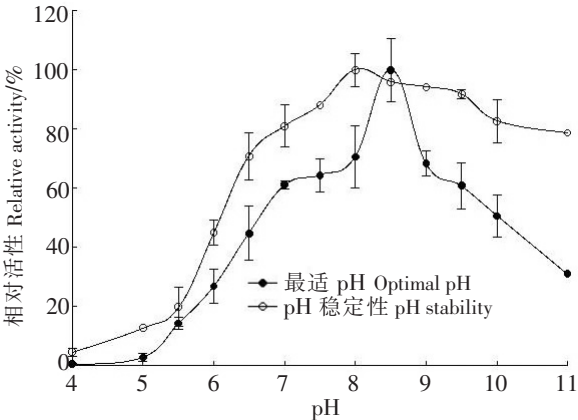


图6 日本鳗鲡胰蛋白酶的最适 pH 值和 pH 值稳定性

Fig.6 Optimal pH and pH stability of trypsin from Japanese eel

2.2.4 蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶活性的影响

如表2所示, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Pefabloc SC、PMSF、benzamidine、LBTI 以及 STI 可以强烈抑制胰蛋白酶的活性。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 可以明显抑制酶的活力, 原因可能是胰蛋白酶活性

位点附近存在半胱氨酸残基,影响了酶与底物的结合,这与鲈鱼胰蛋白酶的结果相似<sup>[6]183</sup>。天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstatin 对酶活性有一定的影响。金属蛋白酶抑制剂 EDTA 和 1, 10-phenanthroline 对其活性几乎没有影响。然而, Yoshinaka 等<sup>[9]5</sup>报道,日本鳗鲡胰蛋白酶 1 的稳定性与钙离子有关, EDTA 添加可降低其稳定性,而 EDTA 对胰蛋白酶 2 的稳定性影响较小,与本研究的结果类似。

2.2.5 胰蛋白酶的底物特异性

如表 3 所示,与其他底物相比,胰蛋白酶对 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA 的分解能力最强,相对分解效率为 104.4%,其次为 Boc-Val-Pro-Arg-MCA (101.0%)。胰蛋白酶对 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA 和 Boc-Leu-Lys-Arg-MCA 的分解效率分别为 Boc-Val-Leu-Lys-MCA 的 5.2 倍和 2.1 倍。Craik 等<sup>[23]</sup>研究表明,胰蛋白酶对 Arg 的分解效率为 Lys 的 2~10 倍。本研究的结果表明,胰蛋白酶对 P<sub>1</sub>位为 Arg 底物的分解强于 P<sub>1</sub>位为 Lys 的底物。然而,胰蛋白酶对胰凝乳蛋白酶底物 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) 和氨肽酶底物 (Arg-MCA) 不产生分解,表明其良好的底物特异性。

表 2 蛋白酶抑制剂对日本鳗鲡胰蛋白酶活性的影响

Tab.2 Effect of proteinase inhibitors on the activity of trypsin from Japanese eel

抑制剂 Inhibitors	终浓度 Concentration /(mmol·L <sup>-1</sup> )	相对活性 Relative activity/%
None	0	100
Pefabloc SC	1	0
PMSF	1	9.6±0.6
benzamidine	5	0
STI	0.001	0
LBTI	0.05	35.2±2.3
pepstatin	0.001	81.3±3.1
E-64	0.01	66.1±6.4
EDTA	10	98.0±5.4
1,10-phenanthroline	10	90.7±2.1

表 3 胰蛋白酶的底物特异性

Tab.3 Substrate specificity of trypsin toward different substrates

底物 Substrates	相对活性 Relative activity/%
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	100
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	104.4±2.8
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	101.0±2.0
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	57.2±1.1
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	41.3±1.4
Z-Phe-Arg-MCA	23.6±0.6
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	20.5±2.6
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	5.8±0.3
Arg-MCA	0
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0

2.2.6 胰蛋白酶的动力学参数

如表 4 所示,以 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 为底物,日本鳗鲡胰蛋白酶的 K<sub>m</sub>值为 3.1 μmol/L, k<sub>cat</sub>值为 59.9 s<sup>-1</sup>。鳗鲡胰蛋白酶的 K<sub>m</sub>值比鲈鱼<sup>[6]183</sup>胰蛋白酶 B 和鳊鱼<sup>[14]352</sup>胰蛋白酶 B 的 K<sub>m</sub>值高,说明其对底物的亲和力弱。鲈鱼胰蛋白酶 B 和鳊鱼胰蛋白酶 B 的催化效率 (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) 分别为鳗鲡胰蛋白酶的 4.8 倍和 3.1 倍。

表 4 日本鳗鲡胰蛋白酶的动力学参数

Tab.4 Kinetic parameters of trypsin from Japanese eel

酶 Enzymes	K <sub>m</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /(s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> :K <sub>m</sub> /[(μmol·L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
鳗鲡胰蛋白酶 Japanese eel trypsin	3.1	59.9	19.3
鲈鱼胰蛋白酶 B Japanese sea bass trypsin B	0.7	67.8	92.6
鳊鱼胰蛋白酶 B Mandarin fish trypsin B	1.9	111.3	59.2

2.2.7 鳗鲡胰蛋白酶肽质量指纹图谱的分析

将纯化的蛋白酶进行 MALDI-TOF/TOF 二级质谱分析,结果如图 7 所示,共获得 5 个肽段,含 76 个氨基酸残基。经与 NCBI 数据库中现有数据比对发现,获得的序列与日本鳗鲡胰蛋白酶原 (gi | 19032293) 的氨基酸序列相似性为 100%,证明所纯化的蛋白质为胰蛋白酶。在酶原活化方面,日本鳗鲡胰蛋白酶原前体将 13 和 14 位氨基酸之间的肽键断裂,去掉信号肽 (MRSLVFILLGVA) 而形成胰蛋白酶原。胰蛋白酶原经过肠激酶活化后,去掉激活肽 (VALDDDK) 变成有活性的胰蛋白。理论



- creas of carp. Fisheries Science, 2000, 66: 1172-1179.
- [6] CAI Q F, JIANG Y K, ZHOU L Z, et al. Biochemical characterization of trypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 159(3): 183-189. DOI:10.1016/j.cbpb.2011.04.002.
- [7] 中华人民共和国农业部渔业局. 中国渔业年鉴 2014. 北京: 中国农业出版, 2014: 217.
- [8] 胡庚东, 陈家长, 尤洋. 澳洲鳎和日本鳎、欧洲鳎消化酶活性的比较. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(4): 85-87.
- [9] YOSHINAKA R, SATO M, SUZUKI T, et al. Purification and some properties of two anionic trypsins from the eel (*Anguilla japonica*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1985, 80(1): 5-9. DOI:10.1016/0305-0491(85)90414-6.
- [10] KROGDAHL A, BAKKE-MCKELLEP A M, BAEVERFJORD G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Aquaculture Nutrition, 2003, 9(6): 361-371. DOI:10.1046/j.1365-2095.2003.00264.x.
- [11] LOWARY O H, ROSEBROUGH N J, FAN A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 256-275.
- [12] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [13] LINEWEAVER H, BURK D. The determination of enzyme dissociation constants. Journal of the American Chemical Society, 1934, 56(3): 658-666.
- [14] LU B J, ZHOU L Z, CAI Q F, et al. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). Food Chemistry, 2008, 110(2): 352-360. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.02.010.
- [15] ZHOU L Z, RUAN M M, CAI Q F, et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a trypsin from the hepatopancreas of snakehead (*Channa argus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 161(3): 247-254. DOI:10.1016/j.cbpb.2011.11.012.
- [16] WANG Q, GAO Z X, ZHANG N, et al. Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 58: 655-659. DOI:10.1021/jf903052s.
- [17] SIMPSON B K, HAARD N F. Trypsin from Greenland cod (*Gadus ogac*) isolation and comparative properties. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1984, 79(4): 613-622. DOI:10.1016/0305-0491(84)90375-4.
- [18] 翁凌, 李腾, 阴利华, 等. 南美白对虾丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究. 集美大学学报 (自然科学版), 2010, 15(4): 272-278.
- [19] UNAJAK S, MEESAWAT P, PAEMANEE A, et al. Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*). Food Chemistry, 2012, 134(3): 1533-1541. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.03.074.
- [20] KLOMKLAO S, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(15): 5617-5622. DOI:10.1021/jf060699d.
- [21] HEU M S, KIM H R, PYEUN J H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 112(3): 557-567. DOI:10.1016/0305-0491(95)00111-5.
- [22] KIM M, JEONG Y. Purification and characterization of a trypsin-like protease from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) intestine. Journal of Food Biochemistry, 2013, 37: 732-741.
- [23] CRAIK C S, LARGMAN C, FLETCHER T, et al. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. Science, 1985, 228(4697): 291-297. DOI:10.1126/science.3838593.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)