

家蚕肠液蛋白酶消化生理参数的研究

程佳¹, 刘朝良^{1*}, 王在贵^{1*}, 张宏福², 杨文静¹, 韩薇¹, 程昌粟¹, 项菲菲¹

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 家蚕肠液蛋白酶对家蚕消化吸收蛋白质及其生长发育有着十分重要的作用。为探明影响家蚕肠道蛋白酶活力的因素, 从家蚕肠道内容物中分离出蛋白酶酶液, 在不同温度、pH 及金属离子处理条件下, 用福林-酚法测定酶活力变化情况, 确定家蚕肠液蛋白酶的最适作用条件, 同时研究了家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长的变化规律。结果表明, 在 35℃、pH10.0 左右条件下蛋白酶活力最大, 低浓度 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活有抑制作用, 高浓度 Ca^{2+} 对酶有抑制作用, Mg^{2+} 浓度对酶活物影响不明显, 家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长而增强。

关键词: 家蚕; 肠道内容物; 蛋白酶活性; 福林-酚法

中图分类号: S881.24

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0056-04

Study on the digestion physiology parameter of protease from intestine of silkworm

CHENG Jia¹, LIU Chaoliang¹, WANG Zaigui¹, ZHANG Hongfu²,
YANG Wenjing¹, HAN Wei¹, CHENG Changsu¹, XIANG Feifei¹

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science of CAAS, Beijing 100193)

Abstract: Protease in silkworm gut takes an important role in the protein digesting process and development of silkworm. In order to prove the factors influencing the protease activity in silkworm gut, we isolated the protease enzyme from the contents of silkworm gut, and determined the changing process of protease activity under different temperatures, pH values and metal ion concentrations by Folin phenol method, so as to make sure the most suitable conditions for the protease in silkworm gut. At the same time, the change of protease activity in midgut of silkworm with the increase of age was researched. The results indicated that the maximum activity of protease were at 35℃, and pH 10.1. The low concentrations of Mn^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} and the high concentration of Ca^{2+} inhibited enzyme activity, while the concentration of Mg^{2+} showed significant effect on the enzyme activity. The protease activity in midgut increased greatly with the growth of silkworm.

Key words: silkworm; intestine; proteinase activity; Folin-phenol method

蛋白酶又称蛋白水解酶, 常按照其作用的最适 pH 范围分为碱性、酸性和中性蛋白酶 3 类, 具有催化蛋白质水解的作用, 使蛋白质分子内的肽键断裂, 生成游离的氨基酸和短肽^[1]。蛋白酶种类较多, 其活力测定一般采用 Folin-酚法^[2-5]。蛋白质是参与家蚕物质代谢的重要营养成分之一, 特别是发育进入 5 龄期, 机体需要贮藏大量的蛋白质以满足后期结茧和繁殖的需要。所以 5 龄期家蚕肠道蛋白酶活力

的发挥程度将对家蚕消化吸收桑叶蛋白及后期的生产和繁殖性能产生较大的影响。20 个世纪 90 年代王琛柱等^[6]对棉铃虫幼虫中肠 3 种蛋白酶种类及活性进行了鉴定, 而关于家蚕幼虫中肠蛋白酶种类及活性鉴定几乎未见报道。目前国内关于家蚕肠道蛋白酶活力的研究有对肠壁分泌蛋白酶基因的克隆及不同品种家蚕之间的肠壁分泌蛋白酶活力的差异比较^[7-8], 如屠洁等对杂交种(华峰×雪松)家蚕 5 龄

收稿日期: 2012-08-17

基金项目: 动物营养学国家重点实验室开放基金项目(2004DA125184F1104), 转基因专项子项目“猪肽 YY (Petide YY) 蛋白功能研究”和国家星火计划项目(2013GA710092)共同资助。

作者简介: 程佳, 硕士研究生。

* 通信作者: 刘朝良, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: cyschx@163.com 王在贵, 博士, 副教授。E-mail: wzgui@sina.com

幼虫中肠蛋白水解酶的最适反应温度和 pH 值进行了研究。也有学者报道家蚕肠道产蛋白酶微生物的分类及初步产酶能力^[9], 但至今尚无对金属离子影响家蚕肠液总蛋白酶活力研究的报道。本实验研究不同温度、pH 及不同金属离子在不同浓度条件下对后肠总蛋白酶活力的影响, 得出其最适的降解条件, 为 5 龄家蚕后期生产性能的提高提供生理调控理论与实际依据。

1 材料与方 法

1.1 动物饲养

菁松×皓月品种幼蚕由农业大学生命科学学院蚕学教研室提供, 桑叶喂养至 5 龄, 按照饲育分为 5 个阶段: 1~5 龄, 采用 1 日 3 回育, 早上 8:00, 下午 2:00 和晚上 20:30 各饲喂 1 次, 按照正常的消毒程序进行蚕具的消毒灭菌。至 5 龄第 2 天取 20 条家蚕冷冻保藏, 作为肠液蛋白酶生理参数研究的供试材料。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 电子天平 (0.0001 g); 精密 pH 计 (精确至 0.01); 电热恒温水浴锅; 722S 可见分光光度计; 高速冷冻离心机。

1.2.2 主要试剂 L-酪氨酸; 福林 (Folin) 试剂; 酪蛋白; 三氯乙酸。

1.3 试验方法

1.3.1 家蚕肠道蛋白酶的提取 取冷冻储藏的 5 龄家蚕蚕体, 在操作台上将蚕体浸入去离子水中解冻后, 用大头针固定在解剖板上, 用剪刀剪开体表, 取出肠道, 剔除肠壁吸出肠道内容物, 加少许去离子水, 放入离心管中 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 冷冻离心 10 min, 取上清液, 放于 4℃ 冰箱中待用, 使用前适当稀释。

1.3.2 家蚕肠道蛋白酶活力测定 按照文献^[10]提供的福林-酚法经过改进后测定蛋白酶活力。酶活力单位定义: 在一定温度和 pH 条件下, 每分钟从酪蛋白中降解释放一定量的酪氨酸所需要酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.3.3 标准曲线绘制 将酪氨酸溶液配制成 $0\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的各种不同溶液, 分别吸取 1 mL, 各加入 $0.4\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液 5 mL 及福林 (Folin) 试剂 1 mL, 置 30℃ 显色 5 min, 分别测定 OD_{660} 值, 以酪氨酸浓度为横坐标, OD_{660} 值为纵坐标, 绘出标准曲线。

1.3.4 不同 pH 对蛋白酶活力影响 取酶液 1 mL, 预热至 30℃, 分别加入 pH 9.4、pH 9.9、pH 10.1 和 pH 10.4 并且经预热的酪蛋白溶液 1 mL, 于 30℃ 水

浴反应 10 min, 反应结束后加入 10% 三氯乙酸溶液 2 mL, 立即摇匀, 静置 10 min 后过滤。取滤液 1 mL 按标准曲线制作的步骤测定 OD_{660} 值 (水浴温度为 30℃)。对照管加酶液而不加酪蛋白, 放在水浴锅中保温 10 min 后加入三氯乙酸溶液, 再补加 pH 10.1 酪蛋白和酶液, 测定 OD_{660} 值。

1.3.5 不同温度条件对蛋白酶活力影响 取酶液 1 mL, 预热至 25℃, 加入 pH 10.1 并经预热的酪蛋白溶液 1 mL, 于 25℃ 水浴反应 10 min, 按 1.3.4 方法测定蛋白酶活力, 再分别测定 30℃、35℃、40℃ 和 50℃ 时的肠液蛋白酶活力。

1.3.6 不同金属离子及浓度对蛋白酶活力影响 配制 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgSO_4 、 FeSO_4 、 MnSO_4 、 CaCl_2 和 CuSO_4 各 25 mL, 再将其分别配制 10^{-2} 、 10^{-3} 和 $10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不同浓度梯度的溶液。取酶液 1 mL, 分别加入 3 种浓度梯度不同金属离子溶液 1 mL, 预热至 35℃, 同上方法测定 OD_{660} 值。

1.3.7 家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长的变化 从 3 龄至 5 龄于每一龄期第 2 天取 4 头蚕, 恒温冷藏于 -20℃ 温度下保存, 第 5 龄取样结束后, 将各龄期家蚕样品在 20℃ 水中解冻, 解剖取出家蚕中肠于烧杯中捣碎, $5000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速冷冻离心 10 min 取上清液, 过滤后定容至 100 mL, 按照以上最适条件测定中肠蛋白酶活力。

2 结果与分析

2.1 酪氨酸标准曲线

绘制的标准曲线为 $y=0.0096x-0.0054$, 其中 $R^2=0.9987$, 由标准曲线可知, 福林-酚试剂的线性显色范围值 (OD_{660}) 为 0.1~0.7。

2.2 不同 pH 对肠液蛋白酶活力的影响

不同 pH 对家蚕肠液蛋白酶活力影响结果如图 1 所示。

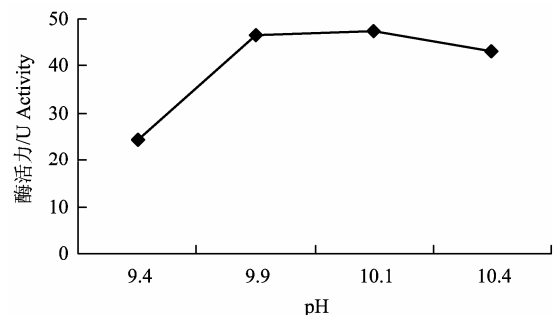


图 1 不同 pH 条件下蛋白酶活力 ($T=30^\circ\text{C}$)
Figure 1 Determination of enzyme activity under different pH values ($T=30^\circ\text{C}$)

由图 1 可知, 家蚕肠液总蛋白酶最适作用 pH 约在 10.0, pH9.4~10.0 之间酶活力呈上升趋势, 从 pH10.0~10.4 酶活力略微下降。

2.3 不同温度对肠液蛋白酶活力影响

不同 pH 对蛋白酶活力影响结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 从 25~50℃ 之间家蚕肠道总蛋白酶活力呈先上升后下降的规律, 其最适作用温度约为 35℃, 总体活力变化趋势仍表现出典型的倒“U”形曲线, 说明在家蚕肠道总蛋白酶活力中有某一种蛋白酶活力起着主导作用。

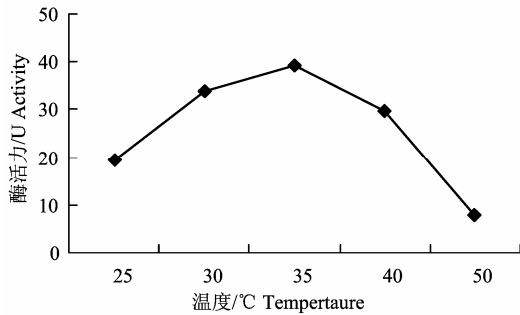


图 2 不同温度条件下酶活力测定 (pH=10.1)

Figure 2 Determination of enzyme activity under different temperatures (pH=10.1)

2.4 不同金属离子及浓度对肠液蛋白酶活力影响

不同金属离子对肠液总蛋白酶活力影响结果见表 1。

表 1 不同金属离子及其浓度对蛋白酶活力影响

Table 1 Effects of different kinds of metal ions on enzyme activities

酶活力/U Enzymetic activity	10 ⁻² mol·L ⁻¹	10 ⁻³ mol·L ⁻¹	10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹
Mn ²⁺	34.83	17.85	9.21
Mg ²⁺	19.10	18.27	18.48
Fe ²⁺	11.40	7.23	2.65
Ca ²⁺	3.90	18.17	12.85
Cu ²⁺	11.19	7.02	2.33
空白 Blank	11.50	11.50	11.50

由表 1 可知, Mn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺浓度对家蚕肠液总蛋白酶活力的维持有着十分重要作用, 随着它们浓度的降低, 酶活力下降趋势十分明显; Ca²⁺浓度对酶活影响也较大, 但其浓度在 10⁻³ mol·L⁻¹ 时家蚕肠液总蛋白酶活力最大, Ca²⁺过高或者过低有会对酶活力产生抑制作用; 从表 1 可以明显看出, 在一定浓度范围内, Mg²⁺浓度对酶活力影响不明显。

2.5 家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长的变化

按照 1.3.7 的设定测定家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长的变化结果如图 3。

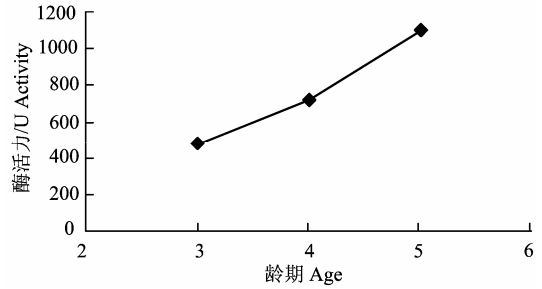


图 3 家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长的变化

Figure 3 Variation of protease activity in midgut of silkworm with the increase of age

由图 3 可以看出, 随着龄期增长, 家蚕中肠蛋白酶活力呈较大幅度的增长趋势, 特别从 4 龄至 5 龄期增幅更加明显, 5 龄期中肠蛋白酶活力是 4 龄期的 1.56 倍。

3 讨论

3.1 家蚕肠液蛋白酶活力的测定

本实验采用的蛋白酶活力测定方法是经过适当改进的 Folin-酚法, 评价的是肠液总蛋白酶活力。待测酶样为混合液体, 在酶活力测定时并非在空白样品中先加三氯乙酸, 而是让空白管样品在不加底物条件下和反应管一起在同一温度下保温至反应结束后再加入三氯乙酸, 这样可以消除样品不纯所带来的酶活测定值误差, 这是本研究在蛋白酶活力测定时所做的改进之处, 主要目的为了获得相对准确蛋白酶活力的测定数值。

3.2 pH 对家蚕肠液蛋白酶活力的影响

通过本实验研究发现, 家蚕肠道蛋白酶的最适作用酸碱条件为 pH10.0 左右, 这和屠洁报道的家蚕 5 龄幼虫肠道蛋白水解酶的最适反应 pH 值为 9.8 较为接近^[11]。而林昌麒报道了家蚕幼虫中 60% 以上的品种肠道 pH 集中于 9.21~9.60, 当家蚕幼虫接近 5 龄时 pH 达到最大^[12]。由此可以看出, 5 龄期家蚕肠道蛋白酶的最适作用 pH 和肠道环境实际 pH 存在一定的差异, 推测可能与肠道微生物产蛋白酶构成了实际发挥作用肠液蛋白酶的主要成分有关, 从肠液蛋白酶活力随 pH 的变化曲线也可以验证以上推测, 但这一推测仍然需要大量试验来验证。如果以上推测得到验证, 实际生产中, 在不影响家蚕其他生长性能的前提下, 可以尝试着适当调高肠道 pH

值以增加家蚕对桑叶蛋白饲料的消化利用能力。

3.3 温度家蚕肠液蛋白酶活力的影响

从图 2 的结果可以看出, 家蚕肠道蛋白酶的最适作用温度为 35℃, 这和文献[11]报道的结果较为一致, 而一般情况下家蚕的最适生长环境温度为 28~30℃^[13], 当环境温度过高或者过低均需要家蚕调节自身的体温以适应环境温度, 但家蚕肠液蛋白酶的最适催化温度和家蚕的最适生长温度表现出一定的差异, 这就进一步验证了家蚕肠道微生物蛋白酶活力对肠液总蛋白酶活力贡献较大的推测。但是由本研究结果可以看出, 通过调节温度达到提高蛋白酶消化能力对于提高家蚕生产性能意义可能不大。

3.4 金属离子对肠液蛋白酶活力影响

桑叶中金属离子浓度相对较低, 按照干重含量每公斤桑叶含金属离子约万分之几摩尔^[14], 本实验选择的几种金属离子设置浓度相对较大, 实验结果表现出部分金属离子对肠液总蛋白酶表现出较强的激活作用。从高等动物的营养需要看, 某些微量元素大剂量的添加往往可以有效达到快速促生长的作用, 所以本研究结果对于通过微量元素添加提高肠液蛋白酶活力来调控家蚕生长发育和提高家蚕生产性能可能有着十分重要的参考价值。

3.5 家蚕中肠蛋白酶活力随龄期增长的变化

家蚕在其幼年期生长过程中, 需要不断的在体内沉积蛋白质—满足生长与结茧的需要。前期消化吸收桑叶蛋白主要是为了满足机体生长的需要, 而 4 龄后除了满足机体生长的需要外, 还要在贮藏足够量的蛋白质以满足后期结茧和繁殖的需要。从本研究可以看出, 随着龄期增长, 家蚕中肠蛋白酶活

力呈较大幅度的增长趋势, 也是家蚕这一生理规律的集中体现。

参考文献:

- [1] 熙泰, 于自然. 现代生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 18-21.
- [2] 何杰. 胰蛋白酶活力的快速测定[J]. 中国生化药物杂志, 1994, 15(1): 57-58.
- [3] 陈丽萍. 支气管哮喘患儿血浆类胰蛋白酶与类糜蛋白酶活性测定及其临床意义[J]. 泰山医学院学报, 2006, 27(1): 14-16.
- [4] 彭必雨, 王霞, 王剑, 等. 制革常用蛋白酶活力测定方法及结果的比较[J]. 皮革科学与工程, 2004, 14(3): 7-10.
- [5] 郭薇, 陈玉川, 刘水平, 等. 豚鼠过敏性休克类胰蛋白酶活力测定[J]. 法医学杂志, 2001, 17(4): 212-213.
- [6] 姜永煌. 家蚕 35K 蛋白酶基因的组织表达[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 259-261.
- [7] 曹广力, 朱越雄. 乐胺磷对 5 龄期家蚕肠液蛋白酶活性的影响[J]. 江苏蚕业, 1999, 5(3): 8-10.
- [8] 高绘菊, 路国兵, 查传勇, 等. 家蚕肠道产酶菌的分离与筛选[J]. 蚕业科学, 2007, 33(2): 228-233.
- [9] 姜孝成. 生物学实验教程[M]. 长沙: 湖南师范大学出版社, 2007: 347-349.
- [10] 林昌麒, 糜懿殿. 家蚕幼虫肠液 pH 值的调查[J]. 江苏蚕业, 1998, 5(3): 17-18.
- [11] 屠洁, 王国基. 家蚕 5 龄幼虫蛋白水解酶的最适反应温度和 pH 值[J]. 蚕业科学, 2005, 31(1): 100-102.
- [12] 王雄鹰, 吴鹏转. 家蚕体温与环境温度差异动态变化[J]. 华南农业大学学报, 1992, 13(2): 95-97.
- [13] 王在贵, 朱保健, 储海娟, 等. 不同叶龄桑叶中微量元素含量分析[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(1): 95-97.
- [14] 王琛柱, 钦俊德. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定[J]. 昆虫学报, 1996, 39(2): 7-14.