

牙鲆幼鱼消化道内蛋白酶活性及食糜蛋白的 GFP 示踪

边慧慧^{1,2} 黄 健^{1,2*} 王秀华² 蒋继志³

(¹上海海洋大学, 上海 201306)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³河北大学, 保定 071002)

摘 要 用添加绿色荧光蛋白(GFP)饲料投喂牙鲆,研究了不同消化时间内食糜在牙鲆消化道中的分布情况,采用福林-酚法测定了不同时间胃、前肠、中肠和后肠各组织黏液蛋白酶活性。结果表明,牙鲆在摄食后消化道蛋白酶活性随着食糜在消化道内的分布而变化,食物的刺激引起消化腺分泌蛋白酶。牙鲆摄食后1h食糜达到中肠,胃和中肠蛋白酶活性与空腹相比迅速增高;食糜在5h时遍布整个消化道,此时胃蛋白酶活性几乎检测不出,而前肠蛋白酶活性迅速增高,5h达到最高,然后开始降低;8h时中肠蛋白酶活性一直很高,之后降低;而后肠直到12h其蛋白酶活性仍维持在较高水平,说明牙鲆这种消化道较短的鱼类其肠道比胃在蛋白质消化过程中发挥更重要的作用。

关键词 牙鲆 消化道 绿色荧光蛋白 示踪 蛋白酶活力

中图分类号 Q5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0036-06

Protease activity and chyme protein tracing by GFP in the digestive tract of flounder *Paralichthys olivaceus*

BIAN Hui-hui^{1,2} HUANG Jie^{1,2*} WANG Xiu-hua² JIANG Ji-zhi³

(¹Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

(²Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³Hebei University, Baoding 071002)

ABSTRACT The distribution of the chyme in the digestive tract of flounder *Paralichthys olivaceus* was studied by adding green fluorescent protein (GFP) to the bait. The protease activity in the mucus of different part of the digestive tract was studied by the Folin-phenol reagent method post ingestion. The results showed that the protease activity changed with chyme distribution in the digestive tract after feedion. The chyme reached the midgut 1 h after ingestion, and the protease activity of stomach and midgut increased rapidly. The chyme was distributed in the whole digestive tract 5 h after ingestion, and the stomachic protease activity reduced to near null. The protease activity in the midgut kept at the highest level until 8 h. The protease

国家科技支撑计划课题(2006BAD03B0504)、国家 863 计划重点项目课题(2006AA100310)和山东省科技攻关计划项目(2006GG2205005)共同资助

* 通讯作者。E-mail: Huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062

收稿日期:2009-01-29;接受日期:2009-02-18

作者简介:边慧慧(1983-),女,硕士研究生,主要从事海水鱼病原菌及疫苗技术研究。E-mail: bhui-83@163.com

activity in the hindgut kept at the high level until 12 h after feeding. The results showed that the intestines might be more significant in protein digestion than the stomach for the fish with short digestive tract.

KEY WORDS *Paralichthys olivaceus* Digestive tract Trace GFP
Protease activity

鱼类肠道、胰脏中分泌的消化酶成分是与食性相关的,肉食性鱼类消化道内的蛋白酶在消化过程中发挥的作用更重要(徐勇等 2005),对于鱼类养殖过程中饵料的合理应用具有重要意义。另外,了解摄食后不同时间食糜在消化道内的分布和蛋白酶在鱼体内的活性,可以为我们在免疫方面的研究提供一些依据。国内外虽有较多关于鱼类消化酶的报道(Quentel *et al.* 1997; 付新华等 2005;王宏田等 2002;冯俊荣等 2006),但准确形象地观察消化道内食糜蛋白的涌动及消化吸收的方法尚未见报道。传统的消化道酶活测定都是采取组织匀浆测定,这显然包含组织蛋白酶活性在内,无法反映消化道内蛋白酶的真实活性。本实验第一次采用带有绿色荧光蛋白(GFP)质粒的大肠杆菌作为蛋白指示剂,简单、直观和形象地指示了牙鲆摄食饲料后不同时间食糜蛋白在消化道的分布状况,同时取摄食后不同时间进行胃、前肠、中肠和后肠各组织黏液,直接分析其蛋白酶活性,并初步探讨了该方法在控制摄食行为的作用和药物缓释方面的应用价值。了解牙鲆消化生理学,旨在为牙鲆的养殖和病害防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验用鱼和仪器材料准备

1.1.1 牙鲆

2008年4月16日购自青岛胶南大珠山古镇营村养殖场,体长 13.0 ± 2.0 cm,体重 22.0 ± 2.7 g。充氧降温运输到中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物病害控制与分子病理学实验室的水实验室进行暂养,水温 19 ± 1 °C,盐度 28 ± 2 ,全天连续充气,并定时投喂颗粒饲料(青岛金海力水产科技有限公司)驯化暂养14 d。

1.1.2 GFP蛋白粗提液

将带有GFP质粒的*E. coli*菌株(GFP-*E. coli*,本实验室保存)接种于LB液体培养基(含Amp和L-阿拉伯糖),37 °C过夜培养,PBS洗涤离心;通过裂解法提取蛋白,将配制好的蛋白质裂解液(终浓度为:pH8.0、10 mmol/L的Tris-HCl,pH8.0、1 mmol/L的EDTA,10 mmol/L的CaCl₂,0.5 mg/ml的溶菌酶和0.1 mg/ml的DNA酶,)与菌液(1.0×10^9 CFU/ml)以1:10(V:V)比例混合,冰上放置30 min;再将样品放置于-70 °C冰冻,然后42 °C水浴解冻,此方案循环4次;最后样品放置37 °C,30 min;10 000 r/min,4 °C离心15 min,取绿色上清并采用真空冷冻干燥法浓缩,Bradford法测定粗提液的蛋白浓度。

1.1.3 模拟消化液

模拟胃液的制备用胃蛋白酶(活性1:3 000,Sigma)以pH 2.6、0.2 mol/L的磷酸氢二钠-柠檬酸稀释,工作浓度为0.01%;模拟肠液的制备用胰蛋白酶(活性1:250,Sigma)以pH 9.0、0.05 mol/L的Tris-HCl稀释,工作浓度为0.01%。

1.1.4 颗粒饲料制备

将带有GFP质粒的*E. coli*菌株接种于含Amp和L-阿拉伯糖LB液体培养基,37 °C过夜培养,PBS洗涤离心,0.5%福尔马林灭活16 h;无菌检测后,按 1.2×10^9 CFU/g比例将菌液与海水鱼用饲料(青岛金海力水产科技有限公司)粉末混合,以2%的褐藻酸钠作为黏合剂制备成GFP-*E. coli*颗粒饲料A。

可食用淀粉与海水鱼饲料粉末以3:1的比例,加入5%的二甲基-β-丙酸噻唑诱食剂,以2%的褐藻酸钠作为黏合剂制备成颗粒饲料B。

1.2 GFP 体外消化试验

以模拟胃液和肠液进行的体外消化为试验组;pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液和 pH 2.6 磷酸氢二钠-柠檬酸稀释液为阴性对照组;去离子水稀释的 GFP 为空白对照组。

采用胃蛋白酶-胰蛋白酶两步法(黄沧海等 2005)进行体外消化 GFP,方法如下:0.5 ml 浓度为 3.04 mg/ml GFP 粗提液加入到 0.3 ml 模拟胃液中,每组 3 个平行,于台式恒温培养箱中,以其温度达到 37 °C 时开始计时,震荡 3h,频率为 80 次/min。取出用 0.2 mol/L NaOH 溶液滴定消化液,使其 pH 值为 9.0,加入 0.3 ml 模拟肠液,37 °C 震荡 3 h。分别取实验组、空白和阴性对照组 100 μ l 加入到 96 孔酶标板中,分别做 3 个重复。在 LAS-3000 化学发光荧光凝胶成像仪(Fujifilm, 日本)上对 GFP 进行拍照,并对消化后的 GFP 进行 SDS-PAGE 分析。

1.3 摄食后的不同时间消化道各段食糜分布测定

投喂颗粒饲料 A,鱼分 5 组,分别在 1、5、8、12 和 24 h 解剖取消化道,将整段消化道放于玻璃培养皿上,以普通饲料(青岛金海力水产科技有限公司)投喂的牙鲆做对照。在 LAS-3000 凝胶成像仪上对 GFP 进行拍照。

1.4 消化道黏液样品的采集

投喂颗粒饲料 B 后,分别在 1、5、8、12 和 24 h 取牙鲆消化道黏液,每组样品取 3 尾作重复。消化道黏液取样依据 Lavelle 等(1997),稍作调整:冰上迅速解剖消化道后,分为胃、前肠、中肠和后肠 4 部分(施志仪等 2006);用细线结扎后,纵面剪开,分别用无菌脱脂棉棒刮擦消化道壁取其黏液。放到 0.1 ml PBS 中,涡旋混合 30 s。然后 10 000 \times g,4 °C 离心 15 min,收集上清液。进行蛋白浓度以及蛋白酶活力测定,24 h 内检测完毕。

1.5 消化道黏液蛋白浓度测定

所有黏液总蛋白含量测定用 Bradford 完成,再用 PBS 液将其稀释到相同浓度。采用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物研究所)。

1.6 蛋白酶活性测定

1.6.1 胃蛋白酶活性测定

采用福林-酚试剂法测定蛋白酶活性(刘玉梅等 1991)。以酪蛋白为底物,在 0.2 mol/L pH 2.0 柠檬酸-盐酸缓冲液条件下,黏液中每毫克蛋白每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸的酶量为 1 个蛋白酶活力单位[μ nit/(min \cdot mg)]。

1.6.2 肠蛋白酶活性测定

方法同胃蛋白酶活性测定相似,只是将缓冲体系换作 0.2 mol/L, pH 8.5 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

1.7 数据统计与分析方法

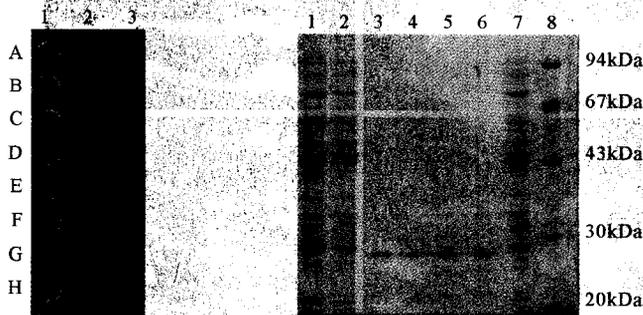
试验数据用 Microsoft Excel 作初步处理,SPSS (Ver. 11.5)软件包进行统计分析。试验各组之间的差异采用单因子方差(One-Way ANOVA)分析,先进行方差齐性分析,方差齐性则运用 LSD 法进行单因素方差多重比较,方差非齐性则采用 TamhanepsT2 法进行单因素方差分析,显著水平采用 0.05,结果用平均值 \pm 标准误差($\bar{X} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 GFP 体外消化检测

分别用去离子水、pH 2.0 磷酸氢二钠-柠檬酸、pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液与 GFP 粗提液反应作空白对照和

阴性对照,胃蛋白酶-胰蛋白酶两步法对 GFP 粗提蛋白液进行消化。图 1 为 GFP 荧光拍照显示出荧光强度依次减弱。图 2 为 SDS-PAGE 电泳分析,消化后的 GFP 粗提蛋白液中大部分蛋白都被消化掉,且荧光拍照未观察到荧光。这说明 GFP 蛋白粗提液能被消化道消化掉,可以将 GFP-*E. coli* 混到饲料中根据荧光的强弱和消失情况,来指示不同时间段食糜的在胃肠道分布情况。



注:1、2 和 3 组分别为空白对照组、阴性对照组和消化实验组;
A~H 分别为各组的平行

Note: 1, 2, and 3 are blanks, negative controls, and digestive experiment samples

图 1 GFP 荧光拍照

Fig. 1 GFP fluorescence

注:1~2、3~6 和 7 泳道分别为阴性对照组、实验组样品和空白对照组样品;8 泳道代表分子量标记

Note: Lane 1~2, 3~6 and 7 are negative control, digestive, and blank samples respectively; Lane 8 is the protein marker

图 2 GFP 体外消化后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of *in vitro* digested GFP



图 3 添加 GFP-*E. coli* 颗粒饲料荧光拍照

Fig. 3 Fluorescence of feed with GFP-*E. coli* added

2.2 摄食 GFP-*E. coli* 颗粒饲料后的不同时间内消化道各段食糜分布

普通 *E. coli* 颗粒饲料未检测到绿色荧光,而 GFP *E. coli* 颗粒饲料在荧光拍摄下发出强烈的绿色荧光(图 3),说明 GFP 荧光能很好地在饲料中显示。

牙鲆摄食 GFP-*E. coli* 颗粒饲料 A 后,GFP 很清晰地指示食糜蛋白质如何分布在消化道中(图 4)。摄食 1 h 后,食糜蛋白到达中肠;摄食 5 h 后,食糜蛋白遍布整个消化道;摄食 8 h 后,胃内食糜蛋白开始减少;而在 12 h 时只有极少量的食糜蛋白存在于后肠;24 h 消化道内几乎已没有任何食糜蛋白存在。

2.3 摄食后不同时间消化道各段蛋白酶活性的分布

投喂饲料 24 h 后,牙鲆消化道内的食糜彻底排空。牙鲆在这种空腹状态下,肠道中的蛋白酶活性最低。摄食后 1 h,消化道蛋白酶活性迅速增高,特别是胃和中肠内蛋白酶活性很高,然后胃内的蛋白酶活性迅速降低,5 h 后胃内几乎检测不到蛋白酶活性。而前肠蛋白酶活性继续升高,5 h 的酶活性最高,然后缓慢降低;中肠蛋白酶活性在 1~8 h 一直很高,之后降低到中肠水平。而后肠的蛋白酶活性投喂后开始增高,在 5~12 h 的蛋白酶活性维持一定的高度,然后下降到很低的水平。

比较牙鲆不同消化道段的蛋白酶活性和食糜蛋白停留时间可以看到,胃内蛋白酶活性存留时间最短,在 5 h 即降低到几乎检测不出,但食糜蛋白停留时间相对较长,一直能停留到 8 h;而肠道内食糜蛋白从摄食后 1~8 h 留存期间其蛋白酶活性也一直较高,特别是后肠,直到 12 h 仍有很高的蛋白酶活性。说明牙鲆这种消化道较短的鱼类其肠道比胃在蛋白消化上发挥更重要的作用。

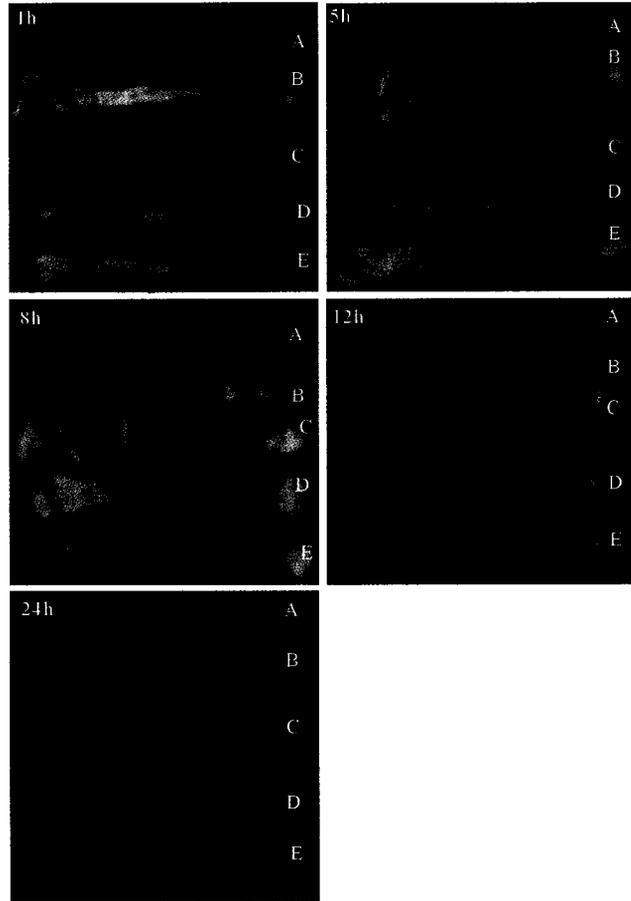
3 讨论

2008 年度诺贝尔化学奖获得者 Dr. Martin Chalfie 的贡献是验证了 GFP 可以被用来追踪和标记基因或蛋白(Chalfie *et al.* 1994)。GFP 含有特殊的生色团结构,其生色团是由蛋白质内部第 65~67 位的丝氨酸、

脱氢酪氨酸、甘氨酸自身环化和氧化形成的,用蓝紫光激发即能发出肉眼清晰可见的绿色荧光,无需任何底物或辅助因子(赵 华等 2003)。GFP 作为基因报告系统,在活体内、在原位即时地检测基因表达和进行蛋白定位得到了许多报道。本研究将 GFP 应用到鱼类消化道食糜蛋白的示踪,是 GFP 的又一种全新应用思路。

鱼类消化道酶活性与摄食时间密切相关,但是在蛋白酶测定时,饲料中的蛋白容易干扰蛋白酶活性测定。本文通过采用低蛋白含量的淀粉饲料很好地解决了这一问题,所提取黏液中只存在微量来自于饲料中的可溶性蛋白,对蛋白酶测定的影响可以忽略不计。消化道黏液的取样是影响测定结果的另一重要环节,本实验采取用无菌脱脂棉签分段擦吸消化道壁黏液,可以最大量的提取到消化道壁上的黏液,比用软膏刀(Irie *et al.* 2005)或钝化玻片(Esteve-Gassen *et al.* 2004)刮取更为完全和温和。

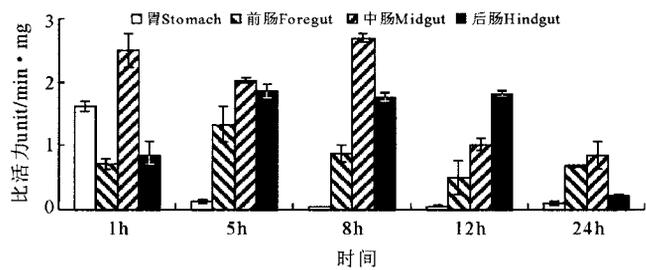
有研究者认为后肠是摄取抗原的主要部位(Quentel *et al.* 1997; Strand *et al.* 1997)。Esteve-Gassent 等(2004)研究表明,肛门灌注灭活创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* 疫苗后,鳗鱼可以获得 80% 以上的免疫保护率,接近注射免疫,高于浸泡免疫。国外的研究者也大多致力于用可生物降解的高分子材料包埋抗原制备口服疫苗,希望能保护抗原经过胃和前肠不被降解。结果显示,疫苗微囊化后,在后肠中检测到的完整的抗原数量有所增加。本文结果显示,牙鲆这类消化道较短的鱼类肠道对蛋白的消化作用可能比胃更重要,肠道内蛋白酶活性一直比较高,而胃内蛋白酶活性维持时间较短;因此,如果能够让疫苗等蛋白类药物驻留在胃内,将可能避开蛋白酶的消化作用。



注:A 为对照,B,C,D 和 E 为实验组的 4 个平行

Note: A is the control; B, C, D and E are four parallels of the experiment group

图 4 GFP 指示的摄食后不同时间消化道内食糜蛋白的分布
Fig. 4 The chyme protein distribution indicated by GFP tracer in the digestive tract at different time post ingestion



注:同一柱形图上不同小写字母代表有显著差异(P<0.05)

Note: Means with different superscripts within the same column diagram are significantly different (P<0.05)

图 5 摄食后消化道各段蛋白酶活性
Fig. 5 Protease activity in different part of the digestive tract post ingestion

参 考 文 献

- 王宏田, 张培军. 2002. 牙鲆体内消化酶活性的研究. 海洋与湖沼, 33(5):472~476
- 付新华, 孙 溢, 孙世春. 2005. 大菱鲆消化酶的活力. 中国水产科学, 12(1):26~33
- 冯俊荣, 陈 营, 刘 红. 2006. 牙鲆幼鱼消化能力与肠道蛋白酶活性的研究. 水产科学, 25(4):163~165
- 刘玉梅, 朱谨钊, 吴厚余. 1991. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究. 海洋与湖沼, 22(6): 571~575
- 余俊红, 沈继红, 王祥红, 王宝坤, 纪伟尚, 胡应劲, 徐怀恕. 2001. 鳃弧菌口服微胶囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果. 中国水产科学, 8(2):76~79
- 赵 华, 梁婉琪, 杨永华. 2003. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学研究中的应用. 植物生理学通讯, 39(2):171~178
- 杨佳文, 安利国. 1999. 鱼类黏液细胞研究进展. 水产学报, 23(4):403~408
- 施志仪, 陈晓武, 顾一峰. 2006. 牙鲆消化道组织学观察及内分泌细胞分布. 中国水产科学, 13(5):851~853
- 徐 勇, 曲克明, 马绍赛. 2005. 大菱鲆消化酶研究现状与展望. 海洋水产研究, 26(5):86~88
- 黄沧海, 陈东晓. 2005. 几种蛋白质原料体外消化率测定方法的比较. 饲料工业, 26(20):48~50
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263: 802~805
- Esteve-Gassent, M. D., Fouz, B., and Amaro, C. 2004. Efficiency of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. Fish & Shellfish Immun. 16:93~105
- Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T., and Kodama, H. 2005. Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunization with bacterial antigen entrapped liposomes. Fish & Shellfish Immun. 18: 235~242
- Lavelle, E. C., Jenkins, P. G., and Harris, J. E. 1997. Oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly (oL-lactide-co-glycolide) microparticles. Vaccine, 10: 1 070~1 078
- Quentel, C., and Vigneulle, M. 1997. Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. Dev. Biol. Stand. 90:69~78
- Romalde, J. L., Asteria, L. A., Ravelo, C., and Toranzo, A. E. 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. Aquaculture, 236:119~129
- Shephard, K. L. 1994. Functions of fish mucus. Rev. Fish Biol. Fish. 4: 401~429
- Strand, H. K., and Dalmo, R. A. 1997. Absorption of immunomodulating β -(1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Fish Dis. 20: 41~49