

草鱼肝胰脏中两种胰蛋白酶的 纯化及部分性质的研究*

耿莉娜¹, 胡重江², 李英文¹

(1. 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆市高校生物活性物质工程研究中心, 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047; 2. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400716)

摘要 本试验采用硫酸铵分级沉淀和鸡卵类粘蛋白偶联的琼脂糖凝胶亲和层析的方法, 从草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝胰脏中提取胰蛋白酶进行纯化, 得到两种酶, 即胰蛋白酶 A(GTA)和胰蛋白酶 B(GTB), 并对其性质进行了分析。结果表明, 两种酶的 SDS-PAGE 电泳均呈现出单一条带, 表明已得到高度纯化, 两种酶分子量约为 27 Kda。以 BANPA 为底物, 测得草鱼胰蛋白酶 A(GTA)的动力学常数(K_m)为 0.37 mM。以 TAME 为底物测得两种胰蛋白酶最适反应温度为 60 °C, 最适反应 pH 值为 8.0, 当温度超过 60 °C, 它们不稳定, 这两种胰蛋白酶在 pH 值 9.0 ~ 11.0 时较稳定。

关键词 草鱼; 胰蛋白酶; 亲和层析; 性质研究

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2008)01-0014-06

胰蛋白酶属丝氨酸蛋白酶家族, 具有肽链内切酶活性, 对由碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸)的羧基与其它氨基酸的氨基所形成的键具有高度的专一性, 在对鱼类食物蛋白质的消化中起重要的生理作用。它由胰腺分泌, 广泛存在于鱼类的肝胰脏、肠道以及幽门盲囊中。许多研究报道, 胰蛋白酶是以无活性的酶原形式存在于鱼类胰脏中, 被肠激酶或有活性的胰蛋白酶自身激活, 从肽链 N 端赖氨酸和异亮氨酸残基之间的肽键断开, 失去一段六肽, 分子构象发生一定改变后转变为有活性的胰蛋白酶。

目前已经从多种哺乳动物如鼠、狗、牛、猪等中分离出胰蛋白酶以及胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶。对鱼类消化酶的研究也有报道, Vonk 在 1927 年就研究了鲤鱼(*Cyprinus carpio*)肝胰脏的蛋白酶活性^[1]; 在国内, 黄耀桐于最早对草鱼肠道肝胰脏蛋白酶活性进行了初步研究, 并分析了消化酶与饲料的关系^[2]; 倪寿文对草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶作了初步探讨^[3]; 李广丽对草鱼和鲤鱼肠道、肝胰脏消化酶的活性作了初步研究^[4]; 黄峰等采用生物化学与组织学观察相结合的方法对鲢、鳙的消化器官组织中胰蛋白酶的活性分布进行

了具体的研究^[5]; 叶元土等对长江特有的两种肉食性鱼类南方大口鲈和长吻鮠的胃、肝胰脏、肠道中蛋白酶、淀粉酶的最适温度和最适 pH 值进行了测定^[6]。上述对鱼类胰蛋白酶的研究结果主要还是基于粗酶活性测定的方法, 还不能真正反映胰蛋白酶的活性变化。本文在分离纯化草鱼胰蛋白酶的基础上, 进一步对得到的两种草鱼胰蛋白酶成分的酶学性质进行了初步研究, 有助于深入分析鱼类胰蛋白酶在蛋白质消化中的作用。

1 材料与方 法

1.1 亲和介质的合成

1) 鸡卵类粘蛋白的分离及纯化。本试验使用自提的鸡卵类粘蛋白, 蛋清加入三氯乙酸沉淀杂蛋白, 再加入丙酮沉淀得到粗的卵类粘蛋白。用 Sephadex G-25 凝胶层析脱盐, 再用 DE-32 离子交换层析柱纯化, 测定蛋白含量及卵类粘蛋白的比活性及总活力^[7, 10]。

2) 亲和和吸附剂的合成。本试验采用环氧丙烷活化载体与偶联配基^[7], 活化后抽干, 用缓冲液溶解卵类粘蛋白进行偶联, 终止后, 抽干淋洗浸泡于亲和

* 收稿日期: 2007-11-23

资助项目: 重庆市自然科学基金项目(No. CSTC-2007BB1229)

作者简介: 耿莉娜(1983-)女, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向为动物学。

柱平衡液中,装柱,平衡备用。

1.2 草鱼胰蛋白酶(GT)的纯化

草鱼内脏采于北碚天生市场,取肝胰脏和少量中肠前段,加入抽提液,搅碎,过夜激活,离心取上清液,得到粗酶抽提液。粗提液用30%~70%硫酸铵分级沉淀,离心收集沉淀溶解得粗酶液。将粗酶液上样,先用pH 3.5的亲洗液(glycine-HCl)洗脱,收集洗脱峰,再用pH 3.0的亲洗液洗脱,收集洗脱峰将pH值调到9.0左右。

1)纯化效果及纯化蛋白质分子量的测定。各阶段的纯化效果及纯化蛋白质的分子量用15%的SDS-PAGE^[8]用低分子量蛋白质标准(14.4~97.4 kDa, Amresco公司)作对照,银染法染色。

2)蛋白质含量的测定。参照Bradford的方法^[9],以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,在595 nm下测定吸光度,先作标准曲线,由此标准曲线,根据测出的未知样品的A₅₉₅值,即可查出未知样品的蛋白质含量。

3)胰蛋白酶的活性测定。以对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)测定胰蛋白酶的活性。测定胰蛋白酶的TAME活性单位定义是在底物(TAME)浓度为1 mM、反应液为0.05 M Tris-HCl、pH 7.8、光程1 cm、反应温度25 °C、波长247 nm的条件下,OD值递增0.001 min⁻¹,为1个TAME单位。

1.3 GT性质的研究

1)GT反应的最适温度和热稳定性。在不同的温度下,以TAME为底物测定酶活性,将最高的酶活定义为100%,计算其相对活性。再分别置于不同的温度条件下保温30 min后,以TAME为底物测定剩余活性,计算其相对活性。

2)GT反应的最适pH值和酸碱稳定性。以TAME为底物分别置于不同pH值条件下进行反应,并测定剩余酶活性。将最高的酶活力定义为100%,计算其相对活性。再在不同的pH环境中温育0.5 h后,以TAME为底物测定剩余的酶活性,计算其相对活性。

3)酶的动力学常数K_m的测定。以苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺(BAPNA)为底物,用Hanes作图法,以 $1/[S]/v \sim 1/[S]$ 作图,图中截距为K_m·V⁻¹,斜率为V⁻¹,即可求得K_m^[7]。

2 结果

2.1 鸡卵类粘蛋白的分离及纯化

蛋清经三氯乙酸沉淀杂蛋白,用丙酮沉淀,然后

经Sephadex G-25凝胶层析脱盐(图1),收集第一洗脱峰,再用DE-32离子交换层析柱纯化(图2)。

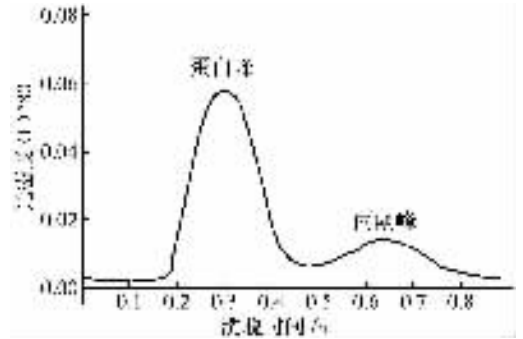


图1 鸡卵类粘蛋白的Sephadex G-25凝胶层析图
Fig.1 Sephadex G-25 Gel-filtration Chromatography of CHOM

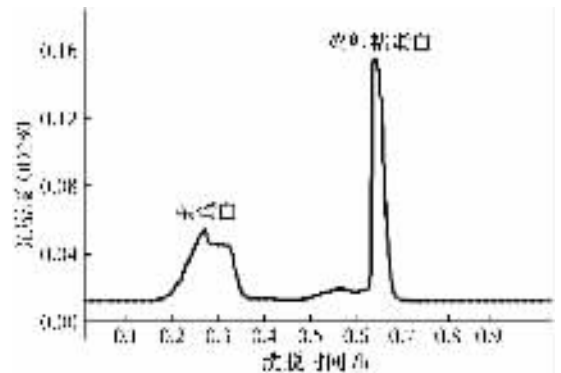


图2 鸡卵类粘蛋白DEAE-纤维素离子交换柱层析图
Fig.2 Ion Exchange Chromatography on DEAE-cellulose of CHOM

2.2 GT的纯化

1)草鱼胰蛋白酶的亲和层析。草鱼肝胰脏经抽提得粗酶抽提液,经硫酸铵分级沉淀得粗酶液,上亲和层析柱吸附,先用亲和洗液1洗脱,得到草鱼胰蛋白酶A(GTA);再用亲和洗液2洗脱,得到草鱼胰蛋白酶B(GTB),见图3;用考马斯亮蓝法测定BSA蛋白质含量标准曲线,见图4,计算纯化效果见表1。

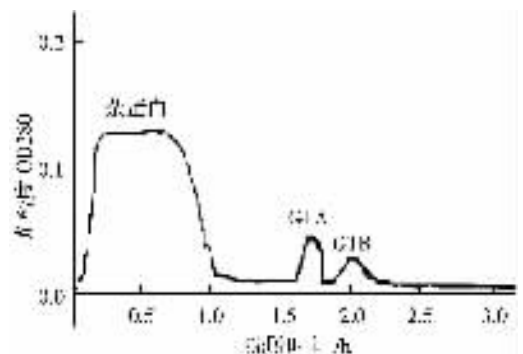


图3 草鱼胰蛋白酶的亲和层析

Fig.3 Affinity Chromatography of Grass Carp Trypsin

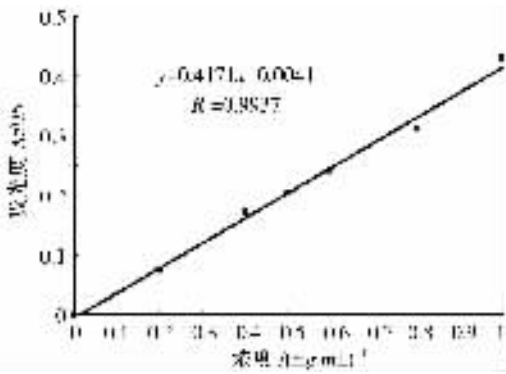


图 4 考马斯亮蓝法测定 BSA 蛋白质含量标准曲线

Fig. 4 Standard Curve of BSA Protein Content Measuring with Bradford Method

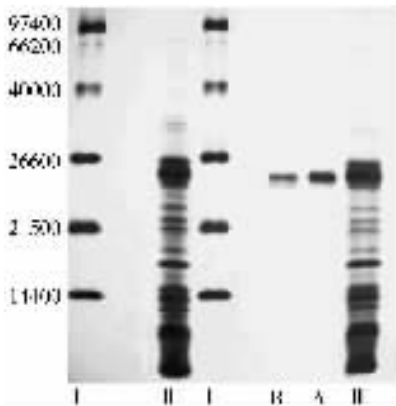
表 1 草鱼肝胰脏胰蛋白酶的纯化

Table 1 Purification of Trypsin from Grass Carp Hepatopancreas

步骤	总蛋白 /mg	总活力/ TAME 单位	比活力/ (TAME 单位·mg ⁻¹)	产率 /%	纯化 倍数
粗酶抽提液	1840	465403	253	100	1
粗酶	832	301600	362.5	64.8	1.4
GTA	1.656	141192.4	61388	30.3	243
GTB	0.72	1041.8	1447	0.2	5

从试验结果可以看出,通过简单、实用的几步纯化手段,获得草鱼胰蛋白酶相当程度的纯化。其中 GTA 的比活力达到 61388 TAME 单位,纯化倍数 243 倍,产率 30.3%;GTB 的活性较低,比活力 1447 TAME 单位/mg,纯化倍数 5。

2)分子量的确定。经 SDS-PAGE,求得 GTA 和 GTB 分子量约为 27 kDa,见图 5。



注: I 低分子量蛋白质标准; II 粗酶抽提液; III 粗酶; A GTA; B GTB

图 5 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis of GTA and GTB

2.3 GT 部分性质的研究

1)GTA 的动力学常数 K_m 。以 BAPNA 为底物,求得 GTA 的动力学常数 K_m 为 0.37 mM。见图 6。

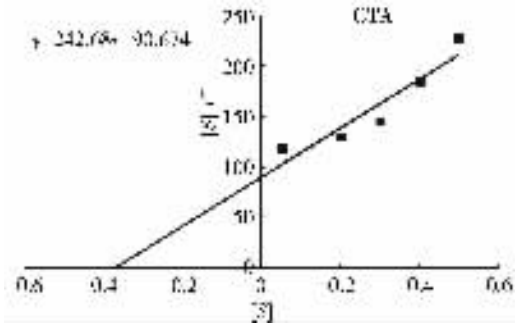


图 6 GTA 的动力学常数 K_m (以 BAPNA 为底物)

Fig. 6 K_m Value of GTA Using BAPNA as Substrate

本试验研究了草鱼胰蛋白酶的部分性质,测得 GTA 的动力学常数 K_m ,GTB 因活性较低,未能测得其动力学常数 K_m 。

2)GTs 的反应最适 pH 值。这两种酶的反应活性受 pH 值的影响较大,反应的最适 pH 值为 8.0;pH 值低于 5.5 时酶活性很低;pH 值在 5.5~8.0 之间,其活性迅速升高;pH 值超过 8.0 后,活性降低,结果见图 7。

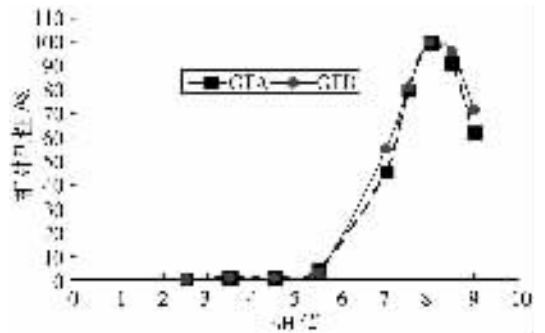


图 7 GTs 的反应最适 pH 值(以 TAME 为底物)

Fig. 7 pH Optimum of GTs on TAME

3)GTs 的 pH 值稳定性。GTA,GTB 在低 pH 值条件下稳定性均较差,在 pH 9.0~11.0 时较稳定。GTA 在 pH 5.5~9.0 之间稳定性逐渐升高,pH 超过 9.0 后,稳定性逐渐降低,pH 9.0 时稳定性最高;GTB 在 pH 5.5~9.5 之间稳定性逐渐升高,pH 超过 9.5 后,稳定性逐渐降低,pH 9.5 时稳定性最高,结果见图 8。

4)GTs 的反应最适温度。两种胰蛋白酶的活性随温度升高而增强,最适反应温度为 60℃。GTA 在反应温度超过 60℃时,活性逐渐下降,反应温度达到 70℃后,酶活性迅速降低;GTB 在反应温度超过 60℃后,活性迅速降低,结果见图 9。

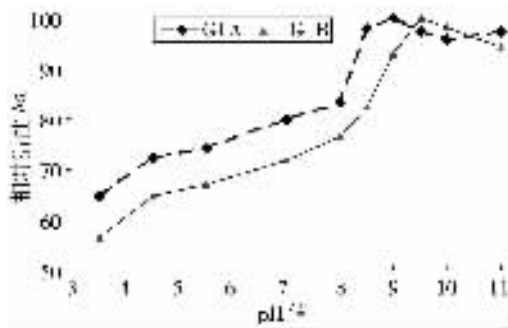


图8 GTs的pH值稳定性(以TAME为底物)

Fig.8 pH Stability of GTs on TAME

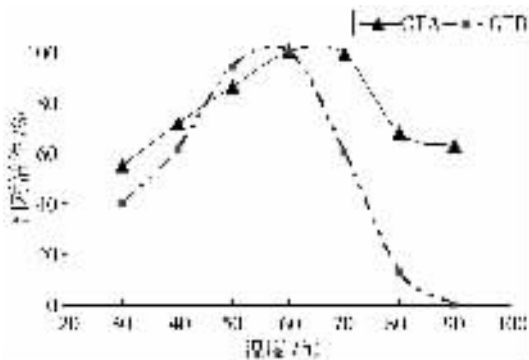


图9 GTs的反应最适温度(以TAME为底物)

Fig.9 Temperature Optimum of GTs on TAME

5)GTs的热稳定性。GTs在40℃以下具有相当高的热稳定性。当GTs在40℃保温30min后,其残留活性达到酶最大活性的91.7%(GTA)和80.6%(GTB);在温度40℃以上酶迅速失活;到达60℃时,酶残余活性仅为最大活性的2.6%(GTA),2.0%(GTB);到达80℃时,酶残余活性仅为最大活性的1.0%(GTA)0.5%(GTB)结果见图10。

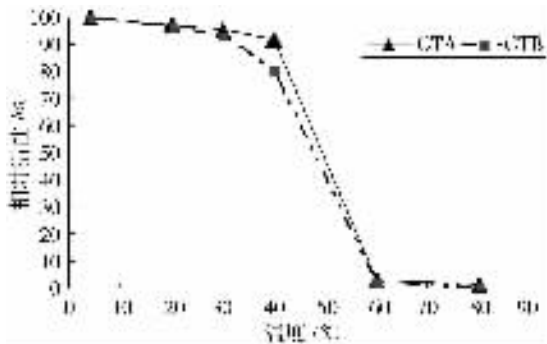


图10 GTs的热稳定性

Fig.10 Temperature Stability of GTs on TAME

3 讨论

3.1 草鱼胰蛋白酶的纯化

在固体硫酸铵分级沉淀操作过程中,应注意控制硫酸铵的加入速度,应在轻轻搅拌下,少量多次缓

慢加入,避免硫酸铵局部浓度过高引起蛋白质共沉淀。纯化操作无须透析,使得纯化时间大大缩短,并获得较高回收率。从试验结果可以看出,通过简单实用的几步纯化手段,获得一定程度纯化的草鱼胰蛋白酶。其中GTA纯化倍数243倍,产率30.3%,但是GTB的活性较低纯化倍数为5,可能与鱼类胰蛋白酶在酸性条件下不稳定有关。经两步洗脱,GTB在亲和层析柱上停留时间过长。这个问题可能的解决途径为,直接用亲和洗脱液2将GTA、GTB洗脱下来,然后用其他层析方法进一步进行分离。

本试验所测得的草鱼胰蛋白酶的分子量为27kDa,据目前研究,鱼类胰蛋白酶的分子量主要范围是在18~30kDa。不同种鱼胰蛋白酶的分子量一般是不相同的,但是差异都不是太大。如Overnell等^[11]得到鳕鱼(*Gadus morhua*)几种胰蛋白酶的分子量为18~22kDa;Bougatet等^[12]得出沙丁鱼(*Sardina pilchardus*)的胰蛋白酶分子量为25kDa,鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[13]胰蛋白酶的分子量为28kDa,远东沙丁鱼(*Sardinops melanostictus*)和远东多线鱼(*Pleuroprammus azonus*)^[14]胰蛋白酶的分子量均为24kDa;Titani等人^[15]通过电泳技术,从多刺猫鲨(*Squalus acanthias*)胰脏中纯化出胰蛋白酶,电泳后出现两条带,一条11kDa,另一条23kDa。

3.2 草鱼胰蛋白酶的性质

米氏常数(K_m)表示底物浓度对胰蛋白酶水解速度的影响, K_m 值越小,酶与底物的亲和力越大;反之, K_m 值越大,酶与底物的亲和力越小。它是酶的特征性常数,只与酶的性质、酶所催化的底物和酶促反应条件(如温度、pH、有无抑制剂等)有关,与酶的浓度无关。酶的种类不同, K_m 值不同,同一种酶与不同底物作用时, K_m 值也不同。酶的 K_m 值范围很广,大致在 10^{-1} ~ 10^{-6} M之间。以BAPNA为底物时,凤尾鱼(*Engraulis encrancholus*)两种胰蛋白酶 K_m 值为0.83mM和0.66mM^[16];鲤鱼(*Cyprinus carpio*)胰蛋白酶的 K_m 值为0.039mM^[13];大西洋鳕(*Gadus morhua*)胰蛋白酶的 K_m 值为0.077mM^[17];格陵兰鳕(*Gadus ogac*)胰蛋白酶的 K_m 值为1.67mM^[18]。本试验测得草鱼胰蛋白酶的 K_m 值为0.37mM,大小适中,比鲤鱼的高,可知胰蛋白酶对BAPNA的亲和力偏小。

根据国内外研究结果显示^[19],大多数鱼类消化道中的胰蛋白酶适宜pH值都是中性偏碱性,在酸性条件下极不稳定,同时也存在种属特异性。鱼类胰蛋白酶适宜pH值一般在8.0~10.0。如美洲沙

脑鱼 (*Sardinops sagax caerulea*)^[20] 胰蛋白酶的最适 pH 值为 8.0; 沙丁鱼 (*Sardina pilchardus*)^[12] 胰蛋白酶的最适 pH 值为 8.0 ~ 9.0; Munilla-Morán 等^[21] 比较研究深海鲑 (*Sebastes mentella*)、大鲈鲱 (*Scophthalmus maximus*) 和乌颊鱼 (*Sparusaurata*) 等 3 种肉食性鱼类, 发现其胰蛋白酶最适 pH 值为 9.5 ~ 10.0, 但也有个别情况, 大西洋鲑 (*Salmo salar*) 则大于 10.0, 其最适 pH 值达到了 10.6^[22]。本实验测得草鱼胰蛋白酶的最适 pH 值为 8.0, 其最适 pH 值为中性偏碱性, 符合鱼类胰蛋白酶的最适 pH 值范围。根据本试验对草鱼胰蛋白酶酸碱稳定性的研究, 结果表明, 草鱼胰蛋白酶在酸性条件下活性丧失得最快, 由此可知, 草鱼胰蛋白酶在 pH 9.0 ~ 11.0 范围内稳定性较高, 在弱碱性条件下稳定, 在酸性条件下极不稳定。和哺乳动物的胰蛋白酶在酸性条件下稳定不同, 从各种鱼类分离得到的胰蛋白酶在碱性条件下稳定^[23-24], 草鱼的胰蛋白酶具有类似性质。

据研究报道, 鱼类胰蛋白酶的最适反应温度在 30 ~ 65 °C 范围内, 如非洲鲶鱼 (*Clarias gariepinus*)^[25] 胰蛋白酶的最适温度为 30 ~ 40 °C; 美洲沙脑鱼 (*Sardinops sagax caerulea*)^[19] 为 50 °C; 鲮鱼 (*Mugil cephalus*)^[26] 为 55 °C; 鳀鱼 (*Katsuwonus pelamis*)^[27] 和沙丁鱼 (*Sardina pilchardus*)^[12] 均为 60 °C; 青干金枪鱼 (*Thunnus tonggol*)^[28] 可高达 65 °C。本试验测得草鱼胰蛋白酶的最适温度为 60 °C, 这与鱼类胰蛋白酶的最适反应温度范围相一致。对黄鳍胰蛋白酶热稳定性的研究表明, GTs 在 40 °C 以下具有相当高的热稳定性, 温度在 40 °C 以上, 酶迅速失活。本试验的结果表明, 草鱼胰蛋白酶的热稳定性随着温度的升高, 其活性丧失越快, 热稳定性越差。其它学者的研究结果也是如此, 如凤尾鱼^[16] 胰蛋白酶在 45 °C 保温 2 h 后, 失去 20% 的活性; 在 55 °C 时失去 60% 的活性; 在 60 °C 时则全部失去活性; 鳀鱼 (*Katsuwonus pelamis*)^[27] 胰蛋白酶在 30 ~ 50 °C 较稳定, 50 °C 以上活力减弱, 60 °C 保持 68% 的活力, 80 °C 时全部失活。GTA、GTB 在一些性质上表现相似, 而在另一些性质上表现相异, 进一步说明, GTA、GTB 是两种相似的酶。这和鲤鱼有两种胰蛋白酶相类似^[29]。

参考文献:

- [1] 尾崎久雄. 鱼类消化生理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [2] 黄耀桐, 刘永坚. 草鱼肠道肝胰脏蛋白酶活性的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1998, 12(4): 328-333.
- [3] 倪寿文, 桂远明, 刘焕亮. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨 [J]. 动物学报, 1993, 39(2): 160-168.
- [4] 李广丽, 王义强. 草鱼、鲤鱼肠道、肝胰脏消化酶活性的初步研究 [J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(1): 34-45.
- [5] 黄峰. 鲢、鳙胰蛋白酶的研究 [J]. 水产学报, 1996, 20(1): 68-71.
- [6] 叶元土, 林仕梅, 罗莉, 等. 温度、pH 值对南方大口鲶、长吻鮠蛋白酶和淀粉酶活力的影响 [J]. 大连水产学院学报, 1998, 13(2): 17-23.
- [7] 郝福英, 周先碗, 黄玉芝, 等. 生命科学实验技术 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2004.
- [8] LAEMMLI U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [9] BRADFORD M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 249-254.
- [10] 厉朝龙, 陈枢青, 刘子贻, 等. 生物化学与分子生物学实验技术 [M]. 浙江: 浙江大学出版社, 2000.
- [11] OVERNELL J. Digestive Enzymes of the Pyloric Caeca and of Their Associated Mesentery in the Cod (*Gadus morhua*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1973, 46B: 519-531.
- [12] BOUGATEF A, SOUISSI N, FAKHFAKH N, et al. Purification and Characterization of Trypsin from the Viscera of Sardine (*Sardina pilchardus*) [J]. Food Chemistry, 2007, 102: 343-350.
- [13] COHEN T, GERTLER A, BIRK Y. Pancreatic Proteolytic Enzymes from Carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and Physical Properties of Trypsin, Chymotrypsin, Elastase and Carboxypeptidase B [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1981, 69B: 639-646.
- [14] KISHIMURA H, HAYASHI K, MIYASHITA Y, et al. Characteristics of Trypsins from the Viscera of True Sardine (*Sardinops melanostictus*) and the Pyloric Ceca of Arabesque Greenling (*Pleurogrammus azonus*) [J]. Food Chemistry, 2006, 97: 65-70.
- [15] TITANI K, ERICSSON L H, NEURATH H, et al. Amino Acid Sequence of Dogfish Trypsin [J]. Biochemistry, 1975, 14(7): 1358-1366.
- [16] MARTINEZ A, OLSEN R L, SERRA J L. Purification and Characterization of Two Trypsin-Like Enzymes from the Digestive Tract of Anchovy, *Engraulis encrancholus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1988, 91B: 677-684.
- [17] ASGEIRSSON B, FOX J W, BJARNASON J B, et al. Purification and Characterization of Trypsin from Poikilo-

- therm *Gadus morhua* [J]. *Biochemistry* ,1989 ,180 :85-94.
- [18] SIMPSON B K , HAARD N F. Purification and Characterization of Trypsin from the Greenland Cod (*Gadus ogac*). 1. Kinetic and Thermodynamic Characteristics [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* ,1984 ,62 : 894-900.
- [19] 李茵君 , 邵文友 , 姚艳红 等. 长鳍吻鲈消化系统组织学初步研究 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)* , 2007 ,24(3) :13-16.
- [20] CASTILLO-YANEZ F J , PACHECO-AGUILAR R , GARCÍA-CARREÑO O F L , et al. Isolation and Characterization of Trypsin from Pyloric Caeca of Monterey Sardine *Sardinops sagax caerulea* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* ,2005 ,140B :91-98.
- [21] MUNILLA-MORAN R , SABORIDO-RAY F. Digestive Enzymes in Marine Species. I. Proteinase Activities in Gut from Redfish (*Sebastes mentella*) , Seabream (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* ,1996 ,113B :395-402.
- [22] OUTZEN H , BERGLUND G I , SMALAAS A O , et al. Temperature and pH Sensitivity of Trypsins from Atlantic Salmon , *Salmo salar* , in Comparison with Bovine and Porcine Trypsin [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* ,1996 ,115B :33-45.
- [23] DE-VECCHI S D , COPPEZ Z. Marine Fish Digestive Proteases-relevance to Food Industry and South-west Atlantic Review [J]. *Journal of Food* ,1996 ,20 :193-214.
- [24] HAARD N F. A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology* ,1992 ,1(1) :17-35.
- [25] UVS W , HECHT T. Assays on the Digestive Enzymes of Sharptooth Catfish , *Clarias gariepinus* (*Pisces : Clariidae*) [J]. *Aquaculture* ,1987 ,63 :301-313.
- [26] GUIZANI N , ROLLE R S , MARSHALL M R , et al. Isolation , Purification and Characterization of a Trypsin from the Pyloric Caeca of Mullet (*Mugil cephalus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* ,1991 ,98B :517-521.
- [27] KLOMKLAO S , BENJAKUL S , VISESSANGUAN W , et al. Purification and Characterisation of Trypsins from the Spleen of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) [J]. *Food Chemistry* ,2007 ,100 :1580-1589.
- [28] KLOMKLAO S , BENJAKUL S , VISESSANGUAN W , et al. Purification and Characterization of Trypsin from the Spleen of Tongol Tuna (*Thunnus tonggol*) [J]. *Food Chemistry* ,2006 ,54 :5617-5622.
- [29] CAO M J , OSATOMI K , SUZUKI M , et al. Purification and Characterization of Two Anionic Trypsins from the Hepatopancreas of Carp [J]. *Fisheries Science* ,2000 ,66 : 1172-1179.

Purification and Characterization of Two Kinds of Trypsins from the Hepatopancreas of Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*)

GENG Li-na¹ , HU Chong-jiang² , LI Ying-wen¹

(1. The Key Laboratory of Animal Biology , Engineering Research Center of Bioactive Substances , College of Life Sciences , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 ; 2. College of Life Sciences , Southwest University , Chongqing 400716 , China)

Abstract : The goals of this research are to purify and characterize trypsin from hepatopancreas of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Trypsins from the hepatopancreas of grass carp are purified by ammonium sulfate fractionation , CHOM sepharose 4B affinity column to obtain a single band on SDS-PAGE. Two kinds of trypsin are isolated , called GTA and GTB , the relative molecular mass of which is 27 kDa by SDS-PAGE. As a result , GTA was 243-fold purified , with the specific activity of 61388 TAME units/mg protein and recovery of 30.3% , while GTB 5-fold purified , with the specific activity of 1447 TAME units/mg protein and recovery of 0.2% . Using BAPNA(benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide) as substrate , the Michaelis constant (K_m) of GTA is 0.37mM. The optimum pH and temperature of the two trypsin for the hydrolysis of TAME(N-p-tosyl-L-arginine methyl ester) hydrochloride are 8.0 and 60°C , respectively. The two trypsin are not stable to heat treatment up to 60°C. The GTA shows pH stability between 8.5 and 11.0 and the GTB shows pH stability between 9.0 and 11.0. This stability is similar to that reported for most marine organism trypsin , which are highly unstable under acidic conditions but very stable at neutral to slightly alkaline conditions.

Key words : grass carp ; trypsin ; affinity chromatography ; characterization