

牙鲆孵化酶的分离纯化及其部分生物化学性质研究

史振平^{1,2}, 樊廷俊¹, 丛日山¹, 汤志宏¹, 汪小锋^{1,3}, 付永锋^{1,4}

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266033; 3. 西安大略大学 生物系, 加拿大安大略省伦敦市 N6A, 3K7; 4. 复旦大学 生命学院, 上海 200433)

摘要: 利用凝胶过滤柱层析和阴离子交换柱层析技术, 从牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 胚胎孵化液中分离纯化出了大小约为 34.8 ku 的牙鲆孵化酶。该酶卵膜裂解的最适反应温度为 35℃, 最适 pH 为 7.0; 对底物酪蛋白的米氏常数 K_m 值为 1.53 mmol/L。该酶对丝氨酸蛋白酶和胰蛋白酶的专一性抑制剂非常敏感, 而对其他蛋白酶抑制剂不敏感, 表明该酶极可能是一种丝氨酸蛋白酶类型的胰蛋白酶。此外, 该酶可浓度依赖性地被 EDTA 所抑制, 被 Cu^{2+} 所强烈抑制, 被 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 所激活, 对 Zn^{2+} 则不敏感, 表明该酶很可能是一种金属蛋白酶。

关键词: 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*); 孵化酶; 卵膜裂解活性; 丝氨酸蛋白酶; 金属蛋白酶
中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2008)11-0044-07

在多种动物的早期胚胎发育过程中, 胚胎周围都包被有一层保护性外膜, 发育到特定阶段后, 胚胎必须从这层膜的包围中解脱出来即孵化 (hatching), 才能进一步生长和发育。许多动物如昆虫^[1], 棘皮动物^[2], 两栖动物^[3-5], 硬骨鱼^[6,7] 和哺乳动物^[8], 其孵化都是借助于特异性酶来完成的。在鱼类和两栖类中, 这种专门负责胚胎孵化的关键性蛋白酶被称为孵化酶 (hatching enzyme, HE)。孵化酶是由早期胚胎中的一时性 (transient) 孵化腺细胞合成与分泌的, 这类酶合成量极少, 故很难分离。1989 年, 日本鲷鱼 (*Oryzias latipes*)^[6,7] 和海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*)^[9] 的孵化酶被高度纯化出来, 并查清了其生化性质。近年来, 海胆^[10]、鲷鱼^[11] 和非洲爪蟾孵化酶 cDNA 克隆化的成功, 使这些酶可被用作分子生物学探针。

20 世纪 80 年代, 学者们便开始对日本鲷鱼、虹鳟 (*Salmo gairdneri* Rich) 和白斑狗鱼 (*Esox lucius* L.)、底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) 和斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 孵化酶的部分生化性质进行研究^[6,7,12-15], 随后又查清了日本鲷鱼的 cDNA 序列与基因表达模式。但在重要的经济鱼类偏口鱼中, 至今还未见到有关其孵化酶生物化学性质及其基因表达模式的研究报道。目前, 学者们也逐渐认识到, 弄清鱼类的孵化机制也是人为控制鱼类胚胎孵化和提高经济鱼类种苗育成率的重要途径之一^[16]。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是中国主要的海水经济增殖鱼类, 尽管其成体生产技术已比较成熟, 但因其苗种繁育过程中胚胎孵化率较低, 致使其种苗养成率很不理想, 已在一定程度上影响了牙鲆

养殖业的经济效益。弄清牙鲆孵化酶 (*Paralichthys hatching enzyme*, PHE) 的生化性质, 对于阐明其胚胎的孵化机制具有重要的理论意义, 可通过提高孵化率进而提高牙鲆种苗养成率及养殖效益, 因此具有极大的应用价值和广阔的应用前景。

作者首次对海水养殖偏口鱼类——牙鲆的孵化酶进行研究, 旨在弄清其部分生物化学性质, 为进一步阐明牙鲆等鱼类的孵化机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

牙鲆受精卵, 由中国水产科学研究院黄海水产研究所柳学周研究员与烟台海阳海珍品养殖厂惠赠。

1.2 方法

1.2.1 牙鲆胚胎的人工培养及孵化液的制备

新鲜牙鲆受精卵悬浮于新鲜海水中, 21℃ 充气培养。待 90% 以上的胚胎孵化后, 用滤网捞出孵出仔鱼, 所得培养液即为孵化液。来自 5 000 个胚胎的孵化液, 于 4℃ 进行 67% 硫酸铵溶液 (SAS) 沉淀处理。离心 (8 000 r/min, 30 min; 4℃) 收集蛋白质沉淀, 将沉淀溶解后用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液透析; 再用 Centricon 10 浓缩离心管进行脱

收稿日期: 2006-04-10; 修回日期: 2006-07-02

基金项目: 国家教育部留学回国人员基金项目 (980418)

作者简介: 史振平 (1976-), 女, 博士, 主要从事海洋经济动物细胞工程与细胞分化研究; 樊廷俊, 通讯作者, 教授, 博士生导师, 博士, 电话: 0532-82031637, E-mail: tjfan@ouc.edu.cn

盐和浓缩处理,至终体积 0.3 mL 作为孵化酶粗品置 - 20 保存备用。

1.2.2 卵膜的制备

3 000 粒新鲜牙鲆卵,用 10 mL 玻璃注射器和 4 号针头挤破后,室温静置 20 min,收集浮于上层的卵膜(vitelline envelope, VE),经蒸馏水充分冲洗后,离心(4 000 r/min, 45 min)收集卵膜。卵膜经超声波破碎后,再用丙酮脱水处理(10 min)和蒸馏水冲洗,悬浮于 3 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)缓冲液中,分装后置 - 20 冻存备用。

1.2.3 酶的纯化

Sephacryl S-100 凝胶过滤柱用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)平衡处理 14 h 后,将 0.3 mL 孵化酶粗品(来自约 5 000 个胚胎)上柱,用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)进行洗脱,分步收集洗脱组分并进行卵膜裂解活性测定,收集高酶活性的峰值组分,经浓缩脱盐后,一部分作为 Sephacryl S-100 纯化样品,置 - 20 保存备用;其余部分用阴离子交换柱进一步纯化。DEAE-sepharose FF 离子交换柱用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)缓冲液平衡处理 2 h 后,将凝胶过滤纯化样品上柱,用含 NaCl 浓度为 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mol/L 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)进行梯度洗脱,分步收集洗脱组分,进行卵膜裂解活性测定,收集高酶活性的峰值组分,经脱盐和浓缩后,作为孵化酶纯化样品置 - 20 保存备用。以上柱层析纯化操作均在 4 进行。

1.2.4 SDS-PAGE

孵化酶粗品和 Sephacryl S-100 纯化样品经 Centricon 10 离心管浓缩和脱盐后,依 Laemmli^[17]的方法进行 SDS-PAGE,用 0.05% 考马斯亮蓝 R-250 显色。DEAE-sepharose F. F. 纯化样品采用同样的方法进行 SDS-PAGE,用 0.1% AgNO₃ 染色。

1.2.5 酶活性测定

1.2.5.1 蛋白裂解活性测定

PHE 蛋白裂解活性的测定以 3.3 g/L 酪蛋白为底物,参照 Yasumasu 等^[6]的方法进行。取 100 μL 待测酶样品与 100 μL 3.3 g/L 酪蛋白溶液混匀,在 30 反应 30 min 后,加入 3 mL 冰三氯乙酸终止反应,于 4 静置 30 min,离心(5 000 r/min, 30 min, 4),收集上清液测定 A₂₈₀ 光吸收值。阴性对照用 100 μL 缓冲液替代待测酶样品,其他条件相同。在此反应条件下,以 A₂₈₀ 值每分钟增加 0.001 定义为一个酶活力单位(U)。

1.2.5.2 卵膜裂解活性测定

PHE 卵膜裂解活性的测定参照 Yamagami^[18]的方法进行。取 100 μL 卵膜与 100 μL 待测酶样品混

匀,在 30 反应 30 min 后,加入 3 mL 冰冷水终止反应,于 4 静置 2 h,离心(5 000 r/min, 30 min, 4)收集上清,测定 A₂₈₀ 光吸收值。阴性对照用 100 μL 缓冲液替代待测酶样品,其他条件相同。在此反应条件下,以 A₂₈₀ 光吸收值每分钟增加 0.001 定义为一个酶活力单位(U)。

1.2.6 EDTA、金属离子与蛋白酶抑制剂实验

蛋白酶抑制剂碘乙酰胺(IAM)、亮抑蛋白酶肽(leupeptin)、利马豆胰蛋白酶抑制剂(LBTI)、N-乙基马来酰亚胺(NEM)、卵类黏蛋白(ovomucoid)、胍苯基甲烷磺酰氟盐酸(*p*-APMSF)、抑胃酶肽 A(pepstatin A)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、甲苯磺酰赖氨酸氯甲酮(TLCK)、甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲酮(TPCK)以及 EDTA 溶解于蒸馏水中,苯丁抑制素(bestatin)和胰凝乳蛋白酶抑制剂(chymostatin)溶解于二甲基亚砷(DMSO)中。取不同浓度的 EDTA、金属离子(Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺)和各种蛋白酶抑制剂各 20 μL,分别与 20 μL 孵化酶纯品混匀,再各加入 50 μL 3.3 g/L 酪蛋白,于 30 反应 30 min 后,加入 3 mL 冰三氯乙酸终止反应,于 4 静置 30 min 后,离心(4,5 000 r/min, 30 min)收集上清液,分别测定其 A₂₈₀ 光吸收值。阴性对照用 20 μL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)替代上述反应体系中的酶样品;阳性对照用 20 μL 上述 Tris-HCl 缓冲液替代反应体系中的 EDTA 或金属离子或各种蛋白酶抑制剂,其 A₂₈₀ 光吸收值定为 100%。

PHE 的活性回复实验具体方法参照 Hata^[19]的方法,PHE 纯化样品 100 μL 与 100 μL EDTA (20 mmol/L)混匀,置 0 静置作用 20 min 后,分别加入 100 μL 5 mmol/L 的 Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ 溶液,于 0 中反应 3 h,然后测定各样品的蛋白裂解活性。

1.2.7 温度和 pH 对 PHE 活性的影响

分别在 20,25,30,35 和 40 的温度下以及 5.0, 6.0,7.0,8.0,9.0 和 10.0 的 pH 下测定 PHE 的活性,以确定温度与 pH 对 PHE 活性的影响。

1.2.8 酶动力学曲线的测定

将 100 μL 待测酶液与 100 μL 不同浓度的酪蛋白混匀后,在 30 反应 30 min 后,加入 3 mL 冰三氯乙酸终止反应,于 4 静置 30 min,离心(5 000 r/min, 30 min, 4),收集上清液测定 A₂₈₀ 光吸收,以 A₂₈₀ 值每分钟增加 0.001 定义为一个酶活力单位。所用底物的质量浓度分别为 2,3,4,5,6 g/L。并根据米氏方程 $v = V_{\max} [S] / (K_m + S)$ (式中 *S* 为反应底物, *[S]* 为反应底物浓度, *v* 为反应速率, *V_{max}* 为酶完全被底

物饱和时的最大反应速率)及 Goll & Galvan 等描述的 Lineweaver-Burk 双倒数作图法^[9]绘制酶动力学曲线,计算米氏常数 K_m 值。

2 结果

2.1 酶的纯化

来自 5 000 个胚胎的孵化液经 67 % 硫酸铵 4 过夜沉淀,收集沉淀并用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液透析;再用 Centricon 10 浓缩离心管进行脱盐和浓缩处理,至终体积 0.3 mL 作为孵化酶粗品置 -20 保存待用。经测定,孵化酶粗品蛋白含量为 15.9 mg,酶的总活力为 118 $A_{280} \times 10^{-3} / \text{min}$ 。

用 0.3 mL 来自 5 000 个牙鲆胚胎的 67 % SAS 沉淀的 PHE 粗品上样于 Sephacryl 凝胶过滤柱,分步收集洗脱组分(图 1)。以卵膜为底物分别进行卵膜裂解活性测定,发现第 10~12 号洗脱组分具有很强的卵膜溶解活性,将 10~12 号洗脱组分混合,取出部分作为凝胶过滤纯化样品使用,其余样品再次上样于 DEAE-sepharose FF 离子交换柱,分别对分布收集洗脱组分进行卵膜溶解活性测定,发现第 26 号洗脱组分具有很高的卵膜溶解活性,其洗脱 NaCl 浓度为 0.3 mol/L,收集第 26 号洗脱组分,作为 PHE 纯化样品使用。

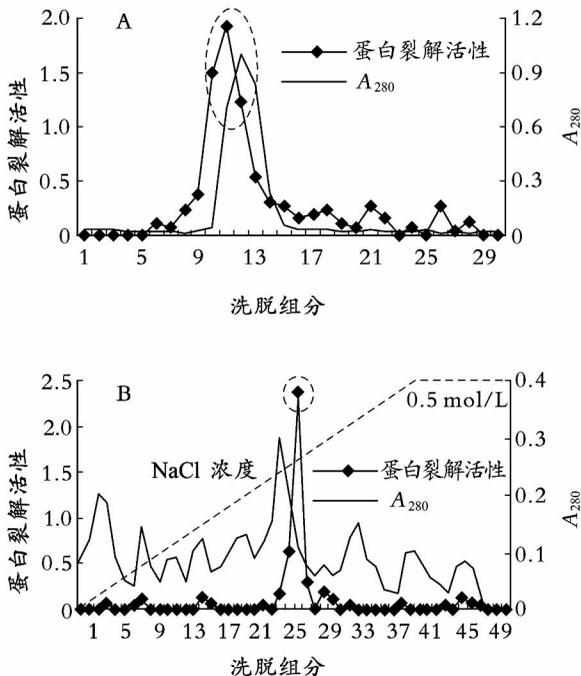


图 1 PHE 粗品的凝胶柱层析和阴离子柱层析

Fig. 1 Column chromatography of crude PHE

A. PHE 粗酶的凝胶过滤柱层析;B. 凝胶过滤样品的离子柱层析(10~12 管)

A. sephacryl S-100 gel-filtration chromatography of crude PHE; B. DEAE sepharose fast flow column chromatography of the gel-filtrated PHE fraction (No. 10~12 run-off fractions)

以上各步的纯化倍数及得率见表 1。

表 1 PHE 的纯化结果

Tab. 1 Purification of PHE

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (IU)	比活 ^b (IU/mg)	得率 (%)	纯化倍数
PHE 粗品 ^a	15.90	118	7.42	100	1.0
Sephacryl S-100 纯化样品	5.24	90	17.18	76.27	2.32
DEAE Sepharose FF 纯化样品	0.08	23.67	295.88	20.06	39.88

a. 取自 5 000 个牙鲆胚胎, PHE 为牙鲆孵化酶;b. 以卵膜 (1 000 个/mL) 作为特异性底物测定牙鲆孵化酶的卵膜裂解活性

2.2 SDS-PAGE

取 PHE 粗品和凝胶过滤纯化样品各 20 μL 进行 SDS-PAGE,用 0.05 % 考马斯亮蓝 R-250 显色。结果表明, PHE 粗品中含有多种蛋白,凝胶过滤纯化样品中含有两种以上的蛋白(图 2A)。DEAE-sepharose F. F. 纯化样品采用同样的方法进行 SDS-PAGE,用 0.1 % AgNO_3 染色。结果表明离子交换柱纯化后的 PHE 样品只有一条 34.8 ku 的电泳带,表明所得 PHE 纯化样品的纯度很高(图 2B)。

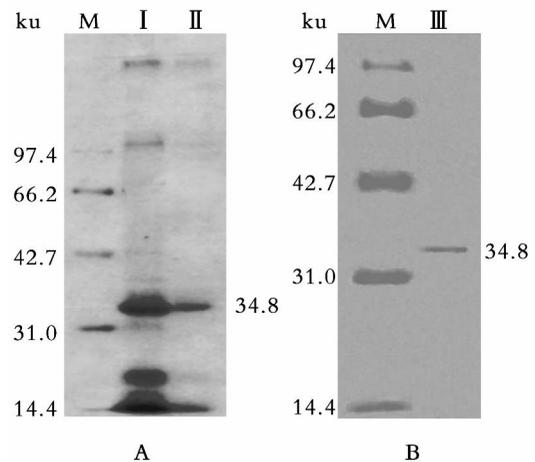


图 2 PHE 不同纯化样品的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of different PHE preparations

A. PHE 粗酶和凝胶过滤样品的 SDS-PAGE(考马斯亮蓝染色) M. marker; . PHE 粗酶; . 凝胶过滤样品

B. 离子柱样品的 SDS-PAGE(银染)

M. marker; . 离子柱样品

A. crude enzyme and sephacryl fractions; Lane M, SDS-PAGE middle molecular protein standards; Lane , 67P-SAS precipitate; Lane , sephacryl S-100 fractions

B. silver-stained DEAE-sepharose fraction, Lane M, SDS-PAGE middle molecular protein standards; Lane , DEAE-sepharose fraction

2.3 不同温度与 pH 值对孵化酶活性的影响

通过测定不同温度 (20 ~ 40) 与不同 pH 值 (pH 5 ~ 11) 下 PHE 纯化样品的卵膜裂解活性,发现

温度与 pH 值对 PHE 活性均有明显的影响, PHE 的最适作用温度为 35 ,最适 pH 值为 7.0 (图 3)。

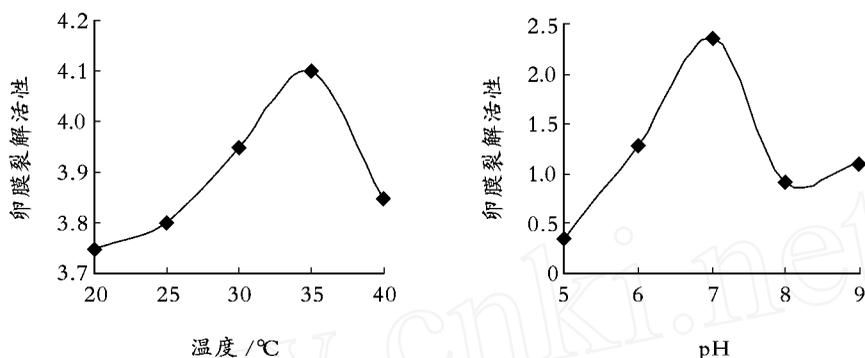


图 3 温度和 pH 对 PHE 活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature and pH on PHE

2.4 EDTA 和几种金属离子对孵化酶活性的影响

在不同浓度 EDTA 的作用下,通过测定 PHE 纯化样品的蛋白裂解活性,发现孵化酶活性可浓度依赖性地被 EDTA 所抑制(表 2)。通过测定不同浓度的 Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 对 PHE 纯化样品的蛋白裂解活性的影响,发现孵化酶活性可被 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 所激活、被 Cu^{2+} 所强烈抑制,而对 Zn^{2+} 不敏感(表 2)。

表 2 EDTA 和金属离子对 PHE 的影响

Tab. 2 Effects of EDTA and metal ions on PHE

处理方法	最大抑制率 (%)
PHE	100
EDTA (1 mmol/L)	11.8
EDTA (5 mmol/L)	29.4
EDTA (10 mmol/L)	82.4
EDTA (20 mmol/L)	88.2
Cu^{2+} (5 mmol/L)	5.8
Zn^{2+} (5 mmol/L)	88
Mg^{2+} (2 mmol/L)	170
Ca^{2+} (2 mmol/L)	447

利用浓度为 5 mmol/L 的各种金属离子对

20 mmol/L EDTA 预处理后的 PHE 样品进行酶活性回复实验发现,只有 5 mmol/L Cu^{2+} 能有效地回复被 EDTA 所抑制的 PHE 活性,而其他金属离子几乎没有回复作用(表 3)。

表 3 不同金属离子对 EDTA 预处理后 PHE 的活性回复效果

Tab. 3 Recovery effects of different metal ions on EDTA-pre-treated PHE

处理方法	酶活性 (%)
PHE	100
PHE + EDTA (20 mmol/L)	17.4
PHE + EDTA (20 mmol/L) + Cu^{2+} (5 mmol/L)	86.9
PHE + EDTA (20 mmol/L) + Zn^{2+} (5 mmol/L)	21.7
PHE + EDTA (20 mmol/L) + Mg^{2+} (5 mmol/L)	30.4
PHE + EDTA (20 mmol/L) + Ca^{2+} (5 mmol/L)	39.1

2.5 各种蛋白酶抑制剂对孵化酶活性的影响

利用对各种蛋白酶抑制剂对 PHE 纯化样品的蛋白降解活性进行研究,该酶活性可为 LB TI, SB TI, bestatin, *p*-APMSF 所强烈抑制,对 leupeptin, ovomucoid, PMSF, pepstatin, TLCK 也非常敏感,但对 TPCK, NEM, IAM 和 chymostatin 不甚敏感(表 4)。表明 PHE 可能是一种属于胰蛋白酶类型的丝氨酸蛋白酶。

表 4 几种抑制剂对 PHE 活性的影响

Tab. 4 Effects of different protease inhibitors on PHE

抑制剂	抑制剂浓度 (mmol/L)	最大抑制率 (%)
LB TI	10	98.9
SB TI	10	92.1
bestatin ^a	10	90.6
<i>p</i> -APMSF	20	83.0
leupeptin	10	73.6
ovomucoid	5	73.2
PMSF	50	68.7
pepstatin A	10	64.9
TLCK	100	60.4
TPCK	50	48.3
NEM	100	39.6
IAM	50	35.5
chymostain ^a	2	30.2

^a 以二甲亚砜 (20%) 为溶剂时不影响酶的活性

2.6 酶动力学曲线

使用不同浓度的酪蛋白作为底物,研究牙鲆孵化酶的酶动力学特性。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法绘出动力学曲线 (图 4), 计算所得的 K_m 值为 1.53 mmol/L。

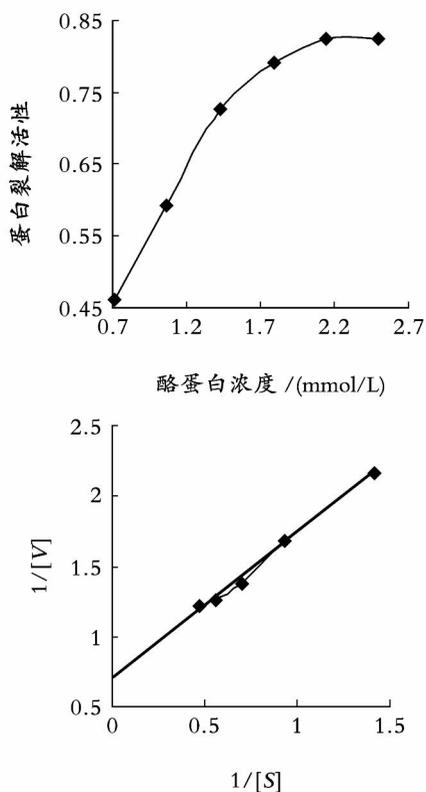


图 4 PHE 的酶动力学曲线

Fig.4 The kinetic properties of PHE

3 讨论

孵化酶是在早期胚胎发育过程中由孵化腺细胞合成与分泌的专门负责胚胎孵化的一种关键性蛋白酶。对多种鱼类孵化酶的研究表明,孵化酶不仅具有卵壳裂解活性,而且具有蛋白水解酶活性^[20],两栖类也是如此^[3-5,21]。但到目前为止,国内外仍未见有关 PHE 和牙鲆孵化腺细胞的研究报道。作者首次对偏口鱼类——牙鲆孵化酶进行了研究,旨在弄清其生物化学性质和酶性质,为进一步阐明牙鲆等鱼类的孵化机制奠定基础。

Yamagami 于 1970 年设计了一种快速而有效的孵化酶卵膜裂解活性的测定方法,即用卵膜作为底物,通过测定酶解后反应液 A_{280} 值的增加来表示孵化酶的卵膜裂解活性。并首次以卵膜为天然底物对日本鲈鱼的 HE 活性进行了测定,成功地鉴定出了日本鲈鱼 HE。鉴于卵膜为鱼类 HE 的天然底物,作者选用牙鲆卵膜对 PHE 活性进行测定,以保证所测酶活性确为 PHE 的特异性酶活性。

作者利用 67% 硫酸铵沉淀、Sephacryl 凝胶过滤柱层析和 DEAE-sepharose FF 阴离子交换柱层析,从牙鲆胚胎的孵化液中分离纯化出了 PHE 分子,其在 SDS-PAGE 电泳中的分子质量约为 34.8 ku,这与海鞘 (*Ciona intestinalis*) HE (34 ku) 在大小上是非常相似的^[22],也处在底鳃 HHE 的分子质量范围内 (15 ~ 40 ku)^[20],但比日本鲈鱼 HCE (24 ku)^[7]、LCE (25.5 ku)^[6]、虹鳟 (10 ku)^[23] 及白斑狗鱼 (10 ~ 15 ku)^[14] 的 HE 要大。

牙鲆 PHE 的最适反应温度约为 35 °C,比日本鲈鱼和底鳃 HE 的最适温度 (30 °C) 稍高^[14]。牙鲆 PHE 的卵膜裂解活性在 pH 7.0 时最高,该最适 pH 值要低于日本鲈鱼 HCE (8.0, 8.5)^[7]、LCE (pH 8.6)^[6]、底鳃 HE (8.0 ~ 8.5)^[15] 及虹鳟 HE (pH 8.0)^[23] 的最适 pH 值。

通过对 PHE 纯化样品进行蛋白酶抑制实验发现,孵化酶对 LB TI, SB TI, bestatin, *p*-APMSF 极为敏感,对 PMSF, ovomucoid, leupeptin, pepstatin, TLCK 也非常敏感,而对 chymostatin, TPCK, NEM 和 IAM 却不敏感;由于 PMSF, *p*-APMSF, leupeptin 为丝氨酸蛋白的特异性抑制剂, LB TI, SB TI, ovomucoid 为胰蛋白酶的特异性抑制剂, IAM 为巯基酶的特异性抑制剂, pepstatin 为酸性蛋白酶的特异性抑制剂,可见,牙鲆 PHE 既不像巯基酶也不像是酸性蛋白酶,而是一种属于胰蛋白酶类型的丝氨酸蛋白酶。这与在底鳃^[15]、斑马鱼^[16] 甚至与非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[3,5]、小鼠^[24] 中的研究结果是一致

的;但与日本鳉鱼^[6,7]和虹鳉鱼^[23] HE 的碱性蛋白酶性质是不同的,与蛙(*Rana pirica*)^[4]的半胱氨酸蛋白酶性质也不相同,尽管它们均是胰蛋白酶类型的蛋白酶。

利用 EDTA 与金属离子 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 对该酶活性进行研究发现,该 PHE 可浓度依赖性地为 EDTA 所抑制,20 mmol/L 的 EDTA 对该酶活性的抑制作用可高达约 90%;同时,该酶活性还能被 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 所强烈激活、为 Cu^{2+} 所强烈抑制,但几乎不受 Zn^{2+} 的影响。活性回复实验表明,Cu 离子能够有效回复被 EDTA 所抑制的酶活性。所有这些结果均表明,PHE 很可能也是一种 Cu-金属蛋白酶,与日本鳉鱼^[6,7]、虹鳉鱼^[23]、底鳉^[15]、白斑狗鱼^[14] 等鱼类以及海鞘^[22]、非洲爪蟾^[3,5] 和蛙^[4] HE 的金属蛋白酶性质是相同的,只不过上述 HE 隶属于 Zn-金属蛋白酶,而 PHE 则属于 Cu-金属蛋白酶。

综上所述,牙鲆作为海水鱼中偏口鱼类的代表,其孵化酶在大小、反应温度、pH 值以及酶性质等方面大都与底鳉的 HE 相似,均是属于丝氨酸蛋白酶类型的金属蛋白酶。目前,本实验室正在进行牙鲆 HE cDNA 探针的制备和 cDNA 文库的构建研究,旨在弄清牙鲆 HE 基因在孵化前后牙鲆胚胎中的时空表达模式,将为进一步弄清牙鲆胚胎的孵化机制与建立孵化率的人为提高技术奠定理论基础。

参考文献:

[1] Kofatos F C, Williams C M. Enzymatic mechanism for the escape of certain moths from their cocoons [J]. *Science*, 1964, 146: 538- 540.

[2] Hoshi M, Numakunai T, Sawada H. Evidence for participation of sperm proteinases in fertilization of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: Effect of protease inhibitors [J]. *Dev Biol*, 1981, 86: 117- 121.

[3] 樊廷俊,片桐千明.非洲爪蟾孵化酶的纯化及其部分生化性质研究 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30 (1): 75- 80.

[4] Kitamura Y, Katagiri C. Characterization of the hatching enzyme from embryos of an anuran amphibian, *Rana pirica* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1 387 (1- 2): 153- 164.

[5] Fan T J, Katagiri C. Properties of hatching enzyme from *Xenopus laevis* [J]. *Euro J Biochem*, 2001, 268 (18): 4 892- 4 898.

[6] Yasumasu S, Iuchi I, Yamagami K. Isolation and some properties of low choriolytic enzyme (LCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes* [J]. *J Biochem*, 1989a, 105: 212- 218.

[7] Yasumasu S, Iuchi I, Yamagami K. Purification and

partial characterization of high choriolytic enzyme (HCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes* [J]. *J Biochem*, 1989b, 105: 204- 211.

[8] Perona R M, Wassarman P M. Mouse blastocysts in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm [J]. *Dev Biol*, 1986, 114: 42- 52.

[9] Lepage T, Gache C. Purification and characterization of the sea urchin embryo hatching enzyme [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 4 787- 4 793.

[10] Lepage T, Gache C. Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo [J]. *EMBO J*, 1990, 9: 3 003- 3 012.

[11] Yasumasu S, Yamada K, Akasaka K, et al. Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development [J]. *Dev Biol*, 1992, 153: 250- 258.

[12] Hagenmaier H E. The hatching process in fish embryos. Characterization of the hatching protease (Chorionase) from the perivitelline fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich, as a metalloenzyme, *Willhelm roux Arch* [J]. *Entwicklungsmech Org*, 1974, 175: 157- 162.

[13] Denuce J M. Some characteristics of a hatching enzyme produced by the marine teleost, *Gobius joso* [J]. *Arch Int Physiol Biochim*, 1976, 83: 179- 180.

[14] Schoots AFM, Denuce J M. Purification and characterization of hatching enzyme of the pike *Esox lucius* [J]. *Int J Biochem*, 1981, 13: 591- 602.

[15] DiMichele L, Taylor M H. The mechanism of hatching in *Fundulus heteroclitus*: development and physiology [J]. *J Exp Zool*, 1981, 217: 73- 79.

[16] 樊廷俊,史振平.鱼类孵化酶的研究进展 [J]. *海洋与湖沼通报*, 2002, 1: 48- 56.

[17] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680- 685.

[18] Yamagami K. A method for rapid and quantitative determination of the hatching enzyme (chorionase) activity of the Medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Annot Zool Jpn*, 1970, 43: 1- 9.

[19] Hata S, Azumi K, Yokosawa H. Ascidian phenoloxidase: its release from hemocytes, isolation, characterization and physiological roles [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1998, 119: 769-776.

[20] Kaighn M E. A biochemical study of the hatching process in *Fundulus heteroclitus* [J]. *Dev Biol*, 1964, 9: 56- 80.

[21] Fan T J, Katagiri C H. The mode of action on vitel-

- line envelope of *Xenopus* hatching enzyme as revealed by its two molecular forms [J]. **Zool Science**, 1997, **14**(1): 101- 104.
- [22] D'Aniello A, de Vincentiis M, Di Fiore MM, *et al.* Hatching enzyme from the sea-squirt *Ciona intestinalis*: purification and properties [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1997, **1** **339**(1): 101- 112.
- [23] Hagenmaier H E. The hatching process in fish embryos. . The enzymological properties of highly purified enzyme (chorionase) from the perivitelline fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1974a, 49b: 313- 324.
- [24] Sawada H, Yamazaki K, Hoshi M. Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties [J]. **J Exp Zool**, 1990, **254**(1): 83- 87.

Purification and partial biochemical characterization of hatching enzyme from *Paralichthys olivaceus*

SHI Zhen-ping^{1,2}, FAN Ting-jun¹, CONG Ri-shan¹, TANG Zhi-hong¹, WANG Xiao-feng^{1,3}, FU Yong-feng^{1,4}

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China; 3. Department of Biology, the University of Western Ontario, London, Ontario, Canada, N6A, 3 K7; 4. College of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Received :Apr. ,10 ,2006

Key words : *Paralichthys olivaceus* ;hatching enzyme ;choriolytic activity ;serine protease ;metalloprotease

Abstract : Using sephacryl S-100 column gel-filtration and DEAE-sepharose fast flow ion-exchange chromatography, hatching enzyme (HE) from *Paralichthys olivaceus* (PHE) was purified. The molecular size of PHE in SDS-PAGE is about 34.8 ku, and its choriolytic activity was optimized at pH of 7.0 and temperature of 35 °C, respectively. The K_m value was 1.53 mmol/L with the substrate of casein. The PHE was very sensitive to trypsin-specific inhibitors and serine protease-specific inhibitors but not sensitive to other protein inhibitors. The results of inhibitors on PHE imply that PHE is most probably a trypsin-type serine protease. The PHE could be inhibited by EDTA in a dose-dependent manner. Metal ions of Ca^{2+} and Mg^{2+} could greatly enhance the choriolytic activity of PHE, whereas Cu^{2+} could enormously inhibit the choriolytic activity of PHE. But Zn^{2+} had shown almost no inhibition on PHE activity. The results on EDTA and metal ions imply that this PHE might be a kind of metalloprotease.

(本文编辑:张培新)