

文章编号: 1004 - 7271(2007)04 - 0362 - 06

## 淡水鱼肌球蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 热稳定性的季节变化

韩黎, 陶妍, 汪之和

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要:**对来自春季(4月份)、夏季(8月份)、秋季(11月份)和冬季(1月份)的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)骨骼肌肌球蛋白进行提取和纯化,通过测定肌球蛋白在不同热变性温度下  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的变性速率常数( $K_D$ ),考察了两种淡水鱼肌球蛋白热稳定性的季节变化。研究结果表明,两种鱼肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性均显示夏季鱼 > 春季鱼 > 秋季鱼 > 冬季鱼。在 35 °C、40 °C、45 °C 和 50 °C 的热变性温度下,测定了两种鱼的肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 变性速率常数( $K_D$ ),证明了肌球蛋白的热变性符合一级反应速度方程。经 35 °C 热变性的肌球蛋白的  $K_D$  值显示了冬季鱼约为夏季鱼的 4 倍,而秋季鱼和春季鱼介于冬季鱼和夏季鱼之间,且秋季鱼的  $K_D$  值略低于冬季鱼,而春季鱼的  $K_D$  值略高于夏季鱼。在 40 °C、45 °C 和 50 °C 的热变性温度下,对各种肌球蛋白测得的  $K_D$  值的变化趋势与上述结果相似。本研究证明了淡水鱼肌球蛋白的热稳定性夏季鱼明显优于冬季鱼,而春季鱼和秋季鱼分别与夏季鱼和冬季鱼的相似。

**关键词:**淡水鱼; 肌球蛋白;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; 热稳定性; 季节变化

中图分类号: S 986.1 文献标识码: A

## Seasonal changes in thermal stability of $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase for myosins from freshwater fish

HAN Li, TAO Yan, WANG Zhi-he

(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In this study, myosins were prepared from fast skeletal muscles of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) seasonally acclimatized and collected in winter (January), spring (April), summer (August) and autumn (November). Seasonal changes in thermal stabilities of myosins from the two species of freshwater fish were examined by determining inactivation rate constants ( $K_D$ ) of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. The results indicated that  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities of myosins from the two species of freshwater fish showed the summer fish > the spring fish > the autumn fish > the winter fish. The  $K_D$  values of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of myosins incubated at 35, 40, 45 and 50 °C were measured, demonstrating thermal denaturation of myosin proceeds as the first-order reaction. The  $K_D$  values for myosins incubated at 35 °C showed that the winter fish were about 4 times higher than those from the summer fish, whereas myosins from the autumn and spring fish showed  $K_D$  values comparable to those of the winter and summer fish, respectively,

收稿日期: 2006-09-14

基金项目: 上海市教委重点项目 (05ZZ50)

作者简介: 韩黎 (1982-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产生物资源利用。E-mail: wxqdl@sina.com.cn

通讯作者: 陶妍, E-mail: ytao@shfu.edu.cn, Tel: 021-65711922

and the former was slightly lower than the winter fish and the latter was slightly higher than the summer fish. Change tendency of the  $K_D$  values of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase for myosins incubated at 40, 45 and 50 °C was similar to those for myosins incubated at 35 °C. These results demonstrated that thermal stabilities of myosins from freshwater fish seasonally acclimatized were different, namely the summer fish was significantly superior to the winter fish, whereas the spring and autumn fish had thermal stabilities similar to those of the summer and winter fish, respectively.

**Key words:** freshwater fish; myosin;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; thermal stability; seasonal change

肌球蛋白是鱼肌肉中最丰富也是最重要的蛋白质,是肌原纤维蛋白的主要构成成分<sup>[1]</sup>。由于肌球蛋白的球状头部具有 ATPase 的活性,因此,在测定鱼肌肉蛋白质变性时通常以肌球蛋白 ATPase 的活性作为指标。Johnston 等<sup>[2]</sup>在上世纪 70 年代的《自然》杂志上首次提出了海水鱼类肌肉肌原纤维蛋白  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 的热稳定性与环境温度的关系。Wang 等<sup>[3]</sup>报道了季节温度变化对我国几种主要淡水鱼肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 热稳定性的影响。而迄今为止国内几乎未见关于鱼类肌球蛋白方面的研究报道。因为肌原纤维蛋白的性质主要是由肌球蛋白的性质所决定的<sup>[4]</sup>,因此,在肌球蛋白水平上考察其  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 热稳定性的变化将更深入地揭示淡水鱼肌肉蛋白质性质的变化规律。本文以四大家鱼中的草鱼和鲢骨骼肌肌球蛋白为研究对象,对来自不同季节的两种淡水鱼骨骼肌肌球蛋白进行提取,并测定它们在不同热变性温度下的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 变性速率常数 ( $K_D$ ),以期考察淡水鱼肌球蛋白热稳定性的季节变化规律,为淡水鱼的加工和贮藏提供可资参考的基础理论数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验鱼

草鱼和鲢均来自于上海市青浦区,于 2005 年 8 月和 11 月,2006 年 1 月和 4 月购自上海市图们路农贸市场,分别作为夏、秋、冬、春季的实验材料。鲢平均体重( $730 \pm 30$ ) g,平均体长( $40 \pm 5$ ) cm;草鱼平均体重( $1\ 780 \pm 50$ ) g,平均体长( $55 \pm 5$ ) cm。取其骨骼肌(白色肌)用于肌球蛋白的制备。

### 1.2 肌球蛋白的提取和纯化

参照 Hwang 等<sup>[4]</sup>的方法,略有改进。白色肌 100 g 绞碎,用 6 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液(pH 6.9)洗净后,离心(11 500 g,10 min,4 °C),用 2 倍体积含 7.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  和 0.15 mmol/L DTT、7.5 mmol/L ATP 的 0.675 mol/L KCl 溶液(pH 6.4)抽提 10~12 min,离心(条件同上),上清液用 9 倍冷的蒸馏水稀释后离心(条件同上),得沉淀用含 3 mol/L KCl 和 0.6 mmol/L DTT 的 0.12 mol/L Tris-maleate 缓冲溶液(pH 7.5)溶解,加入 1/10 体积的含 110 mmol/L ATP,55 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  和 5.5 mmol/L EGTA 溶液(pH 7.5)后,用 40%~55%的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和溶液分离得沉淀为粗肌球蛋白,再用含 0.5 mol/L KCl 和 0.1 mmol/L DTT 的 20 mmol/L Tris-maleate 缓冲溶液(pH 7.5)溶解沉淀并透析过夜。蛋白质浓度采用双缩脲法<sup>[5]</sup>测定,肌球蛋白浓度调整至 3 mg/mL。

### 1.3 肌球蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

肌球蛋白的 SDS-PAGE 参照 Laemmli<sup>[6]</sup>的方法。浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 10%,肌球蛋白进样量 20  $\mu\text{g}$ 。电泳结束后用 0.1%的考马斯亮蓝 R-250 对凝胶进行染色,用 25%的甲醇和 7%的醋酸混合液脱色。标准分子量蛋白采用华美生物工程公司提供的次高分子量标准蛋白。

### 1.4 肌球蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及热稳定性的测定

肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的测定在 25 °C 下进行,反应液体系为 0.05 mol/L KCl,20 mmol/L Tris-maleate(pH 7.5)、0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$ 、2 mmol/L ATP、0.3 mg/mL 肌球蛋白。反应从加入 ATP 开始,精确计时,反应 5 min 后加入 2.5 mL 15% TCA 终止反应。将反应液离心,取 1 mL 上清液加 1 mL 硫酸钼酸、

2.5 mL 蒸馏水、0.5 mL 米吐尔试剂,室温下显色 45 min,在 640 nm 处测吸光度,查标准曲线,计算释放的无机磷酸量。另取试管,在试管中先加入 2.5 mL 15% TCA,再依次加入上述反应试剂作为空白对照。

蛋白质热稳定性的测定按照下述方法进行:取 12 根试管平均分成 4 组,每管中加入一定量的肌球蛋白溶液,把四组试管分别置于 35、40、45 和 50 °C 四个不同温度的恒温水浴中保温,每间隔一定时间取出一管置于冰浴中,立即测定初始肌球蛋白和保温过不同时间的肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 的活性,通过下式计算变性速率常数  $K_D$ 。

$$K_D = 1/t(\ln C_0 - \ln C_t)^{[7]}$$

$C_0$  和  $C_t$  分别表示肌球蛋白保温前和保温  $t$  时间后的  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性。

### 1.5 统计学方法

$t$  检验:平均值的成对二样本分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 肌球蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

我们对夏季和冬季的两种淡水鱼肌球蛋白进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳,以期考察采用本文中的实验方法所提取的肌球蛋白的纯度。如图 1 所示,可以看到分子量大约 200 ku 的肌球蛋白重链亚基(MHC)谱带和分子量大约在 20 ku 的肌球蛋白轻链亚基(A1-LC,DTNB-and A2-LC)谱带,然而几乎未见分子量约 43 ku 的肌动蛋白和其它调节蛋白等的谱带,证明了所提取的肌球蛋白具有较高的纯度。

### 2.2 环境温度对肌球蛋白 $Ca^{2+}$ -ATPase 活性的影响

如图 2 所示,两种鱼的肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性均显示了夏季鱼明显高于冬季鱼。Watabe 等<sup>[8]</sup>报道了鲤鱼在 10、20 和 30 °C 驯化下,其肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 的活性显示为 30 °C 驯化鱼 > 20 °C 驯化鱼 > 10 °C 驯化鱼。这些结果表明了栖息于较高环境温度下的淡水鱼一般具有更高的肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性。虽然 4 月份的月平均气温(15.8 °C)略低于 11 月份(17 °C),然而春季鱼的酶活却高于秋季鱼的酶活;且春季鱼更接近于夏季鱼,而秋季鱼更接近于冬季鱼(见图 2),此结果似乎有悖于上述结论,我们在下文中将作进一步讨论。

### 2.3 不同季节的两种淡水鱼肌球蛋白 $Ca^{2+}$ -ATPase 变性速率常数的变化

图 3 是夏季和冬季的两种淡水鱼肌球蛋白在由低至高的四种热变性温度下,其  $Ca^{2+}$ -ATPase 相对活性的自然对数与保温时间的关系。由图 3A、B、C、D 可见,两者均显示了良好的直线相关(35 °C,  $r^2 = 0.92 - 0.99$ ; 40 °C,  $r^2 = 0.91 - 0.99$ ; 45 °C,  $r^2 = 0.98 - 0.99$ ; 50 °C,  $r^2 = 0.94 - 0.99$ ),清楚地证明了

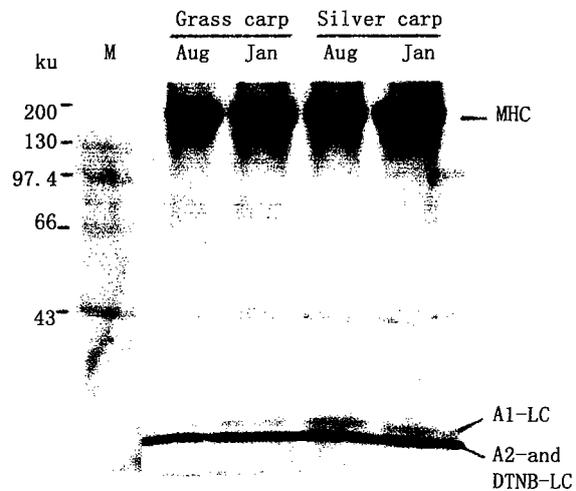


图 1 肌球蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of myosins

M: 次高分子量标准蛋白;肌球蛋白重链(200 ku);钙调素结合蛋白(130 ku);免磷酸化酶 B(97.4 ku);牛血清蛋白(66 ku);免肌动蛋白(43 ku)。MHC:肌球蛋白重链;LC:肌球蛋白轻链;A1 和 A2:肌球蛋白碱轻链;DTNB:5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)轻链

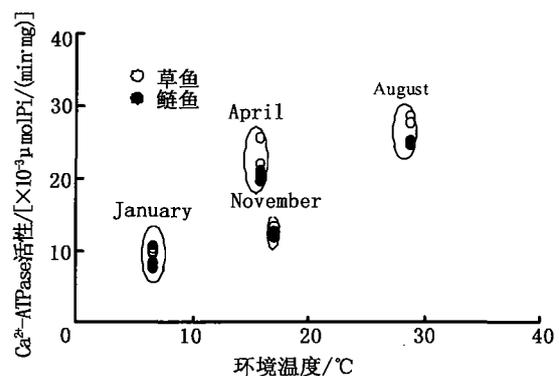


图 2 肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性与环境温度的关系

Fig. 2 Relationship between myosin  $Ca^{2+}$ -ATPase activities and environment temperatures

肌球蛋白的热变性符合一级反应速度方程(春季和秋季的两种淡水鱼的测定结果与上述结果相似,数据未显示)。据此,我们进一步计算了肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的变性速率常数  $K_D$ 。图 4 显示了来自不同季节的草鱼和鲢肌球蛋白在四种热变性温度下其  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 变性速率常数( $K_D$ )的变化。 $K_D$  能够清楚地反映肌球蛋白的热稳定性, $K_D$  值越大,则热稳定性就越差;反之,亦然。由图 4A 可见,在 35 °C 热变性温度下,冬季的草鱼和鲢肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值分别为  $22.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  和  $17.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ;而对夏季的草鱼和鲢所测得的肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值分别为  $5.2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  和  $4.2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ,显示了冬季鱼大约是夏季鱼的 4.3 倍,表明两种淡水鱼肌球蛋白的热稳定性夏季鱼明显优于冬季鱼( $P < 0.01$ )。秋季的草鱼和鲢肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值分别为  $14.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  和  $13.6 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ,分别与冬季两种鱼的  $K_D$  值比较接近。对春季的草鱼和鲢所测得的肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值分别为  $6.9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  和  $5.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ,分别与夏季两种鱼的  $K_D$  值比较接近。

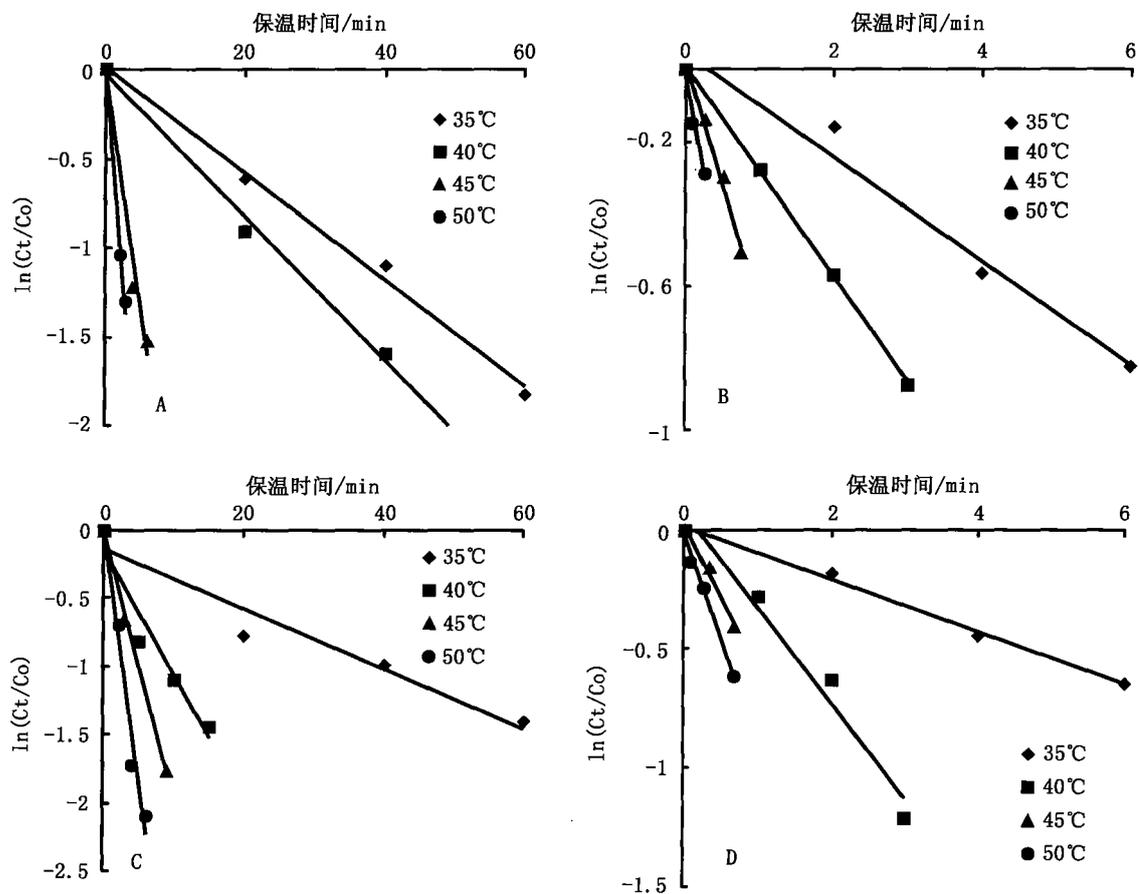


图 3 肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 相对活性的对数值与保温时间的关系

Fig. 3 Relationship between logarithms of relative  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities of myosin and incubation times  
A: 夏季草鱼; B: 冬季草鱼; C: 夏季鲢; D: 冬季鲢

此外,对不同季节的两种淡水鱼肌球蛋白在 40 °C、45 °C 和 50 °C 热变性温度下的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值进行了测定,发现随着热变性温度的提高, $K_D$  值也随之变大,但是两种淡水鱼肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值的季节变化趋势基本上是一致的,即冬季鱼 > 秋季鱼 > 春季鱼 > 夏季鱼(见图 4 B、C、D)。上述结果充分表明了两种淡水鱼肌球蛋白的热稳定性夏季鱼明显优于冬季鱼,而春季鱼和秋季鱼分别接近夏季鱼和冬季鱼。Guo 等<sup>[7]</sup>报道了 10 °C 驯化鲤鱼肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值是 30 °C 驯化鲤鱼的 1.7 倍;Wang 等<sup>[3]</sup>对不同季节的多种淡水鱼肌原纤维  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的热稳定性进行了研究,同样发现在夏季(8 月份)的水温环境下栖息的淡水鱼,其肌原纤维蛋白的热稳定性最高。Nakaya 等<sup>[9]</sup>

通过差示扫描量热仪(DSC)分析了不同驯化温度下鲤肌球蛋白结构的变化,同样发现 30 ℃ 驯化的鲤其肌球蛋白的结构最稳定。上述前人的研究结果和本研究结果均证明了淡水鱼肌肉蛋白质的热稳定性与其栖息环境温度密切相关。

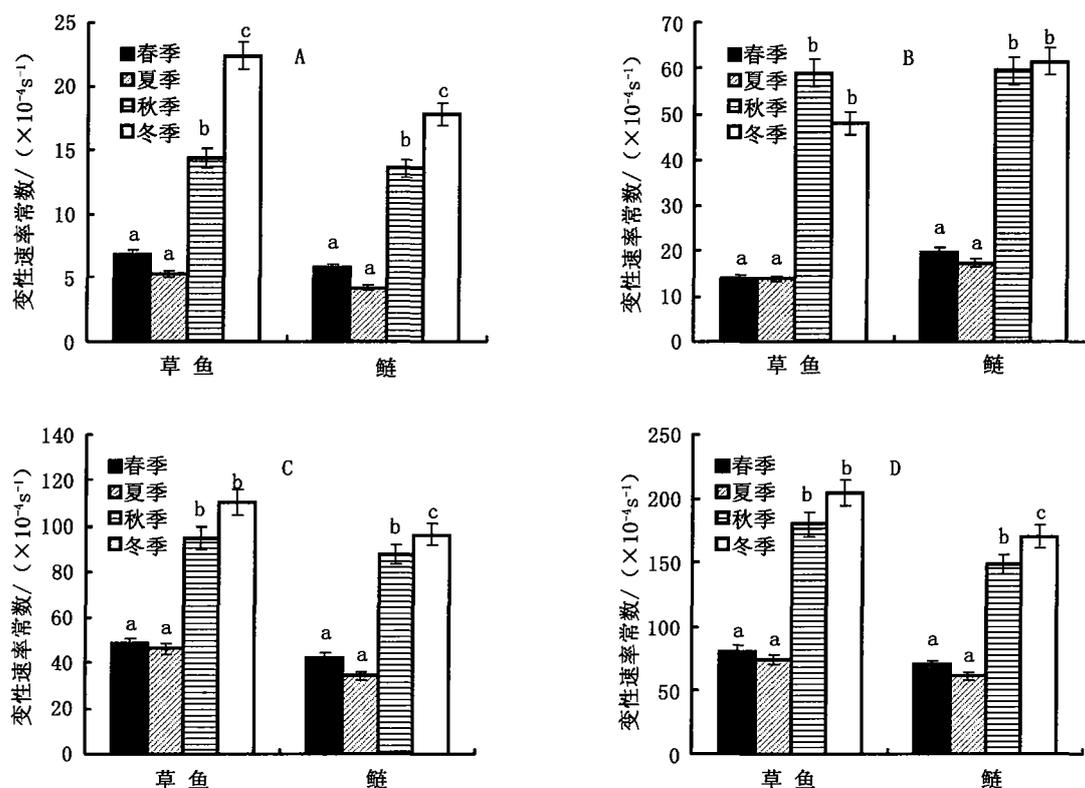


图 4 肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 变性速率常数的季节变化

Fig. 4 Seasonal changes in inactivation rate constants of myosin  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

注:图中同种鱼种标有不同字母的数值之间差异显著( $P < 0.01$ )

A:35 ℃; B:40 ℃; C:45 ℃; D:50 ℃

## 2.4 环境温度与 $K_D$ 值的相关性分析

为了进一步了解淡水鱼肌球蛋白的热稳定性与环境温度之间的关系,我们调查了上海地区从 2005 年 5 月至 2006 年 4 月共 12 个月的月平均气温。以在 2005 年 8 月(平均气温 28.7 ℃)、11 月(平均气温 17.0 ℃)和 2006 年 1 月(平均气温 6.1 ℃)、4 月(平均气温 15.8 ℃)采样的鱼分别作为夏、秋、冬、春的试料。通过以不同季节的两种淡水鱼在 45 ℃ 和 50 ℃ 条件下测得的  $K_D$  值对应于环境温度作图,可以发现,在夏季鱼和冬季鱼的情况下,肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值显示了随着环境温度的上升而显著下降(见图 5),表明了淡水鱼肌球蛋白的热稳定性与环境温度呈负相关。然而,春季鱼和秋季鱼肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $K_D$  值与环境温度的关系似乎有悖于上述理论,虽然 4 月份较 11 月份的平均气温略低,但春季鱼的热稳定性明显优于秋季鱼,且显示了它们的热稳定性分别接近于夏季鱼和冬季

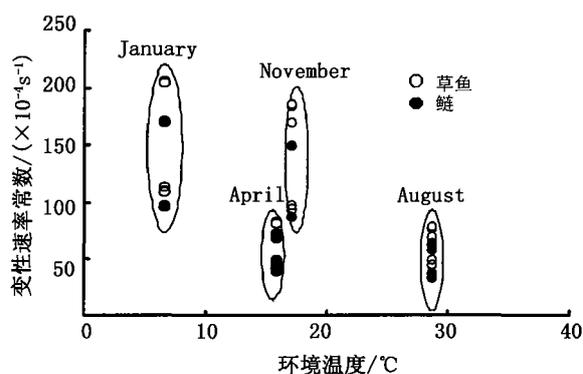


图 5 肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 变性速率常数与环境温度的关系

Fig. 5 Relationship between inactivation rate constants of myosin  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and environment temperatures

虽然 4 月份较 11 月份的平均气温略低,但春季鱼的热稳定性明显优于秋季鱼,且显示了它们的热稳定性分别接近于夏季鱼和冬季

鱼。

Tao 等<sup>[10]</sup>报道了实验室外水槽中自然温度条件下驯养的草鱼的肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 的  $K_D$  值,发现春季鱼与秋季鱼之间在肌球蛋白热稳定性上差异显著,显示了与本研究相似的结果。Imai 等<sup>[11]</sup>和 Hirayama 等<sup>[12]</sup>证明了蛋白质热稳定性的变化与其分子结构的变化密切相关,他们提出了肌球蛋白重链一级结构的变化是导致其性质变化的主要原因,而肌球蛋白重链一级结构的变化归咎于不同环境温度下特定的肌球蛋白重链同工型基因的表达。因此,导致春秋两季淡水鱼在肌球蛋白热稳定性方面展现差异的原因可分析如下:在春季和秋季的自然环境下,鱼的摄食量、日照时数、荷尔蒙水平及池塘内氧气含量等诸多自然因素的变化是很显然的,而这些因素在很大程度上影响了编码肌球蛋白的同工型基因的表达,进而影响了鱼肌肉蛋白质的性质<sup>[13]</sup>。另外一个重要的原因可能是春季和秋季在温度转变上正好是相反的两个时期:前者朝着水温逐步升高的夏季发展,而后者则相反。Tao 等<sup>[14]</sup>从温度驯化的草鱼中分离到了低温和高温型肌球蛋白重链同工型基因,并研究了它们依赖于季节温度变化的表达模式,发现春、夏季草鱼主要表达高温型基因,而秋、冬季草鱼则表达低温型基因。因此,本研究结果中不同季节的淡水鱼之间在肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及其热稳定性方面展现差异的原因被推测与它们在结构性质上的差异有关,进而与不同季节温度下肌球蛋白重链同工型基因的差异表达有关。本文在淡水鱼蛋白质基础理论研究方面所获得的结果和数据对于淡水鱼加工中工艺参数的确定及原料保藏条件的控制方面将提供重要的参考依据。

#### 参考文献:

- [1] 沈月新. 水产食品学[M]. 中国农业出版社,2001.
- [2] Johnston I A, Goldspink G. Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolutionary adaptations to temperature[J]. *Nat*,1975,257:620-622.
- [3] Wang Z, Hu F, Luo Z Y. Seasonal effect on the thermostability of myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in freshwater fish muscle [J]. *J Aquat Food Product Technol*,1997,6(2):5-15.
- [4] Hwang G C, Watabe S, Hashimoto K. Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation[J]. *J Comp Physiol*,1990,160B:233-239.
- [5] Gornall A G, Bardawill C J, David M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction[J]. *J Biol Chem*,1949,177:751-765.
- [6] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nat*,1970,227:680-685.
- [7] Guo X F, Watabe S. ATPase activity and thermostability of actomyosins from thermally acclimated carp[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*,1993,59:363-369.
- [8] Watabe S, Hwang G C, Nakaya M, *et al*. Fast skeletal myosin isoforms in thermally acclimated carp[J]. *J Biochem*,1992,111:113-122.
- [9] Nakaya M, Watabe S, Ooi T. Differences in the thermal stability of acclimation temperature-associated types of carp myosin and its rod on differential scanning calorimetry[J]. *Biochem*,1995,34:3114-3120.
- [10] Tao Y, Kobayashi M, Fukushima H, *et al*. Changes in enzymatic and structural properties of grass carp fast skeletal myosin induced by the laboratory-conditioned thermal acclimation and seasonal acclimatization[J]. *Fish Sci*,2005,71:195-204.
- [11] Imai J I, Hirayama Y, Kikuchi K, *et al*. cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with temperature acclimation[J]. *J Exp Biol*,1997,200:27-34.
- [12] Hirayama Y, Watabe S. Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle[J]. *Eur J Biochem*,1997,246:380-387.
- [13] Vornanen M. Seasonal and temperature-induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts[J]. *Am J Physiol*,1994,267:R567-R573.
- [14] Tao Y, Kobayashi M, Liang C S, *et al*. Temperature-dependent expression patterns of grass carp fast skeletal myosin heavy chain genes[J]. *Comp Biochem Physiol*,2004,B,139:649-656.