

# 鲢鱼肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶的研究

曹敏杰<sup>1</sup>, 李 燕<sup>1</sup>, 翁 凌<sup>1</sup>, 王锡昌<sup>2</sup>

(1.集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2.上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘 要** 本文研究了白鲢鱼肌肉中肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(myofibril-bound serine proteinase, MBSP)的作用。SDS-PAGE 结果显示肌原纤维在 55~60℃下加热后肌球蛋白重链有明显的分解现象。长时间加热也导致  $\alpha$ -辅肌动蛋白, 肌动蛋白和原肌球蛋白的分解。此结果表明鲢鱼肌肉中存在肌原纤维结合型蛋白酶。丝氨酸蛋白酶抑制剂(Pefabloc SC和利马豆胰蛋白酶抑制剂)及金属蛋白酶抑制剂EDTA有效抑制了肌球蛋白重链的分解, 而其它酶类的抑制剂不产生任何作用, 提示该酶为需金属离子激活的肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶。

**关键词:** 肌原纤维; 丝氨酸蛋白酶; 分解; 抑制剂; 免疫印迹

## Study on Myofibril-bound Serine Proteinase in Silver Carp

CAO Min-jie<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, WENG Ling<sup>1</sup>, WANG Xi-chang<sup>2</sup>

(1.College of Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China  
2.College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of silver carp has been characterized. Myosin heavy chain (MHC) degraded markedly when silver carp myofibril was incubated at 55~60℃ as shown by SDS-PAGE. Prolonged incubation of myofibril also caused the degradation of other myofibrillar proteins such as  $\alpha$ -actinin, actin and tropomyosin to some degree. The results suggested the existence of an endogenous myofibril associated proteinase. Serine proteinase inhibitors (Pefabloc SC and Lima bean trypsin inhibitor) and EDTA greatly suppressed the degradation of myosin heavy chain, while inhibitors for cysteine, and aspartic proteinases did not show any effect. These effects indicated that the endogenous proteinase was a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) that needed metal ion(s) for activation.

**Key words:** myofibril; serine proteinase; degradation; inhibitor; Western blot

中图分类号 Q939.91

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)01-0091-04

鱼糜制品加工过程中在 50~60℃ 的温度带内常常因产生蛋白质分解而引起凝胶形成能下降, 此种现象也被称之为凝胶劣化。凝胶劣化的产生不仅影响鱼糜制品的弹性, 更影响其商品价值。以往的研究认为, 鱼糜制品凝胶形成能下降主要是组织蛋白酶作用所造成的<sup>[1,2]</sup>。但是, 组织蛋白酶类(如 B, H, L 等)皆来自溶酶体, 为水溶性酸性蛋白酶。由于鱼糜制品制作工艺中需经多次漂洗, 甚至弱碱水漂洗, 最后产品中水溶性蛋白酶的残留量应相当少。再者, 此类酶在中性或弱碱性条件下的活性已受到极大抑制。因此, 由于组织蛋白酶的作用而引起鱼糜制品凝胶劣化的解释在理论上难于说明。近期研究发现, 鱼肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(myofibril-bound serine proteinase, MBSP)的作用可能是造成肌原纤维蛋白质, 尤其是肌球蛋白重链(myosin heavy

chain, MHC) 分解, 从而引起鱼糜制品弹性的下降的主要原因<sup>[3~6]</sup>。然而, 迄今为止, 除了淡水鲤鱼<sup>[7]</sup>和海水狗母鱼<sup>[8]</sup>外, 国内外从生物化学角度对鱼类 MBSP 的研究进行得很少。主要的困难在于两个方面: 1. 该类酶与肌原纤维蛋白牢固结合而很难解离; 2. 该类酶在肌原纤维中的含量极少。

我国是淡水鱼养殖大国, 据报道, 2001 年我国鲢鱼的产量已达到 490 万吨, 约占淡水鱼总量的 30%。制作鱼糜制品是淡水鱼加工利用的一个必然方向。而如何增强淡水鱼鱼糜制品的弹性一直是水产加工研究者探讨的课题。因此, 如果能彻底了解淡水鱼中 MBSP 的酶学及食品学特性, 那么就有可能找到有效抑制 MBSP 活性的食品添加剂从而提高淡水鱼糜制品的弹性, 改善其品质, 为我国淡水鱼加工利用带来一定的理论指导。

收稿日期: 2003-12-30

作者简介: 曹敏杰(1964-), 男, 教授, 博士, 主要从事生物化学及分子生物学研究。

本文着重探讨了鲢鱼肌肉中MBSP的存在情况、基本性质及其对肌原纤维蛋白质的分解作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

从厦门集美市场购买的鲜活的白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)经去头、去皮、去骨采肉后立即使用或置于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

丝氨酸蛋白酶抑制剂Pefabloc SC来自Merck公司(德国), 利马豆胰蛋白酶抑制剂(LBTI)来自日本和光公司。E-64和pepstatin A来自上海生工, SDS-PAGE和免疫印迹用的标准蛋白样液及免疫印迹显色试剂盒从Bio-Rad公司购得。大鼠抗鲤鱼肌动蛋白、抗鲤鱼 $\alpha$ -辅肌动蛋白及抗鲤鱼原肌球蛋白抗体由日本长崎大学水产学部原研治教授提供。辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG来自丹麦DAKO公司。其他的试剂均为分析纯或化学纯。

### 1.2 设备

实验设备包括冷冻离心机(Avanti™ JA-25, Beckman, 美国), 组织捣碎机(PT2100, Kinematica, 瑞士), 凝胶成像仪(Vilber Lourmat, 法国), 恒温水浴(Memmert, 德国), 垂直电泳槽及电转移装置(Bio-Rad, 美国)等。

### 1.3 肌原纤维蛋白的制备

以下整个过程在 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。新鲜的白鲢背部肌肉用刀切成小块后与4倍体积的20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.5)一起经组织捣碎机捣碎。捣碎后的溶液在 $8000 \times g$ 离心10min。弃除上清液, 将下层沉淀取出用上述缓冲液搅匀, 组织捣碎机捣碎,  $8000 \times g$ 离心10min, 取出沉淀。再重复以上清洗过程3次, 将最后得到的沉淀取出并溶解于含0.5mol/L NaCl的20mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.0)即为鲢鱼肌原纤维蛋白。制备的肌原纤维蛋白或立即用于实验或存放于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

### 1.4 白鲢肌原纤维在不同温度下的自我分解作用

取肌原纤维100 $\mu\text{l}$ 置于1.5ml Eppendorf管中, 分别在40、50、55、60、 $70^{\circ}\text{C}$ 下加热2h。样品经SDS化后上样于12%浓度的SDS-PAGE<sup>[9]</sup>, 电泳胶以考马斯亮蓝染色后分析蛋白质的降解情况。

### 1.5 各种蛋白酶抑制剂对结合型蛋白酶的作用

取肌原纤维100 $\mu\text{l}$ 于1.5ml eppendorf管中, 加入蛋白酶抑制剂至不同终浓度(见表1), 室温反应30min后转入 $55^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中继续反应2h。样品经SDS化后上样于12%浓度的SDS-PAGE, 电泳胶以考马斯亮蓝染色后分析各种抑制剂对由结合型蛋白酶引起的肌原纤维蛋白质降解的抑制效果, 从而了解结合型蛋白酶的性质。

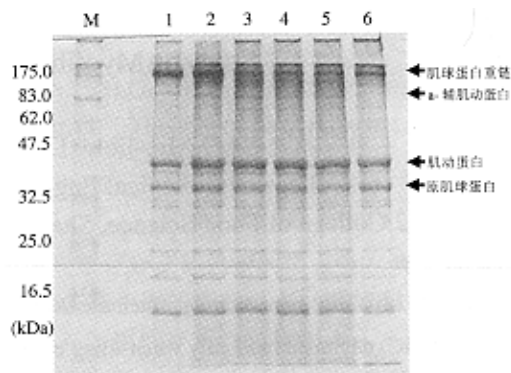
### 1.6 不同加热时间的分解实验

为了进一步分析结合型蛋白酶对肌球蛋白重链以外

的其它结构蛋白( $\alpha$ -辅肌动蛋白, 肌动蛋白和原肌球蛋白)的分解作用, 我们对肌原纤维在 $55^{\circ}\text{C}$ 下作了不同加热时间的实验。鲢鱼肌原纤维在 $55^{\circ}\text{C}$ 下分别加热0、1、2、4h, 经SDS处理后上样于12%的SDS-PAGE。电泳后, 蛋白质以电转移法<sup>[10]</sup>转移至硝酸纤维素膜上, 经抗原抗体反应后分析蛋白质的降解情况。

## 2 结果与讨论

鲢鱼肌肉在反复清洗去除可溶性蛋白以后, 仍然有对肌原纤维蛋白, 尤其是对肌球蛋白重链(MHC)起明显分解作用的现象, 表明鲢鱼肌原纤维中存在一种结合型的蛋白酶(图1)。而在较低温度( $40^{\circ}\text{C}$ )和较高温度( $70^{\circ}\text{C}$ )下, 此分解现象较不明显, 提示此酶的最适温度为 $55 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 。



M, 标准分子量; 1, 对照样(0h); 2,  $40^{\circ}\text{C}$ ; 3,  $50^{\circ}\text{C}$ ; 4,  $55^{\circ}\text{C}$ ; 5,  $60^{\circ}\text{C}$ ; 6,  $70^{\circ}\text{C}$ 。四种主要肌原纤维蛋白的位置以箭头标示。

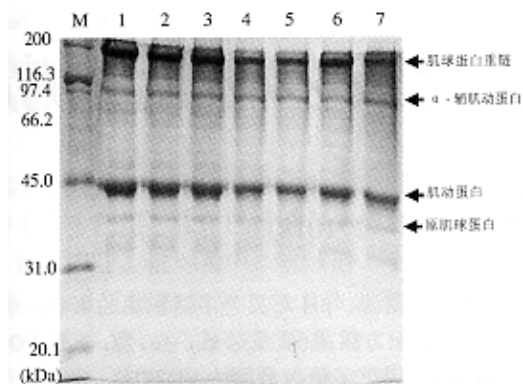
M, protein marker; 1, control (0h); 2,  $40^{\circ}\text{C}$ ; 3,  $50^{\circ}\text{C}$ ; 4,  $55^{\circ}\text{C}$ ; 5,  $60^{\circ}\text{C}$ ; 6,  $70^{\circ}\text{C}$ . Arrowheads indicate the positions of four major myofibrillar proteins.

图1 鲢鱼肌原纤维蛋白在不同温度下的自我分解(2h)

Fig.1 Degradation of silver carp myofibrillar proteins at different temperatures for 2h

为了进一步查明引起肌球蛋白重链分解的酶属何种性质的蛋白酶, 我们对在不同种类蛋白酶抑制剂存在下肌原纤维蛋白的分解也作了考察。如图2所示, 丝氨酸蛋白酶抑制剂Pefabloc SC, LBTI和金属蛋白酶抑制剂EDTA有效地抑制了MHC的分解, 而半胱氨酸蛋白酶抑制剂E-64和天冬氨酸蛋白酶抑制剂Pepstatin A则不产生任何抑制效果。由此得知引起鲢鱼肌原纤维蛋白分解的蛋白酶极可能与来自鲤鱼<sup>[7]</sup>及狗母鱼<sup>[8]</sup>的MBSP一样, 是一种丝氨酸蛋白酶。又由于该酶活性受EDTA的抑制, 因此, 推测金属离子对该酶的活性有相当重要的作用。

由MBSP引起的肌球蛋白重链的分解是时间依存的(图3)。 $55^{\circ}\text{C}$ 下4h的加热使MHC蛋白的80%以上发生降解。此结果也表明鲢鱼MBSP在 $55^{\circ}\text{C}$ 有较高的热稳定性。

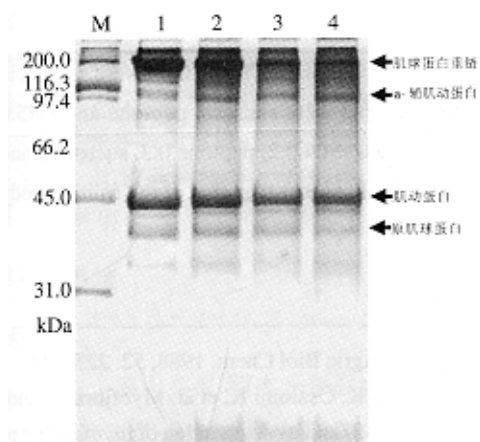


M, 标准分子量; 1, 对照 (0h); 2, Pefabloc SC; 3, LBTI; 4, E-64; 5, Pepstatin A; 6, EDTA; 7, 对照 (55°C, 2h)。

M, protein marker; 1, control (1h); 2, Pefabloc SC; 3, LBTI; 4, E-64; 5, Pepstatin A; 6, EDTA; 7, control (55°C, 2h).

图2 鲢鱼肌原纤维蛋白在不同抑制剂存在下的分解(2h)

Fig.2 Degradation of silver carp myofibrillar proteins in the presence of different inhibitors (2h)



M, 标准分子量; 1, 对照 (0h); 2, 1h; 3, 2h; 4, 4h。

M, protein marker; 1, control (0h); 2, 1h; 3, 2h; 4, 4h.

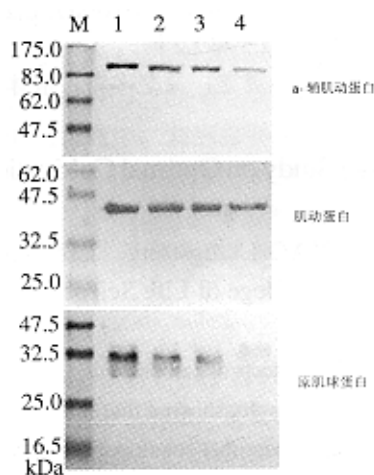
图3 鲢鱼肌原纤维蛋白在55°C不同加热时间下的分解

Fig.3 Time-course degradation of silver carp myofibrillar proteins at 55°C

肌球蛋白重链(MHC)是分子量为20万的大分子蛋白质,其分解情况可直接通过SDS-PAGE来判断。而对于分子量相对较小的其它结构蛋白如 $\alpha$ -辅肌动蛋白(分子量10万),肌动蛋白(分子量4.3万)和原肌球蛋白(分子量3.4万)的分解则由于MHC等大分子分解产物的影响难于通过SDS-PAGE作判断。为此,在本研究中我们利用了针对此三种蛋白的抗体来检测它们由内源性蛋白酶MBSP引起的分解。

$\alpha$ -辅肌动蛋白在肌原纤维中所占的比例很少,关于此蛋白的分解情况,迄今为止鲜有报道。本文利用免疫印迹法检测了其由于MBSP的作用而引起的分解。

如图4所示,长时间的加热(55°C, 4h)可引起 $\alpha$ -辅肌动蛋白的显著分解。一般认为,肌动蛋白对蛋白酶的作用有较强的抵抗性<sup>[1]</sup>,此推测在本文中也得到了证实。尽管肌动蛋白的蛋白带随加热时间的延长而逐渐减弱,与 $\alpha$ -辅肌动蛋白和原肌球蛋白相比,经MBSP作用后肌动蛋白的残留量仍为最高。免疫印迹的结果也显示MBSP对原肌球蛋白的分解作用,经55°C, 4h加热后,原肌球蛋白几乎被完全分解。以上结果与作者等<sup>[6]</sup>报道的来自鲤鱼的MBSP对肌原纤维蛋白的作用是相吻合的。



M, 标准分子量; 1, 对照 (0h); 2, 1h; 3, 2h; 4, 4h。

M, prestained protein marker; 1, control (0h); 2, 1h; 3, 2h; 4, 4h.

图4 免疫印迹法检测 $\alpha$ -辅肌动蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白的分解(55°C)

Fig.4 Western blot detection of the degradation of  $\alpha$ -actinin, actin and tropomyosin at 55°C

对于鱼类的MBSP的研究早在三十多年前由日本研究者开展,但由于MBSP与肌原纤维蛋白强烈结合和含量低等原因,很难用常规的方法将其从肌原纤维中分离出来。因此,分离纯化MBSP并研究其性质的工作很少有人进行。目前国际上只有从海水狗母鱼<sup>[8]</sup>和淡水鲤鱼<sup>[7]</sup>中得到了完全纯化的MBSP并对其性质做了比较全面的研究。用Boc-Phe-Ser-Arg-MCA作底物得狗母鱼和鲤鱼MBSP的最适温度均为55°C,最适pH值为8.0。而酶抑制剂实验表明,MBSP明显地受到丝氨酸蛋白酶抑制剂(Pefabloc.SC、STI、aprotinin, benzamidin和leupeptin)的抑制作用。同性质的酶最近在仓鼠<sup>[11]</sup>中也被发现。相信今后此类酶会在不同的动物体内被发现。

### 3 结论

由以上研究得知鲢鱼肌肉中存在肌原纤维结合型蛋白酶,其最适温度为55~60°C。该酶的活性受丝氨酸蛋白酶抑制剂及EDTA的抑制,推测其为一需金属离子

# 泰山赤灵芝液体培养条件优化及多糖含量测定

姚良同, 林榕珊, 李娟, 刘敏, 赵倩, 贾乐\*

(山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 本文探讨了泰山赤灵芝(*Ganoderma lucidum*)液体培养中碳源、氮源、pH对灵芝多糖积累的影响。结果表明, 培养基最适碳源、氮源、pH值分别为蔗糖、蛋白胨、5.0, 其配方组成(质量分数, %)为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, 蛋白胨 0.3, 蔗糖 5, pH 5.0, 灵芝多糖含量可达 11.77%, 分别是子实体和孢子粉的 2.5 和 2.2 倍。

**关键词:** 泰山赤灵芝; 灵芝多糖; 液体培养

## Assay Study on Optimal Cultivation Conditions to Accumulate the *Ganoderma* Polysaccharide

YAO Liang-tong, LIN Rong-shan, LI Juan, LIU Min, ZHAO Qian, JIA Le\*

(College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:** The effects of carbon source, nitrogen source and pH to accumulate the *Ganoderma* polysaccharide were studied in this paper. The results showed that the optimal carbon source, nitrogen source and pH were sucrose, peptone and pH 5.0 respectively. The optimal conditions were:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, peptone 0.3, sucrose 5 and pH 5.0. The concentration of *Ganoderma* polysaccharide in mycelia was 11.77%, 2.5 fold higher than that of the fruiting body.

收稿日期 2003-12-23

\*通讯作者

作者简介: 姚良同(1965-), 男, 实验师, 主要从事食药真菌多糖研究。

参与的肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(MBSP)。MBSP对肌原纤维蛋白, 尤其是肌球蛋白重链在 55℃, pH 8.0 条件下产生显著的分解作用, 提示该酶极可能是造成鱼糜制品凝胶劣化的主要原因。

### 参考文献:

- [1] An H, Weerasinghe V, Seymour T A, et al. Cathepsin degradation of pacific whiting surimi proteins[J]. *J Food Sci*, 1994, 59: 1013-1017.
- [2] Lee J J, Chen H C, Jiang S T. Purification and characterization of proteinase identified as cathepsin L and L-like proteinase from mackerel[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57: 1470-1476.
- [3] Shimizu Y A, Nishioka F. Modori (fish gel degradation at around 60℃) inducing property of croaker myosin preparation[J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1986, 52: 2027-2032.
- [4] Toyohara H, Sakata T, Yamashita K, et al. Degradation of oval-file fish meat gel caused by myofibrillar proteinase(s)[J]. *J Food Sci*, 1990, 52: 364-368.
- [5] Toyohara H, Shimizu Y. Relation between the modori phenomenon and myosin heavy chain breakdown in threadfin bream gel[J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 225-227.
- [6] Cao M J, Hara K, Osatomi K, et al. Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins[J]. *J Food Sci*, 1999, 64: 644-647.
- [7] Osatomi K, Sasai H, Cao M J, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp cyprinus carpio ordinary muscle[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 116B: 183-190.
- [8] Cao M J, Osatomi K, Hara K, et al. Identification of myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Sauridawania* which specifically cleaves the arginine site[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 125B: 255-264.
- [9] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [10] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350-4354.
- [11] Holt J C, Hatcher V B, Caulfield J B, et al. Cloning of the cDNA and nucleotide sequence of a skeletal muscle protease from myopathic hamsters[J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 181: 125-135.