

赖氨酸和精氨酸对三种离子强度下罗非鱼肌球蛋白溶解度及构象的影响

周春霞, 时娇娇, 付苇娅, 代振清, 郑惠娜, 洪鹏志

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 本研究以罗非鱼肉为原料, 提取肌球蛋白, 选取三种代表性的盐浓度, 分别采用 10 mmol/L 的赖氨酸 (*L*-lysine) 和精氨酸 (*L*-arginine) 溶液对其进行透析处理, 探讨氨基酸对低离子强度下肌球蛋白增溶行为的影响。结果显示: 在实验范围内, 肌球蛋白的溶解度随离子强度的增加而增大 ($p < 0.05$); 氨基酸对高离子强度 (600 mmol/L KCl) 条件下肌球蛋白的溶解度、浊度及二级结构的影响较小; 低离子强度 (1 mmol/L KCl) 条件下, 赖氨酸和精氨酸能抑制肌球蛋白纤丝形成, 降低体系的浊度, 增溶效果明显, 增溶后 α -螺旋含量增加 ($p < 0.05$); 生理离子强度 (150 mmol/L KCl) 条件下, 体系的浊度明显下降, 溶解度增加, 表面疏水性增大, α -螺旋含量下降 ($p < 0.05$), 丝状体完全解离, 体系更加分散; 初步分析赖氨酸和精氨酸诱导低离子强度下肌球蛋白增溶的原因可能与体系 pH 值的变化及对蛋白质分子间静电相互作用的影响有关。

关键词: 肌球蛋白; 离子强度; 组氨酸; 精氨酸; 溶解度

文章编号: 1673-9078(2016)12-99-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.016

Effect of *L*-lysine and *L*-arginine on Solubility and Conformation of Tilapia Myosin at Three Ionic Strengths

ZHOU Chun-xia, SHI Jiao-jiao, FU Wei-ya, DAI Zhen-qing, ZHENG Hui-na, HONG Peng-zhi

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Myosin was extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle, and 5.0 mg/mL myosin was dialyzed against three ionic strengths of a solution containing 10 mmol/L *L*-lysine and *L*-arginine. Effect of amino acid on solubilization of myosin was investigated at different ionic strengths. The solubility of myosin increased with increasing ionic strength ($p < 0.05$). In a high-ionic-strength (600 mmol/L KCl) solution, little effect of *L*-lysine and *L*-arginine was detected on solubility, turbidity, and secondary structure on tilapia myosin. In a low-ionic-strength (1 mmol/L KCl) solution, the presence of *L*-lysine and *L*-arginine inhibited formation of myosin filament, and caused a decrease in turbidity, significantly increased solubility, accompanied by a significant increase in α -helix content of solubilized myosin. Nevertheless, in a physiological-ionic-strength (0.15 mol/L KCl) solution, a decrease in turbidity and increase in solubility of tilapia myosin was detected, accompanied by a significant increase in surface hydrophobicity ($p < 0.05$) and loss of α -helix content. The myosin filament was completely depolymerized, and the protein system was more dispersed at physiological ionic strength with *L*-lysine and *L*-arginine. The results indicated that *L*-lysine and *L*-arginine changed the pH of myosin solution because of a specific role in disrupting electrostatic interactions, which resulted in the solubilization of myosin at low ionic strength.

Key words: myosin; ionic strength; *L*-lysine; *L*-arginine; solubility

肌球蛋白是鱼肌肉蛋白的主要成分, 约占鱼肌原

收稿日期: 2015-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201389); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划资助项目 (Yq2013090)

作者简介: 周春霞 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品深加工

通讯作者: 洪鹏志 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 水产品深加工

纤维蛋白的 55%~60%^[1]。肌球蛋白分子是长型不对称结构, 含有两个球状头部和一个棒状尾部, 在生理条件下, 分子尾部间通过静电相互作用形成不溶性的长丝^[2]。在体外高盐 (如 0.6 mol/L KCl) 溶液中, 分子间静电相互作用被破坏, 分子以单体或可溶性寡聚体形式存在, 溶解度较高, 而在体外低盐 (<0.2 mol/L

KCl) 溶液中, 肌球蛋白分子聚集成纤丝, 呈不溶状态^[2,3], 由此限制了肌肉蛋白的加工特性。研究表明, 在 pH 6.5~8.5 范围内, 含 5 mmol/L 组氨酸的溶液透析处理可以使低离子 (1 mmol/L KCl) 强度条件下鸡胸肉肌球蛋白的溶解度高于 80%, 且随 pH 值的上升溶解度增大, 而相同条件下精氨酸和甘氨酸对增溶效果不明显^[4], 增溶前后可溶和不溶组分的多肽组成与高离子强度条件下肌球蛋白的电泳图谱没有差异, 透射电镜 (TEM) 分析显示, 其机理可能是肌球蛋白棒状尾部的拉长改变了分子间的静电相互作用, 抑制纤丝的形成, 由此起到增溶效果^[4,5]; 与高离子 (0.6 mol/L KCl) 强度条件下形成的不透明凝胶相比, 在 40 °C 或 50 °C 热处理 10 min, 含 5 mmol/L 组氨酸和 1 mmol/L KCl 的鸡胸肉肌球蛋白 (5 mg/mL) 体系能形成透明的热诱导凝胶^[6]; 与此类似, 5 mmol/L 组氨酸可以显著增强兔肉肌球蛋白的溶解性和热凝胶性能^[7]; 而同样添加量的组氨酸不能抑制生理离子 (0.15 mol/L KCl) 强度条件下鸡胸肉肌球蛋白^[6]和兔肉肌球蛋白^[7]分子聚集成纤丝, 机理还有待进一步研究; 对猪肌球蛋白而言, 在低离子强度、生理离子强度和高离子强度条件下, 5 mmol/L 组氨酸和 (或) 赖氨酸均能诱导肌球蛋白分子结构展开, 表面疏水性和活性巯基含量增加, α -螺旋含量损失, 由此达到明显的增溶效果^[8]; 但在生理离子强度条件下, 50 mmol/L 的精氨酸对猪肌球蛋白有增溶作用且对分子的二级结构没有影响, 其增溶效果可能与精氨酸阳离子破坏肌球蛋白分子的静电相互作用有关^[9]。由此表明, 氨基酸增溶效果与肌球蛋白的来源、体外离子强度和氨基酸的种类等有关, 不同条件下的增溶机理也可能不完全相同。为此, 本研究以大宗养殖罗非鱼为原料, 提取肌球蛋白, 研究精氨酸和赖氨酸处理对三种离子强度下肌球蛋白溶解性、浊度及结构特征的影响, 探讨氨基酸诱导肌球蛋白增溶行为及机理, 为低盐水产蛋白产品的研发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活罗非鱼: 2015 年 6 月~8 月分三次购自湛江当地市场, 迅速带回实验室, 取其背部白肉、分装及 -75 °C 储存备用。

十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、甲醇、冰乙酸、脲和十二烷基硫酸钠等, 购于广东光华科技股份有限公司; 氯化钾、六水合氯化镁、硫酸铵和乙二胺四乙酸二钠, 购于广州化学试剂厂; 5-腺

昔三磷酸二钠盐 (ATP) 和二巯苏糖醇 (DTT), 购于广州齐云生物科技有限公司; 乙二醇-双-(2-氨基乙醚) 四乙酸 (EGTA), 购于上海源叶生物科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷, 购于国药集团化学试剂有限公司; 快速 Lowry 法蛋白含量测定试剂盒 (2000T), 购于上海荔达生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X) 和考马斯亮蓝染色液, 购于碧云天生物技术研究所; 蛋白质分子量标准 (宽), 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 赖氨酸 (*L*-(+)-lysine) 和精氨酸 (*L*-(+)-arginine), 购于东京化成工业株式会社; 8-苯胺基-1-萘磺酸 (ANS), 购于美国 SIGMA 公司; 醋酸铀染料, 购于美国 SPI-CHEM 公司; 以上试剂均为分析纯; 马来酸, 购于美国 MP 公司, 为优级纯试剂。

1.2 仪器与设备

RO-50I 超纯水机, 重庆利迪实验仪器设备有限公司; FM-100 雪花制冰机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TJ12-A 绞肉机, 广东番禺恒联食品机械厂; JYL-C012 九阳料理机, 九阳股份有限公司; PHS-3C 数显 pH 计, 上海雷磁仪器厂; BSA124S-CW 电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; Avanti J-26sxp 高效离心机, 美国 Beckman 公司; UV-2550 型紫外分光光度计, RF-5301P 荧光分光光度计, 日本岛津公司; ECP3000 电泳仪, DYCZ-24DN 双垂直电泳槽, 北京六一仪器厂; UVP 凝胶成像系统, 美国 UVP 公司; Chirascan 圆二色谱仪, 英国应用光物理公司; JEM-1400 型透射电子显微镜, 日本电子公司。

1.3 试验方法

1.3.1 肌球蛋白的提取

参照 Hwang 等^[10]的方法, 所有操作均在 4 °C 条件下进行, 所用溶液均预先冷却到 4 °C。取新鲜搅碎鱼肉 200 g, 加 5 倍 (g/mL, *m/V*) 缓冲液 A (20 mmol/L PBS、pH 7.0、0.02% NaN₃), 高速匀浆 (20000 r/min, 30 s), 浸提 15 min 后离心 (5500 r/min, 10 min), 取沉淀重复上述过程 2 次。向所得沉淀中加入 3 倍 (g/mL, *m/V*) 提取液 B (0.45 mol/L KCl, 5 mmol/L ATP, 7.5 mmol/L MgCl₂, 0.15 mmol/L DTT, pH 6.4), 搅拌 15 min 后离心 (10000 r/min, 10 min)。四层纱布过滤, 取滤液用 9 倍 (mL/mL, *V/V*) 蒸馏水稀释, 静置 10 min 后离心 (6000 r/min, 10 min) 得沉淀。向沉淀中加入 1/5 倍 (g/mL, *m/V*) 缓冲液 C (0.12 mol/L Tris-maleic acid, 3 mol/L KCl, 0.6 mmol/L DTT, pH 7.5), 混匀后放置 2 h, 混合体系中添加 1/10 倍 (g/mL,

m/V) ATP 溶液 D (0.11 mol/L ATP、55 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L EGTA, pH 7.5) 溶液后, 搅拌 1 h。加入硫酸铵至饱和度 40% 时离心 (10000 r/min, 15 min) 取上清液, 继续加硫酸铵至饱和度 45% 时离心 (10000 r/min, 15 min) 取沉淀。沉淀于透析液 E (20 mmol/L PBS、0.6 mol/L KCl、0.1 mmol/L DTT、pH 7.0) 中透析至无 SO₄²⁻ 检出, 然后离心 (50000 r/min, 60 min), 所得上清液即为肌球蛋白溶液。

采用 Lowry 法^[11] 检测上清液蛋白含量, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准物, 测量波长为 750 nm, 并进行 SDS-PAGE 电泳 (5% 分离胶, 12% 浓缩胶), 经凝胶成像系统计算蛋白质纯度高于 94%。

1.3.2 三种离子强度下氨基酸透析处理肌球蛋白样液的制备

将肌球蛋白溶液分成三组, 分别用低离子强度透析液 (20 mmol/L PBS、1 mmol/L KCl、0.1 mmol/L DTT、pH 7.0)、生理离子强度透析液 (20 mmol/L PBS、150 mmol/L KCl、0.1 mmol/L DTT、pH 7.0) 和高离子强度透析液 (20 mmol/L PBS、600 mmol/L KCl、0.1 mmol/L DTT、pH 7.0) 调节肌球蛋白浓度至 5.0 mg/mL, 取 25 mL 溶液用对应离子强度的透析液 (含 10 mmol/L L-lysine 或 L-arginine) 透析 24 h。以不含氨基酸的透析液直接透析作为对照。每个样品重复一次, 上述操作均在 4 °C 条件下进行。

1.3.3 浊度的测定

透析后的样品溶液在室温下放置 30 min 后, 使用紫外分光光度计, 在 370 nm 的波长下, 测定蛋白样品的吸光值即为蛋白样品的浊度, 用 A₃₇₀ 标示。

1.3.4 溶解度的测定

透析后的蛋白溶液经高速离心 (50000 r/min, 15 min, 4 °C) 后, 采用 lowry 法^[12] 检测其上清液蛋白含量。肌球蛋白的溶解度按离心所得上清液蛋白含量占离心前溶液中总蛋白含量的百分比计算。每个样品测定三次以上。

1.3.5 表面疏水性的测定

采用 ANS 荧光探针法检测可溶性蛋白的表面疏水性。离心后的肌球蛋白上清液逐步稀释 (0.0625、0.125、0.25 和 0.5 mg/mL), 取不同浓度的溶液各 4 mL, 加入 20 μL 的 ANS 溶液 (8.0 mmol/L ANS、0.01 mol/L PBS、pH 7.0) 振荡, 静置 10 min (避光), 测定样品的荧光强度 (FI)。本实验中, 激发波长和发射波长分别为 374 nm 和 485 nm, 狭缝宽均为 5 nm。减去各样品溶液未加探针时的荧光强度即为每种蛋白的相对荧光强度值 (RFI)。以 RFI 对蛋白质浓度作图, 其初始段的斜率作为蛋白质的表面疏水性指标 (ANS-S₀)。

每个样品测定三次以上。

1.3.6 二级结构含量分析

不同条件下透析处理的肌球蛋白上清液稀释至 0.1 mg/mL, 进行圆二色谱测定。波长扫描范围为 190~260 nm, 样品池光径为 1 mm, 上样量 0.3 mL, 测量温度为 5 °C, 测定分辨率为 0.5 nm, 扫描速度为 100 nm/min, 灵敏度为 20 mdeg, 响应时间为 0.25 s, 以未添加肌球蛋白的缓冲液做空白, 实验结果取三次扫描的平均值。 α -螺旋含量的计算公式如下^[12]:

$$[\theta]_{222} = \frac{[\theta]_{\text{obs}} \times M_w}{10000 \times C \times L}$$

$$\alpha\text{-helix content (\%)} = \frac{[\theta]_{222}}{-40000} \times 100$$

其中, $[\theta]_{\text{obs}}$ 为蛋白质溶液在 222 nm 处测得的椭圆率, mdeg; M_w 为肌球蛋白分子的平均氨基酸残基分子质量, 取 115 g/mol; C 为测量的肌球蛋白溶液的浓度, 0.1 mg/mL; L 为样品测量时的比色皿光程长度, cm; $[\theta]_{222}$ 为 222 nm 处的摩尔椭圆率, deg·cm²/dmol。每个样品测定二次取平均值。

1.3.7 TEM 检测

将透析处理的肌球蛋白溶液用对应的透析液稀释至 0.25 mg/mL, 滴一滴肌球蛋白样液于蜡板上, 立即覆盖铜网 (已镀碳膜) 于液滴上, 具膜的一面接触液滴, 吸附 3~5 min 后用滤纸吸去多余的液体; 同法置于醋酸铀液滴上负染 3~5 min, 滤纸吸干多余的负染液; 同法多次置于水滴上负染 3~5 min, 滤纸吸干多余水后, 于恒温箱中自然干透后即可电镜观察 (加速电压: 80 kV)。

1.4 数据处理

数据均用 Origin 7.5 处理, 采用 JMP 7.0 分析方差, 并用 t -检验进行差异显著性分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 赖氨酸和精氨酸对肌球蛋白溶液浊度的影响

固定肌球蛋白浓度 5.0 mg/mL, 选取 1 mmol/L、150 mmol/L 和 600 mmol/L KCl 三种代表性的盐浓度, 分别试验 10 mmol/L 的赖氨酸 (L-lysine) 和精氨酸 (L-arginine) 溶液透析处理对肌球蛋白体系浊度的影响, 结果如图 1。结果表明, 在高离子 (600 mmol/L KCl) 强度条件下, 添加赖氨酸或精氨酸透析前后肌球蛋白体系均是澄清状态, 370 nm 比色测定的浊度值均低于 0.1, 表明在体外高离子强度条件下, 肌球蛋白溶液

澄清, 分子以单体或寡聚物形式存在; 而在生理离子 (150 mmol/L KCl) 强度和低离子 (1 mmol/L KCl) 强度条件下, 肌球蛋白组装成纤丝, 呈不溶状态^[3,7], 未经氨基酸透析处理的蛋白体系呈浑浊状态, 且低离子强度下更为明显, 可检测的浊度值随离子强度的增大而减小 ($p<0.05$); 经过 10 mmol/L 赖氨酸或精氨酸透析处理后肌球蛋白体系明显澄清, 浊度值下降 ($p<0.05$), 且生理离子强度条件下澄清效果更明显, 分析原因可能与氨基酸的添加使肌球蛋白纤丝聚集作用减弱, 浊度下降^[4,8]。另外, 在实验范围内, 两种氨基酸透析处理的体系浊度没有明显差异, 分析两种氨基酸的增溶作用方式可能类似。

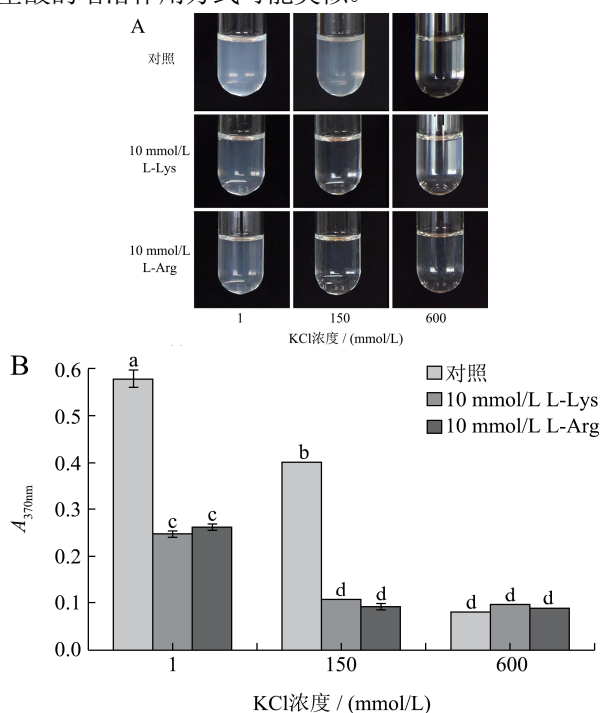


图1 三种离子强度下赖氨酸和精氨酸对罗非鱼肌球蛋白体系浊度的影响

Fig.1 Effect of L-lysine and L-arginine on turbidity of tilapia myosin at three ionic strengths

注: 图中数据相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.2 赖氨酸和精氨酸对肌球蛋白溶解性的影响

对上述透析处理后的各肌球蛋白体系进行高速离心, 检测离心前后可溶性蛋白的含量, 由此计算溶解度的变化, 结果如表 1。未经处理的肌球蛋白溶解度随离子强度的增大而增大 ($p<0.05$), 与体系浊度的检测结果一致, 即高浓度的盐离子破坏分子间的静电相互作用, 抑制丝状体形成, 体系的溶解度高^[3], 且经

赖氨酸及精氨酸处理后溶解度变化不明显; 在低离子强度溶液中, 肌球蛋白的溶解度较低 (~30%), 经赖氨酸或精氨酸透析后溶解度增加到近 80%, 研究结果与赖氨酸和组氨酸对猪肌球蛋白^[8]的增溶效果类似, 但增溶前后肌球蛋白的溶解度有一定差异, 原因可能与蛋白来源及氨基酸种类有关, 也与溶解度检测过程中体系的蛋白浓度和离心力等有关; 在实验条件下, 生理离子强度的肌球蛋白溶液浊度仍然较高, 但离心后沉淀极少, 因而检测到的蛋白质溶解度 (62.20%) 较高, 且经氨基酸处理后增溶效果明显 ($p<0.05$); 另外, 赖氨酸和精氨酸都是碱性氨基酸, 其添加会导致肌球蛋白溶液的 pH 值改变, 低离子强度下 10 mmol/L 的赖氨酸和精氨酸透析前后体系的 pH 值从 7.00 增加到 8.24 和 8.30, 生理离子强度下 pH 值增加到 9.17 和 9.20, 在碱性条件下, 蛋白分子带上了净负电荷, 溶解度增加, 由此分析 pH 值的改变可能是引起增溶的原因之一, 但在同样的碱性 pH 值和离子强度条件下, 肌球蛋白的溶解度低于添加氨基酸后的溶解度 (如低离子强度条件下, 直接调节肌球蛋白体系的 pH 值为 8.24, 检测到的溶解度为 32.69±0.27%), 其作用机理有待进一步研究。

表 1 三种离子强度下精氨酸和赖氨酸对罗非鱼肌球蛋白溶解度的影响 (%)

Table 1 Effect of L-lysine and L-arginine on solubility of tilapia myosin at three ionic strengths (%)

KCl 浓度 / (mmol/L)	myosin at three ionic strengths (%)		
	对照	10 mmol/L L-Lys	10 mmol/L L-Arg
1	29.03±0.56 ^c	78.83±4.35 ^c	79.05±3.34 ^c
150	62.20±2.98 ^d	94.55±1.44 ^a	86.96±5.70 ^b
600	97.67±0.35 ^a	98.99±2.30 ^a	99.70±2.18 ^a

注: 表中数据相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 赖氨酸和精氨酸对肌球蛋白表面疏水性的影响

蛋白质的三级结构主要靠疏水相互作用来维持。8-苯胺基萘-1-磺酸 (ANS) 是一种带负电荷的疏水性染料, 可以通过疏水相互作用和静电作用与蛋白质表面疏水基团结合。如图 2 所示, 在实验范围内, 各实验组的可溶性肌球蛋白表面疏水性均随离子强度的增大而增大 ($p<0.05$), 且经赖氨酸或精氨酸透析后可溶性蛋白的疏水性均增大, 由此表明赖氨酸及精氨酸可能破坏了肌球蛋白分子的三级结构, 使包埋于肌球蛋白内部的芳香族疏水性基团暴露, 分子的表面疏

水性增加, 研究结果与组氨酸和(或)赖氨酸诱导猪肌球蛋白增溶和分子三级结构的变化结果类似^[8]; 已有的报道显示, 低离子强度条件下, 肌球蛋白分子处于聚集状态, 表面疏水性较低, 而体外高离子强度条件下蛋白质分子间静电相互作用被破坏, 分子解离成单体, 尾部的疏水基团充分暴露, 结合更多的探针指示物, 因此在 0.6 mol/L KCl 溶液中, 肌球蛋白分子的溶解性和表面疏水性增加明显^[13]; 另外, 在实验条件下, 赖氨酸和精氨酸分子均带正电荷, 可能与带负电的 ANS 探针通过静电相互作用结合, 使可检测的 ANS-S₀ 值增大, 因此赖氨酸和精氨酸透析处理后体系的表面疏水性均增加; 比较而言, 低离子强度条件下氨基酸透析处理使表面疏水性的增加不明显 ($p>0.05$), 而生理离子强度和高离子强度条件下透析处理使表面疏水性的增加显著 ($p>0.05$), 分析原因很可能仍与不同离子强度下分子聚集和解离状态有关^[13]。

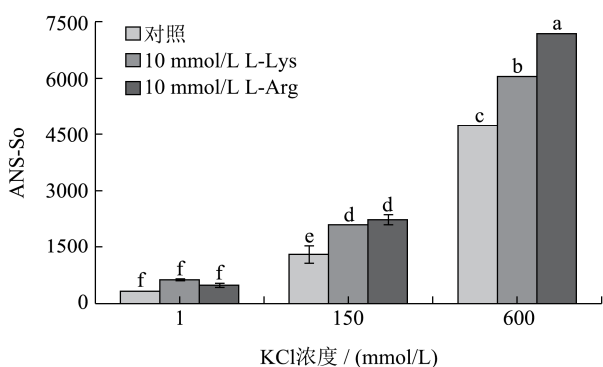


图2 三种离子强度下赖氨酸和精氨酸对罗非鱼肌球蛋白表面疏水性的影响

Fig.2 Effect of L-lysine and L-arginine on surface hydrophobicity of tilapia myosin at three ionic strengths

注: 图中数据相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.4 赖氨酸和精氨酸对肌球蛋白二级结构含量的影响

不同离子强度下赖氨酸和精氨酸溶液透析处理对肌球蛋白二级结构的影响用圆二色谱进行表征。在实验条件下, 所检测的肌球蛋白圆二色谱图在 208 nm 和 222 nm 处均出现两个负的特征肩峰谱带 (结果未列出), 这是典型的 α -螺旋特征峰, 由此计算 α -螺旋含量, 结果如图 3。肌球蛋白两条重链以左手 α -螺旋方式相互缠绕形成 α -双螺旋杆状尾部和两个球状头部^[2], α -螺旋主要靠多肽链上羧基 (-CO) 和氨基 (-NH) 之间的氢键维持, 此外静电相互作用也有影响。由图 3 可知, 随着盐浓度的增大, 可溶性肌球蛋白分子中 α -

螺旋含量增加, 可能与高盐离子破坏蛋白质分子间静电相互作用, 减弱了电荷对氢键的影响有关^[14], 且高离子强度条件下, 氨基酸添加也会导致 α -螺旋含量下降; 低离子强度条件下, 赖氨酸和精氨酸透析处理使分子表面电荷增加, 肌球蛋白分子恢复单体状态, α -螺旋含量升高; 生理离子强度下, 经赖氨酸和精氨酸透析后的肌球蛋白分子 α -螺旋含量下降, 且赖氨酸的影响更为明显。以上研究结果与氨基酸对猪肌球蛋白结构的影响不完全相同, 在低离子强度、生理离子强度和高离子强度条件下, 5 mmol/L 组氨酸和(或)赖氨酸均能诱导肌球蛋白分子结构展开, α -螺旋含量损失^[8], 但生理离子强度条件下, 50 mmol/L 的精氨酸和赖氨酸对肌球蛋白有增溶作用且对其分子的二级结构没有影响^[9]; 另外, 5 mmol/L 组氨酸改变鸡胸肉肌球蛋白分子的构象, 分子间静电相互作用减弱抑制纤维形成, 由此产生增溶作用^[4]。由此进一步表明, 氨基酸增溶效果与肌蛋白的来源、体外离子强度和氨基酸的种类及添加量等有关, 不同条件下对蛋白质分子结构的影响及增溶机理可能不完全相同, 相关作用机制还有待进一步研究。

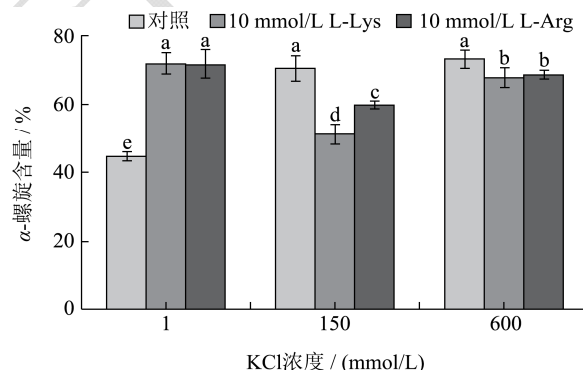


图3 三种离子强度下赖氨酸和精氨酸对罗非鱼肌球蛋白 α -螺旋含量的影响

Fig.3 Effect of L-lysine and L-arginine on α -helix content of tilapia myosin at three ionic strengths

注: 图中数据相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.5 赖氨酸和精氨酸对肌球蛋白分子形态的影响

经透射电子显微镜 (TEM) 分析三种离子强度条件下赖氨酸和精氨酸对肌球蛋白体系分散状态及分子形态的影响, 结果如图 4。在 1 mmol/L KCl 溶液中, 未添加氨基酸的肌球蛋白体系呈明显的长丝状 ($\times 30000$, 1 μm), 分子间相互交错缠绕 ($\times 120000$, 200 nm), 添加赖氨酸和精氨酸后纤维图像已不明显,

继续放大可以观察到纤丝聚集体的部分解离,体系分散均匀,结合增溶效果及肌球蛋白分子二级和三级结构的变化分析,赖氨酸和精氨酸的增溶机理很可能与干扰肌球蛋白分子间的静电相互作用而导致纤丝解离有关,此结果与低离子强度(1~50 mmol/L KCl)条件下组氨酸对鸡胸肉肌球蛋白影响的图像分析结果类似^[5];在150 mmol/L KCl溶液中,肌球蛋白体系已逐渐分散,分子间部分缠绕,添加氨基酸后蛋白体系更为均匀,TEM图中完全没有丝状体聚合物存在,由此表明赖氨酸或精氨酸可能参与了肌球蛋白丝状体的解离,结合其对蛋白质分子二级和三级结构的破坏,与高离子强度条件下的TEM图像比较分析,氨基酸阳离子对肌球蛋白分子间静电相互的影响可能比中性盐更有效,且氨基酸与盐的作用也不完全相同,此研究结果与生理离子强度条件下组氨酸对鸡胸肉蛋白的影响结果不同^[5],其差异可能源于蛋白来源及氨基酸种类;而高离子强度条件下,肌球蛋白体系完全分散,肌球蛋白分子以单体或可溶性寡聚物存在^[3],且实验条件下,赖氨酸和精氨酸的添加对体系分散程度的影响不明显,进一步表明高盐离子对蛋白质分子结构具有保护作用。

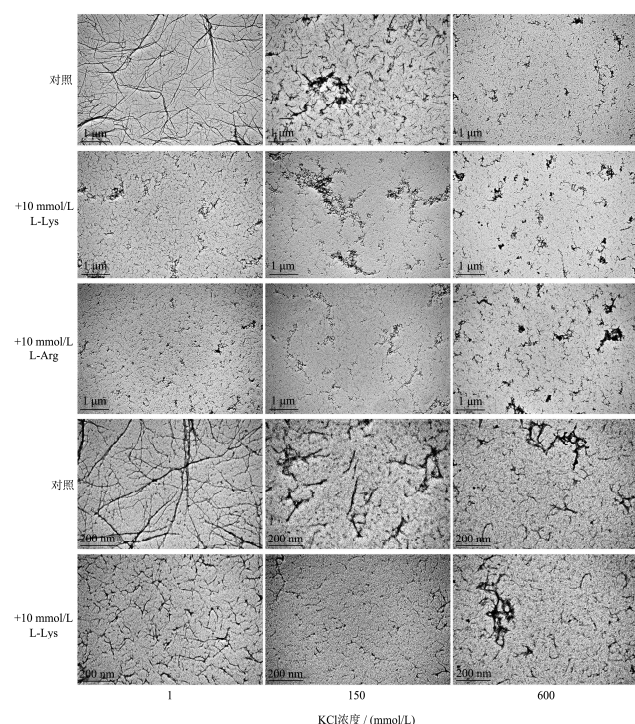


图4 三种离子强度下赖氨酸和精氨酸对罗非鱼肌球蛋白透射电镜图的影响

Fig.4 Effect of *L*-lysine and *L*-arginine on transmission electron micrograph morphology of tilapia myosin at three ionic strengths

3 结论

在1 mmol/L、150 mmol/L和600 mmol/L KCl三种代表性的盐浓度条件下,肌球蛋白的溶解度随离子强度的增大而增大;精氨酸和赖氨酸透析处理可以降低低离子强度和生理离子强度条件下肌球蛋白体系的浊度,具有明显的增溶效果;精氨酸和赖氨酸均带正电荷,体系pH值增加,溶解度增大,但与同样pH值和离子强度条件下肌球蛋白的溶解度不同;低离子强度条件下,增溶后体系的表面疏水性变化不明显,二级结构含量增加,原有纤丝部分解离,体系分散均匀,因此,此条件下赖氨酸和精氨酸的增溶机理很可能与干扰肌球蛋白分子间的静电相互作用而抑制纤丝形成有关;而生理离子强度条件下,精氨酸及赖氨酸处理后肌球蛋白的三级和二级结构明显破坏,纤丝完全解离,体系更为分散,相关作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Lanier T C, Yongsawatdigul J, Carvajal-Rondanelli P. Surimi gelation chemistry. In: Park J W (Eds). Surimi and surimi seafood, third edition [M]. Boca Raton: CRC Press, 2013
- [2] Harrington W F, Rodgers M E. Myosin [J]. Annual Review of Biochemistry, 1984, 53: 35-73
- [3] Tsunashima Y, Akutagawa T. Structure transition in myosin association with the change of concentration: solubility equilibrium under specified KCl and pH condition [J]. Biopolymers, 2004, 75(3): 264-277
- [4] Hayakawa T, Ito T, Wakamatsu J, et al. Myosin is solubilized in a neutral and low ionic strength solution containing L-histidine [J]. Meat Science, 2009, 82(2): 151-154
- [5] Hayakawa T, Ito T, Wakamatsu J, et al. Myosin filament depolymerizes in a low ionic strength solution containing L-histidine [J]. Meat Science, 2010, 84(4): 742-746
- [6] Hayakawa T, Yoshida Y, Yasui M, et al. Heat-induced gelation of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine [J]. Meat Science, 2012, 90(1): 77-80
- [7] 赵晓阳,李可,邹玉峰,等.组氨酸与氯化钾混合液对兔肉肌球蛋白特性的影响[J].食品科学,2014,35(9):6-10
ZHAO Xiao-yang, LI Ke, ZOU Yu-feng, et al. Effect of mixed solutions of *L*-histidine and KCl on heat-induced gel properties of rabbit skeletal myosin [J]. Food Science, 2014, 35(9): 6-10
- [8] Guo X Y, Peng Z Q, Zhang Y W, et al. The solubility and conformational characteristics of porcine myosin as affected by the presence of *L*-lysine and *L*-histidine [J]. Food

- Chemistry, 2015, 170(1): 212-217
- [9] Takai E, Yoshizawa S, Ejima D, et al. Synergistic solubilization of porcine myosin in physiological salt solution by arginine [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62(11): 647-651
- [10] Hwang G, Watabe S, Hashimoto K. Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1990, 160(3): 233-239
- [11] Lowery O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J. Boil. Chem.*, 1951, 193(1): 265-275
- [12] Ogawa M, Kanamaru J, Miyashita H, et al. Alpha-helical structure of fish actomyosin: changes during setting [J]. *Journal of Food Science*, 1995, 60(2): 297-299
- [13] Thawornchinsombut S, Park J W. Role of ionic strength in biochemical properties of soluble fish proteins isolated from cryoprotected Pacific whiting mince [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2005, 29(2): 132-151
- [14] Goto Y, Takahashi N, Fink A L. Mechanism of acid-induced folding of proteins [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(14): 3480-3488