

# 重金属离子对鲫蛋白 ATPase活性和SH基总量的影响

董绪燕, 孙智达<sup>\*</sup>, 谢笔钧

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 研究了体外添加  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  等不同浓度的重金属离子对肌动球蛋白和肌球蛋白 ATPase活性和 SH基总量的影响。随  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  浓度的升高, 肌动球蛋白的 ATPase活性和 SH基总量先升高, 后下降, 肌球蛋白的 ATPase活性逐渐降低, SH基量先略有升高, 后下降。  $Cu^{2+}$  浓度的升高引起蛋白中 ATPase活性和 SH基含量明显下降, 显示了较强的毒性。

**关键词:** 重金属离子, 肌动球蛋白, 肌球蛋白, ATPase, SH

**Abstract** The effect of  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  with different concentration on ATPase activity and total sulphydryl content of actomyosin and myosin was studied. The result showed that with the increasing of concentration of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ , ATPase activity and total sulphydryl content of actomyosin raised slightly and then decreased obviously. ATPase activity of myosin reduced, and total sulphydryl content was similar to one of actomyosin. But the accession of concentration of  $Cu^{2+}$  reduced ATPase activity and total sulphydryl content evidently, which displayed terrible toxicity.

**Keywords** heavy metals, actomyosin, myosin, ATPase, SH

中图分类号: TS254.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)10-0060-03

随着鱼糜制品的迅速发展, 鱼浆加工已从传统的手工形式进入到大规模工业化生产, 制品也从简单的鱼丸、鱼糕到工业化程度很高的仿蟹肉、鱼肉香肠、鱼肉火腿, 这些制品的品质很大程度上依赖于原料的品质。原料鱼浆的功能性质直接支配着加工品

收稿日期: 2007-03-05 \* 通讯联系人

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270938)。

的粘弹性、质地和口感, 客观评价鱼浆的功能性质对于提高产品品质具有重要意义。评定鱼浆功能性质经常采用间接的测定方法, 包括 ATPase活性法、盐溶性蛋白分离法、粘度法、超离心沉淀图法等, 其中 ATPase活性法常作为研究判断鱼肉品质的最佳指标之一<sup>[1]</sup>。鱼肌肉蛋白质的生化特性是影响鱼食用质量和保鲜加工特性的极为重要的因素。研究发现, 蛋白质的结构稳定性、易变性以及酶的催化作用等大都是由于巯基 (SH基) 和二硫键所引起的结果<sup>[2]</sup>。本文主要探讨添加外源重金属离子  $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  对鲫肌动球蛋白和肌球蛋白 ATPase活性和 SH基总量的影响, 对于研究鱼肉蛋白质性状, 判断蛋白质变性程度及鉴定肌肉蛋白质的纯度都有重要的意义, 以期得到鲫鱼鱼浆加工的良好品质, 进一步促进其它淡水鱼制品的开发和研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

鲫 华中农业大学市场售, 个体重  $500 \pm 50g$   
ATP二钠盐和牛血清白蛋白 为 Sigma公司产品;  
DTNB 生化试剂, 上海源聚生物科技有限公司; 其余试剂 均为分析纯。

冷冻离心机 日本日立; 紫外分光光度计 Shimadzu pH计 美国 Orien 260。

### 1.2 肌动球蛋白和肌球蛋白的制备<sup>[2]</sup>

1.2.1 肌动球蛋白的制备 鲫背肉 (约 10g) 用去离子水漂洗三次 (肉:水 = 1:5)  $\rightarrow$  4倍的磷酸缓冲液 ( $I=0.05$ , pH 7.5) 清洗 (3000r/min, 10min) 三次  $\rightarrow$  3倍的  $0.45mol/L$  KCl-磷酸缓冲液 ( $I=0.5$ , pH 7.5) 进行抽提  $\rightarrow$  离心取上清液  $\rightarrow$  稀释沉淀  $\rightarrow$  离心取沉淀 ( $4000r/min$ )  $\rightarrow$  溶于  $0.6mol/L$  KCl溶液中, 放在  $5^{\circ}C$  下保存备用。

1.2.2 肌球蛋白的制备 取上述经 4倍的磷酸缓冲液

[16] Henry W E, Katz H, Pilgrim F J. Texture of semi-solid food- sensory and physical correlates [J]. J Food Sci 1978, 36: 155-168.

[17] Lee C, Imoto E M, Rha C. Evaluation of cheese texture [J]. J Food Sci 1978, 43: 1600-1605.

( $I = 0.05$ ,  $pH 7.5$ )清洗 (3000r/min, 10min) 三次后的样品  $\rightarrow$  3倍的 ATP-MgCl<sub>2</sub>-0.45mol/L-磷酸缓冲液 ( $pH 6.4$ ) 提取 7min  $\rightarrow$  离心取上清液  $\rightarrow$  稀释沉淀  $\rightarrow$  离心取沉淀 (4000r/min)  $\rightarrow$  溶于 0.6mol/L KCl 溶液中, 放在 5°C 下保存备用。

### 1.3 ATPase活性测定<sup>[2]</sup>

测定 ATP 酶活性时的反应液组成如下: 0.5mol/L  $pH 7.0$  Tris-马来酸缓冲液 0.5mL; 0.1mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液 0.5mL; 2.0mmol/L KCl 溶液 2.2mL; 肌动球蛋白和肌球蛋白均制成 0.6mol/L 氯化钾-20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-马来酸溶液 ( $pH 7.0$ ), 调节蛋白浓度为 3.0mg/mL, 加入重金属离子溶液, 使 Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 的浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5mmol/L, 1mL; 去离子水 5.3mL; 20mmol/L ATP 溶液,  $pH 7.0$  0.5mL。测定时, 先将前五项混合, 25°C 恒温后加 ATP 溶液, 计时 10min 后取反应混合液 2mL, 加 1mL TCA 溶液 (15%) 作为反应终止剂, 反应液用滤纸过滤。再取上述反应混合液 2mL, 不与其反应, 直接与 1mL TCA 溶液 (15%) 混合后比色, 做空白对照。

上述实验中无机磷按文献 [3] 测定。吸样液 2mL 于 50mL 容量瓶中, 加 20mL 水, 2.0mL 钼酸铵溶液, 0.25mL SnCl<sub>4</sub> 甘油溶液, 并加水至刻度, 20min 内用分光光度计在 690nm 处测光密度。酶活 (U/g) 以每分钟每克蛋白生成 1 $\mu$ mol 磷含量为一个酶单位。

### 1.4 SH基含量测定<sup>[2]</sup>

蛋白溶液浓度和重金属离子浓度同 1.3, 在 3.0mL 蛋白样品中加入 2.0mL 磷酸缓冲液 ( $pH 8.0$   $I = 0.1$ ), 并加水稀释至 10.0mL, 充分混合。各取 3.0mL 上述混合液于 2 个比色皿 I、II 中, 以比色皿 I 液为对照, 在 412nm 处调节光度计使比色皿 II 液的吸收为零。在比色皿 II 液中加入 0.02mL DTNB 溶液, 混匀后在 412nm 处测定其吸收 (A)。空白实验, 加入 0.02mL 磷酸缓冲液 ( $pH 7.0$   $I = 0.1$ )。根据下式关系, 可求得 SH 基的含量。

$$C_0 = A / \epsilon \times D$$

式中  $C_0$ —SH 基的摩尔浓度;  $A$ —412nm 处的吸光度;  $D$ —稀释倍数;  $\epsilon$ —分子吸光系数 13600 (mol/L\*cm)。

### 1.5 蛋白含量测定

采用 Folin-phenol 中的 Lowry 法测定<sup>[4]</sup>。

### 1.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 软件进行数据处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重金属离子对 ATPase 活性的影响

为讨论和了解重金属离子污染对鱼体生化指标的影响, 采用外源添加不同浓度的 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 重金属离子, 然后研究它们对鱼体肌动球蛋白和肌球蛋白 ATPase 和总 SH 基量的影响, 结果见图 1 图 2 所示。

由图 1 图 2 可知, 随着重金属离子浓度的增加,

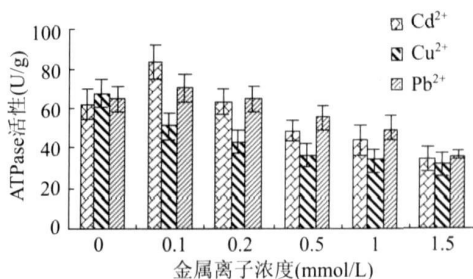


图 1 重金属离子对肌球蛋白 ATPase 活性的影响

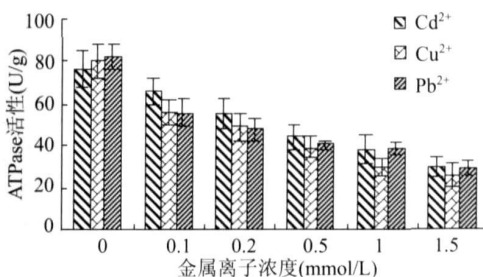


图 2 重金属离子对肌球蛋白 ATPase 活性的影响

肌动球蛋白和肌球蛋白的 ATPase 活性呈现下降的趋势。Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 在低浓度 0.1mmol/L 时可使肌动球蛋白的 ATPase 活性升高, 随后又明显下降, 在 1.5mmol/L 浓度时下降为原来的 55.3% 和 55.1%, Cu<sup>2+</sup> 直接引起活性下降, 在 1.5mmol/L 时下降为空白值的 43.3%。Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 均引起肌球蛋白的酶活下降, 在 1.5mmol/L 时分别下降为原来的 31.9%、35.8% 和 39.2%。

少量的重金属离子可以使蛋白适度变性, 变性后某些活性基团暴露, 使酶活性增强, Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 可激活肌动球蛋白 ATPase, Cd<sup>2+</sup> 的激活作用大于 Pb<sup>2+</sup>, 随着金属离子浓度的增加, 蛋白发生完全变性, 酶活性降低。但肌球蛋白的 ATPase 活性与肌动球蛋白不同, 呈现下降趋势, 这可能与蛋白结构不同有关, 有待于进一步研究。低浓度的 Cu<sup>2+</sup> 能够抑制蛋白 ATPase 的活性, 显示了很强的毒性, 使蛋白活性降低, 对酶活性有抑制作用, 进一步说明了 Cu<sup>2+</sup> 的毒性比较强。

本实验采用 Ca<sup>2+</sup> 激活 ATPase 来反映重金属离子对 ATPase 活性的影响。肌球蛋白的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 在 1~10mmol/L Ca<sup>2+</sup> 存在条件下有很高的活性, 而肌动蛋白存在则无此影响, 因此肌球蛋白的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性实际上就是肌动球蛋白的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性<sup>[2]</sup>。本实验条件下 Ca<sup>2+</sup> 的浓度为 5mmol/L, 此时 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 具有很高的活性。3.0mg/mL 的蛋白浓度下, 肌球蛋白的 ATPase 活性平均为 79.9U/g 高于肌动球蛋白的活性 66.8U/g 与此结论相符。

Ca<sup>2+</sup> 动态平衡的轻微变化与低剂量重金属污染相似, 在一定时间内能影响细胞的维持和调节 Ca<sup>2+</sup> 信号的能力。曾有 Hg<sup>2+</sup> 对蚌中 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 影响的报道, Hg<sup>2+</sup> 能够直接对控制 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 基因表达的细胞路径起作用, 可能是通过 Hg<sup>2+</sup> 激活的 Ca<sup>2+</sup> 或酪

氨酸激活酶发送信号<sup>[5]</sup>。

激活剂对酶的作用具有一定的选择性,即一种激活剂只能对某些酶起激活作用,而对另一种酶可能有抑制作用,有时离子之间可能存在拮抗效应,有的激活剂在高离子浓度时可以从激活剂转为抑制剂<sup>[6]</sup>。Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>在低浓度时作为激活剂,高浓度时转化为抑制剂,抑制了 ATPase 活性。

## 2.2 重金属离子对 SH 基总量的影响

由图 3 图 4 可知, Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 在 0.1~1.5mmol/L 时对肌动球蛋白和肌球蛋白 SH 基含量的影响相似。随 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 离子浓度的增加,肌动球蛋白和肌球蛋白的 SH 基含量先升高后下降,在 Cd<sup>2+</sup> 0.5mmol/L 时,肌动球蛋白的 SH 基含量最高,达到  $15.7 \times 10^{-5}$  mol/L,比原来增加了 70.1%;而肌球蛋白在 0.2mmol/L Cd<sup>2+</sup> 时达到最高值  $14.1 \times 10^{-5}$  mol/L,小于肌动球蛋白的最高值, Pb<sup>2+</sup> 在 0.1~1.5mmol/L 时对 SH 基含量的影响变化不明显,而 Cu<sup>2+</sup> 在低浓度时引起 SH 基含量迅速下降,肌动球蛋白下降更加明显,在 0.2mmol/L 时 SH 基含量降为零。

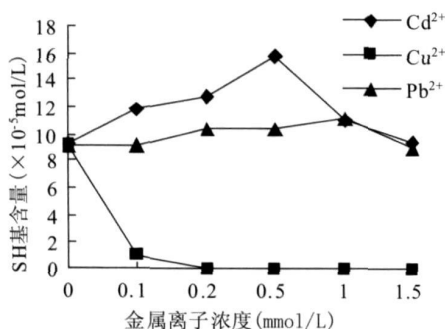


图 3 重金属离子对肌动球蛋白 SH 基的影响

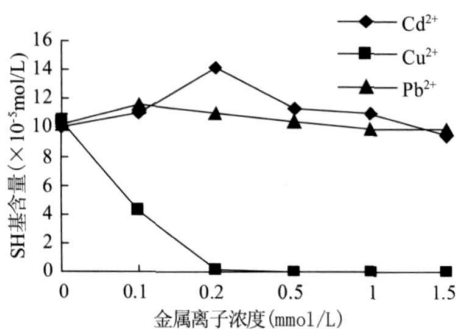


图 4 重金属离子对肌球蛋白 SH 基的影响

SH 基通常是汞作用的优先位点<sup>[7,8]</sup>。过渡金属很容易与蛋白质的巯基发生作用,形成金属-蛋白质复合物,通常金属离子在蛋白质分子的一定位点结合,可能产生生物活性,具有一定的功能。随着变性剂浓度的增加,天然状态的蛋白质不断转化为复合物,最终导致蛋白质完全变性。然而,由于变性剂和变性蛋白的结合是非常弱的,因此,只有高浓度的变性剂才能引起蛋白质完全变性<sup>[7]</sup>。Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 高浓度时引起蛋白质变性,SH 基含量减少,Cu<sup>2+</sup> 在 0.1mmol/L 时 SH 基含量减少,进一步说明了 Cu<sup>2+</sup> 的毒性比较强,与 ATPase 活性变化相符。

金属离子对 ATPase 的抑制作用可以通过 DTT 或谷胱甘肽进行还原,说明金属的毒性作用于蛋白 ATPase 的 SH 基,这也就是重金属离子引起肌动球蛋白和肌球蛋白 ATPase 和 SH 基变化趋势一致的原因。也曾有报道认为肌球蛋白的 ATPase 是汞作用于收缩性蛋白的作用位点<sup>[9]</sup>,主要是由于肌球蛋白由不同的可以与汞反应的 SH 基组成<sup>[10,12]</sup>。

对 Cu<sup>2+</sup> 抑制 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 和 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 的解释可能是由于酶和功能巯基的出现。重金属根据金属的类型和氧化状态对 SH 基表现了各种亲和力,Cu<sup>2+</sup> 一旦进入细胞中,一部分被高亲和力的 SH 基诱导为 Cu<sup>+</sup>。Cu<sup>2+</sup> 影响 ATPase 中的 SH 基有两种可能的方式,直接结合或者通过氧化应激产物氧化<sup>[13]</sup>。

重金属离子对 ATPase 影响的动力学效应属于非竞争性抑制,非竞争性抑制剂一般是具有能结合酶中 SH 基的基团,而这种 SH 基对于酶活性来说也是很重要的,因为它们有助于维持和稳定酶分子的构象<sup>[6]</sup>。

## 3 结论

随重金属离子 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 浓度的增加,肌动球蛋白 ATPase 活性呈现先上升后下降的趋势,肌球蛋白明显下降,添加 Cu<sup>2+</sup> 后肌动球蛋白和肌球蛋白的 ATPase 活性一直下降,Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 对肌动球蛋白和肌球蛋白 SH 基的影响相似。随 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 离子浓度的增加,肌动球蛋白和肌球蛋白的 SH 基含量先升高后下降,Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高引起蛋白中 SH 基含量明显下降,显示了较强的毒性。

## 参考文献:

- [1] 项建琳,吴少军,陈洁,等. 鲤鱼肌肉 ATP 酶生化特性研究[J]. 食品工业科技, 1999, 20(3): 11-13.
- [2] 万建荣,洪玉菁,奚印慈,等. 水产食品化学分析手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993.
- [3] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992.
- [4] Lowry O H, Roerough N J, Far A L, et al Protein measurement with folin phenol reagent[J]. J Bio Chem, 1951 (93): 265-275.
- [5] Burlando B, Bonomo M, Capri E, et al Different effects of Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase Hg<sup>2+</sup> induction of protein expression[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2004, 201-207.
- [6] 谢笔钧. 食品化学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [7] Anner B M, Moosmayer M, Mesch E. Mercury blocks the Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism[J]. Am J Physiol 1992, 262 F830-F836.
- [8] Mesch E, Moosmayer M, Anner B M. Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase[J]. Am J Physiol 1992, 262 F837-F842.

(下转第 102 页)

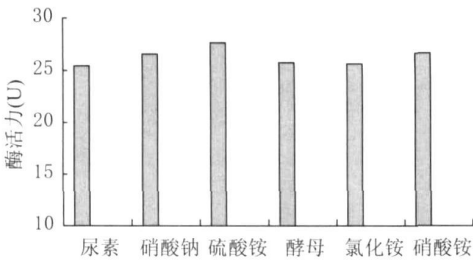


图 3 氮源对混合菌株产酶的影响

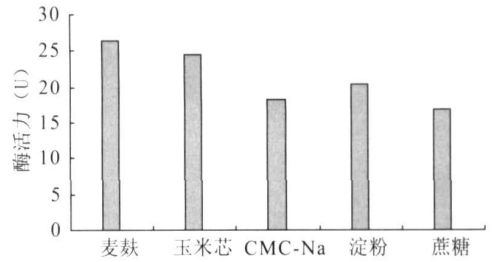


图 4 碳源对混合菌株产酶的影响

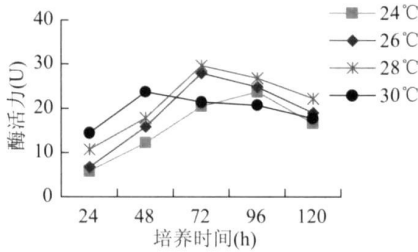


图 5 发酵温度对混合菌株产酶的影响

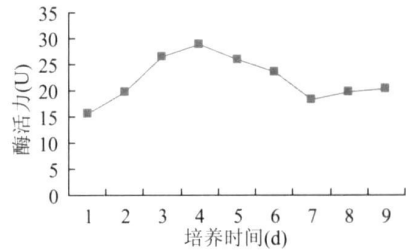


图 6 培养时间对混合菌株产酶的影响

表 4 混合菌株接种茶的正交实验结果分析

实验号	A 接种量 (%)	B 培养时间 (h)	C 培养温度 (°C)	空白	效果综合评分
1	1	1	1	1	7.63
2	1	2	2	2	8.42
3	1	3	3	3	7.95
4	2	1	2	3	8.36
5	2	2	3	1	9.68
6	2	3	1	2	8.83
7	3	1	3	2	7.88
8	3	2	1	3	8.59
9	3	3	2	1	6.89
K <sub>1</sub>	24.00	23.87	25.05	24.20	
K <sub>2</sub>	26.87	26.69	23.67	25.13	
K <sub>3</sub>	23.36	23.67	25.51	24.90	
k <sub>1</sub>	8.00	7.96	8.35	8.07	
k <sub>2</sub>	8.96	8.90	7.89	8.38	
k <sub>3</sub>	7.79	7.89	8.50	8.30	
R	1.17	1.01	0.61	0.31	

酶的最佳条件为: 接种量为 3%, 培养时间为 16h 培养温度为 28℃。

### 3 结论

经过分离选育, 在样品冷泡茶中分离获得三株生长速度快, 能产纤维素酶的菌株 SW<sub>2</sub>, SW<sub>3</sub>, F<sub>29</sub>, 经过这三株混合菌株发酵的茶, 在冷水中短时冲泡

的浸出物能明显的得到提高。混合菌株对纤维素的分解能力要明显高于单一菌株, 且混合菌株的产酶的最佳条件为: 硫酸铵为氮源, 麸皮为碳源。温度为 28℃, 培养时间为 4d。混合菌株培养发酵的最佳条件为: 接种量为 3%, 培养时间为 16h 培养温度为 28℃。

### 参考文献:

[1] 方元超, 等. 酶技术在茶饮料生产中的应用研究 [J]. 饮料工业, 1999(1): 12-15.  
 [2] 方德华主编, 微生物实验技术(第三版) [M]. 西南农业大学自编教材.  
 [3] 谢正锡等主编. 现代微生物培养基和试剂手册 [M]. 福建科技出版社, 1994.  
 [4] 毛清黎, 王星飞. 外源多糖水解酶提高红碎茶品质的生化机制研究 [J]. 食品科学, 2001, 22(3): 13-16.  
 [5] 王元凤, 王登良, 等. 酶技术在茶叶深加工中的应用研究 [J]. 饮料工业, 2000, 3(6): 18-22.  
 [6] 史玉英, 沈其荣. 纤维素分解菌群的分离和筛选 [J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 56-62.  
 [7] 潘锋, 史小丽, 等. 不同真菌纤维素酶固体发酵条件的比较研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2001(2): 33-35.

(上接第 62 页)

[9] Vassalob D V, Moreira C M, Oliveira E M, Bertold D M, Veibso T C. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine [J]. Toxicol Appl Pharmacol 1999, 156 113-118.  
 [10] Flink IL, Rader JH, Banerjee S K, Morik in E. A trial and ventricular cardiac myosins contain different heavy chain species [J]. FEBS Lett 1978, 94 125-130.  
 [11] Halbach S, Schonsteiner G, Ebner F, Reiter M. The effects

of p-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBs) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATP hydrolysis by sarcolemmal ATPase [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1981, 318 121-129.  
 [12] Halbach S. Mercury compounds lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue [J]. Arch Toxicol 1990.  
 [13] Viarengo A, Pertica M, Mancinelli G, et al. In vivo effect of copper on calcium homeostasis mechanisms of mussel gill cell plasma membranes [J]. Comp Biochem Physiol 1996(3): 421-425.