

# 三种海洋浮游甲壳动物Tm的研究

苏 永 全      肖 景 霖

(厦门大学海洋系)      (厦门大学生物系)

## 摘 要

纯化三次的日本毛虾、中国毛虾和中华假磷虾的Tm含量分别占其干重的0.86%, 0.87%, 和0.70%; SDS-PAGE测定两种毛虾Tm亚基分子量约 $3.3-3.6 \times 10^4$ , 磷虾的约 $3.2-3.5 \times 10^4$ ; 等电聚焦分析出此三种动物Tm的pI约为pH5.0; 在pH4.8或7.2的镁溶液中, 三种Tm均能形成针状晶体, 透射电镜下可见到约39nm横纹周期及若干细节; 三种Tm均含有Glu、Asp、Lys、His、Arg、Ser、Thr、Gly、Ala、(Cys)<sub>2</sub>、Val、Met、Ile、Leu、Tyr和Phe, 但都未测出Pro和Trp; 圆二色性测定指出, 在远紫外区三种Tm均显示出峰型极为相似的典型 $\alpha$ 螺旋双负峰, 峰极点分别落在222和208nm处, 日本毛虾、中国毛虾和中华假磷虾Tm在208nm处的 $\alpha$ 螺旋度分别占整个肽链的76.6%, 74.2%和61.6%.

1871年, Lanskester (见Green<sup>[1]</sup>) 首先用光谱法测定了溞(Daphnia)的血红蛋白, 被认为是浮游动物蛋白质生化研究的开始. 此后, 其蛋白质研究大都停留在总蛋白量的测定和氨基酸的分离分析. 1981年, Nishita等<sup>[2]</sup>进行了南极磷虾(*Euphausia superba*)的肌动球蛋白(actomyosin)的生化特性等研究. 迄今, 还未见有关浮游动物原肌球蛋白(Tropomyosin 下称Tm)的报道. 本文对三种浮游甲壳动物Tm的制备、结构和生化特性进行了研究. 试图通过分析, 阐明在个体细小的浮游动物中是否也含有, 含量如何, 为浮游动物的生化研究特别是Tm研究提供一些资料; 已有资料表明, 不同种属的动物, Tm的结构及其生化特性有着细微的或显著的差异<sup>[3]</sup>. 因此, 能否利用这些不同, 区分鉴别一些种属亲缘关系相近, 形态分类难于辨认的种类, 将经典的分类提到分子水平上来探讨.

## 一、材料与方 法

### 1. 材料收集处理

本文所用的材料中国毛虾(*Acetes chinensis*)和日本毛虾(*A. japonicus*)分别于1985年3月6日和同年7月27日取自厦门曾厝垵浅海手操网的鲜活个体; 中华假磷虾

本文于1987年2月6日收到, 修改稿于1988年2月5日收到.

*Pseudeuphausia sinica*) 系1985年3月19日在曾厝垵与浯屿之间海面的定置网采集的新鲜样品。标本存放于冰瓶，立即带回实验室冰库中(+2°C)处理。先用0.5mol/l NaCl溶液洗涤，再挑选出所需的纯一种类。各取60只(分三组，每组20只)用滤纸吸干体表的水，称湿重。其余纯种动物加适量冰冷的0.6mol/l NaCl溶液(1/5=V/V)捣碎，于冰库中(+2°C)搅拌5分钟，高速离心收集沉淀物，用冰冷乙醇和丙酮分步脱水制干样后，-10°C冰库保存。

## 2. T<sub>m</sub>的制备纯化

按Bailey<sup>[4]</sup>法略作改进抽提。在pH 4.8条件下沉淀和硫酸铵盐析法纯化T<sub>m</sub>三次。除离心室操作外，其余均在+4°C以下进行。

## 3. T<sub>m</sub>的纯度分析和含量测定

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定蛋白纯度<sup>[5]</sup>。蛋白样品液含SDS和巯基乙醇各1%，蔗糖40%、溴酚蓝0.1%，沸水浴中处理5分钟。凝胶浓度T=10%，交联度c=30%。蛋白样品用量每管约35μg，每管电流2.5mA。以考马斯亮蓝R-250染色。蛋白含量采用双缩脲法于550nm处测定，牛血清蛋白(Sigma产品)为参比。

## 4. 分子量测定

以标准混合蛋白(美国Bio-Rad产品)为参比，SDS-PAGE法测分子量。胶浓度及染色同3。待测蛋白直接加入标准蛋白中分析。标准蛋白如下。

磷酸化酶B	Phosphorylase B	92 500
牛血清蛋白	Bovine Serum Albumin	66 200
卵清蛋白	Ovalbumin	45 000
碳酸酐酶	Carbonic Anhydrase	31 000
大豆胰蛋白酶抑制剂	Soybean Ttrypsin Inhibitor	21 500
溶菌酶	Lysozyme	14 400

## 5. 等电聚焦分析

以Ampholine作为两性电解质载体，聚丙烯酰胺凝胶作抗对流支持介质等电聚焦，测定三种动物T<sub>m</sub>的等电点。凝胶T=4%，c=2.7%。40%Ampholine为LKB产品，pH 3.5—10占凝胶的1%，pH6—8占0.01%。蛋白样品内含尿素8mol/l、蔗糖40%、结晶紫0.5%。直接将蛋白样品加在凝胶顶部。每管用约38—45μg，每管恒压20V，直至结晶紫出管外。

## 6. 电子显微镜样品处理

SDS-PAGE纯的三种T<sub>m</sub>样品，先对重蒸水透析6—8h，再对0.05mol/l磷酸冲缓液(pH 7.2)透析结晶。用负染和投影技术制片。负染：取适当浓度的蛋白晶体液(10μg/μl)于0.3% Formvar支持膜的铜网上(膜厚度约15.0nm)，室温下晾干后立即用2%醋酸铀(pH 7.0)染色。晾干后置JEM-100CXII电子显微镜(日产)下观察。投影：同上蛋白样品滴于铜网上，室温下晾干，HUS-5GB真空喷涂仪(日立)于tgθ=10/4喷白金粉末，厚度约11.0nm。同上电镜观察。

## 7. 氨基酸分析

SDS-PAGE纯的T<sub>m</sub>经三氯乙酸沉淀，重蒸水溶解，对重蒸水透析，按Kasper<sup>[6]</sup>法水解，835-50型氨基酸分析仪（日立）分析。

## 8. 圆二色性测定

为比较不同种属动物T<sub>m</sub>的主肽链构象特征，测定了此三种动物T<sub>m</sub>的圆二色性。各经三次纯化的T<sub>m</sub>样品，再经高速冷冻离心除去杂质后，溶解于0.01mol/l磷酸缓冲液（pH 7.2）中（0.1mg/ml），于JASCO-J20圆二色性仪（日产）的远紫外区（250—190nm）测圆二色性。

# 二、结 果

## 1. 纯度和含量

日本毛虾、中国毛虾和中华假磷虾的SDS-PAGE纯度检测，结果表明，20—35%硫酸铵盐析部分的蛋白，呈电泳单一扫描图谱（图1），而35—70%部分的物质，至少出现双条或一大团粗谱区带。

据此可以认为，只有20—35%硫酸铵盐析的蛋白属T<sub>m</sub>。这在等电聚焦分析和电镜微细结构观察中也证实了这一点。双缩脲测定结果指出，日本毛虾、中国毛虾和中华假磷虾的T<sub>m</sub>分别占其干重的0.86%（0.73—0.97%）、0.87%（0.81—0.94%）和0.70%（0.62—0.80）。可以看出，同属的两种毛虾，T<sub>m</sub>含量较相近，而中华假磷虾的含量较低。

## 2. 分子量（MW）

待测和标准蛋白经SDS-PAGE后，明显地看出，此三种动物T<sub>m</sub>迁移位于标准蛋白卵清蛋白和碳酸酐酶之间（图2）。由Beckman DU-8B分光光度计—扫描仪所得峰谱，计算各种蛋白迁移率<sup>[7]</sup>，用最小二乘法即可算出此三种蛋白的亚基分子量：同属两种毛虾T<sub>m</sub>约为 $3.3—3.6 \times 10^4$ ，中华假磷虾的约 $3.2—3.5 \times 10^4$ （图2）。

## 3. 等电点（pI）

等电聚焦扫描图谱如图3所示。据张法<sup>[7]</sup>计算其等电点约为pH 5.0。尚未看出此三种

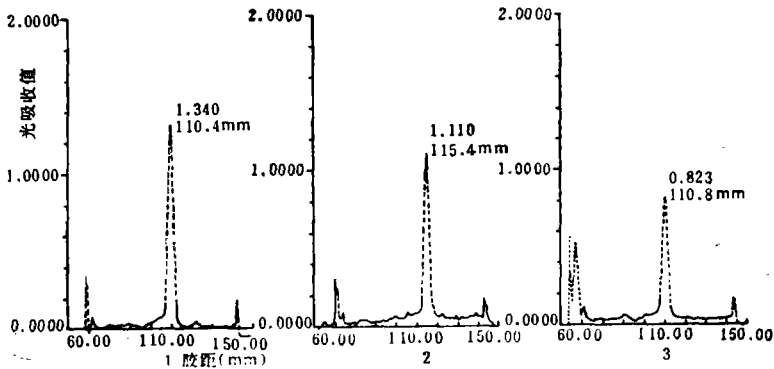


图1 三种动物T<sub>m</sub>的SDS-PAGE扫描图谱  
1—中国毛虾 2—日本毛虾 3—中华假磷虾

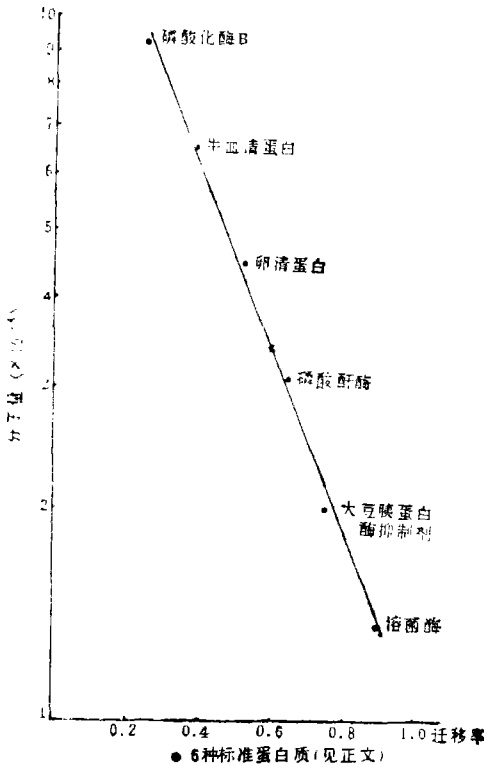


图2 7种蛋白质的分子量对数电泳迁移率

动物Tm的pI有显著的差异。

#### 4. 电镜观察

图4是三种动物Tm晶体的电子显微镜照片。可以看出，(1)低倍镜下，它们的晶体外形呈纺锤型或针叶型。高倍镜下，则可见到清晰的横纹周期，每周期中又有若干细节，但细节相间似乎不完全一致。经测定三种动物的Tm横纹周期约为38—40nm，还没发现毛虾和磷虾Tm横纹周期有明显差异，这或许与它们同属甲壳纲、种属关系相互亲近有关，抑或与Tm的横纹周期特性有关；(2)白金丝喷涂投影的照片，虽可明显地看到横纹周期，但其界限模糊，其中的细节也无法显出。在这一点上，负染的观察效果显然比投影的佳。

#### 5. 氨基酸组成

表1示出了三种动物Tm的氨基酸组成。可以看出：Glu、Asp、Lys、His和Arg等强极性氨基酸的含量很丰富，占总氨基酸含量的54%以上。酸性和碱性分别占总量的

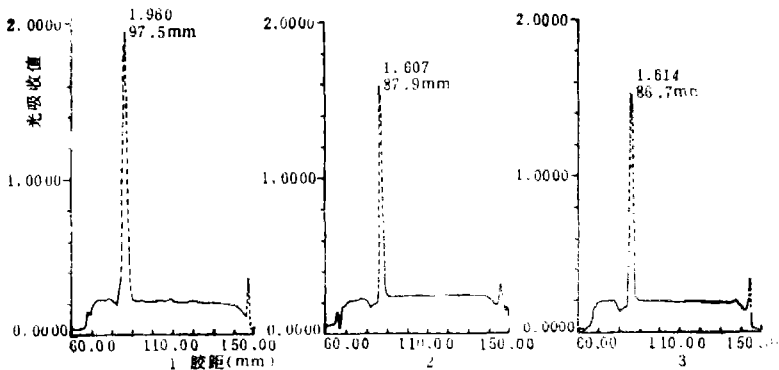


图3 Tm的等电聚焦扫描图谱

1—中国毛虾 2—日本毛虾 3—中华假磷虾

38—41%和15—17%。但是，不同种动物Tm的各种氨基酸含量却不尽相等。可以看出，同属的两种毛虾，各氨基酸含量都很相近，显示出亲缘关系相近的动物Tm化学组成相似的特性。而不同目的假磷虾一些氨基酸含量与毛虾的相差较大，尤其是Met和Lys，分别低3.7—3.9和1.6—1.7倍。但Arg的含量却高于毛虾的1.6—1.7倍。这些差异是否仅仅是由于种属不同的关系引起的，不能遽下结果。但是代谢途径中处于重要地位的

Ala、Glu和Asp的含量却很相近。

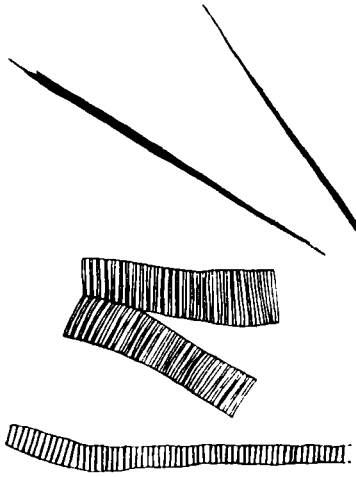


图4A 中国毛虾Tm晶体的电镜形态

上——加速电压60kV, 物镜光阑孔径300 $\mu$ m  
 $\times (2.969 \times 10^4)$  负染  
 中——加速电压80kV, 物镜光阑孔径200 $\mu$ m  
 $\times (9.400 \times 10^4)$  负染  
 下——加速电压60kV, 物镜光阑孔径300 $\mu$ m  
 $\times (3.596 \times 10^4)$  投影

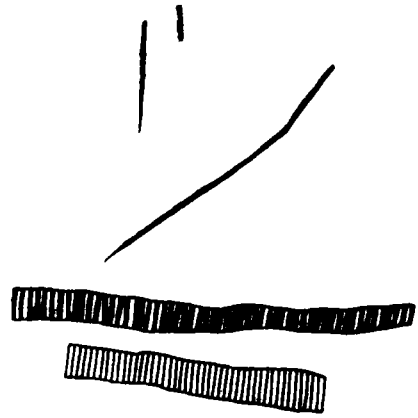


图4B 日本毛虾Tm晶体的电镜形态

上——加速电压80kV, 物镜光阑孔径200 $\mu$ m  
 $\times (2.341 \times 10^4)$  负染  
 中——加速电压80kV, 物镜光阑孔径200 $\mu$ m  
 $\times (9.628 \times 10^4)$  负染  
 下——加速电压60kV, 物镜光阑孔径200 $\mu$ m  
 $\times (4.234 \times 10^4)$  投影

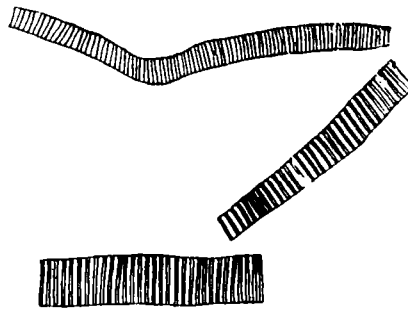


图4C 中华假磷虾Tm的电镜形态

加速电压80kV, 物镜光阑孔径200 $\mu$ m

上—— $\times (4.572 \times 10^4)$  负染

下—— $\times (9.864 \times 10^4)$  负染

## 6. 圆二色性

三种动物Tm的圆二色性峰谱于图5示出。它们都呈 $\alpha$ 螺旋型肽链的双负峰,而且峰极点均落在222和208nm处。据Greenfield法<sup>[9]</sup>计算,此三种动物Tm的 $\alpha$ 螺旋度和克分子椭圆值列于表2。可以看出,峰形较高的222nm所计算的 $\alpha$ 值反比较低峰的208nm要小,此乃计算方法不同所致。但总的来看,222nm处的 $\alpha$ 螺旋占整个肽链分子的50%以上,208nm处的则都超过60%。如用Chen<sup>[9]</sup>的方法计算,则 $\alpha$ 螺旋度要高得多。

由图5,表2可看出,虽然三种动物Tm的圆二色性峰谱形状相似,极点也一致,但其

表1 三种浮游动物Tm的氨基酸组成

动 物	中 国 毛 虾		日 本 毛 虾		中 华 假 磷 虾	
	$\mu\text{mol/l}$	%	$\mu\text{mol/l}$	%	$\mu\text{mol/l}$	%
赖氨酸 Lys	2.692	11.32	2.429	11.79	0.105	6.99
组氨酸 His	0.197	0.83	0.176	0.85	0.008	0.53
精氨酸 Arg	1.125	4.73	1.023	4.96	0.119	7.92
天冬氨酸 Asp	4.225	17.77	3.283	15.93	0.263	17.51
苏氨酸 Thr	0.597	2.51	0.516	2.50	0.048	3.20
丝氨酸 Ser	0.691	2.91	0.562	2.73	0.070	4.66
谷氨酸 Glu	5.544	23.32	4.774	23.17	0.313	20.84
甘氨酸 Gly	0.548	2.31	0.480	2.33	0.047	3.13
丙氨酸 Ala	2.645	11.13	2.386	11.53	0.171	11.38
胱氨酸 (Cys) <sub>2</sub>	0.075	0.32	0.071	0.34	0.006	0.40
缬氨酸 Val	0.727	3.06	0.651	3.16	0.057	3.79
蛋氨酸 Met	0.519	2.18	0.492	2.39	0.012	0.80
异亮氨酸 Ile	0.836	3.52	0.750	3.64	0.055	3.66
亮氨酸 Leu	2.619	11.02	2.335	11.33	0.181	12.05
酪氨酸 Tyr	0.514	2.16	0.466	2.26	0.029	1.93
苯丙氨酸 Phe	0.219	0.92	0.211	1.02	0.018	1.20
色氨酸 Trp	—	—	—	—	—	—
脯氨酸 Pro	—	—	—	—	—	—

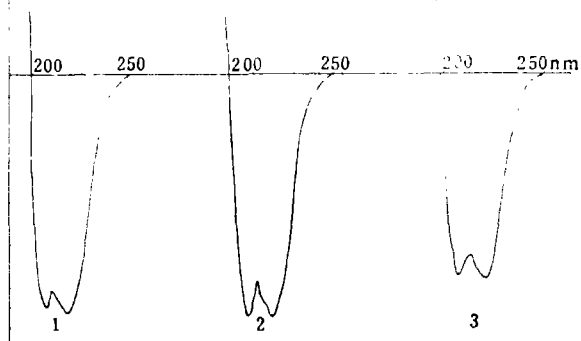


图5 Tm圆二色性图谱

1——日本毛虾 2——中国毛虾 3——中华假磷虾

表2 三种浮游动物Tm的螺旋度(%)

动 物	$[\theta]_{222}$	$[\theta]_{208}$	$\alpha_{222}$	$\alpha_{208}$
日本毛虾	-26 450	-26 220	65.4	76.6
中国毛虾	-25 990	-25 530	64.2	74.2
中华假磷虾	-22 310	-21 850	54.3	61.6

峰高度却有着明显的不同，因而所计算的椭圆值和螺旋度也互有高低。两种毛虾的情况比较相似，而中华假磷虾的椭圆值和螺旋度较低，说明动物种属相异，T<sub>m</sub>的圆二色性谱也不同。

### 三、讨 论

浮游动物是种类繁多、数量很大的一类小型生物。由于体小肉少，要对其进行结构蛋白的生化研究，就需挑拣出足够数量的个体，确有不少困难。看来，个体微小、取材困难或许是至今还未见到有这类动物T<sub>m</sub>研究报道的原因之一。国内外有关T<sub>m</sub>研究的论文不少，但所用的材料都是个体较大动物的横纹肌、心肌或平滑肌。而个体细小的浮游动物的肌肉是极难甚至无法直接把它分离出来。因此，本文所用的三种甲壳动物的T<sub>m</sub>分离纯化就应有所改进。首先，考虑到以整个个体制备T<sub>m</sub>时，具有活性的酶（特别是消化道的酶）的影响。刚开始时未能注意到这一点，以致所获得的T<sub>m</sub>量很少（约0.13%），而最明显的是结晶过程中找不到蛋白晶体，因为T<sub>m</sub>的一个特性是极易解聚和降解或失去结晶能力<sup>[3]</sup>。因此，制成干样时，将整个动物体匀浆后离心除酶。又在制备纯化时，加入适量的EDT-ANa<sub>2</sub>，以整合某些酶中的金属离子，从而抑制样品中酶的活性。同时注意低温操作，即使有少量酶存在也难于表现其活性来破坏T<sub>m</sub>的制备纯化和结晶。这样，不仅T<sub>m</sub>含量提高了6—7倍，而且也易于结晶，便于制备电镜样品。

蛋白质的结晶，与其纯度、浓度、环境的pH值、温度及金属离子等因素有关。本文三种动物的T<sub>m</sub>结晶也是如度。在其他因素恒定的情况下，pH的变化对晶体的形成很值得探讨。一般地说，蛋白质在环境的pH与其等电点接近时，晶体易于析出，本文的T<sub>m</sub>情况亦然。然而，当环境的pH为中性（pH 7.2）时，所形成的晶体外形和电镜下横纹周期图案与接近此蛋白pH值的环境pH4.8时的情况相似。但在pH6.0时却找不到晶体；同时还发现，此三种T<sub>m</sub>刚抽提出来即进行透析结晶，也较顺利。若于0.01mol/l磷酸缓冲液（pH 7.2）保存3—4个月后（低温环境，但不至使T<sub>m</sub>冻结成冰块），再透析结晶，则很困难。看来，经一段时间后的三种T<sub>m</sub>，可能由于空间结构上产生某些不可逆的变化而无法形成晶体。再者，刚抽提出的T<sub>m</sub>，先对重蒸水透析后，再于磷酸缓冲液-MgCl<sub>2</sub>中结晶，也较容易。但在其他条件下如0.01mol/l磷酸缓冲液（含0.01mol/l Tris，pH7.2）透析后再行结晶，也很困难，甚至根本找不到晶体。就此现象，可能是含有一定量的Tris的磷酸缓冲液中，有某些物质（如离子等）阻碍着T<sub>m</sub>结晶前的透析“净化”，或许是Tris-磷酸缓冲环境与袋内透析物溶液不能形成足够强的渗透压，致使袋中T<sub>m</sub>的某些杂质小分子不能析出来或环境中的镁离子无法渗透进袋中与T<sub>m</sub>形成晶体。有关这些问题，尚待深入探讨。

表1中三种动物T<sub>m</sub>的氨基酸组成中，强极性氨基酸（酸性和碱性氨基酸）的含量占50%以上，而且很相近（53—58%），其酸性和碱性氨基酸含量也各相差无几。任梅轩<sup>[10]</sup>曾计算了兔、猪心、鸭肫、对虾和乌贼等T<sub>m</sub>氨基酸的含量，其结果碱性氨基酸含量（13—20%）与本文的情况相似。酸性和极性氨基酸由于计算方法不同而有所差异，但就他们

的计算,也都非常接近,酸性和极性氨基酸分别占25—28%和61—63%。由此看来,不论是脊椎动物的哺乳类(如兔)和鸟类(如鸽子),还是无脊椎动物的甲壳类(如对虾、毛虾和磷虾类)和软体类(如乌贼);不论是动物的横纹肌还是心肌或平滑肌,其 $T_m$ 的一个共同特性是残基性质相似的一类氨基酸含量相近。再者,从表1还可清楚看出,极少甚至不含有Trp和Pro。值得指出的是Pro,它和Gly一样,在蛋白质的 $\alpha$ 螺旋结构中,它们都是肽链螺旋的破坏者,肽链中凡有这两种氨基酸出现的部位,螺旋则断裂或转向,而 $T_m$ 的螺旋度一般都很高(占77—79%)<sup>(3, 11)</sup>,这或许与Pro的微量甚至缺乏和Gly的低含量有直接的关系。但是,本文三种 $T_m$ 的氨基酸虽有上述的共同特性,然而种类不同致使它们的氨基酸组成特性又有着某些细微或明显的差异,如Gly的含量在中华假磷虾 $T_m$ 中所占比例高于两种毛虾,这或许是导致它的 $T_m$ 的 $\alpha$ 螺旋含量较低的原因之一(表2)。

### 参 考 文 献

- [1] Green, J., Variation in the haemoglobin content of *Daphnia*, *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, **145** (1956), 214—232.
- [2] Nishita, K., Y. and Arai Ken-ichi, Biochemical characteristics of actomyosin from Antarctic Krill, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher.*, **47** (1981), 1237—1244.
- [3] Pan, C. H., *et al.*, Immunochemical characteristic and the structure of troponomyosin from some chondrochthyes, *Sci. Sin.*, **13** (1964), 9, 1641—1655.
- [4] Bailey, K., Troponomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril, *Biochem. J.*, **43** (1948), 271—279.
- [5] 莽克强、徐乃正、方荣祥, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 1975.
- [6] Kasper, C. B., *Protein Sequence Determination*, Ed by Needleman, S. P., 2nd Revised and Enlarged Springer-Verlag, Berlin, 1975, 114—161.
- [7] 张龙翔等, 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 1982.
- [8] Greenfield, N. and G. D. Fasman, Computed circular Dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochem.*, **8** (1969), 4108—4116.
- [9] Chen, Y., J. T. Yang and K. H. Chan, Determination of the helix and  $\beta$ -form of protein in aqueous solution by circular dichroism, *Biochem.*, **13** (1974), 3350—3359.
- [10] 任梅轩、曹天钦, 不同来源的原肌球蛋白的化学结构的比较研究, 生理学报, **21** (1957), 91—99.
- [11] Chang, Y. S. and T. C. Tsao, Conformational changes of rabbit troponomyosin in different solvents, *Sci. Sin.*, **11** (1962), 1353—1368.