



ATP 含量与外源酶添加对罗非鱼肌原纤维蛋白磷酸化水平的影响

喻叶^{1,2}, 魏涯^{1,3}, 陈胜军^{1,3}, 黄卉^{1,3}, 岑剑伟^{1,3}, 潘创^{1,3},
李春生^{1,3}, 王迪^{1,3}, 王悦齐^{1,3}, 冯阳^{1,3}, 赵永强^{1,3*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东广州 510300;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

3. 三亚热带水产研究院, 海南省深远海渔业资源高效利用与加工重点实验室, 海南三亚 572000)

摘要: 蛋白质磷酸化修饰可影响肌肉品质, 为探究外源酶添加对罗非鱼肌原纤维蛋白磷酸化水平的影响, 在向罗非鱼肌原纤维蛋白溶液中分别加入蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 后进行体外孵育, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光染色测定不同时间段内的磷酸化水平变化。并通过将罗非鱼肌肉浸泡在不同浓度 ATP 溶液中测定肌原纤维蛋白的蛋白磷酸化水平以探究 ATP 对其的影响。结果显示, 在 0~72 h, PKA 组磷酸化水平均显著高于对照组和 AP 组, PKA 组整体磷酸化水平从 0 h 的 0.35 ± 0.01 上升至 12 h 的 0.37 ± 0.01 , 而后下降至 72 h 的 0.29 ± 0.01 , 呈先上升后下降的趋势, 其中, 肌球蛋白重链磷酸化水平和肌动蛋白磷酸化水平分别从 0 h 的 0.73 ± 0.01 、 0.86 ± 0.01 下降至 72 h 的 0.58 ± 0.02 和 0.68 ± 0.01 。当孵育时间为 0、4、24 和 48 h 时, 3 组磷酸化水平均具有显著差异。在外源添加 0.3 mol/L ATP 后, 结果显示肌原纤维蛋白整体磷酸化水平 (0.46 ± 0.00) 显著高于对照组 (0.42 ± 0.01)。PKA 可促进罗非鱼肌原纤维蛋白磷酸化修饰, AP 则使其去磷酸化。研究表明, 宰杀后罗非鱼肌肉中的 ATP 含量、PKA 及 AP 活性水平是影响蛋白质磷酸化水平的关键因素。本研究可为探明罗非鱼品质变化机制与调控策略提供理论依据。

关键词: 罗非鱼; 肌原纤维蛋白; 蛋白质磷酸化; 蛋白激酶 A; 碱性磷酸酶; ATP

中图分类号: S 983; TS 254.4

文献标志码: A

磷酸化是最早报道和研究最多的, 同时也是生物体内最为普遍且重要的一种蛋白质翻译后修饰。蛋白质磷酸化通常指 ATP 或 GTP 上的磷酸基团在蛋白激酶的催化作用下被转移到蛋白质氨基酸残基上的过程, 主要功能是机体内酶的活性

调节、分子间相互作用调控等^[1]。蛋白质磷酸化会影响肉的品质参数, 如嫩度、色泽和持水力^[2]。与表现出低磷酸化水平蛋白的肌肉相比, 具高磷酸化水平蛋白的肉质往往较硬, 且磷酸化蛋白质多数与羊肉的糖酵解、肌肉收缩有关^[3]。彭喆等^[4]

收稿日期: 2024-05-13 修回日期: 2024-06-14

资助项目: 国家自然科学基金 (32372257); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46); 海南省自然科学基金 (323MS122); 海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目 (2021CXLH0006); 广东省省级科技计划项目 (2023B0202010017); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2023TD78)

第一作者: 喻叶 (照片), 从事水产品加工及贮藏研究, E-mail: yuye3317@outlook.com

通信作者: 赵永强, 从事水产品加工与质量安全研究, E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn



对刺参进行研究, 发现磷酸化胶原蛋白聚集体会降低咀嚼性和粘度。但目前对蛋白质磷酸化及肉质变化机理的研究主要集中在牛肉、羊肉等畜禽产品上^[5-7]。不同于陆生动物, 水产品因其肌纤维较短、肌肉含水量高, 肉质大多鲜嫩, 且肌肉中含多种蛋白质, 这也使其在储藏时更容易发生腐败变质^[8]。按照生理功能划分, 肌肉蛋白质主要为3大类: 收缩蛋白、调节蛋白和骨架蛋白^[9]。肌球蛋白、肌动蛋白以及二者结合形成的肌动球蛋白都属于收缩蛋白, 相关研究表明, 收缩蛋白的改变与肌肉品质调控存在关联。例如, Tulli等^[10]提出肌动蛋白可作为预测鱼类品质的生物标志物。Yang等^[11]发现肌原纤维结构蛋白降解会导致鱼肉质软化, 同时也进一步发现相关骨架蛋白的降解加速了鱼肉软化。

本团队前期研究发现, 罗非鱼贮藏过程中硬度与持水性等品质变化与蛋白质磷酸化水平具有相关性, 并提出肌原纤维蛋白磷酸化水平可能通过影响肌动球蛋白解离, 从而影响肉质变化^[12]。但是关于蛋白质磷酸化修饰水平的产生机制如何, 肌球蛋白和肌动蛋白在贮藏过程中磷酸化水平如何变化以及影响蛋白质磷酸化修饰水平的因素有哪些, 这些方面仍有待研究。贮藏过程中肌原纤维蛋白发生磷酸化或者去磷酸化修饰都会对其结构和功能产生影响, 进而可能调控肌肉的生化特性^[13]。蛋白激酶催化磷酸化反应, 磷酸酶则促进去磷酸化反应。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 是生物体内普遍存在的一种磷酸酶, 可对底物分子起到去磷酸化作用, 从碱性磷酸酶诱导的蛋白质中去除磷酸基团的过程称为去磷酸化^[14]。相反, 蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 具有催化丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化蛋白质的能力^[15]。本研究选取罗非鱼肉作为实验材料, 研究蛋白激酶 A 和碱性磷酸酶对罗非鱼肌原纤维蛋白磷酸化水平的影响, 为后续可以从调控蛋白质磷酸化水平出发研究调控肌肉品质提供模型参考。此外, 本研究还探索了 ATP 含量对罗非肉贮藏过程中蛋白质磷酸化的影响规律, 旨在为探明罗非鱼品质变化机制与调控策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验所选取罗非鱼每条净重 (1 000±200) g,

购自广州某超市。5 min 内将其运输至实验室, 击晕宰杀, 取背部肌肉, 使用医用剪刀剔除鱼皮及其筋膜后在预冷的蒸馏水中清洗, 擦干水后装入无菌密封袋置于装满冰块的泡沫箱中保藏, 每隔 4 h 更换冰块, 在不同时间节点取出鱼肉样品, 液氮速冻后-80 °C 保存。本研究严格遵守实验动物伦理, 并获得了所在单位伦理审查委员会的批准。

PKA (bs-02201p)、AP (bs-0520p), 北京博奥森生物技术有限公司。非预染蛋白 Marker 分子量标准品, 美国赛默飞世尔。ATP, 美国 Sigma-Aldrich 公司。NUPAGE 12% 预制胶、电泳缓冲液 (X20)、Pro-Q Diamond、SYPRO Ruby 染色液, 美国 Invitrogen 公司。5×SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 上样缓冲液 (P0015), 上海碧云天生物技术有限公司。其他常规试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

IKA-T25 组织匀浆机, 德国 IKA; FE28 数显 pH 计, 美国梅特勒-托利多; FM 400A 型制冰机, 美国 Grant 公司; 3K30 台式高速冷冻离心机, 德国 Sigma; Sunrise-basic 吸光酶标仪, 德国 TECAN; HX-20 恒温金属浴, 上海沪析实业有限公司; 基础电泳仪, 美国 BIO-RAD; MINI Space 3000 凝胶成像系统, 上海天能生命科学有限公司。

1.3 实验方法

肌原纤维蛋白制备 参考 Okitani^[16] 的方法并稍作修改, 称取处理过后的新鲜罗非鱼肉 4.0 g, 按照 1:10 的比例加入预冷的缓冲液 (0.01 mol/L Na₂CO₃、0.04 mol/L NaHCO₃、pH 7.2), 将混合液充分匀浆, 随后于 10 000 r/min 下低温离心 15 min, 去除水溶性蛋白 (肌浆蛋白)。沉淀加入上述缓冲液 (含 0.6 mol/L KCl), 再次匀浆, 上清液即为所需蛋白采用 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。

肌原纤维蛋白的体外磷酸化处理 参考高星^[17] 的方法, 设置高、中、低 3 组不同磷酸化水平的蛋白质溶液, 高水平磷酸化组按 10 U:25 μL 在肌原纤维蛋白溶液中添加 PKA; 低磷酸化水平组按 25 U:25 μL 添加 AP; 未添加 PKA 与 AP 的蛋白溶液设为对照组 (中磷酸化水平组), 3 组构成肌原纤维蛋白磷酸化的体外模型。将上述体系在冰藏条件下培养 0、4、12、24、48 和 72 h, 分别在每个时间点取一定量蛋白质, 液氮速冻后

于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

蛋白质磷酸化水平测定 从冰箱中分别取出添加 PKA、AP 和不添加任何物质的蛋白质, 流水解冻后将蛋白质溶液与 SDS-PAGE 上样缓冲液按 4:1 混合, 混合液在金属浴 ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) 煮沸 5 min, 冷却离心后得到电泳样品。电泳时蛋白上样量统一控制在 $6\text{ }\mu\text{g}$, 电压保持恒定, 为 80 V。电泳后将凝胶固定 (50% 甲醇、10% 乙酸)、水洗后置于摇床上依次进行 Pro-Q Diamond 和 SYPRO Ruby 染色, 具体染色脱色步骤参照陈立娟^[18]的方法。对每一次染色并洗脱干净后的凝胶于 MINI Space 3000 进行扫描。其中 Pro-Q Diamond 只对磷酸化蛋白质特异性染色, 而 SYPRO Ruby 可对所有蛋白进行染色。使用 Image J 软件 (v1.54) 对蛋白条带进行光密度值定量分析。将 (P) 认作 Pro-Q Diamond 染色后蛋白条带光密度值, (T) 为 SYPRO Ruby 染色后蛋白条带光密度值, P 与 T 的比值即为蛋白质的磷酸化水平^[19-20]。

ATP 处理肌原纤维蛋白 参考 Ren 等^[21]方法, 取 5 g 新鲜罗非鱼背部肌肉, 分别添加 1 mL 0.1 mol/L ATP 溶液、0.2 mol/L ATP 溶液、0.3 mol/L ATP 溶液 (ATP 纯品溶于 0.01 mol/L MgCl_2 溶液中) 作为 ATP 处理组, 对照组不添加 ATP, 采用溶剂做对照。将 3 个处理组和对照组分别在冰藏条件下培养 24 h, 随后迅速收集样品, 液氮速冻并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

ATP 处理肌原纤维蛋白磷酸化水平测定

肌原纤维蛋白提取以及磷酸化水平测定方法参照上述办法进行。

数据分析 使用 SPSS v.22 软件对数据进行单因素方差分析, 显著性差异采用邓肯多重比较法 ($P<0.05$), 各组计算数据均以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果

2.1 体外蛋白质磷酸化水平分析

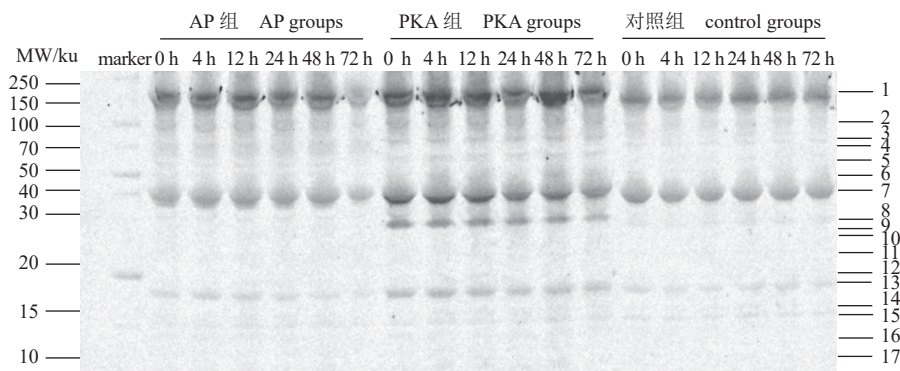
在 0~72 h 内, PKA 组磷酸化水平均显著高于对照组和 AP 组 ($P<0.05$), PKA 组整体磷酸化水平从 0 h 的 0.35 ± 0.01 下降至 72 h 的 0.29 ± 0.01 ($P<0.05$), 呈先上升后下降的趋势。孵育 72 h 后对照组的蛋白质磷酸化水平呈下降趋势, 而 PKA 组的蛋白质磷酸化水平先上升后下降 (图 1)。孵育 0、4、12、24、48 和 72 h 后 PKA 组蛋白质的

磷酸化水平均显著高于空白对照组和 AP 组 ($P<0.05$), 说明 PKA 在培养过程中催化肌原纤维蛋白发生磷酸化反应。PKA 组蛋白质的磷酸化水平在 12 h 最高, 而后随着孵育时间的延长, 磷酸化水平逐渐降低, 这可能与 PKA 以及 ATP 的消耗有关。孵育 0、4、24 和 48 h 后, AP 组的蛋白质磷酸化水平显著低于对照组 ($P<0.05$), 这同样说明 AP 使得肌原纤维蛋白在孵育过程中发生去磷酸化, 从而降低磷酸化水平。实验结果表明, 经过 PKA 和 AP 孵育后, 有效改变了肌原纤维蛋白的磷酸化状态。

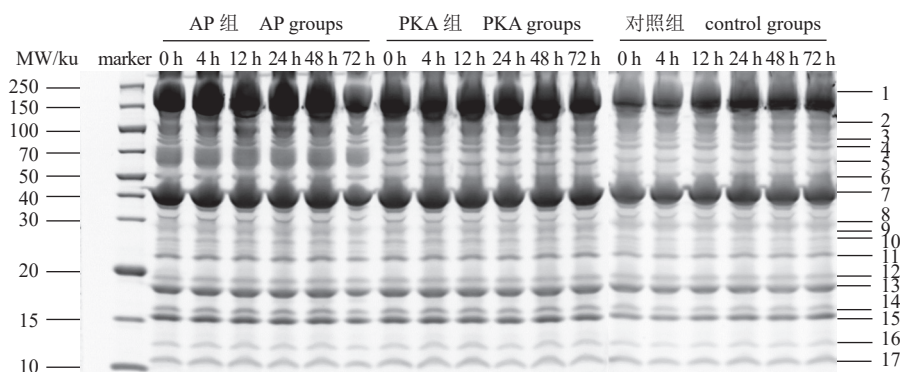
2.2 不同酶处理后肌球蛋白以及肌动蛋白磷酸化水平变化

肌球蛋白重链磷酸化水平变化 肌球蛋白磷酸化修饰对于维持细胞骨架活性及细胞功能发挥了重要作用^[22]。肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC) 分子质量约为 220 ku, 因其在肌原纤维蛋白中含量占比较高, 故选择 MHC 进行研究。从图 2 中可以看出, AP 组、对照组和 PKA 组的 MHC 磷酸化水平随时间呈现先上升再下降的趋势 (0~12 h 内上升, 12~72 h 下降), 当孵育时间为 12 和 72 h 时, PKA 组 MHC 磷酸化水平显著高于对照组和 AP 组 ($P<0.05$), 对照组显著高于 AP 组 ($P<0.05$), 这说明 PKA 和 AP 在肌球蛋白重链磷酸化修饰过程中同样发挥了促进磷酸化和去磷酸化的作用。当不添加任何酶处理时, 略微不同于肌原纤维整体蛋白磷酸化水平变化, MHC 磷酸化水平在 0~12 h 呈上升趋势, 说明在此过程中 MHC 磷酸化修饰占主导地位, 同时也可推测 MHC 磷酸化修饰在肌原纤维蛋白整体磷酸化修饰中占比较小。高星等^[23]在对羊背最长肌肌肉的肌球蛋白重链实验中, 同样发现磷酸化水平在 0~72 h 内呈先上升后下降趋势。

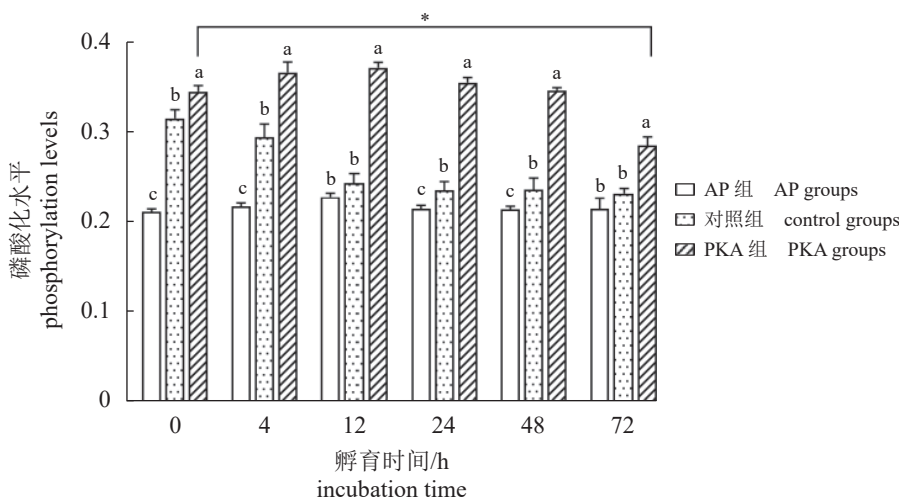
肌动蛋白磷酸化水平变化 对图 3-a 中 I、II 进行光密度值分析, 不同酶处理后肌动蛋白的磷酸化水平随时间变化的结果如图 3-b 所示。对照组肌动蛋白磷酸化水平在 0~72 h 内逐渐下降, 最后趋于稳定, 与“体外蛋白质磷酸化水平分析”结果中对照组肌原纤维蛋白整体磷酸化水平变化趋势一致。除试验初期 (0 h) 外, 在孵育过程中 (0~72 h), PKA 组肌动蛋白磷酸化水平均显著高于 ($P<0.05$) 对照组以及 AP 组, 且变化趋势也同肌原纤维蛋白整体磷酸化水平一样呈先上升 (0~



(a)



(b)



(c)

图1 AP组、PKA组和空白对照组在不同孵育时间下的磷酸化水平

(a) Pro-Q Diamond 染色; (b) SYPRO Ruby 染色; (c) 磷酸化水平, 不同小写字母表示组内差异显著 ($P < 0.05$), "*"代表横线指向的两组差异显著 ($P < 0.05$), 下同; (a) 与 (b) 右侧的序号为电泳条带编号。

Fig. 1 Phosphorylation level analysis of AP, PKA group and control group under different incubation time

(a) Pro-Q Diamond staining, (b) SYPRO Ruby staining, (c) determination of phosphorylation level in three groups, values with different lowercase letters mean significant differences within groups ($P < 0.05$), "*" denotes a significant difference between the two groups pointed to by the horizontal line ($P < 0.05$), the same below; the numbers on the right side of (a) and (b) are the serial numbers of electrophoretic bands.

12 h)后下降(12~72 h)趋势。类似的, AP组在孵育过程中(0~72 h), 肌动蛋白磷酸化水平均显著低于 ($P < 0.05$) 对照组和PKA组, 呈先升(0~12 h)

后降(12~72 h)趋势。实验结果表明, PKA和AP可以作用于肌动蛋白, 有效改变其磷酸化修饰水平。

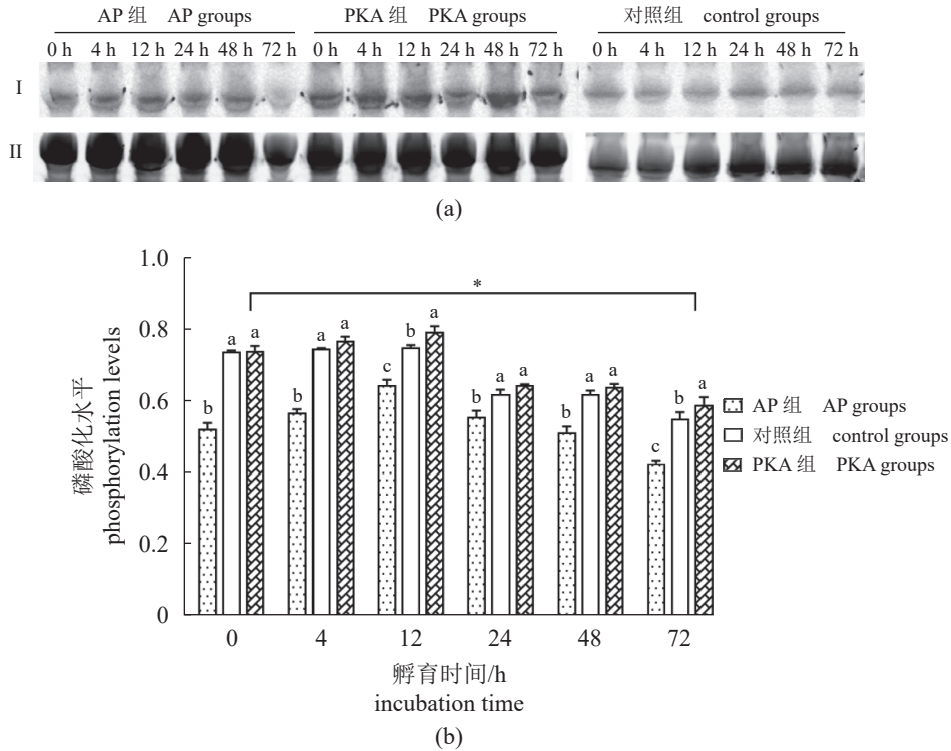


图 2 不同酶孵育过程中肌球蛋白重链的磷酸化水平

(a) I. Pro-Q Diamond 染色, II. SYPRO Ruby 染色图, (b) 不同孵育时间点肌球蛋白重链的磷酸化水平。

Fig. 2 Phosphorylation level of myosin heavy chain during different enzyme incubations

(a) I. Pro-Q Diamond staining, (a) II. SYPRO Ruby staining graph, (b) phosphorylation level of myosin heavy chain at different incubation time points.

2.3 ATP 对肌原纤维蛋白质整体磷酸化水平的影响

ATP 对肌原纤维蛋白质整体磷酸化水平的影响 结果显示, 在外源添加 0.3 mol/L ATP 后, 肌原纤维蛋白整体磷酸化水平 (46.00 ± 0.00) 显著高于 ($P < 0.05$) 空白对照组 (0.42 ± 0.01) (图 4), 说明由于该浓度 ATP 的加入, 肌原纤维蛋白的磷酸化水平提高, 在体外适量浓度的 ATP 可能改变蛋白质修饰状态。此外, 试验还发现 0.1 mol/L ATP 溶液与 0.3 mol/L ATP 溶液分别与罗非鱼肉混合后, 二者的蛋白磷酸化水平也存在显著差异, 0.3 mol/L ATP 处理过后的磷酸化水平显著高于后者 ($P < 0.05$), 这说明蛋白质磷酸化修饰水平对于 ATP 存在一定的浓度依赖性。有学者发现, 加大 ATP 的含量会抑制肌肉中钙离子的释放, 而 Ca^{2+} 会对 μ -钙蛋白酶活性产生影响, μ -钙蛋白酶活性降低后, 肌肉中的结构蛋白如肌钙蛋白 T 等的降解必然会减少^[24-25]。此外, 糖酵解以及蛋白激酶均会影响肌肉中 ATP 的含量, 这意味着蛋白质的磷酸化水平也可能受到影响^[26]。

ATP 处理对 MHC 和肌动蛋白磷酸化水平的影响 如图 5 所示, (a) I、(a) II、(c) 分别代表 MHC 的 Pro-Q 染色、Ruby 染色图和磷酸化水平; (b) I、(b) II、(d) 分别代表肌动蛋白 Pro-Q 染色、Ruby 染色图和磷酸化水平。从 (c) 中可看出, 当 ATP 的浓度为 0.1、0.2 mol/L 时, MHC 和肌动蛋白磷酸化水平虽高于对照组, 但效果并不显著, ATP 浓度的大小对磷酸化有一定影响。当 ATP 浓度为 0.3 mol/L 时, MHC 和肌动蛋白的磷酸化水平均显著高于对照组 (未添加 ATP) ($P < 0.05$), 说明该浓度下, ATP 可以促进 MHC 和肌动蛋白磷酸化, ATP 成为影响蛋白质磷酸化修饰的一个重要因素。无论是肌原纤维蛋白整体磷酸化水平还是 MHC 和肌动蛋白等单个蛋白条带分析, 都验证了 ATP 在磷酸化修饰过程中具有重要作用。

3 讨论

大多数研究表明, 蛋白质磷酸化修饰通过调节糖酵解与肌原纤维蛋白降解速率、调节肌球蛋白解离程度及肌红蛋白氧化还原氧化性等方式造

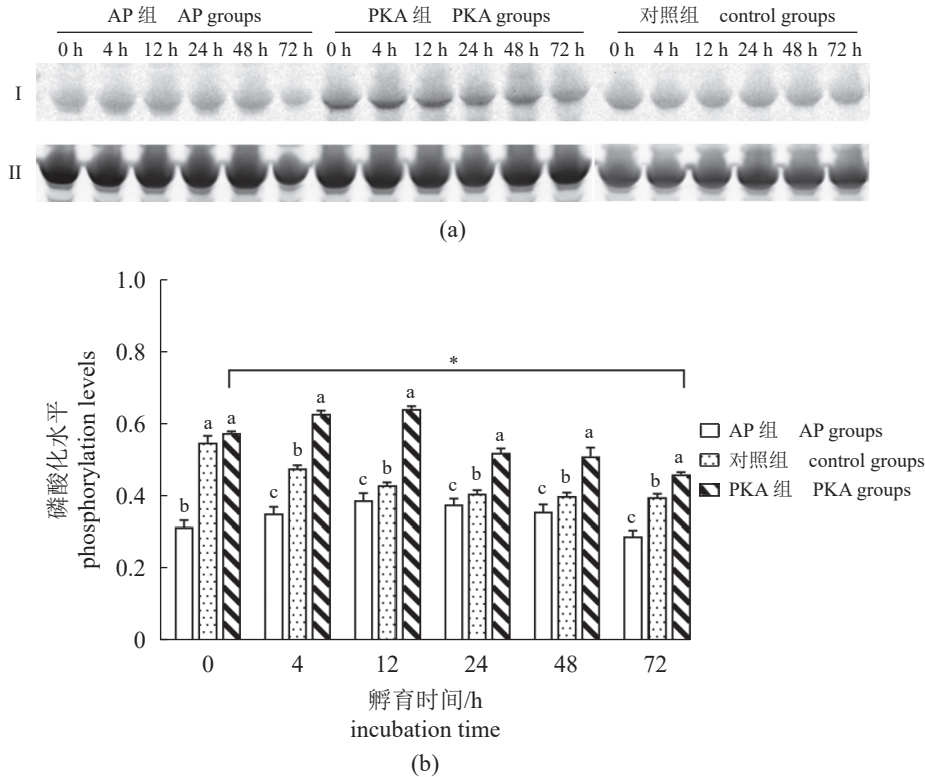


图3 不同酶孵育过程中肌动蛋白的磷酸化水平

(a) I. Pro-Q Diamond 染色, II. SYPRO Ruby 染色图, (b) 肌动蛋白的磷酸化水平。

Fig. 3 Phosphorylation levels of actin during different enzyme incubations

(a) I. Pro-Q Diamond staining, II. SYPRO Ruby staining graph, (b) phosphorylation level of actin at different incubation time points.

成水产品质构、色差及持水性等品质的变化。Sun 等^[27]研究了虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 横纹肌和平滑肌间磷酸化蛋白质差异, 确定了横纹肌糖酵解相关的特异磷酸化位点, 解析了磷酸化修饰调节 PYGM、GPI 与 PFK 等糖酵解酶活性介导的扇贝肌肉品质形成的分子机制。Chen 等^[28]在探讨草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肉硬度差异形成的机制中发现, 烯醇化酶与果糖二磷酸酯醛缩酶的磷酸化修饰对草鱼硬度的提升发挥作用, 肌原纤维蛋白及紧密连接点的磷酸化修饰提高了草鱼肉的硬度。Zhang 等^[29]研究了大西洋鳕 (*Gadus morhua*) 抽吸导致的宰前应激与宰后贮藏时间影响下的鱼肉蛋白质磷酸化水平变化情况, 结果表明肌原纤维蛋白的磷酸化水平要高于肌浆蛋白, 宰前应激影响了热休克蛋白和糖酵解途径相关代谢酶类磷酸化状态。Zhang 等^[30]探讨了不同磷酸化修饰水平对缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) 肌原纤维蛋白功能特性和胶凝特性的作用机制时发现, 磷酸盐介导肌原纤维蛋白发生的不同水平的磷酸化能够通过离子相互作用和静电作用改善蛋白质的交联, 从而最终改善缢蛭蛋白质的胶凝特性。

Yu 等^[12]研究发现, 罗非鱼肌原纤维蛋白磷酸化与其内聚力和持水性呈负相关、与硬度和 Ca²⁺-ATP 酶活性呈正相关, 磷酸化修饰通过调节肌动蛋白的解离速率而影响罗非鱼的品质。

本研究中, 肌原纤维蛋白和 PKA、AP 孵育的结果表明, PKA 可促进肌原纤维蛋白磷酸化修饰, 而 AP 使其去磷酸化。早前, Li 等^[31]发现 μ-钙蛋白酶对经过 AP 处理的肌原纤维蛋白的降解程度大于未经任何处理的蛋白质, 提出去磷酸化促进蛋白水解, 并可能在调节 μ 钙蛋白酶活性方面发挥积极作用。进一步的研究表明, AP 去磷酸化的肌浆蛋白的 μ-钙蛋白酶活性更高。Du 等^[32]通过研究 PKA 和 AP 对 μ-钙蛋白酶的影响, 发现 PKA 的磷酸化和 AP 的去磷酸化都正向调节钙蛋白酶 μ 活性, PKA 对 μ 钙蛋白酶的磷酸化改善了其降解并导致活化, 而 AP 则诱导蛋白质中除磷酸基团, 降低磷酸化水平。实验过程中所构建的高磷酸化水平组 (PKA 组)、中磷酸化水平组 (对照组) 和低磷酸化水平组 (AP 组) 在磷酸化水平上具有显著差异, 可为后续从蛋白质磷酸化水平出

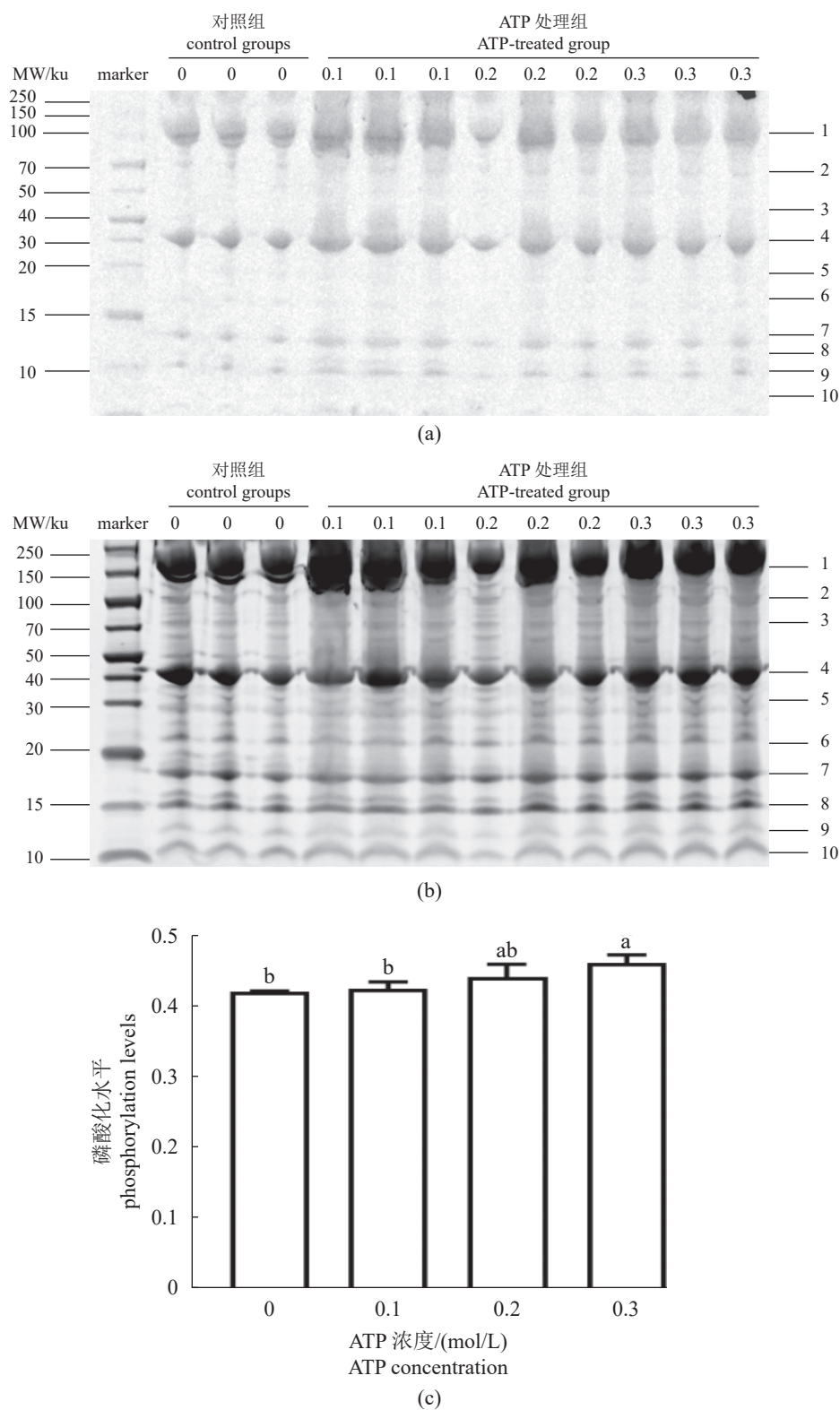


图 4 不同 ATP 含量处理后罗非鱼肌肉原纤维蛋白的磷酸化水平

(a) Pro-Q Diamond 染色, (b) SYPRO Ruby 染色, (c) 不同 ATP 含量处理后蛋白质磷酸化水平, (a) 与 (b) 右侧的序号为电泳条带编号。

Fig. 4 Phosphorylation levels of tilapia meat myofibrillar proteins after treatment with different ATP levels

(a) Pro-Q Diamond staining, (b) SYPRO Ruby staining, (c) protein phosphorylation levels after treatment with different ATP contents; the numbers on the right side of (a) and (b) are the serial numbers of electrophoretic bands.

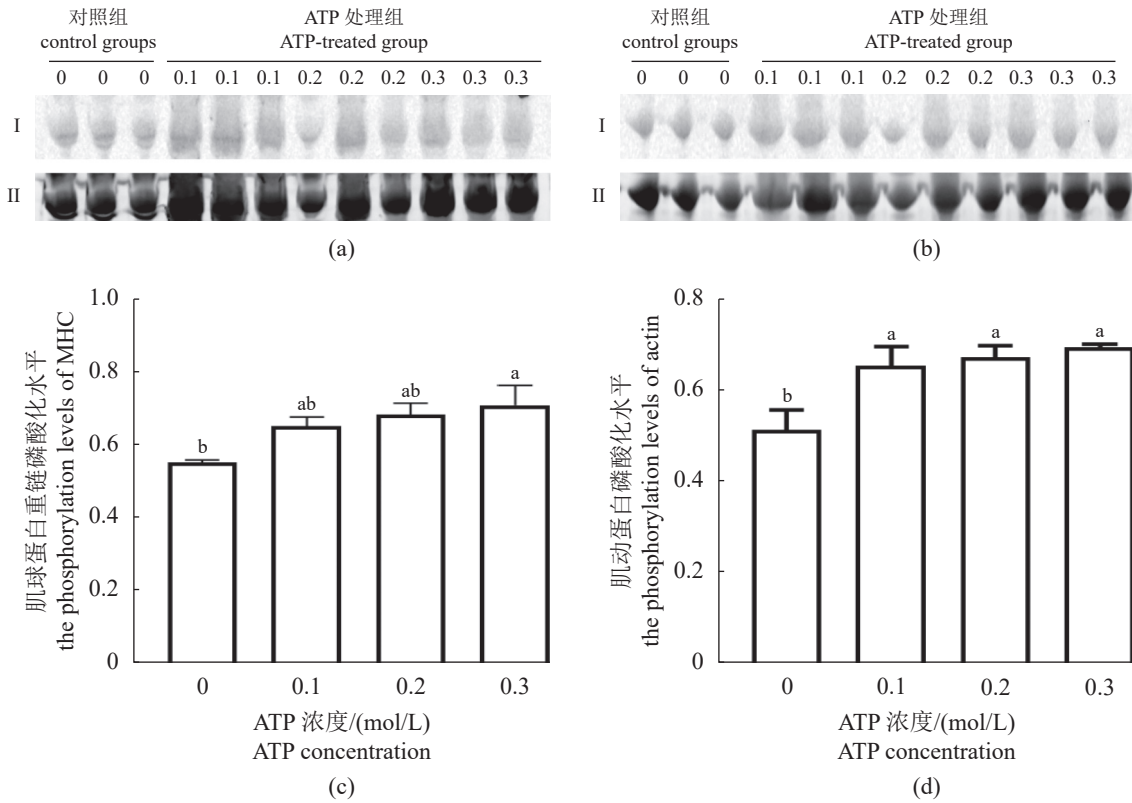


图 5 ATP 处理对 MHC 和肌动蛋白磷酸化水平的影响

(a) I. 肌球蛋白重链 Pro-Q Diamond 染色, II. SYPRO Ruby 染色图; (b) I. 肌动蛋白 Pro-Q Diamond 染色, II. SYPRO Ruby 染色图; (c) 不同含量 ATP 处理下肌球蛋白重链的磷酸化水平; (d) 不同含量 ATP 处理下肌动蛋白的磷酸化水平。

Fig. 5 Effects of ATP treatment on the phosphorylation levels of MHC and actin

(a) I. MHC Pro-Q Diamond staining, II. SYPRO Ruby staining graphs; (b) I. actin Pro-Q Diamond staining, II. SYPRO Ruby staining graphs; (c) the phosphorylation levels of MHC under the treatment of different contents of ATP; (d) the phosphorylation levels of actin under the treatment of different contents of ATP.

发研究调控肌肉品质提供模型参考。此外, 该研究还分别分析了 MHC 和肌动蛋白在孵育过程中的磷酸化水平变化, 同样发现 PKA 和 AP 可有效改变其磷酸化状态。

ATP 是一种重要的能量来源, 在磷酸化翻译后修饰中作为关键底物, 为蛋白质提供磷酸化基团^[33]。死后肌肉中的 ATP 含量是影响蛋白质磷酸化水平的关键因素。有研究报道 ATP 在体外的代谢过程中参与肉质的形成, 此外还发现肌肉的持水性与 ATP 之间存在联系^[34]。在外源添加 ATP 后, 结果显示肌原纤维蛋白整体磷酸化水平显著高于空白对照组, 且分别对 MHC 和肌动蛋白所属条带分析, 发现 ATP 可以促进 MHC 和肌动蛋白磷酸化。此外, 发现蛋白质磷酸化修饰水平对于 ATP 存在浓度依赖性。Ren 等^[21]通过实验也发现, ATP 在绵羊死后肌肉蛋白质磷酸化过程中发挥了重要作用。有研究提出, 肌原纤维蛋白发生磷酸化修饰后可能会减少内源性蛋白酶对它的降解程

度, 例如, μ -钙蛋白酶对磷酸化的肌原纤维蛋白的敏感性降低^[31]。故可认为 ATP 通过调控蛋白质磷酸化修饰的水平, 进而影响蛋白质的降解, 从而影响肉质变化。近年来, 磷酸化修饰引起的水产品品质变化已逐渐被研究人员重视, 开展外源因素对水产品肌原纤维蛋白磷酸化水平的影响方面的研究, 可为探明水产品品质变化机制与新的调控策略建立提供新的思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Li X, Zhang D Q, Ren C, *et al.* Effects of protein posttranslational modifications on meat quality: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 289-331.

[2] 王文琪, 张雅玮, 李加慧, 等. 蛋白质磷酸化对宰后肉质影响研究进展 [J]. *食品科学*, 2023, 44(9): 221-

230.
Wang W Q, Zhang Y W, Li J H, *et al.* Research progress on the effect of protein phosphorylation on post-mortem meat quality[J]. *Food Science*, 2023, 44(9): 221-230 (in Chinese).
- [3] Chen L J, Li X, Ni N, *et al.* Phosphorylation of myofibrillar proteins in post-mortem ovine muscle with different tenderness[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(5): 1474-1483.
- [4] 彭喆, 侯虎, 冯雁临, 等. 磷酸化与钙交联处理对刺参胶原聚集体凝胶特性的影响 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 190-195.
Peng Z, Hou H, Feng Y L, *et al.* Effects of phosphorylation and calcium cross-linking on the gel properties of sea cucumber collagen aggregates[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2015, 31(10): 190-195 (in Chinese).
- [5] Chen L, Li Z, Li X, *et al.* The effect of sarcoplasmic protein phosphorylation on glycolysis in postmortem ovine muscle[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(12): 2714-2722.
- [6] Chen L, Bai Y Q, Everaert N, *et al.* Effects of protein phosphorylation on glycolysis through the regulation of enzyme activity in ovine muscle[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 537-544.
- [7] Yang Y Y, Han L, Yu Q L, *et al.* Phosphoproteomic analysis of *Longissimus lumborum* of different altitude yaks[J]. *Meat Science*, 2020, 162: 108019.
- [8] 相悦, 孙承锋, 李来好, 等. 花鲈冰藏过程中肌原纤维蛋白生化特性与新鲜度变化的相关性 [J]. *水产学报*, 2021, 45(2): 283-295.
Xiang Y, Sun C F, Li L H, *et al.* Correlation between changes in freshness and protein biochemical properties of *Lateolabrax japonicus* during iced storage[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 283-295 (in Chinese).
- [9] 周进, 赵前, 刘俊荣, 等. 鱼贝类鲜活品质调控机制研究进展 [J]. *水产科学*, 2022, 41(2): 316-324.
Zhou J, Zhao Q, Liu J R, *et al.* Freshness quality regulation of fish and shellfish: a review of research progress[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(2): 316-324 (in Chinese).
- [10] Tulli F, Fabbro A, D'Agaro E, *et al.* The effect of slaughtering methods on actin degradation and on muscle quality attributes of farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(11): 7182-7190.
- [11] Yang F, Jia S N, Liu J X, *et al.* The relationship between degradation of myofibrillar structural proteins and texture of superchilled grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillet[J]. *Food Chemistry*, 2019, 301: 125278.
- [12] Yu Y, Wei Y, Chen S J, *et al.* Correlation analysis of phosphorylation of myofibrillar protein and muscle quality of tilapia during storage in ice[J]. *Food Chemistry*, 2024, 451: 139502.
- [13] Ryder J W, Lau K S, Kamm K E, *et al.* Enhanced skeletal muscle contraction with myosin light chain phosphorylation by a calmodulin-sensing kinase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20447-20454.
- [14] Kurosawa M. Phosphorylation and dephosphorylation of protein in regulating cellular function[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 1994, 31(3): 135-139.
- [15] Shiraha H, Glading A, Chou J, *et al.* Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase a phosphorylation of m-calpain[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(8): 2716-2727.
- [16] Okitani A, Ichinose N, Itoh J, *et al.* Liberation of actin from actomyosin in meats heated to 65 °C[J]. *Meat Science*, 2009, 81(3): 446-450.
- [17] 高星, 李欣, 李铮, 等. 肌动球蛋白磷酸化对其解离的影响 [J]. *食品科学*, 2017, 38(9): 21-26.
Gao X, Li X, Li Z, *et al.* Effect of phosphorylation on actomyosin dissociation[J]. *Food Science*, 2017, 38(9): 21-26 (in Chinese).
- [18] 陈立娟, 李欣, 李铮, 等. 蛋白质磷酸化调控羊肉肌原纤维蛋白的功能 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(7): 1360-1370.
Chen L J, Li X, Li Z, *et al.* Protein phosphorylation on the function of myofibrillar proteins in mutton muscle[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(7): 1360-1370 (in Chinese).
- [19] Wang Y, Li X, Li Z, *et al.* Changes in degradation and phosphorylation level of titin in three ovine muscles during postmortem[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(4): 913-920.
- [20] Huang H G, Larsen M R, Karlsson A H, *et al.* Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in

- postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences[J]. *Proteomics*, 2011, 11(20): 4063-4076.
- [21] Ren C, Hou C L, Zhang D Q, *et al.* ATP regulates the phosphorylation and degradation of myofibrillar proteins in ground ovine muscle[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(1): 311-318.
- [22] Nakamura A, Xie C, Zhang Y, *et al.* Role of non-kinase activity of myosin light-chain kinase in regulating smooth muscle contraction, a review dedicated to Dr. Setsuro Ebashi[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(1): 135-143.
- [23] 高星, 李欣, 李铮, 等. 宰后肌肉中肌球蛋白磷酸化调控肌动球蛋白解离作用机制 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(16): 3199-3207.
- Gao X, Li X, Li Z, *et al.* The mechanism of myosin phosphorylation regulating actomyosin dissociation of skeletal muscle during postmortem[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(16): 3199-3207 (in Chinese).
- [24] Du M T, Li X, Li Z, *et al.* Phosphorylation inhibits the activity of μ -calpain at different incubation temperatures and Ca^{2+} concentrations *in vitro*[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 649-655.
- [25] Huang H G, Larsen M R, Lametsch R. Changes in phosphorylation of myofibrillar proteins during postmortem development of porcine muscle[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(4): 1999-2006.
- [26] Li X H, Wang L R, Li Y H, *et al.* Calcium regulates motility and protein phosphorylation by changing cAMP and ATP concentrations in boar sperm *in vitro*[J]. *Animal Reproduction Science*, 2016, 172: 39-51.
- [27] Sun X J, Li L, Zhang T S, *et al.* Identification and characterization of phosphoproteins in the striated and smooth adductor muscles of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131242.
- [28] Chen L J, Liu J, Kaneko G, *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis of soft and firm grass carp muscle[J]. *Food Chemistry*, 2020, 303: 125367.
- [29] Zhang L T, Li Q, Sørensen J S, *et al.* Protein phosphorylation profile of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in response to pre-slaughter pumping stress and post-mortem time[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134234.
- [30] Zhang Q, Hou Y K, Liu X H, *et al.* Improvement in the gelling properties of myofibrillar protein from the razor clam (*Sinonovacula constricta*) through phosphorylation and structural characterization of the modified protein[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 20: 101006.
- [31] Li Z, Li X, Gao X, *et al.* Phosphorylation prevents *in vitro* myofibrillar proteins degradation by μ -calpain[J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 455-462.
- [32] Du M T, Li X, Li Z, *et al.* Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ -calpain activity[J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 33-39.
- [33] Humphrey S J, James D E, Mann M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015, 26(12): 676-687.
- [34] Batlle N, Aristoy M C, Toldrá F. ATP metabolites during aging of exudative and nonexudative pork meats[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(1): 68-71.

Effects of ATP content and exogenous enzyme addition on the phosphorylation level of myofibrillar protein in tilapia

YU Ye^{1,2}, WEI Ya^{1,3}, CHEN Shengjun^{1,3}, HUANG Hui^{1,3}, CEN Jianwei^{1,3}, PAN Chuang^{1,3},
LI Chunsheng^{1,3}, WANG Di^{1,3}, WANG Yueqi^{1,3}, FENG Yang^{1,3}, ZHAO Yongqiang^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Key Laboratory of Efficient Utilization and Processing of Marine Fishery Resources of Hainan Province,
Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572000, China)

Abstract: Protein phosphorylation modification can affect muscle quality. In order to investigate the effect of exogenous enzyme addition on the protein phosphorylation level of tilapia myofibrillar protein, tilapia myofibrillar protein solution was incubated in vitro by adding protein kinase A (PKA) and alkaline phosphatase (AP), respectively, and changes in phosphorylation level were determined by dodecyl sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and fluorescence staining at different time intervals. In addition, the effect of adenosine triphosphate (ATP) on tilapia muscle was investigated by immersing the muscle in different concentrations of ATP solution to determine the level of myofibrillar fibrillar protein phosphorylation. The results showed that from 0 to 72 h, the phosphorylation level of PKA group was significantly higher than that of control group and AP group, and the overall phosphorylation level of PKA group increased from 0.35 ± 0.01 at 0 h to 0.37 ± 0.01 at 12 h, and then decreased to 0.29 ± 0.01 at 72 h, with a general trend of increasing and then decreasing. In addition, the phosphorylation level of myosin heavy chain and actin phosphorylation level decreased from 0.73 ± 0.01 and 0.86 ± 0.01 at 0 h to 0.58 ± 0.02 and 0.68 ± 0.01 at 72 h, respectively ($P<0.05$). Phosphorylation levels were significantly different in all three groups when incubation time was 0, 4, 24 and 48 h. After addition of 0.3 mol/L exogenous ATP, the results showed that the overall phosphorylation level of myofibrillar proteins (0.46 ± 0.001) was significantly higher than that of the control group (0.42 ± 0.01). PKA promotes phosphorylation modification of myofibrillar proteins in tilapia, while alkaline phosphatase dephosphorylates them. It was shown that ATP content, PKA and AP activity levels in the muscle of slaughtered tilapia were key factors affecting the level of protein phosphorylation. This study may provide a theoretical basis for exploring the mechanism of quality change and regulatory strategies in tilapia.

Key words: tilapia; myofibrillar protein; protein phosphorylation; protein kinase A; alkaline phosphatase; ATP

Corresponding author: ZHAO Yongqiang. E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32372257); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-46); Natural Science Foundation of Hainan Province (323MS122); Joint Project of Hainan Science and Technology Program and Sanya Yazhou Bay Science and Technology City (2021CXLH0006); Guangdong Provincial Science and Technology Programs (2023B0202010017); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD78)