

文章编号: 1000-0615(2017)06-0836-09

DOI: 10.11964/jfc.20160810521

皱纹盘鲍副肌球蛋白的分离纯化及初步性质研究

游银川¹, 张凌晶^{1,2}, 颜龙杰¹, 翁凌^{1,2}, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2*}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 为了研究鲍鱼肌原纤维中副肌球蛋白(PM)的性质, 以皱纹盘鲍为原料, 采用硫酸铵盐析和羧基磷灰石柱层析相结合的方法, 从肌肉中纯化得到PM。利用肽质量指纹图谱测定其内部肽片段氨基酸序列; 采用双向电泳测定其等电点; 用圆二色谱研究其二级结构特征, 进一步利用红外光谱对其官能团进行表征。SDS-PAGE结果显示, PM分子量约为97.0 ku。肽质量指纹图谱分析获得36条肽段共403个氨基酸残基, 与盘鲍和太平洋牡蛎PM的一致性分别为99.7%和72.0%, 表明纯化蛋白确为PM。双向电泳测得PM等电点约为5.4, 证明其为一种酸性蛋白。圆二色谱结果显示, PM溶液在192 nm处有一正吸收峰, 在208和223 nm处各有一负吸收峰, 具有典型 α -螺旋结构的特征谱峰型; 其热变性温度为58.1 °C。红外光谱分析结果进一步证实, PM具有完整的 α 螺旋结构。对鲍鱼PM理化特性进行研究, 可为鲍鱼质构相关研究及鲍鱼制品深加工提供一定的理论基础。

关键词: 皱纹盘鲍; 副肌球蛋白; 肽质量指纹图谱; 双向电泳; 圆二色谱

中图分类号: TS 254.1

文献标志码: A

鲍鱼属软体动物门(Mollusca), 腹足纲(Gastropoda), 原始腹足目(Archaeogastropoda), 鲍科(Haliotidae), 鲍属(*Haliotis*)。鲍鱼以其独特的口感、风味和均衡的营养价值位列“海产八珍”之首。随着经济发展和人民生活水平的提高, 鲍鱼制品越来越受到消费者青睐, 已成为重要的海洋经济物种。据统计, 2014年中国鲍鱼总产量达12万 t, 较2013年增长近4.5%^[1]。

鲍鱼肌肉主要由肌原纤维蛋白(40%~50%)和胶原蛋白(20%~35%)组成^[2], 二者的紧密结合使得鲍鱼肌肉具有独特的质构特性^[3]。与其他无脊椎动物肌原纤维蛋白组成相似, 鲍鱼肌原纤维蛋白主要包括副肌球蛋白(paramyosin, PM)、肌动蛋白(actin)、肌球蛋白(myosin)、原肌球蛋白(tropomyosin, TM)和肌钙蛋白(troponin)。研究表明, 作为鲍鱼肌肉主要结构蛋白, 肌原纤维蛋白和胶原蛋白在加工过程中的生化变化, 对其肌肉硬度、黏弹性和咀嚼性等有重要影响^[4-5]。PM作为

无脊椎动物特有蛋白, 在鲍鱼肌原纤维蛋白中含量最高, 占比达35.8%。Sano等^[6]报道, 少量PM能够显著增加无脊椎动物肌肉的凝胶形成能力, 使得制品具有更好的弹性和黏结性。Ehara等^[7]研究发现, PM含量的增加会导致凝胶制品质地更为坚硬。

目前, 国内外有关鲍鱼PM的研究相对较少。Suzuki等^[8]从盘鲍(*Haliotis discus discus*)中发现一种和原肌球蛋白具有免疫交叉反应的新型过敏原, 鉴定其为PM, 并进一步利用分子生物学技术对其进行克隆、表达和免疫原性分析证实^[9]。Zhu等^[10]通过SDS-PAGE观察到皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)肌肉在热处理过程中, 可提取的PM随着温度的升高逐渐减少, 而在50~80 °C范围内, 制品的黏弹性呈上升趋势。

本实验以皱纹盘鲍为原料, 采用盐析—柱层析方法, 从肌肉中纯化PM, 对其等电点、热变性温度和傅立叶红外光谱等理化性质进行研

收稿日期: 2016-08-29 修回日期: 2017-03-13

资助项目: 国家自然科学基金(31471640); 海洋公益性行业专项(201305015)

通信作者: 曹敏杰, E-mail:mjcao@jmu.edu.cn

究, 旨在了解鲍鱼PM的特点, 为鲍鱼深加工提供一定理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活皱纹盘鲍购于福建厦门高崎水产市场, 平均体质量(70.0±3.0) g, 即杀后取其肌肉, 立即使用或冻存于-70 °C待用。

羟基磷灰石层析柱(CHT-II Cartridge)、两性电解质、碘乙酰胺(IAA)、二硫苏糖醇(DTT)和IPG胶条, 美国Bio-Rad公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA), 美国Sigma公司; 乙腈、三氟乙酸, 英国Merck公司; 质谱用标准分子量, 美国AB SCIEX公司; 蛋白质标准分子量, 立陶宛Fermentas公司; 预染标准蛋白, 美国New England Biolabs公司; β -巯基乙醇, 上海生工生物有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PT-2100组织捣碎机, 瑞士Kinematica公司; Avanti JA-25高速冷冻离心机, 美国Beckman公司; 蛋白质电泳装置, 美国Bio-Rad公司; Box凝胶成像仪, 英国Syngene公司; 5800 MALDI-TOF/TOF质谱仪, 美国AB SCIEX公司; EttanIPGphor 3等电聚焦电泳仪, 美国GE Healthcare公司; Chirascan圆二色谱仪, 英国Applied Photophysics公司; Nicolet is 50红外光谱仪, 美国Thermo公司。

1.3 实验方法

PM的分离纯化 实验过程中, 除特别说明外, 所有操作均在冰上或4 °C下进行。蛋白纯化参照Suzuki等^[8]方法, 并略作改进: 将鲍鱼肌肉洗净、切碎, 加入其质量10倍体积的10 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS)(含0.15 mol/L NaCl和0.5 mmol/L L-半胱氨酸, pH 6.8), 组织捣碎, 7000 r/min离心10 min, 弃上清液, 重复4次。所得沉淀加入适量缓冲液A (10 mmol/L PBS含0.5 mol/L NaCl和0.1% β -巯基乙醇, pH 6.8), 充分溶解。7000 r/min离心10 min, 收集上清液, 加入MgCl₂至终浓度为1 mmol/L, 搅拌过夜。随后, 11 000 r/min离心30 min, 所得上清液加入(NH₄)₂SO₄至饱和度为10%~25%。4 °C搅拌30 min, 静置2 h后, 9000 r/min离心10 min, 以少量缓冲液A溶解沉淀, 充分透

析后, 上样于预先用缓冲液A充分平衡的羟基磷灰石层析柱, 充分流洗未吸附部分至A₂₈₀为基线, 以10~200 mmol/L缓冲液A对吸附部分进行线性洗脱, 即可得到纯化的PM(图1)。

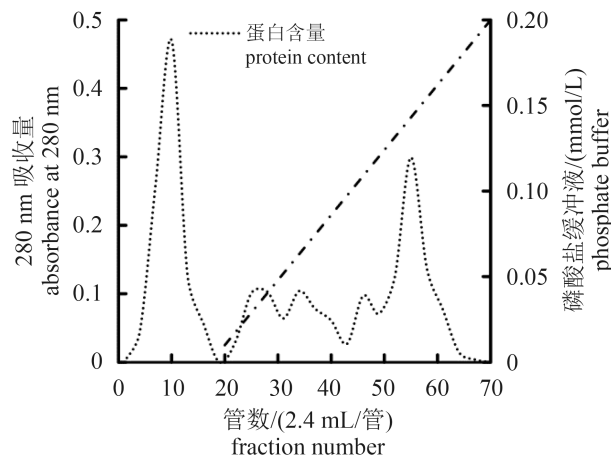


图1 PM的羟基磷灰石柱层析图

Fig. 1 Purification of PM from the *H. discus hannai* by hydroxyapatite chromatography

SDS-PAGE SDS-PAGE主要参考Laemmli^[11]的方法, 采用浓度为10%的分离胶对PM纯化效果进行分析。电泳结束后, 小心取出凝胶, 以考马斯亮蓝对凝胶染色, 脱色至蛋白条带清晰后, 用凝胶成像仪记录结果。

蛋白浓度的测定 柱层析过程中, 通过紫外法测定样品A₂₈₀来检测样品的蛋白含量。其余实验均参照Lowry等^[12]方法测定蛋白含量。

PM的肽质量指纹图谱鉴定 纯化PM经10% SDS-PAGE后, 经考马斯亮蓝染色, 切胶回收蛋白条带。将蛋白条带送往上海中科新生命生物科技有限公司进行肽质量指纹图谱鉴定。

PM的等电点测定 PM等电点测定参照Jiang等^[13]方法, 选取长度为7 cm、pH值范围为3~10的IPG胶条进行等点聚焦, 第二向采用10%的SDS-PAGE, 最终根据样品点位置计算其等电点。

PM的热稳定性分析 吸取80 μ L PM (0.05 mg/mL)于石英样品池扫描, 光径0.5 mm, 波长范围180~260 nm, 步长1 nm, 每一波长扫描0.6 s, 扫描温度20~80 °C, 升温速率0.5 °C/min, 以超纯水作为空白对照进行圆二色谱扫描。采用CDNN软件分析蛋白质二级结构含量, 通过Global软件对热变性温度进行分析。

PM的傅立叶红外光谱分析 取适量PM干粉和溴化钾粉末，充分混匀，放入粉末压片机中压片后，置于傅立叶红外光谱仪中进行扫描。扫描区间600~4000 cm⁻¹，分辨率设置为4 cm⁻¹，用OMNIC分析软件除去背景值。

2 结果

2.1 PM的纯化结果

通过10%~25%饱和度(NH₄)₂SO₄盐析和羟基磷灰石柱层析相结合的方法，从皱纹盘鲍肌肉中分离纯化出一种PM(图1)。结果显示，大量杂蛋白出现在未吸附部分，当磷酸盐缓冲液浓度为0.12 mol/L时，目的蛋白被洗脱下来。对洗脱部分进行SDS-PAGE(图2-a)和Native-PAGE(图2-b)分析，样品均呈现单一条带，表明PM得到高度纯化。同时，以标准蛋白为参照，测得其分子量约为97.0 ku。

2.2 PM的质谱鉴定

纯化样品经10% SDS-PAGE电泳，切胶回收，用胰蛋白酶酶解之后，进行MALDI-TOF/TOF质谱分析。在一级肽指纹图谱中(图3-a)，每个峰代表一种酶解片段，选择信噪比大于50的肽段进行二级质谱分析，在NCBI数据库中对所得数据进行肽段序列检索。

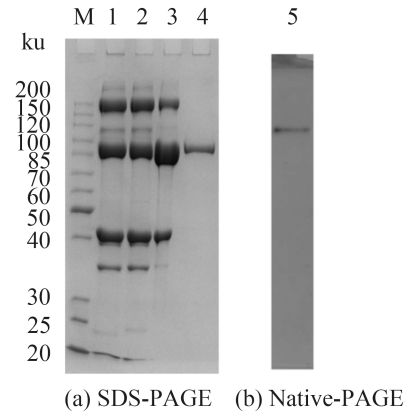


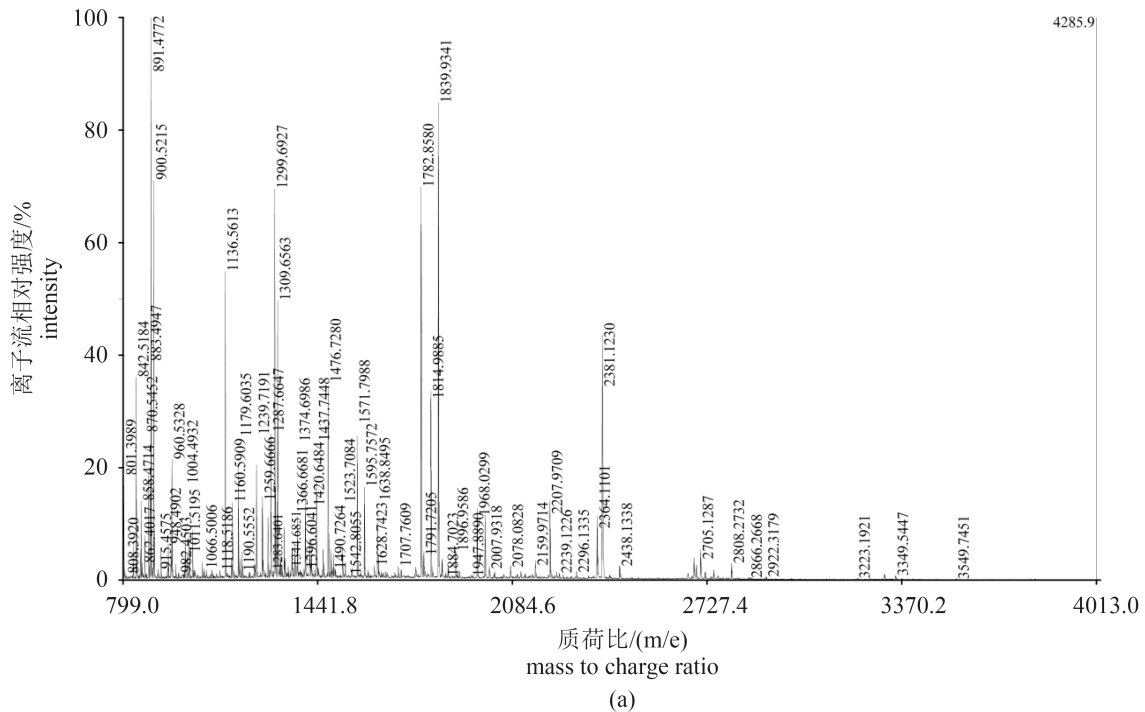
图2 电泳分析

M. 标准蛋白分子量; 1. 肌原纤维蛋白; 2. 10%饱和度硫酸铵上清液; 3. 10%~25%饱和度硫酸铵沉淀; 4. 羟基磷灰石柱层析洗脱部分纯化的PM

Fig. 2 Analysis of the homogeneity of PM by SDS-PAGE (a) and Native-PAGE (b)

M. protein marker; 1. myofibrillar protein; 2. supernatant with 10% saturation of (NH₄)₂SO₄ from the myofibrillar protein; 3. precipitate with 10%-25% saturation of (NH₄)₂SO₄ from the myofibrillar protein; 4. fraction from hydroxyapatite column (purified PM)

本次质谱分析获得36个肽段，共403个氨基酸残基(表1)。肽段序列比对结果显示(图3-b)，分别与无脊椎动物中盘鲍、太平洋牡蛎PM氨基酸序列一致性达99.7%和72.0%，在生物学上表现出较高同源性，证明纯化蛋白确为PM。



(图3 Fig. 3)

表 1 皱纹盘鲍肌肉PM质谱分析获得的肽段序列

Tab. 1 The peptide sequences of PM according to the method of peptide mass fingerprinting

起止序列	start-end	理论值	calculated masses	观察值	observed mass	肽序列	sequence of peptides
18~23		801.3889		801.3979		SYNVYR	
37~48		1459.7388		11 459.7029		IRELEDALDTER	
57~71		1782.8657		1782.8585		NLAEITFYDQVADR	
99~116		1968.0397		1968.0280		DLELAVISHESAEASLRK	
171~180		1017.4960		1017.5049		ADGLQGSVDR	
202~225		2683.3323		2683.3010		LTQENFDLQHQQVQELDSANAALAK	
228~239		1374.6971		1374.6933		SQLQASNDLKR	
240~246		862.3901		862.4016		QLDDES	
269~280		1400.6176		1400.6177		YEESESASTLR	
297~304		1011.5179		1011.5180		FEKELMAK	
319~330		1476.7000		1476.7279		IAQLEDECETLR	
370~380		1286.6699		1286.6722		TLENENGILQR	
381~393		1475.7272		1475.7452		RCDELGAEVSALR	
426~432		845.4475		845.4549		NLSDQLR	
453~467		1762.8752		1762.8295		AQLEMERDSLASQLR	
468~479		1333.623		1333.6195		DTEEALRDAEGK	
480~491		1239.7168		1239.7191		LAAAQAALNQLR	
500~509		1260.6267		1260.6486		EKDEEIDNIR	
511~521		1259.6703		1259.6666		SSARAIEELQR	
522~529		960.5360		960.5319		TLIEVETR	
540~546		924.4785		924.4786		KYETDIR	
573~584		1641.9697		1641.9037		VKELEVLLEEER	
592~599		889.4738		889.4850		GQLSISER	
602~612		1299.6903		1299.6931		IALQQEVEDVR	
613~620		888.4785		888.4848		SLLEAAER	
623~635		1458.6931		1458.6893		KNAENELNDANAR	
636~651		1814.9884		1814.9844		LSELQIQVTALSNDKR	
652~672		2380.0867		2380.1084		RMEADISAMQSDLEDAINAQR	
681~687		891.4683		891.4775		LFNENVR	
707~714		1028.6099		1028.6079		KQLEIEIR	
720~729		1136.5582		1136.5613		LEEAEAFATR	
742~754		1571.8024		1571.7994		IRDLEAELEAEQR	
772~782		1420.6486		1420.6459		EIQMQTEDDRR	
804~820		2055.9651		2055.9849		QIEESEDVANLTMNKYR	
821~832		1437.7445		1437.7443		KAQQLEEADHR	
833~844		1316.6991		1316.6865		ADMAEKNLVAVR	

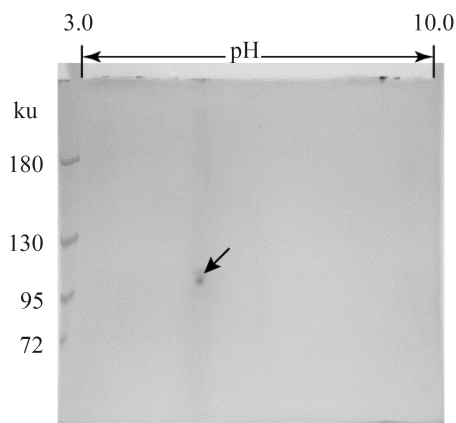


图 4 PM的双向电泳图

Fig. 4 Two-dimensional electrophoresis of purified PM

3 讨论

副肌球蛋白(PM)作为贝类肌原纤维蛋白中的一个特征蛋白, 国内外学者对其的研究报道仍较少。本研究通过硫酸铵盐析与羟基磷灰石柱层析相结合的方法, 从皱纹盘鲍肌肉中获得高纯度PM。对PM进行质谱分析所得36个肽段中, 肽段SYNVYR与Watabe等^[15]从紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)牵缩肌中克隆到的PM N-端非螺旋区部分氨基酸序列相一致, 提示该肽段源于PM的N-端非螺旋区域。进一步研究发现, 该蛋白与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[16]、日本裂体吸虫(Q05870.2, *Schistosoma japonicum*)和地中

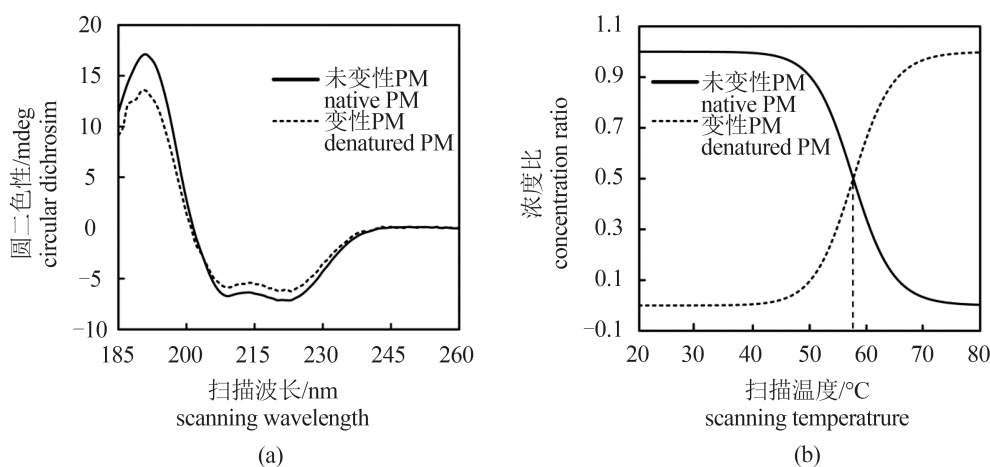


图 5 圆二色谱分析温度对鲍鱼PM二级结构的影响

(a) 温度对PM的影响; (b) PM热变性温度的测定

Fig. 5 Effect of temperature on the secondary structure of PM as detected by CD spectra

(a) the effect of temperature on PM; (b) determination of the Td of PM

表 2 皱纹盘鲍PM傅立叶红外光谱特征吸收峰位置及说明

Tab. 2 General peak assignment of the FTIR spectra of PM

分类 assignment	波数/cm ⁻¹ wave number	说明 ^[14] illustration
酰胺A Amide A	3270.2	N-H伸缩振动 N-H stretch
酰胺B Amide B	2955.9	烯炔C-H和NH ₃ ⁺ 的非对称伸展 C-H stretch and NH ₃ ⁺ asymmetric stretch
酰胺I Amide I	1651.8	C=O伸缩振动与COO ⁻ 相关 C=O stretch coupled with COO ⁻
酰胺II Amide II	1548.3	N-H弯曲振动与C-N伸缩共振 N-H bend vibration coupled with C-N stretch
-	1463.1	CH ₂ 弯曲振动 CH ₂ bend vibration
-	1390.2	COO ⁻ 非对称伸缩振动 COO ⁻ asymmetric stretch
-	1366.1	CH ₂ 摇摆振动 CH ₂ wagging vibration
酰胺III/ Amide III	1231.3	N-H弯曲振动和C-N伸缩共振 N-H bend vibration coupled with C-N stretch
-	1066.4	C-O伸缩振动 C-O stretch

注: -, 无统一名称的光谱区

Notes: -, no common name for the spectral region

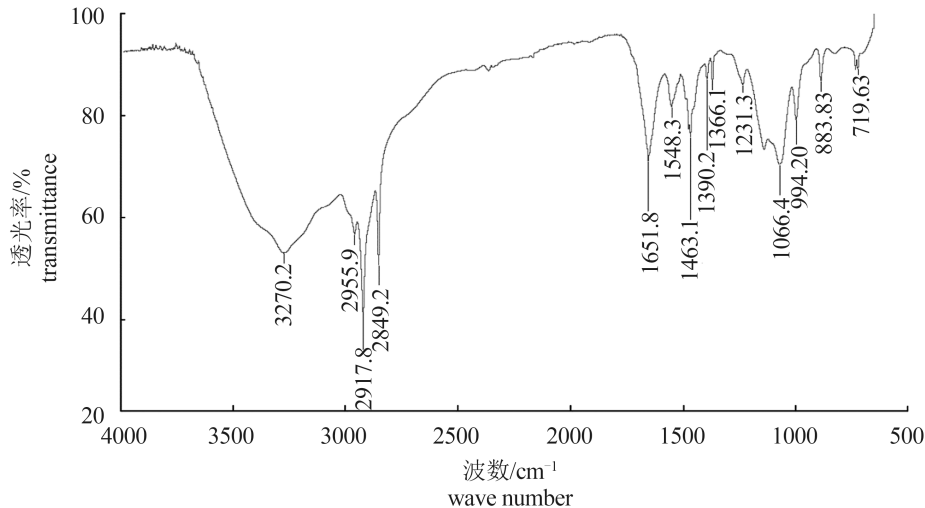


图6 PM的傅立叶红外扫描图谱

Fig. 6 FTIR spectrum of PM

海貽贝(AB016070, *M. edulis*)等不同物种PM具有很高的同源性,表明在生物进化过程中,PM的氨基酸序列能够保持相对稳定。

利用双向电泳获得皱纹盘鲍PM的等电点为5.4。其他无脊椎动物PM的等电点为5.3左右,如盘鲍($pI=5.36$)、合浦珠母贝($gi|472824661$, *Pinctada fucata*)($pI=5.31$)和日本裂体吸虫(Q05870.2)($pI=5.3$)等。需要指出的是,以上PM等电点是通过软件模拟获得,而本研究采用的双向电泳可以同时测出蛋白等电点、分子量及蛋白纯度。王耀耀等^[17]研究指出,当鲍鱼肌原纤维溶液pH低于5.5时,发生明显聚集而导致溶解度急剧下降。这是由于PM占肌原纤维蛋白比例达35.8%,当溶液pH接近其等电点($pH=5.4$)时,蛋白质空间结构的改变和电荷的减少,导致其溶解度降低所致。

皱纹盘鲍PM具有典型的 α -螺旋CD图谱特征,这与已报道的结果^[18-19]相吻合,即PM分子结构由两个完全相同的 α -螺旋相互盘绕而成,在N-端和C-端分别形成短的非螺旋区域。此外,鲍鱼PM热变性温度为58.1 $^{\circ}C$,介于扇贝肌球蛋白热变性温度(41.6~55.0 $^{\circ}C$)与肌动蛋白热变性温度(70.2~79.2 $^{\circ}C$)之间^[20],具有较高的热变性温度。研究表明,无脊椎动物粗肌丝由位于中心的PM和位于表面的肌球蛋白组成,随着温度升高,鲍鱼肌肉PM和肌球蛋白会发生热聚集,对肌肉粘弹性产生重要影响^[10]。PM作为软体动物的第二类重要过敏原,对热相对稳定。但其热

稳定性较原肌球蛋白(TM)差,100 $^{\circ}C$ 抽提鲍鱼肌肉盐溶性蛋白10 min后,PM的含量会因热变性沉淀而大量减少^[8]。因此,为使鲍鱼制品具有良好的质构特性,在加工过程中,应对PM的热变性特点加以充分考虑。

据Sai等^[21]报道,蛋白的酰胺A带出峰位置与N-H伸缩振动的频率密切相关,单一N-H伸缩振动的波数范围通常在3400~3440 cm^{-1} ,而当肽段中N-H基团形成氢键时,其出峰位置会转移到较低波数范围,一般在3300 cm^{-1} 左右。本研究中,PM酰胺A带的出峰位置在波数3270.2 cm^{-1} ,由此表明,PM分子内存在N-H伸缩振动,多数N-H基团已形成氢键,而氢键对于 α -螺旋结构的维持具有重要作用。酰胺B带的形成是由于烯炔C-H和 NH_3^+ 不对称伸缩振动引起的,其出峰波数在2950 cm^{-1} 左右,PM酰胺B带出峰波数为2955.9 cm^{-1} ,符合酰胺B带出峰波数。酰胺I带主要由蛋白质多肽骨架的C=O基团伸缩振动(大约80%)形成,特征频率为1600~1700 cm^{-1} 。PM酰胺I带出峰频率为1651.8 cm^{-1} ,符合酰胺I带出峰波数。酰胺II带主要由蛋白分子内N-H键的弯曲振动(40%~60%)和C-N键伸缩振动(18%~40%)形成,而酰胺III带的形成离不开C-N键的伸缩振动。酰胺I带与蛋白质二级结构密切相关,而酰胺III带能够证明蛋白中螺旋结构的完整存在^[22]。因此,FTIR红外光谱结果表明,本研究纯化的PM具有完整的 α -螺旋结构。

本研究通过盐析—柱层析法,从皱纹盘鲍

肌肉中高度纯化得到一种分子量为97.0 ku, 等电点为5.4的副肌球蛋白(PM)。圆二色谱和傅立叶红外光谱分析结果表明, PM具有完整的 α -螺旋结构, 热变性温度为58.1 °C。实验结果探明了鲍鱼PM理化及结构特征, 有望为鲍鱼加工提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴-2015[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 218.
The People's Republic of China Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. China fishery statistical yearbook-2015[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 218(in Chinese).
- [2] 朱蓓薇. 海珍品加工理论与技术的研究[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
Zhu B W. Research on theory and technology of precious seafood processing[M]. Beijing: Science Press, 2010 (in Chinese).
- [3] Øiseth S K, Delahunty C, Cochet M, *et al.* Why is abalone so chewy? Structural characterization and relationship to textural attributes[J]. Journal of Shellfish Research, 2013, 32(1): 73-79.
- [4] Gao X, Ogawa H, Tashiro Y, *et al.* Rheological properties and structural changes in raw and cooked abalone meat[J]. Fisheries Science, 2001, 67(2): 314-320.
- [5] 游银川, 麻金花, 段雪昆, 等. 皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白的性质研究及抗体制备[J]. 水产学报, 2016, 40(2): 267-277.
You Y C, Ma J H, Duan X K, *et al.* Isolation and characterization of pepsin-soluble collagen from abalone (*Haliotis discus hannai*) and preparation of a polyclonal antibody[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(2): 267-277(in Chinese).
- [6] Sano T, Fnoguchi S, Tsuchiya T, *et al.* Contribution of paramyosin to marine meat gel characteristics[J]. Journal of Food Science, 1986, 51(4): 946-950.
- [7] Ehara T, Nakagawa K, Tamiya T, *et al.* Effect of paramyosin on invertebrate natural actomyosin gel formation[J]. Fisheries Science, 2004, 70(2): 306-313.
- [8] Suzuki M, Kobayashi Y, Hiraki Y, *et al.* Paramyosin of the disc abalone *Haliotis discus discus*: identification as a new allergen and cross-reactivity with tropomyosin[J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 921-926.
- [9] Suzuki M, Shimizu K, Kobayashi Y, *et al.* Paramyosin from the disc abalone *Haliotis discus discus*[J]. Journal of Food Biochemistry, 2014, 38(4): 444-451.
- [10] Zhu B W, Dong X P, Sun L M, *et al.* Effect of thermal treatment on the texture and microstructure of abalone muscle (*Haliotis discus*)[J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(6): 1467-1473.
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [12] Lowry O, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 263-275.
- [13] Jiang Y K, Sun L C, Cai Q F, *et al.* Biochemical characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(13): 8069-8076.
- [14] Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, *et al.* Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*)[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 708-716.
- [15] Watabe S, Iwasaki K, Funabara D, *et al.* Complete amino acid sequence of *Mytilus* anterior byssus retractor paramyosin and its putative phosphorylation site[J]. Journal of Experimental Zoology, 2000, 286(1): 24-35.
- [16] Vinós J, Domingo A, Marco R, *et al.* Identification and characterization of *Drosophila melanogaster* paramyosin[J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 220(3): 687-700.
- [17] 王耀耀, 朱蓓薇, 董秀萍, 等. 鲍鱼腹足肌原纤维蛋白的组成及其性质[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(3): 183-186.
Wang Y Y, Zhu B W, Dong X P, *et al.* Constituent and characterization of myofibrillar protein from abalone[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2011, 30(3): 183-186(in Chinese).
- [18] Cohen C, Parry D A D. A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods[J]. Journal of Structural Biology, 1998, 122(1-2): 180-187.
- [19] Sonobe H, Obinata T, Minokawa T, *et al.* Characterization of paramyosin and thin filaments in the smooth muscle of acorn worm, a member of hemic-hordates[J]. Journal of Biochemistry, 2016, 160(6): 369-379.

- [20] Paredi M E, Tomas M C, Crupkin M. Thermal denaturation of myofibrillar proteins of striated and smooth adductor muscles of scallop (*Zygochlamys patagonica*). A differential scanning calorimetric study[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(4): 830-834.
- [21] Sai K P, Babu M. Studies on *Rana tigerina* skin collagen[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 128(1): 81-90.
- [22] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)[J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 81-89.

Isolation and characterization of paramyosin from abalone (*Haliotis discus hannai*)

YOU Yinchuan¹, ZHANG Lingjing^{1,2}, YAN Longjie¹, WENG Ling^{1,2},
LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to investigate the characterization of paramyosin (PM), PM was purified from the muscle of abalone (*Haliotis discus hannai*) by ammonium sulfate fractionation and hydroxyapatite chromatography. The molecular mass of PM was about 97.0 ku as estimated by SDS-PAGE. Peptide mass fingerprinting of PM obtained 36 peptide fragments with a total of 403 amino acid residues, which were 99.7% and 72.0% identical with PMs from *H. discus discus* and *Crassostres gigas*, respectively. The isoelectric point of PM detected by two-dimensional electrophoresis was approximately 5.4, suggesting it is an acidic protein. Circular dichroism spectrum of PM solution demonstrated a rotatory maximum at 192 nm and two negative peaks at 208 nm and 223 nm, indicating the typical spectral characteristic of α -helix structure. Meanwhile, the denaturation temperature (T_d) of PM was 58.1 °C as determined by circular dichroism spectrum analysis. FTIR spectra further confirmed that PM has intact α -helical structure. The isolation and physicochemical property investigation of PM from the muscle of abalone would provide theoretical foundation for studying proteins related to its texture and for deep-processing of abalone products.

Key words: *Haliotis discus hannai*; paramyosin; peptide mass fingerprinting; two-dimensional electrophoresis; circular dichroism spectrum

Corresponding author: CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Scientific Foundation of China (31471640); Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean(201305015)