

# 温度对东方铃蟾和中华大蟾蜍肌组织 ATP 酶活性的影响

冯照军<sup>①</sup> 季丽萍<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>徐州师范大学生物系 徐州 221116; <sup>②</sup>徐州师范大学体育系 徐州 221009)

**摘要:** 研究了不同温度对东方铃蟾和中华大蟾蜍肌组织中肌球蛋白钙激活 ATP 酶活性的影响。结果表明,从 16℃ 上升到 32℃,两种动物两种肌组织 ATP 酶活性均逐渐升高,但东方铃蟾 ATP 酶活性变化比中华大蟾蜍敏感;从 32℃ 上升到 44℃,ATP 酶活性均下降,但东方铃蟾 ATP 酶活性变化比中华大蟾蜍更敏感;ATP 酶活性的最适温度在 32℃。ATP 酶活性可能与这两种动物的入眠、出眠时间及耐热性有关。

**关键词:** 东方铃蟾;中华大蟾蜍;肌球蛋白钙激活 ATP 酶活性;温度

**中图分类号:** Q493 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2001)05-14-04

## Effects of Temperature on ATPase Activity of Musclar Tissues in the Toads *Bombina orientalis* and *Bufo gargarzians*

FENG Zhao-Jun<sup>①</sup> JI Li-Ping<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>Department of Biology, Xuzhou Normal University Xuzhou 221116;

<sup>②</sup>Department of Physical Education, Xuzhou Normal University Xuzhou 221009, China)

**Abstract:** This paper deals with effects of the different temperature on the myosin Ca<sup>++</sup>-ATPase activity of various musclar tissues of *Bombina orientalis* and *Bufo gargarzians*. The results indicated that the ATPase activity of both animals was going up with the ascent of temperature from 16 ~ 32℃, but the change of ATPase activity of *Bombina orientalis* was more sensitive to the temperature increase than that of *Bufo gargarzians*. The ATPase activity was going down with the ascent of temperature from 32 ~ 44℃, but the change of ATPase activity of *Bombina orientalis* was much more sensitive than that of *Bufo gargarzians*. The optimum temperature for the ATPase of both animals was 32℃. The ATPase activity has probable relation to the time of hibernation, the time of emergence and heat hardiness.

**Key words:** *Bombina orientalis*; *Bufo gargarzians*; Activity of myosin Ca<sup>++</sup>-ATPase; Temperature

变温动物可以通过形态、行为、生理生化等方面的变化来适应环境温度的变动,这已经成为动物生理生态学的主要研究领域之一,国外早在 60 年代就开始了这方面的研究<sup>[1-3]</sup>,国内则始于 80 年代<sup>[4-7]</sup>。郑元林等<sup>[5,6]</sup>研究认为东方铃蟾(*Bombina orientalis*)和中华大蟾蜍(*Bufo gargarzians*)肌组织 Ca<sup>++</sup>-ATPase 活性具有组织

特异性,而且前者的心肌和腓肠肌 ATP 酶活性均低于后者相应组织中 ATP 酶活性,两者心肌 ATP 酶活性均高于腓肠肌 ATP 酶活性;中华大

第一作者介绍 冯照军,41 岁,男,副教授;研究方向:两栖爬行动物学;E-mail: xsdfeng@china.com

收稿日期:2000-06-17,修回日期:2001-06-12

蟾蜍肌组织 ATP 酶活性具有季节性变化。那么,不同的温度对肌组织 ATP 酶活性是否有影响?本文对此进行了测定和比较,旨在从酶分子水平探讨这两种动物对环境温度变化的生化适应性及其生理生态特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

1999年7月在江苏省连云港市云台山捕得东方铃蟾成体12只,同月份在徐州市南郊农田捕得中华大蟾蜍成体12只。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 肌球蛋白液的制备** 处死动物,取心肌和腓肠肌组织各100 mg,参照朱平等<sup>[4]</sup>的方法向5 ml的匀浆器中加入3 ml预冷的提取液(0.05 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液,0.5 mol/L 氯化钾;pH 7.5)、2 ml蒸馏水及剪碎的肌组织,冰浴下匀浆;静置匀浆液2 h后,在0~4℃的冷冻离心机内离心30 min(6 000 r/min);弃去上清液后再加入5 ml提取液,混匀后静置过夜(12 h);同前条件下再次离心30 min,上清液即为肌球蛋白液。

**1.2.2 无机磷的测定** 按不同温度,分别反应得到无机磷待测液:将0.1 ml 0.1 mol/L 氯化钙、0.4 ml 提取液、0.4 ml 50 mmol/L 腺三磷(ATP)及0.1 ml 肌球蛋白液顺序加入20 ml的具塞试管中,加盖并摇匀;分别在16、20、24、28、32、36、40和44℃条件下温浴反应10 min后,立即加入1 ml 20%的三氯乙酸,摇匀终止反应;反应液离心5 min(4 000 r/min),清液即为无机磷待测液。按Pollard<sup>[8]</sup>的方法测定无机磷含量(先作出无机磷标准曲线备查),对照组不加ATP,只多加0.1 ml 提取液,用分光光度计在820 nm处测定无机磷 OD 值,每个样品平行测定4次。

**1.2.3 酶蛋白的测定** 参照Lowry<sup>[9]</sup>的方法测定酶蛋白的含量(先用小牛血清白蛋白作出标准蛋白曲线备查):将0.5 ml 肌球蛋白液与0.5 ml 蒸馏水和1 ml Folin-酚试剂甲混合并摇匀,25℃条件下保温15 min;然后向其中加入3 ml

Folin-酚试剂乙(先将Folin-酚试剂乙原液稀释10倍);摇匀后温浴反应30 min,用分光光度计在540 nm处测定蛋白质 OD 值,每个样品平行测定4次。

ATP 酶活性单位定义为:单位时间内单位重量酶蛋白催化 ATP 水解所释放无机磷的微小分子数( $\mu\text{mol Pi}/\text{mg Protein} \cdot \text{min}$ )。对各组间酶活性值( $\bar{X} \pm SE$ )的差异性进行 *t*-检验,以活性最高值作为相对活性 100%。

## 2 结果

由表1、图1可知,两种动物肌组织 ATP 酶活性均随反应温度不同而异,但变化的特点不同。从16℃上升到32℃时,东方铃蟾 ATP 酶活性呈上升趋势,从32℃上升到44℃,酶活性呈下降趋势;不同肌组织 ATP 酶活性变化的情况不尽相同,从16℃上升到24℃,心肌 ATP 酶活性小幅上升,24℃以上时大幅上升,32℃时达到峰值,从32℃上升到44℃时,ATP 酶活性又大幅下降,44℃时达最低值;从16℃上升到32℃,腓肠肌 ATP 酶活性小幅上升,32℃时达到峰值,从32℃上升到44℃时,ATP 酶活性大幅下降,44℃时为最低值;心肌 ATP 酶活性显著高于腓肠肌 ATP 酶活性( $P < 0.01$ )。中华大蟾蜍心肌与腓肠肌 ATP 酶活性变化特征相似,温度从16℃上升到32℃时,ATP 酶活性逐渐上升,32℃时达到峰值,从32℃上升到44℃时,ATP 酶活性逐渐下降,44℃时达到最低值;心肌 ATP 酶活性与腓肠肌 ATP 酶活性相差不大( $P$

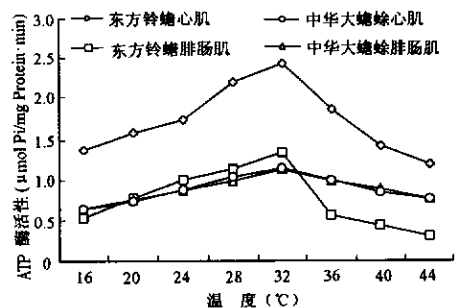


图1 温度对东方铃蟾和中华大蟾蜍心肌和腓肠肌组织 ATP 酶活性的影响

>0.05)。

表 1 不同温度条件下东方铃蟾和中华大蟾蜍肌组织 ATP 酶活性( $n = 12$ )

肌组织	温度(°C)	东方铃蟾		中华大蟾蜍	
		ATP 酶活性( $\bar{x} \pm SE$ )	相对活性(%)	ATP 酶活性( $\bar{x} \pm SE$ )	相对活性(%)
心肌	16	1.367 ± 0.120	56.72 <sup>ns</sup>	0.643 ± 0.047	57.62 <sup>*</sup>
	20	1.570 ± 0.171	65.15 <sup>ns</sup>	0.748 ± 0.039	67.03 <sup>*</sup>
	24	1.729 ± 0.171	71.74 <sup>*</sup>	0.868 ± 0.031	77.78 <sup>*</sup>
	28	2.187 ± 0.146	90.75 <sup>ns</sup>	0.980 ± 0.048	88.17 <sup>*</sup>
	32	2.410 ± 0.165	100 <sup>*</sup>	1.116 ± 0.040	100 <sup>*</sup>
	36	1.852 ± 0.230	76.85 <sup>*</sup>	0.983 ± 0.034	88.08 <sup>ns</sup>
	40	1.408 ± 0.221	58.42 <sup>ns</sup>	0.885 ± 0.036	76.61 <sup>*</sup>
	44	1.180 ± 0.175	48.96	0.765 ± 0.046	68.55
腓肠肌	16	0.536 ± 0.123	40.27 <sup>ns</sup>	0.642 ± 0.029	56.51 <sup>ns</sup>
	20	0.774 ± 0.115	58.15 <sup>ns</sup>	0.737 ± 0.040	64.88 <sup>*</sup>
	24	0.998 ± 0.122	74.98 <sup>ns</sup>	0.876 ± 0.068	77.11 <sup>*</sup>
	28	1.125 ± 0.126	84.52 <sup>ns</sup>	1.035 ± 0.044	91.11 <sup>ns</sup>
	32	1.331 ± 0.157	100 <sup>*</sup>	1.136 ± 0.042	100 <sup>*</sup>
	36	0.564 ± 0.149	42.37 <sup>*</sup>	0.988 ± 0.036	86.97 <sup>*</sup>
	40	0.436 ± 0.147	32.76 <sup>*</sup>	0.839 ± 0.046	73.86 <sup>ns</sup>
	44	0.304 ± 0.134	22.84	0.758 ± 0.041	66.73

ns:  $P > 0.05$ , \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$

### 3 讨论

东方铃蟾和中华大蟾蜍肌组织 ATP 酶活性依赖温度而变化,并呈现一定的种间差异和组织间差异。两种动物两种肌组织 ATP 酶活性在 16~32°C 范围内随温度上升而升高,并在 32°C 时达到最高值,其中,东方铃蟾心肌 ATP 酶活性上升较为明显。虽然东方铃蟾 ATP 酶活性对较低温度(16~24°C)的反应与中华大蟾蜍相似,但对较高温度(24°C 以上)的反应则比中华大蟾蜍敏感,这可能与广泛分布的中华大蟾蜍早出眠(3 月上旬)、晚入眠(11 月上旬)<sup>[10]</sup>和东方铃蟾晚出眠(4 月上旬)、早入眠(9 月下旬)<sup>[11]</sup>的生态习性有关。

温度从 32°C 继续上升时,两种动物肌组织 ATP 酶活性均呈下降趋势,东方铃蟾 ATP 酶活性下降得比中华大蟾蜍更明显。至 44°C 时,东方铃蟾 ATP 酶活性分别下降到最高活性的 49%(心肌)和 23%(腓肠肌),中华大蟾蜍 ATP 酶活性则分别下降到最高活性的 69%(心肌)和 67%(腓肠肌)。结果提示,在 32°C 以上时,东方铃蟾 ATP 酶活性对温度的反应比中华大蟾蜍更敏感,前者 ATP 酶活性下降幅度大于后

者,说明前者对较高温度的耐受性弱于后者,这可能与东方铃蟾在我国仅分布于东北及华北沿海一带的山区水域(水温通常较低),而中华大蟾蜍则为广布种的分布状况有一定关系。另外,从体型上看,东方铃蟾的成熟个体显著小于中华大蟾蜍,前者在 32°C 及以下的各温度段的 ATP 酶活性不同程度地高于后者,该结果与绝大多数动物的代谢规律相符合<sup>[2,12]</sup>,即符合体表面积定律。

### 参 考 文 献

- [1] Dewitt, C. B. Microclimatic and behavioral factors in the thermoregulation of the lizard, *Dipsosaurus dorsalis*. *Amer. Zool.*, 1962, 2: 403.
- [2] Lamprey, H. F. Estimation of the large mammal densities, biomass and energy exchange in the Tarangire game reserve and the masai steppe in Tanganyika. *East Afr. Wildlife. J.*, 1964, 2: 1~59.
- [3] Licht, P. The temperature dependence of myosin-adenosinetriphosphatase and alkaline phosphatase in lizards. *Comp. Physiol.*, 1964, 12: 331~340.
- [4] 朱平, 杨同书. 心肌收缩蛋白质的研究. 白求恩医科大学学报, 1984, 10(4): 375~379.
- [5] 郑元林, 刘德岷. 季节及人工低温对大蟾蜍肌组织 ATP 酶的影响研究. 动物学研究, 1990, 11(4): 337~341.

- [ 6 ] 郑元林,刘德岷,陈才法等. 东方铃蟾与中华大蟾蜍肌组织钙激活 ATP 酶活性的比较研究. 动物学杂志, 1995, 30(2): 17 ~ 19.
- [ 7 ] 李仁德,刘乃发. 温度对蜥蜴腓肠肌 ATP 酶活性影响的研究. 动物学报, 1994, 40(1): 45 ~ 50.
- [ 8 ] Pollard, T. D. Assays for myosin. *Methods of Enzymol.*, 1982, 83: 123 ~ 130.
- [ 9 ] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. Farrar *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265 ~ 275.
- [ 10 ] 邹寿昌. 大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 冬眠时的肥满度及部分内脏器官的变化. 两栖爬行动物学报, 1985, 4(4): 320 ~ 324.
- [ 11 ] 邹寿昌,冯照军,李宗芸. 东方铃蟾繁殖期的生态及形态生理研究. 动物学杂志, 1991, 26(1): 22 ~ 24.
- [ 12 ] 祖元纲. 能量生态学引论. 长春: 吉林科学技术出版社, 1990. 222 ~ 225.