

## 中国对虾血细胞中酚氧化酶活力研究\*

## STUDIES ON THE PHENOLOXIDASE ACTIVITIES IN HOMOCYTES OF THE SHRIMP

罗日祥 姜玉香 李光友

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

无脊椎动物血淋巴中的酚氧化酶的研究已有大量资料,不少学者<sup>[4,7,8]</sup>认为黑色素的聚集与昆虫伤口愈合、结节形成及包被作用有联系,而黑色素的聚集则与昆虫血淋巴中的酚氧化酶及其底物相关。程振衡和梁子才<sup>[1]</sup>也发现在亚洲玉米螟血淋巴中的酚氧化酶可以粘附到酵母菌细胞表面。在水生无脊椎动物中,有关酚氧化酶的研究报道甚少,特别是对虾酚氧化酶的特性研究,还未见到这方面的有关资料。本文报道中国对虾(*Penaeus chinensis*)血淋巴中血细胞内的酚氧化酶的存在及各种因子对其活力特性的影响。

## 1 材料与方 法

## 1.1 实验用中国对虾

采于胶州湾(1988年4~5月),体长18~23cm,全是雌虾。取血淋巴时,针管内先抽进适量的防凝剂。

## 1.2 溶液配制

缓冲液(简称Buf)1 称取0.400g二甲砷酸钠、7.350g柠檬酸钠、21.390g蔗糖、9.306gNa<sub>2</sub>-EDTA溶于水中,冲至250ml,pH6.8。

Buf2 称取0.160g二甲砷酸钠、8.557g蔗糖、0.186gNa<sub>2</sub>-EDTA溶于水中,冲至100ml,pH7.0。

Buf3 称取0.160g二甲砷酸钠、0.055g氯化钙、8.766g氯化铯溶于水,冲至100ml,pH7.0。

Buf4 称取1.599g二甲砷酸钠溶于水中,冲至1000ml,调pH为7.0。

Buf5 0.1mol/L磷酸钾缓冲液,pH6.0。

0.01mol/L L-DOPA溶液 准确称取0.0493g L-DOPA溶于25ml容量瓶中,冲至刻度,摇匀备用。

0.2mol/L氯化钙溶液。

1%SDS溶液 称取已纯化的SDS0.4g定容25ml。

## 1.3 步骤与方法

血细胞酚氧化酶(简称PO)液的制备采用Ashida<sup>[3]</sup>在淡水龙虾中的方法,酶活力测定参照Horowitz和Shen<sup>[5]</sup>的方法进行,酶活力单位参照Ashida<sup>[2]</sup>方法,用波长(OD)为490nm测定的光密度值1.000为酶活力单位。

## 2 实验结果

## 2.1 正常状态下的酶活力

取7支试管,每管分别移入3.9mlBuf5,1mlL-DOPA,0.1ml制备的血细胞酶液,迅速摇匀计时,取样测定,尔后每隔2min测定1次PO活力,测定结果见图1。

2.2 Ca<sup>2+</sup>对PO活力的影响

取0.1ml酶液,0.055mlBuf4,0.025mlCaCl<sub>2</sub>溶液,0.020ml水,摇匀保温(30℃)2min,加入3.8mlBuf5,1mlL-DOPA,迅速摇匀计时,取样测定,尔后每隔2min于490nm波长测定1次PO活力,测定结果见图2。

## 2.3 SDS对PO活力的影响

取0.1ml制备的酶液,0.055mlBuf4,0.020mlSDS(1%)溶液,0.025ml水摇匀,30℃保温2min,尔后加入3.8mlBuf5,1mlL-DOPA,迅速摇匀计时,取样测定,每隔2min测定1次PO活力,测定结果见图3。

2.4 SDS和Ca<sup>2+</sup>对PO活力的影响

取0.1ml制备的酶液,0.055mlBuf4,0.025mlCaCl<sub>2</sub>溶液,0.020ml1%SDS,摇匀,30℃保温2min,尔后加入3.8mlpH6.0Buf5,1mlL-DOPA,迅速摇匀计时,

\* 山东省自然科学基金资助项目。

中国科学院海洋研究所调查研究报告第2981号。

收稿日期:1996年7月15日

取样测定,每隔 2min 测 1 次 PO 活力,测定结果见图 4。

### 2.5 pH 对 PO 活力的影响

取 5 支试管,分别加入 pH 为 5.0, 5.5, 6.0,

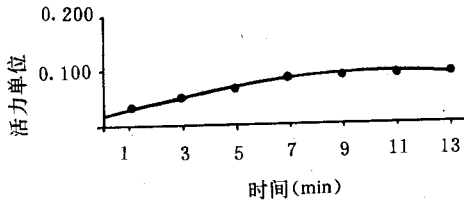


图 1 正常状态下的 PO 活力

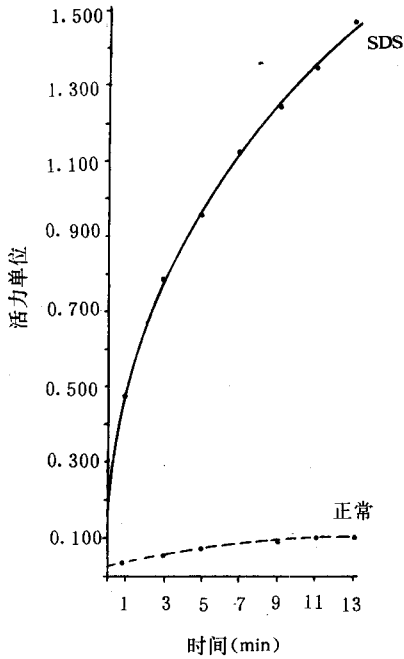


图 3 SDS 对 PO 活力的影响

### 2.6 温度对 PO 活力的影响

取 9 支试管,各加入 0.2ml 酶液,分别在 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃ 的水浴中保温 6min, 尔后冷却至 25℃, 各管再加入 3.8ml Buf5, 1ml L-DOPA, 再在 30℃ 水浴反应 5min, 测定 PO 活力, 测定结果见图 6。

6.5, 7.0 的缓冲液 3.8ml, 尔后各管均加 0.02ml 酶液。1ml L-DOPA, 迅速摇匀计时, 每隔 2min 测定 1 次 PO 活力, 测定结果见图 5。

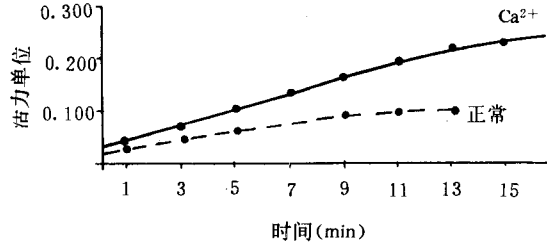


图 2 Ca<sup>2+</sup> 对 PO 活力的影响

## 3 讨论

### 3.1 正常血细胞 PO 活力

在自然状态下,中国对虾血细胞酶提取液的 PO 活力在 0.1 个活力单位以内(图 1), PO 在反应时间延长时,活力单位稍有增加。对水生无脊椎动物 PO 的研究,由于资料较少,在自然状态下,PO 以酶的形式存在为主,还是以 PPO 的形式存在为主,尚还无统一的认识。从图 1 表明,PO 活力随反应时间的加长,稍有增加。这可以认为血细胞中不仅有 PO 的存在,而且还有酶原(PPO)的存在。该 PPO 随反应时间的加长而逐渐激活。

### 3.2 Ca<sup>2+</sup>、SDS 对中国对虾血细胞中 PPO 的激活作用

用一定浓度的 Ca<sup>2+</sup> 处理血细胞提取液,可使 PO 活力增加。此活力的增加,可能是 Ca<sup>2+</sup> 对 PPO 的激活所致。用 1% 的 SDS 处理血细胞提取液,PO 活力巨增,这说明 1% SDS 对 PPO 有显著的激活作用。按测定的 PO 活力计算,用 SDS 激活后,PO 活力比正常值大 10~15 倍。用 1% SDS 加一定浓度的 Ca<sup>2+</sup> 处理血细胞提液,测定的 PO 值比正常的大 5~6 倍,比单独使用 SDS 的减少 50%。这可能是 SDS 遇到 Ca<sup>2+</sup> 后生成不溶性的 SDS 钙盐所致。

### 3.3 pH 值的变化对 PO 活力的影响

改变 pH 值可使 PO 活力产生显著变化(图 5)。pH 为 5.0, 5.5 时,PO 活力处于最低值; pH 为 6.0

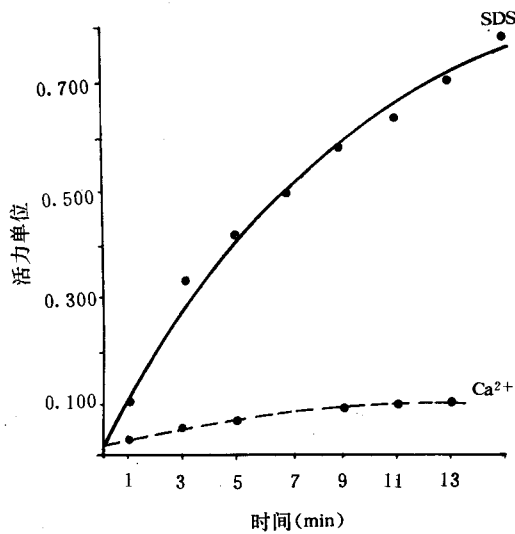


图4 SDS和Ca<sup>2+</sup>对PO活力的影响

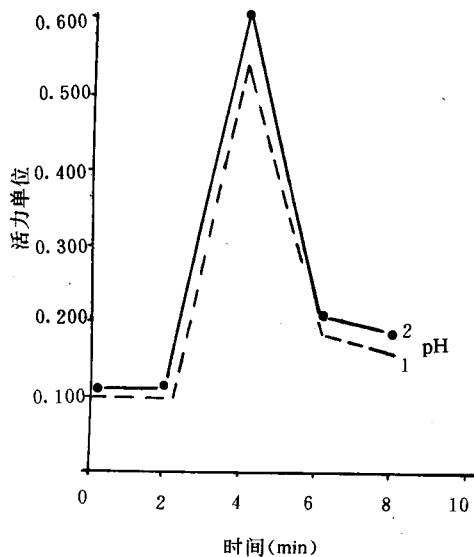


图5 pH对PO活力的影响

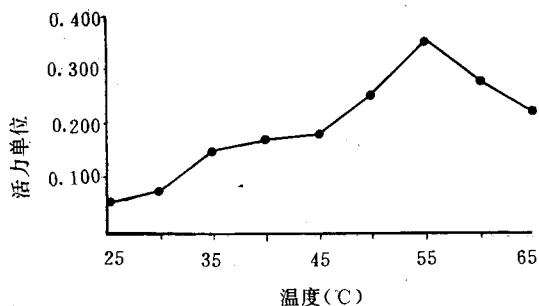


图6 温度对PO活力的影响

时,PO活力达峰值;而pH调至6.5,7.0时,PO活力

显著下降,但比pH5.0,5.5时高。该结果说明pH值与PO活力有密切的关系。该酶的最适pH为6.0。

### 3.4 温度与PO活力的关系

PO活力随温度的改变而变动着。温度为55°C时,测得的PO活力最高。以55°C为起点,不管温度从这点开始下降还是上升,PO活力均会降低。这说明该酶的最适反应温度为55°C。中国对虾的黑化,主要是PO的作用所致,故对虾的加工和储存,均需在低温下进行。另外也可把虾煮熟后再低温保存,此法可使虾保存2~3a不变质。对浮头虾或一些死亡病虾的保存,采用后一种方法,效果更好。

从SDS和改变pH值能使PO活力巨增这一结果,可以认为PO在正常条件下,主要以PPO的形式存在于血细胞中,只有在受到某些因子的刺激或激活时,PPO才以PO的形式释放到血淋巴液中。这与Soderhall<sup>[9]</sup>,Leonard<sup>[6]</sup>认为PO是以PPO的形式存在于血细胞中,只有在蜕皮和化蛹时或对异物进行反应时,才释放到血淋巴中的报道一致。

## 4 结语

实验结果表明,在自然状态下,中国对虾血淋巴中的血细胞内存有PO,但更多的是以酶原的形式偶于血细胞内,不显活性。只有在某种生理功能的需要或受某种因子刺激时,PPO才以PO的形式陆续地释到血淋巴液中,执行它的生理机能。该酶的最适pH值为6.0,最适作用温度为55°C,也可以说在一定范围内改变pH值,或提高温度,与SDS, Ca<sup>2+</sup>一样均能激活PPO,提高PO活力。

## 参考文献

- [1] 程振衡、梁子才,1990. 昆虫学报 33(4):424~429.
- [2] Ashida, M., 1971. Arch Biochem. Biophys. 144:749-762.
- [3] Ashida, M., Söderhäll, K., 1984. Comp. Biochem. Physiol. 77 B:21-26.
- [4] Guzo, D., D. B., 1987. J. Insect Physiol. 33:19-31.
- [5] Horowitz, N. H., Shen, S. C., 1952. J. Biol. Chem. 197:513-520.
- [6] Leonard, C. et al., 1985. J. Insect Physiol. 31:789-799.
- [7] Ratcliffe, N. A. & Rowley, A. F., 1979. Dev. Comp. Immun. 3:189-243.
- [8] Salt, G., 1970. Dev. Comp. Immun. 11:479-485.
- [9] Söderhäll, K., 1982. Dev. Comp. Immun. 6:601-611.