中国对虾酚氧化酶的部分生物化学特性的初步研究 *

汪小锋　　樊廷俊 * *

(青岛海洋大学海洋生命学院海洋生物系　青岛　266003)

提要　以海捕中国对虾(*Penacus chinensis*) 为材料,运用离心、凝胶过滤柱层析和离子交换柱层析的方法从对虾血淋巴中部分纯化出酚氧化酶。实验又以 L-DOPA 为底物,分析各种因子对其活力的影响。结果显示酚氧化酶的最适 pH 值约为 6.0,最适温度为 40 ℃, Cu^{2+}能强烈抑制酚氧化酶的活性,而 Mg^{2+}则能促进其活性,表明酚氧化酶可能是一种金属酶。

关键词　中国对虾(*Penacus chinensis*) ,酚氧化酶,金属酶,活性研究
中图分类号　Q55　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-3096(2003) 04-0071-05

无脊椎动物缺乏真正的抗体,没有免疫记忆。因此无脊椎动物只能依靠先天性免疫过程来抵抗寄生虫和疾病[1-3]。其中甲壳纲动物在体腔中能利用血细胞和体液防卫反应来保护自己免受寄生虫的侵染。从已有的证据说明,酚氧化酶原激活系统在甲壳动物防御系统中起了重要作用[1,4-6]。非己信号可按一定的顺序激活丝氨酸蛋白酶,有活性的丝氨酸蛋白酶又激活酚氧化酶原为有活性的酚氧化酶。具有活性的酚氧化酶诱导有关基质由酚到醌,最终产生黑色素,黑色素及其代谢中产物可杀死微生物及寄生虫,起到免疫作用[3,7,8,9]。1991 年 Aspan 等从螯虾(*Pacifastacus leniusculus*) 血细胞中提纯到酚氧化酶原[10]。1997 年

* 国家教育部高等学校骨干教师资助计划 160004 号。
* * 通讯作者:樊廷俊,出生于 1964 年,博士,教授。通信地址:青岛海洋大学海洋生命学院,E-mail: tjfan@ouqd.edu.cn
第一作者:汪小锋出生于 1978 年,硕士研究生。
收稿日期:2001-10-10;修回日期:2002-04-20

Perazzolo[5]在圣保罗对虾(*Penaeus paulensis*)中研究了酚氧化酶的激活系统，发现90%的酚氧化酶活性存在于血细胞中。1999年，Gollas-Galvan等[11]从加州对虾(*Penaeus californiensis*)的血细胞中纯化出了分子量为114 ku的酚氧化酶原，被水解后产生一个分子量107 ku、有活性的酚氧化酶；还利用L-DOPA底物对其生化特性进行了研究，发现该酶具有酪氨酸酶样的性质。1999年，Sritunyalucksana等[12]对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的酚氧化酶原进行了分子克隆和鉴定，其推测分子量约为78.7 ku；并发现酚氧化酶原的mRNA是在血细胞而不是在肝胰腺中合成的。但到目前为止，关于中国对虾的酚氧化酶的分离纯化及各种因子对纯化酚氧化酶的影响还未见有报道。作者通过离心、凝胶过滤柱层析和离子交换柱层析的方法从对虾血淋巴中部分纯化出酚氧化酶，并对其部分生化特性进行了研究，以期为中国对虾非特异性免疫及其调控机理的研究创造一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

海捕中国对虾(*Penaeus chinensis*)(体长约18~22 cm)；Sephacryl S-100凝胶过滤柱、Q Sepharose Fast Flow强阴离子交换柱均为Pharmacia公司产品；UV730紫外分光光度计为日本岛津公司产品；Centricon 10浓缩离心管为Amicon公司产品。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶液的制备 取海捕新鲜活中国对虾，用5 mL针筒吸入约2 mL预冷的Alsever氏抗凝剂(2.05 g葡萄糖，0.8 g柠檬酸钠，0.42 g氯化钠，加双蒸水至100 mL)，将针头从对虾的头胸甲背部的间隙中插入心脏取血，所得血淋巴放入预置于4 ℃冰浴中的5 mL离心管中，于4 ℃离心(1 000 r/min，60 min)破碎血细胞，然后收集上清液，作为酚氧化酶粗品使用。

1.2.2 酶的纯化 Sephacryl S-100凝胶过滤柱用0.02 mol/L Tris-HCl(2.4 g Tris溶于912 mL 0.02 mol/L的HCl中，加双蒸水至1 000 mL，pH 7.1)缓冲液预平衡12 h后，取2 mL酚氧化酶粗品上柱，用0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.1)进行洗脱(流速：0.5 mL/min)并分部收集洗脱组分。利用0.02 mol/L L-DOPA进行酶活性测定，具有高酶活性的峰值组分被收集起来，一部分作为Sephacryl S-100纯化样品置-20 ℃保存备用；另一部分再上样于Q Sepharose Fast Flow阴离子交换柱进行进一步的纯化，用含0.5 mol/L NaCl的0.02 mol/L Tris-HCl(pH 7.1)缓冲液进行梯度洗脱(流速：1 mL/min)，分部收集洗脱液，同样用0.02 mol/L的L-DOPA进行酶活性测定，收集具有高酶活性的峰值组分，经脱盐和浓缩(1.98 g/L)后，作为Q Sepharose Fast Flow纯化样品置-20 ℃保存备用(以上柱层析纯化操作均在4 ℃进行)。

1.2.3 酚氧化酶的活性测定 酚氧化酶活性测定以L-DOPA为特异性底物，参照Ashida等[13]的方法。具体测定时，将100 μL待测酶液及100 μL 0.02 mol/L L-DOPA于28 ℃恒温水浴中混匀，反应40 min后，加入1.3 mL预冷的0.01 mol/L的磷酸钾盐缓冲液(pH 6.0)。在此反应条件下，以A_{490}值每分钟增长0.001定义为一个酶活力单位。分别在pH 3.0，pH 4.0，pH 5.0，pH 6.0，pH 7.0，pH 8.0和pH 9.0，以及20 ℃，30 ℃，40 ℃，50 ℃和60 ℃的温度下，测定酚氧化酶活性，以确定pH值与温度对酚氧化酶活性的影响。

1.2.4 EDTA、金属离子实验 100 μL酚氧化酶的纯化样品中分别加入100 μL各种不同浓度的EDTA和各种金属离子(Zn^{2+}，Mg^{2+}，Ca^{2+}，Cu^{2+})，于28 ℃恒温水浴中预处理20 min后，加入100 μL的0.02 mol/L L-DOPA，28 ℃反应40 min，最后加入1.2 mL的磷酸钾盐缓冲液，测定490 nm光吸收。阳性对照用100 μL 0.01 mol/L磷酸钾盐缓冲液(pH 6.0)替代上述反应体系中的EDTA或金属离子；阴性对照用100 μL 0.01 mol/L磷酸钾盐缓冲液(pH 6.0)替代上述反应体系中的酶样品。

2 结果

2.1 酚氧化酶纯化

2.1.1 凝胶过滤柱层析 约20 mL酚氧化酶的粗品(蛋白质浓度17.89 g/L)分批上样于Sephacryl S-100凝胶过滤柱，分部收集洗脱组分(图1)。用0.02 mol/L L-DOPA进行酶活性测定，发现11~14号组分均具有很高的酶活性，将11~14号组分混合，部分作为酚氧化酶凝胶过滤纯化样品使用，其余样品进行离子交换柱层析。

2.1.2 离子交换柱层析 来自Sephacryl S-100凝胶过滤的酚氧化酶纯化组分(11~14号组分)，上样于Q Sepharose Fast Flow强阴离子交换柱，分部收集洗脱组分(图2)。以0.02 mol/L L-DOPA进行酶活性测定，发现23~26号组分具有很高的酶活性。将23~26号组分混合，作为酚氧化酶纯化样品使用。

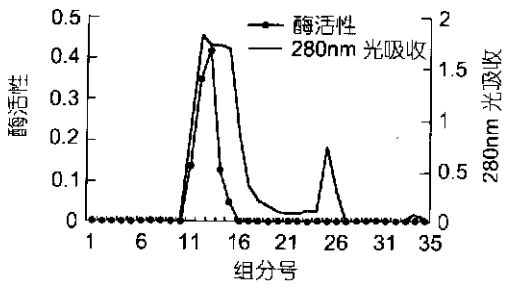

图 1　中国对虾酚氧化酶粗品的 Sephacryl S-100 凝胶过滤柱层析

Fig.1　Sephacryl S-100 column chromatography of crude phenoloxidase from *Penaeus chinensis*

酚氧化酶活性用 0.02 mol/ L的特异性底物 L-DOPA进行测定,图中显示出的为 280 nm光吸收曲线和酶活性曲线

The enzyme activity was measured by using 0.02 mol/ L L-DOPA as a substrate. Profiles corresponding to absorbance at 280 nm and the enzyme activity are shown

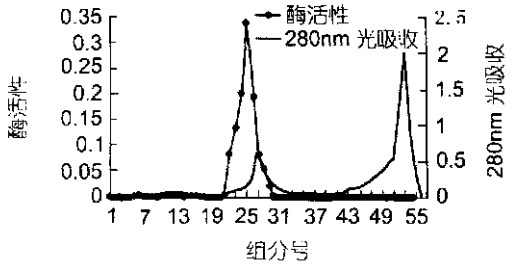

图 2　中国对虾酚氧化酶 Sephacryl S-100 凝胶过滤样品的 Q Sepharose Fast Flow柱层析

Fig.2　Q Sepharose Fast Flow column chromatography of the gel-filtrated phenoloxidase from *Penaeus chinensis*

Sephacryl S-100凝胶过滤样品 (11 ~ 14号洗脱组分) 上样于 Q Sepharose Fast Flow离子交换柱。酚氧化酶活性用 0.02 mol/ L的特异性底物 L-DOPA进行测定,图中显示出的为 280 mm光吸收曲线和酶活性曲线

The Sephacryl S-100 run-off fractions (11 ~ 14) were loaded onto a Q Sepharose Fast Flow column. The enzyme activity was measured by using 0.02 mol/ L L-DOPA as a substrate. Profiles corresponding to absorbance at 280 nm, enzyme activity are shown

2.2　酚氧化酶样品的酶活性分析

2.2.1　温度和 pH对酚氧化酶活性的影响　在不同 pH值下对酶活性进行测定发现,pH 6.0时酶活性最高,pH低于 6.0时,酶活性随着 pH值的升高而逐渐升高;pH超过 6.0后,酶活性则随着 pH值的升高而逐渐降低[图 3(A)]。在不同测定温度下,40 ℃时的酶活性最高,在 20 ~ 40 ℃之间,酶活性随着温度的升高而逐渐升高;而超过 40 ℃以后,酶活性便随着温度的升高而逐渐降低[图 3(B)]。

2.2.2　EDTA和几种金属离子的作用　利用各种金属离子和 EDTA对所得酚氧化酶活性的影响进行研究发现,EDTA和 Cu^{2+}能强烈抑制酚氧化酶的活

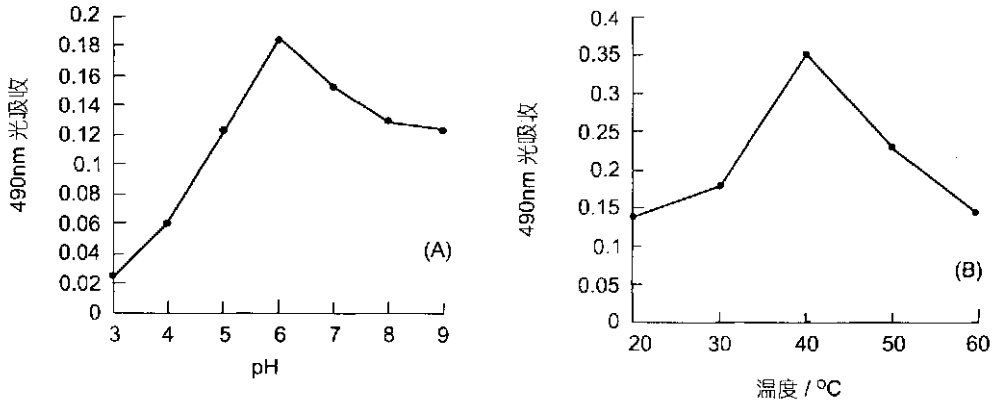

图 3　不同 pH值和温度对中国对虾酚氧化酶活性的影响

Fig.3　Effects of different pH and temperature on Penaeus phenoloxidase

(A)不同 pH值对中国对虾酚氧化酶活性的影响。结果表明,该酶的最适 pH值为 6.0。(B)不同温度对中国对虾酚氧化酶活性的影响。结果表明,该酶的最适温度为 40 ℃。酶活性用 0.02 mol/ L的特异性底物 L-DOPA进行测定。

(A) Effect of different pH on Penaeus PO. The optimal pH value of the enzyme was 6.0. (B) Effect of different temperature on Penaeus PO. The optimal temperature of the enzyme was 40 ℃. The enzyme activity was measured by using 0.02 mol/ L L-DOPA as a substrate

性，而 Mg^{2+}则能促进酚氧化酶活性，说明 PO很可能是一种金属蛋白酶(图 4)。

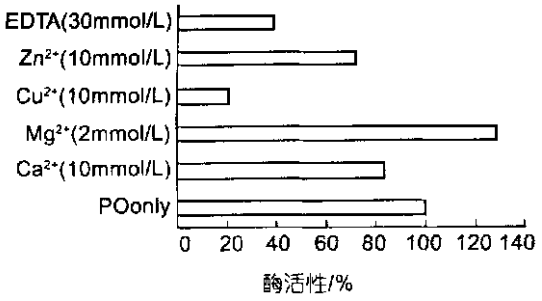

图 4 EDTA与不同金属离子对中国对虾酚氧化酶活性的影响

Fig.4 Effects of EDTA and different metal ions on Penaeus phenoloxidase

EDTA和 Cu^{2+}对酶活性的抑制作用最强，抑制率在 60%~80%以上；Ca^{2+}和 Zn^{2+}的抑制作用次之，图中所示 Ca^{2+}和 Zn^{2+}的浓度为其抑制率最高时的浓度。Mg^{2+}对酶活性具有促进作用，促进率约为 30%。酶活性用 0.02 mol/L的特异性底物 L-DOPA进行测定。

The inhibition in the EDTA and Cu^{2+} exhibited 80%~100% inhibition at concentrations higher than those indicated. Concentrations of Ca^{2+} and Zn^{2+} indicate those exhibiting highest inhibition so far tested. Mg^{2+} shows 30% enhancement of enzyme activity. The enzyme activities were measured by using 0.02 mol/L L-DOPA as a substrate.

3 讨论

酚氧化酶(PO)是广泛存在于无脊椎动物体内的非特异性免疫系统的主要成员之一，然而目前对 PO生化性质的研究大多集中在昆虫方面，至于甲壳类动物 PO生化性质的研究则比较少，至今还未见到有关中国对虾 PO的分离纯化及其生物化学性质的研究报道。本文通过离心、凝胶过滤柱层析和离子交换柱层析的方法从对虾血淋巴中得到了具有较高纯度的酚氧化酶。

实验得到的酚氧化酶最适 pH值为 6.0。本文所得的最适 pH值(6.0)与罗日祥等[14]对中国对虾血淋巴中酚氧化酶粗提物的最适 pH值是完全一致的，与日本对虾[15]和龙虾[16] PO的最适 pH值也相同，而与加州对虾 PO(pH 8)[11]和白对虾 PO(pH 7.5)[17]的最适 pH值有一定差异，这可能与不同对虾种类的生存环境如环境温度以及病原体类型等不同有关。由于罗日祥等得到的酚氧化酶粗提物实际上既含有酚氧化酶，也含有酚氧化酶原，这样所得的最适 pH值与纯酚氧化酶的最适 pH值相一致，说明 pH值的变化对酚氧化酶原可能没有激活作用。

本文所得酚氧化酶的最适温度(40 ℃)与日本对虾 PO的最适温度[15]相同，略低于栉孔扇贝[18]和白对虾[17] PO的最适温度(45 ℃)，而高于龙虾的最适温度(37 ℃)[16]，其间的差异很可能与对虾的种类及其生活环境(如环境温度和病原体类型等)不同有关。罗日祥等在中国对虾中发现，酚氧化酶粗提物的最适温度约为 55 ℃，这一温度之所以与本文所得最适温度有较大差异，很可能是因为他们在实验中所用的酶样品为酚氧化酶的粗提物，含有很多杂蛋白，所得结果为多种蛋白酶综合反应的最适温度，而并非单纯酚氧化酶的最适温度。

本文在研究 EDTA和金属离子对纯化的中国对虾酚氧化酶活性的影响时，发现 EDTA及 Cu^{2+}能较强的抑制酚氧化酶的活性，而 Ca^{2+}对酚氧化酶作用很小，Mg^{2+}则能较大幅度地增加酚氧化酶的活性，表明该酶很可能是一种 Cu^{2+}-金属蛋白酶。这与贻贝多酚氧化酶的研究结果相同[19]，也证实了 Dressler等认为多酚氧化酶催化过程中需要 Cu^{2+}维持结构的观点。而 Mg^{2+}之所以能较大幅度地增加酚氧化酶的活性，很可能是通过促进底物与该酶活性中心的亲和力进而有助于酚氧化酶活性的发挥来实现的。此外，Ca^{2+}对酚氧化酶粗品的活性具有很强的促进作用，表明 Ca^{2+}可能参与了酚氧化酶原的激活过程。但至于 Ca^{2+}是直接作用于酚氧化酶原，还是通过酚氧化酶原激活系统起到激活作用的，目前正在进一步研究中。

参考文献

1 黄辉洋，李少菁，王桂忠．甲壳动物酚氧化酶活力及其在养殖中的应用．海洋通报，2000，19(3)：79-84

2 李天道，于 佳，俞开康．中国对虾血清中酚氧化酶活力研究．海洋湖沼通报，1998(1)：51-56

3 王 雷，李光友．中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究．海洋与湖沼，1995，26(2)：179-185

4 Gargioni R, Barracco M A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. J Morphol, 1998, 236(3): 209-221

5 Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev Comp Immunol, 1997, 21(5): 385-395

6 Söderhäll K, Cerenius L, Johansson M W. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta G (ed.). New Directions in Invertebrate Immunology. Fair Haven: SOS Publications, 1996. 229-253

7 孟凡伦,张玉臻. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价. 海洋与湖沼,1999,30(1):110-115

8 Smith VJ, Söderhäll K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev Comp Immunol, 1991(15): 251-261

9 Sung H H, Chang H J, Her C H, et al. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. J Invertebr Pathol, 1998, 71(1): 26-33

10 Aspan A, Söderhäll K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochem. 1991(21): 363-373

11 Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Vargas-Albores F. Prophenoloxidase from brown shrimp(*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comp Biochem Physiol (Part B), 1999, 122(1): 77-82

12 Sritunyalucksana K, Cerenius L, Söderhäll K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol, 1999, 23(3):179-186

13 Ashida M, Dohke K. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm. Bombyx Mori Insect Biochem, 1980(10): 37-47

14 罗日祥,姜玉香. 中国对虾血细胞中酚氧化酶活力研究. 海洋科学,1996(6):1-3

15 赵 娇,戚晓玉,尤瑜敏,等. 日本对虾的酚氧化酶的特性研究. 上海水产大学学报,1997,6(3):157-165

16 夏 栋,卞 疆. 龙虾多酚氧化酶的纯化及其部分生化特性. 江苏食品与发酵,2000(1):16-20

17 Simpson B K. Phenoloxidase from shrimp(*Penaeus setiferus*): purification and some properties. J Agric Food Chem, 1987, 35: 918-921

18 孙虎山,李光友. 栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性. 中国水产科学,1999,6(2):9-13

19 刘汝高. 贻贝(*Mytilus edulis* Linne)足丝固化过程中酶学性质的初步研究. 中国海洋药物,1987(4):173-177

SOME BIOCHEMICAL SPECIFICITY STUDIES OF PHENOLOXIDASE FROM *Penaeus chinensis*

WANG Xiao-Feng FAN Ting-Jun

(*Department of Marine Biology, College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao*, 266003)

Received: Oct.,10,2001

Key Words: *Penacus chinensis*, Phenoloxidase, Metalloenzyme, Activity characterization

Abstract

Using L-DOPA as a probe, phenoloxidase (PO) from *Penaeus chinensis* hemolymph was purified by gel-filtration and ion-exchange chromatography, and characterized in terms of its enzymatic properties in this study. Enzymatic activity of PO against L-DOPA was optimal at pH 6.0, temperature of 40 ℃. This enzyme is very sensitive to EDTA and metal ions, its activity is strongly enhanced by Mg^{2+} and strongly inhibited by Cu^{2+}, which indicates that PO is probably a variety of metalloenzyme.

(本文编辑:刘珊珊)