

# 日本蛭酚氧化酶的分离纯化及其部分生物化学性质研究

杨玲玲,樊廷俊,丛日山,汤志宏,孙文杰,刘光兴,孟祥红,朱丽岩

(中国海洋大学 生命科学与技术学部 海洋生物系,山东 青岛 266003)

**摘要:**利用离子交换层析和凝胶过滤层析等方法,从日本蛭(*Charybdis japonica*)血淋巴中分离纯化出了酚氧化酶,并以 *L*-二羟苯丙氨酸(*L*-DOPA)作为特异性底物对其生化性质和酶性质进行了研究。结果表明,酚氧化酶和酚氧化酶原的分子质量分别为 64.5 ku 和 69.5 ku。以 *L*-DOPA 为底物对酚氧化酶纯品进行研究发现,其最适 pH 值为 6.0、最适温度为 40<sup>o</sup>。对底物 *L*-DOPA 和儿茶酚的米氏常数  $K_m$  值分别为 3.41 和 7.97 mmol/L。该酶对亚硫酸钠、苯硫脲极为敏感,对硫脲、苯甲酸非常敏感,表明该酶很可能是一种儿茶酚酶型的酶。此外,EDTA、DETC、 $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  均能显著抑制该酶活性,且 10 mmol/L  $Cu^{2+}$  能有效地回复该酶被 DETC 所抑制的酶活性,表明该酶确为一种 Cu 金属酶。

**关键词:**日本蛭(*Charybdis japonica*);酚氧化酶;*L*-DOPA (*L*-dihydroxyphenylalanine);儿茶酚酶;金属酶  
**中图分类号:**Q55      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-3096(2008)02-0029-07

酚氧化酶(phenoloxidase(简称 PO), E. C. 1. 10. 3. 1)作为酚氧化酶原(proPO)的活性形式,是在无脊椎动物非特异性免疫中起关键作用的一种酶<sup>[1,2]</sup>。例如,酚氧化酶可能通过一个类似于硫羟酸酯的基团结合到受感染的细胞表面并产生有毒性的中间产物——酚;在 Taura 综合征病毒(TSV)感染的对虾中,酚有助于宿主抵抗病毒入侵到体腔中<sup>[3]</sup>。目前已知,proPO 激活系统的级联反应能够参与无脊椎动物血淋巴中的免疫应答并产生黑色素<sup>[1,2]</sup>。研究表明昆虫和海洋贝类的酚氧化酶是一种铜依赖性蛋白,它介导酚类(如 *L*-DOPA)转化为不稳定的醌,醌随之通过非酶促反应转化为黑色素<sup>[4]</sup>。现有的研究表明无脊椎动物的酚氧化酶以无活性的形式存在于血细胞中。宿主受到感染时,微生物细胞壁组分激活丝氨酸蛋白酶,然后,无活性的酚氧化酶被丝氨酸蛋白酶逐步激活<sup>[2]</sup>。

目前已从多种无脊椎动物中分离纯化得到了酚氧化酶原,纯化的酚氧化酶原单体的分子质量一般为 70~87 ku,经酶裂解激活后,转化成分子质量为 60~77 ku 的活性形式的酚氧化酶<sup>[5-9]</sup>。研究表明,甲壳动物的酚氧化酶原是在血细胞中合成的<sup>[10]</sup>。Gollas-Galván 等<sup>[11]</sup>从褐虾(*Penaeus californiensis*)中分离出一种酪氨酸酶类型的酚氧化酶。Fan 等<sup>[9]</sup>首次从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)中纯化了酚氧化酶并对其进行了生化性质研究,发现其酚氧化酶也是一种酪氨酸酶类型的金属蛋白酶。

然而,到目前为止,尚未有关于蟹酚氧化酶性质的研究报道。本研究旨在纯化出日本蛭(*Charybdis*

*japonica*)的酚氧化酶,并对其生化性质和酶学性质进行系统研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

海捕日本蛭(体长约 8 cm)购于青岛南山水产品市场。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶液的制备

取海捕新鲜活日本蛭,从其最后一对步足基部软膜处切断,使血淋巴直接滴入一个事先装有预冷的 Alsever 氏抗凝剂<sup>[9]</sup>的小烧杯中。血淋巴样品冻融 3 次后,于 4<sup>o</sup> 离心(8 000 r/min, 1 h),收集上清。上清经 67%饱和硫酸铵在 4<sup>o</sup> 沉淀过夜后,离心后所得沉淀溶解于 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.1)缓冲液中,脱盐并浓缩后冻干,置 -20<sup>o</sup> 作为 PO 粗品使用。

#### 1.2.2 酶的纯化

约 5 mg PO 冻干品溶于 0.5 mL 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.1)缓冲液中,离心(12 000 r/min, 1 h, 4<sup>o</sup>)所得上清上样于用相同缓冲液预平衡后的 Sephacryl S-100 凝胶过滤柱(Pharmacia, 1.5 cm ×

收稿日期:2005-01-13;修回日期:2005-06-17

基金项目:国家 863 青年基金项目(2001AA649040);教育部重点项目(02132)

作者简介:杨玲玲(1979-),女,山东胶州人,硕士研究生;樊廷俊,通讯作者,博士,教授,博士生导师,主要从事海洋经济动物细胞工程与细胞分化研究,电话:0532-82031637, E-mail: tjfan@ouc.edu.cn

40 cm),并以相同缓冲液进行洗脱(流速:0.5 mL/min),分部收集洗脱组分。利用 *L*-DOPA 进行 PO 活性测定,收集具有高酶活性的峰值组分,部分作为 Sephacryl S-100 纯化样品置 -20 备用;其余部分上样于 Q Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱(Pharmacia, 1 cm × 30 cm)继续进行纯化,用含 0.1 ~ 0.5 mol/L NaCl 的相同 Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱(流速:1 mL/min),分部收集洗脱组分,用 *L*-DOPA 进行 PO 活性测定,收集具有高酶活性的峰值组分,经脱盐和浓缩后,作为 PO 纯品置 -20 保存备用。以上柱层析操作均在 4 进行。

### 1.2.3 SDS-PAGE

各种 PO 样品经浓缩和脱盐后,参照 Laemmli<sup>[12]</sup>的方法进行 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳),并用 0.05% 考马斯亮蓝(R-250)显色。

### 1.2.4 PO 活性测定

PO 活性测定以 *L*-DOPA 为特异性底物,参照 Ashida 和 Dohke<sup>[13]</sup>的方法进行。取 100 μL 待测酶液与 100 μL 15 mmol/L *L*-DOPA 混匀后,于 28 反应 40 min,加入 2.8 mL 预冷蒸馏水终止反应。用 UV-2450 分光光度计测定 490 nm 光吸收。在此反应条件下,以 490 nm 光吸收值( $A_{490}$ )每分钟增长 0.001 定义为一个酶活力单位(U)。

在 pH 5.0 ~ 9.0 或 20 ~ 60 的条件下,分别测定 PO 活性,以确定日本蛭 PO 的最适反应 pH 值和温度。在底物特异性鉴定中,用儿茶酚、对苯二酚、苯酚或酪氨酸替代 *L*-DOPA。

### 1.2.5 几种金属离子、金属螯合剂与氧化酶抑制剂实验

苯甲酸溶解于无水乙醇中,金属螯合剂(EDTA, DETC),金属离子( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )和其余氧化酶抑制剂均溶解于蒸馏水中。100 μL PO 纯品中分别加入 100 μL 各种不同浓度的金属螯合剂、金属离子和氧化酶抑制剂,于 40 预处理 20 min 后,用 *L*-DOPA 测定 PO 活性。阳性对照用 100 μL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.1) 缓冲液替代反应体系中的金属螯合剂或金属离子或氧化酶抑制剂;阴性对照用相同缓冲液替代反应体系中的酶液。

PO 活性回复实验参照 Hata 等<sup>[14]</sup>的方法。100 μL PO 纯品与 100 μL 20 mmol/L 的 EDTA 或 DETC 混匀后,于 0 静置 20 min,分别加入 100 μL 2.5, 5, 10, 15 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ , 于 0 反应 3 h,分别测定其 PO 活性。

### 1.2.6 酶动力学曲线的测定

100 μL PO 纯品分别与 100 μL 不同浓度的 *L*-

DOPA 或儿茶酚混匀反应,测定其 PO 活性。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法绘制出 PO 动力学曲线,计算其米氏常数  $K_m$  值。

### 1.2.7 蛋白质质量测定

PO 粗品,凝胶过滤纯化样品和离子交换纯化样品的蛋白质质量测定参照 Lowry 等<sup>[15]</sup>的方法,以牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司产品)为标准蛋白。

## 2 结果

### 2.1 酚氧化酶纯化

#### 2.1.1 凝胶过滤柱层析

来自约 4 只日本蛭的 PO 粗品(5 mg)溶解于 0.2 mL 上述 Tris-HCl 缓冲液中(蛋白质质量浓度和总酶活分别为 9.9 g/L 和 16.12 U)。在 0.2 mL PO 粗品的凝胶过滤柱洗脱组分中,第 25 ~ 27 管组分对 *L*-DOPA 具有高 PO 活性(图 1),收集并混匀后(蛋白质质量浓度和总酶活分别为 0.84 g/L 和 11.25 U),作为 PO 的凝胶过滤纯化样品使用。

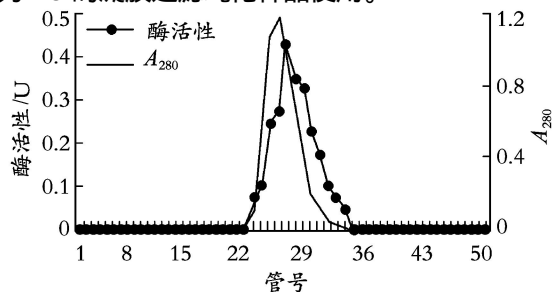


图 1 PO 的 Sephacryl S-100 凝胶过滤层析

Fig. 1 Sephacryl S-100 gel-filtration of the crude PO

#### 2.1.2 离子交换柱层析

在凝胶过滤纯化样品的阴离子交换柱洗脱组分中,发现 24 ~ 26 号组分对 *L*-DOPA 具有高 PO 活性(图 2),收集并混匀(蛋白质质量浓度和总酶活分别为 0.027 g/L 和 9.0 U)后进行脱盐和浓缩处理,作为 PO 纯品使用。

各步纯化倍数及得率见表 1。

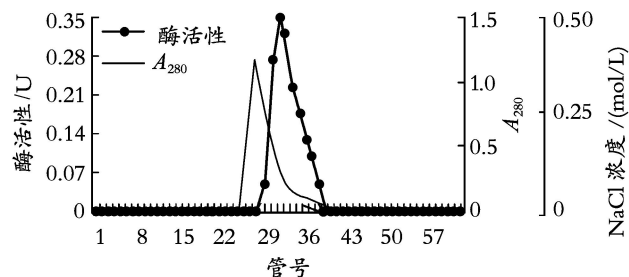


图 2 PO 的 Q Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析

Fig. 2 Q Sepharose FF ion-exchange chromatography of the gel-filtrated PO

表 1 日本蛭酚氧化酶的纯化

Tab. 1 Purification of PO from haemolymph of *C. japonica*

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 <sup>b</sup> (U)	比活 <sup>b</sup> (U/mg)	得率 (%)	纯化倍率
粗酶 <sup>a</sup>	4.95	16.12	3.26	100	1.0
Sephacryl S-100 柱层析纯化样品	2.51	11.25	4.48	69.8	1.37
Q Sepharose FF 柱层析纯化样品	0.08	9.0	112.5	55.83	34.51

注:a. 从 4 只日本蛭中提取;b. 以 15 mmol/L L-DOPA 为特异性底物

2.2 各种 PO 样品的 SDS-PAGE

对所得 PO 的粗品、凝胶过滤纯化样品、离子交换纯化样品 (PO 纯品) 以及 10 g/L SDS 激活后的 PO 纯品, 进行 SDS-PAGE。电泳结果 (图 3) 显示, 本实验所得 PO 纯品含有 69.5 和 64.5 ku 两条带 (图 3,C), 而 SDS 激活后的 PO 纯品只含有 64.5 ku 一条带 (图 3,D), 表明 PO 纯品的纯度很高。

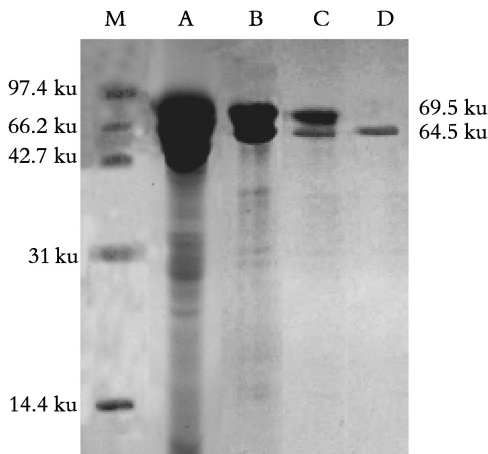


图 3 日本蛭酚氧化酶不同样品的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of different *Charybdis* PO preparations

M. 低分子质量标准蛋白 (分子质量如图左所示); A. PO 粗品; B. 凝胶过滤纯化样品; C. 离子交换纯化样品; D. SDS 激活后的 PO 纯品

M. SDS-PAGE low molecular weight protein standards with molecular weights shown in ku on the left; A. crude PO; B. gel-filtrated PO; C. ion-exchanged PO; D. purified PO after SDS activation

2.3 PO 纯品的酶活性分析

2.3.1 温度和 pH 对 PO 活性的影响

在不同 pH 值和不同温度下对 PO 活性分别进行了测定。结果 (图 4) 表明, pH 6.0 时酶活性最高; 40 时的酶活性最高。说明 PO 纯品的最适 pH 值为 6.0, 最适温度为 40。

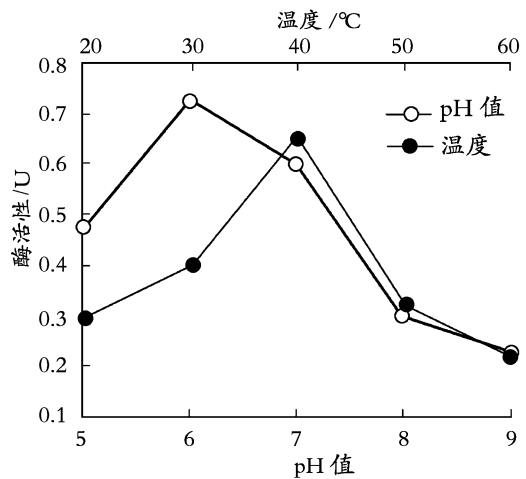


图 4 不同温度和 pH 对日本蛭酚氧化酶的影响

Fig. 4 Effects of different temperatures and pH values on purified *Charybdis* PO

2.3.2 PO 的酶动力学曲线

根据 PO 纯品对不同浓度 L-DOPA 和儿茶酚的酶活性, 利用 Lineweaver Burk 双倒数作图法绘出日本蛭 PO 的动力学曲线 (图 5)。经计算, PO 纯品对 L-DOPA 的  $K_m$  值为 3.41 mmol/L; 对儿茶酚的  $K_m$  值为 7.97 mmol/L。

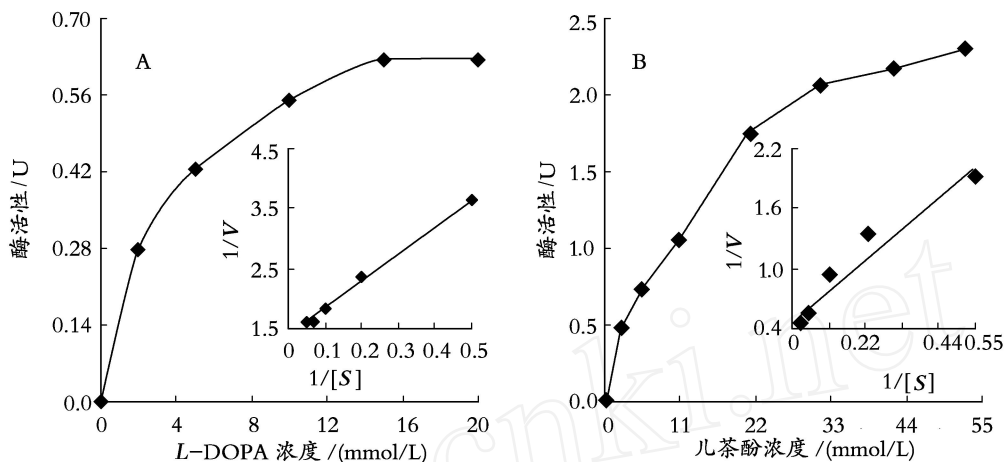


图5 日本蛭酚氧化酶的酶动力学曲线

Fig. 5 The kinetic properties of purified *Charybdis* PO

A. PO对L-DOPA的动力学曲线;B. PO对儿茶酚的动力学曲线

A. The kinetic properties of purified PO on L-DOPA; B. The kinetic properties of purified PO on catechol

### 2.3.3 各种抑制剂对酚氧化酶活性的影响

各种抑制剂对PO纯品酶活性的影响结果表明,PO对亚硫酸钠和苯硫脲极为敏感,对硫脲和苯甲酸很敏感,对半胱氨酸、柠檬酸和抗坏血酸却不甚敏感(图6);另外PO对EDTA, DETC,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  很敏感,而对  $Ca^{2+}$  不甚敏感(图7)。

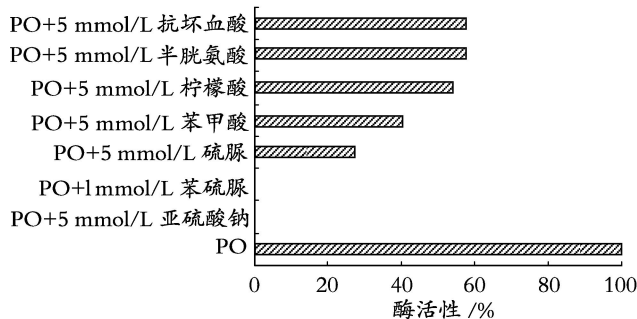


图6 氧化酶抑制剂对PO活性的影响

Fig. 6 Effects of inhibitors on purified PO

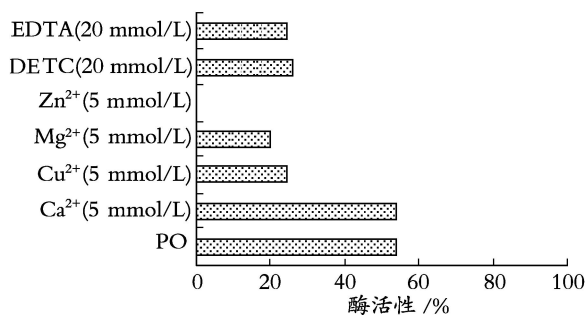


图7 金属离子及金属螯合剂对PO活性的影响

Fig. 7 Effects of metal ions and chelators on purified PO

各种金属离子对PO酶活性的回复结果显示,  $Cu^{2+}$  能有效回复被EDTA抑制的PO活性,而其他金属离子几乎没有回复作用(图8)。为了证实该PO是否确为一种含Cu金属酶,作者又利用不同浓度  $Cu^{2+}$  对DETC预处理的PO纯品进行了回复研究,发现10 mmol/L  $Cu^{2+}$  几乎能完全回复被DETC抑制的酶活性(图9)。

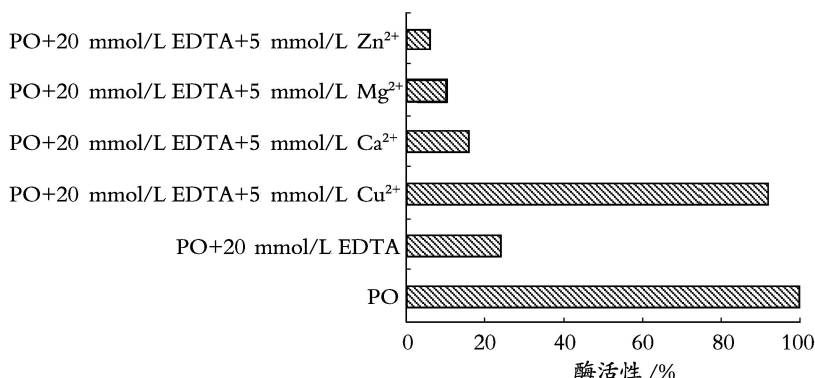


图8  $Cu^{2+}$ 对EDTA预处理后的PO活性的影响

Fig. 8 Recovery effect of  $Cu^{2+}$  on the activity of EDTA-pretreated PO

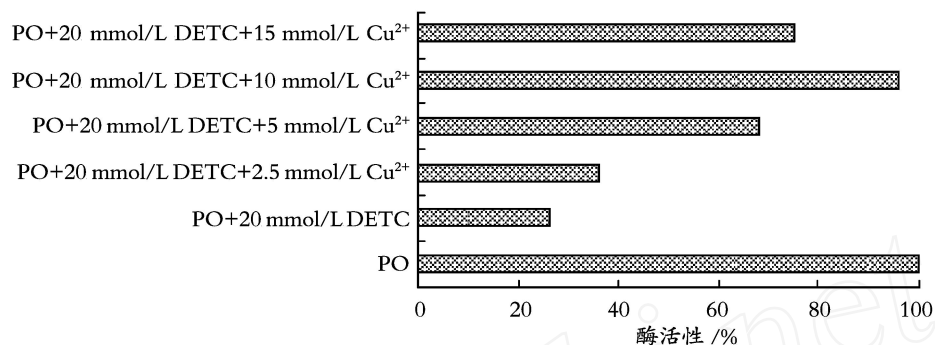


图9 Cu<sup>2+</sup>对 DETC 预处理后的 PO 活性的影响

Fig. 9 Recovery effect of Cu<sup>2+</sup> on the activity of DETC-pretreated PO

### 3 讨论

PO 是许多甲壳动物和昆虫识别外源物的级联反应中的一个关键性末端组分,而 proPO 则是其无活性的酶原形式。本研究利用凝胶过滤和离子交换柱层析从日本蛭血淋巴中纯化出 PO,并以 L-DOPA 为特异性底物对其进行了性质鉴定。在 SDS-PAGE 中,未经激活的 PO 纯品有 69.5 ku 和 64.5 ku 两种大小的分子,而 SDS 激活后的 PO 纯品则只有一种 64.5 ku 大小的分子,且两种 PO 纯品均具有高 PO 活性,说明 PO 纯品中所含有的 69.5 ku 分子是 pro-PO,而 64.5 ku 分子是 PO;SDS 激活后的 PO 纯化样品在 SDS-PAGE 中只有一条带,说明本文所得 PO 纯化样品的纯度很高,也证明在日本蛭血淋巴中只有一种类型的 PO。PO 纯品在粗品的基础上被纯化了 34.51 倍,其得率为 55.83 %。

日本蛭 PO 的分子质量为 64.5 ku,proPO 为 69.5 ku,该 PO 的大小与龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*)<sup>[6]</sup>和海鞘 (*Halocynthia roretzi*)<sup>[14]</sup>的 PO (62 ku) 相似,而小于中国明对虾<sup>[9]</sup> (77 ku) 和褐虾<sup>[11]</sup> PO (107 ku)。PO 的分子质量依物种的不同、是否为单体形式以及活性状态不同而不同。本研究所得 proPO 经 SDS 激活后加工去除了一个 5 ku 的多肽片段而变为 PO,这与许多无脊椎动物中 proPO 经过蛋白裂解激活而切去一个 5~15 ku 的多肽片段是一致的<sup>[11]</sup>。如在褐虾中切除的片段为 7 ku<sup>[11]</sup>,菲律宾蛤 (*Ruditapes philippinarum*) 中为 9.2 ku<sup>[16]</sup>。

日本蛭的 PO 纯品对 L-DOPA 的最适 pH 为 6.0,最适温度为 40。该最适 pH 值与中国明对虾<sup>[9]</sup> PO 的相同,而低于褐虾 PO (8.0)<sup>[11]</sup>和白对虾 (*Penaeus setiferus*) PO (7.5) 的最适 pH 值<sup>[17]</sup>。该最适温度与日本对虾 (*Penaeus japonicus*)<sup>[18]</sup>、中国明对虾<sup>[9]</sup> 和菲律宾蛤<sup>[16]</sup> PO 的最适温度是一致的,低于白对虾 (*P. setiferus*)<sup>[17]</sup> 的最适温度 (45),但高

于日本蛭 PO 粗品的最适温度 (30) (结果未发表)。可见,该最适 pH 值和最适温度的差别,可能与来源物种及其生活环境 (如温度,病原体种类等) 甚至 PO 纯度等的差异有关。

日本蛭 PO 纯品对 L-DOPA 的 K<sub>m</sub> 值为 3.41 mmol/L,与日本对虾 PO 的 K<sub>m</sub> 值 (3.45 mmol/L)<sup>[18]</sup> 相同,稍高于褐虾 PO<sup>[11]</sup> (2.5 mmol/L) 和中国明对虾 PO<sup>[9]</sup> (1.99 mmol/L)。上述 K<sub>m</sub> 值的差异可能与物种差异、酶的结构、pH 值、温度等条件有关。此外,本文所得日本蛭 PO 纯品对儿茶酚的 K<sub>m</sub> 值为 7.97 mmol/L,表明该酶对儿茶酚的结合能力要低于 L-DOPA。

据报道,昆虫中的 PO 可分为漆酶 (E. C. 1. 10. 3. 2, *p*-diphenol : O<sub>2</sub> oxidoreductase)、儿茶酚酶 (E. C. 1. 10. 3. 1 diphenol : O<sub>2</sub> oxidoreductase) 和酪氨酸酶 (E. C. 1. 14. 18. 1 monophenol, L-DOPA : O<sub>2</sub> oxidoreductase) 三种<sup>[19]</sup>。日本蛭 PO 能够有效地氧化 L-DOPA 和儿茶酚,但不能氧化对苯二酚和酪氨酸,表明该酶是一种典型的儿茶酚酶。各种氧化酶抑制剂对日本蛭 PO 活性的影响结果表明,该酶对儿茶酚酶的特异性抑制剂苯硫脲和亚硫酸钠极为敏感,对硫脲和苯甲酸非常敏感,但对柠檬酸、半胱氨酸和抗坏血酸不敏感,表明该酶极可能是一种儿茶酚酶类型的 PO。该性质与褐虾<sup>[20]</sup> PO 相同,而与海鞘<sup>[14]</sup>、中国明对虾<sup>[9]</sup>、淡水小龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*)<sup>[10]</sup>、褐虾<sup>[11]</sup> 等其他一些甲壳动物 PO 的酪氨酸性质不同<sup>[9-11]</sup>。

金属螯合剂 EDTA 和 DETC 均能显著抑制 PO 活性,且 Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 也能有效地抑制 PO 活性,表明该 PO 可能是一种含铜金属酶。此外,被 DETC 抑制的 PO 活性可特异性地被 Cu<sup>2+</sup> 回复,鉴于 DETC 是铜离子的特异性螯合剂,从而表明日本蛭 PO 确是一种铜金属酶,与中国明对虾<sup>[9]</sup>、淡水小龙虾<sup>[10]</sup>、海鞘<sup>[14]</sup> 和菲律宾蛤<sup>[16]</sup> 的 PO 相似。且已在

淡水小龙虾中鉴定出了两个功能性的铜离子结合位点<sup>[10]</sup>,酶中所含有的铜离子恰好解释了 Cu<sup>2+</sup> 和金属螯合剂为什么能同时抑制该酶活性。目前正在进行该 PO 的基因克隆与筛选研究。

## 参考文献:

- [1] Johansson M W, Söderhäll K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system[J]. **Parasitology Today**, 1989, 5:171-176.
- [2] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. **Current Opinion in Immunology**, 1998, 10:23-28.
- [3] Song Y L, Yu C I, Lien T W, *et al.* Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2003, 14:317-331.
- [4] Coles J A, Pipe R K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 1994, 4:337-352.
- [5] Aso Y, Kramer K J, Hopkins T L, *et al.* Characterization of haemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L) [J]. **Insect Biochemistry**, 1985, 15:9-17.
- [6] Asp  A, Söderhäll K. Purification of prophenoloxidase from crayfish cells, and its activation by an endogenous serine proteinase [J]. **Insect Biochemistry**, 1991, 21:363-373.
- [7] Durrant H J, Ratcliffe N A, Hipkin C R, *et al.* Purification of the pro-phenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis* [J]. **The Biochemical Journal**, 1993, 289:87-91.
- [8] Kwon T H, Lee S Y, Lee J H, *et al.* Purification and characterization of prophenoloxidase from the haemolymph of coleopteran insect *Holotrichia diomphalia* larvae[J]. **Molecules and Cells**, 1997, 7:90-97.
- [9] Fan T J, Wang X F. Purification and partial biochemical characterization of phenoloxidase from *Panaeus chinensis* [J]. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 2002, 34:589-94.
- [10] Asp  A, Huang T S, Cerenius L, *et al.* cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1995, 92:939-943.
- [11] Gollas- Galv T, Hernandez-López J, Vargas-Albores F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Panaeus californiensis*) hemocytes[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1999, 122:77-82.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. **Nature**, 1970, 227:680-685.
- [13] Ashida M, Dohke K. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. **Insect Biochemistry**, 1980, 10:37-47.
- [14] Hata S, Azumi K, Yokosawa H. Ascidian phenoloxidase: its release from hemocytes, isolation, characterization and physiological roles [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1998, 119:769-776.
- [15] Lowry O H, Rosebrough N L, Farr A L, *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1951, 193:265-275.
- [16] Cong R S, Sun W J, Liu G X, *et al.* Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2005, 18:61-70.
- [17] Simpson B K, Marshall M R, Otwell W S. Phenoloxidase from shrimp (*Panaeus setiferus*): purification and some properties [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1987, 35:918-921.
- [18] Zhao J, Qi X Y, You Y M, *et al.* Study on some characteristics of phenoloxidase from Japanese prawn, *Panaeus japonicus* [J]. **Journal of Shanghai Fisheries University**, 1997, 6:157-165.
- [19] Barrett F M. Phenoloxidases from larval cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: characterization, developmental changes, and inhibition by antiphenoloxidase antibodies[J]. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 1987, 5:99-118.
- [20] Vargas-Albores F, Guzmán-Murillo A, Ochoa J L. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Panaeid shrimp (*Panaeus californiensis*) [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1993, 106A:299-303.

## Purification and partial characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*

YANG Ling-ling , FAN Ting-jun , CONG Ri-shan , TANG Zhi-hong , SUN Wen-jie ,  
LIU Guang-xing , MENG Xiang-hong , ZHU Li-yan

(Department of Marine Biology , Division of Life Science and Technology , Ocean University of China ,  
Qingdao 266003 , China)

**Received :** Jan. , 13 , 2005

**Key words :** *Charybdis japonica* ; phenoloxidase ; *L*-DOPA (*L*-dihydroxyphenylalanine) ; catechol oxidase ; metalloenzyme

**Abstract :** Phenoloxidase (PO) from hemolymph of *Charybdis japonica* was purified by gel-filtration and ion-exchange chromatography , and characterized in terms of its molecular weight and enzymatic properties by using *L*-dihydroxyphenylalanine (*L*-DOPA) as the specific substrate in this study. It was found that pro-phenoloxidase (proPO) , isolated as a monomeric protein , had a molecular weight of 69.5 ku , and a 64.5 ku PO molecule was often contained in preparations. The PO showed an optimal pH value of 6.0 , and an optimal temperature of 40 °C , respectively. And an apparent  $K_m$  value of PO was 3.41 on *L*-DOPA , and 7.97 on catechol , respectively. PO activity was extremely sensitive to sodium sulfite and 1-phenyl-2-thiourea , and quite sensitive to thiourea and benzoic acid. Based on its sensitivity to different oxidase inhibitors and a higher affinity on catechol , this PO was thus classified as an *o*-diphenoloxidase. The PO activity was also strongly inhibited by  $Zn^{2+}$  ,  $Mg^{2+}$  , ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethyldithiocarbamate (DETC) . And the DETC-inhibited PO activity can be recovered perfectly by  $Cu^{2+}$  . Then it can be concluded that *Charybdis* PO is most probably a metalloenzyme that required  $Cu^{2+}$  for its full activity.

(本文编辑 :刘珊珊)