

# 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)漆酶型 酚氧化酶的纯化及特性分析\*

蒋经伟 邢 婧<sup>①</sup> 战文斌

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

**提要** 采用非变性电泳结合特异性底物发色方法从菲律宾蛤仔血细胞中分离出一种酚氧化酶,研究了该酶的酶促反应动力学参数,金属离子、抑制剂对酶活的影响。结果表明,分离获得的酚氧化酶分子量约为 563kDa;对底物邻苯二酚、左旋多巴(L-DOPA)、多巴胺、对苯二酚的米氏常数  $K_m$  分别为 0.42、1.60、1.79 和 1.76mmol/L;酶的活性在  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  浓度为 5、10、20、30mmol/L 时受到抑制;酶的活性可被抑制剂抗坏血酸、二乙基二硫代氨基甲酸钠(DETC)、半胱氨酸、亚硫酸钠、柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、叠氮钠和硫代尿素等抑制。根据底物特异性、抑制剂等结果,所分离获得的酚氧化酶属于漆酶型的含铜酚氧化酶。

**关键词** 菲律宾蛤仔,血细胞,漆酶型酚氧化酶,金属酶

**中图分类号** Q26

酚氧化酶是软体动物免疫防御系统中最重要的免疫因子之一,通过催化底物酚生成不稳定的醌,醌经过一系列非酶促反应生成黑色素,最终黑色素及其中间产物参与黑化、吞噬、包埋、损伤修复和病原清除等免疫过程(刘志鸿等, 2003; Munoz *et al*, 2006; Cerenius *et al*, 2008)。酚氧化酶免疫功能的发挥与酶的生化特性紧密相关,有关双壳类软体动物血淋巴中酚氧化酶活力与温度、pH 等环境因子以及病原或异物刺激的关系的研究已有诸多报道。在牡蛎(*Saccostrea glomerata*)中(Aladaileh *et al*, 2007),血淋巴中酚氧化酶活力对温度和 pH 的变化非常敏感,在 37℃、pH 8.5 的条件下具有最大值,当条件变为 5℃、pH 5.0 时,血淋巴中酚氧化酶活力下降 60%;在珍珠牡蛎(*Pinctada fucata*)中(Jing *et al*, 2006),铜离子刺激可引起血淋巴中酚氧化酶活力急剧升高,并且酚氧化酶对刺激的应答早于其他被测酶;在菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、鸡帘蛤(*Chamelea gallina*)和葡萄牙蛤(*Tapes decussatus*)中(Munoz *et al*, 2006),对

受寄生虫感染的个体的血淋巴进行酚氧化酶活力测定,发现酚氧化酶活力显著高于对照组;在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中(Xing *et al*, 2008; Lin *et al*, 2011),急性病毒性坏死病毒感染或微生物多糖刺激 5h 后,血淋巴中酚氧化酶活力急剧升高,并发现酚氧化酶是机体中对病原或异物刺激最早作出应答的免疫因子之一。此外,在贻贝(*Mytilus edulis*, *Perna viridis*, *Perna perna*)以及海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)中(Coles *et al*, 1994; Asokan *et al*, 1997; Barracco *et al*, 1999; Jordan *et al*, 1997; Hellio *et al*, 2007),同样发现血淋巴中的酚氧化酶活力对温度、pH、盐度、细菌或免疫多糖的刺激极为敏感。这些结果表明酚氧化酶是双壳类软体动物免疫防御和生理应答系统中最为敏感的因子之一,但在双壳贝类中有关该酶的分离提纯及酶学特性的研究并不多,仅见于海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、贻贝(*Mytilus edulis*)和菲律宾蛤仔等几个物种(Renwraent *et al*, 1996; Cong *et al*, 2005; Jiang *et al*, 2011),主要

\* 国家自然科学基金资助项目,30901112号;教育部新世纪优秀人才支持计划项目,NCET-10-0763号;教育部留学归国人员科研启动金,教外司留[2011]1139号。蒋经伟,博士研究生, E-mail: weijingjiang@live.cn

通讯作者:邢 婧,博士,副教授, E-mail: xingjing@ouc.edu.cn

收稿日期:2011-09-07,收修改稿日期:2011-10-30

研究了该酶的分子量、底物特异性、特定浓度的金属离子及抑制剂对酶活的影响等内容,本研究采用非变性电泳结合特异性底物发色的方法从菲律宾蛤仔血细胞中得到一种漆酶型的酚氧化酶,并分析了该酶的酶促反应动力学参数、不同浓度的金属离子和抑制剂对酶活的影响,以期为双壳类软体动物酚氧化酶的特性研究积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)[壳长(2.1±0.3)cm]购自青岛南山水产品市场,于实验室暂养、备用。

### 1.2 血细胞破碎液上清的制备

从菲律宾蛤仔的围心腔抽取血淋巴,血淋巴在4℃、400g离心10min,收集血细胞沉淀,用PBS缓冲液(2.7mmol/L KCl, 0.137mol/L NaCl, 1.47mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.09mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, PBS, pH 7.6)重悬。重悬液经超声波破碎后,于4℃、15000g离心40min,取上清液作为血细胞破碎液上清(HLS),-80℃冻存,备用。

### 1.3 酚氧化酶的纯化

采用非变性凝胶电泳,分离胶为连续梯度丙烯酰胺,浓度为6%—20%,浓缩胶为5%。将HLS上样凝胶中,以恒功率3W的条件在Tris-甘氨酸缓冲液(0.025mol/L Tris, 0.2mol/L Glycine, pH 8.0)中电泳12h,以分子量范围为67—669kDa的Marker(GE)作为标准蛋白。电泳后,将凝胶中的一条泳道切下浸于1%邻苯二酚溶液中发色,以定位酚氧化酶条带的位置;将未发色凝胶中的对应酚氧化酶条带切下,浸于PBS缓冲液中,分别经高速分散器匀浆,超声波破碎,17000g离心30min。收集上清液并脱盐浓缩,最终得到纯化的酚氧化酶溶液。整个过程除发色步骤外均在4℃下完成,用于酚氧化酶纯化的各种缓冲液中均不含有十二烷基硫酸钠(SDS)和还原剂。

### 1.4 酚氧化酶活性和蛋白浓度测定

按照 Xing 等(2008)的方法测定酚氧化酶活性。具体操作为:100μl HLS 或提纯的酚氧化酶溶液与2.0ml 15mmol/L 的左旋多巴(L-DOPA)混匀后,在490nm 波长下测定光吸收,每隔30min 读数一次,共读30次,在此反应条件下以A<sub>490</sub>值每分钟增长0.001定义为一个酶活力单位(U)。采用Bradford(1976)方法测定蛋白浓度,以牛血清白蛋白(Sigma)作为标准蛋

白。酚氧化酶总活力为样品中具有的全部酚氧化酶活力;酚氧化酶特异性活力(U/mg)定义为每毫克蛋白所具有的酚氧化酶活力。总活力回收率、纯化倍数的计算方法如下:

$$\text{总活力回收率} = \frac{\text{纯化后的酚氧化酶总活力}}{\text{纯化前 HLS 酚氧化酶总活力}}$$
$$\text{纯化倍数} = \frac{\text{纯化后的酚氧化酶特异性活力}}{\text{纯化前 HLS 酚氧化酶特异性活力}}$$

### 1.5 酶促反应动力学参数的测定

100μl 酚氧化酶溶液分别与2.0ml 不同浓度的邻苯二酚、L-DOPA、多巴胺、对苯二酚和酪氨酸底物溶液混匀,在490nm 光吸收下测定酚氧化酶活性。采用Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算酚氧化酶的反应动力学参数。本实验重复3次。

### 1.6 金属离子对酚氧化酶活性的影响

以MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>和CaCl<sub>2</sub>作为二价金属离子来源。于4℃,100μl 酚氧化酶溶液分别与100μl 不同浓度的各种金属离子溶液预孵育20min,然后加入1.9ml 15mmol/L 的L-DOPA 溶液,最后在490nm 光吸收下测定酚氧化酶活性。对照组中,以100μl 超纯水代替金属离子溶液。本实验重复3次。

### 1.7 抑制剂对酚氧化酶活性的影响

选择半胱氨酸、抗坏血酸、亚硫酸钠、柠檬酸、硫代尿素、叠氮钠、二乙基二硫代氨基甲酸钠(EDTA)和乙二胺四乙酸二钠(DETC)作为抑制剂。在4℃条件下,100μl 酚氧化酶溶液分别与100μl 不同浓度的各种抑制剂溶液混匀后,预孵育20min,然后加入1.9ml 15mmol/L 的L-DOPA 溶液,混匀后在490nm 光吸收下测定酶活。对照组中,以100μl 超纯水代替100μl 抑制剂溶液。本实验重复3次。

### 1.8 数据分析

1.6 和 1.7 节中的实验数据使用 SPSS 11.5 分析,结果以平均值±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 酚氧化酶的纯化

非变性电泳后,HLS 呈现许多连续的蛋白条带,但其中仅一条蛋白带与邻苯二酚反应呈现红褐色,即为含酚氧化酶的条带,分子量约为563kDa(图1)。蛋白浓度和酚氧化酶活性测定结果显示,从77.62mg 的HLS 总蛋白中得到0.21mg 酚氧化酶的纯化样品,

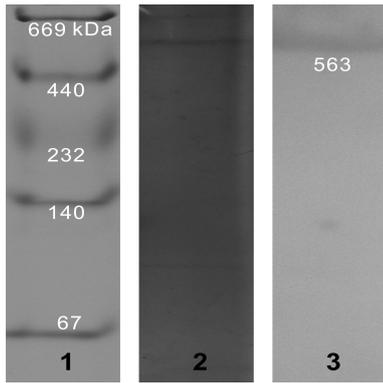


图1 菲律宾蛤仔血细胞破碎液上清非变性电泳图

Fig.1 Native-PAGE of the hemocyte lysate supernatant from *R. philippinarum*

1. 标准蛋白; 2. 血细胞破碎液上清考马斯亮蓝 R-250 染色结果; 3. 血细胞破碎液上清邻苯二酚显色结果

纯化前的 HLS 酚氧化酶总活力和特异性活力分别为 947.54U 和 12.21U/mg, 纯化后的酚氧化酶总活力和特异性活力分别为 507.5U 和 2416.67U/mg, 总活力回收率为 53.56%, 纯化倍数为 197.93。

2.2 酶促反应动力学参数

经 Lineweaver-Burk 双倒数作图

法计算得到, 纯化的酚氧化酶对邻苯二酚、L-DOPA、多巴胺、对苯二酚的米氏常数  $K_m$  分别为 0.42、1.60、1.79、1.76mmol/L, 但该酶不能催化酪氨酸(图 2)。

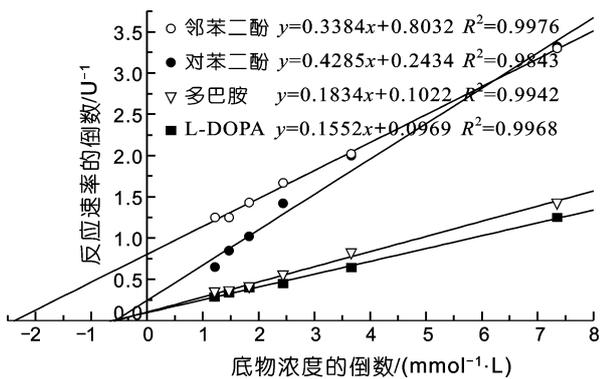


图2 酚氧化酶的动力学参数分析

Fig.2 Kinetics analysis of the phenoloxidase

2.3 金属离子对酚氧化酶活性的影响

$Mn^{2+}$ 除在 50mmol/L 浓度时对酚氧化酶活性有较弱的激活作用外, 在 5、10、20、30mmol/L 时均抑制酚氧化酶的活性;  $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 在所选浓度均抑制酚氧化酶的活性, 其中  $Fe^{2+}$ 和  $Cu^{2+}$ 对酚氧化酶活性的抑制作用较强(图 3)。

2.4 抑制剂对酚氧化酶活性的影响

8 种抑制剂对酚氧化酶的活性均有抑制作用, 其中抗坏血酸、DETC、半胱氨酸和亚硫酸钠对酚氧化酶活性的抑制作用最为强烈, 均在 10mmol/L 浓度时产生完全抑制; 柠檬酸、EDTA、叠氮钠和硫代尿素对酚氧化酶活性的抑制作用依次减弱, 在浓度为

50mmol/L 时对酚氧化酶活性抑制率分别为 100%、94%、23%、7% (图 4)。

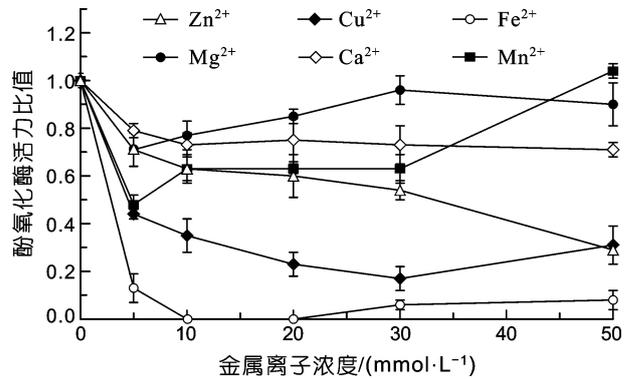


图3 金属离子对酚氧化酶活性的影响

Fig.3 Effects of metal ions on the activity of the phenoloxidase

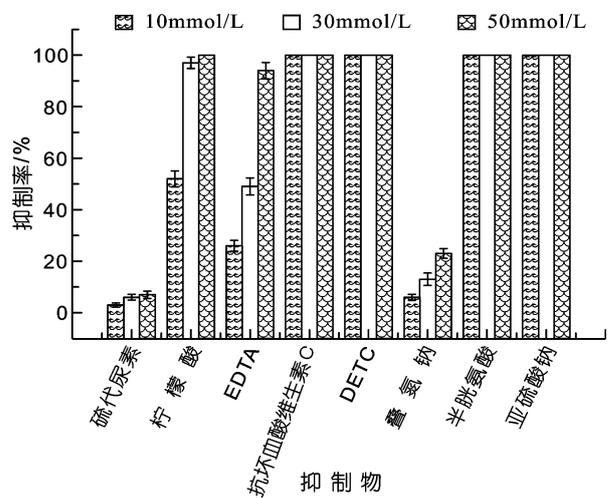


图4 抑制剂对酚氧化酶活性的影响

Fig.4 Effects of inhibitors on the activity of the phenoloxidase

3 讨论

本研究采用非变性电泳结合特异性底物发色的方法从菲律宾蛤仔血细胞中部分纯化出一种酚氧化酶。该酶可催化邻苯二酚、左旋多巴(L-DOPA)、多巴胺和对苯二酚, 但不能催化酪氨酸, 其活性受到  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 和  $Ca^{2+}$ 的明显抑制以及抗坏血酸和 DETC 等的强烈抑制, 但受 EDTA、硫代尿素和叠氮钠的抑制较弱。根据 Barret(1987)对酚氧化酶的分类, 所分离的酚氧化酶属于漆酶型酚氧化酶。已报道的菲律宾蛤仔酚氧化酶(Cong *et al*, 2005)可催化酪氨酸和 L-DOPA, 但不能催化对苯二酚, 属于酪氨酸酶型酚氧化酶, 其活性受到  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 和  $Ca^{2+}$ 的明显抑制以及 DETC、EDTA 和硫代尿素的强烈抑制, 但

受抗坏血酸的抑制较弱。二者在底物及酶学特性上的差异证明在菲律宾蛤仔中存在不止一种类型的酚氧化酶。

非变性电泳结果显示部分纯化的酚氧化酶分子量为 563kDa, 与海湾扇贝酚氧化酶的分子量(555kDa) (Jiang *et al*, 2011)相似, 但高于贻贝(*Mytilus edulis*)酚氧化酶(381kDa) (Renwrantz *et al*, 1996)和牡蛎 *S. glomerata* 酚氧化酶(219kDa) (Aladaileh *et al*, 2007)。Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对本研究所得的酚氧化酶活性有明显的抑制作用, 这一结果与菲律宾蛤仔酪氨酸酶型酚氧化酶中的结果相似(Cong *et al*, 2005), 表明菲律宾蛤仔中的两种酚氧化酶都受到 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的抑制, 并且这种影响不呈现剂量依赖性。此外, 本研究得到的酚氧化酶还受到 Mn<sup>2+</sup>和 Fe<sup>2+</sup>的抑制, 并且抑制作用不呈现剂量依赖性, 这与海湾扇贝的酚氧化酶相似(Jiang *et al*, 2011)。目前为止, 二价金属离子影响酚氧化酶活性的机制尚不明确, 有报道推测二价金属离子可能通过影响酚氧化酶特定肽段的二级结构来影响酚氧化酶的活性(Feng *et al*, 2008), 但这种推论尚无法解释本实验中金属离子影响的非剂量依赖性, 尤其是 Mn<sup>2+</sup>, 在低浓度(5、10、20、30mmol/L)表现为抑制, 在高浓度(50mmol/L)有激活作用, 因此二价金属离子影响酚氧化酶活性的具体机制有待于进一步研究。

柠檬酸、DETC、半胱氨酸、亚硫酸钠对本研究中酚氧化酶活性的强烈抑制作用与菲律宾蛤仔酪氨酸酶型酚氧化酶的结果较为相似(Cong *et al*, 2005)。但是 EDTA 和硫代尿素对酪氨酸酶型酚氧化酶抑制作用强烈, 对本研究中的酚氧化酶抑制作用较弱; 而抗坏血酸对酪氨酸酶型酚氧化酶抑制作用较弱, 对本研究中的酚氧化酶抑制作用强烈; 而且叠氮钠作为漆酶的典型抑制物(Nellaiappan *et al*, 1989; Chakroun *et al*, 2010), 可明显抑制本研究所得的酚氧化酶的活性。因此, 从抑制物的影响结果上也可以得出, 本研究中的酚氧化酶不同于菲律宾蛤仔中已报道的酪氨酸酶型酚氧化酶。此外, EDTA 和 DETC 均能抑制本研究中酚氧化酶的活性, 表明该酶是含铜的酚氧化酶。

致谢 中国海洋大学水产学院林听听、李子牛、倪永庆同学在实验材料采集、处理过程中给予帮助, 谨致谢忱。

### 参 考 文 献

刘志鸿, 牟海津, 王清印, 2003. 软体动物免疫相关酶研究进

展. 海洋水产研究, 24: 86—90

- Aladaileh S, Rodney P, Nair S V *et al*, 2007. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148: 470—480
- Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P, 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel, *Perna viridis* Linnaeus. *Developmental and Comparative Immunology*, 21: 1—12
- Barracco M N, Dias I, Moreira F M, 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish and Shellfish Immunology*, 9: 387—404
- Barret F M, 1987. Phenoloxidases from larval cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: characterization, developmental changes, and inhibition by antiphenoloxidase antibodies. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 5: 99—118
- Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248—254
- Cerenius L, Lee B L, Söderhäll K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29: 263—271
- Chakroun H, Mechichi T, Martinez M J *et al*, 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 45: 507—513
- Coles J A, Pipe R K, 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 4: 337—352
- Cong R S, Sun W J, Liu G X *et al*, 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 18: 61—70
- Feng C J, Song Q S, Lü W J *et al*, 2008. Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151: 139—146
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B *et al*, 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 433—440
- Jiang J W, Xing J, Sheng X Z *et al*, 2011. Characterisation of phenoloxidase from the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research*, 30: 273—277
- Jing G, Li Y, Xie L P *et al*, 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144: 184—190
- Jordan P J, Deaton L E, Cardenas W *et al*, 1997. Initial charac-

- terization of the hemolymph phenol oxidase system in the scallops *Argopecten irradians* and *Placopecten magellanicus*. *Journal of Shellfish Research*, 16: 355
- Lin T T, Xing J, Jiang J W *et al*, 2011.  $\beta$ -glucan-stimulated activation of six enzymes in the haemocytes of the scallop *Chlamys farreri* at different water temperatures. *Aquaculture*, 315: 213—221
- Munoz P, Meseguer J, Esteban M A, 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 12—19
- Nellaiappan K, Devasundari A F, Dhandayuthapani S, 1989. Properties of phenol oxidase in *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, 99: 403—407
- Renwranz L, Schmalmack W, Redel R *et al*, 1996. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. *Journal of Comparative Physiology Part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 165: 647—658
- Xing J, Lin T T, Zhan W B, 2008. Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiosis virus (AVNV). *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 847—852

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE-TYPE PHENOLOXIDASE FROM THE CLAM *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

JIANG Jing-Wei, XING Jing, ZHAN Wen-Bin

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

**Abstract** In this paper, a phenoloxidase (PO) of clam *Ruditapes philippinarum* was purified from hemocytes using linear-gradient native-PAGE combined with catechol staining. The results showed that this PO had a molecular mass of 563kDa in native-PAGE. Kinetics determination indicated that the  $K_m$  values of PO for catechol, L-DOPA, dopamine and hydroquinone were 0.42, 1.60, 1.79 and 1.76mmol/L, respectively. The PO activity was inhibited by  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  at concentrations of 5, 10, 20, 30mmol/L, and also inhibited by inhibitors including ascorbic acid, sodium diethyldithiocarbamate (DETC), cysteine, sodium sulfite, citric acid, ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA), sodium azide and thiourea. Based on the substrate specificity and the results of inhibition, it could be concluded that this PO was a laccase-type copper-containing phenoloxidase.

**Key words** *Ruditapes philippinarum*, Hemocytes, Laccase-type phenoloxidase, Metalloenzyme

### 2011 年度《海洋与湖沼》动态

(1) 《海洋与湖沼》2011 年最新公布的总被引频次在海洋科学期刊中名列第一位; 影响因子为 1.404, 学科影响指标和综合评价总分均列海洋科学期刊首位; 综合评价总分在全国科技期刊中排第 18 位。

(2) 荣获 2011 年度百种中国杰出学术期刊奖。

(3) 荣获 2011 年度中国精品科技期刊奖。