

# 金属离子对菜青虫酚氧化酶活力的影响

薛超彬<sup>2</sup>, 王勤<sup>1</sup>, 贺量<sup>1</sup>, 柯莉娜<sup>1</sup>, 罗万春<sup>2</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 山东农业大学植保学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 以菜青虫五龄幼虫为材料, 冰浴匀浆, 在 4℃ 下 8 000 r/min 离心, 取上清液, 经 35% 饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀, 经 Sephadex G-100 凝胶柱层析等步骤分离, 获得部分纯化的菜青虫酚氧化酶制剂. 研究多种金属离子对该酶活性的影响, 结果表明: 碱金属离子 K<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 对酶活力没有影响. 碱土金属离子 Mg<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 对酶有激活作用, 激活作用的大小顺序为 Mg<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Ba<sup>2+</sup>. 过渡金属离子 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对酶活力的影响呈现不同的效应, Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对该酶活性有不同程度的激活作用, Cu<sup>2+</sup> 浓度在 0.10 mmol/L 内对该酶有一定的激活作用, 浓度大于 0.13 mmol/L 为抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 为 0.65 mmol/L. 重金属离子 Hg<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 和 Pb<sup>2+</sup> 对酶活力有不同程度的激活作用, 以 Hg<sup>2+</sup> 的激活作用最为显著.

**关键词:** 菜青虫; 酚氧化酶; 金属离子; 酶活力

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)Sup-0120-03

菜青虫是菜粉蝶 (*Pieris rapae* L.) 的幼虫, 它主要侵食十字花科植物的叶, 从而其伤口方便了软腐病菌侵入, 最后导致植物软腐病的发生, 严重影响了蔬菜的品质<sup>[1]</sup>. 在防治该害虫上, 目前一般采用化学防治方法, 但农药残留常常对人体和环境造成较大危害. 因此, 发展对人体安全且对昆虫具专化作用的杀虫剂用于菜青虫的防治尤为重要. 酚氧化酶 (phenoloxidase, EC. 1.14.18.1) 广泛存在于生物体内. 它是昆虫体内的一种重要酶类, 在昆虫的变态发育和免疫系统中起重要作用<sup>[2-4]</sup>. 它具有单酚酶活性和二酚酶活性, 能将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸 (L-多巴), 然后再将多巴氧化成多巴醌. 昆虫中最常见的鞣化是醌鞣化, 其中包括 O-醌与蛋白表面的自由氨基成键结合<sup>[5]</sup>. 酚氧化酶是一种含铜的金属酶, 每一个亚基含有两个金属铜离子, 两个铜离子分别与蛋白质分子中组氨酸结合, 另有一个内源桥基将两个铜离子联系在一起, 构成酚氧化酶催化氧化反应活性中心<sup>[6]</sup>. 金属离子在酶的催化反应中起重要作用, 估计有三分之一的酶在催化过程的一个或几个阶段中需要金属离子. 金属离子通过使底物直接结合到活性部位, 或者通过可逆地改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应, 或者通

过静电稳定或屏蔽负电荷等途径参加酶的催化反应<sup>[7]</sup>. 本文探讨了金属离子对酚氧化酶活力的影响, 为开发以该酶为靶标的“新型害虫控制剂”进行理论探讨.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菜青虫 (*Pieris rapae* L.) 采自从厦门市集美区后溪镇菜园, 在室内大量饲养. 收集五龄幼虫于 -20℃ 下保存备用. L-多巴 (L-DOPA) 为 Sigma 产品, 金属离子无机盐及其他试剂均为国产分析纯, 所用试剂均用重蒸水配制.

### 1.2 酶液的制备

取菜青虫五龄幼虫按 5 倍体质量的比例加入预冷的 0.20 mol/L 磷酸 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 缓冲液 (pH 6.8), 冰浴匀浆, 4℃ 静置 30 min, 4℃ 离心 (8 000 r/min) 30 min, 得上清液, 35% 饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀, 4℃ 离心 (8 000 r/min) 30 min, 取沉淀加入适量 0.20 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 溶解. 置于 4℃ 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 中透析直至无 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 检出, 期间更换数次透析液. 将透析后酶液经 Sephadex G-100 凝胶分离纯化, 测定各分离管的酶活力, 收集活力峰部分作为酶活力分析原料.

### 1.3 金属离子对酶活力影响的测定

参照陈清西等<sup>[8]</sup>的方法, 并略有改进. 采用磷酸钠盐缓冲体系, 2 mL 的测活体系中包含终浓度为 0.10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8), 1.0 mmol/L L-DO-

收稿日期: 2005-02-19

基金项目: 国家自然科学基金 (30270887), 福建省科技攻关课题 (2004N002) 资助

作者简介: 薛超彬 (1978-), 男, 博士研究生.

\* 通讯作者: Tel/Fax: 0592-2185487,

E-mail: chenqx@jngxian.xmu.edu.cn

PA, 不同浓度的金属离子, 加入 0.1 mL 酶液, 监测 475 nm (消光系数  $\epsilon = 3\ 700\ \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>[9]</sup> 光密度值随时间的增长直线, 从直线斜率求得酶活力. 实验在 37℃ 恒温下进行, 使用仪器为 Beckman DU 650 分光光度计. 以无效物反应体系为对照, 计算酶在各种金属离子存在下的相对活力. 各实验均重复 3 次, 以平均值表示酶活力, 酶活力单位 (U) 定义为在该条件下, 每分钟产生 1 mmol/L 产物的酶量.

## 2 结果与分析

### 2.1 碱金属离子对酶活力的影响

选用 NaCl、KNO<sub>3</sub> 和 Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为效应物, 研究碱金属离子 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 对酶活力的影响. 结果(表 1)表明: 当在测活体系中 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 浓度为 0~10 mmol/L 时, 酶活力相对稳定, 说明一价碱金属离子对酶活力没有影响, 同时也表明 Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 对酶活力无影响.

表 1 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 对菜青虫酚氧化酶相对活力的影响  
Tab.1 Effect on the activity of phenoloxidase from *Pieris rapae* by Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup>

金属离子浓度 /(mmol·L <sup>-1</sup> )	相对活力/%		
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
0	100	100	100
1.25	99.7	100	100
2.50	100	99.6	99.5
5.00	99.3	100.8	100.7
7.50	100.9	100	99.6
10.00	99.8	100.8	99.9

### 2.2 碱土族金属离子对酶活力的影响

选用 MgCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 为效应物, 测定了 Mg<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 二价碱土金属离子对酶活力的影响. 结果(图 1A)表明: 这些碱土族金属离子对酶均有不同程度的激活作用. 其中 Mg<sup>2+</sup> 的激活作用较为显著, 0.25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 可使酶活力提高 17%. 这 3 种金属离子的激活程度依次为 Mg<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Ba<sup>2+</sup>.

### 2.3 过渡金属离子对酶活力的影响

选用 MnSO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub> 和 ZnSO<sub>4</sub> 无机盐为效应物, 研究过渡金属离子 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对酶活力的影响. 结果表明: 过渡金属离子对酶的催化作用呈现不同的效应. 即 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对酶有不同程度的激活作用(图 1B). Zn<sup>2+</sup> 在 0.45 mmol/L 时可使酶活力提高 15%; Cu<sup>2+</sup> 对酶活力的影响结果(图

1C)表明: Cu<sup>2+</sup> 浓度在 0~0.10 mmol/L 时, 对酶活力有激活作用, Cu<sup>2+</sup> 浓度为 0.05 mmol/L 时, 可使酶活力提高 17.5%, 当 Cu<sup>2+</sup> 浓度大于 0.13 mmol/L 时, 对酶活力具有抑制作用, 即酶活力随 Cu<sup>2+</sup> 浓度增大而逐渐降低. 计算得出导致酶活力下降一半所需的 Cu<sup>2+</sup> 浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.65 mmol/L.

### 2.4 重金属离子对酶活力的影响

分别以 HgCl<sub>2</sub>、CdCl<sub>2</sub> 和 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 为效应物, 检测 Hg<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 和 Pb<sup>2+</sup> 重金属离子对酶活力的影响. 结果(图 1D)表明: 重金属离子对酶有不同程度的激活作用. Hg<sup>2+</sup> 的激活作用较 Pb<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 显著. 0.20 mmol/L Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 分别可使酶活力提高 50%、30%和 19%.

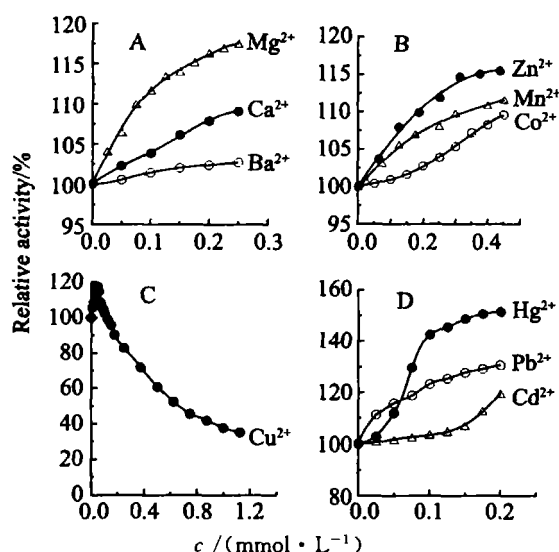


图 1 金属离子对菜青虫酚氧化酶活力的影响

Fig.1 Effects on phenoloxidase from *Pieris rapae* activity by metal ions

## 3 讨论

不同金属离子对酶活力的影响不同, 它们对酶的结构和功能所起的作用也不相同. 酶和金属的关系有 3 种情况: 1) 金属离子与酶蛋白紧密结合, 在酶的分离纯化过程中不相分离, 作为酶的组成部分; 2) 金属离子与酶蛋白松散结合, 纯化的酶中往往不含这类金属离子, 但当加入这些离子后酶活力大大提高, 这一类称为酶的金属离子激活剂; 3) 金属离子可抑制酶的活力, 称为酶的金属离子抑制剂<sup>[10]</sup>.

碱金属离子 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 对菜青虫酚氧化酶都没有影响, 可能是 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 等离子在细胞内外都是常见的, 它们在生物学上的主要作用是中和阴离子的电荷和保持细胞内外的渗透压, 经过长期的进化, 细胞对

这些离子浓度变化有着严密的调控机制,酚氧化酶的结构与功能也已适应这些离子浓度的变化<sup>[11]</sup>,所以 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 等离子对酶活力无影响。在研究二价金属离子 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ 对菜青虫酚氧化酶的作用时发现,这些金属离子对该酶有不同程度的激活作用,可能是由于这些离子的电子云排布中具有空轨道,能与酶蛋白分子中 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 等形成配位键,起着维持酶蛋白活性中心构象的作用<sup>[12]</sup>,以至于酶活力提高。 $\text{Cu}^{2+}$ 能强烈抑制中国对虾(*Penaeus chinensis*)酚氧化酶的活力,而 $\text{Mg}^{2+}$ 则能激活酶活力<sup>[13]</sup>,这与本文研究结果基本一致。重金属离子对菜青虫酚氧化酶活力有激活作用,这一结果与重金属离子对大多数酶的作用有所不同,可能是由于酶的种类和来源不同所致。

### 参考文献:

- [1] 柯莉娜,薛超彬,王勤,等.苯甲酸及其衍生物对菜青虫多酚氧化酶抑制作用[J].厦门大学学报(自然科学版),2004,43(6):856-860.
- [2] Ashida M, Yamazaki H. Biochemistry of the phenoloxidase system in insect: with special reference to its activation. Molting and Metamorphosis[M]. Tokyo: Japan Science Society Press, 1990. 239-261.
- [3] Boman H G, Faye I, Gudmundsson G H, et al. Cell-free immunity in *Cecropia*: a model system for antibacterial proteins[J]. Eur. J. Biochem., 1991, 20(1): 23-31.

- [4] 长谷川金,著.昆虫变态的生理化学[M].张义成,陆明贤,译.北京:农业出版社,1988.
- [5] 王荫长.昆虫生物化学[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [6] Wilcox D E, Porras A G, Hwang Y T, et al. Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase[J]. J. Am. Chem. Soc., 1985, 107: 4 015-4 027.
- [7] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2003.
- [8] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. J. Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18: 491-496.
- [9] Jiménez M, Chazarra S, Escribano J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes[J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49(8): 4 060-4 063.
- [10] Suckling C J. Enzyme Chemistry: impact and Application[M]. London: Chapman and Hall Press, 1984.
- [11] 赵欣平,舒畅,杨芳,等.金属离子和脲对白蜡虫碱性磷酸酶的影响[J].昆虫学报,2002,45(2):318-322.
- [12] 于新,黄小丹,冯彤,等.草菇酚氧化酶及过氧化物酶特性的研究[J].仲恺农业技术学院学报,1998,11(3):27-33.
- [13] 樊廷俊,汪小锋.中国对虾(*Penaeus chinensis*)酚氧化酶分离纯化及其部分生物化学性质[J].生物化学与生物物理学报,2002,34(5):589-594.

## Effects of Some Metal Ions on the Activity of Phenoloxidase from *Pieris rapae* L.

XUE Chao-bin<sup>2</sup>, WANG Qin<sup>1</sup>, HE Liang<sup>1</sup>, KE Lina<sup>1</sup>, LUO Wanchun<sup>2</sup>, CHEN Qingxi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;)

**Abstract:** Phenoloxidase is responsible for enzymatic browning during the growth of the insects. It is also involved in the defense reaction and has some certain relation with the immune condition of the insects. Phenoloxidase is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis: the hydroxylation of monophenol and the oxidation of  $\Theta$  diphenol to the corresponding  $\Theta$  quinone. As a series of researches, in the present paper, effects of some metal ions on the activity of phenoloxidase from the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L. were studied. The results showed that  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  and  $\text{Na}^+$  had no any effects on the activity of the tested enzyme.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  activated the enzyme and the activated order following:  $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ . The transitional metal ions had different effects on the activity of the enzyme.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  activated the enzyme.  $\text{Cu}^{2+}$  had different behaviors. At low concentration (lower than 0.10 mmol/L)  $\text{Cu}^{2+}$  could enhance the enzyme activity, but, at high concentration (higher than 0.13 mmol/L)  $\text{Cu}^{2+}$  could inhibit the enzyme and its  $IC_{50}$  was estimated to be 0.65 mmol/L. The results also indicated that  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  enhanced the enzyme activity and  $\text{Hg}^{2+}$  was a more efficacious activator in the heavy metal ions what we had determined.

**Key words:** *Pieris rapae* L.; phenoloxidase; metal ions; enzyme activity