

有机溶剂对菜青虫多酚氧化酶活力的影响

王勤¹,柯莉娜¹,薛超彬²,罗万春²,陈清西^{1*}

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

2. 山东农业大学农药毒理与应用技术省级重点实验室,山东 泰安 271018)

摘要:以菜青虫五龄虫为材料,分离提取多酚氧化酶,研究有机溶剂乙醇、正丙醇、乙二醇、丙二醇、丙三醇等对该酶催化 L-多巴(L-DOPA)氧化活力的影响.测定抑制作用的 IC_{50} 分别为 12.4、6.4、24.2、15.5 和 17.0%. 抑制剂作用的动力学研究结果表明:乙醇、乙二醇和丙三醇对酶的抑制作用表现为非竞争性类型,其抑制常数 K_1 分别为 12.05、23.50 和 17.53 mmol/L;正丙醇和丙二醇对酶的作用表现为混合型抑制,抑制常数 K_1 分别为 4.18 和 12.79 mmol/L, K_{18} 分别为 19.45 和 22.41 mmol/L.

关键词:菜青虫五龄虫;多酚氧化酶;有机溶剂;抑制作用

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

菜青虫是菜粉蝶 (*Pieris rapae* L.) 的幼虫,为菜粉蝶危害蔬菜的主要形态,它严重影响了蔬菜的种植.昆虫的多酚氧化酶(Polyphenoloxidase,简称 PPO, EC 1.10.1.1)在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要的作用^[1,2].它除了参与酚类物质的氧化以外,还与苯丙基类化合物的代谢以及类黄酮和生物碱的合成有关^[3].因此,在 1993 年我国著名昆虫毒理学家张宗炳指出:探索新杀虫药剂的 1 条最有希望的途径是生物合理途径,其中“原酪氨酸酶抑制剂”被列为首位^[4].所以设计适当的该酶的抑制剂作为杀虫剂具有广阔的应用前景,使昆虫无法完成发育而停留在幼虫期或蛹期进而死亡,这就需要深入了解 PPO 的性质,了解效应物对多酚氧化酶活力的影响变化,进一步了解昆虫的抗药机理.作为对菜青虫多酚氧化酶的系列研究,我们曾经探讨了菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶的性质差异、苯甲酸及其衍生物和铜离子及铜试剂等对该酶活力的

抑制作用(待见报).多数多酚氧化酶抑制剂是脂溶性,需采用有机溶剂溶解,本文探讨了有机溶剂对该酶活力的影响以及抑制作用机理,旨在为开发以该酶为靶标的新型害虫控制剂提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 实验材料

菜青虫 (*Pieris rapae* L.) 采自厦门市集美区后溪镇菜园,置室内大量饲养,以实验室培养的无农药甘蓝为食物进行繁殖,3 代后收集 5 龄虫置冰箱冷冻保存备用. L-多巴(L-DOPA)为 Sigma 化学公司产品,甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、乙二醇、丙二醇、丙三醇等试剂均为国产分析纯试剂,使用的蒸馏水为玻璃重蒸水.

1.2 多酚氧化酶(PPO)酶液的制备

取 5 龄幼虫按 5 倍体重的比例加入预冷的 0.20 mol/L $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$ 缓冲液(pH 6.80),冰浴匀浆,冰箱 4 静置 30 min,4 离心(4 800 r/min) 30 min.得上清液,用 35% 饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 处理约 45 h,其间更换透析液 5~6 次.将透析后酶液通过 Sephadex G 100 凝胶分离纯化,测定所得各分离管的酶活力,收集活力峰作为酶活力分析原料.蛋白浓度测定采用 Folin-酚法.

1.3 酶活力测定方法

PPO 活力测定参考文献[5],在包含 0.2 mol/L

收稿日期:2004-05-09

基金项目:博士后基金;福建省自然科学基金(B0410003);科技攻关课题项目(2004N002)

作者简介:王勤(1969-),女,博士后.

* Corresponding author,

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

pH 6.8 磷酸缓冲液, 1.0 mmol/L L-DOPA (作为底物) 和不同浓度的有机溶剂的 2.0 mL 的测活体系中, 加入酶液 30 μ L, 立刻混匀。于 Beckman DU 650 分光光度计, 37 $^{\circ}$ C 恒温下测定 475 nm 处的光密度值随时间的增长直线, 从其斜率求得酶活力, 消光系数按 ($\epsilon = 3700 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[6] 计算。效应物对酶的抑制作用机理是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化反应的动力学参数包括表观米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 的变化来判断。

2 实验结果

2.1 有机溶剂对菜青虫 PPO 活力的影响

分别以甲醇(a)、乙醇(b)、正丙醇(c)、异丙醇(d)、正丁醇(e)、乙二醇(f)、丙二醇(g)和丙三醇(h)为效应物, 探讨它们对菜青虫 PPO 催化 L-DOPA 氧化反应活力的影响。酶的剩余活力与有机溶剂的浓度依赖关系结果见图 1, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力逐渐下降。20% 浓度的上述有机溶剂依次分别使酶活力下降 57%, 42%, 25%, 52%, 77%, 59%, 47% 和 41%。一元醇的抑制效果为 $c > b > d > a > e$, 其中 c 约为 e 的 3 倍。多元醇的抑制效果为 $h > g > f$, h 和 g 没有太大差异。各有机溶剂导致酶活力下降一半, 所需的抑制剂浓度 (IC_{50}) 总结于表 1, 以供比较。

2.2 乙醇对菜青虫 PPO 的抑制作用表现为可逆效应

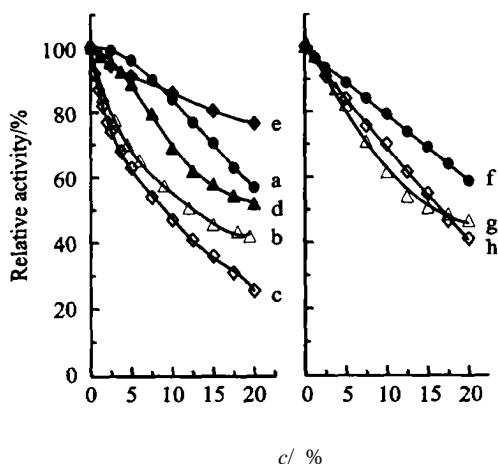


图 1 几种有机溶剂对菜青虫 PPO 活力的影响

Fig. 1 Effects of some organic acids on the activity of PPO from the 5th instar of *Pieris rapae* L. a~h was methylalcohol, ethylalcohol, propanol, isopropylalcohol, butanol, ethylene glycol, mono-propylene glycol, glycerol, respectively

在测活体系中, 固定底物(L-DOPA)浓度为 1.0 mmol/L, 加入不同浓度乙醇, 改变酶的加入量, 测定不同浓度乙醇对菜青虫多酚氧化酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响。图 2 表示酶经乙醇作用后的剩余酶活力与加入酶量间的关系, 酶活力对酶量作图得到 1 组通过原点的直线, 随着乙醇浓度的增大, 直线的斜率降低。此结果说明乙醇对酶的抑制作用属于可逆过程, 增加抑制剂浓度导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制, 催化效率降低, 而不是通过导致有效的酶量减少, 而引起酶活力的下降。本实验中所用的其它几种有机溶剂也均表现为可逆效应。

2.3 乙醇对菜青虫 PPO 表现为非竞争性抑制机理及抑制常数的测定

以乙醇为效应物研究抑制剂对菜青虫 PPO 的抑制作用机理。在测活体系中, 固定加入的酶量, 改变底物 L-DOPA 浓度, 测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响, 以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线, 说明酶促反应遵循米氏 (Michaelis-Menten) 动力学方程。以乙醇为效应物, Lineweaver-Burk 双倒数作图为一组横轴截距不变的直线, 说明乙醇不影响米氏常数 (K_m), 只影响最大反应速度 (V_m), 其抑制机理表现为非竞争性类型。图 3 为乙醇对菜青虫 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图, K_m 值不随着乙醇浓度的增大而改变, 而 V_{max} 则随着乙醇浓度增大而下降, 说明抑制剂与酶分子的结合和底物分子与酶的结合是独立的, 抑制剂不改变酶对底物的亲和力。这种抑制剂可以同时

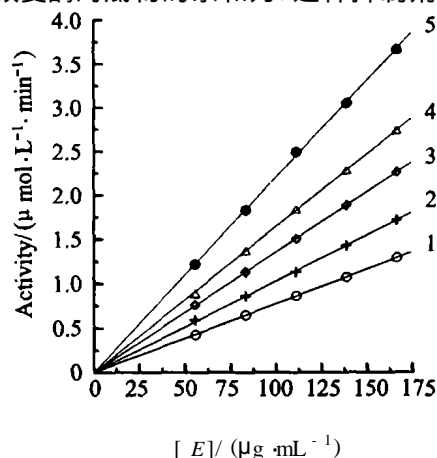


图 2 不同乙醇浓度下酶活力和酶量的关系

曲线 1~5 分别代表乙醇的浓度为: 0, 5, 10, 15 和 20%

Fig. 2 The effect of concentrations of ethylalcohol on the activity of the PPO from the 5th instar of *Pieris rapae* L.

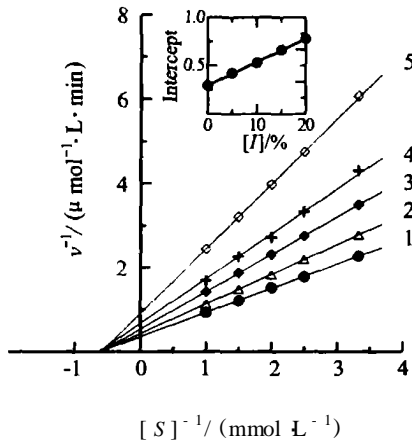


图3 乙醇对菜青虫 PPO 的抑制作用
直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0, 5, 10, 15 和 20 %

Fig. 3 Lineweaver-Burk polts for inhibition of ethylalcohol on the PPO from the 5th instar of *Pieris rapae* L.

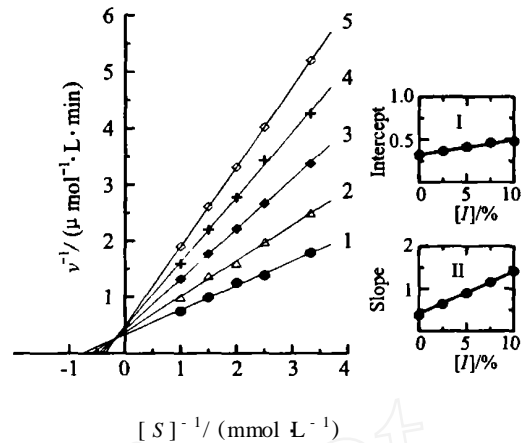


图4 正丙醇对菜青虫 PPO 的抑制作用
直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0, 2.5, 5.0, 7.5 和 10 %

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of propanol on the PPO from the the 5th instar of *Pieris rapae* L.

与游离酶 (E) 和结合酶 (ES) 结合,且结合常数相同.以不同浓度乙醇下测定的 $1/V_m$ 对乙醇浓度作图(图3内插图)为1条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数 ($K_I = K_{IS}$).相同的方法测得乙二醇、丙三醇对菜青虫 PPO 的抑制类型也表现为非竞争性抑制,所测得的抑制常数列于表 1.

表1 几种有机溶剂对菜青虫 PPO 抑制效应的比较
Tab.1 Comparison of the inhibitory effects of some organic acids on the PPO from the 5th instar of *Pieris rapae* L.

化合物	IC ₅₀ / %	抑制类型	抑制常数/ (mmol L ⁻¹)	
			K _I	K _{IS}
乙醇	12.4	非竞争性	12.05	12.05
正丙醇	6.4	混合性	4.18	19.45
乙二醇	24.2	非竞争性	23.50	23.50
丙二醇	15.5	混合性	12.79	22.41
丙三醇	17.0	非竞争性	17.53	17.53

2.4 正丙醇对菜青虫 PPO 表现为混合型竞争性抑制机理及抑制常数的测定

以相同的方法研究正丙醇对菜青虫 PPO 抑制作用机理.以正丙醇为效应物, Lineweaver-Burk 双倒数作图得到相交在第 2 象限的 1 组直线,横轴截距和纵轴截距都因正丙醇的浓度变化而改变,即米

氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 都随着正丙醇浓度改变而改变,其抑制机理表现为混合型效应.以斜率(图 4. I)和纵轴截距(图 4. II)对正丙醇浓度作图为直线,分别可以求出抑制剂对游离酶的抑制常数 (K_I) 和对酶-底物络合物的抑制常数 (K_{IS}).相同的方法测得丙二醇对菜青虫 PPO 的抑制类型也表现为混合型,所测得的抑制常数列于表 1.

3 讨论

多酚氧化酶(PPO)在昆虫体内以无活性的酚氧化酶原形式存在于血液和体壁内,在昆虫体液免疫中起着重要作用,与表皮层的着色和硬化等有关^[7].因此,可以通过抑制多酚氧化酶的活性使昆虫无法进一步生长发育直至死亡,从而达到灭虫目的.这也是生物农药开发的新途径.

本文选取的材料为菜青虫五龄虫,是经过本实验室种植、培养的甘蓝养殖 3 代后收集的,体内没有任何残余农药污染,保证了从所用的材料提取的 PPO 酶活力不受影响.本文采用直接抽提的菜青虫粗酶液检测酶活力,较好地反映了昆虫体内酶的性质,对探讨抑制剂的抑制效应与机理具有非常明显的实践意义.在本文所采用的几种有机溶剂中,甲醇、正丁醇、异丙醇对菜青虫 PPO 无明显的抑制效果,乙醇、正丙醇、乙二醇、丙二醇、丙三醇则表现出了较强的抑制作用,其中正丙醇的抑制效果最好.从表 1 可见,乙醇、乙二醇和丙三醇对该酶的抑制作用

机理表现为非竞争性类型,正丙醇和丙二醇则表现为混合型抑制。这种抑制类型的变化可能是由于在碳链上多了一个亚甲基,使电荷密度发生了变化而引起的。另外,曾伟成等^[8]曾报道乙醇对酪氨酸酶的抑制作用为反竞争性抑制,这可能与酪氨酸酶的来源不同有关。本文初步探讨了几种有机溶剂对菜青虫 PPO 的抑制作用,从效应物的角度可为生物杀虫剂的开发提供理论基础。

参考文献:

- [1] Ashida M, Yamazaki H. Molting and Metamorphosis [M]. Tokyo:Japan Science Society Press.,1990. 239 - 261.
- [2] Boman H G, Faye I, Gudmundsson G H. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial protein [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1991, 20(1): 23 - 31.
- [3] Auerbach V, Sheer D E. Forty bertz EEG in learning disabled and normal boys[J]. *J. Learn Disabi.*, 1988, (3): 15 - 17.
- [4] 张宗炳,冷欣夫. 杀虫药剂毒理及应用[M]. 北京:化学工业出版社,1993.
- [5] 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.
- [6] Jimenez M, Chazarra S, Escibano J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (8): 4 060 - 4 063.
- [7] 鲁兴萌. 多酚氧化酶的研究进展[J]. *中国蚕业*, 2000, 82(2): 49 - 50.
- [8] 曾伟成,陈曾变,郑能武. 乙醇对酪氨酸酶活性的影响[J]. *海峡药学*, 2000, 12(4): 36 - 37.

Inhibitory Effects of Some Organic Acids on the Polyphenoloxidase from the 5th Instar of *Pieris rapae* L.

WANG Qin¹, KE Li-na¹, XUE Chao-bin², LUO Wan-chun², CHEN Qing-xi^{1*}

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

2. Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The polyphenoloxidase (PPO) is more 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. The polyphenoloxidase is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis--the hydroxylation of a monophenol and the oxidation of -diphenol to the corresponding -quinone. As a series of researches, in the present paper, inhibitory effects of some organic solvent on the polyphenoloxidase (PPO) from the 5th instar of *Pieris rapae* were studied. The results showed that ethylalcohol (b), propanol (c), ethylene glycol (f), monopropylene glycol (g), glycerol (h) could inhibit the PPO activity for the oxidation of L-DOPA. The reactions of these inhibitors with the PPO are reversible with remaining enzyme activity. The IC_{50} (the inhibitor concentrations leading to 50% activity lost) were estimated to be 12.4、6.4、24.2、15.5 和 17%, respectively. The inhibitory mechanisms of compounds of b, f and h were showed to be noncompetitive type and the inhibitory constants (K_I) were determined to be 12.05、23.50 and 17.53 mmol/L, while c and g belong to be mixed typed inhibitors and their K_I are 4.18 and 12.79 mmol/L, K_{IS} are 19.45 and 22.41 mmol/L, respectively.

Key words: the 5th instar of *Pieris rapae* L.; polyphenoloxidase; organic solvent; inhibitory mechanism