

学校编码: 10384

分类号_____密级

学号: 21620071152054

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

菜青虫酚氧化酶的基因克隆及化合物对
酶活性的影响

**Molecular cloning of the cDNA encoding
prophenoloxidase from larvae of *Pieris rapae* and
inhibitory effects of compounds on its activity**

周晶晶

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 4 月 日

论文答辩时间: 2010 年 5 月 26 日

学位授予日期: 2010 年 月 日

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2010 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 (√)

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 2010 年 月 日

导师签名:

日期: 2010 年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
1 引言	3
1.1 菜粉蝶的概况	3
1.2 酚氧化酶的研究概况	4
1.2.1 酚氧化酶的生理功能.....	4
1.2.2 酚氧化酶的分布.....	7
1.2.3 酚氧化酶的活性中心.....	8
1.2.4 酚氧化酶生化特性.....	10
1.2.5 酚氧化酶基因克隆.....	13
1.2.6 酚氧化酶基因的组织表达.....	16
1.2.7 酚氧化酶抑制剂的研究概况.....	17
1.3 本课题的研究意义	19
2 材料试剂、仪器与方法	20
2.1 材料与试剂	20
2.2 仪器	21
2.3 方法	22
2.3.1 菜青虫酚氧化酶的基因克隆.....	22
2.3.2 菜青虫酚氧化酶基因的组织表达.....	31
2.3.3 效应物对菜青虫酚氧化酶活力的影响.....	33
2.3.4 苯甲醛缩氨基硫脲类化合物的合成.....	35
3 结果	36
3.1 菜青虫酚氧化酶的 cDNA 克隆结果.....	36
3.1.1 菜青虫总 RNA 的提取	36
3.1.2 菜青虫 PPO 基因中间片段扩增	36
3.1.3 PPO1 和 PPO2 基因 3' 末端片段扩增	38

3.1.4 菜青虫 PPO1 和 PPO2 基因 5' 末端片段扩增	39
3.1.5 菜青虫 PPO1 和 PPO2 基因的生物信息学分析	39
3.1.6 菜青虫 PPO1 和 PPO2 的氨基酸序列同源性比较	50
3.1.7 基于 PPO 基因的系统进化分析	55
3.2 Quantitative Real-Time PCR 方法分析 PPO 基因在菜青虫组织中的表达	61
3.3 合成的苯甲醛缩氨基硫脲类化合物对菜青虫 PO 活力的影响	64
3.3.1 2-羟基苯甲醛缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制作用	64
3.3.2 4-羟基苯甲醛缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制作用	64
3.3.3 4-二甲氨基苯甲醛缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制作用	66
3.3.4 2-氯苯甲醛缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制作用	68
4 讨论	69
4.1 菜青虫 PPO 基因分子克隆及序列分析	69
4.2 菜青虫 PPO 基因的组织表达	71
4.3 四种取代苯甲醛缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制作用比较 ..	73
参考文献	77
缩略语中英文对照表	87
致谢	89

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
1 Introduction	3
1.1 The background of <i>Pieris rapae</i>	3
1.2 The background of PO	4
1.2.1 Biological function of PO	4
1.2.2 Distribution of PO.....	7
1.2.3 Active center of PO.....	9
1.2.4 Biochemical characteristics of PO	10
1.2.5 Gene clone of PO.....	13
1.2.6 Tissue expression of PO.....	16
1.2.7 A review of researches on phenoloxidase inhibitor.....	18
1.3 Contents and significance	20
2 Material, Reagent and Instrument	21
2.1 Material and Reagent	21
2.2 Instrument	22
2.3 Method	23
2.3.1 cDNA cloning of PPO from <i>Pieris rapae</i>	23
2.3.2 Tissue expression of PO gene.....	32
2.3.3 Effect of benzaldehyde thiosemicarbozones.....	34
2.3.4 Benzaldehyde thiosemicarbozones synthesis	36
3 Results	37
3.1 The result of cDNA cloning of PPO from <i>Pieris rapae</i>	37
3.1.1 RNA extraction from <i>Pieris rapae</i>	37
3.1.2 Amplification of partial cDNA PPO	37
3.1.3 3'-Rapid Amplification of PPO1 and PPO2.....	39
3.1.4 5'-Rapid Amplification of PPO1 and PPO2.....	40

3.1.5 Bioinformatics analysis of sequence of PPO1 and PPO2 gene	40
3.1.6 Homology comparison of PPO1 and PPO2	51
3.1.7 Phylogenetic tree analysis of PPOs	55
3.2 Relatively Quantitative RT-PCR analyse tissue expression of PO gene	61
3.3 Effects of benzaldehyde thiosemicarbozones on PO	64
3.3.1 Effect of 2-hydroxy benzaldehyde thiosemicarbazone	64
3.3.2 Effect of 4-hydroxy benzaldehyde thiosemicarbazone	65
3.3.3 Effect of 4-Dimethylaminopyridine benzaldehyde thiosemicarba zone	66
3.3.4 Effect of 2-chloro benzaldehyde thiosemicarbazone	68
4 Discussion	69
4.1 Cloning and Analysis of PPO cDNA sequence	70
4.2 Tissue expression of PPO gene	71
4.3 Comparison of the benzaldehyde thiosemicarbozones on PO Activity	72
References	77
Abbreviations	87
Acknowledgement	89

中文摘要

酚氧化酶(phenoloxidase, PO, EC.1.14.18.1)在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要的作用,是昆虫生命活动中的重要调节酶,该酶主要参与吞噬和黑化过程,以及伤口愈合和角质硬化。PPO(prophenoloxidase)是无活性的酶原,通过蛋白级联反应激活形成 PO。在本研究中,我们首次克隆了来自菜青虫(鳞翅目:粉蝶科)五龄幼虫的 PPO1 和 PPO2 的 cDNA 全长序列。

主要实验结果如下:

1. PrPPO1 的 cDNA 全长为 3307 bp,编码蛋白由 682 个氨基酸组成,分子量为 78.5 kDa,PI 为 6.18; PrPPO2 的 cDNA 全长为 2384 bp,编码蛋白由 691 个氨基酸组成,分子量为 79 kDa,PI 为 5.98。PrPPO1 和 PrPPO2 氨基酸序列的生物信息学分析表明: N-末端均缺乏信号肽,含有一个保守的蛋白裂解位点(RF)和一个硫醇脂位点(CGCGWPQ/RHML)。此外,都含有可能的 N-糖基化位点,但只有 PrPPO2 有 O-糖基化位点。BLASTp 表明 PrPPO1 的氨基酸序列与其他鳞翅目 PPO1 氨基酸序列相似性为 71-74%; PrPPO2 的氨基酸序列与其他鳞翅目 PPO2 氨基酸序列相似性为 70-75%。

2. 通过相对定量 RT-PCR 分析 PrPPO1 和 PrPPO2 两个基因在菜青虫组织中的表达差异性,结果表明: PrPPO1 和 PrPPO2 基因在菜青虫五龄幼虫的血淋巴、表皮、中肠和头中均有表达,两个基因在血淋巴中的表达量最高,在中肠的表达量最低。系统进化树表明 PrPPO1 与小菜蛾的亲缘关系最近, PrPPO2 与云杉卷叶蛾的 PPO2 亲缘关系最近,均属于节肢动物血蓝蛋白家族。

3. 用苯甲醛缩氨基硫脲类化合物作为抑制剂,研究其对菜青虫酚氧化酶的抑制动力学。结果表明,合成的四种苯甲醛缩氨基硫脲类化合物对菜青虫酚氧化酶抑制作用的 IC_{50} 分别为 0.5、0.6、4 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 其动力学研究结果表明: 这四种化合物均为可逆的混合型抑制剂,其抑制常数(K_I)分别为 0.059、0.047、0.033 和 $0.036 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这为进一步设计新的高生物活性、低毒、副作用小的酚氧化酶抑制剂提供了一定的参考依据,因而合成的化合物在农业杀虫剂领域具有广泛的应用前景。

关键词: 菜青虫; 酚氧化酶; 基因克隆; 组织表达; 相对定量 RT-PCR; 苯甲醛缩氨基硫脲; 抑制作用;

Abstract

Phenoloxidase (PO, EC.1.14.18.1) acts as an important role during the process of insect growth and immune defense. The enzyme is involved in encapsulation and melanization processes as well as wound healing and cuticle sclerotization. PO is an active form of prophenoloxidase (PPO) after proteolytic cleavage by serine proteinase(s). In this study, we have cloned two full-length cDNA of PPO1 and PPO2 from the *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pierididae). The contents and results were summarized as follows:

1. The full-length cDNA of PrPPO1 is 3,307 bp and encodes a protein of 682 amino acids. The calculated molecular weight of the deduced protein was about 78.5 kDa and the pI was 6.18; The full-length of PrPPO2 cDNA is 2,384 bp and encodes a protein of 691 amino acids. The calculated molecular weight of the deduced protein was about 79 kDa and the pI was 5.98. PrPPO1 and PrPPO2 containing a conserved proteolytic cleavage site found in other PPOs and a thiol ester motif. PrPPO1 and PrPPO2 have not signal peptide. BLASTp search showed that the deduced amino acid sequence of PrPPO1 had a high identity to the published sequence of PPO1 from other lepidopterous insects, ranges from 71–75% identical to other known lepidopteran PPO1 sequences.

2. The results of relative quantification showed that PrPPO1 and PrPPO2 mRNA was expressed in haemocyte, cuticle, midgut and head of *P. rapae*, the experiment indicated that the two genes were expressed much differently in all tested different tissues. Constructed phylogenesis tree, the result indicated that PrPPO1 was most closely related to *Plutella xylostella*, but far from manual.

3. Inactivation kinetics of PO from *Pieris rapae* by benzaldehyde thiosemicarbozones were studied. The IC_{50} were 0.5, 0.6, 4 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The results indicated that benzaldehyde thiosemicarbozone compounds inhibit PO activity were mixed competitive inhibition, and inhibition were reversible. The inhibitory constants (K_i) were determined to be 0.059, 0.047, 0.033 and 0.036 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. These compounds possibly have the practical application in the fields of and agricultural insecticides.

Key Words: *Pieris rapae* Linne; Prophenoloxidase; Gene clone; Tissue expression; Relative Quantification; Benzaldehyde thiosemicarbozones; Inhibition

1 引言

1.1 菜粉蝶的概况

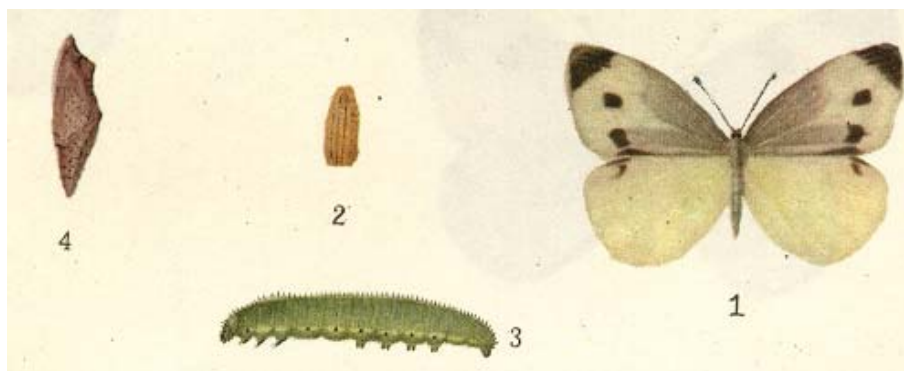
菜粉蝶(*Pieris rapae* Linne, 英文名: cabbage butterfly)又名菜白蝶,属于昆虫纲、鳞翅目、粉蝶科,幼虫称为菜青虫,是菜粉蝶危害蔬菜的主要形态(如图 1)。菜青虫是世界性害虫,在我国各省尤其以华东、华南、华中、西南、华北及西北的南部受害较重。它的寄主植物有 35 种,分属九科,主要侵食含芥子油气味较浓的甘蓝、芥菜等十字花科植物的叶,由幼虫为害造成的伤口方便了软腐病菌的侵入,最后导致软腐病的发生,此外,它所排出的粪便会污染叶面与菜心,引起腐烂,严重影响了蔬菜的产量与质量^[1]。



图 1 包菜被害状

Fig.1 The nibbled cabbage

菜粉蝶成虫的体长 12-20 毫米,翅长 45-55 毫米。前翅白色,近翅基部灰黑色,顶角黑色,中室外侧下方有两个黑圆斑。后翅白色,前缘有一或二个不整形黑斑。卵似瓶形,表面有较规则的纵横凸纹。幼虫为多足型,蛹为被蛹,属完全变态类型。其幼虫(菜青虫)体长 28-35 毫米。青绿色,背中线为一条断续不甚明显的黄色纵线,各节气门线上有两个黄斑,背面密生细毛和小黑点。蛹似纺锤形,体背有三条纵隆线和三个角状突起(如图 2)。



1. 成虫 2. 卵 3. 幼虫 (菜青虫) 4. 蛹
1. imago 2. egg 3. larva 4. pupae

图 2 菜粉蝶
Fig.2 cabbage butterfly

菜粉蝶是一年多代的害虫，一年发生的代数由北向南逐渐增加。北方一般为 3-4 代，南方可达 8-9 代。成虫只在白天活动，主要取食花蜜和产卵，卵是产在甘蓝和花椰菜这类具有芥子油气味的十字花科植物叶上。卵多散产，直立于叶上，夏季多产于叶背，冬季多产于叶片正面，只有少数产于叶柄上。每一雌虫平均产卵 120 粒左右。初孵化的幼虫主要在叶背啃食，残留表皮。幼虫随着年龄的增长啃食菜叶的面积越来越大，严重时只残留叶柄与叶脉。老熟幼虫多在植株菜叶的后面或正面化蛹，化蛹前吐丝将尾足缠结于菜叶或附着物上，再吐一丝缠绕腹部第一节而化蛹。蛹能耐 $-32 \sim -50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温。高温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上时，发育不正常，羽化率极低。越冬时都以蛹的形态，位于甘蓝等被害菜株上及为害地附近的屋檐、篱笆、土缝和枯枝、杂草、落叶中，大多在干燥阴暗的环境里，而且有滞育特性 [1,2,3]。

1.2 酚氧化酶的研究概况

1.2.1 酚氧化酶的生理功能

无脊椎动物缺乏真正的抗体，只能依靠先天性免疫机制来抵抗细菌等外来病原的侵袭。当外来病原入侵时，无脊椎动物首先要依靠其特有的识别分子识别蛋白来识别外来病原，然后将信息传递到特定细胞内，促使这些细胞合成免疫因子如酚氧化酶、凝集素、抗菌肽等，最后利用这些免疫因子经一定的免疫反应杀死外来病原，达到免疫的目的。大量的研究表明：在这些复

杂的免疫反应之中，酚氧化酶和酚氧化酶原激活系统作为一个高效的识别和防御系统起到了至关重要的作用。

昆虫是地球上种类最多的生物类群，在生态系统中占有重要地位。昆虫在长期的进化过程中发展出了一套独特的免疫系统，由细胞免疫和体液免疫组成。细胞免疫主要依赖血细胞对外来抗原或异物的吞噬和包被作用，是由浆细胞或粒细胞完成的^[4]。当昆虫受到外界微生物的入侵和伤害时，通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应级联而使酚氧化酶原裂解成酚氧化酶，参与机体的免疫防御反应，氧化酪氨酸、多巴和多巴胺等物质成黑色素。在氧化过程中形成包被的细胞层中产生了具有细胞毒性的醌，醌也有利于杀死被包被的微生物。

酚氧化酶(phenoloxidase, 简称 PO, EC.1.14.18.1)也称为酪氨酸酶，是一个双功能酶，表现在它的羟化酶活性及氧化酶活性^[5]，它负责自然界中广泛分布的黑色素生物合成的起始^[6]。在色素合成过程中，它先将 L-酪氨酸羟化，产生邻二羟基苯丙氨酸 (L-多巴)，然后再将 L-多巴氧化成多巴醌^[7,8]，醌与蛋白质结合导致硬化^[9,10,11]。N-乙酰多巴胺在 PO 作用下形成醌的衍生物，这个衍生物再脱乙酰或羧基后，经非酶促缩合成为一个吲哚结构，这个吲哚结构又以各种方式聚合形成黑色素如图 3 所示^[12]，故 PO 又是唯一参与色素合成的酶。这两个阶段都需要氧分子的参与。PO 有三种形式：颗粒型、漆酶型和损伤型。颗粒型在正常发育过程中通过合成黑色素而改变昆虫的体色，漆酶型则参与了新表皮的硬化反应，损伤型在昆虫受到伤害时通过合成具有细胞毒性的醌而对入侵微生物产生杀伤作用^[13]。

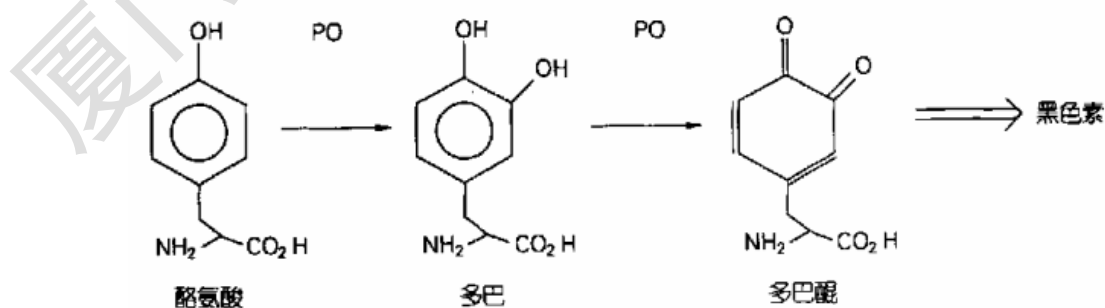


图 3 昆虫酚氧化酶催化形成黑色素的模式图

Fig. 3 The schemachart of PO catalyze forming melanogenesis form insect

酚氧化酶在昆虫的正常发育过程中具有重要的生理功能，包括：（1）参与表皮的硬化和黑化^[14, 15]：昆虫体壁中的酪氨酸在 PO（羟化酶）的作用下生成 N-乙酰多巴胺，N-乙酰多巴胺在 PO（氧化酶）的催化作用下生成 N-乙酰多巴醌，N-乙酰多巴醌再与其他蛋白质交链形成浅色或暗色物质（鞣化作用），即昆虫的黑化或硬化过程。而昆虫体壁的黑化和硬化过程与黑色素的形成过程是一致的。昆虫在外来微生物感染或受伤后，酚氧化酶原被激活为有活性的酚氧化酶，氧化昆虫体内的酚类物质如酪氨酸、多巴、多巴胺等产生黑色素，黑色素可以包被和黑化侵入的不能被细胞吞噬的大型外来物，包括病原微生物，以抑制病原物的生长和繁殖，减轻对寄主细胞的危害；（2）参与伤害防御^[16, 17, 18]：在节肢动物中，PO 可参与防御反应(节肢动物免疫)和伤口愈合。对于小颗粒异物如细菌，宿主可通过吞噬作用来消灭它，当入侵的异物太大（如寄生虫）而无法被单个血细胞吞噬时，宿主便通过黑色素包囊反应来抵抗和消灭寄生虫，而 PO 在这个过程中起重要作用。当外来入侵时，PPO 从血细胞中释放出来并被激活成 PO，在外来物有机体上产生黑色素沉淀，通过包囊和黑化来限制入侵的外来物。因此，在包囊物的周围、血细胞的结节中和感染真菌的角质部位会出现黑色素沉淀。与此相似，当昆虫受伤时，损伤部位出现深色色素区，这是由于 PPO 被蛋白酶水解激活，而激活的 PO 将酚氧化成醌，最终形成黑色素所致^[19]。酚氧化酶在伤口处催化产生黑色素沉淀以防止血淋巴丢失，并阻止入侵的微生物乘机进入，由此对有机体产生保护作用；（3）加速伤口的愈合^[20]。（4）产生具有细胞毒作用的氧自由基和具有潜在细胞毒作用的半醌及三羟酚，进一步增强寄主的防御能力。活性氧如超氧阴离子、羟基自由基和过氧化氢是脊椎动物和无脊椎动物防御系统的细胞毒性成分，黑色素形成过程中伴随活性氧的产生，同时也产生具细胞毒性的半醌及三羟酚，半醌有结合亲核物质的特性，醌可结合到外来细胞物质的表面，通过形成黑色素包囊来隔离入侵的外来物，并通过醌和其它的中间产物（如醌甲基化物和半醌）产生氧的还原形式来摧毁入侵的微生物如病原菌或寄生虫。

综上所述，PO 是昆虫表皮硬化和黑化过程中的关键性酶，与它紧密相关的醌鞣化(Quinone tanning)在昆虫的生命过程中具有重要作用^[21]。

1.2.2 酚氧化酶的分布

酚氧化酶有两种同分异构体,即酪氨酸酶型(tyrosianse; EC1.14.18.1)和漆酶型(Laease; EC1.10.3.2)。在无脊椎动物中,酪氨酸酶型的酚氧化酶主要参与黑化和伤口愈合,有时也可能参与硬化过程^[22]。这种酶主要以酶原的形式存在于表皮中,当受伤或者因为蜕皮激素效价低而导致缺少保幼激素时该酶原才被激活^[23]。这种类型的酚氧化酶已从许多昆虫中纯化出来,并且对其性质进行了研究,如 *calliphora vicina*^[24], *calPoaes ethlius*^[25], *Symmerista cannicosta*^[26], *Manduca sexta* 等^[27]。酪氨酸型酚氧化酶由存在于表皮中的颗粒型酚氧化酶、壳脂蛋白中的损伤型酚氧化酶和体液中的酚氧化酶组成,能被一氧化碳所抑制和氧化酪氨酸等单酚^[28]。颗粒型酚氧化酶主要存在于表皮中,参与外骨骼的黑色素形成,受保幼激素(Juvenile Hormone, JH)的调节,在 JH 存在时可以阻止其形成,进而阻止表皮的黑化(Hiruma K.1988)^[29]。损伤型酚氧化酶,可通过形成具有细胞毒性的醌和在伤口处形成覆盖物对表皮愈合起作用,在昆虫的免疫功能中起重要作用。

在无脊椎动物中,漆酶型的酚氧化酶在昆虫中主要参与硬化过程,现已从 *Locusta migratoria*、*Bombyx mori* 和 *Drosophila virilis* 等中纯化出了该酶。目前,已经在很多昆虫体内(如双翅目、鳞翅目、鞘翅目和半翅目等)检测到漆酶型酚氧化酶的存在,并且在昆虫的各个发育期都能测定。

在血液中,酚氧化酶是以无活性的酶原形式存在,酶原存在于昆虫的血细胞中,也有一些报道称酚氧化酶存在于昆虫的血浆中,如 Ashida 等^[30] 用免疫电镜细胞化学技术间接地定位了家蚕血细胞中的 PPO,结果表明:PPO 仅存在于浆细胞和类绛色细胞中,分布于胞质和核质内,而在颗粒细胞、球形细胞和原始血细胞中不存在 PPO。以蝗虫^[31]、棉铃虫^[32]、亚洲玉米螟^[33] 为试材研究得出 PO 既存在于血细胞中也存在于血浆中。Soderhall 和 Leonard^[34,35] 则认为 PO 以 PPO 形式存在于类绛色细胞中。但是,家蝇的 PPO 仅在预蛹期出现^[36],幼虫和蛹的酚氧化酶是以活化的形式存在^[37]。在蟑螂与美洲蜚蠊中,PO 主要存在于血细胞中^[35],相反,在家蚕(*B.mori*)、烟草天蛾(*Manduca sexta*)及麻蝇中,PO 活性主要存在于血浆而不是血细胞中^[39,40]。对一些无脊椎动物的酚氧化酶在体内分布的研究表明,PO 存在于血细胞、血

浆或同时存在于血细胞和血浆中^[38]。这种差别可能与使用抗凝血剂有关，因为有些抗凝血剂能够不可逆地抑制 PO 活性。除了血淋巴以外，一些学者还发现 PO 存在于其它组织中。

昆虫表皮中存在 PO 早在 40 多年前就有报道。Stevenson (1967)观察到螯虾新形成的上表皮和蜕皮前的内表皮中存在 PO。Locke^[41]观察到 PO 存在于蛾角质上表皮细胞的高尔基体和多泡体中，在这种昆虫中，上表皮既能分泌酚氧化酶也能重新吸收酚氧化酶。Binnington^[42]以多巴胺作底物，利用超微机构细胞技术在昆虫铜绿蝇(*Lucilia cuprina*)角质的上表皮和原表皮中发现 PO 的存在，并且原表皮中 PO 的活性只有在人为的角质损伤激活过程发生后才可被检测到。在绿蝇中，Binnington(1988)以多巴胺作底物，用超微结构细胞化学技术显示：PO 存在于角质的上表皮和原表皮中，原表皮中的 PO 活性只有在人为的角质损伤激活过程发生后才能被检测到。此外，蚊子的中肠上皮中也存在 PO，PO 与蚊子抗寄生虫感染的生理功能有关。昆虫血淋巴中的 PO 经修饰可转运到表皮，但表皮中的 PO 不能转运到血淋巴中。过去认为表皮中的 PO 都属于活性型，但最近研究表明表皮中的 PO 也是以 PPO 形式存在。

在大多数情况下，大量的酚氧化酶原是在动物血细胞的亚细胞中形成的。但也有例外，例如家蚕的酚氧化酶原是通过类绛色细胞合成的，果蝇的酚氧化酶原是通过含晶细胞合成的，而甲壳类的则通过颗粒细胞有时是半颗粒细胞合成的。最近，Asano 证明在家蚕中，起源于血细胞的酚氧化酶原从血细胞中释放出来后，又经过翻译后的修饰，然后通过一种未知的机理转运至整个表皮。这些发现表明血细胞产生的酚氧化酶原可能通过相似的转运机理转移到其它一些组织，由于血细胞也经常渗透到其它组织中，所以，血细胞可能是许多组织中酚氧化酶原合成的场所。所以，多数昆虫在正常生理状态下，PPO 存在于血细胞或血浆、中肠和表皮等组织中。在血液中，PO 常以无活性的酶原(PPO)的形式存在，它可以被各种因子包括蛋白酶激活。

1.2.3 酚氧化酶的活性中心

目前已有上百种酚氧化酶研究报道，有 20 来种酶已经被测序，但尚未有晶体结构的报道(Giebel et al, 1990; Seo et al, 2003)^[43, 44]，因此仍无法通过晶

体衍射得到酶的三维结构。但是根据 NMR, 光谱和动力学研究, 人们已经搞清楚了酶的活性中心结构。酚氧化酶具有独特的双重催化功能即单酚酶 (Monophenoloxidase, MPO) 活性和二酚酶 (Diphenoloxidase, DPO) 活性, 可催化单酚 (Monphenols) 羟化成二酚 (如 L-DOPA), 并把二酚再度氧化成醌, 这是昆虫表皮黑化硬化的初始产物, 这一功能是与酶的活性中心结构密切相关的。

酚氧化酶的活性位点有结合两个铜离子的底物羟基结合位点, 和两个芳香基团结合位点, 这一结构是酶与底物专一性的基础。光谱和动力学研究发现酚氧化酶的双核铜活性位点结构与血蓝蛋白的活性中心结构十分相似, 而且有趣的是最新研究表明血蓝蛋白也有一定程度的酚氧化酶活性^[45], 这一现象也说明了双核铜中心对酚氧化酶活性的重要作用。

酚氧化酶的双核铜中心结构如图 4 所示。每个铜离子由三个组氨酸残基的亚氨基共价结合固定在活性中心上, 其中两个组氨酸在横向, 结合度较强, 另一个位于轴向, 结合度较弱。两个铜离子之间结合氧原子, 形成电子通路。铜离子结合氧原子的个数并不是固定不变的, 由铜离子结合氧原子数的不同, 酚氧化酶可分为三种型态^[46,47]: 氧化态 (Eoxy)、还原态 (Emet) 和脱氧态 (Edeoxy)。这三种酶形态的存在和互相转化是酚氧化酶独特双重催化功能的基础^[48]。

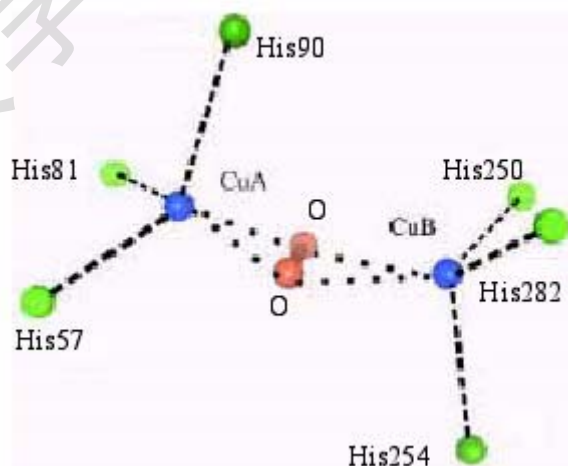


图 4 酚氧化酶活性中心的双核铜中心结构 (仿 Solomon 等, 1993)

Fig.4 Binuclear Cu(II) active centre of tyrosinase

根据酚氧化酶的结构, Fenoll 等人提出一个反应机制^[49], 认为二酚以一个单原子螯合配体的方式与 Eoxy 活性位置的一个铜离子结合。中间产物通

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库