DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2011.03.042
河南农业科学,2011,40(3):85-87
Journal of Henan Agricultural Sciences

槲皮素和硫脲对桑尺蠖多酚氧化酶的抑制作用

张永亮[1],朱 勇[2]
(1.周口师范学院 生命科学系,河南 周口 466001;2.西南大学 生物技术学院,重庆 400715)

摘要:多酚氧化酶在昆虫的变态发育和免疫防御中起着非常重要的作用。为开发以该酶为靶标的新型害虫抑制剂提供理论依据,以桑尺蠖(*Phthonandria atrineata*)五龄幼虫为材料提取多酚氧化酶,探讨了槲皮素和硫脲对该酶的抑制作用。结果表明,槲皮素只改变桑尺蠖多酚氧化酶的米氏常数,不改变其最大反应速度;而硫脲只改变其最大反应速度,不改变米氏常数,因此,它们分别属于桑尺蠖多酚氧化酶的竞争性和非竞争性抑制剂。

关键词:桑尺蠖;多酚氧化酶;槲皮素;硫脲;抑制作用
中图分类号:S888.72+1 Q55 文献标识码:A 文章编号:1004-3268(2011)03-0085-03

Inhibitory Effects of Quercetin and Thiourea on the Polyphenol Oxidase from *Phthonandria atrineata*

ZHANG Yong-liang[1], ZHU Yong[2]
(1. Department of Life Sciences, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China;
2. School of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Polyphenol oxidase plays important roles in metamorphosis development and immune defense of insects. In order to provide the theoretical basis for developing new pest inhibitors with the enzyme as a target, the inhibition effects of quercetin and thiourea on polyphenol oxidase extracted from 5th instar larvae of *Phthonandria atrineata* were studied. The results indicated that quercetin changed Michaelis constant but not maximum reaction rate of the polyphenol oxidase. Thiourea changed maximum reaction rate but not Michaelis constant. Therefore, quercetin and thiourea could be competitive and non-competitive inhibitors for polyphenol oxidase, respectively.

Key words: *Phthonandria atrineata*; Polyphenol oxidase; Quercetin; Thiourea; Inhibitory effects

昆虫在其一生中要经历几次蜕皮,初生的新表皮柔软色淡,经过硬化和黑化过程变坚硬[1]。多酚氧化酶(polyphenol oxidase,PPO)是这一黑化硬化过程中的关键性酶,它能够催化单酚羟化为二酚(如L-DOPA),并把二酚氧化成醌,醌在非酶促条件下最终生成黑色素。多酚氧化酶不仅参与黑色素形成、角质硬化和伤口愈合,还作为非自身识别系统在对寄生物的防御反应中发挥作用[2]。由于不同昆虫体内的多酚氧化酶表现不同的酶学特性[3],因此深入研究不同来源多酚氧化酶的作用机制,对开发新型"环境友好"杀虫剂具有重要的理论及现实意义。

桑尺蠖(*Phthonandria atrineata*)是鳞翅目、尺蠖蛾科农业害虫,终年危害桑树,常暴发成灾,采用化学方法防治,存在害虫的抗药性增强及环境污染等问题。鉴此,在提取和初步纯化桑尺蠖多酚氧化酶的基础上,对其抑制动力学特性进行研究,为开发以该酶为靶标的新型害虫抑制剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料及主要的试剂和仪器

桑尺蠖五龄幼虫采自周口市蚕农桑园,置于-20℃保存备用。槲皮素、硫脲、邻苯二酚、L-多巴、

收稿日期:2010-11-16
基金项目:教育部博士学科点基金(20060635008);重庆市教委基金(040208)
作者简介:张永亮(1967-),男,河南上蔡人,副教授,博士,主要从事生物化学与分子生物学的教学与科研工作。
E-mail:zylxndx@163.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

固体硫酸铵及 Sephadex G-100 均为上海生工生物技术有限公司产品。752S 型紫外可见分光光度计和凝胶层析柱分别为上海棱光有限公司和重庆泰坦贸易有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 多酚氧化酶的提取及纯化[4] 取冰冻保存的桑尺蠖五龄幼虫,放入液氮中研磨成细粉,加入适量预冷的 0.02mol/ L 磷酸钠盐缓冲液(PBS, pH 7.0),冰浴下温和搅匀,于 4 ℃冰箱中静置 30 min 后,0 ℃条件下 4000 r/ min 离心 60min,取上清液即为粗酶提取液。向其中加入固体硫酸铵至 80%饱和度,经静置、离心后,将沉淀溶解在适量的 PBS 中,然后用相同的缓冲液透析,并经聚乙二醇 8000 浓缩。将获得的酶液加到 Sephadex G-100 凝胶层析柱上,用 PBS 缓冲液洗脱,得到初步纯化的桑尺蠖多酚氧化酶提取液。

1.2.2 酶活力测定 酶活力测定参照 Benjamin 等[5]的方法并略加改进。3mL 的反应体系包括:0.1mL 的酶液、0.02mol/ L PBS(pH 7.0)和一定浓度的邻苯二酚或 L-多巴,用分光光度计检测其在 410 nm 或 475nm 下的吸光度。以每分钟每毫克蛋白引起吸光度值改变 0.001 为一个酶活力单位(U),各试验均重复 3 次,取其平均值。

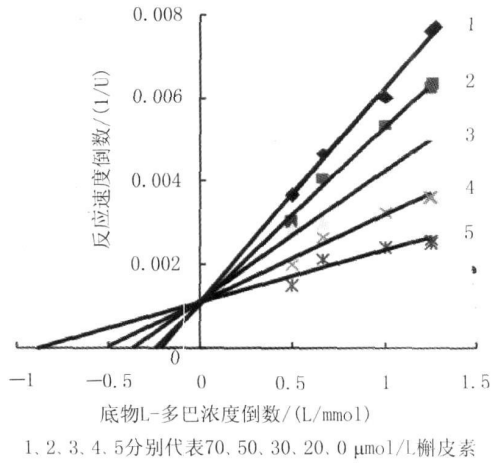
1.2.3 槲皮素对桑尺蠖多酚氧化酶的抑制作用 在 3mL 的反应体系中设定底物 L-多巴的浓度分别为 2.0、1.5、1.0、0.8mmol/ L,在每一个底物浓度下,加入槲皮素的浓度分别为 0、20、30、50、70μmol/ L。将酶液分别与上述各浓度的槲皮素混匀,静置 5min 后加入相应底物和 PBS,然后分别测定各反应体系在 1 min 内的吸光值变化。用双倒数作图法,绘出槲皮素抑制桑尺蠖多酚氧化酶的双倒数图。

1.2.4 硫脲对桑尺蠖多酚氧化酶的抑制作用 3 mL 的反应体系中设定底物邻苯二酚的浓度分别为 2.5、3.3、5、10mmol/ L。在每一个底物浓度下,加入硫脲的浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4mmol/ L,将酶液分别与上述各浓度的硫脲混匀,静置 5min 后加入相应底物和 PBS,然后分别测定各反应体系在 1min 内的吸光值变化。用双倒数作图法,绘出硫脲抑制桑尺蠖多酚氧化酶的双倒数图。

2 结果与分析

2.1 槲皮素对桑尺蠖多酚氧化酶的影响

以 L-多巴为底物,测定了不同槲皮素浓度下桑尺蠖多酚氧化酶反应速度随底物浓度变化的规律,作双倒数图(Lineweaver-Burk 图)(图 1)。从图 1 可以看出,无论有无槲皮素存在,5 条直线都交于纵轴上的同一点,即 V_{max}(最大反应速度)值都是相同的。桑尺蠖多酚氧化酶的 K_m(米氏常数)值(直线与左边横轴的交点)与槲皮素的存在与否有关,当槲皮素浓度为零时,K_m最小,即酶与底物的亲和力最大;有槲皮素存在时,K_m 随着槲皮素浓度的增加而增大。槲皮素只改变桑尺蠖多酚氧化酶的 K_m,不改变 V_{max},这说明槲皮素是桑尺蠖多酚氧化酶的竞争性抑制剂,底物 L-多巴和抑制剂槲皮素是在酶的相同部位结合的。

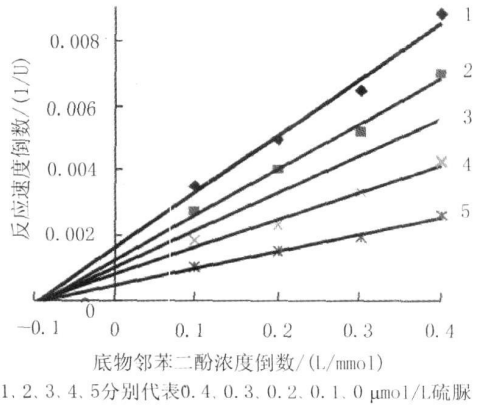


1、2、3、4、5分别代表70、50、30、20、0 μmol/L槲皮素

图 1 槲皮素抑制桑尺蠖多酚氧化酶的双倒数图

2.2 硫脲对桑尺蠖多酚氧化酶的影响

以邻苯二酚为底物,测定了不同硫脲浓度下桑尺蠖多酚氧化酶反应速度随底物浓度变化的规律,作双倒数图(图 2)。从图 2 可以看出,无论是否有硫脲存在,5 条直线都交于纵轴左边横轴上的同一点,但在纵轴上的截距各不相同,也就是它们的 K_m 值相同,而 V_{max} 值不同,并且反应速度随硫脲浓度的增加而降低。以上结果说明,硫脲只改变桑尺蠖多酚氧化酶的最大反应速度,不改变米氏常数,即硫脲是其非竞争性抑制剂。底物邻苯二酚和抑制剂硫脲在与桑尺蠖多酚氧化酶络合时是在酶的不同部位结合的。



1、2、3、4、5分别代表0.4、0.3、0.2、0.1、0 μmol/L硫脲

图 2 硫脲抑制桑尺蠖多酚氧化酶的双倒数图

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

昆虫体内的多酚氧化酶一般以无活性的酚氧化酶原的形式存在于血液和体壁内。这种酶原的活化方式大致有以下几种: (1)酶自身的催化作用; (2)酶亚单位的聚集; (3)部分酶原蛋白被某种活性物质分解后使其活化[6]。酚氧化酶原的活化也可由激活剂促成, 许多研究者使用十二烷基硫酸钠[7]、十六烷基吡啶氯化物[8]、氯化钙[9]等作为酶原的激活剂对多酚氧化酶进行了研究。本研究得到的桑尺蠖多酚氧化酶具有催化活性, 可能是酶原已被上述活化方式激活, 其机制有待于进一步研究。

本研究结果表明, 槲皮素是桑尺蠖多酚氧化酶的竞争性抑制剂。其抑制机制可能是由于槲皮素与底物结构相似, 都含有羟基, 两者同时竞争酶的活性中心。槲皮素可与酶结合形成无活性的二元复合物, 使酶不能再与底物结合, 从而抑制了酶的活性。硫脲是桑尺蠖多酚氧化酶的非竞争性抑制剂, 推测其抑制机制可能是硫脲不直接与酶活性中心的双铜结合, 而是通过它的羰基与酶活性中心周围的亲核基团如-SH、$-NH_2$、-OH 结合, 生成的产物占据酶活性中心周围的空间, 形成空间位阻, 阻止了底物与酶活性中心的结合, 从而抑制了酶的活性。

参考文献:

[1] Ashida M, Yamazaki H I. Molting and metamorphosis[M]. Tokyo: Japan Science Society Press, 1990: 239-265.

[2] Boman H G, Faye I, Gudmundsson G H, *et al*. Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial protein[J]. Eur J Biochem, 1991, 201: 23-31.

[3] Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, *et al*. Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin[J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92: 7774-7778.

[4] 张永亮, 朱勇. 桑尺蠖多酚氧化酶的分离纯化[J]. 河南农业科学, 2010(5): 69-71.

[5] Benjamin N D, Montgomery M W. Polyphenol oxidase of royal ann cherries: purification and characterization[J]. Food Sci, 1973, 38: 799-806.

[6] Ashida M. Purification and characterization of prephenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144: 749-762.

[7] Espín J C, van Leeuwen J, Wichers H J. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom tyrosinase by serine proteases[J]. Agr Food Chem, 1999, 47: 3509-3517.

[8] Michael R C, Kiran R, James B, *et al*. Purification characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 953-967.

[9] 杨林先, 王妲, 曲柏宏. 钙处理对苹果梨叶片钙调蛋白含量及过氧化物酶、多酚氧化酶活性的影响[J]. 河南农业科学, 2010(2): 74-76.

更正

本刊 2010 年 11 期封二第 15 行, 应改为“2006 年获南京农业大学博士学位”。

特此更正并致歉意!

本刊编辑部

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net