

软体动物和甲壳动物酚氧化酶的研究进展

吴曙 王淑红* 王艺磊 张子平

(集美大学水产学院 集美大学水产生物技术研究所 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 厦门 361021; 德克萨斯州立大学化学和生物化学系 圣马克斯 美国 TX 78666)

摘要: 软体动物和甲壳动物的很多品种都是重要的经济养殖品种。随着养殖业集约化程度的提高,各种病害频繁发生,造成了巨大的经济损失。于是越来越多的人开始关注软体动物和甲壳动物的免疫防御系统,并对其进行研究。酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是一种含铜的氧化酶,广泛存在于微生物、动物和植物体内。作为酚氧化酶原激活系统的重要一员,PO在无脊椎动物的先天免疫机制中起着重要的作用,有关其生物化学、免疫学和分子生物学特性的研究一直以来受到广泛关注,尤其在节肢动物中进展很快。作者对酚氧化酶在软体和甲壳动物中的功能、组织定位及表达、基因克隆和序列分析及其系统演化等几个方面的研究进展进行了综述。基因序列分析和系统进化树证据均表明,催化功能相同的软体动物酪氨酸酶与节肢动物PO的基因有较大差异。该结果对目前被广泛接受并使用的酪氨酸酶专门用于哺乳类,酚氧化酶专门用于无脊椎动物的分类法提出了挑战。因此作者建议,将酚氧化酶专门用于节肢动物,酪氨酸酶用于软体动物等非节肢动物和脊椎动物。

关键词: 酚氧化酶;酪氨酸酶;软体动物;甲壳动物

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)05-137-10

Phenoloxidase in Mollusca and Crustacean

WU Shu WANG Shu-Hong* WANG Yi-Lei ZHANG Zi-Ping

(*The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; Department of Chemistry and Biochemistry, Texas State University, San Marcos, TX 78666, USA*)

Abstract: Most of the Mollusca and Crustacean are economic species. The diseases related to environmental deterioration and germ plasm degeneration have caused great economic loss. More and more studies have been focusing on the immune defense system of Mollusca and Crustacean. As a key part of prophenoloxidase-activated system, phenoloxidase (PO) plays an important role in initial immune defense of invertebrates. The function, tissue location and expression, gene cloning and sequence analysis, as well as phylogenetic analysis of PO in Mollusca and Crustacean are reviewed in this paper. The results from sequence and phylogenetic analysis evidently indicate that although the tyrosinase from Mollusca and the PO from Crustacean are isoenzymes, their encoded genes are quite different. This evidence challenges to the widely accepted view that PO belongs to invertebrates, while tyrosinase belongs to vertebrates. Therefore, PO only should be specified to arthropod, while the tyrosinase should be referred to mollusca and other non-arthropod as well as vertebrates.

Key words: Phenoloxidase; Tyrosinase; Mollusca; Crustacean

基金项目 福建省科技重点项目(No. 2007N0048),集美大学创新团队项目(No. 2008A001),集美大学校启动金(No. ZQ2007002);

* 通讯作者, E-mail: shwang@jmu.edu.cn;

第一作者介绍 吴曙,男,硕士研究生;研究方向:水生生物学;E-mail: wuxuxu530@yahoo.com.cn.

收稿日期:2009-02-24,修回日期:2009-06-23

酚氧化酶(PO)作为一种含铜的氧化酶广泛存在于微生物、动物和植物体内。一直以来,不同的物种或不同的文献对酚氧化酶的叫法不同,如有着共同酶学编码 E. C. 1. 14. 18. 1 的 PO、单酚氧化酶(monophenoloxidase)和酪氨酸酶(tyrosinase),还有具类似催化功能的双酚氧化酶(diphenoloxidase, E. C. 1. 10. 3. 1, 又称儿茶酚氧化酶, catecholoxidase)和漆酶(laccase, E. C. 1. 10. 3. 2)。为了消除这种名称上的混乱, Sugumaran^[11]于1996年建议将酪氨酸酶专门用于哺乳类,酚氧化酶专门用于无脊椎动物。其依据是哺乳类和无脊椎动物 PO 催化的生化反应虽然十分相似,但它们的 DNA 序列并不完全相同,无脊椎动物 PO 缺乏哺乳类 PO 的信号肽和跨膜域的氨基酸序列。目前,该命名方法被普遍接受并采用。

无脊椎动物由于缺乏脊椎动物的适应性免疫系统,因此其先天免疫系统在免疫防御中的作用就变得尤为重要。大量的研究表明,PO 是大多数无脊椎动物先天免疫防御系统中的重要成员^[2-14]。鉴于 PO 在无脊椎动物先天免疫中的重要作用,已对 PO 进行了包括其生化特性、免疫功能和组织定位等的广泛研究^[4]。近年来,有关 PO 基因的克隆、结构分析以及表达等分子生物学研究也取得了很大的进展^[5]。为了更全面地了解作为重要经济品种的贝类和甲壳类的免疫系统,本文就水生软体动物和甲壳动物酚氧化酶的研究进展作以下综述。

1 软体动物和甲壳动物酚氧化酶的功能

在无脊椎动物中,PO 一般都以无活性的酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)的形式存在,无活性的 proPO 在丝氨酸型蛋白酶作用下转变成有活性的 PO。丝氨酸型蛋白酶本身也以酶原的形式存在,可被细菌和真菌等的细胞壁成分激活^[15]。酚氧化酶及其因子构成了一个复杂的酶级联反应系统,即所谓的酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase-activated system, proPO-As)。该系统由 PO、蛋白酶、模式识别蛋白和蛋白酶的抑制剂构成。proPO-As 系统能识别微生物

的表面分子^[16],在活化过程中产生一系列具有生理活性的物质,通过多种方式参与宿主防御反应,包括提供调理素、促进血细胞吞噬作用、包囊作用和结节形成,以及介导凝集和凝固、产生杀菌物质等。在对甲壳动物的研究中发现 proPO-As 的成分直接参与细胞信息传递^[17],可见,该系统在甲壳动物的防卫中起极为重要的作用。因此,proPO-AS 被认为是与脊椎动物的补体系统类似^[12]的一种识别系统。

此外,PO 是黑色素形成的关键酶^[6],由氧化反应形成的色素沉着对机体起到保护作用。如虾的褐变是由于多酚氧化酶催化内源性物质形成黑色素所致^[18]。PO 还参与昆虫蜕皮后新形成角质的硬化,它是惟一参与角质硬化的酶,为柔软的无脊椎动物身体提供保护。在硬化过程中,PO 产生的醌与角蛋白及甲壳质相互作用,最终交联形成角质,高度硬化的角质能阻断微生物和异物的入侵^[7]。节肢动物由于机械性损伤等原因产生伤口后,PO 在伤口处催化产生黑色素沉淀以防止血淋巴丢失,并阻止微生物入侵,由此对机体起到保护作用^[8]。

PO 在软体动物中不仅参与先天免疫应答,还参与卵囊、足丝、壳基质蛋白、角质层的形成等多种生理反应^[19]。Munoz 等^[20]用寄生虫感染了 3 种双壳类,发现感染组的血淋巴和血细胞中的 PO 活性都比对照组有显著增加,证明 PO 参与贝类的免疫应答。此外,光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)的卵块中也可检测到 PO 活性^[21],提示了 PO 在卵形成中的潜在作用。软体动物的足丝和壳基质存在类似情况,说明 PO 也可能在足丝和壳基质的形成中起作用^[22, 23]。此外, Nagai 等^[24]证明 PO 在软体动物外壳的黑色素生成以及色素沉着中起关键作用。PO 首先将酪氨酸等单酚类底物转化成 L-DOPA,然后在一系列的级联反应后合成黑色素,可帮助软体动物抵抗紫外辐射以及其他损伤。软体动物的外壳可分为两层:里面的珍珠层以及外面的柱状层。Nagai 等^[24]在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)外壳柱状层发现了两个 PO 样蛋白,提示 PO 参与了软体动物外壳柱状层

的形成。

2 软体动物和甲壳动物酚氧化酶的组织定位及表达

自从 PO 的重要作用逐渐被认识以来,许多文章研究了 PO 的组织定位,其中研究最多的部位是血淋巴。

1994 年,Coles 等^[31]用不含抗凝血剂的缓冲液从贻贝 (*Mytilus edulis*) 的血淋巴中分离出血细胞,并检测到血细胞中存在 proPO。他们还发现:PO 反应产物存在于贻贝血细胞的细胞质颗粒中,且主要定位在嗜酸性颗粒细胞中。超微结构观察显示 PO 阳性产物位于血细胞质大颗粒中。Asokan 等^[13]将翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 的血淋巴分成血浆和血细胞,用蛋白酶或去污剂激活后清楚地表明 proPO 既存在于血细胞中也存在于血浆中;不仅如此,Asokan 等还证明血细胞中 proPO 的含量至少是血浆中的 20 倍,这说明血细胞是贻贝 proPO 的主要储存场所。Hellio 等^[14]证明太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的血淋巴存在 PO 活性。PO 以 proPO 形式存在血淋巴和血细胞,能被外源性的蛋白酶 (1 g/L) 和活性剂 LPS (1 g/L)、酵母多糖 (0.6 g/L)、昆布多糖 (0.6 g/L) 等激活。孙虎山等^[25]用电镜细胞化学和分光光度技术对栉孔扇贝 (*Chlamys farreni*) 血淋巴中的酚氧化酶 (PO) 进行了研究。结果表明:栉孔扇贝血细胞中存在 PO 活性。细胞质中直径分别为 300 ~ 430 nm 和 130 ~ 200 nm 的大小 2 种颗粒呈 PO 强阳性。Luna 等^[26]检测了太平洋牡蛎、扇贝 (*Argopecten ventricosus*)、小狮爪海扇蛤 (*Nodipecten subnodosus*) 以及江珧 (*Atrina maura*) 4 种软体动物的幼体 (larval) 和稚体 (juvenile) 的组织匀浆以及成体的血浆和血细胞的 PO 活性。幼体组织匀浆中没发现 PO 活性,稚体组织匀浆仅在牡蛎和小狮爪海扇蛤中发现了 PO 活性,成体的各个样本均有发现 PO 活性。免疫刺激后,成体 4 个物种的血浆 PO 活性均有提高,血细胞 PO 活性增强的只有小狮爪海扇蛤。Munoz 等^[20]检测了菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、鸡帘蛤 (*Chamelea*

gallina)、缀锦蛤 (*Tapes decussatus*) 的血淋巴以及血细胞,均有发现 PO 活性。

在甲壳动物中,proPO 几乎全部存在于血细胞中。陆宏达等^[27]发现中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 血淋巴的血清和血细胞裂解上清液中都有 PO 活力,而血浆中无 PO 的存在,血清中的 PO 来自于血细胞。马贵华等^[28]的研究表明,在中华绒螯蟹成蟹血淋巴中均检测出酚氧化酶的活性,而在中华绒螯蟹大眼幼体组织匀浆上清液中亦检测到酚氧化酶的活性。Sung^[29]等发现斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 酚氧化酶以酶原的形式存在于大颗粒细胞和小颗粒细胞的颗粒中,可被多种物质激活,并释放到血浆中。Ai^[30]等在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血细胞中克隆到了一个新的 proPO 基因 (proPO-2),用 Northern 和实时定量 PCR 发现 proPO-2 主要在血细胞中表达,并且在对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 刺激后表达呈下调。Western 结果表明,proPO-2 存在于凡纳滨对虾血细胞,但不存在于血浆中。间接免疫荧光分析可在血细胞的表面和其细胞核检测到 proPO-2 的活性。在罗氏沼虾中,也有报道 proPO 仅在血细胞中合成^[31]。

除了血淋巴外,一些研究者还检测了 PO 在其他组织中的分布。刘晓云等^[10]研究表明,在健康中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的组织细胞中基本检测不到酚氧化酶活性,而在受病毒感染的对虾中,不同的组织可检测到不同水平的酚氧化酶活性。其中尤以淋巴器和角质细胞中酚氧化酶活性最强。Stevenson 等^[32]观察到螯虾新形成的上角质层 (epicuticle) 和蜕皮前的内角质层 (endocuticle) 中存在 PO;PO 分泌出来后似乎渗入上角质和内角质层中;当硬化发生时,PO 活性消失。Bai 等^[21]在光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 的卵块中发现了 PO 活性,对其进行了分离和鉴定。梁建光等^[33]采用电镜细胞化学技术对栉孔扇贝外套膜中的 PO 进行了定性定位研究。结果表明,外套膜的少数上皮细胞和血细胞中,有直径分别为 150 ~ 220 nm 和 350 ~ 450 nm 的 2 种颗粒,呈 PO 强阳

性。从形态、大小及内容物性质分析,小颗粒应属于过氧化物酶体,大颗粒应属于初级溶酶体。RT-PCR 显示 PO 的 mRNA 仅在合浦珠母贝的外套膜缘特异表达,在足、鳃、生殖腺、消化腺、闭壳肌、血细胞等组织中不表达。进一步的原位杂交和酚氧化酶活性染色显示酚氧化酶仅在中隆的外层上皮细胞表达^[19]。Nagai 等也在合浦珠母贝的壳层发现了两个 PO 样的蛋白,并证明这两个蛋白只在外套膜特异表达^[24]。

3 软体动物和甲壳动物酚氧化酶原基因的克隆及序列分析

随着基因克隆、序列测定以及基因表达分析等技术的兴起,PO 的分子生物学研究也取得了很大的进展。在水生无脊椎动物中,多种酚氧化酶原的 cDNA 已被克隆(表 1)。

表 1 部分水生无脊椎动物酚氧化酶原、酪氨酸酶基因及其序列分析

Table 1 Sequence analysis of several prophenoloxidase and tyrosinase gene in aquatic invertebrates

	NCBI 登录号 Accession number	物种 Species	ORF (bp)	保守区 Conserved domains	信号肽/跨膜域 Signal peptide/ Transmembrane helices
甲壳动物酚氧化酶原 Arthropod prophenoloxidase	EF493829	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	2 040	血蓝蛋白超家族	无/无
	DQ435606	锯缘青蟹 <i>Scylla serrata</i>	2 022	血蓝蛋白超家族	无/无
	AF521949	短沟对虾 <i>Penaeus semisulcatus</i>	2 055	血蓝蛋白超家族	无/无
	AF521948	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	2 061	血蓝蛋白超家族	无/无
	DQ182596	罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	2 016	血蓝蛋白超家族	无/无
	EF595973	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	1 884	血蓝蛋白超家族	无/无
	AB073223	日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	2 067	血蓝蛋白超家族	无/无
	A Y655139	美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	2 052	血蓝蛋白超家族	无/无
	软体动物酪氨酸酶 Mollusk tyrosinase	DQ112679	合浦珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	1 338	酪氨酸酶超家族
AJ297474		乌贼 <i>Sepia officinalis</i>	1 821	酪氨酸酶超家族	无/无
AB107880		阿根廷鱿鱼 <i>Illex argentinus</i>	1 878	酪氨酸酶超家族	有/无
AB107881		阿根廷鱿鱼 <i>I. argentinus</i>	1 878	酪氨酸酶超家族	有/无
脊索动物酪氨酸酶 Chordate tyrosinase	D63950	真海鞘 <i>Halocynthia roretzi</i>	1 791	酪氨酸酶超家族	有/无
	XMF002123004	玻璃海鞘 <i>Ciona intestinalis</i>	2 073	酪氨酸酶超家族	有/有
多孔动物酪氨酸酶 Porifera tyrosinase	BAJ574915	海绵 <i>Suberites domuncula</i>	1 776	酪氨酸酶超家族	有/有
腔肠动物酪氨酸酶 Cnidaria tyrosinase	XMF002163773	水螅 <i>Hydra magnipapillata</i>	1 824	酪氨酸酶超家族	无/无

在甲壳动物中, Gai 等^[34]从中华绒螯蟹的血细胞中克隆到了 3 549 bp 的 *proPO* 全长 cDNA, 该 *proPO* 基因与其他甲壳动物的一致性为 52% ~ 68%。锯缘青蟹 (*Scylla serrata*)^[35] *proPO* 基因全长 2 663 bp, 编码了含 673 个氨基酸的蛋白质, 推导的分子量 (molecular weight, MW) 和等电点 (isoelectric point, pI) 分别为 77.5 ku 和 5.96。锯缘青蟹的 *proPO* 序列与其他节肢动物的 *proPO* 显示出较高的一致性, 尤其是与邓杰内斯蟹 (*Cancer magister*) 同源基因的序

列相似性达到了 78%。叶星等^[36]克隆的短沟对虾 (*Penaeus semisulcatus*) 酚氧化酶原基因全长 2 055 bp, 编码 684 个氨基酸, 推算 MW 为 78 153 u, pI 为 6.25。斑节对虾酚氧化酶原基因全长 2 061 bp, 编码 686 个氨基酸, MW 为 78 581 u, pI 为 5.83。两种对虾酚氧化酶原基因具有高度的同源性, 二者的核苷酸和推测的氨基酸序列同源性分别为 93% 和 92%。罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[31] 的 *proPO* cDNA 全长为 2 547 bp, 酚氧化酶原 MW 为 76.7

ku, pI 为 7.05。比对结果显示与其他虾类 *proPO* 的相似性较高。此外,克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 和美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 的 *proPO* 基因也分别拿到了全长 (NCBI 登录号分别为: EF595973、AB073223、AY655139)。

上述 *proPO* 基因的序列分析显示,甲壳动物 *proPO* 基因含有两个公认的铜离子结合位点、一个蛋白酶水解位点和一个 C 末端的保守区。大部分 *proPO* 基因有相同的基因结构特征和硫酸基的基序 (CGWPRHM), 没有发现信号肽序列。节肢动物酚氧化酶原基因同源性的 高低与种间亲缘关系相关。不同种类间酚氧化酶活性中心重要组成部分的 2 个铜结合位点、位于铜结合位点内的 6 个组氨酸以及与铜结合位点相邻的氨基酸序列高度保守^[36]。

在软体动物中,目前未见 *PO* 基因的克隆研究,仅有零星的有关酪氨酸酶基因的研究报道。Zhang 等^[19] 在合浦珠母贝中克隆了一个 1 487 bp 的酪氨酸酶全长 cDNA, 1 338 bp 长的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码了 445 个氨基酸,推定的氨基酸分子量为 47 ku, 包含两个铜离子结合位点以及一个推定的信号肽序列。此外,从乌贼 (*Sepia officinalis*) 克隆了一个 2 031 bp 的酪氨酸酶全长 cDNA (NCBI 登录号: AJ297474), 1 821 bp 的 ORF 编码了 606 个氨基酸;从阿根廷鱿鱼 (*Illex argentinus*) 的墨汁里面也分离出了酪氨酸酶前体两个亚基的全长 cDNA^[37]。这两个亚基,每个亚基都有两个铜离子结合位点,以及信号肽序列。

在其他无脊椎动物中,目前也仅见几个酪氨酸酶基因的克隆研究,未见 *PO* 基因的克隆研究。Sato 等^[38] 在真海鞘 (*Halocynthia roretzi*) 中克隆了一个 4 198 bp 的酪氨酸酶全长 cDNA, 它有一个编码 596 个氨基酸的开放阅读框。Muller 等^[39] 在海绵 (*Suberites domuncula*) 中克隆得到全长 1 970 bp 的酪氨酸酶基因。此外,玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*)、水螅 (*Hydra magnipapillata*) 也各自发现一个类似于酪氨酸酶基因的全长 cDNA (NCBI 登录号分别为: XM-

002123004、XM002163773)。

关于 *proPO* 基因的多态性,不同的无脊椎动物有不同的发现。在家蚕等昆虫中发现存在两种或多种形式的 *proPO*^[40],而在甲壳动物中,继日本囊对虾发现两种 *proPO* 基因, Ai 等^[29] 也在凡纳滨对虾中发现同样的多态性,他们在凡纳滨对虾血细胞中克隆到了一个新的 *proPO* 基因 (*proPO-2*), *proPO-2* 的 cDNA 全长 2 514 bp, 2 076 bp 的 ORF 编码了 691 个氨基酸残基。*proPO-2* 与之前的 *proPO-1* 的一致性达到了 72%。目前,这种多态性存在的意义尚不清楚。有人推测不同的 *proPO* 或许具有不同的功能^[41],例如一种形式可以在角质中沉积,而另一种形式则存在于血淋巴中,角质和血淋巴 *PO* 的物理和化学性质并不完全相同。家蚕 (*Bombyx mori*) 血液中的 *proPO* 可以被转运到角质中沉积,它的外角质层含有酚氧化酶原以及它的活化级联反应,提示 *proPO* 可能参与角质的硬化并抵御寄生虫的入侵^[42]。

4 水生无脊椎动物酚氧化酶(和酪氨酸酶)的系统演化

从 NCBI 下载酚氧化酶和酪氨酸酶的核苷酸及氨基酸序列文件后,采用 MEGA4 软件进行多序列比对,然后用 MEGA4 软件以 NJ 法, Bootstrap 确认 (默认 500 次重复) 构建进化树 (图 1, 2)^[19, 37]。无脊椎动物 *PO* 中含有两个公认的铜结合位点以及 6 个保守的组氨酸残基。其组氨酸残基的位置非常保守,6 个组氨酸残基分配在两个铜原子周围。节肢动物 *PO* 氨基酸序列显示同源性最显著的区域是与节肢动物血蓝蛋白对应的 CuA 和 CuB 区,而与脊椎动物酪氨酸酶铜结合位点的相应位点相似性很低,同时节肢动物的 *PO* 缺乏脊椎动物酪氨酸酶的信号肽以及跨膜域,表明节肢动物 *PO* 与节肢动物血蓝蛋白有更高的同源性。而软体动物酪氨酸酶却与脊椎动物酪氨酸酶同源关系比较密切 (图 1, 2), 同时软体动物酪氨酸酶具有类似脊椎动物酪氨酸酶的信号肽,表明脊椎动物的酪氨酸酶可能起源于软体动物的酪氨酸酶。

其他无脊椎动物中,真海鞘的酪氨酸酶与节肢动物的不同(图 1,2),其氨基酸序列与脊椎动物酪氨酸酶有 36% ~ 39% 的相似性,且真海鞘的酪氨酸酶具有类似脊椎动物的信号肽,表明其与脊椎动物酪氨酸酶具有较高的同源性^[38]。海绵和玻璃海鞘的酪氨酸酶也与节肢动物不同,具有类似脊椎动物的信号肽以及跨

膜域(表 1)。有趣的是,果蝇(*Drosophila melanogaster*) proPO 与血蓝蛋白之间序列的相似性很低,与脊椎动物酪氨酸酶序列的相似性也极低。果蝇的 proPO 与昆虫的储存蛋白显示出一定的同源性,尽管储存蛋白没有结合铜的能力^[43]。

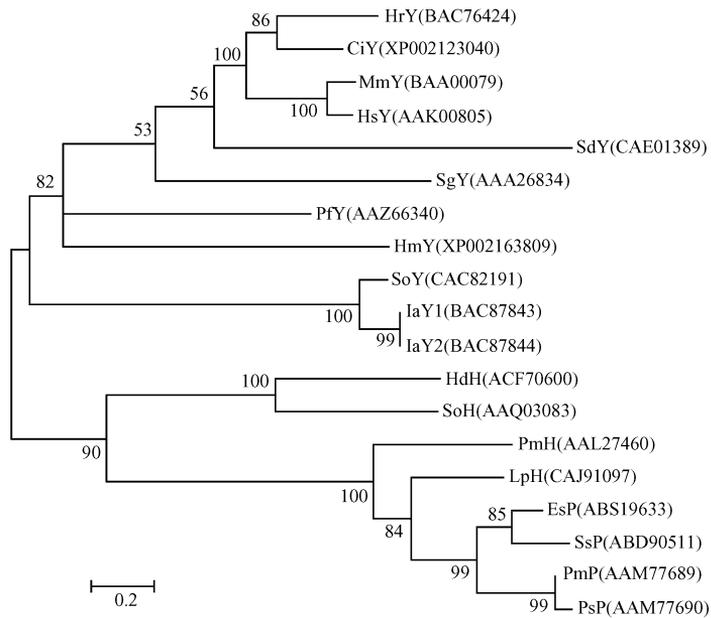


图 1 酚氧化酶、酪氨酸酶和血蓝蛋白氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree derived from PO, tyrosinase and hemocyanin amino acid sequences

节点处的数值为支持率(500 次重复)。蛋白名称的缩写如下,EsP:中华绒螯蟹 PO;SsP:锯缘青蟹 PO;PmP:斑节对虾 PO;PsP:短沟对虾 PO;PmH:斑节对虾血蓝蛋白;LpH:马蹄蟹血蓝蛋白亚基 II;HdH:杂色鲍血蓝蛋白;SoH:乌贼血蓝蛋白;IaY1 和 IaY2:阿根廷鲑鱼酪氨酸酶前体 1 和 2;SoY:乌贼酪氨酸酶;PFY:合浦珠母贝酪氨酸酶;HrY:真海鞘酪氨酸酶;CiY:玻璃海鞘酪氨酸酶;SdY:海绵酪氨酸酶;HmY:水螅酪氨酸酶;SgY:螺旋链霉菌酪氨酸酶;MmY:小家鼠酪氨酸酶;HsY:人酪氨酸酶。

Numbers above the branches represent the bootstrap values (%) for 500 simulations. Abbreviated protein names as follows, EsP: *Eriocheir sinensis* PO; SsP: *Scylla serrata* PO; PmP: *Penaeus monodon* PO; PsP: *P. semisulcatus* PO; PmH: *P. monodon* hemocyanin; LpH: *Limulus polyphemus* hemocyanin subunit II; HdH: *Haliotis diversicolor supertexta* hemocyanin; SoH: *Sepia officinalis* hemocyanin; IaY1 and IaY2: *Illex argentinus* tyrosinase precursor 1 and 2; SoY: *S. officinalis* tyrosinase; PFY: *Pinctada fucata* tyrosinase; SgY: *Streptomyces glaucescens* tyrosinase; HrY: *Halocynthia roretzi* tyrosinase; CiY: *Ciona intestinalis* tyrosinase; SdY: *Suberites domuncula* tyrosinase; HmY: *Hydra magnipapillata* tyrosinase; MmY: *Mus musculus* tyrosinase; HsY: *Homo sapiens* tyrosinase.

近年来发现甲壳动物以及软体动物中的血蓝蛋白不仅在物理化学性质、基因序列、蛋白质结构等方面与酚氧化酶非常相似^[44],而且在一定的条件下还可正反反馈调节 PO 活性^[45]。不仅如此,有学者进一步证实了血蓝蛋白在一些激活剂作用下同样可表现出 PO 活性^[46~51]。

Siddiqui 等以邻苯二酚为底物,发现罗曼蜗牛(*Helix pomatia*)、乌贼的血蓝蛋白表现出微弱的 O-双酚氧化酶活性,枯草杆菌蛋白酶水解后这种活性有所增强^[46]。甲壳动物中也存在类似的情况。Zlateva 等^[47]报道青蟹(*Carcinus maenas*)血蓝蛋白可被高氯盐诱导表现出 O-双

酚氧化酶活性。Decker 等^[48]发现加利福尼亚庞蛛 (*Eurypelma californicum*) 血蓝蛋白在胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶水解下可表现出酚氧化酶活性。Pless 等^[49]报道巨型深海大虱 (*Bathynomus giganteus*) 血蓝蛋白在 SDS (sodium dodecylsulfate) 诱导下可表现出 O-双酚氧化酶活性。严芳等^[50]报道凡纳滨对虾血蓝蛋白在胰蛋白酶诱导下可表现出一定的酚氧化酶活性。血蓝蛋白表现出自然的或人工的 PO 活性,是因为血蓝蛋白的分子发生构象变化,从而使 PO 特异底物能够结合到血蓝蛋白活性位点^[51]。这些研究成果和图 1、2 的结果相符,为 PO (酪氨酸酶) 和血蓝蛋白的同源性提供了佐证。

Van Holde 等^[52]推测,可能包括 PO、酪氨酸酶和血蓝蛋白在内的所有的铜蛋白都起源于同一种双核蛋白,随着进化分离成软体动物 (a 型) 和节肢动物 (b 型) 两类。a 型包括软体动物血蓝蛋白,非节肢动物的儿茶酚氧化酶和酪氨酸酶。b 型包括节肢动物的血蓝蛋白和 PO。他的推测与图 2 的结果是相符的。而根据我们构建的系统进化树 (图 1),软体动物血蓝蛋白却不属于 a 型,而是属于 b 型,与节肢动物的血蓝蛋白和 PO 具有更高的同源性。但无论如何,节肢动物 PO 和软体动物酪氨酸酶都不应该划在一类。

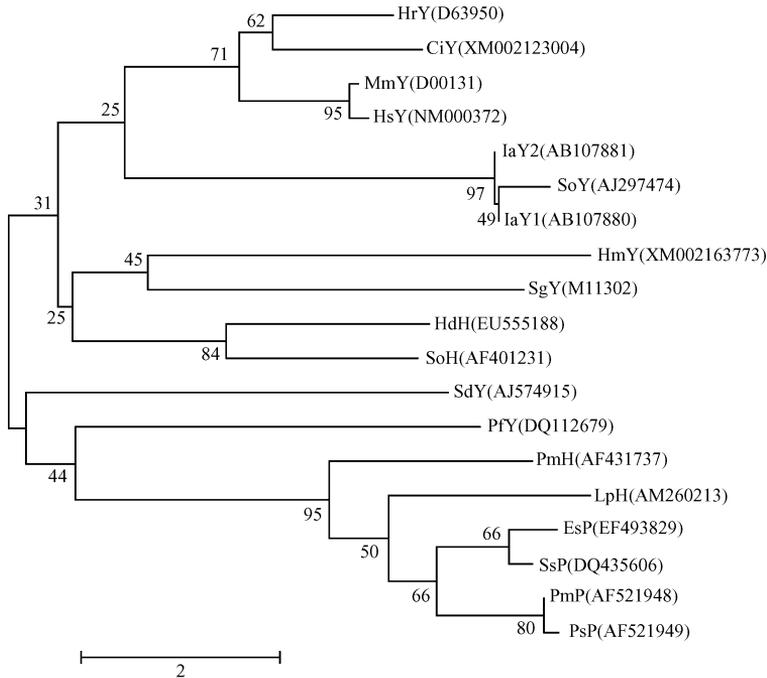


图 2 酚氧化酶、酪氨酸酶和血蓝蛋白核苷酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree derived from PO, tyrosinase and hemocyanin nucleotide sequences
节点处的数值为支持率(500 次重复)。缩写见图 1。

Numbers above the branches represent the bootstrap values (%) for 500 simulations. For abbreviated names, see Fig 1.

5 结 语

本文开篇即指出,Sugumaran^[1]建议将酪氨酸酶专门用于哺乳类,酚氧化酶专门用于无脊椎动物。但是,近几年关于软体动物等非节肢

动物酪氨酸酶的分子生物学研究结果表明^[19, 37, 38, 53],有必要重新定义上述分类方法(图 1,2)。由我们聚类分析的结果(图 1,2)可以看出,以软体动物为代表的非节肢动物酪氨酸酶与脊椎动物酪氨酸酶表现出较高的相似

性,而且大多数非节肢动物酪氨酸酶具有类似脊椎动物酪氨酸酶的信号肽以及保守区(表1)。因此,我们建议将酚氧化酶专门用于节肢动物,而酪氨酸酶用于软体动物等非节肢动物和脊椎动物。

目前,节肢动物的 PO 得到了较为广泛的研究^[5,6],而软体动物,特别是贝类酪氨酸酶的研究却比较有限^[53]。贝类是动物界极为重要的一个群类,种类繁多,分布广泛,许多种类具有很高的经济价值,与人类的生产、生活具有非常密切的关系。贝类相关基因的克隆与结构分析不仅有利于贝类的产业的发展,对于研究生物进化也具有十分重要的意义。近几年虽然可见一些关于贝类酪氨酸酶生化特性以及分子生物学的报道,但相比节肢动物而言还远远不够,有必要进一步开展更深入的研究。值得指出的是,在本文酚氧化酶组织定位中所涉及的软体动物 PO 活性的体现,都是基于其催化反应的分析结果,在这个层面上,很难区分是 PO 还是酪氨酸酶。现有的分子生物学证据倾向于软体动物体内的是酪氨酸酶而非 PO,由此可以推测,酪氨酸酶在软体动物的免疫防御系统中也起着重要的作用,有必要进行深入广泛的研究。

参 考 文 献

- [1] Sugumaran M. Roles of the insect cuticle in host defence reactions. In: Soderhall K, Iwanaga S, Vasta G eds. *New Directions in Invertebrates Immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1996, 355 ~ 374.
- [2] Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, *et al.* Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, **92**: 7 774 ~ 7 778.
- [3] Coles J A, Pipe R K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, **4**: 337 ~ 352.
- [4] Prota G. *Melanins and Melanogenesis*. San Diego: Academic Press, 1992.
- [5] 庞秋香, 庞书香, 赵博生. 酚氧化酶及其酶原的生化特性与分子生物学研究进展. *现代生物医学进展*, 2008, **8**(1): 196 ~ 200.
- [6] 庞秋香, 庞书香, 赵博生. 酚氧化酶及其酶原的研究进展()——免疫学特性、细胞定位及其功能. *现代生物医学进展*, 2008, **8**(7): 1 385 ~ 1 388.
- [7] Sugumaran M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res*, 2002, **15**(1): 2 ~ 9.
- [8] Sugumaran M. Characterization of phenoloxidase complexes. In: Wiesner A ed. *Techniques in Insect Immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1998, 205 ~ 215.
- [9] Sugumaran M. Prophenoloxidase activation and insect immunity. *UCLA Symp Mol Cell Biol*, 1990, **121**: 47 ~ 62.
- [10] 刘晓云, 张志峰, 于利等. 中国对虾组织细胞中酚氧化酶活力的研究. *高技术通讯*, 2002, **8**: 89 ~ 92.
- [11] Cerenius L, Lee B L, Soderhall K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*, 2008, **29**(6): 263 ~ 271.
- [12] Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998, **10**: 23 ~ 28.
- [13] Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis linnaeus*. *Dev Comp Immunol*, 1997, **21**(1): 1 ~ 12.
- [14] Hellio C, Anne B N, Cagnaire B, *et al.* Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, **22**: 433 ~ 440.
- [15] Meng FL, Zhang YZ, Kong J, *et al.* The research review of phenoloxidase activating system in crustacean. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, **30**(1): 110 ~ 115.
- [16] Sung H H, Chang H J, Her C H, *et al.* Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebr Pathol*, 1998, **71**(1): 26 ~ 33.
- [17] Barracco M A, Duvic B, Soderhall K. The α -1,3-glucan binding protein from the crayfish *Pacifastacus ieniussculus*, when reached with a 43 man, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res*, 1991, **266**: 491 ~ 497.
- [18] 张丽. 日本冷冻虾的加工与保鲜. *食品科学*, 1990, **5**: 13 ~ 15.
- [19] Zhang C, Xie L P, Huang J, *et al.* A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**: 632 ~ 639.
- [20] Munoz P, Meseguer J, Esteban M A. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to nature

- infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, **20**(1): 12~19.
- [21] Bai G, Brown J F, Watson C, *et al.* Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol B*, 1997, **118**: 463~469.
- [22] Gordon J, Carriker M R. Sclerotized protein in the shell matrix of a bivalve mollusk. *Mar Biol*, 1980, **57**: 251~260.
- [23] Waite J H, Tanzer M L. The bioadhesive of *Mytilus byssus*: a protein containing L-DOPA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, **96**: 1 554~1 561.
- [24] Nagai K, Yano M, Morimoto K, *et al.* Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol B*, 2007, **146**: 207~214.
- [25] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性. *中国水产科学*, 1999, **6**(2): 9~13.
- [26] Luna G A, Maeda M A, Vargas A F. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, **15**(4): 275~282.
- [27] 陆宏达, 刘凯, 张明辉. 中华绒螯蟹血淋巴中酚氧化酶的部分生化特性. *上海水产大学学报*, 2007, **16**(3): 236~241.
- [28] 马贵华, 钟青, 曹义虎等. 中华绒螯蟹酚氧化酶的初步研究. *江西农业学*, 2006, **18**(1): 41~44.
- [29] Sung H H, Yang Y L, Song Y L. Enhancement of microbicidal activity in the tiger-shrimp *P. mondon* via immunostimulation. *Crust Biol*, 1996, **16**(2): 278~284.
- [30] Ai H S, Liao J X, Huang X D, *et al.* A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Dev Comp Immunol*, 2009, **33**: 59~68.
- [31] Liu C H, Tseng D Y, Lai C Y. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase cDNA from haemocytes of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult stage. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, **21**(1): 60~69.
- [32] Stevenson J R, Adomako T Y. Diphenol oxidase in the crayfish cuticle: Localization and changes in activity during the molting cycle. *Insect Physiol*, 1967, **13**: 1 803~1 811.
- [33] 梁建光, 王宜艳, 孙虎山. 栉孔扇贝外套膜过氧化物酶和酚氧化酶的电镜细胞化学研究. *鲁东大学学报(自然科学版)*, 2007, **23**(1): 80~83.
- [34] Gai Y, Zhao J, Song L, *et al.* A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, **24**(2): 156~167.
- [35] Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Dev Comp Immunol*, 2007, **31**(1): 12~22.
- [36] 叶星, 郑清梅, 白俊杰. 短沟对虾和斑节对虾酚氧化酶原基因的克隆和序列分析. *海洋与湖沼*, 2003, **34**(5): 533~540.
- [37] Naraoka T, Uchisawa H, Mouri H, *et al.* Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(19): 4 026~4 038.
- [38] Sato S, Masuya H, Numakunai T, *et al.* Ascidian tyrosinase gene: its unique structure and expression in the developing brain. *Dev Dyn*, 1997, **208**(3): 363~374.
- [39] Müller W E, Grebenjuck V A, Thakur N L, *et al.* Oxygen-controlled bacterial growth in the sponge *Suberites domuncula*: toward a molecular understanding of the symbiotic relationships between sponge and bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(4): 2 332~2 341.
- [40] Yamamoto K, Yakiyama M, Fujii H. Expression of prophenoloxidase mRNA during silkworm hemocyte development. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**(6): 1 197~1 202.
- [41] Morgan T D, Thomas B R, Yonekura M, *et al.* Soluble tyrosinases from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem*, 1990, **20**: 251~260.
- [42] Masaaki A, Paul T B. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, **92**: 10 698~10 702.
- [43] Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, *et al.* Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, **92**: 7 769~7 773.
- [44] Paul R J, Prow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology (Jena)*, 1998, **100**: 298~306.
- [45] 章跃陵, 王三英, 刘光明等. 南美白对虾血蓝蛋白对酚氧化酶活性的影响. *中国水产科学*, 2005, **12**(4): 402~406.
- [46] Siddiqui N I, Akosung R F, Gelens C. Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **48**: 1 138~1 144.
- [47] Zlateva T, Dimuro P, Salvato B, *et al.* The O-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Lett*, 1996, **384**: 251~254.
- [48] Decker H, Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *Biol Chem*, 1998, **273**: 25 889~

- 25 892.
- [49] Pless D, Aguilar M, Falcon A, *et al.* Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **409**: 402 ~ 410.
- [50] 严芳, 章跃陵, 罗活强等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白酚氧化酶活性的研究. *水产科学*, 2008, **27**(1): 5 ~ 8.
- [51] Decker H, Tuzcek F. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25**: 392 ~ 397.
- [52] Van Holde K E, Miller K I, Decker H. Hemocyanins and invertebrate evolution. *Biol Chem*, 2001, **276**: 15 563 ~ 15 566.
- [53] Decker H, Terwilliger N. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J Exp Biol*, 2000, **203**: 1 777 ~ 1 782.

山东省莱州市发现黄颈拟蜡嘴雀

2009年5月17日,笔者在山东省莱州市三山岛沿海防护林(119°22'E, 37°27'N)发现一只体型较大(约22cm)的黄绿色鸟类,并拍到照片(图1)。该鸟头及喉部灰色,覆羽、肩及上背暗灰,颈背及领环黄色。虹膜深褐色,嘴绿黄色,脚橘黄色。该鸟善鸣叫,叫声清晰响亮,多为5~7个音节的哨音,有时为一连串快速圆润的“pip”声。该鸟多在林地栖息,一般活动于中下部的树冠层,飞行径直而迅速,但活动范围相对稳定,且不甚惧人。

经与《中国鸟类野外手册》对照并查阅相关资料,确定该鸟为黄颈拟蜡嘴雀(*Mycerobas affinis*)的雌鸟。据《中国鸟类分类与分布名录》记载,黄颈拟蜡嘴雀分布于甘肃西部、西藏南部、云南西北部和四川西部,该鸟在莱州被发现,为山东省、乃至我国中东部地区的首次记录。在其后的一个月,先后又有多人在同一地点拍到其照片,我们推测该鸟为迷鸟。



图1 黄颈拟蜡嘴雀

张锡贤

(山东省莱州市农业局 莱州 261400)