

· 研究论文 ·

# 甘蓝多酚氧化酶的生物化学性质及其杀虫剂的诱导作用

王丽红, 高希武\*

(中国农业大学 昆虫系, 北京 100094)

**摘要:** 采用时间动力学法, 在研究了甘蓝多酚氧化酶的最适反应条件的基础上, 对有机溶剂和杀虫剂对多酚氧化酶活性的影响进行了研究。结果表明: 甘蓝多酚氧化酶反应的最适 pH 值为 6.4, 最适反应温度为 55℃; 丙酮和乙醇对多酚氧化酶活性有明显的激活作用; 高效氯氟菊酯、灭多威和辛硫磷以及小菜蛾和桃蚜取食的胁迫会对多酚氧化酶的活性产生影响。

**关键词:** 多酚氧化酶; 杀虫剂; 甘蓝; 昆虫

中图分类号: Q 946.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2004)04-0033-05

## Biochemical Characteristics and Induction by Insecticides of Polyphenol Oxidase in Cabbage

WANG Lihong, GAO Xiwu\*

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The optimum condition for determination of polyphenol oxidase (PPO) from cabbage and the induction of polyphenol oxidase by insecticides and *Plutella xylostella* and *Myzus persicae* infest were investigated. The optimum pH value and temperature are 6.4 and 55℃ for assay of polyphenol oxidase activities respectively in cabbage. Ethanol and acetone exhibit the activation to polyphenol oxidase from cabbage.  $\alpha$ -cypermethrin, methomyl and phoxin, and the infesting of *Plutella xylostella* and *Myzus persicae* can influence the specific activity of polyphenol oxidase in cabbage.

**Key words:** polyphenol oxidase; insecticide; cabbage; insect

多酚氧化酶又称酪氨酸酶, 具有单酚单氧化酶 (EC 1.10.3.1) 和邻苯二酚氧化酶 (EC 1.10.3.1) 活性。L-酪氨酸在它的催化作用下羟基化生成多巴, 然后经过一系列的生化反应生成黑色素。该酶广泛存在于人、动物、植物和微生物体内, 在食品的保存和医药中都受到高度的重视。在高等植物中多酚氧化酶主要存在于植物的块茎 (如马铃薯) 或绿色植物的叶绿体 (如菠菜、甜菜、绿色的橄榄) 中<sup>[1]</sup>。多酚氧化酶可增加植物对病原菌的抗性, 如烟草对炭疽病菌 *Colletotrichum nicotianae* Sacc、黄瓜对黑星病

菌 *Cladosporium cucumerinum* ELL. et Arthur、苹果对轮纹病菌 *Macrophoma kawatsukai* Hara、棉苗对枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* (Atk) Synder et Hansen、水稻对白叶枯病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* (Ishiyama) Dye 和细菌性条斑病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzicola* (Fang, Ren, Chen, Chu, Fan & Wu) Dye 以及番茄对刺吸式口器昆虫的抗性<sup>[2]</sup>。有关植物病害生理研究表明, 病原菌侵染可引起寄主植物体内多酚氧化酶活性的升高, 多酚氧化酶把酚类物质

收稿日期: 2004-03-01; 修回日期: 2004-07-24

作者简介: 王丽红 (1979-), 女, 辽宁抚顺人, 硕士研究生, 研究方向为农药毒理学

\* 通讯作者; 联系电话: 010-62732974; E-mail: gaowu@263.net.cn, lihongcau@eyou.com

氧化成对病原菌毒性更强的醌(或其衍生物)。多酚氧化酶活性与植物的抗病性呈正相关<sup>[3]</sup>。甘蓝上多种病虫害的控制依赖于农药的作用,特别是蚜虫的防治。蚜虫抗药性的产生会使药剂的使用量进一步增加,同时也增加了杀虫剂在甘蓝上残留的风险,因此研究替代的防治技术是减少杀虫剂污染的重要途径,其中培育抗虫品种是有害生物综合治理(Integrated Pest Management, IPM)中首先考虑的措施之一。多酚氧化酶是作物品种抗性的因子之一,通过该酶可以使植物体内的一些化合物转变成对病菌或昆虫有毒或可阻止其取食的化合物。多酚氧化酶广泛分布于甘蓝的各个部位,通过研究甘蓝植株内多酚氧化酶的性质,对于将来人工调控以酚类化合物为主的甘蓝抗病性或抗虫性的研究具有重要的参考价值。另一方面,研究害虫和杀虫剂对甘蓝胁迫及对多酚氧化酶的影响对于协调IPM中化学防治和作物抗虫品种的利用也具有重要的参考价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试甘蓝

品种为早熟甘蓝8132,在温室种植,不接触任何药剂、肥料。

### 1.2 供试药剂

92% 辛硫磷(phoxin)原药(天津农药厂产品); 98% 灭多威(methomyl)原药(山东华阳科技股份有限公司产品); 95% 高效氯氰菊酯(*beta*-cypemethrin)原药(江苏化工股份有限公司产品)。其他化学试剂均为市售分析纯。

### 1.3 酶液制备

摘取甘蓝一定部位的叶片,洗净,晾干,用液氮速冻后快速研磨,用pH 6.5、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液匀浆以提取多酚氧化酶,三层纱布过滤后,匀浆液于10 000 g、4℃下离心20 min后取上清液作为酶源。

### 1.4 酶活性测定

参照梁沛等<sup>[4]</sup>改进的方法。反应体系为1.5 mL,含酶液30 μL。以邻苯二酚作为底物(浓度为0.025 mol/L),用PE40紫外-可见扫描分光光度计在420 nm下测量每分钟光密度值(OD值)的变化量,重复3次。反应温度为25℃。

### 1.5 最适酶浓度的确定

反应体系为1.5 mL。分别加酶液(酶浓度相当

于0.812 mg pro/mL) 5、10、20、30、40、50、60 μL 和0.05 mol/L 邻苯二酚735 μL,用0.1 mol/L pH 6.5的磷酸缓冲液补齐,在35℃下测活性。

### 1.6 底物浓度与酶活性的关系

反应体系为1.5 mL。分别加入邻苯二酚至终浓度为1.67、3.33、6.67、13.33、26.67 μmol/L 的酶液30 μL,其余用0.1 mol/L pH 6.5 磷酸缓冲液补齐,测定酶活性。

### 1.7 pH 值对酶活性的影响

参照张龙翔等报道的方法<sup>[5]</sup>,分别配制pH 值2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、6.4、7.0、8.0、9.0、10.0和10.6的缓冲液。在不同pH 值条件下分别测定多酚氧化酶的活性,重复3次。

### 1.8 温度对酶活性的影响

分别在21、30、40、48、53、55、59、65℃下测定多酚氧化酶的活性。对照在4.41 mL 0.025 mol/L 邻苯二酚溶液中加入120 μL 乙醇饱和的苯基硫脲抑制多酚氧化酶的活性,其余同测定管。在测定管中加入4.41 mL 0.025 mol/L 邻苯二酚,在相应温度下水浴预热2 min,然后加入90 μL 酶液,1 min后加入120 μL 乙醇饱和的苯基硫脲,在420 nm 测定吸光值。

### 1.9 有机溶剂对酶活性的影响

反应体系为1.5 mL。加入酶液30 μL,0.05 mol/L 邻苯二酚735 μL(用0.1 mol/L pH 6.5的磷酸缓冲液配制),乙醇(或丙酮)20、40、80、160 μL(在体系内的最终体积分数分别为1.33%、2.67%、5.67%、11.34%),其余用0.1 mol/L pH 6.5磷酸缓冲液补齐。以不加有机溶剂为对照。在35℃下测活性,测定方法参见1.3。

### 1.10 杀虫剂和昆虫对酶活性的影响

分别用高效氯氰菊酯(1.3 mg/L)、辛硫磷(300 mg/L)和灭多威(600 mg/L)对盆栽甘蓝喷雾(10 mL/株),测定不同时间甘蓝叶片酶活性的变化。

分别在每株甘蓝叶片上接入50头蚜虫 *Myzus persicae* 或者2头小菜蛾 *Plutella xylostella*,测定不同时间叶片酶活性的变化。

### 1.11 三种杀虫剂对离体甘蓝多酚氧化酶活性的抑制作用

用无水乙醇配成系列浓度药液(高效氯氰菊酯0.0216 mol/L、灭多威0.1850 mol/L、辛硫磷0.0671 mol/L),分别将酶液30 μL(酶浓度相当于

0.812 mg pro/mL) 与上述 3 种杀虫剂 (20  $\mu$ L) 混合, 按 1.3 的方法测定酶活性。以相同含量的无水乙醇为对照, 每个处理 3 次重复。

抑制率 (%)

$$= (1 - \text{处理组比活力} / \text{对照组比活力}) \times 100$$

## 1.12 蛋白含量测定

参照 Bradford<sup>[6]</sup> 考马斯亮蓝 G-250 法。

## 2 结果分析

### 2.1 酶浓度对酶活力的影响

甘蓝多酚氧化酶的反应速率在酶浓度低时呈直线上升, 后上升速度缓慢, 趋于极限值 (图 1)。说明测定甘蓝多酚氧化酶时不能无限制地增加酶的浓度, 只有在线性范围内才能正确地评价甘蓝多酚氧化酶的活性。

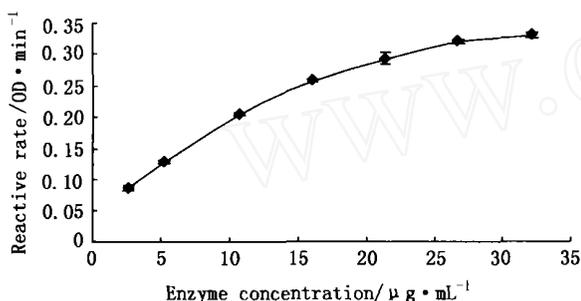


Fig. 1 The assay of the optimum concentration of polyphenol oxidase in cabbage

### 2.2 底物浓度对酶活力的影响

酶比活力随着底物浓度的增加而加强, 在本实验测定的底物浓度范围内, 没有发现底物抑制现象 (图 2)。按米氏方程, 通过双倒数作图法, 得出该酶的米氏常数 ( $K_m$ ) 为 7.956 mmol/L, 最大反应速度 ( $V_{max}$ ) 为 31.25  $\text{OD} \cdot (\text{mg pro})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

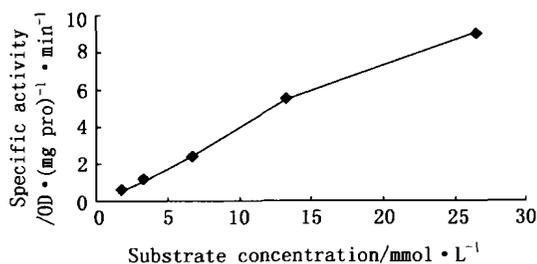


Fig. 2 The effect of substrate concentration on the specific activity of polyphenol oxidase from cabbage

### 2.3 pH 值对多酚氧化酶活性的影响

在 24 下反应体系的 pH 值对甘蓝多酚氧化酶的比活力有明显的影响 (图 3)。在 pH 5.0 以下几乎没有活性; 在 pH 5.0~6.0 之间, 酶比活力迅速上升; 在 pH 6.0~7.0 之间酶活力较高, pH 6.4 时多酚氧化酶比活力最高, 当 pH 大于 7.0 时, 多酚氧化酶比活力下降, 到 pH 8.0 时基本无活性。

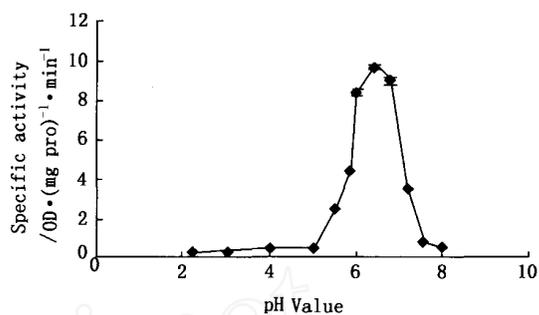


Fig. 3 The effect of pH values on the specific activity of polyphenol oxidase from cabbage

### 2.4 温度对多酚氧化酶活性的影响

温度对甘蓝多酚氧化酶比活力具有明显的影响 (图 4)。酶比活力在 20~50 之间呈直线上升, 在 50~60 之间比活力差别不大, 在 55 时达到最大值, 60 之后随温度升高酶比活力下降很快, 说明由于温度升高引起的酶蛋白的变性作用高于温度升高引起的酶催化活性增加的作用。

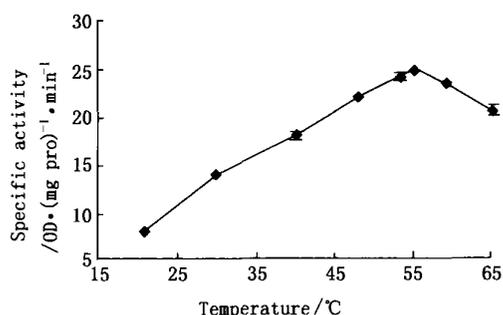


Fig. 4 The effect of temperature on the specific activity of polyphenol oxidase from cabbage

### 2.5 有机溶剂对多酚氧化酶的激活作用

在一定浓度范围内丙酮和乙醇都对甘蓝多酚氧化酶具有激活作用, 酶比活力随有机溶剂在体系内体积分数的增加而升高。乙醇的激活作用高于丙酮, 乙醇 (体系内所占的体积分数为 11.34%) 的激活作用可以使其活性提高将近 50% (图 5)。

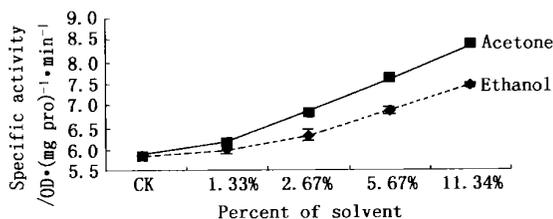


Fig 5 The activation of ethanol and acetone on polyphenol oxidase from cabbage

## 2.6 杀虫剂处理和昆虫取食对多酚氧化酶活性的诱导作用

高效氯氰菊酯、灭多威和辛硫磷处理甘蓝 1 d 后,甘蓝的多酚氧化酶活性有降低的趋势,表现为先降低,随后逐渐升高,到第 3 d 时高效氯氰菊酯和灭多威处理者多酚氧化酶活性明显高于对照组,而辛硫磷处理与对照组接近(图6)。这种诱导的趋势与高效氯氰菊酯、灭多威和辛硫磷 3 种杀虫剂对甘蓝离体多酚氧化酶活性的抑制作用比较吻合。灭多威(2 467 mmol/L)和辛硫磷(0 894 mmol/L)对甘蓝多酚氧化酶的抑制率分别为 34.2% 和 83.3%,明显高于高效氯氰菊酯的抑制作用(表 1)。

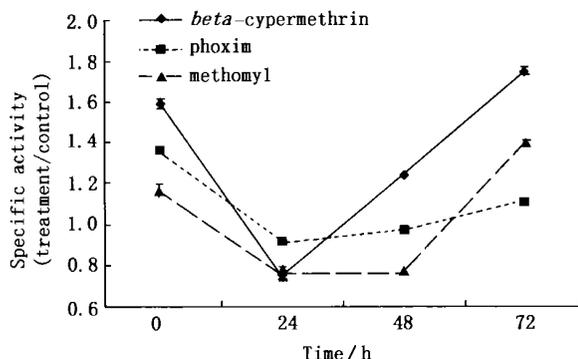


Fig 6 Effect of insecticides on polyphenol oxidase activity in cabbage

Table 1 The effect of insecticides on the specific activity of polyphenol oxidase activity in cabbage

Insecticides	Concentration of insecticide/mm $\cdot$ L $^{-1}$	Inhibition ratio (%)
beta-cypermethrin	0 288	3.28
methomyl	2 467	34.17
phoxim	0 894	83.29

小菜蛾和蚜虫取食甘蓝诱导甘蓝体内多酚氧化酶的趋势与药剂处理有类似之处(图7)。小菜蛾取食 1 d 后甘蓝多酚氧化酶的活性明显降低,在取食

2~3 d 内,酶活性开始逐步上升;蚜虫取食后甘蓝多酚氧化酶的活性在 3 d 内没有明显改变,但是仍可以看出其经历了降低-升高的过程。这可能与小菜蛾取食量比蚜虫大或与二者的取食方式不同有关。

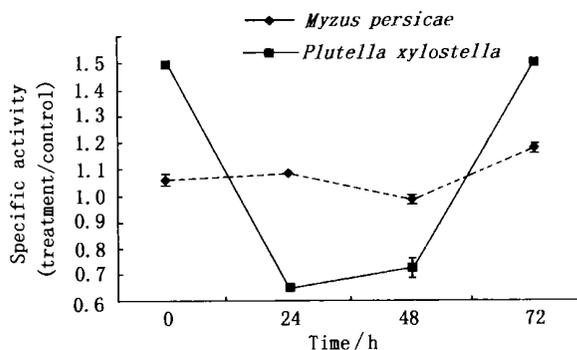


Fig 7 Effect of *Plutella xylostella* and *Myzus persicae* diamondback moths and green peach aphids on polyphenol oxidase activity in cabbage

## 3 讨论

甘蓝多酚氧化酶的比活力在 pH 6.0~7.0 之间变化不大,在 pH 6.4 时最高,说明该酶的最适 pH 值在 6.4 左右。在 50~60 之间比活力相差不大,在 55 左右达到最高,说明最适反应温度为 55。不同物种之间多酚氧化酶反应的最适条件差异很大。白腊荔枝 *Coldenia procumbens* 多酚氧化酶活力测定的最佳条件是 pH 值为 7.3,温度为 62<sup>[7]</sup>;莴苣的最适测定温度为 50<sup>[8]</sup>;向日葵的多酚氧化酶活力测定的最适 pH 值为 7.0,最适反应温度为 60<sup>[9]</sup>;温柏 *Cydonia oblonga* 的多酚氧化酶测定最佳条件是 pH 值为 6.8,温度为 45<sup>[10]</sup>。温度对多酚氧化酶活性有双重影响,一方面温度升高可加快酶催化反应速度,另一方面则促使酶蛋白变性,是两种对抗效应的综合反映。甘蓝多酚氧化酶活力测定有较高的最适温度,这可能是甘蓝在常温下变色缓慢的原因。在甘蓝加工运输过程中,降低温度有利于保护色泽。

多酚氧化酶存在无活性的或者说是潜在的一种状态,在同一试验材料中,可能同时存在着有活性和无活性两种状态的多酚氧化酶<sup>[11]</sup>。在很多情况下,无活性的多酚氧化酶可以被激活,例如:蛋白酶<sup>[12]</sup>、尿素<sup>[13]</sup>都可以激活多酚氧化酶。丙酮和乙醇是常用的有机溶剂,本研究发现,二者对甘蓝多酚氧化酶都有激活作用,乙醇(体积分数为 11.34%)的作用可以使酶活性提高 50%。但是并不是所有多酚氧化酶都

会被乙醇激活, 曾伟成等就曾报道乙醇对多酚氧化酶有抑制作用<sup>[1]</sup>。

病虫害作为胁迫方式的一种也会影响植物体内多酚氧化酶的活性。华山松 *Pinus amandii* Franch 受蚜虫或螨类侵害后, 其含糖量、酚类物质含量比正常华山松低, 过氧化物酶和多酚氧化酶活性都比正常华山松高。受侵害的华山松与正常植株同一器官相比较, 叶和根的变化较大, 茎的变化较小<sup>[14]</sup>。蚜虫取食前, 棉花不同品种的多酚氧化酶活性差异不显著, 取食后不同抗性品种的多酚氧化酶活性差异显著, 多酚氧化酶的活性与棉花的抗蚜性呈正相关<sup>[15]</sup>。本研究发现, 小菜蛾取食3 d 后甘蓝多酚氧化酶的活性明显高于对照组, 蚜虫取食则与对照没有明显差异, 可能与小菜蛾取食量比蚜虫大或二者的取食方式不同有关。

杀虫剂和害虫作为对甘蓝的胁迫作用, 会影响甘蓝多酚氧化酶的活性。在72 h 内, 酶活性变化很明显, 说明多酚氧化酶和甘蓝对胁迫的反应是相关的, 可以通过对甘蓝多酚氧化酶活性的测定, 来作为衡量杀虫剂胁迫或害虫胁迫作用的一个指标。目前已经有利用多酚氧化酶作为生物传感器来检测对氧磷和毒死蜱的报道<sup>[16]</sup>。

#### 参考文献

- [1] ZENG Wei-cheng (曾伟成), CHEN Zeng-xie (陈曾燮), ZHENG Neng-wu (郑能武). 乙醇对酪氨酸酶活性的影响[J]. *Channel Pharmacology* (海峡药学), 2000, 12(4): 36-37.
- [2] HE Li-hong (贺立红), BEN Jin-hua (宾金华). 高等植物中的多酚氧化酶[J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 2001, 37(4): 340-345.
- [3] SHEN Ye-shou (沈业寿), XIE Ji-feng (谢继锋), CHU Su (储苏). 魔芋感染软腐病后多酚氧化酶和蔗糖酶活性的变化[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2001, 29(5): 611-612.
- [4] LIANG Pei (梁沛), MENG Feng-xia (孟凤霞), GAO Xi-wu (高希武), et al. 小菜蛾多酚氧化酶生物化学性质研究[J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2003, 46: 553-557.
- [5] ZHANG Long-xiang (张龙翔), ZHANG Ting-fang (张庭芳), LI Ling-yuan (李令媛). Biochemical Experiment Method (生化实验方法和技术) [M].

Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), 1997. 462-467.

- [6] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding [J]. *Analyt Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [7] LIU Guang-dong (刘光东), JIANG Shi-yun (蒋世云), SHI Yu-zhong (师玉忠). 荔枝多酚氧化酶动力学研究[J]. *Guangxi Science & Technology of Tropical Crops* (广西热作科技), 1999, (2): 1-4.
- [8] CHEN Xue-hong (陈学红), QIN Weidong (秦卫东), GAO Hui (高卉), et al. 莴苣中多酚氧化酶特性的研究[J]. *Jiangsu Foodstuff and Zymolysis* (江苏食品与发酵), 2002, 109: 10-13.
- [9] Tchone M. Uber Polyphenole in Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) und Andere Gesundheitsrelevante Inhaltsstoffe [D]. Berlin: School of Process Sciences and Engineering, 2003.
- [10] H Üya Y, Ayten S. Non-covalent immobilization of quince (*Cydonia oblonga*) polyphenol oxidase on alumina [J]. *Acta Chim Slov*, 2002, 49: 893-902.
- [11] Whitaker J R. Polyphenol oxidase [A]. Wong D W S. Food Enzymes Structure and Mechanism [C]. New York, 1995. 271-307.
- [12] King R S, Flurkey W H. Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenol oxidase [J]. *Sci Food Agric*, 1987, 41: 231-240.
- [13] Swain T, Mapson L W, Robb D A. Activation of *Vicia faba* (L) tyrosinase as effected by denaturing agents [J]. *Phytochemistry*, 1996, 5: 469-482.
- [14] WU Jian-rong (伍建榕), SHENG Shi-fa (盛世法), LU Jing (卢靖), et al. 华山松对蚜虫及螨侵害产生的生化响应[J]. *J Southwest Forestry College* (西南林学院学报), 2001, 21(4): 229-233.
- [15] WANG Hong-liang (王洪亮), WANG Qing-lian (王清连). 棉花多酚氧化酶对棉蚜为害的反应[J]. *J Henan Vocation-Technical Normal College* (河南职业技术学院学报), 2001, 29(2): 1-2.
- [16] Silvana A, Alina A, Camelia B, et al. Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase-comparative study of two enzyme sensors [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 374: 39-45.

(责任编辑: 唐 静)