

罗万春 薛超彬 编著

昆虫酚氧化酶 及其抑制剂



科学出版社

www.sciencep.com



华夏英才基金学术文库

昆虫酚氧化酶及其抑制剂

罗万春 薛超彬 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是一本基础理论知识与研究论文并存的专著。酚氧化酶广泛存在于动植物体内,昆虫酚氧化酶抑制剂对于开发无公害昆虫控制剂具有重要作用。本书介绍了昆虫酚氧化酶研究概况、分离纯化及活性测定技术、酶抑制动力学研究以及酶抑制剂结构与活性的关系。此外,本书还包括作者所在研究团队近年来发表的部分文章。本书对于发展环境友好害虫控制剂具有重要参考价值。

本书可供大专院校生物学、植保学、制药工程等专业师生、农药科研院所研究人员或从事昆虫毒理学方面的工作者参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

昆虫酚氧化酶及其抑制剂/罗万春,薛超彬编著. —北京:科学出版社, 2010

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 978-7-03-026113-7

I. 昆… II. ①罗…②薛… III. 杀虫剂-研究 IV. TQ453

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 216390 号

责任编辑:王海光 夏 梁/责任校对:鲁 素

责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市农林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 1 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2010 年 1 月第一次印刷 印张: 21 3/4 插页: 6

印数: 1—1 500 字数: 417 000

定价: 75.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈文林〉)

序 一

昆虫属于典型的外骨骼动物，是动物界最大的一个类群，约占动物种类的三分之二以上。在昆虫体内，酚氧化酶是一种重要的酶，它在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要作用。酚氧化酶催化完成的醌鞣化作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化，这个过程对于具有“外骨骼”的昆虫生命过程至关重要。在昆虫变态的各个阶段，譬如，由新生卵发育为成熟卵、幼虫蜕皮、幼虫化蛹以及蛹羽化为成虫后的体壁及其附肢（如翅、足等）的黑化和硬化过程都与酚氧化酶的作用息息相关。因此，酚氧化酶抑制剂的研究可以为发展新型害虫控制剂提供重要线索，特别是研究不同昆虫酚氧化酶特性及抑制剂抑制动力学将会为发现一类全新的、专化性的无公害害虫控制剂提供理论基础和实践参考。

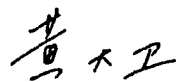
从农药的发展方向来看，对杀虫剂而言，以害虫生命过程中某个关键的生理生化作用机制作为研究模型，人为地设计、合成干扰此作用机制的化合物，从中筛选出先导化合物，然后进行结构优化，这种对靶标进行设计、研究和开发的思路，无疑是环境友好农药发展的方向。

山东农业大学罗万春教授带领他的研究团队，在国家自然科学基金的资助下，把握新农药研究中生物合理设计（biorational design）方向，以昆虫酚氧化酶为靶标，进行了卓有成效的研究，他们在工作过程中深入酚氧化酶研究领域，对该领域的研究概况与研究技术进行了深入探讨，在此基础上，结合国内外文献资料与他们的工作经验，与薛超彬博士共同完成了《昆虫酚氧化酶及其抑制剂》一书，这部专著对于昆虫学和环境友好农药研究工作者都具有重要的参考价值。

生物合理设计是一个诱人的领域。对杀虫剂而言，其理论基础是昆虫生物化学。即以靶标生物体生命过程中某个关键的生理生化作用机制作为研究模型，人为地设计、合成干扰此作用机制的化合物，从中筛选出先导化合物，然后进行结构优化开发。这类研究通常包括以下步骤：①研究某一昆虫的某一生化途径（biochemical pathway）；②研究抑制剂干扰的机制；③设计生物合理干扰物。其后再以确定的干扰物结构为先导化合物，或 N 次先导化合物进行先导优化，开发出最佳候选物，进而进入应用开发与安全性评价等工作程序。无疑，《昆虫酚氧化酶及其抑制剂》一书为读者提供了这样的概念与实践参考。

另外，该书将研究论文作为一个部分编排，以便与读者进行更直接的交流，这也是一种很好的尝试。

该书获得华夏英才基金资助并由科学出版社出版,是我国生物学界的一件喜事,将为有关专业的高等院校师生与研究人员提供重要参考。



中国昆虫学会理事长

2009年6月6日

序 二

新农药创制始终是农药科学和农药工业发展的原动力。科学的发展和社会的进步要求新世纪创制的农药应是生物合理农药 (biorational pesticide) 或环境相容性农药 (environmental compatible pesticide), 应具备“对有害生物高效, 对非靶标生物及环境安全”的特点。要实现农药品种的创新, 就必须在研究策略和研究思路方面有所创新。就研究策略而言, 新农药创制可归纳为四个方面: 随机筛选 (random screening)、类推合成 (analogue synthesis)、天然产物模型 (natural product model) 及生物合理设计 (biorational design)。其中, 生物合理设计日趋重要, 备受关注, 具有广阔的发展前景。所谓生物合理设计, 是利用靶标生物生命过程中某个特定的关键生理生化作用机理作为研究模型, 设计和合成能干扰该机理的化合物, 从中发现先导化合物, 经先导优化开发新农药的一条途径。就研究思路而论, 目前的商品化杀虫剂绝大多数是作用于昆虫神经系统的神经毒剂。由于昆虫的神经系统及其功能和哺乳动物相似, 因此要开发出具有生理生化选择性的神经毒剂就比较困难。相反, 昆虫的其他系统, 如表皮系统、呼吸系统等, 无论是结构还是生理生化功能, 和哺乳动物都有显著差别。因此, 以这些系统的生理生化关键途径为研究模型, 就有可能开发出新型的生物合理杀虫剂。昆虫蜕皮形成的新表皮, 需要迅速鞣化 (硬化), 否则昆虫必将死亡, 昆虫正常的表皮鞣化过程需要一系列酶的催化, 其中最重要的是酚氧化酶。如果一个化合物可以有效地抑制酚氧化酶的活性, 就可能具有开发为杀虫剂的潜力。

罗万春教授正是基于这些认识, 带领他的研究生在两项国家自然科学基金的资助下, 以新农药创制为目标, 从酚氧化酶的酶学特性、抑制剂合成筛选、抑制动力学和酚氧化酶抑制剂构效关系等方面进行了深入系统的研究, 取得了一系列有重要理论意义和潜在经济价值的成果。在此基础上, 罗万春教授结合自己的体会与经验, 与薛超彬博士共同完成了这部专著。该书的特点是: 既阐明了有关酚氧化酶的基本原理, 又介绍了相关的研究方法及实验技术; 既反映了国内外的研究进展, 又展示了自己的研究成果。该书的出版, 将促进我国昆虫毒理学的发展, 对我国新农药的创制具有重要的参考价值。

只言片语, 不足为序, 谨以此致贺!

吴文君

西北农林科技大学农药研究所

2009年5月26日

前 言

在自然界生物王国里，酚氧化酶（phenoloxidase, PO）无处不在。无论是脊椎动物还是无脊椎动物（包括昆虫）、植物和微生物，酚氧化酶都在其生命过程中发挥着重要作用。也正是由于该酶的性质和功能及其在不同生物体生命活动中的作用，对其生物化学、生理学、药理学和毒理学的研究引起了许多专业领域的关注。

有关酚氧化酶的报道已有百年历史。早在 1905 年，Dewits 就提出昆虫的酚氧化酶与黑色素形成有关。后来的研究表明，酚氧化酶广泛存在于动物、植物、昆虫、真菌和细菌体内，可以引起一些水果、蔬菜和甲壳类动物在贮藏期间变色；它可作为多种植物抗病性鉴定的指标或反映植物抗病性的一个辅助生化指标；与动物黑色素合成以及在皮肤等处沉着着色有关等。在节肢动物中，酚氧化酶是昆虫体内的一种重要酶类，在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要作用。

国外从 20 世纪 60 年代开始，就有人开始了酚氧化酶抑制剂的研究，譬如在化妆品行业和医药界，由于酚氧化酶与黑色素合成以及在皮肤等处沉着有关，而酚氧化酶抑制剂干扰了黑色素的合成过程，故可用于合成美容品和药物；另外，酚氧化酶抑制剂也可以作为一些蔬菜、水果在贮存期间保鲜使用。

酚氧化酶催化完成的醌鞣化作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化，这个过程对于具有外骨骼的昆虫生命过程至关重要。我们一直从事昆虫毒理学教学和研究工作，深知当今农药的发展正面临一个关键时刻，发展对环境友好害虫控制剂的理念越来越深入人心，这个领域也越来越成为世界各国科学技术争相抢占的一个制高点。研究开发新杀虫剂的途径一般认为有如下四个方面：①随机筛选（random screening）；②类推合成（analogue synthesis）；③天然产物模型（natural product model）；④生物合理设计（biorational design）。生物合理设计是一个诱人的领域，其理论基础是昆虫生物化学，即以靶标生物体生命过程中某个关键的生理生化作用机制作为研究模型，人为地设计干扰此类作用机制的化合物，从中筛选出先导化合物，然后进行结构优化开发。特别是计算机辅助分子设计（computer-aided molecular design, CAMD）用于此类研究大有前途。

我有幸获得国家留学基金的资助，于 2000 年作为访问学者赴美国加利福尼亚大学（Berkeley）进行合作研究，在 Isao Kubo 教授的指导下进入了酚氧化酶研究领域，虽然研究对象是蘑菇酪氨酸酶（mushroom tyrosinase），但该研究室

的工作思路给了我很大启发,虽然来自动物的同类酶系与该酶有不同之处,但作为基础研究仍具有重要意义,且该酶抑制剂理论可以为发展新型害虫控制剂提供重要线索,特别是研究不同昆虫酚氧化酶特性、抑制剂抑制动力学、化合物与生物活性的相关性,将会为发现一类全新的、专化性的无公害昆虫控制剂提供理论基础和实践参考。

回国后,我很高兴有机会将此思路付诸于行动。2003年与2006年,我带领的研究小组前后两次获得国家自然科学基金的资助(30270887, 30571237),开始了对昆虫酚氧化酶及其抑制剂的研究。我与我的研究生一起对不同目的多种重要农业、林业、仓储害虫的酚氧化酶学特性、抑制剂的筛选及不同抑制剂对不同来源酚氧化酶的抑制动力学等方面进行了探索,得出了许多有益的数据。在此基础上,借助华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室的研究平台开始了酚氧化酶高活性化合物的结构与生物活性相关性研究。为了获得更多的酚氧化酶抑制剂,山东农业大学化学与材料科学学院的姜林教授加入了我们的研究组,他与他的研究生为该项研究合成了大量新化合物,极大地丰富了我们的研究内容。

为了促进该研究领域的发展,与同行进行更广泛的交流,我们总结了近几年的研究成果,编著成此书,意图奉献给读者一本基础理论与研究论文并存的专著。本书分为两部分,第一部分为酚氧化酶研究概述,包括四章。第一章主要叙述了有关酚氧化酶及昆虫酚氧化酶的基本概况,为本书的其他章节进行了知识铺垫。第二章为昆虫酚氧化酶分离、纯化及活性测定技术。在这一章里,我们将最新的研究结果融入书中,即比较了紫外分光光度计与酶标仪微量两种方法测定昆虫酚氧化酶蛋白含量及活力的优劣,推荐了研究昆虫酚氧化酶科学、简捷、快速的方法。第三章为昆虫酚氧化酶抑制剂抑制动力学研究方法与技术,包括酶促反应的基础动力学、环境对酶活力的影响以及酶活力抑制动力学研究等。第四章为昆虫酚氧化酶抑制剂结构与活性关系,这是在我们的研究中深入展开的部分。第二部分为研究论文。我们分成不同的研究小组,分别对昆虫酚氧化酶的基本酶学特性进行了研究,并对一些抑制剂对不同来源酚氧化酶的抑制动力学进行了报道,择其重要者进行了结构与生物活性相关性研究,其中也研究了我们自己合成的若干化合物对酚氧化酶的活性。这些研究论文大部分已在国内外有关杂志发表。由于研究方向的侧重,论文发表的刊物比较分散,这在某种程度上限制了与同行的交流,借此机会把它们归纳起来,希望能起到抛砖引玉的作用,共同为发现杀虫剂新的靶标,为发展环境友好农药贡献力量。

在我们的研究过程中,意外发现了昆虫酚氧化酶在害虫控制理论研究中的另一方面意义,即昆虫酚氧化酶对害虫抗药性的形成可能做出了贡献,这在害虫抗

药性形成理论中是一个新发现。我们因此发表了“Does Phenoloxidase Contributed to the Resistance? Selection with Butane-fipronil Enhanced its Activities from Diamondback Moths”一文，并收录在本书中。

需要说明的是，研究论文部分完全是在参考很少文献的基础上进行写作，即在对不同昆虫酚氧化酶的特性完全不了解或对试验的化合物是否具有抑制活性完全无把握的情况下进行的探索，故经常选择不同的试虫作为研究对象，对同一种化合物进行考察，即出现了所谓的重复性工作。我们认为，在对不同昆虫的酚氧化酶分子结构并不清楚的情况下，这些工作仍具有独特的意义；另一方面，这样处理，未经过事后的修饰，把我们的研究思路及过程无保留地呈现在读者面前，对于学术上的交流，乃至展开讨论，无疑是大有裨益的。另外，对于用不同文字发表的论文同时收录并编入本书，意在进行一些论文写作方面的交流，这样安排，我们觉得对培养研究生有很多益处。

研究论文部分重点关注以昆虫酚氧化酶为杀虫剂新靶标以及一些抑制剂对该靶标酶的酶促动力学研究。通过对不同来源酚氧化酶的测定，发现黄酮类化合物槲皮素（又称栲皮酮）对该酶的单酚酶和二酚酶活力均有很强的抑制作用，为典型的竞争性抑制剂；该化合物只能与游离酶结合，而不能与酶-底物络合物结合；曲酸对酚氧化酶表现可逆抑制效应，为竞争性抑制类型；芹菜素对该酶表现可逆抑制效应，为非竞争性抑制类型；苯甲酸类化合物对酚氧化酶表现不同的抑制作用，其中，对羟基苯甲酸属于可逆反应的混合型抑制剂，5-甲氧基水杨酸属于可逆抑制效应的竞争性抑制剂；间苯二酚类化合物均为酚氧化酶的竞争性抑制剂，其中，4-己基间苯二酚对酚氧化酶活性的抑制能力极强。在本书中，以上研究结果都以研究论文的形式进行报告。

本书所涉及的研究内容，我们认为仍属于“冰山之一角”，譬如酚氧化酶源被氧化为酚氧化酶的过程，尚待理论阐述；有关不同目、科、属、种昆虫的酚氧化酶分子生物学特性，亦应该是深入了解的方向。

本书的编撰，是我们科研小组的老师和研究生共同智慧的结晶。从第五章的研究论文可以看出，各位研究生作出了较大贡献，为本书的出版奉献了每个人的聪明才智，其中高兴祥和王树栋还参加了本书第一章和第三章的编写。我和薛超彬博士只不过是负责一些组织和编辑的工作。

我们的研究工作，得到了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陈清西教授，华中师范大学化学学院农药与化学生物学教育部重点实验室杨光富教授等的大力支持，借此机会，谨代表本研究室的全体人员对他们的无私帮助表示衷心的感谢。

必须指出，我们编著这本书本是一种尝试，特别是将研究论文作为本书的

目 录

序一

序二

前言

第一部分 酚氧化酶研究概述

第一章 酚氧化酶及昆虫酚氧化酶概况	3
第一节 酚氧化酶概况	3
1.1.1 酚氧化酶的起源	3
1.1.2 酚氧化酶的组织定位	4
1.1.3 酚氧化酶的分子生物学研究	5
1.1.4 酚氧化酶活性中心结构	8
1.1.5 酚氧化酶的催化氧化	10
第二节 昆虫酚氧化酶	12
1.2.1 酚氧化酶在昆虫体内的存在及激活	12
1.2.2 酚氧化酶在昆虫体内的生理功能	13
1.2.3 酚氧化酶抑制剂的研究	15
1.2.4 酚氧化酶抑制剂在害虫控制领域的前景	16
参考文献	17
第二章 昆虫酚氧化酶分离纯化及活性测定技术	20
第一节 昆虫酚氧化酶分离纯化基本技术	20
2.1.1 绪言	20
2.1.2 酶源材料的制备与分离纯化一般步骤	20
2.1.3 凝胶层析法	21
2.1.4 离子交换层析法	24
2.1.5 亲和层析法	25
第二节 昆虫酚氧化酶的分离纯化、纯度鉴定及活性测定	26
2.2.1 绪言	26
2.2.2 菜青虫幼虫的酚氧化酶分离纯化步骤	27
2.2.3 麻蝇蛹酚氧化酶的分离纯化步骤	27
2.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定昆虫酚氧化酶纯度	28

2.2.5 昆虫酚氧化酶活力测定方法	30
参考文献	32
第三章 昆虫酚氧化酶抑制动力学研究方法与技术	33
第一节 酶促反应的基础动力学	33
3.1.1 米氏方程推导	33
3.1.2 米氏方程的意义	34
3.1.3 K_m 和 V_m 的求取	35
第二节 环境因素对酶活力的影响	36
3.2.1 温度与酶活力	36
3.2.2 pH 与酶活力	37
3.2.3 底物浓度对酶活力的影响	38
3.2.4 金属离子对酶活力的影响	38
3.2.5 有机溶剂对酶活力的影响	39
第三节 酶抑制动力学	39
3.3.1 可逆与不可逆抑制作用的区分	40
3.3.2 竞争性抑制作用	41
3.3.3 非竞争性抑制作用	43
3.3.4 反竞争性抑制作用	44
参考文献	45
第四章 昆虫酚氧化酶抑制剂结构与活性的关系	46
第一节 构效关系研究概述	46
4.1.1 二维定量构效关系方法	46
4.1.2 三维定量构效关系方法	49
4.1.3 2D-QSAR、3D-QSAR 与数据库相结合	55
第二节 材料与方法	56
4.2.1 供试化合物	56
4.2.2 2D-QSAR 法	56
4.2.3 3D-QSAR 法	59
第三节 酚氧化酶抑制剂 2D-QSAR	60
4.3.1 取代基效应对苯甲醛、苯甲酸或苯甲醛缩氨基硫脲及它们的衍生物 对酚氧化酶的抑制活性的影响	60
4.3.2 取代基效应对苯甲酸及其衍生物和苯甲醛缩氨基硫脲及其衍生物对菜青 虫酚氧化酶抑制活性的影响	64
4.3.3 取代基效应对苯甲醛及其衍生物和苯甲醛缩氨基硫脲及其衍生物对菜青 虫酚氧化酶的抑制活性的影响	65

第四节 酚氧化酶抑制剂 3D-QSAR	67
4.4.1 3D-QSAR 模型的建立	67
4.4.2 CoMFA 模型	71
4.4.3 CoMSIA 模型	72
参考文献	73

第二部分 研究论文

专题一 昆虫酚氧化酶基本特性研究	77
菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较	77
甜菜夜蛾多酚氧化酶特性及曲酸等抑制剂抑制作用研究	86
槐尺蠖多酚氧化酶的部分纯化及酶学特征	94
Enzymatic Properties of Phenoloxidase from <i>Pieris rapae</i> (Lipidoptera)	
Larvae	103
专题二 昆虫酚氧化酶抑制剂活性与抑制动力学研究	113
芹菜素等三种生物源化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用	113
几种苯甲酸类化合物对甜菜夜蛾多酚氧化酶活性的影响	120
Inhibitory Effects of Kojic Acid on Phenoloxidase of Diamondback Moth	
<i>Plutella xylostella</i>	128
Inhibitory Effects of 4-Dodecylresorcinol on the Phenoloxidase of the	
Diamondback Moth <i>Plutella xylostella</i> (L.) (Lepidoptera Plutel-	
lidae)	139
Inhibitory Effects of Apigenin on Phenoloxidase of Diamondback Moth,	
<i>Plutella xylostella</i> (Lepidoptera Plutellidae)	150
栝皮酮对甜菜夜蛾酚氧化酶抑制作用研究	162
铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用	171
5,7,4'-三羟基黄酮等生物源化合物对菜青虫幼虫生长发育的影响	180
Inhibition Kinetics of Cabbage Butterfly (<i>Pieris rapae</i> L.) Larvae Phe-	
noloxidase Activity by 3-Hydroxy-4-Methoxybenzaldehyde Thiosemic-	
arbazone	188
Inhibitory Effects of Schiff Analogs of Salicylidene Aniline on Pheno-	
loxidase from <i>Pieris rapae</i> L. (Lepidoptera; Pieridae)	205
2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制作用	218
Inhibitory Effects of 2-Hydroxybenzaldehyde on the Activity of Phenolo-	
xidase from <i>Pieris rapae</i> (Lipidoptera) Larvae	230

专题三 昆虫酚氧化酶抑制剂结构与活性关系研究	246
3D-QSAR and Molecular Docking Studies of Benzaldehyde Thiosemicarbazone, Benzaldehyde, Benzoic Acid, and Their Derivatives as Phenoloxidase Inhibitors	246
Quantitative Structure-Activity Relationship Studies of Mushroom Tyrosinase Inhibitors	264
2D-QSAR Studies of Benzaldehyde, Benzoic acid, Benzaldehyde Thiosemicarbazone, and their Derivatives as Insect Phenoloxidase Inhibitors	281
专题四 昆虫酚氧化酶与害虫免疫及抗药性的关系研究	293
槲皮素对黄粉虫血淋巴酚氧化酶的生理效应	293
Does Phenoloxidase Contributed to the Resistance? Selection with Butanefipronil Enhanced its Activities from Diamondback Moths	303
专题五 昆虫酚氧化酶部分抑制剂的合成研究	315
取代水杨醛席夫碱的合成及其对昆虫酚氧化酶的抑制活性	315
取代苯甲醛缩氨基硫脲的合成及其对昆虫酚氧化酶的抑制活性	321
α -巯基- β -取代苯基丙烯酸的合成及其对昆虫酚氧化酶的抑制活性	327

第一部分 酚氧化酶研究概述

第一章 酚氧化酶及昆虫酚氧化酶概况

酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) (EC. 1. 14. 18. 1), 又称为酪氨酸羟化酶 (tyrosinehydroxylase) 或酪氨酸酶 (tyrosinase), 广泛存在于动物、植物和微生物中, 位于黑素细胞中的黑素体内, 绝大部分与黑素体膜相结合, 只有极少部分以游离状态存在。不同来源的 PO, 其生物化学特性具有一定的差异, 并且在同种生物的不同器官中也具有不同的特征。在高等植物中, 酚氧化酶通过催化形成黑色素痂痂, 防止昆虫和微生物的攻击。在脊椎动物中, 酚氧化酶催化产生的黑色素可进入表皮和毛发的角质细胞中, 使体表着色。哺乳动物合成的黑色素可以保护皮肤和眼睛, 抵御紫外线的辐射, 防止内部组织过热等。

酚氧化酶具有独特的双重催化功能, 是生物体内黑色素合成的关键酶, 与昆虫的发育、伤口愈合和果蔬的褐变有密切关系。因此多年来, 酚氧化酶一直受到学术界的关注, 其研究涉及生物、医学、农学、化学、药学等多个学科和领域。目前已有上百种酚氧化酶的研究报道, 来源于 20 多种生物的酚氧化酶已被测序, 近几年来, 对该酶的研究愈加深入, 已有来自于链霉菌的酚氧化酶晶体结构的报道。另外, 酚氧化酶在酶学研究历史上有重要意义: 它是第一个用亲和色谱纯化的酶; 是最早发现能将酶分子内部氧原子掺入到有机物中的酶; 早期提供酶自杀性失活的实例也是酚氧化酶。

第一节 酚氧化酶概况

1. 1. 1 酚氧化酶的起源

虽然酚氧化酶和血蓝蛋白 (hemocyanin, HC) 都是含铜的蛋白质, 但血蓝蛋白的功能是作为氧的载体而不是催化氧化还原反应。在节肢动物的甲壳类、螯肢动物和多足类三个纲中, 血蓝蛋白以细胞外寡聚体的形式存在, 与软体动物血蓝蛋白的结构不同, 但功能相似。节肢动物血蓝蛋白第一个铜结合位点 (Cu^{A}) 和第二个铜结合位点 (Cu^{B}) 非常相似, 即 Cu^{A} 区的氨基酸序列与 Cu^{B} 区类似。软体动物血蓝蛋白只有在 Cu^{B} 区显示与节肢动物血蓝蛋白的高度相似性。节肢动物的酚氧化酶含有节肢动物血蓝蛋白 Cu^{A} 和 Cu^{B} 的响应位点, 并且序列相似, 似乎是同源的蛋白质。但是相比之下, 酚氧化酶与软体动物血蓝蛋白的同源关系更为密切, 软体动物血蓝蛋白的 Cu^{A} 区和 Cu^{B} 区分别与酚氧化酶 Cu^{A} 区和 Cu^{B} 区的氨基酸序列相似, 并且在每一个铜结合位点, 除了三个组氨酸外, 还有几个

氨基酸也是保守的,这进一步证明了软体动物血蓝蛋白和酚氧化酶之间存在密切的同源关系。

昆虫在进化过程中形成了复杂的气管系统,该系统可以直接把空气中的氧气运输到各个组织,这或许是昆虫血淋巴中的血蓝蛋白在进化中消失的原因。虽然昆虫缺乏功能性血蓝蛋白,但含有一种血淋巴蛋白(hexamerin),其四级结构与六聚体的血蓝蛋白相似,因其在昆虫幼体时期浓度很高而在变态或成虫时期形成新的身体结构(如角质),因此也有人把它称作幼体血清蛋白或存储蛋白。尽管这种血淋巴蛋白缺乏双铜核结合位点,但该蛋白与血蓝蛋白序列、亚基的大小、六聚体的形状有一定的相似性,人们推测含铜的血蓝蛋白和无铜的血淋巴蛋白有一个共同的祖先。

对已经克隆的节肢动物酚氧化酶进行分子生物学研究,结果表明:酚氧化酶与节肢动物血蓝蛋白 Cu^B 序列具有同源性,而其第一个铜结合位点(Cu^A)则与节肢动物血蓝蛋白的 Cu^A 序列不同;软体动物血蓝蛋白与节肢动物的酚氧化酶不同,其第一个铜结合位点(Cu^A)与酚氧化酶(包括细菌、真菌以及脊椎动物的酚氧化酶)的 Cu^A 序列非常相似,但与 Cu^B 序列不同,因此, Lerch 和 Germann 设想存在一个含有铜结合位点的祖先单核铜结合蛋白,该位点对应于酚氧化酶基因家族成员的第二个铜结合位点(Cu^B);对于节肢动物的血蓝蛋白,通过该位点的复制可产生双核的铜结合蛋白;对于软体动物的血蓝蛋白和酚氧化酶,则发生基因融合,即在祖先蛋白的基因上增加了特殊的第一个铜结合位点基因(Cu^A)。Van Hold 在此假设的基础上进一步指出,细菌和真菌的酚氧化酶在含有 Cu^A 和 Cu^B 结合位点的基因家族中可能是原始的,脊椎动物的酚氧化酶和软体动物的血蓝蛋白是上述原始基因的分支;在软体动物中,原始基因通过复制形成现存的多聚体血蓝蛋白;脊椎动物通过原始基因的复制形成酚氧化酶基因家族的各种成员。Fujimoto 等根据已知的酚氧化酶原 [pre- (或 pro-) phenoloxidase, proPO]、血蓝蛋白和酚氧化酶的序列,利用邻近-连接法构建了显示此三者之间进化关系的系统发育树,在此基础上指出:脊椎动物的酚氧化酶和软体动物的血蓝蛋白构成一个基因家族,而 proPO 与节肢动物血蓝蛋白构成另一个家族,节肢动物的 proPO 与节肢动物的血蓝蛋白很可能起源于一个共同的祖先蛋白,且独立于脊椎动物和微生物的酚氧化酶。

1.1.2 酚氧化酶的组织定位

以多巴和多巴胺为底物孵育物质来显示酚氧化酶是研究脊椎动物黑色素形成的标准细胞化学技术,这种技术也可用于无脊椎动物中。因为节肢动物的血淋巴既有体液免疫成分也有细胞免疫成分,因此许多学者对 proPO 在血淋巴中的定位进行了研究。Coles 从贻贝 (*Mytilus edulis*) 的血淋巴中分离出血细胞,并用