

贻贝足丝固化过程酶作用的初步探讨*

许实荣 梁熙亮 姜康后

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 从贻贝斧足肌中提取了多酚氧化酶和芳基硫酸酯酶, 前者能作用于邻苯二酚和邻苯三酚, 但不作用于对苯二酚; 后者能作用于底物硝基邻苯二酚硫酸酯 (P-Nitrocatechol Sulphate)。应用硫脲和 NaHSO_3 及 KH_2PO_4 和 Na_2SO_3 , 均能抑制幼贝和成贝分泌足丝进行附着, 抑制浓度分别是 10—15mmol 硫脲, 2—4% NaHSO_3 ; 1—5mmol KH_2PO_4 , 1—3mmol Na_2SO_3 , 这种抑制作用是可逆的。本实验结果进一步证明贻贝足丝的形成过程是足丝酚蛋白的单宁化过程, 同多酚氧化酶和芳基硫酸酯酶的作用有关。

1972年, Shimony 和 Nigrelli 第一次报告在蔓足类藤壶 (*Balanus eburneus*) 中提取了芳基硫酸酯酶。并认为芳基硫酸酯酶的活性与硫酸化粘多糖和酯蛋白的形成有密切联系, 这个过程可能涉及外骨骼和藤壶胶的固化。同时证明芳基硫酸酯酶受 KH_2PO_4 和 Na_2SO_3 抑制, 但不受氰化物抑制^[10]。

对贻贝足丝固化机理研究, 仅报道过在贻贝斧足足丝腺的紫腺中曾发现存在多酚氧化酶, 并认为贻贝足丝部分可能是由一种单宁化的醌蛋白 (Quinone tanned protein) 所构成^[2]。关于贻贝斧足中的芳基硫酸酯酶尚未见报道。为此, 我们对贻贝足丝固化过程酶的作用进行了初步探讨, 这对贻贝养殖育苗条件及防除贻贝在管道附着都有实际意义。

一、材料与方 法

贻贝: 新鲜的活贻贝, 采集的当天养于池中, 供实验用。

多酚氧化酶的提取: 取新鲜活贻贝剖开剪下斧足肌, 放于冰浴中。组织称重后用4倍重量的冷重蒸水提取, 在高速捣碎机中匀浆2分钟, 然后在冷冻离心机 (2500 r/min) 离心30分钟 (0℃), 去沉淀。上清液做酶活力测定。

多酚氧化酶活力测定: 参考林哲甫等^[11]和 Ponting^[6]的方法。反应在室温 (20℃左右) 进行, 2ml 柠檬酸- H_3PO_4 缓冲液 (pH6.8), 加2ml 底物 (1%), 最后加入1ml 酶液。混合后立即倒入比色杯, 并在不同的时间读440m μ 光密度的变化。对照样品是将酶液煮沸5分钟代替新鲜酶液。

芳基硫酸酯酶的提取: 参考 Roy 的方法^[8]并略有改进。因为芳基硫酸酯酶A和B存在于线粒体中, 我们采用了制备丙酮粉以破坏线粒体脂膜的方法。取新鲜贻贝剥取斧足, 用5倍体积冷丙酮 (0℃), 在冰库中用高速捣碎机匀浆2分钟, 然后把匀浆抽滤, 并用冷丙酮和冷乙醚洗, 吸滤干后, 滤饼粉碎通过 P_2O_5 真空干燥。酶溶液的制备是将3g 丙酮粉用

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1470号。

收稿日期: 1986年3月13日。

20ml 重蒸水在 37℃ 提取 1 小时。然后在 2000r/min 离心(或用多层纱布过滤), 除去残渣。上清液再进行离心 (1000r/min) 30 分钟, 清液用于测酶活力。

芳基硫酸酯酶底物制备: 芳基硫酸酯酶底物——硝基邻苯二酚硫酸酯 (NCS: P-Nitrocatechol sulphate) 的制备, 参考 Roy^[8] 和 Smith^[9] 的方法。所制备产物用少量蒸馏水重结晶几次, 真空干燥保存。

芳基硫酸酯酶活力测定: 按 Roy^[8] 方法略有改变。底物 (NCS2%) 0.8ml 加 0.4ml pH5.0 醋酸缓冲液, 最后加 0.8ml 酶液。混合后按不同时间加 4ml 三氯醋酸停止反应, 反应液过滤后取出清液 3ml 并加 5ml 靛醇试剂 (quinol), 然后在 500m μ 读光密度。反应温度为 37℃。空白对照是将酶液煮沸 5 分钟代替新鲜酶液。

蛋白浓度: 用双缩脲方法在 540m μ 测定。

蛋白浓度标准曲线: 用牛血清白蛋白制作。

二、结 果

1. 贻贝斧足中多酚氧化酶的活力测定

我们从贻贝斧足中提取了多酚氧化酶, 并发现此酶能作用于邻苯三酚和邻苯二酚(图 1), 但不作用于对苯二酚。

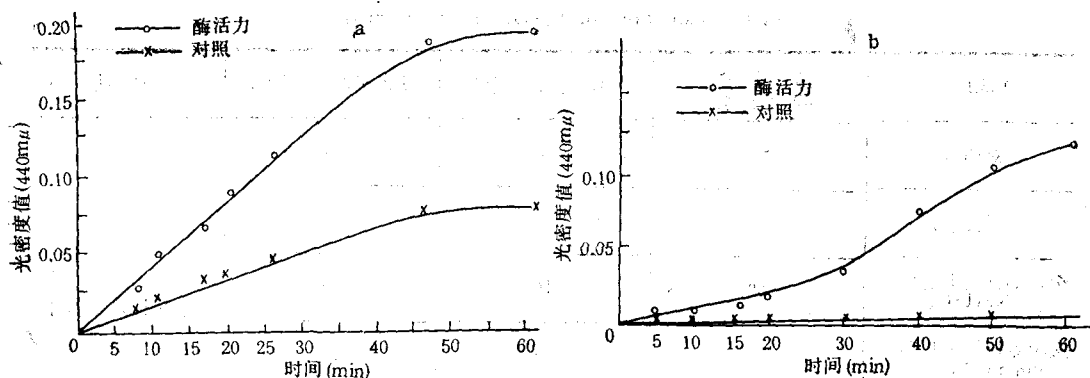


图 1 贻贝多酚氧化酶活力测定

Fig. 1 Measurement of Polyphenol Oxidase activity in mussel

a. 底物为 1% 邻苯三酚; b. 底物为 1% 邻苯二酚。

温度 20℃, pH = 6.8, 酶浓度为 0.3mg 蛋白/ml。

2. 贻贝斧足中芳基硫酸酯酶的活力测定

在脊椎动物、无脊椎动物的组织和器官中的芳基硫酸酯酶都有报道^[3-5,7,11]。从脊椎动物中提取的芳基硫酸酯酶, 由于其对底物的专一性、对抑制剂的不同反应及其在细胞内分布的不同可以分为芳基硫酸酯酶 A, B 和 C 三种。

芳基硫酸酯酶 A 和 B 也称“可溶性”硫酸酯酶, 性质相似, 主要在线粒体中发现, 破坏线粒体以后很容易以一种可溶性的形式得到。而芳基硫酸酯酶 C 只限于在微粒体上, 被称为“不溶性”芳基硫酸酯酶。

我们从贻贝斧足中提取了芳基硫酸酯酶, 并进行酶活力测定, 证明能作用于底物硝基

邻苯二酚硫酸酯,这类类似于脊椎动物芳基硫酸酯酶 A, B (图 2)。

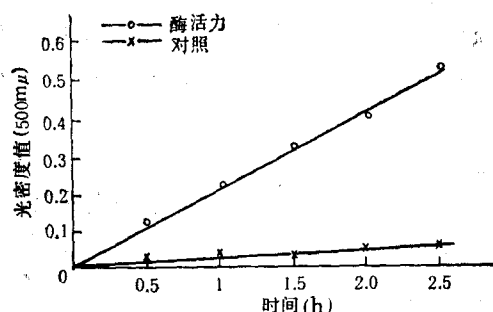


图 2 贻贝芳基硫酸酯酶活力测定

Fig. 2 Measurement of aryl sulphatase activity in mussel

底物为 2% NCS, 温度为 37°C, pH = 5.0,
酶浓度为 1mg 蛋白/ml。

3. 多酚氧化酶与芳基硫酸酯酶的抑制剂对贻贝附着的影响

应用多酚氧化酶的抑制剂——硫脲、 NaHSO_3 和芳基硫酸酯酶的抑制剂—— Na_2SO_3 , KH_2PO_4 对贻贝幼贝和成贝进行生物实验, 观察其生物效应。发现以上 4 种抑制剂对贻贝的分泌足丝附着均有影响。这种影响作用是可逆的, 当把经过抑制剂处理的贻贝重新放入新鲜海水时, 又能分泌足丝进行附着。

(1) 贻贝幼贝附着实验: 选取壳长为 2—3mm 的幼贝分别移入手术皿, 在室温 18°C 进行实验, 并在解剖镜下检查结果(表 1)。

表 1 多酚氧化酶和芳基硫酸酯酶抑制剂对贻贝幼贝附着的影响

Tab. 1 Effect of the inhibitors of Polyphenol Oxidase and aryl sulphatase on the hardening of byssus of young mussel

实验项目	幼贝数(个) 20ml(海水)	幼贝附着数(个)	幼贝不附着数(个)	说 明
对照(1)	57	56	1	幼贝移入 4 小时后检查
对照(2)	43	42	1	
多酚氧化酶抑制剂, 3‰ NaHSO_3	69	16	53	
多酚氧化酶抑制剂, 40mmol 硫脲	49	23	26	
芳基硫酸酯酶抑制剂, 5mmol KH_2PO_4	70	18	52	
芳基硫酸酯酶抑制剂, 5mmol Na_2SO_3	66	20	46	

以上经过抑制剂处理的幼贝重新换新鲜海水, 经过 19 小时后再进行检查附着结果(表 2)。

(2) 贻贝成贝附着实验: 共做了三批, 酶抑制剂浓度为: 2—4‰ NaHSO_3 、10—15mmol 硫脲、1—5mmol KH_2PO_4 、1—3mmol Na_2SO_3 。由于每批生物材料不同, 不便加以比较。但各批实验组与对照组比较结果都较明显, 而且每批进行两次以上的重复实验(即加抑制剂再换海水), 都证明抑制剂对成贝附着作用的影响具可逆性。从 1979 年至 1980 年共做了 7 次实验, 最后一次的结果描述如下:

选取壳长 4—5cm 大小的贻贝, 分别在 3000ml 的海水中, 在室温 11°C 进行实验。结

表 2 经酶抑制剂处理后的幼贝在新换海水中的附着情况

Tab. 2 After the treatment of inhibitor, the hardening of the byssus of young mussel in newly replaced seawater

实验项目	幼贝数(个) 20ml(海水)	幼贝附着数(个)	幼贝不附着数(个)	说 明
对照(1)	57	55	2	换海水 19 小时后 检查
对照(2)	40	40	0	
经 3%NaHSO ₃ 处理 后换海水	60	55	5	
经 40mmol 硫脲处理 后换海水	49	48	1	
经 5mmol KH ₂ PO ₄ 处 理后换海水	65	62	3	
经 5mmol Na ₂ SO ₃ 处 理后换海水	60	57	3	

表 3 多酚氧化酶和芳基硫酸酯酶抑制剂对贻贝成贝附着影响

Tab. 3 Effect of the inhibitors of Polyphenol Oxidase and aryl sulphatase on the hardening of byssus of adult mussel

实验项目	贻贝数(个) 3000ml(海水)	附着数(个)	不附着数(个)	说 明
对照(1)	15	15	0	经 16 小时检查
对照(2)	15	15	0	
多酚氧化酶抑制剂, 4% NaHSO ₃	15	1	14	
15 mmol 硫脲	15	12	3	
芳基硫酸酯酶抑制剂, 4mmol KH ₂ PO ₄	15	4	11	
3mmol Na ₂ SO ₃	15	5	10	
4%NaHSO ₃ , 4mmol KH ₂ PO ₄ (混合)	15	0	15	
15mmol 硫脲, 5mmol Na ₂ SO ₃ (混合)	15	2	13	

注: 我们还做了在两组已经附着的贻贝中分别加入酶抑制剂的实验: 一组加 4% NaHSO₃, 4mmol KH₂PO₄; 另一组加 15mmol 硫脲, 5 mmol Na₂SO₃ 混合。结果并不影响贻贝附着, 也没发现溶断足丝。

果见表 3。

以上各组重新换海水后, 贻贝又能重新附着, 结果如表 4。

4. 酶抑制剂类似物对贻贝附着的影响

为了进一步说明以上抑制剂的专一性, 我们又选用了几种与上述酶抑制剂结构相似的化学物质: K₂HPO₄, K₂SO₄, NaHCO₃ 和 (NH₄)₂SO₄ 并用相同的浓度对贻贝附着进行比较实验, 结果除 (NH₄)₂SO₄ 外, 其余几种对贻贝附着均无影响, 结果见表 5。

表 4 经抑制剂处理后的成贝在新换海水中的附着情况

Tab. 4 After the treatment of inhibitor, the hardening of the byssus of adult mussel in newly replaced seawater

实验项目	贻贝数(个) 3000(海水)	附着数(个)	不附着数(个)	说 明
对照(1)	15	15	0	换海水后经 24 小时 检查
对照(2)	15	15	0	
4mmol KH_2PO_4	15	15	0	
4‰ NaHSO_3	15	15	0	
15mmol 硫脲	15	15	0	
3mmol Na_2SO_3	15	15	0	
4‰ NaHSO_3 + 4mmol KH_2PO_4	15	13	2	
15mmol 硫脲 + 5mmol Na_2SO_3	15	15	0	

表 5 酶抑制剂类似物对贻贝成贝附着影响

Tab. 5 Effect of the analogous inhibitor on the hardening of byssus of mussel

实验项目	贻贝数(个) 3000ml (海水)	附着数(个)	不附着数(个)	说 明
对照	15	15	0	经 24 小时后检查
4mmol K_2HPO_4	15	15	0	经 24 小时后检查(海水中发现有凝胶状的沉淀产生)
3mmol K_2SO_4	15	15	0	经 24 小时后检查
4‰ NaHCO_3	15	15	0	经 24 小时后检查
3mmol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15	0	15	闭壳, 经换海水 24 小时后有 6 个附着; 经 48 小时有 13 个附着; 经 72 小时则 15 个全附着

三、讨 论

1. 从贻贝斧足提取多酚氧化酶, 能作用邻苯三酚和邻苯二酚, 与香蕉多酚氧化酶相似。从图 1a 可见邻苯三酚产生自动氧化。图 1b 所示的酶在 30 分钟前活力偏低, 可能由于试验溶液从冰箱取出后(5—10℃)混合温度偏低所致。

2. 我们用制备丙酮粉方法, 从贻贝斧足提取了芳基硫酸酯酶, 能作用底物 NCS, 类似于脊椎动物芳基硫酸酯酶 A 和 B。

3. 多酚氧化酶抑制剂——10—15 mmol 硫脲, 2—4‰ NaHSO_3 ; 芳基硫酸酯酶抑制剂——1—5 mmol KH_2PO_4 , 1—3mmol Na_2SO_3 均能影响贻贝进行附着, 这种影响是可逆的。从实验初步结果来看, 从酶抑制剂寻找防除贻贝附着的新方案, 即探索既不污染

海洋环境又高效防除附着生物, 提供了可能性。

4. KH_2PO_4 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 均能影响贻贝附着, 而 KH_2PO_4 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是单细胞饵料的营养物质, 在贻贝人工育苗中, 施肥时要防止过量, 以防氨态氮和 PO_4^{3-} 在育苗池中大量贮集, 以免影响贻贝附着变态。同时应加大换水量、采用生物过滤法除去多余氨态氮和 PO_4^{3-} 等, 才能保证贻贝良好的附苗条件。

5. 3mmol K_2SO_4 对贻贝附着没影响, 而 Nigrelli (1972) 用 5mmol MgSO_4 对离体酶试验有抑制作用, 但 NiSO_4 (5mmol) 却对酶有激活作用, 这可能是 SO_4^{2-} 对贻贝附着没有影响之故。从本实验结果证明: 贻贝足丝的形成过程是足丝酚蛋白的单宁化过程, 同多酚氧化酶和芳基硫酸酯酶的作用有关。

参 考 文 献

- [1] 林哲甫, 1965. 香蕉果肉组织的多酚氧化酶. 植物生理学报 2(2): 94.
- [2] Brown, C. H., 1957. Structural Materials in Animals. London, Pitman Publishing, pp. 187.
- [3] Dodgson, K. S. and B. Spencer, 1952. Purification of the arylsulphatase of *pattella vulgata*. *Biochem. J.* 51: 43—44.
- [4] Dodgson, K. S. and B. Spencer, 1957. Assay of Sulphatases. *Meth. Bioch. Anal.* 4: 211—255.
- [5] Hirschman, A., 1969. Soluble sulfatase in growing bone of rats. *Science* 164: 834—835.
- [6] Ponting, J. D. and M. A. Joslyn, 1948. Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extracts. *Arch. Biochem. Biophys.* 19: 47—63.
- [7] Roy, A. B., 1955. The Sulphatase of ox liver. *Biochem. J.* 59: 8—12.
- [8] Roy, A. B., 1956. The Sulphatase of ox liver. *Biochem. J.* 64: 651—657.
- [9] Smith, J. N., 1951. Some Sulphate Esters of Nitroquinol and 4-Nitrocatechol. *J. Chem. Soc.* 4: 2861—2863.
- [10] Shimony, T. and R. F. Nigrelli, 1972. Arylsulphatases in *B. eburneus*. *Mar. Biol.* 14(4): 349—358.
- [11] Walker, G., 1971. A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle, *Balanus balanoides*. *Mar. Biol.* 9: 205—212.

THE ACTION OF POLYPHENOL OXIDASE AND
ARYLSULPHATASES ON THE PROCESS OF
BYSSUS HARDENING IN THE MUSSEL
MYTILUS EDULIS LINNAEUS*

Xu Shirong, Liang Xiliang and Lou Kanghou

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Polyphenol oxidase and arylsulphatase were obtained from the foots of the mussel *Mytilus edulis* Linnaeus. Its catalysis appears similar to that from banana; arylsulphatases from the *Mytilus edulis* Linnaeus act upon p-nitrocatechol sulphate. Its catalysis appears similar to that from the vertebrate tissue.

Byssus hardening of the *Mytilus edulis* Linnaeus was inhibited by inhibitors of polyphenol oxidase and arylsulphatase. The concentration of inhibitors was 10—15 mmol thiourea, 2—4% NaHSO₃, 1—5 mmol KHPO₄, 1—3 mmol NaSO₃, respectively.

These inhibitors are CS(NH₂)₂, NaHSO₃ and Na₂SO₃, KH₂PO₄. Their inhibitions are reversible. In other words, when inhibitor is removed from sea water, byssus hardening of the Mussel is restored.

However substances that are structurally analogous to the inhibitors, such as K₂HPO₄, K₂SO₄, NaHCO₃ cannot affect the byssus hardening of the Mussel.

* Contribution No. 1470 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.