

文章编号: 1004 - 7271(2007)03 - 0236 - 06

## 中华绒螯蟹血淋巴中酚氧化酶的部分生化特性

陆宏达<sup>1</sup>, 刘凯<sup>1</sup>, 张明辉<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 上海市水产研究所, 上海 200433)

**摘要:**对中华绒螯蟹血淋巴的血清、血浆和血细胞裂解上清液(HLS)中酚氧化酶(PO)的活力以及该酶最适pH和温度进行了测定分析,结果表明在血清和HLS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;以L-Dopa为底物,中华绒螯蟹PO活力的最适pH值为6.5,最适温度为40℃。采用SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>以及SDS与Ca<sup>2+</sup>联合和SDS与Mg<sup>2+</sup>联合分别对酚氧化酶原(proPO)进行激活试验,血清和HLS中的PO活力都有显著的增加,其中SDS的激活作用最强,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的激活作用最弱,SDS与Ca<sup>2+</sup>联合和SDS与Mg<sup>2+</sup>联合的混合激活作用介于SDS和Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>之间,激活试验表明中华绒螯蟹的PO主要以酚氧化酶原(proPO)形式存在于血细胞中。

**关键词:**中华绒螯蟹;酚氧化酶;生化特性

中图分类号:S 917 文献标识码:A

## The partial biochemical characteristics of phenoloxidase in *Eriocheir sinensis* hemolymph

LU Hong-da<sup>1</sup>, LIU Kai<sup>1</sup>, ZHANG Ming-hui<sup>2</sup>

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** By the analysis of phenoloxidase (PO) activity in *Eriocheir sinensis* serum, plasma and hemocyte lysate supernatant (HLS) and pH, temperature effects on PO activity, the results show that there is PO activity in the serum and HLS and no PO activity in the plasma, PO in the serum is originally from hemocytes; Using L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as substrate, the highest PO activity is under the conditions of pH 6.5 and 40 °C. When SDS, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, SDS plus Ca<sup>2+</sup> and SDS plus Mg<sup>2+</sup> are respectively used as prophenoloxidase (proPO) activators, PO activity in the serum and HLS significantly increases. Among the activators, SDS shows the highest proPO activation, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> show the lowest proPO activation, the proPO activation of SDS plus Ca<sup>2+</sup> and SDS plus Mg<sup>2+</sup> is lower than SDS and higher than Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. the activating experiments indicate that PO exists in the hemocytes in the inactive proPO style.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; phenoloxidase; biochemical characteristics

收稿日期: 2006-07-30

基金项目: 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 陆宏达(1960-),男,江苏启东人,教授,主要从事水产动物病害方面的研究。Tel: 021-65710526; E-mail: hdlu@shfu.edu.cn

昆虫、甲壳类等节肢动物不具有特异性免疫功能,免疫防御是通过非特异性免疫功能发挥作用,酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)是节肢动物十分重要的非特异性血淋巴免疫因子之一,具有调理促进血细胞吞噬、包囊、结节形成、黑化、介导凝集和凝固、产生杀菌物质以及伤口的愈合等作用<sup>[1-4]</sup>。大多数节肢动物的 PO 以非激活状态的酚氧化酶原(Prophenoloxidase, proPO)形式存在于血淋巴中<sup>[5]</sup>,不同节肢动物中的 PO 活力、proPO 存在量以及分布位置有较大差异。在水生经济甲壳类中,对酚氧化酶系统方面的研究已有报道的主要有中国对虾<sup>[6]</sup>、龙虾<sup>[7]</sup>、日本沼虾<sup>[8]</sup>、白对虾<sup>[9]</sup>、加州对虾(*Penaeus californiensis*)<sup>[10]</sup>等,而中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)作为我国特有的重要淡水养殖经济甲壳动物,有关其 PO 方面的研究尚未见报道。本文通过对中华绒螯蟹血清、血浆以及血细胞裂解上清液(Haemocyte lysate supernatant, HLS)中 PO 活力及其影响因素和刺激物的作用等方面进行分析研究,探讨中华绒螯蟹血淋巴中该酶的存在、存在位置、存在形式以及其部分生化特性,不仅可丰富中华绒螯蟹的基础免疫学,而且可为中华绒螯蟹的免疫防病提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物和抗凝剂

中华绒螯蟹购于上海市水产市场,健康,体重 60~80 g,置于大小为 80 cm×75 cm×60 cm、水深为 45 cm 的水族箱中暂养 1 周,充气,每日投饵,隔日吸污。

血淋巴抗凝剂采用 1.67 倍抗凝剂<sup>[11]</sup>,其成分为:0.23 mol/L NaCl、0.17 mol/L 葡萄糖、50.00 mmol/L 柠檬酸钠、43.33 mmol/L 柠檬酸、16.67 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>、pH 6.5。

### 1.2 血清、血浆和 HLS 的制备以及 PO 活力的测定

#### 1.2.1 血清的制备

昆虫、甲壳类等节肢动物由于绝大多数种类个体小,血淋巴以及血清量少,而实验用量大,大多研究以多只动物血淋巴或血清混合后作为研究对象,本研究采用相同的方法进行。取 10 只暂养的中华绒螯蟹,分别用洁净的 16 号针头插入其第三或第四步足基部软膜处收集血淋巴于 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中,4℃ 静置过夜,低温离心(10 000 r/min, 20 min),小心吸取血清混合于 10 mL 离心管中,4℃ 保存备用。

#### 1.2.2 血浆与 HLS 的制备

取 10 只暂养的中华绒螯蟹,分别用装有预冷抗凝剂的 5 mL 注射器从其第三或第四步足基部软膜处抽取血淋巴混合,抗凝剂与血淋巴体积比为 2:5,在低温 3 000 r/min 离心 10 min,上清液为血浆;HLS 的制备参考 Ashida<sup>[12]</sup>的方法略作改进,将混合沉淀的血细胞中加入预冷的 0.1 mol/L 柠檬酸钠、0.1 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub>、0.25 mol/L 蔗糖、0.01 mol/L 二甲砷酸钠、pH 6.8 的缓冲液(Buffer1),4 000 r/min 低温离心 10 min,弃上清液;沉淀再加入预冷的 0.25 mol/L 蔗糖、5 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>、0.01 mol/L 二甲砷酸钠、pH 6.8 的缓冲液(Buffer2),4 000 r/min 低温离心 10 min,洗涤两次,弃上清液;按 1:1 的比例加入预冷的 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1.5 mol/L NaCl、0.01 mol/L 二甲砷酸钠、pH 6.8 的缓冲液(Buffer3)重悬浮,-20℃ 反复冻融破碎 10 次,7 000 r/min 低温离心 10 min,上清液为 HLS。

#### 1.2.3 PO 活力的测定

PO 活力的测定参照 Ashida<sup>[13]</sup>的方法略作改进。以 L-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)为底物,将 2.8 mL 的 0.1 mol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)与 0.1 mL 的 0.01 mol/L 的 L-DOPA 混匀,30℃ 保温 2 min 后,分别加入 0.1 mL 待测的血清、血浆(扣除抗凝剂后实际血浆量)和 HLS(扣除悬浮液 Buffer3 后实际 HLS 量)样品,混匀,迅速倒入比色皿。在 490 nm 下分别测定起始时的吸光率 O. D. 值和 30 min 时的吸光率 O. D. 值,在 30 min 内以平均每分钟 O. D. 值增加 0.001 作为一个酶活力单位(U)(以下简称:在 490 nm 下测定 PO 活力单位)。

### 1.3 抗凝剂、pH、温度对血清 PO 活力的影响

#### 1.3.1 抗凝剂对血清 PO 活力的影响

按体积比为 2:5 的比例,即在 0.1 mL 血清中加入 0.04 mL 抗凝剂作为待测样品,对照组按相同比例加入双蒸水,再分别加入 2.76 mL 的 0.1 mol/L pH 6.5 的 PBS,混匀,30 °C 保温 2 min,然后分别加入 0.1 mL 的 0.01 mol/L 的 L-Dopa,混匀,迅速倒入比色皿。在 490 nm 下测定 PO 活力单位。

#### 1.3.2 pH 对血清 PO 活力的影响

在 2.8 mL 不同 pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)的 0.1 mol/L PBS 中分别加入 0.1 mL 血清样品,混匀,30 °C 保温 2 min,然后加入 0.1 mL 的 0.01 mol/L 的 L-Dopa,混匀,迅速倒入比色皿。在 490 nm 下测定 PO 活力单位。

#### 1.3.3 温度对血清 PO 活力的影响

取 9 支试管,各加入 0.1 mL 血清,分别在 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C 水浴保温 5 min,然后冷却至 30 °C,各管再分别加入 2.8 mL 0.1 mol/L pH 6.5 的 PBS,混匀,30 °C 保温 2 min 后,加入 0.1 mL 的 0.01 mol/L 的 L-Dopa,混匀,迅速倒入比色皿。在 490 nm 下测定 PO 活力单位。

### 1.4 SDS 和金属离子对血清、血浆和 HLS 中的 proPO 激活作用

#### 1.4.1 血清中的 proPO 激活作用

proPO 激活作用参考 Ashida<sup>[12]</sup>的方法略作改进。

SDS 对 proPO 激活作用:取 0.1 mL 血清,0.055 mL 0.01 mol/L 二甲砷酸钠 pH 6.8 的缓冲液(Buffer4),0.020 mL 1% SDS 溶液,0.025 mL 双蒸水,混匀,30 °C 保温 2min,然后加入 2.7 mL pH 6.5 的 PBS,0.1 mL 0.01 mol/L 的 L-Dopa,混匀,迅速倒入比色皿。在 490 nm 下测定 PO 活力单位。对照组用相同量的双蒸水代替刺激物。

Ca<sup>2+</sup> 对 proPO 激活作用:取 0.1 mL 血清,0.055 mL Buffer4,0.025 mL 0.2 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,0.020 mL 双蒸水,混匀,后处理以及测定方法与 SDS 相同。

Mg<sup>2+</sup> 对 proPO 激活作用:取 0.1 mL 血清,0.055 mL Buffer4,0.025 mL 0.2 mol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液,0.020 mL 双蒸水,混匀,后处理以及测定方法与 SDS 相同。

SDS 与 Ca<sup>2+</sup> 对 proPO 激活作用:取 0.1 mL 血清,0.055 mL Buffer4,0.020 mL 1% SDS 溶液,0.025 mL 0.2 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,混匀,后处理以及测定方法与 SDS 相同。

SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 对 proPO 激活作用:取 0.1 mL 血清,0.055 mL Buffer4,0.020 mL 1% SDS 溶液,0.025 mL 0.2 mol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液,混匀,后处理以及测定方法与 SDS 相同。

#### 1.4.2 血浆、HLS 中的 proPO 激活作用

SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、SDS 与 Ca<sup>2+</sup>、SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 对血浆、HLS 中 proPO 激活作用的测定方法与血清中 proPO 激活作用的测定方法相同。测定样品为 0.1 mL 血浆(扣除抗凝剂后实际血浆量)、0.1 mL HLS(扣除悬浮液 Buffer3 后实际 HLS 量)。

## 2 结果

### 2.1 中华绒螯蟹血清、血浆和 HLS 中的 PO 活力

中华绒螯蟹血清、血浆、HLS 与 PO 的低物 L-DOPA 分别混合作用后,血清中 PO 活力为 4.3 U;血浆中,30 min 内其 O. D. 值没有变化,酶活力为 0 U;在 HLS 中 PO 活力为 0.1 U;表明血清、HLS 中存在一定量的 PO,而血浆中无 PO 的存在(图 1)。

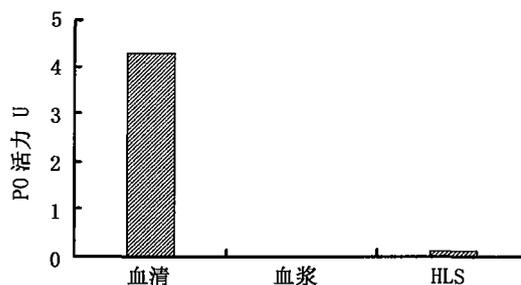


图 1 中华绒螯蟹血清、血浆和 HLS 中的 PO 活力  
Fig. 1 PO activity in *Eriocheir sinensis* serum, plasma and HLS

## 2.2 抗凝剂、pH、温度对血清 PO 活力的影响

加抗凝剂的血清与 PO 底物 L-DOPA 混合作用后,PO 活力为 4.16U,与加双蒸水的对照组 PO 活力为 4.3 U 相比,其 PO 活力单位略有下降,但两者无显著差异,表明抗凝剂对 PO 活力无影响(图 2)。

pH 对血清 PO 活力有显著影响,在 pH 5~8 范围内,pH 5.0 时,PO 活力最低,为 2.57 U;随着 pH 的上升,其活力逐渐增加;pH 6.0~6.5 区间,活力增加速率加快,在 pH 6.5 时,PO 活力最高,达 6.97 U;随后,随着 pH 的下降,其活力逐渐下降,在 pH 8 时 PO 活力为 4.5 U(图 3)。PO 活力的最适 pH 为 6.5。

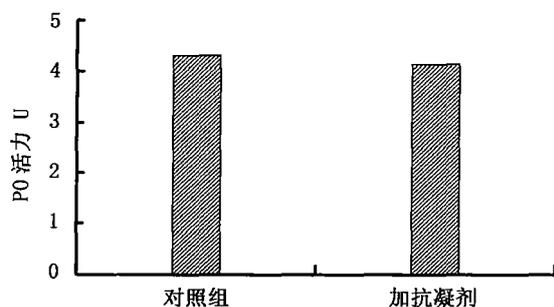


图 2 抗凝剂对血清 PO 活力的影响

Fig.2 Anticoagulant effects on PO activity in serum

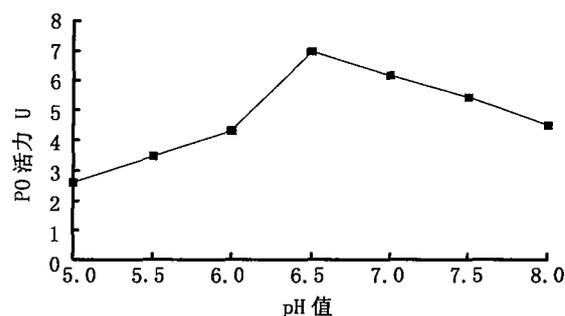


图 3 pH 对血清 PO 活力的影响

Fig.3 pH effects on PO activity in serum

温度对血清 PO 活力有显著的影响,在 30℃~70℃ 的温度范围内,从 30℃ 到 40℃,血清 PO 活力呈上升趋势;温度达到 40℃ 时,血清 PO 活力最高,为 7.23 U;而当温度超过 40℃,血清 PO 活力则迅速下降,至 70℃ 时 PO 活力降到最低,为 1.9 U,此时血清中出现明显的乳白色蛋白变性现象(图 4)。PO 活力的最适温度为 40℃。

## 2.3 SDS 和金属离子对血清、血浆和 HLS 中的 proPO 激活作用

### 2.3.1 血清中的 proPO 激活作用

相对 PO 活力为 4.3 U 的对照组,血清中分别加 SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、SDS 与 Ca<sup>2+</sup>、SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 后 PO 活力都有不同程度的增加,加 SDS 的组,PO 活力增加幅度最大,达 22.3 U;加 Ca<sup>2+</sup> 组和加 Mg<sup>2+</sup> 组,两者 PO 活力增加幅度相似,分别为 12.7 U 和 12.13 U;当 SDS 与 Ca<sup>2+</sup> 或 SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 一起加入时,它们的 PO 活力分别处于单独加入的两者之间,为 17.93 U 和 17.76 U,即低于 SDS 组,但分别高于 Ca<sup>2+</sup> 组、Mg<sup>2+</sup> 组(图 5)。无论单独加入 SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 还是 SDS 与 Ca<sup>2+</sup> 联合、SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 联合加入,都能激活血清中 proPO,使 proPO 变为 PO。

### 2.3.2 血浆中的 proPO 激活作用

在测定的 30 min 时间内,无论是对照组血浆还是血浆中分别加入 SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、SDS 与 Ca<sup>2+</sup>、SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 的各个组中 O. D. 增加值均为 0,表明血浆中无 PO 活力也无 proPO 存在。

### 2.3.3 HLS 中的 proPO 激活作用

HLS 中分别加 SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、SDS 与 Ca<sup>2+</sup>、SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 后,PO 活力都有不同程度的增加。加 SDS 的组,PO 活力增加幅度最大,达 22.43 U;加 Ca<sup>2+</sup> 组和加 Mg<sup>2+</sup> 组,PO 活力分别为 4.73 U、3.8 U;当 SDS 与 Ca<sup>2+</sup> 或 SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 一起加入时,PO 活力分别处于单独加入的两者之间,为 12.3 U 和 14.5 U,即低于 SDS 组,但分别高于 Ca<sup>2+</sup> 组、Mg<sup>2+</sup> 组;对照组 HLS 中 PO 活力为 0.1 U(图 6)。结果表明各组都能激活 HLS 中的 proPO,使 proPO 变为 PO。

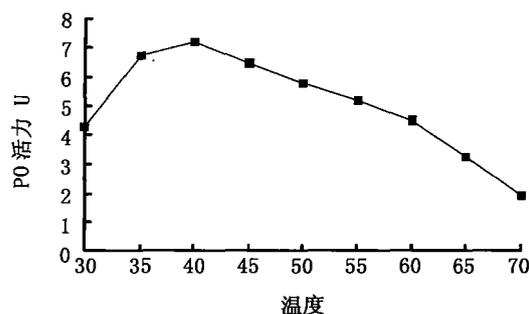


图 4 温度对血清 PO 活力影响

Fig.4 Temperature effects on PO activity in serum

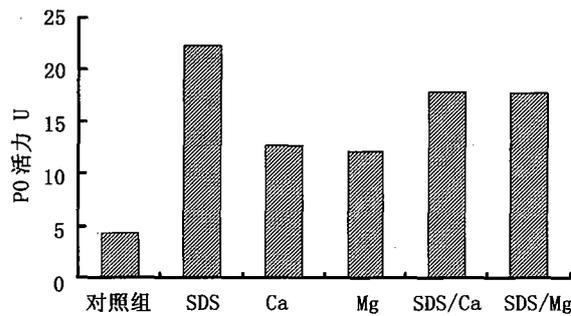


图5 中华绒螯蟹血清中的 proPO 激活作用

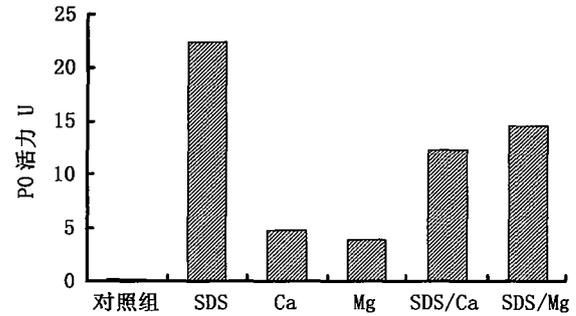
Fig.5 The activation of proPO in *Eriocheir sinensis* serum

图6 中华绒螯蟹 HLS 中的 proPO 激活作用

Fig.6 The activation of proPO in *Eriocheir sinensis* HLS

### 3 讨论

通过中华绒螯蟹血清、血浆、HLS 中 PO 的测定,在血淋巴的血清中和 HLS 中都能检测到 PO 活力,而血浆中无 PO 的存在,表明中华绒螯蟹血淋巴中存在 PO。中华绒螯蟹血淋巴离体后,其血细胞迅速出现形态结构的改变,在短时间内血细胞膜破裂,胞内物质溢出<sup>[14]</sup>,因此中华绒螯蟹血清中包含有血细胞胞内的成分。血浆是血淋巴加抗凝剂后经离心分离弃血细胞的成分,加抗凝剂后血细胞保持原有的细胞形态结构<sup>[11]</sup>,血浆不包含有血细胞胞内的成分,由于血浆中无 PO 以及抗凝剂对 PO 活力无影响,因此血清中的 PO 是在血清制备过程中由血细胞破裂释放而来,表明 PO 是分布在中华绒螯蟹血淋巴的血细胞中,这与大多数节肢动物中的 PO 分布在血细胞中<sup>[15]</sup>的报道相一致。但血清中的 PO 来自于血细胞,为何在未经过外源刺激物作用下血清中的 PO 活力高于血细胞中的 PO 活力,可能血细胞内以 proPO 形式存在的 PO 在血细胞破裂后释放到血清过程中被血清中的某些成分激活的结果,已有研究报道龙虾血细胞溶解后释放的 proPO 在血凝过程中被部分激活<sup>[16]</sup>。

樊廷俊等<sup>[6]</sup>在用 EDTA 对中国对虾 PO 活力影响的试验中,发现 EDTA 对中国对虾 PO 活力有较强的抑制作用,在该反应体系中 EDTA 终浓度为 10 mmol/L。而本文进行抗凝剂对中华绒螯蟹血清中 PO 活力影响的试验中,尽管抗凝剂中存在 EDTA,但对 PO 活力无影响,是由于本反应体系中 EDTA 含量远低于前者,终浓度仅为 2.78 mmol/L,由此可见 EDTA 需达到一定的浓度才能对 PO 活力起到抑制作用。

pH 值和温度对 PO 活力有显著的影响,本试验中中华绒螯蟹血清中的 PO 活力最适 pH 值为 6.5,略高于中国对虾、栉孔扇贝 (*C. farreri*) PO 活力的最适 pH 值 6.0<sup>[6,17]</sup> 和龙虾 6.3<sup>[7]</sup>,低于日本沼虾 7.0<sup>[8]</sup>、白对虾 7.5<sup>[9]</sup> 和加州对虾 (*Penaeus californiensis*) 8.0<sup>[10]</sup>;中华绒螯蟹血清中的 PO 活力最适温度为 40 °C,与中国对虾<sup>[6]</sup> 和日本沼虾<sup>[8]</sup> 完全一致,但略高于龙虾的最适温度 37 °C,低于白对虾和栉孔扇贝的 PO 最适温度 45 °C<sup>[9,17]</sup>;表明最适 pH 值和温度存在种间差异,这些种间差异可能与它们的生存环境不同等因素有关。

酚氧化酶系统是一个多级酶联反应系统,大多数节肢动物的 PO 以非激活状态的 proPO 形式存在,proPO 激活后转变为 PO 而发挥免疫作用<sup>[5]</sup>。在未受刺激物作用时,中华绒螯蟹血清中和 HLS 中 PO 活力均较低,尤其 HLS 中 PO 活力更低,为 0.1 U,相似于栉孔扇贝血细胞中 PO 活力为 0 U<sup>[17]</sup> 水平。SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 以及 SDS 与 Ca<sup>2+</sup> 联合和 SDS 与 Mg<sup>2+</sup> 联合分别作用后,血清中和 HLS 中 PO 活力均有大幅度地增加,表明中华绒螯蟹中的 PO 与大多数节肢动物的 PO 以非激活状态的 proPO 形式存在<sup>[2]</sup> 相一致。由于血浆受刺激物作用后未表现出 PO 活力,血浆中不存在 proPO,因此血清中的 proPO 与 PO 一样,也是在血清制备过程中由血细胞破裂释放而来,中华绒螯蟹的 proPO 存在于血细胞中。中华绒螯蟹血细胞分为 4 种类型:无颗粒细胞、小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞<sup>[18]</sup>,proPO 存在于哪一种血细胞中以及血细胞中哪一部位有待于进一步的研究。

SDS、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 都具有强的激活作用,但 SDS 使血清中和 HSL 中的 PO 活力增加幅度最大,SDS 与 Ca<sup>2+</sup> 一起加入时无论血清中还是 HSL 中的 PO 活力显著低于单独 SDS 激活后的 PO 活力,这些现象

类似于中国对虾<sup>[13]</sup>,认为 SDS 遇到  $\text{Ca}^{2+}$  后生成不溶性的 SDS 钙盐<sup>[19]</sup>,削弱了 SDS 的单独激活作用。SDS 与  $\text{Mg}^{2+}$  一起加入时与 SDS 与  $\text{Ca}^{2+}$  一起加入时具有类似的现象,SDS 遇到  $\text{Mg}^{2+}$  后同样可生成不溶性的 SDS 镁盐。

不同的刺激物其激活机制不尽相同,受 SDS 刺激后,中华绒螯蟹血清中 PO 活力与 HSL 中 PO 活力在总体水平上无显著差异,分别达到了 22.3 U 和 22.43 U;而受  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  刺激后,血清中的 PO 活力分别为 12.7 U 和 12.13 U,HSL 中 PO 活力分别为 4.73 U、3.8 U,血清中的 PO 活力高于 HSL 中 PO 活力 2~3 倍。SDS 的激活作用显著大于  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的激活作用是由于调节激活的生化机制不同,SDS 直接作用于 proPO,与 proPO 结合,使其构象改变,暴露活力位点,而使 PO 活化<sup>[20]</sup>;Gollas-Galvan 等<sup>[21]</sup>研究认为  $\text{Ca}^{2+}$  对加州对虾酚氧化酶系统的激活作用,是首先通过激活该酶级联反应系统中的酚氧化酶原活化酶(proPO activating enzyme, PPAE)后,再由 PPAE 激活 proPO,使 proPO 转变为 PO, $\text{Ca}^{2+}$  不是直接作用于 proPO,不同的激活生化机制产生不同的激活效果。受  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  刺激后血清中的 PO 活力分别都高于 HSL 中 PO 活力 2~3 倍,PPAE 含量的多少直接影响 proPO 的激活作用和最后的 PO 活力,因此这样的差异可能是由于血清中的 PPAE 含量高于 HSL 中的 PPAE 含量所产生的结果。

### 参考文献:

- [1] Söderhäll K, Cerenius L, Johansson M W. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense[J]. Annu NY Acad Sci, 1994, 712: 155 - 161.
- [2] 王雷,李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展[J]. 海洋科学, 1992, 3: 18 - 19.
- [3] Söderhäll K. 1,3-glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate[J]. Comp Biochem Physiol, 1983, 74B, 221 - 224.
- [4] Söderhäll K, Ajaxon R. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces spp.* and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish[J]. J Invertebr Path, 1982, 39: 105 - 109.
- [5] Söderhäll K. Prophenoloxidase activating system and melanization — a recognition mechanism of Arthropods? A review[J]. Developm Comp Immunol, 1984, 6: 601 - 611.
- [6] 樊廷俊,汪小锋. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)酚氧化酶的分离纯化及其部分生物化学性质[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(5): 589 - 594.
- [7] 夏栋,卞疆. 龙虾多酚氧化酶的纯化及其部分生化特性[J]. 江苏食品与发酵, 2000, 1: 16 - 19.
- [8] 李义. 温度、pH 对日本沼虾血清酚氧化酶活力及稳定性的影响[J]. 海洋科学, 2002, 26(10): 1 - 3.
- [9] Simpson B K, Marshall M R, Orwell W S. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): Purification and some properties[J]. J Agric Food Chem, 1987, 35: 918 - 921.
- [10] Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Vargas-Alboreo F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes[J]. Comp Biochem Physiol (Part B), 1999, 122(1): 77 - 82.
- [11] 张明辉,陆宏达. 中华绒螯蟹血淋巴液抗凝剂的筛选[J]. 水产科技情报, 2005, 32(增刊): 93 - 99.
- [12] Ashida M, Söderhäll K. The prephenoloxidase activating system in crayfish[J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 77B(1): 21 - 26.
- [13] Ashida M. Purification and characterization of prephenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry And Biophysics, 1971, 144: 749 - 762.
- [14] 陆宏达,张明辉. 中华绒螯蟹血细胞数及离体后形态学变化[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 444 - 462.
- [15] Crossley A C. Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage and secretion in hemocytes[M]//Insect hemocytes. Cambridge Univ Press, Cambridge, 1979: 423.
- [16] Söderhäll K. Fungal cell wall 1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate[J]. Developm Comp Immunol, 1981, 5: 565 - 573.
- [17] 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力[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 9 - 13.
- [18] 陆宏达. 中华绒螯蟹血淋巴细胞的显微、亚显微形态结构以及分类[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 89 - 95.
- [19] 黄辉洋,李少菁,王桂忠. 甲壳动物酚氧化酶活力及其在养殖中的应用[J]. 海洋通报, 2000, 19(3): 79 - 84.
- [20] Asada N. Reversible activation of prophenoloxidase with 2-propanol in *Drosophila melanogaster* [J]. J Exp Zool, 1998, 282(1-2): 28 - 31.
- [21] Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Vargas-Alboreo F. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp [J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117A: 419 - 425.