

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00211

凡纳滨对虾血蓝蛋白与人红细胞的作用靶位

曹劲松, 汤俊荣, 章跃陵, 郭玲玲, 陈传道, 陈洁辉

汕头大学 理学院 生物学系, 海洋生物研究所, 广东 汕头 515063

摘要: 采用亲和层析、SDS-PAGE、Far-Western-blotting、MALDI-TOF/MS 等亲和蛋白质组学方法, 发现凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血蓝蛋白可与人红细胞膜上一种分子量为 27 kD 的膜蛋白发生特异性结合, 经 Mascot 搜索引擎检索该蛋白与人红细胞膜蛋白——硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase)具有高度同源性。继而运用生物信息学技术对其相互作用进行分析, 结果显示, 硫氧还蛋白过氧化物酶与血蓝蛋白在三维结构水平可发生特异性的对接, 且其结合位点呈现“锁-钥模型”。由此推测, 硫氧还蛋白过氧化物酶可能为对虾血蓝蛋白与人红细胞结合靶位之一, 所获研究结果为进一步揭示血蓝蛋白的凝血、溶血作用机制等奠定了良好的基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 血蓝蛋白; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 作用靶位

中图分类号: S91

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)02-0211-06

血蓝蛋白(hemocyanin)是位于节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白, 脱氧状态为无色, 结合氧状态为蓝色, 与血红蛋白(hemoglobin)、蚯蚓血红蛋白(hemerythrin)并称为动物界中的3种呼吸蛋白^[1]。值得一提的是, 近年来人们发现血蓝蛋白不仅具有输氧功能, 而且还与能量的贮存、渗透压的维持以及蜕皮过程的调节有关^[2-3]。尤其是, 本实验室既往研究发现凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血蓝蛋白还具有多种免疫学活性。严芳等^[4-5]报道, 血蓝蛋白在胰蛋白酶诱导下可表现出一定的酚氧化物酶活性。章跃陵等^[6]运用亲和蛋白质组学和 Western-blotting 等分子生物学方法证实凡纳滨对虾血清中与病原菌直接结合的主要蛋白为血蓝蛋白; 进一步实验发现, 血蓝蛋白对大肠杆菌(*Escherichia coli*)K12 等细菌具有凝集活性^[7], 且外膜蛋白 X OmpX 为血蓝蛋白与大肠杆菌 K12 的凝集作用靶标^[8]。尤其

是本课题组最近证实血蓝蛋白具有红细胞凝集活性和溶血活性^[9-10], 但其与红细胞的作用靶标尚不清楚, 更不消说对其作用机理的研究。为此, 本研究以对虾血蓝蛋白和人红细胞为研究对象, 运用 Far-Western-blotting、生物信息学等技术, 探索血蓝蛋白与人红细胞可能的作用靶标, 为阐明血蓝蛋白凝血、溶血作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾购于汕头市华勋水产有限公司, 体长约 10 cm。人血采自汕头大学医院。

1.2 实验方法

1.2.1 虾血清的制备 选用 1 mL 注射器从对虾围心腔抽取血淋巴, 置 4℃ 过夜, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, -20℃ 保存备用。

1.2.2 凡纳滨对虾血蓝蛋白的纯化与鉴定 按章跃

收稿日期: 2011-08-30; 修订日期: 2011-10-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871939; 31072237); 广东省自然科学基金资助项目(9151064001000001; 10251503101000002); 广东省科技计划项目(2009B020309006); 汕头市科技计划项目(2011-19).

作者简介: 曹劲松(1986-), 男, 硕士生, 主要从事海洋动物免疫与病害学研究. E-mail: 09jscao@stu.edu.cn

通信作者: 章跃陵, 博士, 教授, 博士生导师. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

陵等^[12]报道的方法进行。

1.2.3 人红细胞膜蛋白的提取 参照肖毅等报道的方法进行^[12], 取抗凝人血 4 ml, 3 000 r/min 离心 20 min, 以 3 倍体积预冷 PBS(pH 7.4) 洗涤 3 次(4 ml, 5 000 r/min, 15 min), 预冷 Tris-HCl(0.01 mol/L, pH 7.2)与红细胞($V:V=40:1$)混合, 4℃ 放置 2 h, 再以 9 000 r/min 离心 20 min, 预冷 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗涤 3 次。沉淀以适量预冷 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)悬浮, 小量分装保存备用。

1.2.4 血蓝蛋白与人红细胞膜蛋白相互作用研究 取适量红细胞膜样品按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳 (5%浓缩胶, 12%分离胶), 待电泳结束后, 50 V 恒压电转过夜, 丽春红 S (Ponceau S) 总蛋白显色, TBS (0.02 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4) 充分洗涤, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h, TBS 洗膜 5 min × 3 次, 与适量血蓝蛋白孵育 2 h 后, TBS 洗膜 5 min × 3 次, 兔抗血蓝蛋白(1:200)孵育 2 h, TBS 洗膜 10 min × 3 次, HRP-羊抗兔 IgG (1:500) 孵育 1h, TTBS 洗膜 10 min × 3 次, DAB 显色。

1.2.5 质谱鉴定 采用 Zhang 等报道的方法进行^[7]。用洁净刀片直接从 SDS-PAGE 凝胶上切取待测蛋白条带, 依次进行胶内蛋白酶解、MALDI-TOF/MS 肽指纹图谱分析和 Mascot 搜索引擎检索 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=../data/20110303/FttmrnenL.dat&hit=4

1.2.6 生物信息学分析 采用 PDB(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)、SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)、Hex6.3、POCKET-FINDER (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/pocketfinder/>) 等在线软件预测硫氧还蛋白过氧化物酶与血蓝蛋白的三级结构、活性中心及相互作用位点。

2 结果与分析

2.1 亲和层析纯化血蓝蛋白的鉴定

如图 1 所示, 亲和层析纯化后所得血蓝蛋白 SDS-PAGE 电泳表现为 75、77 kD 两条带, 与凡纳滨对虾血蓝蛋白相关报道相符^[10]。继而分别以兔抗血蓝蛋白抗血清和羊抗兔- HRP 为一抗和二抗进行 Western-blotting 分析, 结果发现血蓝蛋

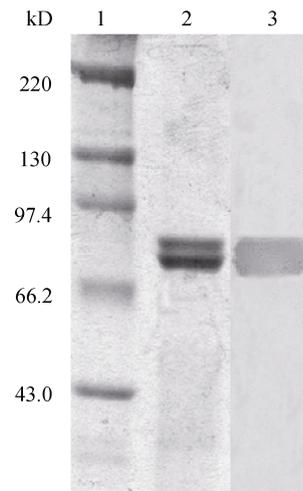


图 1 亲和层析纯化血蓝蛋白 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

1. 蛋白质 Markers; 2、3. 分别为血蓝蛋白 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

Fig. 1 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of hemocyanin purified from *L. vannamei* by affinity chromatography
Lane 1: Protein markers; Lanes 2–3: SDS-PAGE and Western-blotting analysis of hemocyanin, respectively.

白两个亚基条带均显色, 与预期结果一致。由此说明, 所纯化的蛋白确实为血蓝蛋白, 且成分单一。

2.2 血蓝蛋白与人红细胞膜蛋白相互作用分析

取适量人红细胞膜蛋白进行 SDS-PAGE 和 Far-Western-blotting 分析。结果如图 2 所示, 红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 表现为分子量为 23~200 kD 的 9 条带, 其中分子量为 27 kD 的一种膜蛋白与血蓝蛋白孵育后, 与兔抗血蓝蛋白抗血清呈明显阳性(图 2)。由此说明, 27 kD 的红细胞膜蛋白可能为血蓝蛋白与红细胞的作用靶标。

2.3 血蓝蛋白与人红细胞作用靶标的鉴定

为了进一步鉴定上述与血蓝蛋白相结合的人红细胞膜蛋白, 取其蛋白条带, 胰蛋白酶胶内酶切后进行肽质量指纹图谱检测 (图 3) 和 Mascot 搜索引擎检索(表 1)。结果发现, 该 27 kD 蛋白与人红细胞硫氧还蛋白过氧化物酶(pI 5.44)具有高度同源性。由此推测, 血蓝蛋白与红细胞结合靶位可能为硫氧还蛋白过氧化物酶。

2.4 血蓝蛋白与硫氧还蛋白过氧化物酶相互作用分析

为了更深入了解硫氧还蛋白过氧化物酶与血

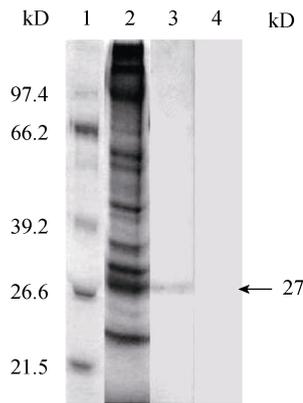


图 2 Far-Western-blotting 分析

1. 蛋白质 Markers; 2. 人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 分析;
3. 人红细胞膜蛋白与血蓝蛋白孵育后 Far- Western-blotting 分析; 4. 阴性对照

Fig 2 Far-Western-blotting analysis

Lane 1: Protein markers; Lane 2: SDS-PAGE analysis of membrane proteins of human erythrocyte; Lane 3: Far-Western-blotting analysis after human erythrocyte membrane proteins incubating with hemocyanin; Lane 4: Negative control

蓝蛋白的相互作用关系, 在预测两者三维结构及其表面分子所在范围、活性位点(图 4 A-D)等的基础之上, 运用 Hex6.3 软件分析两者对接模型(刚性对接), 在充分考虑两者的结合角度、方向、及形状和静电贡献等综合因素的情况下, 从 2 000 个连接模型中优选出一个最合理的对接模型(图 4 E)。在此模型中, 硫氧还蛋白过氧化物酶与血蓝蛋白共形成 134 个氢键, 总分子能减少 1 J。其相互作用位点处在两者表面分子范围内, 且包含硫氧还蛋白过氧化物酶活性中心, 呈现经典的“锁-钥模型”。由此说明, 血蓝蛋白与硫氧还蛋白过氧化物酶应该可以相互作用并形成较稳定的结构。

3 讨论

现代分子免疫学研究表明, 天然免疫分子主要通过识别或结合那些微生物表面保守的、而

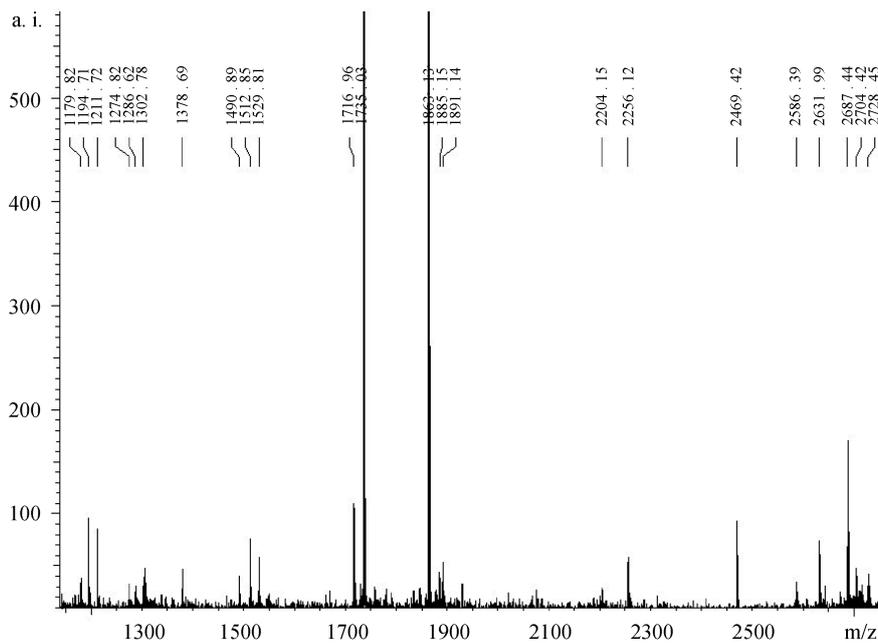


图 3 27 kD 蛋白 MALDI- TOF/MS 肽质量指纹图谱

Fig. 3. MALDI- TOF/ MS peptide mass fingerprint (PMF) spectra in gel tryptic digest of 27 kD protein

表 1 肽质量指纹图谱 Mascot 搜索引擎(NCBI nr 数据库) 检索结果

Tab.1 Homologous search results of 27 kD hprotein by its PMF using Mascot search engine of NCBI nr database

m/z	Mr (expected)	Mr (calculated)	miss	ppm	start – end	sequence
1863.1300	1862.1227	1862.0625	1	32	91 – 108	R.KEGGLGPLNIPLLDVTR.R
1735.0300	1734.0227	1733.9676	0	32	92 – 108	K.EGGLGPLNIPLLDVTR.R
1891.1400	1890.1327	1890.0687	1	34	92 – 109	K.EGGLGPLNIPLLDVTRR.L
1179.8200	1178.8127	1178.6295	1	155	109 – 118	R.RLSEDYGVLK.T
1211.7200	1210.7127	1210.6670	0	38	139 – 149	R.QITVNDLPVGR.S

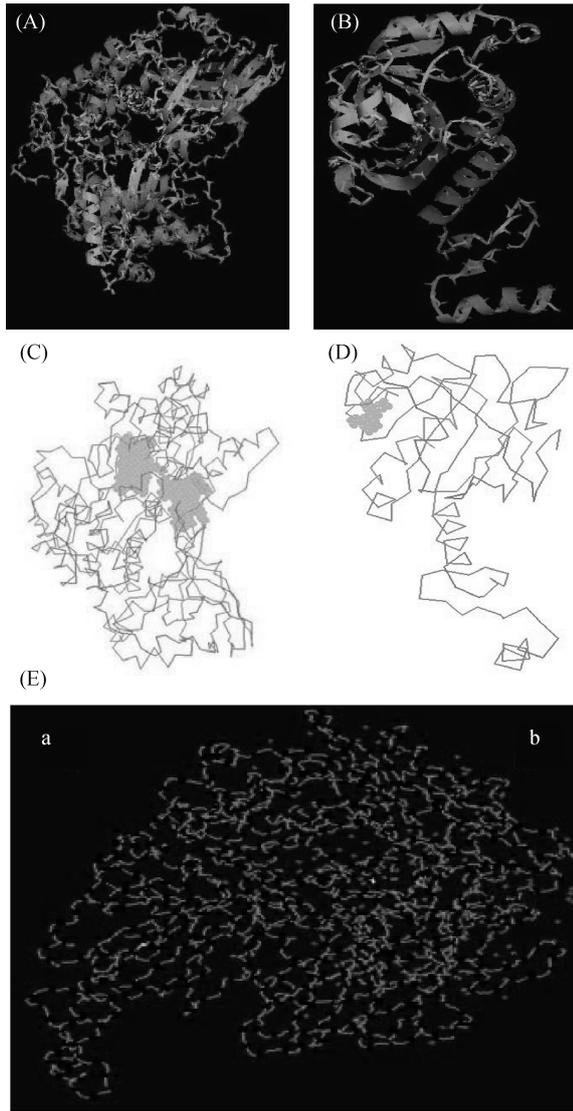


图 4 血蓝蛋白和硫氧还蛋白过氧化物酶三级结构、活性位点及相互作用预测

(A、B)分别为血蓝蛋白、硫氧还蛋白过氧化物酶三级结构预测图；(C、D)分别为血蓝蛋白、硫氧还蛋白过氧化物酶活性位点预测；(E)硫氧还蛋白过氧化物酶与血蓝蛋白结合预测图，a：硫氧还蛋白过氧化物酶，b：血蓝蛋白。通过 Hex6.3 预测硫氧还蛋白过氧化物酶与血蓝蛋白相互作用位点，(E)图为 2 000 个预测对接结构中最合理的一个。(C)图和(D)图中阴影部分为活性位点。

Fig. 4 Tertiary structure, active sites and interaction prediction of hemocyanin and thioredoxin peroxidases

A–B: The tertiary structure of hemocyanin and thioredoxin peroxidases, respectively; C–D: The predicting active sites of hemocyanin and thioredoxin peroxidases, respectively; E: The interaction prediction of hemocyanin and thioredoxin peroxidases, a: thioredoxin peroxidases, b: hemocyanin. The shadow part of Fig. C and Fig. D are active site.

在宿主中又不存在的病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)而发挥免疫学活性。揭示天然免疫分子与病原微生物的作用靶标被认为是阐明天然免疫分子作用机制的前提和基础。Chandrabala 等^[13]发现血清麦芽糖 A (serum amyloid A, SAA) 能特异性结合大肠杆菌(*E. coli*)和绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等革兰氏阴性细菌的外膜蛋白 A (OmpA), 并进一步发现该外膜蛋白 A 能增强巨噬细胞的吞噬作用及 TNF- α 和 IL-10 的合成; Yang 等发现栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) C-type lectin (CfLec-1) 能与脂多糖、 β -甘露糖和肽聚糖 3 种病原相关分子模式结合, 从而引发抗病原菌的免疫反应^[14]。本课题组既往研究结果显示, 对虾血蓝蛋白与病原菌凝集作用靶标为 OmpX^[8]。最近我们研究发现, 对虾血蓝蛋白可以与异种动物红细胞相结合而发挥凝集、溶血活性^[9-11]。但其与红细胞的作用靶标尚不清楚, 有待进一步研究。

近年来, 后基因组学的快速发展为寻找蛋白质之间的相互作用关系、建立相互作用关系网络图等提供了重要手段。其中以蛋白质复合物亲和纯化、二维电泳、生物质谱和生物信息学等为主要研究方法的亲和蛋白质组学是研究蛋白质相互作用的主要技术路线^[15]。Delphine 等^[17]采用 HPLC 和生物质谱等蛋白质组学方法从两种对虾(*P. vannamei* 和 *P. stylirostris*)血浆中分离并鉴定出 3 种新的血蓝蛋白抗菌降解片段^[17]。Christopher 等^[17]利用 PDB 等蛋白数据库, 预测美洲鲎(*Limulus polyphemus*)血蓝蛋白活性中心附近存在磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)连接位点, 且 PS 可增强血蓝蛋白酚氧化酶活性; Xue 等^[19]通过构建三维定量构效关系模型和 FlexX 柔性对接, 阐明了酚氧化酶及其抑制剂—4-丁基苯甲醛氨硫脲的相互作用机理。本研究运用亲和蛋白质组学和生物信息学技术路线, 发现分子量约为 27 kD 人红细胞膜蛋白——硫氧还蛋白过氧化物酶可与血蓝蛋白发生特异性结合, 两者结合位点呈现“锁-钥模型”。由此提示, 对虾血蓝蛋白与红细胞的结合靶标有可能为硫氧还蛋白过氧化物酶。

一般认为, 硫氧还蛋白过氧化物酶是过氧化还原酶超家族的一员, 其与 NADPH 组成硫氧还蛋白系统, 其主要功能为抗氧化作用。值得关注的是, 近年来人们发现硫氧还蛋白过氧化物酶还具有促细胞生长、抗细胞凋亡和调节转录因子活性等多种功能, 同时在寄生虫与宿主相互作用中发挥主要作用, 并具备较强的免疫原性^[19-21]。值得关注的是, 本研究发现人红细胞硫氧还蛋白过氧化物酶还可作为一种 PAMP 分子与对虾血蓝蛋白发生特异性结合。不难推测, 血蓝蛋白之所以选择膜蛋白作为作用靶标, 可能主要是由于血蓝蛋白与其结合后可抑制红细胞生长、促进红细胞凋亡, 从而达到清除异种动物红细胞的目的。课题组前期研究显示, 对虾血蓝蛋白发挥凝血、溶血活性的主要构象分别为十二聚体、二聚体(或三聚体), 溶血作用机制为胶体渗漏机制, 且在血蓝蛋白对红细胞发挥溶血反应的过程中可观察到凝血现象的发生^[9]。因此, 本研究所发现的血蓝蛋白与红细胞的作用靶标——硫氧还蛋白过氧化物酶, 究竟与对虾血蓝蛋白发挥凝血活性有关, 还是溶血活性有关, 抑或与两者均相关还有待于进一步研究和探索。相信, 随着对虾血蓝蛋白抗红细胞作用机制研究的进一步深入, 其在免疫反应中的地位和作用必将被彻底揭示。

参考文献:

- [1] Terwilliger N B. Function adaptations of oxygen-transport proteins [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201: 1085-1098.
- [2] Jaenicke E, Föll R, Decker H. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (26): 34267-34271.
- [3] Paul R J, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates [J]. *Zoology*, 1998, 100: 319-327.
- [4] 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 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (4): 402-406.
- [5] 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 [J]. *水产科学*, 2008, 27 (1): 5-8.
- [6] 章跃陵, 林智建, 李祖江, 等. 凡纳滨对虾血清中直接与病原菌相结合的主要蛋白的鉴定 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (1): 105-109.
- [7] Zhang Y L, Wang S, Xu A L, et al. Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5 (4): 815-821.
- [8] 章跃陵, 严芳, 樊大军, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白与病原菌凝集作用靶标的鉴定 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24 (5): 457-462.
- [9] Pan J Y, Zhang Y L, Wang S Y, et al. Dodecamer is required for agglutination of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin with bacterial cells and red blood cells [J]. *Mar Biotechnol*, 2008, 10: 645-652.
- [10] Zhang Y L, Yan F, Hu Z, et al. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27: 330-335.
- [11] 章跃陵, 林伯坤, 陈俊, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白的细菌凝集活性 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (6): 1006-1011.
- [12] 肖毅, 杨粉莲. 两种提取红细胞膜蛋白方法的比较 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997, 13 (2): 44-45.
- [13] Chandrabala S, Ranjeeta H D, John G R. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria [J]. *Blood*, 2006, 108: 1751-1757.
- [14] Yang J L, Wang L L, Zhang H, et al. C-Type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization [J]. *Plos One*, 2011, 6 (2): e17089.
- [15] Panisko E A, Conrads T P, Goshe M B, et al. The postgenomic age: characterization of proteomes [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30: 97-107.
- [16] Delphine D G, Denis S, Julien G, et al. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (50): 47070-47077.
- [17] Christopher J, Sharoon M, Jacqueline Narn. Possible role of phosphatidylserine-hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35: 155-163.
- [18] Xue C B, Zhang L, Luo W C H, et al. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 15: 2006-2015.
- [19] 梁鹏, 张一娜, 滕宗艳. 硫氧还蛋白生物活性及其与人类疾病的关系 [J]. *中国老年学志*, 2004, 24: 478-480.
- [20] 贺媛, 夏陈海, 孙璐, 等. 人硫氧还蛋白同 ASK1 的结合与硫氧还蛋白氨基酸位点的关系 [J]. *心脏杂志*, 2011, 23

(4): 421-425.

过氧化物酶基因的克隆及序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 1(29): 67-70.

[21] 李永光, 李文卉, 盖文燕, 等. 多头带绦虫硫氧还蛋白

Identification of interaction target of human erythrocyte recognized by *Litopenaeus vannamei* Hemocyanin

CAO Jinsong, TANG Junrong, ZHANG Yueling, GUO Lingling, CHEN Chuandao, CHEN Jiehui

Department of Biology and Marine Biology Institute, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China

Abstract: Shrimp hemocyanin possesses erythrocyte hemagglutinative and hemolytic properties. We used affinity chromatograph, SDS-PAGE, far-western-blotting, MALDI-TOF/MS, and bioinformatics to determine the target of hemocyanin binding. Hemocyanin bound specifically to an ~27 kD human erythrocyte membrane protein. The protein shared high homology with human erythrocyte thioredoxin peroxidase. Shrimp hemocyanin bound to human thioredoxin peroxidase following the “lock - key model” at the tertiary structure level. Together, our data suggest that thioredoxin peroxidase mediates, at least in part, the interaction between erythrocytes and shrimp hemocyanin. Our observations provide insight into the mechanism of hemocyanin hemagglutination and hemolysis.

Key words: shrimp; hemocyanin; thioredoxin peroxidases; interaction target

Corresponding author: ZHANG Yueling. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

书 讯

欢迎订阅海洋出版社渔业科学系列图书！

序号	ISBN	书 名	定价	作者
1	978-7-5027-8140-8	海洋渔业可持续发展战略—以浙江为例	38.00	任淑华等
2	978-7-5027-8150-7	人工鱼礁工程学	60.00	夏章英
3	978-7-5027-8108-8	中国宝贝总科图鉴	138.00	张素萍
4	978-7-5027-8119-4	中国海洋鱼类寄生蠕虫物种多样性	168.00	刘升发
5	978-7-5027-8105-7	多营养层次的海水综合养殖	98.00	王清印
6	978-7-5027-8107-1	渔业生产与经济管理	80.00	夏章英
7	978-7-5027-8051-7	人工鱼礁关键技术研究示范	90.00	贾晓平
8	978-7-5027-8088-3	水产经济动物增养殖学	60.00	李明云
9	978-7-5027-8068-5	南沙群岛渔业史	60.00	夏章英
10	978-7-5027-8067-8	水产养殖学专业生物学基础课程实验	68.00	石耀华

联系地址：北京市大慧寺路 8 号 海洋出版社 邮 编：100081 电话：010-62132549

联系人：郑银娣 唐兴云