

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18292

源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的化学合成肽段的免疫调控活性

陶梦圆, 李长平, 伦镜盛, 钟名其, 陈洁辉, 章跃陵

汕头大学理学院生物学系 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063

摘要: 以源于血蓝蛋白化学合成肽段 B1 为研究对象, 运用蛋白质组学、分子生物学等策略分析其对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的免疫调控活性。结果显示, 与对照组比, 对虾在受到肽段 B1 刺激后, 血浆中 2 条分子量分别为 65 kD 和 35 kD 的蛋白条带(分别命名为 p65 和 p35)表达水平显著上调。经质谱和 Western blot 鉴定, p65、p35 与包括对虾 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、葡聚糖模式识别脂蛋白、血蓝蛋白等在内的 13 个蛋白具有高度同源性, 其中 p65 与兔抗血蓝蛋白抗体呈明显的阳性反应。实时荧光定量 PCR 检测显示, 肽段 B1 刺激对虾 24 h 后, 5 个质谱鉴定免疫相关基因: 血蓝蛋白大亚基、血蓝蛋白小亚基、谷氨酰胺转氨酶、 α 2 巨球蛋白亚型 2、葡聚糖模式识别脂蛋白在肝胰腺、鳃和血细胞等组织中 mRNA 的表达水平显著性($P<0.05$)或极显著性($P<0.01$)上调。由此推测, 源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的化学合成肽段 B1 对包括血蓝蛋白在内的多种免疫因子的表达具有一定的调控作用。

关键词: 凡纳滨对虾; 血蓝蛋白; 肽段 B1; 免疫调控

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)05-0844-08

血蓝蛋白是一种广泛存在于节肢动物和软体动物血淋巴中, 由多个亚基组成的含铜呼吸蛋白。近年来研究表明, 血蓝蛋白不仅具有输氧功能, 而且还具有酚氧化酶、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、溶血等多种免疫学功能^[1-2]。有趣的是, 随着研究的深入, 人们发现血蓝蛋白还可以降解产生多个免疫相关肽段^[3-9]。最近, 本课题组发现 12 种源于血蓝蛋白的化学合成肽段(B1-3, B9-11, B13-14, S7-10, 生物信息学预测这些肽段可由血蓝蛋白降解产生)对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、乙型链球菌(*Streptococcus iniae*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)等具有明显的抗性^[10-12]。由此说明, 对虾血蓝蛋白确实可以产生多个不同大小的可以直接抵抗包括真菌、细菌等多种病原微生物在内的肽段。

既往研究证实, 生物体内各种免疫因子之间并不是孤立存在, 而是存在复杂的相互联系, 它

们之间特异的相互作用被认为是生物体抵御病害侵袭的重要分子基础^[13]。Wang 等^[14]发现中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) C-型凝集素 (FcLec4) 可以和 β -整合素(β -integrin)发生相互作用, 且 β -integrin 基因被沉默后 FcLec4 的调理素活性受到明显的抑制。Liu 等^[15]报道日本对虾 (*Penaeus japonicus*)小 G 蛋白 Ran Gase 可通过与肌球蛋白 myosin 相互作用而调节血细胞的吞噬作用。del Campo 等^[16]还发现匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet haemocyanin, KLH)可以作为一种非特异性免疫刺激物, 激活哺乳动物的免疫防御反应, 并有望作为一种抗原用于抗癌疫苗的研发。Havanapan 等^[17]证实南美白对虾血蓝蛋白 C 末端丝氨酸磷酸化可以激活其 ERK1/2 (extracellular regulated protein kinases)信号转导通路, 从而参与对桃拉综合征病毒(Taura syndrome virus, TSV)入侵的抵御。由此推测, 源于血蓝蛋白的降解肽段除了具有上述免

收稿日期: 2018-08-22; 修订日期: 2019-01-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372558, 31672689); 广东省自然科学基金项目(2017A030311032); 广东省普通高校省级重大科研项目(2017KZDXM033).

作者简介: 陶梦圆(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫生物学研究. E-mail: 12mytao@stu.edu.cn

通信作者: 章跃陵(1971-), 教授, 博士生导师. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

疫学功能外^[1-12], 还有可能具有免疫调控活性, 进一步对其进行探索具有重要意义。

为此, 本研究从课题组所获得的 12 种源于血蓝蛋白的化学合成肽段中, 选取抑菌活性较强的化学合成肽段 B1 为研究对象, 采用蛋白质组学、分子生物学等策略探索其免疫调控活性, 对阐明血蓝蛋白降解肽段在对虾免疫防御中的地位具有重要意义, 同时为血蓝蛋白降解肽段在水产养殖中的应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾购买于广东省汕头市华勋水产有限公司牛田洋养殖基地。

1.2 实验方法

1.2.1 肽段合成 根据课题组前期研究结果^[10], 采用固相化学合成法合成源于血蓝蛋白的肽段 B1。

1.2.2 免疫刺激实验 参照 Wen 等^[9]报道的方法进行。首先用 0.01 mol/L pH 7.2 的无菌 PBS 溶液溶解化学合成肽段 B1, 制备质量浓度为 0.1 mg/mL 的注射液。然后将驯养 2 d 的对虾随机分为对照组和实验组, 每组 80 尾, 分别取 100 μ L 0.1 mg/mL 肽段 B1 溶液或 0.01 mol/L pH 7.2 无菌 PBS 溶液于对虾第 2、3 腹节之间进行肌肉注射, 24 h 后抽取对虾血淋巴用于血浆制备。

1.2.3 对虾血浆的制备 参照章跃陵等^[7]报道的方法进行, 用 1 mL 注射器于对虾心脏抽取血淋巴, 并将其与抗凝剂(115 mmol/L 葡萄糖、336 mmol/L NaCl、27 mmol/L 柠檬酸钠、9 mmol/L EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) 1 : 1 混合, 800 g 4℃离心 10~15 min, 取上清, 32000 r/min 4℃离心 10 h, 取上清, 分装后于-20℃保存备用。

1.2.4 SDS-PAGE 与 Western blot 分析 参照章跃陵等^[7]报道的方法进行。取 1.2.3 收集的实验组、对照组血浆蛋白样品 26 μ L (1.65 mg/mL), 采用 5%浓缩胶、12%分离胶进行 SDS-PAGE 分析。电泳结束后, 按常规方法进行电转, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别与兔抗血蓝蛋白抗血清(1 : 2000)和羊抗兔 IgG-HRP (1 : 1500) 25℃孵育 2 h 和 1 h, TBST 充分洗涤, DAB 显色扫描。

1.2.5 LC-MS/MS 鉴定 采用 Wen 等^[9]报道的方法选用洁净刀片从 1.2.4 SDS-PAGE 凝胶上切取目的条带(p65 和 p35), 分别依次进行胶内蛋白酶解、LC-MS/MS 分析和 Mascot 搜索引擎检索。

1.2.6 RNA 提取与 cDNA 合成 参照 1.2.2 免疫刺激对虾 24 h 后, 取血细胞、肝胰腺和鳃组织, 采用总 RNA 快速抽提试剂盒提取总 RNA, 反转录试剂盒(TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)将其反转录成 cDNA, -20℃保存备用。

1.2.7 引物设计 基于质谱鉴定结果, 结合相关文献[18-20], 选取 11 个免疫相关基因, 分别编码: 血蓝蛋白大亚基(hemocyanin large subunit, HMCL)、血蓝蛋白小亚基(hemocyanin small subunit, HMCS)、酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)、谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TGase)、 β -1,3-葡聚糖结合蛋白(β -1,3-glucan-binding protein, β GBP)、 α 2 巨球蛋白亚型 2(α 2 macroglobulin isoform 2, α 2-M2)、血淋巴凝结蛋白(hemolymph clottable protein, HCP)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine proteinase inhibitor, Spi)、精氨酸激酶(arginine kinase, AK)和葡聚糖模式识别脂蛋白(glucan pattern-recognition lipoprotein, GPL), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物(表 1)。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测 按 Kamikawa 等^[21]建立的 Taqman qPCR 方法进行。采用 Eppendorf Mastercycler ep realplex 实时荧光定量 PCR 仪进行反应, 反应体系为: Premix Ex Taq Mix 10 μ L, MilliQ 水 7 μ L, 正反向引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L。PCR 程序: 95℃预变性 10 min; 95℃变性 15 s, 60℃退火 30 s, 共 40 个循环。每个样品设置 3 个平行, 在确认每个样品扩增反应时所产生的溶解曲线是单一波峰后, 获取 C_t 值(C_t 值为每个反应体系内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数)用于数据处理。

1.2.9 数据分析 采用 SPSS 19.0 对所得数据进行分析处理, 采用方差分析(ANOVA)进行显著性分析, 所有测定结果表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$), 其中 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

表 1 凡纳滨对虾免疫相关基因引物
Tab. 1 Nucleotide primers for immune related genes of *Litopenaeus vannamei*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
a2-M2-F	GATCACCACCAAGAGGAACGG
a2-M2-R	ACAACATCAAGCTTCCCTTCGTA
AK-F	CCTCCGCTGTGAACGAGATTG
AK-R	GGTTGGTGGGGCAGAAAGTG
BGBP-F	GTCAACCCCGTCTTGAGCG
BGBP-R	CCAGTTACGAGGCAACATCCA
EF-F	TATGCTCCTTTTGGACGTTTTGC
EF-R	CCTTTTCTGCGGCCCTTGGTAG
GPL-F	ATGGCAGAATGTGTCTGGAA
GPL-R	AAGCTTGCCCTGCGCATTAT
HCP-F	TCGTGCGAAACCTTGGGAA
HCP-R	GATCTGCGAGAGGGCGGA
HMCL-F	GAGTAGCCTATTTCTGGAGAGGACAT
HMCL-R	AAGCGAACGGTAAGTTGATGATGTA
HMCS-F	CCTGGCCTCATAAAGACAACA
HMCS-R	TTTTCCACCCTTCAAAGATACC
PK-F	TGGTGAAGAAGCCCCGTCC
PK-R	GGGTAGCCTCCCTTAGCAGTTT
PPO-F	TTCCCGTCCCGCTTCGT
PPO-R	CGGCTTCGCTCTGGTTAGG
Spi-F	GGGAGGGCGGTAGCGTGTA
Spi-R	CTTCAAACCTGGCGTATCTGTGG
TGase-F	CCACGACCTTATCAAGAGCA
TGase-R	AGGACACCCTTATGGGAACA

2 结果与分析

2.1 肽段 B1 刺激对虾后血浆 SDS-PAGE 分析

如图 1 所示, 肽段 B1 刺激对虾 24 h 后, 与对照组相比, 实验组出现 2 条分子量分别为 65 kD 和 35 kD 的表达显著上调的蛋白条带(分别命名为 p65 和 p35)。

2.2 p65 和 p35 LC-MS/MS 和 Western blot 分析

为了鉴定肽段 B1 刺激 24 h 后对虾血浆中的差异蛋白, 选择 p65、p35 进行 LC-MS/MS 分析。结果发现, p65 与 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、血淋巴凝结蛋白、葡聚糖模式识别脂蛋白、血蓝蛋白、 α 2 巨球蛋白亚型 2、丝氨酸蛋白酶抑制剂、谷氨酰胺转氨酶、酚氧化酶原、 α -1,4-葡聚糖磷酸化酶、丙酮酸激酶等 10 个蛋白具有高度同源性(图 2A,

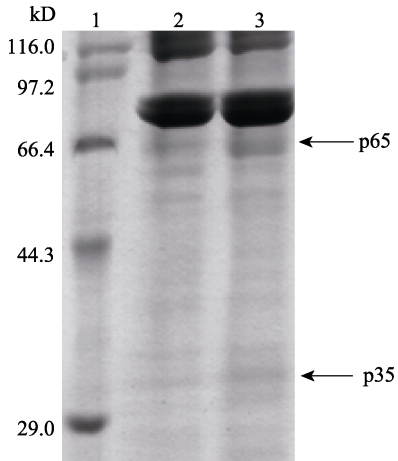


图 1 肽段 B1 刺激 24 h 后凡纳滨对虾血浆 SDS-PAGE 分析

1: 标准分子量蛋白; 2-3: 分别为 PBS、肽段 B1 免疫刺激后对虾血浆 SDS-PAGE 分析。

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of plasma from *Litopenaeus vannamei* injected with peptide B1 for 24 h
1: markers; 2-3: SDS-PAGE analysis of plasma of *Litopenaeus vannamei* injected with PBS and peptide B1, respectively.

表 2); p35 与 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、血蓝蛋白(片段)、酚氧化酶原-2、丝氨酸蛋白酶抑制剂、 α 2 巨球蛋白亚型 2、精氨酸激酶、血淋巴凝结蛋白、胰蛋白酶(片段)、谷氨酰胺转氨酶和热激蛋白 90 等 10 个蛋白具有高度同源性(图 2B, 表 3)。两者同源蛋白中 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、血蓝蛋白等 7 个蛋白完全相同。

为了进一步验证所鉴定蛋白, 以兔抗血蓝蛋白抗血清为一抗进行 Western blot 分析, 发现 p65 可与兔抗血蓝蛋白抗体呈明显的阳性反应(图 3)。由此说明, 所鉴定蛋白可靠性较好, 可用于下一步研究与分析。

2.3 LC-MS/MS 鉴定蛋白实时荧光定量 PCR 验证

为了在转录水平进一步验证上述 LC-MS/MS 鉴定结果(表 2, 表 3), 本研究选取血蓝蛋白大亚基、血蓝蛋白小亚基、酚氧化酶原、谷氨酰胺转氨酶、 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、 α 2 巨球蛋白亚型 2、血淋巴凝结蛋白、丙酮酸激酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂、精氨酸激酶和葡聚糖模式识别脂蛋白等 11 个免疫相关基因进行实时荧光定量 PCR 分析。结果如图 4 所示, 与对照组相比, 3 种组织中总计

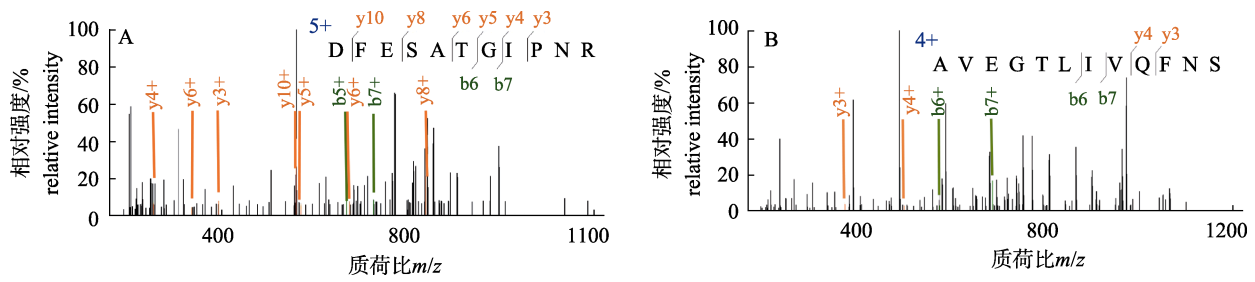


图 2 p65(A)和 p35(B)LC-MS/MS 分析序列图谱

A: 血蓝蛋白; B: 谷氨酰胺转氨酶.

Fig. 2 LC-MS/MS sequencing spectra of p65 (A) and p35 (B)

A: hemocyanin; B: transglutaminase.

表 2 肽段 B1 刺激凡纳滨对虾 24 h 后血浆新增条带 p65 的 LC-MS/MS 鉴定结果

Tab. 2 LC-MS/MS identification of p65 band from *Litopenaeus vannamei* injected with peptide B1 for 24 h

蛋白 protein	蛋白得分 protein Q score	蛋白分子量 protein mass
β -1,3-葡聚糖结合蛋白 β -1,3-glucan-binding protein	168.2935078	163911.485
血淋巴凝结蛋白 hemolymph clottable protein	113.285204	187945.2601
葡聚糖模式识别脂蛋白 glucan pattern-recognition lipoprotein	101.7657039	240627.6144
血蓝蛋白 hemocyanin	80.164632951	74934.4904447004
α 2 巨球蛋白亚型 2 α 2 macroglobulin isoform 2	51.26975639	166166.5717
丝氨酸蛋白酶抑制剂 serine proteinase inhibitor	43.02725628	80293.698
谷氨酰胺转氨酶 transglutaminase	42.89809253	84805.49707
酚氧化酶原 prophenoloxidase	40.7346937	78094.3902
α -1,4-葡聚糖磷酸化酶 α -1,4 glucan phosphorylase	19.37108174	97955.72286
丙酮酸激酶 pyruvate kinase	18.41254715	63740.66055

表 3 肽段 B1 刺激凡纳滨对虾 24 h 后血浆新增条带 p35 LC-MS/MS 鉴定结果

Tab. 3 LC-MS/MS identification of p35 band from *Litopenaeus vannamei* injected with peptide B1 for 24 h

蛋白 protein	蛋白得分 protein Q score	蛋白分子量 protein mass
β -1,3-葡聚糖结合蛋白 β -1,3-glucan-binding protein	79.93939256	163911.485
血蓝蛋白(片段) hemocyanin (fragment)	30.5177104157	77036.1967647004
酚氧化酶原-2 prophenoloxidase-2	23.88797017	78784.56147
丝氨酸蛋白酶抑制剂 serine proteinase inhibitor	23.28158739	80293.698
α 2 巨球蛋白亚型 2 α 2 macroglobulin isoform 2	22.29631606	166166.5717
精氨酸激酶 arginine kinase	20.11811313	40142.3883
血淋巴凝结蛋白 hemolymph clottable protein	11.6023681	187945.2601
胰蛋白酶(片段) trypsin (fragment)	9.486318973	19525.90913
谷氨酰胺转氨酶 transglutaminase	7.2008256	85889.07368
热激蛋白 90 Hsp90	3.6004128	83248.95645

5 种基因表达上调, 6 种基因表达下调。其中, 在血细胞中血蓝蛋白大亚基、血蓝蛋白小亚基 mRNA 表达水平极显著上升($P<0.01$), 在肝胰腺中 α 2 巨球蛋白亚型 2 和谷氨酰胺转氨酶 mRNA 表达水平显著上升($P<0.05$), 在鳃中葡聚糖模式识别脂蛋白和血蓝蛋白大亚基 mRNA 表达水平

分别显著上升($P<0.05$)和极显著上升($P<0.01$)。

3 讨论

本研究以课题组前期获得的抑菌活性较强的源于凡纳滨对虾血蓝蛋白化学合成肽段 B1 为研究对象, 发现其刺激对虾后, 血浆中 2 条分子量

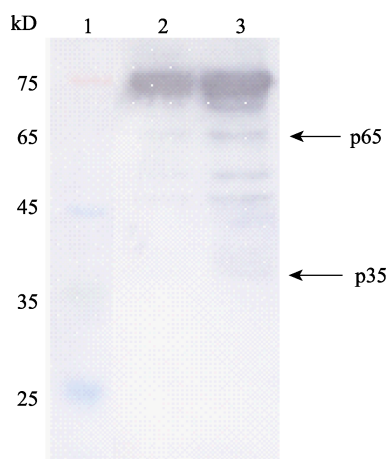


图 3 肽段 B1 刺激 24 h 后凡纳滨对虾血浆 Western blot 分析

1: 标准分子量蛋白; 2-3: 分别为 PBS、肽段 B1 免疫刺激后对虾血浆 Western blot 分析。

Fig. 3 Western blot analysis of plasma from *Litopenaeus vannamei* injected with peptide B1 for 24 h

1: markers; 2-3: Western blot analysis of plasma of *Litopenaeus vannamei* injected with PBS and peptide B1, respectively.

分别为 65 kD 和 35 kD 的蛋白条带表达水平显著上调。经 LC-MS/MS 鉴定和 Western blot 验证, 该 2 条蛋白条带与对虾 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、葡聚糖模式识别脂蛋白、血蓝蛋白等 13 个蛋白具有高度同源性。在此基础之上, 进一步选取包括 β -1,3-葡聚糖结合蛋白、血蓝蛋白大亚基、血蓝蛋白小亚基等在内的 11 个免疫相关基因进行实时荧光定量 PCR 分析, 探索其在转录水平上的表达变化情况, 发现其中 5 个基因(血蓝蛋白大亚基、血蓝蛋白小亚基、谷氨酰胺转氨酶、 α 2 巨球蛋白亚型 2 和葡聚糖模式识别脂蛋白)在肽段 B1 刺激对虾 24 h 后表达水平显著性或极显著性上升, 与蛋白表达水平一致。这些研究结果提示, 源于血蓝蛋白的肽段 B1 可能对包括血蓝蛋白在内的多个免疫因子具有调控活性。

与之类似, 本课题组前期研究发现副溶血弧菌和乙型链球菌刺激凡纳滨对虾 72 h 后, 血蓝蛋白和谷氨酰胺转氨酶基因表达呈正相关关系, 且血蓝蛋白对谷氨酰胺转氨酶基因的表达具有一定的调控作用^[22]。同时, 血蓝蛋白可以与 α 2 巨球蛋白 2 发生相互作用, 且血蓝蛋白对 α 2 巨球蛋白 2 的表达具有一定的促进作用^[23]。Li 等^[24]报道斑节对虾(*Penaeus monodon*)抗菌肽 penaeidin 基因

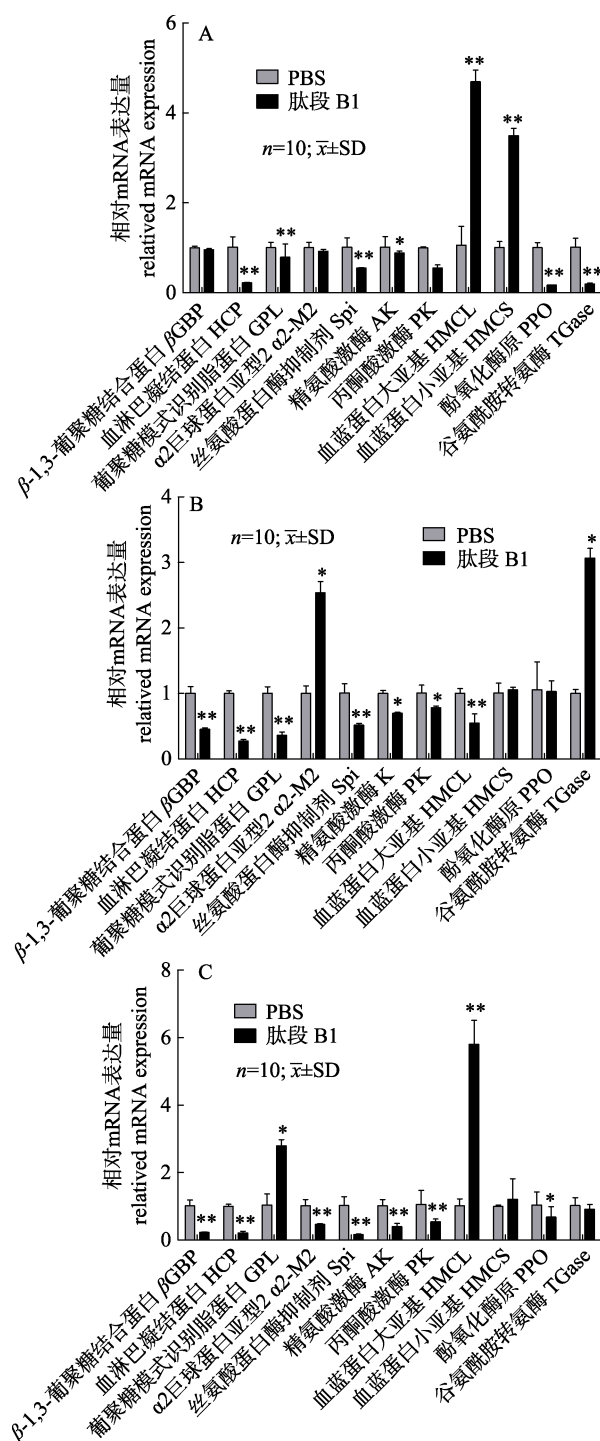


图 4 肽段 B1 刺激对虾 24 h 后不同组织免疫相关基因 mRNA 表达水平变化分析

A. 血细胞; B. 肝胰腺; C. 鳃。*和**表示与 PBS 组相比差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)

Fig. 4 Analysis of mRNA expression levels of different immune related genes in different tissues of *Litopenaeus vannamei* at 24 h after peptide B1 injection
A. Hemocytes; B. Hepatopancreas; C. Gill. * and ** denote significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) with PBS group, respectively.

敲降后血细胞黏附性减少 20%, 整合素- β 和胶原蛋白的表达分别降低 91%和 64%, 胶原酶表达增加 396%, 化学合成 penaeidin 回补后基因表达正常, 说明 penaeidin 具有类似细胞因子的调控功能。由此推测, 肽段 B1 所发挥的免疫调控活性可能与血蓝蛋白大同小异, 两者之间有可能存在相辅相成的关系。

值得一提的是, Western blot 分析发现 p65 蛋白可与兔抗血蓝蛋白抗体呈明显的阳性反应, 结合本课题组最新发现的血蓝蛋白在胰蛋白酶作用下可以降解产生包括 65 kD 在内的多个降解肽段的研究结果^[25], 推测肽段 B1 有可能促进血蓝蛋白大片段降解肽段的产生。Song 等^[26]报道凡纳滨对虾 Janus 激酶(LvJAK)启动子可以由 LvJAK 自身或 LvSTAT 调节, 从而可形成正反馈调节回路。Zhao 等^[27]发现虾 Ran 蛋白可以与 Ran 启动子结合, 通过自身反馈调节调节 Ran 基因的转录。这些研究结果提示, 血蓝蛋白降解片段的产生也可能存在自我调节的正反馈调节机制, 其可能是对虾快速抵御病原微生物的一种新的方式。

综上所述, 本研究主要发现源于血蓝蛋白的化学合成肽段 B1 可能对血蓝蛋白、谷氨酰胺转氨酶、 $\alpha 2$ 巨球蛋白亚型 2、葡聚糖模式识别脂蛋白等免疫因子的表达具有调控活性。所获结果对进一步阐明对虾血蓝蛋白功能性降解肽段的免疫学意义及形成机制具有重要价值, 至于肽段 B1 的具体调控机制等还有待进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] Coates C J, Nairn J. Diverse immune functions of hemocyanins[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 45: 43-55.
- [2] Zhang Z H, Zhang P, Zhang Y L. Advancement on the immune function, molecular basis underlying multifunctionality and application of hemocyanin[J]. Journal of Shantou University (Nature Science), 2016, 31(1): 46-53. [张泽蕙, 张佩, 章跃陵. 血蓝蛋白免疫学功能、分子基础与应用新进展[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2016, 31(1): 46-53.]
- [3] Coates C J, Decker H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74: 293-317.
- [4] Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, et al. Crustacean immunity-antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(50): 47070-47077.
- [5] Petit V W, Rolland J L, Blond A, et al. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2016, 1860(3): 557-568.
- [6] Qiu C W, Sun J, Liu M, et al. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and antimicrobial analysis of two C-terminal fragments[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(1): 46-53.
- [7] Zhang Y L, Ye X Q, Chen J H, et al. A new fragment with 28.5 kD degraded from hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(3): 425-430. [章跃陵, 叶向群, 陈洁辉, 等. 凡纳滨对虾 28.5 kD 血蓝蛋白的降解新片段[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 425-430.]
- [8] Zhang Z H, Huang H, Wen Y, et al. A novel 6.0 kD fragment resistant to *Vibrio parahaemolyticus* derived from shrimp, *Litopenaeus vannamei*, hemocyanin[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 218-224. [张泽蕙, 黄河, 文英, 等. 与凡纳滨对虾抗副溶血弧菌有关的 6.0 kD 血蓝蛋白降解肽段[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 218-224.]
- [9] Wen Y, Zhan S X, Huang H, et al. Identification and characterization of an 18.4kDa antimicrobial truncation from shrimp *Litopenaeus vannamei* hemocyanin upon *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 56: 450-458.
- [10] Huang H. Identification of the hemocyanin-derived fragments from shrimp *Litopenaeus vannamei* and investigation of their antibacterial activities and related-degradation enzymes[D]. Shantou: Shantou University, 2013. [黄河. 凡纳滨对虾血蓝蛋白抗菌降解片段的鉴定、抑菌活性的分析及其相关降解酶的探索[D]. 汕头: 汕头大学, 2013.]
- [11] Yang S, Huang H, Wang F, et al. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Amino Acids, 2018, 50: 995-1005.
- [12] Li C P, Yang J, Huang H, et al. Anti-*Aspergillus niger* activities on the chemical synthesis peptides derived from hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 189-194. [李长平, 杨俊, 黄河, 等. 源于凡纳滨对虾血蓝蛋白化学合成肽段的抗黑曲霉活性[J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 189-194.]

- [13] Jordan J D, Landau E M, Iyengar R. Signaling networks: The origins of cellular multitasking[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 193-200.
- [14] Wang X W, Zhao X F, Wang J X. C-type Lectin binds to β -integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(4): 2405-2414.
- [15] Liu W F, Han F, Zhang X B. Ran GTPase regulates hemocytic phagocytosis of shrimp by interaction with myosin[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(3): 1198-1206.
- [16] del Campo M, Arancibia S, Nova E, et al. Hemocyanins as immunostimulants[J]. *Revista Medica de Chile*, 2011, 139(2): 236-246.
- [17] Havanapan P O, Kanlaya R, Bourchookarn A, et al. C-terminal hemocyanin from hemocytes of *Penaeus vannamei* interacts with ERK1/2 and undergoes serine phosphorylation[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(5): 2476-2483.
- [18] Wang Y C, Chang P S, Chen H Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(6): 1161-1177.
- [19] Yue F, Pan L Q, Xie P, et al. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157: 246-251.
- [20] Wen Y, Cao J S, Zhang Z H, et al. The effect of immune enhancement-related genes in mud crab, *Scylla paramamosain*, stimulated with rhubarb polysaccharides[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(3): 387-392. [文英, 曹劲松, 张泽蕙, 等. 大黄多糖对拟穴青蟹免疫相关基因表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(3): 387-392.]
- [21] Kamikawa R, Nagai S, Hosoi-Tanabe S, et al. Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments[J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(3): 413-420.
- [22] Wang Z H. Investigation of the proteins interaction with hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei*[D]. Shantou: Shantou University, 2014. [王泽焕. 凡纳滨对虾血蓝蛋白相互作用蛋白的研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2014.]
- [23] Chen X B. Investigation of the interaction between α 2-macrogloblin and hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei*[D]. Shantou: Shantou University, 2015. [陈希斌. 凡纳滨对虾 α 2-巨球蛋白与血蓝蛋白相互作用的研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2015.]
- [24] Li C Y, Yan H Y, Song Y L. Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) penaeidin possesses cytokine features to promote integrin-mediated granulocyte and semi-granulocyte adhesion[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 8(1): 1-9.
- [25] Li C P, Wang F, Aweya J J, et al. Trypsin of *Litopenaeus vannamei* is required for the generation of hemocyanin-derived peptides[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 79: 95-104.
- [26] Song X, Zhang Z J, Wang S, et al. A Janus Kinase in the JAK/STAT signaling pathway from *Litopenaeus vannamei* is involved in antiviral immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 662-673.
- [27] Zhao Z, Wang J J, Zhang X B. Feedback regulation of Ran gene expression by Ran protein[J]. *Gene*, 2011, 485(2): 85-90.

Immunological regulatory properties of chemically synthesized peptides from the hemocyanin of shrimp *Litopenaeus vannamei*

TAO Mengyuan, LI Changping, LUN Jingsheng, ZHONG Mingqi, CHEN Jiehui, ZHANG Yueling

Department of Biology and Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou University, Shantou 515063, China

Abstract: Previous studies have demonstrated that chemically synthesized peptides from the hemocyanin of the shrimp *Litopenaeus vannamei* possess antibacterial activities. However, to date, little is known about their immune regulatory function. In this study, a chemically synthesized peptide, B1, from the hemocyanin of shrimp *L. vannamei* was investigated using proteomics, molecular biology, and immunological strategies. The results showed that, compared with the control, two protein bands with sizes 65 kD and 35 kD (designated as p65 and p35, respectively) were significantly upregulated in shrimp plasma following stimulation with peptide B1. LC-MS/MS and Western blot analyses revealed that p35 and p65 shared a high degree of homology with 13 proteins, including hemocyanin, β -1,3-glucan-binding protein, and transglutaminase. Moreover, p65 could bind specifically to rabbit anti-shrimp hemocyanin antibody. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that five LC-MS/MS-identified genes, including hemocyanin large subunit, hemocyanin small subunit, transglutaminase, α 2 macroglobulin, and glucan pattern-recognition lipoprotein, were significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) upregulated in shrimp hepatopancreas, gills, and hemocytes following stimulation with peptide B1. Collectively, our data demonstrated that peptide B1, chemically synthesized from hemocyanin of the shrimp *L. vannamei*, may possess regulatory properties and induce the expression of different immunological factors including hemocyanin.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; hemocyanin; peptide B1; immunological regulation

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