

文章编号:1005-8737(2000)04-0014-05

中国对虾血淋巴液中的凝集素

彭其胜, 郭文场, 杨振国, 王玉平

(中国人民解放军军需大学动物科技系, 吉林 长春 130062)

摘要: 用饱和硫酸铵盐析、S-200-HR 凝胶层析、DEAE-sepharose 离子交换层析从中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 血淋巴液中分离出 1 种凝集素, 通过 SDS-PAGE 测定, 该凝集素由 2 个亚基组成, 分子量分别为 80 000、75 000; 此凝集素能凝集牛、马、鼠、兔、鸡、羊和人 A、B、O 型红细胞, 其凝集活性不被 D-甘露糖、D-果糖、D-乳糖、乙酰半乳糖、神经氨酸、D-葡萄糖、D-半乳糖和 D-岩藻糖抑制; 其最适血凝 pH 为 6~8, Ca^{2+} 不影响其凝集活性。

关键词: 中国对虾; 血淋巴液; 凝集素; 纯化

中图分类号: Q959.223; Q592.3

文献标识码: A

凝集素广泛存在于植物、动物及微生物体内, 是指所有非免疫原的能凝集细胞或沉淀含糖大分子的蛋白质或糖蛋白, 一般具有糖结合专一性, 能与糖蛋白或糖脂的糖相结合^[1], 它具有多种生理生化功能, 如细胞识别、细胞间的粘附, 受体介导的胞饮等均可能有凝集素的参加。更重要的是, 人们发现海产无脊椎动物血淋巴液中存在的凝集素具有替代免疫球蛋白的功能, 在识别异物等机体防御中发挥着重要作用^[2]。海产无脊椎动物凝集素的研究迄今已有不少报道^[2~8], 但对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 凝集素的研究较少^[9~11]。本文报道中国对虾血淋巴液中凝集素对红细胞的凝集活性、单糖半抗原性及分离纯化的研究结果。

1 材料与方法

1.1 中国对虾血淋巴液的采集

实验用虾采自中国人民解放军天津警备区八一盐场, 体长 10~13 cm, 体重 20~25 g。用经高压灭菌的 1 ml、5 号针头注射器从中国对虾围心腔内抽取血样, 置于 2 ml eppendorf 管, 经 3 000 r/min 离心

10 min, 取出上清液(血淋巴液), -20℃ 保存。

1.2 中国对虾凝集素的分离纯化

1.2.1 盐析 将冷冻在 -20℃ 的血淋巴液置室温解冻后, 溶解在 45% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液中, 振荡、搅拌混匀, 置 4℃ 冰箱过夜, 用 3 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 其沉淀溶解在蒸馏水中。

1.2.2 离子交换层析 取 DEAE-sepharose (fast flow) 经处理后, 用 pH 7.8 BPS (0.1 mol/L Tris·HCl - 0.1 mol/L NaCl - 0.02 mol/L CaCl_2) 平衡装柱 (2.5 cm × 50 cm) 备用。后将上述盐析粗提液用 0.1 mol/L BPS 溶解和平衡透析, 8 000 r/min 离心 20 min 去不溶物, 上清液用于 DEAE-sepharose 离子交换层析, 用离子强度 0.1~0.5 mol/L 的 BPS 进行线性离子梯度洗脱, 分部收集, 流速为 0.6 ml/min, 经 280 nm 检测和凝血活性测定后, 收集蛋白峰。

1.2.3 凝胶层析 将经离子交换层析的蛋白质盐溶液加到已清洗并用 BPS 充分平衡的 S-200-HR 层析柱内, 用 0.1 mol/L BPS 洗脱, 控制流速在 3 ml/5 min, 经 280 nm 检测和凝血活性测定后, 收集蛋白峰, 透析除盐、浓缩, 得中国对虾凝集素纯品。

1.3 血凝活性测定

以 Alsever's 液为抗凝剂分别采取鸡、兔、牛、马、羊、鼠及人 A、B、O 型血, 用 0.9% 生理盐水充分

收稿日期: 2000-07-05

作者简介: 彭其胜 (1969-), 男, 中国人民解放军军需大学动物科技系讲师, 硕士, 从事水产微生物及免疫学。

洗涤,然后 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,重复 4 次洗涤,最后 1 次 2 500 r/min 离心 3 min,用 0.9% 生理盐水配制成体积分数 2% 的红细胞悬液,置于 4℃ 冰箱,备用。

用 0.9% 生理盐水将中国对虾凝集素稀释至原血淋巴液体积,在微型“V”型血凝板上用 0.9% 生理盐水 25 μ l 对中国对虾凝集素稀释液或中国对虾血淋巴液 25 μ l 进行倍比稀释,加入相应的红细胞,在微型振荡器上振荡 1 min 之后,在室温下静置 1 h 或在 4℃ 冰箱静置 4 h,观察结果。如红细胞不发生凝集,则在“V”型板的孔内沉于孔底形成一界线清晰的红色小点;如发生凝集,红细胞之间形成一似网络状扩散的红色斑块。

1.4 糖抑制血凝试验

取 8 种常见能抑制昆虫凝集素的单糖,用生理盐水分别配成 0.3 mol/L 浓度,取 25 μ l 对虾凝集素置于“V”型血凝板小孔中,用 0.9% 生理盐水依次作 2 倍稀释后,每孔加入 25 μ l 0.3 mol/L 糖液,静置 0.5 h,再加入 25 μ l 2% 鸡红细胞,室温下静置 2 h 后,检查凝集情况。

1.5 中国对虾凝集素亚基分子量的测定

亚基分子量在 SDS-PAGE 上测定,在 pH 8.3 Tris-甘氨酸缓冲液中电泳,分离胶浓度为 10%,积层胶浓度为 5%,电泳 4 h,开始电压为 8 V/cm,最后稳定在 15 V/cm,考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇-乙酸-水退色保存^[12]。同时用牛血清白蛋白、磷酸化酶、卵白蛋白、碳酸酐酶、胰蛋白酶、溶菌酶作标准蛋白,退色后以分子量对数对 R_f (相对迁移率)作标准曲线,计算出中国对虾凝集素的亚基分子量。

1.6 影响凝集活性的因素试验

温度试验:凝集素在 -70℃、-20℃、4℃、20℃、37℃ 下分别保存不同时间,以新鲜的凝集素作对照测凝集活力。pH 试验:参照王雷的配方配制对虾生理盐水^[13],以酸碱调节,配制 pH 3~10 的对虾生理盐水,测定凝集素在不同 pH 下的凝集活力。 Ca^{2+} 试验:用 0.9% 生理盐水配制 0.01 mol/L $CaCl_2$ 和不含 $CaCl_2$ 的溶液作为血凝缓冲液测凝集活力。凝集用红细胞为鸡红细胞。

2 结果

2.1 中国对虾凝集素的分离和纯化结果

中国对虾血淋巴液经稀释、硫酸铵盐析,DEAE-sepharose 线性离子梯度洗脱,获得 3 个蛋白峰,第 2

峰具有强凝集活性(图 1)。将此峰再进行 S-200-HR 分子筛柱层析,可获 3 个蛋白峰,经凝集活性检测,仅第 2 峰有强凝集活性,收集此活性峰,透析除盐、浓缩后,得中国对虾凝集素样品纯品(图 2)。

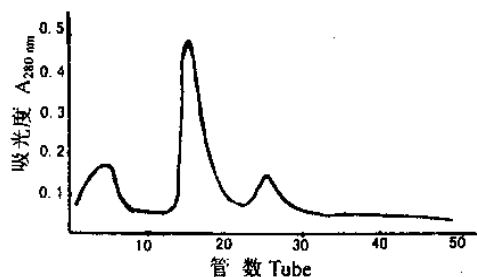


图 1 中国对虾凝集素在 DEAE-sepharose 柱上的离子梯度洗脱

Fig.1 The plot of linear-gradient system for *P. chinensis* agglutinin on DEAE-sepharose column

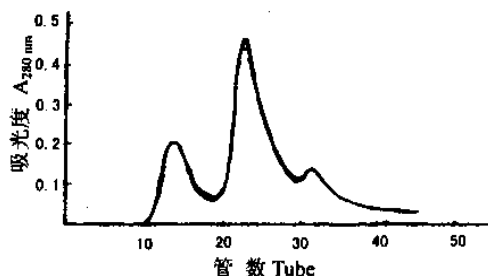


图 2 中国对虾凝集素在 S-200-HR 柱上的层析

Fig.2 Chromatography of *P. chinensis* agglutinin on S-200-HR column

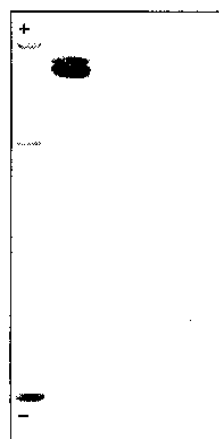


图 3 中国对虾凝集素的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of *P. chinensis* agglutinin (left: standard protein, right: *P. chinensis* agglutinin)

2.2 中国对虾凝集素亚基分子量

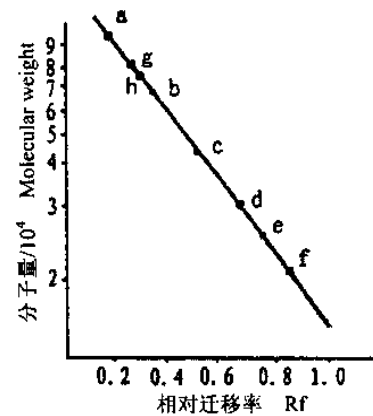
SDS-PAGE 测得中国对虾凝集素由 2 个亚基组成(图 3),对 SDS-PAGE 凝胶进行薄层扫描分析,这 2 个亚基的含量为 96%,说明上述纯化步骤所得的样品是中国对虾凝集素纯品。与标准蛋白的相对迁移率(R_f)直线相比较,测得亚基分子量分别为 80 000、75 000(图 4)。

2.3 中国对虾凝集素和血淋巴的血凝活性

从表 1 可知,中国对虾凝集素对鸡、兔、人 A、B、O 型红细胞的凝集效价最高,对牛、鼠红细胞凝集效价次之,对羊、马红细胞的凝集活性最低。中国对虾血淋巴液对上述 9 种红细胞的凝集没有专一性,凝集活力均为 2^{-5} 。

2.4 温度、 Ca^{2+} 及 pH 对凝集活性的影响

不同温度处理的中国对虾凝集素表明, -70°C 、 -20°C 保存半年活力不变, 4°C 保存半个月活力不变, 20°C 保存 24 h 活力不变, 37°C 保存 2 h 活力不变。血凝生理盐水的最佳 pH 为 6~8, Ca^{2+} 不影响凝集活性。



标准蛋白 Standard proteins: a. 磷酸化酶 Phosphorylase(94 000); b. 牛血清白蛋白 Bovine serum albumin(67 000); c. 肌动蛋白 Actin(43 000); d. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase(30 000); e. 胰蛋白酶 Trypsin(23 000); f. 溶菌酶 Lysozyme(14 500).

图 4 中国对虾凝集素的亚基分子量

Fig. 4 Molecular weight of subunit of *P. chinensis* agglutinin (g: 80 000, h: 75 000)

表 1 中国对虾凝集素和中国对虾血淋巴液对不同供血动物的血凝结果

Table 1 Hemagglutinating activity of *P. chinensis* agglutinin and hemolymph to erythrocytes from different animal

血细胞 Erythrocyte	中国对虾凝集素和中国对虾血淋巴液在“V”型板上的倍比稀释 Serial 2-fold dilution of <i>P. chinensis</i> agglutinin and hemolymph in microtiter V-plate							
	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6}	2^{-7}	2^{-8}
人 A Human A	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	-	-
人 B Human B	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
人 O Human O	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
牛 Bovine	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
鼠 Rat	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
兔 Rabbit	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
鸡 Chicken	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
羊 Sheep	+	+	+	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
马 Horse	+	+	+	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-

注: 每组上行为中国对虾凝集素的凝集活力, 下行为中国对虾血淋巴液的凝集活力。The upper data refer to hemagglutinating activity of *P. chinensis* agglutinin in each erythrocyte's group; the lower data refer to hemagglutinating activity.

2.5 中国对虾凝集素糖抑制血凝结果

从表 2 可知, 这 8 种常见能抑制昆虫凝集素的

单糖对中国对虾凝集素无抑制作用。

表 2 不同单糖对中国对虾凝集素的凝集活性抑制作用

Table 2 Inhibition on hemagglutinating activity of *P. chinensis* agglutinin by different sugars

项目 Item	中国对虾凝集素在“V”型板上的倍比稀释 Serial 2-fold dilution of <i>P. chinensis</i> agglutinin in microtiter V-plate							
	2 ⁻¹	2 ⁻²	2 ⁻³	2 ⁻⁴	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸
对照组 Control	+	+	+	+	+	+	+	-
D-甘露糖 D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	-
D-果糖 D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	-
D-乳糖 D-lactose	+	+	+	+	+	+	+	-
乙酰半乳糖 GalNAC	+	+	+	+	+	+	+	-
神经氨酸 Neuraminic acid	+	+	+	+	+	+	+	-
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	-
D-半乳糖 D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	-
D-岩藻糖 D-fucose	+	+	+	+	+	+	+	-

注:上述凝集红细胞都为鸡红细胞。Only chicken erythrocyte was used in inhibition experiment.

3 讨论

(1) 通过硫酸铵盐析, S-200-HR、DEAE-sephrose(fast flow)层析, 从中国对虾血淋巴液中分离出由分子量为 80 000、75 000 两个亚基组成的凝集素。虽然 Vargas-Albores F^[14]从白虾的血淋巴液用亲和层析纯化出分子量为 100 000 的凝集素, Tsuboi I^[17]用亲和层析从马蹄蟹血淋巴液中纯化出 533 000 的凝集素, Kawabata S^[8]用亲和层析从马蹄蟹血淋巴液纯化出 5 种凝集素, 以及国内外学者^[15-21]用亲和层析从昆虫体内纯化出多种凝集素, 但是一般抑制昆虫凝集素的糖类不抑制中国对虾血淋巴液的凝集活性, 导致寻找中国对虾凝集素的糖半抗原的困难。因此, 在试验中很难设计亲和层析。笔者认为, 只要选择适当的硫酸铵饱和度、凝胶层析、离子梯度层析, 也可从中国对虾血淋巴液中提纯出理想的凝集素。

(2) 继从蓖麻籽提取液中发现凝集素以后, 人们观察到凝集素的血凝活力, 并通过被凝集的血细胞的来源而异证明了凝集素的血凝作用具有供血动物种属专一性^[1]。但不是所有凝集素都有这种性质, Hall^[2,3]从龙虾血淋巴液中分离出 2 种凝集素 (LAG-1, LAG-2), LAG-1 对血细胞凝集没有专一性, LAG-2 只对鼠红细胞有凝集活性。Koji Muramoto^[4-6]从海产紫藤壶中分离出的 3 种凝集素 (BRA-1, BRA-2, BRA-3) 对血细胞的凝集不统一, 其中 BRA-1、BRA-2 能凝集的红细胞种类较多, BRA-3 具有专一性。作者分离出的这种中国对虾凝集素能凝集多种脊椎动物红细胞, 且被凝集红细胞种属差异不明显。

(3) 凝集素通过与细胞表面糖蛋白中的特异性糖基相结合, 形成细胞间桥梁, 导致细胞被凝集。绝大多数凝集素都有专一的糖结合点, 但也有例外, PHA *Phaseolus vulgaris* lectin^[1]的生物活性不被任何一种单糖或均一寡聚糖抑制; 常见的糖类对厚果鸡血藤凝集素无明显的抑制作用^[1]; 牟海津等^[11]在研究糖类对中国对虾血细胞凝集素的抑制作用时, 没有发现抑制现象, 这种结果与表 2 结果一致。虽然这 8 种常见能抑制昆虫凝集素的单糖不能抑制中国对虾凝集素的凝集活性, 但不能肯定中国对虾凝集素不能被糖抑制。因此, 寻找能抑制中国对虾凝集素的单糖尚需进一步试验。

参考文献:

- [1] 孙 册, 朱 政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 1-5.
- [2] James L H, David T, Rowland J. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. specificity of agglutinin-erythrocyte binding[J]. Biochemistry, 1974a, 13(4): 828-832.
- [3] James L H, David T, Rowland J. Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and Physicochemical characterization[J]. Biochemistry, 1974b, 13(4): 821-827.
- [4] Koji Muramoto, Ryusuki Kado, Yoshio Takei, et al. Seasonal changes in the multiple lectin compositions of the acorn barnacle megabalanus rosa as related to ovarian development[J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 98B(4): 603-607.
- [5] Koji Muramoto, Hirshi Yako, Hisao Kamiya. Multiple lectins as major proteins in the coelomic fluid of the acorn barnacle megabalanus rosa[J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 107B(3): 405-409.
- [6] Koji Muramoto, Hirshi Yako, Koji Marakami, et al. Inhibition of the growth of calcium carbonate crystals by multiple lectins in the coelomic fluid of the acorn barnacle megabalanus rosa[J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 107B(3): 401-409.

- [7] Tsuboi I, Sato N, Kimuras. Isolation and characterization of a sialic acid - specific binding lectin from the hemolymph of Asian horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus* [J]. Biochim Biophys Acta, 1993 Mar 21, 1156(3):255-262.
- [8] Kawabatas, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab [J]. Dev Comp Immunol, 1999 Jun-Jul, 23(4-5): 401-400.
- [9] 罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J]. 海洋与湖泊, 1997, 28(6):573-576.
- [10] 罗日祥. 中国对虾凝集活力及弧菌的诱导动力学[J]. 海洋学报, 1997, 19(4):
- [11] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 中国对虾血细胞凝集素的性能研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3):32-35.
- [12] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 880-887.
- [13] 王 雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖泊, 1995, 26(2):179-184.
- [14] Vargas-Albores F. Purification and comparison of beta-1, 3- glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol, 1997 Apr, 116(4):453-458.
- [15] 朱呈智, 李海峰, 赵 刚, 等. 亚洲玉米螟血细胞表面凝集素受体的探测[J]. 昆虫学报, 1994, 37(1):125-126.
- [16] 王 霁, 李根君, 段吉群, 等. 舍蝇(*Musca domestica vicina*)凝集素的分离、纯化和部分性质研究[J]. 生物化学杂志, 1991, 7(1):47-53.
- [17] 朱呈智, 孙 勇. 粘虫血淋巴中的凝集素[J]. 昆虫学报, 1992, 35(4):399-404.
- [18] Kurt Drickamer. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins [J]. The Journal of Biological chemistry, 1988, 263(20):9 557-9 560.
- [19] Michel Brehelin. Hemolymph coagulation in locusta migratoria: evidence for a functional equivalent of fibrinogen [J]. Comp Biochem Physiol, 1979, 62B:329-334.
- [20] Dirk Stynen, Karin Vansteenwgen, Arnold de Loof. Anti-galactose lectins in the haemolymph of sarcophagi bullata and three other caliphorid flies [J]. Comp Biochem physiol, 1985, 81B(1): 171-175.
- [21] Hiroto Komano, Den'ichi Mizuno, Shunji Natori. A possible mechanism of induction of insect lectin [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(14):7 087-7 089.

Agglutinin in hemolymph of *Penaeus chinensis*

PENG Qi-sheng, GUO Wen-chang, YANG Zhen-guo, WANG Yu-ping

(Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: Agglutinin with hemagglutinating activity was found in hemolymph of *Penaeus chinensis*. By extraction, fraction with saturated ammonium sulfate precipitation, linear gradiention-exchange chromatography on DEAE-sepharose and followed by gel filtration on S-200-HR, an agglutinin was purified from the hemolymph of *P. chinensis*. The purified agglutinin showed 2 bands on SDS-PAGE, and the molecular weights of these sub-units were 80 000 and 75 000, respectively. As a kind of lobster agglutinin(LAG), *P. chinensis* agglutinin does not have specific hemagglutination to certain erythrocyte, but is able to agglutinate the erythrocytes of bovine, horse, sheep, rat, rabbit, chicken and A, B, O-types of erythrocytes, respectively. Its hemagglutinating activity isn't specially inhibited by D-mannose, D-fructose, D-lactose, GalNAC, neuraminic acid, D-glucose, D-galactose and D-fucose which can inhibit insect lectin. The agglutinin also showed an optimum hemagglutinating activity over a narrow range of pH 6~8, and the hemagglutination was not dependent on Ca^{2+} .

Key words: *Penaeus chinensis*; hemolymph; agglutinin; purification