

南美白对虾血蓝蛋白对酚氧化酶活性的影响

章跃陵^{1,2}, 王三英¹, 刘光明², 陈 粤², 邹湘辉²

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 汕头大学 理学院生物学系, 广东 汕头 515063)

摘要:以采自厦门的南美白对虾(*Penaeus vannamei*)为研究对象,运用病原菌人工感染、血蓝蛋白浓度和酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性测定等方法探索南美白对虾血蓝蛋白在体内、外对其血清酚氧化酶活性的影响。结果表明,南美白对虾人工感染副溶血弧菌后,其血淋巴中血蓝蛋白浓度和PO活性的变化趋势基本一致。在体外实验中将一定量的血蓝蛋白重组蛋白添加至血清中,其PO活性可明显升高;但同时添加血蓝蛋白重组蛋白和 *E. coli* K12 超声破碎液后,其PO活力反而降低。研究提示,血蓝蛋白在一定范围内确实可以正反馈调节PO活性,但在细菌等干扰之下,其又可表现出一定的负反馈抑制活性。

关键词:南美白对虾;血蓝蛋白;酚氧化酶活性;反馈调节

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0402-05

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。而酚氧化酶是一种重要的免疫分子,广泛存在于动物、植物和真菌中。它不仅参与伤口的愈合、皮肤色素的合成和果实的着色,以及昆虫外骨骼的骨化作用,而且具有免疫识别和免疫防御作用^[1-3]。近年来研究证实,血蓝蛋白不仅与酚氧化酶在物理化学性质^[4]、基因序列^[5]、蛋白质一级结构和三级结构^[6]等方面非常相似,而且在一定的条件下还可表现出酚氧化酶活性^[7-11]。为此,一些学者甚至认为血蓝蛋白可能由酚氧化酶进化而来^[14-15],其两者的比较研究正引起学术界的高度关注。而迄今为止,国内、外尚未见报道有关血蓝蛋白对酚氧化酶活性影响的研究。本研究采用测定酚氧化酶活性的方法,探索血蓝蛋白在体内、外对酚氧化酶活性的影响,为进一步研究血蓝蛋白的免疫学功能,丰富虾类免疫系统研究,探索对虾疾病免疫学防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

南美白对虾(*Penaeus vannamei*)购于厦门大学菜市场,体长约10 cm。

副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和大肠杆菌

(*E. coli* K12)均为厦门大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室保存菌种。

血蓝蛋白重组蛋白由厦门大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室克隆与表达。

1.2 方法

1.2.1 虾血清的制备 按王雷等的方法进行^[16]。用1 mL注射器直接从南美白对虾心脏抽取血淋巴,4℃冰箱过夜,3 000 r/min离心20 min,于-20℃保存备用。

1.2.2 感染菌液的制备 将副溶血弧菌接种至肉汤培养基,37℃培养过夜,3 000 r/min离心20 min,弃上清,用无菌生理盐水(0.85%)洗涤2次,经血球计数板法显微计数,将菌液稀释为 5.0×10^7 CFU/mL,于4℃保存备用。

1.2.3 南美白对虾人工感染 将实验对虾分为对照组(A组)和实验组(B组),分别取0.1 mL 0.85%的无菌生理盐水和1.2.2制备的菌液于南美白对虾第2腹节处进行肌肉注射,并分别于注射后6 h、12 h、24 h和36 h随机挑取5尾虾取其血淋巴,制备混合血清,于4℃保存备用。

1.2.4 大肠杆菌K12超声破碎液的制备 取100 mL LB培养基常规培养 *E. coli* K12,于4℃5 000 r/min离心10 min收集菌体,用生理盐水洗涤菌体3次;将细菌重悬于3 mL 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,

收稿日期:2004-08-23;修订日期:2004-12-08。

基金项目:国家“863”计划项目基金(2002AA629050);广东省自然科学基金(博士启动基金)资助项目(130-122187)。

作者简介:章跃陵(1971-),男,博士,主要从事海洋分子免疫学研究。E-mail:zhangyuelun@vip.sina.com

1 mmol/L EDTA 中,反复冻融数次,于 0℃ 用 50% 功率超声处理 6 次,每次 20 s,小量分装,于 -20℃ 保存备用。

1.2.5 酚氧化酶(PO)活性的测定 采用 Ashida (1971)方法^[17],以 L-dopa 为底物,将 3 mL 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸钾缓冲液与 50 μ L 0.01 mol/L L-dopa 及 50 μ L 南美白对虾血清于室温下混匀,每隔 3 min 读取 490 nm 波长下的光密度值(OD₄₉₀),以 OD₄₉₀ 对反应时间作图,以实验条件下每分钟 OD₄₉₀ 增加 0.001 为 1 个酶活力单位。

1.2.6 虾血清中血蓝蛋白浓度的测定 采用 Johnson 等方法^[18],以 10 mmol/L CaCl₂、50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 为稀释液对南美白对虾血清进行 1:10 稀释,用 GENESYS TM 2 分光光度计分别测定其 280 nm 下和 334 nm 下光密度值 OD₂₈₀ 和 OD₃₃₄,按 $E_{280\text{nm}}=13.5$ 和 $E_{334\text{nm}}=2.30$ 计算血蓝蛋白浓度(mg/mL)。

1.2.7 血蓝蛋白体内对酚氧化酶活性的影响 取 A 组和 B 组 6 h、12 h、24 h 和 36 h 的混合血清,运用 1.2.5 和 1.2.6 方法测定其血蓝蛋白浓度和 PO 活性,以 Microsoft Excel 作图分析不同时段血蓝蛋白浓度和酚氧化酶活性之间的关系。

1.2.8 血蓝蛋白体外对酚氧化酶活性的影响 以血蓝蛋白重组蛋白为材料,采用 1.2.5 方法,测定血蓝蛋白体外对南美白对虾血清酚氧化酶(PO)活性的影响,将实验分为对照组(a 组)、实验一组(b 组)、实验二组(c 组)和实验三组(d 组)共 4 组进行。a~d 组组分如下,a 组:50 μ L 南美白对虾血清 + 50 μ L 0.01 mol/L pH 7.4 PBS;b 组:50 μ L 南美白对虾血清 + 25 μ L 0.01 mol/L pH 7.4 PBS + 25 μ L 200 μ g/mL 血蓝蛋白重组蛋白;c 组:50 μ L 南美白对虾血清 + 25 μ L 0.01 mol/L pH 7.4 PBS + 25 μ L 35 mg/mL *E. coli* K12 超声破碎液;d 组:50 μ L 南美白对虾血清 + 25 μ L 200 μ g/mL 血蓝蛋白重组蛋白 + 25 μ L 35 mg/mL 大肠杆菌 K12 超声破碎液。

2 结果与分析

2.1 血蓝蛋白体内对血清酚氧化酶活性的影响

采用 Johnson 等方法^[18]和 Ashida 方法^[17],分别测定 A 组和 B 组 6 h、12 h、24 h 和 36 h 混合血清血蓝蛋白浓度和酚氧化酶活性(PO)。结果发现,与 A 组相比,B 组血蓝蛋白浓度在 6~24 h 呈上升趋势,

此后逐渐下降,至第 36 h 两者趋于一致(图 1)。与之类似,B 组 PO 活性在注射后 6 h 缓慢下降,但 12 h 后急剧上升,24 h PO 活力最高,以后随着时间的延长迅速下降,至第 36 h 和 A 组趋于一致(图 1~3)。由此可以认为,血清中 PO 活力的高低与其血蓝蛋白浓度的大小有关。

2.2 血蓝蛋白体外对血清酚氧化酶活性的影响

采用 Ashida 方法^[17],测定血蓝蛋白体外对酚氧化酶活性的影响,结果表明,与 a 组相比,b 组和 c 组血清中的 PO 活力均升高,而 d 组血清中的 PO 活力却反而降低。酶活力单位分别为:a 组,0.83;b 组,1.389;c 组,1.33;d 组,0.72(图 4、5)。经 F 检验,b、c 和 d 3 组之间具有极显著性差异($P<0.01$)。

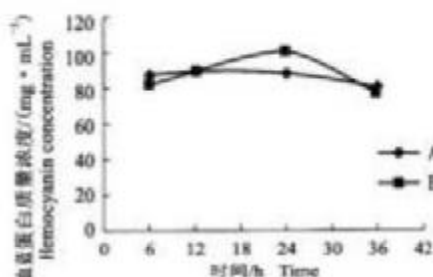


图1 南美白对虾感染副溶血弧菌后血清血蓝蛋白的浓度变化

A: 对照组; B: 实验组

Fig.1 Variation of hemocyanin concentration in *P. vannamei* after injection of *V. parahaemolyticus*
A: Control group; B: Experimental group

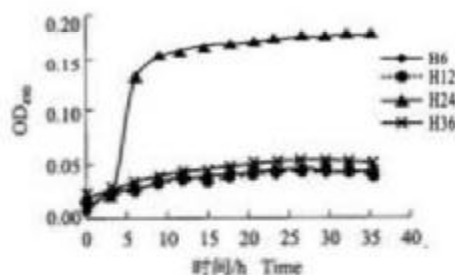


图2 南美白对虾感染副溶血弧菌后血清酚氧化酶活力动力曲线

注:曲线 H6、H12、H24、H36 分别为 6 h、12 h、24 h 和 36 h 血清酚氧化酶活性动力曲线图

Fig.2 Kinetic curve of PO activity in serum of *P. vannamei* after injection of *V. parahaemolyticus*

Note: Series H6, H12, H24, H36 are curves of PO activities with hemolymph obtained at 6 h, 12 h, 24 h and 36 h, respectively

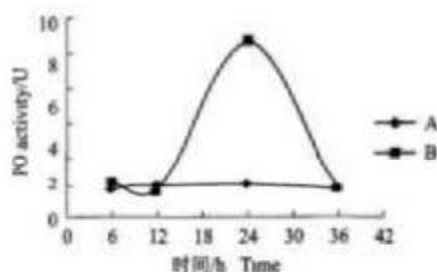


图3 南美白对虾感染副溶血弧菌后血清中酚氧化酶活力的变化

A: 对照组; B: 实验组

Fig.3 PO activity unit variety analysis in serum obtained from *P. vannamei* after injection of *V. parahaemolyticus*
A: Control group; B: Experimental group

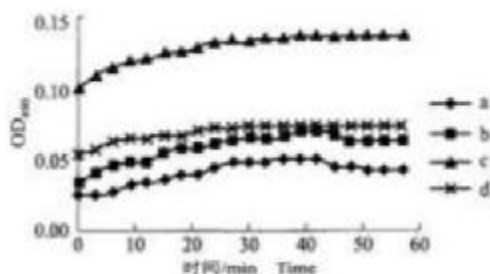


图4 南美白对虾血清蛋白重组蛋白对其血清酚氧化酶活力影响的动力曲线

a: 对照组; b: 血清中添加血蓝蛋白重组蛋白; c: 血清中添加 *E. coli* K12 超声破碎液; d: 血清中同时添加血蓝蛋白重组蛋白和 *E. coli* K12 超声破碎液

Fig.4 Kinetic curve of PO activity of *P. vannamei* serum appended different materials

Series a: Control group; Series b: Appended hemocyanin recombinant protein; Series c: Appended sonicated cells of *E. coli* K12; Series d: Appended both hemocyanin recombinant protein and sonicated cells of *E. coli* K12

3 讨论

血蓝蛋白是一种多功能蛋白,它不仅具有输氧功能,而且具有免疫防御功能。尤其值得一提的是,它在一些化学试剂如 percholate、trypsin 和 SDS^[7-9],生物防御分子如黏附分子和抗菌肽^[10-11],以及血细胞组成成分的作用下可表现出类似于酚氧化酶的功能^[12],甚至其亚基或功能单位在蛋白酶或 SDS 的诱导下也可表现出不同程度的酚氧化酶活性^[13]。但到目前为止,尚未见有关血蓝蛋白对血清酚氧化酶活性影响的报道。本研究以南美白对虾血清为研究对象,分体内和体外两个方面探索血蓝蛋白对血清酚氧化酶活性的影响,对阐明血蓝蛋白这

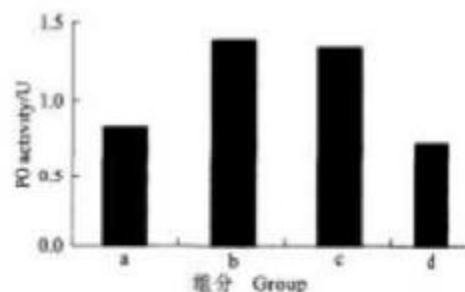


图5 南美白对虾血清蛋白重组蛋白对其血清酚氧化酶活力的影响

a: 对照组; b: 血清中添加血蓝蛋白重组蛋白; c: 血清中添加 *E. coli* K12 超声破碎液; d: 血清中同时添加血蓝蛋白重组蛋白和 *E. coli* K12 超声破碎液

Fig.5 PO activity comparative analysis of *P. vannamei* serum appended different materials

a: Control group; b: Appended hemocyanin recombinant protein; c: Appended sonicated cells of *E. coli* K12; d: Appended both hemocyanin recombinant protein and sonicated cells of *E. coli* K12

一多功能蛋白的免疫学机理及其与酚氧化酶的关系具有重要意义。

为了探索血蓝蛋白对血清酚氧化酶活性的影响,首先分别测定南美白对虾在注射副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 后 6 h、12 h、24 h 和 36 h 混合血清中的血蓝蛋白浓度及其对应的酚氧化酶活性。结果表明,南美白对虾在受到副溶血弧菌攻击后血蓝蛋白浓度的变化趋势与本实验同时所测的血清酚氧化酶活性变化趋势基本一致,两者在注射 12 h 之内会发生轻微的浮动,但随后逐渐上升,24 h 达到最高点之后又逐渐下降,36 h 又恢复到正常水平(图 2、3)。由此说明,血蓝蛋白确实与血清酚氧化酶密切相关,其浓度的变化可在一定程度上影响酚氧化酶活性的变化。

在本课题研究中,发现血蓝蛋白重组蛋白同样具有生物学活性,与天然血蓝蛋白具有相同的生物学功能(另文发表)。据此,在体内实验的基础上,为了进一步探索血蓝蛋白体外对酚氧化酶活性的影响,以血蓝蛋白重组蛋白为材料,分别测定在虾血清中添加血蓝蛋白重组蛋白、*E. coli* K12 超声破碎液及其两者混合后对南美白对虾血清酚氧化酶(PO)活性的影响。结果显示,血蓝蛋白重组蛋白可促进血清 PO 活力的提高,与本研究在体内实验中所发现的血蓝蛋白对 PO 活力影响的结论一致。由此说明,血蓝蛋白在一定范围内确实可以促进 PO 活性的提高,其对 PO 活性具有正反馈调节作用。但有

意思的是,血蓝蛋白重组蛋白和 *E. coli* K12 超声破碎液的混合物非但不能促进血清 PO 活性的提高,反而促使其 PO 活性的降低(图 5)。该现象可能是由于血蓝蛋白重组蛋白和 *E. coli* K12 的相互作用,从而抑制了血清 PO 系统的激活所造成的,它可能是血蓝蛋白对 PO 活性影响的一个负反馈抑制。在本课题组的既往研究中发现,血蓝蛋白可与细菌外膜蛋白(outer membrane protein, Omp)特异性结合^[1],而脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)也可与 Omp 分子在外膜内呈牢固的共价结合并发生强烈的相互作用^[19],同时它又是激活酚氧化酶原级联系统的有效因子之一^[20]。由此推测,血蓝蛋白对酚氧化酶活性产生负反馈抑制的机制,可能是由于血蓝蛋白与细菌特异性结合从而导致血清中可供激活酚氧化酶活性的 LPS 浓度下降,或由于血蓝蛋白与细菌 Omp-LPS 结合形成的复合物可直接抑制 LPS 对酚氧化酶原级联系统的激活。

综上所述,血蓝蛋白在一定范围内确实可以正反馈调节酚氧化酶活性,但在细菌等干扰之下,其又可表现出一定的负反馈抑制活性。但其机理尚不十分明确,相信,随着对血蓝蛋白免疫活性和血蓝蛋白与酚氧化酶相互关系的进一步探索,以及虾、蟹等甲壳动物免疫体系的深入研究,其机制将逐步完善和反映其实际情况。

参考文献:

- [1] Washington C, Dunkert J R. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, 7: 283 - 295.
- [2] Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10: 23 - 28.
- [3] Johansson M, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates [J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 1996, 15: 46 - 66.
- [4] Paul R J, Prow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates [J]. *Zoology*, 1998, 100: 319 - 327.
- [5] Aspen A, Huang T S, Cerenius L, et al. cDNA cloning of prophenoloxidase from the fresh crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. *PNAS*, 1995, 92: 939 - 943.
- [6] Schweikardt T, Jaenicke E, Decker H. Homology modeling of hemocyanins and tyrosinases: pitfalls in automated approaches [J]. *Micron*, 2004, 35: 97 - 98.
- [7] Zlateva T, Muro P D I, Salvato B, et al. The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin [J]. *FEBS Lett*, 1996, 384: 251 - 254.
- [8] Decker H, Rinko T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 25 889 - 25 892.
- [9] Decker H, Ryan M, Jaenicke E, et al. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurytemora californicum*, and *Cancer magister* [J]. *J Bio Chem*, 2001, 276: 17 796 - 17 799.
- [10] Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 29 264 - 29 267.
- [11] Nagai T, Otsuki T, Kawabata S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 27 166 - 27 170.
- [12] Adachi K, Hirata T, Nishikita T, et al. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme [J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2003, 134: 135 - 141.
- [13] Siddiqui N I, Préaux G, Gielens C. Intrinsic and induced o-diphenoloxidase activity of β -hemocyanin of *Helix pomatia* [J]. *Micron*, 2004, 35: 91 - 92.
- [14] Burnmaster T. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins [J]. *Micron*, 2004, 35: 121 - 122.
- [15] Innesberger A, Burnmaster T. Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily [J]. *J Comp Physiol [B]*, 2004, 174 (2): 169 - 180.
- [16] 王 雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血清巴因子的测定及方法研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26 (1): 34 - 41.
- [17] Auhada M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Acta Biochem Biophys*, 1971, 144: 749 - 762.
- [18] Johnson B A, Bonaventura C, Bonaventura J. Allosteric modulation of *Gallineta sapidus* hemocyanin by binding L-lactate [J]. *Biochemistry*, 1984, 23: 872 - 878.
- [19] 鱼艳荣, 刘希成, 张彦明, 等. 革兰氏阴性菌外膜蛋白研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2000, 21 (2): 35 - 39.
- [20] Soderhall K, Hall L. Lipopolysaccharide induced activation of the prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1984, 797: 99 - 104.

1) Zhang Y L, Wang S Y, Peng X X. A protein reacted with anti-human IgM is hemocyanin precursor in shrimp *Penaeus tomnamei* [A]. *海洋生物高技术论坛论文集(下册)* [M]. 2003. 681 - 692.

Variation of phenoloxidase activity affected by hemocyanin in shrimp *Penaeus vannamei*

ZHANG Yue-ling^{1,2}, WANG San-ying², LIU Guang-ming², CHEN Yue², ZOU Xiang-hui²

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology, School of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: It has been confirmed that hemocyanin is a kind of important multifunctional protein found in the hemolymph of both arthropod and mollusk. And phenoloxidase is a type of vital immune protein in invertebrate. Recently, interest has been focused on comparative research between hemocyanin and phenoloxidase. In the paper, a preliminary study was made to characterize the variation of phenoloxidase activity affected by in vivo hemocyanin and in vitro hemocyanin recombinant protein in shrimp *Penaeus vannamei* obtained from Xiamen. The methods of artificial infection by *V. parahaemolyticus* and measurement of both concentration of hemocyanin and phenoloxidase activity were used. The results showed that the variational trend of hemocyanin's concentration was similar to that of phenoloxidase activity after the shrimp was infected by *V. parahaemolyticus*, both of which increased to their maximum in 24 h, then descended slowly, finally came back to normal level in 36 h. In comparison with control group in vitro, the shrimp serum's phenoloxidase activity increased obviously after hemocyanin recombinant protein was added in at the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or ultrasonic solution of *E. coli* K12 at the concentration of 35 mg/mL . However, when both hemocyanin recombinant protein and ultrasonic solution of *E. coli* K12 were added into the shrimp serum, its phenoloxidase activity descended immediately. It suggests that hemocyanin can adjust the phenoloxidase activity by means of positive feedback, but it also can adjust the phenoloxidase activity by means of negative feedback when its reactive solution is involved in some bacteria. In summary, these results are the latest discovery in the field of the immune function of hemocyanin and phenoloxidase, which will be helpful for elucidating the immune mechanism of hemocyanin and interrelation between hemocyanin and phenoloxidase.

Key words: *Penaeus vannamei*; hemocyanin; phenoloxidase activity; feedback adjustment

This work was supported by grants from State 863 Project of China (2002AA629050) and Guangdong Natural Science Fund (Doctor's Startup Fund) (130-122187).