

文章编号:1005-8737(2001)04-0001-04

日本对虾血清凝集素的基本物理化学性质

廖绍安, 李 筠*, 张晓华, 纪伟尚, 徐怀恕

(青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛, 266003)

摘要: 日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 亲虾体长 19~24.5 cm, 取其血清。7 种动物血液取自大白鼠、小白鼠、豚鼠、兔、鸡、羊、人。结果表明: ① 虾血清分别在 28、37、56℃ 时热处理 30 min, 其凝集活性不变, 在 70℃ 和 80℃ 热处理 30 min 后凝集活性完全丧失。② 血清在 pH 为 5~7.5 的 TBS 缓冲液中凝集活性稳定, 在 pH 为 8~9 之间凝集活性迅速下降。③ 凝集抑制实验表明半乳糖、甘露糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖胺、N-乙酰-D-葡萄糖胺等 5 种糖对血清凝集素都有较强的抑制作用, 尤其 D-葡萄糖胺和 N-乙酰-D-葡萄糖胺的抑制作用更强。④ 交叉吸附实验结果显示日本对虾血清对大白鼠、小白鼠的红细胞有较强的亲和性。

关键词: 日本对虾; 血清凝集素; 理化性质; 凝集效价

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

凝集素作为具有与糖专一性结合并能促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白, 最早发现在植物体内, 后来又在动物体内发现, 尤其广泛存在于无脊椎动物体内及微生物中, 在生命活动中发挥重要作用^[1,2]。国内外对无脊椎动物尤其对经济甲壳动物如龙虾 (*Panulirus argus*)^[3], 对虾如印度对虾 (*Penaeus indicus*)^[4]、褐对虾 (*P. californiensis*)^[5]、斑节对虾 (*P. monodon*)^[6]、中国对虾 (*P. chinensis*)^[7,8] 等的凝集素研究已较多。对对虾凝集素的功能研究多集中在免疫上, 凝集素与酚氧化酶系统等体液因子和血细胞因子一起构成不同于高等动物的特异性免疫体系^[9,10]。本文对日本对虾 (*P. japonicus*) 凝集素的基本理化性质进行初步研究, 旨在探讨其在对虾免疫中的作用, 为深入研究对虾的免疫机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料

收稿日期: 2001-03-25

基金项目: 欧盟委员会资助项目 (TS3-T94-0269)

作者简介: 廖绍安 (1970-) 男, 原青岛海洋大学硕士研究生, 现中科院南海海洋研究所博士生。

* 通讯作者

日本对虾亲虾体长 19~24.5 cm, 取自山东莱州大华水产养殖公司。7 种动物血液取自大白鼠、小白鼠、豚鼠、兔、鸡、羊、人, 并分别用 Alsevers 液固定, 贮于 4℃ 冰箱中。

1.2 对虾血清的制备

从亲虾心脏无菌抽取血淋巴, 注入洁净无菌的 Eppendorf 离心管中, 28℃ 放置 1 h, 划破血凝块, 离心, 将血清转入洁净无菌的 Eppendorf 离心管中, 加入叠氮化钠, 终质量分数为 0.05%, -25℃ 保存。

1.3 细胞悬液的制备

将 Alsevers 液中 4℃ 保存的动物血液, 用无菌生理盐水制备细胞悬液, 离心 (2 000 r/min, 15 min)、洗涤、再离心, 将压积细胞用 TBS 缓冲液同样洗涤、离心, 重复 1 次。所得压积细胞再用 TBS 缓冲液制成 1% 细胞悬液备用。

1.4 血清凝集效价的测定

将制得的血清加入 96 孔板的第 1 列孔中, 每孔 50 μ l, 用 TBS 作 2 倍系列稀释; 在每孔血清中加入 50 μ l 1% 的细胞悬液, 细心混匀, 28℃ 放置 45~60 min 后在显微镜 ($\times 100$) 下检测其凝集强度。凝集强度划分为 5 个级别 (+4, +3, +2, +1, 0), 以出现 +1 的最高稀释倍数作为凝集效价。

1.5 血清中凝集素性质的测定

1.5.1 血清的处理温度和 pH 血清分别在 28℃、37℃、56℃、70℃、80℃ 下热处理 30 min, 然后快速冷却; 用酸、碱将 TBS 缓冲液的 pH 调为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 用上述不同的缓冲液与血清作 2 倍系列稀释, 混匀, 在 25~28℃ 下静置处理 3 h。鸡血红细胞检测凝集效价。

1.5.2 凝集抑制实验 将半乳糖、甘露糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖胺、N-乙酰-D-葡萄糖胺等 5 种糖用 TBS 缓冲液分别配成 200、100、50、25 mmol/L 的溶液作为抑制剂。将血清在 96 孔板中作 2 倍系列稀释, 再在各个孔中分别加入浓度和种类不同的抑制剂室温放置 3 h, 同时设置一个系列稀释不加抑制剂作对照组。鸡血红细胞检测凝集效价。

1.5.3 交叉吸附实验 在洁净无菌的 Eppendorf 离心管中加入 50 μ l 血清, 用等量的 TBS 缓冲液稀释, 混匀, 加入 450 μ l 10% 的红细胞悬液, 充分振荡混匀, 室温放置 1 h, 充分反应后, 离心 (3 000 r/min, 15 min), 回收上清液。分别用 7 种红细胞检测该上清液的凝集效价。

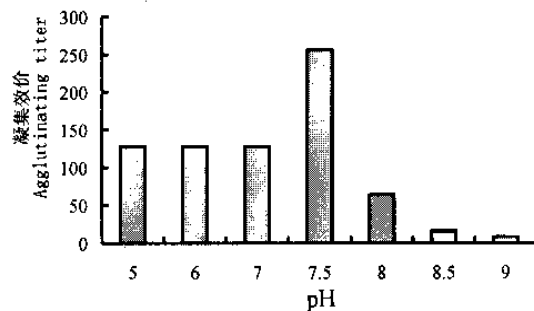


图1 温度对血清凝集素效价的影响

Fig.1 Effect of temperature on agglutinating activity

2 结果与分析

2.1 对虾血清中凝集素的物理化学性质

日本对虾血清在 28、37、56℃ 条件下, 凝集素活性没有被破坏, 且凝集效价相同; 而 70℃ 和 80℃ 条件下, 与鸡血红细胞发生凝集反应的凝集素完全被破坏, 不发生凝集 (图 1); 当系列稀释的血清经 70℃ 水浴处理 30 min 后, 变成乳白色胨状物, 有少许上清液, 而经 80℃ 水浴处理的血清完全变为乳白色胨

状物, 二者均不再具有凝集活性。不同酸碱度处理血清, 其凝集效价发生变化。经 pH 5.0~7.5 缓冲液处理后的对虾血清, 其血细胞凝集活性较高, 在 pH 7.5 以上凝集活性呈下降趋势 (图 2)。

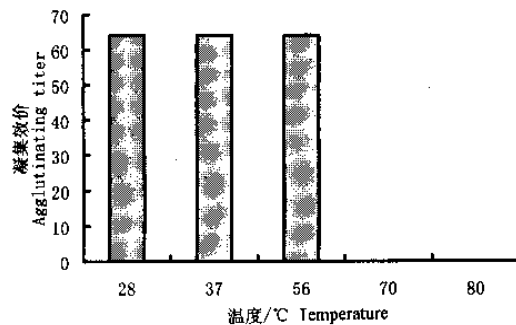


图2 pH 对血清凝集素效价的影响

Fig.2 Effect of pH on agglutinating activity

2.2 血清凝集素对单糖和红细胞的亲和性

抑制试验所用红细胞是与正常虾血清凝集效价较高的大白鼠和豚鼠红细胞。试验结果表明 (表 1), 采用大白鼠红细胞时 5 种单糖均能不同程度地抑制红细胞与对虾血清间的凝集反应。L-阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖的抑制作用较小, 且其抑制能力与抑制剂浓度无明显相关性, 而 2 种氨基糖 (D-葡萄糖胺、N-乙酰-D-葡萄糖胺) 抑制作用较强, 其抑制能力随着浓度的升高而增强。当采用豚鼠的红细胞时, L-阿拉伯糖有较强的抑制能力, 且不随浓度的上升而加强, 2 种氨基糖仍然有较高的抑制作用, 尤其是 N-乙酰-D-葡萄糖胺, 当浓度上升到 200 mmol/L 时, 几乎完全抑制。可见, 日本对虾血清凝集素对氨基糖有较强的专一性。

2.3 交叉吸附实验

交叉吸附结果 (表 2) 表明, 经大白鼠和小白鼠红细胞凝集后, 血清对其他血细胞的凝集能力都很差; 经豚鼠红细胞凝集后, 血清对其他动物的红细胞仍能凝集, 尤其是对大白鼠和小白鼠的红细胞凝集能力仍较强; 经兔红细胞凝集后的血清对其他动物红细胞也能发生不同程度的凝集, 尤其是对豚鼠和人的红细胞凝集能力仍较强; 经鸡、绵羊、人等 3 种红细胞凝集后的血清对大白鼠和小白鼠红细胞的凝集程度较高, 而对其他几种的凝集非常低。

表 1 单糖凝集抑制试验

Table 1 Inhibition of agglutination of erythrocytes by simple saccharide

糖 Saccharide	单糖浓度/(mmol·L ⁻¹) Saccharide concentration									
	0(control)		25		50		100		200	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
L-阿拉伯糖 L-arabinose	512	512	128	64	128	64	128	64	128	64
D-葡萄糖胺 D-glucosamine	512	512	64	128	32	128	8	64	8	64
N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-acetylglucosamine	512	512	128	128	64	32	32	2	4	1
半乳糖 Galactose	512	512	128	256	128	256	128	256	128	256
甘露糖 Mannose	512	512	128	256	128	256	128	256	64	256

注:A表示所用红细胞为大白鼠红细胞 Rat erythrocytes are used;B表示所用红细胞为豚鼠红细胞 Guinea pig erythrocytes are used.

表 2 日本对虾血清与红细胞吸附后交叉吸附的凝集效价

Table 2 Agglutination titer of *P. japonicus* serum against RBC types tested

日本对虾血清吸附的红细胞 <i>P. japonicus</i> serum agglutinated by erythrocyte	红细胞 Erythrocyte							
	大白鼠 Rat	小白鼠 Mouse	豚鼠 Guinea pig	兔 Rabbit	鸡 Chicken	绵羊 Sheep	人 Human	
大白鼠 Rat	0	0	0	0	0	8	0	
小白鼠 Mouse	0	0	8	0	2	16	4	
豚鼠 Guinea pig	32	256	0	16	8	16	4	
兔 Rabbit	8	16	128	0	2	32	128	
鸡 Chicken	16	64	0	8	0	8	0	
绵羊 Sheep	8	16	0	0	0	0	0	
人 Human	16	64	0	2	0	0	0	

3 讨论

对日本对虾血清凝集素的热变性实验结果表明,在 28~56℃ 间凝集活性稳定,70℃ 和 80℃ 时凝集素活力完全丧失。该结果与其他多种甲壳动物相似,如北美龙虾^[11]、棘龙虾^[12]、螯虾^[13]等。Ueda^[14]报道 17 种日本近海甲壳动物血淋巴凝集素的热稳定性分析显示其变性温度在 65~80℃ 之间。北美龙虾^[11]血清的凝集活力在温度不超过 56℃ 时也保持稳定。

不同的血清凝集素保持其凝集活力的 pH 范围稍有不同。日本对虾血清凝集素的活性在 pH 5.0~7.5 稳定,pH 7.5~9.0 时逐渐下降;螯虾^[13]在 pH 5~10 仍有凝集活性。本文所做 pH 对凝集素活性的影响可能是溶液中离子键的相互作用,使凝集素与受体结合的位点构相改变,不能与受体结合。

目前已发现多种糖能与甲壳动物血清中的凝集素专一性地结合,其中多种是乙酰氨基糖。本文的凝集抑制试验中检测到所用的 5 种单糖都能抑制日本对虾血清的凝集活性,其抑制作用均在 75% 以上,特别是 D-葡萄糖胺、N-乙酰-D-葡萄糖胺表现出强烈的抑制能力,且随浓度的增加抑制作用明显加

强。这表明日本对虾血清中有多种凝集素组分,血清中对应后 2 种糖专一性的凝集素是其主要成分。在用 2 种红细胞检测时都发现 N-乙酰-D-葡萄糖胺对血清凝集活性的抑制比 D-葡萄糖胺抑制能力强,这反映了凝集素的识别不仅与全糖有关,而且与糖的某一特殊基团有关,与 Ravindranath^[15]和 Bretting^[16]等的观点一致。日本对虾血清凝集素对细菌的凝集可能是与细菌表面的含有这些糖基的糖蛋白或脂多糖结合引起的,无脊椎动物的凝集素的单一分子还可能存在多个结合位点^[17],使凝集素能更好地发挥作用。

对虾血清中有多种凝集素,红细胞表面也有多种凝集素的结合位点,红细胞凝集现象是凝集素和其相应位点结合的结果。交叉吸附实验结果表明日本对虾血清中与大白鼠、小白鼠、羊、人等 4 种红细胞表面受体结合的凝集素在血清中是主要的,而羊红细胞和人红细胞表面的位点与前 2 种有一定的差别。同时也说明这 5 种红细胞表面与血清中的凝集素结合的位点和大白鼠红细胞、小白鼠红细胞表面的结合位点有部分相同或相似性。

参考文献:

- [1] 孙 册, 朱 政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [2] Saron N. Lectins: Molecular mechanisms of receptor recognition [A]. International marine Biotechnology Conference, Tromsø [C]. Norway: Tromsø University TROMSØ, 1994.
- [3] Ronald T A, Peter F W, William N. The carbohydrate composition of invertebrate hemagglutinin subunits isolated from the lobster *Panulirus argus* and the oyster *Crassostrea virginica* [J]. Comp Biochem Physiol, 1973, 44(b): 185-189.
- [4] Maheswari R, Mullainadhan P, Arumugam M. Characterisations of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1997, 7(1): 17-28.
- [5] Vargas A F, Guzman M A, Ochoa J L. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph [J]. Comp Biochem Physiol, 1993, 104B(2): 407-413.
- [6] Ratanapo S, Chulavatnatol M. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 102B(4): 855-859.
- [7] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 中国对虾红细胞凝集素的性能研究. 中国水产科学, 1999, 6(3): 32-35.
- [8] 彭其胜, 郭文场, 杨振国, 等. 中国对虾血淋巴液中的凝集素. 中国水产科学, 2000, 7(4): 14-18.
- [9] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学, 1995, 4: 1-3.
- [10] McKay D, Jenkin C R. Immunity in the invertebrates: the role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachanna bichir*) [J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1970, 48: 139-150.
- [11] John W C, James E S. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1973, 21: 255-262.
- [12] Albert Tytler. Natural haemagglutinins in the body fluids and seminal fluids of various invertebrates [J]. Biol Bull, 1946, 90: 213-219.
- [13] Van H, Miller, Steven R B. A preliminary physicochemical characterization of an agglutinin found in the Hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1972, 19: 83-93.
- [14] Ueda R, Sugita H, Deguchi Y. Naturally occurring agglutinin in the hemolymph of Japanese coastal Crustacea [J]. Nippon Suisan Gakkaishi Bull Jap Soc Sci Fish, 1991, 57(1): 69-78.
- [15] Ravindranth M H, Paulson J C, Irie R F. Human melanoma antigen O-acetylated ganglioside GD₃, is recognized by *Cancer antennarius* lectin [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 8 850-8 856.
- [16] Bretting H, Kabat E A. Purification and characterization of agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites [J]. Bio Chem, 1976, 15: 3 228-3 236.
- [17] Vasta G R. Animal lectins: Self/non-self recognition roles in the acute phase response [A]. International marine Biotechnology Conference, Tromsø [C]. Norway: Tromsø University TROMSØ, 1994.

Physicochemical properties of agglutinin from serum of *Penaeus japonicus*

LIAO Shao-an, LI Yun*, ZHANG Xiao-hua, JI Wei-shang, XU Huai-shu

(Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: The shrimp serum was collected from *Penaeus japonicus*, body length 19.0~24.5 cm. Seven blood samples were collected from rat, mouse, guinea pig, rabbit, chicken, sheep and human, respectively. The results show that: 1) when heated at 28, 37, and 56℃ for 30 min, respectively, the shrimp serum is stable in agglutinating activity, but when heated at 70℃ and 80℃ for 30 min, the serum loses its agglutinating activity completely; 2) at pH 5.0~7.5 of the TBS buffer, the agglutinating activity is stable, and at pH 8~9, the agglutinating activity declines dramatically; 3) the agglutinating inhibition test shows that the serum agglutination can be inhibited obviously by mannose, galactose, glucosamine(GlcN), N-acetylglucosamine(GlcNAc) and arabinose, especially GlcN and GlcNAc which have the most obvious effect; 4) the crossed absorption test with the 7 animal bloods shows that the serum of *P. japonicus* has a strong affinity to the erythrocytes of rat and mouse.

Key words: *Penaeus japonicus*; serum agglutinin; physicochemical characterization; agglutinating titer

* Corresponding author