

注射磷脂酰丝氨酸对凡纳滨对虾血蓝蛋白合成、 酚氧化酶活性的影响

杨留冰, 潘鲁青*

(中国海洋大学水产学院,海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要:为研究磷脂酰丝氨酸(PS)对凡纳滨对虾血蓝蛋白合成、酚氧化酶活性的影响,并探讨 PS 激活凡纳滨对虾血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的机制,实验采用 5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个 PS 浓度对凡纳滨对虾尾节肌肉进行注射,注射量为 50 μL ,对照组注射生理盐水,各处理组设 3 个平行组,取样时间为 0、6、12、24、36、48 和 60 h,分别测定了血浆血蓝蛋白含量,肝胰脏血蓝蛋白 p75、p77 亚基和 mRNA 的表达以及血浆血蓝蛋白酚氧化酶活性。结果显示:与对照组相比,血蓝蛋白含量在 6 h 内略有下降,6~36 h 内呈峰值变化,24 h 时达到最大值($P < 0.05$);血蓝蛋白亚基 p75、p77 和 mRNA 表达在 0~36 h 内呈峰值变化,12 h 时达到最大值($P < 0.05$);血蓝蛋白酚氧化酶活性在 36 h 内呈峰值变化,12 h 时达到最大值($P < 0.05$)。研究表明,PS 能够激活凡纳滨对虾血蓝蛋白的酚氧化酶活性,表现出明显的时间剂量效应,同时在短时间内引起血蓝蛋白含量下降,随后机体启动血蓝蛋白的合成机制,证实 PS 是凡纳滨对虾血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的激活因子,为对虾血蓝蛋白免疫活性的研究奠定了理论基础。

关键词:凡纳滨对虾;磷脂酰丝氨酸;血蓝蛋白合成;酚氧化酶活性

中图分类号:Q 178.1; S 917.4

文献标志码:A

血蓝蛋白是广泛存在于节肢动物和软体动物血淋巴中的呼吸蛋白^[1],占血淋巴总蛋白含量的 60%~93%^[2-3]。近年来的研究表明,血蓝蛋白不仅仅是一种呼吸蛋白,而且是可以发挥多种生理功能的多功能蛋白,尤其是免疫学功能如酚氧化酶活性^[4-9]、抗微生物活性^[10-18]、凝集活性^[19-24]和溶血活性^[25-26]等。酚氧化酶是一种广泛存在于动物、植物、真菌和一些细菌中的免疫物质,它启动黑色素的合成,参与宿主防御反应,同时在节肢动物外骨骼的硬化过程中起着关键的作用。尤其是在甲壳动物中,酚氧化酶原激活系统是一种重要的免疫识别和免疫防御系统,在抵抗外来病原物质入侵和环境胁迫下发挥着重要的作用。大量研究表明,离体纯化的血蓝蛋白可以在外源变性剂,如十二烷基磺酸钠(SDS)^[5]、高氯酸盐^[27]、异丙醇^[28]和尿素^[29]等,内源活性物质

如胰蛋白酶^[4]、胰凝乳蛋白酶^[5]、血细胞溶解产物(HLS)^[7]、抗菌肽^[30]和凝血因子^[31]等的诱导刺激下发挥出酚氧化酶活性。最近,Coates 等^[8]研究证实了美洲鲎(*Limulus polyphemus*)血蓝蛋白在磷脂酰丝氨酸(PS)的作用下可表现出酚氧化酶活性,并认为存在于细胞膜内侧的 PS 可能是血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的自发激活因子。

PS 是存在于动物细胞膜内侧小叶上的极性磷脂分子,能够参与多种细胞反应过程,是一种重要的免疫分子^[32],包括诱导细胞凋亡过程^[33]、影响体液免疫中生理和药理抑制反应^[34]以及参与凝血反应^[35]等。甲壳动物酚氧化酶原激活系统(proPO 系统)是一种重要的免疫识别和免疫防御系统,在抵抗外来病原物质入侵和环境胁迫下发挥着重要的免疫作用,目前大多数关于甲壳动物血蓝蛋白酚氧化酶活性的研究都是在离体条件下

收稿日期:2013-01-26 修回日期:2013-03-30

资助项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0597)

通信作者:潘鲁青,E-mail:panlq@ouc.edu.cn

进行的,而有关对虾在注射 PS 的条件下血蓝蛋白合成、酚氧化酶活性的研究尚未见报道。实验研究了注射 PS 对凡纳滨对虾血蓝蛋白含量、亚基(p75、p77)和 mRNA 表达以及酚氧化酶活性的影响,探讨了 PS 对血蓝蛋白合成、酚氧化酶活性的影响,提供了 PS 自发激活凡纳滨对虾血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)于2011年12月购于青岛市崂山区沙子口对虾养殖场,体色正常,健康活泼,体质量(15.7 ± 2.3)g,生物学体长(10.8 ± 1.2)cm,水温(22.9 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,盐度为34,pH 8.0 ± 0.3 ,连续充气,日换水2次,日换水量为1/2,同时投喂对虾配合饲料。

1.2 实验方法

磷脂酰丝氨酸(PS)溶液的制备 PS 购于 Sigma 公司,PS 贮存溶液的制备(1 mg/mL)参照 Coates 等^[8]的方法,将 PS 固体颗粒重悬于对虾生理盐水(SSS, shrimp salt solution, 450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, pH 7.3),4 $^{\circ}\text{C}$ 下超声波破碎1 h,脱气,再用水系微孔滤膜(0.22 μm)过滤6次除去大的单层囊膜后即得到 PS 最大浓度工作液(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

实验梯度设置 实验对虾暂养一周,以适应实验室的养殖环境条件,实验期间和暂养期间的养殖管理操作相同,实验期间对虾没有死亡情况。实验在50 cm \times 60 cm \times 40 cm 的塑料水箱内进行,每个箱内放养40尾虾。本实验分为4个处理组:注射生理盐水组,注射5、10和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PS 组。实验采用人工注射的方式进行,分别取对虾生理盐水和3种浓度的 PS 溶液于凡纳滨对虾尾节肌肉处进行注射,注射量为50 μL ,以注射对虾生理盐水组为对照组,各处理组均设3个平行组。注射后取样时间点为0、6、12、24、36、48和60 h。

1.3 样品制备

血淋巴的采集和血浆的制备 于心脏处采集凡纳滨对虾血淋巴,使用消毒的5号针头和1 mL 注射器直接插入对虾头胸甲后缘围心腔内3 mm 左右进行采血,抽血前注射器内预先吸入0.3

mL 参照文献[36-37]的方法并加以改进的预冷凡纳滨对虾抗凝剂(0.34 mol/L NaCl,0.01 mol/L KCl,0.01 mol/L EDTA- Na_2 ,0.01 mol/L HEPES, pH 7.45,渗透压为780 mOsm/kg),最终使得抗凝剂和血淋巴的比例为1:1。取合并后的抗凝血淋巴1.0 mL,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下800 g 离心10 min 后,取蓝色上清,即为血浆样品,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

肝胰脏总 RNA 的提取 肝胰脏总 RNA 的提取按照 Trizol[®] (Invitrogen[™])的说明书进行操作。每个平行组取5尾虾,分别解剖其肝胰脏于研钵中,并在液氮条件下研磨充分,然后取80~100 mg 组织粉末于无 RNAase 的离心管中,加入1 mL Trizol,在涡旋振荡器上剧烈震荡,然后置于离心管架上静置5 min。接着在4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 \times g 离心15 min,吸取上清。加入0.2 mL 氯仿,剧烈震荡15 s,静置3 min,接着在4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 \times g 离心15 min,缓慢吸取上层水相于新的离心管中,剩余有机相可存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于总蛋白质的提取。加入0.5 mL 异丙醇于水相样品中,上下颠倒快速混匀样品,室温静置10 min,然后于4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 \times g 离心10 min。弃去上清,加入1 mL 75%乙醇,轻轻洗涤沉淀,然后于4 $^{\circ}\text{C}$ 下7 500 \times g 离心10 min,重复洗涤1次。室温干燥 RNA 沉淀10 min,然后用30 μL DEPC 水回溶。取1 μL 总 RNA 样品进行1%琼脂糖凝胶电泳以鉴定总 RNA 的完整性,电泳结果保证28S rRNA 与18S rRNA 亮度比为2:1,电泳条件为135 V,10 min;同时使用核酸蛋白仪(Ultrospec 2100 pro)对总 RNA 样品进行 RNA 浓度测定,要求 $A_{260\text{nm}}:A_{280\text{nm}} \in [1.8 \sim 2.0]$ 以及 $A_{260\text{nm}}:A_{230\text{nm}} > 2.0$ 。

肝胰脏总蛋白质的提取 将肝胰脏总 RNA 提取过程中剩余的有机相中剩余的水相清除干净,加入0.3 mL 无水乙醇,上下颠倒混合样品,静置3 min,接着于4 $^{\circ}\text{C}$ 下2 000 \times g 离心5 min。取上清,并转入4 mL 离心管中。加入1.5 mL 异丙醇,上下颠倒混合样品,静置10 min,接着于4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 \times g 离心10 min。弃上清,用2 mL 0.3 mol/L 盐酸胍(含95%乙醇)清洗蛋白沉淀,然后静置20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下7 500 \times g 离心5 min,重复此过程2次。接着弃去上清,加入2 mL 无水乙醇进行洗涤操作(步骤同上)。弃去上清液,于真空干燥机中干燥蛋白质10 min,然后加入400 μL 1% SDS,95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下蒸煮10 min,室温冷却1 h,

接着于4℃下10 000×g离心10 min。取上清液,即为肝胰脏总蛋白质样品,于-20℃下保存备用。

1.4 指标测定

血蓝蛋白含量的测定 血浆血蓝蛋白含量的测定参考 Nickerson 等^[38]和 Baden 等^[39]的方法并加以改进。取解冻的30 μL 血浆样品于96孔酶标板中,然后加入270 μL 双蒸水,于酶标仪(MDC, spectra Max190, America)中充分震荡混匀,避免产生气泡。接着在335 nm 波长下测定血浆的吸光值 OD_{335nm},血蓝蛋白的浓度(mg/mL)可采取以下公式进行计算:

$$E_{335nm}(\text{mg/mL}) = 2.3 \times \text{OD}_{335nm}$$

血蓝蛋白亚基表达的测定 参考 Bradford^[40]的方法测定肝胰脏总蛋白的浓度,并适当改进,利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对血蓝蛋白亚基表达进行分析。取肝胰脏总蛋白25 μg 的样品溶液与2×SDS-PAGE 上样缓冲液等体积混合,在100℃下煮沸5 min,先在低电压25 V 下预电泳30 min,然后以3%浓缩胶,12%分离胶的浓度利用 mini 电泳槽进行常压电泳,电泳条件为浓缩胶中50 V 持续约40 min,分离胶中110 V 持续约2 h。电泳结束后,使用0.025%考马斯亮蓝 G-250(含10%乙酸)对凝胶进行染色,持续2 h,然后用10%乙酸进行脱色,每1小时更换一次脱色液,直至背景透明条带清晰即可。接着在凝胶成像系统(培清 JS-680D)下进行拍照,然后使用 AlphaEaseFC 软件对目的蛋白条带的灰度值进行分析,以表示血蓝蛋白亚基的表达水平。

血蓝蛋白 mRNA 表达的测定 (1) 血蓝蛋白 cDNA 的合成。以肝胰脏总 RNA 为模板, Oligo dT 为引物合成 cDNA 第一链。采用20 μL 反转录体系,取肝胰脏总 RNA 样品2 μg, Oligo dT 2 μL,然后用灭菌水补足至13 μL,70℃热浴

变性5 min,接着立即0℃冰浴退火5 min。然后加入按顺序依次加入5×RT buffer 4 μL, dNTP 2 μL 和反转录酶 M-MLV 1 μL,接着在42℃下加热变性1 h,然后于95℃下加热10 min 失活 M-MLV 以终止反应,4℃低温暂时保存,然后将反转录得到的 cDNA 分装,于-20℃保存。

(2) 血蓝蛋白基因反转录 PCR 反应体系。以对虾 *β-actin* 基因为内参,血蓝蛋白和 *β-actin* 基因的上下游引物通过引物设计软件 Primer 5.0 和 Oligo 6 设计引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成,具体序列见表1,PCR 反应体系见表2。以反转录得到的 cDNA 为模板,优化退火温度 T_m 值和循环次数,最终确定 *β-actin* 和血蓝蛋白基因的 PCR 反应条件为:95℃预变性3 min,94℃变性30 s,60.3℃(*β-actin*)/53.0℃(血蓝蛋白)复性1 min,72℃聚合1 min,循环次数均为30次,72℃再延伸7 min,4℃保存。PCR 反应结束后,产物经1%琼脂糖凝胶电泳(135 V, 25 min),然后在凝胶成像系统(培清 JS-680D)下观察、拍照,利用 AlphaEaseFC 软件对 PCR 产物条带的灰度值进行半定量分析,以灰度值比值(血蓝蛋白基因片段灰度值/内参 *β-actin* 基因片段灰度值)表示血蓝蛋白 mRNA 的相对表达水平。

表1 血蓝蛋白基因和 *β-actin* 基因的引物序列

Tab.1 The sequences of primers of hemocyanin and *β-actin* gene

基因 target gene	引物序列 forward/reverse sequence	产物长度/bp product length
血蓝蛋白	上游引物:5'-CCCTTCTGGTGGAATGAT-3' 下游引物:5'-CAATATGGGCAGTGTTATGT-3'	445
<i>β-actin</i>	上游引物:5'-GCCAGAGCAAGCGAGGTAT-3' 下游引物:5'-CGGTGGTCGTGAAGGTGTAG-3'	439

表2 血蓝蛋白和 *β-actin* mRNA 表达的 PCR 体系

Tab.2 The PCR reaction system of hemocyanin and *β-actin* mRNA expression

灭菌水 sterile water	10×Taq buffer	2.5 mmol/L dNTP	25 μmol/L 上游引物 forward sequence	25 μmol/L 下游引物 reverse sequence	rTaq 酶 rTaq DNA polymerase	DNA 模板 template DNA
16.25	2.5	2	2	1	0.25	2

(3) 血蓝蛋白酚氧化酶活性的测定。参照 Perdomo-Morales 等^[41]的方法并加以改进,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)并结

合4-甲基儿茶酚胺活性染色相结合的方法来测定血蓝蛋白的酚氧化酶活性。利用 Bradford^[40]的方法测定血浆总蛋白浓度,取8 mg 血浆总蛋白样

品,与 $2 \times$ Native-PAGE 上样缓冲液 1:1 等体积混匀,先在 25 V 下无样品预电泳 30 min,接着以 3% 浓缩胶,5% 分离胶的浓度利用 mini 电泳槽对血浆样品进行常压电泳,电泳条件为浓缩胶中 35 V 持续约 50 min,分离胶中 90 V 持续约 2 h 30 min,电泳过程在冰浴上进行。待电泳结束后,先将凝胶用双蒸水轻轻漂洗干净,接着将凝胶浸泡于 10 mmol/L 4-甲基儿茶酚胺(含 0.3% MBTH 和 25% 乙醇)中进行避光过夜染色。用双蒸水轻轻漂洗干净凝胶,在凝胶成像系统(培清 JS-680D)下进行扫描、拍照,接着用双蒸水轻轻漂洗干净凝胶,然后用 0.025% 考马斯亮蓝 G-250(含 10% 乙酸)对凝胶再进行染色,用 10% 乙酸进行脱色。然后在凝胶成像系统(培清 JS-680D)下进行扫描和拍照。最后使用 AlphaEaseFC 软件对目的蛋白条带的灰度值进行分析,以目的条带灰度值的变化来表示血蓝蛋白的酚氧化酶活性的变化。

1.5 数据处理与分析

实验过程所收集的数据均以 3 个平行组的平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)来表示,并采用单因素方差分析(ANOVA)和最小显著差数检验法(LSD)对实验数据进行统计分析, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 注射磷脂酰丝氨酸对凡纳滨对虾血浆血蓝蛋白含量、肝胰脏血蓝蛋白亚基和 mRNA 表达水平的影响

注射 PS 对凡纳滨对虾血浆血蓝蛋白含量、肝胰脏血蓝蛋白亚基(p75、p77)和 mRNA 表达水平影响显著($P < 0.05$),而对照组无明显变化。血浆血蓝蛋白含量和肝胰脏血蓝蛋白亚基(p75、p77)在 0~36 h 内呈峰值变化,其中,血蓝蛋白含量在 6 h 内略有下降,6 h 处达到最低值,但与对照组无显著差异,而 p75、p77 亚基则表现为逐渐上升的趋势,其中,血蓝蛋白含量在 24 h 处达到最大值,p75、p77 亚基表达在 12 h 处达到最大值,然而两者均未与 PS 注射浓度呈现明显的相关性,36 h 后各指标趋于稳定,与对照组无显著差异(图 1 和图 2)。在注射 PS 短时间内血蓝蛋白 mRNA 表达迅速上升,在 12 h 处血蓝蛋白 mRNA 相对表达丰度值最高,各浓度组均显著高于对照组水平($P < 0.05$),但是并未与 PS 注射浓度呈现明显的相关性,然后于 36 h 后恢复至对照组水平(图 3)。

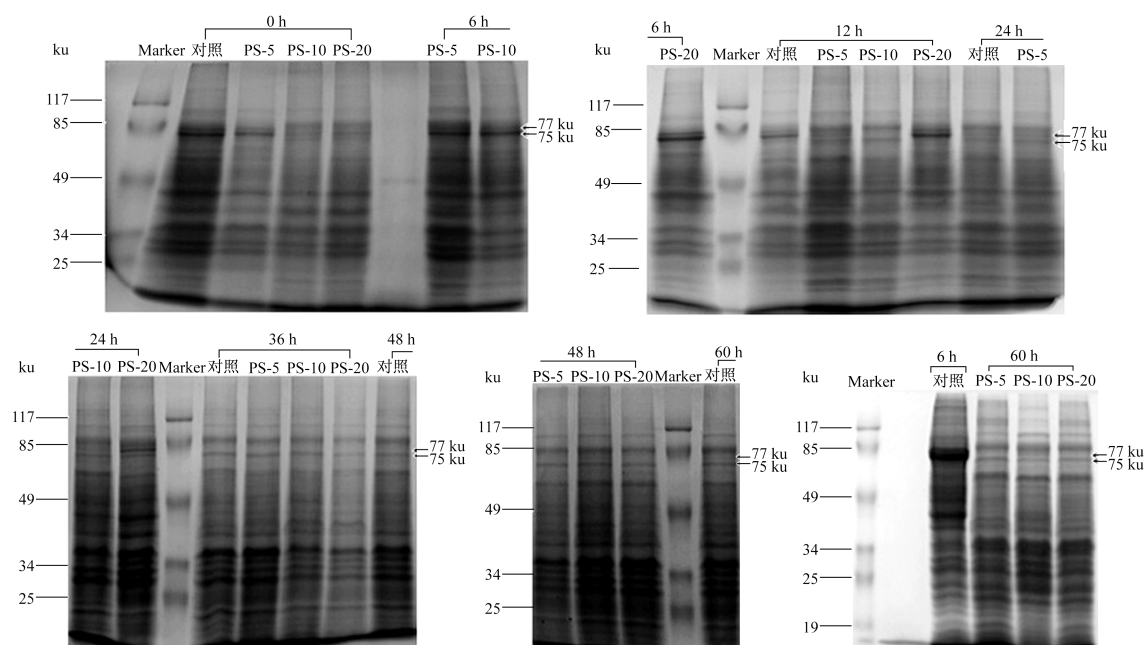


图 1 注射 PS 对凡纳滨对虾肝胰脏血蓝蛋白亚基(p75、p77)表达的影响

上标为不同浓度的 PS 处理和取样时间。

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of subunits of hemocyanin (p75 and p77) from hepatopancreas tissue in shrimp *L. vannamei* after injection of PS

Different concentrations of PS and sampling time were marked out over the picture.

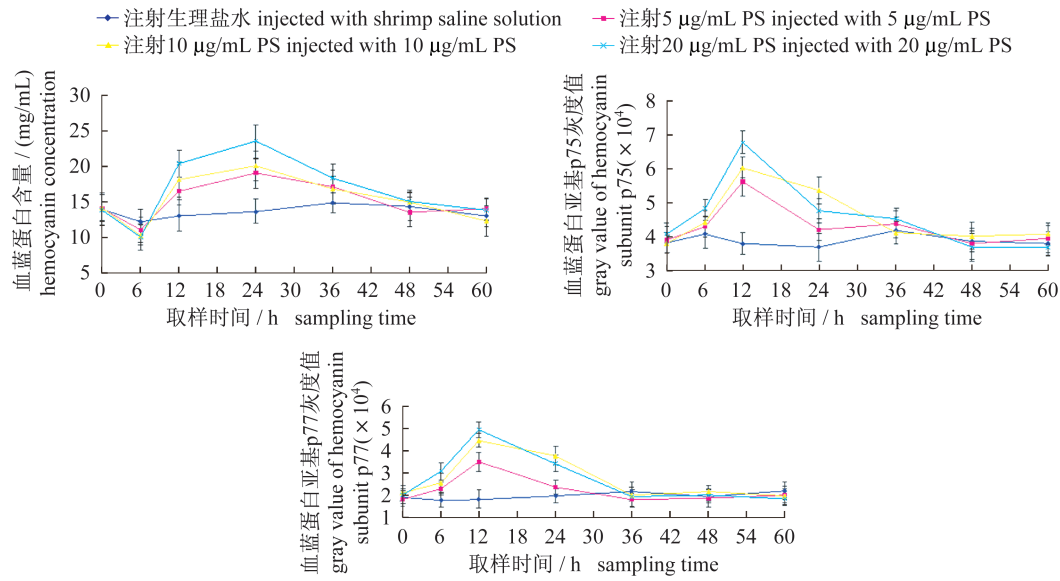


图 2 注射 PS 对凡纳滨对虾血浆血蓝蛋白含量、肝胰脏血蓝蛋白亚基 (p75、p77) 表达的影响
Fig. 2 Time course changes of plasmatic hemocyanin concentration and expression of subunits of hemocyanin (p75 and p77) from hepatopancreas tissue in shrimp *L. vannamei* after injection of PS

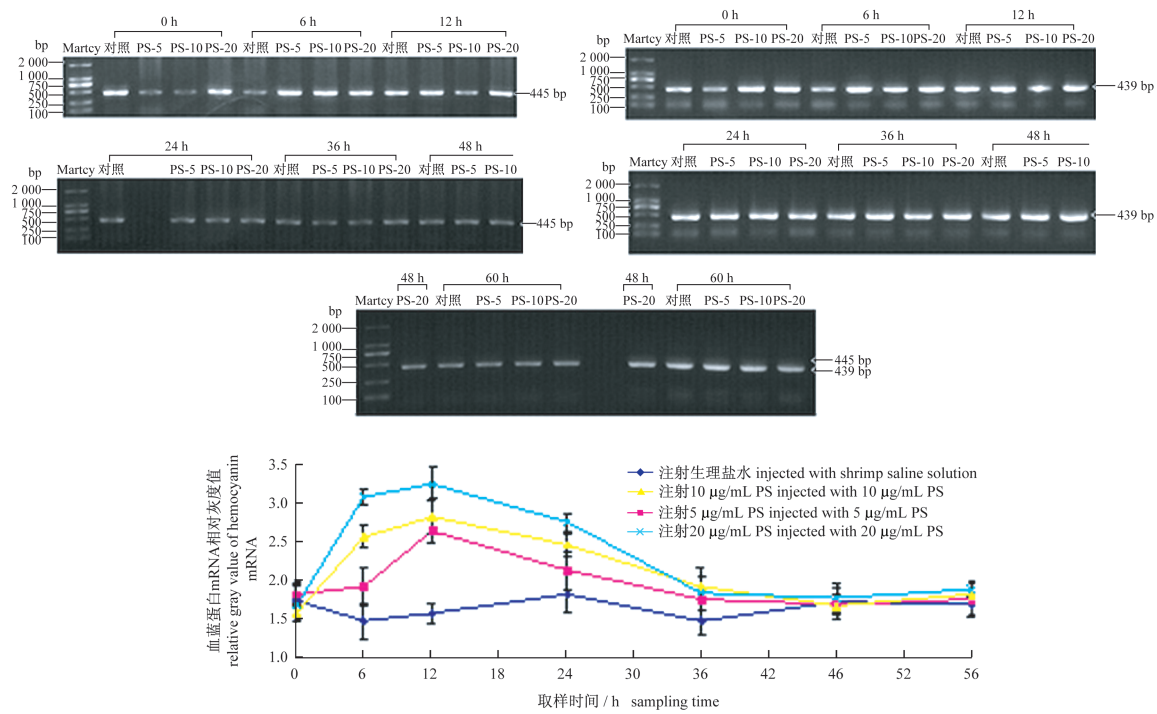


图 3 注射 PS 对凡纳滨对虾肝胰脏血蓝蛋白 mRNA 表达的影响
 上标为不同浓度的 PS 处理和取样时间。
Fig. 3 AGE analysis and expression changes of hemocyanin mRNA from hepatopancreas tissue in shrimp *L. vannamei* after injection of PS
 Different concentrations of PS and sampling time were marked out over the picture.

2.2 注射磷脂酰丝氨酸对凡纳滨对虾血浆血蓝蛋白酚氧化酶活性的影响

注射 PS 对凡纳滨对虾血蓝蛋白酚氧化酶活性影响显著 ($P < 0.05$), 而对对照组无显著变化(图

4 和图 5)。各个实验组血蓝蛋白酚氧化酶活性在注射 PS 后 36 h 内呈峰值变化, 在 12 h 内迅速上升, 于 12 h 时达到最大值, 36 h 后保持稳定状态, 与对照组没有显著性差异。

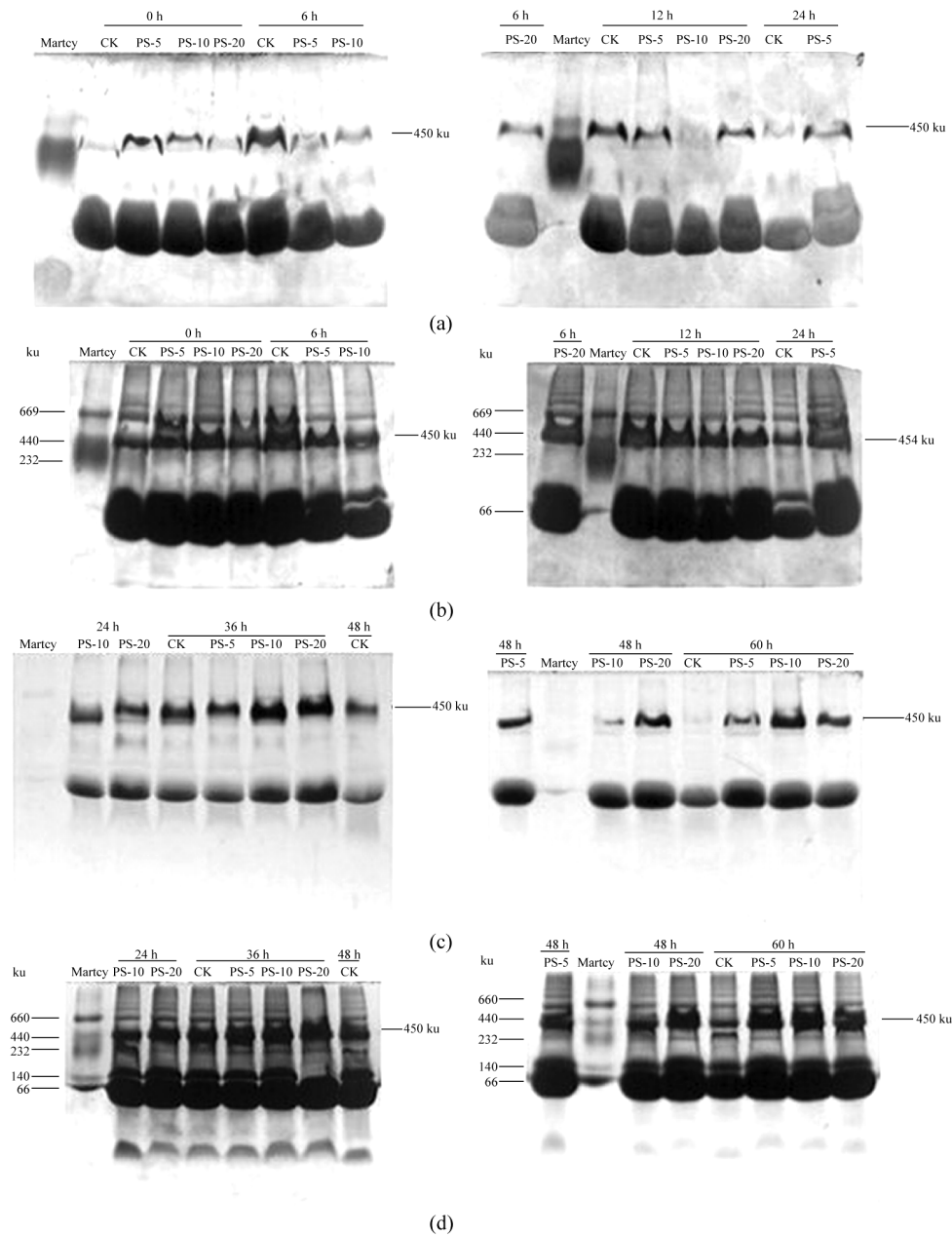


图 4 注射 PS 对凡纳滨对虾血浆血蓝蛋白酚氧化酶活性的影响电泳图

(a), (c) 对应 4-甲基儿茶酚胺染色结果; (b), (d) 对应考马斯亮蓝 G-250 染色结果, 图片上标为不同浓度的 PS 处理和取样时间。

Fig. 4 Native-PAGE analysis of prophenoloxidase activity from plasmatic hemocyanin in shrimp *L. vannamei* after injection of PS

(a) and (c) was results from 4-methyl catecholamine coloration while (b) and (d) from CBB G-250, and different concentrations of PS and sampling time were marked out over the picture.

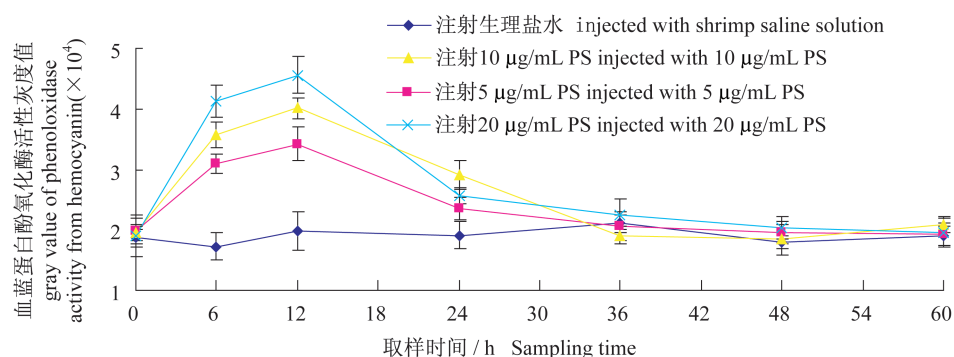


图5 注射 PS 对凡纳滨对虾血浆血蓝蛋白酚氧化酶电泳灰度值的影响

Fig. 5 Time course changes of prophenoloxidase activity from plasmatic hemocyanin in shrimp *L. vannamei* after injection of PS

3 讨论

3.1 注射磷脂酰丝氨酸对凡纳滨对虾血蓝蛋白合成的影响

甲壳动物血蓝蛋白的是由不同亚基组成的多聚体蛋白质,典型的结构单位是由 6 条亚基组成的六聚体^[42-43]。Zatta^[44] 研究证实普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 血蓝蛋白结构中含有磷脂成分,去除后可引起血蓝蛋白物理化学及生理学特性的改变,进而推测脂类在血蓝蛋白结构中可能发挥着稳定构象的作用;据 Coates 等^[8] 报道美洲蟹 (*Limulus polyphemus*) 血蓝蛋白与磷脂酰丝氨酸相互作用后引起的构象变化同 SDS 诱导血蓝蛋白产生的构象变化相似,且该复合物可催化酚类底物氧化,进而认为带负电荷的磷脂,特别是磷脂酰丝氨酸,可能是血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的体内自发激活因子。另外,章跃陵等^[13,16] 已经鉴定出凡纳滨对虾血蓝蛋白六聚体中的三条亚基分子量大小分别是 73、75 和 77 ku,而且许多学者通过同位素参入法、免疫沉淀法以及原位杂交法等研究手段表明十足目甲壳类动物血蓝蛋白的合成位点在肝胰脏组织^[44-47],并且进一步定位到肝胰脏中的 F 细胞^[48]。实验研究结果显示凡纳滨对虾在注射 PS 后 6~36 h 内血浆血蓝蛋白含量呈峰值变化,于 24 h 处达到最大值;而肝胰脏血蓝蛋白 p75 和 p77 亚基表达和 mRNA 的表达则在 0~36 之间呈峰值变化,而且肝胰脏血蓝蛋白亚基的表达和 mRNA 的表达呈现出明显的一致性,各处理组的亚基表达和 mRNA 表达在短时间内迅速升高,在 12 h 处均达到最高值。而且 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PS 注射组比其他处理组在取样时间内各

项指标均明显升高,同时血浆血蓝蛋白含量与肝胰脏血蓝蛋白亚基和 mRNA 的表达在 5 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 注射组中具有一定的时间效应关系,并且与 PS 浓度呈正相关。由此说明,注射 PS 后凡纳滨对虾启动了血蓝蛋白的合成,首先肝胰脏血蓝蛋白基因表达迅速升高,随后启动血蓝蛋白亚基和合成和组装,然后聚集并释放到血淋巴当中去。另外,Favilla 等^[49] 研究表明盐酸胍可以诱导艾氏滨蟹 (*Carcinus aestuarii*) 血蓝蛋白 75 ku 亚基的折叠构象打开;Lei 等^[17] 证明在 WSSV 病毒胁迫下,日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 血蓝蛋白 p75 亚基的基因可被诱导强烈表达,而 p73 亚基基因则没有。这些研究结论与本实验结果中 p75 亚基的高丰度表达以及 p73 亚基的低丰度不显著表达相吻合。作者认为 PS 参与了凡纳滨对虾血蓝蛋白的合成,在短时间内具有明显的变化规律。

3.2 注射磷脂酰丝氨酸对凡纳滨对虾血蓝蛋白酚氧化酶活性的影响

研究显示甲壳动物血蓝蛋白和酚氧化酶在基因序列和蛋白质结构方面具有一定的相似性,并可在 SDS 刺激下表现出一定的酚氧化酶活性^[4,50-51];同时大量研究表明甲壳动物血蓝蛋白在 SDS^[5]、胰蛋白酶^[4]、胰凝乳蛋白酶^[5]、HLS^[7]、磷脂酰丝氨酸^[8]、 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} ^[52] 等物质刺激下可表现出酚氧化酶活性,不同物种的血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的刺激物质有所不同,且血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的形式也有所不同,具体表现在同一刺激物或激活酚氧化酶活性^[5,52],或没有酚氧化酶活性^[4],甚至抑制酚氧化酶活性的发挥^[7]。最近,血蓝蛋白酚氧化酶活性研究有了新突破: Xu 等^[53] 研究表明日本对虾的

一种肿瘤抑制因子 QM 蛋白可以和血蓝蛋白相互作用并调节酚氧化酶的活性;来自于细胞内膜上的磷脂酰丝氨酸(PS)可以激活美洲鲎血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性,并产生与 SDS-血蓝蛋白复合物相似的三四级结构,进而认为 PS 参与了血蓝蛋白体内自发激活酚氧化酶活性的通路^[8]。实验表明注射 PS 后,凡纳滨对虾血蓝蛋白的酚氧化酶活性在 36 h 内呈峰值变化,在 12 h 内活性迅速升高,于 12 h 处活性达到最高值,与 PS 浓度呈现明显的正相关性,然后于 36 h 后恢复至对照组水平,这与血浆血蓝蛋白含量在 6 h 内略有下降是一致的。这说明血蓝蛋白的酚氧化酶活性的发挥依赖于血浆血蓝蛋白含量的早期补给,而血蓝蛋白含量的补给则又依赖于血蓝蛋白 mRNA 的即时表达和血蓝蛋白各个亚基的组装并迅速释放。作者认为 PS 是甲壳动物体内血蓝蛋白发挥酚氧化酶活性的激活因子,血蓝蛋白展现为酚氧化酶后含量下降,PS 可以通过刺激血蓝蛋白的合成来满足机体对血蓝蛋白发挥呼吸功能等其他生命过程的需要。

综上所述,作者认为在对虾体内 PS 是血蓝蛋白展现酚氧化酶活性通路上的重要因子,可启动血蓝蛋白在肝胰脏中的合成,肝胰脏中血蓝蛋白 mRNA 和血蓝蛋白亚基表达短时间内迅速上调,紧接着亚基快速折叠组装成血蓝蛋白的聚体形式并分泌到血淋巴当中,并展现出一定的酚氧化酶活性,辅助参与并可调节酚氧化酶原激活系统。因此,血蓝蛋白在甲壳动物机体内除作用于正常的呼吸功能外,还可以发挥酚氧化酶活性,协同体内各种其他的先天性免疫因子共同参与免疫防御反应,维持动物自身健康活泼的生命状态。

参考文献:

- [1] van Holde K E, Miller K I, Decker H. Hemocyanins and invertebrate evolution [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (19): 15563 - 15566.
- [2] Djangmah J S. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (*fabricius*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1970, 32 (4): 709 - 731.
- [3] Tyler A, Metz C B. Natural heteroagglutinins in the serum of the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. I. Taxonomic range of activity, electrophoretic and immunizing properties [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1945, 100 (3): 387 - 406.
- [4] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322 (2): 490 - 496.
- [5] Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Perera E, et al. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) [J]. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2008, 1780 (4): 652 - 658.
- [6] García-Carreño F L, Cota K, Navarrete del Toro M A. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56 (15): 6454 - 6459.
- [7] Fan T J, Zhang Y N, Yang L L, et al. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 152 (2): 144 - 149.
- [8] Coates C J, Kelly S M, Nairn J. Possible role of phosphatidylserine-hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35 (2): 155 - 163.
- [9] Martínez-Alvarez O, Gómez-Guillén C, Montero P. Presence of hemocyanin with diphenoloxidase activity in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) post mortem [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107 (4): 1450 - 1460.
- [10] Destoumieux-Garzón 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (50): 47070 - 47077.
- [11] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (10): 7927 - 7933.
- [12] Zhang X J, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Antiviral Research*, 2004, 61 (2): 93 - 99.

- [13] 章跃陵,卓亦明,朱永飞,等.南美白对虾人工感染细菌后肝胰脏中主要变化蛋白的研究[J].水产科学,2005,24(6):19-23.
- [14] 刘文杰,苏静,王桂忠,等.锯缘青蟹感染副溶血弧菌后血淋巴中差异蛋白的初步研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2005,44(增刊):191-194.
- [15] 章跃陵,叶向群,陈洁辉,等.凡纳滨对虾 28.5kD 血蓝蛋白的降解新片段[J].中国水产科学,2008,15(3):425-430.
- [16] 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):105-110.
- [17] Lei K Y, Li F, Zhang M C, *et al.* Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(7):808-813.
- [18] Liu W, Qian D, Yan X J. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hemolymph of *Scylla serrata* response to white spot syndrome virus infection [J]. *Aquaculture*, 2011, 314 (1-4):53-57.
- [19] 章跃陵,陈俊,林伯坤,等.南美白对虾血蓝蛋白细胞凝集活性初探[J].汕头大学学报:自然科学版,2005,20(3):48-53.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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]. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(6):645-652.
- [23] Alpuche J, Rosas C, Vázquez L, *et al.* Activation of immunological responses in *Litopenaeus setiferus* hemocytes by a hemocyanin like-lectin [J]. *Aquaculture*, 2009, 292(1-2):11-15.
- [24] Yan F, Zhang Y Y, Jiang R P, *et al.* Identification and agglutination properties of hemocyanin from the mud crab (*Scylla serrata*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1):354-360.
- [25] Zhang Y L, Yan F, Hu Z, *et al.* Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2):330-335.
- [26] 曹劲松,汤俊荣,章跃陵,等.凡纳滨对虾血蓝蛋白与人红细胞的作用靶位[J].中国水产科学,2012,19(2):211-216.
- [27] Zlateva T, Di Muro P, Salvato B, *et al.* The *o*-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 1996, 384(3):251-254.
- [28] Adachi K, Hirata T, Nagai K, *et al.* Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(8):1130-1136.
- [29] Fujieda N, Yakiyama A, Itoh S. Five monomeric hemocyanin subunits from *Portunus trituberculatus*: purification, spectroscopic characterization, and quantitative evaluation of phenol monooxygenase activity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics*, 2010, 1804 (11):2128-2135.
- [30] Nagai T, Osaki T, Shun-ichiro K. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (29):27166-27170.
- [31] Nagai T, Shun-ichiro K. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(38):29264-29267.
- [32] Chaurio R A, Janko C, Muñoz L E, *et al.* Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation [J]. *Molecules*, 2009, 14 (12):4892-4914.
- [33] Tyurina Y Y, Shvedova A A, Kawai K, *et al.* Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine [J]. *Toxicology*, 2000, 148(2-3):93-101.
- [34] Guarcello V, Triolo G, Cioni M, *et al.* Phosphatidylserine counteracts physiological and pharmacological suppression of humoral immune response [J]. *Immunopharmacology*, 1990, 19(3):185-195.
- [35] Stevenson K J, Poller L. The procoagulant activity of partial thromboplastin extracts: the role of phosphatidyl serine [J]. *Thrombosis Research*, 1982, 26(5):341-350.
- [36] Vargas-Albores F, María-Antonia G, José-Luís O. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1993, 106 (2):299-303.

- [37] 蒋琼,王雷,罗日祥. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选[J]. 水产学报,2001,25(4):359-363.
- [38] Nickerson K W, van Holde K E. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin-I. circular dichroism absorption spectra [J]. Comparative Biochemistry Physiology-Part B: Comparative Biochemistry,1971,39(4):855-872.
- [39] Baden S P, Eriksson S P, Weeks J M. Uptake, accumulation and regulation of manganese during experimental hypoxia and normoxia by the decapod *Nephrops norvegicus* (L.) [J]. Marine Pollution Bulletin,1995,31(1-3):93-102.
- [40] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1 - 2): 248-254.
- [41] Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Perera E, et al. Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2007,23(6):1187-1195.
- [42] Markl J, Hofer A, Bauer G, et al. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins:II. Crustacea [J]. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology,1979,133(3):167-175.
- [43] Burmester T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins [J]. Journal of Comparative Physiology-part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology,2002,172(2):95-107.
- [44] Zatta P. Protein-lipid interactions in *Carcinus maenas* (Crustacea) hemocyanin [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry,1981,69(4):731-735.
- [45] Senkbeil E G, Wriston Jr J C. Hemocyanin synthesis in the American lobster, *Homarus americanus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology,1981,68(1):163-171.
- [46] Rainer J, Brouwer M. Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry,1993,104(1):69-73.
- [47] Khayat M, Funkenstein B, Tietz A, et al. *In vivo*, *in vitro* and cell-free synthesis of hemocyanin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology,1995,112(1):31-38.
- [48] Lehnert S A, Johnson S E. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology,2002,133(2):163-171.
- [49] Favilla R, Goldoni M, Del Signore F, et al. Guanidinium chloride induced unfolding of a hemocyanin subunit from *Carcinus aestuarii* II. Holo form [J]. Biochimica et Biophysica Acta,2002,1597(1):51-59.
- [50] Aspán A, Huang T S, Cerenius L, et al. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1995,92(4):939-943.
- [51] Pless D D, Aguilar M B, Falcón A, et al. Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 409 (2): 402-410.
- [52] 陈锋菊,严芳,杨平. 锯缘青蟹血蓝蛋白酚氧化酶活性研究 [J]. 华南农业大学学报,2009,30(1):46-50.
- [53] Xu J Y, Wu S J, Zhang X B. Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin [J]. Cellular Physiology and Biochemistry,2008,21(5-6):473-480.

Hemocyanin synthesis and hemocyanin-derived phenol oxidase in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) injected with phosphatidyl serine

YANG Liubing, PAN Luqing*

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Department of Aquaculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to investigate the effects of injecting phosphatidyl serine (PS) on hemocyanin synthesis and hemocyanin-derived phenol oxidase (Hd-PO) and probe into the pathway and activating mechanism of PS as a possible native elicitor for Hd-PO in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), we injected adult white shrimps different PS with 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and assayed hemocyanin concentration in plasma, expression of hemocyanin subunits (p75 and p77) and mRNA in hepatopancreas, along with Hd-PO activity in plasma from white shrimp. They were investigated by spectrophotometry, native-PAGE, SDS-PAGE and RT-PCR *in vivo* with different sampling time at 0, 6, 12, 24, 36, 48 and 60 h respectively, and we set the control group and parallel group. The results showed that hemocyanin concentration declined slightly during 6 h after injecting PS and afterwards changed as a peak by 36th h after injection with a maximum at 24th h ($P < 0.05$); expression of hemocyanin subunits and mRNA all had peak changes during 36 h after injecting PS, and likewise, all reaching their ceiling values at 12th h ($P < 0.05$); Hd-PO activity had a peak change within 36 h after injecting PS, with its climax at 12th h ($P < 0.05$). The research revealed that PS could activate hemocyanin to show phenol oxidase activity with significant time-dose effects, and meanwhile brought down hemocyanin concentration in a short time at first and subsequently started the hemocyanin synthesis, indicating that PS is the elicitor of Hd-PO in white shrimp, which lays the theoretical foundation for the study on immunological function of hemocyanin in shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; phosphatidyl serine; hemocyanin synthesis; phenol oxidase activity

Corresponding author: PAN Luqing. E-mail: panlq@ouc.edu.cn