



中国鲎血蓝蛋白提纯及其纯化物的液相色谱串联质谱分析

赵忠浩^{1,2}, 常雪晴^{1,2}, 王有基^{1,2}, 何锦锋³,
台宗光⁴, 朱全刚⁴, 胡梦红^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 北海市产品质量检验所, 广西 北海 536000;

4. 上海市皮肤病医院, 上海 200443)

摘要: 为了获得高纯度的中国鲎血蓝蛋白并探究其潜在的应用价值, 实验从中国鲎血淋巴中提取了血蓝蛋白, 并用 AKTA 蛋白纯化系统进行纯化, 使用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 技术对纯化后的血蓝蛋白进行定性分析, 最后从 uniprot 蛋白数据库下载了 22 条分属 5 个物种的血蓝蛋白的氨基酸序列, 并构建了 N-J 系统进化树。结果显示, 制备的血蓝蛋白纯度较高, 从纯化后的中国鲎血蓝蛋白中鉴定到了 12 种血蓝蛋白的亚基, 包括 Hemocyanin subunit I、Hemocyanin subunit II、Hemocyanin subunit III a、Hemocyanin subunit III b、Hemocyanin subunit IV、Hemocyanin subunit V、Hemocyanin subunit VI 等。uniprot 数据库显示, 这些亚基最早在圆尾鲎和美洲鲎体内被发现。N-J 系统进化树显示, 中国鲎血蓝蛋白与圆尾鲎和美洲鲎血蓝蛋白具有高度的同源性, 并且鲎科动物血蓝蛋白与凡纳滨对虾、锯缘青蟹的血蓝蛋白有较近的进化关系, 这意味着可根据虾蟹血蓝蛋白的功能推测中国鲎血蓝蛋白的功能。本研究结果有助于中国鲎血蓝蛋白的功能预测和应用研究。

关键词: 中国鲎; 血蓝蛋白; 纯化; 液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS); 进化树

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

血蓝蛋白 (hemocyanin, Hc) 是广泛存在于节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜蛋白质, 与血红蛋白和蚯蚓血红蛋白并称为自然界的三大呼吸蛋白^[1-2]。中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda) 肢口纲 (Merostomata) 剑尾目 (Xiphosura) 鲎科 (Limulidae) 东方鲎属 (*Tachypleus*), 是一种古老的海洋生物。作为节肢动物的一员, 中国鲎体内也含有丰富的血蓝蛋白^[3]。随着研究的深入, 人们发现血蓝蛋白除了具有运输氧气的作用, 还有其他多种功能^[4], 如能量储存^[5]、免疫防御^[6-8] 以及参与甲壳动物的蜕皮^[9-11] 等。

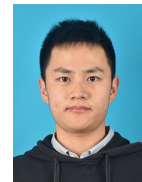
随着对血蓝蛋白功能的深入研究, 人们发现血蓝蛋白可以应用在很多方面。在材料化学上, 血蓝蛋白由于可以表现出催化过氧化氢和多酚的特性, 因此可以被用来制成生物传感器检测双酚 A^[12]。在免疫防御上, 血蓝蛋白在机体内就承担着很重要的作用, 研究表明, 血蓝蛋白具有酚氧化酶活性、抗病毒活性、凝集活性、抑菌活性、凝血溶血活性、抗肿瘤活性等, 因此血蓝蛋白常被制成各种免疫产品, 如匙孔血蓝蛋白 (KLH) 被用于浅表性膀胱癌患者的治疗^[13]; 血蓝蛋白也被作为抗体注射到兔体内用于获得高效价的兔源多

收稿日期: 2020-07-17 修回日期: 2021-03-18

资助项目: 香港海洋公园保育基金 (OT031617); 2017 北海市“十三五”海洋经济创新发展示范项目 (Bhsfs006)

第一作者: 赵忠浩 (照片), 从事海鲎生理学, E-mail: 1054873542@qq.com

通信作者: 胡梦红, 从事濒危海洋动物保育和生理生态研究, E-mail: mhhu@shou.edu.cn



克隆抗血浆^[14]。除此之外,在研究物种进化及物种起源上,血蓝蛋白也是重要的分子标记^[15]。

节肢动物和软体动物的血蓝蛋白在分子结构^[16]和系统发生起源^[17-18]上都不同。因此,尽管它们都含有铜离子且都在动物体内运输氧气,但它们是通过趋同进化^[19-20]形成的独特分子。一般来说,节肢动物的血蓝蛋白是由6个分子量为75 ku的亚基组合成的六聚体,或者以六聚体为单位形成六聚体低聚物^[21]。不同物种低聚物中六聚体的数目也不同,甲壳动物中一般为1~2个,蜆科动物血蓝蛋白是由8个六聚体组成的复杂聚合物^[22]。Sullivan等^[23]通过研究发现,美洲蜆(*Limulus polyphemus*)血蓝蛋白至少由8种不同的亚基组成,这8种亚基彼此之间的氨基酸组成非常相似,且分子量都为65~70 ku。Nemoto等^[24]最早报道了中国蜆血蓝蛋白 α 链氨基末端溴化氢片段的氨基酸序列,该片段由87个氨基酸组成,这是目前关于中国蜆血蓝蛋白序列信息的唯一报道。

在蛋白质鉴定中,质谱法是一种被广泛使用的鉴定技术,蛋白质质谱鉴定就是将蛋白样品分子离子化后,根据不同离子间质荷比(m/z)的差异来分离并确定分子质量,从而确定一个蛋白质或多肽。本研究从中国蜆的血淋巴中提取纯化血蓝蛋白,并对提取到的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析,对目的条带进行液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析,根据质谱结果在数据库上进行搜索和比对,从而确定蛋白质。本研究还从uniprot蛋白数据库下载了中国蜆和其他甲壳类物种的血蓝蛋白氨基酸序列并进行比对,以探讨中国蜆血蓝蛋白与其他物种血蓝蛋白的亲缘关系,这将有助于中国蜆血蓝蛋白的功能预测和应用研究。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

实验成蜆来自广西省北海市竹林盐场养殖基地,于人工海水中暂养2周。本研究以雄蜆为实验对象,选取健康有活力、无断肢、无寄生虫的雄蜆[体质量(1 434.53±34.52)g,前体宽度(26.32±0.30 cm)],取血用于后续实验。

1.2 实验条件

AKTA pure 蛋白纯化条件 层析柱型号(Hil-

oad 16/60 superdex 200 pg), Tris-HCl (pH 8.0)+300 mm NaCl 平衡层析柱,5 mL 血蓝蛋白粗提液上样, Tris-HCl(pH 8.0)+300 mm NaCl 洗脱,流速 1 mL/min, 2 000 mAU 处监测收集物。

液相色谱-串联质谱条件 色谱柱(预柱): Acclaim PepMap RPLC C₁₈ (300 μ m i.d.×5 mm, 5 μ m); 分析柱: Acclaim PepMap RPLC C₁₈ (150 μ m×150 mm, 1.9 μ m); 流动相 A: 0.1% 甲酸, 2% ACN; 流动相 B: 0.1% 甲酸, 80% ACN。梯度洗脱条件: 6% B (0 min)→9% B (8 min)→14% B (16 min)→30% B (36 min)→40% B (15 min)→95% B (3 min); 流速 600 nL/min; 进样体积 5 μ L。柱温 25 $^{\circ}$ C。

一级质谱参数: 分辨率 7 000; 扫描范围: m/z 400~1 200; 喷雾电压 2.2 kV; 毛细管温度 270 $^{\circ}$ C。二级质谱参数: 分辨率 17 500; 选择每张一级质谱图的强度最高的 20 个离子进行二级碎裂, 二级碎裂能量为 27。

1.3 蛋白样品的制备

血淋巴样品的制备 将 12 号针的尖端从头胸甲和腹甲之间插入心脏采集血淋巴, 取血淋巴于离心管中, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 1 h, 保留上清液。

血蓝蛋白的粗提及纯化 取 0.5 mL 上清液于离心管中, 用移液枪逐滴缓慢加入 1 mL 100% 的饱和硫酸铵溶液, 将离心管放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。第 2 天取出离心管, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 1 h, 去除上清液并加入 1 mL pH 值 7.0~7.6 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)重悬蛋白, 得到血蓝蛋白粗提液。

将 5 mL 血蓝蛋白粗提液加入到 AKTA pure 蛋白纯化系统中, 在 2 000 mAU 处监测收集物, 得到血蓝蛋白纯化样品。

SDS-PAGE 取 10 μ L 溶液样本, 与 2.5 μ L 加载缓冲液(5 \times)混合, 沸水中加热 5 min; 将样品和 marker 加入 12% 分离凝胶的孔中, 然后盖上顶盖并连接电极。电压设定为 80 kV, 运行 15 min。然后将电压设定为 120 kV, 运行 1 h; 卸下胶板, 剥离胶放入考马斯亮蓝染色液中, 室温染色 1 h。加入脱色液, 置于 80 r/min 脱色摇床上, 每 20 min 更换 1 次脱色液至完全脱净。

胰蛋白酶酶解 胶粒脱色: 将目的条带切成 1 mm³ 的胶粒, 分别装入 1.5 mL EP 管中。使用 50% ACN-50% 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液脱色,

放置 10~30 min 吸出弃去, 重复此操作至胶粒无色。胶粒脱水: 加入 100% ACN 100 μ L, 放置 30 min, 待胶粒呈白色团状, 弃去 ACN, 室温放置干燥。还原烷基化: 按照 100 μ L/管加入 10 mmol/L DTT (二硫苏糖醇) 于 56 $^{\circ}$ C 水浴中还原 1 h, 吸出弃去。按照 100 μ L/管加入 55 mmol/L IAA (吡啶乙酸), 暗处室温反应 1 h, 吸出弃去。加脱色液 (50% ACN-50% 50 mm NH_4HCO_3) 洗 1 遍, 吸出弃去, 加入 100% ACN 100 μ L, 放置 30 min, 待胶粒呈白色团状, 弃去 ACN, 室温放置干燥。酶切: 取浓度为 15 ng/ μ L 的酶 (用 50 mmol/L NH_4HCO_3 稀释), 按照 7~10 μ L/管的量加入酶溶液, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 40 min, 取出后每管补加 5~10 μ L 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 密封置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 16 h。肽段提取: 加提取液 (5% TFA-50% ACN-45% 水) 100 μ L/管, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后, 超声 5 min, 离心 5 min, 将提取液移入另一新 EP 管中, 重复提取 1 次, 将提取液合并, 真空离心干燥。肽段用样品溶解液 (0.1% 甲酸、2% 乙腈) 溶解, 充分振荡涡旋, 13 200 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 上清转移到上样管中, 等待质谱分析。

1.4 数据库检索

质谱分析得到的原始文件使用 Maxquant (1.6.2.10) 分别检索目标蛋白数据库, 检索参数: ① 固定修饰 (fixed modifications): Carbamidomethyl (C); ② 可变修饰 (variable modifications): oxidation (M); acetyl (protein N-term); ③ 酶 (enzyme): 胰蛋白酶 (trypsin); ④ 遗漏酶切位点 (maximum missed cleavages): 2; ⑤ 一级质谱误差 (peptide mass tolerance): 20 ppm; ⑥ 二级质谱误差 (fragment mass tolerance): 20 ppm; ⑦ 肽段/碎片离子质量数 (mass values): monoisotopic (单同位素); ⑧ 显著性阈值 (significance threshold): 0.01。

2 结果

2.1 中国鲎血蓝蛋白的 SDS-PAGE 分析

为了初步了解纯化后的血蓝蛋白组分, 实验采用 SDS-PAGE 对纯化后血蓝蛋白的相对分子质量进行测定, 电泳图谱显示, 纯化后的血蓝蛋白纯度较高, 只有 1 条明显的条带, 其分子质量约 70 ku (图 1)。

2.2 中国鲎血蓝蛋白的质谱鉴定结果分析

将搜索出来的蛋白质进行筛选, 设蛋白质得

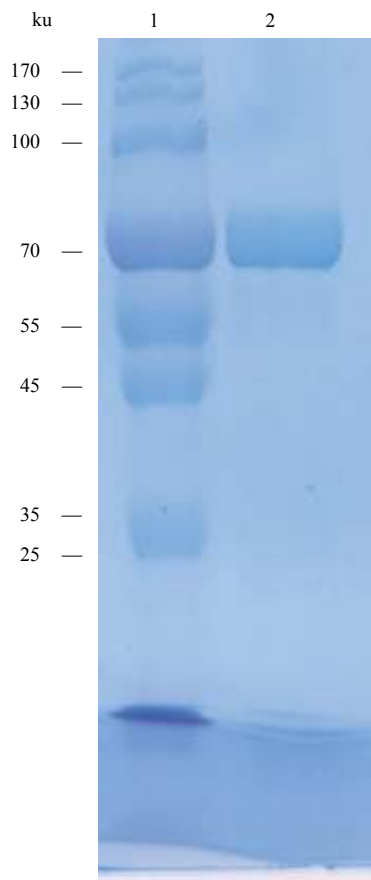


图 1 中国鲎血蓝蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

1. Marker, 2. 血蓝蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis results of hemocyanin

1. Marker, 2. hemocyanin

分 score 值 >70, 序列覆盖度 >20% 时有统计学意义^[25]。将 SDS-PAGE 胶带中的目的条带切成胶粒, 然后进行脱水、还原烷基化、酶切、提取、溶解。经过充分振荡的溶解液离心后将上清液经 LC-MS/MS 分析, 将得到的质谱原始文件使用 Maxquant (1.6.2.10) 程序分别检索目标蛋白数据库, 并根据蛋白质得分 score 值、序列覆盖度的大小及蛋白相对强度进行综合分析。结果从目的条带中鉴定到 12 种蛋白 (表 1), uniprot 数据库显示均为血蓝蛋白, 这些蛋白中, Hemocyanin subunit I、Hemocyanin subunit II、Hemocyanin subunit III a、Hemocyanin subunit III b、Hemocyanin subunit IV、Hemocyanin subunit V、Hemocyanin subunit VI、Hemocyanin subunit HR6 共 8 种最早在圆尾鲎 (*Carcinoscorpius rotundicauda*) 体内被发现; Hemocyanin II、Hemocyanin subunit VI a、Hemocyanin subunit VI b、Hemocyanin subunit VI 共 4 种最早在美洲鲎体内被发现。

表 1 中国鲎血蓝蛋白的质谱鉴定结果

Tab. 1 Results of mass spectrometric identification of *T. tridentatus* hemocyanin

| 编号 no. | 蛋白编号 accession | 注释 description | 分子量/ku MW | 蛋白得分 score | 肽段覆盖度 sequence coverage | 肽段长度/个 sequence lengths | 蛋白强度 ($\times 10^6$) intensity |
|--------|----------------|--|-----------|------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1 | A1X1V1 | Hemocyanin subunit I OS= <i>C. rotundicauda</i> | 71.681 | 323.31 | 69.7 | 624 | 941 140 |
| 2 | A1X1V2 | Hemocyanin subunit II OS= <i>C. rotundicauda</i> | 72.613 | 323.31 | 49 | 629 | 644 810 |
| 3 | A1X1V3 | Hemocyanin subunit IIIa OS= <i>C. rotundicauda</i> | 72.984 | 323.31 | 34.2 | 631 | 558 120 |
| 4 | A1X1V4 | Hemocyanin subunit IIIb OS= <i>C. rotundicauda</i> | 72.826 | 323.31 | 48.2 | 628 | 647 790 |
| 5 | A1X1V5 | Hemocyanin subunit IV OS= <i>C. rotundicauda</i> | 72.577 | 323.31 | 70.8 | 624 | 1 330 100 |
| 6 | A1X1V6 | Hemocyanin subunit V OS= <i>C. rotundicauda</i> | 74.043 | 323.31 | 50.2 | 638 | 384 540 |
| 7 | A1X1V7 | Hemocyanin subunit VI OS= <i>C. rotundicauda</i> | 72.898 | 248.06 | 36.9 | 631 | 108 980 |
| 8 | Q9TWE5 | Hemocyanin subunit HR6 OS= <i>C. rotundicauda</i> | 59.259 | 90.085 | 52.1 | 514 | 31 332 |
| 9 | A2AX56 | Hemocyanin II OS= <i>L. polyphemus</i> | 72.628 | 306.41 | 26 | 628 | 98 574 |
| 10 | A2AX57 | Hemocyanin subunit IIIa OS= <i>L. polyphemus</i> | 72.278 | 170.4 | 25.7 | 627 | 159 790 |
| 11 | G8YZR0 | Hemocyanin subunit IIIb OS= <i>L. polyphemus</i> | 72.791 | 200.79 | 37.9 | 628 | 102 300 |
| 12 | A2AX59 | Hemocyanin subunit VI OS= <i>L. polyphemus</i> | 73.743 | 323.31 | 46.2 | 638 | 297 210 |

注: OS=*C. rotundicauda*, 表示源自圆尾鲎; OS=*L. polyphemus*, 表示源自美洲鲎
Notes: OS=*C. rotundicauda*, indicates derived from *C. rotundicauda*; OS=*L. polyphemus*, indicates derived from *L. polyphemus*

2.3 中国鲎血蓝蛋白的 LC-MS/MS 肽质量指纹图分析

酶解后的肽混合物经 LC-MS/MS 分析, 获得肽质量指纹图 (PMF), 该图质量较高, 峰信号较强, 信噪比高。图 2 是目的条带的质谱检测总离子流色谱图, 该图峰数目较多且峰宽较小, 说明

液相色谱分离效率较好且质谱数据采集正常。图 3 是得分最高肽段的二级质谱图, 该图碎片离子匹配较完整, 证明肽段真实性较高, 氨基酸序列为 DRKGELFYMHQMCAR。

2.4 中国鲎血蓝蛋白的 N-J 系统进化树分析

在 uniprot 数据库搜索凡纳滨对虾 (*Litopen-*

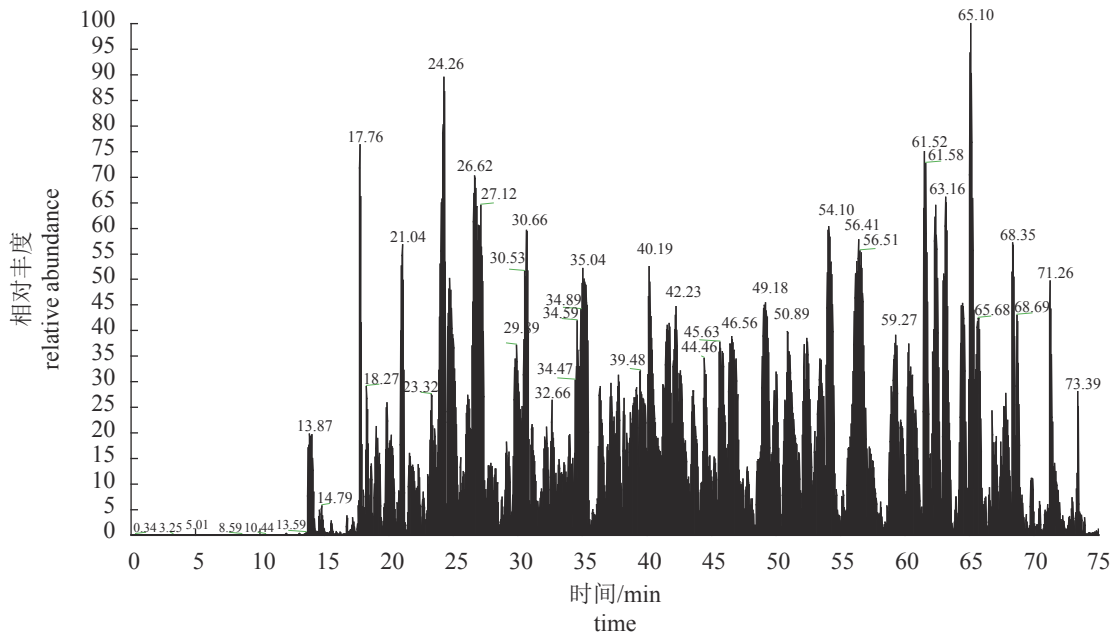


图 2 血蓝蛋白的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion flow chromatogram of hemocyanin

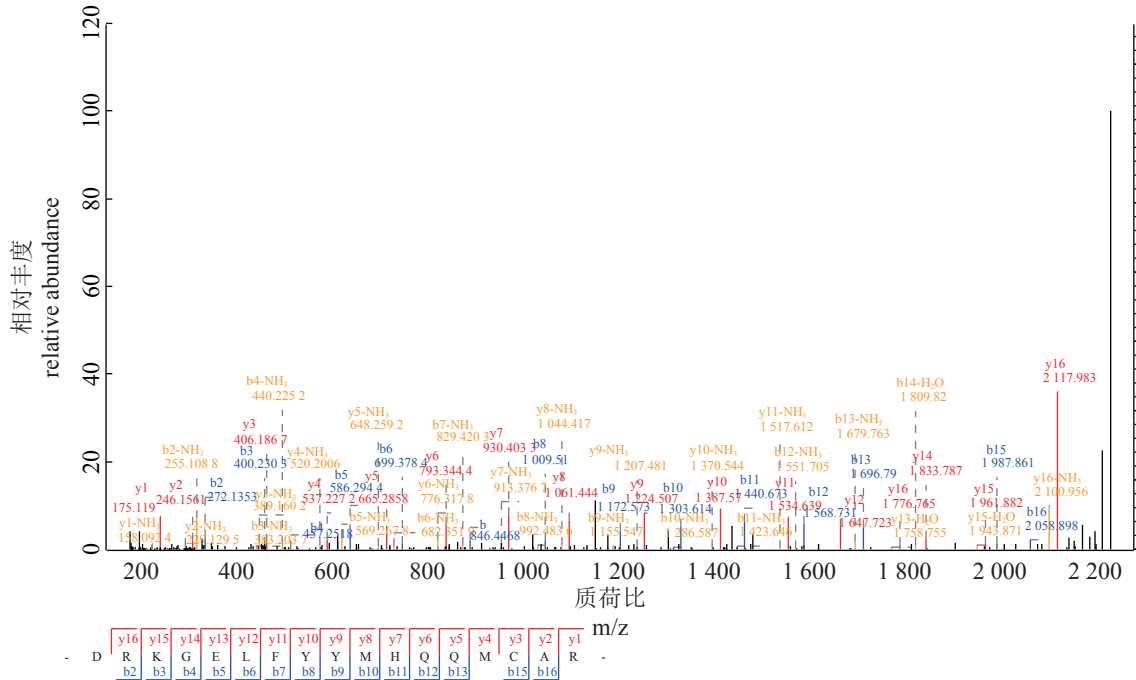


图 3 DRKGELFYMHQQMCAR 肽段二级质谱图

图中蓝色是 b 离子, 红色是 y 离子, 黄色是 b 离子和 y 离子丢失水或氨基的离子; 最下面一排为鉴定到的肽段的碎片离子

Fig. 3 Result of secondary mass spectrum of DRKGELFYMHQQMCAR peptide

Peptide spectra are shown with b fragment ions color-coded blue, y fragment ions red, and the yellow colors are the b and y ions that have lost water or amino; the bottom row is the fragment ions of the identified peptide

aeus vannamei)、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 和 4 种鲎类的血蓝蛋白氨基酸序列, 共搜索下载血蓝蛋白序列 22 条, 其中凡纳滨对虾 5 条、锯缘青蟹 1 条、中国鲎 1 条、圆尾鲎 8 条、美洲鲎 7 条、巨鲎 (*T. gigas*) 0 条。运用 ClustalW 方法对 22 条血蓝蛋白氨基酸序列进行多序列比对, 并用 MEGA 7 软件对 22 条蛋白序列构建 N-J 系统进化树 (图 4), 每个节点处的数字表示补偿检验置信值, 进化树共有 20 个节点, 其中 17 个节点处的置信值 (占 85%) 大于 70, 表明进化树整体可信度较高。

3 讨论

SDS-PAGE 方法建立于 20 世纪 60 年代, 之后经过科学家的多次改良, 在分离、鉴定和纯化蛋白质方面表现出极高的优越性。同时由于聚丙烯酰胺凝胶电泳具有操作简单、分子交联度高、分辨率强、分离范围窄、可分离相差较小的蛋白质样品等优点, 广泛用于蛋白质相对分子质量的测定中^[26]。通过与标准蛋白质样品的相对迁移率对比, 即可估计待测蛋白质样品的相对分子质量^[27]。本研究使用 SDS-PAGE 的方法对纯化后的血蓝蛋白进行分子质量的初步测定以及纯度的观察, 电

泳结果发现, 样品呈现出单一的条带 (图 1), 表明纯化后的血蓝蛋白纯度较高, 该血蓝蛋白的分子质量约为 70 ku。研究表明, 在 SDS-PAGE 电泳中加入 SDS, 使得蛋白样品携带大量负电荷, 从而掩盖了不同蛋白原有的电荷量, 因此在 SDS-PAGE 电泳中, 样品的迁移速度只取决于蛋白的相对分子质量, 而与其所携带的电荷及分子的形状无关^[28]。质谱鉴定结果显示, 纯化后的血蓝蛋白包含 12 种不同的血蓝蛋白亚基, 它们同属血蓝蛋白家族, 具有较高的同源性。除了 Hemocyanin subunit HR6 分子质量为 59 ku 外, 其他 11 种亚基分子质量均为 71~75 ku, 这与电泳结果一致。胶图中没有显示 59 ku 这条带, 原因可能是 Hemocyanin subunit HR6 蛋白占比太小, 表 1 中的“蛋白强度”从一定程度上反映了蛋白占有量, HR6 亚基的蛋白强度值远低于其他蛋白, 这可能是胶图没有显示 HR6 条带的原因。

LC-MS/MS 是一种鉴定化合物组分的技术, 广泛应用于药物、食品和生物等领域的研究。本研究利用 LC-MS/MS 技术对提纯后的中国鲎血蓝蛋白进行质谱鉴定, 通过肽质量指纹图谱等数据在 uniprot 蛋白数据库中检索得到 12 种血蓝蛋白。

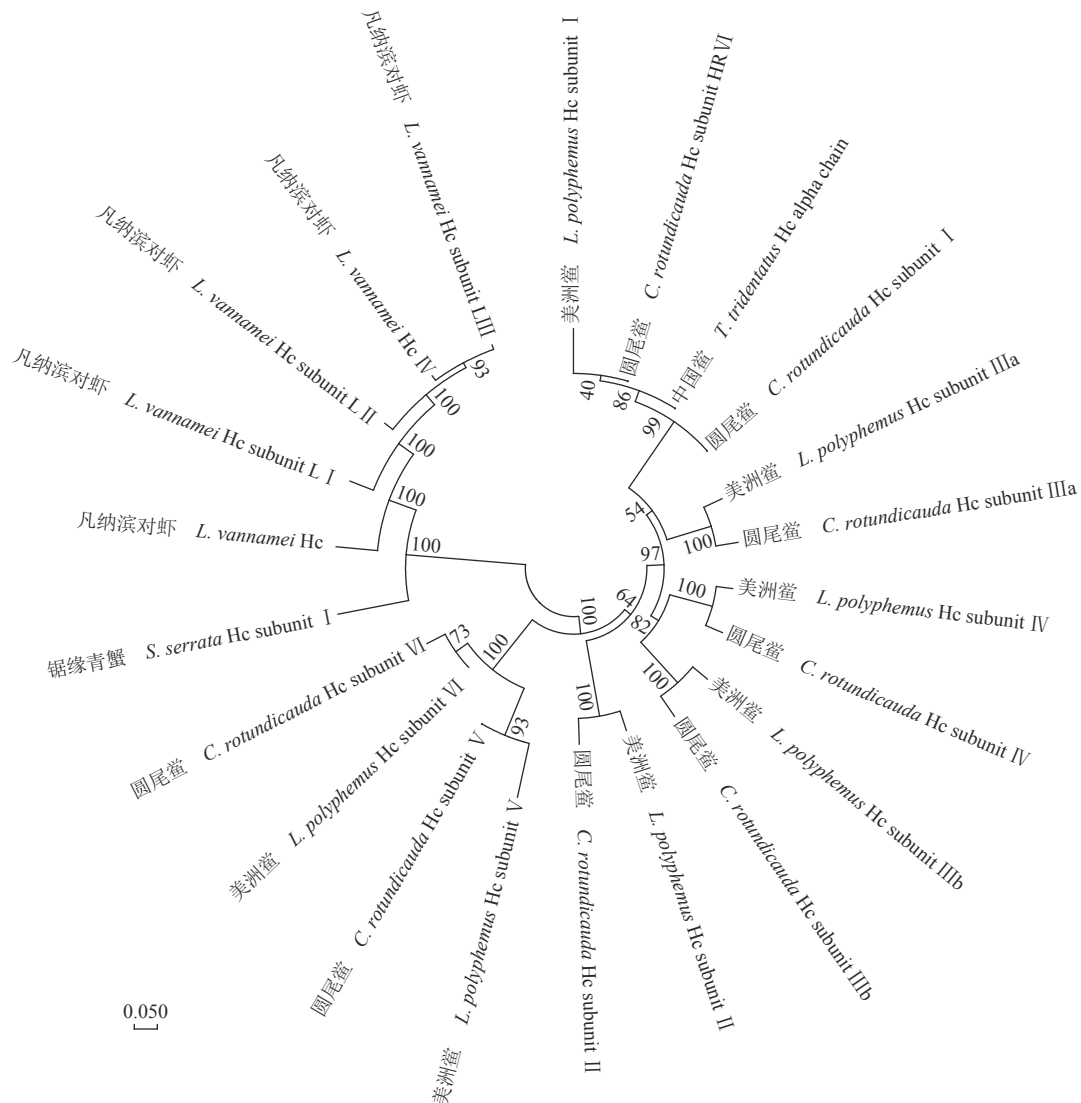


图 4 血蓝蛋白的 N-J 系统进化树

节点上的数字表示补偿检验置信值

Fig. 4 N-J phylogenetic tree of hemocyanin

The number on the node represents the confidence value of the compensation test

LC-MS/MS 得到的总离子流色谱图、肽段的二级质谱图结果质量较高、信噪比大、峰信号较强, 满足后续的数据分析和蛋白质数据库的搜索。MS/MS 结果中, 若蛋白质序列的专一性高, 且覆盖率达到 20%~50%, 表明根据其肽序列所查询的结果可靠^[25]。在本研究蛋白质序列比对的结果中发现, 12 种蛋白的 score 值均较高, 且序列覆盖度都在 25% 以上, 表明鉴定结果可靠。

由于国内外对中国鲎血蓝蛋白蛋白质组的研究报道较少, 因此数据库中中国鲎血蓝蛋白的序列信息较少, 而同属鲎科的圆尾鲎和美洲鲎的血蓝蛋白序列信息较多。检索结果显示, 匹配到的

12 种蛋白分别为最早在圆尾鲎体内被发现的 Hemocyanin subunit IV、Hemocyanin subunit I、Hemocyanin subunit IIIb、Hemocyanin subunit II、Hemocyanin subunit IIIa、Hemocyanin subunit V、Hemocyanin subunit VI、Hemocyanin subunit HR6 和最早在美洲鲎体内被发现的 Hemocyanin subunit VI、Hemocyanin subunit II、Hemocyanin subunit IIIb、Hemocyanin subunit IIIa。其中 Hemocyanin subunit HR6 于 1995 年被 Hiroaki 和 Fumio 在圆尾鲎血淋巴中发现并命名, 同时 HR6 亚基被证明由 515 个氨基酸组成^[29], 这与本研究结果相符。1974 年 Sullivan 等^[23] 使用葡聚糖凝胶层析的方法

将美洲鲎的血蓝蛋白分馏为 5 个可分辨的主要区域, 并将其命名为 Hemocyanins I~V, 这些血蓝蛋白区域以 1:2:3:1:0.7 的比例分布, 其中 Hemocyanins III 包含 2 个部分。本研究从中国鲎的血蓝蛋白中检测到了 Hemocyanins I~V 的全部 5 个亚基和 Hemocyanins III 的 2 个部分。虽然圆尾鲎和美洲鲎血淋巴内都存在 Hemocyanin subunit VI、Hemocyanin subunit II、Hemocyanin subunit III b、Hemocyanin subunit III a 这 4 个亚基, 但是由于物种的不同, 这些同名的亚基之间都存在一些细微的差异, 如氨基酸长度和分子质量之间都有微小的差别。另外 uniprot 蛋白质数据库中存在的唯一一条与中国鲎血蓝蛋白有关的氨基酸序列在本研究中并未被检出, 这是因为数据库中中国鲎血蓝蛋白 α 链氨基末端溴化氢片段只有 87 个氨基酸序列, 而这 87 个氨基酸序列全部包含在圆尾鲎血蓝蛋白数据库中的 Hemocyanin subunit I 中, 因此, 本研究只匹配到了圆尾鲎血蓝蛋白数据库中的 Hemocyanin subunit I。

研究表明, 血蓝蛋白具有多种免疫功能, 如酚氧化酶活性、抗菌、凝集活性等。关于血蓝蛋白的免疫功能多样性研究, 目前主要集中在两个方面。一个是血蓝蛋白的糖基化修饰, 另一个是血蓝蛋白有多个不同的亚基。章跃陵等^[30]从凡纳滨对虾的血清中分离出 5 种含糖量不同的血蓝蛋白, 发现这些血蓝蛋白之间的酚氧化酶活性、细菌凝集活性和溶血活性均表现出明显的差异, 且血蓝蛋白去糖基化后免疫活性显著下降。陈传道^[31]的实验也显示出类似的结果。这些均表明不同的糖基化修饰可能是血蓝蛋白免疫功能多样性的分子基础之一。很多研究表明血蓝蛋白有多个不同的亚基, 这些亚基之间的序列和分子量存在一定的差异, 序列的差异必然导致功能的差异, 不同的序列和不同的糖基化修饰共同造就了血蓝蛋白的免疫功能多样性。本研究发现, 中国鲎血蓝蛋白亚基在序列上和美洲鲎、圆尾鲎之间有很多相似性, 这有助于不同物种间血蓝蛋白功能的探索, 但是这些序列相似的亚基在糖基化程度上是否相似, 是否会影响血蓝蛋白的功能, 还有待进一步探索。

蛋白质序列可以决定蛋白质结构, 进而决定蛋白质的功能, 因此对蛋白质序列的分析是进行蛋白质功能分析的基础。近年来关于凡纳滨对虾、锯缘青蟹等物种的血蓝蛋白的研究较多, 关于中

国鲎血蓝蛋白的研究较少。为了探究中国鲎血蓝蛋白与其他物种间血蓝蛋白的亲缘关系, 本研究从 uniprot 蛋白质数据库中下载了凡纳滨对虾、锯缘青蟹和 4 种鲎类的血蓝蛋白序列, 并构建了 N-J 系统进化树。结果显示, 凡纳滨对虾和锯缘青蟹的血蓝蛋白进化关系更近, 中国鲎、美洲鲎和圆尾鲎的血蓝蛋白进化关系更近, 尤其是其同名的血蓝蛋白亚基的氨基酸序列相似度极高(图 4)。同时发现, 鲎科动物的血蓝蛋白与其他 2 个物种的血蓝蛋白也具有较近的进化关系。这提示可以根据凡纳滨对虾血蓝蛋白的已知功能去推测中国鲎血蓝蛋白的功能。李长平等^[32]的研究显示, 凡纳滨对虾的血蓝蛋白酶解多肽在体外具有良好的凝集和抑菌活性。刘尚杰^[33]发现, 源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的化学合成肽段在体外可以发挥抗肿瘤的作用。中国鲎血蓝蛋白是否也具有这些功能, 需要进一步探索。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Burmester T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins[J]. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2002, 172(2): 95-107.
- [2] Markl J. Evolution of molluscan hemocyanin structures[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(9): 1840-1852.
- [3] Coates C J, Talbot J. Hemocyanin-derived phenoloxidase reaction products display anti-infective properties[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 86: 47-51.
- [4] Scherbaum S, Hellmann N, Fernández R, et al. Diversity, evolution, and function of myriapod hemocyanins[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2018, 18(1): 107.
- [5] Paul R, Bergner B, Pfeiffer-Seidl A, et al. Gas transport in the haemolymph of arachnids-oxygen transport and the physiological role of haemocyanin[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1994, 188(1): 25-46.
- [6] Qin Z D, Babu V S, Wan Q Y, et al. Antibacterial activity of hemocyanin from red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 391-399.
- [7] Ramasamy S M, Denis M, Sivakumar S, et al. Phenolox-

- idase activity in humoral plasma, hemocyanin and hemocyanin separated proteins of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 977-985.
- [8] Yan F, Zhang Y L, 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.
- [9] Galindo C, Gaxiola G, Cuzon G, *et al.* Physiological and biochemical variations during the molt cycle in juvenile *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2009, 29(4): 544-549.
- [10] Glazer L, Tom M, Weil S, *et al.* Hemocyanin with phenoloxidase activity in the chitin matrix of the crayfish *gastrolith*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(10): 1898-1904.
- [11] Terwilliger N B, Dangott L, Ryan M. Cryptocyanin, a crustacean molting protein: evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(5): 2013-2018.
- [12] 阳鹏. 铜蛋白的直接电化学及其电催化传感的研究[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2013.
- Yang P. Studies on direct electrochemistry of cuprein and their electrocatalytic biosensing[D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2013 (in Chinese).
- [13] 梁铸林, 杨为民. 膀胱癌主动免疫治疗研究进展[J]. *临床外科杂志*, 2007, 15(1): 56-58.
- Liang Z L, Yang W M. Research progress of active immunotherapy for bladder cancer[J]. *Journal of Clinical Surgery*, 2007, 15(1): 56-58 (in Chinese).
- [14] 史国营. 内皮素-1 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立与初步应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- Shi G Y. Development of the sandwich ELISA for detecting ET-1 and its initial application[D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [15] 谢维, 栾云霞. 节肢动物血蓝蛋白家族的组成与演化[J]. *生命科学*, 2011, 23(1): 106-114.
- Xie W, Luan Y X. Members of the arthropod hemocyanin superfamily and their evolution[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(1): 106-114 (in Chinese).
- [16] Ellerton H D, Ellerton N F, Robinson H A. Hemocyanin-a current perspective[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1983, 41: 143-248.
- [17] Drexel R, Siegmund S, Schneider H J, *et al.* Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*)[J]. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1987, 368(6): 617-635.
- [18] Voll W, Voit R. Characterization of the gene encoding the hemocyanin subunit e from the tarantula *Eurypelma californicum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(14): 5312-5316.
- [19] Stern D L. The genetic causes of convergent evolution[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(11): 751-764.
- [20] Losos J B. Convergence, adaptation, and constraint[J]. *Evolution*, 2011, 65(7): 1827-1840.
- [21] Magnus K A, Hazes B, Ton-That H, *et al.* Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences[J]. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1994, 19(4): 302-309.
- [22] 潘鲁青, 金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 484-491.
- Pan L Q, Jin C X. A review on hemocyanins of crustacean[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 484-491 (in Chinese).
- [23] Sullivan B, Bonaventura J, Bonaventura C, *et al.* Hemocyanin of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Structural differentiation of the isolated components[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1976, 251(23): 7644-7648.
- [24] Nemoto T, Takagi T. The amino acid sequence of the amino-terminal cyanogen bromide fragment of *Tachypleus tridentatus* hemocyanin alpha chain[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 1981, 670(1): 79-83.
- [25] 夏其昌, 曾嵘, 曹兴军, 等. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 559.
- Xia Q C, Zeng R, Cao X J, *et al.* Protein chemistry and proteomics[M]. Beijing: Science Press, 2004: 559 (in Chinese).
- [26] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2): 368-379.
- [27] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E. Improved Phos-tag

- SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling[J]. *Proteomics*, 2011, 11(2): 319-323.
- [28] 石继红, 赵永同, 王俊楼, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小分子多肽[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(6): 761-763.
- Shi J H, Zhao Y T, Wang J L, *et al.* Analysis of low molecular peptides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2000, 21(6): 761-763 (in Chinese).
- [29] Sugita H, Shishikura F. A case of orthologous sequences of hemocyanin subunits for an evolutionary study of horseshoe crabs: amino acid sequence comparison of immunologically identical subunits of *Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus tridentatus*[J]. *Zoological Science*, 1995, 12(5): 661-667.
- [30] 章跃陵, 邢立刚, 严芳, 等. 5种凡纳滨对虾血蓝蛋白的糖基化修饰及功能对比分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(7): 655-661.
- Zhang Y L, Xing L G, Yan F, *et al.* Comparative analyses of five hemocyanin isomers from shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 25(7): 655-661 (in Chinese).
- [31] 陈传道. 凡纳滨对虾血蓝蛋白抗肿瘤活性及其功能多样性的糖分子基础研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2012.
- Chen C D. Investigations on the antitumor activity of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin and the glycosylation basis of its multiple functions[D]. Shantou: Shantou University, 2012 (in Chinese).
- [32] 李长平, 黄河, 王帆, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白酶解多肽的凝集与抑菌活性[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 1042-1047.
- Li C P, Huang H, Wang F, *et al.* Agglutinative and antibacterial activity of the peptides hydrolyzed from *Litopenaeus vannamei* hemocyanin with trypsin[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 1042-1047 (in Chinese).
- [33] 刘尚杰. 两种源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的化学合成肽段体外抗肿瘤活性及其作用机制研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2018.
- Liu S J. *In vitro* antitumor activity and molecular mechanisms of two chemically synthesized *Litopenaeus vannamei* hemocyanin-derived peptides [D]. Shantou: Shantou University, 2018 (in Chinese).

Hemocyanin purification from Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) and analysis of the purified products by liquid chromatography tandem with mass spectrometry

ZHAO Zhonghao^{1,2}, CHANG Xueqing^{1,2}, WANG Youji^{1,2}, HE Jinfeng³,
TAI Zongguang⁴, ZHU Quangang⁴, HU Menghong^{1,2*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Beihai Product Quality Testing Institute, Beihai 536000, China;

4. Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai 200443, China)

Abstract: *Tachypleus tridentatus* belongs to the arthropod phylum, and its blood contains a lot of hemocyanin. Hemocyanin plays an important role in the organism, such as transporting oxygen, immune defense, and energy storage. Hemocyanin also has many applications *in vitro*, such as being made into biosensors and immune products. This study aims to obtain high-purity hemocyanin of *T. tridentatus* and explore its potential application value. In this study, hemocyanin was extracted from hemolymph of *T. tridentatus* and purified with AKTA protein purification system. The purified hemocyanin was qualitatively analyzed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technology. Finally, 22 amino acid sequences of hemocyanin from 5 species were downloaded from the uniprot protein database, then the N-J phylogenetic tree was constructed. The results showed that the purity of the purified hemocyanin was high. Twelve types of hemocyanin subunits were identified from hemocyanin of *T. tridentatus*, including Hemocyanin subunit I, Hemocyanin subunit II, Hemocyanin subunit IIIa, Hemocyanin subunit IIIb, Hemocyanin subunit IV, Hemocyanin subunit V, Hemocyanin subunit VI, etc. According to the uniprot database, these subunits were first found in *Carcinoscorpius rotundicauda* and *Limulus polyphemus*. The N-J phylogenetic tree shows that hemocyanin of *Tachypleus tridentatus* has a high degree of homology with *C. rotundicauda* and *L. polyphemus*. It was also found that there was a close evolutionary relationship of hemocyanin between hemocyanin of Limulidae and *Litopenaeus vannamei* and *Scylla serrata*, which suggests that the function of hemocyanin in *T. tridentatus* can be inferred from the function of hemocyanin in other species. This study obtained high-purity hemocyanin from hemolymph of *T. tridentatus*, and the results of this study are helpful to the function prediction and application research of Chinese horseshoe crab hemocyanin.

Key words: *Tachypleus tridentatus*; hemocyanin; purification; LC-MS/MS; phylogenetic tree

Corresponding author: HU Menghong. E-mail: mhhu@shou.edu.cn

Funding projects: Hong Kong Ocean Park Conservation Fund (OT031617); "Thirteenth Five-Year" Marine Economic Innovation and Development Demonstration Project of Beihai in 2017 (Bhsfs006)