

doi: 10.7541/2013.146

与不同病原菌相结合的凡纳滨对虾血蓝蛋白溶血活性对比分析

张小瑜 林晓敏 章跃陵 路群山 邹文卉 伦镜盛

(汕头大学理学院生物学系, 广东省海洋生物技术重点实验室, 汕头 515063)

摘要: 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象, 采用亲和孵育、PAGE、SDS-PAGE、Western-blotting、溶血活性测定等技术, 探索与6种不同病原菌相结合的血蓝蛋白溶血活性的差异。结果发现, 与副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻酸弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli* K12)、乙型链球菌(*Beta Streptococcus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 6种不同细菌相结合的血蓝蛋白(分别命名为 HMC-VP、HMC-VA、HMC-VF、HMC-EC、HMC-BS、HMC-SA)对鸡红细胞表现出不同的溶血活性, 其中 HMC-VP、HMC-SA 溶血活性最高(100.00%), HMC-VA 溶血活性最低(39.68%)。在此基础上, 进一步采用糖基氧化和胰蛋白酶消化等策略探索引起该6种血蓝蛋白溶血活性差异的分子基础。结果表明, 该6种血蓝蛋白经糖基氧化后, 溶血活性大幅度下降抑或丧失, 而经胰蛋白酶水解后, 溶血活性大幅度升高抑或达到100.00%。由此说明, 与不同病原菌相结合的血蓝蛋白免疫学功能(溶血活性)存在显著性差异, 造成该差异的原因可能与血蓝蛋白的糖基化修饰、蛋白构象的多样性有关。

关键词: 对虾; 血蓝蛋白; 溶血活性; 多样性

中图分类号: S945.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)06-1079-06

血蓝蛋白是位于节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白, 一般认为, 血蓝蛋白的主要生物学功能与机体内氧的输送有关, 但近年来研究表明, 血蓝蛋白是一种多功能蛋白, 其不仅具有输氧功能, 而且还具有酚氧化酶^[1-3]、抗病毒^[4-6]、抗细菌^[7, 8]、抗肿瘤^[9, 10]、凝集^[11-13]和溶血^[14, 15]等多种非特异性免疫学活性。

本实验室前期采用亲和蛋白质组学技术路线发现对虾血清中直接与病原菌相结合的主要蛋白为血蓝蛋白^[16]。本课题组乔杰等^[17]进一步研究证实, 这些与不同病原菌相结合的血蓝蛋白在凝集、抑菌活性方面存在较大差异。然而, 这些与不同细菌直接相结合的血蓝蛋白在溶血活性上是否同样也存在差异, 还有待于进一步研究。为此, 积极探索其溶血活性的差异以及导致该差异形成的分子

基础, 对阐明血蓝蛋白功能多样性的分子机制等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾由汕头市华助水产有限公司提供, 新鲜鸡血购自汕头市鮑浦农贸市场。实验用副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻酸弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、大肠杆菌 K12(*Escherichia coli* K12)、乙型链球菌(*Beta Streptococcus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为本实验室保存菌种。

1.2 主要试剂

兔抗凡纳滨对虾血蓝蛋白抗血清由本实验室免疫制备, Dot-ELISA 实验表明, 其效价大约为

收稿日期: 2012-08-30; 修订日期: 2013-06-01

基金项目: 国家自然科学基金(Nos.30871939 & 31072237); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No.NCET-11-0922); 广东省自然科学基金(Nos.10251503101000002 & 9151064001000001); 广东省科技计划项目(No. 2009B020309006); 广东省高等学校高层次人才项目(2011)资助

作者简介: 张小瑜(1987-), 女, 陕西咸阳人; 硕士; 主要从事无脊椎动物分子免疫研究。E-mail: 10xyzhang3@stu.edu.cn

通信作者: 章跃陵, Tel: 0754-82902580; E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

1 : 1000, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (Goat anti-Rabbit IgG-HRP)购自武汉博士德生物工程有限公司, PVDF膜为MILLIPORE公司产品, 葡聚糖凝胶 Sephadex G-100为Pharmacia公司产品, β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)、丙烯酰胺(Acryl- amide)、双丙烯酰胺(Bis- acrylamide)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie brilliant blue G-250)、二氨基联苯胺(3'3-diaminobenzidine, DAB)、丽春红 S(Ponceau S)等试剂购于上海 Sangon 生物工程有限公司, 无水乙醇、甲醇、冰乙酸、浓硫酸等试剂购于汕头西陇化工有限公司。

1.3 实验方法

虾血清的制备 参照章跃陵等^[13]方法进行, 用 1 mL 注射器直接对对虾心脏抽取血淋巴, 4℃冰箱过夜, 12000 r/min 离心 20min, 取血清, -20℃保存备用。

Sephadex G-100 柱层析纯化血蓝蛋白 参照 Sellos, *et al.*^[18]方法纯化对虾血蓝蛋白。其大致流程如下: 选用 Sephadex G-100 按常规方法装柱, 加入对虾血清 1.5 mL, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)洗脱, 流速 1 mL/min, 自动部分收集器收集血蓝蛋白洗脱峰(命名为 HMC-SD), Bradford 法测定蛋白浓度, -20℃保存备用。

病原菌悬液的制备 取副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、河弧菌、大肠杆菌、乙型链球菌和金黄色葡萄球菌 6 种病原菌, 分别用肉汤培养基/LB 培养基于 28—37℃培养 24h, 收集菌液, 室温 12000 r/min 离心 2min, 0.9%生理盐水洗涤 3 次, 高温灭活, Tris-HCl (pH 8.0)室温浸泡 3h, 5000 r/min 离心 10min, 0.9% 生理盐水洗涤 3 次, 用培养基 1/5 体积的 0.9% 生理盐水重悬, 4℃保存备用。

与不同病原菌结合的血蓝蛋白的分离纯化参照章跃陵等^[16]报道的方法, 将副溶血弧菌等 6 种病原菌悬液分别与等体积虾血清室温孵育 2h, 5000 r/min 离心 10min, 取沉淀, 0.9%生理盐水洗涤 3 次, 5000 r/min 离心 10min, 0.8 mol/L NaCl, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)室温重悬 2h, 12000 r/min 离心 10min, 取上清, 冷丙酮沉淀, 0.01 mol/L PBS 重悬, Bradford 法测定蛋白浓度, -20℃保存备用。与副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、河弧菌、大肠杆菌、乙型链球菌和金黄色葡萄球菌 6 种病原菌相结合的血蓝蛋

白分别命名为: HMC-VP、HMC-VA、HMC-VF、HMC-EC、HMC-BS、HMC-SA。

PAGE、SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析 取 Sephadex G-100 纯化血蓝蛋白以及与不同病原菌相结合的 6 种血蓝蛋白样品适量, 按常规方法进行 PAGE 和 SDS-PAGE 分析, 其中浓缩胶、分离胶浓度分别为 5%和 10%。

SDS-PAGE 电泳结束后用半干式电转仪根据凝胶面积按 0.8 mA/cm²电转 100min, 5%脱脂奶粉(0.02 mol/L TBS, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4)室温封闭 1h, 兔抗血蓝蛋白抗血清(1 : 1000)和羊抗兔 IgG-HRP (1 : 3000)分别室温孵育 2h 和 1h, TTBS 充分洗涤, DAB 显色拍照。

溶血实验与溶血动态观察 溶血实验: 参照 Hatakeyama, *et al.*^[19]报道的方法进行。选用 3.8%柠檬酸钠为抗凝剂收集新鲜鸡血, 抗凝血经 2000 r/min 离心 10min, 去血浆, 取血细胞, 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤, 500 r/min 离心 5min, 重复三次。最后用 0.01 mol/L PBS-Ca²⁺ (pH 6.0) 配成 0.5% (v/v)红细胞悬液。分别取 0.9 mL 红细胞悬液与 0.3 mL 待测血蓝蛋白(0.2 mg/mL)混匀, 37℃ 孵育 1h, 3500 r/min 离心 10min, 取上清, 540 nm 测定吸光度, 记为 A。阴性对照以 PBS-Ca²⁺替代血蓝蛋白(A₀), 阳性对照以 0.1% Triton X-100 替代血蓝蛋白(A₁₀₀)。溶血率 = $(A - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100\%$ 。

溶血动态观察: 取 10 μ L 0.5% 鸡红细胞悬液与等量待测血蓝蛋白混匀滴加在洁净的载玻片上, 37℃培养箱静置 20、40、60min 后分别用 Olympus BH-2 型显微镜观察并拍照。

血蓝蛋白糖基氧化前后溶血活性比较分析 血蓝蛋白糖基氧化参照 Pagano, *et al.*^[20]报道的方法进行。待氧化血蓝蛋白样品分别与 15 mmol/L KIO₄ (0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠, pH 4.5)避光、室温孵育 1h, 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 透析过夜。糖基氧化后采用上述策略比较分析血蓝蛋白糖基氧化前后溶血活性的差异。

血蓝蛋白胰蛋白酶消化前后溶血活性比较分析 胰蛋白酶消化参照 Perdomo-Morales, *et al.*^[21]报道的方法, 并适当改进进行。将血蓝蛋白(0.4 mg/mL)与 0.1 mg/mL 胰蛋白酶等体积混合, 37℃孵育 1h。经胰蛋白酶水解后按照上述策略比较分析血蓝蛋白胰蛋白酶消化前后溶血活性的差异。

2 结果

2.1 与不同病原菌相结合的血蓝蛋白的分离纯化与鉴定

如图 1 所示, HMC-SD 及 HMC-VP、HMC-VA、HMC-VF、HMC-EC、HMC-BS、HMC-SA PAGE 电泳均表现为单一条带, SDS-PAGE 图谱呈现为 75、77 kD 两条带, 且均可以与抗血蓝蛋白抗体发生特异性结合。这说明所分离的成分均为血蓝蛋白。

2.2 六种血蓝蛋白溶血活性对比分析

选取鸡红细胞探索与不同病原菌相结合的 6 种血蓝蛋白溶血活性的差异。结果发现, 6 种血蓝蛋白对鸡红细胞溶血活性存在明显的差异, 其中 HMC-VP、HMC-SA 溶血活性最高, 溶血率为 100.00%, HMC-VA 溶血活性最低, 溶血率为 39.68%, 前者约为后者的 2.5 倍, 与对照组 HMC-SD 相比, HMC-VP、HMC-SA

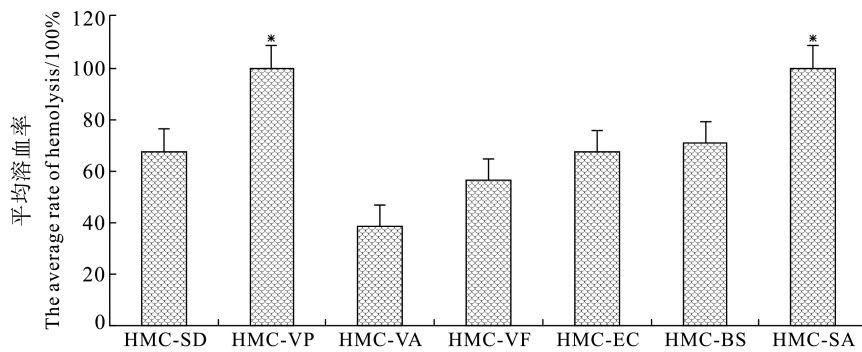


图 2 与 6 种不同病原菌相结合的对虾血蓝蛋白溶血活性比较分析

Fig.2 Comparison of hemolytic activities of six *L. vannamei* hemocyanin isomers bound directly to different bacteria, respectively

*表示与 HMC-SD 溶血活性相比具有显著差异($P < 0.05$)

* Showing significant difference from hemolytic activities of HMC-SD

为了进一步在细胞水平对比分析与不同病原菌相结合的血蓝蛋白溶血活性的差异, 我们选取 HMC-VP、HMC-VF、HMC-VA 三种溶血率差异较大的血蓝蛋白, 在 20、40、60min 三个时间点对其溶血活性进行动态比较分析。结果如图 3 所示, 与鸡红细胞 37°C 孵育 60min 后, HMC-VP 孵育组细胞破裂严重, 未见完整红细胞, HMC-VF 孵育组大部分细胞破裂, HMC-VA 孵育组仅有少量红细胞破裂, 所获研究结果与溶血率测定结果一致, 说明与不同病原菌相结合的血蓝蛋白在溶血活性上确实存在明显差异。

2.3 糖基氧化、胰蛋白酶消化前后血蓝蛋白溶血活性比较分析

如表 1 所示, 与不同病原菌结合的 6 种血蓝蛋

存在显著性差异(图 2)。

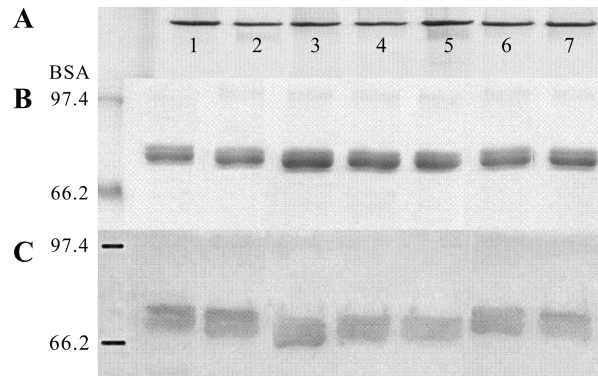


图 1 与 6 种不同病原菌相结合的血蓝蛋白 PAGE(A)、SDS-PAGE(B)和 Western-blotting(C)分析

Fig. 1 PAGE, SDS-PAGE and Western-blotting analysis of six *L. vannamei* hemocyanin isomers bound directly to different bacteria, respectively

1—7 分别为 HMC-SD、HMC-VP、HMC-VA、HMC-VF、HMC-EC、HMC-BS、HMC-SA

白糖基氧化后, 其溶血活性显著性降低, 除 HMC-EC 外, 其他 5 种血蓝蛋白溶血活性几乎全部丧失, 与氧化前相比, 6 种血蓝蛋白氧化后溶血活性存在极显著性或显著性差异。

如图 4 所示, 与不同病原菌结合的 6 种血蓝蛋白经胰蛋白酶水解后, 溶血活性均明显提高, 除 HMC-VA 溶血率为 94% 外, 其他 5 种血蓝蛋白溶血活性均为 100%, 与酶解之前相比, HMC-VA、HMC-VF、HMC-EC、HMC-BS 等 4 种血蓝蛋白溶血活性存在极显著性或显著性差异。

表 1 糖基氧化前后不同血蓝蛋白溶血活性比较分析

Tab. 1 Comparison of hemolytic activities between hemocyanin isomers with and without carbohydrate epitopes

血蓝蛋白 Hemocyanin isomer	溶血率 Hemolytic activity (%)	
	糖基氧化前 Before oxidation	糖基氧化后 After oxidation
HMC-VP	100.00±0.00	2.70±2.85**
HMC-SA	100.00±0.00	0.00±0.00**
HMC-BS	70.67±17.72	0.00±0.00**
HMC-EC	67.16±10.30	46.35±5.85*
HMC-VF	56.59±14.68	0.00±0.00**
HMC-VA	39.68±5.67	0.00±0.00**
HMC-SD	74.32±16.92	0.00±0.00**

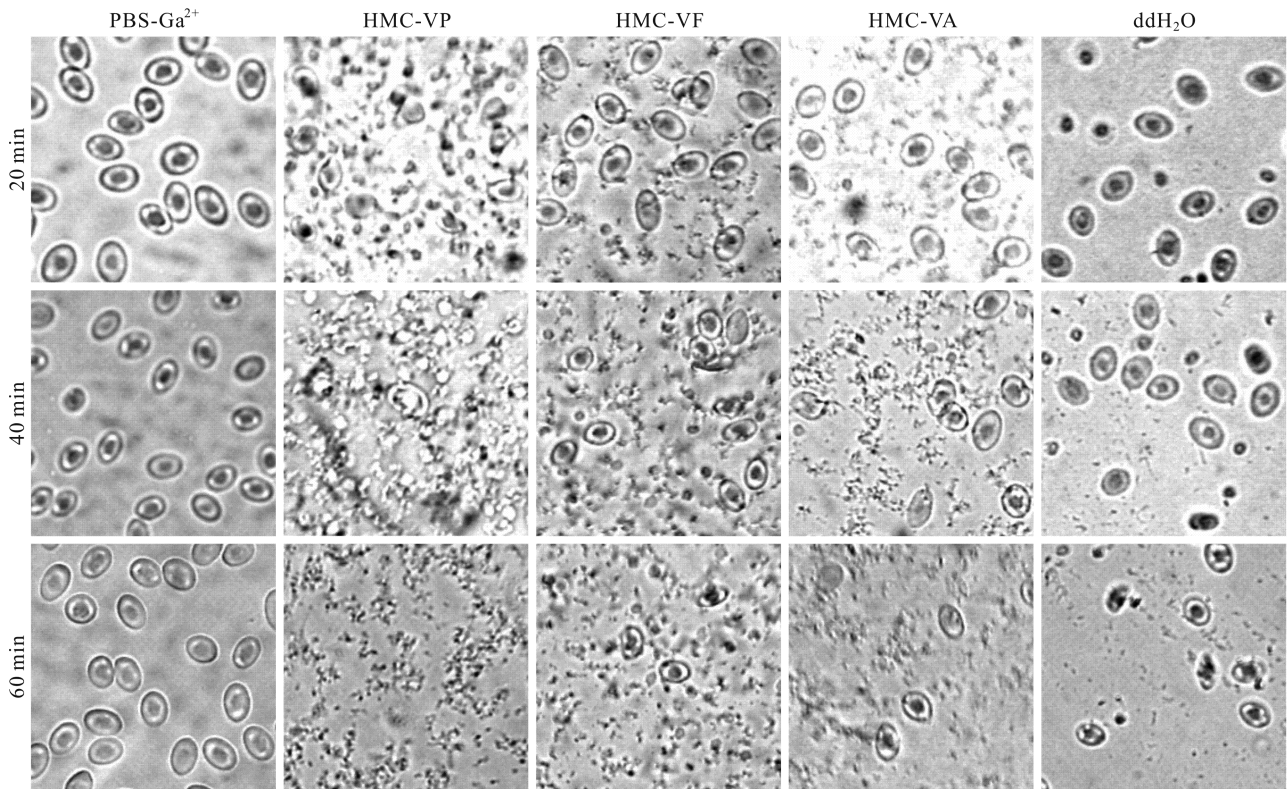


图3 HMC-VP、HMC-VF 和 HMC-VA 3 种血蓝蛋白对鸡红细胞溶血活性动态比较分析

Fig. 3 Dynamic comparison of hemolytic activities of HMC-VP, HMC-VF and HMC-VA against chicken erythrocyte in the cellular level

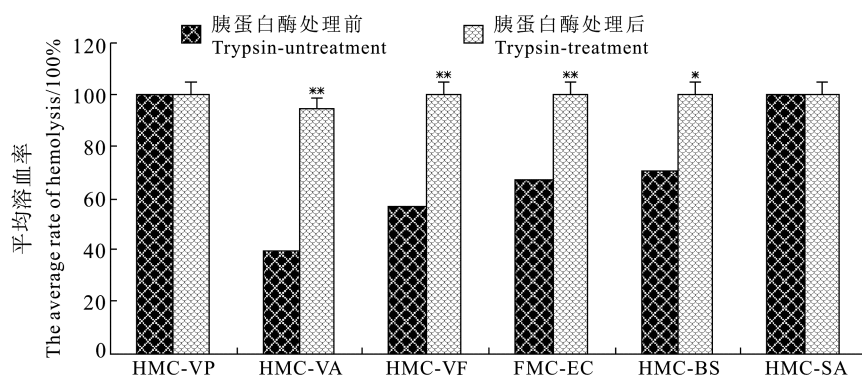


图4 胰蛋白酶处理前后不同血蓝蛋白溶血活性比较分析

Fig. 4 Comparison of hemolytic activities between hemocyanin isomers between trypsin-treatment and -untreatment

*表示与溶血活性胰蛋白酶处理前相比具有显著差异($P < 0.05$), **表示具有极显著差异($P < 0.01$)

* Showing significant difference from trypsin-treatment of hemolytic activities; ** Showing highly significant difference

3 讨论

一般认为,无脊椎动物免疫分子由于胚系基因种类有限而不具备分子多态性。但近年来研究结果表明,众多无脊椎动物非特异性免疫分子同样具有分子多态性^[22-24]。如 Zhang, *et al.* ^[22]报道淡水蜗牛 *Biomphalaria glabrata* 纤维蛋白原相关蛋白 FREP3 至

少具有 314 条不同的基因序列; Schmucker, *et al.* ^[23]发现果蝇 *Drosophila* 由于选择性剪切使其唐氏综合症细胞黏附分子(Down syndrome cell adhesion molecule, DSCAM)具有 38000 种潜在的亚型。有意思的是,最近本室发现存在于对虾中的血蓝蛋白具有单核苷酸多态性^[24],尤其是乔杰等发现与不同病原菌相结合的血蓝蛋白 2-DE 泳图谱存在明显差异,即出现不同的血蓝蛋白多态性分子的组合,且这些不同的血蓝蛋白多态性分子组合对同一病原菌的凝集、抑菌活性等均存在明显差异^[17]。

结合前期报道,对虾血蓝蛋白对鸡红细胞同样具有溶血活性^[15]。提示,这些与不同病原菌相结合的血蓝蛋白在溶血活性方面也可能存在差异,故进一步对其进行探索具有重要意义。

为此,本研究选用 3 种革兰氏阴性菌(副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、河弧菌均为对虾常见致病菌)、1 种重要模式菌(大肠杆菌 K12)以及 2 种革兰氏阳性

菌(水产致病菌乙型链球菌、人兽共患致病菌金黄色葡萄球菌)6种病原菌作为配体将对虾血蓝蛋白分离成不同成分,并对其溶血活性进行对比分析,结果发现该6种血蓝蛋白对鸡红细胞溶血率存在明显差异。与本室既往研究发现的与不同病原菌相结合的血蓝蛋白凝集、抑菌等免疫学功能存在明显差异的结果一致^[17]。由此推测,这些与不同病原菌相结合的特定血蓝蛋白多态性分子组合可能是对虾血蓝蛋白发挥功能多样性的分子基础之一。

为了进一步探索这些与不同病原菌相结合的血蓝蛋白存在结构上的哪些差异,我们继而选用高碘酸盐、胰蛋白酶分别氧化、降解该6种血蓝蛋白,并比较处理前后溶血活性的差异。结果发现高碘酸盐氧化血蓝蛋白糖基后,除HMC-EC的溶血率没有显著降低外,其余5种血蓝蛋白的溶血活性几乎完全丧失。与课题组以往研究发现糖含量不同的血蓝蛋白免疫学功能存在明显差异的结果一致^[25]。与之相反,胰蛋白酶处理后,该6种血蓝蛋白的溶血活性均有显著性提高,其与Decker, *et al.*^[26]、Perdomo-Morales, *et al.*^[3, 21]发现狼蛛*Eurypelma californicum*、龙虾*Panulirus argus*血蓝蛋白被胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶水解后酚氧化酶活性显著提高的结果相似。由此推测,这些血蓝蛋白溶血活性的发挥可能既与其糖基化修饰程度不同有关,又与其空间构象存在差异有关。至于其确实情况还有待于进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] 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**: 155—163
- [2] Guo D, Zhang Y, Zeng D, *et al.* Functional properties of hemocyanin from *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum* [J]. *Experimental Parasitology*, 2009, **123**: 277—281
- [3] Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Perera E, *et al.* Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1780**: 652—658
- [4] Nesterova N V, Zagorodnya S D, Moshtanska V, *et al.* Antiviral activity of hemocyanin isolated from marine snail *Rapana Venosa* [J]. *Antiviral Research*, 2011, **90**(2): A38
- [5] Zagorodnya S D, Dolashka P, Baranova G V, *et al.* Anti-EBV activity of hemocyanin isolated from *Helix lucorum* [J]. *Antiviral Research*, 2011, **90**(2): A66
- [6] Dolashka P, Velkova L, Shishkov S, *et al.* Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana hemocyanin* [J]. *Carbohydrate Research*, 2010, **345**: 2361—2367
- [7] Jiang N, Tan N S, Ho B, *et al.* Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy [J]. *Nature Immunology*, 2007, **8**(10): 1114—1122
- [8] Destoumieux 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]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(50): 47070—47077
- [9] Dolashka P, Velkova L, Iliev I, *et al.* Antitumor activity of glycosylated molluscan hemocyanins via Guerin ascites tumor [J]. *Immunological Investigations*, 2011, **40**(2): 130—149
- [10] Becker M I, Fuentes A, Campo M D, *et al.* Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas hemocyanin* is associated with unique biochemical properties [J]. *International Immunopharmacology*, 2009, **9**: 330—339
- [11] 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**: 354—360
- [12] Zhang Y L, Wang S Y, Xu A L, *et al.* Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization [J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, **5**: 815—821
- [13] Zhang Y L, Lin B K, Chen J, *et al.* Bacterial agglutinative activity of hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, **13**(6): 1006—1011 [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. 中国水产科学, 2006, **13**(6): 1006—1011]
- [14] Yan F, Qiao J, Zhang Y L, *et al.* Hemolytic properties of hemocyanin from mud crab *Scylla serrate* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2011, **30**(3): 957—962
- [15] Zhang Y L, Yan F, Hu Z, *et al.* Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**: 330—335
- [16] Zhang Y L, Lin Z J, Li Z J, *et al.* Identification of the main proteins binding with pathogen directly in *Litopenaeus vannamei* serum [J]. *Journal of Fisheries Sciences of China*, 2008, **32**(1): 105—110 [章跃陵, 林智健, 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. 水产学报, 2008, **32**(1): 105—110]
- [17] Qiao J. Investigation of protein polymorphism of hemocyanin from *Litopenaeus vannamei* and its immunological functions [D]. Thesis for Master of Shantou University. 2011 [乔杰. 凡纳滨对虾血蓝蛋白蛋白质水平多态性及其免疫学意义的研究. 汕头大学硕士学位论文, 2011]

- [18] Sellos D, Lemoine S, Wormhoudt A V. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects [J]. *FEBS Letters*, 1997, **407**: 153—158
- [19] Hatakeyama T, Nagatomo H, Yamasaki N. Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**: 3560—3564
- [20] Pagano M R, Mendieta J R, Muñoz F F, *et al.* Roles of glycosylation on the antifungal activity and apoplast accumulation of StAPs (*Solanum tuberosum* ssp. *proteases*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, **41**(5): 512—520
- [21] 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**: 1187—1195
- [22] Zhang S M, Adema C M, Kepler T B, *et al.* Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate [J]. *Science*, 2004, **305**(5681): 251—254
- [23] Schmucker D, Clemens J C, Shu H, *et al.* Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity [J]. *Cell*, 2000, **101**(6): 671—684
- [24] Zhao X L, Guo L L, Zhang Y L, *et al.* SNPs of hemocyanin C-terminal fragment in shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *FEBS Letters*, 2012, **586**(4): 403—410
- [25] 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 [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. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, **25**(7) : 655—661]
- [26] Decker H, Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(40): 25889—25892

COMPARATIVE ANALYSIS OF HEMOLYTIC ACTIVITY OF HEMOCYANIN ISOMERS BINDING TO DIFFERENT BACTERIA IN SHRIMP *LITOPENAEUS VANNAMEI*

ZHANG Xiao-Yu, LIN Xiao-Min, ZHANG Yue-Ling, LU Qun-Shan, ZOU Wen-Hui and LUN Jing-Sheng
(Department of Biology and Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: In this study, we investigated the diversities of six *Litopenaeus vannamei* hemocyanin isomers binding to different bacteria. The methods of affinity-binding, PAGE, SDS-PAGE, Western-blotting and hemolytic activity assays were used. The results indicated that all the six hemocyanin isomers, namely hemocyanin isomer directly binding to *Vibrio parahaemolyticus* (HMC-VP), *Vibrio alginolyticus* (HMC-VA), *Vibrio fluvialis* (HMC-VF), *Escherichia coli* K12 (HMC-EC), *Beta Streptococcus* (HMC-BS) and *Staphylococcus aureus* (HMC-SA) displayed different hemolytic activities to chicken erythrocyte. Among of these, HMC-VP and HMC-SA showed the highest hemolytic activity and reached almost complete (100.00%), while that of HMC-VA was only 39.96%. To further elucidate the molecular basis underlying hemocyanin isomers functional diversities, the assays of glycosyl-oxidation and trypsin digestion were selected. The results showed that glycosyl-oxidation led to a generally significant decrease in hemolytic activity of all of the hemocyanin isomers, even completely abolished. In contrast, the hemolytic activities of these hemocyanin isomers were highly increased, even reached 100.00% after trypsin digestion. Thus, these results revealed that six hemocyanin isomers possessed different hemolytic activities, which may be related to the diversity of protein glycosylation and conformation.

Key words: Shrimp; Hemocyanin; Hemolytic activity; Diversity