

胰蛋白酶、SDS 对三疣梭子蟹酚氧化酶活力的影响

楼倩, 韩柳, 张兰婷

(江西省水利科学研究院; 江西省鄱阳湖水资源与环境重点实验室, 江西 南昌 330029)

摘要: 本文研究了胰蛋白酶、SDS 对三疣梭子蟹血浆血细胞中酚氧化酶活性的影响, 分别测定了血浆、血细胞裂解溶液中酚氧化酶活性; SDS 和胰蛋白酶分别刺激血浆和血细胞裂解液后酚氧化酶活力变化, 分析了酚氧化酶原系统在三疣梭子蟹血淋巴的存在位置以及其应答机制。结果表明, 三疣梭子蟹血细胞裂解液中的酚氧化酶活力 ($9.93\text{U} \pm 1.03\text{U}$) 高于血浆中酚氧化酶活力 ($0.80\text{U} \pm 0.04\text{U}$); 胰蛋白酶对三疣梭子蟹血浆和血细胞裂解液中的酚氧化酶活力激活作用不明显, 分别为 $0.91\text{U} \pm 0.07\text{U}$ 和 $9.06\text{U} \pm 3.65\text{U}$; SDS 对三疣梭子蟹血浆中酚氧化酶活力有激活作用, 为 $0.96\text{U} \pm 0.03\text{U}$, 对血细胞裂解产物中酚氧化酶活力的有显著激活作用, 为 $71.12\text{U} \pm 14.25\text{U}$ 。三疣梭子蟹的酚氧化酶原系统主要存在于血细胞中, 既可以通过多级酶联免疫反应将酚氧化酶原激活成酚氧化酶参与免疫反应, 也可以通过与酚氧化酶原结合, 改变其蛋白构象, 激活酚氧化酶。胰蛋白酶通过前一种方式激活酚氧化酶原系统, 而 SDS 通过后一种方式激活, SDS 对酚氧化酶原的激活速率远高于胰蛋白酶。

关键词: 三疣梭子蟹; 酚氧化酶; 十二烷基硫酸钠; 胰蛋白酶

中图分类号: SP68.252.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-4701(2017)01-0009-05

0 引言

十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 是一种常见的阴离子表面活性剂, 极易溶于水, 在生化实验及免疫检验中常用作蛋白质变性剂和助溶剂, 同时也广泛应用于液体洗涤剂及化学试剂的工业生产^[1]。有研究表明 SDS 等表面活性剂污染物随着生活污水及工业废水被排入到环境中, 对鱼类、哺乳动物和甲壳动物具有潜在毒性作用^[2,3]。胰蛋白酶 (Trypsin) 是一种消化蛋白酶, 在脊椎动物的胰脏中作为胰液的成分而分泌, 起到消化蛋白的作用^[4]。在甲壳动物体内, 胰蛋白酶可以通过裂解酶蛋白激活酚氧化酶原系统^[5], 起到提高甲壳动物免疫功能的作用。

甲壳动物通过完善的非特异性免疫系统, 来抵御外来微生物的侵袭^[6]。其非特异性免疫包括细胞免疫和体液免疫。酚氧化酶原激活系统 (prophenol-oxidase activated system, proPO-AS) 是甲壳动物体液免疫的重要识别系统。酚氧化酶原 (prophenol-oxidase, proPO) 被激活形成酚氧化酶 (phenol oxidase, PO), PO 又称为

酪氨酸酶 (tyrosinase), 它是一种含双铜的氧化还原酶, 在无脊椎动物的体液免疫中起着非常重要的作用, 能够催化单酚羟 (monophenols) 氧化成邻二酚 (o-diphenols) (如多巴), 并把邻二酚氧化成醌 (o-quinones), 醌在非酶促条件下形成最终的反应产物黑色素^[7], 可以抑制病原细胞外蛋白酶活性, 从而杀死病原体。

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 是一种重要的海洋经济动物, 隶属于甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、梭子蟹科 Portunidae, 是重要的经济蟹类。因其经济价值高、营养丰富、生长快等优点成为我国沿海重要的海水养殖品种之一^[8]。本实验以三疣梭子蟹为模式生物, 胰蛋白酶、SDS 作为刺激因子, 通过分析两种刺激因子分别对三疣梭子蟹血浆和血细胞溶解产物中酚氧化酶活性的影响, 来确定酚氧化酶原激活系统在血液中的主要存在部位, 为甲壳动物免疫学研究提供理论基础, 为健康水产养殖发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三疣梭子蟹购买于宁波水产大世界, 体重约 110 g

收稿日期: 2016-11-18

作者简介: 楼倩 (1991-), 女, 硕士, 助理工程师。

(甲壳长度平均 4 cm), 雌性。选取健康、活动力强、步足完整的三疣梭子蟹作为实验对象。十二烷基硫酸钠、L-DOPA 等试剂购买于上海 Sangon 生物工程有限公司。抗凝剂^[9] (0.45 mol/L 氯化钠, 0.1 mol/L 葡萄糖, 30 mmol/L 柠檬酸三钠, 26 mmol/L 柠檬酸, 10 mmol/L EDTA, pH=4.6)。裂解液为 SSS (shrimp salt solution, 450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L Hepes, PH=7.3)。

1.2 实验方法

1.2.1 血淋巴样品制备

三疣梭子蟹在冰上放置 15~20 min 后, 擦干蟹体表水分, 用洁净玻璃注射器, 抽取 4℃ 预冷抗凝剂, 再从蟹第四步足基关节处用玻璃注射器抽取等量血淋巴, 4℃ 保存, 用以血浆样品和血细胞溶解产物制取。

1.2.2 血浆样品制取

将不同三疣梭子蟹的血淋巴样品混合均匀, 4℃ 下 1 000 r/min 离心 10 min, 取蓝色上清液, 保存于 -20℃ 冰箱中, 作为血浆样品^[10], 用以测定酚氧化酶活力。沉淀为血细胞, 用以血细胞溶解产物制取。

1.2.3 血细胞溶解产物制备

将沉于底部的血细胞用 SSS 透析过夜, 血细胞溶液与 SSS 溶液体积 (V/V) 比为 1:10。下层沉淀细胞用抗凝剂离心洗涤 1 次, 再用 SSS 离心洗涤 1 次, 最后将沉淀细胞用 SSS 制成悬液 (体积比 1:5)。在 4℃ 下 20 000 r/min 离心 20 min, 取上清液即为血细胞溶解产物 (HLS), -20℃ 保存, 用以测定酚氧化酶活力。

1.2.4 酚氧化酶活性测定方法

参考 LIU 等^[11] 和 HERNANDEZ-LOPEZ 等^[12] 方法, 以 L-DOPA 为底物, 测定酚氧化酶活力。具体实验过程如下: 将 0.6 ml 血浆样品或 HLS 与 2 ml SSS 溶液 (当测定 SDS、胰蛋白酶对酚氧化酶活力影响时, 将 SSS 溶液分别换成 2 ml 0.1 mol/ml SDS 和 2 ml 0.1 mol/ml 胰蛋白酶溶液即可) 在室温 (25℃) 黑暗条件下预先孵育 30 min, 然后加入 1 ml L-DOPA (2 mg/ml) 溶液, 孵育 10 min 后, 加 0.4 ml 蒸馏水后立即放入分光光度计中, 在 490 nm 下光密度值 (O.D.)。蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定, 分别测定血浆和 HLS 中的蛋白含量。定义每分钟每毫克蛋白增加 0.001 OD 值为一个酚氧化酶活力单位。

1.3 统计方法

用统计分析软件 SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Science) 对各实验结果进行单因素方差分析及 LSD 多重比较。

2 实验结果与分析

2.1 三疣梭子蟹血浆和细胞溶解产物中酚氧化酶活力

采用 LIU 等^[11] 方法分别测定三疣梭子蟹血浆和血细胞溶解产物中的酚氧化酶活力, 在 490 nm 下, 每间隔 2 min 测定一次, 共测定 30 min。结果表明, 血浆和血细胞溶解产物中的酚氧化酶活力缓慢升高, 三疣梭子蟹血浆中酚氧化酶活力为 $0.8 \text{ U} \pm 0.04 \text{ U}$, 细胞溶解产物中酚氧化酶活力为 $9.93 \text{ U} \pm 1.03 \text{ U}$, 经 F 检验两者间具有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 1)。

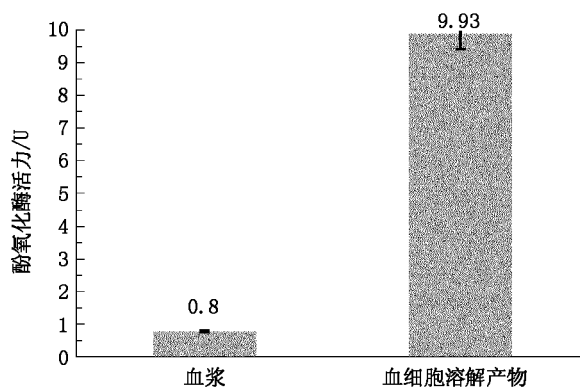


图 1 三疣梭子蟹血浆和血细胞溶解产物中酚氧化酶活力

2.2 胰蛋白酶、SDS 对三疣梭子蟹血浆中酚氧化酶活力的影响

用 2 ml 0.1 mol/ml SDS 或 2 ml 0.1 mol/ml 胰蛋白酶溶液替换 SSS 溶液, 分别测定胰蛋白酶、SDS 对三疣梭子蟹血浆中酚氧化酶的活力的影响, 检测方法同 1.3。结果表明, 加入胰蛋白酶的血浆中酚氧化酶活力与未加的血浆中酚氧化酶活力差别不大, 为 $0.91 \pm 0.07 \text{ U}$, 加入 SDS 的血浆中酚氧化酶活力在 0~20 分钟成上升趋势, 20 分钟之后趋于稳定, 为 $0.91 \text{ U} \pm 0.07 \text{ U}$; 经 F 检验, 加入胰蛋白酶的血浆样品与血浆样品中的酚氧化酶没有显著性差异 ($P > 0.05$), 而加入 SDS 的血浆样品与原血浆样品中的酚氧化酶差异显著 ($P < 0.05$) (见表 1 和图 2)。

表 1 血浆样品中酚氧化酶活力的测定

样品	酚氧化酶活力/U
血浆样品	$0.80 \text{ U} \pm 0.04 \text{ U}$
血浆样品 + 胰蛋白酶	$0.91 \text{ U} \pm 0.07 \text{ U}$
血浆样品 + SDS	$0.96 \text{ U} \pm 0.03 \text{ U}$

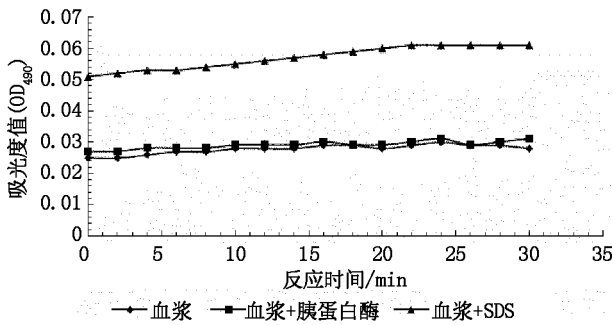


图 2 胰蛋白酶、SDS 刺激的血浆样品中酚氧化酶活力影响动力曲线

2.3 胰蛋白酶、SDS 对三疣梭子蟹 HLS 中酚氧化酶活力的影响

在细胞溶解产物中,分别加入胰蛋白酶和 SDS,测定酚氧化酶活力,结果表明,加入胰蛋白酶的细胞溶解产物中酚氧化酶活力与未加的血细胞溶解产物中酚氧化酶活力差异不明显,为 $9.06\text{ U} \pm 3.65\text{ U}$;加入 SDS 的细胞溶解产物中酚氧化酶活力在 0~25 分钟呈上升趋势,25~30 分钟趋于稳定,为 $71.12\text{ U} \pm 14.25\text{ U}$ 。经 F 检验,加入胰蛋白酶的血浆样品与血浆样品中的酚氧化酶没有显著性差异 ($P > 0.05$)。加入 SDS 的血浆样品与原血浆样品中的酚氧化酶活性差异有高度显著性 ($P < 0.01$) (见表 2 和图 3)。

表 2 细胞溶解产物酚氧化酶的活力

样品	酚氧化酶活力/U
HLS	$9.93\text{ U} \pm 1.03\text{ U}$
HLS + 胰蛋白酶	$9.06\text{ U} \pm 3.65\text{ U}$
HLS + SDS	$71.12\text{ U} \pm 14.25\text{ U}$

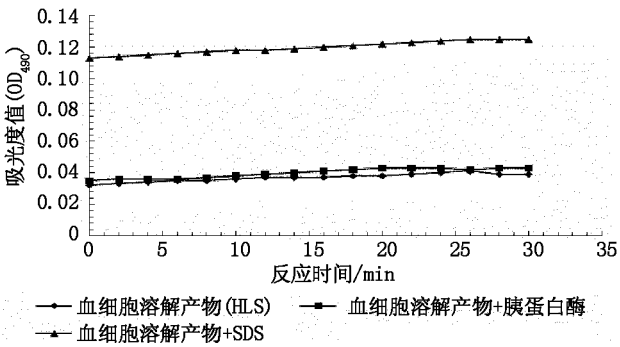


图 3 胰蛋白酶、SDS 刺激的三疣梭子蟹血细胞溶解产物中酚氧化酶活力影响动力曲线

3 讨论

本研究通过离心、透析的方法分别观察了胰蛋白酶、SDS 分别对三疣梭子蟹血浆和血细胞裂解液中酚氧化酶活性的影响。结果表明:

(1)细胞溶解产物中的酚氧化酶活力高于血浆中的酚氧化酶,分别为 $0.8 \pm 0.04\text{ U}$ 和 $9.93 \pm 1.03\text{ U}$ 。三疣梭子蟹的酚氧化酶激活前都是以酶原的形式存在,即酚氧化酶原 proPO。Söderhäll 等^[13]研究表明,proPO 产生于成熟的血细胞中,本实验中,细胞溶解产物中的酚氧化酶活性远高于血浆,说明三疣梭子蟹的酚氧化酶原激活系统主要存在于血细胞中。

(2)胰蛋白酶对三疣梭子蟹血浆、HLS 中酚氧化酶原激活作用不明显,分别为 $0.91 \pm 0.07\text{ U}$ 和 $9.06 \pm 3.65\text{ U}$;SDS 对于三疣梭子蟹血浆中的酚氧化酶原激活作用不明显,为 $0.96\text{ U} \pm 0.03\text{ U}$,对 HLS 中的酚氧化酶原激活作用显著,达到 $71.12 \pm 3.25\text{ U}$ 。这与严芳等^[6]研究中国对虾酚氧化酶活性时所得结果基本一致。

原因可能是由于胰蛋白酶与 SDS 对酚氧化酶原激活机制不同。proPO 系统是一种重要的多级酶联反应系统,通过血细胞释放体液免疫因子和吞噬、包裹异物来进行免疫防疫,能够迅速识别并有效清除入侵微生物^[14]。许多分子都能激活 proPO,外来微生物如革兰氏阴性菌的脂多糖 (LPS)、革兰氏阳性菌的肽聚糖 (Pep - tide)、真菌细胞壁的 $\beta - 1,3$ 葡聚糖 ($\beta - 1,3 - \text{glu - can}$) 等^[15 - 17]可以与识别蛋白发生特异性免疫反应,触发 proPO - AS 的激活,其他因素也可以触发 proPO 的激活,如温度、溶氧、钙离子、胰蛋白酶、巨球蛋白等都能激活酚氧化酶原系统^[5,15,18 - 20]。当病原体侵入时,病原体相关分子模式识别蛋白与病原体中相关保守分子结合,识别蛋白一旦与异物发生特异性结合,使得酚氧化酶原激活酶 (PPA) 激活 proPO^[18]形成 PO,PPA 是一种丝氨酸蛋白酶,PPA 通过限制性蛋白水解,使得 proPO 释放出小肽转变为具有活性的 PO,从而激活整个 proPO 系统,进而形成黑色素及诱导其他免疫功能并达到消灭异物的目的 (见图 4)。

SDS 对 proPO 的激活与胰蛋白酶激活模式不同,Decker^[21]等实验表明,利用大豆胰蛋白酶抑制剂 (soy - bean trypsin inhibitor, STI) 可以明显抑制胰蛋白酶引起的激活,而不能抑制 SDS 引起的激活。有研究表明,SDS 是通过与 proPO 直接结合,使蛋白去折叠,改变酶蛋白分子的结构,暴露其活性位点,最后活化 pro -

PO^[22]。因此,SDS 对于酚氧化酶的激活速度会比胰蛋白酶快很多。

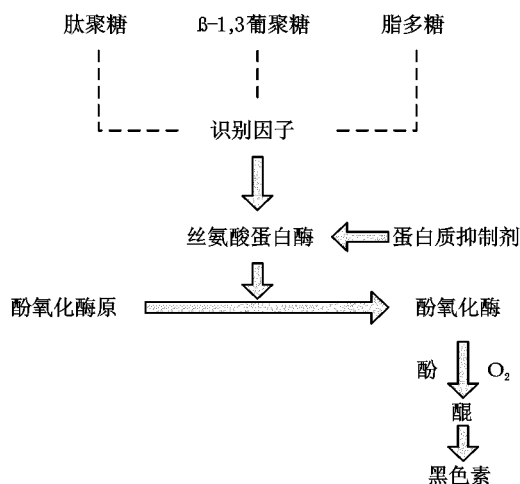


图4 节肢动物酚氧化酶激活模式

综上所述,三疣梭子蟹酚氧化酶原激活系统主要存在于血细胞中,其激活模式有多种,SDS 通过改变酚氧化酶酶原蛋白分子的激活方式比胰蛋白酶通过多级酶连免疫反应的激活方式快很多。但是 SDS 改变酶蛋白分子结构的机理尚不清楚,还需进一步实验探究。

参考文献:

- [1] WU Y L, PAN L P, YU S L, et al. Cloning, microbial expression and structure - activity relationship of polyphenol oxidases from *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010(145): 66 ~ 72.
- [2] 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.
- [3] ASPDN A, HUANG T S, CERENIUS L, et al. cDNA cloning of prophenoloxidase from the fresh crayfish *Pacifastaeus leniusculus* and its activation [J]. *PNAS*, 1995(92): 939 ~ 943.
- [4] Brookman, J. L., Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem*, 1989(19): 47 ~ 57.
- [5] CARDENAS W, DANKERT R J. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Fish Shellfish Immun*, 1997(7): 283 ~ 295.
- [6] 严芳, 章跃陵, 罗活强, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白酚氧化酶活性的研究 [J]. *水产科学*, 2008, 27(1): 5 ~ 8.
- [7] Ashida M. Purification and characterization of pre - phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, 144(2): 749 ~ 762.
- [8] XU J R, WANG C L, MU C K, et al. Relationship between oxygen consumption and oxygen consumption rate and the bodymass of portunus trituberculatus at its early development stage [J]. *Journal of Marine Science*, 2012, 30(1): 102 ~ 106.
- [9] SCHNAPP D, KEMP G D, SMITH V J. Purification and characterization of a proline - rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin - 7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *Eur J Biochem*, 1996(240): 532 ~ 539.
- [10] ZLATEVA T, DIMIRO P, SALVATO B, et al. The odiphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin [J]. *FEBS Lett*, 1996, 384(3): 251 ~ 254.
- [11] LIU C H, CHEN J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004(16): 321 ~ 334.
- [12] HERNANDEZ - LOPEZ J, GOLKXS - GALVAN T, VARGAS - ALBORES F. Activation of the prophenoloxidase system of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996(113)(1): 61 ~ 66.
- [13] SöDERHÄLL I, BANGYEEKHUN E, MAYO S, et al. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastaeus leniusculus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003(27): 661 ~ 672.
- [14] 陈国福, 黄健, 宋晓玲. 对虾免疫机能研究概括 [J]. *水产学报*, 2004, 28(2): 209 ~ 215.
- [15] SRICHAROE N, KIM J J, TUNKIJANUKIJ S, et al. Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005(29): 1017 ~ 1031.
- [16] YU X Q, JIANG H B, WANG Y, et al. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochem Molec Biol*, 2003(33): 197 ~ 208.
- [17] BUDA S E, SHAFER H T. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase - activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005(140B): 521 ~ 531.
- [18] TANNER A C, BURNETT L E, BURNETT G K. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2006(144A): 218 ~ 223.
- [19] 汪小锋, 契廷俊. 中国对虾酚氧化酶的部分生物化学特性的初步研究 [J]. *海洋科学*, 2003, 27(4): 71 ~ 75.
- [20] HAUTON C, HAWKINS L E, WILLIAMS J A. In situ variability in phenoloxidase activity in the Shore Crab, *Carcinus maenas* (L.) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 117B(2): 267 ~ 271.
- [21] DECKER H, RYAN M, JAENICKE E, et al. SDS - induced Phenoloxidase Activity of Hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurytemora californicum*, and *Cancer magister* [J]. *Biol Chem*, 2001, 276(21): 17796 ~ 17799.
- [22] 罗日祥, 姜玉香, 李光友. 中国对虾血细胞中酚氧化酶活力的研究 [J]. *实验与技术*, 1996(6): 1 ~ 4.

编辑: 张绍付

Effects of Trypsin and SDS on the activity of Phenoloxidase from *Portunus trituberculatus*

LOU Qian, HAN Liu, ZHANG Lanting

(Jiangxi Institute of Water Sciences; Key Laboratory of Poyang Lake Water
Resources and Environment of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China)

Abstract: In this research, the effect of Trypsin and SDS on *Portunus trituberculatus* was analyzed. Phenoloxidase (PO) of plasma and hemocytely supernatant (HLS) were measured as well as the Kinetic curve of PO activity of Trypsin and SDS conducted on plasma and HLS; analysis the prophenol-oxidase activated system (ProPO-AS) existing position and immune mechanism of *Portunus trituberculatus*. The results showed that PO activity of HLS ($9.93 \text{ U} \pm 1.03 \text{ U}$) is higher than plasma ($0.80 \text{ U} \pm 0.04 \text{ U}$); the effect of Trypsin conducted on plasma and HLS was not significant were $0.91 \text{ U} \pm 0.07 \text{ U}$ and $9.06 \text{ U} \pm 3.65 \text{ U}$; the effect of SDS conducted on plasma and HLS was obvious were $0.96 \text{ U} \pm 0.03 \text{ U}$ and $71.12 \text{ U} \pm 14.25 \text{ U}$. ProPO-AS of *Portunus trituberculatus* exist in hemocytely, it participate the immune response through different paths; Trypsin through the multi-stage enzyme-linked immunosorbent reaction to oxidize ProPO to PO while SDS active PO by change the structure of ProPO. The efficiency of SDS active ProPO-AS is significantly higher than Trypsin.

Key words: *Portunus trituberculatus*; Phenoloxidase; SDS; Trypsin

翻译: 楼倩

江西省水利厅召开党委扩大会议 传达学习中央和全省经济工作会议精神

2016年12月30日,江西省水利厅党委书记、厅长罗小云主持召开厅党委扩大会议,传达学习贯彻中央经济工作会议和全省经济工作会议精神,动员全厅上下迅速把思想和行动统一到中央和省委、省政府的决策部署上来,扎实做好各项水利工作,推进全省经济发展。

罗小云指出,要深刻领会习近平总书记经济战略思想,坚持用党中央经济工作方略统揽发展全局,深刻领会和准确把握我国经济发展进入新常态这个重大判断、新发展理念这个重大创新、推进供给侧结构性改革这个重大任务、三大国家发展战略这个重大布局、稳中求进这个重大原则,更加自觉践行新发展理念,更加主动适应新常态,善于把握趋势性变化,善于进行战略性思考,善于按市场规律谋划发展,自觉用习近平总书记经济战略思想指导实践。

罗小云强调,要迅速把思想和行动统一到全省经济工作会议精神上来,深刻领会和准确把握全省2017年经济工作的总体要求、发展目标和重点任务,全面准确把握省委书记鹿心社和省长刘奇的讲话精神实质,紧密联系水利工作,用会议精神指导我省水利改革发展。要以水生态文明建设统领明年各项工作,扎实推进河长制工作。要高度重视水利扶贫工作,强化监督,加强配合,确保水利扶贫工作落到实处。

罗小云特别强调,我省大力推动河长制实施,所取得的成效获得各方肯定与好评。在全省经济工作会议上,河长制作为大湖流域生态文明建设重要制度再次被提及。要深入实施河长制,积极探索流域综合管理制度,打造河长制升级版,通过各级河长和全社会的共同努力,以流域生态综合治理工作为纽带,将河流打造成金丝带,把周边自然美景、土地资源、历史文化资源等“珍珠”,串出一条条美丽的“项链”。

江西省水利厅副厅长朱来友、杨丕龙、廖瑞钊,省纪委驻水利厅纪检组组长吴信根,副厅长吴义泉、王纯、副巡视员祝水贵,鄱建办副主任纪伟涛、刘超、罗传彬,江西省水利投资集团公司董事长齐伟、总经理喻小平和江西省水利厅机关各处室、厅直各单位主要负责人参加会议。

(江西省水利厅办公室 钟建平)