

凡纳滨对虾血清凝集素、溶血素的特性研究

曹剑香, 简纪常, 吴灶和, 鲁义善

(广东海洋大学 水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要:对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的血清凝集素和溶血素部分特性的研究结果表明,凡纳滨对虾血清凝集素热稳定性较差,温度高于 50 时,活性呈明显减弱至无活性,其最适温度为 25~45;最适 pH 为 8~9;盐度为 24~48 时,凝集活性最强,当盐度超过 48 或者低于 6 时,凝集活性较差;凝集素活性能被浓度高于 16 mmol/L (包括 16 mmol/L) EDTA-Na₂, D-葡萄糖, D-果糖及 D-半乳糖完全抑制。Cu²⁺ 使凝集素的活性完全丧失,而 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 能使凝集活性明显增强。45~60 时,溶血素活性逐渐增强,60 时达到最高;当 pH 6~9 时,溶血素的活性较强;盐度为 18~36 时,能增强溶血素的活性;EDTA-Na₂ 对溶血素的活性几乎无影响;Cu²⁺ 使溶血素丧失活性, Mg²⁺ 能增强溶血活性, Mn²⁺ 对溶血素的活性没有影响,而 Ca²⁺ 和 Ba²⁺ 对溶血素有轻微的抑制作用。

关键词:凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*);凝集素;溶血素

中图分类号:S942.1

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2006)06-0001-05

近年来,随着虾类养殖业的迅速发展,病害问题日益严重,不断暴发细菌、病毒性流行病,使我国养虾业蒙受了巨大的经济损失。在认识到使用抗生素等药物带来的药物残留,环境污染,产生抗药性菌种等负面影响后,对虾类免疫防御机制的研究开始受到重视。凝集素和溶血素是无脊椎动物体内两种重要的非特异性免疫防御因子。凝集素广泛存在于生物体中,在血淋巴中可以引起异物聚集,在体外可选择凝集脊椎动物血细胞和某些细菌微生物,并充当识别因子,根据异物表面的糖基组成区分“自己”和“异己”;具有高度的调理作用,可在吞噬细胞和异物间形成分子连接,促进吞噬细胞对异物的吞噬作用^[1]。溶血素作为一种非特异性免疫防御因子,已在多种无脊椎动物血清中发现。溶血素与脊椎动物血细胞表面的特异性糖链结合后,使细胞膜发生破坏溶解,从而使其在清除和杀灭病原微生物的活动中发挥积极的作用^[2]。到目前为止,人们已在 40 多种甲壳动物体内发现血细胞凝集素的存在,但有关甲壳动物溶血素的研究甚少,所见的报道仅限于美洲马蹄蟹(*Tachypleus gigas*)^[3],龙虾(*Panulirus argus*)^[4],日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[5]等。虽然已有对日本对虾^[6-8],中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[9-12],罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[13]等血清凝集素和日本对虾^[5]血清溶血素的部分性能

的研究报道,但有关凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)凝集素和溶血素的研究尚未见报道。作者研究了凡纳滨对虾凝集素、溶血素的活性,以期充实虾类免疫防御机制的研究内容。

1 材料和方法

1.1 材料来源

实验用凡纳滨对虾取自湛江市水产局养殖场。

1.2 血清的制备

从围心窦穿刺抽取血淋巴液,4 放置 12 h,待析出血清后,10 000 r/min 离心 10 min,吸取血清,-20 保存备用。

1.3 外界因素对凡纳滨对虾血清凝集素活性的影响

1.3.1 凡纳滨对虾血清凝集素活性的测定

血细胞凝集试验参照牟海津等^[9]的方法稍加修

收稿日期:2004-10-26;修回日期:2005-11-25

基金项目:广东省重大科技专项(A3050302);湛江市科技兴海项目(0309005);湛江市粤海饲料公司项目

作者简介:曹剑香(1978-),女,湖南衡山人,硕士研究生,主要从事水产动物疾病的研究,E-mail:axiang1017@163.com;简纪常,通讯作者,电话:0759-2362173,E-mail:jianjichang@21cn.com

改。用 Alsever's 液无菌采集红鳍笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) 血液, 2 500 r/min 离心 5 min, 用无菌生理盐水洗涤细胞 2 次, 配成 2% 的红细胞悬液。凝集试验采用玻片凝集法。将待测凡纳滨对虾血清作 2 倍系列稀释, 取 50 μ L 稀释的血清与 50 μ L 2% 的红细胞悬液混合均匀, 再取 50 μ L 混合液于玻片的各凹形孔中, 每个孔重复一次, 25 $^{\circ}$ C 保温 40 min, 在光学显微镜 ($\times 40$) 下检测有无凝集块形成, 以形成明显凝集块的最高稀释倍数作为血清的凝集效价。

1.3.2 外界因素的作用

1.3.2.1 温度

凡纳滨对虾的血清分别经 40, 45, 50, 55, 60, 80, 100 $^{\circ}$ C 处理 20 min 后, 快速冷却, 用生理盐水作倍比稀释, 检测虾血清凝集活性的变化。

1.3.2.2 pH 值

用 HCl, NaOH 将生理盐水的 pH 调成 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 用不同 pH 的生理盐水对血清作倍比稀释, 检测虾血清凝集活性的变化。

1.3.2.3 盐度

用 NaCl 配制盐度为 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48 和 60 溶液, 应用不同盐度的溶液对血清作倍比稀释, 检测虾血清凝集活性的变化。

1.3.2.4 EDTA-Na₂

分别用含 0, 2, 4, 8, 16, 32 和 64 mmol/L EDTA-Na₂ 的生理盐水对血清作倍比稀释, 检测虾血清凝集活性的变化。

1.3.2.5 金属离子

用含 10 mmol/L 的 CaCl₂, CuCl₂, MgCl₂, MnCl₂, BaCl₂ 的生理盐水分别对血清作倍比稀释, 检测虾血清凝集活性的变化。

1.3.2.6 糖抑制试验

将 D-葡萄糖、D-果糖、D-乳糖、D-半乳糖、D-木糖、D-棉子糖、L-山梨糖、L-鼠李糖、蔗糖和甘露糖分别配成 0.1 mol/L, 取 25 μ L 糖溶液与 25 μ L 待测血清混匀, 然后在加入 25 μ L 的 2% 红鱼血细胞, 25 $^{\circ}$ C 保温 40 min, 检测虾血清凝集活性的变化。

1.4 外界因素对凡纳滨对虾血清溶血活性的影响

1.4.1 凡纳滨对虾血清溶血活性的测定

溶血活性的测定参照牟海津等^[5]的方法稍加修改。取 3 mL 红细胞悬液与 0.1 mL 凡纳滨对虾血清液混匀, 间歇振荡, 25 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 取出后立即冰浴以终止反应, 经 2 500 r/min 离心后获得上清液。对照管用生理盐水代替对虾血清。以对照管上清液作空

白, 用 UV755B 紫外分光光度计于 540 nm 处测光密度值 (OD), 以 OD_{540nm} 值增加 0.001 定义为 1 个溶血活性单位 (U)。

1.4.2 外界因素的作用

1.4.2.1 温度

分别取经 40, 45, 50, 55, 60, 80, 100 $^{\circ}$ C 处理的虾血清 0.1 mL 与 3 mL 红细胞悬液混合, 检测虾血清溶血活性的变化。

1.4.2.2 pH 值

待测血清分别与 pH 为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 的生理盐水等量混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 10 min 后, 检测虾血清溶血活性的变化。

1.4.2.3 盐度

待测血清分别与盐度为 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48 和 60 的 NaCl 溶液等量混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 10 min 后, 检测虾血清溶血活性的变化。

1.4.2.4 EDTA-Na₂

待测血清分别与含 0, 2, 4, 8, 16, 32 和 64 mmol/L EDTA 的生理盐水等量混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 10 min 后, 检测虾血清溶血活性的变化。

1.4.2.5 金属离子

待测血清分别与含 10 mmol/L 的 CaCl₂, CuCl₂, MgCl₂, MnCl₂, BaCl₂ 金属离子的生理盐水等量混合, 4 $^{\circ}$ C 放置 10 min 后, 检测虾血清溶血活性的变化。

2 结果

不同温度对凡纳滨对虾血清凝集素和溶血素活性的影响见表 1。经 40, 45 $^{\circ}$ C 处理 20 min 后, 凡纳滨对虾血清凝集效价与未经处理 (25 $^{\circ}$ C) 时的相同, 溶血素活性也变化不明显, 之后随着温度的升高凝集活性下降, 而溶血素活性有不同程度的增强, 60 $^{\circ}$ C 时达到最高, 到 80, 100 $^{\circ}$ C 时, 血清完全变成乳白色脓状物, 无凝集和溶血活性。

表 1 温度对凡纳滨对虾血清凝集素和溶血素活性的影响

Tab. 1 The effect of temperature on the activities of agglutinin and hemolysin of serum of *L. vannamei*

温度 ($^{\circ}$ C)	凝集效价	溶血活性
25	24	28
40	24	29
45	24	27
50	16	34
55	8	42
60	4	61
80	-	-
100	-	-

注: “-”表示血清无凝集活性, 无溶血活性, 表 2~5 同

从表 2 可知,在 pH 3~11 范围内对虾血清均能凝集红细胞,而在 pH 8~9 时凝集活性最高;pH 1~2 和 pH 12 时凝集活性完全丧失。当 pH 6~9 时,溶血素的活性较强,在 pH 1 时,血清发生变性,形成絮状沉淀,无溶血性。

表 2 pH 对凡纳滨对虾血清凝集素和溶血素活性的影响
Tab. 2 The effect of pH on the activities of agglutinin and hemolysin of serum of *L. vannamei*

pH	凝集效价	溶血活性
未处理	8	25
1	-	-
2	-	21
3	4	23
4	4	24
5	4	21
6	4	31
7	8	28
8	16	31
9	16	32
10	8	24
11	4	26
12	-	25

不同盐度对凡纳滨对虾血清凝集素和溶血素活性的影响见表 3。当盐度为 24~48 时,凝集活性最强,当盐度高于 48 或者低于 6 时,凝集活性较差。盐度为 18~36 时,溶血素的活性较强。

表 3 盐度对凡纳滨对虾血清凝集素和溶血素活性的影响
Tab. 3 The effect of salinity on the activities of agglutinin and hemolysin of serum of *L. vannamei*

盐度	凝集效价	溶血活性
未处理	8	28
4	4	24
6	4	21
12	8	27
18	8	34
24	16	49
36	16	45
48	16	28
60	4	24

表 4 结果表明,当 EDTA-Na₂ 浓度为 0~4 mmol/L 时,对虾血清的凝集活性最高且相同,当

表 6 糖类对凡纳滨对虾血清凝集素活性的影响

Tab. 6 The effect of saccharide on the activity of agglutinin of serum of *L. vannamei*

糖类	D-葡萄糖	D-果糖	D-乳糖	D-半乳糖	D-棉子糖	D-木糖	L-山梨糖	L-鼠李糖	甘露糖	蔗糖
凝集活性	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+

注:“-”表示凝集活性被抑制,“+”表示有凝集活性

EDTA-Na₂ 浓度高于 16 mmol/L (包括 16 mmol/L) 时,血清凝集活性被完全抑制。EDTA-Na₂ 对溶血素的活性几乎无影响。

表 4 EDTA 对凡纳滨对虾血清凝集和溶血素作用的影响
Tab. 4 Effect of EDTA on the activities of agglutinin and hemolysin of serum of *L. vannamei*

EDTA-Na ₂ 浓度 (mmol/L)	凝集效价	溶血活性
0	16	30
2	16	32
4	16	32
8	4	30
16	-	31
32	-	30
64	-	28

从表 5 可知,CuCl₂ 使凝集素活性完全丧失;Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 能使血清的凝集活性增强,且 Ca²⁺ 的作用比 Mg²⁺ 强,Mn²⁺ 和 Ba²⁺ 溶液对血清凝集活性没有影响。Cu²⁺ 完全抑制溶血素的活性,Mg²⁺ 使溶血活性增强,Mn²⁺ 对溶血素的活性没有影响,而 Ca²⁺ 和 Ba²⁺ 对溶血素的作用有轻微的抑制。

表 5 二价金属离子对凡纳滨对虾血清凝集素和溶血素活性的影响
Tab. 5 The effect of divalent metal on the activities of agglutinin and hemolysin of serum of *L. vannamei*

二价金属离子	凝集效价	溶血活性
未处理	4	30
Cu ²⁺	-	-
Ca ²⁺	32	24
Mg ²⁺	8	34
Mn ²⁺	4	30
Ba ²⁺	4	22

不同糖类对凡纳滨对虾血清凝集素活性的影响见表 6。对虾血清凝集活性能被 D-葡萄糖、D-果糖和 D-半乳糖等 3 种糖所抑制。

3 讨论

3.1 凝集素活性的变化

多数甲壳动物的凝集素具有热不稳定性,其变性温度一般在 65~80 之间。日本对虾血清凝集素在 28~56 间凝集活性稳定,在 70 和 80 时凝集活力完全丧失^[8],而中国明对虾血清凝集素具有较好的热稳定性,经 60~100 处理 20 min 后,少量未凝固的血清对鸡红细胞仍具有一定的凝集活性^[9]。本实验结果表明,凡纳滨对虾的血清凝集素的热稳定性与日本对虾的相似。这些对虾血清凝集素热稳定性的差异可能与其生活环境及凝集素分子的化学结构和活性位点的化学性质有关^[15,16]。

不同甲壳动物血清凝集素所适应的 pH 范围稍有不同。螯虾凝集素在 pH 5~10 内具有凝集素活性^[17];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^[8];而中国明对虾凝集素具有广泛的 pH 值范围,在 pH 3~11 内可不同程度地凝集鸡红细胞^[9]。本实验结果表明,凡纳滨对虾血清凝集素与中国明对虾凝集素相似,也具有广泛的 pH 范围,在 pH 3~11 范围内可不同程度地凝集红鱼血细胞。戴聪杰等^[15,16]的研究结果表明,凡纳滨对虾的血清凝集素在 pH 3~11 范围内对兔红细胞都具有凝集活性,在 pH 6.0 的中碱性环境凝集作用较强,这也与本实验结果基本一致,而在对斜生栅藻细胞的凝集中,pH 8.0 时,凝集活性完全丧失。pH 值对凝集素活性的影响可能是 pH 的变化可使凝集素与相应受体的构象改变,无法与相应受体结合,从而影响凝集素的活性。

牟海津等^[5]在研究中国明对虾血清对鸡红细胞的凝集作用时发现,在一定盐度范围内,增加盐度可提高中国明对虾血清的凝集活性。本实验发现,在盐度为 4~60 时,都能在凡纳滨对虾血清中检测到凝集作用,当盐度为 24~48 时,血清凝集素活性有所增强,因此,认为对虾血清凝集活性的增强可能与对虾更适应于高盐度环境生长有关。

无脊椎动物凝集素的凝集作用常常需要二价金属离子的参与。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 能增强血清的凝集活性,且 Ca^{2+} 的作用比 Mg^{2+} 强,而 Cu^{2+} 完全抑制了凝集素的活性, Mn^{2+} 和 Ba^{2+} 对凝集活性没有影响,因此认为凡纳滨对虾血清凝集素产生凝集作用需要 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的参与,而不需要 Mn^{2+} 和 Ba^{2+} 的参与; Cu^{2+} 使凝集素的结构发生变化,凝集活性丧失。EDTA 对甲壳动物血清凝集素活性有不同程度的抑制作用。当 EDTA- Na_2 浓度高于 8 mmol/L 时,螯合部

分或全部参与凝集作用的金属阳离子,部分或完全抑制血清凝集素的活性。

凝集素是一类对特定细胞多糖具有亲和力的、能选择凝集脊椎动物血细胞和某些微生物细胞的、多价构型的热敏蛋白或糖蛋白复合物。凝集素的最大特征在于它们能够识别糖蛋白和糖肽,特别是细胞膜中复杂的碳水化合物结构,即细胞膜表面的碳水化合物决定簇——糖基^[14],因此,一种凝集素具有对某一种特异性糖基专一性结合的能力。凡纳滨对虾血清的凝集活性能被 D-葡萄糖、D-果糖和 D-半乳糖等 3 种糖抑制。表明凡纳滨对虾凝集素能与这 3 种糖发生结合,从而抑制了凝集素与细胞表面糖蛋白的结合;或者是这 3 种糖与凝集素竞争血细胞表面的受体,从而抑制凝集素的活性。

3.2 溶血素活性的变化

溶血素是无脊椎动物免疫防御系统中的一种重要的非特异性免疫因子,其作用类似于脊椎动物的补体系统,可以溶解异物细胞,参与调理作用^[1,18]。无脊椎动物的溶血素与脊椎动物血细胞表面的特异性糖链结合后,破裂细胞膜造成溶血现象^[2]。

凡纳滨对虾溶血素在 pH 2~12 均有活性,在 pH 6~9 时,溶血活性较强。表明凡纳滨对虾溶血素活性具有较广的 pH 范围,且在 pH 6~9 时,溶血素处在溶血活性的最佳构型。凡纳滨对虾溶血素的溶血活性在盐度为 18~36 时较强,这可能与适应于高盐度环境有关。

无脊椎动物的溶血素热稳定性较差。但凡纳滨对虾血清溶血素经 45~60 处理后,溶血活性逐渐增强,而 80~100 时,血清发生变性凝固,无溶血性。表明在 45~60 内,温度的增加可以提高凡纳滨对虾血清溶血素的溶血活性。 Mg^{2+} 能促进溶血作用, Mn^{2+} 对溶血素活性无影响,而 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对溶血素活性有轻微的抑制。在反应液中加入少量的 Ca^{2+} ,能增强日本对虾溶血素的溶血作用^[3],而本实验发现, Ca^{2+} 对凡纳滨对虾血清溶血素活性没有明显的影响。说明 Ca^{2+} 可能是日本对虾溶血素进行溶血作用所必需的金属离子,而凡纳滨对虾的溶血素在进行溶血作用时不需要 Ca^{2+} 的参与。因此, Ca^{2+} 对溶血素的作用还有待进一步研究。EDTA- Na_2 对溶血素的活性几乎无影响。因而认为金属离子不是凡纳滨对虾溶血素产生溶血活性的必需因子。

参考文献:

- [1] 王建平,吴雄飞. 虾类血细胞及体液免疫的研究现状[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, 19(4):

- 354-360.
- [2] Hatakeyama T, Kohzaki H, Nagatomo H, *et al.* Purification and characterization of four super dependent lectines from the marine invertebrate, *Cucumariaechninata*[J]. *J Biochim Todyo*, 1994, **116**(1) : 209-214.
- [3] Armstrong P B, Armstrong M T, Ougley J L. A hemolytic activity in the blood of the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus* that resembles the mammalian complement sustem[J]. *Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole*, 1992, **183**(2) :378-379.
- [4] 高健, 李跃华. 甲壳类的体液棉衣因子及其环境作用[J]. 水产养殖, 1992, 6:21-23.
- [5] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 日本对虾溶血素的活性测定及性能研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(4) : 362-367.
- [6] 廖绍安, 李筠, 张晓华, 等. 日本对虾血清凝集素及其免疫作用的初步研究[J]. 中国水产科学, 2002, **9**(3) :224-227.
- [7] 戴聪杰, 陈寅山. 日本对虾血清和肌肉提取液凝集活力的初步研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2002, **18**(4) :81-85.
- [8] 廖绍安, 李筠, 张晓华, 等. 日本对虾血清凝集素的基本物理化学性质[J]. 中国水产科学, 2001, **8**(4) : 1-4.
- [9] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 中国对虾血细胞凝集素的性能研究[J]. 中国水产科学, 1999, **6**(3) :32-35.
- [10] 彭其胜, 郭文场, 杨振国, 等. 中国对虾血淋巴凝集素的血凝活性与促噬作用[J]. 水产学报, 2001, **25**(3) :197-202.
- [11] 彭其胜, 郭文场, 杨振国, 等. 中国对虾血淋巴液中的凝集素[J]. 中国水产科学, 2001, **7**(4) :14-18.
- [12] 罗日祥. 中国对虾凝集素活力及弧菌的诱导动力学[J]. 海洋科学, 1997, **19**(4) :117-120.
- [13] 曹广立, 朱越雄. 罗氏沼虾血清凝集素的凝集作用及糖的影响[J]. 科学养鱼, 1999, 12:13-14.
- [14] 陈皓文, 孙丕喜, 宋庆云. 外源凝集素——水产动物御敌的有力兵器[J]. 黄渤海海洋, 1995, **13**(3) :61-70.
- [15] 戴聪杰, 陈寅山. 甲壳动物血清中凝集素的凝集作用及影响因素[J]. 泉州师范学院学报(自然科学), 2002, **20**(6) :76-81.
- [16] 戴聪杰, 陈寅山. 福建 10 种甲壳动物凝集素的研究[J]. 泉州师范学院学报(自然科学), 2002, **20**(2) : 89-94.
- [17] 莫照兰, 李会荣, 俞勇, 等. 细菌糖蛋白对螯虾免疫因子的影响[J]. 中国水产科学, 2000, **7**(3) :28-32.
- [18] 赵红霞, 张艳秋, 黄磊, 等. 虾类的免疫系统与免疫防治[J]. 中国兽医杂志, 2003, **39**(1) :41-44.

Properties of agglutinin and hemolysin in serum of *Litopenaeus vannamei*

CAO Jian-xiang, JIAN Ji-chang, WU Zao-he, Lu Yi-shan

(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals & Guangdong Province Education Department Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China)

Received :Oct. ,26 ,2004

Key words :*Litopenaeus vannamei*; agglutinin; hemolysin

Abstract : A preliminary study on the physic and chemical properties of agglutinin and hemolysin in serum of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was carried out. The results showed that the agglutinin had the optimal temperature ranged 25 ~ 45 °C, the optimal pH 8.0 ~ 9.0 for hemagglutinating activity. Enhancing salinity in certain range could improve the hemagglutinating activity. The activity depended on Ca²⁺ and could be inhibited by EDTA, D-glucose, D-fructose and D-galactose. The activity of hemolysin could be improved to some extent under 45 ~ 60 °C for 20min. When the temperature rose to 80 °C, the serum was denatured and solidified. The optimal pH range was 6 ~ 9, salinity range 18 ~ 36. The hemolytic activity could be inhibited by Cu²⁺, Mg²⁺ could enhance the activity, and Ca²⁺ and Ba²⁺ can slightly inhibit the activity, while Mn²⁺ and EDTA had no effect on its activity.

(本文编辑:刘珊珊)