

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200426165

UDC _____

厦 门 大 学

_____ 硕 士 _____ 学 位 论 文

日本囊对虾血蓝蛋白的基因结构及抗病毒机制 的初步研究

Characterization of Hemocyanin subunits from *Marsupenaeus japonicus* and their involvement in antiviral defense

雷开宇

指导教师姓名: 徐 洵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 4 月 22 日

论文答辩时间: 2007 年 6 月 3 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: _____ 杨丰 _____

评 阅 人: _____ 杨丰 _____

_____ 章晓波 _____

_____ 邵宗泽 _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

血蓝蛋白主要存在于甲壳纲，多足纲，肢口纲和蛛形纲动物体内。作为血淋巴的主要组成成分，血蓝蛋白大概占血淋巴总蛋白含量的 95% 以上。血蓝蛋白在对虾肝胰腺内被合成，并以六聚体为一单位的形式游离在血淋巴中，负责氧气的运输起着“分子肺”（即呼吸蛋白）的作用。

另外，血蓝蛋白作为一种多功能蛋白还被证实参与一些生理过程，如渗透压的调节、能量的贮藏和酶的活力。而最受我们关注的是血蓝蛋白已被发现在节肢动物和软体动物的天然免疫系统起着重要的作用，但主要集中在抗菌防御体系，而对血蓝蛋白在抗病毒防御体系中的作用人们却知之甚少。

我们的研究中发现纯化的天然状态的血蓝蛋白在体内能够显著地减缓白斑杆状病毒对对虾的感染。因此，我们从日本囊对虾中克隆得到了两个血蓝蛋白亚基的基因（*PjHcL* 和 *PjHcY*）。有趣的是我们发现病毒感染对这两个亚基的表达产生了不同的影响。病毒的侵染诱导了大量 *PjHcL* 基因 mRNA 的转录，但 *PjHcY* 基因却无明显变化。而且，在抗病对虾体内我们也发现血蓝蛋白的表达量显著升高，同时在转录水平，相比于 *PjHcY* 基因，*PjHcL* 基因明显上调。这些发现不但揭示了对虾血蓝蛋白在抗病毒防御系统中的重要作用，还提示我们血蓝蛋白这两个不同亚基可能在对虾天然免疫系统中发挥着不同的作用。

关键词： 血蓝蛋白；对虾；抗病毒

Abstract

Hemocyanin occurs in several classes: Crustacea, Myriapoda, Merostomata and Arachnida. As the main protein component of hemolymph, hemocyanin typically represents up to 95% of the total amount of protein. Hepatopancreas has been shown to be the site of hemocyanin synthesis. Hemocyanin (hexamer form) is freely dissolved in shrimp hemolymph and mainly responsible for oxygen transport.

In addition to their primary function as an oxygen carrier for many arthropods, it has been suggested that hemocyanins would be multifunctional proteins involved in physiological processes such as osmoregulation, protein storage or enzymatic activities. Although it was also found to function in innate immunity of many arthropods and mollusks, involvement of hemocyanin in antiviral defense is seldom reported.

In this study, we found that purified shrimp hemocyanin significantly delayed the infection of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) *in vivo*. Two hemocyanin subunit genes (*PjHcY* and *PjHcL*) were thus cloned from *Marsupenaeus japonicus*. Interestingly, the effect of viral infection on the expression of these two subunits was different. *PjHcL* mRNA was strongly induced by WSSV infection while *PjHcY* varied little. Moreover, in WSSV-resistant shrimp, a much more significant up-regulation was found on the expression of *PjHcL* comparing with *PjHcY*. These findings not only reveal an important role of shrimp hemocyanin in antiviral defense, but

also suggest a possible difference between its subunits in shrimp innate immunity.

Keywords: Hemocyanin; Shrimp; Antiviral

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Chinese abstract	I
English abstract	II
1 Introduction	1
1.1 Shrimp Culture in China	1
1.2 The Immune System of Shrimp	1
1.3 Characterization and Research Progress of Hemocyanin	7
1.4 The Purpose and Signification of this Study.....	17
2 Materials and Methods	19
2.1 Materials	19
2.2 Research Methods	27
3 Results and analyses	43
3.1 The Antiviral Property of <i>M. japonicus</i> Hemocyanin	43
3.2 cDNA Sequences of Hemocyanin	43
3.3 Expression of Hemocyanin Subunits in WSSV-sensitive and resistant Shrimp	46
3.4 Expression of hemocyanin subunit genes in response to WSSV challenge	49
3.5 The Genomic Structure of Hemocyanin and Promoter Sequence	52
3.6 Prediction of Transcription Factor Binding Sites and Promoter Activity	55
3.7 Partial Expression of Hemocyanin Subunits and Their Antiviral Property	58
4 Discussion	60
5 Summary and Perspect	62
References	64
Acknowledgement	75

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
1 前言	1
1.1 我国对虾的养殖现状	1
1.2 对虾的免疫系统	1
1.3 血蓝蛋白的基本特征与研究进展	7
1.4 本论文研究的目的及意义	17
2 材料与方法	19
2.1 材料	19
2.2 实验方法	27
3 结果与分析	43
3.1 日本囊对虾血蓝蛋白抗病毒活性实验	43
3.2 血蓝蛋白 cDNA 序列的扩增	43
3.3 <i>PjHcL</i> 和 <i>PjHcY</i> 在抗病虾和普通虾体内的转录表达差异	46
3.4 <i>PjHcL</i> 和 <i>PjHcY</i> 在病毒胁迫后的转录表达差异	49
3.5 血蓝蛋白的基因结构和启动子的扩增	52
3.6 <i>PjHcL</i> 和 <i>PjHcY</i> 启动子转录因子结合位点分析及功能验证	55
3.7 血蓝蛋白亚基的分段表达及各段抗病毒活性检测	58
4 讨论	60
5 小结和展望	62
参考文献	64
致谢	75

1. 前 言

1.1 我国对虾的养殖现状

对虾是人们最喜欢的海产食品之一，因此对虾养殖具有较高的经济价值。世界对虾的养殖业从 50 年代开始，就以惊人的速度增长，而对虾的消费量也逐年递增^[1]。我国对虾养殖业虽从近二十年才发展起来，但已成为养殖业中最具经济价值的水产品之一。我国当前的对虾养殖品种主要有斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 等^[2]。

然而，在养虾业高速发展的同时，人们忽视了虾病的防治研究，导致了世界虾病的流行，给养虾业带来了巨大的损失，1992 年我国虾产量为 20 万吨，而 1994 年却下降到 5.5 万吨，年直接经济损失达数十亿人民币^[3]。可喜的是，1996 年以后，我国对虾养殖业开始出现复苏，养殖产量逐渐开始回升，发展前景变得比较乐观。其主要表现在：(1) 对虾病害科研工作取得了阶段性的突破；(2) 通过创办对虾养殖病害防治示范区，树立了一批走精养高产之路的样板；(3) 对虾的产业基础比较好；(4) 对虾有广阔的国内外市场^[4]；(5) 淡水养虾迅猛发展。

人工养殖对虾的疾病主要由细菌和病毒引起。虽然细菌病可用抗生素控制，但大量使用抗生素，不仅可导致细菌产生抗药性，而且还可抑制对虾自身免疫力的发挥。同时，对病毒病目前尚无特殊治疗方法。故国内外治疗对虾病普遍采用的方法是“以防为主”，其根本目的是通过提高对虾自身免疫能力以增强其抗病力。因此研究甲壳类动物的免疫机制，有效的提高虾类本身的抗病能力，是解决病害问题的一条非常有效的途径。自 60 年代以来，瑞典，美国，日本等国的学者发表了大量的论文集专著，对甲壳动物免疫机制等问题进行了有益的探索。而至今，对虾白斑病毒仍是对虾养殖业最主要的威胁^[5]。

1.2 对虾的免疫系统

脊椎动物已经建立了较为系统的免疫学理论和实验方法，但无脊椎动物的免疫一开始不被重视，起步较晚。甲壳类动物的免疫大概在 20 世纪 60 年代后开始研究。一般认为，无脊椎动物只存在原始的、非特异性的免疫系统^[6]。对虾的免疫系统主要包括免疫器官、免疫细胞和各种免疫因子。免疫器官包括甲壳、鳃、

血窦和淋巴器官等^[7]，免疫细胞包括血细胞和淋巴细胞^[8]，免疫因子指各种与免疫相关的多肽和蛋白。

1. 2. 1 虾类免疫应答机制

尽管许多学者对对虾类免疫应答机制进行了大量的研究，但其详细机制尚未得到完全阐明。目前，一般认为，虾类免疫主要包括血细胞的吞噬、包裹、凝集和溶菌活性，以及血淋巴中的免疫应答因子如酚氧化酶原激活系统、凝集素、抗菌肽、溶血素、溶菌酶、蛋白酶抑制剂、类 Ig 蛋白和血蓝蛋白(hemocyanin, Hc)等的识别和防御作用。反应机制传统上分为细胞免疫和体液免疫，两者缺一不可，密切相关。其免疫过程可能为：当外界异物侵袭机体时，异物表面的分子作用于宿主的半粒细胞，细胞受体与非己分子结合，刺激细胞产生胞吐作用进行脱颗粒，把酚氧化酶原系统释放到周围介质中。随后，酚氧化酶被激活，活化过程中产生一系列的活性物质，促进血细胞的吞噬作用，介导凝集和凝固，产生杀菌物质，从而消除入侵的病原和外来异物^[3, 9, 10, 11, 12]。

1. 2. 2 免疫应答主要组织和器官

虾类免疫应答的主要组织和器官为血淋巴和类淋巴器。类淋巴器位于虾体胃的腹侧，左右各 1 叶，长约 5~7 mm，为膜包被的管状结构，由内皮细胞、基质细胞和血细胞三种细胞组成^[13]。类淋巴器为一造血结，可产生无粒细胞和粒细胞。最近，刘晓云等^[14]在研究中国对虾淋巴器时发现，淋巴器起源于触角动脉，外包结缔组织膜，内部充满小管，小管依其发育时期和功能不同表现为三种不同的形态，其中第二种小管具有生成和释放血细胞的功能。

1. 2. 3 免疫应答细胞

虾类的免疫功能主要是通过血细胞来完成。它既是免疫细胞的担当者，又是体液免疫的提供者。关于血细胞的分类和命名，目前尚无统一标准，一般根据血细胞在光镜下有无颗粒、颗粒多少及颗粒大小分为无粒细胞（透明细胞）、小粒细胞（半粒细胞）和粒细胞^[15]。而无粒细胞又具有两种不同的形态，一种具有巨噬细胞的性质，另一种具有类似淋巴细胞的性质并称之为“浆样细胞”^[16]。研究表明，三种血细胞因含有不同的免疫酶而具有不同的免疫功能^[17]，其中无粒细胞具有吞噬功能，“浆样细胞”在接受抗原刺激后，在内质网中有免疫物质合成，并以细胞表面形成泡状突起的方式进行释放。小粒细胞具有活跃的

胞吐作用、细胞毒作用、识别异物以及贮存和释放的酚氧化酶原的能力，是防御反应之关键细胞。颗粒细胞虽无吞噬能力，但同样具有细胞毒作用和释放的酚氧化酶原的能力，如用活化的酚氧化酶系统的组分处理可迅速使之发生胞吐作用并释放出有活性的酚氧化酶参与体液免疫^[18]。

1. 2. 4 免疫应答因子

体液性免疫因子在对虾免疫防御中发挥着十分重要的作用，这些因子包括先天和诱导产生的各种生物大分子，主要是血淋巴中的各类抗菌因子、抗病毒因子、血凝因子、细胞激活因子、识别因子、凝集素、溶血素及溶菌酶、酚氧化酶等具有免疫活性的酶类以及活性氧中间产物（表 1）。这些免疫因子的作用在于识别异物，包括外来入侵的病原菌和病毒；通过凝集、沉淀、包裹、溶解等方式抑制病原体的生长及扩散，或者直接将其杀灭并排出体外；发挥调理作用，促使吞噬细胞更易于吞噬外来颗粒；另外，还可能参与止血、凝固、物质吸收与运输以及创伤修复等生理作用^[19]。目前所知，与 Hc 密切相关的免疫应答因子主要有两种：酚氧化酶和抗菌肽。

1. 2. 4. 1 酚氧化酶原（Prophenoloxidase, proPO）激活系统

在无脊椎动物免疫中，由一些蛋白组成的酚氧化酶原（prophenoloxidase, proPO）激活系统可以导致黑色素产生，细胞粘附，包裹和吞噬作用以及结节形成^[20,21]。它是一个识别异己的有效的免疫系统，从识别细菌的脂多糖或肽聚糖和真菌的 β -1,3-葡糖苷开始。这个系统包括一个由模式识别分子（pattern-recognition proteins, PRPs），几种酶原的蛋白酶以及酚氧化酶原组成的蛋白酶链。

进化上，proPO 属于四个亚家族中的一种：（1）arylphorin 亚家族（昆虫的一种储藏蛋白，没有铜结合功能）；（2）鳃足亚纲的 Hc，在氧转运中起作用的一种铜结合蛋白；（3）螯肢动物的 Hc；（4）昆虫和甲壳类的 proPO（参与免疫反应的铜结合蛋白质）。最近在蜘蛛 *Eurypelma californicum*^[22] 和蜚蠊 *Tachypleus tridentatus*^[23] 中发现 Hc 的 N 端在被蛋白酶裂解后有 PO 活性，提示尽管螯肢动物的 Hc 在正常情况下作为氧载体，但在受伤后它也可变成 PO 防止微生物入侵。系统分析显示，proPO 亚家族与螯肢动物 Hc 有着更高的进化关系^[24]。

ProPO 的活性形式 PO 是一种酪氨酸酶（tyrosinase），它催化两个连续的反

应：单酚氧化为双酚（单酚氧化酶活性），二酚氧化为醌（双酚氧化酶活性）。经 P0 形成醌在黑色素生物合成的级联反应中只是一个开始。P0 在表皮骨化、伤口复原和对外物的包囊中也是重要的。节肢动物的 P0 在正常的生理状态下作为一个无活性的酶原存在，它们被蛋白酶的裂解激活，除了最近发现的一个来自昆虫黄蜂 *Pimpla hypochondriaca* 的 proP0，它没有蛋白酶的裂解也是有活性的，而且它还有一个不同是它有信号肽^[25]。

表 1 螯虾 *Pacifastacus leniusculus* 血细胞和血淋巴中的主要免疫应答因子

Proteins and peptides	Mass(kDa)	Function
Prophenoloxidase system		
Prophenoloxidase(ProPO)	76	Precursor of phenoloxidase and melanin formation. Serine protease
ProPO activating enzyme (ppA)	48	which contains β -defensin-like domain.
LPS and β 1,3-glucan binding proteins (LGBP)		
β 1,3-glucan binding protein	100	One of the triggers of prophenoloxidase activating system (ProPO system).
LGBP	40	Involvement in ProPO system. Opsonin and cell adhesion.
Mannose-binding lectin	28	secreted from hemocytes upon challenge.
Cell adhesion proteins		
Peroxnectin	76	Cell adhesion molecule and, binding to peroxidase.
Masquerade-like protein 1	124/134	Cell adhesion protein which contains non-catalytic serine protease domain.
Masquerade-like protein 2	40	secreted from hemocytes upon challenge.
Proteinase inhibitor		
α_2 -Macroglobulin	190 X 2	Complement-like activity.
Pacifastin	155	Serine protease inhibitor which contains a unique transferring chain.
Subtilisin inhibitor	28	
Kazal-type inhibitors	10-30	Four domains-Kazal type protease inhibitor.
Antibacterial proteins		
Lysozyme	14	Cell lysis.
Hemagglutinin	420	Hemagglutinating activity.
Cytosolic ferritin	440	A storage protein for ferric ion.
Astocidine 1	1.6	Antimicrobial peptide.
Astocidine 2	1.8	Antimicrobial peptide.
Curcimine-like peptides	14-20	Antimicrobial peptide.
Anti-LPS factor	13.5	secreted from hemocytes upon challenge.
Others		
Vitellogenin-related protein	210 X 2	A plasma clotting protein, lipoprotein-like, and TGase substrate.
Transglutaminase (TGase)	90	Cross-linking.
Hemocyanins	360	O ₂ transporter, phenoloxidase-like activity, and produces anti-microbial peptides.
Astakine	8.7	Cytokine-like activity in hematopoiesis.

在螯虾中，proP0 合成和定位于血细胞的颗粒中，可被 β -1, 3-葡糖苷结合蛋白诱发外排进入血浆，而螯虾 Hc 是在肝胰腺中合成^[26]。螯虾 proP0 从血细胞 cDNA 文库中被克隆，它编码 706 个氨基酸，推测分子量为 80.7kD，与纯化天然 proP0 的分子量（76kD）相近。它包括两个保守的 Cu 结合位点，与天然 proP0 含有两个 Cu 原子相符，这些保守位点与节肢动物 Hc 中的相应位点相似。螯虾 proP0 上的活化酶裂解位点在 Arg176 和 Thr177 之间。

PRPs 是 proP0 系统的触发分子，它们结合于微生物成分，并诱导 proP0 系统中蛋白酶的活化，最后 proP0 被一种内源的胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶（即所谓

的 proPO 活化酶, ppA) 裂解, 转化成 PO。到现在为止, 四种 ppA 和一种辅助因子已从四种不同动物中被克隆, 甲虫 *Holotrichia diomphalia*^[27,28], 丝虫 *Bombyx mori*^[29], 烟草天蛾 *Manduca sexta*^[30], 和螯虾 *Pacifastacus leniusculus*^[31]。纯化的螯虾 ppA 分子量约 36kD, 能在没有别的因子作用下将 proPO 转变成有活性的 PO。初级结构显示它们皆作为典型的丝氨酸蛋白酶的酶原而存在。它们也包含一或二个与蜚^[32]和哺乳动物防卫素 (defensin)^[33,34]有同源氨基酸序列的回形结构域。螯虾 ppA 的回形结构域重组产物在体外有抗革兰氏阳性细菌的活性, 所以螯虾甚至其它的 ppA 有双重功能^[31]。

螯虾 ppA 的 cDNA 从血细胞 cDNA 文库中被克隆, 共 1736bp, 编码一个 468 个氨基酸的酶原 (proppA)。通过 Northern 杂交在螯虾血细胞 mRNA 中探测到一个 1.8kb 的转录本。proppA 有一个保守的 23 个氨基酸的信号肽, 成熟蛋白包括 445 个氨基酸, 计算分子量为 48kD, 估计 pI 为 9.04。根据序列分析, proppA 活化的裂解位点在 Arg236 和 Ile237 之间, 分裂为 23kD 的带正电的 N 端一半 (pI 11.9) 和 25kD 的带负电 C 端一半 (pI 4.6)。C 端一半由一个典型的丝氨酸蛋白酶结构域组成, 其序列与其它无脊椎动物和脊椎动物丝氨酸蛋白酶相似。N 端一半包括一个碱性的富甘氨酸结构域, 一个碱性的富脯氨酸结构域和一个回形结构域, 其回形结构域与三种昆虫 proppA 和蜚凝结酶原的相应结构域相似, 其中的二硫键模式与蜚的 big defensin 和牛嗜中性粒细胞 β -defensin-12 中的相似^[31]。

随着 proPO 系统的活化, 一些其它的蛋白质也会活化, 如一种细胞粘附蛋白 peroxinectin 已在螯虾 *Pacifastacus leniusculus*^[35] 和斑节对虾 *Penaeus monodon*^[36] 中被纯化和定性。斑节对虾 peroxinectin 的 cDNA 共 2337bp, 编码 778 个氨基酸, 包括一个 20 氨基酸的信号肽, 在血细胞中组成型表达, 给对虾注射 β -1,3-葡糖苷或海带多糖会导致 peroxinectin 的表达大大减少。其成熟蛋白 (758 个氨基酸) 推测分子量 84.8kD, pI 9.0。在对虾 peroxinectin 序列中发现了两个 integrin 的保守结合域 RGD (Arg-Gly-Asp) 和 KGD (Lys-Gly-Asp)。对虾的 peroxinectin 与螯虾的有 69% 同源性, 与无脊椎动物和脊椎动物中的过氧化物酶相似^[36]。另外在螯虾中还发现了一种 peroxinectin 的结合蛋白 (230kD), 它是血细胞表面的一种超氧化物歧化酶 (EC-SOD), 包括一个信号肽,

一个 SOD 结构域和一个富含 Pro 氨基酸残基的 C 末端, 没有跨膜结构域, 高盐浓度下它即从膜上释放出来。所以, 与过氧化物酶结合可能是 SOD 的一个新功能^[37]。

proPO 系统必须被调节控制, 避免系统中活性物质的毒性, 特别是 PO 能产生高毒性中间物。几种能防止 ppA 过度活化的蛋白酶抑制剂^[38, 39]和一个能直接抑制 PO 活性的 PO 抑制剂 (POI)^[40, 41]已在几种节肢动物中被发现。螯虾中最有效的 ppA 抑制剂是 pacifastin^[42], 它包括一个含有九个蛋白酶抑制剂亚单位的轻链 (44kD) 和一个含有三个转铁蛋白结构域的重链 (105kD), 两链由一个肽键连接, 形成一种新的蛋白酶抑制剂, 命名为 pacifastin 样的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 它存在于许多昆虫中, 能抑制 proPO 系统^[43, 44]。九个蛋白酶抑制剂亚单位彼此同源, 并与蚱蜢 *Locusta migratoria* 的蛋白酶抑制剂同源, 它们都富含 Cys, 与其它蛋白酶抑制剂明显不同^[42]。

1. 2. 4. 2 抗菌肽

抗菌肽已经被认为是非特异性免疫系统的重要成分, 它们存在于许多生物中, 包括无脊椎动物、脊椎动物和植物。它们通常是小分子 (不超过 100 个氨基酸), 带正电, 其一级结构高度变化, 但二级结构都是两性的。其表达可能是组成型或诱导型, 或兼而有之。尽管它们结构变化很大, 但通常可根据某种结构模式分为三类: 一是形成 α 螺旋、没有半胱氨酸的线状肽 (cecropin 和 magainin 家族), 二是含有半胱氨酸的环状肽 (defensin 家族), 三是富含脯氨酸和/或甘氨酸的肽。 α 螺旋家族抗菌肽在水溶液中通常有一个随机螺旋结构, 它能渗透进细菌膜中, 通过离子通道的形成破坏膜结构^[45, 46]。此类抗菌肽具有广谱抗菌活性, 包括革兰氏阴性和阳性细菌, 真菌和原生动物。Defensin 家族肽又根据它们的结构分为两个亚类, 具有三链 β 折叠结构的哺乳动物 defensin^[47], 和具有两链 β 折叠和一个侧面 α 螺旋结构的昆虫 defensin^[48]。尽管所有的 defensin 都含有三个二硫键, 但哺乳动物和昆虫的 defensin 有不同的模式。哺乳动物 defensin 的抗菌谱包括革兰氏阴性和阳性细菌, 分支杆菌, 许多真菌和一些囊膜病毒, 而昆虫 defensin 主要抗革兰氏阳性菌, 对革兰氏阴性菌和真核细胞有少许活性。Defensin 通过形成孔洞影响细菌膜结构^[49]。第三类抗菌肽中的富含脯氨酸肽存在于昆虫, 甲壳动物和哺乳动物中, 只对少数几种革兰氏阴性菌有活性, 并且只是抑菌。

在昆虫和螯肢动物中已有几种抗菌肽被鉴定，但甲壳动物中被鉴定的较少，如蟹 *Carcinus maenas*^[50] 和虾 *Penaeus vannamei*^[51] 中。*Penaeus vannamei* 中的 penaeidin 及其 cDNA 的全部序列已被确定，成熟分子（50 或 62 个氨基酸残基）的 N-端结构区富含脯氨酸残基，而 C 端区含有 3 个分子内二硫键。Penaeidin 中的 1 个肽在第一个氨基酸位置上经翻译后修饰加上了一个焦谷氨酸，其中 2 个肽可能因切除了甘氨酸残基而使竣基端发生酰胺化。其 mRNA 在血细胞中以组成型表达，而在心脏、淋巴器官、生殖腺和眼中只有轻微的表达，在肝胰腺和小肠中不表达。对从注射死细菌（微球菌、大肠杆菌 D31）后的虾中提取的血细胞 RNA 进行 Northern 杂交，发现在注射 3 或 6hr 后 penaeidin 的表达有一个减少，注射 24 h 后才恢复到正常虾的表达水平。Penaeidin 的表达和分布是通过血细胞的数量来调节的，原位杂交和免疫组织化学实验表明，penaeidin 定位在颗粒细胞的胞浆颗粒中，通过脱颗粒而释放，它最早出现于糠虾 II 期，但其 mRNA 早在无节幼体 V 期已出现^[51, 52]。最近从螯虾 *Pacifastacus leniusculus* 血淋巴中纯化并定性了两种低分子量抗菌肽 astacidin1 和 2。Astacidin1 含 16 个氨基酸残基，可抗革兰氏阳性和阴性细菌，它与其它已知的抗菌肽没有同源性，可被 LPS 或糖苷诱导上调表达^[53]。Astacidin2 含 14 个氨基酸残基，与从半翅类昆虫 *Palomena prasina* 中纯化的一种富含脯氨酸的抗菌肽 metalnikowin 1 有很高的同源性^[54]。

在许多生物中都发现了抗菌肽可由大分子前体产生，如亚洲蟾蜍 *Bufo bufo* 的 buforin1^[55]，老鼠的 α -defensin^[56]，人的 defensin-5^[57]。这应是产生不同效果分子和增强抗菌反应的有效方法。在甲壳动物中，螯虾的 astacidin1 和最近在对虾 *Penaeus stylirostris* 和 *Penaeus vannamei* 中发现的三种抗真菌肽 PshCt1、PshCt2 和 PvhCt 都是由蛋白酶从其 Hc 的 C 端释放出来的^[58]。

1. 3 血蓝蛋白的基本特征与研究进展

在脊椎动物中，血红蛋白是传运O₂和带走CO₂的呼吸蛋白，因此，已故著名结构生物学家Perutz将其命名为“分子肺”。除两胚层辐射对称级 (graderadiata) 的原始有机体如海绵、水母等以微绒毛被动地直接借助水流摄取O₂以外，其余的后生动物几乎都要依赖于呼吸蛋白，但并不是所有的呼吸蛋白都是血红蛋白。比如在少数较原始的海洋无脊椎动物如星虫、鳃曳动物、腕足类和小部分多毛纲环

节动物中为蚯蚓血红蛋白(hemerythrin),该蛋白是一类由4个 α 螺旋区组成的含一对 Fe^{2+} 亚单位聚成的球形八聚体。

在物种数量最多的后生动物类群——节肢动物和软体动物的血淋巴中存在着一种奇异的在结合氧时呈蓝色的Hc。此种蛋白在这两门中起着呼吸蛋白即分子肺的作用。Hc最早是以一种类酚氧化酶的酶的形式出现的,然后出现了不同的Hc亚基,最后变成两种功能截然不同的含铜蛋白^[59]。作为无脊推动物中最大的两个门,这两门动物从古至今都相当繁茂,尤其是在脊椎动物发生前。

1. 3. 1 血蓝蛋白的分子特性

Hc是在软体动物和节肢动物血淋巴中发现的存在于细胞外,负责氧的运输的一类巨大的蛋白质。在已研究的所有两类动物的Hc中,其氧结合位点处都含有一对铜离子,脱氧时表现为 Cu(I) 状态,氧化后变成 Cu(II) 状态(图1A)。正是这种变化导致Hc在结合氧时呈现为蓝色。

在甲壳动物中,这种氧的转运/储藏蛋白在肝胰腺中表达并以很高的浓度定位于血浆中,占了血浆总蛋白的90-95%^[60,98]。Hc在血浆中的含量还会受其它多种因素的影响,如pH、温度、盐度、蜕皮、个体发育状态和其他环境因子等。

Hc是一种多功能的蛋白,尽管这种蓝色色素通常被认为是氧的转运者。已有报道,这种呼吸色素可以作为储藏蛋白,渗透物^[61]和抗菌肽的前体(precursor)^[62]在体内起作用。近来研究报告表明,节肢动物Hc不仅是氧的携带者,还可以起到缓解和调节渗透压^[63],携带蜕皮激素^[61]的作用,并且还有可能作为表皮的一部分起作用^[64]。更重要的是Hc在体外还被证明可以对几种鱼病毒产生非特异的抑制作用^[65]。

1. 3. 2 血蓝蛋白分子的结构和分类

Hc可分为两大类,即节肢动物的Hc和软体动物的Hc。

1. 3. 2. 1 节肢动物的血蓝蛋白

节肢动物门的螯肢类、甲壳类、多足类和蜘蛛中都含有Hc。其中最大的类群昆虫虽不存在Hc,但含有与Hc有同源关系的六聚蛋白(hexamer)。六聚蛋白又分为富含芳香族氨基酸的和富含甲硫氨酸的两个类群。另外,在节肢动物的近亲有爪类(Onychophora)中也发现了节肢动物类型的Hc^[66]。

节肢动物Hc由分子量大约是72kDa的亚基组成。尽管观察到这些亚基有明显

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库