

## 凡纳滨对虾 28.5 kD 血蓝蛋白的降解新片段

章跃陵<sup>1,2</sup>, 叶向群<sup>3</sup>, 陈洁辉<sup>1</sup>, 黄通旺<sup>1</sup>, 胡忠<sup>1</sup>, 李远友<sup>2</sup>

(1. 汕头大学 理学院生物学系, 广东 汕头 515063; 2. 汕头大学 海洋生物研究所, 广东 汕头 515063; 3. 汕头大学 医学院第一附属医院, 广东 汕头 515041)

**摘要:** 血蓝蛋白是一种具有多种非特异性免疫学活性且可以产生免疫学活性降解片段的多功能蛋白。为了探索血蓝蛋白新的降解片段, 本研究以凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为研究对象, 采用比较蛋白质学技术分析对虾感染病原菌后血清蛋白质组的变化。结果发现, 对虾感染副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 12 h 后, 血清中新增一种 28.5 kD 的蛋白 (命名为 p28.5)。经 MALDI-TOF/MS 分析, 其与凡纳滨对虾血蓝蛋白 75 kD 亚基具有高度同源性。进一步研究显示, p28.5 蛋白不仅可与抗血蓝蛋白抗体发生特异性结合, 而且还与对虾抗感染能力呈正相关。由此推测, p28.5 蛋白应该是对虾感染病原菌后产生的一种 28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段, 其可能是血蓝蛋白发挥免疫学功能的一种新方式的产物。[中国水产科学, 2008, 15(3): 425-430]

**关键词:** 凡纳滨对虾; 28.5 kD; 血蓝蛋白; 降解新片段; 抗感染

**中图分类号:** Q71

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2008)03-0425-06

血蓝蛋白是一种存在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, 其主要生理功能与机体内的输氧有关。但近年来研究表明, 血蓝蛋白是一种多功能蛋白<sup>[1-2]</sup>, 其不仅与能量的贮存, 渗透压的维持以及蜕皮过程的调节有关, 而且还具有酚氧化物酶样活性、抗病毒活性和凝集活性等多种非特异性免疫学功能<sup>[3-7]</sup>。特别引起学术界重视的是, 其在免疫防御反应中还可降解产生多种具有抗菌活性的降解片段。Destoumieux-Garzon 等<sup>[8]</sup> 从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和细角滨对虾 (*Litopenaeus stylirostris*) 2 种虾血清中分离出 3 种源于血蓝蛋白 C 末端的抗菌肽。Lee 等在淡水小龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 中分离纯化出 1 种源于血蓝蛋白 C 末端的广谱性抗菌肽 astacidin 1<sup>[9]</sup>。因此, 积极寻找新的血蓝蛋白降解片段对阐明血蓝蛋白这一多功能蛋白的非特异性免疫学活性具有重要价值。本研究采用比较蛋白质学技术进一步探讨对虾感染病原菌后血清蛋白质组的变化, 以期找到新的血蓝蛋白降解片段, 为揭示血蓝蛋白降解机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料** 凡纳滨对虾购于汕头市蛇浦农贸市场, 体长约 10 cm。

**1.1.2 试剂** 兔抗凡纳滨对虾血蓝蛋白抗血清由厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室馈赠, 羊抗兔 IgG-HRP 购于 SINO-AMERICAN 公司, 三氟乙酸为日本东京化成工业株式会社产品, 乙腈为国产色谱纯, 碘乙酰胺为 Sigma 产品, 胰蛋白酶购自 Promega 公司。常规试剂购于上海 Sangon 生物工程有限公司, 质谱仪为 Reflex III MALDI-TOF (Bruker 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 对虾血清的制备** 按王雷等报道的方法进行<sup>[10]</sup>。用 1 mL 注射器直接从凡纳滨对虾心脏抽取血淋巴, 4 ℃ 冰箱过夜, 3 000 r/min 离心 20 min, 于 -20 ℃ 保存备用。

**1.2.2 副溶血弧菌悬液的制备** 采用章跃陵等报道的方法进行<sup>[11]</sup>。将副溶血弧菌接种、培养、离心、

收稿日期: 2007-08-01; 修订日期: 2007-11-06.

**基金项目:** 广东省自然科学基金项目 (06027212); 广东省科技计划项目 (2007B020701006); 汕头市科技计划项目 (2006-148); 国家自然科学基金资助项目 (30400258).

**作者简介:** 章跃陵 (1971-), 男, 博士, 副教授, 主要从事无脊椎动物功能蛋白质组学及分子免疫学研究. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

洗涤、计数并稀释为  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL 的菌悬液。

**1.2.3 对虾的人工感染** 将实验对虾分为对照组(A组)和实验组(B组)2组,分别取 0.1 mL 0.85% 的无菌生理盐水和 1.2.2 制备的菌悬液于对虾第 2 腹节处进行肌肉注射。于注射后 6 h、12 h、24 h 和 36 h 随机挑取 5 尾存活对虾,抽取其血淋巴按 1.2.1 分别制备单个对虾血清与混合对虾血清。为了便于分析,将实验组存活对虾和濒临死亡对虾(感染副溶血弧菌之后连续收集并按时间段统计分类)分别归为实验组 1(B<sub>1</sub>组)和实验组 2(B<sub>2</sub>组),并将不同时段获得的对虾血清依次命名为 B1/B2-6h, B1/B2-12h, B1/B2-24h 和 B1/B2-36h,与之对应,对照组对虾血清分别命名为 A-6h, A-12h, A-24h 和 A-36h,于 -20 °C 保存备用。

**1.2.4 SDS-PAGE 电泳** 用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 将 1.2.2 所制备的混合对虾血清按体积比 1:10 稀释,与 2×SDS 凝胶加样缓冲液等体积混合,100 °C 煮沸 5 min,采用 3% 浓缩胶、10% 分离胶按常规方法进行。

**1.2.5 MALDI-TOF/MS 分析** 采用章跃陵等报道的方法进行<sup>[12]</sup>。从 SDS-PAGE 凝胶上取 p28.5 蛋白条带,依次进行胶内蛋白酶解、肽指纹图谱分析和 MS-Fit 搜索引擎检索。

**1.2.6 Western-blotting 分析** 同 1.2.3 SDS-PAGE 电泳,按常规方法进行电转移和总蛋白显色,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,依次与兔抗血蓝蛋白 IgG 抗血清(1:400)和羊抗兔 IgG-HRP(1:1 000)室温孵育 2 h 和 1 h, DAB 显色,图像扫描和分析。

### 1.2.7 p28.5 蛋白与对虾抗感染能力相关性分析

同 1.2.4 分别进行 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 组单个对虾血清 SDS-PAGE 电泳,根据 p28.5 蛋白在电泳图谱上出现与否,计算 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 组以及 B<sub>2</sub> 组 12 h 前后濒临死亡对虾中 p28.5 蛋白出现的几率,以探讨 p28.5 蛋白与对虾抗感染能力的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 对虾感染副溶血弧菌后血清 SDS-PAGE 分析

如图 1 所示,与对照组相比,对虾感染副溶血弧菌后, B1-12h、B1-24h、B1-36h 以及 B2-24h、B2-36h 混合血清在 SDS-PAGE 电泳图谱上新增 1 条分子质量约 28.5 kD 的蛋白带(命名为 p28.5 蛋白),而 B1-6h 以及 B2-6h、B2-12h 无 p28.5 蛋白条带出现。实验中还发现, p28.5 蛋白条带的着色强度随着对虾

感染病原菌时间的延长而逐步加深,在 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 组中由弱到强的显色顺序分别为: B1-12h、B1-24h、B1-36h 和 B2-24h、B2-36h。由此提示, p28.5 蛋白应该为对虾感染副溶血弧菌后血清中的新增蛋白。

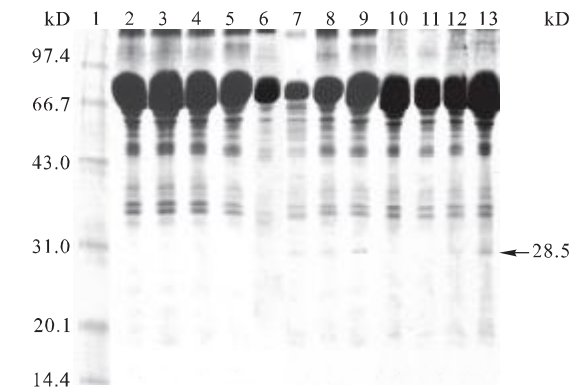


图 1 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后混合血清 SDS-PAGE 分析

1: 标准蛋白质; 2~5: 分别为 A-6h、A-12h、A-24h 和 A-36h 混合血清 SDS-PAGE 分析; 6~9: 分别为 B1-6h、B1-12h、B1-24h 和 B1-36h 混合血清 SDS-PAGE 分析; 10~13: 分别为 B2-6h、B2-12h、B2-24h 和 B2-36h 混合血清 SDS-PAGE 分析。

Fig.1 SDS-PAGE analysis of mixed shrimp sera obtained from *Litopenaeus vannamei* infected by *Vibrio parahaemolyticus*

1: Protein markers; 2~5: SDS-PAGE analysis of A-6h, A-12h, A-24h and A-36h mixed sera respectively; 6~9: SDS-PAGE analysis of B1-6h, B1-12h, B1-24h and B1-36h mixed sera respectively; 10~13: SDS-PAGE analysis of B2-6h, B2-12h, B2-24h and B2-36h mixed sera respectively

### 2.2 p28.5 蛋白 MALDI-TOF/MS 分析

为了进一步鉴定 p28.5 蛋白,取其蛋白条带进行 MALDI-TOF/MS 分析(图 2),结果发现, p28.5 蛋白与凡纳滨对虾血蓝蛋白前体(Hemocyanin precursor, Accession: 1085839)具有高度同源性,其肽指纹图谱匹配率达到 81% (查询结果见表 1)。但经 NCBI 数据库查询该蛋白序号已废止使用。采用 NCBI protein-protein BLAST 进一步分析,发现该蛋白与南美白对虾血蓝蛋白 75 kD 亚基(gi|854403)具有 100% 的一致性,故可以认为该蛋白实际上为凡纳滨对虾血蓝蛋白 75 kD 亚基。由此推断,凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后其血清中新增的 p28.5 蛋白与其血蓝蛋白 75 kD 亚基具有高度的同源性。

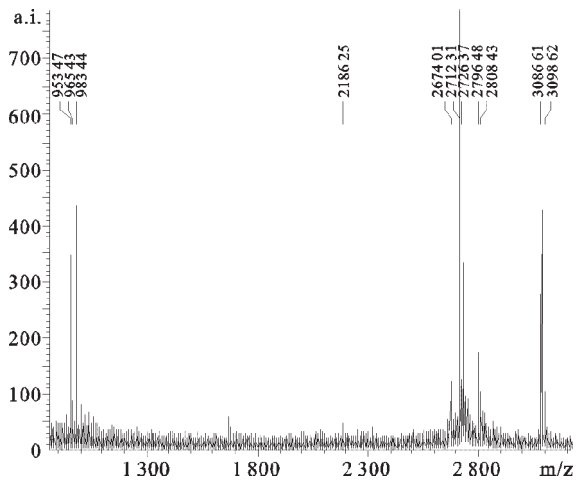


图2 p28.5 蛋白 MALDI-TOF/MS 分析肽质量指纹图谱

Fig.2 MALDI-TOF/MS peptide mass fingerprint (PMF) spectra of p28.5 protein

表1 p28.5 蛋白肽质量指纹图谱 MS-Fit 搜索引擎检索结果

Tab.1 Homologous search results of the PMF of p28.5 protein by MS-Fit search engine

| 检索蛋白<br>Searched<br>protein | 检索分值/%<br>Mowse score | 肽质量指纹图<br>谱匹配数/%<br>Masses matched | 蛋白分子量<br>/(D)/ 等电点<br>Protein<br>MW/(D)/pI |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| p28.5                       | 2.09                  | 9 (81)                             | 74981/5.3                                  |

| 蛋白序列号<br>Accession # | 物种<br>Species                    | 蛋白<br>Protein                  |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 1085839              | 南美白对虾<br><i>Penaeus vannamei</i> | 血蓝蛋白前体<br>Hemocyanin precursor |

2.3 p28.5 蛋白Western-blotting 分析

为了进一步证实 p28.5 蛋白与对虾血蓝蛋白 75 kD 亚基之间的关系,随机选取 A-12h 和 B1-12h 混合对虾血清进行 Western-blotting 分析。结果如图 3 所示,兔抗血蓝蛋白抗体除与 A-12h、B1-12h 血清中的分子量为 75 kD 和 77 kD 的 2 个血蓝蛋白亚基发生特异性的结合外,还分别可与 A-12h、B1-12h 血清中的 2、6 条带呈阳性,尤其是 B1-12h 混合对虾血清不仅其血蓝蛋白含量显著减少,而且在 28.5 kD 处出现 1 条明显的棕色条带。由此说明,凡纳滨对虾血蓝蛋白在受到病原菌感染后可产生多条降解片段,其中 p28.5 蛋白为主要降解片段。

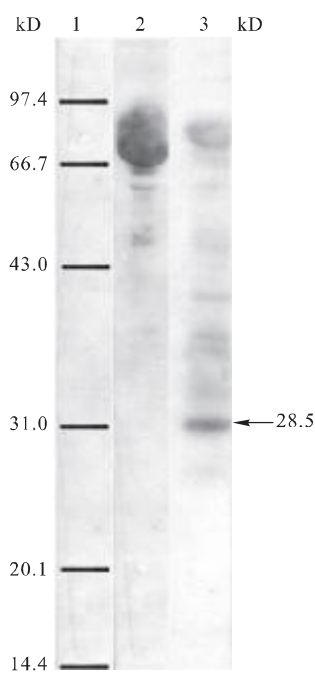


图3 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后部分混合血清 Western-blotting 分析

1: 标准蛋白质; 2~3: 分别为 A-12h 和 B1-12h 混合虾血清 Western-blotting 分析 (一抗和二抗分别为兔抗虾血蓝蛋白抗体和羊抗兔-IgG-HRP)

Fig.3 Western-blotting analysis of partially mixed shrimp sera obtained from *Litopenaeus vannamei* infected by *Vibrio parahaemolyticus*

1: Protein markers; 2~3: Western-blotting analysis of A-12h and B1-12h mixed sera respectively (first and second antibodies were rabbit anti-shrimp hemocyanin antibody and goat anti-rabbit IgG-HRP respectively)

2.4 28.5 kD血蓝蛋白降解新片段与对虾抗感染能力相关性分析

为了进一步分析所发现的 28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段 (即 p28.5 蛋白) 与对虾抗感染能力的相关性,分别对 B1、B2 组单个对虾血清进行 SDS-PAGE 电泳,结果如表 2 和图 4 所示, p28.5 蛋白在 A、B1 和 B2 组出现的几率分别为 0%、70% 和 42.8%, B2 组中 12 h 前后 p28.5 蛋白出现的几率分别为 25% 和 56.25%。由此说明,28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段在对虾血清中出现与否与对虾抗感染能力呈正相关。

表 2 p28.5 蛋白在 A、B1 和 B2 组中出现的几率  
Tab.2 Percentage of p28.5 protein presenting in groups of A, B1 and B2 respectively

| 组别<br>Group | 6 h |      |      | 12 h |      |     | 24 h |      |     | 36 h |      |      | 总计 Total |      |      |
|-------------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|----------|------|------|
|             | n   | ASP* | %**  | n    | ASP* | %** | n    | ASP* | %** | n    | ASP* | %**  | n        | ASP* | %**  |
| A           | 5   | 0    | 0    | 5    | 0    | 0   | 5    | 0    | 0   | 5    | 0    | 0    | 20       | 0    | 0    |
| B1          | 5   | 1    | 20   | 5    | 5    | 80  | 5    | 4    | 80  | 5    | 4    | 80   | 20       | 14   | 70.7 |
| B2          | 6   | 2    | 33.3 | 6    | 1    | 7.7 | 8    | 4    | 50  | 8    | 5    | 62.5 | 28       | 12   | 42.8 |

注：\* 指新增 p28.5 蛋白的对虾数量；\*\*指 p28.5 蛋白出现的几率。  
Note: \* means amount of shrimp presented p28.5 protein; \*\* means presented percentage of p28.5 protein.

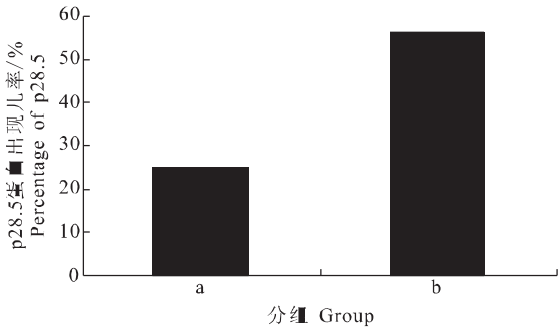


图 4 B2 组 12 小时前后濒临死亡对虾中 p28.5 蛋白出现的几率

a b: 分别为 B2 组 12 h 之内和 12 h 之后对虾中出现 p28.5 蛋白的几率。  
Fig.4 Comparative analysis of presented percentage of p28.5 protein in the group of B2 between within 12 h and after 12 h

a-b: Percentage of p28.5 protein presented in B2 group within 12 h and after 12 h respectively.

3 讨论

一般认为对虾属甲壳类无脊椎动物不具备特异性免疫系统,其免疫主要以天然免疫为主,故研究对虾的抗病防御因子受到海洋生物工作者的极大关注 [13-15]。近年来,功能基因组学技术的快速发展为发现新的对虾免疫防御分子及系统的研究对虾防御体系提供了重要的手段。Dhar 等采用 cDNA 微阵列技术发现白斑杆状病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 感染细角滨对虾后,其体内与免疫、结构等有关的多种基因表达水平发生了不同程度的变化 [16]。Wang 等 [17] 运用 cDNA 微阵列技术发现 WSSV 感染中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 后,一部分免疫相关基因如热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP70 and HSP90)、磷酸海藻糖合成酶 (trehalose-phosphate synthase, TPS) 等表达上升,而另一部分基因如 ATP 合成酶 A 链、精氨酸激酶等

表达下降。He 等 [18] 运用抑制性消减杂交技术在感染病原菌后的日本对虾体内发现了 25 种可能与急性应激反应 (acute phase response, APR) 相关的基因。本研究运用蛋白质组学技术路线,首次在感染副溶血弧菌后的凡纳滨对虾血清中发现了 1 种 28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段,并初步推测其与对虾抗感染能力呈正相关。由此可以认为,功能基因组学技术路线确实是一套快速发现与鉴定对虾新的免疫防御分子的行之有效的办法。

近年来研究证实,血蓝蛋白是一种具有多种非特异性免疫学活性且可以产生免疫活性降解片段的多功能蛋白 [8-9]。为了探索血蓝蛋白新的降解片段,通过比较分析凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后不同时间段的血清蛋白质组,发现对虾在感染副溶血弧菌 12 h 后其血清中新增一种 28.5 kD 蛋白 (图 1),经 MALDI-TOF/MS 分析和 Western-blotting 证实,该蛋白不仅与凡纳滨对虾血蓝蛋白 75 kD 亚基具有高度同源性 (图 2,表 1),而且还可与抗血蓝蛋白抗体发生特异性结合 (图 3)。由此推测,p28.5 蛋白应该是对虾感染病原菌后由血蓝蛋白 75 kD 亚基降解产生的一种新的降解片段。不过,与 Destoumieux-Garzon 等 [8] 和 Lee 等 [9] 所报道的血蓝蛋白降解片段相比,本研究所发现的是一种大片段的血蓝蛋白降解片段,二者差别较大,可能主要与种属差异及实验方法不同有关。

本研究通过分析 28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段在 A、B1 和 B2 组中出现的几率,以进一步探索所发现的 28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段与对虾抗感染能力大小的关系。结果发现,28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段在感染副溶血弧菌后存活对虾中出现的几率明显高于濒临死亡对虾中出现的几率。而在濒临死亡对虾中,12 h 之前死亡对虾中出现的几率显著低于 12 h 之后死亡对虾中出现的几率 (表 2、图 4)。由此推测,28.5 kD 血蓝蛋白降解新片段

在对虾血清中出现与否与对虾抗感染能力呈正相关。目前,大量研究证实,APR 是机体在受伤或感染状态下的一种普遍的保护性生理反应,在受到细菌、病毒等病原微生物感染以后,其可诱导表达新的与抗感染有关的急性应激反应蛋白 (acute phase protein, APP)<sup>[19-23]</sup>。Yoshiga 等<sup>[22]</sup>发现,2 种伊蚊 (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*) 受到细菌感染后可分泌一种抵御病原微生物的 66 kD 的 APP。Jiang 等<sup>[23]</sup>报道,烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 中存在一种能结合  $\beta$ -1,3-糖苷或磷壁酸的 APP ( $\beta$ -1,3-糖苷识别蛋白-2,  $\beta$ -GRP-2),其既可凝集真菌、细菌,还可激活酚氧化酶原激活系统。值得关注的是, Destoumieux-Garzon 等<sup>[8]</sup>、Lee 等<sup>[9]</sup>以及本研究均证实,对虾在受到病原菌感染后其血蓝蛋白可降解产生多种与抗感染有关的血蓝蛋白降解片段。提示这可能是无脊椎动物抵御病原微生物入侵的一种新的非特异性免疫学方式。至于其具体机制尚待进一步研究和探索。

#### 参考文献:

- [1] Paul R J, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates[J]. *Zoology*, 1998, 100: 319-327.
- [2] Adachi K, Wakamatsu K, Ito S, et al. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18 (3): 214-219.
- [3] Decker H, Ryan M, Jaenicke E, et al. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 17 796-17 799.
- [4] Adachi K, Hirata T, Nishioka T, et al. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme [J]. *Comp Biochem Physiol : Part B*, 2003, 134: 135-141.
- [5] Zhang X B, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from *Penaeus monodon* [J]. *Antiviral Res*, 2004, 61: 93-99.
- [6] 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]. *J Proteome Res*, 2006, 5: 815-821.
- [7] 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): 1 006-1 011.
- [8] Destoumieux-Garzon 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]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 47 070-47 077.
- [9] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 7 927-7 933.
- [10] 王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26 (1): 34-41.
- [11] 章跃陵, 王三英, 刘光明, 等. 南美白对虾血蓝蛋白对酚氧化酶活性的影响 [J]. *中国水产科学*, 2005, 4: 402-406.
- [12] Zhang Y L, Wang S Y, Peng X X. Identification of a type of human IgG-like protein in shrimp *Penaeus vannamei* by mass spectrometry [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 301: 39-54.
- [13] Bachère E. Shrimp immunity and disease control [J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 3-11.
- [14] 章跃陵, 王三英, 彭宣宪. 虾类免疫学的基础和应用研究 [J]. *海洋科学*, 2000, 24 (12): 26-29.
- [15] Westenberg M, Heinhuis B, Zuidema D, et al. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2005, 114 (1-2): 133-139.
- [16] Dhar A K, Dettori A, Roux M M, et al. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays [J]. *Arch Virol*, 2003, 148 (12): 2 381-2 396.
- [17] Wang B, Li F H, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA Microarray [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8 (5): 491-500.
- [18] He N H, Liu H P, Xu X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17 (2): 121-128.
- [19] Bas S, Gauthier B R, Spenato U, et al. CD14 is an acute-phase protein [J]. *J Immunol*, 2004, 172: 4 470-4 479.
- [20] Macdonald J, Tonry J, Hall R A, et al. NS1 protein secretion during the acute phase of west nile virus infection [J]. *J Virol*, 2005, 79: 13 924-13 933.
- [21] Cairoli F, Battocchio M, Veronesi M C, et al. Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase

- in the peripartum period [J]. Electrophoresis, 2006, 27 (8): 1 617-1 625.
- [22] Yoshiga T, Hernandez V P, Fallon A M, et al. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection [J]. PNAS, 1997, 94: 12 337-12 342.
- [23] Jiang H, Ma C, Lu Z Q, et al. Beta-1,3-glucan recognition protein-2 (betaGRP-2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds beta-1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34 (1): 89-100.

## A new fragment with 28.5 kD degraded from hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Yue-ling<sup>1,2</sup>, YE Xiang-qun<sup>3</sup>, CHEN Jie-hui<sup>1</sup>, HUANG Tong-wang<sup>1</sup>, HU Zhong<sup>1</sup>, LI Yuan-you<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China; 2. Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou 515063, China; 3. First Affiliated Hospital, Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China)

**Abstract:** It has been suggested that hemocyanin would be a multifunctional protein involved in immune process, producing some fragments with different immune activities in particular. To search some new fragments of hemocyanin, a comparative analysis was conducted among serum proteome of shrimp *Litopenaeus vannamei* during different periods after the shrimp was infected by the pathogen using comparative proteomics technologies. The results showed that a new protein with 28.5 kD (namely p28.5) was found in the *Litopenaeus vannamei* serum after it had been infected by *Vibrio parahaemolyticus* for 12 h. Then the p28.5 protein was subjected to MALDI-TOF mass spectrometry analysis, and the database searching results indicated that p28.5 protein showed high homology with *Litopenaeus vannamei* hemocyanin 75 kD subunit. Further evidence indicated that the p28.5 protein not only strongly reacted with anti-shrimp hemocyanin antibody specially, but also was related to anti-infection function of shrimp. These results lead to the deduction that the p28.5 protein is a new fragment with 28.5 kD degraded from hemocyanin, suggesting p28.5 protein as a new type of non-specific immune pattern of hemocyanin. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 425-430]

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; 28.5 kD; hemocyanin; new degraded fragment; anti-infection

Author's E-mail: [zhangyl@stu.edu.cn](mailto:zhangyl@stu.edu.cn)