

對蝦凝血與疾病的關係

(I) 各種類蝦凝血速度及重要血淋巴成分的比較

Relationship between Hemolymph-Coagulation and Disease in Shrimps

(I) Coagulation Rate *in vitro* and the Hemolymph Proteins of Various Shrimp Species

蔡蔭和·陳玉玲·呂佩融

Inn-Ho Tsai, Yuh-Ling Chen and Pei-Jung Lu

Abstract

1. The *in vitro* coagulation rates of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*, *Metapenaeus ensis*, and *Macrobrachium rosenbergii*) were compared under different anticoagulation conditions to assess the clotting capability of the species.
2. Methods were described for the analysis of thrombin-like protease and transglutaminase in the shrimp hemocytes, and of three protease inhibitors from the shrimp plasma.
3. It was demonstrated that the *in vitro* coagulation rate and level of the trypsin inhibitors in the hemolymph were correlated with the disease and trauma states of the shrimp in some cases.

緒論

蝦血液(或血淋巴)中含有血球及多樣蛋白質成份,可惜除了攜帶氧氣的 hemocyanin 較明瞭之外,其餘成分的功能及構造仍諸多未解明,有待生化及細胞學等基礎研究的推進。蝦血大致有以下特性:血球量特少(只佔體積的 0.5% 以下),hemocyanin 量特多(佔總蛋白質的 95%),血球易活化易溶裂,蝦血易凝集成不溶血塊。蝦血不似哺乳類的血及血球,也不便全沿習傳統的血液研究方法;大體言之,蝦血的成分除了攜帶氧氣及二氧化碳的功能,還有運輸、貯藏、調控及對付外物入侵、適應生理變化等作用。已知哺乳類及其他品種的體液因應發炎、受傷(trauma)、發燒、懷孕、疾病等各種生理、病理狀態,都有成分的變化,例如 acute-phase reactants;在上述狀態或肝病變時, α_1 -acid glycoprotein, fibrinogen, α_1 -protease inhibitor, C-reactive protein 等蛋白質的量在體液中大量增加(Heinrich, *et al.*, 1990)。在甲殼類也有類似某些高等動物的血液成份(Hergenhahn, *et al.*, 1987, Doolittle and Riley, 1990),雖然它們沒有 fibrinogen 及 immunoglobulin。本研究希望藉分析不同品種,或不同生理、病理狀況下蝦血的凝血速度,以及定量重要蝦血成分,以建立用蝦血診斷或追蹤蝦病變的方法,同時進一步研討蝦血成分的功能。

實驗材料與方法

一、生化試藥及酵素

EGTA, glycylglycyl ethyl ester (GGEE), dansyl-cadaverine casein, *p*-amino benzamidine, HgCl_2 , *N*-benzoyl-Arg *p*-nitroanilide, succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide, furylacryloyl Phe-Phe (FAPP), glucose, Tris 等購自 Sigma 公司, succinyl anhydride 購自 Pierce Co., 牛的 trypsin, chymotrypsin 及 carboxypeptidase 是購自 Worthington Co., 草蝦的 trypsin, chymotrypsin 及 carboxypeptidase 則由其 midgut 經 DEAE-ion exchange, gel-filtration 等加以純化 (Tsai and Liu, 1986; Lu *et al*, 1990; Lu and Tsai, 1991)。

二、蝦品種

草蝦 (*Penaeus monodon*)、紅尾蝦 (*P. penicillatus*)、斑節蝦 (*P. japonicus*)、砂蝦 (*Metapenaeus ensis*)，以及淡水長腳大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*)。

三、蝦血之抽取及凝血速度測定

蝦一般是當天自市場或養殖池取得，先養在 3.0% 鹽度之海水用 2.5 ml 或 3 ml sterile syringe 抽血，抽血前蝦子先以冰海水 (0°C) 冰昏 (約 45 秒至 1 分鐘)，以酒精棉輕拭其第一對與第二對泳足之間的腹部 (以消毒)，先置 1/10 抽血量的抗凝劑於針頭 (23G)，從其腹部消毒處抽血，小心避免抽入空氣或海水。抽出之血迅速置於冰的 siliconized microfuge tubes 中。

凝血時間的確定是將蝦血抽出後置於 1.5 ml microfuge 於室溫中，每隔 5 分鐘傾斜一次，直到傾倒 180° 仍呈凝集狀則視為凝血。超過 1 小時未凝者每隔 30 分鐘觀察一次，直至 6 個小時仍未凝者，則留置 24 小時再紀錄有無凝血。每種蝦子用不同抗凝劑各抽三隻，測其凝血時間，求得平均值，各組凝血時間差異均不超過一個觀察間隔時間。

四、蝦血球溶出液的製備 (hemocyte lysate)

抽自活蝦未凝之蝦血，在 1~5 分鐘內離心 3,000 rpm × 10 min at 2~4°C，將上層液倒於另一 tube，以抗凝 buffer (海水蝦用 Oyster Tris buffer；淡水蝦用 1/2 Oyster Tris-buffer) rinse 沉澱之 hemocyte 兩次。

每 1 ml 血量所得之蝦血球以 0.1 ml 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 使之 hypotonic lysed，在 <4°C 以下貯存及操作，用以分析 transglutaminase 與 thrombin-like enzyme 之活性。

五、Transglutaminase (轉胺酶) 的測定

採用文獻中用以定血漿凝集因子 XIII 的方法，此因子即此酶的複合體 (Lorand and Conrad, 1984)。所用的螢光基質及作用蛋白為 dansyl cadaverine 與 *N*-succinyl casein。

製 succinyl-casein 是用 succinyl anhydride 處理 casein，再將多餘 reagent 等以透析方式除去。此酵素催化其螢光之 dansyl cadaverine 聯接於 succinyl casein 的 Gln residue 造成 fluorescent blue shift 及 intensity 增強，其催化活性可用 RFE/t (relative fluorescence enhancement rate) 表示

$$\text{i.e.} \quad \frac{RFE}{t} = \frac{F_{(\text{sample})} - F_{(\text{blank})}}{F_{(\text{blank})} \cdot t}$$

用 hemocyte lysate 10 μl 來分析 transglutaminase, final total volume 0.7 ml，儀器利用 Hitachi Fluorospectrophotometer (model F4000)。

六、血球凝集蛋白酶的測定

我們發現蝦血球具有 thrombin-like 的絲胺酸蛋白酶，故用 1.43×10^{-5} M Benzoyl-Val-Pro-Arg-MCA 做為 substrate 在 700 μ l 5 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer 中測此 protease 活性（約加 30 μ l hemolysate），以 0.1 μ M AMC (ie. 水解之產物) 的 fluorescent emission 為 165 作校正值，initial rate 以 fluorescence change, $\Delta F/\text{min}$ 表示之，total assay volume 為 0.7 ml。

七、蝦血血漿中 protease inhibitors 的測定

我們發現蝦血中有豐富的 trypsin inhibitor, chymotrypsin inhibitor 與 carboxypeptidase A inhibitor，對於蝦中腸腺得到的三類 protease (3, 4, 5) 有 species-specificity，且前二者的 inhibition 是 competitive，大約 incubate 5 分鐘以後 inhibition 程度不再變化，如果用 0.7 ml total volume，少於 10 μ l 的蝦血即可測得三種 inhibitors，如欲省材料，可用更少的蝦血在 micro cuvettes 中分析，ie. 大約 550 μ l 或 170 μ l 容量的吸光槽，以下三抑制劑的測定所用條件為 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl pH 7.5 at 25°C。用的酵素均來自草蝦，哺乳類的蛋白酶不宜。

(1) Trypsin inhibitor assay:

將純化後之草蝦 trypsin 2 μ g 與血中 inhibitor incubate 10 分鐘加入 1×10^{-4} M L-BAPNA (total volume 0.7 ml) 於 spectrophotometer 410 nm 下測吸光增加之速度，使用儀器為 Hitachi spectrophotometer (Model U3200)。蝦血用量約 0.5~1 μ l per run。其活性 unit 之定義：能抑制 2 μ g 草蝦 trypsin 50% 活性之量為 1 unit。

(2) Chymotrypsin inhibitor assay:

將純化後之草蝦 chymotrypsin 以 2×10^{-8} M 濃度與蝦血中之 inhibitor incubate 10 分鐘後，加入 1×10^{-4} M Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, total volume 0.7 ml 於 spectrophotometer 410 nm 下測吸光增加。蝦血用量約為 5 μ l/run，其活性 unit 之定義：能抑制 2×10^{-8} M (0.7 ml) 之草蝦 chymotrypsin 50% 活性的 chymotrypsin inhibitor 之量為 1 unit。

(3) Carboxypeptidase A inhibitor assay:

將純化後之草蝦 carboxypeptidase A 經 potato carboxypeptidase inhibitor titrate 後以 5×10^{-9} M carboxypeptidase A 與蝦血 incubate 10 分鐘，加入 1×10^{-4} M FAPP (total volume 0.7 ml) 於 spectrophotometer 328 nm 下測吸光降低變化。原 OD (buffer+enzyme+substrate) 大約以 1.0~1.2 為宜，sample 加入後 $\text{OD} \leq 1.4$ ，(OD 下降 $\Delta E = 2,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。蝦血用量大約 10 μ l/run, unit 定義：能抑制 5×10^{-9} M (0.7 ml) 之草蝦 carboxypeptidase A 50% 活性的 carboxypeptidase A inhibitor 之量為 1 unit。

結果與討論

不同品種蝦類的凝血速度

蝦血凝得很快，除非使用無菌針筒及適當的抗凝劑。抗凝的原理乃基於動物凝血都需要有鈣離子，凝集因子或蛋白酶存在。經過一些初步實驗的篩選以及文獻的收集，我們所選用抗凝劑包括 EGTA (Ca^{2+} chelator), Gly-Gly ethyl esters (GGEE; transglutaminase pseudosubstrate), p-aminobenzamidine (protease inhibitor) 或 HgCl_2 (transglutaminase inactivator)。用 50 μ l 左右抗凝劑置於 2.5 ml 針，研究淡水蝦及不同海水蝦（草蝦、沙蝦、斑節蝦）的抽血條件，我們得到各種抗凝劑的使用對凝血時間的影響之初步結果，如表一所示。

表一 四種蝦凝血時間的比較 (二月的實驗結果)

各種海水蝦抽血之抗劑皆溶於改良的 Oyster Tris buffer (18 mM Tris-HCl, 0.55 M NaCl, 13 mM KCl, 1.67 mM D-Glucose pH 7.5)。而淡水蝦之抽血其抗凝劑則溶於 1/2 diluted Oyster Tris buffer, 因為測淡水蝦 plasma 的 conductivity 約為草 plasma 蝦的二分之一。

Anticoagulant	蝦 別			
	草 蝦	沙 蝦	斑 節 蝦	淡 水 蝦
5 mM EGTA	>24 h	6 h	40 min	>24 h
5 mM GGEE	24 h	15 min	25 min	5 min
0.5 mM <i>p</i> -Aminobenzamidine	>24 h	25 min	60 min	
10 μ M HgCl ₂	>24 h	2 h	40 min	>24 h

對草蝦而言, 此四類抗凝劑皆能有效防止凝血。一般而言, 蝦子若受驚嚇或掉落地上, 所抽的血皆較快凝。雖四類抗凝劑亦對他種蝦有效, 但凝血時間頗具品種差異。

斑節蝦在此四類蝦中最不易抽血, 因為斑節蝦血容易快速凝固, 所以抽斑節蝦血宜十分小心, 避免抽入空氣, 蝦血一與空氣接觸即會變較深色, 且凝集速變快, 另外斑節蝦較易凝血的原因, 可能其血球濃度較高 (草蝦 10 (冬)~18 (夏) $\times 10^6$ cell/ml; 斑節蝦 16 (冬)~6.7 (夏) $\times 10^6$ hemocyte/ml) 所致, 似乎生長及健康的狀態或生理對血球有影響, 且具季節性變化。表一並列入淡水長臂蝦凝血時間與抗凝劑的關係, 發現使用 EGTA 及 HgCl₂ 皆能有效抑制其血液凝固, 而用 GGEE 抽血時抗凝效果非常不好, 且在顯微鏡下觀察 GGEE 抽血所得的 hemocyte 發現明顯的不規則狀, 似乎血球已遭破壞。

抽血後海蝦血液用 Oyster Tris buffer 稀釋 20 倍, 而淡水蝦以 1/2 Oyster buffer 稀釋。在光學顯微鏡 (Olympus) 下放大 100 倍觀察, 並以 hemocytometer 計數血球數目, 計算濃度。於二月抽得草蝦與斑節蝦血發現斑節蝦的血球濃度較高, 但若在夏季 (八月) 再次比較幾種蝦的血球濃度得結果如下:

草 蝦	18 $\times 10^6$ hemocytes/ml
斑 節 蝦	6.1 $\times 10^6$ //
沙 蝦	4.7 $\times 10^6$ //
淡 水 長 臂 蝦	5.0 $\times 10^6$ //

因此蝦血球濃度似乎與蝦養殖的狀況有密切的關係, 以斑節蝦而言, 在冬季是其盛產季節, 蝦隻個體較大, 反之夏天所用斑節蝦個體較小, 所抽得血色較淡, 體色也較淡, 血球濃度較稀。此關聯性有待更多的研究, 才能確定血球數目與凝血快慢的關係。

凝集蛋白酶的研究及檢測

因 leupeptin 等能抗凝的事實引導我們探研蛋白水解酶在凝血的角色。蝦 hemolysate 中可測得 trypsin 或 thrombin-like protease, 發現此 protease 的 substrate specificity 很像 thrombin (表二) 所以我們用已知 thrombin 的研究方法, 比較蝦的血球凝集蛋白酶與 thrombin 的異同, 並進行其純化等生化實驗。螢光基質 MCA 的分析法參見 Kawabata 等 (1988)。

表二 自草蝦血球部分純化的凝集蛋白酶的基質特擇性

基	質	% 相對速率
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA		100
Boc-Asp(OBz)-Pro-Arg-MCA		80
Boc-Val-Pro-Arg-MCA		80
Cbz-Phe-Arg-MCA		24
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA		23
Tosyl-Gly-Pro-Arg-MCA		38

不同抗凝劑對血球酵素的收量影響

以各種抗凝劑對草蝦、斑節蝦、沙蝦及淡水長臂蝦抽血，所得血球溶出液 (hemolysate) 中 transglutaminase 及 thrombin-like protease 活性的結果如表三，要注意的是草蝦與斑節蝦之 thrombin-like protease 活性在 0°C 下仍 loss 很快 (24 hr 有 80% loss)。如果要確實比較此三種蝦子之 enzyme activity 可能必須配合 hemocyte counting 及蛋白質濃度測定才能有較客觀的數據，由於不易把血球所附著之 hemocyanin 等大量的蛋白質從 membrane 外洗淨，所以蛋白質定量變化很大。

表三 不同抗凝劑之使用對四類蝦血球內酵素的影響

酵 素 活 性 品 種	Transglutaminase (RFE/min)				Protease (ΔF /min)			
	草 蝦	斑 節	砂 蝦	淡水蝦	草 蝦	斑 節	砂 蝦	淡水蝦
抗 凝 劑								
5 mM EGTA	夏 6.0 冬 5.2	4.2 4.3	0.8 2.5	<0.05	夏 5.1 冬 0.6*	1.4 1.0*	0.2 0.4*	1.3
2 mM GGEE	夏 3.5 冬 3.1	4.2 4.4	0.2 1.7	<0.05	夏 3.2 冬 1.4	0.7 1.2	0.2 0.9	3.1
50 μ M HgCl ₂	夏 4.4 冬	3.6 4.8	0.6 2.5	<0.05	夏 6.2 冬 1.9	0.3 1.2	0.4 1.3	2.2

註 1.* Hemocyte lysis 時又加 1.5 mM EDTA in 10 mM Tris-HCl buffer。

註 2.表中酵素活性值皆是由三隻蝦子之 10 μ l 蝦血球酵素活性求其平均所得，且個體間差異不超過 30% (S. D. $\leq 30\% \bar{V}$)。

由表三可知：

- ①以 EGTA 抽血，三種蝦子的 thrombin-like protease 之活性皆較低，而以 HgCl₂ 抽血 protease activity 略高，但 HgCl₂ 濃度高時 (>50 μ M) 明顯抑制 transglutaminase 活性。
- ②以 GGEE 抽血，所得 protease 活性比 EGTA 抽血好，但在 hemocyte lysis 後加 EGTA 則 protease activity 仍然會減低，2 mM 及 5 mM GGEE 對蝦抽血其 protease 活性差不多，但 5 mM GGEE 抽血會使 transglutaminase activity 略低。
- ③草蝦的 thrombin-like protease activity 有時會異常的增高，尤其是飼養溫度較高時會有部份草蝦 protease activity 特別高 (比一般高 6~10 倍)，懷疑可能有少量 hepatopancrease 中之 trypsin contamination，或其他原因，值得追蹤研究。
- ④明顯可看出淡水長臂蝦 hemolysate 中之 transglutaminase 特別低而從表一知以 GGEE 為抗凝劑所抽得的淡水蝦血，凝得很快，GGEE 是 transglutaminase 的抑制劑，可能淡水蝦的凝血

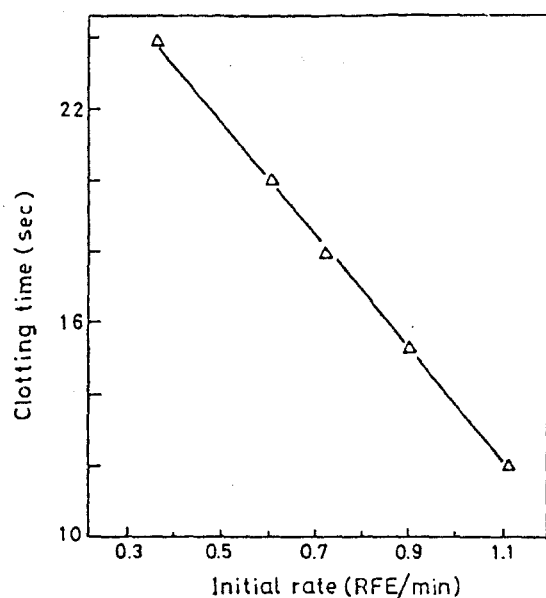


Fig. 1. Correlation between clot-forming and amine-incorporating activities of the shrimp hemocyte transglutaminase. Five enzyme doses (20, 25, 30, 40, 50 μ l (0.077 mg/ml)) were used. Initial rate was determined from the fluorescence assay as described in "Experimental Methods". Clotting time was measured with 60 μ l plasma, 50 μ l enzyme solution (transglutaminase and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) and 5.4 μ l 1 M CaCl_2 .

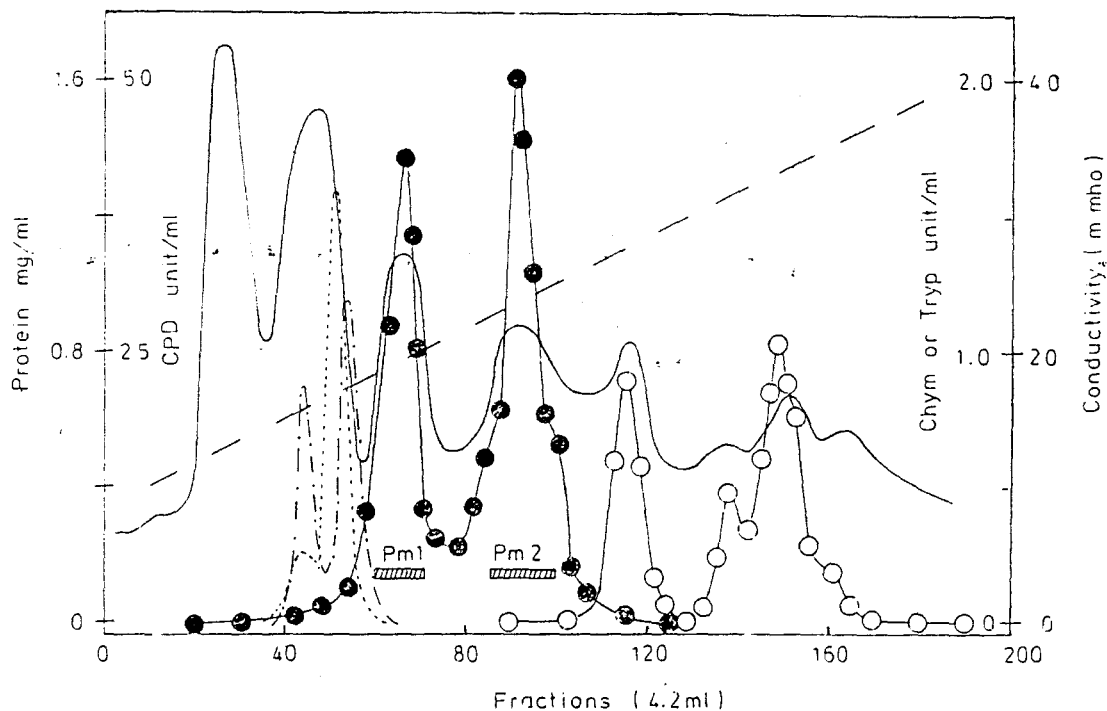


Fig. 2. DEAE-cellulose chromatography of digestive extracts from *Penaeus monodon*. Protein assay by Bradford method (—); chymotrypsin or chym. activity (●—●); trypsin or tryp. activity (○—○); CPD or carboxypeptidase A (-----) and B (----); conductivity (— —).

過程中與其他三種海水蝦不同，transglutaminase 對淡水蝦的凝血反應似乎較不重要。而草蝦的 transglutaminase 活性與試管中凝血速度成正比，見 Fig. 1。但必須注意血球溶離可造成此酶收量低。

蝦血漿中蛋白酶抑制劑之測定

由不同抗凝劑所得的血漿都有豐富的 anti-trypsin 及 anti-chymotrypsin，以及可測出的 anti-carboxypeptidase；這些抑制劑的定量需使用蝦的中腸腺 (midgut 或 hepatopancreas) 純化得到的蛋白酶。這些蛋白酶我們已經過離子交換樹脂 (Fig. 2) 以及其他種 chromatography 得

表四 不同抗凝劑用於抽血對於四類蝦血漿中蛋白酶抑制素的影響

酵素活性皆取自三隻蝦血漿酵素活性之平均值，且個體間差異不超過 20% (S. D. $\leq 20\%$)。

Anticoagulant	Trypsin inhibitor (μg Trypsin/ μl)				Chymotrypsin inhibitor (μg Chymotrypsin/ μl)			
	草 蝦	斑 節	砂 蝦	淡水蝦	草 蝦	斑 節	砂 蝦	淡水蝦
5 mM EGTA	12.0	6.4	3.8	9.9	3.0	1.7	1.7	0.7
2 mM GGEE	10.3	8.0	5.4	8.2	2.7	2.0	1.8	0.8
50 μM HgCl ₂	13.2	13.4	7.8	10.7	3.5	2.5	2.4	1.0

表五 不同蝦種蝦血中 Protease inhibitor 濃度的比較

Sample (hemolymph)				蛋 白 比 濃 度 (μg enzyme inhibited/mg hemolymph protein)		
				T ₁	Pm2	CPD A
草 蝦	漁	1*		26	0.95	0.033
		2*		24	0.46	0.017
		3*		15	0.40	0.027
		4*		28	0.57	0.012
	南	1**		37	ND	0.027
		2**		52	ND	0.044
		3**		41	ND	0.031
斑 節 蝦	正 常			27	1.7	0.018
	白肉病			51	0.6	0.076
	長不大			41	0.6	0.069
紅 尾 蝦	♀	1***		9.6	ND	0.043
		2***		17	ND	0.031

T₁, Pm2 與 CPD A 分別為 trypsin, chymotrypsin 和 carboxypeptidase A (見 Fig. 2)。

*: 漁 1 組為正常蝦=control, 漁 2, 3 組: 分別經已失活性之弧菌口服與浸泡處理, 漁 4 組為口服與浸泡共同處理。

** : 南 1~3 組: 為臺南水試所不同蝦池中之病蝦。

斑節蝦為宜蘭家畜疾病防治所提供。

各組之數據均為 3~5 隻蝦 hemolymph 的平均值 (S. D. $\leq 30\%$)。

***: ♀ 1 及 ♀ 2 均為生殖季節之成熟母蝦 (體長 18~20 cm)。

ND: not determined.

到相當純化的酵素，哺乳類的蛋白酶雖容易買到純的，但不容易被蝦血抑制，故不採用。表四列出三種抗凝劑用來抽血，所得之血漿的蛋白酶抑制劑，並沒有很大之差別。

不同品種不同病理狀態蝦血蛋白酶抑制劑的含量

表五列出一些初步定量蛋白酶抑制劑的結果。此結果顯示各品種的蝦都有類似的蛋白酶抑制劑含量，紅尾蝦所用的材料特別大隻，其蛋白質含量特別高，所以雖 trypsin inhibitor 在單位體積的濃度實高於或近於草蝦者，但其比濃度值反而稍低（表五）。較有意義的是染病或不正常的蝦血往往有較高的 trypsin inhibitor 濃度（見南 1, 2, 3 比漁 1，及斑節蝦的結果）。而 chymotrypsin inhibitor 濃度却反而因感染或病變而降低，其關聯仍有待進一步或更多種採樣加以證實。很有趣的是，我們注意到斑節蝦的白肉病（或稱熟肉症）的蝦血不凝，以及剪或燒斷眼柄（一種 trauma）的蝦血中 trypsin inhibitor 大為增高，持續數日後才恢復，所以我們繼續這些方向的研究，以確定其間因果關係。

摘 要

本研究著重於發掘蝦血中重要蛋白質的功能及與蝦病之可能關聯，本年度的結果主要有三方面：(1)運用不同的抽血條件或抗凝劑比較四、五種養殖蝦凝集的速度，由試管中的凝血速率看來，斑節蝦及砂蝦比草蝦凝血功能強。(2)建立分析蝦血血球中兩種酵素：轉氨酶（類似凝血因子XIII的a單元）與凝集蛋白酶（Thrombin-like）的方法。並能用少量蝦血血漿分析定量其中的三種蛋白酶抑制劑。(3)採取不同病狀的蝦血材料及不同品種比較發現某些病蝦的血漿 anti-trypsin 有異常升高的現象，而白肉症的斑節蝦凝血功能障礙。各品種均有類似的血漿蛋白酶抑制劑。

致 謝

本研究獲農委會經費補助（79 農建 7.1-漁 21(3)）特此致謝。在病蝦採樣方面，獲宜蘭縣家畜疾病防治所羅浴沂所長、臺大動物系宋延齡博士以及臺南水試所同仁的指導與諸多協助，謹向他們致由衷謝忱。

參 考 文 獻

- Carrell, B. W. and Boswell, D. R. (1986) "Serpins" in Chapter 12, "Protease Inhibitors." (Barrett & Salvesen eds.) Elsevier Sci.
- Doolittle R. F. and Riley M. (1990) "The amino-terminal sequence of lobster fibrinogen reveals common ancestry with vitellogenins." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 16-19.
- Heinrich, P. C., Castsll, J. V., Andus, T. (1990) "Interleukin-6 and the acute phase response." *Biochem. J.* 265: 621-636.
- Hergenbahn, H. G., Aspan, A. and Soderhall, K. (1987) "Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma." *Biochem. J. (London)* 248: 223-228.
- Kawabata, S. I., Miura, T., Morita, T., Kato, S., Fujikawa, K., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S. (1988) "Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin." *Eur. J. Biochem.* 172: 17-25.

- Lorand, L. and Conrad, S. M. (1984) "Transglutaminases." *Mol. Cell. Biochem.* 58: 9-35.
- Lu, P. J., Liu, H. C. and Tsai, I. H. (1990) "The midgut trypsin of shrimp (*Penaeus monodon*): high efficiency toward native protein-substrates including collagens." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 371: 851-859.
- Lu, P. J. and Tsai I. H. (1990) "Carboxypeptidases A and B from the Penaeid shrimps." (in preparation)
- Tsai, I. H. and Liu, H. C. (1986) "Purification and characterization of chymotrypsins from the digestive glands of penaeid shrimps." In: *Contemporary Themes in Biochemistry*, ICSU Short Reports (eds. O. L. Kon, *et al.*) 72-73.
- Tsai, I. H. and Kao, L. R. (1988) "Hemolymph clotting system and its transglutaminase of shrimp (*Penaeus monodon*).¹" *The Symposium on Application of Biotechnology in Aquaculture and Agriculture*, Jan., 12-13, 1988, Taichung, Taiwan.
- Kao, L. R. (1987) Master Thesis, Nat'l Taiwan Univ.