

對蝦凝血與疾病的關係

(II) 對蝦凝集蛋白質的純化分析及濃度調節

陳玉玲¹ 黃肅惠¹ 鄭金華² 蔡蔭和¹

¹ 中央研究院生物化學研究所

² 臺灣省水產試驗所(東港分所)

我們從斑節蝦抽血漿，並利用陰離子交換樹脂及分子過濾篩等色層分析管柱來純化凝集蛋白。此分子由 19 及 18 萬分子量的醣蛋白質單元所組成，血中以兩個或偶數個單元結合型式存在。其氮端的氨基酸序列用自動定序儀解出，顯示其構造將近 80% 似草蝦或龍蝦的凝集蛋白。將草蝦凝集蛋白的抗血清用火箭免疫電泳法來定量分析對蝦的血漿中凝集蛋白，我們發現夏秋，脫殼前以及抽血或剪尾或剪眼柄傷害後其凝集蛋白濃度增加。

前 言

甲殼類的血球因品種不同其大小性狀均有差異，大致說來對蝦血淋巴含有 hyaline 與 granule cells 兩型，各有不同的細胞組織與化學反應與功能；前者與凝集有關，後者可噬菌作用與清除外物 (Hose, *et al.* 1990)。顯然，granule cells 包圍異物與噬菌與抗病有直接關聯，而 hyaline cells 造成的血液凝集與疾病的關係吾人所知極少，是否與慢性的病變有關，有待進一步研究。甲殼類的血凝集大致有三種類型 (Tait, 1911)：一以血球凝集為主，不呈現血漿凝塊，例如蟹類的；另一有血球凝集之後伴隨局部有限的凝塊，例如緬因龍蝦，再一種如太平洋龍蝦及多種對蝦，有血球 (hyaline cell) 快速破裂造成快速凝血成不溶血塊 (Durliat 1985; Martin *et al.* 1991)。

蝦類血漿中的凝集蛋白不同於哺乳類的 fibrinogen (Doolittle and Fuller, 1972; Fuller and Doolittle, 1971)，近來龍蝦的凝集蛋白的構造亦有初步報告 (Doolittle and Riley, 1990)，我們曾從蝦血漿純化凝集蛋白，亦從草蝦血球中純化研究其凝集酵素 (transglutaminase) (Tsai *et al.* 1991)，本研究的目的是在進一步純化斑節蝦凝集蛋白，分析其構造與草蝦、龍蝦的凝集蛋白構造相比較，並建立免疫化學定量方法，以做為瞭解凝集蛋白在蝦體之分佈、其功能與調節，及其進化的研究基礎。

材料與方法

抗凝劑及蝦血的抽取

採血抗凝劑是 EGTA-Oyster butter (50 mM, EGTA, 18 mM Tris-HCl, 0.55 M NaCl, 13 mM KCl, 1.67 mM D-glucose, pH 7.5)。蝦子是當天自市場或養殖池取得，先養在 3.0% 鹽度之海水中，用 3 ml 的無菌針筒抽血，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或第二對泳足之間的腹部以消毒，先置 1/10 抽水量的抗凝劑於針頭 (23 G)，從其消毒處抽血，小心避免抽入空氣或海水，抽出之血迅置於冰的塑膠離心管中。

蝦血球溶出液的製備

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，將上層液倒於另一離心管，以抗凝 buffer (Oyster Tris buffer) 洗沉澱之血球兩次，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 $<4^{\circ}\text{C}$ 以下貯存。

蝦血蛋白濃度與凝集蛋白的分析

1. 蝦血漿蛋白質濃度的定量是採用色素吸附呈色的方法 (Bradford, 1976) 以 Protein Assay dye reagent (Bio-Rad) 來測定總蛋白質濃度。凝集蛋白則另可以下兩方法測定。

2. 將層析管柱分離所得之分劃以 TE buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 稀釋至波長 280 nm 吸光值為 1, 取 0.1 ml 置於 1.5 ml 離心管中, 加入 $10\ \mu\text{l}$ 蝦血球溶出液及 40 mM CaCl_2 , 放置室溫每隔 1 分鐘觀察一次, 凝集蛋白在此濃度下皆可約一分鐘內凝集不能流動。

3. 將 Sepharose CL-6B 分離所得之分劃取 0.1 ml 如上法使凝集蛋白凝集, 約五分鐘後以 50 mM EDTA 終止反應, 並加入 $20\ \mu\text{l}$ 電泳溶離液 (5×Concentrated; 0.3 M Tris-HCl, 50% glycerol, 5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.0025% bromophenol blue, pH 6.8) 於沸水中加熱三分鐘後離心 (12,000 rpm, 一分鐘), 取上清液以 SDS-PAGE 電泳及染色觀察凝集後分子量增加情形。

凝集蛋白的純化

蝦血抽出後立即在 4°C 離心 (3,000 rpm, 10 分鐘) 將血球與血漿分開。血漿可立即作為純化凝集蛋白之用或貯存於 -40°C 至 -20°C 備用。取血漿 15 ml 對 3 公升 TE buffer, 透析 10 小時以上; 將此通過陰離子交換樹脂層析管柱 (TSK DEAE-650 column, $2\times 9\ \text{cm}$), 先以 30 ml TE buffer 洗過, 再以 0–0.4 N NaCl (in TE buffer, 200 ml: 200 ml) 流梯度, 每小時 18 ml, 收集各分劃測 280 nm 吸光值, 並作凝集測定。

DEAE-650 所得具凝集作用的分劃經冷凍乾燥, 再溶於 2 ml 水, 接著通過膠體過濾管柱 (Sepharose CL-6B, $1.5\times 100\ \text{cm}$) 以 TE buffer 流析, 流速為每小時 16 ml。收集各分劃測 280 nm 吸光值並作凝集測定。同一支管柱也分離標準蛋白質以作為分子量校正依據。

CL-6B 所得具凝集作用的分劃經冷凍乾燥再溶於 1 ml 水, 再以高效率液相層析儀用 Zorbax GF-450 column (Du Pont 公司出品) 進一步純化凝集蛋白。以 0.2 N 醋酸胺 pH 8.0 流析, 收集所得的凝集蛋白以離心抽真空法抽乾後進行氮端序列的定序及胺基酸組成分析。

電泳

SDS 膠片電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 是使用 Neville buffer system (Neville, 1971), 在 5% polyacrylamide gel 進行電泳分析。而 SDS-polyacrylamide-agarose gel electrophoresis 則是以 3.5% acrylamide 及 0.5% agarose 在 Neville buffer system 作電泳分析。

凝集蛋白抗血清的製備

將純化所得的凝集蛋白先跑 5% SDS- 電泳, 將凝集蛋白的 band (190 KDa 左右) 小心切下, 收集約 200 μg 之凝集蛋白, 切碎後加入 1 ml PBS (Phosphate buffer saline) 及 1 ml Adjuvant 徹底混合使之乳化, 皮下注射在 1.5 公斤重的紐西蘭白兔背部, 同樣方法每隔三週追加注射 100 μg 之凝集蛋白, 第一次追加注射後 10 天採兔血 5 ml 取血清以 Ouchterlony double immunodiffusion 測試抗凝集蛋白抗血清之 titer, 第二次後每次追加注射後第十天抽血 20~40 ml 取得血清以備用。

Rocket 免疫電泳分析是參考 Laurell (1966) 所提之方法, 使用 0.85% agarose in 18 mM barbitate buffer (pH 8.6) 含 1/30 體積之 antiserum (western blotting titer 1/1000) 在 Gel-fix (德國 Serva 公司出品) 膠片上作成 0.2 cm 厚度的 gel, 將之浸在 50 mM barbitate buffer (pH 8.0) 中 100 mV 電泳 3 小時 (或 50 mV overnight), 以 0.5% Coomassie blue

R-250 染色，同時以純化所得的凝集蛋白 $1\sim 15\ \mu\text{g}$ 為定量標準，作成標準曲線圖，測量各樣材在泳膠上「火箭」的高度，利用內插法定量。

結果與討論

凝集蛋白的純化

斑節蝦的血淋巴透析後用 TSK DEAE-650 層析管柱來純化 (Fig. 1)；我們發現可以被血球溶出液所凝集的主要在第 62~79 分割管。用 5% SDS-PAGE 分析各管時發現在第 60 管之前流出來的主要為 hemocyanin，而第 62~79 管主要含分子量 18 萬及 19 萬的蛋白質，而且有更大的蛋白質留在 Stacking gel 上未跑入 separating gel。續將第 62~79 管以 Sepharose CL-6B gel filtration 純化，結果如 Fig. 2。由標準分子量蛋白質以此管柱分離所得分子量校正曲線所做內插法我們算出斑節蝦凝集蛋白 (在 Sepharose CL-6B 管柱中的第 27~33 分割流析出來) 的分子量約為數十萬至百萬 (Fig. 3)。我們利用更高解析度的 HPLC (GF 450, Du pond Co.) 試圖更純化由 Sepharose CL-6B 得到的凝集蛋白 (Fig. 4)，並不成功，但也可推論其分子量大約是數十萬至百萬。凝集試驗 (參見「方法」) 顯示此分割加入血球溶出液及 5 mM 鈣離子後五分鐘可凝集。我們又以 3.5% acrylamide-0.5% agarose SDS-electrophoresis 分析凝集前後的產物，結果如 Fig. 5B, lane M 為 Marker 是 myosin (其分子量是 205 KDa) 而 lane 1 是未凝集前蛋白質在 gel 上呈現梯狀分佈，最小是 180 KDa 及 190 KDa，這些梯狀分佈的蛋白質分子量像是 180 KDa 及 190 KDa 二蛋白質 (Fig. 5A) 所形成的 dimers 或 oligomers，而 Fig. 5B lane 2 是凝後上清液，其階梯狀分佈的蛋白質完全消失，可見 lane 1 大小呈梯狀分佈的蛋白質為凝集蛋白。抽血過程可能造成部分凝集，或原來就有一些高倍凝集型態 (如四偶或八偶體) 存在蝦的血漿中，鑑於斑節蝦血球極易受激釋出凝集酵素又比別的品種 (如草蝦) 更迅速凝血的事實，抽血過程確可能增加高分子量的分子。Fig. 5A 亦顯示斑節蝦凝集蛋白 subunit 分子量亦比草蝦者稍大，而且 19 萬分子量的比 18 萬的含量多。

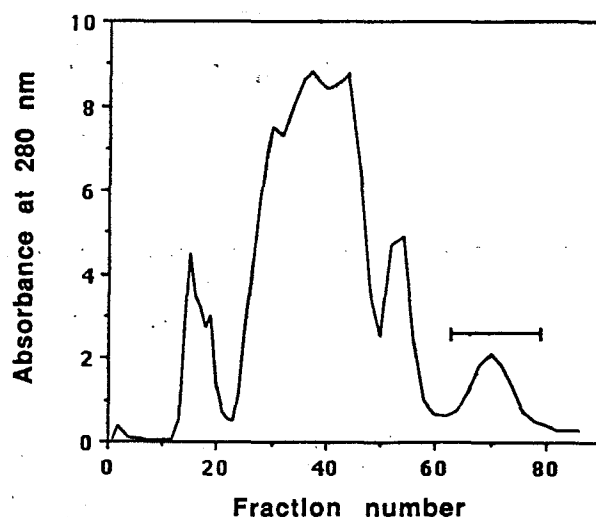


Fig. 1. TSK DEAE-650(s) ion exchange chromatography of *P. japonicus* plasma. Initial buffer was 1 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and a gradient of 0-0.4 M NaCl in the same buffer (200 ml: 200 ml) followed; flow rate was 18 ml/hr and fractions of 4 ml were collected at 4°C. Fractions 62-79 contained the clottable proteins.

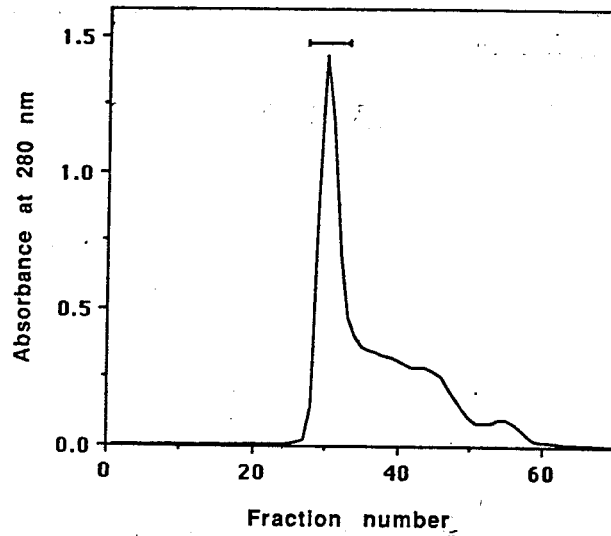


Fig. 2. Gel filtration of the *P. japonicus* clottable proteins from Fig. 1 on Sepharose CL-6B column. Elution buffer was 1 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), flow rate was 16 ml/hr, fractions of 2.2 ml were collected at 4°C. Fractions 27-33 were the clottable protein.

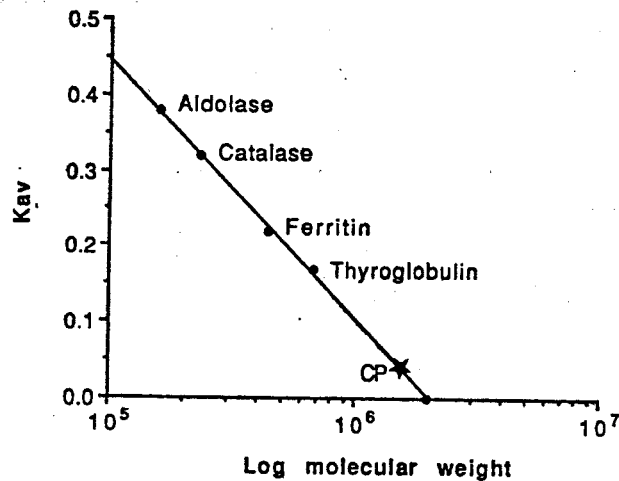


Fig. 3. Determination of the native molecular weight of the shrimp clottable protein (CP) with gel-filtration column (Sepharose CL-6B) which is precalibrated with four marker proteins.

凝集蛋白的化學結構

斑節蝦凝集蛋白雖在電泳分析上呈現多個不同分子量的 bands，在 GF-450 column 上却無法分開，其 HPLC 回收後以自動定序儀 (protein sequencer model model 477 A, Applied Biogystems, CA, USA) 作 N 端序列，結果顯示這些不同分子量的分子只出現單一種 N 端序列，其前 15 個氨基酸為 LQPGLEYQYDYDAXV，因此更能推測這些分子皆是由相似或同一單元 (monomer) 形成不同大小的 oligomers。若將斑節蝦的與草蝦 (本實驗室) 及龍蝦 (Doolittle & Riley, 1990) 的凝集蛋白之 N 端序列作一比對，發現其相似性分別為 79% 及 75%。我們也以凝集蛋白分子量最小的部分所得的抗體作 western blotting 發現這些 oligomer 也皆能與此抗體作用。

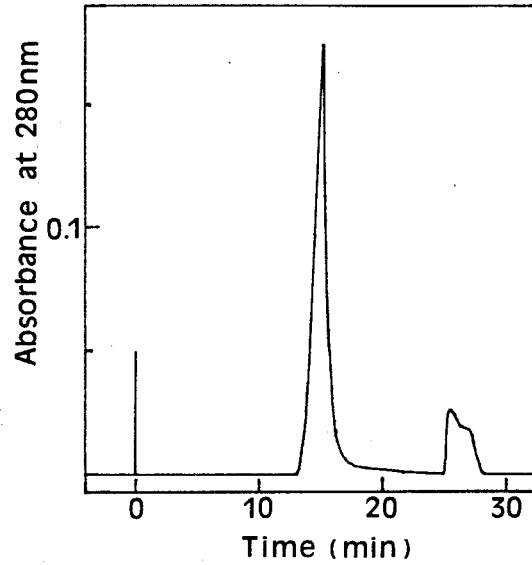


Fig. 4. HPLC gel-filtration chromatography of *P. japonicus* CP on a Zobak GF-450 column. Buffer used was 0.2 N ammonium acetate (pH 6.8) at room temperature, flow rate was 1 ml/min.

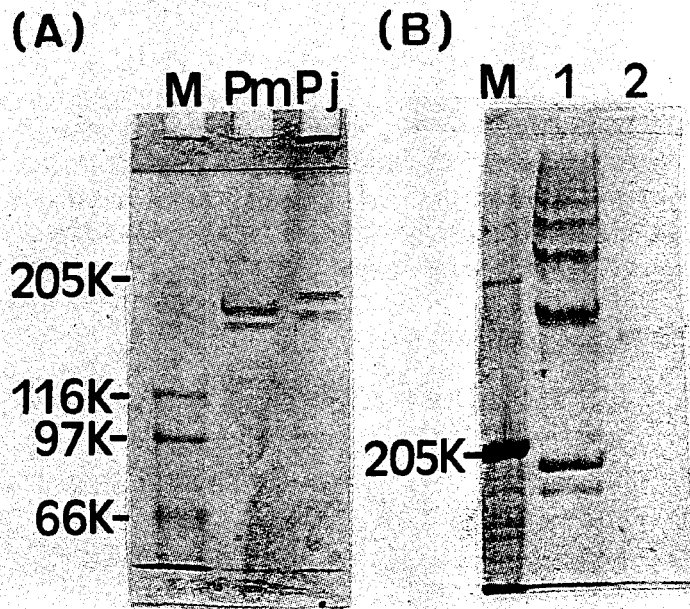


Fig. 5. (A) SDS-PAGE of the shrimp plasma clottable proteins. Stacking and running gels were 4.5% and 5% polyacrylamide, respectively. Pm and Pj denote the purified clottable proteins from *P. monodon* and *P. japonicus*. Markers (lane M) were: bovine serum albumin (66 kDa), phosphorylase B (97 kDa), β -galactosidase (116 kDa), myosin (205 kDa). (B) Electrophoretic analysis of the *P. japonicus* clottable protein before and after adding the hemocyte lysate cross-linking enzyme. A SDS-polyacrylamide/agarose gel was used, lane M, myosin; lane 1, clottable protein before adding hemocyte lysate; lane 2, the supernatant of the clotted sample.

凝集蛋白的免疫化學分析

我們也純化得到草蝦血凝集蛋白，進而製備來自兔子對抗凝集蛋白的複株抗體血清。本試驗選擇幾種甲殼類包括斑節蝦、沙蝦、淡水長臂蝦、螯蝦、龍蝦、蟬 (*Scylla serrata*) 及花蟹 (*Portuna sanguinolentus*) 等，將這些甲殼類的血漿與草蝦凝集蛋白抗體以 Ouchterlony double immunodiffusion 方法分析，由沉澱結果 (Fig. 6) 顯示草蝦及斑節蝦血漿皆與草蝦凝集蛋白抗體有免疫沉澱產生，而沙蝦的血漿也可與之沉澱，但沉澱線不明顯，草蝦與斑節蝦的沉澱線之間插出 (Spur) 看來，草蝦與斑節蝦具有的 epitopes 不完全相同。其他非蝦之甲殼類不能與草蝦凝集蛋白的抗血清發生沉澱。

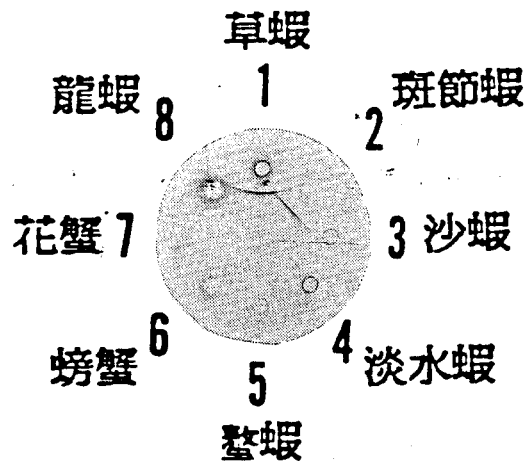


Fig. 6. Double immunodiffusion test of the clottable proteins (CP) from different species of crustacean. Central well, the antiserum against *P. monodon* CP; wells 1-4 were the plasma from shrimps *P. monodon*, *P. japonicus*, *Metapenaeus ensis* and *Macrobrachium rosenbergii*, wells 5-8 were those from crayfish (*Procambarus clarki*), mud crab (*Scylla serrata*), crab (*Portuna sanguinolentus*), and spiny lobster (*Homarus*), respectively.

凝集蛋白濃度受生理或外界因素的影響

為研究凝集蛋白如何調適，我們先分析各種情況如不同季節（氣溫）、性別，或脫殼前後之蝦血，以瞭解凝集蛋白量之生理變化。以 Rocket immunoelectrophoresis 的方法來定量血漿中的凝集蛋白，可以準確定量凝集蛋白的範圍在 $0\sim 12\ \mu\text{g}$ （即 0.1 至 $1.5\ \mu\text{l}$ 血為宜）。此研究指出夏季比冬季蝦血 CP 含量高，可因降溫而濃度下降。不同性別的蝦血含量差不多 ($5\sim 7\ \text{mg/ml}$)。脫殼前凝集蛋白會增加達兩倍，而脫殼後又慢慢回到正常的量，由此結果我們認為血中凝集蛋白的量與脫殼週期有密切的相關性。

由於蝦隻個體間凝集蛋白的量差異大，因此我們採取個別草蝦連續一週抽血來追蹤觀察。經剪眼柄、剪尾扇等處理後測定單隻草蝦血中凝集蛋白的變化，結果如 Fig. 8。實驗結果發現無論有無剪眼柄或尾扇，草蝦經連續抽血，血漿總蛋白質濃度逐日減低 ($130\ \text{mg/ml}$ 降至 $80\ \text{mg/ml}$)，而以剪雙眼柄之蝦血蛋白質濃度下降最為明顯，例如未剪眼柄或尾者第七天是第一天天血總蛋白濃度之 $1/2$ ，而剪雙眼柄者第七天之血蛋白濃度為第一天之 $1/3$ 。但是這些實驗蝦血中凝集蛋白的濃度却漸增加，尤其是未經剪尾剪柄的正常蝦因逐日抽血少量而其凝集蛋白濃度提高至 $4\sim 5$ 倍（約由 $3\ \text{mg/ml}$ 漸增為 $14\ \text{mg/ml}$ ），但剪尾或眼柄的受傷蝦子增加濃度較緩，在抽血第六天即有濃度持平甚而下降之趨勢，尤其剪

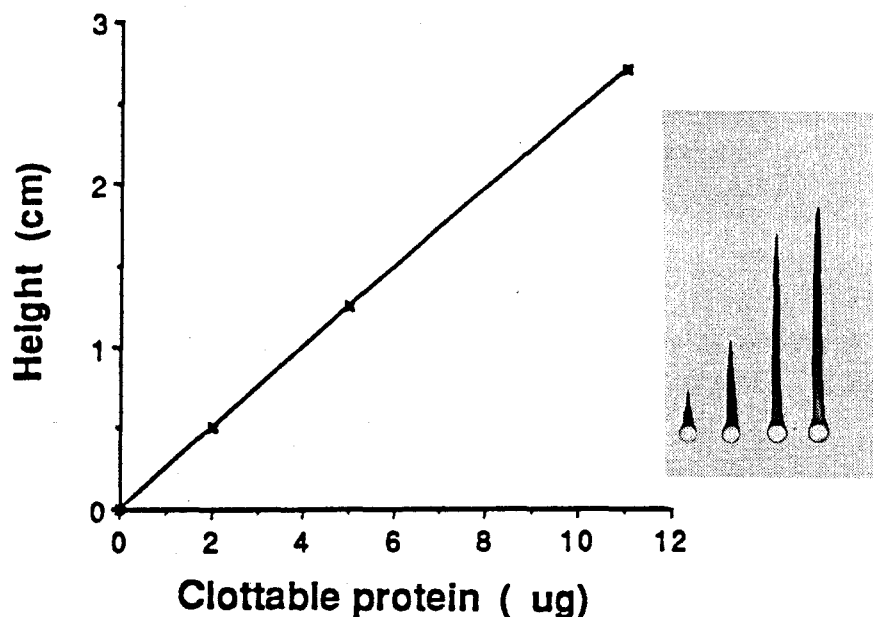


Fig. 7. (Right): rocket immunoelectrophoresis of the shrimp clottable proteins. The gel contained anti-CP antiserum (150 μ l in 5 ml 0.85% agarose), 2 μ g, 5 μ g, 11 μ g, 15 μ g of *P. monodon* CP in 5 μ l were loaded in the wells before electrophoresis. Electrophoretic peak heights were plotted against amount of CP applied after staining and washing (Left).

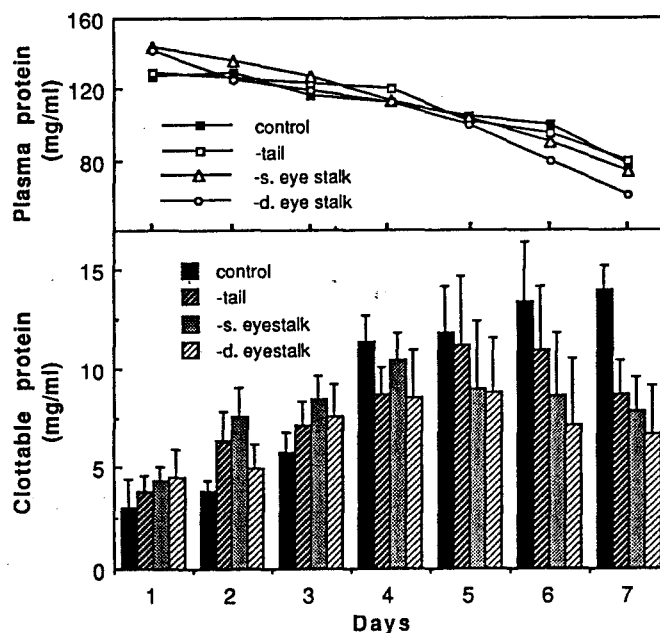


Fig. 8. The concentration changes of total plasma proteins (upper) and the clottable proteins (lower) of *P. monodon* under different trauma conditions. Experimental shrimps were undergone disectomy of either their tail fans, single-eyestalk, both eyestalks or without any of the treatment (as control). After the treatment about 0.1 ml hemolymph was withdrawn daily and individually analyzed for the concentrations of the hemolymph proteins (Bradford, 1976) and clottable proteins (by the rocket immunoelectrophoresis method). The boxes and bars shown are the means \pm S.E.M for each experiment with 3-5 shrimps.

雙眼柄者凝集蛋白含量六天之後降低最快，推想可能其適應力較差，無法如正常蝦提高凝集蛋白之濃度。在此將本研究作一初步結論：臺灣斑節蝦的凝集蛋白素是單元分子量為 19 萬及 18 萬的雙偶體或複偶體 (oligomers)，其分子性質與氮端的氨基酸序列類似於草蝦及龍蝦的凝集蛋白，且在免疫性質上相似。可用對抗草蝦凝集素的抗體來定量分析各種對蝦血漿的凝集素，所需的蝦血大約是 0.5 μ l。實驗結果顯示蝦血凝集素的濃度隨脫殼週期、季節氣候及受外傷等因素而做調節變化，本研究結果指出蝦血凝集素的分析可能可做為蝦病的一種生理或病理指標，實際之應用仍待更進一步印證。

誌 謝

本研究部份承農委會 80 農建 -7.1- 糧 121(59) 給予蔡蔭和計劃經費的補助，並得羅秀婉，宋延齡等教授多方支援，氮端序列之分析承陳順文先生協助，深表謝意。

參 考 文 獻

- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Doolittle, R. F. and M. Riley (1990) The amino-terminal sequence of lobster fibrinogen reveals common ancestry with vitellogenins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167: 16-19.
- Doolittle, R. F. and G. M. Fuller (1972) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis studies on lobster fibrinogen and fibrin. *Biochim. biophys. Acta* 263: 805-809.
- Durliat, M. (1985) Clotting processes in Crustacean decapods. *Biol. Rev.* 60: 473-498.
- Fuller, G. M. and R. F. Doolittle (1971) Studies of invertebrate fibrinogen. II. Transformation of lobster fibrinogen into fibrin. *Biochemistry* 10: 1311-1315.
- Hose, J. E., G. G. Martin, and A. S. Gerard (1990) A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. *Biol. Bull.* 178: 33-45.
- Laurell, C. B. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15: 45-52.
- Martin, G. G., J. E. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbnoy and N. McMrell (1991) Location and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustacean. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 517-522.
- Neville, D. M. Jr. (1971) Molecular weight determination of protein dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* 246: 6328-6334.
- Tait, J. (1911) Types of crustacean blood coagulation. *J. Marin. Biol. Assoc. U. K.* 9: 191-198.
- Tsai, I. H., Y. L. Chen and P. J. Lu (1991) Relationship between Hemolymph-coagulation and disease in shrimps: (1) Coagulation rate *in vitro* and the hemolymph proteins of various shrimp species, in: COA Fisheries Series No. 29 (Reports on fish Disease Res. XI) (e. d. K. H. Kou), pp. 22-30.

Relationship between Hemolymph-Coagulation and Disease in Shrimps

(II) Purification and Characterization of the Hemolymph Coagulogen of Penaeids

Yuh-Ling Chen¹, Su-Huei Huang¹, Jin-Hua Cheng² and Inn-Ho Tsai¹

¹ Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taiwan

² Tungkang Marine Labs, Taiwan Fisheries Res. Inst. Tungkang, Taiwan

(1) The clottable proteins were purified from the hemolymph of *Penaeus japonicus* by DEAE-ion exchange and gel-filtration chromatographies. They were cross-linked by the hemocyte transglutaminase to form insoluble clot in the presence of Ca²⁺.

(2) Composing of glycoprotein monomers of 190 and 180 KDa, they exist as dimers or higher oligomers.

(3) The N-terminal amino acid sequences of the penaeid clottable proteins are 75~80% similar to each other and to that of the spiny lobster.

(4) By rocket immunoelectrophoretic assay, it was shown that concentrations of the hemolymph clottable protein changed with respect to seasons, molting stages and trauma conditions.