

# 杂色鲍血蓝蛋白多克隆抗体的制备与血蓝蛋白 35kDa 片段鉴定

姜敬哲<sup>1</sup>, 韩焘<sup>1,2</sup>, 王江勇<sup>1</sup>, 杨慧英<sup>1,2</sup>, 刘金叶<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学 上海 201306)

**摘要:** 以杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)为研究对象, 通过密度梯度离心方法纯化得到高纯度血蓝蛋白, 以其作为抗原皮下注射免疫新西兰大白兔, 从而获得高效价的兔源多克隆抗血清。进一步通过 Protein A 抗原亲和纯化的方法对该抗血清纯化, 最终获得效价更高、检测特异性更好的血蓝蛋白多克隆抗体。应用该抗体进行 Western 检测发现, 鲍血淋巴中存在着多样的血蓝蛋白衍生产物; 进一步结合质谱技术对其中 35 kDa 条带进行鉴定发现, 其来源于血蓝蛋白 I 型亚基的 H 结构域。

**关键词:** 杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve); 血蓝蛋白; 亲和纯化; 多克隆抗体; 35 kDa 蛋白

中图分类号: Q176 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)03-0067-07

杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)是我国南方重要的养殖鲍品种, 其肉质鲜美、营养丰富。由于近年来急速膨胀的鲍养殖业及日益恶化的养殖环境, 鲍病害呈现出爆发性的增长态势, 对水产养殖业造成了极大损害<sup>[1-4]</sup>。由于鲍等软体动物缺少特异性免疫系统, 对其先天免疫系统的了解又十分有限, 因此广泛而深入的开展针对其先天免疫系统及免疫分子的相关研究具有重要意义<sup>[5]</sup>。

血蓝蛋白(Hemocyanin)是一种具有多样生物功能的呼吸蛋白, 在节肢和软体动物的免疫防御反应中发挥重要作用。除氧气运输外, 还在金属离子转运、蛋白质储存、渗透压调节、蜕皮激素载体、表皮固化等方面发挥作用, 越来越多的证据表明它还在免疫反应中发挥多种多样的功能<sup>[6-8]</sup>。由于血淋巴中血蓝蛋白的含量非常丰富, 深入开展针对鲍等重要海水养殖贝类的血蓝蛋白及相关免疫功能的研究工作, 充分发挥其含量丰富且功能多样的特点, 对于水产病害的防治应用将具有重要意义。

节肢动物血蓝蛋白的研究比较深入, 相比而言, 人们对软体动物血蓝蛋白的认识十分有限, 主要原因是软体动物血蓝蛋白的基因结构更为复杂。软体动物血蓝蛋白的结构单元为十聚体, 由 10 个亚基围成的中空圆柱状结构, 其亚基大小约为 400 kDa, 是一条含有 7~8 个重复结构域的超长肽链。软体动物血蓝蛋白一般由两种亚基基因编码, 二者编码区序列相似性较高, 但内含子的位置、长度及序列均没有

相似性<sup>[9-10]</sup>。已知, 欧洲鲍(*Haliotis tuberculata*)中血蓝蛋白 I 型亚基基因序列长度可达 28 kb、II 型基因的长度接近 20 kb<sup>[11]</sup>。

对于这种庞大而复杂的基因序列, 很难通过基因克隆表达的方法获得具有天然活性的蛋白产物。本文使用超速离心方法, 从鲍血淋巴中纯化了血蓝蛋白并免疫新西兰大白兔, 获得了高效价的杂色鲍血蓝蛋白抗血清; 进一步采用抗原亲和纯化方法制备了高纯度的血蓝蛋白抗体, 为软体动物血蓝蛋白的相关研究打下良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

主要实验试剂包括: 完全弗氏佐剂(Pierce), 不完全弗氏佐剂(Pierce), 20×TMB 底物显色试剂盒(CWbio), HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L, CWbio), Protein A 凝胶(CWbio), 中等分子质量蛋白非预染 Marker IV(CWbio), Binding Buffer(CWbio), Eluting Buffer(CWbio), 10×PBST(pH7.5, CWbio), 0.22 μm

收稿日期: 2010-12-24; 修回日期: 2011-04-26

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2010TS16); 广东省海洋渔业科技推广专项(2008899E01)

作者简介: 姜敬哲(1980-), 男, 黑龙江富裕人, 博士, 助理研究员, 研究方向为水生生物分子生物学与病害防治, 电话: 020-89022636, E-mail: jingzhejiang@yahoo.cn; 王江勇(1971-), 通信作者, 男, 博士, 研究员, E-mail: wjy104@163.com

PVDF 杂交膜(Waterman), PageRuler Plus 宽范围蛋白预染 Marker(Fermentas), AP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L, Proteintech), 其他试剂均为国产分析纯生化试剂。

主要实验设备包括: 高速冷冻离心机(Sigma), 超速冷冻离心机(BECKMAN LE-80K), HD-4 层析工作站(上海沪西分析仪器厂), 层析柱(Pharmacia), DEM-3 型自动洗板机(北京拓普分析仪器有限公司), 酶标仪(BIO-RAD), 蛋白电泳及 Western 杂交相关设备(BIO-RAD), 蛋白定量检测仪(Amersham Biosciences), 透析袋 (BLUEBIRD), 超滤管 (Millipore)。

实验动物: 体重约 2 kg 的 2 只新西兰大白兔(购自北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂), 分别编号为 Hc537 和 Hc538。

## 1.2 血蓝蛋白的纯化

血蓝蛋白的纯化采用 CsCl 密度梯度离心方法, 具体步骤参考彭文等方法<sup>[12-13]</sup>, 纯化后的血蓝蛋白用 SDS-PAGE 电泳检测。

## 1.3 抗血清效价检测(间接法 ELISA)

在酶标板各孔中加入 100  $\mu$ L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)溶解的包被蛋白(含 200 ng), 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜; PBST 洗涤用自动洗板机进行(参数设定: 3 次, 每次振板 5 s, 下面洗涤步骤均同此); 每孔加 300  $\mu$ L 的 5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h; PBST 洗涤 3 次; 将待检测一抗血清或免疫前血清按设计稀释度稀释后 100  $\mu$ L 每孔加入酶标板中, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次; 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 IgG, 按适当比例稀释后 100  $\mu$ L 每孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 40 min; PBST 洗涤 3 次; 每孔加入 100  $\mu$ L 现配的 TMB 底物显色工作液, 显色 10 min, 加入 50  $\mu$ L 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色, 在酶标仪上测 450 nm 波长的 OD 值。

## 1.4 抗血清的制备

### 1.4.1 免疫前血清背景检测

每只白兔耳缘静脉取血 0.5~1 mL, 分离血清。按照 1.3 节方法检测免疫前血清背景: 一抗稀释比例为: 1 1 000、1 3 000、1 9 000、1 27 000、1 81 000、1 243 000、1 729 000, 以 PBS 作空白对照; 二抗稀释比例为 1 10 000。

### 1.4.2 抗原免疫

首次免疫(0 天)剂量为 600  $\mu$ g/只, 抗原的 PBS

溶液中加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射; 第 21 天进行二免, 400  $\mu$ g/只, 抗原用弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射; 第 35 天进行三免: 400  $\mu$ g/只, 抗原用弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射。

### 1.4.3 免疫后血清效价测定

免疫 10 天后, 每只白兔耳缘静脉取血 0.5~1 mL, 分离抗血清, 按照 1.3 节方法检测免疫血清效价。一抗稀释比例为: 1 1 000、1 3 000、1 9 000、1 27 000、1 81 000、1 243 000、1 729 000, 阴性对照使用免疫前血清按 1 10 000 倍稀释, 空白对照为 PBS; 二抗稀释比例为 1 10 000。

### 1.4.4 收集抗血清

检测效价符合要求后第 2 天, 以心脏穿刺的方法采全血并分离抗血清。

## 1.5 抗体的亲和纯化及检测

用 Binding Buffer 平衡 protein A 亲和柱至基线平稳; 将用 Binding Buffer 稀释的血清样品负载上柱, 收集流穿液, 将流穿液再次上柱, 继续平衡至基线平稳; 加入 Eluting Buffer 洗脱, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测纯度; 用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 透析收集的洗脱峰, 使纯化后的 IgG 保存在 PBS 环境中; 用蛋白定量检测仪测定纯化后总 IgG 浓度并进行 SDS-PAGE 电泳检测。抗体效价检测按照 1.3 节方法, 一抗稀释比例为: 4 000, 1 333, 444, 148, 49, 16, 5.4  $\mu$ g/L。

## 1.6 Western 检测

SDS-PAGE 电泳结束后, 将胶、滤纸、膜及棉布等浸于装有电转液(Glycine 39 mmol/L, Tris-base 48 mmol/L, 甲醇 20%)的托盘中 5~10 min; 组装电转装置, 注意保证胶与膜之间没有气泡, 电转为恒流 350 mA 90 min, 冰浴中进行; 转膜后取下杂交膜, 加入封闭液(含 4%脱脂奶粉的 TBST)于 37 $^{\circ}$ C 下缓慢摇动, 封闭 1~2 h; 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 将膜浸入一抗杂交液(1 1000~1 10000 倍稀释的一抗封闭液)中, 4 $^{\circ}$ C 杂交过夜; TBST 洗膜 3 次, 将膜浸入二抗杂交液(1 3000 倍稀释的二抗封闭液), 37 $^{\circ}$ C 杂交 1 h; TBST 洗膜三次, 将膜正面朝下帖到显色液(0.33% NBT, 0.17% BCIP, 100 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)中, 避光显色 10 min。

## 1.7 质谱鉴定

根据 Western 杂交结果, 对应割取凝胶上 35 kDa

位置处条带, 送由暨南大学测试中心进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 纯化血蓝蛋白的检测

如图 1 所示, CsCl 密度梯度离心纯化的血蓝蛋白纯度良好, 高分子量区(约 400 kDa)有明显单一条带, 符合抗原纯度要求。

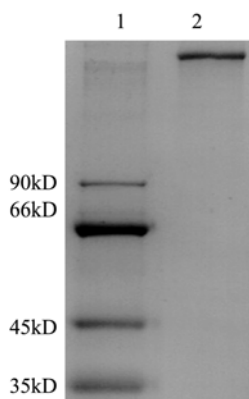


图 1 SDS-PAGE 检测纯化的杂色鲍血蓝蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified hemocyanin from *Haliotis diversicolor* Reeve  
 胶浓度为 12.5%; 1. 中等分子量蛋白 Marker; 2. 纯化的血蓝蛋白, 上样量 4  $\mu$ g  
 Gel concentration: 12.5%; 1. protein markers; 2. 4  $\mu$ g of purified hemocyanin

### 2.2 ELISA 检测免疫前、后血清效价

由表 1 可见, 两只家兔免疫前后的血清效价对比明显, 免疫后的抗血清 ELISA 检测值远高于免疫

前血清、空白及阴性对照。但 Hc538 的抗血清效果更好, 由 243 000 和 729 000 倍的稀释结果可见, Hc538 的血清效价约为 Hc537 的 3 倍左右。因此, 后续亲和纯化实验使用 Hc538 的抗血清。

### 2.3 亲和纯化抗体检测

本实验以效价较高的 Hc538 的 20 mL 抗血清为基础, 进行 Protein A 亲和纯化。共获得约 220 mg 的纯化 IgG 抗体 22 mL, 浓度为 9.21 mg/mL。经 SDS-PAGE 检测(图 2), 抗体纯度良好: 在约 50 kDa 处的蛋白条带与兔 IgG 重链的分子量吻合; 在约 27 kDa 处的条带与轻链的分子量吻合。进一步对纯化后的抗体进行 ELISA 检测(表 2), 当抗体浓度为 16 ng/mL 以上时, OD<sub>450nm</sub> 能够维持在空白对照 OD 值的 2 倍以上, 且大于 0.1, 当浓度稀释为 5.4 ng/ $\mu$ L 时则不再满足上述条件。因此该纯化抗体的 ELISA 检测灵敏度约 16 ng/mL。

### 2.4 Western 杂交检测

图 3 为血蓝蛋白 western 杂交结果, 其中 A 和 C 为杂色鲍血淋巴总蛋白 SDS-PAGE 电泳图, B 和 D 为对应的血蓝蛋白的 Western 检测图, 胶浓度为 12.5%; 其中图 A、B 的 1~4 号泳道血淋巴总蛋白上样量分别为 250、500、750 和 750 ng, 其中图 C、D 的 1~4 号泳道上样量分别为 100、250、500 和 1 000 ng, M 为 Marker; B 图一抗使用 1:1000 稀释的 Hc538 抗血清, D 图中一抗使用 1:5000 稀释的亲和纯化抗体(终浓度为 1842 ng/mL)。红色箭头表示质谱鉴定的条带。由 Hc538 抗血清 western 杂交结果(图 3(B))可见, 血蓝

表 1 ELISA 检测免疫前、后血清效价

Tab. 1 ELISA detection of serum titres before or after immunization

稀释比例	Hc537*		Hc538	
	免疫前	免疫后	免疫前	免疫后
1 1000	0.690**	3.501	0.576	3.501
1 3000	0.298	3.501	0.202	3.501
1 9000	0.103	3.501	0.106	3.501
1 27000	0.089	3.501	0.088	3.501
1 81000	0.083	2.277	0.069	3.501
1 243000	0.077	0.851	0.065	2.320
1 729000	0.061	0.275	0.061	0.785
空白对照 <sup>1</sup>	0.043	0.042	0.047	0.042
阴性对照 <sup>2</sup>	—	0.089	—	0.083

注: \*为 Hc537 和 Hc538 为用于免疫的家兔编号; \*\*为 ELISA 测得的血清效价(OD<sub>450nm</sub> 平均值, n=2); 1. 空白对照使用 PBS; 2. 阴性对照使用免疫前血清, 按 1:10000 稀释

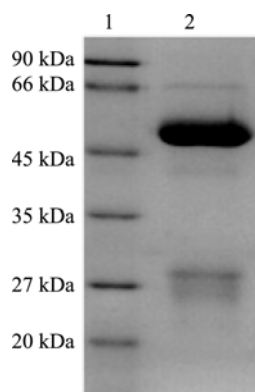


图 2 SDS-PAGE 检测亲和纯化后的抗体

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of affinity purified antibodies

胶浓度为 12.5%; 1. 蛋白 markers; 2. 亲和纯化的抗体, 上样量 8 μg

Gel concentration: 12.5%; 1. protein markers; 2. 8 μg of affinity purified antibodies

表 2 ELISA 检测亲和纯化后抗体效价

Tab. 2 ELISA detection of affinity purified antibodies

抗体浓度(ng/mL)	OD <sub>450nm</sub>
4000	3.501
1333	3.501
444	1.955
148	0.681
49	0.249
16	0.112
5.4	0.062
PBS control	0.040

蛋白杂交条信号都集中在 35 kDa 以上区域, 其中 35 kDa 处有两条明显的杂交带, 70 kDa 的以上区域杂交信号非常密集; 而 35 kDa 以下区域基本没有杂交信号。杂色鲍完整血蓝蛋白的大小约为 400 kDa 左右, 由杂交结果看, 250 kDa 以上范围有很强的杂

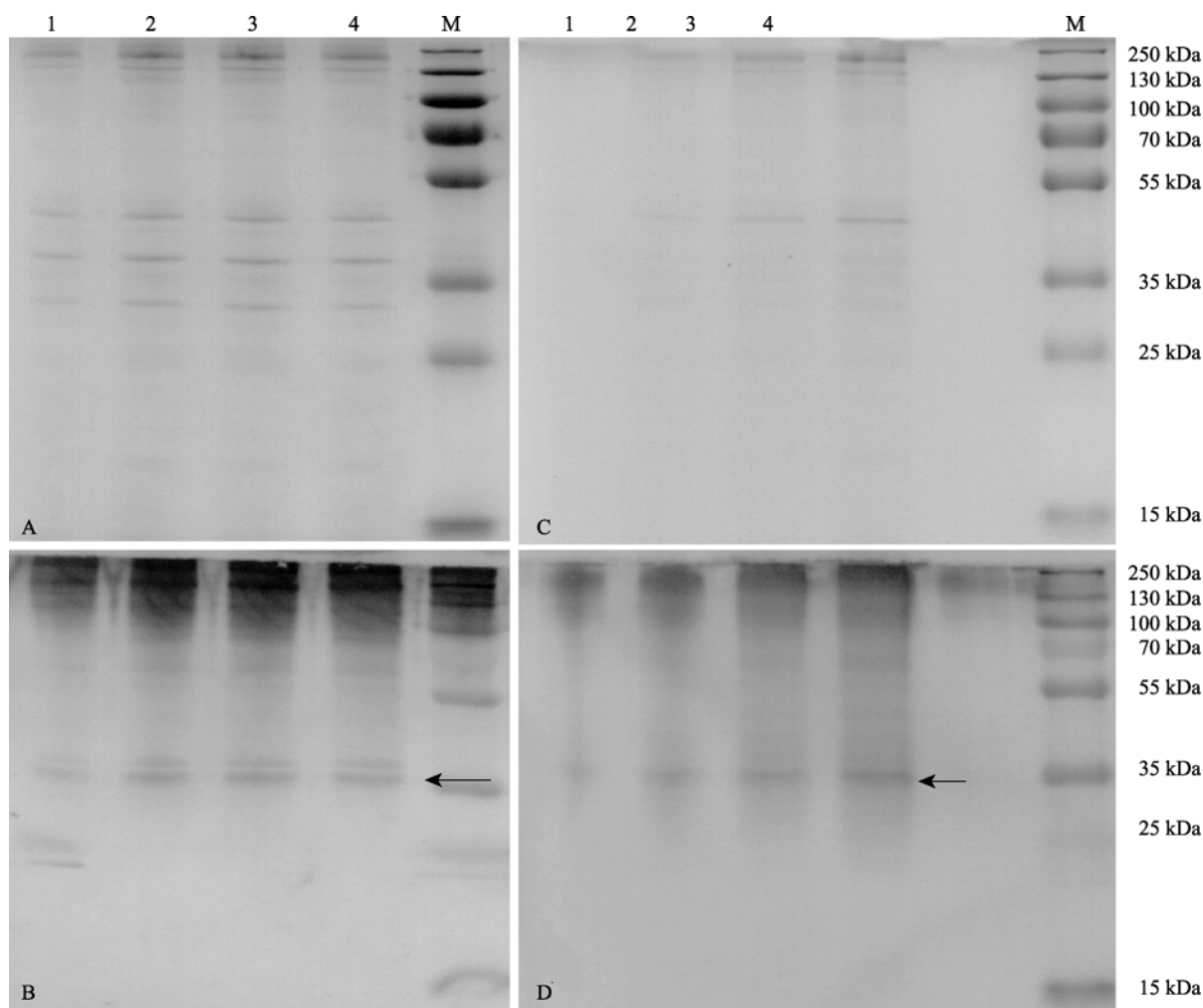


图 3 杂色鲍血淋巴总蛋白 SDS-PAGE 电泳及血蓝蛋白的 Western 检测

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blotting analysis of total protein and hemocyanin in *Haliotis diversicolor* Reeve hemolymph

交信号,与预期结果相符。使用亲和纯化抗体杂交的效果与抗血清类似(图 3D)。其中不同的是,35 kDa 位置只检测到一条明显的特异条带。图 3B 中一抗使用的血清为 1:1000 稀释,而图 3D 中一抗使用的纯化抗体用量为 1:5000,其检测 250 ng 血淋巴总蛋白的效果与抗血清检测 250 ng 总蛋白的效果相似。由此可见,纯化后的抗体特异性及检测灵敏度都得到了提升。可能由于图 3C、D 中样品有所降解,55~25 kDa 处的杂交信号有所增强,但并不影响抗体效果的检测。

### 2.5 质谱鉴定 35 kDa 蛋白

由于 35 kDa 处的杂交条带较为特异,进一步用 MALDI-TOF/TOF 质谱对其序列进行鉴定。结果表明

(图 4),该条带为血蓝蛋白;对一级质谱图中多个高丰度肽段进行的二级质谱鉴定发现,其中 3 个肽段首尾相连后,刚好拼接为长度 40 个氨基酸的多肽,与 NCBI 数据库中的杂色鲍血蓝蛋白片段 (gi|194410718) 序列一致性达到 100%。由于杂色鲍血蓝蛋白序列并不完整,与欧洲鲍 (*Haliotis tuberculata*) 中完整的血蓝蛋白序列比较发现,该序列与 I 型亚基 (gi|12053765) 的相似性高达 95%,与 II 型亚基 (gi|27368649) 的相似性为 79%;根据比对到目标序列的位置判断,该序列与 H 结构域的吻合度最高。由此可以推测,该 35 kDa 蛋白很可能来源于血蓝蛋白 I 型亚基的 H 结构域降解区段。

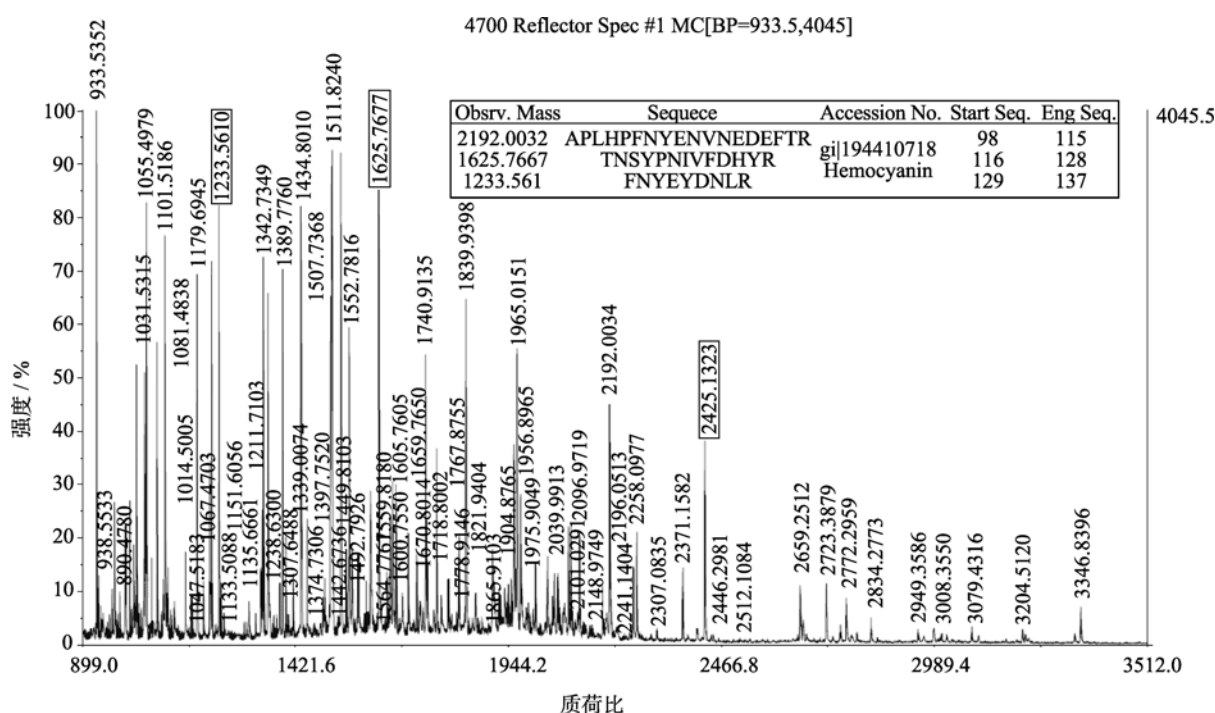


图 4 35kDa 蛋白条带谱鉴定结果

Fig. 4 Mass spectrum identification of the 35kDa protein band

## 3 讨论

采用密度梯度离心方法,从少量(10 mL)鲍血中,提取到足量的(>300 μg)、高纯度且结构完整的血蓝蛋白(图 1)<sup>[12-13]</sup>。纯化产物中包含完整血蓝蛋白亚基,并维持了体内天然修饰状态与活性,适用于体外活性研究和抗体制备。血蓝蛋白的纯化还可以采用亲和层析方法<sup>[8,14]</sup>,通过在凝胶介质上偶联血蓝蛋白抗体,达到特异纯化的目的。该方法操作复杂、纯化效率低,抗体对不同亚基的偏好性还会影响纯化效果。

相比亲和层析,密度梯度离心操作简单、高效,以该抗原免疫获得的抗体,并不存在亚基的偏好性问题。

血蓝蛋白的存在形式多种多样,在以完整蛋白分子发挥功能的同时,还能降解成更小的片段行使功能。一些节肢动物的血蓝蛋白需要被轻微的水解或变性,才能表现出免疫活性<sup>[15-16]</sup>。Destoumieux-Garzon 等<sup>[17]</sup>从两种对虾的正常血淋巴中纯化到 3 种大小不同的抗菌肽,分别为 2.7 kDa 的 PvHCt, 7.9 kDa 的 PsHCt1 和 8.3 kDa 的 PsHCt2。进一步的序列鉴定发现,它们可能是血蓝蛋白 C 末端不同的

降解产物。Lee 等<sup>[18]</sup>从正常淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)血淋巴中也纯化到一种分子质量为 1.9 kDa 的抗菌肽(Astacidin1)。章跃陵等<sup>[19]</sup>利用制备的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血蓝蛋白的多克隆抗体,杂交检测对虾血淋巴总蛋白时发现:除血蓝蛋白条带外,另有多达 6 条不同大小的特异杂交带。其中 28.5 kDa 的条带因副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染而增强,相应血蓝蛋白条带有所减弱。

虽然甲壳类动物中血蓝蛋白存在着多种多样的衍生肽段,但在鲍等软体动物中还未见相关研究报道。由文中的 Western 结果看,杂色鲍血蓝蛋白的杂交带远远超过对虾中的 6 条,甚至更为复杂。该结果在抗血清(图 3(B))及纯化后的抗体(图 3(D))杂交中都得到了验证。同时,ELISA 空白及阴性对照本底很低(表 1 和表 2),可以排除非特异杂交的可能。由于高分子量区的杂交信号过于密集,影响质谱鉴定,因此,文中只对分离较好的 35 kDa 条带进行了质谱鉴定。上述结果表明,鲍等软体动物中血蓝蛋白的衍生产物可能更加多变,不仅 C 末端能够产生抗菌肽类片段<sup>[12-13]</sup>,序列内部的各结构域也能独立发挥作用。虽然本研究确认了 35 kDa 的蛋白来自于血蓝蛋白 I 型基因的 H 结构域,但对其序列的起始位置及行使的功能尚不清楚,进一步的研究工作还要依赖于完整的杂色鲍血蓝蛋白序列以及基因工程重组表达的方法,对这些功能肽段的活性进行深入研究。

## 4 结论

本研究获得了杂色鲍血蓝蛋白的兔源抗血清及其亲和纯化抗体,该抗体效价较高、特异性良好。Western 杂交检测发现,鲍血蓝蛋白存在多种多样的衍生片段,对其中 35 kDa 蛋白条带的质谱鉴定发现,该蛋白可能来自于血蓝蛋白 I 型亚基的 H 结构域。本研究结果表明,鲍等软体动物血蓝蛋白可能存在着比节肢动物血蓝蛋白更为复杂的衍生变化。

### 参考文献:

- [1] Wang J Y, Guo Z X, Feng J, et al. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong province, China [J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23(4): 1163-1168.
- [2] 王江勇, 孙秀秀, 王瑞旋, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析 [J]. 南方水产, 2010, 6(5): 21-26.
- [3] 刘广锋, 徐力文, 黄建荣, 等. 杂色鲍养殖环境中致病性弧菌分布调查 [J]. 南方水产, 2005, 1(3): 60-64.
- [4] 王江勇, 王瑞旋, 刘广锋, 等. 杂色鲍幼虫大规模死亡与细菌数量的关系 [J]. 南方水产, 2005, 1(1): 57-61.
- [5] 姜敬哲, 张微, 王江勇, 等. 哈维氏弧菌感染的杂色鲍全组织均一化 cDNA 文库的构建 [J]. 南方水产, 2010, 6(5): 37-42.
- [6] 章跃陵, 罗芸, 彭宣宪. 血蓝蛋白功能研究新进展 [J]. 海洋科学, 2007, 31(2): 77-80.
- [7] Alpuche J, Rosas C, Vázquez L, et al. Activation of immunological responses in *Litopenaeus setiferus* hemocytes by a hemocyanin like-lectin [J]. Aquaculture, 2009, 292(1-2): 11-15.
- [8] Zhang Y L, Yan F, Hua Z, et al. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 330-335.
- [9] Decker H, Hellmann N, Jaenicke E, et al. Minireview: Recent progress in hemocyanin research [J]. Integrative and Comparative Biology, 2007, 47(4): 631-644.
- [10] Yoon J, Fujii S, Solomon E I. Geometric and electronic structure differences between the type 3 copper sites of the multicopper oxidases and hemocyanin/tyrosinase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(16): 6585-6590.
- [11] Altenhein B, Markl J, Lieb B. Gene structure and hemocyanin isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots [J]. Gene, 2002, 301(1-2): 53-60.
- [12] 彭文, 王江勇, 丁雪娟. 杂色鲍血蓝蛋白的分离纯化与酚氧化酶活性研究 [J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 52-58.
- [13] 彭文, 姜敬哲, 王江勇, 等. 理化因子对杂色鲍血蓝蛋白酚氧化酶活性的影响研究 [J]. 南方水产, 2010, 6(2): 1-6.
- [14] 刘文杰. 锯缘青蟹血淋巴和血蓝蛋白免疫活性研究[D]. 厦门大学硕士学位论文, 2006: 33-34.
- [15] Decker H, Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(40): 25889-25892.

- [16] Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(29): 27166-27170.
- [17] 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(50): 47070-47077.
- [18] Lee S Y, Lee B L, Soderhall K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(10): 7927-7933.
- [19] 章跃陵, 叶向群, 陈洁辉, 等. 凡纳滨对虾 28.5kD 血蓝蛋白的降解新片段[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 425-430.

## Preparation of hemocyanin polyclonal antibody and the identification of 35 kDa hemocyanin fragment in *Haliotis diversicolor* Reeve

JIANG Jing-zhe<sup>1</sup>, HAN Tao<sup>1,2</sup>, WANG Jiang-yong<sup>1</sup>, YANG Hui-ying<sup>1,2</sup>, LIU Jin-ye<sup>1,2</sup>

(1. South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Received:** Dec.,24,2010

**Key words:** *Haliotis diversicolor* Reeve; hemocyanin; affinity purification; polyclonal antibody; 35k Da protein.

**Abstract:** *Haliotis diversicolor* Reeve, was taken as research material. High purity hemocyanin proteins were purified from the hemolymph of abalone using CsCl density gradient centrifugation method. By injection of the purified antigen to a rabbit, high titer polyclonal anti-serum was acquired. The anti-serum was further processed with the protein A affinity purification to produce purified antibodies. Finally, the purified polyclonal antibodies with higher titer and specificity were acquired. Further Western blotting with these antibodies, plenty of hemocyanin was found as derivates of various molecular weights in abalone hemolymph.

(本文编辑: 康亦兼)