

SDS-PAGE 与液质联用技术分离和鉴定中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血浆蛋白*

黄冰心^{1,2} 蒋 昊^{1,2} 张继泉¹ 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

提要 提取中国明对虾的血浆蛋白用 SDS-PAGE 进行分离。将电泳条带从上到下平均切成 4 份, 分别胶内酶解并利用液相色谱-串联质谱系统进行质谱分析。利用 SEQUEST 软件对 NCBI 蛋白数据库进行检索, 鉴定了 66 个中国明对虾血浆蛋白质。运用生物信息学手段, 对鉴定的蛋白进行功能分类, 包括转录、细胞结构和骨架、信号转导、蛋白质合成与处理、蛋白质折叠、分拣和降解、免疫功能、生长和发育、能量代谢、细胞周期、碳水化合物代谢、钙离子平衡、抗氧化剂和氨基酸和脂类代谢等。本研究丰富了中国对虾血浆蛋白质表达谱, 可为进一步研究对虾免疫机制提供有力的支持。

关键词 中国明对虾, 血浆, 蛋白质组

中图分类号 Q816

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国特有的经济虾类, 在我国水产养殖业占有重要地位。但是各种病害给对虾养殖带来了巨大的经济损失, 严重制约了养虾业的健康发展。大量使用药物降低了虾类的抵抗力, 同时, 药物残留又对人类健康构成威胁, 从而影响养殖业的可持续发展。因此, 深入研究虾类的免疫机理, 寻找与虾类抗菌、抗病毒有关的免疫因子, 通过采取有效手段激活和诱导虾类的免疫反应, 增强其防病能力, 将是虾类病害及其防治研究的重要方向(相建海, 2001; Shen *et al*, 2004)。

血淋巴是中国明对虾重要的组成部分, 承担着许多重要的功能, 血浆中的蛋白质有很多种, 分别来源于各种不同的组织与细胞, 这些蛋白质参与机体的凝血、免疫、小分子物质(包括激素等)运输、营养等一系列生理或病理过程。免疫过程是一个复杂的过程, 因此利用蛋白质组学的方法对血浆蛋白进行鉴

定和功能分类, 从而更全面地研究对虾免疫机理, 发现在免疫反应中变化明显的免疫因子并对其进行深入研究, 将有助于了解虾类的免疫机理, 促进虾类疾病的防治(Wyatt *et al*, 1978; 江晓路等, 1999; 郭志勋等, 2006; 姚翠鸾, 2005¹⁾)。

蛋白质组学研究的经典方法一般是通过高分辨率的双向凝胶电泳分离蛋白质, 随后进行胶内酶解和质谱鉴定, 辅之以生物信息学的数据挖掘, 达到鉴定蛋白质的目的。但是对虾血浆中血蓝蛋白含量过高, 导致血蓝蛋白在双向凝胶图谱上分子量介于 65—80kD 之间和等电点 pI 介于 3—10 之间弥漫, 掩盖了许多低丰度蛋白。

本研究中, 作者采用 SDS-PAGE 结合液相色谱与串联质谱的技术研究中国明对虾血浆蛋白质组。将血浆蛋白先进行单向电泳分离, 根据蛋白分子量预分离成不同的组分, 再进行质谱鉴定, 共鉴定了 13

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目, 2006CB101800 号。黄冰心, 博士, E-mail: huangbx@ms.qdio.ac.cn

通讯作者: 相建海, 研究员, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2008-01-26, 收修改稿日期: 2008-03-28

1) 姚翠鸾, 2005. 免疫刺激后中国明对虾血液抗菌力应答及两种免疫相关因子 LYZ 和 AK 的研究. 中国科学院研究生院博士学位论文

类共 66 种蛋白质,为下一步找出与重要免疫功能相关的关键蛋白,深入研究对虾免疫机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用虾:实验用中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) [体长(10.5±0.6)cm]购自青岛即墨对虾养殖场,实验前于中国科学院海洋研究所水族楼水族箱中充气暂养 10 天,使其适应实验室内养殖环境。水温为 24—26℃,盐度为 30—32。

试剂和仪器:超纯水来源于 Millipore 超纯水系统(Millipore, USA),色谱级乙腈、甲酸、碘乙酰胺及 DTT(Merck, USA),测序级胰蛋白酶(Sigma),氯化钠、碳酸氢胺、柠檬酸钠(上海生工),液相色谱质谱系统(ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA),其中 HPLC 系统配备有低压混合四元泵(具有脱气装置),离子阱质谱检测器型号为 Thermo Finnigan LTQ Deca XP^{Plus},反相色谱柱为 Thermo Finnigan C₁₈ 反相柱(150×0.18mm, 3μm)。

1.2 血浆蛋白提取和预处理

依照 Destoumieux 等(1997)描述的方法抽取对虾的血淋巴。所有操作过程均在冰上完成,在试验开始前加入蛋白酶抑制剂。用预先吸入 2ml 抗凝剂(0.45 mol/L 氯化钠, 0.1mol/L 葡萄糖, 30mmol/L 柠檬酸钠, 26mmol/L 柠檬酸, 10mmol/L EDTA, pH 7.3)的注射器从健康对虾(10 尾)第一腹节基部腹窦取血淋巴,混匀, 800g、4 离心 20min, 去除血细胞。之后 12000g、4 离心 10min。取血浆分装后存于 -80℃, 备用。

将血浆与 4 倍体积的含 0.2% DTT(W/V)、10%三氯乙酸(W/V)的 -20℃ 预冷丙酮混合; -20℃ 沉淀过夜; 14000g、4 离心 30min; 弃上清,将沉淀重悬于含 0.2% DTT 的预冷丙酮中洗涤; -20℃ 放置 1h; 14000g、4 离心 30min; 在通风橱中让丙酮充分挥发,得到干燥的沉淀。

1.3 SDS-PAGE

取 500 μg 干燥沉淀,加入 100 μl 1×SDS-PAGE 上样缓冲液溶解沉淀,充分振荡后煮沸 3—5min, 12000g 离心 15min。

配制 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每泳道大约上样 10 μl。样品尽量加在中间的孔中,未加样孔中加入等体积 1×SDS-PAGE 上样缓冲液,在样品旁边泳道中加入等体积的低分子量标准。先恒流 10mA, 运行

时间为 0.5h,再于 20mA 运行至溴酚蓝前沿到达分离胶底部约 1cm 时,停止电泳,剥胶,考马斯亮蓝染色、脱色等。

1.4 胶内蛋白质的酶解

凝胶在扫描仪上扫描后,将经过 SDS-PAGE 分离后的对虾血浆蛋白凝胶用洁净的刀片从上到下分成 4 个区段(图 1),按照 Shevchenko 等(1996)的方法将切下的 4 个条带分别进行胶内酶解。

1.5 蛋白质条带质谱分析

上述酶解产物用液相色谱-串联质谱仪(Thermo Finnigan, San Jose, CA)分析。液相色谱系统包括高压液相色谱仪 Surveyor (Thermo, San Jose, CA),自动进样器和 Thermo Finnigan LTQ 离子阱质谱仪(Thermo, San Jose, CA),样品用 150×0.18mm C₁₈ 反相毛细管色谱柱分离。从反相柱上洗脱下的样品,通过电喷雾源直接进入质谱。实验中流动相为溶剂 A(0.1%甲酸水溶液, V/V)和溶剂 B(0.1%甲酸乙腈水溶液, V/V)。色谱柱用 95%的溶剂 A 清洗 20min,然后肽段用溶剂 B 以 5%的线性梯度洗脱,在 100min 内到 85%的溶剂 B,流速为 190μl/min,分流后过柱的流速为 2μl/min。离子源参数设置为:电喷雾电压 3.2kV;毛细管温度 180℃,归一化碰撞能量为 35%。采用二种扫描形式收集图谱数据,全扫描质量范围为 m/z 400—1800,以动态排除方式获得 4 个最高的峰进行 MS/MS 扫描,MS/MS 的碰撞能量仪器自动优化。其他设置为 Xcalibur 软件的默认设置。

1.6 质谱数据的蛋白质数据库搜寻分析

质谱采集到的原始数据先采用 SEQUEST 软件(University of Washington, licensed to Thermo Finnigan)在 NCBI 数据库进行搜索和匹配。搜索标准是:MS/MS Tolerance 为 0.4Da,胰酶特异性耐受 3 个错误剪切,固定修饰为半胱氨酸的甲基化;可变修饰为甲硫氨酸的氧化。对搜索结果的筛选原则: DelCn>0.1; Xcorr 值的标准为:电荷为+1 时 Xcorr>1.9,电荷为+2 时 Xcorr>2.2,电荷为+3 时 Xcorr>3.75,匹配两个或两个以上不同的肽段。

1.7 血浆蛋白的 KEGG 功能分类

利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)对鉴定得到的血浆蛋白质功能进行分类。

2 结果

2.1 血浆蛋白的提取和 SDS-PAGE 分离

中国明对虾血浆蛋白质 SDS-PAGE 结果(图 1)显示, 在 65—90 kD 区段, 弥漫着高丰度蛋白, 其它区段蛋白分离比较理想, 没有高丰度蛋白。将蛋白条带如图 1 切成 4 部分, 用于胶内酶解。

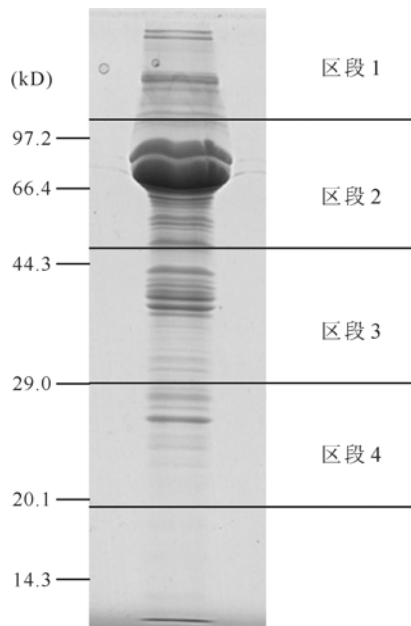


图 1 SDS-PAGE 分离中国明对虾血浆蛋白

Fig.1 SDS-PAGE separation of the plasma proteins

注: 12% SDS-PAGE 分离中国明对虾血浆蛋白, 上样量为 50 μg , 按图示分为 4 份后, 利用液相色谱质谱仪鉴定蛋白质

2.2 血浆蛋白的串联质谱分析

用 Thermo Finnigan LTQ Deca XP^{Plus} 对酶解的肽段进行分析, SEQUEST 软件搜索 NCBI Inr 数据库, 同时进行手工筛选, 鉴定出 66 种可信度较高的蛋白(表 1)。通过 KEGG 检索, 66 种血浆蛋白质被分为 13 类, 蛋白质分类情况及各类所含蛋白质如表 2 所示。

为了进一步揭示蛋白质组成, 利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) KEGG 网站(<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)对鉴定得到的血浆蛋白质功能进行分类, 结果见表 2。由表 2 可知, 所鉴定出的蛋白主要包括转录、细胞结构和骨架、信号转导、蛋白质合成与处理、蛋白质折叠分拣和降解、免疫功能、生长和发育、能量代谢、细胞周期、碳水化合物代谢、钙离子平衡、

抗氧化剂、氨基酸和脂类代谢等。

3 讨论

中国明对虾血浆蛋白在对虾免疫中发挥十分重要的作用, 确定中国明对虾血浆蛋白组成, 可为研究血浆蛋白中参与免疫防御的因子提供了初步实验依据, 为研究人员在分子水平阐明虾类疾病的发病机制提供蛋白质组学方面的理论依据。鉴于中国明对虾血浆蛋白质组的高度复杂性, 在样品分析过程中对蛋白质进行预分离是十分必要的。经过 SDS-PAGE 分离后, 再将条带分成不同分子量大小的区段, 这样可以减少样品的复杂性。将低丰度蛋白与高丰度蛋白分开进行酶解, 这样可避免在鉴定过程中高丰度蛋白对低丰度蛋白的影响。与双向电泳相比, 基于 SDS-PAGE 的蛋白质组学研究方法不能同时分离蛋白的各种翻译后修饰形式, 不能比较精确地定量, 可能会丢失蛋白的一些理化信息, 如等电点、分子量等。但是它也有双向电泳无法比拟的优点, 例如: 样品制备简单、容易自动化、能鉴定一些双向电泳很难分离的蛋白, 如小于 10kD 或大于 100kD 的蛋白(Peng *et al*, 2003; Liu *et al*, 2004)。从本研究中鉴定出的血浆蛋白分子的性质(等电点、分子量)可以看出, 作者采用的方法可以无偏向性地对样品中各种蛋白进行鉴定, 其鉴定能力强于以双向电泳为基础的分析方法。因此, 在中国明对虾血浆蛋白质组学研究中, 基于 SDS-PAGE 的蛋白质组学研究方法是双向电泳的一种有效补充, 两种方法结合为血浆蛋白质的分析提供更全面的信息。

在肽段混合物分析和 SEQUEST 搜索完成以后, 对于搜索结果的过滤条件的选择非常重要。如果过滤条件太严格, 很多鉴定的阳性结果可能会被过滤掉, 特别是对于人们所感兴趣的低丰度的蛋白, 更容易被过滤掉; 如果过滤条件太宽松, 鉴定蛋白的数目就会大大增加, 就会出现很多假阳性的结果, 干扰后续分析。本研究充分考虑以上两种情况, 选用了合适的过滤标准(+1, Xcorr>1.9; +2, Xcorr>2.2; +3, Xcorr>3.75; DeltCn>0.1), 同时进行手工筛选, 得到 66 种血浆蛋白。在这些鉴定得到的血浆蛋白中, 有关免疫功能(26%)的蛋白所占比例最大, 这也反映了在中国明对虾生命活动中, 血浆是免疫功能的重要执行者。

表 1 本文中鉴定的血浆蛋白
Tab.1 The identified plasma proteins in this study

登录号	蛋白质[物种名称]	分子量	等电点 pI	多肽覆盖率(%)
Structural and Cytoskeletal				
gi 50513239	calpain B (<i>Gecarcinus lateralis</i>)	87563.1	4.49	19.23
gi 22651822	muscle-specific calpain (<i>Homarus americanus</i>)	66321.9	5.17	19.13
gi 414985	fast myosin heavy chain (<i>Homarus gammarus</i>)	47883.0	5.24	23.24
gi 37925239	slow muscle myosin S1 heavy chain (<i>Homarus americanus</i>)	58564.1	5.22	12.23
gi 607633	tropomyosin (<i>Metapenaeus ensis</i>)	31705.8	4.66	8.76
gi 6689047	actin (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	29479.3	5.95	13.58
Immune function				
gi 16612121	hemocyanin (<i>Penaeus monodon</i>)	51152.3	5.10	55.46
gi 27463265	allergen Pen m 2 (<i>Penaeus monodon</i>)	40113.5	6.05	26.69
gi 52788273	beta-1,3-glucan-binding protein precursor (BGBP) (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	164012.8	6024	20.91
gi 6601498	clottable protein (<i>Penaeus monodon</i>)	188457.5	5.27	6.35
gi 81230850	cryptocyanin 2 (<i>Cancer magister</i>)	78261.7	8.00	16.02
gi 28465341	c-type lysozyme (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	18227.6	8.79	39.24
gi 4585366	extracellular superoxide dismutase precursor (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	23056.8	6.70	20.74
gi 1771447	integrin (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	88480.2	5.52	25.84
gi 86264151	leucine-rich repeat protein (<i>Penaeus monodon</i>)	62479.2	6.77	19.96
gi 17221657	lysozyme like protein (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	16609.6	8.93	44.92
gi 119655552	peritrophin 3 precursor (<i>Penaeus monodon</i>)	34627.9	5.22	11.04
gi 1150532	peroxinectin (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	89316.6	7.49	21.03
gi 16303283	prophenoloxidase (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	78973.3	6.14	22.97
gi 118429535	ferritin protein (<i>Artemia franciscana</i>)	18823.1	5.30	18.63
gi 37575429	serine proteinase (<i>Penaeus monodon</i>)	31591.1	4.70	8.28
gi 89258155	carboxypeptidase B (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	33120.4	4.43	5.41
Energy metabolism				
gi 7677489	vacuolar ATP synthase subunit B L form (<i>Carcinus maenas</i>)	54517.2	5.31	20.86
gi 56182374	arginine kinase (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	40130.5	5.92	39.61
gi 116735062	cytochrome oxidase subunit I (<i>Sida crystallina</i>)	20866.9	9.46	20.51
gi 115361509	glutamate-gated chloride channel alpha subunit (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>)	51600.1	9.36	31.15
gi 116874254	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase (<i>Armases miersii</i>)	52094.3	5.01	24.37
gi 48427654	NADH dehydrogenase subunit 1 (<i>Cherax destructor</i>)	34161.9	6.31	13.49
gi 20513962	2-domain hemoglobin protein subunit (<i>Daphnia spinulata</i>)	29456.5	9.01	20.53
Carbohydrate metabolism				
gi 6946697	aconitase (<i>Daphnia pulex</i>)	85887.5	7.03	14.34
gi 20126736	glucose-6-phosphate isomerase (<i>Alpheus colombiensis</i>)	13894.9	8.22	26.64
gi 89521254	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>Cambarus hamulatus</i>)	29668.7	5.79	23.02
gi 6688857	phosphoenolpyruvate carboxykinase (<i>Nephrops norvegicus</i>)	71617.6	6.90	33.21
gi 705408	phosphoglucose isomerase (<i>Calanus finmarchicus</i>)	34460.6	6.05	26.64
gi 3885968	phosphopyruvate hydratase (<i>Penaeus monodon</i>)	47265.7	6.18	20.97
gi 19848023	triosephosphate isomerase (<i>Archaeopotamobius sibiriensis</i>)	24371.6	5.33	5.8
gi 74046621	putative glycogen synthase (<i>Nebalia hessleri</i>)	36712.8	7.35	26.46
gi 113374110	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (<i>Lindernia crustacea</i>)	48713.2	7.20	9.98

续表

登录号	蛋白质[物种名称]	分子量	等电点 pI	多肽覆盖率(%)
Amino acid and lipid metabolism				
gi 21358765	dopamine beta hydroxylase (<i>Homarus americanus</i>)	46610.1	5.31	19.08
gi 108744354	glutathione reductase (<i>Tigriopus japonicus</i>)	49637.8	6.55	24.45
gi 113207860	glutamate dehydrogenase (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	52448.6	6.68	10.97
gi 13752282	aldoketoreductase-like protein (<i>Orconectes limosus</i>)	37628	8.70	29.46
gi 4894766	phospholipid phospholipase C beta isoform (<i>Homarus americanus</i>)	128555.1	7.41	10.22
gi 71534669	trypsin (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>)	26415.7	4.98	14.86
Calcium homeostasis				
gi 41018885	crustacean calcium-binding protein 23 (<i>Homarus americanus</i>)	15055.9	5.46	31.39
gi 8272624	frequenin (<i>Procambarus clarkii</i>)	19091.5	5.53	36.2
gi 74849932	orchestrin precursor (<i>Orchestia cavimana</i>)	14578.7	4.46	26.56
gi 134315	Sarcoplasmic calcium-binding protein, beta chain (<i>Penaeus</i> sp.)	21968.4	4.52	14.06
Antioxidant				
gi 41323499	catalase (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	57268.8	6.71	23.37
Protein synthesis and processing				
gi 13111506	elongation factor-2 (<i>Cypridopsis vidua</i>)	81175.4	6.15	15.7
gi 56112341	ribosomal protein L10 (<i>Callinectes sapidus</i>)	25457.6	10.19	37.73
gi 51965684	translation initiation factor 2 gamma subunit (<i>Daphnia magna</i>)	54358.2	9.24	18.27
gi 104508999	argonaute (<i>Penaeus monodon</i>)	104910.1	9.36	12.25
gi 44829119	ribosomal protein L24 (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	18184.4	11.60	15.24
Protein folding, sorting and degradation				
gi 107910630	70 kD heat shock protein (<i>Rimicaris exoculata</i>)	67053.8	5.40	31.91
gi 57117799	heat shock protein 90 (<i>Homarus americanus</i>)	40057.8	5.28	19.64
gi 510473	polyubiquitin (<i>Artemia franciscana</i>)	78387.6	8.46	37.45
gi 625174	ubiquitin (<i>Artemia franciscana</i>)	25294.7	6.42	32.44
Growing and development				
gi 86129739	vitellogenin (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	283645.4	6.13	32.62
Cell cycle				
gi 54660743	cyclin B (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	45163.1	8.98	21.45
Transcription				
gi 38232235	RNA polymerase II largest subunit (<i>Artemia salina</i>)	49865.8	7.58	25.17
gi 260525	histone H1 (<i>Tigriopus californicus</i>)	19195.4	10.82	20.44
gi 83376040	mitochondrial RNA polymerase (<i>Tigriopus californicus</i>)	132506.2	9.07	17.32
Signal transduction				
gi 48479033	heterotrimeric GTP-binding protein alpha subunit G-alpha-q (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	41393.0	5.16	9.63
gi 575677	putative serine proteinase inhibitor (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	47122.6	5.96	28.67
gi 72139259	thrombospondin (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	102033.3	4.11	11.41

表 2 鉴定得到血浆蛋白的分类

Fig.2 Classification of the proteins identified in Chinese shrimp plasma

功能分类	蛋白质个数	功能分类	蛋白质个数
细胞结构和骨架	6	蛋白质合成与处理	5
免疫功能	16	蛋白质折叠、分拣和降解	4
能量代谢	7	生长和发育	1
碳水化合物代谢	9	细胞周期	1
氨基酸和脂类代谢	6	转录	3
钙离子平衡	4	信号转导	3
抗氧化剂	1		

本研究可为进一步找出对虾血浆中与免疫相关的关键蛋白打下基础,这对于病害的早期诊断和从蛋白质水平研究病害的发病机理具有积极的意义,为虾类病害的防治提供新的思路与途径。

参 考 文 献

- 江晓路,刘树青,牟海津等,1999. 真菌多糖对中国明对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响. *动物学研究*, 20(1): 41—45
- 相建海,2001. 海水养殖生物病害发生与控制. 北京: 海洋出版社, 1—15
- 郭志勋,冯娟,王江勇等,2006. 斑节对虾血淋巴细胞对鳃弧菌的清除作用. *中国水产科学*, 13: 28—31
- Destoumieux D, Bulet P, Loew D *et al*, 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamea* (Decapoda). *J Biol Chem*, 272: 28398—28406
- Liu H, Sadygov R G, Yates J R, 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 76: 4193—4201
- Peng J, Elias J E, Thoreen C C *et al*, 2003. Evaluation of multi-dimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res*, 2: 43—50
- Shen Y Q, Xiang J H, Wang B *et al*, 2004. Discovery of immune related factors in *Fenneropenaeus chinensis* by annotation of ESTs. *Progress in Natural Science*, 14(1): 47—54
- Shevchenko A, Jensen O N, Podtelejnikov A V *et al*, 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 14440—14445
- Wyatt G R, Pan M L, 1978. Insect plasma proteins. *Ann Rev Biochem*, 47: 779—817

PROFILING THE PLASMA PROTEOME OF *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* WITH SDS-PAGE AND LC-MS/MS

HUANG Bing-Xin^{1,2}, JIANG Hao^{1,2}, ZHANG Ji-Quan¹, XIANG Jian-Hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

Abstract Plasma, as a major component of hemolymph, plays important physiological functions in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* immunity. However, it is difficult to analyze plasma proteome by 2-DE because plasma is a complicated and dynamically changing system, consisting of different types and abundant proteins. In this study, SDS-PAGE pre-fractionation combined with LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) was applied to achieve more comprehensive proteome profiles of plasma proteins. 66 non-redundant proteins were identified in this research. By means of bioinformatics, the identified proteins was classified in terms of functions in transcription, structural and cytoskeletal, signal transduction, protein synthesis, protein folding-sorting-degradation, immunity, growth performance, energy metabolism, cell cycle, carbohydrate metabolism, calcium homeostasis, antioxidant and amino acid, and lipid metabolism, which shall enhance our understanding on the immunity mechanisms of Chinese shrimp.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, Plasma, Proteome