

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15067

与凡纳滨对虾抗副溶血弧菌有关的 6.0 kD 血蓝蛋白降解肽段

张泽蕙, 黄河, 文英, 钟名其, 伦镜盛, 章跃陵

汕头大学 理学院生物学系 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063

摘要: 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象, 采用人工感染、Tricine-SDS-PAGE、Western-blotting、MALDI-TOF/TOF、抑菌实验等方法对血蓝蛋白小分子降解肽段进行研究。结果发现, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)刺激对虾 24 h 后, 与对照组相比, 其血淋巴中新出现 5 个分子量为 6.0~31.0 kD 的与兔抗血蓝蛋白抗体呈阳性的小分子条带。其中, 分子量为 6.0 kD 的 a 条带(命名为 HMCp6 肽段)与凡纳滨对虾血蓝蛋白具有高度同源性, 对副溶血弧菌具有明显的抑菌活性, 与对照组相比, 存在极显著性差异($P < 0.01$)。由此说明, HMCp6 应该是对虾感染副溶血弧菌后所产生的一种新的小分子降解肽段, 推测其在对虾抗感染防御中发挥重要作用。

关键词: 凡纳滨对虾; 血蓝蛋白; 降解肽段; HMCp6; 抑菌活性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0218-07

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。有趣的是, 近年来研究发现其不仅具有输氧功能, 而且还可以通过多种方式参与机体的免疫防御^[1-2], 包括具有酚氧化酶活性^[3]、抗病毒^[4]、抗菌^[5-7]、溶血^[8-9]、抗肿瘤^[10]等多种免疫学功能, 甚至还可作为免疫刺激物^[11-12]提高机体免疫学活性。尤其是, 随着血蓝蛋白研究的不断深入, 人们发现对虾血蓝蛋白还可产生类似抗菌肽的小分子^[13-14]。Destoumieux-Garzón 等^[13]研究报道南美对虾(*Penaeus vannamei*)和南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)血蓝蛋白 C 末端能够降解产生 3 种具有抗真菌活性的小分子片段; Lee 等^[14]发现淡水小龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)血蓝蛋白 C 末端可降解产生一种分子量约 1.9 kD 的有广谱抗菌作用的肽段; 本课题组以往研究发现, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)后, 血清中出现一种分子量 28.5 kD 血蓝蛋白降

解新肽段, 并与对虾抗感染能力呈正相关^[15]。但迄今为止, 与对虾抗菌有关的血蓝蛋白降解片段的研究还不够深入, 为此, 对其进行进一步探索, 对揭示血蓝蛋白产生抗菌降解肽段的作用机制和寻找新的对虾疾病免疫学防治途径等具有重要意义。

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华勋水产有限公司牛田洋养殖基地, 体长约 10 cm。实验用副溶血弧菌为本实验室保存菌种。

1.1.2 试剂 兔抗血蓝蛋白抗血清由本实验室制备, 羊抗兔 IgG-HRP 购于 SINO-AMERICAN 公司; 牛血清白蛋白、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、吐温-20 (Tween-20)、醋酸铵(ammonium acetate)、脱脂奶粉(skimmed milk)、葡萄糖(glucose)、柠檬酸钠购自广州威佳科技有限公司; 二硫苏糖醇

收稿日期: 2015-02-06; 修订日期: 2015-04-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372558); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0922); 广东省自然科学基金项目(S2013010015190); 广东省高等学校科技创新重点项目(2012CXZD0025).

作者简介: 张泽蕙(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫生物学研究. E-mail: 13zhzhang1@stu.edu.cn

通信作者: 章跃陵(1971-), 教授, 博士生导师. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

(DL-dithiothreitol)、溴酚蓝(bromophenol blue)购自 Sigma 公司, 常用试剂购于上海 Sangon 生物工程有限公司; 质谱仪为 MALDI-TOF/TOF 质谱仪 (Applied Biosystem, 4800 型)(中国科学院上海生命科学研究院蛋白质组学研究分析中心)。

1.2 方法

1.2.1 副溶血弧菌悬液的制备 采用课题组以往报道的方法^[16]进行。将副溶血弧菌接种、扩培、离心、洗涤、计数, 并稀释为 3.0×10^7 CFU/mL 的菌悬液, 4℃保存备用。

1.2.2 病原刺激实验 将暂养后的对虾随机分成对照组和实验组 2 组, 每组 11 尾, 分别取 0.1 mL 1.2.1 制备的菌悬液或 0.85% 无菌生理盐水于对虾第 2 和第 3 腹节之间进行肌肉注射, 注射 24 h 后抽取对虾血淋巴用于血浆的制备。

1.2.3 血浆的制备 按王雷等^[17]报道的方法进行。用 1 mL 注射器从对虾心脏抽取血淋巴并与抗凝剂(336 mmol/L NaCl、115 mmol/L 葡萄糖、27 mmol/L 柠檬酸钠、9 mmol/L EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) 1:1 混合, 800 g 离心 10~15 min, 取上清, 于-20℃保存备用。

1.2.4 Tricine-SDS-PAGE 分析 参照 Schagger^[18]报道的方法进行。采用 4% T、3% C 浓缩胶; 10% T、3% C 夹层胶; 16.5% T、3% C 分离胶。电泳结束后, 考马斯亮蓝 R-250 染色, HP ScanJet 3670 扫描仪扫描和 Quantity One 软件分析。

1.2.5 Western-blotting 分析 电泳结束后, 按常规方法进行电转, 5% 脱脂奶粉 25℃封闭 2 h, 分别与兔抗血蓝蛋白抗血清(1:1000)和羊抗兔 IgG-HRP (1:1500) 25℃孵育 2 h 和 1 h, DAB 显色, 同 1.2.4 进行图像扫描和分析。

1.2.6 MALDI-TOF/TOF 鉴定 采用课题组以往报道的方法进行^[19]。用洁净刀片直接从 SDS-PAGE 凝胶上切取待测蛋白条带 a, 依次进行胶内蛋白酶解、MALDI-TOF/TOF 分析和 Mascot 搜索引擎检索(<http://www.matrixscience.com>)。

1.2.7 HMCp6 肽段的纯化与鉴定 参考 Sainz 等^[20]报道的方法进行 HMCp6 肽段的纯化。用洁净刀片直接从凝胶中切取足够量的蛋白条带 a,

100 μL 无菌 Milli-Q 水 4℃浸泡 3 d, 超滤浓缩后按 Wu 等^[21]报道的尿素复性方法进行蛋白复性, 选用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶解的不同浓度梯度的尿素溶液(5 mol/L、3 mol/L、1 mol/L 和 0 mol/L) 4℃透析, Bradford 法测定蛋白浓度, 同 1.2.4 进行 Tricine-SDS-PAGE 鉴定。同时, 以 Milli-Q 水替代切胶回收所得样品为阴性对照。

1.2.8 抑菌活性分析 参照课题组以往研究报道的方法^[22]进行。取 1.2.1 稀释后的菌液 50 μL 与不同稀释浓度蛋白样液(0.126 mg/mL) 50 μL 混匀, 置于 30℃恒温水浴锅中孵育 2 h, 取 50 μL 混合液涂平板, 每组 2 个平行, 37℃倒置培养 12~24 h 后计数菌落并拍照。阴性和阳性对照分别为无菌 Milli-Q 水和卡那霉素(Kanamycin, 0.126 mg/mL)。抑菌率(%)=(阴性对照菌落数-实验组菌落数)/阴性对照菌落数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 对虾感染副溶血弧菌后血浆 Tricine-SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析

如图 1 所示, 副溶血弧菌刺激对虾 24 h 后, 与对照组相比, 其血浆蛋白在 Tricine-SDS-PAGE 图谱上新出现 7 个表达量显著变化的蛋白条带, 其分子量范围为 6.0~31.0 kD。其中 3 个蛋白条带(a、b、c)表达上调, 4 个蛋白条带(d、e、f、g)表达下调。Western-blotting 分析显示, 5 个蛋白条带(a、c、e、f、g)与兔抗血蓝蛋白抗体呈明显阳性。由此推测, 副溶血弧菌刺激对虾后所出现的 5 个蛋白条带可能为血蓝蛋白的降解肽段。

2.2 MALDI-TOF/TOF 分析

为了进一步鉴定上述变化条带是否为血蓝蛋白降解肽段, 选择变化最为明显的分子量为 6.0 kD 的 a 蛋白条带(命名为 HMCp6 肽段)进行 MALDI-TOF/TOF 分析(图 2)。Mascot 软件 MS/MS 及 MS+MS/MS 搜索结果显示, 1089.5325、1108.5752、1226.5814、1599.8016 这 4 个肽段序列与凡纳滨对虾血蓝蛋白大亚基序列(gi|325462537)、小亚基序列(gi|854403) C 末端氨

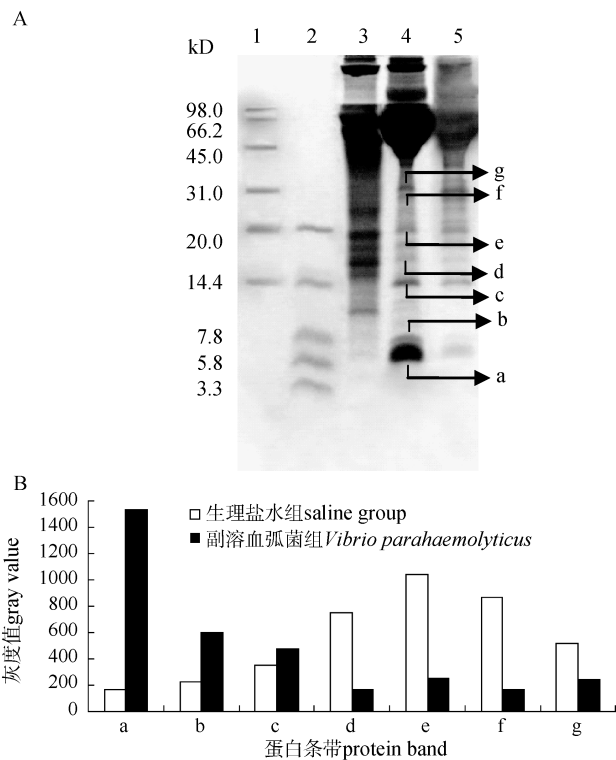


图 1 对虾感染副溶血弧菌前后血浆小分子蛋白表达差异分析

A. 血浆 Tricine-SDS-PAGE 与 Western-blotting 分析; 1~2: 分别为低分子量、超低分子量标准蛋白质; 3~4: 分别为注射生理盐水、副溶血弧菌后血浆 Tricine-SDS-PAGE 分析; 5: 泳道 4 Western-blotting 分析; B. 差异蛋白条带灰度值对比分析.

Fig. 1 Differential expression analysis of low molecular proteins in plasma of *Litopenaeus vannamei* infected with and without *Vibrio parahaemolyticus*

A. Tricine-SDS-PAGE and Western-blotting analysis of plasma of *L. vannamei*; 1~2: Low and super low molecular weight protein markers, respectively; 3~4: Tricine-SDS-PAGE analysis of plasma injected with normal saline and *V. parahaemolyticus*, respectively; 5: Western-blotting analysis of lane 4. B. Comparative analysis of the gray value of altered protein bands.

氨基酸序列具有高度同源性(表 1)。由此推测, HMCp6 肽段可能为凡纳滨对虾血蓝蛋白大亚基

和小亚基 C 末端的降解肽段混合物。

2.3 HMCp6 肽段的纯化与鉴定

采用胶内回收方法纯化 HMCp6 肽段, 如图 3 所示, 所纯化肽段在 Tricine-SDS-PAGE 图谱上表现为分子量约为 6.0 kD 的单一条带, 与图 1 中副溶血弧菌刺激对虾后血浆 Tricine-SDS-PAGE 图谱中的 a 蛋白带大小一致, 说明所纯化的 HMCp6 肽段成分单一, 可进一步用于免疫学活性分析。

2.4 HMCp6 肽段抑菌活性分析

采用平板计数法检测 HMCp6 肽段对病原菌的抑菌活性, 结果发现, HMCp6 肽段对副溶血弧菌具有明显的抑菌活性, 其抑菌率为 98%, 与阴性对照相比, 具有极显著差异(图 4)。由此说明, HMCp6 肽段可能为副溶血弧菌刺激对虾后血蓝蛋白降解所产生的一种新的抗菌降解肽段。

3 讨论

近年来国外学者研究表明, 存在于高等动物甚至低等生物中的一些免疫分子或免疫相关分子可降解产生多种功能性的降解片段, 在机体防御中发挥重要免疫学功能。例如, Kondori 等^[23]发现人乳铁蛋白 N-末端衍生肽 HLopt2 (20-31)对 4 种致病真菌如新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)等具有明显的抑菌活性。Nguyen 等^[24]证实人巨噬细胞炎性蛋白 3α (MIP-3α/CCL20)、白介素 8 (IL-8)、中性粒细胞活性蛋白 2 (NAP-2)、thrombocidin-1 (TC-1)等趋化因子的 C 末端可降解产生不同抗菌活性的抗菌肽。Zhang 等^[25]报道日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)抗菌肽 AJHba 与其肝血红蛋白 α 链序列非常相似。Patat 等^[26]发现南美白对虾组蛋白 H2A 的 N 末端与抗菌肽 buforin 1、

表 1 HMCp6 肽段肽质量指纹图谱用 MS+MS/MS 搜索引擎的检索结果
Tab. 1 Homologous search results of the PMF of HMCp6 peptide fragment by MS+MS/MS search engine

预测分子质量 calculated mass	实际分子质量 observed mass	肽段起始位置 start sequence	肽段结束位置 end sequence	肽段序列 sequence	蛋白名称 protein name	蛋白序列号 accession no.
1089.5225	1089.5325	654	662	VFNHGEHIH	hemocyanin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	gi 854403
1108.5674	1108.5752	640	648	VFEDLPNFK	hemocyanin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	gi 854403
1226.5814	1226.6075	663	672	VFNHGEHIHH	hemocyanin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	gi 325462537
1599.7662	1599.8016	630	642	YPDNRPHGYPLDR	hemocyanin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	gi 325462537

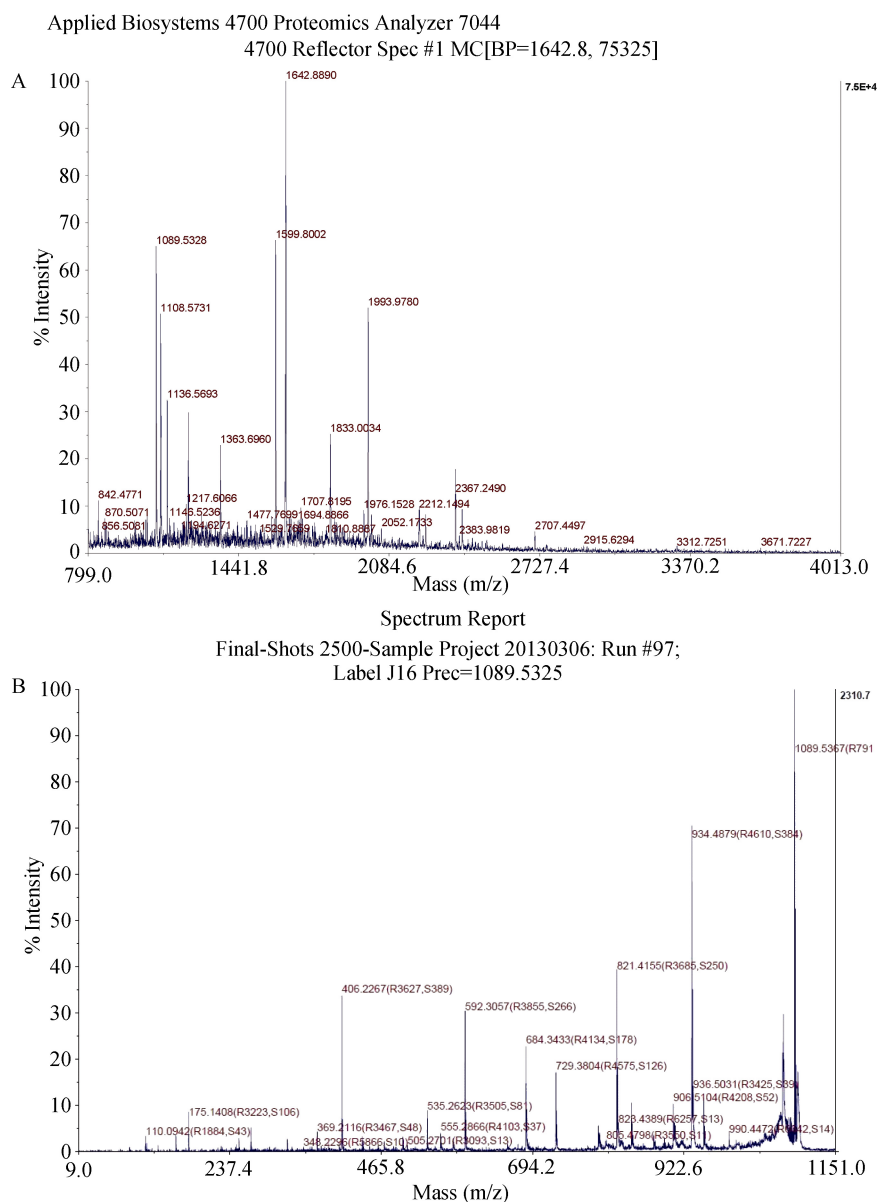


图 2 MALDI-TOF/TOF 鉴定 HMCp6 肽段

A、B 分别为 HMCp6 肽段肽质量指纹图谱及其核质比为 1089.5325 的谱峰 MALDI-TOF/TOF 分析图谱。

Fig. 2 HMCp6 peptide fragment identified by MALDI-TOF/TOF

A and B are peptide mass fingerprint (PMF) spectra of HMCp6 peptide fragment and MALDI-TOF/TOF spectra from one of its spectral peak at m/z 1089.5325.

parasin、hipposin 具有高度同源性。Sila 等^[27]发现鲃鱼(*Barbus callensis*)触须肌动蛋白的蛋白水解产物 (BMPHs) 对金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等 5 种革兰氏阳性菌和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等 5 种革兰氏阴性菌具有抑菌活性。Sathyan 等^[28]在巨蜆 (*Crassostrea madrasensis*)、僧帽牡蛎 (*Saccostrea cucullata*)、文蛤 (*Meretrix casta*)、大批把螺 (*Ficus*

gracilis)、大织纹螺 (*Bullia vittata*) 等多个软体动物血淋巴中发现一种由 25 个氨基酸组成的组蛋白降解肽段, 其与已报道的无脊椎动物组蛋白 H2A 抗菌肽具有高度同源性。

值得一提的是, 最近包括本课题组在内的研究表明, 对虾血蓝蛋白同样可以产生功能性降解片段^[13-15], 但这些研究还不够深入。本研究采用蛋白质组学策略发现, 凡纳滨对虾感染副溶血弧

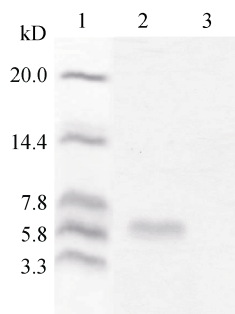


图 3 胶内回收 HMCp6 肽段 Tricine-SDS-PAGE 分析
1: 超低分子量标准蛋白质; 2: 胶内回收 HMCp6 肽段; 3: 阴性对照(Milli-Q 水)。

Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE analysis of HMCp6 peptide fragment by gel extraction method
1: Super low molecular weight protein markers; 2: HMCp6 peptide fragment purified by gel extraction; 3: Negative control (Milli-Q water).

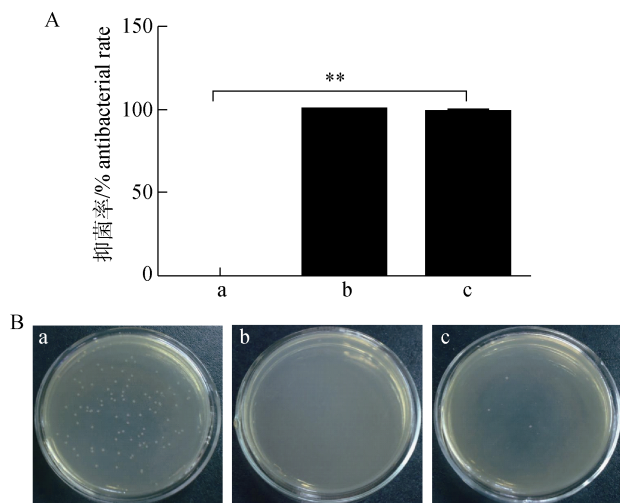


图 4 HMCp6 肽段对副溶血弧菌抑菌活性分析
A. 抑菌率统计分析。**表示与对照组相比较差异显著 ($P<0.01$); B. 抑菌效果图。a: 阴性对照(Milli-Q); b: 卡那霉素(0.126 mg/mL); c: HMCp6 肽段(0.126 mg/mL)。

Fig. 4 Antibacterial activity analysis of HMCp6 peptide fragment by gel extraction method against *Vibrio parahaemolyticus*
A. Statistical analysis of antibacterial activity. **indicates significantly different compared with control ($P<0.01$); B. Effect of antibacterial activity.
a: Negative control (Milli-Q); b: Kanamycin (0.126 mg/mL); c: HMCp6 peptide fragment (0.126 mg/mL).

菌后, 其血浆中新出现 5 个与抗血蓝蛋白抗体发生特异性结合的小分子肽段, 其中 HMCp6 肽段经质谱鉴定与凡纳滨对虾血蓝蛋白具有高度同源性, 与 Chongsatja 等^[29]报道的桃拉综合征病毒 (Taura syndrome virus, TSV)刺激南美白对虾后,

其血细胞中源于 C、N 末端的血蓝蛋白降解肽段变化明显的结果相似。由此说明, 对虾受病原刺激后其血蓝蛋白确实可以产生多个降解肽段。

为了探索 HMCp6 肽段的免疫学活性, 在胶内回收、纯化与复性的基础之上进一步检测其对病原菌的抑菌活性。有趣的是, 本研究发现 HMCp6 肽段对副溶血弧菌具有明显的抑菌活性, 与 Lee 等^[14]发现淡水小龙虾血蓝蛋白可以降解产生一种分子量为 1.9 kD 的抗菌降解肽段的结果相似。由此提示, HMCp6 肽段应该是对虾感染副溶血弧菌后所产生的一种新的降解肽段, 其与以往研究者所报道的血蓝蛋白降解肽段大小存在差异的原因^[13-15, 29], 可能与种属差异及研究方法不同等有关。

综上所述, 本研究发现副溶血弧菌刺激对虾后, 其血蓝蛋白可产生 1 种新的分子量约为 6.0 kD 的具有抗菌活性的降解肽段 HMCp6。所获研究结果为进一步阐明血蓝蛋白抗菌降解肽段的形成机制及其在对虾免疫防御中的作用和地位奠定了良好的基础。至于本研究所发现的其他种与血蓝蛋白抗体呈阳性的肽段是否为血蓝蛋白的降解肽段以及其是否同样具有抗菌活性, 还有待于通过质谱鉴定、免疫学分析等进一步研究和证实。

参考文献:

- [1] Zhang Y L, Luo Y, Peng X X. Advancement on the function of hemocyanin[J]. Marine Sciences, 2007, 31(2): 77-80. [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.]
- [2] Coates C J, Nairn J. Diverse immune functions of hemocyanins[J]. Dev Comp Immunol, 2014, 45(1): 43-55.
- [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: 17796-17799.
- [4] Zhang X B, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*[J]. Antiviral Res, 2004, 61(2): 93-99.
- [5] Jiang N X, Tan N S, Ho B, et al. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy[J]. Nat Immunol, 2007, 8: 1114-1122.
- [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(4): 815–821.
- [7] Yan F, Zhang Y L, Jiang R P, et al. Identification and agglutination properties of hemocyanin from the mud crab (*Scylla serrata*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 354–360.
- [8] Zhang Y L, Yan F, Hu Z, et al. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 330–335.
- [9] Yan F, Qiao J, Zhang Y L, et al. Hemolytic properties of hemocyanin from mud crab *Scylla serrata*[J]. J Shellfish Res, 2011, 30(3): 957–962.
- [10] Riggs D R, Jackson B J, Vona-Davis L, et al. *In vitro* effects of keyhole limpet hemocyanin in breast and pancreatic cancer in regards to cell growth, cytokine production, and apoptosis[J]. Am J Surg, 2005, 189(6): 680–684.
- [11] Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, et al. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e87240.
- [12] Arancibia S, Campo M D, Nova E, et al. Enhanced structural stability of *Concholepas* hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(3): 688–699.
- [13] Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, et al. Anti-fungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 47070–47077.
- [14] 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: 7927–7933.
- [15] Zhang Y L, Ye X Q, Chen J H, et al. A new fragment with 28.5 kD degraded from hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(3): 425–430. [章跃陵, 叶向群, 陈洁辉, 等. 凡纳滨对虾 28.5 kD 血蓝蛋白的降解新片段[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 425–430.]
- [16] Zhang Y L, Wang S Y, Liu G M, et al. Variation of phenoloxidase activity affected by hemocyanin in shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(4): 402–406. [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, 12(4): 402–406.]
- [17] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Measuring methods and variations of some haemolymph factors in *Penaeus chinensis* after their oral ingestion of immuno drugs[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1995, 26(1): 34–41. [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.]
- [18] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 16–22.
- [19] 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(1): 39–54.
- [20] Sainz J C, García-Carreño F L, Hernández-Cortés P. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2004, 138(2): 155–162.
- [21] Wu C L, Söderhäll K, Söderhäll I. Two novel ficolin-like proteins act as pattern recognition receptors for invading pathogens in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. Proteomics, 2011, 11(11): 2249–2264.
- [22] Qiao J, Du Z H, Zhang Y L, et al. Proteomic identification of the relate immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 31(6): 736–745.
- [23] Kondori N, Baltzer L, Dolphin G T, et al. Fungicidal activity of human lactoferrin-derived peptides based on the antimicrobial $\alpha\beta$ region[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(1): 51–57.
- [24] Nguyen L T, Chan D I, Boszhard L, et al. Structure–function studies of chemokine-derived carboxy-terminal antimicrobial peptides[J]. BBA–Biomembranes, 2010, 1798(6): 1062–1072.
- [25] Zhang D L, Guan R Z, Huang W S, et al. Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha in the liver of Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(3): 625–631.
- [26] Patat S A, Carnegie R B, Kingsbury C, et al. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(23–24): 4825–4833.
- [27] Sila A, Nedjar-Arroume N, Hedhili K, et al. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria[J]. LWT–Food Sci Technol, 2014, 55(1): 183–188.
- [28] Sathyan N, Philip R, Chaithanya E R, et al. Identification and molecular characterization of molluskin, a histone-H2A- derived antimicrobial peptide from molluscs[J]. ISRN Mol Biol, 2012, 2012: 1–6.
- [29] Chongsatja P, Bourchookarn A, Lo C F, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon Taura syndrome virus infection[J]. Proteomics, 2007, 7(19): 3592–3601.

A novel 6.0 kD fragment resistant to *Vibrio parahaemolyticus* derived from shrimp, *Litopenaeus vannamei*, hemocyanin

ZHANG Zehui, HUANG He, WEN Ying, ZHONG Mingqi, LUN Jingsheng, ZHANG Yueling

Department of Biology and Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou University, Shantou 515063, China

Abstract: Recent reports have revealed that hemocyanin in shrimp and other invertebrates is a novel multifunctional protein with immunological activities, such as phenoloxidase, antiviral, antibacterial, hemolytic, and antitumor activities. Moreover, several studies—including our own previous findings—indicate that hemocyanin may produce some functional fragments involved in pathogen resistance in shrimp. However, no study has comprehensively evaluated these fragments. We conducted a comparative analysis in the proteome of the shrimp *Litopenaeus vannamei* after the shrimp were infected with *Vibrio parahaemolyticus* for 24 h to search for novel hemocyanin fragments. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting analyses of hemolymph drawn directly from the pericardial sinus revealed five peptide fragments (bands a, c, e, f, g), ranging from 6.0 to 31.0 kD, that bound to anti-shrimp hemocyanin antibodies in plasma, compared with those in the control group, suggesting that they might be hemocyanin degradation products. Moreover, a 6.0 kD peptide fragment (named HMCp6) was subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem time-of-flight mass spectrometry analysis, and the database search results indicated that the HMCp6 peptide fragment was highly homologous with two subunits of *L. vannamei* hemocyanin (gi|325462537 and gi|854403). This result is similar to the finding that the C- and N-terminal hemocyanin fragments are significantly altered in *Penaeus vannamei* hemocytes during Taura syndrome virus infection. The HMCp6 peptide fragment possessed clear antibacterial activities (antibacterial rate, 98%) against *V. parahaemolyticus*. This result agrees with a previous finding that a 1.9 kD antibacterial peptide from *Pacifastacus leniusculus* hemocyanin possesses clear antibacterial activities against Gram-positive bacteria. In conclusion, our data suggest that the HMCp6 peptide fragment might be a novel fragment derived from hemocyanin with a pathogen-resistance function. These results will assist in investigations of the mechanism of these hemocyanin fragments and help to establish strategies for controlling diseases in shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; hemocyanin; degraded fragment; HMCp6; antibacterial activity

Corresponding author: ZHANG Yueling. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn