

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.16214

源于凡纳滨对虾血蓝蛋白化学合成肽段的抗黑曲霉活性

李长平, 杨俊, 黄河, 张泽蕙, 王帆, 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: 选用黑曲霉(*Aspergillus niger*)为研究材料, 采用滤纸片法、显微观察和电镜分析等方法探索 12 种源于凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血蓝蛋白化学合成肽段的抗黑曲霉活性。结果发现, 6 种合成肽段(B2、B10、B13、B14、S7 和 S9)在 80 $\mu\text{g/mL}$ 时能不同程度地抑制黑曲霉的生长, 抑制率为 30%~100%, 其中, S7 和 B10 抑制效果最佳。在此基础上, 进一步选用 B10 分析其对黑曲霉孢子数目和形态的影响。结果显示, B10 不仅可以明显延迟黑曲霉孢子的生长, 而且还可以显著抑制孢子囊的发育。由此推测, 对虾血蓝蛋白可能可以降解产生具有抗黑曲霉活性的功能性肽段, 这对进一步阐明对虾血蓝蛋白功能性降解肽段的免疫学活性及其作用机制具有重要价值。

关键词: 凡纳滨对虾; 生物信息学; 血蓝蛋白; 化学合成肽段; 抗黑曲霉活性

中图分类号: S942

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0189-06

甲壳动物血蓝蛋白约占血淋巴总蛋白的 90% 以上, 是一种含铜呼吸蛋白, 也是一种多功能蛋白, 近年来研究发现其不仅具有输氧功能, 还具有酚氧化酶活性^[1-3]、抗肿瘤^[4-5]、抗病毒^[6-7]、抗菌^[8-11]和溶血^[12-13]等多种免疫学功能。尤其是随着血蓝蛋白研究的深入, 人们发现血蓝蛋白还可产生多种功能性降解片段。Lee 等^[14]在淡水小龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)血淋巴中分离纯化得到一种具有抗菌功能的源于血蓝蛋白 C-末端的小分子肽段(astacidin 1), 同时在脂多糖和葡聚糖刺激下 astacidin 1 的表达显著上调。Destoumieux-Garzon 等^[15]从南美白对虾(*Penaeus vannamei*)和南美蓝对虾(*Penaeus styli rostris*)的血浆中分离出 PvHCt (2.7 kD)、PsHCt 1 (7.9 kD)、PsHCt 2 (8.3 kD) 3 种具有抗真菌活性的多肽, 其与血蓝蛋白 C-末端的相似性为 95%~100%。章跃陵等^[16]和张泽蕙等^[17]研究显示凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)刺激后, 其体内可新产生分子量约为 6.0 kD、28.5 kD 的 2

种肽段, 其与血蓝蛋白具有高度同源性, 其中, 28.5 kD 肽段在血清中含量的高低与对虾抵御病原菌能力的强弱呈正相关, 6.0 kD 肽段对副溶血弧菌有明显的抑菌活性。同时, Wen 等^[18]通过二维电泳、质谱等蛋白质组学技术, 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌 24 h 后, 在其血清中发现一种新的分子量为 18.4 kD 的血蓝蛋白降解新肽段(命名为 HMCS4)。体外凝集实验发现重组表达的 rHMCS4 对 6 种病原菌具有较强的凝集活性。尤其值得一提的是, 本课题组最近采用生物信息学软件(AntiBP Server、CAMP、APD2)预测凡纳滨对虾血蓝蛋白可以产生 34 条不同的功能性降解肽段, 并采用固相化学合成法合成抗菌效果可能较强的 12 种肽段(B1、B2、B3、B9、B10、B11、B13、B14、S7、S8、S9、S10)。抑菌实验显示, 该 12 种化学合成肽段对副溶血弧菌和乙型链球菌(*Streptococcus pyogenes*)具有不同程度的抑制作用^[19]。刘瑶等^[20]发现, 凡纳滨对虾血蓝蛋白具有抗黑曲霉(*Aspergillus niger*)活性, 但这些化学合

收稿日期: 2016-07-20; 修订日期: 2017-06-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372558); 广东省自然科学基金项目(S2013010015190); 广东省高等学校重大科研项目培育计划类项目(2014GKXM043).

作者简介: 李长平(1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫生物学研究. E-mail: 14cpli@stu.edu.cn

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

成肽段是否同样具有抗黑曲霉活性尚不清楚。为此,本研究以该 12 种源于血蓝蛋白的化学合成肽段为研究对象,运用抗真菌实验、显微观察和电镜分析等方法分析其抗黑曲霉的活性及其可能的作用机制,对丰富血蓝蛋白降解肽段免疫学活性及其作用机制的研究具有重要意义,同时为血蓝蛋白降解肽段的实践应用同提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

12 种源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的生物信息学预测肽段^[18]由北京中科亚光生物科技有限公司采用 Fmoc 固相合成法合成,反向高效液相色谱法纯化,具体序列信息见表 1。实验用黑曲霉为汕头大学微生物学实验室馈赠。

表 1 12 条血蓝蛋白生物信息学预测肽段序列
Tab. 1 The prediction of 12 peptide sequences with bioinformatics

编号 number	多肽序列 peptide sequence
B1	DVNFLHKKIYGNIRY
B2	VNFLHKKIYGNIRYS
B3	GGEAVQKLVREVKDG
B9	GVARIRDLLIHESRI
B10	RIRDLLIHESRIRDA
B11	RIRDAIAHGYIVDKV
B13	YYGALHNTAHIVLGR
B14	GRWNAIELDKFWVKL
S7	YYGALHNTAHIVLGR
S8	ELDKFWVSLKGGKTS
S9	LDKFWVSLKGGKTSI
S10	FWVSLKGGKTSIERK

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉的活化 参照 Amiri 等^[21]的方法,将黑曲霉接种于新鲜 PDA 斜面培养基中,置 30℃ 培养箱中培养 3 d,转种 2 次,封口膜封闭,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 黑曲霉菌悬液的制备 取 1.2.1 中的活化好的黑曲霉溶于 3~5 mL 无菌生理盐水,反复吹洗并收集黑曲霉,配成 1.5×10⁷ CFU/mL 的霉菌孢子菌悬液,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 抗黑曲霉分析 参照刘瑶等^[20]的研究方法,

将 1.2.2 中的菌悬液浓度稀释至 3×10⁶ CFU/mL(预实验得出的最佳菌液浓度),取 100 μL 菌液均匀地涂在 6 个 PDA 培养基表面,用无菌镊子夹取直径为 1 cm 的灭菌滤纸片放入含菌平皿中,每皿平均放置 4~5 个。将浓度为 1 mg/mL 过滤除菌的对虾血蓝蛋白化学合成肽段依次稀释为 160 μg/mL、80 μg/mL 和 40 μg/mL,分别取 50 μL 轻轻滴到滤纸片上,4℃ 培养 8~10 h 后,30℃ 倒置培养,观察滤纸片周围霉菌生长情况。以 0.9% 无菌生理盐水和 500 μg/mL 双抗储存液(青霉素和链霉素)分别作为阴性对照和阳性对照。每个样品做 2 组平行。

1.2.4 显微观察 将 B10(浓度为 80 μg/mL)与黑曲霉孢子悬液(浓度为 3×10⁶ CFU/mL)混合,0.9% 无菌生理盐水作为阴性对照,置于 4℃ 孵育 6 h 后涂于 PDA 平板,30℃ 倒置培养。灭菌棉签分别沾取培养 30 h、35 h、40 h 和 45 h 后的黑曲霉,置于装有 1 mL 0.9% 无菌生理盐水的 EP 管中,在 Olympus BX51 显微镜下观察并拍照。

1.2.5 电镜分析 挑取 1.2.4 中对照组和实验组(80 μg/mL 的 B10)形态差异明显的黑曲霉,2.5% 戊二醛固定过夜,0.2 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,分别用浓度为 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇脱水,取脱水后的菌悬液滴于 1 cm×1 cm 的盖玻片上,用导电银胶将玻片固定于样品台上,喷镀导电层,置于 JEOL-JSM 6360LA 扫描型电子显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 12 种化学合成肽段的抗黑曲霉活性分析

首先选取前期研究抗细菌效果较好的源于对虾血蓝蛋白化学合成的肽段 S7 和 B10 探索抗黑曲霉菌的最佳浓度^[18]。如图 1a、1b 所示, S7 和 B10 在浓度为 160 μg/mL、80 μg/mL、40 μg/mL 时均可形成大小不一的抑菌圈,其中浓度为 80 μg/mL 时,两者抑菌效果最佳,其抑菌率为 100% (表 2)。

在此基础之上,进一步分析其他 10 种化学合成肽段在浓度为 80 μg/mL 时对黑曲霉的抗性,结果发现,另外 4 种化学合成肽段: B2、B13、B14、S9 同样可以不同程度的抑制黑曲霉的生长,其抑菌率分别为 70%、60%、30%、80%,而其他 6 种

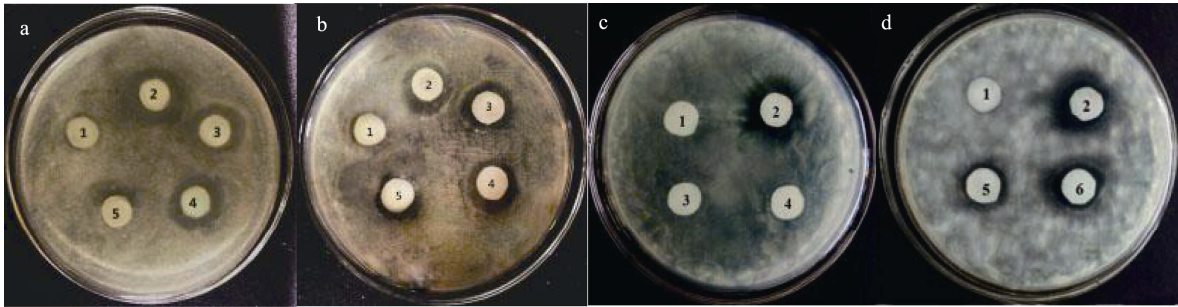


图 1 源于对虾血蓝蛋白化学合成肽段的抗黑曲霉活性

a、b. 分别为化学合成肽段 S7、B10 抗黑曲霉活性分析; 1: 0.9% 无菌生理盐水; 2: 500 μg/mL 双抗储存液(青霉素和链霉素); 3~5: 分别为 160 μg/mL、80 μg/mL 和 40 μg/mL 的化学合成肽段 S7 或 B10。
c、d. 80 μg/mL 化学合成肽段 B9、B11、B14 和 S9 抗黑曲霉活性分析;
1: 0.9% 无菌生理盐水; 2: 500 μg/mL 双抗储存液(青霉素和链霉素); 3~6: 分别为 80 μg/mL 化学合成肽段 B9、B11、B14 和 S9。

Fig. 1 Activity of anti-*Aspergillus niger* of chemical synthesis peptides from shrimp hemocyanin
a, b. Activity of anti-*Aspergillus niger* of chemical synthesis peptides S7 and B10, respectively. 1: 0.9% stroke-physiological saline solution; 2: 500 μg/mL of penicillin-streptomycin solution; 3~5: 160 μg/mL, 80 μg/mL, 40 μg/mL of chemical synthesis peptides S7 and B10, respectively. c, d. Activity of anti-*Aspergillus niger* of 80 μg/mL chemical synthesis peptides B9, B11, B14 and S9. 1: 0.9% stroke-physiological saline solution; 2: 500 μg/mL of penicillin-streptomycin solution; 3~6: 80 μg/mL chemical synthesis peptides B9, B11, B14 and S9, respectively.

表 2 12 种源于对虾血蓝蛋白化学合成肽段的抗黑曲霉活性

Tab.2 Anti- <i>Aspergillus niger</i> activities of 12 chemical synthesis peptides from shrimp hemocyanin														
指标 item	B1	B2	B3	B9	B10	B11	B13	B14	S7	S8	S9	S10	阴性对照 negative control	阳性对照 positive control
抑菌圈直径/cm the diameter of inhibition zone	1	1.7	1	1	2.0	1	1.6	1.3	2.0	0	1.8	1	1	2.2
抑菌率/% inhibition rate	0	70	0	0	100	0	60	30	100	0	80	0	0	100

注: 滤纸片直径为 1 cm; 抑菌率=(实验组抑菌圈-阴性对照抑菌圈)/阴性对照抑菌圈×100%。
Note: The diameter of filter paper is 1 cm. Inhibition rate=(inhibition zone of experiment group-inhibition zone of negative group)/inhibition zone of negative group×100%.

化学合成肽段与黑曲霉孵育后, 未见可见的抑菌圈(图 1c、1d, 表 2)。

2.2 化学合成肽段 B10 对黑曲霉孢子数目和形态的影响

基于上述研究结果, 选取抑菌效果最佳的化学合成肽段 B10, 采用显微观察和电镜分析技术进一步分析其对黑曲霉孢子数目和形态的影响。如图 2 所示, 与对照组相比, 实验组在 30 h、35 h 和 40 h 时孢子数目显著减少 50%~90%, 45 h 时孢子数目无明显变化。尤其是孢子囊形态显著变小, 其中对照组、实验组孢子囊直径分别为 35 μm、15 μm (图 3)。由此推测, 源于对虾血蓝蛋白的化

学合成肽段可能通过延迟黑曲霉孢子的生长、抑制孢子囊的发育等方式而发挥抗黑曲霉活性。

3 讨论

对虾血蓝蛋白是一种具有酚氧化酶活性、抗病毒、抗菌、溶血和抗肿瘤等多种免疫学功能的蛋白^[22], 同时, 血蓝蛋白也可以降解产生具有免疫学功能的降解片段, 如 Destoumieux-Garzon 等^[15]和 Petit 等^[23]在对虾血浆中分离得到 3 种源于血蓝蛋白 C-末端的具有抗真菌功能的抗菌肽, 进一步通过固相化学合成其中的 PvHCt(2.7 kD), 发现其对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)具有高效的抗

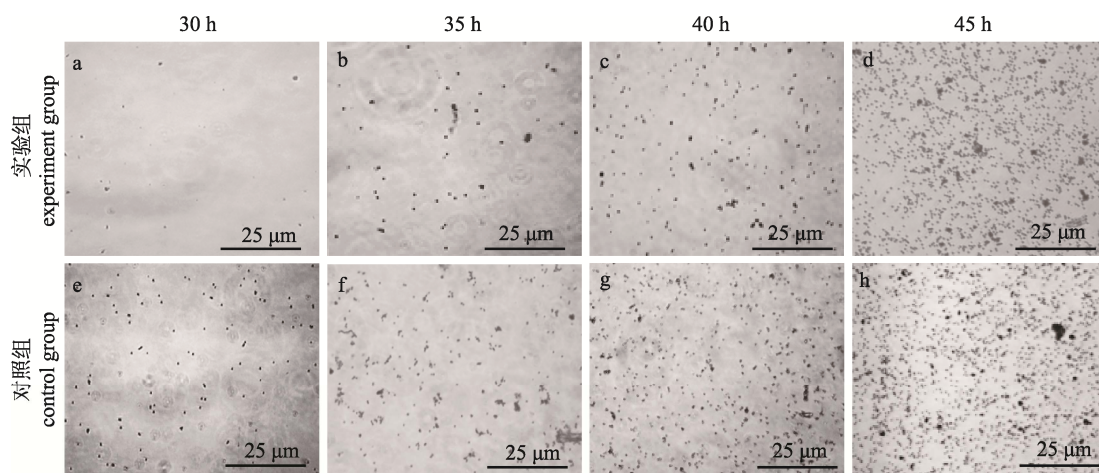


图 2 B10 抗黑曲霉活性显微动态分析(400×)

a~d 分别为 B10 与黑曲霉作用 30 h、35 h、40 h、45 h; e~h 分别为 0.9% 无菌生理盐水与黑曲霉作用 30 h、35 h、40 h、45 h.

Fig. 2 Dynamical microscopic analysis of anti-*Aspergillus niger* activity of B10 (400×)

a~d. Interaction of B10 and *Aspergillus niger* for 30 h、35 h、40 h、45 h, respectively; e~h. Interaction of 0.9% stroke-physiological saline solution and *Aspergillus niger* for 30 h、35 h、40 h、45 h, respectively.

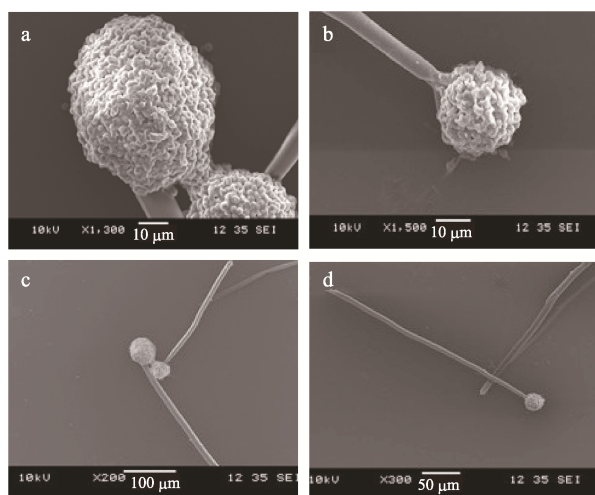


图 3 B10 抗黑曲霉活性电镜分析

a, c. 0.9% 无菌生理盐水; b, d. B10.

Fig. 3 Electron microscope analysis of anti-*Aspergillus niger* activity of B10

a, c. 0.9% stroke-physiological saline solution; b, d. B10.

性, 而且其活性与 α -螺旋结构有关。Qiu 等^[24]通过毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达中国明对虾(*Penaeus chinensis*)血蓝蛋白 C-末端的 rFCHc-1、rFCHc-2 2 种肽段, 发现这 2 种肽段分别对炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)和灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)具有明显的抗菌活性。Choi 等^[25]发现源于淡水小龙虾血蓝蛋白的抗菌肽 astacidin 1 对白色念珠菌(*Candida albicans*)的生长具有明显

的抑制作用。本课题组前期研究发现凡纳滨对虾在副溶血弧菌感染后, 其体内分别产生 6.0 kD、18.4 kD 和 28.5 kD 3 种具有不同程度抗菌效果的血蓝蛋白降解片段。有趣的是, 本课题组最近通过生物信息学、化学合成和抑菌实验等发现源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的 12 种分子量约为 1.6 kD 化学合成肽段(表 1)具有抗菌活性, 且生物信息学分析表明这些肽段可以形成与抗菌肽相类似的 α -螺旋和 β -折叠结构^[18, 22], 与已报道的对虾血浆中分离的抗菌肽段相比, 合成肽段 S8、S9 和 S10 位于 Wen 等^[18]报道的 HMCS4 的 N 端的 α -螺旋区, 其他合成肽段尚未发现类似同源性报道。那么这些合成肽段是否同样具有抗真菌活性尚不清楚, 有待进一步研究。

为此, 本研究采用滤纸片法进一步探索 12 种源于对虾血蓝蛋白的化学合成肽段对黑曲霉的抗性, 发现 12 种肽段与黑曲霉作用后, 与对照组相比, 6 种肽段(B2、B10、B13、B14、S7、S9)在 80 μ g/mL 时纸片周围出现大小不等的抑菌圈, 显示其具有抗黑曲霉活性。与刘瑶等^[20]报道的凡纳滨对虾血蓝蛋白抗黑曲霉活性相比, 这些合成肽段的活性较高, 前者约为后者的 1%~10%。但是, 与 Destoumieux-Garzon 等^[15]和 Qiu 等^[24]报道的在体内分离和真核表达的肽段相比, 其抗真菌活性

较弱,前者约为后者的 3~15 倍。由此推测,血蓝蛋白降解肽段具有比血蓝蛋白更强的抗真菌活性,至于其活性大小可能与肽段的大小、结构、纯化方式以及物种差异性等有关。

为进一步研究其抗黑曲霉作用机制,采用显微观察和电镜分析的方法发现肽段 B10 与黑曲霉作用 30~40 h 后孢子数与对照组相比显著减少,而且其孢子囊的发育受到抑制,但是菌丝的形态无显著变化,与 Choi 等^[25]所报道的淡水小龙虾血蓝蛋白降解肽段 astacidin 1 通过增加真菌膜通透性和 K^+ 的释放而诱导真菌细胞膜破裂的作用机制存在差异,与刘瑶等^[20]前期发现的对虾血蓝蛋白全蛋白抗黑曲霉的作用机制存在不同。由此推测,血蓝蛋白全蛋白及其不同的降解肽段对不同的真菌可能存在不同的抗性机制,该抗性机制还有待于进一步研究和证实。

综上所述,本研究发现 6 种源于凡纳滨对虾血蓝蛋白的化学合成肽段对黑曲霉具有明显的抗性,可能与抑制黑曲霉孢子囊的生长发育有关。本研究为进一步阐明血蓝蛋白产生抗菌肽段的种类、功能及其形成机制等奠定了良好的基础,为寻找新的对虾病害防控策略提供了科学依据与新的思路,促进我国对虾养殖业的健康、持续发展。至于这些化学合成肽段是否还具有其他的免疫学功能及其在对虾先天免疫系统中的作用有待于进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] Glazer L, Tom M, Weil S, et al. Hemocyanin with phenoloxidase activity in the chitin matrix of the crayfish gastrolith[J]. Journal of Experimental Biology, 2013, 216(10): 1898-1904.
- [2] Raynova Y, Doumanova L, Idakieva K N. Phenoloxidase activity of *Helix aspersa* maxima (garden snail, gastropod) hemocyanin[J]. Protein Journal, 2013, 32(8): 609-618.
- [3] Coates C J, Nairn J. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity: a contributing factor to hyperpigmentation in *Nephrurus norvegicus*[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1-2): 361-369.
- [4] Gesheva V, Chausheva S, Mihaylova N, et al. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma[J]. BMC Immunology, 2014, 15: 34.
- [5] Zheng L, Zhao X, Zhang P, et al. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* has antiproliferative effect against HeLa cell *in vitro*[J]. PLoS ONE, 2016, 11(3): e0151801.
- [6] Zhang X B, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*[J]. Antiviral Research, 2004, 61(2): 93-99.
- [7] Zanjani N T, Sairi F, Marshall G, et al. Formulation of abalone hemocyanin with high antiviral activity and stability[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 53: 77-85.
- [8] Li Z, Tang B, Zhang H. Investigation on the interaction between an antimicrobial in aquaculture, malachite green and hemocyanin from mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, 135: 669-675.
- [9] 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]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(4): 815-821.
- [10] 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 Immunology, 2011, 30(1): 354-360.
- [11] Wang J, Zhang F Y, Song W, et al. Characterization of hemocyanin from the mud crab *Scylla paramamosain* and its expression analysis in different tissues, at various stages, and under *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 16639-16651.
- [12] Zhang Y L, Yan F, Hu Z, et al. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 330-335.
- [13] Yan F, Qiao J, Zhang Y L, et al. Hemolytic properties of hemocyanin from mud crab *Scylla serrata*[J]. Journal of Shellfish Research, 2011, 30(3): 957-962.
- [14] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(10): 7927-7933.
- [15] Destoumieux-Garzón 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]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(50): 47070-47077.
- [16] Zhang Y L, Ye X Q, Chen J H, et al. A novel 28.5kDa fragment derived from shrimp, *Litopenaeus vannamei*, hemocyanin[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.]
- [17] Zhang Z H, Huang H, Wen Y, et al. A novel 6.0 kDa fragment resistant to *Vibrio parahaemolyticus* derived from shrimp, *Litopenaeus vannamei*, hemocyanin[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 218-224. [张泽惠, 黄河, 文英, 等. 与凡纳滨对虾抗副溶血弧菌有关的 6.0 kDa 血蓝蛋白降解肽段[J]. 2016, 23(1): 218-224.]
- [18] Wen Y, Zhan S, Huang H, et al. Identification and characterization of an 18.4 kDa antimicrobial truncation from

- shrimp *Litopenaeus vannamei* hemocyanin upon *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 56: 450-458.
- [19] Huang H. Identification of the hemocyanin-derived fragments from shrimp *Litopenaeus vannamei* and investigation of their antibacterial activities and related-degradation enzymes[D]. Shantou: Shantou University, 2013. [黄河. 凡纳滨对虾血蓝蛋白抗菌降解肽段的鉴定、抑菌活性的分析及其相关降解酶的探索[D]. 汕头: 汕头大学, 2013.]
- [20] Liu Y, Chen R H, Wang Z H, et al. Anti-*Aspergillus niger* property of hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 802-807. [刘瑶, 陈若泓, 王泽焕, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白的抗黑曲霉活性[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 802-807.]
- [21] Amiri A, Holb I J, Schnabel G. A new selective medium for the recovery and enumeration of *Monilinia fruticola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* from stone fruits[J]. Phytopathology, 2009, 99(10): 1199-1208.
- [22] Coates C J, Nairn J. Diverse immune functions of hemocyanins[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2014, 45(1): 43-55.
- [23] Petit V W, Rolland J L, Blond A, et al. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, 1860(3): 557-568.
- [24] Qiu C, Sun J, Liu M, et al. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and antimicrobial analysis of two C-terminal fragments[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(1): 46-53.
- [25] Choi H, Lee D G. Antifungal activity and pore-forming mechanism of astacin 1 against *Candida albicans*[J]. Biochimie, 2014, 105: 58-63.

Anti-*Aspergillus niger* activities on the chemical synthesis peptides derived from hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei*

LI Changping, YANG Jun, HUANG He, ZHANG Zehui, WANG Fan, ZHANG Yueling

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

Abstract: Hemocyanin is an extracellular copper-containing protein present in the hemolymph of both mollusks and arthropods. Several studies have shown that hemocyanin could produce some fragments with antibacterial and antifungal activities. Interestingly, we recently found 12 chemically synthesized peptides, predicted by bioinformatics, derived from hemocyanin in the shrimp *Litopenaeus vannamei*, that possessed obvious resistance to *Vibrio parahaemolyticus* and *Streptococcus pyogenes*. However, to date little is known about antifungal activities of these peptides. Here, by using the methods of chemical synthesis, antifungal experimentation, and microscopy, we attempted to determine the anti-*Aspergillus niger* activity of the 12 chemically synthesized peptides and the possible mechanism. Our results showed that six synthetic peptides (B2, B10, B13, B14, S7, and S9) exhibited obvious anti-*A. niger* activity at a concentration of 80 µg/mL, with the inhibition rate ranging from 30% to 100%. We selected B10 for further analysis, including the effect of concentration and shape of *A. niger* spores. Light microscopy and scanning electron microscopy analyses showed that the sporangium of *A. niger* grew more slowly under the action of B10 and the experimental groups treated for 30 h, 35 h, and 40 h had significantly reduced spore numbers (50%–90%); additionally, the sporangial morphology of the experimental groups was significantly smaller than that of the control group. Thus, it was preliminarily shown that six of the 12 chemically synthesized peptides from *L. vannamei* developed anti-*A. niger* activities by inhibiting sporangium growth. This research is of significant value in explaining the immunological activity and functional mechanism of the fragments of shrimp hemocyanin.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; bioinformatics; hemocyanin; chemically synthesized peptides; anti-*Aspergillus niger* activity

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