

甲壳动物抗菌肽研究进展

Research progress on the study of antimicrobial peptide from crustacea

黄文树¹, 王克坚², 李少菁¹

(1. 厦门大学 海洋系 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 海洋环境科学教育部重点实验室 福建 厦门 361005)

中图分类号: S94 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)02-0064-05

滥用抗生素增强了微生物耐药性,而新药开发却相对滞后,迄今,几乎所有的抗生素仅是早期 15 种左右抗生素的衍生物。近年来在生物体内发现一类具有广谱抗微生物活性的物质——抗菌肽,因其作用靶位与传统抗生素作用模式不同而倍受关注^[1]。抗菌肽研究现已成为医药学、免疫学和分子生物学等研究的新热点。

抗菌肽研究真正兴起是从 20 世纪 80 年代初开始,即 1980 年, Boman 等从美国天蚕 (*Hyatophora cecropia*) 蛹中分离得到具有抗菌活性多肽——cecropins,并于次年在《Nature》上公布了其氨基酸序列,从此揭开了抗菌肽研究的序幕。此后,人们不断地从细菌、真菌,到两栖类、昆虫、高等植物、哺乳动物、直至人类体内,都分离到抗菌肽。到 2002 年 8 月,已从各种真核生物中分离到 700 多种抗菌肽,并确定了部分抗菌肽氨基酸结构和基因序列。

1 抗菌肽种类

一般根据抗菌肽分子的氨基酸序列,二级结构以及其功能不同,可将抗菌肽分为三大类^[2]。

第一类为环型抗菌肽,因其富含半胱氨酸形成分子内二硫桥,而呈发夹式 β 片层结构 (hairpin-like β -sheet) 或者形成 α 螺旋与 β 片层结构的混合构造 ($\alpha\beta$ motif/CS $\alpha\beta$)。

第二类也是最早发现的一类抗菌肽,具有 α -螺旋结构的两亲线性多肽。

第三类为富含脯氨酸或/和甘氨酸线性多肽,有时它们可占氨基酸组成的 25% 以上,富含脯氨酸抗菌肽一般呈二联体或者三联体,特别是形成 Pro-Arg-Pro motif。

有些抗菌肽如对虾的抗菌肽 penaeidin,可能同时

具有其中几类抗菌肽基本特征,如既含有分子内二硫桥,又富含脯氨酸。

2 抗菌肽作用机理

抗菌肽种类繁多,不同抗菌肽作用机制不同,多数抗菌肽杀死靶微生物无需受体介导,可直接作用于细胞膜上,而少数细胞则需要受体的协助才能发挥较好的抗菌作用。

2.1 直接作用于微生物的细胞膜^[3]

多数抗菌肽利用静电作用穿过带负电的细菌细胞壁,达到作用靶位——细胞膜。根据分子结构的不同,抗菌肽穿过细胞膜可有以下两种模式:桶-桶板模 (barrel-stave model) 和毯式模式 (carpet model)。

桶-桶板模式:采用此种模式的抗菌肽主要有 pardaxin, alamethicin 和 δ -endotoxin (内毒素) 的 $\alpha 5$ 螺旋等。此类抗菌肽具有如下特点:(1)有明显的结构特异性,如两性 α -螺旋,疏水性 α -螺旋, β -折叠或者同时具有 α -螺旋和 β -折叠结构;(2)具有杀细菌和溶解红细胞活性;(3)在低于实验观测的摩尔浓度,也有杀菌作用。具体作用过程:单体抗菌肽或寡聚体由于疏水作用而结合到细胞膜上;低浓度膜结合抗菌肽

收稿日期:2002-12-11;修回日期:2003-03-30

基金项目:国家 863 计划资助项目 (2002A603013);厦门市科技局资助项目 (3502Z20021052);福建省科技资助项目“福建省海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究”。

作者简介:黄文树 (1973-),男,福建莆田人,集美大学水产学院讲师,现为厦门大学海洋系博士生,研究方向:海洋分子生物学 E-mail: wshuang@jmu.edu.cn

单体相互识别(膜结合抗菌肽寡聚体不再游离),抗菌肽插入到细胞膜的疏水核心,集聚呈“桶状”的小孔;继续吸引其他单体或寡聚体扩大孔径,破坏细胞膜。

毯式模式:采用此种模式的抗菌肽主要有:dermaseptin S, cecropins, 人类的抗菌肽 LL-37, caerin1.1 和 trichogin GA IV 等。该类抗菌肽具有如下特点:(1)多肽链上分布着大量阳性电荷,而无特殊构型;(2)有选择地毒杀细菌,能够识别两性离子和阴性电荷的细胞膜,毒杀细菌而不毒杀正常哺乳动物细胞;(3)超过浓度阈值才有杀菌能力。具体作用过程如下:抗菌肽首先通过静电作用结合到微生物细胞膜的磷脂头部基团上;其次,细胞膜表面上的抗菌肽单体重新排列,使他们的亲水表面朝向磷脂的头部或水分子,旋转分子,重新定位疏水性基团,使其朝向细胞膜的疏水性核心;当达到浓度阈值或局部达到阈值时,抗菌肽通过破坏细胞膜的脂质双层的曲率进而穿过或裂解细胞膜。

2.2 受体介导作用

有些抗菌肽,比如由 *Lactococci* 产生的一种含有 14 个氨基酸的两性分子 nisin,其在纳摩尔水平上即可致死细菌,它是高亲和地结合到 Lipid II 上,通过蛋白聚糖脂肪酰基化作用而固定在细胞细菌的细胞膜上,随后再扩散到周围细胞膜上,致死细菌。有些植物防御素也采取此策略^[4]。其作用机制参见文献^[5]。

实际上抗菌肽是怎样致死微生物?有许多假说来阐述此机理,主要有抗菌肽作用于细胞膜上形成孔道,使细胞内容物特别是钾离子大量渗出,正常细胞膜去极化导致细胞的死亡;诱导降解细胞壁的水解酶激活细胞致死的过程;扰乱细胞膜双层结构脂类分子的正常分布,而干扰细胞膜的功能;或如 pyrrolicoricin 它是内在化后,损伤细胞内的重要的靶分子等^[3]。

3 甲壳动物抗菌肽研究进展

甲壳动物防御系统完全依靠先天的、非获得性免疫机制,即细胞免疫和体液免疫因子。甲壳动物细胞免疫是依靠血细胞完成,三种不同类型的血细胞,即透明细胞(hyaline cell),半颗粒细胞(semigranular cell)和颗粒细胞(granular cell),分别参与不同的机体防御反应。透明细胞参与凝集作用,半颗粒细胞参与包裹作用,颗粒细胞和半颗粒细胞均参与吞噬作用,细胞毒性作用和产生抗菌肽。体液免疫因子位于血淋巴中,包括酚氧化酶和相关组成成分(如 β -1,3-葡聚糖结合蛋白 [β -1,3-GBP] 和脂多糖结合蛋白 [LPSBP] 植物凝集素和抗菌肽等^[6]。

相对于陆地节肢动物而言,甲壳动物抗菌肽研究较少。而有关甲壳动物组织中抗微生物活性的证据却不少,报道血细胞中存在抗菌活性物质的甲壳动物有 *Galathea strigosa*, *Nephrops norvegicus*, *Crangon crangon*, *Glyptonotus antarcticus*^[7]和蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[8]等;血浆有抗菌活性的有 *Panulirus argus*^[9], *Panulirus interruptus*^[10], 斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[11]和白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)^[12];肝胰脏有抗菌活性美洲巨螯虾(*Homarus americanus*)^[13],以上均对革兰氏阴性细菌起到抑制或杀死作用。Pan 等发现蓝蟹、白滨对虾和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的组织提取液,具有抗 DNA 病毒和 RNA 病毒活性^[14]。

虽然抗微生物活性的证据已存在多年,但是直到 1996 年才由 Schnapp 等从三叶真蟹(*Carcinus maenas*)的血细胞溶解产物中首先分离到甲壳动物抗菌肽,并对其中一种 6.5ku 抗菌肽 N-末端进行部分测序,发现其氨基酸序列与哺乳动物的 bactenecin 7 相近。为富含脯氨酸的阳离子两性分子,具有抗革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌活性^[15]。

1999 年 Relf 等从三叶真蟹颗粒细胞中分离到一种 11.5ku 抗菌肽,该蛋白对热稳定,耐高盐,仅对海洋革兰氏阳性细菌有很强杀菌力,10mg/L 即可杀死细菌,也是两性阳离子分子,氨基酸序列与已知抗菌肽序列不同,但与人类抗白细胞蛋白酶同源性^[16]。

1999 年 Jayasankar 等从锯缘青蟹 [*Scylla serrata* (Forsk.)] 精液分离到一种能抑制常见海洋细菌,分子量为 20ku 的抗菌肽。首次报道了无脊椎动物精液。遗憾的是,没有进行序列测定的研究工作报道^[17]。

同年, Khoo 等报道了从蓝蟹血细胞中分离到 3.7ku,抗 *E. coli* 活性的抗菌肽——Callinectin,并测定其部分氨基酸序列,发现其氨基末端富含脯氨酸。然而其脯氨酸的排列与其他富含脯氨酸的抗菌肽不同,不形成 Pro-Arg-Pro motif,且与已知抗菌肽同源性弱^[18]。

对甲壳纲的另一大类生物——虾类抗菌肽研究成果令人振奋。叶星等已进行了一些总结^[19]:1994 年 Song 等发现罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)受感染后会诱导产生类似杀菌肽样的物质^[19];1997 年 Destoumieux 等,从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血细胞和血浆中分离几种抗菌肽,测定其中 3 种多肽氨基酸序列,首次报道甲壳动物抗菌肽氨基酸全序列。它们均为富含脯氨酸的阳离子多肽,具有抗真菌和抗细菌活性。用 RT-PCR 筛选凡纳对虾血细胞

cDNA 文库仅获其中两种 penaeidin,测定其核酸序列,推导出氨基酸序列,结果发现其氨基酸序列与分离的抗菌肽不完全一样,其中 cDNA 文库中筛选到的 Penaeidin-2 和 -3 的 C 末端含有甘氨酸,前体分子的 N-末端含有高度保守的信号肽,而分离的抗菌肽却没有此结构,他们认为分离的抗菌肽可能是由其前体分子加工而来,抗菌肽分子成熟加工时,C-末端酰胺化时被去除^[20]。

1999 年 Destoumieux 等进行 penaeidin 基因体外表达研究,并比较体外表达的 penaeidin 与天然的 penaeidin 结构和抗菌活性的差异情况。结果表明它们在结构上存在差异,主要表现为:酵母表达的 penaeidin 分子含末端含有甘氨酸,而天然的 penaeidin C-末端甘氨酸被去除形成 α -酰胺;大约 90% 的重组 pen-3aQ 的第一个氨基酸为谷氨酸,而天然的 pen-3a 的第一个氨基酸为焦谷氨酸。抗菌活性相似,都具有广谱抗真菌和革兰氏阳性细菌,但对革兰氏阴性细菌活性较弱^[21]。

为了研究 penaeidin 在对虾免疫系统中的作用,2000 年 Destoumieux 等用 Northern blot 分析方法和免疫组织化学等方法,系统研究了凡纳对虾抗菌肽合成和储存的部位,结果表明 penaeidin 在血细胞中是以组成型合成,并贮存于颗粒细胞或半颗粒细胞的细胞质中,不存在于透明细胞中。同时研究微生物刺激对 penaeidin 表达的影响,结果发现细菌免疫 3 h 后,循环血细胞中 penaeidin mRNA 水平明显下降,12 h 后恢复到起始水平,24 h 后有轻微上升,但未达到统计学显著水平,这清楚表明微生物免疫刺激不会增强血细胞中 penaeidin 合成水平。而血浆 penaeidin mRNA 在免疫刺激后 3 h 显著增高,6 h 达到最高,24 h 后血浆中 penaeidin mRNA 含量与起始相近,这种变化可能免疫刺激后血细胞被吸引到免疫感染部位有关。由此可以得出,penaeidin 在血细胞中合成,并贮存于颗粒细胞中,当受到刺激后,释放到血浆中。还研究了 penaeidin 几丁质结合能力,发现整个分子具有很强几丁质结合的活性,推测 penaeidin 通过几丁结合特性而结合到对虾的表皮,进而防止微生物入侵^[22]。这些研究奠定了 penaeidin 在对虾防御系统中的地位。

2000 年 Bachere 等总结凡纳对虾抗菌肽结构特点,并与动物体内分离的天然免疫因子进行比较,发现 penaeidin 是另一类的抗菌肽,其分子中含有富含脯氨酸的 N-末端和由 6 个半胱氨酸组成的 3 个分子内二硫桥构成的环状 C-末端。这些特征通常是

分别出现在两种不同的抗菌肽,而 penaeidin 则同时具有这个特点,因此把它列为一类新的抗菌肽。与其他抗菌肽相似之处是它们均为阳离子的小分子肽,且 pen-3a 的翻译后修饰,是通过将 N 末端谷氨酸变成焦谷氨酸而形成环状;pen-2 和 pen-3 的 C 末端在翻译后加工时,因谷氨酸的酰胺化而被去除,这与其它海洋无脊椎动物中分离的抗菌肽 C 末端酰胺化作用相同^[23]。同年, Destoumieux 总结了 penaeidin 的基因结构、抗菌肽结构、基因表达和加工的可能模型,并指出结构与功能间的关系,以及翻译后的加工对其生物活性的影响等。并通过总结基因表达和免疫后 penaeidin 的分布,进而讨论 penaeidin 结构和特性与免疫功能的关系等^[3]。

为了更清楚地认识虾类免疫能力,2001 年 Destoumieux 等继续寻找对虾体内其他的免疫因子,他们采用固相抽提、RP-HPLC 以及凝胶层析等方法,从凡纳对虾血浆一个分子量为 2.7ku 和细角滨对虾 (*Litopenaeus stylirostris*) 血浆中分离到 7.9ku 和 8.3ku 具有抗真菌活性的小分子肽,值得注意的是,它们是阴离子抗菌肽,即 pI 值分别介于 5.65 和 6.54 之间。Edman 降解和质谱分析其初级结构,发现有 95% ~ 100% 氨基酸序列与血蓝蛋白 C 末端氨基酸序列相同。研究对虾血蓝蛋白 C 末端的片段抗菌活性,发现其与这三种抗菌肽相同,即具有抑制真菌的作用,对细菌不抑制。从这些发现,他们推测分离所得这三种抗真菌活性的多肽,可能由血蓝蛋白裂解而来,并认为对虾可能利用血浆中含量丰富且易得血蓝蛋白,裂解产生具有广谱抗真菌活性的 C-末端片段,认为血蓝蛋白可能是抗真菌多肽的物质基础^[24]。

2001 年 Gross 等构建了凡纳对虾和白滨对虾血细胞和肝胰脏的 cDNA 文库,随机选择 2045 个克隆进行测序,发现与免疫功能基因相对应的表达序列标签 (EST) 有 268 个。根据功能不同,将表达序列标签分为 11 大类型,其中含量最多的是 DNA 复制,修饰,转录和翻译的 EST,及 NCBI 数据库中无或相似性很低的新序列。最常见的免疫功能 ESTs 是抗菌肽,主要存在于血细胞文库,它们分别占凡纳对虾和白滨对虾血细胞 cDNA 文库的 17.7% 和 21%。在免疫功能 EST 中 penaeidin ESTs 占绝大多数。虽然白滨对虾中没有报道过 penaeidin,但是其血细胞文库中 penaeidin 含量却较为丰富。成熟 penaeidin 大小约为 50 到 62 个氨基酸,它是由一个约 720 bp mRNA 转录而来,在 5 个 penaeidin 分子中,其中有两个分子序列相差较大,而其他 3

个分子序列相近。分析血细胞文库中 penaeidin 的丰度,发现同一个体中 penaeidin 存在大量的可变序列。他们认为每种多肽可能具有不同生物学特性和功能。另一种普遍存在于 2 个血细胞文库中 EST,其氨基酸序列和三叶真蟹的 11.5ku 抗菌肽相同,由于在进化上三叶真蟹与对虾亲缘关系较远,因此,他们认为该多肽可能是甲壳动物共同的抗菌肽^[25]。

2001 年,相建海等从中国对虾(*Penaeus chinensis*)中克隆到抗菌肽基因。根据其 DNA 序列推测其氨基酸序列,发现中国对虾抗菌肽的氨基端富含甘氨酸和脯氨酸,且甘氨酸含量较高^[26]。

4 展望

4.1 继续分离甲壳类动物抗菌肽

抗菌肽具有高度多样性,除了由高度保守的蛋白质裂解而来的抗菌肽以外,不同种生物都具有其特有的抗菌肽序列,即使是亲缘关系很近的种也不例外。而且每种生物其体内都含有几种至几十种不同的抗菌肽^[5]。为了更好地研究了解甲壳动物的先天免疫机制,应不断地从各不同的生物中分离抗菌肽,特别重视经济甲壳动物及具有潜在经济价值的甲壳动物抗菌肽分离及定性工作,为今后开展转抗菌肽基因的甲壳动物研究,及利用免疫学的方法来控制甲壳动物疾病的研究奠定基础。

另外,目前甲壳动物中分离的抗菌肽绝大多数是抗真菌和细菌,而对于抗病毒及原虫等抗菌肽研究却未见报道。而至今人们对于病毒性疾病仍未开发出较好的特效药,一旦病毒性疾病暴发给经济带来巨大的损失,因而分离具有抑制和/或杀灭病毒的抗菌肽,则显得特别迫切。

4.2 开展甲壳动物个体发育中抗菌肽研究

至今,所有甲壳动物抗菌肽研究均取材于成体,甲壳动物因其个体发育过程较为独特,生活史较为复杂,具有蜕皮循环和变态现象,幼体和成体在身体结构,生理机能都存在非常大的差异。不同生长发育阶段的个体抵抗微生物感染能力应有差异,特别是在甲壳动物蜕皮循环中,机体特别易受微生物感染,抗菌肽这种先天免疫因子可能起到非常重要的作用,因此研究甲壳动物个体不同发育阶段抗菌肽基因表达差异对揭示甲壳动物先天免疫机制具有重要的意义。

4.3 甲壳动物转抗菌肽基因研究

研究甲壳动物抗菌肽一个重要的目的是希望通过基因改造,转抗菌肽基因,使其在甲壳动物体内进行表达从而达到提高甲壳动物抗微生物感染的目的。目前已在其他的水生动物如青鱼中将已开展转抗菌肽基因研究,并有一定成效。今后应加强甲壳动物转抗菌肽基因研究。

另外,由于 DNA 免疫具有其独特的优点(稳定性好,运输方法,生产工艺相对简单等),构建含有抗菌肽基因的重组子,将其转入甲壳动物,利用自身的表达系统大量表达抗菌肽,提高体内的抗菌肽水平,从而达到抵抗疾病的目的。

4.4 在水产养殖中的应用前景及问题

水产养殖中经常性使用抗生素,致使大多数病原菌产生不同程度耐药性,而抗菌肽具有独特抗菌机制,通过修饰改造,完全有可能设计出可替代传统抗生素的新型抗菌肽药物,为药物开发提供新来源和新思路。另外,在饲料中大量使用抗生素作为添加剂,不仅破坏水产养殖动物体内的正常菌群,而且易在动物体内残留,影响到水产品的品质和出口创汇。因此利用基因工程技术体外生产抗菌肽,以替代传统的抗生素,或作为环保型饲料添加剂,不仅可增强水产养殖生物的抗病能力,而且可提高养殖水产品中的质量,因此海洋生物抗菌肽研究开发具有广阔的应用前景。但是,抗菌肽容易被蛋白酶降解,因此研制抗菌肽药物或添加剂时,应注意抗菌肽药物的给药方式、途径和剂型等方面的问题。

参考文献:

- [1] Breithaupt H. The new antibiotics——Can novel antibacterial treatments combat the rising tide of drug-resistant infections[J]? *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 1 165-1 169.
- [2] Destoumieux D, Munoz M, Bulet P, *et al.* Penaeidins, an family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, decapoda)[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000 57: 1260-1271.
- [3] Shai Y and Oren Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides[J]. *Peptides*, 2001, 22: 1 629-1 641.
- [4] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415: 389-395.
- [5] Breukink E and de Kruij B The lantibiotic nisin, a special

- case or not[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1999, 1462: 223 – 234.
- [6] Sderhll K, Wingren A, Johansson M W, *et al.* The cyto – toxic reaction of haemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus* [J]. **Cell Immunol**, 1985, 94: 326 – 332.
- [7] Chisholm J R S, Smith V J. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species[J]. **Comp Biochem Physiol Acta**, 1995, 110: 39 – 45.
- [8] Noga E J, Arroll T A, Fan Z. Specificity and some phys – iochemical characteristics of the antibacterial activity from the blue crab *Callinectes sapidus* [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 1996, 6: 403 – 412.
- [9] Evans E E, Painter B, Evans M L, *et al.* An induced bactericidin in the spiny lobster *Panulirus argus* [J]. **Proc Soc Exp Biol Med**, 1968, 128: 394 – 398.
- [10] Evans E E, Gushing J E, Sawyer S, *et al.* Induced bactericidal response in the California spiny lobster *Panulirus interruptus* [J]. **Proc Soc Exp Biol Med**, 1969, 132: 111 – 114.
- [11] Adams A Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio species* [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 1991, 1: 59 – 70.
- [12] Noga E J, Arroll T A, Bullis R A, *et al.* Antibacterial activity in hemolymph of white shrimp *Penaeus setiferus* [J]. **J Mar Biotechnol**, 1996, 4: 181 – 184.
- [13] Stewart J E, Zwicker B M. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster. *Homarus americanus* : products of hemocyte – plasma interaction [J]. **Can J Microbiol**, 1972, 18: 1499 – 1509.
- [14] Pan J, kurosky A, Xu B, *et al.* Broad antiviral activity in tissues of crustaceans[J]. **Antiviral Res**, 2000, 48: 39 – 47.
- [15] Schnapp D, Kemp G D, Smith V J. Purification and characterization of a proline – rich anti – bacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin 7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. **Eur J Biochem**, 1996, 240: 532 – 539.
- [16] Relf J M, Chisholm J R S, Kemp G D, *et al.* Purification and characterization of a cysteine – rich 11.5kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *carcinus maenas* [J]. **Eur J Biochem**, 1999, 264: 350 – 357.
- [17] Jayasankar V, Subramoniam T. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1999, 236: 253 – 259.
- [18] Khoo L H, Robinet D W, Noga E J. Callinectin an antibacterial peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*, hemocytes [J]. **Mar Biotechnol**, 1999, 1: 44 – 51.
- [19] 叶星, 白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景[J]. **大连水产学院学报**, 2000, 15(4): 274 – 279.
- [20] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *penaeus vannamei* (Decapoda) [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1997, 272(45): 28 398 – 28 406.
- [21] Destoumieux D, Bulet P, Strub J M, *et al.* Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp [J]. **Eur J Biochem**, 1999, 266: 335 – 346.
- [22] Destoumieux D, Munoz M, Cosseau C *et al.* Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin – binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge [J]. **Journal of Cell Science**, 2000, 113: 461 – 469.
- [23] Bachère E. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity [J]. **Aquaculture**, 2000, 191: 71 – 88.
- [24] Destoumieux D, Saulner D, Garnier J, *et al.* Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276: 47070 – 47077.
- [25] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2001, 25: 565 – 577.
- [26] 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制 [M]. 北京: 海洋出版社, 2001. 111 – 117.

(本文编辑: 刘珊珊)