

光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)酚氧化酶 氧化产物的抗菌特性研究*

蒋经伟¹ 程雨卉^{1,2} 周遵春^{1①} 董颖¹ 陈仲¹ 姜北¹ 高杉¹

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院 大连 116023; 2. 大连海洋大学 大连 116023)

摘要 本文通过线性连续梯度非变性电泳结合邻苯二酚发色法分离纯化了光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)体腔液上清中的酚氧化酶(PO), 然后通过生长曲线测定法进行了光棘球海胆 PO 氧化产物的抗菌特性分析。结果显示: (1) 光棘球海胆体腔液上清中存在 3 种 PO (SnPO1, SnPO2, SnPO3), 在聚丙烯酰胺凝胶中与邻苯二酚反应分别呈现褐色、黄色和紫色; (2) 以多巴胺为底物时, SnPO1 的氧化产物对灿烂弧菌 *Vibrio splendidus*、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 有抗菌作用, SnPO2 氧化产物对哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌和拟诺卡式菌 *Nocardopsis* sp. 有抗菌作用, SnPO3 氧化产物仅对哈维氏弧菌和拟诺卡式菌有抗菌作用; (3) 以左旋多巴为底物时, 仅 SnPO2 氧化产物对拟诺卡式菌有抗菌作用; (4) 光棘球海胆 PO 氧化产物对假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas nigrifaciens*、希瓦氏菌 *Shewanella baltica* 和溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 的生长无明显影响。上述结果表明, 在光棘球海胆中, PO 氧化产物具有窄谱抗菌活性, 多巴胺氧化产物的抗菌活力高于左旋多巴氧化产物, 并且不同 PO 亚型的氧化产物具有不同的抗菌谱和抗菌特性。

关键词 光棘球海胆; 体腔液上清; 酚氧化酶; 抗菌特性

中图分类号 Q176 doi: 10.11693/hyhz20141200352

酚氧化酶(PO)是无脊椎动物非特异性免疫应答过程中的关键免疫因子, 紧密参与抗菌、抑菌、病原清除等多种免疫应答过程(Muñoz *et al.*, 2006; Cerenius *et al.*, 2008; 吴曙等, 2009)。PO 自身不具有任何的抗菌、抑菌活性, 其免疫功能是通过氧化底物反应来实现的(Söderhäll *et al.*, 1998; Aladaileh *et al.*, 2007)。在 O₂ 存在的条件下, PO 将酚类底物(如多巴胺、左旋多巴等)氧化成醌, 醌通过非酶促反应最终转化成黑色素, 非酶促反应中生成的活性中间代谢产物和黑色素不仅具有显著的抗菌、抑菌活性, 还参与血细胞迁移、结节和包囊形成、损伤修复等其他免疫应答活动(Bai *et al.*, 1997; Ballarin *et al.*, 1998; Cerenius *et al.*, 2004)。

关于酚氧化酶氧化产物的抗菌特性研究在一些无脊椎动物物种已有报道。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 中, 纯化的 PO 与多巴胺的反应产物对受试的革兰氏阴性(G⁻)细菌(大肠杆菌 *Escherichia coli*, 肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumonia*, 绿脓假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*)和革兰氏阳性(G⁺)细菌(蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus*, 枯草杆菌 *Bacillus subtilis*, 藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*)的生长均有强烈抑制作用, 而 PO 与左旋多巴的反应产物对上述细菌的生长几乎无明显影响(Zhao *et al.*, 2007)。除具有抗菌活性外, 烟草天蛾 PO 与多巴胺的反应产物还对纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV)、噬

*国家 863 项目, 2012AA10A412 号; 国家自然科学基金项目, 31402336 号; 辽宁省科技计划项目, 2014203006 号; 辽宁省海洋与渔业厅项目, 201301 号。蒋经伟, 博士, 助理研究员, E-mail: weijingjiang@live.cn

① 通讯作者: 周遵春, 博士, 研究员, E-mail: zunchunz@hotmail.com

收稿日期: 2014-12-17, 收修改稿日期: 2015-02-14

菌体和寄生黄蜂 *Microplitis demolitor* 的卵有显著抑制作用(Zhao *et al.*, 2011)。淡水龙虾 *Pacifastacus leniusculus* 血细胞破碎液上清(HLS)与多巴胺的混合物对受试的 G^- 细菌(嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、大肠杆菌、绿脓假单胞菌)和 G^+ 细菌(蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae*)也有强烈抑制作用, 此外, 与烟草天蛾中的结果相似, 淡水龙虾 HLS 与左旋多巴的混合物对上述细菌的抑制作用较弱, 甚至无抑制作用(Cerenius *et al.*, 2010)。PO 与多巴胺反应产物的抗菌活性高于 PO 与左旋多巴反应产物这一现象在海洋无脊椎动物栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 和仿刺参 *Apostichopus japonicus* 中也有发现, 然而, 在上述两个物种中, PO 氧化产物仅对受试细菌中的部分细菌表现出抗菌活性(Xing *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014)。纯化的栉孔扇贝 PO 与多巴胺的反应产物仅对溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*、副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 和杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida* 有显著抑制作用, 而对停乳链球菌 *Streptococcus dysgalactiae*、海豚链球菌 *Streptococcus iniae*、溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 和爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 的生长无明显影响(Xing *et al.*, 2012)。在仿刺参中, 纯化出 3 种 PO (AjPO1, AjPO2, AjPO3), 其中 AjPO1、AjPO3 与多巴胺反应产物均可抑制灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 和哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 的生长, 3 种 PO 与多巴胺的反应产物对希瓦氏菌 *Shewanella baltica*、假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas nigrifaciens*、溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、拟诺卡式菌 *Nocardiosis sp.* 的生长无明显影响(Jiang *et al.*, 2014)。此外, 在太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 中, 血细胞破碎液上清与左旋多巴

的混合物对灿烂弧菌和河口弧菌 *Vibrio aestuarianus* 有显著抑制作用(Luna-Acosta *et al.*, 2011)。上述研究表明, PO 氧化产物的抗菌活性除了取决于底物种类外, 还与 PO 所属物种或 PO 种类有关。

光棘球海胆 *Strongylocentrotus nudus* 属于棘皮动物门, 又称大连紫海胆, 是中国北方近海重要的增殖经济物种(湛垚垚等, 2013)。近年来, 随着海胆养殖规模的扩大, 养殖过程中出现一系列病害问题, 影响了海胆养殖的发展(王斌等, 2006; 周玮等, 2008)。了解光棘球海胆的免疫特性对预防和控制海胆病害具有重要意义, 而目前关于海胆 PO 的研究主要是体腔液中的 PO 活力分析(王轶南等, 2011), 尚缺乏 PO 纯化和 PO 氧化产物抗菌特性研究的报道。因此本文分离纯化了光棘球海胆体腔液中的 PO, 并分析了光棘球海胆 PO 氧化产物对不同细菌的抗菌活性, 以期对海胆免疫机制的研究积累数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)(23.6 ± 4.4) 5 只, 取自辽宁省海洋水产科学研究院引育种中心, 于实验室暂养(水温 $17-18^{\circ}\text{C}$, pH $8.6-8.8$, 盐度 29), 备用。

1.2 实验菌株

以灿烂弧菌、哈维氏弧菌、假交替单胞菌、希瓦氏菌、金黄色葡萄球菌、停乳链球菌、溶壁微球菌和拟诺卡式菌为受试细菌(菌株信息见表 1), 测定光棘球海胆 PO 氧化产物的抗菌谱和抗菌活力。上述细菌在 28°C 、150 r/min 条件下培养至对数生长期, 取细菌培养悬液于 4°C 、 $6000 \times g$ 离心 20 min, 弃上清, 用生理盐水重悬细菌沉淀至终浓度为 $A_{600}=1.0$ 。

表 1 受试细菌信息
Tab.1 The information of the bacteria tested

细菌种类	革兰氏染色属性	细菌来源	培养条件	培养基
灿烂弧菌	G^-	仿刺参	28°C , 150 r/min	2216E
哈维氏弧菌	G^-	仿刺参		
假交替单胞菌	G^-	仿刺参		
希瓦氏菌	G^-	仿刺参		
金黄色葡萄球菌	G^+	ATCC 55804	28°C , 150 r/min	2216E
停乳链球菌	G^+	ATCC 4698		
溶壁微球菌	G^+	ATCC 51499		
拟诺卡式菌	G^+	海绵 <i>Hymeniacidon perleve</i>		

1.3 体腔液上清的制备

用灭菌注射器穿透光棘球海胆(5 只)的围口膜抽取体腔液。将 5 只海胆的体腔液混匀后, 离心(4°C, 3500 r/min, 10 min), 取上清作为体腔液上清(CFS), 冻存于-20°C 备用。

1.4 光棘球海胆 PO 的分离纯化

采用 Jiang 等(2014)报道的线性连续梯度非变性电泳结合邻苯二酚发色法分离光棘球海胆体腔液上清中的 PO。具体步骤如下: 以 CFS 为样品, 在浓度范围为 6%—27%的线性连续梯度聚丙烯酰胺凝胶中电泳 8 h (4°C, 恒流 20 mA), 使用分子量范围为 21—720 kDa 的非变性电泳 Marker(SERVA)作为标准蛋白; 电泳结束后, 将凝胶中的一条泳道切下, 浸于 1%邻苯二酚溶液中发色 5 min, 定位 PO 条带; 根据邻苯二酚发色结果, 将未发色凝胶中的 PO 条带切下, 浸于生理盐水中高速匀浆 1 min, 然后于 4°C、14000 r/min 离心 30 min, 取上清作为部分纯化的光棘球海胆 PO 溶液, 冻存于-20°C 备用。

1.5 光棘球海胆 PO 活力测定

采用多巴络合物生成法(Söderhäll, 1981)测定 PO 活力。使用左旋多巴或多巴胺(Sigma)作为底物, 100 μ L PO 溶液与 2.0 mL 20 mmol/L 底物溶液混匀后, 在 490 nm 波长下连续测定吸光值, A_{490} 值每分钟增加 0.001 定义为 1 个活力单位(U)。分别以左旋多巴、多巴胺为底物, 将分离得到的各 PO 溶液调成 400 U/mL, 用于抗菌活性分析。

1.6 光棘球海胆 PO 氧化产物的抗菌活性分析

分别使用左旋多巴或多巴胺作为底物。100 μ L 细菌悬液、50 μ L PO 溶液与 150 μ L 20 mmol/L 底物溶液(溶于生理盐水)混匀后于 30°C 孵育 1 h。孵育后的混合物离心(4°C, 6000 r/min) 7 min, 弃上清, 将细菌沉淀用 500 μ L 生理盐水重悬后, 再离心(4°C, 6000 r/min)7 min, 弃上清, 最后将细菌沉淀接种到 3 mL 2216E 培养基中进行震荡培养(28°C, 150 r/min)。培养过程中, 每隔 1 h 取 100 μ L 细菌培养悬液测定 A_{600} 。对照组包括以下 3 种孵育方式: (1) 100 μ L 细菌悬液、50 μ L 生理盐水与 150 μ L 20 mmol/L 底物溶液(溶于生理盐水)混匀后于 30°C 孵育 1 h; (2) 100 μ L 细菌悬液、50 μ L PO 溶液与 150 μ L 生理盐水混匀后于 30°C 孵育 1 h; (3) 100 μ L 细菌悬液与 200 μ L 生理盐水混匀后于 30°C 孵育 1 h。其中, 对照(1)用于检测 PO 底物对受试细菌生长的影响, 对照(2)用于检测光棘球海胆 PO 自身对细菌生长的影响, 对照(3)用作空白对

照。本实验重复 3 次。当 PO 与底物处理后的细菌生长曲线同时低于对照(1)、(2)、(3)中的细菌生长曲线, 且对照(1)和(2)中的细菌生长曲线与对照(3)中的相比无明显差别时, 定义 PO 与底物的反应产物对该细菌有抗菌作用。

1.7 数据分析

抗菌活性中检测的实验数据使用 SPSS 11.5 分析计算标准差, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 光棘球海胆 PO 的分离纯化

非变性电泳后, 经邻苯二酚发色, 共发现 3 条 PO 条带, 分别呈现褐色、黄色和紫色(图 1)。3 种 PO 按分子量由高到低分别命名 SnPO1、SnPO2、SnPO3, 3 种 PO 的分子量均小于 Marker 中的最小标准蛋白, 其中 SnPO2 的分子量与溴酚蓝指示剂相近, 而 SnPO3 在非变性电泳中的迁移速率要大于溴酚蓝指示剂。

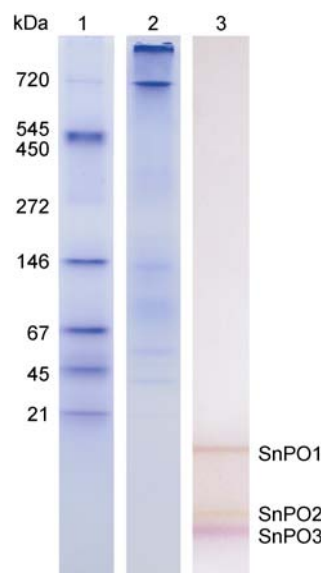


图 1 光棘球海胆体腔液上清非变性电泳图
Fig.1 Native-PAGE of the supernatant of coelomic fluid from *S. nudus*

1: 非变性电泳标准蛋白; 2: 光棘球海胆体腔液上清考马斯亮蓝染色结果; 3: 光棘球海胆体腔液上清 PO 定位结果

2.2 光棘球海胆 PO 氧化产物的抗菌活性分析

与空白对照组相比, 光棘球海胆中的 3 种 PO 对受试的 8 株细菌的生长均无明显影响(数据在结果中省略)。

在受试的 4 株 G⁻细菌中, 光棘球海胆 PO 氧化产

物对灿烂弧菌和哈维氏弧菌有显著抗菌作用(图 2)。当以多巴胺为底物时, SnPO1 的氧化产物对灿烂弧菌和哈维氏弧菌的生长均有抑制作用, 而 SnPO2 和 SnPO3 的氧化产物仅抑制哈维氏弧菌的生长; 以左旋多巴为底物时, 光棘球海胆中 3 种 PO 的氧化产物对 4 种 G^- 细菌的生长均无明显影响。

在受试的 4 株 G^+ 细菌中, 光棘球海胆 PO 氧化产物对金黄色葡萄球菌和拟诺卡式菌有显著抗菌作用(图 3)。多巴胺对停乳链球菌有抑制作用, 因此光棘球海胆 PO 与多巴胺的反应产物对停乳链球菌的抗菌作用无法判断。当以多巴胺为底物时, SnPO1 氧化产物仅抑制金黄色葡萄球菌的生长, SnPO3 氧化产物仅抑制拟诺卡式菌的生长, 而 SnPO2 氧化产物对金黄色葡萄球菌和拟诺卡式菌的生长均有抑制作用; 以左旋多巴为底物时, SnPO2 氧化产物对拟诺卡式菌的生长有抑制作用, SnPO1 和 SnPO3 的氧化产物对 4 种 G^+ 细菌的生长无明显影响。

3 讨论

PO 作为无脊椎动物体内的重要免疫因子, 通过与底物反应生成的产物直接参与杀菌和抑菌过程(Bai *et al.*, 1997; Ballarin *et al.*, 1998; Cerenius *et al.*, 2004)。已有的研究表明, 不同物种 PO 的氧化产物呈现不同的抗菌特性(Zhao *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014), 而海胆在养殖过程中经常受到细菌病害的影响(王斌等, 2006; 周玮等, 2008), 因此了解光棘球海胆 PO 氧化产物的抗菌特性对通过免疫手段预防和控制海胆细菌病害具有重要意义。

不同于菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum*、栉孔扇贝和大鳌虾 *Panulirus argus* 中检测到的单条 PO 带(Perdomo-Morales *et al.*, 2007; 蒋经伟等, 2012; Xing *et al.*, 2012), 在本研究中, 作者从光棘球海胆体腔液上清中分离得到 3 种 PO。光棘球海胆中 3 种 PO 的分子量非常小, 而且在非变性聚丙烯酰胺凝胶中

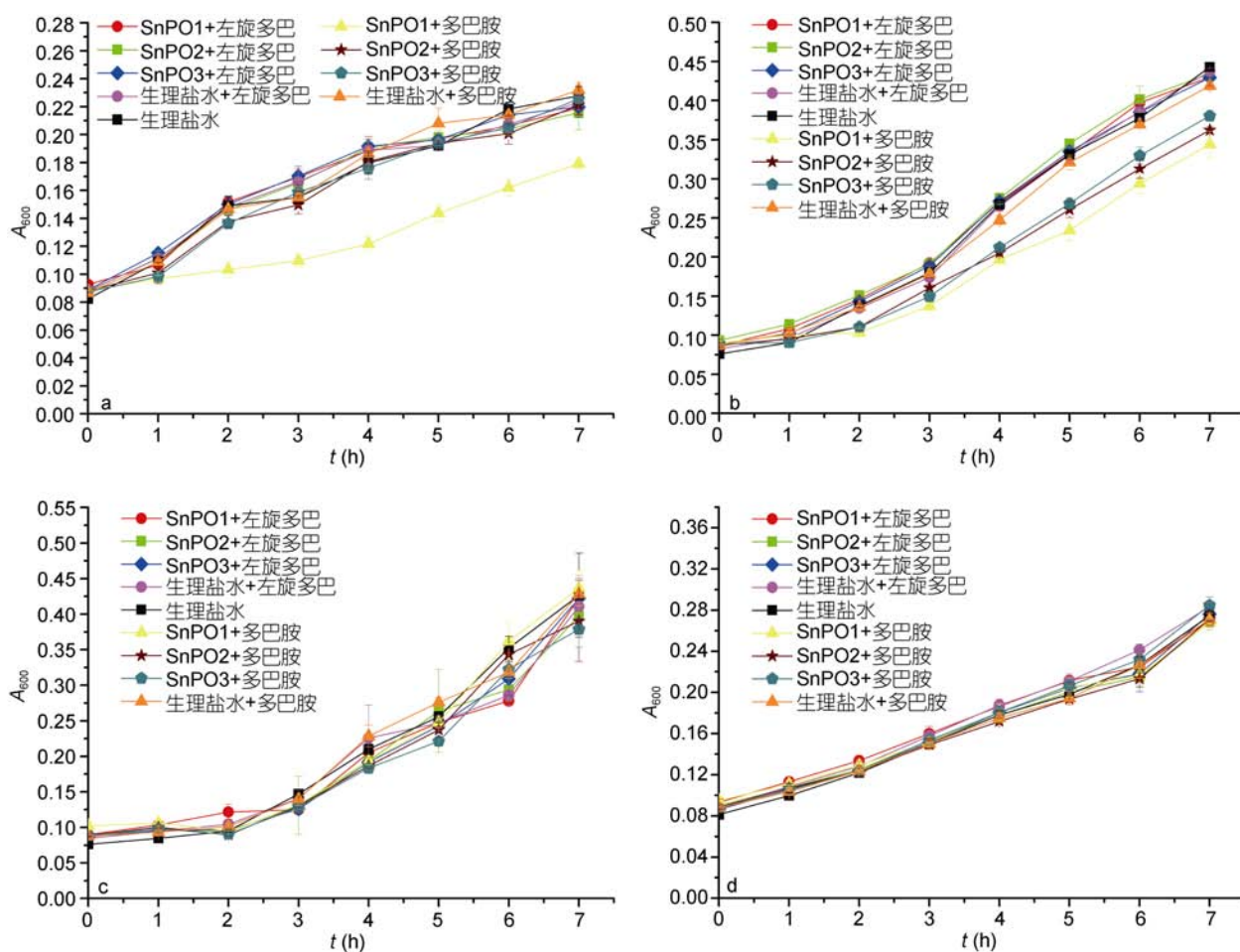


图 2 光棘球海胆 PO 氧化产物对 G^- 细菌生长的影响

Fig.2 The effects of PO oxidation products on growth of Gram-negative bacteria

a: 灿烂弧菌; b: 哈维氏弧菌; c: 假交替单胞菌; d: 希瓦氏菌

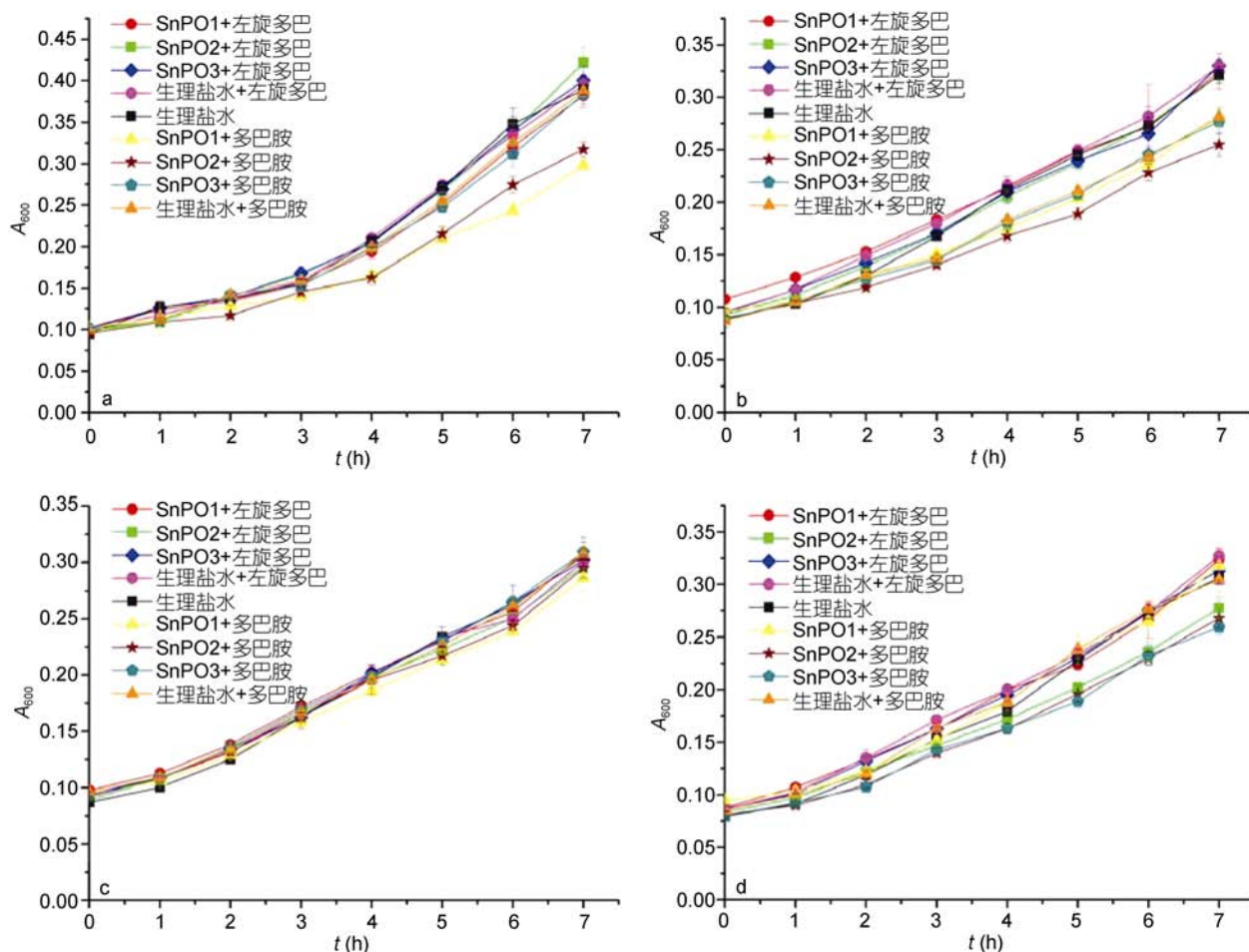
图3 光棘球海胆 PO 氧化产物对 G⁺细菌生长的影响

Fig.3 The effects of PO oxidation products on growth of Gram-positive bacteria

a: 金黄色葡萄球菌; b: 停乳链球菌; c: 溶壁微球菌; d: 拟诺卡式菌

与邻苯二酚反应分别呈现褐色、黄色和紫色的条带,与仿刺参中的结果(Jiang *et al*, 2014)非常相似,表明光棘球海胆和仿刺参中的 PO 系统在进化上具有很高的同源性。以左旋多巴或多巴胺为底物时,光棘球海胆 PO 的氧化产物仅对哈维氏弧菌、灿烂弧菌、金黄色葡萄球菌和拟诺卡式菌有抑制作用,而对假交替单胞菌、希瓦氏菌和溶壁微球菌的生长无明显影响,表明光棘球海胆 PO 氧化产物具有窄谱抗菌活性,与栉孔扇贝和仿刺参中的结果相似(Xing *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2014),不同于烟草天蛾和淡水龙虾 PO 氧化产物的广谱抗菌活性(Zhao *et al*, 2007; Cerenius *et al*, 2010)。在受试的 G⁺细菌中,光棘球海胆 PO 氧化产物对弧菌有显著的抗菌作用,与太平洋牡蛎、栉孔扇贝和仿刺参等海洋无脊椎动物中的结果非常相似(Luna-Acosta *et al*, 2011; Xing *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2014)。由于弧菌是海洋无脊椎动物中最常见的致病

菌之一,上述结果表明,PO 氧化产物对弧菌的显著抗菌作用可能是海洋无脊椎动物 PO 免疫系统适应性进化的结果。光棘球海胆 PO 氧化产物还对部分 G⁺细菌有抗菌作用,与栉孔扇贝中的结果明显不同。在栉孔扇贝中,PO 氧化产物仅对部分 G⁺细菌有抗菌作用,而对 G⁺细菌的生长无明显影响(Xing *et al*, 2012)。光棘球海胆 PO 和仿刺参 PO 在亚型组成和邻苯二酚显色反应上具有很高的相似性,然而在氧化产物抗菌谱上还是有显著的差异。光棘球海胆 PO 氧化产物显著抑制拟诺卡式菌的生长,而仿刺参 PO 氧化产物对拟诺卡式菌无明显的抗菌作用(Jiang *et al*, 2014)。这一结果进一步证明,不同物种间 PO 氧化产物的抗菌谱是有明显差异的。此外,SnPO1 氧化产物对灿烂弧菌、哈维氏弧菌和金黄色葡萄球菌有抑制作用,SnPO2 氧化产物对哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌和拟诺卡式菌有抑制作用,而 SnPO3 氧化产物仅对哈维

氏弧菌和拟诺卡式菌有抑制作用,表明同一物种的不同 PO 亚型之间,氧化产物的抗菌谱也存在差异,与仿刺参中报道的结果相似(Jiang *et al*, 2014)。本研究还发现,多巴胺氧化产物对灿烂弧菌、哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌和拟诺卡式菌有抗菌作用,而左旋多巴氧化产物仅对拟诺卡式菌有抗菌作用,表明在光棘球海胆中 PO 与多巴胺反应产物的抗菌活力高于 PO 与左旋多巴的反应产物。在其他一些无脊椎动物如烟草天蛾、淡水龙虾、栉孔扇贝和仿刺参中也发现多巴胺氧化产物的抗菌活力高于左旋多巴氧化产物(Zhao *et al*, 2007; Cerenius *et al*, 2010; Xing *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2014)。有报道认为多巴胺氧化产物与左旋多巴氧化产物抗菌活力的差异是由 PO 催化底物后生成产物的成分不同造成的, PO 与多巴胺反应后生成二羟吲哚,二羟吲哚及其自氧化产物被证明具有很强的杀菌、抑菌作用,而 PO 与左旋多巴反应后生成多巴醌,多巴醌及其自氧化产物仅具有微弱抗菌作用(Nappi *et al*, 1992; Zhao *et al*, 2007)。上述推论可以从一定程度上解释多巴胺氧化产物与左旋多巴氧化产物的抗菌活性差异,然而该推论尚无法解释不同 PO 间多巴胺氧化产物在抗菌谱和抗菌特性上的差异, PO 氧化产物的抗菌机制有待进一步研究。

致谢 拟诺卡式菌(*Nocardiopsis* sp.)由中国科学院大连化学物理研究所海洋生物产品工程组惠赠,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王 斌, 李 岩, 李 霞等, 2006. 虾夷马粪海胆“红斑病”病原弧菌特性及致病性. 水产学报, 30(3): 371—376
- 王 轶 南, 刘 学 伟, 刘 艳 萍 等, 2011. 虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体腔液的酚氧化酶活性分析. 中国农业科技导报, 13(2): 116—120
- 吴 曙, 王淑红, 王艺磊等, 2009. 软体动物和甲壳动物酚氧化酶的研究进展. 动物学杂志, 44(5): 137—146
- 周 玮, 孙 俭, 王俊杰等, 2008. 我国海胆养殖现状及存在问题. 水产科学, 27(3): 151—153
- 蒋经伟, 邢 婧, 战文斌, 2012. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)漆酶型酚氧化酶的纯化及特性分析. 海洋与湖沼, 43(2): 294—298
- 湛 垚 垚, 黄显雅, 沈 妍等, 2013. 不同性别光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)性腺蛋白质组差异分析. 海洋与湖沼, 44(6): 1642—1647
- Aladaileh S, Nair S V, Raftos D A, 2007. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. Fish & Shellfish Immunology, 23(6): 1196—1208
- Bai G X, Brown J F, Watson C *et al*, 1997. Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *Biomphalaria glabrata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 118(2): 463—469
- Ballarin L, Cima F, Sabbadin A, 1998. Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. Developmental & Comparative Immunology, 22(5—6): 479—492
- Cerenius L, Babu R, Söderhäll K *et al*, 2010. In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. Journal of Invertebrate Pathology, 103(1): 21—23
- Cerenius L, Lee B L, Söderhäll K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology, 29(6): 263—271
- Cerenius L, Söderhäll K, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews, 198(1): 116—126
- Jiang J W, Zhou Z C, Dong Y *et al*, 2014. In vitro antibacterial analysis of phenoloxidase reaction products from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunology, 39(2): 458—463
- Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M *et al*, 2011. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. Fish & Shellfish Immunology, 31(6): 795—800
- Muñoz P, Meseguer J, Esteban M A, 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. Fish & Shellfish Immunology, 20(1): 12—19
- Nappi A J, Vass E, Carton Y *et al*, 1992. Identification of 3, 4-dihydroxyphenylalanine, 5, 6-dihydroxyindole, and N-acetylarterenone during eumelanin formation in immune reactive larvae of *Drosophila melanogaster*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 20(3): 181—191
- Perdomo-Morales P, Montero-Alejo V, Perera E *et al*, 2007. Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. Fish & Shellfish Immunology, 23(6): 1187—1195
- Söderhäll K, 1981. Fungal cell wall β -1, 3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. Developmental & Comparative Immunology, 5(4): 565—573
- Söderhäll K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology, 10(1): 23—28
- Xing J, Jiang J W, Zhan W B, 2012. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: Purification and antibacterial activity of its reaction products generated *in vitro*. Fish & Shellfish Immunology, 32(1): 89—93
- Zhao P C, Li J J, Wang Y *et al*, 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37(9): 952—959
- Zhao P C, Lu Z Q, Strand M R *et al*, 2011. Antiviral, anti-parasitic, and cytotoxic effects of 5, 6-dihydroxyindole (DHI), a reactive compound generated by phenoloxidase during insect immune response. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41(9): 645—652

ANTIBACTERIAL CHARACTERIZATION OF OXIDATION PRODUCTS GENERATED BY PHENOLOXIDASES FROM THE SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS*

JIANG Jing-Wei¹, CHENG Yu-Hui^{1,2}, ZHOU Zun-Chun¹, DONG Ying¹,
CHEN Zhong¹, JIANG Bei¹, GAO Shan¹

(1. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China; 2. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract We purified three types of phenoloxidase (PO) from the coelomic fluid supernatant of sea urchin *Strongylocentrotus nudus* (named SnPO1, SnPO2 and SnPO3) using linear-gradient native-PAGE method combined with catechol staining, and studied the antibacterial characteristics of *S. nudus* PO oxidation products by bacterial growth curve determination. The results show that the three POs presented brown, yellow, and purple, respectively, after reacted with catechol in polyacrylamide gel. With dopamine as substrate, the oxidation products of SnPO1 showed antibacterial activities to *Vibrio splendidus*, *V. harveyi* and *Staphylococcus aureus*, those of SnPO2 to *V. harveyi*, *S. aureus* and *Nocardiopsis* sp., and those of SnPO3 to *V. harveyi* and *Nocardiopsis* sp.. With L-3, 4-dihydroxyphenylalanine as substrate, only the oxidation products of SnPO2 showed antibacterial activity to *Nocardiopsis* sp.. The oxidation products of *S. nudus* POs had no obvious effects on the growth of *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Shewanella baltica* and *Micrococcus lysodeikticus*. Therefore, it could be concluded that *S. nudus* PO oxidation products had limited antibacterial spectrum, the antibacterial activities in dopamine-derived oxidation products were stronger than those in L-3, 4-dihydroxyphenylalanine-derived oxidation products, and different PO isoforms had different antibacterial spectrum and characteristics.

Key words *Strongylocentrotus nudus*; coelomic fluid supernatant; phenoloxidase; antibacterial characteristics