第 37 卷第 11 期
2013 年 11 月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol. 37, No. 11
Nov., 2013

文章编号:1000 - 0615(2013)11 - 1626 - 06　　DOI:10.3724/SP.J.1231.2013.38538

中国明对虾 serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的重组表达及活性分析

王丹丹[1]，刘逸尘[1]，张亦陈[1]，孙 妍[2]，耿绪云[2]，孙金生[1,2*]

（1.天津师范大学生命科学学院，天津市动植物抗性重点实验室，天津 300387；
2.天津市水生动物疫病预防控制中心，天津 300221）

摘要：Serpin 家族成员作为主要的丝氨酸蛋白酶抑制剂，通过调节一系列丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶的活性来调节蛋白酶级联反应，进而参与了包括血液凝结、补体激活、纤维蛋白溶解、炎症反应、肿瘤抑制和激素转运等大量的基本生物过程，在调节机体免疫及其它重要生理功能等方面发挥着重要作用。在前期研究中，从中国明对虾血细胞中克隆得到一个 serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因（*Fc-serpin*，GenBank 登录号：DQ318857），初步研究显示它在转录水平参与了病原菌和白斑杆状病毒（WSSV）引发的中国明对虾先天免疫应答反应；利用原核重组表达系统，成功获得了重组的中国明对虾 serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂（rFc-serpin），纯化复性后得率为 0.3 g/L；活性分析显示，重组目的蛋白（rFc-serpin）对多种病原菌的生长均有一定抑制作用，研究结果进一步证实它参与病原微生物引发的对虾防御应答过程，为探讨甲壳动物先天免疫防御应答机制提供了有价值的参考。

关键词：中国明对虾；丝氨酸蛋白酶抑制剂；重组表达；抑菌活性
中图分类号：Q 785；S 968.2　　**文献标志码**：A

丝氨酸蛋白酶（serine protease，SP）是一类重要的蛋白水解酶，广泛存在于动植物及病原微生物中，介导了机体中很多重要的免疫反应，如血淋巴凝结、补体激活、黑化、吞噬和包囊等[1-2]，而丝氨酸蛋白酶抑制剂（serine protease inhibitor，SPI）作为分子开关调控着这些反应的进程。SPI 通过调控 SP 活力参与蛋白酶级联反应，它作为精确调节 SP 活力的控制因子，可以防止蛋白酶的过量激活，从而避免宿主自身组织的损伤和破坏。SPI 主要存在于血浆或血细胞的颗粒中，共同参与一系列重要的生理功能，包括参与消化作用、受精作用、血液凝结、纤维蛋白溶解、胚胎发育和免疫过程等[3-4]。节肢动物血淋巴中已经发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂，可根据其结构特点、结合机制和功能分为 4 个家族：Kazal 家族、Kunitz 家族、α-巨球蛋白家族和 Serpin 家族[5-6]，甲壳动物中的 SPI 则主要分属于 Kazal 和 Serpin 家族[7]。Serpin 家族结构序列高度同源，C 端为反应中心环区（reactive centre loop，RCL），其 P1 位点决定成员的抑制专一性，靶酶识别的机制为诱导构象改变模型[8]。节肢动物的 SPI 在免疫调节与防御中发挥着重要作用，例如凝结作用、proPO 级联反应、细胞因子激活和对病原的选择消化抑制真菌和细菌蛋白酶的活性等，从而保护机体免受病原微生物侵害。

目前在甲壳动物的 serpin 的研究中，仅在鲎（*Tachypleus tridentatus*）[9]、三疣梭子蟹（*Portunus trituberculatus*）[10]、拟穴青蟹（*Scylla paramamosain*）[11] 和斑节对虾（*Penaeus monodon*）[12-13] 中有相关报道，主要围绕其基因克隆、组织分布、表达特征和初步的活性分析方

收稿日期：2013-01-10　　**修回日期**：2013-06-02
资助项目：国家“九七三”重点基础研究计划（2012CB114405）；国家“八六三”高技术研究发展计划（2012AA092205，2012AA10A401）；国家科技支撑计划（2011BAD13B04，2011BAD13B07）；天津师范大学博士基金项目（52LX18，52LX19）；天津市“131”计划（ZX110103）
通信作者：孙金生，E-mail：jinshsun@163.com

面。我们在前期研究中,从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血细胞中克隆获得一个典型的 serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因(*Fc-serpin*),细菌或病毒(WSSV)的感染可诱导血细胞中该基因表达量的显著上调[14],表明其在先天免疫应答过程中可能发挥着重要作用。在此基础上,利用原核重组表达获得了该抑制剂并初步探讨了其潜在的生物学活性,研究结果有望为探讨甲壳动物先天免疫防御应答机制提供有价值的参考,并为对虾的病害防治奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验动物、菌株、质粒　健康中国明对虾(体长 12 ~ 14 cm)购买于天津市神堂水产育苗养殖有限公司,实验前在水族箱中充气暂养以适应实验室内的养殖环境;菌株 TOP-10F' 为本实验室保存,表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 感受态细胞购于北京市天根生化科技有限公司;实验中所用到的致病菌(大肠杆菌、鳗弧菌、哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、酵母菌、白色念珠菌)由天津市水产养殖病害防治中心提供;克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pCR® T7/NT TOPO® TA 由中国科学院海洋研究所宋林生研究员馈赠。

实验试剂　TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen);质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶纯化试剂盒;限制性核酸内切酶、T_4 DNA 连接酶、DNA marker(TaKaRa);蛋白 marker(Fermentas);异丙基-β-D-硫代半乳糖苷[生工生物工程(上海)有限公司];营养肉汤培养基(北京双旋微生物培养基制品厂);其它试剂均为国产或进口分析纯。

实验仪器　PCR 仪、酶标仪、核酸蛋白检测仪、蛋白电泳仪(Bio-Rad);恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);快速蛋白液相系统(BioLogic DuoFlow, Bio-Rad);台式冷冻离心机(Eppendorf);JY92-2D 超声波细胞粉碎机(新芝);冻干机(北京六一)等。

1.2　总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

从健康的中国明对虾第一腹节基部腹血窦抽取血淋巴,离心获得血细胞,参照 TRIzol 说明书的方法提取血细胞总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳与微量核酸蛋白测定仪进行定性和定量检测,-80 ℃保存备用。以血细胞总 RNA 为模板,poly(T)(5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16(A/C/G)-3′)为反转录引物,合成第一链 cDNA。

1.3　*Fc-serpin* 的表达和纯化

表达载体的构建　根据前期研究中的 *Fc-serpin* 序列(GenBank 登录号:DQ318857)和 pCR® T7/NT TOPO® TA 表达载体序列特征,设计表达引物 *Fc-serpin*-F(5′-ACGCGGTCTGTTTAGGTG-3′)和 *Fc-serpin*-R(5′-AACTTCTGGCGGTGTCG-3′),上游引物 5′端含 *Bam*H I 酶切位点,下游引物 5′端含 *Bst*B I 酶切位点。以血细胞 cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增该基因成熟肽区域。将 PCR 产物纯化后与克隆载体 pMD18-T 连接,选阳性克隆进行测序。测序正确的阳性克隆的质粒与表达载体质粒 pCR® T7/NT TOPO® TA 同时用 *Bam*H I 和 *Bst*B I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段及表达载体质粒,并用 T_4 DNA 连接酶连接,构建重组表达质粒 pCR® T7/NT TOPO® TA-serpin,转化大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 感受态细胞,选阳性克隆进行测序(北京华大基因公司),测序正确后保种待用。

重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析　取 1 mL 上述保种菌体接入 20 mL 新鲜的 LB 培养液中(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37 ℃,200 r/min 培养至 OD_{600nm} 达到 0.6 ~ 0.8 时,取出 1 mL 未诱导的菌液,其余的菌液在 37 ℃、200 r/min 条件下以终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 继续诱导培养 6 h,在 0、1、2、3、4、5 h 分别取样(每次 1 mL),将收集到的样品在 4 ℃,10 000 r/min 条件下离心 5 min,沉淀保存于 -20 ℃待用。在每个样品中加 100 μL 上样缓冲液(1 mol/L pH 6.8 Tris-HCl, 1% 溴酚蓝, 0.154 g DTT, 10% SDS, 10% 甘油)处理,沸水浴 10 min 裂解菌体,将收集到的样品进行 15% SDS-PAGE 电泳检测,以确定蛋白的最佳诱导时间。

重组蛋白的分离纯化及复性　将前述保种菌在 37 ℃条件下大量培养至菌体密度达到 OD_{600nm} 为 0.6 ~ 0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 5 h 后,4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,按 1 g 湿菌体/10 mL 破碎缓冲液(1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA)的比例重悬菌体,在冰浴条件下超声破碎,4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min 收集包涵体;用包涵体洗涤液(300

mmol/L KCL, 50 mmol/L KH_2PO_4, 5 mmol/L Iminazole, 1 mol/L Urea, pH 7.4)洗涤 3 次。上述洗涤获得的包涵体溶于包涵体裂解液(300 mmol/L KCL, 50 mmol/L KH_2PO_4, 5 mmol/L Iminazole, 8 mol/L Urea, pH 7.4),振荡 20 min, 4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 10 min,取上清,应用快速蛋白液相系统(BioLogic DuoFlow, Bio-Rad),通过固定金属亲和层析(IMAC)和 Ni-NTA 技术进行目的蛋白的分离纯化,具体操作按照 Bio-Scale Mini profanity IMAC 操作手册进行。分离纯化后的目的蛋白置于处理好的透析袋中,依次放入含有 8、6、4、3、2、1 和 0 mol/L 尿素的 Tris-HCl 缓冲液中(50 mmol/L, pH 7.4),在 4 ℃条件下每一梯度各透析 4 h 进行复性处理,将复性后的蛋白脱盐后冻干称重,保存于 -80 ℃。

1.4 质谱鉴定

将 SDS-PAGE 胶上的目的条带切下,利用胰蛋白酶进行胶内酶解,取 25 μL 酶解后的样品进行离子阱质谱分析(LCQ DECA XP^{plus} MS, ThermoFirmigan, USA),利用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对。

1.5 重组目的蛋白(rFc-serpin)的抑菌活性分析

采用液体生长方法检测重组目的蛋白(rFc-serpin)的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),所用受试菌株在液体培养基中培养过夜,用培养基稀释其浓度至 OD_{600} 为 0.001左右,在 96 孔板的每孔中加入 50 μL 梯度稀释的重组目的蛋白(终浓度在 1.25 μmol/L 到 80 μmol/L 之间),然后依次加入 50 μL 的受试菌悬液;37 ℃条件下培养 18 ~ 24 h,利用酶标仪通过测定 OD_{595} 来确定 MIC,对照组为 50 μL 菌液与 50 μL Tris-HCl 缓冲液的混合溶液。

2 结果

2.1 重组蛋白的表达与纯化

Fc-serpin 的扩增及其重组表达载体的构建　根据 *Fc-serpin* 的 cDNA 序列设计带有酶切位点的引物,以对虾血细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得含有其 ORF 区的目的片段,回收经测序验证正确后,将其连入表达载体 pCR® T7/NT TOPO® TA 后转化表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 感受态细胞,重组载体测序结果表明载体构建成功。

重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析　经 IPTG 诱导后,利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达,结果发现:在预期分子量稍 45 ku 附近的位置出现了特异条带,该蛋白的表达量随着诱导时间的延长而显著增加,5 h 后表达量达到平台期,继续培养,目的蛋白表达量相对稳定,由于重组目的蛋白带有一个组氨酸标签(-MRGSHHHHHHGM-),故分子量略大于其预测理论值,所以推断该蛋白谱带可能为重组目的蛋白。通过凝胶成像系统分析发现,目的蛋白谱带的表达量占宿主菌总蛋白含量的 30% 左右。

质谱鉴定结果　重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后,切下目的条带,利用 LC-ESI-MS 分析和鉴定的结果显示:rFc-serpin 中有 3 条肽段(-LSGNNLR-, -DNETNNNLFMGVYR- 和 -PFLFLIR-)与我们前期克隆的中国明对虾的 serpin serine proteinase inhibitor 基因推导的氨基酸序列(GenBank 登录号:ABC33916)完全匹配。由此可以判定,上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白 rFc-serpin,中国明对虾 *Fc-serpin* 成熟肽成功地获得了体外重组表达。

重组蛋白的纯化与复性　利用 Ni-IDA 技术对目的蛋白进行纯化,电泳检测显示在 45 ku 附近位置有单一条带,这与 rFc-serpin 预期分子量(46.55 ku)的结果相一致(图 1),纯化的目的蛋白复性后得率约为 0.3 g/L。

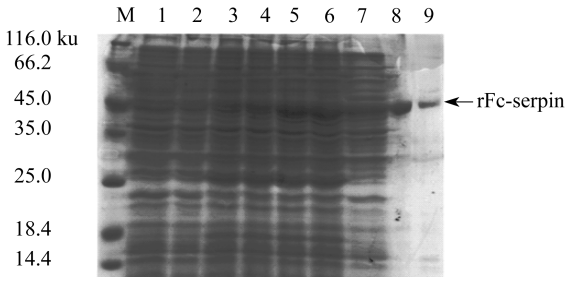

图 1 重组目的蛋白经 IPTG 诱导前后及纯化后的 SDS-PAGE 检测结果

M. 标准蛋白 Marker; 泳道 1 ~ 6. 经 IPTG 诱导 0 ~ 5 h 的含重组质粒的宿主菌中表达的蛋白; 泳道 7. 未转入重组质粒的 BL21 菌株表达的蛋白; 泳道 8. 纯化后的重组蛋白; 泳道 9. 洗涤后纯化前的包涵体蛋白

Fig. 1 Expression and purification of the target fusion protein

M. Protein molecular weight (ku) marker; 1 - 6. Crude extract from BL21(DE3)pLysS (the expression vector induced by IPTG after 0 - 5 h); 7. Crude extract from BL21 (DE3) pLysS (without the expression vector); 8. Purified target protein (rFc-serpin); 9. Unpurified inclusion body protein

2.2　重组蛋白的抑菌活性分析

本研究利用液体生长方法检测了 rFc-serpin 对不同病原菌的最小抑菌浓度(MIC),研究结果发现其对多种革兰氏阳性菌、阴性菌和真菌的生长均有抑制作用,特别是对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和真菌的生长有明显抑制效果,最小抑菌浓度在 5 μmol/L 以下(表 1)。

表 1　重组目的蛋白对主要病原菌的抑菌活性及最小抑菌浓度

Tab. 1　Antimicrobial activity and MIC of rFc-serpin

菌株 microroganism	受试范围内最小抑菌浓度/(μmol/L) MIC
革兰氏阳性菌(G^+)	
苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thurigiensis*)	80
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)	20
枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)	2.5
革兰氏阴性菌(G^-)	
鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)	80
哈维氏弧菌(*Vibrio. harveyi*)	40
大肠杆菌 TOP10F'(*Escherichia coli*)	5
真菌	
酵母菌(*Saccharomycetes. cerevisiae*)	5
白色念珠菌(*Candida albicans*)	5

3　讨论

Serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂在脊椎动物中得到了较为广泛的研究,近年来无脊椎动物中的 SPI 也逐渐得到了重视[15-16]。节肢动物血液凝结和酚氧化酶原激活系统通过丝氨酸蛋白酶的级联作用快速而有效地对外界的威胁刺激做出应答,刺激消失后机体的稳态恢复过程则需要丝氨酸蛋白酶抑制剂的精密调节[17]。大量研究表明,哺乳动物的炎症反应、血液凝结和补体激活等免疫过程均需要 serpin 的参与;节肢动物对微生物感染的快速应答也需要胞外的丝氨酸蛋白酶来介导,这些调节的机制是不可逆的[18]。从甲壳动物体内分离的几种蛋白酶抑制剂也有报道,鲎中的 serpin 可以通过抑制和去除凝结酶来抑制凝结过程[9],现有 3 种 serpin 已证实是胞内凝结抑制剂,分别命名为 TICI 1-3[19-20]。

前期实验中我们首次从中国明对虾血细胞中克隆到一种 serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂(*Fc-serpin*),具有典型的 serpin 家族特征,该基因在转录水平参与了由细菌或病毒引发的免疫应答过程。本研究在此基础上,对 *Fc-serpin* 基因的成熟肽区域进行了原核重组表达,成功获得了纯化的目的蛋白,并对其活性开展了初步研究。鉴于病原菌的侵染引发该基因表达的显著变化,我们探讨了 *Fc-serpin* 参与机体抗菌应答的作用,多种受试病原菌的抑制实验结果表明:该抑制剂对所有受试菌均有不同程度的抑制作用,其中对枯草芽孢杆菌和真菌的抑制效果最为明显。我们所用的表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 具有抗毒性表达的作用,因此可以成功地表达出这种具有抑菌活性的蛋白。有研究表明,Kazal 型抑制剂抑制枯草杆菌蛋白酶的同时也具有抑菌活性(尤其是枯草芽孢杆菌)[21-22],并且抑菌活性与靶酶抑制活性正相关[23];斑节对虾中报道的重组的 PmSERPIN8 对枯草芽孢杆菌有抑制作用,但对哈维氏弧菌无明显抑菌效果[12]。本研究中的 rFc-serpin 展现了多重抑菌活性,推测该抑制剂可能通过抑制病原微生物分泌的枯草杆菌蛋白酶来抑制其生长,作为先天免疫应答调控通路的终端效应物,直接通过调理作用促进血细胞对病原微生物进行凝集、吞噬和杀灭,这为将该蛋白产物作为抗生素替代物应用于养殖生产实践奠定了理论基础。Serpin 家族成员通过 P1 位点的结构特异性发挥抑制作用,其 P1 位点的氨基酸残基直接决定着抑制剂对靶酶的选择性。Fc-serpin 在活性位点环区与其它的 serpin 有很高的相似性,P1 活性位点^{350}Arg 表明它可能主要对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、酚氧化酶原激活酶、凝血酶和凝结酶有抑制活性[13],这些酶都是先天免疫防御系统中重要的体液免疫因子。本研究对中国明对虾血细胞中的 serpin 型抑制剂基因进行了原核重组表达和初步活性分析,探讨了其在对虾先天免疫过程中的可能作用,进一步对其在酚氧化酶原激活途径和抗病毒免疫应答过程中的作用研究正在进行中,这些工作将为探索对虾 serpin 型抑制剂精确的生物功能和调控机制提供有用的信息,并为深入了解甲壳动物免疫应答机制和开展病害防治研究提供理论依据。

参考文献:

[1] Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis,

coagulation, melanization and opsonization [J]. Immunobiology, 2006, 211(4): 213 – 236.

[2] Iwanaga S, Lee B L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(2): 128 – 150.

[3] Rawlings N D, Barrett A J. Evolutionary families of peptidases[J]. Biochemical Journal, 1993, 290(1): 205 – 218.

[4] Krem M M, Cera E D. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002, 27(2): 67 – 74.

[5] Christeller J T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability [J]. FEBS Journal, 2005, 272(22): 5710 – 5722.

[6] Zheng Q L, Chen J, Nie Z M, *et al*. Expression, purification and characterization of a three-domain Kazal-type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 146(2): 234 – 240.

[7] Kanost M R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1999, 23(4 – 5): 291 – 301.

[8] Carrell R W, Evans D L, Stein P E. Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis[J]. Nature, 1991, 353(6344): 576 – 578.

[9] Miura Y, Kawabata S, Iwanaga S. A limulus intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(1): 542 – 547.

[10] Wang S, Cui Z, Liu Y, *et al*. Identification and characterization of a serine protease inhibitor (PtSerpin) in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(4): 544 – 550.

[11] Chen F, Liu H, Bo J, *et al*. Identification of genes differentially expressed in hemocytes of *Scylla paramamosain* in response to lipopolysaccharide[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(1): 167 – 177.

[12] Somnuk S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Gene expression and characterization of a serine proteinase inhibitor PmSERPIN8 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 332 – 341.

[13] Homvises T, Tassanakajon A, Somboonwiwat K. *Penaeus monodon* SERPIN, PmSERPIN6, is implicated in the shrimp innate immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 890 – 898.

[14] Liu Y, Li F, Wang B, Dong B, *et al*. A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(3): 345 – 351.

[15] Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann J A, *et al*. Activation of Drosophila Toll during fungal infection by a blood serine protease[J]. Science, 2002, 297(5578): 114 – 116.

[16] Kim M S, Baek M J, Lee M H, *et al*. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in Holotrichia diomphalia larvae[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(42): 39999 – 40004.

[17] Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(23): 15957 – 15960.

[18] Silverman G A, Bird P I, Carrell R W, *et al*. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(36), 33293 – 33296.

[19] Miura Y, Kawabata S, Wakamiya Y, *et al*. A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(2): 558 – 565.

[20] Agarwala K L, Kawabata S, Miura Y, *et al*. Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3. Purification, characterization, cDNA cloning, andtissue localization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(39): 23768 – 23774.

[21] Donpudsa S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(4): 481 – 488.

[22] Han Y, Yu H, Yang X, *et al*. A serine proteinase inhibitor from frog eggs with bacteriostatic activity [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part

B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 149 (1): 58 – 62.

[23] Li X C, Wang X W, Wang Z H, *et al*. A three-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor exhibiting domain inhibitory and bacteriostatic activities from freshwater crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(12): 1229 – 1238.

Recombinant expression and functional characterization of a Serpin-type serine proteinase inhibitor (Fc-serpin) from the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

WANG Dandan[1], LIU Yichen[1], ZHANG Yichen[1], SUN Yan[2], GENG Xuyun[2], SUN Jinsheng[1,2*]

(1. *Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin* 300387, *China*;
2. *Tianjin Aquatic Animal Infectious Disease Control and Prevention Center, Tianjin* 300221, *China*)

Abstract: Serine proteinase inhibitors (SPI) play an important role in regulating humoral immunity by controlling the activity of serine proteinase (SP) in the process of protease cascade. Serpin family members participate in numerous biological processes by regulating the activity of serine and cysteine proteinases, such as blood clotting, complement activation, fibrinolysis function, inflammation, tumor suppressor and hormone transfer process. In our previous research, we cloned a serpin-type serine proteinase inhibitior gene from hemocytes of Chinese shrimp (*Fc-serpin*, GenBank accession number: DQ318857). The transcript of *Fc-serpin* was induced in response to the infection of bacteria and white spot syndrome virus (WSSV). In this research, recombinant Fc-serpin (rFc-serpin) was successfully expressed in bacteria *E. coli* and purified for further research of bioactivity. The concentration of purified target proteins was 0.3 g/L. rFc-serpin showed *in vitro* antimicrobial activity against main pathogens including Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. The results suggest that rFc-serpin might play a crucial role in the innate immunity of the shrimp and is expected to be applied in disease control.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; serpin; recombinant expression; bacteriostatic activity

Corresponding author: SUN Jinsheng. E-mail: jinshsun@163.com