

溶菌酶和抗菌肽在对虾养殖中的应用

Application of lysozyme and antimicrobial peptides in shrimp culture

张海波^{1,2}, 吴嘉敏¹, 谭洪新¹, 王兴强², 阎斌伦²

(1. 上海海洋大学 生命科学与技术学院, 上海 200090; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

中图分类号: S942.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)06-0061-05

近年来,我国对虾养殖业取得了巨大进步。然而,随着养殖环境日趋恶化和人为原因导致的水质污染等问题的出现,使我国的养虾业依旧面临着流行性病原(细菌、病毒和真菌)的考验。为了从源头上防治和根除这些疾病,国内外一些专家、学者对对虾的先天免疫特别是溶菌酶(Lysozyme)和抗菌肽(Anti-microbial Peptides, AMPs)及其基因工程方面做了深入的研究并且有了一定进展。抗菌肽和溶菌酶正在对虾疾病防治中发挥着越来越重要的作用,具有良好的开发前景。作者对溶菌酶、抗菌肽在对虾生长和免疫方面的作用做了具体的阐述,以期能为对虾生态营养型抗病饲料的开发以及对虾健康养殖提供技术支持。

1 对虾养殖中存在的主要污染

1.1 氮磷污染

在对虾养殖过程中,氮、磷污染物是养殖生态系统物质正常循环的最大障碍^[1],而人工配合饲料是最大的氮、磷污染源;溶入水中的氮磷污染物不仅导致水中溶解氧浓度降低,养分(特别是氮、磷含量)升高,水体富营养化加剧,细菌含量超标,而且常常导致对虾疾病的大面积暴发,给对虾养殖造成严重损失。

1.2 添加剂污染

长期以来,抗生素、化学合成药物和微量元素作为生长促进剂和免疫增强剂应用于对虾养殖业取得了良好的效果,曾对预防虾病、促进生长及提高对虾产量起到了积极作用。但是,近年来,抗生素、化学合成药物和微量元素作为饲料添加剂却引起了人们的争议,原因是上述物质的滥用可使细菌耐药性增强^[2],使得对虾产品药物残留问题日益严重。

1.3 化学消毒剂污染

在对虾养殖过程中,人们常用化学消毒剂如含氯制剂、碱类、氧化剂、醛类、金属盐类、农药类和染料类等来预防和治疗疾病。一般来说,每一种消毒剂对对虾都有一定程度的毒副作用,消毒剂的安全性和有效性是病害防治的关键问题之一;但目前由于缺乏对虾对各种化学消毒剂耐受力与生理状况和环境的关系的研究,因而经常因使用方法不当对养殖对虾造成伤害,甚至使其中毒死亡;另外,消毒剂在对虾体内的残留问题也有待探讨。

2 溶菌酶和抗菌肽的引入和最初应用

溶菌酶是一种有效的抗菌剂,其化学名称为N-乙酰胞壁质聚糖水解酶。最早对溶菌酶的研究起于Nicolle发表的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的溶解子,英国细菌学家Fleming等^[3]发现,在人的唾液、眼泪中存在有能够溶解细胞壁杀死细菌的酶,因其具有溶菌作用而将其命名为溶菌酶。英国的Philip等^[4]用X衍射法对溶菌酶进行研究分析,第一个完全弄清了溶菌酶的立体结构。此后人们发现溶菌酶不仅具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤的作用,而且还有止血、消肿、防腐及加快组织修复等功能。

抗菌肽是生物体产生的一种具有抗菌活性的多肽,瑞典科学家Boman等^[5]在果蝇中发现抗菌肽,随后首次从惜古比天蚕(*Hyatophora cecropia*)蛹中

收稿日期: 2007-11-28; 修回日期: 2008-03-28

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2006548); 江苏省教育厅“青蓝工程”资助项目

作者简介: 张海波(1982),男,江苏连云港人,硕士研究生,主要从事海水集约化养殖方向的研究, E-mail: hbrzhang@stmail.shou.edu.cn; 吴嘉敏,通讯作者,教授,主要从事循环水工厂化养殖方面的研究,电话: 021-65710018

诱导分离到并命名为天蚕素(cecropin)。随后陆续从微生物、昆虫、动物、植物等中分离到类似的成分,目前已发现的抗菌肽有近1000种。昆虫抗菌肽是发现较早的一种小分子多肽,具有热稳定、水溶性好、杀菌力强、抗菌谱广等优点^[6,7]。1987~1998年国际GenBank登录的不同载体的昆虫抗菌肽基因达29种之多,并且已有多种抗菌肽基因在不同表达系统中得到成功表达。如姜兰等^[8]成功制备了重组昆虫抗菌肽,并且发现其对水产养殖中常见病原菌有很好的抗菌效果;温刘发等^[9]报道,工程菌工业化发酵可大规模生产抗菌肽酵母制剂,且具有生产周期短、生产成本低和不受季节和气候变化等外界环境影响的优点,可以作为饲料添加剂来防治动物疾病。

3 对虾溶菌酶的研究现状

3.1 对虾溶菌酶的类型

水产动物溶菌酶按其来源分为3类:c型溶菌酶、g型溶菌酶和i型溶菌酶,大部分对虾溶菌酶属于c型,如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的溶菌酶^[10-12];目前发现的g型溶菌酶存在于鱼类中,如鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)的溶菌酶^[13];i型溶菌酶在进化上是一个独立的分支,存在于海洋无脊椎动物尤其是双壳类中,如东方牡蛎(*Crassostrea virginica*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的溶菌酶^[14,15]。在分类地位上,c型和i型溶菌酶属于同一个家族,c型与g型溶菌酶轻度同源。

3.2 对虾溶菌酶的特性

对虾溶菌酶能切断肽聚糖中N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 β 1,4糖苷键之间的联结,破坏肽聚糖支架,在内部渗透压的作用下细胞胀裂开,引起细菌裂解;还能与带负电荷的病毒蛋白直接作用,与DNA、RNA和脱辅基蛋白形成复合物使病毒失活。对于虾类溶菌酶的活性来说,最理想的条件是pH 6.0~7.0,25℃,碱和氧化剂对它起阻遏作用,食盐起活化作用。热稳定性强,粉状溶菌酶若采用低温干燥贮存,则几乎永不变质;即使在pH值为中性的水溶液中,该酶也可维持数天而不损失其活性。

3.3 对虾溶菌酶的免疫防御及基因表达

对虾溶菌酶基因的研究国内外比较少,从GenBank上可查到的仅有凡纳滨对虾、斑节对虾、短沟

对虾(*Penaeus semisulcatus*)和日本囊对虾等溶菌酶基因序列。其中,Rojtinnakorn等^[16]首先用表达序列标签法(Expressed Sequence Tag, EST)研究了被对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)感染后的日本囊对虾免疫基因表达情况,发现溶菌酶是其重要的抗菌蛋白之一。其次,Hikima等^[10]在昆虫细胞表达了日本囊对虾的溶菌酶基因,发现其产物在pH 7.5和50℃时活性最高,并对对虾的致病菌有抑制作用;De la Riva等^[17]研究发现,凡纳滨对虾重组的溶菌酶对革兰氏阴性菌有抑制作用。与此同时,随着国内分子生物学水平的不断发展进步,中国水产科学研究院的郑清梅等^[11]扩增斑节对虾溶菌酶基因,克隆到pGEM-T Easy Vector系统的T载体上;其后,郑清梅等^[8]对所克隆的斑节对虾溶菌酶基因的cDNA进行改造,并克隆至大肠杆菌表达质粒pBV220,构建斑节对虾溶菌酶表达载体pBV220-lyz,该质粒转化大肠杆菌后经42℃诱导大量表达。此外,高凤英等^[12]以PCR法制备罗氏沼虾溶菌酶基因的生物素标记探针,对感染弧菌后的溶菌酶mRNA的转录水平进行了观察,结果表明溶菌酶基因在非特异性免疫中具有直接的作用。近几年来,溶菌酶在医学、食品工业、细胞工程及基因工程等方面的应用已较为广泛,不仅如此,国内外均有报道在畜牧生产中用溶菌酶作饲料添加剂、兽药保健品已取得独特的效果。

3.4 溶菌酶作为虾饲料添加剂的优势

与普通的抗生素和其他药剂相比,溶菌酶作为虾饲料的添加剂具有以下明显的优势:(1)热稳定性强,耐酸性,能经受饲料制粒的高温;(2)它能广谱抗菌,能破坏革兰氏阳性菌(G^+)的细胞壁,对革兰氏阴性菌(G^-)等也有一定的溶解作用,而对水产动物细胞无毒性作用;(3)与各种诱发炎症的酸性物质结合,溶菌酶能使其失活,同时可以增强抗生素和其他药物的疗效;(4)溶菌酶能改变肠道微生物群,增加肠道有益菌,增加机体抗病力,提高动物的生产性能;(5)在参与机体多种免疫反应时,溶菌酶具有保持机体生理平衡的重要作用;(6)与甘氨酸和聚合磷酸盐等配合使用,具有良好的防腐作用;(7)与葡萄糖氧化酶配合使用时,具有增效作用,且抗酸作用通过花生四烯酸的加入得到进一步增强;(8)能够促进饲料中营养物质的消化、吸收,提高饲料的消化率^[19]。

4 对虾抗菌肽的研究现状

4.1 对虾抗菌肽的结构和特性

尽管抗菌肽在长度上千差万别,几乎所有的抗

菌肽在本质上都是阳离子型,其高级结构无论是以 α 螺旋还是以 β 折叠出现,两亲结构是它们的共同特征。对虾抗菌肽由13~45个氨基酸片段组成,相对分子质量在 1×10^4 以下,不同来源多肽的氨基酸序列具有较强的保守性且具有以下特点:(1) N端由赖氨酸和精氨酸等碱性氨基酸片段组成;(2) C端均酰胺化,富含非极性氨基酸;(3) 绝大多数多肽第2位为Trp,许多特定位置有一些较保守的氨基酸残基;(4) 在一定条件下形成 α 螺旋和 β 折叠结构;(5) 多数等电点大于7,表现出较强的阳离子特征。

4.2 对虾抗菌肽的作用机理

对虾抗菌肽的抗真菌机理研究的很少。有人认为,抗菌肽可使真菌形态发生改变,内部离子快速外流,或抑制线粒体合成能量,从而达到抗菌的效果。事实上,抗菌肽是可被诱导的,趋化到被感染的微生物表面,以此杀灭或降低被入侵生物的生长,增强自然免疫力和获得性免疫力的。传统抗生素主要通过消除微生物生长或生存必需的功能实现的,如阻挠细菌蛋白质的合成或改变酶的活性来达到杀菌目的,细菌通过改变一种基因就足以对付抗生素的这种进攻。由于抗菌肽具有普通抗生素所不具备的一系列优点,有关抗菌肽作用机理的研究成为了热点。近20年来的研究主要着眼于抗菌肽对细菌细胞膜的作用,已构建出孔洞模型、可变毯模型、离子通道模型等几种作用模式。但是近年的研究表明,很多抗菌肽都能有效地穿过细菌的细胞膜,直接与胞内分子相互作用,并不引起膜的破裂。抗菌肽根据其结构特点有着多种杀菌穿膜的机制,其后分别与膜内的靶分子如核酸、蛋白质、信号转导通路等相互作用,最终实现对细菌的杀伤作用。

4.3 对虾抗菌肽的免疫防御及基因表达

迄今,人们已从鱼类、贝类、甲壳类中提取出了一些有抗菌活性的肽和多肽^[20-22]。其中, Penaeidins 是从南美对虾血液中分离出的一组抗菌肽,其既具有抗真菌活性又具有抗细菌活性,并且还具与几丁质相黏连的特性,随后的研究发现,酵母是该基因的很好的异种表达系统。Gross等^[23]研究发现,两种白虾(*Litopenaeus vannamei*和*Litopenaeus setiferus*)在与44个免疫功能基因相关的268个EST中,有172个属于抗菌肽。目前,对虾抗菌肽的表达时间和部位已基本被证实,Munoz等^[24]发现凡纳滨对虾抗菌肽只在血细胞中表达,在糠虾幼体Mysis II时期少部分血细胞中可检测到抗菌肽的表达,而在更早的发育阶段即从无节幼体至蚤状幼体期间没有检测到表达;此外,郭振宇等^[25]发现中国明

对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖期不同阶段均有抗菌肽的表达。

在对虾抗菌肽基因克隆和表达后的抗菌活性检测方面,部分专家学者也做了深入的研究。Chen等^[26]对斑节对虾抗菌肽基因进行cDNA分析;Baracco等^[27]对巴西两种虾(*Litopenaeus schmitti*和*Farfantepenaeus paulensis*)的抗菌肽基因进行了克隆。其次,Destoumieux等^[28]从凡纳滨对虾血细胞中分离了几种抗菌活性因子, Destoumieux等^[29]在其后的研究中将编码该抗菌肽的序列克隆进PCRscript SK(+)并转化到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,进行表达和抗菌活性分析;Kang等^[30,31]对中国明对虾抗菌肽的基因表达进行了研究;薛剑峰等^[32]扩增中国明对虾抗菌肽成熟肽基因,插入原核表达载体Pgex-4T-1中,在*Escherichia coli* BL21表达融合蛋白GST-CHP;Li等^[33]在酵母(*Pichia pastoris*)中大量表达了中国明对虾抗菌肽基因*Chrpeneaidin*, Somboonwivat等^[34]表达了斑节对虾ALF抗菌肽基因。对细菌、真菌、昆虫及某些病毒、肿瘤细胞均有明显的杀伤作用,而对正常真核细胞无伤害作用,所以抗菌肽的发现与利用将为人类与各种病原菌的斗争提供一个有力的武器。由于对抗菌肽结构与功能及杀伤机理的研究进展,新型高效、广谱低毒抗菌肽已成为抗菌肽研究领域的重要方向。

4.4 抗菌肽作为对虾饲料添加剂的优势

近年来,随着抗生素的大量使用,药物残留和细菌耐药性等问题日渐严重,从而引发了人们对水产食品 and 环境的关注,抗生素在对虾饲料中的应用已面临被淘汰或禁用的局面;而对虾抗菌肽因其独特的生物活性以及不同于传统抗生素的特殊作用机理,已引起人们极大的研究兴趣。总体来讲,抗菌肽作为饲料添加剂主要具有以下几点优势:首先,抗菌肽是一类小分子多肽,分子空间结构简单,在机体受到侵犯时,几分钟内就能产生;其次,它的杀菌机理独特,广谱抗菌,水溶性好,对真核细胞几乎无作用,仅作用于原核细胞和发生病变的真核细胞,还可参与宿主天然免疫的其他反应;第三,它具备抵抗胰蛋白酶或胃蛋白酶水解的能力,在动物肠道内几乎不吸收,仅在消化道内发挥作用;与传统抗生素联用,可提高药效并拓宽传统抗生素的抗菌谱,与溶菌酶有协同作用;第四,抗菌肽的成本低,能耐受饲料制粒时的高温,对pH值有较强适应性;此外,抗菌肽是一种具有前途的新型饲料防腐剂。

5 溶菌酶和抗菌肽在对虾养殖中的应用前景

随着养虾业规模的不断扩大,高密度的养殖严重削弱对虾的免疫能力,溶菌酶、抗菌肽作为对虾的非特异性免疫因子,参与机体多种免疫反应,能改善和增强巨噬细胞吞噬能力和消化功能,从一定程度上提高对虾的生长率和成活率。在今后的生产应用中,一方面可以优化溶菌酶和抗菌肽作为虾类饲料的添加剂的生产工艺,争取在进一步降低饲料负面影响的同时确保对虾的健康生长。其次,由于溶菌酶抗菌谱较窄,只对革兰氏阳性菌起作用,为了加强其溶菌作用,建议与甘氨酸、植酸、聚合磷酸盐等物质配合使用,以增强对革兰氏阴性菌的溶菌作用。另一方面,由于溶菌酶、抗菌肽的酵母表达系统价格高昂,为了使其成本降低到可被用户接受并可与其他添加剂相竞争的水平,建议使用成本低、技术成熟、安全高效的藻类表达系统,开发合成活性高、杀菌谱广、成本低、应用广泛和安全的对虾溶菌酶和抗菌肽。总而言之,我国对于对虾溶菌酶、抗菌肽的研究仍处于起步阶段,还有很多问题需要进一步研究,开发新的溶菌酶、抗菌肽资源,降低生产成本,才能促使虾类溶菌酶、抗菌肽在实践中应用。与此同时,随着科学技术的快速发展以及人们生活水平的提高,天然溶菌酶、抗菌肽的研究对对虾养殖业的发展一定会起到不可估量的作用。

参考文献:

- 曹立业. 水产养殖中的氮磷污染 [J]. 水产学杂志, 1996, 9(1): 76-77.
- 李爱华. 水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 87-90.
- Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. Principles of Biochemistry [M]. 2nd Edition. New York: Worth Publishers, 1993. 180-312.
- 刘仲敏, 何伯安. 溶菌酶及其在食品工业中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 1995, 5: 80-82.
- Boman H G, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible anti bacterial defence system in *Drosophila* [J]. **Nature**, 1972, 237: 232-235.
- Boman H G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity [J]. **Cell**, 1991, 65(2): 205-207.
- Crag A G, Trenczek T, Fries I, et al. Mass spectrometric identification of peptides present in immunized and parasitized hemolymph from honeybees without purification [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1989, 165(2): 637-643.
- 姜兰, 白俊杰, 邓国成, 等. 重组抗菌肽的制备及其对水产养殖中常见病原微生物的抑制效果 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 152-155.
- 温刘发, 何丹林, 张常明, 等. 抗菌肽酵母制剂作为饲料添加剂的应用前景 [J]. 中国饲料, 2001, 23: 22-23.
- Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. **Gene**, 2003, 316: 187-195.
- 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因克隆及序列分析 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(4): 413-417.
- 高风英, 叶星, 白俊杰, 等. 两种沼虾溶菌酶基因 ORF 的克隆和罗氏沼虾溶菌酶基因的组织表达 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 615-620.
- Savan R, Aman A, Sakai M. Molecular cloning of G type lysozyme cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2003, 15: 263-268.
- Xue Q G, Sehey K L, Volety A K, et al. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. **Comp Biochem Physiol B**, 2004, 139: 11-25.
- 邹慧斌, 宋林生, 胥炜, 等. 海湾扇贝 g 型溶菌酶基因 cDNA 的克隆与分析 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(7): 101-106.
- Rojtinnakorn J, Hiruno I, Itami T. Gene expression in haemocytes of Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2002, 13(1): 69-83.
- De la Re Vega E, Gardá Galaz A, Díaz Cinco M E, et al. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2006, 20: 405-408.
- 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因的原核表达与产物活性检测 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 20-24.
- 王兴强, 曹梅, 阎斌伦. 水产动物溶菌酶研究概况 [J]. 渔业现代化, 2006, 2: 43-44.
- Schnapp D, Kemp G D, Smith V. Purification and characterization of a praline rich antibacterial peptide with sequence similarity to bacteneicin 7, from the haemocytes of the shore crab *Carcinus maenas* [J]. **Eur Biochem**, 1996, 240: 532-539.
- Fernandes J M O, Gerard M, Graham D K. Isolation and characterization of oncorhynchin II, a histone H1 derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. **Development and Comparative Immunology**, 2004, 28: 127-138.
- Sugiyama N, Araki M, Ishida A M, et al. Further

- isolation and characterization of graministins from the skin secretion of the soapfish *Grammistes sexlineatus* [J]. **Toxicon**, 2005, 45: 595-601.
- [23] Gross P S, Bartlett T 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]. **Development and Comparative Immunology**, 2001, 25: 565-577.
- [24] Munoz M, Vandenbulcke F, Gueguen Y, *et al.* Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei* [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2003, 27(4): 283-289.
- [25] 郭振宇, 董波, 焦传珍, 等. 养殖期中国对虾抗菌肽的表达 [J]. 海洋科学, 2004, 28(1): 48-51.
- [26] Chen J Y, Chuang H, Pan C Y, *et al.* cDNA sequence encoding an antimicrobial peptide of chelonianin from the tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2005, 18: 179-183.
- [27] Barracco M A, Lorgetil J D, Gueguen Y, *et al.* Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti* [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2005, 250: 117-120.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Kang C J, Wang J X, Zhao X F, *et al.* Molecular cloning of the cDNA encoding a mature antimicrobial Peptide from shrimp, *Penaeus chinensis* [J]. **Journal of Shandong University (Nat Sci)**, 2002, 37(6): 552-556.
- [31] Kang C J, Wang J X, Zhao X F, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of C1r penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 16: 513-525.
- [32] 薛剑峰, 康翠洁, 王金星, 等. 中国对虾素在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的重组表达 [J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 235-240.
- [33] Li L, Wang J X, Zhao X F, *et al.* High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, *Chr-penaeidin*, in *Pichia pastoris* [J]. **Protein Expr Purif**, 2005, 39(2): 144-151.
- [35] Somboonwivat K, Marcos M, Tassanakajon A, *et al.* Recombinant expression and antimicrobial activity of anti lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2005, 29: 841-851.

(本文编辑: 刘珊珊)