

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)丝氨酸蛋白酶同源物基因(*Fc-SPH*)的重组表达及活性分析*

杨 焱^{1,2} 刘逸尘^{1,2} 张亦陈^{1,2} 孙 妍³ 耿绪云³ 孙金生^{1,2,3}

(1. 天津师范大学生命科学学院 天津 300387; 2. 天津市细胞遗传与分子调控重点实验室 天津 300387;
3. 天津市水产养殖病害防治中心 天津 300221)

提要 以实验室前期克隆到的中国明对虾丝氨酸蛋白酶同源物基因(*Fc-SPH*)(GenBank 登录号: DQ318859)为基础, 利用原核表达系统对 *Fc-SPH* 基因成熟肽区域进行了重组表达和纯化复性分析, 并对获得的重组目的蛋白开展了抑菌活性及微生物清除功能研究。结果表明: 在体外成功获得了大量有活性的对虾 *Fc-SPH* 蛋白(rFc-SPH), 活性研究显示 rFc-SPH 对大多数受试菌种都有明显的抑制效果, 并可以加速中国明对虾清除体内外源微生物的速度。作者推断 *Fc-SPH* 即可以作为一线防御应答效应物直接参与虾类的先天免疫活动而发挥作用, 也可以通过调理作用促进血细胞对病原微生物的吞噬和杀灭。

关键词 中国明对虾, 丝氨酸蛋白酶同源物, clip 结构域, 生物活性, 先天免疫

中图分类号 Q175

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国最具经济价值和营养价值的海产品之一(孙杰等, 2010), 它们具有由多种免疫应答过程和免疫分子组成的先天免疫系统, 用来防御入侵的病原微生物。丝氨酸蛋白酶(serine protease, SP)是一类重要且分布广泛的蛋白水解酶, 其活性部位都含催化三分子(Ser、His 和 Asp)结构(翁凌等, 2010)。SP 行使着一系列重要的生理功能, 包括参与消化作用、血液凝结、胚胎发育和免疫过程等(Krem *et al.*, 2002)。丝氨酸蛋白酶同源物(Serine protease homologs, SPHs)在氨基酸序列上与 SP 相似, 但由于一个或多个催化残基的缺失或突变导致其明显缺乏酰胺酶活力(曾勇等, 2008)。目前已有文献证实, SPH 在节肢动物中参与酚氧化酶原系统的激活和抗微生物应答(Kawabata *et al.*, 1996; Naitza *et al.*, 2004), 在小龙虾中有模式识别的作用(Huang *et al.*, 2000)。Rattanachai 等(2005)从日本对虾中克隆到

了一个 SPH 基因, 发现基因的表达量在投喂含有肽聚糖的饵料后有显著增加; 最近, Jitvaropas 等(2009)从斑节对虾的血淋巴细胞中克隆得到了一个 SPH 基因, 经过分子克隆和体外表达获得的蛋白具有细胞粘附、抑菌等生物学活性; 在中国明对虾中也报道了一个 SPH 基因, 但仅对其组织分布特征和弧菌感染对其分子结构的影响进行了描述(Ren *et al.*, 2009), 进一步的活性与功能研究还未见报道。作者在前期工作中从中国明对虾血细胞中克隆获得了一个典型的丝氨酸蛋白酶同源物基因(*Fc-SPH*), 细菌和白斑杆状病毒(WSSV)刺激后该基因在血细胞中的表达会显著上调。本研究在此基础上, 对 *Fc-SPH* 基因进行了原核重组表达分析, 并初步研究了其生物活性与功能, 研究结果将为深入了解该基因在对虾先天免疫应答过程中的作用机制提供参考, 也为对虾的病害防治和健康养殖提供借鉴。

* 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114405); 国家自然科学基金项目(30901094 和 30901119); 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B04 和 2011BAD13B07); 天津市自然科学基金项目(10JCZDJC18200 和 10JCYBJC09200)。杨 焱, 硕士, E-mail: starphy0727@gmail.com; 同等贡献第一作者: 刘逸尘, 博士, 副教授, E-mail: cnliuyc@yahoo.com.cn

通讯作者: 孙金生, 博士, 教授, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-12-23, 收修改稿日期: 2012-03-15

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验动物、菌株、质粒 中国明对虾(体长10—14cm)购于天津市水产研究所渤海资源增殖站,实验前在水族循环系统中暂养使其适应实验室内的养殖环境;菌株 TOP10F'为本实验室保存,表达菌株 BL21(DE3)plysS 感受态细胞购于北京天根生化科技有限公司;实验中所用到的病原微生物(哈维氏弧菌、鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母等)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李富花研究员馈赠。

1.1.2 试剂 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen); 限制性核酸内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA marker (TaKaRa); 质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶纯化试剂盒(上海生工); 蛋白 marker (Fermentas); 其它试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 主要仪器

梯度 PCR 仪(Bio-Rad); 微量核酸蛋白测定仪(Bio-Rad); 酶标仪(Bio-Rad)、快速蛋白液相系统(BioLogicDuoFlow, Bio-Rad)、台式冷冻离心机(Eppendorf)、恒温培养箱(上海博讯实业有限公司)、超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)等。

1.3 *Fc-SPH* 的重组表达

1.3.1 表达载体的构建 根据 *Fc-SPH* 的 cDNA 序列设计带有酶切位点(*Nhe* I 和 *Hind* III)的引物(*Fc-SPH*-Ef: 5-GCTAGCCAAGGAGCAACCTGTC-3 和 *Fc-SPH*-Er: 5-AAGCTTCGAATTCGCCCTTATTAA GGCCTAATATTCTGCT-3), 以含有 *Fc-SPH* 的质粒 *Fc-SPH*/pMD18-T(实验室保存)为模板进行 PCR 扩增。将测序正确的阳性克隆质粒与表达载体质粒 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA 同时用 *Nhe* I 和 *Hind* III 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 T₄ DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA-*SPH*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 感受态细胞(具体操作参照 pCR[®]T7/NT TOPO[®]TA Expression Kit)。

1.3.2 重组蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析 取 1ml 上述保种菌体接入 20ml 新鲜的 LB 培养液中(含 100μg/ml 氨苄青霉素), 37℃, 200r/min 培养至 OD_{600nm} 达到 0.6—0.8 时, 取出 1ml 未诱导的菌液, 其

余的菌液在 37℃、200r/min 条件下以终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 继续诱导培养 6h, 在 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h、6h 分别取样, 将收集到的样品在 4℃、10000r/min 条件下离心 5min, 菌泥保存于-20℃待用。在每个样品中加 100μl 上样缓冲液(1mol/L pH 6.8 Tris-HCl, 1%溴酚蓝, 0.154g DTT, 10% SDS, 10%甘油)处理, 沸水浴 10min 裂解菌体, 将收集到的样品进行 15% SDS-PAGE 电泳检测, 以确定重组目的蛋白的最佳诱导时间。

1.4 胶内酶解与 LC-ESI-MS 质谱鉴定

为了验证上述蛋白谱带就是重组目的蛋白, 将诱导后 SDS-PAGE 胶上的目的条带切下, 利用胰蛋白酶进行胶内酶解, 取 25μl 酶解后的样品进行离子阱质谱鉴定(LCQ DECA XPplus MS, ThermoFirmigan, USA), 利用 Bioworks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对分析。

1.5 重组蛋白的分离纯化及复性

将菌液在 IPTG 浓度为 1mmol/L 的条件下诱导培养 5h, 收集菌体超声破碎, 4℃, 离心收集包涵体并用包涵体洗涤液洗涤 3 次。上述洗涤获得的包涵体溶于包涵体裂解液, 离心取上清, 应用快速蛋白液相系统(FPLC)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用透析复性法进行复性, 冻干后称重, 保存于-80℃。

1.6 重组目的蛋白(rFc-SPH)的活性及功能分析

1.6.1 重组目的蛋白的抑菌活性分析 采用液体生长方法检测 rFc-SPH 的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC), 各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 50μl 梯度稀释的重组目的蛋白, 然后依次加入 50μl 的测试菌, 每种测试菌设置 3 个平行。37℃培养 18—24h, 利用酶标仪通过测定 OD_{595} 来确定 MIC, 对照组为 50μl 菌液与 50μl Tris-HCl 缓冲液的混合溶液。

1.6.2 微生物清除功能分析 将实验共分为两组: 实验组按照 50μl/尾虾(细胞浓度为 2×10^9 cells/L)的剂量注射经重组蛋白包被过的哈维氏弧菌; 对照组注射等量的未经包被的哈维氏弧菌。分别在注射后的 15min、30min、60min、180min 抽取 100μl 血淋巴, 每个时间点取 5 尾虾作为平行, 将取出的血淋巴立即涂在营养肉汤平板上, 35℃培养 14—16h。计算各平板

的菌落数,用生物统计学方法进行显著性分析。

2 结果

2.1 重组目的蛋白的表达与纯化

2.1.1 *Fc-SPH* 成熟肽的扩增及其重组表达载体的构建 通过 PCR 扩增,获得含有 *Fc-SPH* 成熟肽的目的片段,回收片段,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。

2.1.2 重组目的蛋白的诱导表达和表达产物的初步分析 IPTG 诱导后结果如图 1 所示,在预期分子量 38.8kDa 的位置出现了特异的蛋白谱带,该蛋白的表达量与诱导时间显著相关,伴随诱导时间的延长,蛋白表达量显著增加,诱导 5h 后表达量达到平台期,继续培养,目的蛋白表达量相对稳定,不再显著增加,所以可以推断这条蛋白谱带就是重组目的蛋白。由于重组蛋白带有一个组氨酸标签(-MRGSHHHHHHGM-),所以分子量略大于其预测的理论分子量。通过凝胶分析软件分析发现,这条蛋白谱带的表达量占到了宿主菌总蛋白含量的 35%左右。

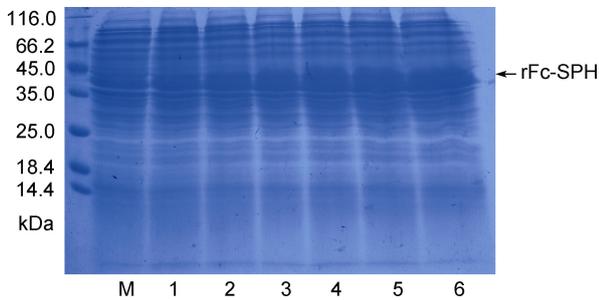


图 1 不同 IPTG 诱导时间对 rFc-SPH 表达量的影响
Fig.1 Expression profile of rFc-SPH fusion protein during different time after being induced by IPTG
M: 蛋白分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导的菌体总蛋白; 2—6: 分别经 IPTG 诱导后 0.5h、1h、2h、3h、4h 和 5h 的菌体总蛋白

2.2 质谱鉴定结果

经鉴定比对分析后发现,所切下的重组蛋白谱带中有三个肽段与中国明对虾丝氨酸蛋白酶基因的推导氨基酸序列完全匹配,序列分别为-QFKLEVIR-、-TFANDVAIR-和-DWIE QNIRP-(图片未列出)。由此可以判定,上述蛋白条带即为重组表达的目的蛋白(rFc-SPH),中国明对虾 *Fc-SPH* 的成熟肽成功地获得了体外重组表达。

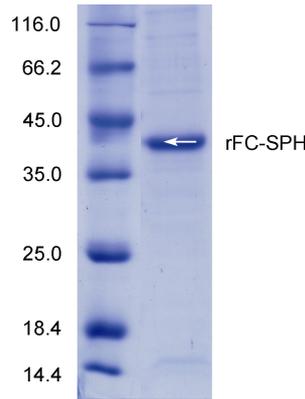


图 2 重组目的蛋白 rFc-SPH 的纯化 SDS-PAGE 图
Fig.2 The purification result of rFc-SPH analyzed by SDS-PAGE

2.3 重组目的蛋白 rFc-SPH 的纯化与复性质谱鉴定正确后,利用 Ni-IDA 技术对超声波破碎菌体中的重组蛋白分别进行分离纯化,电泳检测显示在 38.8kDa 位置有一条单一主带(图 2),这与预期结果一致。纯化的目的蛋白复性后得率约为 0.5g/L。

2.4 重组目的蛋白(rFc-SPH)的活性与功能分析

2.4.1 重组目的蛋白的抑菌活性分析 本研究利用液体生长方法检测 rFc-SPH 对不同病原菌的抑菌活性,结果发现重组目的蛋白对部分革兰氏阳性菌(苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌)、革兰氏阴性菌(大肠杆菌、鳃弧菌和哈维氏弧菌)以及真菌(酵母菌)的生长有明显抑制作用($P < 0.05$),最小抑菌浓度为 1.09—36 $\mu\text{mol/L}$ 之间;对金黄色葡萄球菌没有表现出抑制效果($P > 0.05$)(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(MIC)

Tab.1 Antimicrobial activity and MIC of recombinant target protein (rFc-SPH)

菌株(Microorganism)	受试范围内重组目的蛋白的最小抑菌浓度($\mu\text{mol/L}$)
革兰氏阳性菌(G+)	
苏云金芽孢杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)	36
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	1.09
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	NA
革兰氏阴性菌(G-)	
鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>)	25
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	1.09
哈维氏弧菌(<i>Vibrio harveyi</i>)	35
真菌	
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	25

注: NA 表示在重组目的蛋白最大检测浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$ 条件下,仍没有明显的抑菌效果

2.4.2 重组目的蛋白的微生物清除功能分析 菌落计数结果显示,在注射未包被与包被病原菌后的 15min,前者对虾血淋巴中哈维氏弧菌的数量约为后

者的 2 倍; 到注射后的 30min, 经重组蛋白包被过的哈维氏弧菌已经可以被对虾从体内完全清除, 而未经包被的哈维氏弧菌在注射后 60min 才可完全被清除(表 2)。对虾清除血淋巴中经 rFc-SPH 包被过的哈维氏弧菌的效率比清除普通哈维氏弧菌的效率更高 ($P<0.05$)。

表 2 rFc-SPH 对血淋巴清除哈维氏弧菌的影响
Tab.2 Effect of *V. harveyi* clearance by rFc-SPH from the hemolymph circulation

菌落培养时间 (min)	血淋巴中菌落总数(个克隆)	
	实验组	对照组
15	765*	1388
30	0*	287
60	0	0
120	0	0
180	0	0

注: *为实验组菌落数与对照组菌落数有显著性差异 ($P<0.05$)

3 讨论

尽管丝氨酸蛋白酶(SP)是一类有诸多重要生物功能的蛋白, 但在甲壳动物尤其是对虾中对 SP 深入的分子生物学研究以及精细的作用功能探讨还非常少。前期工作中作者对 *Fc-SPH* 的同源性比较和多序列比对分析结果证实该 cDNA 序列编码的是一种丝氨酸蛋白酶同源物, 胰蛋白酶家族有 6 个保守的半胱氨酸形成 3 个二硫键, 在 *Fc-SPH* 的 Tryp_SPc 结构域中都具有这 6 个保守的半胱氨酸, 预测发现它们可以形成 3 个二硫键以稳定蛋白的结构。SP 中胰蛋白酶家族都具有保守的底物结合空穴, 其中的 Asp 定位于该结合空穴的底部, 它通过与底物断裂位点的 Lys 或 Arg 之间离子力的相互作用而决定着酶作用的特异性 (Perona *et al*, 1995; Hedstrom *et al*, 1992), 比对结果发现在 *Fc-SPH* 的序列中, 该底物结合空穴并不保守, 其中重要的 Asp 残基被 Glu 所取代了, 这也从一个侧面说明 *Fc-SPH* 的主要功能可能不是发挥类似胰蛋白酶的消化作用; 在 *Fc-SPH* 的 Tryp_SPc 结构域中, 具有三分子活性催化位点(Kraut, 1977)中的两个(His 和 Asp), 而另一个位点通常应为 Ser, 在该基因中被 Gly-316 替换了, 斑节对虾和日本对虾中的 SPH 也具有类似特征, 那么它们是否还能正常的发挥胰蛋白酶的功能还是具有其它的功能都需要实验的进一步验证。在脊椎动物和无脊椎动物中均有 SPH 的报道,

哺乳动物的 SPH 缺乏蛋白水解活力, 牛的蛋白 Z 是一个和凝血酶(thrombin)相关的 SPH; 在无脊椎动物中, SPH 可以参与抗微生物应答(Kawabata *et al*, 1996)、模式识别(Huang *et al*, 2000)以及免疫应答等作用(Sakamoto *et al*, 2011)。

那些参与更多复杂生理过程的蛋白酶通常不止包含具催化功能的结构域, 额外的结构域可以帮助达到适宜的蛋白-蛋白之间的相互作用, 以更好地调节蛋白酶的活力并将反应定位到特定分隔的区域。在一些节肢动物中, 含有具二硫键结构的 clip 结构域的 SP 相当重要, 它们可参与防御应答或胚胎发育过程, 它可能调节丝氨酸蛋白酶的活力(Jiang *et al*, 2000)。Clip 结构域的序列并不是很保守, 但其中的 6 个半胱氨酸非常保守。在作者克隆到的 *Fc-SPH* 仅含有一个 clip 结构域, 并具有保守的 6 个半胱氨酸。从对 *Fc-SPH* 基因分析的结果来看, 它具备一个保守的 clip 结构域和一个催化位点 Ser 被 Gly 替代了的胰蛋白酶样结构域, 应该是一个典型的 SPH, 它可能象大多数 SPH 一样在对虾应答病原感染的免疫过程中发挥重要作用。

有文献曾报道, 鲎中的因子 D 作为一种 SP 具有一定的抗微生物活性(Kawabata *et al*, 1996), 本文中的重组目的蛋白 rFc-SPH 对养殖过程中常见的主要革兰氏阳性、阴性细菌和真菌均有明显的抗菌活性, 同时它还具有辅助清除对虾体内的微生物的功能。Jitvaropas 等(2009)在对斑节对虾 SPH 的研究中发现 SP-like domain 具有微生物清除和结合细菌的功能, 而 clip domain 可以抑制部分细菌的生长。本研究结果显示, *Fc-SPH* 具有多种功能, 即可以作为一线防御应答效应物直接参与虾类的先天免疫活动而发挥作用, 也可以充当调理素, 通过调理作用促进血细胞对病原微生物进行吞噬和杀灭, 辅助虾体清除外来病原微生物, 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。本研究以中国明对虾血细胞中的丝氨酸蛋白酶同源物基因为研究对象, 对其成熟肽区域进行了原核重组表达和活性、功能分析, 探讨了其在对虾先天免疫过程中的可能作用, 在中国明对虾中属首次报道, 这些工作将为探索对虾 SPH 精确的生物功能提供有用的信息, 并为深入了解甲壳动物免疫应答机制和开展对虾病害防治研究提供理论参考。

参 考 文 献

- 孙 杰, 王宝杰, 李晓华等, 2010. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征. 水产学报, 34(1): 56—66
- 翁 凌, 李 腾, 阴利华等, 2010. 南美白对虾丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究. 集美大学学报(自然科学版), 15(4): 272—278
- 曾 勇, 王文超, 2008. 克氏原螯虾丝氨酸蛋白酶类似物部分基因的克隆与鉴定. 淡水渔业, 38(5): 22—25
- Hedstrom L, Szilagyi L, Rutter W J, 1992. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science*, 255(5049): 1249—1253
- Huang T S, Wang H, Lee S Y *et al*, 2000. A cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase homologue similar to *Drosophila masquerade*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(14): 9996—10001
- Jiang H, Kanost M R, 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2): 95—105
- Jitvaropas R, Amparyup P, Gross P S *et al*, 2009. Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(3): 236—243
- Kawabata S, Tokunaga F, Kugi Y *et al*, 1996. Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 398(2—3): 146—150
- Kraut J, 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 331—358
- Krem M M, Di Cera E, 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(2): 67—74
- Naitza S, Ligoxygakis P, 2004. Antimicrobial defences in *Drosophila*: the story so far. *Molecular Immunology*, 40(12): 887—896
- Perona J J, Craik C S, 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, 4(3): 337—360
- Rattanachai A, Hirono I, Ohira T *et al*, 2005. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 18(1): 39—48
- Ren Q, Xu Z L, Wang X W *et al*, 2009. Clip domain serine protease and its homolog respond to *Vibrio* challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5): 787—798
- Sakamoto M, Ohta M, Suzuki A *et al*, 2011. Localization of the serine protease homolog BmSPH-1 in nodules of *E. coli*-injected *Bombyx mori* larvae and functional analysis of its role in nodule melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(5): 611—619

RECOMBINANT EXPRESSION AND BIOACTIVITY ANALYSIS OF A SERINE PROTEINASE HOMOLOGUE GENE (*Fc-SPH*) FROM THE CHINESE SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS*

YANG Yi^{1,2}, LIU Yi-Chen^{1,2}, ZHANG Yi-Chen^{1,2}, SUN Yan³, GENG XU-Yun³, SUN Jin-Sheng^{1,2,3}

(1. College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387; 2. Tianjin Key Laboratory of Cyto-genetical and Molecular Regulation, Tianjin, 300387; 3. Tianjin Aquaculture Disease Prevention & Treatment Center, Tianjin, 300221)

Abstract Like other crustaceans, shrimp have a non-specific innate immunity which is composed of diverse processes and molecules to defend themselves against invading pathogens. Arthropod clip domain serine proteinase homologues (clip-SPHs) have been shown to be involved in various biological functions including innate immunity. A serine proteinase homologue (*Fc-SPH*) cDNA was cloned from the haemocytes of *Fenneropenaeus chinensis*. *Fc-SPH* contains a trypsin-like serine protease domain (Tryp_SPc domain) and a clip domain. The transcript of *Fc-SPH* is induced in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection. Recombinant *Fc-SPH* (rFc-SPH) were successfully expressed in bacteria and purified for further research of biological functions. It showed *in vitro* antimicrobial activity against the *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* and *Saccharomyces cerevisiae*. A higher bacterial clearance rate of *V. harveyi* coated with the rFc-SPH compared with *V. harveyi* only was shown by *in vivo* study. It revealed that *Fc-SPH* act as opsonin and could help shrimp to remove external microorganism. The results suggest that *Fc-SPH* might be a multifunctional immune molecule in shrimp defense. It can provide us clues to understand the probable role of SPH in innate immunity of shrimp.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, Serine proteinase homologue (SPH), clip domain, Bioactivity, Innate immunity