

抗菌肽HB β -C在全雄和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异中的作用

熊阳 王帅 丹成 张义兵 梅洁

THE ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE HB β -C IN *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS* RESISTANCE IN ALL-MALE AND HYBRID YELLOW CATFISH

XIONG Yang, WANG Shuai, DAN Cheng, ZHANG Yi-Bing, MEI Jie

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.193>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

青海湖裸鲤和黄河裸裂尻鱼感染多子小瓜虫的病理学比较研究

THE DIFFERENT PATHOLOGY OF *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* AND *SCHIZOPYGOPSIS PYLZOWI* INFECTED WITH *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS*

水生生物学报. 2019, 43(5): 1081–1091 <https://doi.org/10.7541/2019.127>

杂交黄颡鱼与普通黄颡鱼幼鱼生长性能及耐低氧能力的比较

THE GROWTH CHARACTERISTICS AND HYPOXIA TOLERANT ABILITY OF YELLOW CATFISH AND HYBRID CATFISH

水生生物学报. 2019, 43(6): 1271–1279 <https://doi.org/10.7541/2019.151>

壳寡糖对杂交黄颡鱼“黄优1号”(黄颡鱼♀×瓦氏黄颡鱼♂)生长性能与免疫机能的影响

EFFECTS OF DIETARY CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE ON GROWTH PERFORMANCE AND IMMUNITY OF HYBRID YELLOW CATFISH “HUANGYOU NO. 1” *TACHYSURUS FULVIDRACO* ♀ × *TACHYSURUS VACHELLI* ♂

水生生物学报. 2020, 44(4): 707–716 <https://doi.org/10.7541/2020.085>

黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较

THE MORPHOLOGY AND GONAD DEVELOPMENT OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND ITS INTERSPECIFIC HYBRID “HUANGYOU NO. 1” WITH *PELTEOBAGGRUS VACHELLI*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1231–1238 <https://doi.org/10.7541/2019.146>

蝇蛆粉替代鱼粉对杂交黄颡鱼生长性能、体组成和抗氧化能力的影响

EFFECTS OF SUBSTITUTION OF FISH MEAL WITH MAGGOT MEAL ON GROWTH PERFORMANCE, BODY COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF HYBRID YELLOW CATFISH

水生生物学报. 2021, 45(3): 573–581 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.012>

应用DNA分子标记鉴定黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的研究

IDENTIFICATION OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*, *PELTEOBAGGRUS VACHELLI* AND THEIR INTERSPECIFIC HYBRID BY DNA MARKERS

水生生物学报. 2017, 41(2): 321–325 <https://doi.org/10.7541/2017.39>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.193

抗菌肽HB β -C在全雄和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异中的作用

熊阳¹ 王帅¹ 丹成² 张义兵² 梅洁¹

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 为研究全雄黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)和杂交黄颡鱼(黄颡鱼*P. fulvidraco*♀×瓦氏黄颡鱼*P. vachelli*♂)对多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)的抗性差异, 通过生物信息学分析黄颡鱼皮肤黏液蛋白质组, 发现其血红蛋白源抗菌肽(HB β -C)位于血红蛋白 β 链HB β 的碳端, 共33个氨基酸。利用化学合成的不同浓度的HB β -C肽段进行体外抗虫实验, 研究发现其能有效杀死滋养体、包裹体和掠食体阶段的多子小瓜虫, 其中15 μ g/mL的HB β -C能在3min内杀死所有滋养体。基因表达量分析显示, 在杂交黄颡鱼的鳃和皮肤组织中, HB β 的mRNA表达量高于全雄黄颡鱼; 但在应对小瓜虫感染的过程中, 全雄黄颡鱼的HB β mRNA转录水平快速提升, 其表达水平和上升倍率显著高于杂交黄颡鱼。蛋白表达量分析显示, HB β 在全雄黄颡鱼鳃组织中的蛋白表达量明显高于杂交黄颡鱼。免疫荧光定位结果显示, 抗菌肽HB β -C特异地在红细胞中表达, 可以分泌并附着在滋养体上。综上所述, 相对于杂交黄颡鱼, 全雄黄颡鱼中HB β 具有更高的翻译效率, 可以更高效地应对多子小瓜虫的感染。

关键词: 多子小瓜虫; 全雄黄颡鱼; 杂交黄颡鱼; 血红蛋白 β 链; 抗菌肽; 体外抗虫实验

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)05-0975-11



黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是我国一种重要的淡水经济鱼类, 肉质鲜美, 无肌间刺, 营养价值高, 深受广大消费者的喜爱。在相同的养殖条件下, 雄性黄颡鱼在养殖第二年的生长速度是雌性的1.5—2倍, 培育全雄黄颡鱼能够显著提高养殖产量和经济效益^[1]。中国科学院水生生物研究所桂建芳课题组和华中农业大学梅洁课题组开发出了性染色体特异的性别标记, 并建立了一条X和Y染色体连锁标记辅助的全雄鱼培育技术路线^[2-6], 推动黄颡鱼产业的迅速发展。近年来, 由于YY超雄鱼多代自交退化及在亲本培育过程中遇到一些问题, 制约了全雄黄颡鱼产业的发展^[7], 需要进行品种改良或培育新品种。杂交黄颡鱼(黄颡鱼*Pelteobagrus fulvidraco*♀×瓦氏黄颡鱼*Pelteobagrus vachelli*♂)形态特征与黄颡鱼相近, 且其生长速度明显优于黄颡鱼。华中农业大学等多家单位和企业进行联合育种研究, 采用传统选育和杂交育种的方法, 培育出

了水产新品种杂交黄颡鱼“黄优1号”(GS-02-001-2018)^[8]。育种技术的创新和新品种的培育推动了黄颡鱼产业的持续发展, 2019年我国黄颡鱼养殖产量高达5.37×10⁸ kg, 成为发展速度最快的特色淡水鱼之一^[9]。

近年来, 由多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)引起的小瓜虫病(又称白点病)成为黄颡鱼养殖常见的疾病之一, 给我国黄颡鱼养殖业造成巨大的经济损失。多子小瓜虫没有严格的宿主专一性, 能感染绝大部分淡水鱼类, 如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*)和鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)等经济鱼类均易受到感染^[10-16]。刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*; 又称为海水小瓜虫)引起的白点病已成为大范围、经常暴发的传染性疾病, 给

收稿日期: 2020-08-28; 修订日期: 2021-02-06

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-46); 国家重点研发计划(2018YFD0901201和2018YFD0900302)资助 [Supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-46); the National Key R & D Program of China (2018YFD0901201 and 2018YFD0900302)]

作者简介: 熊阳(1993—), 男, 博士研究生; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: xiongyang2018@163.com

通信作者: 梅洁(1981—), 博士, 教授; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: jmei@mail.hzau.edu.cn

海水鱼养殖也造成巨大的经济损失,大部分海水养殖鱼类如斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、卵圆鲳鲆(*Trachinotus blochii*)和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)等均容易感染刺激隐核虫^[17-19]。小瓜虫病的防治目前仍是国际性的难题。

鱼类的皮肤黏液作为抵御寄生虫感染的第一道重要屏障,含有诸多抑杀病原的活性物质如免疫球蛋白、转铁蛋白、补体、凝集素和抗菌肽等^[20]。黄斑蓝子鱼(*Siganus oramin*)等极少数鱼类具有天然抗刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的能力^[21],其皮肤黏液蛋白对多子小瓜虫和刺激隐核虫均有杀伤效果^[22]。鱼类的鳃和皮肤作为分泌皮肤黏液的主要器官,有学者在其中发现了一个抗菌肽(位于血红蛋白 β 链HB β C端的肽段)具有抗多子小瓜虫的效果^[23]。最近,通过蛋白质组技术发现HB β 存在于黄颡鱼皮肤黏液中,其表达量在鲇爱德华氏菌感染后明显上升^[24],说明HB β 可能具有抗菌功能。据多数养殖户反映,全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫的敏感程度存在明显差异。为解析全雄黄颡鱼与杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异的分子机制,本研究系统地比较了全雄黄颡鱼、杂交黄颡鱼和瓦式黄颡鱼对多子小瓜虫的抗性差异,检测了HB β 基因在全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼免疫相关组织中的表达差异,研究了人工合成黄颡鱼抗菌肽(HB β C端的肽段,HB β -C)体外的杀虫效果,旨在为黄颡鱼多子小瓜虫病的防控提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

全雄黄颡鱼(4.43 ± 0.45) g、杂交黄颡鱼(6.07 ± 0.64) g和瓦式黄颡鱼(8.65 ± 1.18) g在武汉百瑞生物技术有限公司循环水养殖系统暂养2周。在暂养期间,随机选取全雄黄颡鱼、杂交黄颡鱼和瓦式黄颡鱼各10尾在光学显微镜下对鳃、鳍条和皮肤黏液进行仔细检查,均未见小瓜虫等寄生虫。

1.2 小瓜虫的培养及其滋养体、包裹体和掠食体的分离

采用张其中等^[25]报道的方法分离小瓜虫的滋养体、包裹体和掠食体,用于体外攻毒试验。将已感染小瓜虫的赤眼鲟与杂交黄颡鱼饲养于同一循环水箱中进行平行感染维持实验所需的小瓜虫。首先用200 mg/L MS-222 (甲基磺酸三胺)将严重感染的杂交黄颡鱼麻醉,然后用干净的细胞刮刀从鱼皮肤和鳍条上取出包裹着囊泡的滋养体,反复清洗多次后,直至去除大部分黏液,将干净滋养体放置装有养殖系统水的培育皿中用于体外抗虫试验和

形成包裹体。滋养体在20℃下约10 min停止游动吸附在培育皿底部,形成一层透明的薄膜形成包裹体,虫体在内旋转运动并以二分裂的形式分裂形成子体,约20 h后成熟并释放出400—600个具有感染性的掠食体,收集后用于抗虫试验。

1.3 小瓜虫人工感染试验及样品收集

在暂养2周后,将健康的全雄黄颡鱼、瓦式黄颡鱼和杂交黄颡鱼分别随机分为对照组和感染组置于90 L水箱中,水温保持在 (20 ± 1.0) ℃,溶解氧 ≥ 6 mg/L以上。每组3个平行,每个平行随机放入65尾鱼。此外,添加一组混合感染组即全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼各32尾,通过分别剪左右腹鳍进行物理辨别。参照Clark等^[26]方法进行小瓜虫人工感染实验,3尾已被平行感染的杂交黄颡鱼与每个感染组共栖息在同一个养殖缸中,而对照组则不放入受感染的鱼,其他养殖环境相同。在试验期间,及时清理死鱼以免污染水质,记录其感染情况并统计每个组合死亡率。在感染的第5天,每个组合分别从3个平行鱼箱中各取5尾鱼,用200 mg/L MS-222 (甲基磺酸三胺)麻醉后,分别取部分皮肤和鳃组织固定在4%多聚甲醛24 h,用于免疫组化和病理学分析;而另取部分组织用液氮处理后转移至-80℃冰箱保存,用于血红蛋白 β 链基因的组织表达分析。

1.4 黄颡鱼血红蛋白源抗菌肽HB β -C生物信息学分析及化学合成

前期我们通过蛋白质组技术比较鲇爱德华氏菌感染前后黄颡鱼皮肤黏液蛋白质的表达变化^[24]。本实验通过本地blastall程序将黄颡鱼黏液蛋白质组所有肽段序列与抗菌肽数据库(http://aps.unmc.edu/AP/APD3_update2020_release.fasta)进行比较分析确定抗菌肽位置。使用以下软件和工具对血红蛋白源抗菌肽HB β -C进行分析: Clone Manager软件对黄颡鱼血红蛋白 β 链基因序列进行分析,确定其开放阅读框(ORF); DNAMAN 7.0软件进行氨基酸序列分析; BLAST工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行核苷酸和氨基酸序列相似性分析。利用HeliQuest工具(<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr>)进行抗菌肽HB β -C进行氨基酸电荷和疏水性分析。以硬骨鱼*Leiosomus xanthurus*的血红蛋白 β 链(蛋白数据检索号1spg.1.B)为模板使用SWISS-MODEL server (<http://swissmodel.expasy.org/>)进行建模预测抗菌肽结构。

抗菌肽HB β -C由南京市金斯瑞生物科技股份有限公司采用固相化学合成法合成,反向液相色谱确定纯度在90%以上,然后利用质谱确定分子量准确无误。

1.5 血红蛋白 β 链在黄颡鱼皮肤和鳃组织中表达量分析

用TRIzol试剂(中国大连, TaKaRa)提取每个样品的总RNA; 通过NanoDrop 2000测定RNA浓度和琼脂糖凝胶电泳确认提取的RNA完整后, 等量混合; 使用PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒按说明书要求进行反转录得到cDNA。RT-PCR反应体系: SYBR Green Mixture 10 μ L, 10 μ mol/L的正向引物(F: 5'-TTCACGCTTCTTGC TAACT-3')和反向引物(R: 5'-CAGCCACGACGAC ATTCA-3')各0.5 μ L, 去离子水8.0 μ L, cDNA 1.0 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性30s, 40个循环(95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30s), 溶解曲线: 65—95 $^{\circ}$ C、0.5 $^{\circ}$ C/次, 5s读板。每个样品设置3个重复。反应结束后分析扩增产物的溶解曲线, 以黄颡鱼 β -actin作为内参基因, 分析每个样品中基因表达情况。

Western blot印迹分析: 将黄颡鱼HB β -C肽段部分序列(PEVHETWQKFLN)进行化学合成后注射到新西兰大白兔获得兔源的HB β 多克隆抗体; 提取鳃组织的总蛋白后再进行15% SDS-PAGE电泳, 用湿转法进行转膜; 在封闭液(5%脱脂奶粉)中封闭1h, 封闭液加入HB β 多克隆抗体(1:1000)中在摇床上4 $^{\circ}$ C封闭过夜; 洗膜, 加入HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (1:1000), 室温摇床孵育1h; 洗膜, 用ECL显色系统进行显色, 置红外激光成像系统检测并拍照。Western blot结果中的条带强度使用Image J软件分析。

1.6 HB β -C体外抗小瓜虫试验

将化学合成的HB β -C粉剂溶于灭菌双蒸水中使其终浓度为1000 μ g/mL, 用双蒸水稀释为500、250、125、50、25、15、5、2和1 μ g/mL。体外试验在96孔细胞培养板中进行, 每孔加入70 μ L不同浓度抗菌肽和10个滋养体, 每种浓度3个平行孔。试验设置未加抗菌肽的作为阴性对照组。每0.5h镜检1次, 4h后统计各孔死亡情况。包囊体和掠食体的药物处理同上。不同生活史小瓜虫死亡判断标准为虫体纤毛不再运动, 膜破裂, 胞内物质外流。

1.7 组织病理学分析

组织样品做石蜡包埋后进行连续切片, 分别进行苏木精-伊红(HE)染色和免疫组化分析。

免疫组化分析: 组织石蜡切片置于65 $^{\circ}$ C烘箱中烘片2h进行脱蜡, PBS洗涤(洗涤3次, 每次5min, 下同)后置于EDTA缓冲液中微波修复, 自然冷却后PBS洗涤; 切片置于3%过氧化氢溶液中室温下避光孵育10min, 阻断内原酶反应; PBS洗涤, 甩干后用5% BSA封闭20min, 封闭非特异性反应; 去除BSA

液, 每张切片加入HB β 多克隆抗体(1:200)覆盖组织, 4 $^{\circ}$ C过夜; PBS洗涤, 每张切片加入Cy3-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (1:1000), 37 $^{\circ}$ C孵育50min; PBS洗涤, 每张切片加50—100 μ L DAPI染液, 室温避光孵育5min; 染色后将切片放入PBS洗涤, 滴加适量的抗荧光淬灭剂于组织上, 盖玻片封片, 荧光显微镜下观察。

1.8 数据分析

使用Excel 2010和SPSS 11.0软件统计分析数据, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验小瓜虫感染组与对照组样品间血红蛋白 β 链基因表达量差异。实验数据为平均值 $\pm$ 标准差(SD)的方式表示, $P<0.05$ 表示差异性显著(*), $P<0.01$ 表示差异性极显著(**)。利用GraphPad Prism 6.0软件做基因表达和Kaplan-Meier生存曲线图, 用Mantel-Cox检验分析曲线之间的差异。

2 结果

2.1 全雄黄颡鱼、杂交黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼对多子小瓜虫的抗性差异分析

为了评估全雄黄颡鱼、杂交黄颡鱼和瓦式黄颡鱼对多子小瓜虫的敏感性, 我们进行了感染试验。在3种鱼进行感染实验后, 每日死亡状况如表1所示。杂交黄颡鱼和瓦式黄颡鱼极易感染多子小瓜虫, 在感染5—6d即可观察到清晰的小白点寄生在皮肤和鳍条上, 光学显微镜下也可观察鳃部被感染, 感染率高达100%。在试验期间, 全雄黄颡鱼未发现临床症状, 通过光学显微镜观察未检测到多子小瓜虫存在于全雄黄颡鱼鳃、皮肤和鳍条组织。

表1 黄颡鱼感染多子小瓜虫每日死亡状况(尾)

Tab. 1 The daily dead status of yellow catfish after infected with *Ichthyophthirius multifiliis*

组别 Group	使用鱼数 Number	每日死亡数Number of dead fish														死亡总数 Total dead fish
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
全雄黄 颡鱼a	60	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
全雄黄 颡鱼b	60	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
全雄黄 颡鱼c	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
杂交黄 颡鱼a	60	0	1	1	4	12	13	5	11	5	2	3	0	3	60	
杂交黄 颡鱼b	60	0	0	4	8	16	10	11	4	0	4	0	3	0	60	
杂交黄 颡鱼c	60	0	2	1	3	11	19	8	9	1	3	0	3	0	60	
瓦氏黄 颡鱼a	60	0	5	6	16	24	7	0	2	0	0	0	0	0	60	
瓦氏黄 颡鱼b	60	3	4	2	13	11	20	6	1	0	0	0	0	0	60	
瓦氏黄 颡鱼c	60	0	3	4	19	17	15	2	0	0	0	0	0	0	60	

在相同感染条件下,瓦式黄颡鱼和杂交黄颡鱼的死亡率高达100%显著高于全雄黄颡鱼($P<0.0001$),而所有对照组鱼均存活且未被感染(图1)。在混合感染组中,杂交黄颡鱼因感染多子小瓜虫大批量死亡,而全雄黄颡鱼依旧镜检未检测到多子小瓜虫存在(图2),少量几条全雄黄颡鱼可能由于鳍条破损细菌感染而死亡。

2.2 黄颡鱼血红蛋白 β 链基因(HB β)及其C端抗菌肽HB β -C生物信息学分析

基于生物信息学分析,黄颡鱼HB β 的cDNA全长为447 bp,共编码148个氨基酸(aa;图3)。通过与抗菌肽数据库(http://aps.unmc.edu/AP/APD3_update2020_release.fasta)进行比较分析发现黄颡鱼抗菌肽HB β -C与斑点叉尾鲷抗菌肽AP01619匹配度高达84.84%,位于黄颡鱼血红蛋白 β 链基因的C端33 aa(图3下划线)。抗菌肽HB β -C的螺旋轮分布如图4A所示,其总电荷为+1.5,总疏水率为51.8%。抗菌肽HB β -C的模型结构图如图4B所示,由序列¹⁰PEVHETWQKFLNVVVAAL²⁸形成 α 螺旋结构。

2.3 黄颡鱼HB β 在鳃和皮肤等免疫组织中mRNA和蛋白表达量分析

我们分别以全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼作为抗感染和易感个体,选取多子小瓜虫的主要感染部位即皮肤和鳃组织检测HB β 的mRNA表达水平。定量

结果如图5A和5B所示,在对照组中,杂交黄颡鱼的鳃和皮肤组织中HB β 的mRNA表达量均高于全雄黄颡鱼;在攻毒试验第5天,HB β 的mRNA表达量在杂交黄颡鱼鳃和皮肤组织中分别上升了3.7倍和1.5倍,而在全雄黄颡鱼鳃和皮肤组织中分别上升了23.8倍和26.3倍,此时全雄黄颡鱼的鳃和皮肤组织中HB β 的mRNA表达量显著高于杂交黄颡鱼。在未感染多子小瓜虫的鳃组织中,全雄黄颡鱼HB β 蛋白表达量比杂交黄颡鱼高2.2倍(图5C和5D),表明全雄黄颡鱼HB β mRNA在鳃和皮肤等免疫组织中蛋白翻译水平明显高于杂交黄颡鱼;在应对小瓜虫感染的过程中,全雄黄颡鱼的mRNA转录水平快速提升,远远高于杂交黄颡鱼,可能与全雄黄颡鱼抗多子小瓜虫的特性相关。

2.4 抗菌肽HB β -C对多子小瓜虫的体外杀伤影响

多子小瓜虫的生活史分为滋养体、包裹体和掠食体三个阶段。当使用50 $\mu\text{g/mL}$ 的HB β -C处理后,滋养体从黏液囊中逃出后在水中剧烈运动,然后25s左右裂解,胞质外流而死(图6A和6B);仅需要15 $\mu\text{g/mL}$ 的HB β -C能在3min内杀死所有滋养体(表2)。由于包裹体具有较厚的包裹膜(图6C),抗菌肽HB β -C较难渗透;当使用500 $\mu\text{g/mL}$ 的HB β -C处理后,前40min包裹体的包裹膜迅速皱缩,里面的子体急剧运动(图6D),之后包裹体中的子体逐渐逃脱游离在水中,约1h后胞质外流最后死亡(图6E和6F)。对于刚释放的掠食体来说,HB β -C需要使用较高浓度(125 $\mu\text{g/mL}$)及花费更长时间(约3h)才能将其完

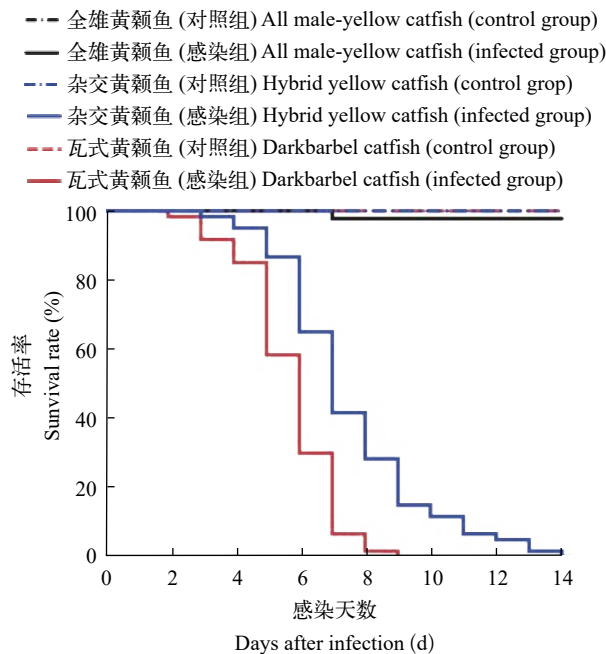


图1 全雄黄颡鱼、杂交黄颡鱼和瓦式黄颡鱼感染多子小瓜虫的存活曲线图

Fig. 1 The survival curves of all-male yellow catfish, hybrid yellow catfish and darkbarbel catfish after infected with *Ichthyophthirius multifiliis*

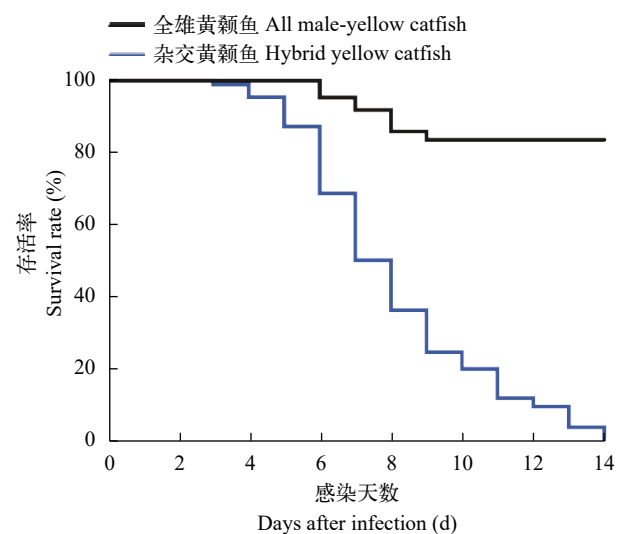


图2 全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼混合感染多子小瓜虫的存活曲线图

Fig. 2 The survival curves of all-male yellow catfish and hybrid yellow catfish after infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. All-male yellow catfish and hybrid yellow catfish were mixed together

	10	20	30	40	50	60
1	ATGGTTCATTGGACAGACGCCGAGCGCCATATCATCGCTGACCTATGGGGAAAGATCAAAA					
1	M V H W T D A E R H I I A D L W G K I K					
	70	80	90	100	110	120
61	CCTGATGAAATCGGACCACAGGCTTTGGCCAGAGTTCTGATTGTGTTTCCATGGACCCAG					
21	P D E I G P Q A L A R V L I V F P W T Q					
	130	140	150	160	170	180
121	AGGTACTTCTCTTCCTTTGGTAATCTATCCAATGCCGCAGCCATCTTAGGAAACCCCAAG					
41	R Y F S S F G N L S N A A A I L G N P K					
	190	200	210	220	230	240
181	GTGGCTGCTCATGGAACGATTGTCATTACCGGACTGGAGAAAGGTGTGAAGAATTTGGAC					
61	V A A H G T I V I T G L E K G V K N L D					
	250	260	270	280	290	300
241	AACGTTAAGGGCGTCTATGCTAAAGCTGAGTGAGCTTCACTCTGACACACTGCACGTGGAT					
81	N V K G V Y A K L S E L H S D T L H V D					
	310	320	330	340	350	360
301	CCCAGCAACTTCACGCTTCTTGCTAACTGCCTCACTGTTTGTCTGGCTGCAAAAGCTCGGA					
101	P S N F T L L A N C L T V C L A A K L G					
	370	380	390	400	410	420
361	CCCCCGCCTTCACTCCCTGAAGTGCACGAGACTTGGCAGAAAGTTCCTGAATGTCGTCGTG					
121	P A A F T P E V H E T W Q K F L N V V V					
	430	440				
421	GCTGCTCTGTGCAAGCAGTACCACTAA					
141	A A L C K Q Y H *					

图3 黄颡鱼HB β 基因cDNA全长及其预测的氨基酸序列

Fig. 3 The cDNA sequence and deduced amino acid sequences of HB β in yellow catfish

抗菌肽序列由下划线标出, 虚线框显示的序列是用来制备抗体的肽段

The antimicrobial peptide sequence is underlined, and the dashed box shows the peptide used to prepare antibody

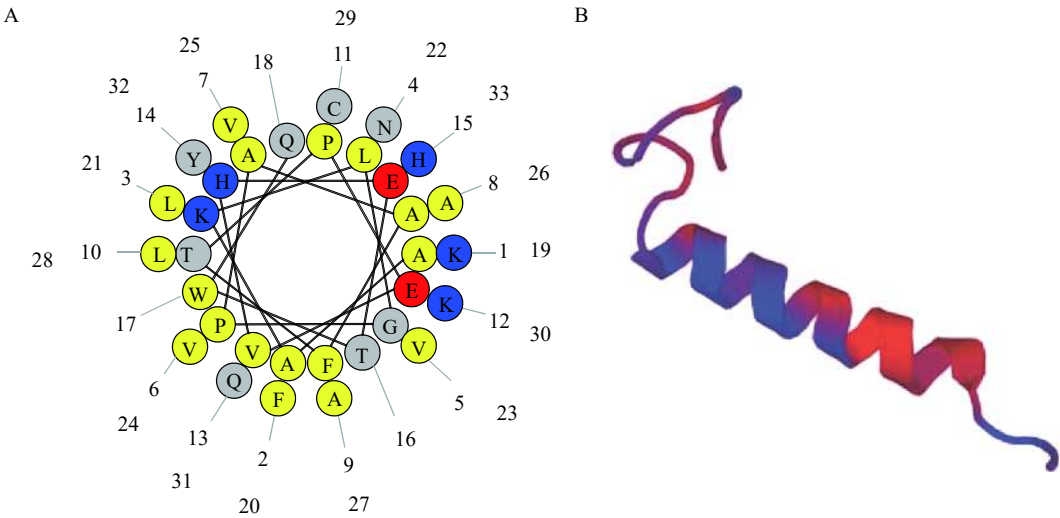


图4 抗菌肽HB β -C的螺旋轮分布和结构模型图

Fig. 4 The helical wheel distribution and structure model of the antimicrobial peptide HB β -C

A. 蓝色圆代表带正电荷氨基酸, 红色圆代表带负电荷氨基酸, 黄色圆代表非极性氨基酸, 灰色圆代表极性氨基酸; B. 红色代表疏水性氨基酸, 蓝色代表亲水性氨基酸

A. Blue circles represent positively charged amino acids, red circles represent negatively charged amino acids, yellow circles represent nonpolar amino acids, and grey circles represent polar amino acids; B. Red color represents hydrophobic amino acids and blue color represents hydrophilic amino acids

全杀死(图 6G和6H)。所有对照组的3个阶段的多子小瓜虫完好无损,各个阶段正常分裂发育。

2.5 HB β 在杂交黄颡鱼感染小瓜虫过程中的表达定位分析

为了研究HB β 在多子小瓜虫感染过程中的组织分布,我们使用连续切片分别进行HB β 抗体荧光免疫组化和苏木精—伊红(HE)染色分析。荧光免疫组化结果显示,HB β 抗体在杂交黄颡鱼鳃组织中的红细胞中有较强的表达信号(图 7A和7B,箭头所示)。此外,HB β 抗体能特异性结合到多子小瓜虫表面,表现出很强的荧光信号(图 7C和7D,箭头所示)。在皮肤组织中,多子小瓜虫寄生位置较深紧靠着基底膜,HB β 抗体也特异性附着多子小瓜虫上(图 7E和7F,箭头所示)。

3 讨论

多子小瓜虫病是水产养殖的主要病害之一,国内外科研工作者早期对小瓜虫的防治药物进行了

大量的筛选,已筛选的有效治疗药物如孔雀石绿、硝酸亚汞和醋酸亚汞等,均由于毒性强、致癌和严重污染环境而被禁用。近年来中草药上筛选的辣椒、生姜、五倍子等和化合物高锰酸钾、福尔马林、硫酸铜等有一定疗效,但大多数药物仅对掠食体阶段有一定效果,对滋养体阶段效果并不显著。小瓜虫病防治的最大难题就是一般药物不能有效渗透到小瓜虫的寄生部位杀死滋养体^[27]。

血红蛋白广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的红细胞中,是由2个 α 亚基和2个 β 亚基形成一个四聚体结构具有携氧功能的重要呼吸蛋白^[28]。近年来,研究者们发现血红蛋白除了具有携氧功能外,其亚基片段可形成各种活性肽,具有止痛、促生长激素释放、阿片样活性、促肾上腺皮质激素释放和血管紧张素转换酶抑制活性等功能^[29—33]。血红蛋白源的肽段可形成多种抗菌肽,其抗菌特性在哺乳类、爬行类、鱼类和贝类中均有发现^[34, 35]。诸多研究发现血红蛋白 α 链35—56位氨基酸和位于血

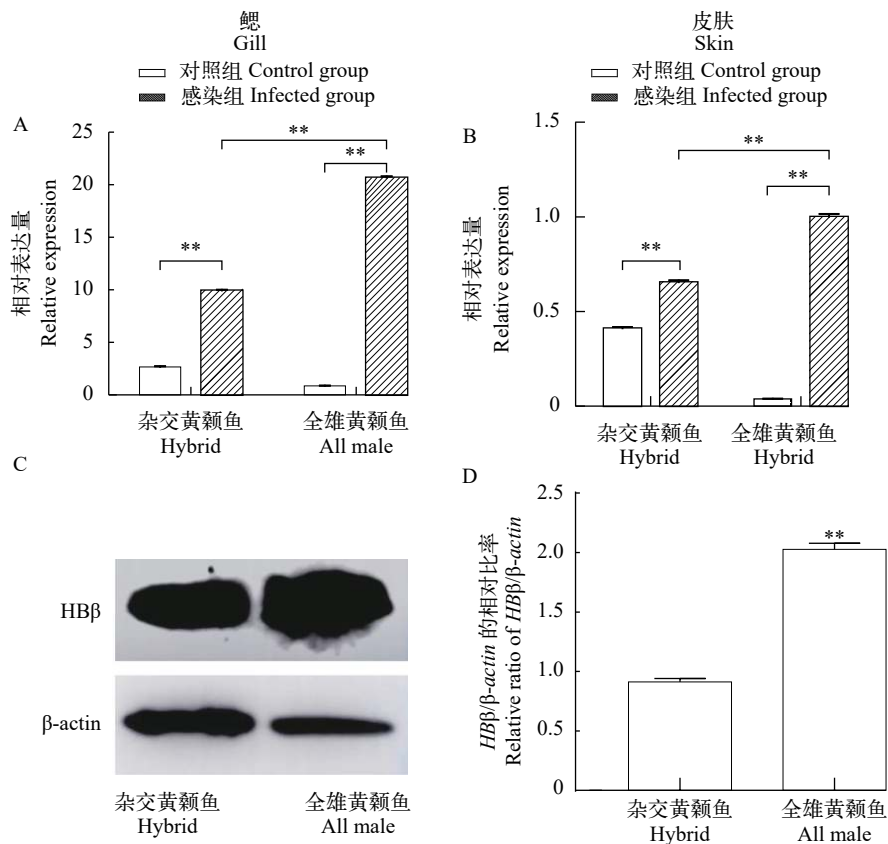


图 5 HB β 在鳃和皮肤组织中的表达分析

Fig. 5 The relative expression of HB β in gill and skin

A、B. HB β 在杂交黄颡鱼和全雄黄颡鱼的鳃(A)和皮肤(B)组织中的mRNA表达分析; C. HB β 在杂交黄颡鱼和全雄黄颡鱼的鳃组织中的蛋白表达分析; D. 使用Image J软件分析C图中HB β / β -actin的相对比率

A, B. The mRNA expression of HB β in gill (A) and skin (B) of hybrid yellow catfish and all-male yellow catfish; C. The protein expression of HB β in gill of hybrid yellow catfish and all-male yellow catfish. D. The relative ratio HB β / β -actin was determined by band intensities that were analyzed by Image J software

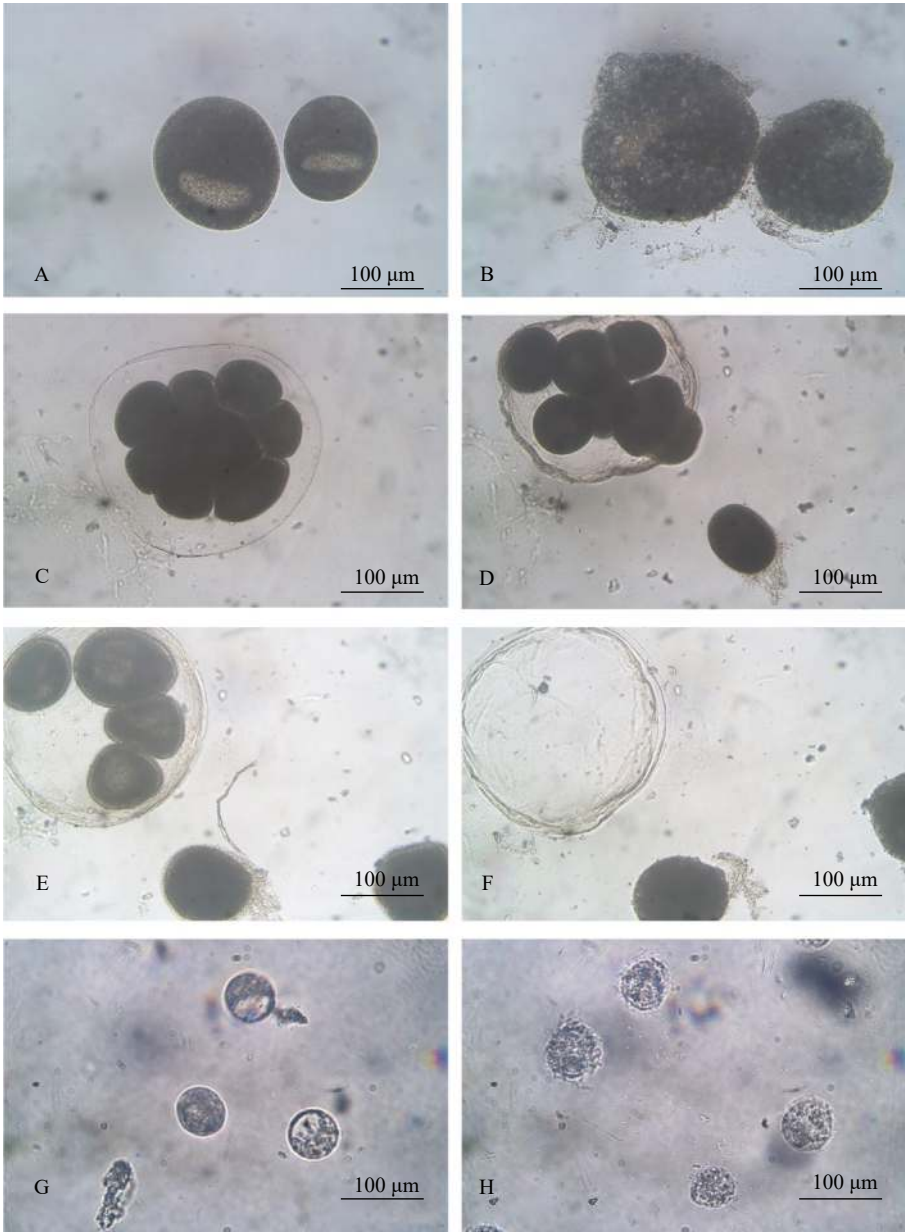


图 6 抗菌肽HBβ-C对不同生活史的多子小瓜虫的影响

Fig. 6 The effect of antimicrobial peptide HBβ-C on *Ichthyophthirius multifiliis* different life cycles

A. 滋养体处理前; B. 50 μg/mL的HBβ-C处理后的滋养体; C. 包裹体处理前; D—F. 500 μg/mL的HBβ-C处理后的包裹体; G. 掠食体处理前; H. 125 μg/mL的HBβ-C处理后的掠食体

A. Untreated trophont; B. Trophont treated with 50 μg/mL HBβ-C; C. Untreated tomont; D—F. Tomont treated with 500 μg/mL HBβ-C; G. Untreated theront; H. Theront treated with 125 μg/mL HBβ-C

表 2 抗菌肽HBβ-C对不同生活史的多子小瓜虫体外影响

Tab. 2 The effect of antimicrobial peptide HBβ-C on the different life cycles of *Ichthyophthirius multifiliis* in vitro

多子小瓜虫生活史 Life cycle of ich	最低杀虫浓度 PC ₁₀₀ (μg/mL)
滋养体Trophont	15
包裹体Tomont	>500
掠食体Theront	125

注: PC₁₀₀为杀死所有寄生虫的最低浓度
Note: PC₁₀₀ was the lowest concentration that all parasites died

红蛋白β链的111—146位氨基酸片段存在抗微生物活性^[23, 36—41]。Ullal等^[23]在斑点叉尾鲟的鳃和皮肤组织中发现位于血红蛋白β链的116—148位氨基酸的短肽, 其仅对小瓜虫滋养体阶段有较好的杀伤效果, 对掠食体和包裹体却没有明显效果。

我们前期在黄颡鱼的皮肤黏液蛋白质组中也曾发现血红蛋白β链的碳端序列HBβ-C, 其表达量在鲇爱德华氏菌感染后明显上升^[24]。本研究合成的黄颡鱼HBβ-C抗菌肽对滋养体阶段效果最佳, 仅

需要15 $\mu\text{g/mL}$ 的HB β -C抗菌肽能在3min内杀死所有滋养体;黄颡鱼HB β -C处理滋养体后短时间内会被诱导分泌出黏液囊并急剧运动,而这种黏液囊与正常滋养体脱离宿主后往包裹体分化时形成的黏液囊肿非常相似,而同样对多子小瓜虫具有杀伤作用的抗菌肽Piscidin 1处理后却并未发现滋养体分泌黏液囊^[42, 43]。从诱导滋养体运动加剧和分泌黏液囊的作用效果来看,抗菌肽HB β -C可能诱导滋养体离开宿主并加速分化,具体还需通过活体试验来进一步证实。此外,黄颡鱼抗菌肽HB β -C对掠食体也有杀伤效果,且高浓度处理包裹体后能导致包裹膜皱缩,导致体内子体旋转加剧甚至从包裹中逃逸出来最终死亡。以上表明黄颡鱼的HB β -C抗小瓜虫能力高于斑点叉尾鲟的HB β -C,抗小瓜虫能力的差异可能是由于HB β -C在2个物种中的序列差异造成的^[23]。一般抗菌肽发挥功能涉及3个重要特征: α 螺旋结构、抗菌肽整体带正电荷和较高含量的疏水性氨基酸。大量研究表明, α 螺旋结构抗菌肽的阳

离子电荷和疏水性氨基酸对抗菌作用至关重要^[44-46]。黄颡鱼抗菌肽Hb β -C大部分氨基酸呈 α 螺旋结构,整体带+1.5电荷,疏水率高达51.8%,而在斑点叉尾鲟发现的抗小瓜虫肽的整体0电荷,疏水率为45%。

斑点叉尾鲟易患鲟爱德华氏菌引起的鲟鱼肠道败血症(Enteric septicemia of catfish, ESC),而蓝鲶(*Ictalurus furcatus*)对鲟爱德华氏菌具有较强的抗性,其杂交种表现出中等抗性水平^[47]。本研究发现全雄黄颡鱼对由多子小瓜虫引起的白点病具有抗性,瓦式黄颡鱼易感染多子小瓜虫而快速死亡;但在养殖过程中也偶有报道全雄和普通黄颡鱼感染小瓜虫的案例,这可能与养殖条件和鱼体本身的健康状态有关系。我们分析杂交黄颡鱼和全雄黄颡鱼在感染多子小瓜虫前后HB β 的表达发现,虽然杂交黄颡鱼的鳃和皮肤组织中HB β 的mRNA表达量均高于全雄黄颡鱼,然而HB β 蛋白在全雄黄颡鱼鳃组织中要明显高于杂交黄颡鱼,这可能与翻译效率有关^[48]。在感染小瓜虫后,全雄黄颡鱼和杂交黄颡

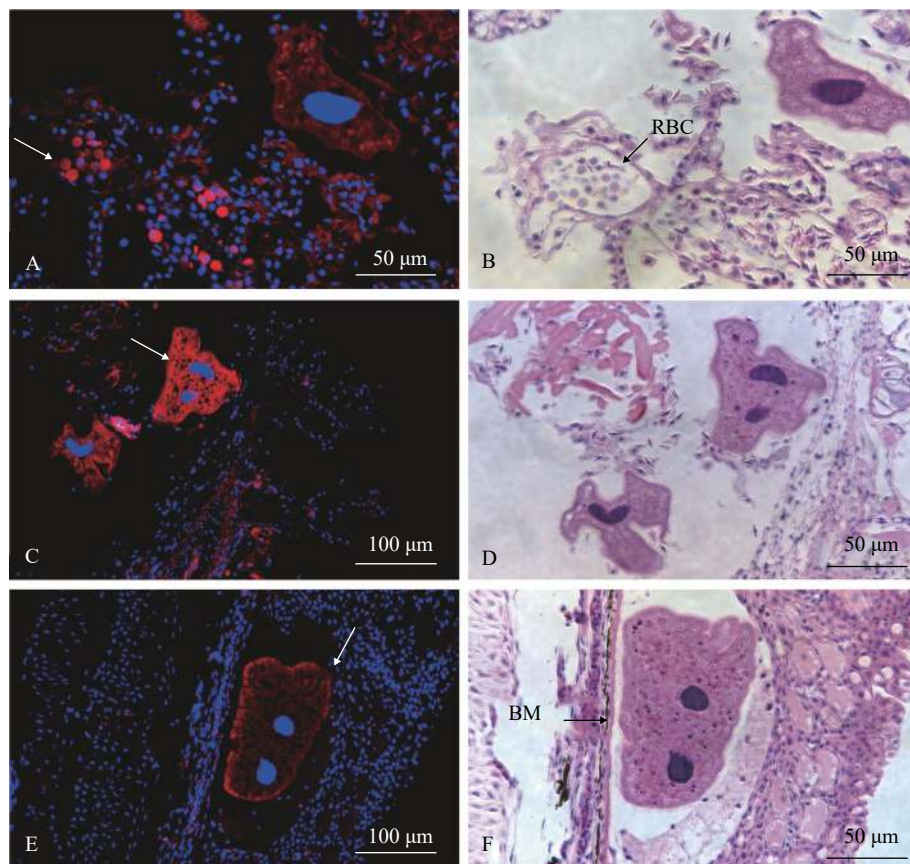


图7 HB β 免疫荧光定位及组织切片分析

Fig. 7 Detection of HB β localization by immunohistochemistry and analysis of histological section

A、C. 鳃组织的HB β 免疫组化分析; B、D. 鳃组织的HE染色分析; E. 皮肤的HB β 免疫组化分析; F. 皮肤的HE染色分析; 白色箭头所指为HB β 的阳性信号(红色荧光); DAPI 标记细胞核(蓝色荧光); RBC. 红细胞, BM. 基底膜

A, C. Immunohistochemistry analysis of HB β in gill; B, D. HE staining analysis of gill; E. Immunohistochemistry analysis of HB β in skin; F. HE staining analysis of skin; White arrowheads indicate the positive signal of HB β (red fluorescence); Nucleus were stained with DAPI (blue fluorescence). RBC. red blood cell, BM. basement membrane

鱼的鳃和皮肤组织中HB β 的mRNA均显著上升, 且全雄黄颡鱼上升倍率更高。研究者发现感染多子小瓜虫产生免疫抗性的鲤中, 掠食体就可以侵入皮肤, 但在感染后2h 80%的多子小瓜虫消失了, 表明鱼体本身可针对寄生虫迅速产生反应抵抗入侵^[49]。在多子小瓜虫感染后, 全雄黄颡鱼能快速合成大量HB β mRNA并高效率翻译成蛋白质, 产生的高水平HB β -C抗菌肽可能有效抵御多子小瓜虫。此外, 黄颡鱼在感染多子小瓜虫后, 抗菌肽HB β -C会富集在多子小瓜虫表面。多子小瓜虫的抑动抗原(Immobilization antigens)可诱导宿主在血清和黏液中产生抗体, 在体外会附着在不同生活史阶段的多子小瓜虫上^[50]。Xu等^[51]发现免疫球蛋白T和免疫球蛋白M广泛存在于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)皮肤中, 当多子小瓜虫感染时立即附着在其表面。抗菌肽导致膜破裂主要通过与其表面相互作用^[52]。杀虫类抗菌肽发挥作用主要通过作用于细胞膜, 扰乱电化学梯度, 从而引起寄生虫渗透性休克, 这一过程主要涉及膜电位的迅速崩溃和细胞内ATP下降; 膜通透性增加; 形态改变如气泡或破裂^[53]。

综上所述, 目前绝大多数药物仅对多子小瓜虫的掠食体阶段有效, 而对寄生在鱼体表的滋养体阶段很难发挥作用; 黄颡鱼抗菌肽HB β -C对寄生在鱼体的滋养体阶段有较好的杀伤效果, 未来可探索利用生物工程技术对抗菌肽HB β -C进行规模化生产, 应用到水产养殖业中。结果证明, 全雄黄颡鱼对小瓜虫病具有抗性, 而杂交黄颡鱼易感。全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼的抗病性能存在差异, 在养殖过程中, 可以根据养殖条件和养殖环境合理选择黄颡鱼的养殖品种。

参考文献:

- [1] Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, *et al.* YY supermale generated gynogenetically from XY female. in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 718-725. [刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从XY雌鱼雌核发育产生YY超雄黄颡鱼 [J]. *水生生物学报*, 2007, **31**(5): 718-725.]
- [2] Wang D, Mao H L, Chen H X, *et al.* Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations [J]. *Animal Genetics*, 2009, **40**(6): 978-981.
- [3] Dan C, Mei J, Wang D, *et al.* Genetic differentiation and efficient sex-specific marker. development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, **9**(10): 1043-1049.
- [4] Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, **57**(15): 1719-1729. [桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良 [J]. *科学通报*, 2012, **57**(15): 1719-1729.]
- [5] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish [J]. *Science China: Life Sciences*, 2014, **44**(12): 1198-1212. [梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, **44**(12): 1198-1212.]
- [6] Mei J, Gui J F. Sexual Size Dimorphism, Sex Determination and Sex Control Breeding in Yellow Catfish [A]/Wang H P, Piferrer F, Chen S L (Eds.), *Sex Control in Aquaculture* [C]. USA: Wiley-Blackwell, 2019: 495-503.
- [7] Xiong Y, Wang S, Guo W J, *et al.* Effects of different animal baits on the gonad development of YY super-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(2): 245-252. [熊阳, 王帅, 郭稳杰, 等. 不同动物饵料对YY超雄黄颡鱼性腺发育的影响 [J]. *水产学报*, 2020, **44**(2): 245-252.]
- [8] Hu W H, Dan C, Guo W J, *et al.* The morphology and gonad development of *Pelteobagrus fulvidraco* and its interspecific hybrid "Huangyou No. 1" with *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(6): 1231-1238. [胡伟华, 丹成, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较 [J]. *水生生物学报*, 2019, **43**(6): 1231-1238.]
- [9] China Bureau of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 53-55. [中华人民共和国渔政局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 53-55.]
- [10] Clark T G, Dickerson H W, Gratzek J B, *et al.* In vitro response of *Ichthyophthirius multifiliis* to sera from immune channel catfish [J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, **31**(sA): 203-208.
- [11] Xu Z, Takizawa F, Parra D, *et al.* Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods [J]. *Nature Communications*, 2016(7): 10728.
- [12] Xu J, Yu Y, Huang Z, *et al.* Immunoglobulin (Ig) heavy chain gene locus and immune responses upon parasitic, bacterial and fungal infection in loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(86): 1139-1150.
- [13] Santiago F G, Kurt B, Michael E N. Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, **31**(6): 576-586.
- [14] Xu D H, Klesius P H, Shoemaker C A. Protective immunity of Nile tilapia against *Ichthyophthirius multifiliis* post-immunization with live theronts and sonicated trophonts [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **25**(1-2): 124-127.
- [15] Yao J Y, Zhou Z M, Li X L, *et al.* Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*) [J]. *Veterinary*

- Parasitology*, 2011, **183**(1-2): 8-13.
- [16] Ahmad N, Amin A, Hemn M, *et al.* External parasite infection of common carp (*Cyprinus carpio*) and big head (*Hypophthalmichthys nobilis*) in fish farms of Mashhad, northeast of Iran [J]. *Journal of Parasitic Diseases*, 2013, **37**(1): 131-133.
- [17] Du J J, Jiang B, Tang J J, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of L-amino acid oxidase in grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(2): 303-309. [杜贾贾, 江飏, 唐嘉嘉, 等. 斜带石斑鱼L-氨基酸氧化酶基因克隆及表达分析 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(2): 303-309.]
- [18] Dan X M, Li A X, Lin X T, *et al.* Immune response and immunoprotection of pompanos (*Trachinotus ovatus*) against *Cryptocaryon irritans* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(1): 13-18. [但学明, 李安兴, 林小涛, 等. 卵形鲳鲹对刺激隐核虫的免疫应答和免疫保护研究 [J]. *水生生物学报*, 2008, **32**(1): 13-18.]
- [19] Jiang B, Wang J, Luo H L, *et al.* Prevention of parasite *Cryptocaryon irritans* in infected large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* by formalin [J]. *Fisheries Science*, 2018, **37**(3): 336-341. [江飏, 王晶, 罗恒利, 等. 福尔马林防治大黄鱼刺激隐核虫病的研究 [J]. *水产科学*, 2018, **37**(3): 336-341.]
- [20] Jiang B, Li Y W, Li A X. The development of *Cryptocaryon irritans* in a less susceptible host rabbitfish, *Siganus oramin* [J]. *Parasitology Research*, 2018, **117**(12): 3835-3842.
- [21] Li R J, Liu F, Wang F H, *et al.* Skin mucus of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans* and some other pathogenic organisms [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(2): 243-251. [黎睿君, 刘芳, 王芳华, 等. 黄斑蓝子鱼皮肤黏液对刺激隐核虫及一些病原菌的抑杀作用 [J]. *水生生物学报*, 2013, **37**(2): 243-251.]
- [22] Brinchmann M F. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using-omics technologies [J]. *Molecular BioSystems*, 2016, **12**(7): 2056-2063.
- [23] Ullal A J, Litaker R W, Noga E J. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, **32**(11): 1301-1312.
- [24] Xiong Y, Dan C, Ren F, *et al.* Proteomic profiling of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) skin mucus identifies differentially-expressed proteins in response to *Edwardsiella ictaluri* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(100): 98-108.
- [25] Zhang Q Z, Zhang Z H, Chen D L, *et al.* Influence of water temperature on hatchability and activity power of theront of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Ecological Science*, 2010, **29**(2): 116-120. [张其中, 张占会, 陈达丽, 等. 水温对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响 [J]. *生态科学*, 2010, **29**(2): 116-120.]
- [26] Clark T G, Dickerson L H W. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, **93**(13): 6825-6829.
- [27] Deng Y Q, Wang K Y, Huang X L. The advanced research of Ichthyophthiriasis in fish [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, **20**(2): 149-153. [邓永强, 汪开毓, 黄小丽. 鱼类小瓜虫病的研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2005, **20**(2): 149-153.]
- [28] Hobson D. The antibacterial activity of hemoglobin [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1958, **107**(2): 167-183.
- [29] Takagi H, Shiomi H, Ueda H, *et al.* A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser [J]. *Nature*, 1979, **282**(5737): 410-412.
- [30] Schally A V, Huang W Y, Redding T W, *et al.* Isolation, structural elucidation and synthesis. of a tetradecapeptide with *in vitro* ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the alpha-chain of porcine hemoglobin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1978, **82**(2): 582-588.
- [31] Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, *et al.* Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1986, **125**(2): 309-310.
- [32] Karelin A A, Philippova M M, Ivanov V T. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides [J]. *Peptides*, 1995, **16**(4): 693-697.
- [33] Ivanov V T, Karelin A A, Philippova M M, *et al.* Hemoglobin as a source of endogenous. bioactive peptides: The concept of tissue-specific peptide pool [J]. *Biopolymers*, 1997, **43**(2): 171-188.
- [34] Sheshadri P, Abraham J. Antimicrobial properties of hemoglobin [J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2012, **34**(6): 896-900.
- [35] Zhang D L, Guan R Z, Huang W S, *et al.* A review on the antimicrobial fragments derived from hemoglobin [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(5): 945-956. [张东玲, 关瑞章, 黄文树, 等. 血红蛋白源抗菌片段的研究进展 [J]. *水生生物学报*, 2013, **37**(5): 945-956.]
- [36] Parish C A, Jiang H, Tokiwa Y, *et al.* Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, **9**(2): 377-382.
- [37] Mak P, Wójcik K, Wicherek L, *et al.* Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood [J]. *Peptides*, 2004, **25**(11): 1839-1847.
- [38] Deng L, Pan X, Wang Y, *et al.* Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina [J]. *Human Reproduction*, 2008, **24**(1): 211-218.
- [39] Liepke C, Baxmann S, Heine C, *et al.* Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003, **791**(1-2): 345-356.
- [40] Seo J K, Lee M J, Jung H G, *et al.* Antimicrobial function of SH β AP, a novel hemoglobin β chain-related antimicrobial peptide, isolated from the liver of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*,

- 2014, **37**(1): 173-183.
- [41] Catiau L, Traisnel J, Chihib N E, *et al.* RYH: a minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity [J]. *Peptides*, 2011, **32**(7): 1463-1468.
- [42] Dickerson H W, Dawe D L. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). Fish Diseases and Disorders [M]. Wallingford, UK: Oxford University Press, 2006: 116-153.
- [43] Silphaduang U, Noga E J. Peptide antibiotics in mast cells of fish [J]. *Nature*, 2001(414): 268-269.
- [44] Yosef R, Naama L S. Effect of the hydrophobicity to net positive charge ratio on Antibacterial. and anti-endotoxin activities of structurally similar antimicrobial peptides [J]. *Biochemistry*, 2010, **49**(5): 853-861.
- [45] Jean K D S, Henderson K D, Chrom C L, *et al.* Effects of hydrophobic amino acid substitutions on antimicrobial peptide behavior [J]. *Probiotics & Antimicrobial Protins*, 2017(7): 1-12.
- [46] Gong H, Zhang J, Hu X, *et al.* Hydrophobic control of the bioactivity and cytotoxicity of de novo designed antimicrobial peptides [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, **11**(38): 34609-34620.
- [47] Shi H T, Zhou T, Wang X Z, *et al.* Genome-wide association analysis of intra-specific QTL associated with the resistance for enteric septicemia of catfish [J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2018, **293**(10): 1-14.
- [48] Tamir T, Asaf C, Kalin V, *et al.* An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation [J]. *Cell*, 2010, **141**(2): 344-354.
- [49] Cross M L, Matthews R A. Ichthyophthiriasis in carp, *Cyprinus carpio* L.: fate of parasites in immunized fish [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1992, **15**(6): 497-505.
- [50] Clark T G, Lin T L, Dickerson H W. Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: Their role in protective immunity [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1995(5): 113-131.
- [51] Xu Z, Parra D, Gomez D, *et al.* Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, **110**(32): 13097-13102.
- [52] McGwire B S, Olson C L, Tack B F, *et al.* Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2003(188): 146-152.
- [53] Torrent M, Pulido D, Rivas L, *et al.* Antimicrobial peptide action on parasites [J]. *Current Drug Targets*, 2012, **13**(9): 1138-1147.

THE ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE HB β -C IN *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS* RESISTANCE IN ALL-MALE AND HYBRID YELLOW CATFISH

XIONG Yang¹, WANG Shuai¹, DAN Cheng², ZHANG Yi-Bing² and MEI Jie¹

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: All-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and hybrid yellow catfish (*P. fulvidraco*♀×*P. vachelli*♂) are the main breeding varieties of yellow catfish. The “white spot disease” caused by *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) is one of the main diseases of yellow catfish in China. Ich resistance assay was performed on all-male and hybrid yellow catfish, as well as the darkarbel catfish (*P. vachelli*). By bioinformatics analysis, we identified an antimicrobial peptide HB β -C from the skin mucus proteome of yellow catfish, a 33 amino acid peptide derived from the C terminal of hemoglobin β chain (HB β). The anti-parasitic test indicated that HB β -C effectively killed the trophont, tomont and theront, especially in trophont stage, and 15 μ g/mL HB β -C killed all trophont within 3min. Gene expression analysis showed that the expression of HB β mRNA in gill and skin of hybrid yellow catfish was higher than that of all-male yellow catfish. Ich challenge significantly increased HB β mRNA level in all-male yellow catfish, which was higher than that of hybrid yellow catfish. Interestingly, the HB β protein level in gill of all-male yellow catfish was higher than that in hybrid yellow catfish. Immunofluorescence results showed that the antimicrobial peptide HB β -C was specifically expressed in red blood cells. After Ich infection, HB β -C was secreted and attached to the trophont in skin and gill. Thus, our results revealed that all-male yellow catfish was much more resistant to Ich than hybrid yellow catfish. The high HB β protein in all-male yellow catfish and its ability to kill all stages of Ich might be closely associated with the resistance of all-male yellow catfish to Ich.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*; All-male yellow catfish; Hybrid yellow catfish; Hemoglobin β chain; Antimicrobial peptide; Anti-parasitic test *in vitro*