

## 대하 Penaeidin 3-2 유전자의 동정 및 발현

박은미<sup>1</sup> · 조현국<sup>1,3</sup> · 홍경은<sup>1</sup> · 남보혜<sup>1</sup> · 김영옥<sup>1</sup> · 김우진<sup>1</sup> · 이상준<sup>1</sup> · 한현섭<sup>1</sup> · 이재용<sup>2</sup> · 김종식<sup>2</sup> · 장인권<sup>2</sup> · 정재훈<sup>3</sup> · 최태진<sup>1,4</sup> · 공희정<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립수산과학원 생명공학연구소

<sup>2</sup>국립수산과학원 서해특성화연구센터

<sup>3</sup>부산대학교 분자생물학과

<sup>4</sup>부경대학교 미생물학과

Characterization and Expression of Penaeidin 3-2 from Fleshy Prawn *Fenneropenaeus chinensis*. Eun-Mi Park<sup>1</sup>, Hyun Kook Cho<sup>1,3</sup>, Gyeong-Eun Hong<sup>1</sup>, Bo-Hye Nam<sup>1</sup>, Young-Ok Kim<sup>1</sup>, Woo-Jin Kim<sup>1</sup>, Sang-Jun Lee<sup>1</sup>, Hyon Sob Han<sup>1</sup>, Jae Yong Lee<sup>2</sup>, Jong-Sheek Kim<sup>2</sup>, In-Kwon Jang<sup>2</sup>, JaeHun Cheong<sup>3</sup>, Tae-Jin Choi<sup>1,4</sup> and Hee Jeong Kong<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, <sup>2</sup>West Sea Mariculture Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, <sup>3</sup>Dept. of Molecular biology, Pusan National University, <sup>4</sup>Dept. of Microbiology, Pukyong National University, Busan, Republic of Korea

**Abstract** Penaeidins are members of a special family of antimicrobial peptides existing in several species of shrimp and play a crucial role in the immunological defense of shrimp. In this study, we isolated and characterized one EST clone (penaeidin) from cDNA library of fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* hemocytes. Amino acids sequence comparison and phylogenetic analysis with other known penaeidins revealed that our clone was completely identical to *F. chinensis* Penaeidin 3-2 (Accession no. ABC33920), which composed of 71 amino acids with a putative signal peptide (1-19) and a cysteine-rich domain (C-terminal part). The expression and distribution of Penaeidin 3-2 transcripts in shrimp were detected in hemocytes, hepatopancreas, and muscles, and that Penaeidin 3-2 was constitutively expressed mainly in hemocytes. The artificial infection of white spot syndrome virus to *F. chinensis* resulted in Penaeidin 3-2 mRNA up-regulation in hemocytes, suggesting that the possible role of Penaeidin 3-2 in host defense system of *F. chinensis*.

**Key words :** Penaeidin 3-2, *Fenneropenaeus chinensis*, white spot syndrome virus, innate immunity

## 서 론

항미생물성펩티드들 (antimicrobial peptides; AMPs) 은 외부 병원체에 대한 1차 면역을 구성하는 중요한 인자로서, 식물, 척추동물, 무척추동물 등 거의 모든 종에서 발견되고 있다. 새우류의 면역계는 적응면역 반응은 존재하지 않고 대신 내재적 면역반응이나 체액성 면역반응만이 존재한다고 알려져 있기 때문에, 새우류에서는 미생물 감염에 대한 면역반응에서 항미생물성펩티드들 (AMPs)의 직접적이고 즉각적인 작용이 매우 중요하다 [2,3]. 새우의 항미생물성펩티

드로서 Pacific white shrimp *Litopenaeus (Penaeus) vannamei*로부터 Penaeidin이 처음 분리·동정되었다 [6].

Penaeidins은 구조적으로 N-말단에 proline이 풍부한 부위를 가지고 C-말단에는 6개의 cysteine을 통해 3개의 이중황화결합을 형성한다 [6]. Penaeidins은 아미노산 서열상에서 특정 잔기의 위치에 따라 Penaeidin 2, Penaeidin 3, Penaeidin 4의 3가지 그룹으로 나뉘었는데, 최근 Penaeidin 5가 대해 (*Fenneropenaeus chinensis*)로부터 동정되었다 [11]. Penaeidins의 기능은 새우의 조직 표면에 발현하여 접촉한 미생물의 대사를 억제시킨다고 알려져 있고 [9,15,20], Penaeidin

\* Corresponding author

Phone: +82-51-720-2453, Fax: +82-51-720-2456

E-mail: konghj@momaf.go.kr

3의 경우 새우의 면역 반응에서 중요한 역할을 한다는 보고가 있다 [10,16,17]. Penaeidins이 그람양성균과 곰팡이 균에 대해서는 아주 강한 항균활성 (MIC of 0.3-5uM)을 보이고, 그람음성균에 대해서는 보통 정도의 항균활성 (MIC of 10-33uM)을 나타내었다 [6,7,12].

Penaeid shrimp의 혈구와 혈장에는 Penaeidin이외에 Crustins과 anti-lipoplysaccharide factors (ALFs)이 있다. Crustins은 *L. vannamei*와 *L. setiferus*, *Penaeus monodon*에서 동정되었는데 [5], 정확한 기능이나 그 작용 기작은 아직 밝혀지지 않았고, 다만 단백질분해효소 저해제들에서 많이 발견되는 whey acidic protein (WAP) 도메인이 발견되는 것으로부터 Crustin이 미생물활성 뿐만아니라 단백질분해효소의 활성을 저해하는 것으로 보인다 [21]. ALFs는 투구게에서 처음 보고되었고 [18], 최근 새우류에서도 동정되었으며 [13,19], 그람 양성균과 그람 음성균 모두에 대해서 항균 작용을 한다고 알려져 있다 [1,14].

본 연구에서는 우리나라 서해안에 서식하는 대하 (*F. chinensis*) 혈구세포의 cDNA library로부터 분리된 EST 클론이 Penaeidin 3-2 유전자와 아미노산 수준에서 동일함을 밝히고, 다른 새우류에서 보고된 Penaeidins과 아미노산 서열상의 연관성을 조사하였다. 그리고 대하의 각 조직별 Penaeidin 3-2 유전자의 발현 양상을 조사하고, 대하에서 흰반점바이러스의 인위감염으로 인한 Penaeidin 3-2 유전자의 발현 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 염기서열결정 및 EST 클론 분석

대하의 혈구 cDNA library를 분석하기 위하여 각 클론들의 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정을 위한 반응은 ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits v3.1의 프로토콜에 준하여 실시한 후, 반응이 끝난 산물은 에탄올 침전법으로 형광 표지된 DNA를 모으고, formamide에 녹여서 Automatic sequencer ABI3730xl (Applied Biosystems, USA)에 running하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에서 제공하는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 서비스를 이용하여 데이터베이스 상의

유사유전자를 검색하였다. 각 클론의 염기서열은 BLAST X에 query하여 e-value가 높은 것을 선별하였으며, Clustal W program을 이용하여 multiple alignment를 실시하였다.

### 계통 분석

Penaeidins의계통분석학적 관계를 비교해 보기 위하여, NCBI GenBank로부터 새우류의 Penaeidins에 대한 아미노산 정보를 얻고 이를 바탕으로 분석프로그램 MEGA3.0 (<http://www.megasoftware.com>)을 이용하여 계통 분석도를 그렸다. 계통 분석도는 neighbor-joining algorithm방법을 이용하여 계통수를 작성하였으며, 계통수의 topology는1000회 반복을 통한 bootstrap 분석에 의하여 결정되었다. 분석에 사용된 유전자들은 다음과 같다: fPEN3-2 (*F. chinensis* fleshy prawn, Accession no. ABC33920); fPEN3-1 (*F. chinensis* fleshy prawn, Accession no. AAP33450); bPEN (*P. monodon* black tiger shrimp, Accession no. AAQ05769); pPEN2-2 (*Farfantepenaeus paulensis* pink shrimp, Accession no. AAX58696); sPEN (*F. subtilis* southern brown shrimp, Accession no. ABO93321); wPEN-3c (*Litopenaeus vannamei* Pacific white shrimp, Accession no. P81060); wPEN-3j (*L. vannamei* Pacific white shrimp, Accession no. Q963D9); wPEN-3a (*L. vannamei* Pacific white shrimp, Accession no. P81058); wPEN-3d (*L. vannamei* Pacific white shrimp, Accession no. Q963D0); wPEN-3b (*L. vannamei* Pacific white shrimp, Accession no. P81059); bPEN2 (*L. stylirostris* blue shrimp, Accession no. AAQ62565).

### RNA 분리

대하의 혈구세포를 분리하여 Trizol reagent (Invitrogen, USA) 1 ml에 넣고 vortex를 이용하여 균질화하고, 대하의 간체장과 근육 조직은 각각 액체 질소를 이용하여 급속 냉각 후 파쇄하여 Trizol reagent를 처리하였다. 균질화된 용액에 Chloroform 200  $\mu$ l를 첨가하여 충분히 섞은 다음 상온에 5분간 정치하였다. 반응액을 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 새 튜브로 옮기고, isopropanol 500  $\mu$ l를 첨가하여 잘 섞은 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 RNA를 침전시켰다. 75% Ethanol/DEPC 500  $\mu$ l를 첨가하여 침

전물을 세척한 후 7500 g에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 제거하고 침전물을 말린 뒤 DEPC가 처리된 물에 녹여서, spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

### Semi-quantitative RT-PCR 수행

Advantage RT-for-PCR kit (BD Biosciences, USA)를 사용하여 total RNA를 cDNA로 합성하였다. RNA 1 µg, oligo(dT) 1 µl와 RNase free water를 전체 반응용액이 12.5 µl가 되도록 섞어 70°C에서 2분간 정치하였다. 5 x RT buffer 4 µl, dNTP mix 1.5 µl, MMLV reverse transcriptase 1 µl와 RNase inhibitor 1 µl을 섞은 다음 37°C에서 60분간 반응시켰다. 만들어진 cDNA를 가지고 Penaeidin 3-2 유전자에 대한 증폭반응을 수행하였다. Penaeidin 3-2의 경우 forward primer: CACCTCACAAGCTCGT와 reverse primer: GGACCTGCTGGGACAAA를 사용하여 283bp의 PCR 산물을 생성하였다. Internal control인 β-actin의 경우 forward primer: CAGACTACCTGCTGCAGATCC와 reverse primer: ATTCCATGCCCAAGAATGA를 사용하여 255bp의 증폭산물을 얻었다. 각각의 증폭산물들은 1.5% agarose gel에서 ethidium bromide 염색으로 확인하였다. Penaeidin 3-2에 대한 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 25 cycles 진행한 다음 72°C에서 5분 동안 신장하였다. β-actin에 대한 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 25 cycles 진행한 다음 72°C에서 5분 동안 신장하였다.

### 바이러스 인위감염 실험

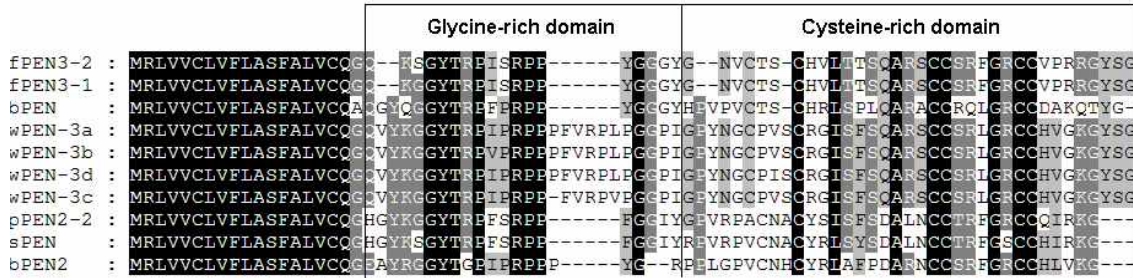
흰반점바이러스 주사액은 바이러스에 감염되어 죽은 대하로부터 분리하였다. 바이러스에 감염되어 죽은 새우는 국립수산과학원 서해특성화연구센터로부터 동결된 상태로 분양받았다. 먼저 새우의 근육 조직을 분리한 후, 무게를 측정하고 중량의 5-10 배의 생리식염수를 첨가하였다. 조직을 4°C로 유지하면서 polytron을 이용하여 파쇄한 후, 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 0.45 µm syringe filter를 이용하여 여과한 후 인위감염 실험에 이용하였다. 감염균은 흰반점바이러스액 100 µl를 체장이 약 8~10 cm 정도인 대하의 복부마디 사이에

주사하였으며, 비감염균은 100 µl의 생리식염수를 주사하였다. 주사액 주사 시 새우들은 cold shock을 주어 마취상태를 유지하였으며 이 후 수조에서 다시 활발하게 움직임을 확인하였다. 바이러스 주사 후 1, 4, 7 일 후에 살아있는 개체를 각 2 마리씩 선택하여 이들로부터 total RNA를 분리하였다. 이후의 과정은 일반적인 RT-PCR 과정과 동일하게 진행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 대하 Penaeidin 3-2 EST 클론의 분석

대하의 혈구세포 cDNA library로부터 얻어진 EST 클론들의 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에서 제공하는BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램 중 blastx 서비스를 이용하여 데이터베이스 상의 유사 유전자를 검색하였다. 대하의 한 EST 클론으로부터 번역된 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 대하 Penaeidin 3-2 (fPEN3-2, Accession no. ABC33920)와 100% 일치함이 밝혀졌다. 대하의 Penaeidin 3-2와 이미 보고된 다른 새우류의 Penaeidins의 아미노산 서열과 비교한 결과를 그림 1에 나타내었다. 대하의 Penaeidin 3-2는 signal peptides로 예상되는 19개 아미노산 잔기를 포함하여 전체 71개의 아미노산 잔기로 이루어져 있었고, Penaeidin family 단백질들에서 공통적으로 나타나는 이중황화결합을 형성할 수 있는 6개의 cysteine 잔기를 가지는 cysteine-rich domain이 C-말단에 존재하였다 (Fig. 1). 그러나 Penaeidins family의 특징 중 하나인 N-말단의 proline-rich domain (보통 7-9개의 잔기로 구성됨)은 대하의 Penaeidin 3-2에서 발견되지 않았고 대신 6개의 glycine 잔기를 가지는 glycine-rich domain을 포함하고 있었다. 따라서 대하의 Penaeidin 3-2는 N-말단에 proline 대신 glycine-rich domain을 통하여 helix 구조를 형성하고 있을 것이라 예상된다 [22]. 새우류의 몇몇 항미생물성펩티들은 chitin-binding domain을 통하여 항미생물성 활성화와 chitin assembly 또는 상처 치유 과정에 관여하는 것으로 예상되고, 이러한 성질은 외부 환경 감염에 대한 새우의 방어 기작에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 대하의 Penaeidin 3-2 또한 C-말단에 chitin-binding domain을 가지고 있는 것이 확인되었다 [8].



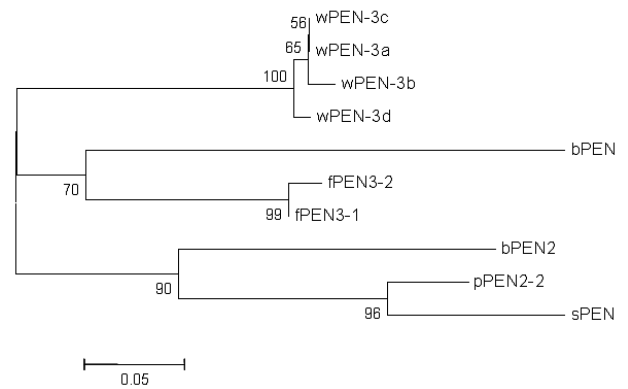
**Fig. 1.** Multiple alignment of amino acids sequences of Penaeidin 3-2 from *F. chinensis* with those of other Penaeidins from black tiger shrimp (bPEN), pink shrimp (pPEN2-2), southern brown shrimp (sPEN), blue shrimp (bPEN2), and pacific white shrimp (wPEN-3c, wPEN-3j, wPEN-3a, wPEN-3d, and wPEN-3b). Identical amino acids are highlighted by black boxes.

**대하 Penaeidin 3-2의 계통수 분석**

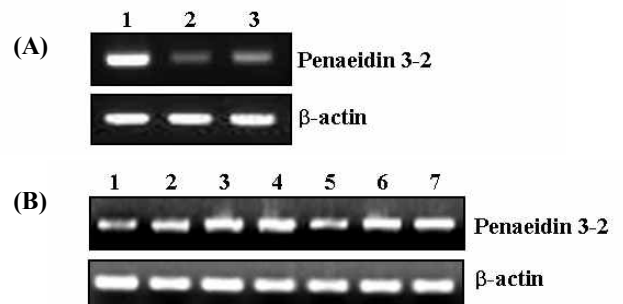
대하의 Penaeidin 3-2와 이미 보고된 다른 새우류의 Penaeidins의 상동성을 조사하고자 계통 분석을 실시하였다. 새우류의 Penaeidins에 대한 아미노산 정보를 NCBI GenBank로부터 얻고 이를 바탕으로 분석 프로그램 MEGA3.0 (<http://www.megasoftware.com>) (Kumar et al., 2004)을 이용하여 계통수를 그렸다. 대하의 Penaeidin 3-2 (fPEN3-2, Accession no. ABC33920)은 대하의 penaeidin 3-1 (fPEN3-1, Accession no. AAP33450)과 98%, black tiger shrimp (*P. monodon*)의 bPEN (Accession no. AAQ05769)과 71%, pink shrimp (*F. paulensis*)의 pPEN2-2 (Accession no. AAX58696), southern brown shrimp (*F. subtilis*)의 sPEN (Accession no. ABO93321), blue shrimp (*L. stylirostris*)의 bPEN2 (Accession no. AAQ62565)과는 67%, Pacific white shrimp (*L. vannamei*)의 Penaeidin 3 family member (wPEN-3c, Accession no. P81060; wPEN-3j, Accession no. Q963D9 wPEN-3a, Accession no. P81058; wPEN-3d, Accession no. Q963D0; wPEN-3b, Accession no. P81059)들과는 66-68%의 아미노산 수준에서의 유사성을 보였다 (Fig. 2).

**대하 Penaeidin 3-2 유전자의 발현 조사**

대하 Penaeidin 3-2의 조직별 발현 양상을 조사하고자 대하 5 마리로부터 혈구, 간체장, 근육 조직을 각각 얻어서 total RNA를 분리하고 RT-PCR을 실시하였다. 대하 Penaeidin 3-2의 전사체는 혈구, 간체장, 근육 조직에서 모두 발견되었고 특히 혈구세포에서 매우 강하게 발현되었다 (Fig. 3). 이는 Penaeidins의 발현이 혈구세포에서 주로 나타난다는 이전의 연구



**Fig. 2.** Phylogenetic analysis of Penaeidins from shrimp using the sequence information from Fig. 1. A phylogenetic tree of the aligned sequences was constructed using the Neighbor-Joining algorithm within MEGA 3.0. The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1000 repetitions). The origins and accession numbers of the Penaeidins amino acids sequences are described in Materials and Methods.



**Fig. 3.** Semi-quantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of Penaeidin 3-2 (A) and the change of Penaeidin 3-2 expression after WSSV infection in shrimp (B). (A) Lane 1, hemocytes; lane 2, hepatopancreas; lane 3, muscle. (B) Lane 1, no infection; lanes 2-3, 1 day after infection; lanes 4-5, 4 days after infection, lanes 6-7, 7 days after infection. Expression of a gene encoding the  $\beta$ -actin was used as a control.

결과들과도 일치하는 결과이다. Penaeidin 3-2의 발현이 간체장과 근육 조직에서 나타나는 것은 새우와 같은 개방형 혈관계를 가지는 무척추 동물의 면역관련 유전자들의 발현에서 흔히 조사되는 infiltrating hemocytes에 의한 것이라 예상된다 [4].

바이러스 감염 후의 대하 Penaeidin 3-2의 발현 변화를 조사하기 위하여 흰반점바이러스의 인위감염 실험을 실시하였다. 바이러스 감염 후 1, 4, 7일 짜 새우의 혈구세포를 채취하여 total RNA의 변화를 RT-PCR의 방법으로 조사하였다. 대하 Penaeidin 3-2의 발현이 증가하였는데, 이는 침입한 바이러스의 생육을 저해하고자 하는 새우의 면역반응으로 생각된다. 이상의 결과들로부터 대하 Penaeidin 3-2가 자체 방어 작용에서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

## 요 약

Penaeidins은 새우류에 존재하는 항미생물성펩티드의 한 종류로서 새우의 외부 병원체에 대한 방어 기작을 구성하는 중요한 인자이다. 본 연구에서는 대하 혈구세포의 cDNA library로부터 분리된 EST 클론을 분리·동정하였다. 아미노산 염기서열 분석과 계통수 분석을 통하여 본 연구에서 분리한 EST 클론이 대하의 Penaeidin 3-2 유전자와 아미노산 수준에서 동일함을 밝혔다. 대하의 Penaeidin 3-2는 signal peptides로 예상되는 19개 아미노산 잔기를 포함하여 전체 71개의 아미노산 잔기로 이루어져 있고, C-말단에는 3개의 이중황화결합을 형성할 수 있는 6개의 cysteine가 존재하였다. 대하 Penaeidin 3-2 전사체는 혈구세포, 간체장, 근육 조직에서 발현되었으며, 특히 혈구세포에서 주로 많이 발현되었다. 흰반점바이러스의 인위감염 실험에서 바이러스 감염 후 대하 Penaeidin 3-2의 발현이 증가하였다. 이상의 결과들로부터 대하 Penaeidin 3-2가 자체 방어 작용에서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원의 연구개발사업 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Aketagawa, J., Miyata, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Morita, T., Hayashida, H., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., and Shimonishi, Y. 1986. Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem.* 261, 7357-7365.
2. Bachere, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*, 191, 71-88.
3. Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immun. Rev.* 198, 149-168.
4. Badariotti, F., Thuau, R., Lelong, C., Dubos, M. P. and Favrel, P. 2007. Characterization of an atypical family 18 chitinase from the oyster *Crassostrea gigas*: evidence for a role in early development and immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 559-570.
5. Bartlett, T. C., Cuthbertson, B. J., Shepard, E. F., Chapman, R. W., Gross, P. S., Warr, G. W. 2002. Crustins, Homologues of an 11.5-kDa Antibacterial Peptide, from Two Species of Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4, 278-293.
6. Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., van Dorsselaer, A., Rodriguez, J. and Bachere, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272, 28398-28406.
7. Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.M., van Dorsselaer, A. and Bachere, E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.* 266, 335-346.
8. Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P. and Bachere, E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1260-1271.
9. Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. and Bachere, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell. Sci.* 113, 461-469.
10. Kang, C.-J., Wang, J.-X., Zhao, X.-F., Yang, X.-M., Shao, H.-L. and Xiang, J.-H. 2004. Molecular cloning and expression analysis of the ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 513-525.
11. Kang, C.-J., Xue, J.-F., Liu, N., Zhao, X.-F., and Wang, J.-X. 2007. Characterization and expression of a new sub-family member of penaeidin, antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Immunol.* 44, 1535-1543.
12. Li, L., Wang, J.-X., Zhao, X.-F., Kang, C.-J., Liu, N., Xiang, J.-H., Li, F.-H., Sueda, S. and Kondo, H. 2005.

- High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. *Protein Exp. Purif.* 39, 144-151.
13. Liu, F., Liu, Y., Li, F., Dong, B. and Xiang, J. 2005. Molecular cloning and expression profile of putative anti-lipopolysaccharide factor in chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar. Biotechnol.* (NY) 7, 600-608.
  14. Morita, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Iwanaga, S., Ohashi, K. and Niwa, M. 1985. Isolation and biological activities of *Limulus* anticoagulant (anti-LPS factor), which interacts with lipopolysaccharides (LPS). *J. Biochem.* 97, 1611-1620.
  15. Munoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D. and Bachere, E. 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 961-972.
  16. Munoz, M., Vandenbulcke, F., Gueguen, Y. and Bachere, E. 2003. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 283-289.
  17. Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D. and Bachere, E. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* 269, 2678-2689.
  18. Muta, T., Miyata, T., Tokunaga, F., Nakamura, T. and Iwanaga, S. 1987. Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *J. Biochem.* (Tokyo) 101, 1321-1330.
  19. Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G. and Bachere, E. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 841-851.
  20. Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis. Aquat. Organ* 61, 123-135.
  21. Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., Jimenez-Vega, F., Avila-vila, A. 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 138, 415-422.
  22. Yang, Y., Poncet, J., Garnier, J., Zatylny, C., Bachere, E., and Aumelas, A. 2003. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.* 278, 36859-36867.