



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

团头鲂补体替代途径相关基因的鉴定及表达研究

IDENTIFICATIONS AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE
COMPLEMENT ALTERNATIVE PATHWAY RELATED GENES
IN *MEGALOBrama amblycephala*

研究生: 丁明
CANDIDATE: DING MING

学号: 2016308110025
STUDENT NO.:

专业: 水产养殖
MAJOR: AQUACULTURE

导师: 刘红教授
SUPERVISOR: PROFESSOR LIU HONG

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇一九年六月

JUNE, 2019

华中农业大学硕士学位论文

团头鲂补体替代途径相关基因的鉴定及表达研究 Identifications and expression analysis of the complement alternative pathway related genes in *megalobrama amblycephala*

研 究 生：丁明

学 号：2016308110025

指导教师：刘红教授

指导小组：王卫民教授

高泽霞教授

王焕岭副教授

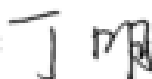
专业：水产养殖研究方向：鱼类遗传育种

获得学位名称：农学硕士获得学位时间：2019 年 6 月

华中农业大学水产学院

二〇一九年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密		如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明 本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。 研究生签名:  时间: 2019年 6 月 3 日			
学位论文使用授权书 本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版; 学校有权保存提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。 注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。 学位论文作者签名:  导师签名:  签名日期: 2019年 6 月 3 日 签名日期: 2019年 6 月 3 日			

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

目录

摘要	i
Abstract	iv
缩略语表	vii
第一章文献综述	1
1 研究问题的由来	1
2 补体系统的研究概况	2
2.1 补体系统概况	2
2.2 补体系统的激活途径	3
2.3 补体因子 D	5
2.4 补体因子 P	6
2.5 补体因子 I	7
2.6 补体因子 H	8
3 研究目的和意义	9
第二章 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因序列和表达模式分析	11
1 材料和方法	11
1.1 样品的采集	11
1.1.1 健康组织样品采集	11
1.1.2 细菌感染实验样品采集	11
1.2 主要的仪器设备及药品试剂	12
1.2.1 主要的仪器设备	12
1.2.2 主要的试剂药品	12
1.2.3 主要试剂配制	12
1.3 引物设计与合成	13
1.4 实验方法	14
1.4.1 总 RNA 的提取	14
1.4.2 总 RNA 质量检测	15
1.4.3 cDNA 第一条链的合成及 PCR 扩增	15
1.4.4 PCR 产物回收与纯化	17
1.4.5 连接转化与阳性克隆筛选	18

1.4.6qRT-PCR 标准曲线制作与 qRT-PCR	18
1.5 序列分析	19
1.6 数据分析	20
2 结果与分析	20
2.1 总 RNA 提取结果	20
2.2 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因序列分析	21
2.2.1 团头鲂 <i>MamPf</i> 基因序列分析	21
2.2.2 团头鲂 <i>MamIf</i> 基因序列分析	25
2.2.3 团头鲂 <i>MamHf</i> 基因序列分析	29
2.3 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因 mRNA 的表达	35
2.3.1 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因 mRNA 组织特异性表达	35
2.3.2 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因在嗜水气单胞菌感染后的表达	36
3 讨论	39
3.1 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因的序列和结构分析	39
3.2 团头鲂 <i>MamPf</i> 、 <i>MamIf</i> 和 <i>MamHf</i> 基因 mRNA 的表达	41
第三章团头鲂 Df 基因原核表达和抑菌活性分析	43
1 实验材料	43
1.1 载体和菌株	43
1.2 主要仪器设备及试剂	43
1.2.1 主要仪器	43
1.2.2 主要药品	43
1.2.3 主要试剂配制	43
1.3 引物设计	44
2 实验方法	45
2.1 原核重组质粒的构建	45
2.1.1 目的基因的扩增及纯化	45
2.1.2 表达载体质粒的提取	45
2.1.3 产物与 pET28a 载体的连接与转化	46
2.2 重组质粒的诱导表达	47
2.3 包涵体的纯化	48

2.4 重组蛋白的纯化和多克隆抗体的制备	48
2.5 Western blot	49
2.6 重组蛋白抑菌实验	50
2.7 数据分析	50
3 结果与分析	51
3.1 团头鲂 <i>MamDf</i> 基因序列分析	51
3.2 团头鲂 pET28a-Df 重组质粒在不同条件下的诱导表达	55
3.3 团头鲂 <i>MamDf</i> 重组蛋白的纯化	58
3.4 Western blot	58
3.5 重组蛋白抑菌活性检测	59
4 讨论	61
参考文献	63
附录	73
攻读学位期间发表论文情况	76
致谢	77

摘要

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国重要的大宗淡水养殖鱼类之一,但是近年来由于嗜水气单胞菌引起的细菌性败血症较为严重,造成巨大的经济损失。鱼类获得性免疫系统不够发达,先天性免疫系统在抵御病原体入侵中发挥着不可替代的作用。补体系统是先天性免疫的重要组成部分,补体替代途径包括补体因子 D (complement factor D)、补体因子 P (complement factor P)、补体因子 I (complement factor I) 和补体因子 H (complement factor H), 被称为最古老的补体激活途径,对补体系统的激活有着重要作用。对补体替代途径相关分子的研究,有助于我们了解团头鲂先天性免疫防御机制,对团头鲂病害防控和遗传育种方面具有重要意义。

本研究克隆了团头鲂 *Pf* (*MamPf*)、*If* (*MamIf*) 和 *Hf* (*MamHf*) 基因的 ORF 序列,并对其进行了生物信息学分析。利用荧光定量 PCR 技术对这些基因在健康组织和感染嗜水气单胞菌后免疫组织的表达进行了分析。原核表达 *MamDf* 重组蛋白,检测 *MamDf* 重组蛋白的抑菌活性。利用 Western blot 技术检测了团头鲂肝脏、脾脏、肾脏和头肾中 *MamDf* 蛋白在感染嗜水气单胞菌后的表达变化。本研究主要结果如下:

1.团头鲂 3 个补体基因 (*MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf*) 的序列分析

MamPf ORF 全长 1329 bp, 编码 442 个氨基酸, DNASTAR 预测其分子量为 48.9kDa。NetNGlyc 1.0 Server 预测显示其没有 N-糖基化位点。多序列比对分析显示,团头鲂和其他物种的 *Pf* 都是由 6 个 TSR 结构域组成,而且 TSR 结构域中有相应的保守序列。系统进化分析显示,鱼类 *Pf* 聚为一支,哺乳动物聚为另一支,团头鲂与斑马鱼的 *Pf* 在进化上亲缘关系最近。基因结构分析显示,团头鲂 *Pf* 基因含有 9 个外显子和 8 个内含子,不同物种间外显子和内含子的数量相似。

MamIf ORF 全长 2007 bp, 编码 668 个氨基酸,其分子量为 74.6kDa, 具有 6 个 N-糖基化位点。团头鲂和其他物种的 *If* 都是由 1 个 FIMAC 结构域、1 个 SRCR 结构域、2 个 LDLa 结构域和一个丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域组成,而且不同物种中每个结构域中都有相应的保守序列。团头鲂与鲤的 *If* 在进化上亲缘关系最近,鱼类 *If* 聚为一支,哺乳动物单独聚为另一支。

*MamHf*ORF 全长 2589 bp, 编码 862 个氨基酸, 其分子量为 97.5kDa, 具有 2 个 N-糖基化位点。团头鲂 *Hf* 基因含有 13 个重复的 SCRs 结构域, 不同物种具有的 SCR 结构域的数量不同。团头鲂与斑马鱼的 *Hf* 在进化上亲缘关系最近, 鱼类 *Hf* 聚为一支, 哺乳动物单独聚为另一支。

2. 团头鲂 3 个补体基因 (*MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf*) 在健康组织和感染嗜水气单胞菌后免疫相关组织中的表达

MamPf、*MamIf* 和 *MamHf* 基因在健康团头鲂 10 种组织中均有表达。*MamPf* 基因在肾脏中表达量最高, 在肠中表达量最低, 在其他组织中均有表达; *MamIf* 基因在肝脏中表达量最高, 在肾脏、血液、鳃和心脏中表达量高, 在脑中表达量最低; *MamHf* 基因在肝脏中表达量最高, 在肌肉中表达量最低, 在其他组织中均有表达。

感染嗜水气单胞菌后, 各组织中 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 发生了显著性的变化, 但不尽相同。在肝脏中, *MamPf* 在感染后 24 h 显著上调并达到峰值, 5 d 时恢复到对照组水平; *MamIf* 在感染后 4 h 有显著性上调, 5 d 时显著上调并达到峰值; *MamHf* 在 4 h~5 d 均显著上调, 3 d 时达到最大值。在脾脏中, *MamPf* 在感染后 4 h, 表达量显著下调, 24 h 显著上调并达到峰值; *MamIf* 在 4h 显著上调并达到峰值, 而后降低到对照组水平; *MamHf* 在 4h 显著上调并达到最大值, 24h 降低到对照组水平。在肾脏中, *MamPf* 表达量在感染后 4h~5d 均显著上调, 4h 达到峰值; *MamIf* 表达量在 4h 显著上调并达到峰值, 24 h 显著下调, 3d 降低到对照组水平; *MamHf* 在 4h 和 24h 都显著上调, 并且在 4h 达到最大值。在头肾中, *MamPf* 表达量在 4h~3d 均显著上调, 并且在 4h 达到最大值, 5d 降低到对照组水平; *MamIf* 在 4h 显著上调并达到最大值后显著下调, 后在 5d 时达到对照组水平; *MamHf* 在 4 h 和 24 h 都显著上调, 并且在 4 h 达到最大值, 3 d 后回到对照组水平。

3. 团头鲂补体因子 D (*MamDf*) 重组蛋白抑菌活性及 Western blot 分析

MamDf 基因有 5 个外显子和 4 个内含子。成功构建了 pET28a-Df 原核表达载体, 并且筛选了最佳表达条件 (37 °C、180 r/min、IPTG=0.05mmol/L 诱导 6 h)。MamDf 重组蛋白对嗜水气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长有明显的抑制效果, 而且, 重组蛋白对革兰氏阴性菌的抑制效果要强于格兰氏阳性菌。采

用 Western blot 方法分析了团头鲂感染嗜水气单胞菌后免疫组织的蛋白表达情况, 结果显示, 在嗜水气单胞菌刺激后 4 h-5 d 内, MamDf 在肝脏、脾脏、肾脏和头肾中都有明显的上调。

关键词: 团头鲂; 嗜水气单胞菌; 补体替代途径; 克隆; 表达; 重组蛋白; 抑菌活性

Abstract

Blunt snout bream(*Megalobrama amblycephala*) is one of the main freshwater fish cultured in China. However, bacterial septicemia caused by *Aeromonas hydrophila* is becoming more serious in recent years, resulting in huge economic losses. The acquired immune system of fish is underdeveloped, and innate immune system plays an irreplaceable role in resisting pathogen invasion. Complement system is an important part of innate immune system. Complement alternative pathway including complement factor D, factor P, factor I and factor H, is the oldest complement activation pathway and plays an important role in the activation of complement system. The study of complement alternative pathway related molecules will help us understand the innate immune defense mechanism of the blunt snout bream, which is of great significance in disease control and genetic breeding of blunt snout bream.

In this study, the ORF sequences of *Pf*, *If* and *Hf* genes in blunt snout bream (*MamPf*, *MamIf* and *MamHf*) were cloned and their sequences were analyzed by bioinformatics. Quantity real-time PCR (qPCR) was used to analyze the expression of *MamPf*, *MamIf* and *MamHf* genes in healthy tissues and after *A. hydrophila* infection. We obtained the MamDf recombinant protein by prokaryotic expression, and detected the bacteriostatic activity of MamDf recombinant protein. Western blot was carried out to detect the expression of MamDf protein in the liver, spleen, kidney and head kidney of blunt snout bream after infection with *A. hydrophila*. The main results of this study are as follows:

1. Gene identifications and sequence analyses of 3 complement genes (*MamPf*, *MamIf* and *MamHf*) from blunt snout bream.

The full-length opening reading frame (ORF) of the *MamPf* was 1329 bp, encoding 442 amino acids with a molecular mass of 48.9kDa. No N-glycosylation site was predicted. Multiple sequence alignment analysis showed that the *MamPf* and other species consisted of 6 TSR domains, and there were corresponding conserved sequences in the TSR domain. Phylogenetic analysis showed that fish Pf clustered into

one branch and mammals clustered into another. The *MamPf* showed the highest identity with zebrafish. The analysis of gene structure showed that *MamPf* gene contained 9 exons and 8 introns, and the number of exons and introns was similar among different species.

The ORF of the *MamIf* was 2007 bp, encoding 668 amino acids with a molecular mass of 74.6 kDa. 6 N-glycosylation sites were predicted. Multiple sequence alignment analysis showed that the *MamIf* and other species consisted of one FIMAC domain, one SRCR domain, two LDLA domains and one serine protease trypsin superfamily domain, and conserved sequences were found in each domain of different species. Phylogenetic analysis showed that fish *If* clustered into one branch and mammals clustered into another. The *MamIf* showed the highest identity with carp.

The ORF of the *MamHf* was 2589 bp, encoding 862 amino acids with a molecular mass of 97.5 kDa. 2 N-glycosylation sites were predicted. *MamHf* gene contained 13 repetitive SCR domains, and the number of SCR domains in different species was different. Phylogenetic analysis showed that fish *Hf* clustered into one branch and mammals clustered into another. The *MamHf* showed the highest identity with zebrafish.

2. Expression of three blunt snout bream complement genes (*MamPf*, *MamIf* and *MamHf*) in healthy tissues and main immune tissues after infection with *A. hydrophila*

The quantity real-time PCR results showed that *MamPf*, *MamIf* and *MamHf* genes were expressed in 10 tissues. The *MamPf* gene was highest expressed in the kidney, lowest expressed in the intestine and also detected in other tissues. The *MamIf* gene was highest expressed in the liver, high in the kidney, blood, gill and heart, and lowest expressed in the brain. The *MamHf* gene was highest expressed in the liver, lowest expressed in the muscle and also detected in other tissues.

After infection with *A. hydrophila*, the *MamPf*, *MamIf* and *MamHf* mRNAs changed significantly. In the liver, *MamPf* was significantly up-regulated and peaked at 24 h after infection, and returned to the control level at 5 d. *MamIf* was significantly up-regulated at 4 h, and peaked at 5 d. *MamHf* was significantly up-regulated from 4 h to 5 d, and peaked at 3 d. In the spleen, *MamPf* was significantly down-regulated at 4 h,

and significantly up-regulated and peaked at 24 h. *MamIf* was significantly up-regulated and peaked at 4 h, then decreased to the control level. *MamHf* was significantly up-regulated and peaked at 4h, and decreased to the control level at 24h. In the kidney, *MamPf* was significantly up-regulated from 4 h to 5 d, and peaked at 4 h. *MamIf* was significantly up-regulated at 4 h and peaked at 24 h, subsequently significantly down-regulated at 24 h, and decreased to the control group at 3 d. *MamHf* was significantly upregulated at 4h and 24h and peaked at 4h. In the head-kidney, *MamPf* was significantly up-regulated from 4 h to 3 d, and peaked at 4 h, and decreased to the control level at 5 d. *MamIf* was significantly up-regulated and peaked at 4h, subsequently significantly down-regulated, and then reached the control level at 5 d. *MamHf* was significantly up-regulated at 4 h and 24 h and peaked at 4 h, and returned to the control group after 3 d.

3. Antimicrobial activity analysis of MamDf recombinant protein and Western blot Analysis

The *MamDf* gene had 5 exons and 4 introns. The prokaryotic expression vector pET28a-Df was successfully constructed, and the optimal expression conditions (37 °C, 180 r/min, IPTG=0.05 mmol/L induction for 6 h) were screened. The recombinant protein of MamDf had obvious inhibitory effects on the growth of *A. hydrophila*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and the inhibitory effect on gram-negative bacteria was greater than that against gram-positive bacteria. Western blot analysis in immune tissues showed that MamDf protein was up-regulated in liver, spleen, kidney and head-kidney within 4 h-5 d after *A. hydrophila* infection.

Keywords: *Megalobrama amblycephala*; *Aeromonas hydrophila*; complement alternative pathway; cloning; expression; recombinant protein; antibacterial activity

缩略语表

缩略语	英文全称	中文全称
Abbreviation	English full name	Chinese full name
AP	Alternative pathway	替代途径
CP	Classical pathway	经典途径
MBL	Mannose-binding lectin pathway	甘露糖结合凝集素途径
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Real-time quantitative PCR	荧光定量 PCR
Cfu	Colony forming units	细菌菌落总数
Kda	Kilodalton	千道尔顿
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
PMSF	Phenylmethylsulfate	苯甲基磺酰氟
SDS	Sodium dodecylsulfate	十二烷基磺酸钠
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kana	Kanamycin	卡那霉素
OD	Optical density	光密度
RIPA	Radio immunoprecipitation assay	RIPA 裂解液
TBST	Tris buffered saline Tween	三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水

第一章 文献综述

1 研究问题的由来

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 又叫武昌鱼, 属于硬骨鱼纲鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲴亚科 (Culterinae)、鲴属 (*Megalobrama*), 是我国一种重要的淡水养殖草食性鱼类, 其生长速度快, 而且养殖成本低 (赖瑞芳 2016; 李思发等 2001)。目前, 团头鲂在我国各地均有养殖, 已经成为我国第六大淡水养殖鱼类, 带来了巨大的经济效益 (李麒麟等 2015)。20 世纪八九十年代, 就已经对团头鲂的胚胎发育和仔鱼生长进行了比较研究 (李军等 1993; 虞鹏程 1998), 近年, 通过条件优化, 又对团头鲂胚胎发育过程做了更加细致的研究 (于淼等 2018)。经过多年对团头鲂种群资源的研究, 团头鲂的各种优良性状被累积 (顾志敏等 2008)。此外, 微卫星和 SSR 等分子标记的开发与应用, 进一步加快了团头鲂的选育工作 (耿瑞静等 2018)。

近年来, 伴随着养殖模式越来越趋于集约化, 加上近亲繁殖导致的种质资源退化, 导致团头鲂的抗病能力越来越差, 尤其是嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 引起的细菌性败血症较为严重, 造成巨大的经济损失 (田甜等 2010)。近些年, 关于团头鲂感染嗜水气单胞菌后的免疫应答的研究逐渐增多, 许多研究者对不同地区的团头鲂源嗜水气单胞菌进行了分离鉴定和流行病学调查, 而且对其耐药性进行了检测, 为研究团头鲂细菌性败血症做了理论基础 (夏飞 2012; 陆春云等 2015; 金承玲 2018)。随着分子生物学技术的不断发展, 对团头鲂免疫相关的基因做了大量的研究, 如白细胞介素 6、 β -防御素、MHC I 类和 II 类基因以及 NK-lysin 等 (扶晓琴等 2016; 张涓等 2015; 柴欣等 2017; 詹柒凤等 2016)。这些研究都为深度剖析团头鲂抗病机制提供了依据。

鱼类相比于哺乳动物, 获得性免疫不够发达, 但是却拥有强大的先天性免疫系统, 先天性免疫系统在抵御病原体入侵中发挥着不可替代的作用。补体系统作为先天性免疫中的重要一员, 而且补体替代途径被称为最古老的补体激活途径, 对补体系统的激活有着重要的作用 (Farries et al 1990)。补体因子 D (*Df*) 和补体因子 P (*Pf*) 是补体替代途径重要的组成部分, 补体因子 I (*If*) 和补体因子 H

(Hf) 是补体替代途径重要的补体调节因子, 在补体替代途径中发挥着重要的作用 (Sabbioni 2000; Heja et al 2012)。目前, 补体替代途径在哺乳动物中研究的较多, 在鱼类中研究的较少且不全面, 团头鲂在免疫过程中补体系统的作用机制尚无研究。对团头鲂补体系统的研究, 不仅有利于理解鱼类感染细菌后的免疫机制, 而且对团头鲂抗病选育工作奠定理论基础。

2 补体系统的研究概况

免疫机制旨在识别和攻击非自身分子, 免疫系统失调会导致免疫缺陷 (如保护反应不足) 和自身分子损伤 (如自身免疫疾病和过敏反应) (Felippe 2016)。免疫系统包括先天性免疫 (非特异性免疫) 和获得性免疫 (特异性免疫), 它们在机体维持自身稳定的过程中都发挥着不可替代的作用。补体系统是先天性免疫的核心组成部分, 在炎症、吞噬作用、抗体的产生和外来分子的清除以及易感细胞的杀伤等方面均起着至关重要的作用 (Volanakis et al 1996; Holland et al 2002; Riley et al 2018)。

2.1 补体系统概况

先天性免疫是机体防御的第一道防线, 对于保护宿主免受病原体入侵至关重要, 即使先前没有感染过病原体, 在感染后也可以立即起作用 (Elvington et al 2016)。补体系统作为先天性免疫的一个主要的体液成分, 广泛存在于获得性免疫缺乏的无脊椎动物中 (Gasque 2004; Boshra et al 2006)。最初被鉴定为“补体”是免疫反应中血清的成分, 后来不断发展与完善。补体系统由近 60 种可溶性蛋白和跨膜蛋白组成 (Fujii et al 1992; Upasana and Ioannis 2017), 包括补体固有成分 (主要包括经典途径中的 C1、C2、C4, 替代途径中的 B 因子、D 因子和 P 因子, 凝集素途径中的 MASP_s 和 MBL, 以及终末溶解途径的 C5~C9 等)、补体调控蛋白 (H 因子、I 因子、C4 结合蛋白等) 和补体受体 (C1q 受体、C5a 受体等), 以及在补体级联反应各过程中产生的活性片段, 主要包括 C3a、C3b 和 C5a 等, 这些蛋白形成了各种识别、效应和调节受体分子的复杂网络, 以精细调节补体途径, 准确高效的发挥其功能 (Brodsky 1991; Heja et al 2012)。众所周知,

补体系统的功能远远超出了清除入侵病原体。除了通过促进病原体清除来保护宿主免受感染外，补体还可以识别自身健康和受损组织，参与机体免疫复合物的清除，以此维持自身的稳定。除此之外，补体还参与诱导和调节先天性免疫细胞和获得性免疫细胞的免疫应答反应（Harboe et al 2008）。

2.2 补体系统的激活途径

补体系统作为先天性免疫的重要组成部分，必须被激活才能发挥免疫效应。在正常生理条件下，存在于血清和体液中的补体大多处于非活性的酶原状态。当补体系统被激活后，补体成分依赖一系列级联放大的酶促反应被活化，形成多种具有生物学活性的中间复合物，发挥着炎症、吞噬作用和免疫调节等生物学效应。补体系统的激活途径主要有 3 条，经典途径（classical pathway, CP）、替代途径（alternative pathway, AP）和甘露糖结合凝集素途径（lectin-binding pathway, MBL）（图 1-1）（Sunyer et al 2003）。

据报道，在脊椎动物进化过程中，补体替代途径首先被建立，然后才是经典途径，所以替代途径又被称为最古老的补体激活途径（Xu et al 2001）。在替代途径中，中心分子 C3 能够自发的转化为液相的 C3 (H₂O)，C3 (H₂O) 不稳定，可自发的水解为 C3a 和 C3b，B 因子是一种丝氨酸蛋白酶，是丝氨酸蛋白酶补体因子 D 的天然底物，D 因子通过裂解单个的 Arg-Lys 键来催化 B 因子裂解为 Ba 和 Bb，进而 C3b 和 Bb 结合，形成复合物 C3 转化酶（C3bBb），这时的 C3 转化酶不稳定，需要结合 P 因子后才能形成稳定的 C3 转化酶。大量的 C3 转化酶又可以正反馈促进 C3b 的形成，不断扩大级联反应。随后，稳定的 C3 转化酶导致膜攻击复合物（MAC）的形成，诱导靶细胞死亡（Nakao et al 2011）。但这个过程不能无限制的扩大，还受到补体调节因子的调节作用。在正常的体液和血清中，存在 H 和 I 两种调节因子，H 因子和 I 因子都是抑制因子，H 因子可以将稳定的 C3 转化酶裂解为 C3b 和 Bb，I 因子可以灭活 C3b，以维持替代途径的稳定有序（Masaru and Fumiko 2001）。

经典途径由 C1q 与免疫复合物或者其它靶标如凋亡细胞结合；凝集素途径通过甘露糖结合凝集素（MBL）与病原微生物表面的重复碳水化合物残基结合，不依赖于抗原抗体复合物；替代途径通过 C3 内部硫酯基团的水解而自发的激活。

三种途径的激活导致经典/凝集素途径 C3 转化酶（C4b2b）和替代途径 C3 转化酶（C3bBb）的产生（Holers 2014）。C3 被切割后产生 C3a 和 C3b 这两个主要的片段，C3a 是一种有效的炎症介质，C3b 是一种调理素，它沉积在靶细胞和颗粒的表面，促进吞噬作用。C3b 还可以正反馈形成更多的 C3 转化酶，扩大补体级联反应。此外，C3b 与已经存在的 C3 转化酶结合后，形成复合物 C5 转化酶，C5 转化酶有切割 C5 的能力，以此激活补体终末途径，最后形成膜攻击复合物来导致靶细胞裂解和炎症反应（Merle et al 2015）。尽管这些活化过程对病原微生物的清除是有利的，但它们对宿主细胞具有潜在的破坏性。为了防止宿主组织的损伤，补体系统的激活受膜结合蛋白和血浆调节分子的严格调节（Chuang et al 2010）。而且替代途径还可以作为经典途径和凝集素途径的扩大环路，据研究表明，即使补体级联反应由经典途径和凝集素途径启动，替代途径产生的活性物质也可占补体激活产物的 80%，因此替代途径的调节尤其重要（Harboe et al 2008）。

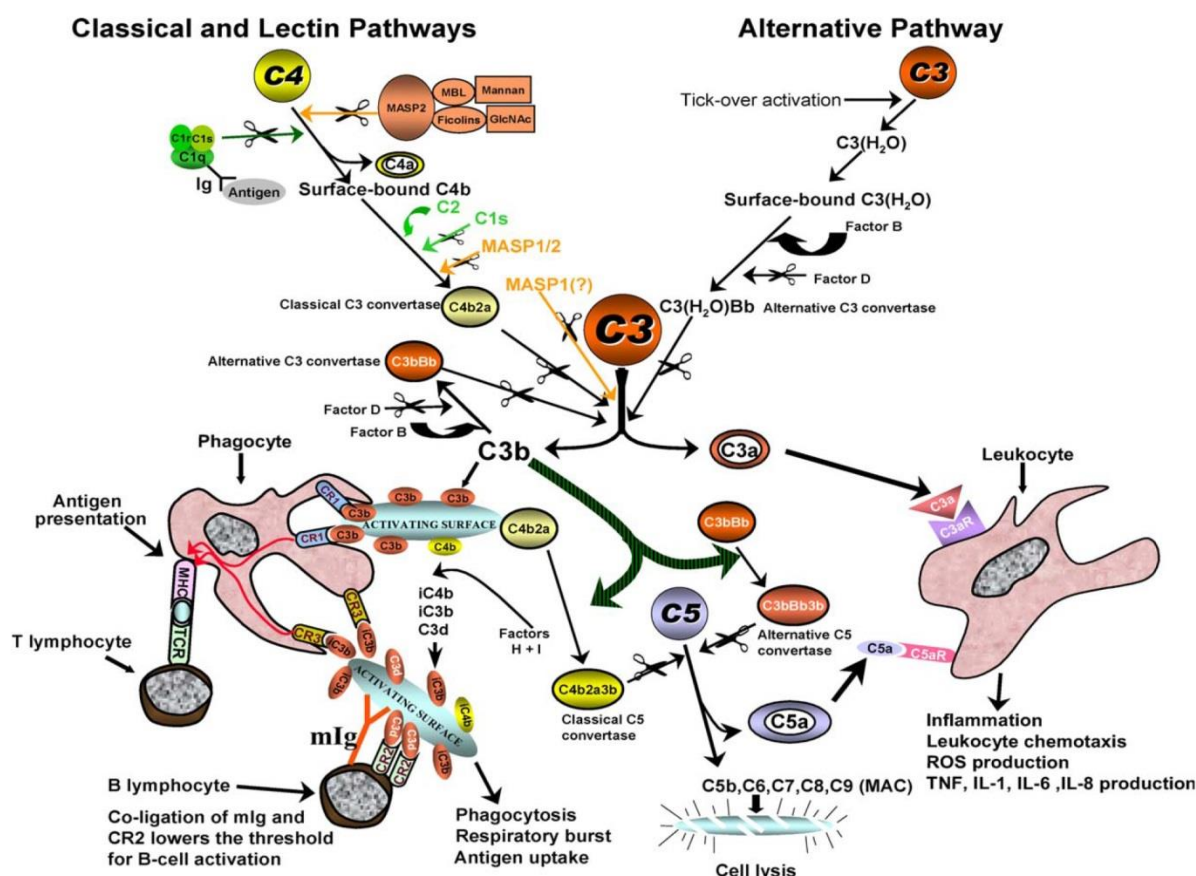


图 1-1 补体系统的激活途径（Sunyer et al 2003）

Fig 1-1 Activation pathway of the complement system (Sunyer et al 2003)

2.3 补体因子 D

补体因子 D (Complement factor D) 又被称为 Df 或者 FD, 是一种丝氨酸蛋白酶, 它是胰蛋白酶家族中的一员, 参与补体替代途径的激活 (Volanakis et al 1996)。补体因子 D 与 C1r、C1s、C2、B 因子和 I 因子一样, 都具有一个丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域 (serine protease trypsin superfamily), 而且它们具有极高的同源性和相似的三级结构 (Hedstrom 2003; Sinh et al 2017; Krem and Cera 2001)。补体途径的激活离不开中心分子 C3, C3 必须被 C3 转化酶催化后才能形成 C5 转化酶, 最后进入补体终末途径。在替代途径的级联反应中, 另外一种丝氨酸蛋白酶被称为补体因子 B (Complement factor B), 它是 Df 已知唯一的天然底物, 参与替代途径中 C3 转化酶的形成, Df 通过催化 Bf 形成 Ba 和 Bb 两个片段, Bb 可以和 C3b 结合形成 C3 转化酶 (C3bBb)。所以, Df 是替代途径中必不可少的组分, 因为它是血液中唯一可以用于催化 C3 转化酶形成的酶 (Xu et al 2001)。此外, Df 是替代途径的限速酶, 在人的血液中的含量很低 (1-2 μ g/mL) (Volanakis et al 1985)。

补体成分主要由肝脏产生, 具有先天免疫防御的能力 (Morgan and Harris 2015; Zipfel and Skerka 2009)。有研究表明, 脂肪组织也可以产生补体成分 C3、B 因子和 D 因子等, 还有其它补体因子也能被脂肪组织产生分泌 (Pattrick et al 2009)。在人类中, 有研究表明, Df 有类似于脂肪酶的活性, 能够促使甘油三酯的合成, 调节机体的能量代谢 (Paglialunga et al 2007; Ronti et al 2006)。

Df 已经在多种硬骨鱼类中被鉴定出来, 包括虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Sunyer et al 1998)、鲤 (*Cyprinus carpio*) (Yano and Nakao 1994)、溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) (Hajnik et al 1998)、斑马鱼 (*Danio rerio*) (Stockhammer et al 2010)、青鳉 (*Oryzias latipes*) (Woo et al 2014)、橄榄比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*) (Kong et al 2009)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) (Zhou et al 2012) 和条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 等 (Godaheewa et al 2016), 从结果看来, 它们的序列和哺乳动物 Df 序列有高度的保守性。而且, 有关 Df 表达和功能研究也逐渐增多, 在不同鱼类中, Df 的表达模式存在差异; 另外, 有研究表明, 在条石鲷和鲤中 Df 有着蛋白酶水解活性。

2.4 补体因子 P

补体因子 P (Complement factor P) 简称 Pf 或者 FP, 又叫备解素 (Properdin), 是一种天然的血浆糖蛋白。Pf 是补体系统中唯一一种正调节因子, 它可以稳定 C3 转化酶 (C3bBb), 使其半衰期增加 5-10 倍; 同时 Pf 作为模式识别分子, 选择性地结合到其募集的 C3b 或 C3 (H₂O) 的表面, 来启动替代途径。所以, Pf 在补体替代途径激活中发挥着重要的作用 (Hourcade 2006; Blatt et al 2016)。

Pf 是一种带正电荷的糖蛋白, 在血浆中的浓度大约为 25 μ g/mL (Fearon and Austen 1975)。它是由相同的大小约 53 kDa 的亚基组成的寡聚蛋白, 每个亚基长 26 nm, 直径 2.5 nm (Camous et al 2011), 它们以头对尾的方式相互结合, 形成环状二聚体、三聚体、四聚体和五聚体 (Alcorlo et al 2013)。该亚基是一种类似棒状的结构, 长 442 个氨基酸, 由 7 个不相同的约 60 个氨基酸的重复序列串联组成, 这些重复序列称为 I 型凝血酶敏感蛋白 (thrombospondin type I repeats), 简称 TSR 结构域 (Higgins et al 1995)。TSR 也存在于人血小板中的细胞粘附分子中, 所以也称为血小板反应蛋白。Pf 和血小板反应蛋白序列比对显示, 前 26 个氨基酸与疟疾环孢子 (CS) 蛋白的相似性达 46% (Goundis and Reid 1988)。研究表明, 这些 TSR 结构域中, 第四个和第五个 TSR 结构域对于 Pf 的生物学功能是必不可少的 (Alcorlo et al 2013; Kouser et al 2016)。自 1954 年发现 Pf 以来, 已经在多种脊椎动物中鉴定了 Pf, 包括哺乳动物 (Maves et al 1995; Naff et al 1980) 和少数鱼类 (Chondrou et al 2008; Zhang et al 2013), 在多数鱼类和无脊椎动物中关于 Pf 的研究很少。

在哺乳动物中, 除肝脏、脾脏和骨髓 (Ponten et al 2010) 能合成备解素外, 中性粒细胞 (Camous et al 2011)、单核细胞 (Whaley 1980)、树突细胞 (Reis et al 2007)、内皮细胞 (Bongrazio et al 2003) 等也能合成备解素。在源自人肝细胞的 HEP G2 细胞中检测不到备解素 mRNA 的表达 (Schwaeble et al 1993)。在被 N-甲酰基-蛋氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸 (fMLP) 或肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 刺激后, 中性粒细胞可以从细胞内释放储存的备解素 (Camous et al 2011)。备解素识别凋亡的 T 细胞后, 通过硫化的甘氨酸-余胺聚糖 (GAGs) 促进巨噬细胞的吞噬作用来除去凋亡的 T 细胞 (Kemper et al 2008; Ferreira et al 2010)。有学者认为, 肝素与备解素及 H 因子相互作用, 然而, 它们的结合动力学和解离常数 (K_d) 非

常的不同 (Yu et al 2005)。与肾脏疾病患者的尿液相比, 在健康的个体的尿液中发现了更高水平的备解素, 所以有学者提出使用血清中备解素的浓度作为肾小球病患者的诊断标志物 (Corvillo et al 2016)。

2.5 补体因子 I

补体系统对于抵御病原体的入侵和消除自身受损细胞是高速有效的, 尤其是补体替代途径的激活, 对维持自身稳定有重要作用。但是如果补体系统被无限制的激活, 也会破坏自身, 造成自我毁灭。所以, 补体系统中还有一种特异性抑制分子, 可以紧密调节补体级联反应, 它就是补体因子 I。

补体因子 I (Complement factor I) 简称 *If*, 是一种可溶性的丝氨酸蛋白酶, 其可以在辅因子的作用下, 通过裂解 C3b 和 C4b, 阻止 C3 转化酶和 C5 转化酶的组装以及下游效应, 来调节补体激活的多种途径, 避免宿主免疫应答的过度扩大 (Boshra et al 2006; Zipfel et al 2007)。而且, *If* 裂解 C3b 可以产生调理素 iC3b, 这对补体受体的生物识别是至关重要的 (Sim and Tsiftoglou 2004; Das et al 2014)。

在人类中, *If* 是一种血清糖蛋白, 其长度为 583 个氨基酸, 相对分子质量为 88 kDa, 是由一条重链 (50 kDa) 和一条轻链 (38 kDa) 通过二硫键连接成的异二聚体 (Catterall et al 1987; Muller-Eberhard 1988)。每条链含有三个 N-糖基化位点, 占 20-25% 的表观分子质量 (Tsiftoglou and Sim 2004)。重链和轻链均位于 4q25 染色体上, 包含了 13 个外显子 (Vyse et al 1994)。对 *If* 的一级结构分析表明了该基因的结构域非常保守, 线性排列的结构域与其它补体和非补体蛋白的结构域序列十分相似 (Nilsson et al 2009)。重链由前导肽 (LP)、FI 膜攻击复合物结构域 (FIMAC)、CD5 样结构域 (SRCR) 和两个低密度脂蛋白受体 A 类结构域 (LDLRA 1 和 2) 组成, 轻链由丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族 (SP) 结构域组成, 其中含有 His-Asp-Ser 催化三联体 (Tsiftoglou et al 2005; Sanchez-Gallego et al 2012)。有研究显示, 重链中的 FIMAC 结构域似乎具有裂解 C3b 和 C4b 的主要结合位点 (Gallego et al 2010)。而且, FIMAC 和 LDLRA 结构域也存在于补体 C6 和 C7 中, C6 是卵磷脂结合蛋白超家族抑制蛋白的成员, 在蛋白质与蛋白质相互作用中发挥作用 (Ullman and Perkins 1997)。SRCR 是一个含约 110 个氨基酸残基的保守结构域, 参与配体结合, 和免疫系统有关 (Hohenester et al 1999)。

到目前为止, 已经对多种脊椎动物中的 If 做了序列和表达分析, 包括人 (*Homo sapiens*) (Goldberger et al 1987; Catterall et al 1987)、小鼠 (*Mus musculus*) (Minta et al 1996)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (Schlaf et al 2010)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) (Kunnathmuglia et al 1993)、虹鳟 (*Anastasiou et al 2011*)、斑点叉尾鮰 (Abernathy et al 2009)、鲤 (Nakao et al 2003)、鲨鱼 (*Shark*) (Shin et al 2009; Wang et al 2014) 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (Xiang et al 2015) 等。研究显示, 与哺乳动物相比, 除了典型的结构域外, 在几种非哺乳动物中的 If 重链中还存在其它序列, 比如在非洲爪蟾中, 重链中在 LDLRA 2 之后存在着带有很高电荷的肽段, 它的功能尚不清楚 (Kunnathmuglia et al 1993)。在鱼类中, LP 和 FIMAC 之间的扩展 cDNA 序列已经在鲤 (Nakao et al 2003)、斑点叉尾鮰 (Abernathy et al 2009)、鲨鱼 (Shin et al 2009; Wang et al 2014) 中报道, 在其它物种中没有报道。特别的是, 鲨鱼中的扩展片段含有相同大小的重复序列, 推测插入的序列可能是物种特异性的反映 (Shin et al 2009)。

2.6 补体因子 H

补体因子 H (Complement factor H) 又叫 Hf 或者 CFH, 是补体替代途径中十分重要的调节因子。补体因子 H 最初被 Nilsson 和 Muller-Eberhard (1965) 鉴定出来, 是由 20 个保守补体蛋白 (CCP) 结构域组成的糖蛋白, 每个 CCP 结构域也被称为短共有重复序列 (SCR), 包含约 60 个氨基酸残基的共有序列, 具有四个不变的半胱氨酸残基, 高度保守的色氨酸和相对保守的甘氨酸、脯氨酸和疏水残基 (Makou et al 2015)。这些 SCR 结构域的功能在人类中是不同的。Hf 的 N 末端 SCR1-4 通过促进 C3 转化酶的衰变来调节补体活性; 位于 C 末端的 SCR18-20 介导表面结合和靶位识别 (Goicoechea 2004; Zipfel and Jozsi 2008)。猪 (*Sus scrofa*) 的 Hf 中的 SCR1-4 的辅因子活性与人的 SCR1-4 类似物一致 (Hegasy et al 2003)。斑马鱼 Hf 中的 SCR2 在与 C3b 结合中起关键作用, 这与人中的 SCR2 类似。此外, Hf 可以用于粘附蛋白和整合素受体 CR3 的配体, 通过与细胞表面结合来清除凋亡细胞, 从而保护自身细胞 (Hellwage et al 2002; Janssen et al 2005)。Hf 是人血液中最丰富的补体成分之一, 血浆浓度范围为 200-800 μ g/mL, 其中肝脏是体内 Hf 的主要来源。然而, Hf 由其它细胞分泌, 包

括单核细胞 (Whaley 1980)、成纤维细胞 (Katz and Strunk 1988)、内皮细胞 (Brooimans 1990)、血小板 (Devine and Rosse 1987) 和视网膜色素上皮细胞 (Clark et al 2014)。Hf 主要作用包括以下三点: (1) 通过与补体因子 B 竞争结合 C3b 来抑制替代途径 C3 转化酶和 C5 转化酶的形成来调节补体激活; (2) 通过置换结合因子 B (加速衰变), 促进 C3 转化酶和 C5 转化酶的分解; (3) 作为丝氨酸蛋白酶因子 I 的辅因子, 提高因子 I 和 C3b 的亲和力 (Cordoba and Jorge 2008)。

除了 CFH, 在人类中还有 5 个 CFH 家族补体因子 H 相关蛋白 (CFHR) 被鉴定出, 它们和 CFH 类似, 也是由不同数量的重复 SCR 结构域组成, 彼此之间有很高的相似性, 编码人因子 H 相关蛋白 CFHR1-5 的基因位于 CFH 旁边。与 CFH 基因类似, CFHRs 也主要在肝脏中表达 (Zipfel et al 2002)。斑马鱼中也鉴定出 CFH 和 4 个 CFHRs, 也是由不同数量的 SCR 结构域组成 (Sun et al 2010)。CFH 基因已经在哺乳动物大鼠 (Demberg et al 2002)、小鼠 (Kristensen and Tack 1986)、猪 (Hegasy et al 2003)、牛 (*Bos taurus*) (Menger and Aston 1985)、兔 (*Lepus sinensis*) (Horstmann and Müller-Eberhard 1985) 等中鉴定出来, 在非哺乳动物鸡 (*Gallus gallus*) (Inoue et al 2001)、七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) (Kimura et al 2004)、斑马鱼 (Sun et al 2010)、虹鳟 (Anastasiou et al 2011)、文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) (Cai et al 2014) 等中也已经鉴定了 CFH 基因。

3 研究目的和意义

近些年来团头鲂养殖业发展的十分迅速, 但随着近亲交配导致的种质资源退化和养殖模式的集约化, 多种病害频发, 其中嗜水气单胞菌造成的危害最大, 已造成了严重的经济损失。虽然团头鲂遗传选育工作已经取得了很大的进展, 尤其是分子机制的研究, 但研究的层面依旧很浅显。因此, 开展团头鲂免疫防御机制的基础研究工作不仅能够推动世界水产学科的理论创新, 而且对我国水产行业健康、快速可持续发展具有重要意义。

目前, 在鱼类补体系统的研究中, 经典途径及其相关分子作用机制研究较多, 但替代途径研究甚少。本研究以团头鲂为研究对象, 利用生物信息学和分子生物

学等技术手段对团头鲂补体系统替代途径 *Df*、*Pf*、*If* 和 *Hf* 基因展开研究，确定 *Pf*、*If* 和 *Hf* 基因的结构特征和 mRNA 水平的表达特征，以及 *Df* 基因蛋白水平的表达特征和蛋白的免疫学功能，探讨其在团头鲂免疫应答过程中的作用机制，为团头鲂抗病选育工作做理论支持。

第二章 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因序列和表达模式分析

1 材料和方法

1.1 样品的采集

1.1.1 健康组织样品采集

实验所用的健康团头鲂 ($500 \pm 10\text{g}$) 采自湖北百容水产良种有限公司 (湖北省黄冈市团风县白鹤林村), 将鱼充氧打包带回华中农业大学水产学院实验室进行暂养, 待其适应环境后开始进行取样。待取样的 6 尾鱼经麻醉剂 (乌来糖) 麻醉, 置于冰盘上分别取肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、心、脑、肌肉、血液和头肾等 10 个组织样品, 取样后立即放入液氮中速冻, 然后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

1.1.2 细菌感染实验样品采集

实验所用团头鲂 ($30 \pm 5\text{g}$) 来自华中农业大学校内基地, 细菌感染所用的嗜水气单胞菌菌株是由实验室保存的病原菌。参照之前的研究 (詹柒凤等 2016), 先通过预实验估计所用的嗜水气单胞菌的浓度, 使死亡率保持在 20% 左右。然后用此浓度 ($1.0 \times 10^6\text{ cfu/mL}$) 的嗜水气单胞菌对实验鱼进行腹腔注射感染, 每尾鱼注射 0.1 mL, 设置实验组和对照组, 对照组注射相同量的 0.75% 的 PBS。分别在 0 h、4 h、24 h、3 d 和 5 d 的时候采集对照组和实验组的肝脏、脾脏、肾脏和头肾等, 每个时间点分别采集 3 组样品, 每组样品 7 尾鱼。取样后立即放入液氮中速冻, 然后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

1.2 主要的仪器设备及药品试剂

1.2.1 主要的仪器设备

Veriti 梯度 PCR 仪（德国 Eppendorf 公司），DYY-III 型电泳仪、水平电泳槽及垂直电泳槽（北京六一仪器厂），台式低温高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司），AC21 IP 电子分析天平（上海恒平科学仪器有限公司），微量移液器（德国 Eppendorf 公司），凝胶成像系统（美国伯乐 BIO-RAD），恒温水浴锅（江苏金坛市金城国盛实验仪器厂），恒温培养振荡器（上海智城分析仪器制造有限公司），电热恒温培养箱（上海新苗医疗器械制造有限公司），电热式压力蒸汽灭菌锅（浙江新丰医疗器械有限公司），超低温冰箱（海尔），超净工作台（苏州净化设备有限公司），分光光度计（美国 Nanodrop），荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司，型号 7300），电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒仪器制造有限公司），研磨仪（德国莱驰），超声波破碎仪（宁波新芝），酶标仪（Tecan 公司），Odyssey 双色红外荧光成像系统（美国 Li-cor 公司）等。

1.2.2 主要的试剂药品

RNA 提取试剂 TRIzol（Invitrogen 公司），反转录试剂盒（Takara），PCR 液体回收试剂盒（Axygen），DH5 α 感受态细胞（北京擎科），SYBR 荧光定量试剂盒（Takara），DNA Maker、Taq 酶、T4 DNA 连接酶（康为试剂公司），其它常规试剂为国产分析纯。

1.2.3 主要试剂配制

（1）0.1%DEPC 水：1mLDEPC 溶于 1000mL 双蒸水中，37℃过夜搅拌混匀后高温高压灭菌。

（2）50×电泳缓冲液（TAE）：242gTris-base，57.1mL 冰乙酸，100 mL0.5mol/L EDTA（pH 8.0），定容至 1L，用时稀释 50 倍。

（3）X-gal 贮存液（20 mg/mL）：用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成 20mg/mL 的贮存液，充分混匀后用锡箔纸包裹-20℃避光保存。

(4) IPTG (200mg/mL): 在 800 μ L 蒸馏水中溶解 200mgIPTG 后, 用蒸馏水定容至 1mL, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装于 1.5 mL 离心管并于-20℃储存。

(5) LB 液体培养基 (100 mL): 蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, 氯化钠 1 g, 蒸馏水 100 mL, 高压灭菌锅中灭菌。

(6) LB 固体培养基 (500 mL): 将 7.5 g 琼脂粉加入配好的 500 mL LB 液体培养基中, 充分溶解。121 ℃高温灭菌 30 min, 待温度降至 50 ℃时即可倒平板, 冷凝后置于冰箱 4 ℃备用。

(7) 氨苄青霉素贮存液: 将 1 g 氨苄青霉素粉末加入到 10 mL 灭菌水中, 再用微孔滤膜 (0.22 μ m) 过滤除菌, 分装后用锡箔纸包裹-20 ℃避光保存。

1.3 引物设计与合成

利用斑马鱼 Pf、If 和 Hf 氨基酸序列在团头鲂基因组中本地 blast 得到各自的同源序列, 再根据同源序列在团头鲂转录组序列中找到大致的 cDNA 序列, 然后根据该序列用 Primer premier 5.0 设计扩增引物以及荧光定量 PCR 引物, 送至武汉擎科公司进行合成。引物详细信息见表 1。

表 2-1 本章节所用的引物信息

Table 2-1 Information of primers used in this section

引物名称	序列(5'→3')	用途
Primer name	Sequence	Usage
PF-ORF-F1	CACTATTGAGGCAGGACGA	ORF 序列验证
PF-ORF-R1	ATACAAGTAGATTGACAGGGACC	ORF 序列验证
PF-ORF-F2	CTGGGGTCCCTGTCAATCTACT	ORF 序列验证
PF-ORF-R2	AAGCAGAGTTTACGGAGTGTGAAT	ORF 序列验证
IF-ORF-F1	GATTGAAGTGCGTCTGCTGAG	ORF 序列验证
IF-ORF-R1	CCAGACAGTCCCTGATTCCAT	ORF 序列验证
IF-ORF-F2	GTGGAGACAACAGTGACGAG	ORF 序列验证
IF-ORF-R2	GGTTCAAAAGCACATATAGTAA	ORF 序列验证
HF-ORF-F1	AAAGATAACTGTGAACTGAGC	ORF 序列验证

表 2-1 续

Table 2-1 Continue

引物名称	序列(5'→3')	用途
Primer name	Sequence	Usage
HF-ORF-R1	CAGTATTATCCCATCCTTGAG	ORF 序列验证
HF-ORF-F2	GTCCCTGTCTGTGAGGCTGT	ORF 序列验证
HF-ORF-R2	AATGAGCTTCGACATGCGTAT	ORF 序列验证
HF-ORF-F3	TCAAACCAACTCAACGCTTC	ORF 序列验证
HF-ORF-R3	GCCTCTCTGACACCTAAATTCG	ORF 序列验证
PF-RT-PCR-F	TCACTATTGAGGCAGGACG	荧光定量
PF-RT-PCR-R	TCACCCAACAAATCACCAC	荧光定量
IF-RT-PCR-F	GTCCTCGTTGTTTTATCTTCAT	荧光定量
IF-RT-PCR-R	TTTGGTTGCTACTGTTTTTTCGT	荧光定量
HF-RT-PCR-F	TTACTCCTGCGACACGGGTT	荧光定量
HF-RT-PCR-R	TTTTATGAAGCGTTGAGTTGGT	荧光定量
18S rRNA-F	CGGAGGTTCTGAAGACGATCA	内参基因
18S rRNA-R	GGGTCGGCATCGTTTACG	内参基因

1.4 实验方法

1.4.1 总 RNA 的提取

制备 0.1%DEPC 水，部分灭菌后于-4 ℃保存用以溶解 RNA；剩余部分用来浸泡枪头与 EP 管。将保存在-80 ℃下的各组织样品取出，在液氮环境下研磨成粉末状，然后按照 Trizol 试剂盒说明书进行样品总 RNA 的提取。步骤如下：

（1）分别取 100 mg 样品粉末于 2 mL EP 管中，向其中加入 1.2 mL Trizol 的，300 μ LDEPC 水以及两颗玻璃珠。使用匀浆器短暂匀浆。

（2）将上述匀浆液室温静置 5 min，然后 12000 r/min，4 ℃离心 5 min，吸取上清液 1500 μ L 于新的 EP 管中。

（3）向上述上清液中加入 1/5 Trizol 体积的氯仿，加入氯仿后需立即用手刷

烈振荡 15 s, 充分乳化后(无分相现象), 室温静置 5 min。12000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 即会分层: 上层清液, 中层为白色蛋白质, 下层为带鲜红色的有机相。

(4) 取 600 μ L 上清液于新的 1.5 mL EP 管中, 并加入等体积的异丙醇, 上下颠倒充分混匀, 15-30 °C 下静置 10 min。12000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 一般离心后管底会有白色沉淀。

(5) 小心弃上清液, 此时可见管底有白色沉淀, 而后沿管壁缓慢加入 1.0 mL 经过冷处理过 75%乙醇(事先稀释好后放于冰上或者 4 °C 冰箱中), 轻轻上下颠倒清洗沉淀, 12000 r/min, 4 °C 离心 5 min。此过程重复 2 次。

(6) 小心弃去乙醇, 尽量除尽乙醇, 使 RNA 沉淀在室温或真空中干燥 2-5 min; 加入 20-50 μ L 的 Rnase-free water 溶解沉淀, 提取的 RNA -80 °C 保存。

1.4.2 总 RNA 质量检测

(1) RNA 纯度的检测: 取 1 μ L RNA 于超微量分光光度计中, 测其在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值。当比值在 1.9~2.1 之间, 表明提取的总 RNA 纯度较高, 没有蛋白质或基因组的污染。

(2) RNA 完整性的检测: 取 2 μ L RNA, 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。经凝胶成像系统观察后, 当 28S 与 18S 条带清晰, 且亮度比大约是 2:1, 5S 条带隐约可见, 而且没有其它条带时, 说明完整性较好。

1.4.3 cDNA 第一条链的合成及 PCR 扩增

将提取的团头鲂样品总 RNA 严格按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒的说明进行反转录, 得到的 cDNA 作为荧光定量 PCR 反应的模板。反应分为两步进行, 首先进行基因组 DNA 的消除反应, 再进行反转录反应。

基因组 DNA 消除反应:

试剂	体积
5×gDNA Eraser Buffer	2.0 μL
gDNA Eraser	1.0 μL
total RNA	1.0 μg
RNase Free dH ₂ O	(7-V _{RNA}) μL
总体积	10 μL

总反应液混匀后，42 °C 2 min，后放在 4 °C 冰上。

反转录反应如下：

试剂	体积
Reaction solution from Step 1	10 μL
5×PrimeScript Buffer 2 (for real time)	4.0 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 μL
RT Primer Mix	1.0 μL
RNase Free dH ₂ O	4.0 μL
总体积	20 μL

反应液混匀后，37 °C 15 min，85 °C 5 s，得到的 cDNA 于 -20 °C 保存。

以反转录产物（cDNA）为模板进行 PCR 扩增，反应体系如下：

试剂	体积
10×Taq PCR Buffer	1.0 μL
Dntp	0.4 μL
上游引物 F1 (10 μM)	0.4 μL
下游引物 R1 (10 μM)	0.4 μL
Taq DNA Polymerase	0.2 μL
反转录产物（cDNA）	0.5 μL
ddH ₂ O	7.1 μL
总体积	10 μL

反应条件为：95 °C 下预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，50-60 °C 下退火 30 s，72 °C 下延伸时间按照 1000 bp/min，共 35 个循环；循环结束后在 72 °C 下再延伸 5 min。PCR 反应结束后，取 PCR 产物 5 μL，以 DL2000 Marker 作为参照，1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.4 PCR 产物回收与纯化

PCR 反应得到目的条带后, 加大反应体积至 20 μL 。将 PCR 反应产物上样至 1% 的琼脂糖凝胶, 150 V 电压下电泳 20 min, 在紫外灯下切胶回收目的片段。

PCR 产物胶回收试剂盒 (Axygen, 美国) 纯化回收操作步骤如下:

(1) 在紫外灯下切下含有目的片段的琼脂糖凝胶, 用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎, 计算凝胶重量, 该重量作为一个凝胶体 (如 100 mg=100 μL 体积)。加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A 后于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 8~10 min, 每隔 2~3 min 混匀一次, 直至凝胶完全熔化。然后加入 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B, 混合均匀, 当 DNA 片段小于 400bp 时加入 1 个凝胶体积的异丙醇。吸取上述混合液, 转移到 DNA 制备管中, 12000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。

(2) 将制备管置回 2 mL 离心管, 加入 500 μL Buffer W1, 12000 r/min 离心 30 s, 弃滤液。

(3) 将制备管置回 2 mL 离心管, 加入 700 μL Buffer W1, 12000 r/min 离心 30 s, 弃滤液。以同样的方法再用 700 μL Buffer W2 洗涤一次。

(4) 将制备管置回 2 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 1 min。将制备管置于洁净的离心管中, 在制备膜中央加 25~30 μL 去离子水, 室温静置 1 min。12000 r/min 离心 1 min 洗脱 DNA。

PCR 产物液体回收试剂盒 (Axygen, 美国) 纯化回收操作步骤如下:

(1) 在 PCR 产物中加入 3 倍体积的 Buffer PCR-A (若 Buffer PCR-A 不足 100 μL , 补足到 100 μL); 混匀后转移到 DNA 制备管中, 将 DNA 制备管置于 2 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。

(2) 将制备管置回 2 mL 离心管中, 加入 700 μL Buffer W2, 12000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。注: Buffer W2 已经加入无水乙醇。

(3) 将制备管置回离心管中, 加入 400 μL Buffer W2, 12000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。

(4) 将制备管置于清洁的 1.5 mL 离心管中, 在制备管膜中央加 25~30 μL 去离子水, 室温静置 1 min。12000 r/min 离心 1 min, 洗脱 DNA。

1.4.5 连接转化与阳性克隆筛选

(1) 连接

根据连接反应试剂盒说明书操作，连接反应体系如下：

试剂	体积
回收产物 DNA	3.0 μL
10 $\times$ Buffer	0.5 μL
pBlue-T 载体	0.5 μL
T4 DNA 连接酶	0.5 μL
10 $\times$ enhancer	0.5 μL
总体积	5.0 μL

混匀后，23 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 后，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接 12~16 h。

(2) 转化

将 5 μL 连接产物无菌条件下加入 50 μL 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中，冰置 30 min；42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 s，随后立即冰上放置 3 min；向菌液中加入 600 μL 无 Amp 的 LB 液体培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 振荡 30 min；菌液离心后弃去 500 μL 上清，向余下菌液中加入 40 μL X-gal、4 μL IPTG，混匀后取 150 μL 均匀涂布于含 Amp 的 LB 固体培养皿上。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱正放 30 min，待菌液被琼脂完全吸收后，为了防止水蒸气冷凝回滴落入平皿中，倒置培养皿，过夜培养。

(3) 阳性克隆筛选

将培养板放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 min 使蓝色斑充分显现，在无菌操作台中挑取白色单菌落，接种于 1 mL 含 Amp 的液体培养基中，放入摇床 37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 培养 5~6 h。将摇好的菌液作为模板进行菌液 PCR 扩增，反应完成后电泳检测结果，挑取大小合适，条带单一清晰的阳性菌液送测序。本实验所有测序均由武汉擎科生物科技有限公司完成。

1.4.6 qRT-PCR 标准曲线制作与 qRT-PCR

质粒标准样品的制备：选择测序结果正确的阳性克隆菌液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中进行扩大培养，然后利用质粒快速提取试剂盒（鼎国）提取质粒 DNA，用分光光

度计测定其浓度以计算拷贝数。

质粒稀释：在 7 个 200 μL 的 PCR 管中加入 36 μL 7. EASY Dilution (for real time PCR)，取 4 μL 质粒 DNA 加入 1 号管，充分震荡混匀，吸取 4 μL 加入二号管，依此类推，按倍比稀释法进行稀释得到质粒标准样品。

标准曲线制作：以稀释的质粒标准样品为模板，经检测合格的目的基因荧光定量引物和 18S-rRNA 引物进行荧光定量 PCR，每个样品做 3 个重复。

荧光定量 PCR (qRT-PCR) 体系和程序如下。

体系：

试剂	体积
SYBR mix	10.0 μL
ddH ₂ O	7.4 μL
Primer1	0.8 μL
Primer2	0.8 μL
cDNA	1.0 μL
Total	20.0 μL

程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, T_m 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s.

40 Cycles

以团头鲂成鱼不同组织以及嗜水气单胞菌感染后采集的不同样品 cDNA 作为模板，用筛选到荧光定量 PCR 引物及最适温度来进行 qRT-PCR，体系和程序如上。

1.5 序列分析

本研究使用的其它物种序列均来自 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。采用 NCBI 数据库 ORF finder 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找开放阅读框 ORF 和预测氨基酸序列，使用 SMART 预测结构域 (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)。使用 ProParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测各蛋白的物理化学参数。使用 DNAMAN 软件进行不同物种的氨基酸序列的多重比对。使用 MEGA 6.06 软件构建 NJ 系统进化树。使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽，通过 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测 N-糖基

化位点。各基因氨基酸序列的二级和三级结构由 Phyre2 预测 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)。

1.6 数据分析

用 SPSS 17.0 软件对目的基因的相对表达量进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 T 检验, 并用 Duncan 进行多重比较, 数值均采用平均值±标准误 (mean±SE) 表示, 当 $P<0.05$ 时, 认为差异显著; 当 $P<0.01$ 时, 认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

结果如图 2-1 所示, 所提取的团头鲂总 RNA 有三条带, 从大到小依次为 28S、18S 和 5S, 从图中可以看出 28S 和 18S 的亮度比大约是 2:1 且条带明亮, 5S 的条带较弱, 表明提取的总 RNA 具有较好的完整性。经超微量紫外分光光度计测定的 OD_{260}/OD_{280} 的值也都在 2.0 左右, 表明总 RNA 的纯度较高, 可用于后续试验。

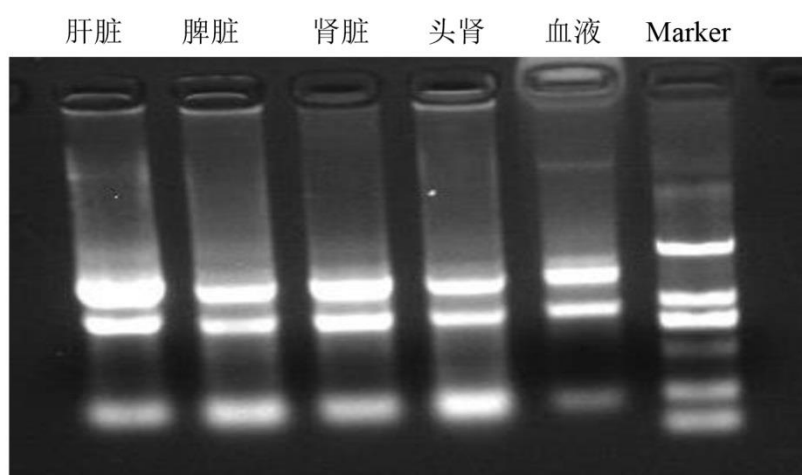


图 2-1 团头鲂总 RNA 提取琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2-1 Electropherogram of total RNA of blunt snout bream

2.2 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因序列分析

2.2.1 团头鲂 *MamPf* 基因序列分析

从团头鲂转录组中获取 *MamPf* cDNA 部分序列,并验证其 ORF 序列。*MamPf* 开放阅读框 (ORF) 全长 1329bp, 编码 442 个氨基酸 (图 2-2), DNASTAR 预测其分子量为 48.9kDa, 理论等电点为 7.50。利用 ProtParam 在线分析 *MamPf* 氨基酸序列,显示其脂肪系数为 43.82,平均疏水系数为-0.750,不稳定指系数为 50.00,被归类为不稳定蛋白。SignalP 4.1 在线分析表明第 1 到 20 个氨基酸为其信号肽, NetNGlyc 1.0 Server 预测显示其没有 N-糖基化位点。Phyre2 预测 *MamPf* 二级结构包括 1 个 α 螺旋(1%)、19 个 β 转角(24%), Pf 三级结构如图所示(附图 2-2)。

ClustalW 多序列比对分析(图 2-3)显示,团头鲂和其他物种的 Pf 都是由 6 个 TSR 结构域组成(图 2-4),而且 TSR 结构域中有相应的保守序列。

利用 MEGA 6.06 软件中的 NJ 分析法构建 Pf 的系统进化树,结果如图 2-5 所示,鱼类 Pf 聚为一支,哺乳动物聚为另一支,鱼类 Df 和哺乳类 Df 有共同的祖先。同时,团头鲂与斑马鱼的 Pf 在进化上亲缘关系最近。

Pf 基因结构分析表明(图 2-6),*MamPf* 基因含有 9 个外显子和 8 个内含子,和斑马鱼、斑点叉尾鲷、大西洋鲑和人类一样,有相同的外显子和内含子数量,而且相对应的内含子长度也相似。另外,对罗非鱼 Pf 基因结构分析表明,罗非鱼和分析的其它物种不同,含有 11 个外显子和 10 个内含子,从第 6 个外显子开始与其他物种外显子长度相似。所有的物种内含子长度差异很大。

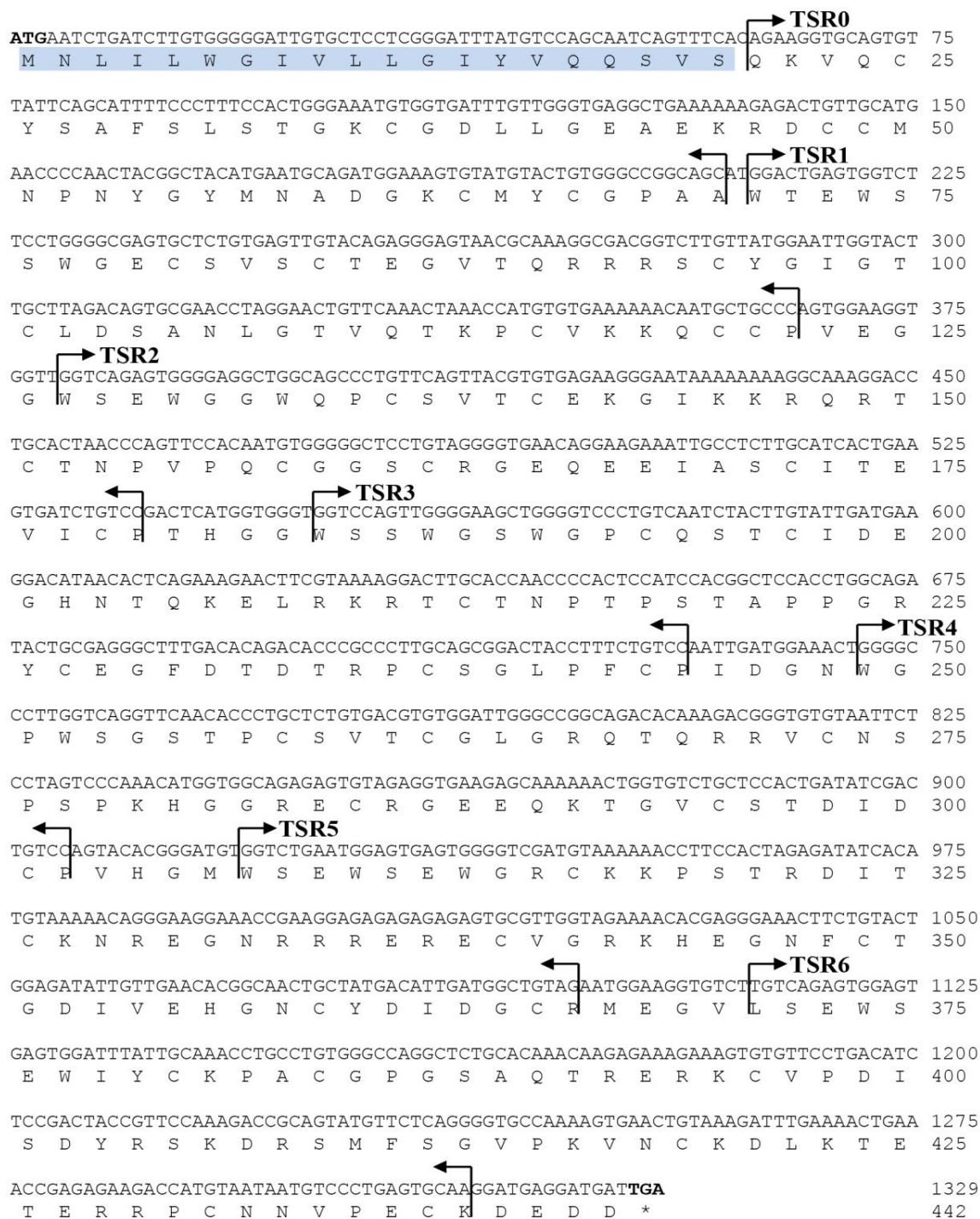


图 2-2 团头鲂 *MamPf* 基因 ORF 序列及编码的氨基酸序列

Fig.2-2 The ORF sequence and encoded amino acids of *MamPf* gene

起始密码子和终止密码子用黑体表示，蓝色填充区域为信号肽，向右箭头和向左箭头之间表示结构域。

Star and stop codons are shown in bold,the signal peptide sequence is shaded in blue, between the right arrow and

the left arrow is a domain.

<i>M. am</i>	MNLILWGI VLLG..IYVQQSVSQKVCYSAFSLSTGKCGDLLG.EAEKRDCMMPNYGYMNA DG.K	62
<i>D. rerio</i>	MNLNLLWILLG..IYVQQSAQMVQCFAFSISTGKCADLLG.EIEKDFCCINPSYGFADG.V	62
<i>C. carpio</i>	MNLILWGI VLLG..IYVQQSVSQMVECFSSFTLSSGKCGNLLG.PVEKNSCCLNPSYGYKADG.V	62
<i>I. punctatus</i>	MRTVMHIIILLVLVLHVQQT VSNLVQCYGTFHPTDGTCSNIMG.KVPQDDCCMMPVYGFQDE DG.V	64
<i>O. mykiss</i>	MVQVLWTSLVLL..ITFRESVYQEVNCSYRFD..NGDCGDL LG.EVTIEDCCLNPHYGIYADG.K	60
<i>H. sapiens</i>	MITEGAQAPRLLLP LLLLLLTPATGSDPVLCTQYEESSGKCKGLLGGGVSVEDCCINTAFAYQKRSGGL	71
<i>M. musculus</i>	.MPAEMQAPQWLL...LLLVILPATGSDPVLCTQYEESSGKCKGLLGRDIRVEDCCLNAAAFQEH DGGL	67
<i>G. gallus</i>	MCWHHVTPVFG..	10
TSR1		
<i>M. am</i>	CMYCGPAAWTEWSSWGECSVSCTEGVQRRRSCYIGITCLDSANLGT VQ....TKPCVKKQCCPVEGGWS	128
<i>D. rerio</i>	CRSCGHAAWSEWSSWSQCSVSCTEGVQRRRF CYGNCSDEDLGTIQ....TKPCVKKDCCPEDGGWS	128
<i>C. carpio</i>	CRSCGRAAWSEWTPWGECSVSCTEGVQRRRSCHGIGNCLDPDNLGKVQ....TKPCVKKACCPVEGGWS	128
<i>I. punctatus</i>	CKSCRHASWTTWSPWLSVSCTEGVQRRRACYGIGECPPDHL LG EI Q....TDPCEDISCCPENGAW S	130
<i>O. mykiss</i>	CKFCGPASWSEWTTWGRCSVPCKEGYSQRRRECQGGKCLTSSLEELQKLTLETKVCI EPDCCPEHGCWS	131
<i>H. sapiens</i>	CQPCRSFRWSLWSTWAPCSVTCSEGSQ LRYRRCVGNWQCSGKVAPGTL..EWQLQACEDQCCPEMGGWS	140
<i>M. musculus</i>	CQACRSFQWSAWSLWGPCSVTCSEGSQ LRRRCVGRGGQCSENVAPGTL..EWQLQACEDQCCPEMGGWS	136
<i>G. gallus</i>	CWGFPAAWSRCSVTCGEGTELRGRSRAEGGGASR.....EWELRACH.MACCPVFGSWS	64
TSR2		
<i>M. am</i>	EWGGWQPCSVTCEKGIKKRQRTCTNFVPPQCGGSCRG.EQEEIASCIT.EVICPTHGGWSSWGSWGPCQSTC	197
<i>D. rerio</i>	KWGNWQPCSVTCENGQKKRQACSNAPKCGGSCSG.EPQEI EPCSA.DTVCP THGGWSTWGNWGRCPVTC	197
<i>C. carpio</i>	EWGNWQLCSVTCGDGVRKRRRTCESEFFQCGGSCSG.AEEEITPCST.EIICPTHGGWSSWGSWGPCVSC	197
<i>I. punctatus</i>	EWSPWQPCSVTCEKGLKKRRTCTSNPPKCGGVCHG.NSEETENCDT.GIVCPTHGGWSAWGNWGAAGTC	199
<i>O. mykiss</i>	KWGEWQPCSATCEKGMRRMRTCTEPPPRCGSSSEG.PSEEEHCVV.DRVCP THGGWSNWSWGPCSGTC	200
<i>H. sapiens</i>	GWGPWEPCSVTCSKGTTRRRACNHAPKCGGHCPG.QAQESEACDT.QQVCP THGAWATWGPWTPCSASC	209
<i>M. musculus</i>	EWGPWGPCSVTCSKGTQIRQVCDNAPKCGGHCPG.EAQSQACDT.QKTCPTHGAWASWGPWSPCSGSC	205
<i>G. gallus</i>	PWGPWGGCSVTCGAGRESRRRGCDAPFPQCGGNCGGGPEKEERICNGGSPICPVGGP WGPWSQWEPGATC	135
TSR3		
<i>M. am</i>	IDEGHNTQKELRKRTCTNPTTAPPGRYCEGFDTDRPCSGLPFCFIDGNWGPWSGSTPFCSVTCGLGRQT	268
<i>D. rerio</i>	IEEGRNTQKEVVRTCTNPSPTAPPGRFCGSEKDRPCSGLPFCFIDGSWGSWSGSACSVCVTCGVGRQM	268
<i>C. carpio</i>	FYEGHSPQKELRKRTCTNPPSTVPRGNLC EGSDDTSRPCSGLPFCFVDGNWGAAGHTPFCSVTCGVGQQT	268
<i>I. punctatus</i>	EVEGISPPQQERYRTCTNPPSVVPRGSDCPGSSSTDLSYCSGLPFCFVNGNWSWGAWEASDCSVTCGVGLQT	270
<i>O. mykiss</i>	AREDLPRPTQRRRCSCSNPPSPVPPGDECPGLGSETRTCDLPSCFVNGNWSWGPWGPSSCSVTCGVGVNE	271
<i>H. sapiens</i>	HGGPHE.PKETRSRKCSAEPSPQKPPGKPCPGLAYEQRRCTGLPPCFVAGGWGPWGPVSPVCTGLGQTM	279
<i>M. musculus</i>	LGGAQE.PKETRSRSCSAPAPSHQPPGKPCSGPAYEHKACSLPPCFVAGGWGPWSPLSPCSVTCGLGQTL	275
<i>G. gallus</i>	RGAG...SSRSRKRCDSAPASVDPPGKPCGEGKTEKGDPCGLPPCFVDGAWGPWAE LTPCPVRCGIGAVT	203
TSR4		
<i>M. am</i>	QRRVCNSPSPKHGGRECRGEEQKTGVCTDIDCVHGMWSEWSEWGRCKKPSTRDITCKNREGNRRREREC	339
<i>D. rerio</i>	QSRICDSPSPKHGGKPCCHGIEQKSLGCLRTAKCPIHGWTEWSEWSICKSPSTRKITQRTRETRKRLRDC	339
<i>C. carpio</i>	QRRICDSPKPAHGGKQCRGEEQQTGICVIPDNCLPLNGI WTEWGEWSACKPPSTRNIRCRYREGKRRERDC	339
<i>I. punctatus</i>	QHRKCDNPAPKYGGQCGPGENTKKLLCTIPKNC PANGWSEWSAWYSCISPNQRIQITCKNRMGRRRLRDC	341
<i>O. mykiss</i>	MLRQCDNPATKHGGLPSCSGSNKGTQICNTKNHCFVDGQWSQNGTWEECKS.NRGNICKRKIGGQRRQRWC	341
<i>H. sapiens</i>	EQRTCNHPVQHHGPPFCAGDATRTHICNTAVPCFVDGEWDSWGEWSPCIRRNMKSSISQEI PGQSRGRTC	350
<i>M. musculus</i>	EQRTCDHPAPRHGGPFPCAGDATRNQMCNKAVPCFVNGWEAWGKWSDCSRLRMS.INCEGTPGQQSRSRSC	345
<i>G. gallus</i>	LRRSCDSPAPQHGGRGCHGNATRAVCGPMGACFAVPHWGPWSSWTHCERRSWGDLRCKEVVGQQKRTREC	274
TSR5		
<i>M. am</i>	VGRKHGEGNFT..GDI..VEHGNCYDIDGERME.....GVLSEWSEWYCKEACGPGSAQTRERKCVDP	399
<i>D. rerio</i>	VGTEHEGKLD..GEI..VEHGSCFDIDKCDME.....ALLSEWSEWSYCKPDCGQDSKQTRSRRKCVDP	399
<i>C. carpio</i>	VDRKYNGDS..GEI..VQHGSCYDIEDCELN.....GVLSEWLSWYCKPDCGPNVQIREMKCVAD	399
<i>I. punctatus</i>	LGREYGGAFCD..GES..VEFERCYDIEGCKAGPDQQIPRALWSEWSKWSYCKPDCGVSSRQTRKRVCIPD	408
<i>O. mykiss</i>	EHTGFGGLTCE..GKI..TDYRPFCDIKSCYFD.....SKLSEWSEWSHCEPPCGEGVKRTRERKCI PN	401
<i>H. sapiens</i>	RGRKFDGHR..AGQQ..QDIRHCYSIQHCPK.....GSWSEWSTWGLCMPPCGPNPTRARQRLCTPL	410
<i>M. musculus</i>	GGRKFNKPC..AGKL..QDIRHCYNINHCEIMK.....GSWSQWSTWSLCTPPCSNPNATVRQRLCTPL	405
<i>G. gallus</i>	VGRDVGSEPCPISGGLGTIQLRACYNVHHCPLS.....GSWTEWQWGLCHPEPCGADPKRSRFRDCRPI	338
TSR6		
<i>M. am</i>	ISDYRS.....KDRSMFSGVPKVNCKDLKTETERRPCNNVPECKDEDD.....	442
<i>D. rerio</i>	ISEYQS.....DDYSLFYGKPVINCEKVKDETETRPCKNVPC.....	437
<i>C. carpio</i>	LSSYNS.....QDPAIFAGNPRVKCDGLKKQTESRPCKNVPCMDK.....	440
<i>I. punctatus</i>	ISKYSE.....PNMELFAGNPDINCPSLAETKETRPCLNLPPC.....	446
<i>O. mykiss</i>	LSGYPEAIGYPIKAKAYFEGEPKVNCTLLKDTKETLACIKVPLCDT.....	447
<i>H. sapiens</i>	LPKYPP.....TVSMVEGQGEKNVTFWGRPLPRCEELQGGKLVVEEKRPCLHVPACKDPEEEEE	468
<i>M. musculus</i>	LPKYPP.....TVSMVEGQGEKNVTFWGTPRPLCEALQGGKLVVEEKRS.....	450
<i>G. gallus</i>	NPNYP.....YVGALWGLWGSMSGLWGYMGDF.....	365

图 2-3 团头鲂与其它物种 Pf 氨基酸多序列比对

Fig. 2-3 Amino acid sequence alignment of Pf from blunt snout bream and other species

相同和相似的氨基酸分别用灰色和浅灰色阴影显示。TSR 结构域用红色框标出。

Identical and similar residues are shaded in gray and light gray, respectively. The TSR domain is marked with a red box.

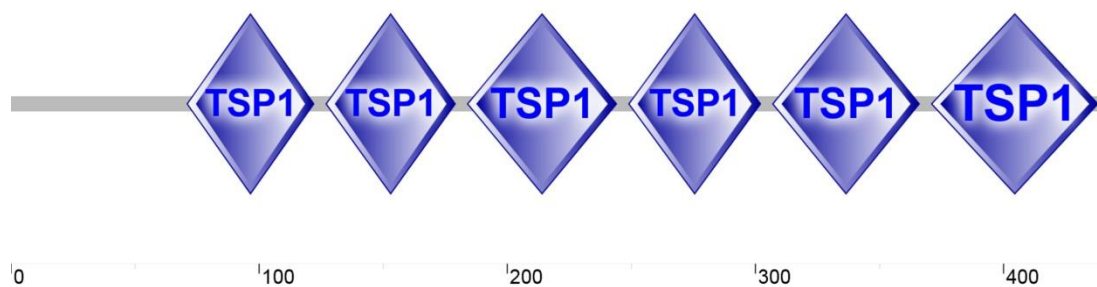


图 2-4 团头鲂 *MamPf* 基因的结构域特征

Fig. 2-4 The domain characteristics of the *MamPf* gene.

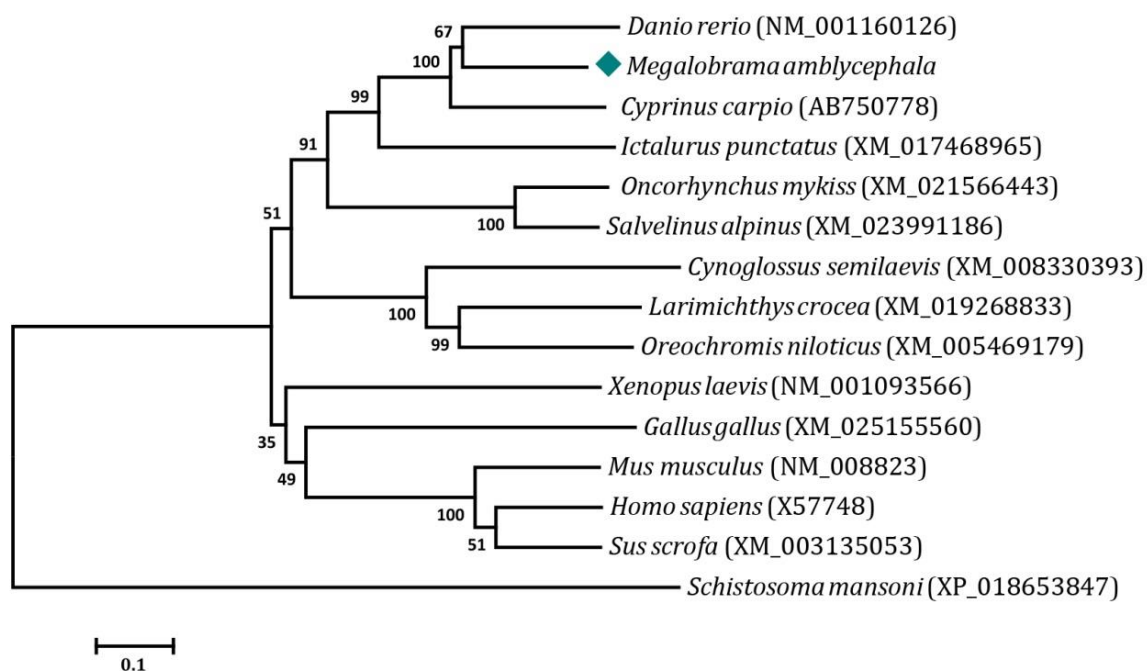


图 2-5 *Pf* 编码氨基酸序列的系统进化树（各物种氨基酸序列登录号在各物种之后）

Fig. 2-5 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by *Pf*. (Accession numbers are shown next to each species).

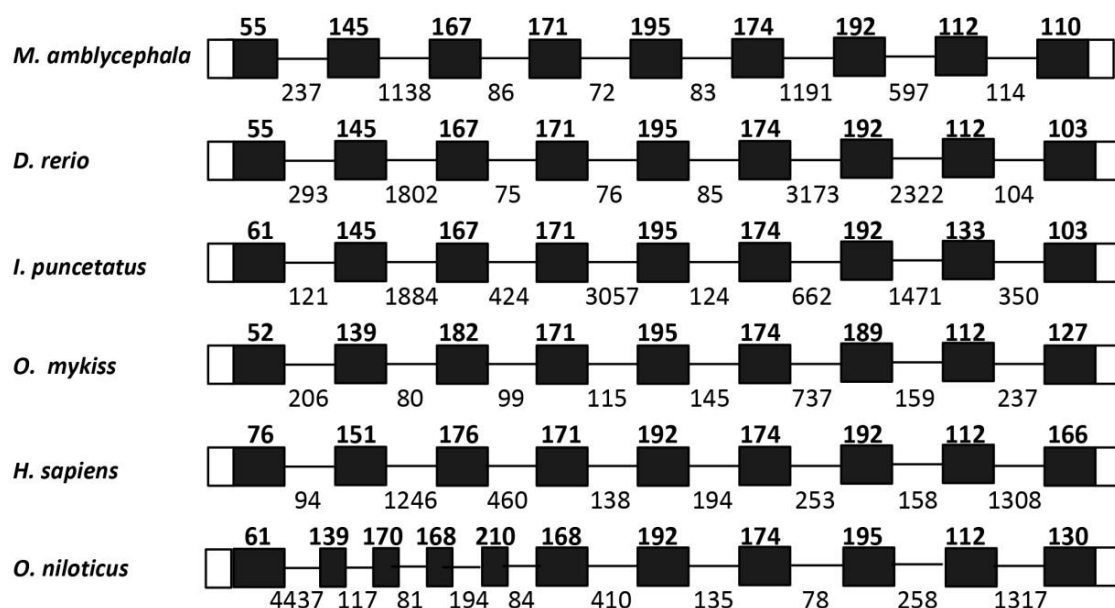


图 2-6 不同物种 *Pf* 基因结构和内含子/外显子大小的比较

粗体的数字和黑框表示外显子，正常数字和线条表示内含子，5'-和 3'-非编码区用空白框表示。基因登录号如下：斑马鱼（NC_007119），斑点叉尾鲷（NC_030420），虹鳟（NC_035092），人（AH005458），罗非鱼（NC_031969）。

Fig. 2-6 Comparison of the *Pf* gene organization and intron/exon sizes between different species
Numbers in bold and black boxes indicate exons, normal number and lines joining the boxes indicate introns, and the 5'- and 3'- untranslated regions are denoted with empty boxes. The Accession numbers of the *Pf* is as follow: *D. rerio*(NC_007119), *I. punctatus*(NC_030420), *O. mykiss* (NC_035092), *H. sapiens* (AH005458), *O. niloticus* (NC_031969).

2.2.2 团头鲂 *MamIf* 基因序列分析

从团头鲂转录组中获取 *MamIf* cDNA 部分序列，并验证其 ORF 序列。*MamIf* 开放阅读框（ORF）全长 2007 bp，编码 668 个氨基酸（图 2-7），DNASTAR 预测其分子量为 74.6kDa，理论等电点为 7.32。利用 ProtParam 在线分析 *MamIf* 氨基酸序列，显示其脂肪系数为 62.77，平均疏水系数为-0.574，不稳定指数为 45.57，被归类为不稳定蛋白。SignalP 4.1 在线分析表明第 1 到 20 个氨基酸为其信号肽，NetNGlyc 1.0 Server 预测显示其具有 6 个 N-糖基化位点，分别位于 aa 112、aa 240、aa 377、aa 523、aa 550 和 aa 574 位点。Phyre2 预测 *MamIf* 二级结构包括 12 个 α

螺旋（8%）、39 个 β 转角（29%）和 1 个 TM 螺旋（2%），MamIf 三级结构如图所示（附图 2-3）。

ClustalW 多序列比对分析（图 2-8）显示，团头鲂和其他物种的 If 都是由 1 个 FIMAC 结构域、1 个 SRCR 结构域、2 个 LDLa 结构域和一个丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域组成（图 2-9），而且不同物种，每个结构域中有相应的保守序列。

利用 MEGA 6.06 软件中的 NJ 分析法构建 If 的系统进化树，结果如图 2-10 所示，鱼类 If 聚为一支，哺乳动物单独聚为另一支。同时，团头鲂与鲤的 If 在进化上亲缘关系最近，其次是斑马鱼和斑点叉尾鮰。

```

ATGAGGGTCTCTGTTGTTTTATCTTCATGTGTCTCTCTCCAGACCGCCACTCTGGCCGACACACACCAAGAACAATAAACAGCAA 90
M R V L V V F I F M C L L F Q T A T L A D T H Q E Q N K Q Q 30
GATCGGTTTCCCTCAATACCAGAGCAAAATCCAGGTGCAGTTTGGTGCAAAATTCGAAGATCCATTTCAAAACACACAGGA 180
D R F P S I P E Q N P G A V L V Q N S N S K D P F Q K H T G 60
AAAAATACGGAGGAACAACTGGTGCACAAAGAGTCACATGACGTACCATTAAACACACCAAAACCCAAAACCTGACGAAAAACAGTA 270
K N T E E Q T G A K Q E S H D V P L T T P K P K T D E K T V 90
GCAACCAAACTCAAAGGAATCTTATGGTGATTCTTGGTCATCCCCAATGTCCGCATCAGAATTACACACGGCTGTCTTGCTCGAAA 360
A T K N S K E S Y G D S L V I P Q C R H Q N Y T R L S C S K 120
GTGTTCTGTCCACCATGGAGGCGATGTATCGCGGGACAGTGCAGCTGTAAGATGCCGTACAAGTGTCCACGGCAGGATTACCGTGCATGT 450
V F C P P W R R C I A G Q C A C K M P Y K C P R Q D Y R A C 150
ACGCTGGACGGACCTGAGTATTACTCCATGTGTCTCAGGCCAAAGCCATCTCTGCAGATCCAACAAGCCTGTGTTCTCTCACATCAGCACA 540
T L D G P E Y Y S M C Q A K A I S C R S N K P V F S H I S T 180
GCCTGCAGAGCGGAAGAGAAGGTGGAAGCACTCTGAAGGACGTGGCTCTCAAAAGTGGTCATGATAACACATGGTTGGGAAAAATG 630
A C R A E E K V E A T L K D A G S Q K V V M I N T W L G K M 210
TTTGTATGTGGCAATGACTGGAATATGGCTGCAGCTAATGTTGTTGTGCGAAACCTCTGAATGTGCGCCAGAGGAGCAGCAGCAGTGAAT 720
F V C G N D W N M A A A N V V C R N P L N V A R G A A A V N 240
AAAACCATGTACAACACTCTTGACGAAGATACTGAATGGCCAACGGAGTGTATGAGTGTTCGCTGCACGGGATCTGAGCTCTCATTGGCA 810
K T M Y N T L D E D T E W P T E C M S V R C T G S E L S L A 270
GAGTGACCATCTATAATCCCCAGCAATCACAATAAACACTGTGGCCATGGCAAAGTGTACAAGGAACCCAAAGGCAATGTAAGAAG 900
E C T I Y N P Q P I T I N T V A M A K C Y K E P K G E C K K 300
TTCCTCTGTGTGAACGGGAAGTGTAAAGCAAAGGAAAACCTCTGCAATGGTGTGATGACTGTGGAGACAACAGTGACGAGATGTGCTGC 990
F L C V N G K C L S K G K L C N G V D D C G D N S D E M C C 330
CAAAGCTGTAATAAGAAAGTGAAGCGTCCACTGTAAGTCGGACGTCTGTATTCCCCGTCACGCCGTCGAGATGGAATCAGGGACTGT 1080
Q S C N K E S E A F H C K S D V C I P R H A V R D G I R D C 360
CTGGGAGGAGAAGATGAACTGGATGAAACGATCAAACCATAGAGAAAATCAGACAGACTTGTCTTCTGATCCATGTCTGAGATCAGA 1170
L G G E D E L D E N D K P L E K N Q T D L F S D P M S E I R 390
AGAATACGTTTCATCTGCCGAGAGCCAGCTTGAGTGTGGCATTCCCAATATGGAGTATGAGTACAACAAAAGGACGATACGACTTCCCAT 1260
R I R S S A E S Q L E C G I P N M E Y E Y K Q K D D T T S H 420
TCACGCAGGAAAGCTTTAGTAGGAGGAGAAGAGGCCCTTACCGACTCAGATACAGTGGCAGGTGGCCATACAGGACGAAGGCTCAATCCAC 1350
S R R K R L V G G E E A L P T Q I Q W Q V A I Q D E G S I H 450
Cleavage site
TGCGGAGGGCGTATCTGGGTGGCTGTGGGTTTTGACCGCCGCCACTGCGTCAGGCCCAAACCAAAGTCTACCGGATCAAGTTCTCC 1440
C G G A Y L G G C W V L T A A H C V R P K P K S Y R I K F S 480
CTCTGGAAGAAGCATCGCAAGCAGTCGACGACAGACAGCATCCCAAGTGAAGAATCATCATCCATCATGAATATGACCCACAAACCTAC 1530
L W K K H R K Q S T T D S I P V K N I I I H H E Y D P Q T Y 510
GCCAATGACATCGCTTTGGTGAGCTAGAGGAGCTGAATCTTTAGACAAGTGCATGCAGGACAACCCGCTGTCCGATCCGCTCTGCGTG 1620
A N D I A L V Q L E E L N L S D K C M Q D N P A V R S V C V 540
CCCTGGTCCACCAACAGTTCAGGCCAACGACACCTGCACCATCTCAGGCTGGGGCCGCGACAGAGCGGGATGTACAGGCAACTCTA 1710
P W S T Q Q F Q P N D T C T I S G W G R D R A G M S Q A T L 570
AAATGGGCAAAATGTGACGATTATTGGTGACTGCAAGAATTATTACAAGGACCGTTTCTCCCTGGAATGGAGTGTGACGGTGACCTGGAG 1800
K W A N V T I I G D C K N Y Y K D R F L P G M E C A G D L E 600
GGGAAGGTGGATTCTGTCTAGGGTACTCCGGAGGGCCGCTGGTGTGTAAGACGCGTCTGGCGTGTCTGTATGTGGGGAATAGTGAGC 1890
G K V D S C Q G D S G G P L V C K D A S G V S Y V W G I V S 630
TGGGGTGATAAATGTGGCCAAGCAATTATCTGGCGTCTACACTAAAGTAGCACATTATTTGACTGGATCCGCTTCAACACAGGCTGG 1980
W G D K C G Q A N Y P G V Y T K V A H Y F D W I R F N T G W 660
GCGGCTGTAAACCAATATAACAGTAA 2007
A A V T K Y N Q * 668

```

图 2-7 团头鲂 *MamIf* 基因 ORF 序列及编码的氨基酸序列Fig.2-7 The ORF sequence and encoded amino acids of *MamIf* gene

起始密码子和终止密码子用黑体表示，蓝色填充区域为信号肽，向右箭头和向左箭头之间表示结构域。

Star and stop codons are shown in bold, the signal peptide sequence is shaded in blue, between the right arrow and the left arrow is a domain.

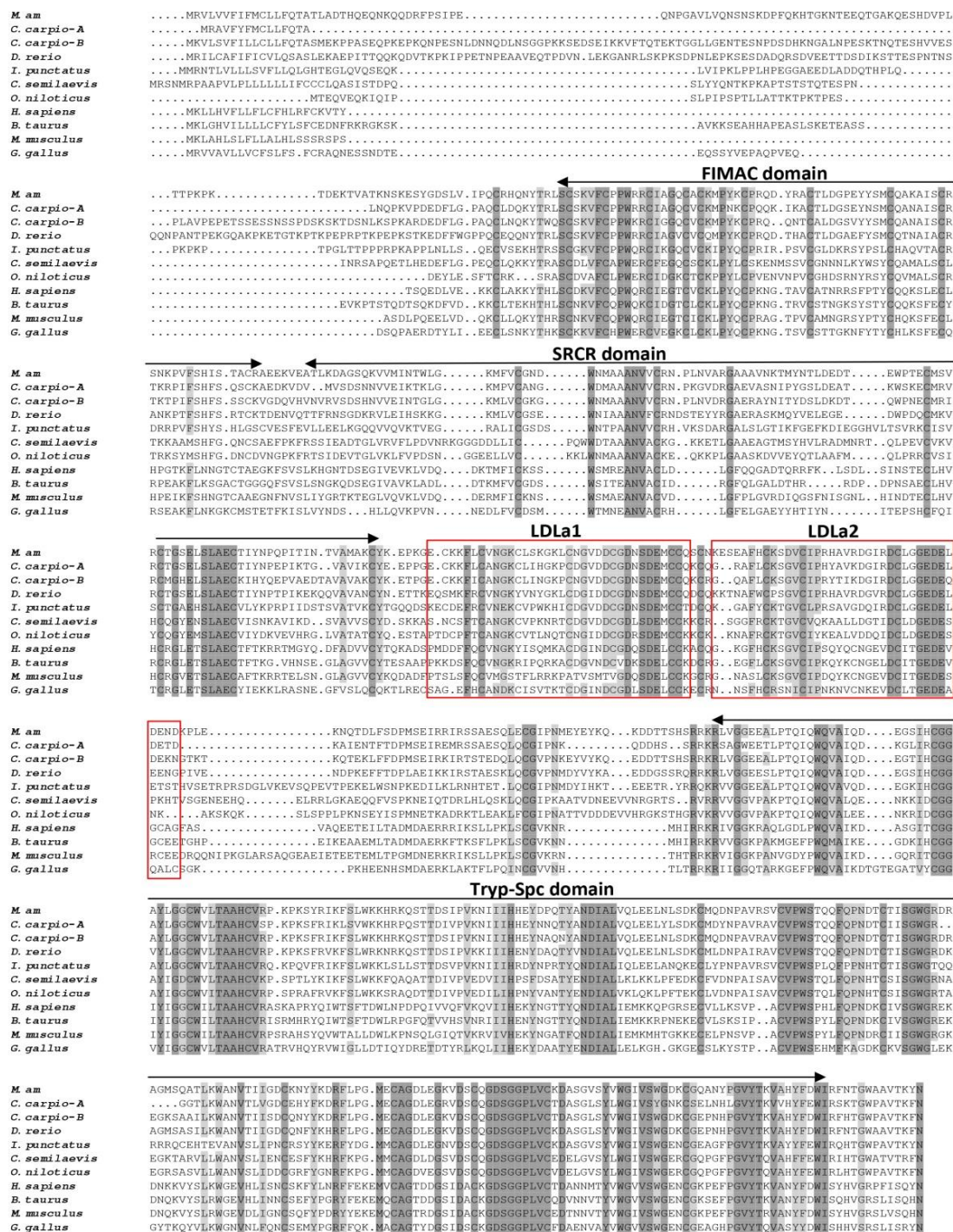
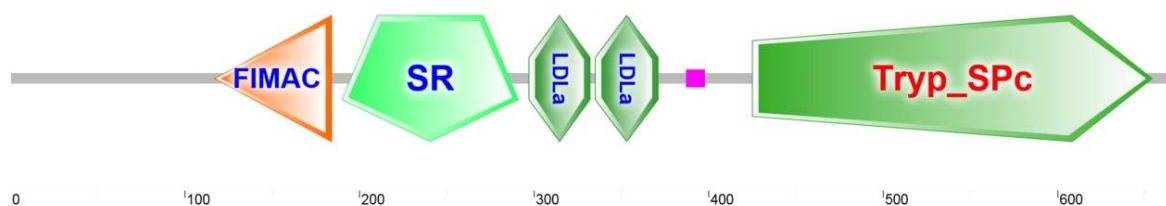
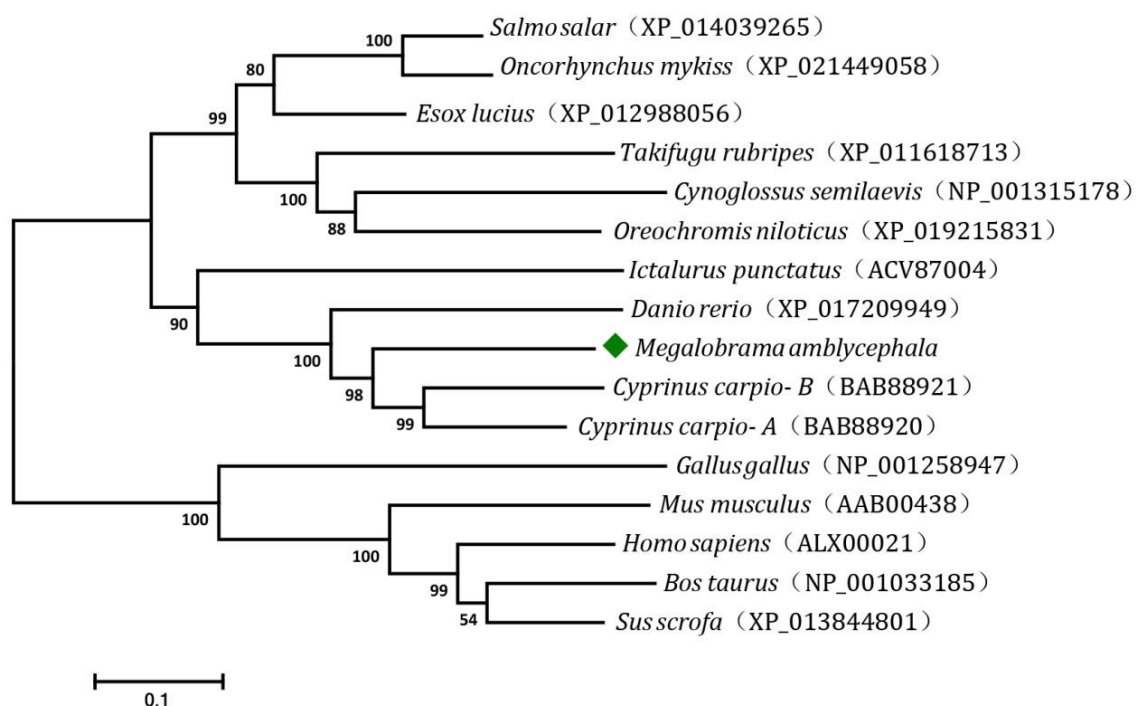


图 2-8 团头鲂与其它物种 If 氨基酸多序列比对

Fig. 2-8 Amino acid sequence alignment of If from chub snout bream and other species

相同和相似的氨基酸分别用灰色和浅灰色阴影显示。FIMAC 结构域、SRCR 结构域和 Tryp-Spc 结构域用双向箭头表示，两个 LDLa 结构域用红色框表示。

Identical and similar residues are shaded in gray and light gray, respectively. The FIMAC domain, the SRCR domain, and the Tryp-Spc domain are represented by double-headed arrows, and the two LDLa domains are represented by red box.

图 2-9 团头鲂 *MamIf* 基因的结构域特征Fig. 2-9 The domain characteristics of the *MamIf* gene.图 2-10 *If* 编码氨基酸序列的系统进化树 (各物种氨基酸序列登录号在各物种之后)Fig. 2-10 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by *If* (Accession numbers are shown next to each species)

2.2.3 团头鲂 *MamHf* 基因序列分析

从团头鲂转录组中获取 *MamHf* cDNA 部分序列, 并验证其 ORF 序列。*MamHf* 开放阅读框 (ORF) 全长 2589 bp, 编码 862 个氨基酸 (图 2-11), DNASTAR 预测

其分子量为 97.5kDa, 理论等电点为 5.95。利用 ProtParam 在线分析 MamHf 氨基酸序列, 显示其脂肪系数为 58.65, 平均疏水系数为-0.550, 不稳定指系数为 35.43, 被归类为稳定蛋白。SignalP 4.1 在线分析表明第 1 到 22 个氨基酸为其信号肽, NetNGlyc 1.0 Server 预测显示其具有 2 个 N-糖基化位点, 分别位于 aa 212 和 aa 684 位点。Phyr2 预测 MamHf 二级结构包括 1 个 α 螺旋(1%)、83 个 β 转角(39%), MamHf 三级结构如图所示 (附图 2-4)。

SMART 软件结构域分析 (图 2-12) 显示, 团头鲂 MamHf 基因含有 13 个重复的 SCRs 结构域, 对其它物种 Hf 氨基酸序列进行分析, 发现不同物种具有的 SCR 结构域的数量不同, 斑马鱼含有 14 个重复的 SCRs 结构域, 而大黄鱼只有 5 个重复的 SCRs 结构域, 人类拥有 20 个重复的 SCRs 结构域之多 (表 2-2)。

利用 MEGA 6.06 软件中的 NJ 分析法构建 Hf 的系统进化树, 结果如图 2-13 所示, 鱼类 Hf 聚为一支, 哺乳动物单独聚为另一支, 鱼类和哺乳动物有共同的进化祖先。同时, 团头鲂和斑马鱼聚为一支, 而其它鱼类聚为另一支。通过比较发现, 团头鲂与斑马鱼的 Hf 在进化上亲缘关系最近。

表 2-2 团头鲂与其他物种 *Hf* 基因氨基酸序列结构特征
Table 2-2 Amino acid sequence structure characteristics of *Hf* gene in blunt snout bream

物种 Species	登录号 Accession number	氨基酸数 Amino acids	SCR 结构域 数目 Number of SCRs	N-糖基化位点数 number of N-glycosylation sites	Predicted N-糖基化位点位置 Predicted positions of N-glycosylation sites
<i>M. amblycephala</i>		862	13	2	212,684
<i>Danio rerio</i>	ADK32771	901	14	0	-
<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_025755201	938	15	4	566,576,617,734
<i>Larimichthys crocea</i>	AKQ99120	443	5	1	238
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117882	827	11	3	184,259,626
<i>Salvelinus alpinus</i>	XP_023859450	401	5	0	-
<i>Takifugu rubripes</i>	XP_011613452	516	7	0	-
<i>Esox lucius</i>	XP_010865438	406	5	0	-
<i>Xenopus laevis</i>	NP_001079684	502	7	1	93
<i>Gallus gallus</i>	XP_025008854	1245	18	7	667,770,824,865,924,1040,1167
<i>Sus scrofa</i>	NP_999446	1234	20	4	527,719,775,1098
<i>Bos taurus</i>	NP_001029108	1236	19	2	775,1100
<i>Mus musculus</i>	NP_034018	1252	20	8	93,694,739,791,819,1048,1079,1243
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_569093	1235	20	6	75,522,773,801,964,1065
<i>Homo sapiens</i>	AA142700	1231	20	9	217,529,718,802,822,882,911,1029,1095

ATGAGAGTTCAGTAAACTCCTCGGCTTCGTCCTTTGGTTGTTTTCTTTAATGTGGTCAATGTCAAGACTGTCTTCGAGAGGATATC 90
M R V P V K L L G F V F W L F F F N C G Q C Q D C L R E D I 30

AAATATGAAACACAGAACCAGCTGCGAAAGCTTCATACAGTGATGGTGAAACAGTGAACTGTACTGCATGACAGGCTTTACTGGCGTG 180
K Y E N T E P A A K A S Y S D G E T V K L Y C M T G F T G V 60

TATAGATTAAAGTGTGAAGAGGGAACATGGAACACAATCGTTGAGCGAAAATGTGCAAGAAAAAATGCAGTCACCCAGGAGACACCA 270
Y R L K C E E G T W N T I V E R K C A K K K C S H P G D T P 90

AATGGTGATTTTAACTTACAGCAGGATCAGAGTTTGATTTTGGAGCAACAGTGTGTACACTTGCAAGAAAGGATTTGAAATGACAAGC 360
N G D F K L T A G S E F D F G A T V L Y T C K K G F E M T S 120

GAAATCAATCATCGTACCTGCAGAGCTCAAGGATGGGATAATACTGTCCCTGTCTGTGAGGCTGTGAAATGTCCAGCCATTGCGACAAAT 450
E I N H R T C R A Q G W D N T V P V C E A V K C P A I R T N 150

GCGTTTGTGACTGCATCAGGCAACACAGAAGAGGGAAGTTATGGTGATGTATCCACTTTGAGTGTGTATCTGTGACAAAAAGATAGAC 540
A F V T A S G N T E E G S Y G D V I H F E C V S A D K K I D 180

GGAAGTAGTGACATTCACTGCACAGAGACGGGCGACTGGAGTGACTCTGTTCCAACTGCAAAGAGATAACATGCACAGCAGCTGTTATA 630
G S S D I H C T E T G D W S D S V P T C K E I T C T A P V I 210

TCAAATGGTTCTGTTGTTGAGCCAGTGCAAGAATACCAGAGAGATGCCATATTAAATACAGATGTTACCAGGGTTCAAGCCTAGAGAG 720
S N G S V V E P V Q E Y Q R D A I L K Y R C S P G F K P R E 240

GGAATCCCCAGATGTGCTAAATTGGTTGGACTCTGAACCCAGAATGTGATGAAGTAATTTGTGAGCTTAAGTCAATAAGATTGGAGTA 810
G I P R C A K F G W T L N P E O D E V T C E L K S I R F G V 270

AAGAAGATCAACCCAGAGGAAAAAATATTTCAGAGGTGGAGAAAGTGTGGAGATCACCTGCGCTGAAAGATACTGGATCTTTCTGTACA 900
K K I N P E G K T I F R G G E S V E I T C A E R Y W I F R T 300

AAAGAAACCATCAGATCATTTACATGTCAAATAACGGGGAGTGGGATCATGAGCCTGTTTGTGAGGTTATTAGATGTGAAGTCCACGT 990
K E T I R S F T C Q N N G E W D H E P V C E V I R C E V P R 330

GACCAGTATGTGTATAGGCCATACTCTTACTTCAGGGGAGATATGACATTGGGAGCAAAAAATATCTTACTATTGCTTTGATGGGGTTGAC 1080
D Q Y V Y R P Y S Y F R G D M T L G A K I S Y Y C F D G V D 360

TATGAGAAAGCAGAGGCCACATGCACACAAGATGGATGGACTCCAAAACCACTGTGTGCTGAAAAATGTGTGCAGCACCAATAATCCCA 1170
Y E K A E A T C T Q D G W T P K P L C A E K M C A A P I I P 390

AATGCAGAGATTTTGGGAGATCAGAGACAAAAAATACTCCAAGAATTCATGGATACAATCAATGTCTTCTCGGTTTGAACCAGAGCAG 1260
N A E I L G D Q R Q K Y S K N S W I Q Y Q C L P G F E P E Q 420

CCTAAATATATCACCTGTAACCTCCCGACTGAATGGACAGGCATACTGCAATGCACTGCAAAACAAAAATGTGCCCTGCTCTATCTGTG 1350
P K Y I T C N S R T E W T G I L Q C T A K Q K L C P A L S V 450

AAAAATGGGTTATACACACCCCTCTCCTCAATGAGGAAGAAATCTTTTACTCTCGCACACGGGTATAAACCATTCCGTGGGAAGTGG 1440
K N G F I H T L S S N E E E I F Y S C D T G Y K P F R G N W 480

TGGGATTCACTGACATGCAGCAGAGGCTCTTGGTCTGAAGAACCTCAGTGCATCCGGGAGGAAGAGTGTGGTGCTTTTCCAGTGTTCAC 1530
W D S V T C S R G S W S E E P Q O I R E E E C G A F P S V H 510

CATGGAAGAACTAAAGCAACAAACAGATCTTCAATGATGGAGACACAACAGCACTTGAATGTGATCCAGGGTTCAAACCAACTCAACGC 1620
H G K L K Q T K Q I F N D G D T T A L E C D P G F K P T Q R 540

TTCATAAATGTGTGATGATGATGGAGACACCAGTTTGTGAGGTGGATGTACATTGTGACAGTCTCCAAAGGTGGAATATGCATTC 1710
F I K C V S G T W E T P V C E V D V H C D S P P K V E N A F 570

ATAACATCTAAACCTAAAGAATTTTATGGATATGGATCCAGTGTAACATACGCATGTGCAAGCTCATTCTTAATGAATGGGAAAAGCACA 1800
I T S K P K E F Y G Y G S S V T Y A C R S S F L M N G K S T 600

GTTTCTGCCGAGTGAAGTGGAAAGAAACACCAACATGTAAAGAGGTATTGTGCTGTAAACACAGCAGTTGAAGACTTAAAAATG 1890
V F C R S G T W K E T P T C K E V L C P V N T A V E D L K M 630

GAGCCTGATATTGAGGGTCCCATCAAACCTGGATACAGGTTAAATTTTATGACAGTAGAGAAGGGCTGAAATTTAAAGGACAGAGAGAA 1980
E P D I E G P I K P G Y R L K F S C S R E G L K L K G Q R E 660

ATCACCTGTCAGTCAAATGGAGAATGGAGCAGCCCTTTTCTACATGTGAAGAGGTAATGTGTGTTGCAACCTGACAGTGAACATGAGA 2070
I T C Q S N G E W S S P F P T C E E V M C V A N L T V N M R 690



图 2-11 团头鲂 *MamHf* 基因 ORF 序列及编码的氨基酸序列

Fig.2-11 The ORF sequence and encoded amino acids of *MamHf* gene

起始密码子和终止密码子用黑体表示，蓝色填充区域为信号肽，向右箭头和向左箭头之间表示结构域。

Star and stop codons are shown in bold, the signal peptide sequence is shaded in blue, between the right arrow and the left arrow is a domain.

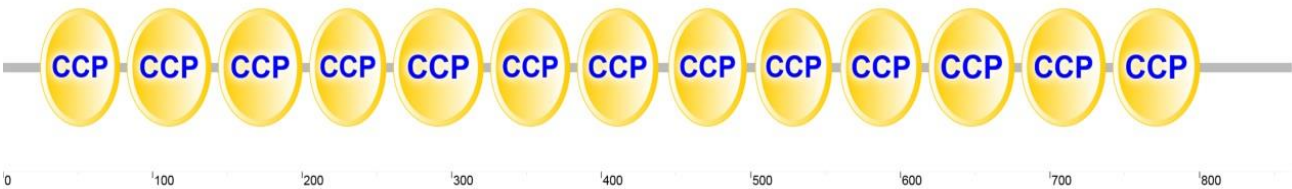


图 2-12 团头鲂 *MamHf* 基因的结构域特征

Fig. 2-12The domain characteristics of the *MamHf* gene.

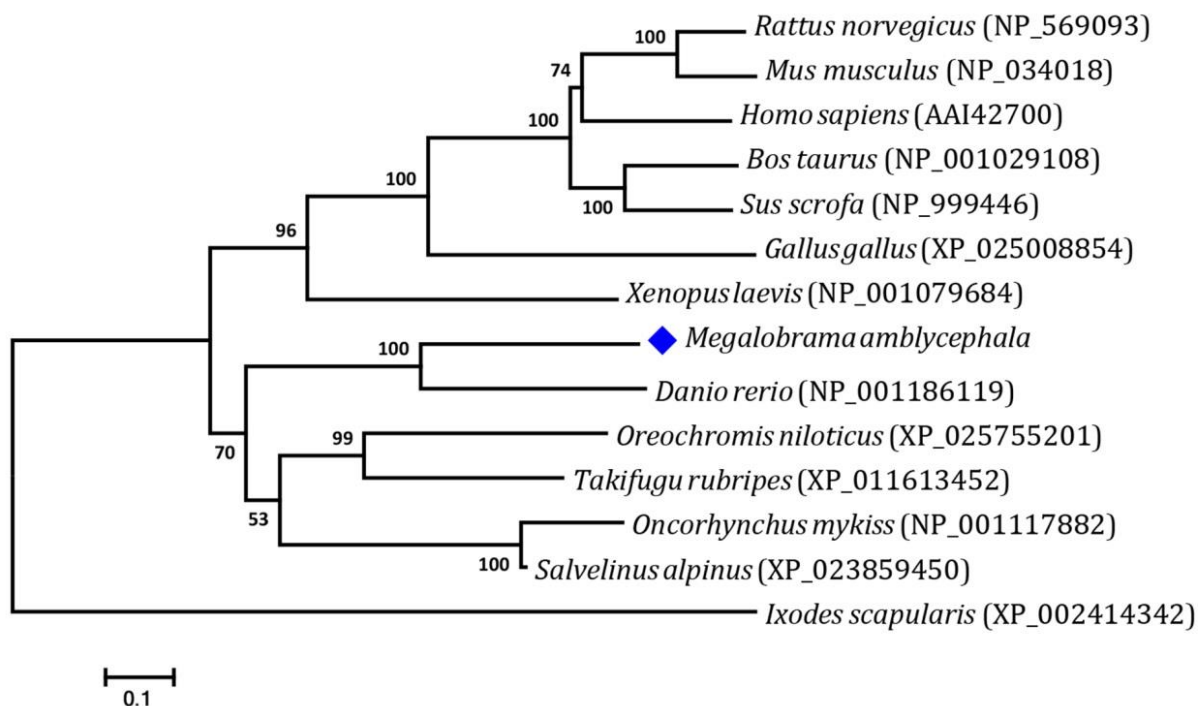


图 2-13 *Hf* 编码氨基酸序列的系统进化树（各物种氨基酸序列登录号在各物种之后）

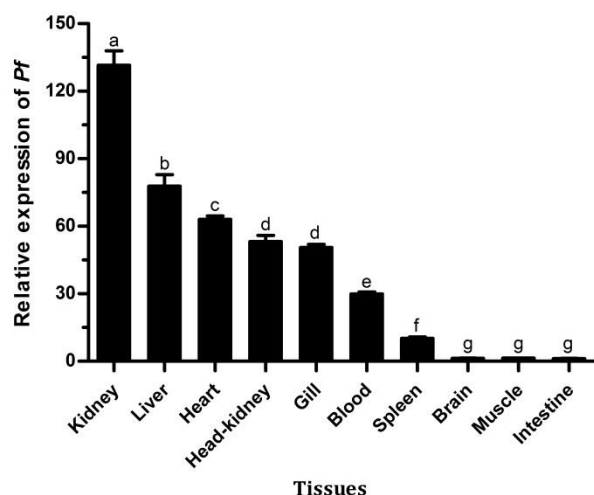
Fig. 2-13 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by *Hf* (Accession numbers are shown next to each species)

2.3 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 的表达

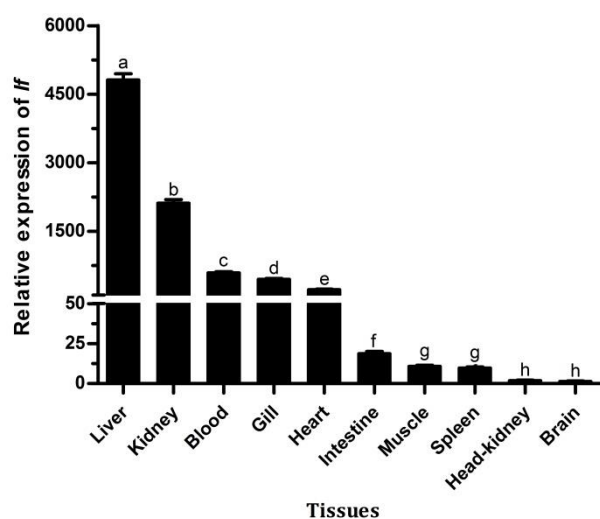
2.3.1 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 组织特异性表达

实时荧光定量 PCR 结果显示(图 2-14),克隆得到的 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因在团头鲂各组织中均有表达,但是在不同组织中的表达水平有差异。*MamPf* 基因在肾脏中表达量最高,在肝脏、心脏、头肾和鳃中表达量高,在肠中表达量最低 (A); *MamIf* 基因在肝脏中表达量最高,在肾脏、血液、鳃和心脏中表达量高,在脑中表达量最低 (B); *MamHf* 基因在肝脏中表达量最高,在肾脏、血液、头肾和心脏中表达量高,在肌肉中表达量最低 (C)。

A.



B.



C.

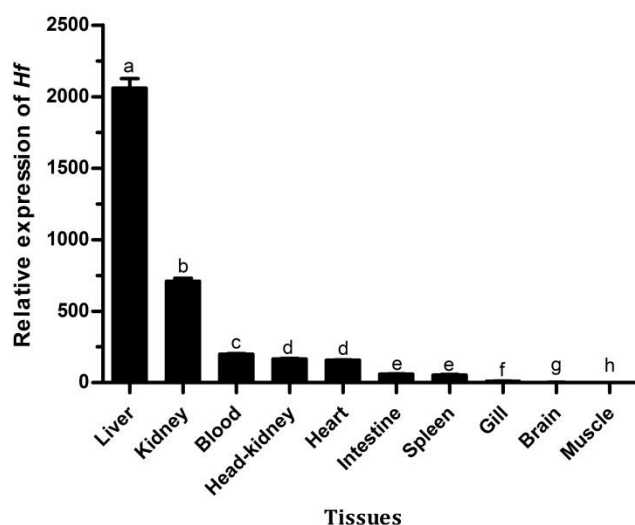


图 2-14 团头鲂不同组织中 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 的相对表达量（不同字母表示有显著性差异）

图 2-14 The relative expression levels of the *MamPf*, *MamIf* and *MamHf* gene in different tissues.(Different letters mean significant differences)

Liver: 肝脏; Spleen: 脾脏; Kidney: 肾脏; Head-kidney: 头肾; Heart: 心脏; Blood: 血液; Intestine: 肠; Brain: 脑; Muscle: 肌肉; Gill: 鳃。

2.3.2 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因在嗜水气单胞菌感染后的表达

实时荧光定量 PCR 检测了嗜水气单胞菌感染后团头鲂 4 种免疫相关组织中 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 表达量的变化（图 2-15）。

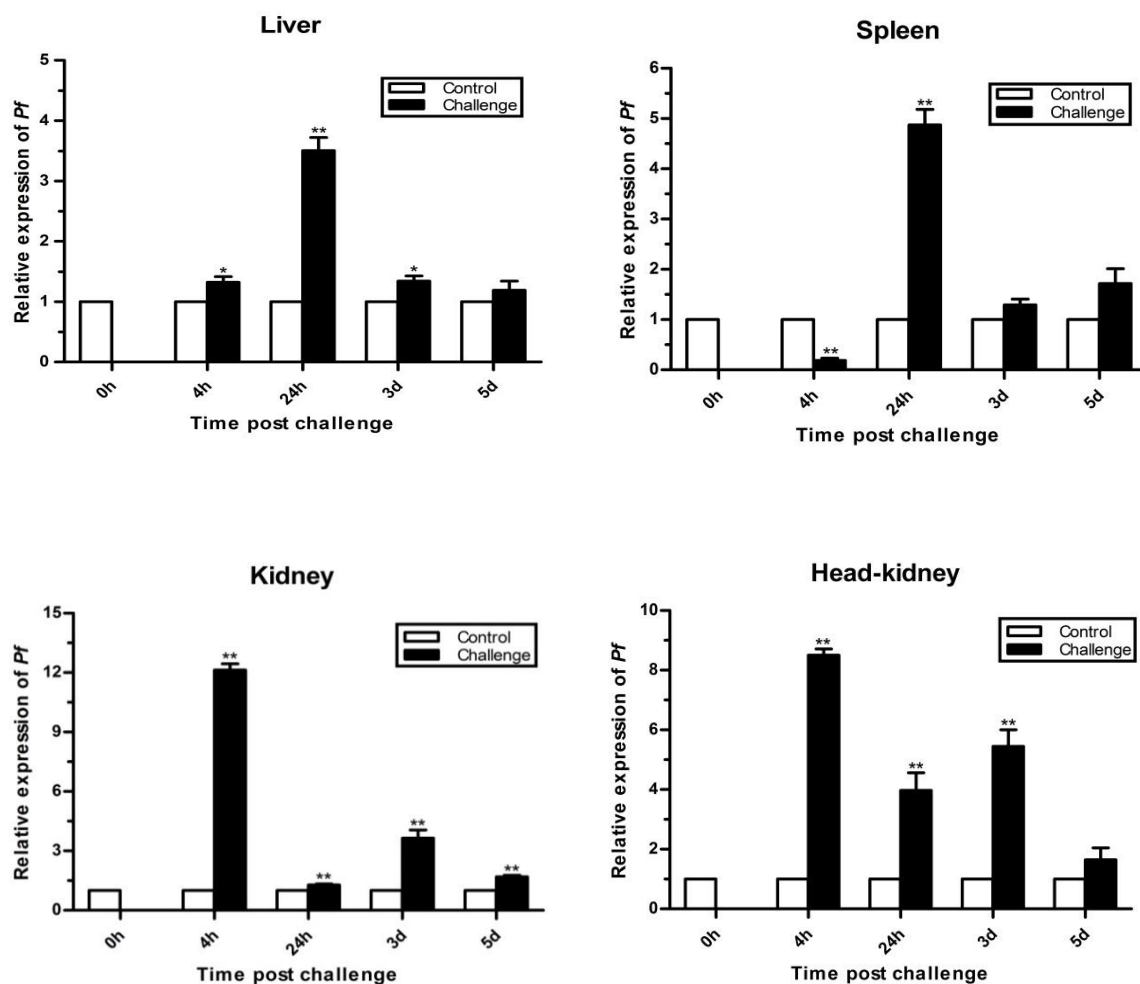
MamPf 基因在感染嗜水气单胞菌后有不同的表达模式：在肝脏中，*MamPf* 在感染后 24h 显著上调并达到峰值，5d 时恢复到对照组水平；在脾脏中，感染后 4h，*MamPf* 表达量显著下调，24h 显著上调并达到峰值，3d 时达到对照组水平；在肾脏中，*MamPf* 表达量在感染后 4h~5d 均显著上调，在 4h 达到峰值；在头肾中，其表达量在 4h~3d 均显著上调，并且在 4h 达到最大值，5d 降低到对照组水平（图 2-15A）。

MamIf 基因的表达模式也不近相同：在肝脏中，4h 有显著性上调，24h 时显

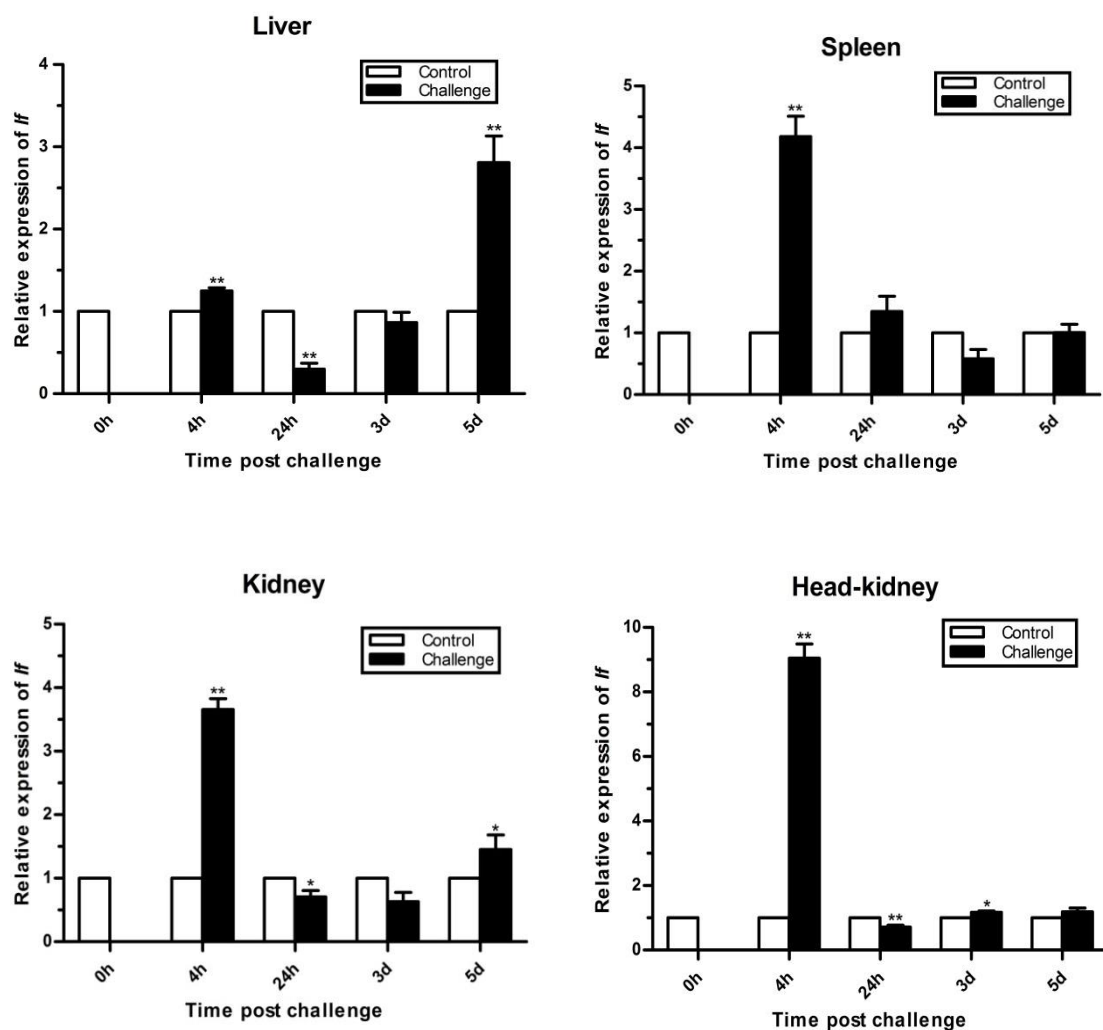
著下调，5d 时显著上调并达到峰值；在脾脏中，4h 显著上调并达到峰值，而后降低到对照组水平；在肾脏中，*MamIf* 表达量在 4h 显著上调并达到峰值，24 小时显著下调，3d 降低到对照组水平；在头肾中，4h 显著上调并达到最大值后显著下调，后在 5d 时达到对照组水平（图 2-15B）。

MamHf 基因和 *MamIf* 表达模式相似：在肝脏中，在 4h~5d 均显著上调，3d 时达到最大值；在脾脏中，4h 显著上调并达到最大值，24h 降低到对照组水平，而后 3d 时又显著上调，5d 回到对照组水平；在肾脏和头肾中，4h 和 24h 都显著上调，并且在 4h 达到最大值，3d 后回到对照组水平（图 2-15C）。

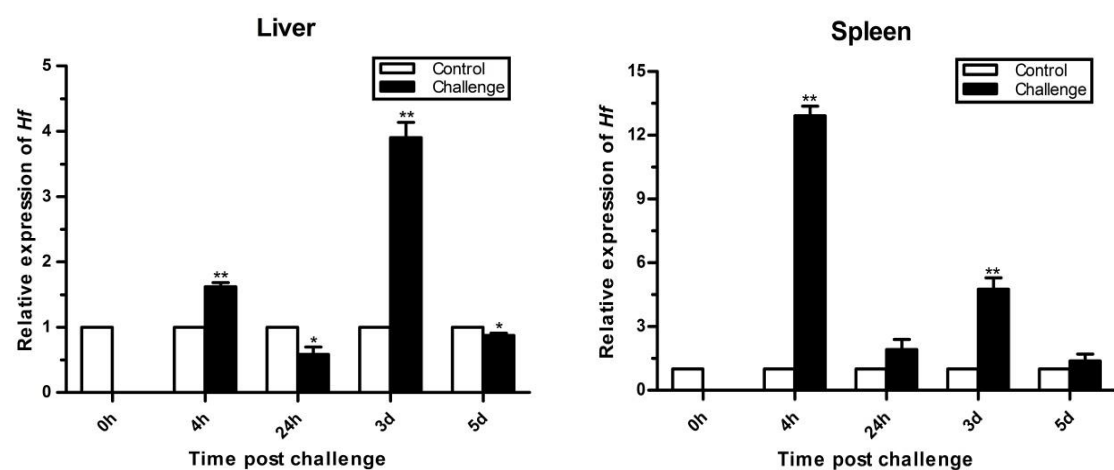
A.



B.



C.



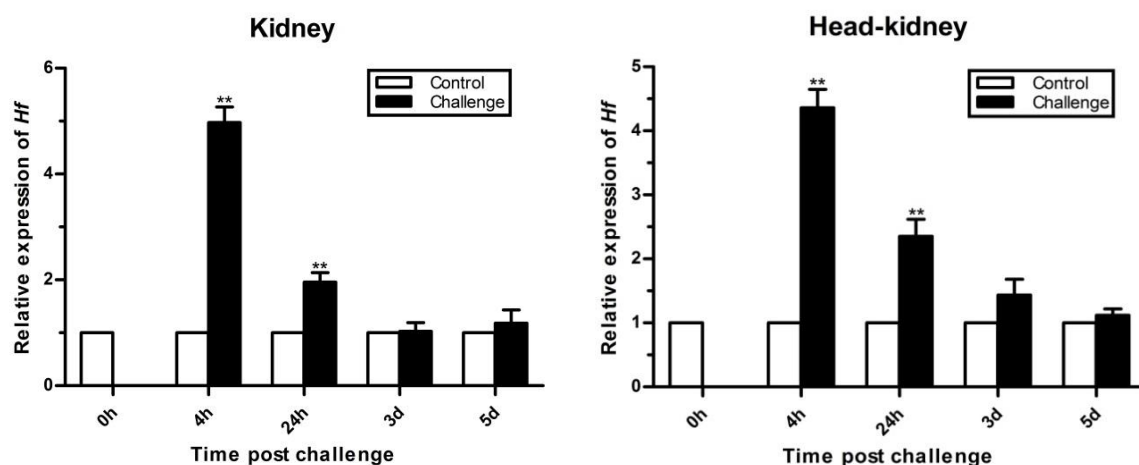


图 2-15 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因在嗜水气单胞菌感染后的肝脏、脾脏、肾脏和头肾中的相对表达量

Fig.2-15 Relative expression of *MamPf*, *MamIf* and *MamHf* transcripts in liver, spleen, kidney and head-kidney after *A. hydrophila* infection

注：差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示。

Note: Statistically significant differences are denoted with ‘*’ ($P < 0.05$) and ‘**’ ($P < 0.01$) respectively.

3 讨论

3.1 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因的序列和结构分析

团头鲂 *MamPf* 基因 ORF 全长 1329bp, 编码 442 个氨基酸, 预测分子量为 48.9 kDa。多序列比对分析表明, 团头鲂 *MamPf* 和其它物种的 Pf 都是由六个 TSR 结构域组成, 而且 TSR 结构域中有相对保守的序列。在人类中, TSR4 和 TSR5 结构域对于 Pf 的生物学功能是必不可少的, 而且都存在特征性的序列 WXXWXXW 和 RXR (Alcorlo et al 2013; Kouser et al 2016)。在本研究中, 团头鲂 *MamPf* 中的 TSR4 和 TSR5 的 WXXWXXW 和 RXR 序列也都存在, 且十分保守。这说明团头鲂 *MamPf* 基因可能和人类 Pf 基因有着类似的功能。系统进化分析表明, 团头鲂 *MamPf* 和斑马鱼在进化上亲缘关系最近; 鱼类 Pf 和哺乳动物 Pf 各分为一支, 且具有相同的祖先, 这与在虹鳟 (Chondrou et al 2008) 和文昌

鱼（Gao et al 2017）中的鉴定的 Pf 进化关系类似。团头鲂 *MamPf* 基因有 9 个外显子和 8 个内含子，和斑马鱼、斑点叉尾鮰、大西洋鲑以及人类相同，但是却不同于罗非鱼（含 11 外显子和 10 内含子），从第 6 个外显子开始与其它物种外显子长度相似，说明可能罗非鱼 Pf 在进化过程中发生了基因突变。

团头鲂 *MamIf* 基因 ORF 全长 2007bp，编码 668 个氨基酸，预测分子量为 74.6kDa。结构分析表明，团头鲂 *MamIf* 含有 1 个 FIMAC 结构域、1 个 SRCR 结构域、2 个 LDLa 结构域和 1 个丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域，表明不同脊椎动物的 If 具有高度的保守性。已经在软骨鱼类中报道过 If H 链在信号肽和 FIMAC 结构域之间存在物种特异性的重复序列（Shin et al 2009; Wang et al 2014），然而在我们的研究中并未发现相同的插入片段，这表明了 If 基因结构和功能的多样性。在本研究中，团头鲂 *MamIf* 基因预测含有 6 个 N-糖基化位点，这和其它硬骨鱼类大致相同。同时，在哺乳动物人类中 If 基因含有 6 个 N-糖基化位点（Catterall et al 1987），小鼠中 If 基因含有 6 个 N-糖基化位点（Minta et al 1996），大鼠中 If 基因含有 7 个 N-糖基化位点（Schlaf et al 2010）。他们都具有 6-7 个 N-糖基化位点，然而却低于软骨鱼类鲨鱼的 If 基因含有的 N-糖基化位点数量，其含有 13 个 N-糖基化位点之多（Shin et al 2009），这些结果表明，If 作为脊椎动物中一种特异性的丝氨酸蛋白酶，其中 N-糖基化位点的数量和位置可能不是 If 行使功能的关键因素。

团头鲂 *MamHf* 基因 ORF 全长 2589 bp，编码 862 个氨基酸，预测分子量为 97.5kDa。本研究中，团头鲂 *MamHf* 含有 13 个 SCR 结构域，这与人（含 20 个 SCR 结构域）、鸡（含 18 个 SCR 结构域）、非洲爪蟾（含 7 个 SCR 结构域）、虹鳟（含 11 个 SCR 结构域）、罗非鱼（含 15 个 SCR 结构域）以及斑马鱼（含 14 个 SCR 结构域）不同，不同物种中 SCR 结构域数量的不同可能是进化过程中功能需求增加的结果（Cai et al 2014）。在团头鲂 *MamHf* 基因中预测到了 2 个 N-糖基化位点，但是在斑马鱼 Hf 基因中却没有预测到 N-糖基化位点，在人类 Hf 中，预测到了 9 个 N-糖基化位点之多，这表明团头鲂 *MamHf* 基因可能经历了新功能化的过程。然而，由于预测糖基化位点程序的限制，预测准确性需要进一步验证，而且糖基化位点与免疫有关（Van Kooyk and Rabinovich 2008），因此关于团头鲂 *MamHf* 基因糖基化位点的研究有待进一步验证。

3.2 团头鲂 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 的表达

在本研究中,团头鲂健康组织 *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 的表达分析结果显示,团头鲂 *MamPf* 在肾脏中表达量最高,在其它组织中也有较高的表达量。在文昌鱼和虹鳟中 (Gao et al 2017; Zhang et al 2013), *Pf* 在肝脏中表达量最高,虽然在人和很多非哺乳动物中, *Pf* 主要在肝脏中产生,但是能产生 *Pf* 的细胞还有很多,包括中性粒细胞、单核细胞和内皮细胞等 (Camous et al 2011); 团头鲂 *MamIf* 在肝脏中表达量最高,这与 *If* 主要在肝脏中合成的报道一致 (Nilsson et al 2011)。肝脏是免疫系统中主要的免疫器官之一,其中存在着多种与免疫相关的成分。*If* 在肝脏中丰富的表达也说明了 *If* 具有免疫功能;团头鲂 *MamHf* 在肝脏中表达量最高,在虹鳟中 (Anastasiou et al 2011), *Hf* 只在肝脏中检测到,在脑、心脏、肠和脾脏中没有检测到 *Hf*,在斑马鱼中 (Sun et al 2010), *Hf* 也是在肝脏中有最高的表达量,在大黄鱼中 (郭宝英等 2015), *Hf* 同样也是在肝脏中表达量最高,这些结果都与本研究结果一致。

在团头鲂感染嗜水气单胞菌后,在肝脏、脾脏、肾脏和头肾中, *MamPf*、*MamIf* 和 *MamHf* 基因 mRNA 的表达趋势有着明显的不同。以前的研究表明 (Gao et al 2017),用 LPS 刺激文昌鱼后, *Pf* 在 8h 达到峰值,而用鳃弧菌或者藤黄微球菌刺激表达更慢,在 24h 达到峰值,且表达水平更低,本研究中,肝脏和脾脏在 24h 达到峰值,而肾脏和头肾中在 4h 达到峰值,这与之前的研究有类似之处;在半滑舌鳎中 (Xiang et al 2015),感染鳃弧菌 6h 后,在肝脏、血液和肠中 *If* 表达水平显著下调,在感染后 12h 和 7d, *If* 表达水平显著上调, *If* 表达有很大波动,在本研究中,在肝脏中,感染嗜水气单胞菌 24h 后, *MamIf* 表达水平显著下调,5 d 时显著上调并达到峰值,在肾脏和头肾中,在不同的时间点也有显著性下调的趋势,说明 *If* 作为一种重要的补体调节因子,调节免疫反应过程,但是具体的调节模式还需要进一步的研究;在感染嗜水气单胞菌 4h 后,脾脏、肾脏和头肾中 *MamHf* 达到峰值,这可能是因为团头鲂受到病原体入侵后,补体系统迅速被激活,并不断被放大,此时补体调节因子也被大量合成,以避免补体途径被无限激活,保护自身不被损伤。在斑马鱼中 (Sun et al 2010),用 LPS 刺激后,肝脏中 *Hf* 在 6h 显著上调并达到峰值,在大黄鱼中 (郭宝英等 2015),感染溶藻弧菌后,肝脏中 *Hf* 在 48h 显著上调并达到峰值,本研究中,感染嗜水气单胞菌后,

肝脏中 *MamHf* 在 3d 时显著上调并达到峰值，它们达到峰值的时间点不同，可能是因为 *Hf* 参与了不同的免疫途径，具有重要的免疫调节作用，但具体机制还有待深入研究。

第三章 团头鲂 Df 基因原核表达和抑菌活性分析

1 实验材料

1.1 载体和菌株

原核表达载体 pET28a 为本实验室收藏。原核表达感受态细胞 Rosetta(DE3) 购自北京康为生物技术有限公司, 嗜水气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均为本实验室收藏。

1.2 主要仪器设备及试剂

1.2.1 主要仪器

同第二章 2.2.1。

1.2.2 主要药品

质粒提取试剂盒 (天根公司), 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I, 异丙-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 氧化型/还原型谷胱甘肽和精氨酸 (Biofroxx 公司), Ni NTABeads 蛋白纯化柱 (天地人和公司), RIPA 强裂解液、PMSF、PVDF 膜、蛋白预染 Marker 及超滤离心管 (Biosharp 公司), SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (武汉塞维尔公司), 脱脂奶粉 (Solarbio 公司), β -actin 抗体 (北京博奥龙公司), 其它常规试剂均为国产分析纯。

1.2.3 主要试剂配制

(1) 电泳缓冲液 5×Tris-甘氨酸 Gly: 15.1 g Tris 碱, 94 g Gly, 5 g SDS, 加入双蒸水混合均匀后定容至 1000 mL。

(2) 1.5 mol/L Tris-HCl: 18.165 g Tris 碱, 加入 50 mL 双蒸水, 浓盐酸调 pH 至 8.8, 定容至 100 mL。

(3) 1.0 mol/L Tris-HCl: 12.11 g Tris 碱, 加入 50 mL 双蒸水, 浓盐酸调 pH 至 6.8, 定容至 100 mL。

(4) 考马斯亮蓝染液: 50 mL 甲醇, 40 mL 双蒸水, 10 mL 冰乙酸, 0.25 g R-250 考马斯亮蓝, 加入双蒸水混合均匀后定容至 100 mL。

(5) 脱色液: 50 mL 甲醇, 40 mL 双蒸水, 10 mL 冰乙酸, 加入双蒸水混合均匀后定容至 100 mL。

(6) 转膜缓冲液: 2.9 g 甘氨酸, 5.8 g Tris 碱, SDS 0.37 g, 加入双蒸水混合均匀后定容至 800 mL, 加入 200 mL 乙醇, 室温保存。

(7) TBST Buffer: 8.775 g NaCl, 2.422 g Tris-HCl (pH 7.6), 加入 0.8 mL Tween 20 后充分混匀, 加入双蒸水定容至 1 L 后, 4 °C 保存。

(8) Western Blot 封闭缓冲液: 称量 5 g 脱脂奶粉加入到 100 mL 的 TBST Buffer 中, 充分搅拌溶解, 滤纸过滤, 4 °C 保存。

1.3 引物设计

从之前的研究中得到团头鲂 *MamDf* 基因 ORF 序列 (范君 2016), 以去掉信号肽序列和终止密码子的成熟序列为模板设计 Df 的原核表达扩增引物, 序列分析参照第二章 1.5 节。为构建 Df 的 pET28a 表达载体, 通过 Primer premier 5.0 软件对基因序列和 pET28a 载体质粒 (抗卡那霉素) 序列进行分析, 选择 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切位点作为表达载体构建的位点, 设计相应引物。

表 3-1 原核表达所用引物信息

Table 3-1 Primers used in the prokaryotic expression system

引物名称 Primer name	序列 (5'→3') Sequence	用处 Usage
DF-ORF-F	CGGACATCAATCGTTCA	ORF 扩增
DF-ORF-R	TTTTTTACTGGGTGGTT	ORF 扩增
DF-28a-F	CCGGAATTCATTACAGGAGGAAGTGAGGCT	重组表达
DF-28a-R	CCGCTCGAGCTGGGTGGTTGTACTGTCAAT	重组表达

注: 加粗部分表示酶切位点。Note: Blotted part indicates the cleavage site.

2 实验方法

2.1 原核重组质粒的构建

2.1.1 目的基因的扩增及纯化

利用表 3-1 中的引物,以团头鲂肝脏 cDNA 为模板,扩增团头鲂 *Df* 基因成熟肽片段,PCR 反应体系及程序见第二章第二节。

2.1.2 表达载体质粒的提取

提取大肠杆菌中 pET28a 表达载体的质粒,按照北京鼎国质粒 DNA 大量提取试剂盒进行前 5 步操作,后用实验室的方法:

(1) 按菌液与 LB 培养基为 1:50 的比例,在 37 °C,180 r/min 摇床中培养 15 mL 的菌液,12000 r/min 离心 1 min,弃上清。

(2) 加 250 μ L Buffer S1 悬浮细菌沉淀,悬浮需均匀,不应留有小的菌块。

(3) 加 250 μ L Buffer S2,温和并充分地上下翻转 4~6 次混合均匀使菌体充分裂解,直至形成透亮的溶液。实验过程中避免剧烈摇晃,否则将导致基因组 DNA 的污染,且步骤不宜超过 5 min。

(4) 加 350 μ L Buffer S3,温和并充分地上下翻转混合 6~8 次,12000 r/min 离心 10 min。(避免剧烈摇晃,否则将导致基因组 DNA 的污染)。

(5) 吸取步骤 4 中的上清并转移到制备管(置于试剂盒内提供的 2 mL 离心管中),12000 r/min 离心 1 min,弃滤液。

(6) 将制备管置回离心管,加 500 μ L Buffer W1,12000 r/min 离心 1 min,弃滤液。

(7) 将制备管置回离心管,加 700 μ L Buffer W2,12000 r/min 离心 1 min,弃滤液;以同样的方法再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。

(8) 将制备管置回 2 mL 离心管中,12000 r/min 离心 1 min。

(9) 将制备管移入新的 1.5 mL 离心管(试剂盒内提供)中,在制备管膜中央加 60~80 μ L Eluent 或去离子水,室温静置 1 min。12000 r/min 离心 1 min。

获得质粒经过琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性，-20℃保存备用。

2.1.3 产物与 pET28a 载体的连接与转化

(1) 将目的基因表达质粒与 pET28a 质粒分别进行双酶切，反应步骤如下：

试剂	使用量 (μL)
ddH ₂ O	4.8
目的片段/质粒	40.0
10×Tango Buffer	5.0
EcoR I	0.1
Xho I	0.1
Total	50.0

反应条件为：37 °C，4-5 h。

将目的基因与 pET28a 质粒连接，反应步骤如下：

试剂	使用量 (μL)
T ₄ DNALigase	0.5
10×T ₄ DNALigase Buffer	1.0
载体	0.5
目的基因	1.5
Total Volume	5.0

反应条件为：23 °C 下 30 min。

(2) 转化

连接产物转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞中，涂布 LB 平板并于 37 °C 培养过夜，操作步骤同第二章第二节，挑取重组质粒的单菌落培养后送至测序。选取鉴定正确的菌液按 1:50 的比例接种于含卡那的 LB 液体培养基中，37 °C 震荡培养至对数生长期 (OD=0.6~0.8)，置于 4 °C 冰箱暂时保存，剩余部分加入甘油与 -20 °C 冰箱保存。

2.2 重组质粒的诱导表达

(1) 将测序正确的 DE3 阳性克隆于 Kan^+ -LB 培养基中活化 12 h。活化后取 500 μL 培养液转接到 50mL 新鲜 LB 培养基中, 于 18、28 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床, 180 r/min 转速下培养至对数期 ($\text{OD}=0.6\sim 0.8$)。

(2) 分别加入终浓度为 0、0.05、0.2 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4 h、6 h 和 24 h, 收集菌液。

(3) 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 转速下, 离心 5 min, 弃去培养基, 并用 PBS 洗涤菌体沉淀 2 次, 再用适量的 PBS 重悬, 超声波破碎至菌液趋向于澄清。

(4) 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 转速下, 离心 5 min, 分离上清和沉淀, 沉淀用同等体积 PBS 悬浮, 分别加入一定体积的 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液, 混匀后于沸水浴中煮 5 min, 室温冷却后上样。

(5) 按表 3-2 配制聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE)。先配置 12% 的分离胶, 等分离胶凝固后再配制 5% 的浓缩胶。样品在浓缩胶中电压用 80 V, 在分离胶时改电压为 120 V, 跑至预染 Marker 清晰分开。

(6) 将凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色液高温染色 2 min 后, 置于脱色液中加热脱色至蛋白条带清晰可见, 并分析最佳的蛋白诱导表达条件。

表 3-2 浓缩胶和分离胶的配制

Table 3-2 Preparation of stacking gel and separating gel

溶液成分	12%分离胶 (mL)	5%浓缩胶 (mL)
ddH ₂ O	1.6	2.04
30%丙烯酰胺	2.0	0.5
1.5 mol/L Tris-HCl	1.3	-
1.0 mol/L Tris-HCl	-	0.39
10% SDS	0.05	0.03
10%过硫酸铵	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
总体积	5	3

2.3 包涵体的纯化

(1) 包涵体超声波裂解。菌液体积为 V，PBS 洗 2 次后加入裂解液 V/5 的 Buffer1。超声波破碎，4 °C, 10000 r/min 离心 30 min，弃上清，收集沉淀。

(2) 包涵体洗涤。A: 加入 V/5 Buffer 2，重悬沉淀 4 °C，10000 r/min 离心 30 min，上清收集于 15 mL 管中；B: 加入 V/5 Buffer 3，重悬沉淀 4 °C，10000 r/min 离心 30 min，上清收集于 15 mL 管中；C: 加入 V/5 Buffer 4，重悬沉淀 4 °C，10000 r/min 离心 30 min，上清收集于 15 mL 管中。

(3) 包涵体溶解。加入 V/50 溶解 Buffer 5，冰上溶解包涵体直至溶液变清亮，10000 r/min 离心 20 min 除去不溶成分保留上清。

(4) 将上清装入透析袋中，置于 50 倍体积透析液 1 中，4 °C 下透析 12 h。

(5) 将上面装有重组蛋白的透析袋置于 50 倍体积透析液 2 中，4 °C 下恒温摇床上 60 r/min 透析 12 h。

(6) 将上面装有重组蛋白的透析袋置于 50 倍体积透析液 3 中，4 °C 下恒温摇床上 60 r/min 透析 12 h。

(7) 将上面装有重组蛋白的透析袋置于 50 倍体积透析液 4 中，4 °C 下恒温摇床上 60 r/min 透析 12 h。

(8) 将上面装有重组蛋白的透析袋置于 50 倍体积透析液 5 中，4 °C 下恒温摇床上 60 r/min 透析 12 h。

(9) 将上面装有重组蛋白的透析袋置于 50 倍体积透析液 6 中，4 °C 下恒温摇床上 60 r/min 透析 12 h，取出透析袋中的重组蛋白，4 °C，10000 r/min 离心 10 min，保留上清，去除沉淀。将上清加入超滤管中，4000 r/min 离心 25 min，浓缩的上清暂时保存在 4 °C 冰箱中。(Buffer1-5 配制方法见附表 3-1，透析液 1-6 配制方法见附表 3-2。)

2.4 重组蛋白的纯化和多克隆抗体的制备

重组质粒 pET28a-Df 原核表达产物为融合蛋白，带有 6×His 标签蛋白，可利用 Ni 柱竞争结合目的蛋白，从而洗脱目的蛋白。使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行过柱纯化，具体步骤如下：

(1) 将 Ni NTA Beads 装入合适的层析柱, 层析用 5 倍柱体积的 Lysis Buffer 进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用。

(2) 将样品加到平衡好的 Ni NTA Beads 中, 保证目的蛋白与 Ni^{2+} 充分接触, 提高目的蛋白的回收率, 收集流出液。

(3) 用 10-15 倍柱体积的 Wash Buffer 进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。

(4) 使用 5-10 倍柱体积的 Elution Buffer, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。

(5) 用 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况, 加入蛋白酶抑制剂后, 4 °C 短暂保存, -20 °C 长期保存。(Lysis Buffer、Wash Buffer 和 Elution Buffer 配制方法见附表 3-3。)

多克隆抗体由武汉爱博泰克生物科技公司制备。采用纯化的重组蛋白免疫兔子。皮下注射约 600 μg 完全弗氏佐剂乳化后的纯化蛋白。在第一次注射后, 每隔两周, 再次注射 300 μg 不完全弗氏佐剂乳化后的纯化蛋白, 共 3 次。第四次免疫后的第 12 d, 对兔子进行采血, 抗血清置于 -80 °C 保存备用。获得抗血清后通过抗原亲和纯化得到特异性较高的抗体, 并分装保存于 -20 °C。

2.5 Western blot

(1) 称取 100 mg 左右的样品放入新的预先标号的 2 mL 离心管中, 加入 1 mL RIPA 裂解液, 然后使用匀浆器在 4 °C 下匀浆至无明显组织块可见。然后将离心管在冰上放置 30 min, 使组织块与裂解液充分混合, 从而让蛋白充分裂解。

(2) 4 °C, 12000 r/min 离心 20 min, 吸取上清, 弃沉淀。

(3) BCA 法测定蛋白浓度。

(4) 取一定量的上清加入 5×SDS 蛋白上样缓冲液混合, 沸水煮 5 min 使其充分变性。

(5) 蛋白样品 SDS-PAGE 凝胶电泳。

(6) 湿转方法转膜, 200 mA, 45 min, 将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。

(7) 用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST) 室温封闭 2 h。

(8) 加入一抗 (用封闭液稀释到合适浓度), 在水平摇床上 4 °C 孵育过夜。

(9) TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入荧光标记二抗 (用 TBST 稀释到合适浓度), 在水平摇床上室温孵育 1 h。

(10) TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 使用 Odyssey 双色红外荧光成像系统扫描拍照。

2.6 重组蛋白抑菌实验

MamDf 重组蛋白透析复性后, 进行抑菌实验, 选择嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行活性分析。先用打孔法确定抑菌最佳浓度, 再用 OD 值法进行抑菌实验。

打孔法:

- (1) 细菌在 28℃ 培养 6-12h, 调整菌液浓度。使其 OD_{600} 在 0.8-1.0 之间。
- (2) 再将其稀释 100 倍, 制得含菌量为 $1\sim 2\times 10^6$ CFU/mL 的菌液。
- (3) 取菌液 150 μ L 涂 LB 培养基, 4℃ 放置 1h。
- (4) 待菌液完全吸收后, 用 6mm 打孔器打孔, 每孔加入 20 μ L 的目的蛋白液, 阴性对照组加等量的 PBS, 阳性对照组加等浓度相同体积的氨苄青霉素或者卡拉霉素。
- (5) 37℃ 培养 18h, 统计抑菌圈的直径。

OD 值法:

- (1) 细菌在 28℃ 培养 6-12min, 调整菌液浓度。使其 OD_{600} 在 0.8-1.0 之间。
- (2) 再将其稀释 100 倍, 制得含菌量为 $1\sim 2\times 10^6$ CFU/mL 的菌液。
- (3) 取菌液 500 μ L 加入 2ml 的 EP 管中, 再加入 500 μ L 的目的蛋白, 混合均匀。
- (4) 28℃ 恒温摇床上培养至 0h、2h、4h、6h、8h、10h 和 12h, 通过超微量分光光度计检测 600nm 处的吸光值。

2.7 数据分析

用 SPSS Statistics 17.0 软件对 OD 值进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 数值均采用平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SE) 表示, 当 $P<0.05$ 时, 认为差异显著; 当 $P<0.01$ 时, 认为差异极显著。

3 结果与分析

3.1 团头鲂 *MamDf* 基因序列分析

MamDf 开放阅读框 (ORF) 全长 753 bp, 编码 250 个氨基酸, DNASTAR 预测其分子量为 27.2kDa, 理论等电点为 6.65。利用 ProtParam 在线分析 *MamDf* 氨基酸序列, 显示其脂肪系数为 71.04, 平均疏水系数为-0.342, 不稳定指数为 39.65, 被归类为稳定蛋白。SignalP 4.1 在线分析表明第 1 到 20 个氨基酸为其信号肽, NetNGlyc 1.0 Server 预测显示其没有 N-糖基化位点。Phyre2 预测 *MamDf* 二级结构包括 4 个 α 螺旋 (13%)、16 个 β 转角 (40%) 和 1 个 TM 螺旋 (6%), 预测的团头鲂 Df 蛋白质三级结构类似于酚氧化酶活化因子 (图 3-1)。

两两序列比对分析表明 Df 在鱼类和哺乳动物中都很保守, 团头鲂 *MamDf* 与草鱼相似度高达 94%, 与斑马鱼 (84%) 和斑点叉尾鲷 (68%) 也很高 (表 3-1)。ClustalW 多序列比对分析 (图 3-2) 显示丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域是严格保守的, 3 个底物结合位点和 3 个活性位点在所有分析的序列中都是完全保守的, 这表明它们在不同物种中的重要性。

利用 MEGA 6.06 软件中的 NJ 分析法构建 Df 的系统进化树, 结果如图 3-3 所示, 鱼类 Df 聚为一支, 哺乳动物聚为另一支, 鱼类 Df 和哺乳类 Df 有共同的祖先。十分有趣的是, 虹鳟和大西洋鲑被归类到了哺乳动物那一支, 说明虹鳟和大西洋鲑比其它鱼类有更高的进化地位。同时, 团头鲂与草鱼的 Df 在进化上亲缘关系最近。

首先我们从 GenBank 中获得了其它脊椎动物的 Df 基因序列和 mRNA 序列, 然后将基因序列和 mRNA 序列进行比对来确定 Df 基因的结构。结果如图 3-4 所示, 团头鲂 *MamDf* 基因有 5 个外显子和 4 个内含子, 其它脊椎动物含有相同数量的外显子和内含子。此外, 团头鲂和斑马鱼对应的外显子长度相似, 罗非鱼和条石鲷对应的外显子长度相似, 小鼠和人对应的外显子长度相似, 但是所有物种的内含子长度都不一致。

表 3-1 团头鲂 *MamDf* 氨基酸序列与其它物种的同源性分析

Table 3-1 Homology analysis of the deduced amino acid sequence of *MamDf* with related

sequences from other species.

Species 物种	Accession No 登录号	Amino acids 氨基酸	Identity(%) 相似度
<i>Megalobrama amblycephala</i>		250	
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	AHB81535	250	94%
<i>Danio rerio</i>	NP_001018368	249	84%
<i>Ictalurus punctatus</i>	AEW10547	250	68%
<i>Esox lucius</i>	XP_010877625	255	65%
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	AIZ96981	277	59%
<i>Paralichthys olivaceus</i>	ACV89350	277	58%
<i>Poecilia reticulata</i>	XP_008397016	275	56%
<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003447819	275	54%
<i>Sus scrofa</i>	XP_013850255	259	45%
<i>Homo sapiens</i>	ABI63376	260	45%
<i>Bos taurus</i>	NP_001029427	259	43%
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CCA64453	253	42%
<i>Salmo salar</i>	ACI69308	257	38%

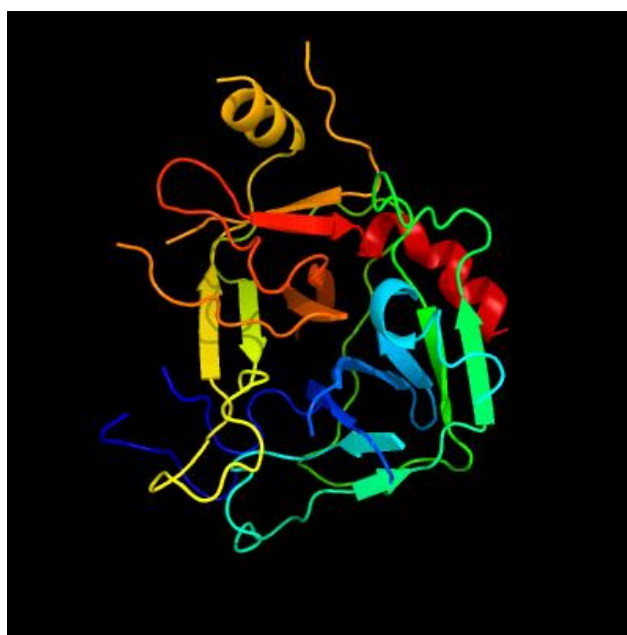


图 3-1 Phyr2 预测的团头鲂 MamDf 蛋白三级结构

Fig.3-1 MamDf protein tertiary structure prediction via the software of Phyr2

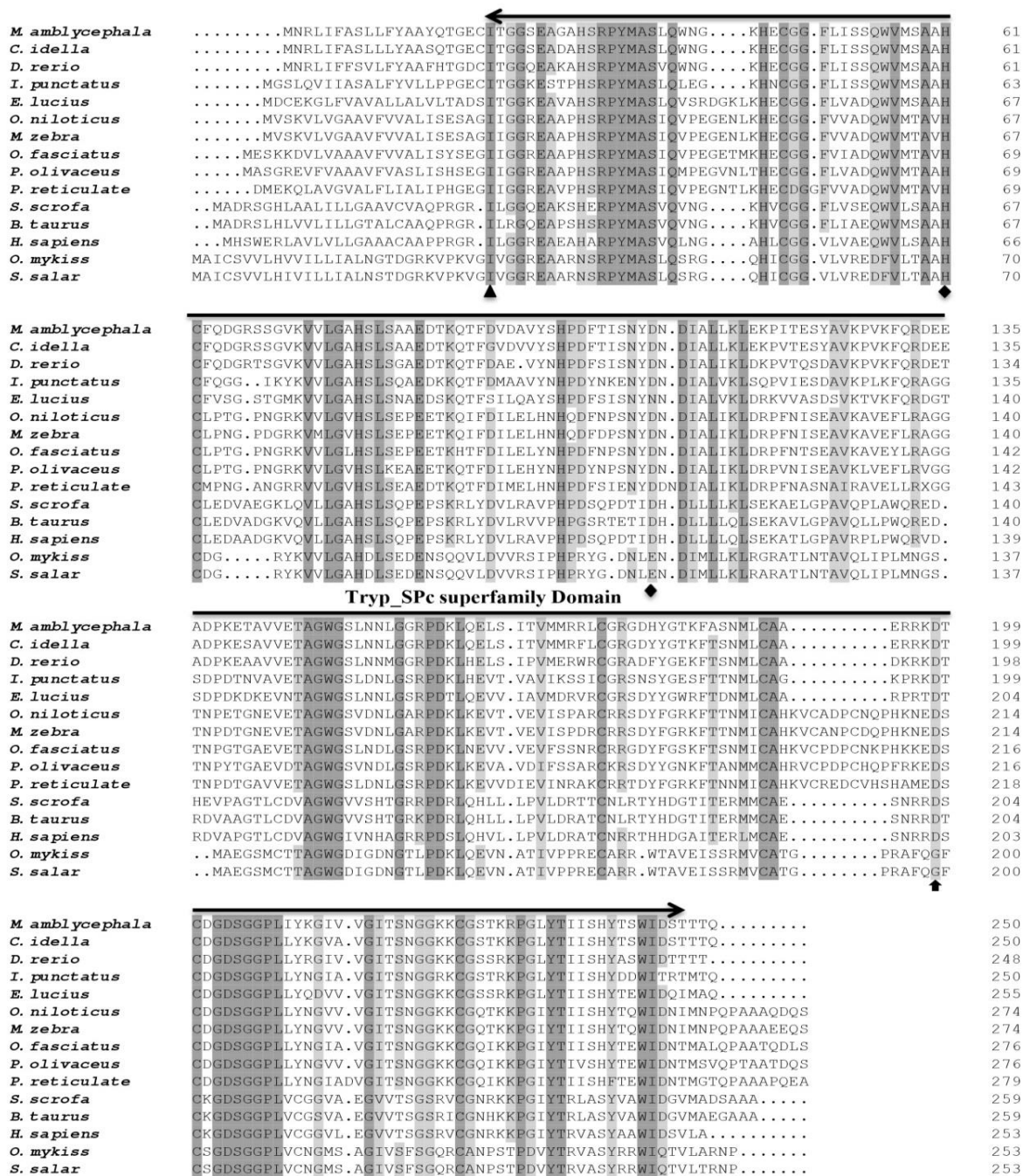


图 3-2 团头鲂与其它物种 Df 氨基酸多序列比对

Fig. 3-2 Amino acid sequence alignment of Df from blunt snout bream and other species

相同和相似的氨基酸分别用灰色和浅灰色阴影显示。丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域用黑色双箭头标记。切割位点用黑色三角形标记。活性位点用黑色菱形标记，底物结合位点用向上的箭头表示。

Identical and similar residues are shaded in gray and light gray, respectively. The serine protease trypsin superfamily domain is marked with a black double-headed arrow. The cleavage site is marked with a black triangle. Active sites are marked with a black rhombus, and substrate binding sites are marked by a downward arrow.

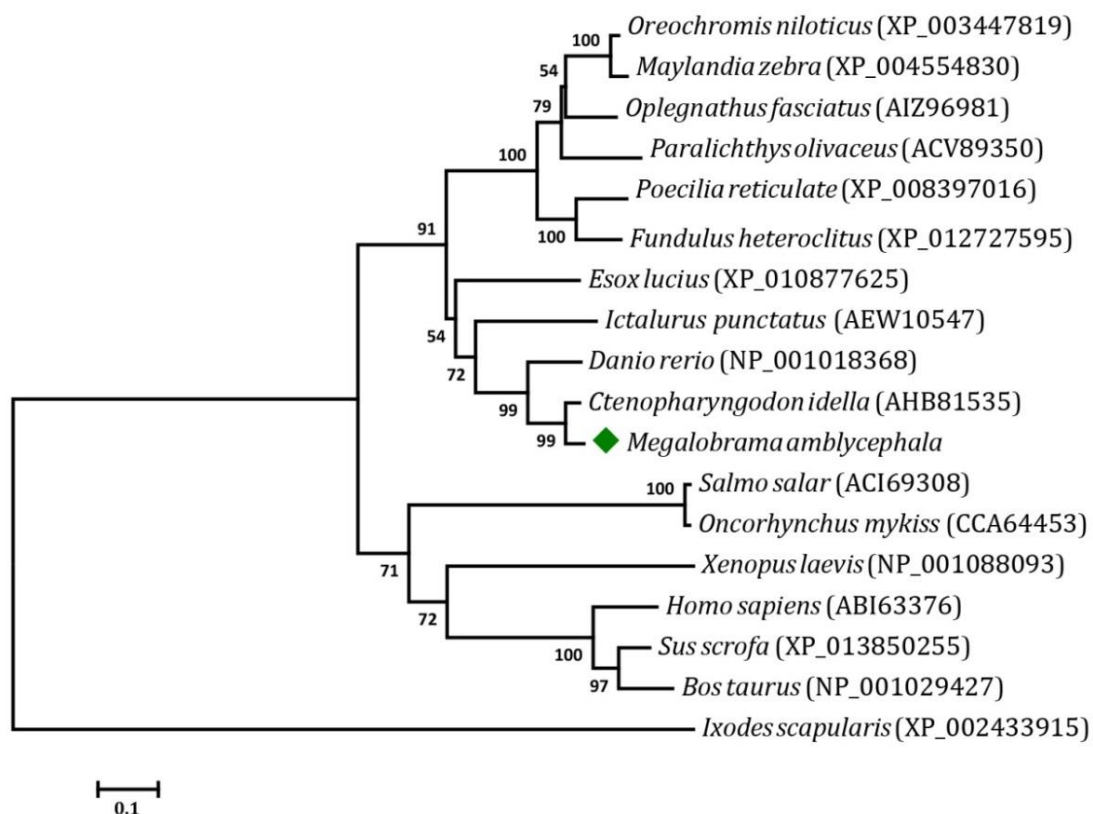


图 3-3*Df* 编码氨基酸序列的系统进化树（各物种氨基酸序列登录号在各物种之后）

Fig. 3-3 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by *Df*. (Accession numbers are shown next to each species)

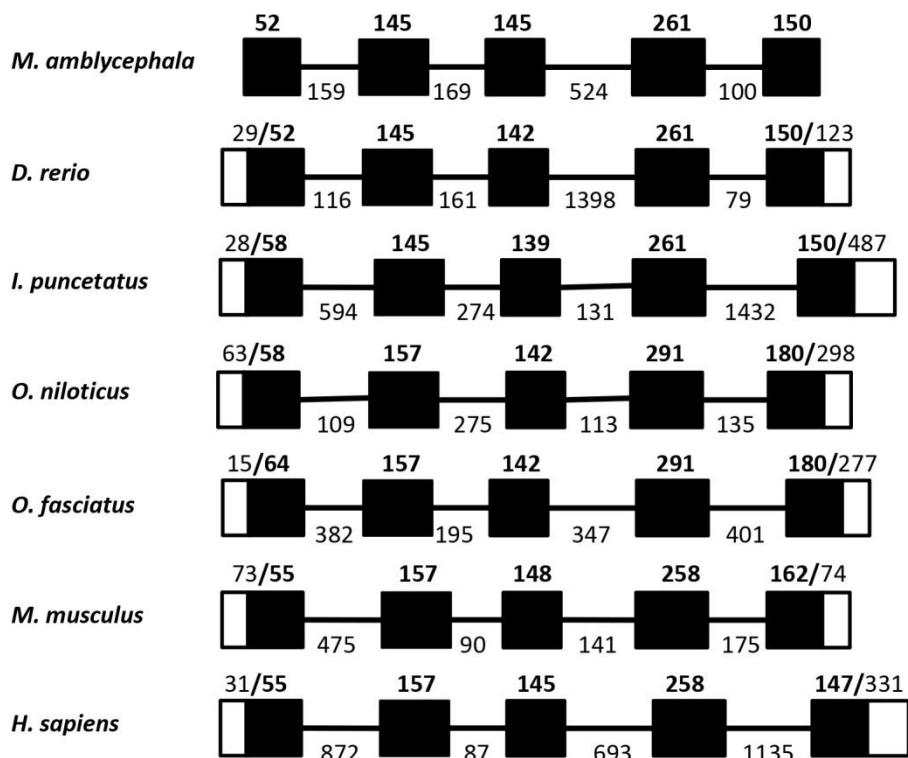


图 3-4 不同物种 *Df* 基因结构模式图

Fig. 3-4 Comparison of the *Df* gene organization and intron/exon sizes between different species

粗体的数字和黑框表示外显子，正常数字和线条表示内含子，5'-和 3'-非编码区用空白框和正常数字表示。

基因 ID 如下：斑马鱼（553553），斑点叉尾鲶（100862744），罗非鱼（100692083），条石鲷（100692083），小鼠（11537），人（1675）。

Numbers in bold and black boxes indicate exons, normal number and lines joining the boxes indicate introns, and the 5'-and 3'- untranslated regions are denoted with empty boxes and normal number. The gene ID of the complement factor D is as follow: *D. rerio*: 553553, *I. punctatus*: 100862744, *O. niloticus*: 100692083, *O. fasciatus*: 100692083, *M. musculus*: 11537, *H. sapiens*: 1675.

3.2 团头鲂 pET28a-Df 重组质粒在不同条件下的诱导表达

团头鲂 MamDf 基因成熟肽序列编码 230 个氨基酸，预测分子量 24.9 kDa，pET28a 载体含有 6×His 标签，大小是 5 kDa，所以预测的 pET28a-Df 融合蛋白分子量约为 29.9kDa。

将重组质粒 pET28a-Df 在 37℃、180r/min 和不同 IPTG 浓度（0、0.05、0.2、1mmol/L）的条件下诱导表达，诱导时间为 4 h，随后用 SDS-PAGE 检测，结果

如图 3-5 所示, MamDf 只在沉淀中表达, 在上清中未表达, 而且当 IPTG 浓度为 0.05mmol/L 时, 融合蛋白表达量最高。

将重组质粒 pET28a-Df 在 28℃、180r/min 和不同 IPTG 浓度 (0、0.05、0.2、1mmol/L) 的条件下诱导表达, 诱导时间为 12 h, 随后用 SDS-PAGE 检测, 结果如图 3-6 所示, MamDf 只在沉淀中表达, 在上清中未表达, 而且当 IPTG 浓度为 0.05mmol/L 时, 融合蛋白表达量最高。相比较在 37℃ 条件下的诱导表达, 在 28℃ 条件下表达量更低, 说明 37℃ 诱导条件更佳。

将重组质粒 pET28a-Df 在 37℃、180r/min、不同 IPTG 浓度 (0.05、1mmol/L) 和不同诱导时间 (4h、6h) 的条件下诱导表达, 随后用 SDS-PAGE 检测, 结果如图 3-7 所示, MamDf 只在沉淀中表达, 在上清中未表达, 当 IPTG 浓度为 0.05mmol/L 时, 诱导 6h 明显比诱导 4h 表达量高, 说明诱导时间 6h 更佳。

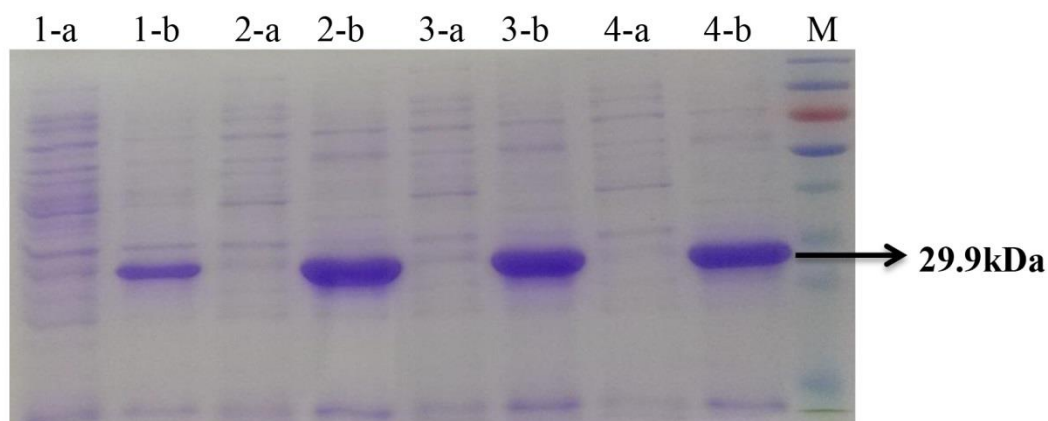


图 3-5 重组质粒 pET28a-Df 在不同 IPTG 浓度下的诱导表达

Fig. 3-5 The induced expression of pET28a-Df vector in different concentrations of IPTG

M: Marker, 1-4 代表 IPTG 浓度 (0、0.05、0.2、1mmol/L), a 和 b 分别表示细菌破碎后的上清和沉淀。

M: Marker, 1-4 represent IPTG concentrations (0, 0.05, 0.2, 1 mmol/L), a represent the supernate, b represents precipitate.

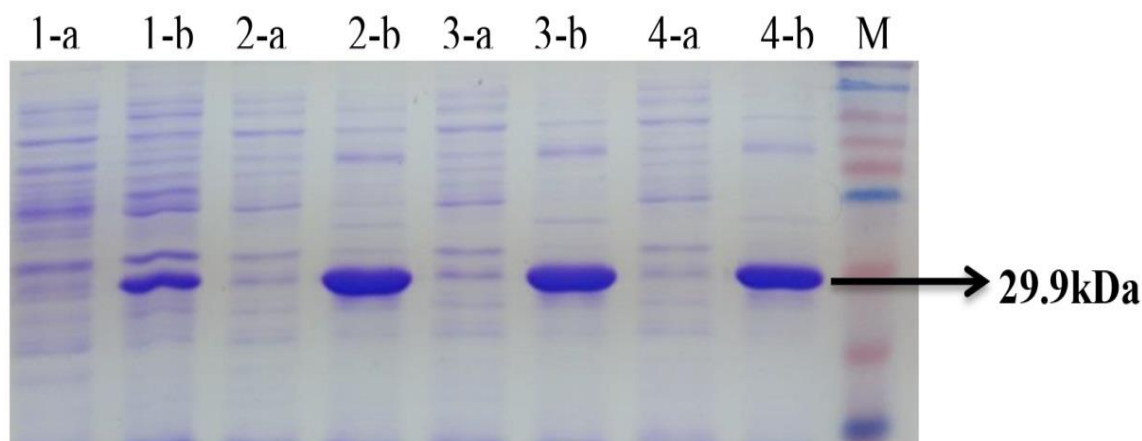


图 3-6 重组质粒 pET28a-Df 在不同 IPTG 浓度下的诱导表达

Fig. 3-6 The induced expression of pET28a-Df vector in different concentrations of IPTG

M: Marker, 1-4 代表 IPTG 浓度 (0、0.05、0.2、1mmol/L), a 和 b 分别表示细菌破碎后的上清和沉淀。

M: Marker, 1-4 represent IPTG concentrations (0, 0.05, 0.2, 1 mmol/L), a represent the supernate, b represents precipitate.

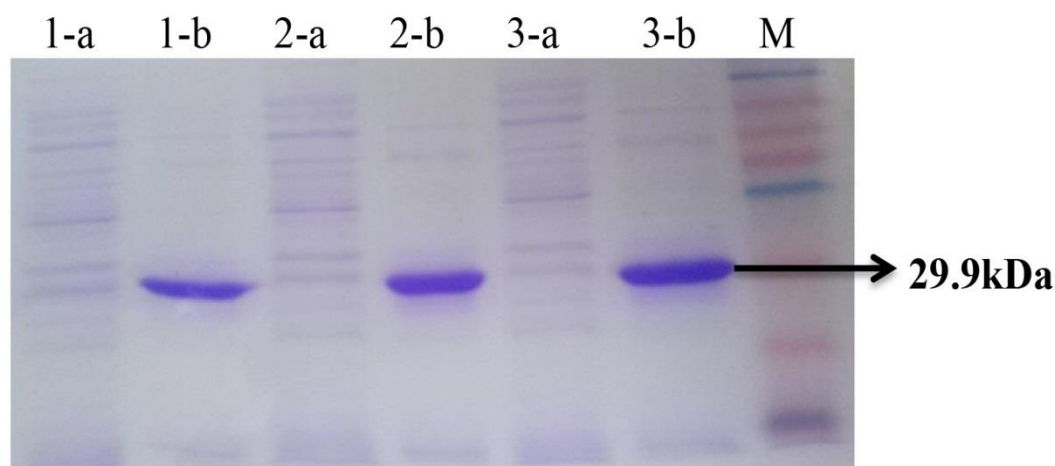


图 3-7 重组质粒 pET28a-Df 在不同诱导时间和 IPTG 浓度下的诱导表达

Fig. 3-7 The induced expression of pET28a-Df vector in different induction time and different concentrations of IPTG

M: Marker, 1-3 代表 IPTG 浓度 (0.05、0.05、1 mmol/L) 和诱导时间 (4h, 6h, 6h), a 和 b 分别表示细菌破碎后的上清和沉淀。

M: Marker, 1-3 represent IPTG concentrations (0.05, 0.05, 1 mmol/L) and induction time (4h, 6h, 6h), a represent the supernate, b represents precipitate.

3.3 团头鲂 MamDf 重组蛋白的纯化

根据 3.2 对原核表达的条件优化, 确定在 37 °C、180 r/min、IPTG=0.05mmol/L 条件下, 诱导 6 h 时, 表达量最高。随后大量表达, 过柱纯化。如图 3-8 所示, 纯化后的重组蛋白条带单一, 纯度很高, 超微量分光光度计检测显示浓度约为 1.2 mg/mL, 符合后续多克隆抗体的制备要求。

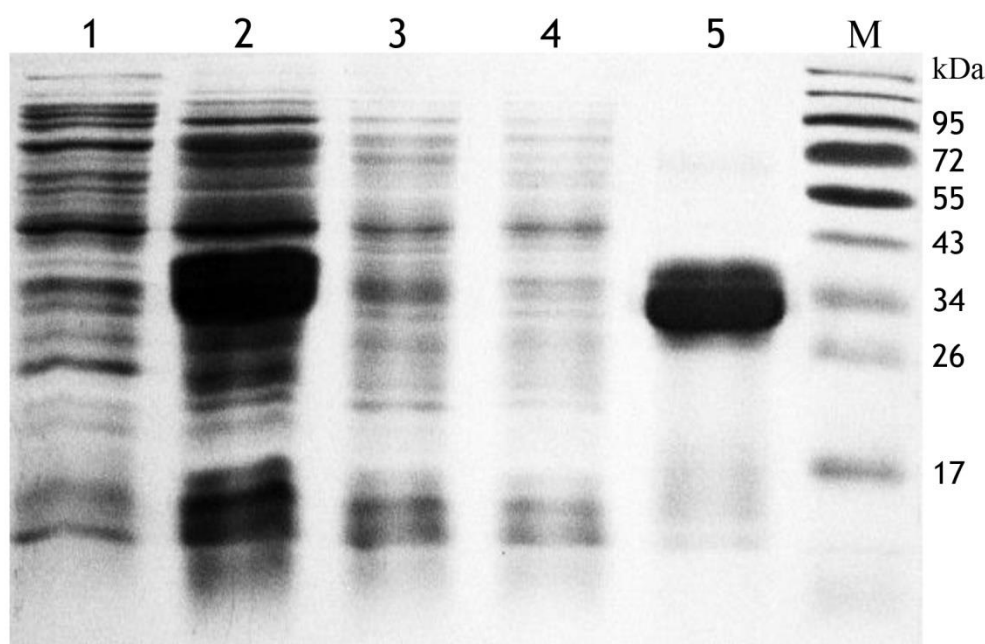


图 3-8 纯化后的 pET28a-Df 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3-8 SDS-PAGE electrophoregram of purified recombinant pET28a-Df proteins

1: IPTG 诱导后的上清, 2: IPTG 诱导后的沉淀, 3: 不加 IPTG 诱导的沉淀, 4: 加 IPTG 诱导的空载质粒, 5: 纯化后的重组蛋白, M: 蛋白 Marker

1: supernatant after IPTG induction; 2: pellet after IPTG induction; 3: pellet prior to IPTG induction; 4: Empty vector pellet after IPTG induction; 5: purified protein elution; M: Protein marker

3.4 Western blot

Western blot (Wb) 检测了多克隆抗体 (rabbit anti-Df) 的特异性, 结果如图 3-9 所示, 用重组 pET28a-Df 蛋白可以检测到与预测分子量接近的单一条带, 表明制备的多克隆抗体特异性较好。可以用于下一步实验。

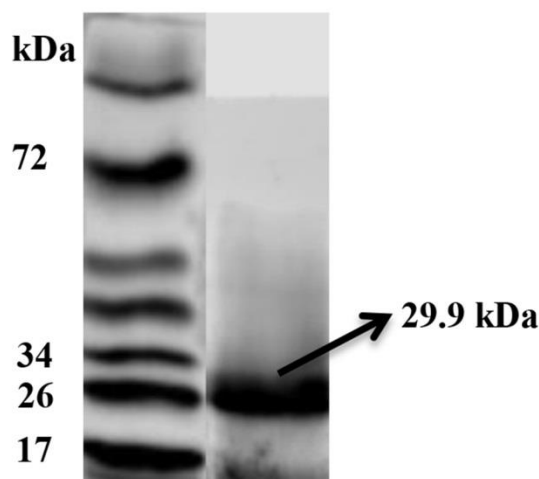


图 3-9 Western blot 分析制备的多克隆抗体的特异性

Fig. 3-9 Specificity analysis of the prepared antibody by Western blot

用制备的多克隆抗体进一步验证了团头鲂感染嗜水气单胞菌后肝脏、脾脏、肾脏和头肾蛋白水平的表达，结果表明（图 3-10），在肝脏中，4 h 蛋白表达量最高；在脾脏中，24 h 时蛋白表达量明显高于其它时间点；在肾脏中，4 h 达到最大值，随后下调至对照组水平；在头肾中，4 h 和 5 d 时 Df 蛋白表达量都很高，且都高于其它时间点。这些表达量的变化趋势，与 mRNA 水平的表达模式类似。

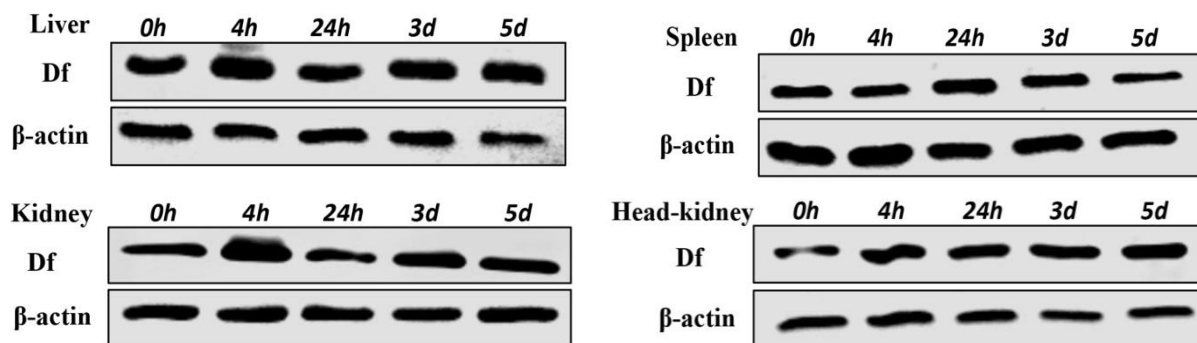


图 3-10 Western blot 分析团头鲂 MamDf 在嗜水气单胞菌感染后肝脏、脾脏、肾脏和头肾中的表达

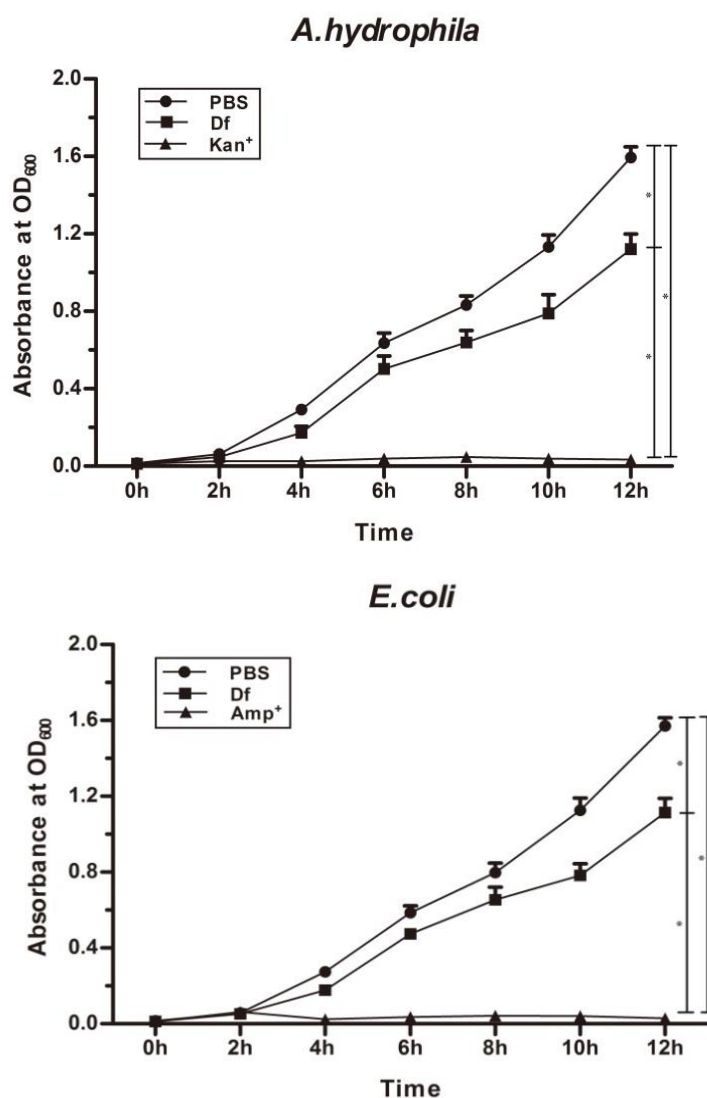
Fig. 3-10 Expression analysis of the *MamDf* gene in the liver, spleen, kidney and head-kidney post

A. hydrophila infection by Western blot

3.5 重组蛋白抑菌活性检测

为了研究原核表达得到的 MamDf 重组蛋白是否具有抑菌活性，选择了嗜水

气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行抑菌实验。结果如图 3-11 所示，MamDf 重组蛋白对 3 种细菌的生长有明显的抑制效果，在 2 h 之前，嗜水气单胞菌和大肠杆菌的生长无明显的影响，2 h 之后，重组蛋白对其生长起到了明显的抑制；在 4 h 之前，金黄色葡萄球菌的生长无明显变化，4 h 之后重组蛋白对金黄色葡萄球菌的生长起到了明显的抑制效果。而且，重组 MamDf 对革兰氏阴性菌的抑制效果较好。



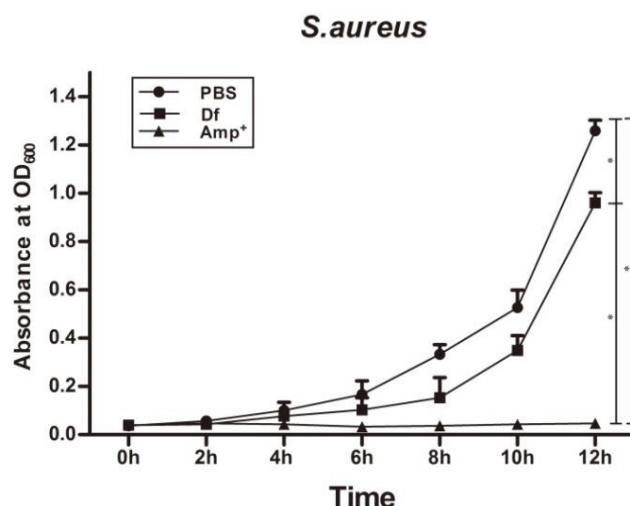


图 3-11 MamDf 重组蛋白对革兰氏阴性菌（嗜水气单胞菌和大肠杆菌）和革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌）的抑菌活性检测

Fig. 3-11 The bacteriostatic activity of the recombinant MamDf protein against gram-negative bacteria (*A. hydrophila* and *E. coli*) and gram-positive bacteria (*S. aureus*)

注：“*”表示两两处理间有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

Note: Statistically significant differences between every two treatments are denoted with “*” ($P < 0.05$).

4 讨论

团头鲂 *MamDf* 基因结构域分析表明, *MamDf* 含有一个丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶超家族结构域、三个底物结合位点和三个活性位点, 它们在脊椎动物中完全的保守, 表明它们对维持基因功能的重要性。N-糖基化位点是真核生物中常见的蛋白翻译后修饰过程, 参与许多生物过程 (Naegeli and Aebi 2015)。但在团头鲂 *MamDf* 中没有发现 N-糖基化位点, 这和草鱼、斑马鱼、猪 (Miner et al 2001) 和人类 (Pascual et al 1993) 中的 *Df* 一样, 但是斑点叉尾鲷中有两个 N-糖基化位点, 橄榄比目鱼中有三个 N-糖基化位点, 表明 *Df* 在不同物种中可能具有不同的功能。在本研究中, 确定了团头鲂 *MamDf* 基因由 4 个内含子和 5 个外显子构成, 硬骨鱼类和哺乳动物中的 *Df* 呈现相对稳定的基因结构, 内含子和外显子的数量相同, 外显子长度也很相似, 但是内含子长度却明显不同。团头鲂 *MamDf*

的三级结构类似于酚氧化酶活化因子,它介导了无脊椎动物胚胎发育和免疫反应的蛋白水解级联反应,表明 MamDf 可能具有更加复杂的功能。系统进化分析表明,鱼类 Df 和哺乳动物 Df 具有共同的祖先,但是虹鳟和大西洋鲑很特别,被归类到了哺乳动物那一支,说明虹鳟和大西洋鲑比其它鱼类有更高的进化地位。

本研究采用了 pET28a 原核表达载体,并且优化了表达条件,但是最终重组蛋白还是在包涵体内表达,一方面是由于 pET28a 这种载体没有溶解性高的融合蛋白,也没有促进二硫键形成的酶的融合蛋白,且不含信号肽,蛋白在形成过程中,很难进行进一步的加工和折叠,蛋白质空间舒展,非常不稳定,所有形成包涵体的可能性很大,另一方面,融合蛋白是否在包涵体中表达,主要受到目标蛋白理化性质和空间结构的影响 (Mirkalantari et al 2012; Sarmitha et al 2012)。

已有研究表明补体因子具有蛋白酶水解活性和抑菌活性。在条石鲷 (Godaheva et al 2016) 和鲤 (Yano et al 1994) 中,已经证明了重组 Df 蛋白具有蛋白酶水解活性。此外,先前报道了 C3b 和 C4b 可以共价结合微生物并使细菌更易于被吞噬细胞吞噬 (Ellis 1999),另一项研究表明, Ba 可以抑制迟缓爱德华氏菌、荧光假单胞菌和哈维氏弧菌的繁殖 (Li and Sun 2017),然而关于重组 Df 蛋白是否具有抑菌活性的研究很少。在本研究中,重组 MamDf 蛋白表现出了对嗜水气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用,并且对革兰氏阴性菌 (嗜水气单胞菌和大肠杆菌) 的抑制作用要强于格兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌)。基于先前的研究 (Ambrus et al 1990; Praz 1986) 猜想可能的抑菌机制,可能是 MamDf 重组蛋白可以通过溶解细菌细胞壁来影响细胞膜通透性来杀死或抑制细菌增殖而起到抑菌作用。有研究表明,丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶家族结构域可以部分反映 Df 的功能,这一结构域是否在抑菌过程中发挥免疫作用需要进一步研究。

目前没有报告过有关 Df 蛋白在感染嗜水气单胞菌后的表达情况,本研究中,检测了团头鲂感染嗜水气单胞菌后的肝脏、脾脏、肾脏和头肾中蛋白水平的表达,结果表明,在肝脏和肾脏中 4h 蛋白表达量最高,这与 mRNA 水平的表达一致;在脾脏中,24h 时蛋白表达最高,也和 mRNA 水平的表达一样;在头肾中, MamDf 基因 mRNA 在 4h 表达量显著上调且达到最大值,5d 时显著下调,但是蛋白水平在 4h 和 5d 时蛋白表达量都很高,说明在头肾中,5d 时 MamDf 仍然起着重要的作用。

参考文献

1. 柴欣. 团头鲂 MHC II α 基因的 SNP 位点开发、鉴定及与抗病性状关联分析. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2017
2. 范君. 团头鲂 4 个补体基因表达分析及 Bf/C2A 基因 SNP 的开发与鉴定. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2016
3. 扶晓琴, 丁祝进, 王卫民, 刘红, 饶友亮. 团头鲂白细胞介素 6 基因启动子报告载体的构建及活性分析. 华中农业大学学报, 2016, 1:86-91
4. 耿瑞静, 谢明辉, 王卫民, 刘寒. 团头鲂的微卫星亲子鉴定. 淡水渔业, 2018, 4: 9-15
5. 郭宝英, 张川, 祁鹏志, 张建成, 管奥, 陈宇, 毋玉婷, 吴常文. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)补体调节因子 CFH 和 CFHR2 基因的分子特征及表达分析. 海洋与湖沼, 2015, 6: 1405-1412
6. 贾永义, 顾志敏, 叶金云, 陈立侨, 朱俊杰, 黄鲜明, 杨元杰. 翘嘴红鲌(♀)×团头鲂(♂)杂种 F1 的形态特征及遗传标记分析. 上海海洋大学学报, 2011, 20: 198-203
7. 金承玲, 方苹. 江苏省嗜水气单胞菌流行病学调查. 水产养殖, 2018, 6:51-52
8. 赖瑞芳. 团头鲂 Toll 样受体基因序列分析及其表达研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2016
9. 李军, 张海明. 团头鲂胚胎及仔稚鱼发育观察. 水产科技情报, 1993, 20: 158-163
10. 李麒麟. 团头鲂胚胎发育的转录组分析. [硕士学位论文]. 长沙: 湖南师范大学, 2015
11. 李思发. 长江重要鱼类生物多样性和保护研究. 上海: 上海科学技术出版社, 2001, 63-71
12. 陆春云, 习丙文, 叶诗尧, 梁利国, 谢骏. 多个环境因素对嗜水气单胞菌感染团头鲂致病力的影响. 生态学杂志, 2015, 34: 2025-2029
13. 田甜, 胡火庚, 陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究. 华中农业大学学报, 2010, 29: 341-345
14. 夏飞. 团头鲂源嗜水气单胞菌分离鉴定、检测及绿色荧光蛋白标记菌株的构建. [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2012
15. 于淼, 方健, 薛亭, 陈凯, 李玲玉, 潘启华, 王艺舟, 邓羽, 陈天圣. 团头鲂的胚胎发育与观察方法优化. 河南师范大学学报(自然版), 2018, 1: 89-94
16. 虞鹏程, 张丰旺. 鄱阳湖渔区的团头鲂胚胎发育观察. 中国水产科学, 1998, 5: 103-108
17. 詹柒凤, 丁祝进, 崔蕾, 范军, 王卫民, 刘红. 团头鲂 NK-lysin 基因鉴定和表达分析. 水产学报, 2016, 8: 1145-1155
18. 张涓. 团头鲂 β -防御素基因的克隆、重组表达及抗菌作用研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2014
19. Abernathy JW, Lu J, Liu H, Kucuktas H, Liu Z. Molecular characterization of complement

- factor I reveals constitutive expression in channel catfish. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27:529-534
20. Alcorlo M, Tortajada A, Rodriguez d CS, Llorca O. Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110:13504-13509
21. Alcorlo M, Tortajada A, Rodriguez de Cordoba S, Llorca O. Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110:13504-13509
22. Ambrus JLJ, Peters MG, Fauci AS, Brown EJ. The Ba fragment of complement factor B inhibits human B lymphocyte proliferation. *J Immunol*, 1990, 144:1549-1553
23. Anastasiou V, Mikrou A, Papanastasiou AD, Zarkadis IK. The molecular identification of factor H and factor I molecules in rainbow trout provides insights into complement C3 regulation. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31: 491-499
24. Blatt AZ, Pathan S, Ferreira VP. Properdin: a tightly regulated critical inflammatory modulator. *Immunol Rev*, 2016, 274:172-190
25. Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol*, 2003, 39: 669-675
26. Boshra H, Li J, Sunyer JO. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20: 239-262
27. Brooimans R. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol*, 1990, 144:3835-3840
28. Cai L, Zhu J, Yin D, Chen L, Jin P, Ma F. Identification and characterization of complement factor H in *Branchiostoma belcheri*. *Gene*, 2014, 553:42-48
29. Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Fremeaux-Bacchi V, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood*, 2011, 117:1340-1349
30. Catterall CF, Lyons A, Sim RB, Day AJ, Harris TJ. Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem J*, 1987, 242:849-856
31. Chondrou M, Papanastasiou AD, Spyroulias GA, Zarkadis IK. Three isoforms of complement properdin factor P in trout: Cloning, expression, gene organization and constrained modeling. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32: 1454-1466
32. Chuang KY, Lambris JD, Hajishengallis G, Ricklin D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 2010, 11:785-797
33. Clark SJ, Schmidt CQ, White AM, Hakobyan S, Morgan BP, Bishop PN. Identification of Factor H-like Protein 1 as the Predominant Complement Regulator in Bruch's Membrane: Implications for Age-Related Macular Degeneration. *J Immunol*, 2014, 193:4962-4970

34. Cordoba SRd, Jorge EGD. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151:1-13
35. Cortes C, Ohtola JA, Saggu G, Ferreira VP. Local release of properdin in the cellular microenvironment: role in pattern recognition and amplification of the alternative pathway of complement. *Front Immunol*, 2013, 3: 412
36. Corvillo F, Bravo Garcia-Morato M, Nozal P, Garrido S, Tortajada A, Rodriguez de Cordoba S, Lopez-Trascasa M. Serum properdin consumption as a biomarker of C5 convertase dysregulation in C3 glomerulopathy. *J Clin Exp Immunol*, 2016, 184:118-125
37. Das D, Murzin AG, Rawlings ND, Finn RD, Coggill P, Bateman A, Godzik A, Aravind L. Structure and computational analysis of a novel protein with metallopeptidase-like and circularly permuted winged-helix-turn-helix domains reveals a possible role in modified polysaccharide biosynthesis. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15:1-12
38. Demberg T, Pollok-Kopp B, Gerke D, Gotze O, Schlaf G. Rat Complement Factor H: Molecular Cloning, Sequencing and Quantification with a Newly Established ELISA. *Scand J Immunol*, 2002, 56: 149-160
39. Devine DV, Rosse WF. Regulation of the activity of platelet-bound C3 convertase of the alternative pathway of complement by platelet factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84:5873-5877
40. Ellis AE. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9: 291-308
41. Elvington M, Liszewski MK, Atkinson JP. Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. *Immunol Rev*, 2016, 274: 9-15
42. Farries TC, Steuer KKL, Atkinson JP. Evolutionary implications of a new bypass activation pathway of the complement system. *Immunol Today*, 1990, 11: 78-80
43. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Integr Med*, 1975, 142:856-863
44. Felipe MJB. *The Immune System: Equine Clinical Immunology*. John Wiley & Sons, Inc, 2016
45. Ferreira VP, Cortes C, Pangburn MK. Native polymeric forms of properdin selectively bind to targets and promote activation of the alternative pathway of complement. *Immunobiology*, 2010, 215: 932-940
46. Fujii T, Nakamura T, Sekizawa A, Tomonaga S. Isolation and characterization of a protein from hagfish serum that is homologous to the third component of the mammalian complement system. *J Immunol*, 1992, 148: 117-123
47. Gallego JIS, Nita IM, Nilsson SC, Trouw LA, Villoutreix BO, Blom AM, Mansson L. Analysis of binding sites on complement Factor I that are required for its activity. *J Biol Chem*, 2010, 285:2256-2256

48. Gao Z, Ma Z, Qu B, Jiao D, Zhang S. Identification and characterization of properdin in amphioxus: Implications for a functional alternative complement pathway in the basal chordate. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 65:1-8
49. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals, *Mol Immunol*, 2004, 41: 1089-1098
50. Godahewa GI, Perera NC, Bathige SD, Nam BH, Noh JK, Lee J. Complement factor D homolog involved in the alternative complement pathway of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular and functional characterization and immune responsive mRNA expression analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 55:423-433
51. Goicoechea d JE. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*, 2004, 41:355-367
52. Goldberger G, Bruns GA, Rits M, Edge MD, Kwiatkowski DJ. Human complement factor I: analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4. *J Biol Chem*, 1987, 262:10065-10071
53. Goundis D, Reid KBM. Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. *Nature*, 1988, 335:82-85
54. Hajnik, CA, Goetz FW, Hsu SY, Sokal N. Characterization of a ribonucleic acid transcript from the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary with structural similarities to mammalian adipsin/complement factor D and tissue kallikrein, and the effects of kallikrein-like serine proteases on follicle contraction. *Biol Reprod*, 1998, 58:887-897
55. Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med*, 2008, 12:1074-1084
56. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*, 2003, 34: 4501-4524
57. Hegasy GA, Willhoeft U, Majno SA, Seeberger H, Zipfel PF, Hellwage J. Pig complement regulator factor H: molecular cloning and functional characterization. *Immunogenetics*, 2003, 55:462-471
58. Heja D, Kocsis A, Dobo J, Szilagyi K, Szasz R, Zavodszky P, Pal G, Gal P. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *National Academy of Sciences (US)*, 2012, 109: 10498-10503
59. Hellwage J, Jokiranta TS, Friese MA, Wolk TU, Kampen E, Zipfel PF, Meri S. Complement C3b/C3d and Cell Surface Polyanions Are Recognized by Overlapping Binding Sites on the Most Carboxyl-Terminal Domain of Complement Factor H. *J Immunol*, 2002, 169:6935-6944
60. Higgins JMG, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB. Characterization of mutant forms of recombinant human properdin lacking single thrombospondin type I repeats. Identification of modules important for function. *J Immunol*, 1995, 155:5777-5785

61. Hohenester E, Sasaki T, Timpl R. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol*, 1999, 6:228-232
62. Holers VM. Complement and Its Receptors: New Insights into Human Disease. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32:433-459
63. Holland MC, Lambiris JD. The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12: 399-420
64. Horstmann RD, Müller-Eberhard HJ. Isolation of rabbit C3, Factor B, and Factor H and comparison of their properties with those of the human analog. *J Immunol*, 1985, 134:1094-1100
65. Hourcade, DE. The Role of Properdin in the Assembly of the Alternative Pathway C3 Convertases of Complement. *J Biochem Anal Stud*, 2006, 281:2128-2132
66. Inoue N, Fukui A, Nomura M, Matsumoto M, Nishizawa Y, Toyoshima K, Seya T. A Novel Chicken Membrane-Associated Complement Regulatory Protein: Molecular Cloning and Functional Characterization. *J Immunol*, 2001, 166:424-431
67. Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Gros P. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, 2005, 437:505-511
68. Katz Y, Strunk RC. Synthesis and regulation of complement protein factor H in human skin fibroblasts. *J Immunol*, 1988, 141:559-563
69. Kemper C, Mitchell LM, Zhang L, Hourcade DE. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105:9023-9028
70. Kimura Y, Inoue N, Fukui A, Oshiumi H, Matsumoto M, Nonaka M, Kuratani S, Fujita T, Nonaka M, Seya T. A Short Consensus Repeat-Containing Complement Regulatory Protein of Lamprey That Participates in Cleavage of Lamprey Complement 3. *J Immunol*, 2004, 173:1118-1128
71. Kong HJ, Hong GE, Nam BH, Kim YO, Kim WJ, Lee SJ, Lee NS, Do JW, Cho HK, Cheong J, Lee CH, Kim KK. An immune responsive complement factor D/adipsin and kallikrein-like serine protease (PoDAK) from the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27: 486-492
72. Kouser L, Abdul-Aziz M, Tsolaki AG, Singhal D, Schwaeble WJ, Urban BC, Khan HA, Sim RB, Kishore U. A recombinant two-module form of human properdin is an inhibitor of the complement alternative pathway. *Mol Immunol*, 2016, 73:76-87
73. Krem MM, Cera ED. Molecular markers of serine protease evolution. *Embo Journal*, 2001, 20: 3036-3045
74. Kristensen T, Tack BF. Murine protein H is comprised of 20 repeating units, 61 amino acids in length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83:3963-3967

75. Kunnathmuglia LM, Chang GH, Sim RB, Day AJ, Ezekowitz RA. Characterization of *Xenopus laevis* complement factor I structure--conservation of modular structure except for an unusual insert not present in human factor I. *Mol Immunol*, 1993, 30:1249-1256
76. Li XP, Sun L. A teleost complement factor Ba possesses antimicrobial activity and inhibits bacterial infection in fish. *Dev Comp Immunol*, 2017, 71:49-58
77. Makou E, Herbert AP, Barlow PN. Creating functional sophistication from simple protein building blocks, exemplified by factor H and the regulators of complement activation. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43:812-818
78. Masaru N, Fumiko Y. Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13:69-73
79. Maves KK, Guenther ST, Densen P, Moser DR, Weiler JM. Cloning and characterization of the cDNA encoding guinea-pig properdin: a comparison of properdin from three species. *Immunol*, 1995, 86:475-479
80. Menger M, Aston WP. Isolation and characterization of the third component of bovine complement. *Vet Immunol Immunopathol*, 1985, 10:317-331
81. Merle NS, Elizabeth CS, Veronique FB, Roumenina LT. Complement System Part I a. *Front Immunol*, 2015, 6: 262
82. Miner J L, Hahn K J, Spurlock ME, Staten NR. Expression and Complement D Activity of Porcine Adipsin. *Protein Expr Purif*, 2001, 23: 14-21
83. Minta JO, Wong MJ, Kozak CA, Kunnath-Muglia LM, Goldberger G. cDNA cloning, sequencing and chromosomal assignment of the gene for mouse complement factor I (C3b/C4b inactivator): Identification of a species specific divergent segment in factor I. *Mol Immunol*, 1996, 33:101-112
84. Mirkalantari S, Amirmozafari N, Kazemi B, Irajian G. Molecular cloning of virB12 gene of *Brucella melitensis* 16M strain in pET28a vector. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5:511-513
85. Morgan BP, Harris CL. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 857-877
86. Muller-Eberhard, JH. Molecular Organization and Function of the Complement System. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57:321-347
87. Naegeli A, Aebi M. Current Approaches to Engineering N-Linked Protein Glycosylation in Bacteria. *Methods Mol Biol*, 2015, 1321: 3-16
88. Naff GB, Hedrick SW, Ratnoff WD, Novak MA, Smith MC, Steiner C, Todd EW. The rabbit properdin system: I. Identification of a new factor and purification of rabbit properdin. *J Immunol*, 1980, 124:2625-2631
89. Nakao M, Hisamatsu S, Nakahara M, Kato Y, Smith SL, Yano T. Molecular cloning of the complement regulatory factor I isotypes from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Immunogenetics*, 2003, 54:801-806

90. Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35: 1296-1308
91. Nilsson SC, Sim RB, Lea SM, Fremeaux-Bacchi V, Blom AM. Complement factor I in health and disease. *Mol Immunol*, 2011, 48:1611-1620
92. Nilsson SC, Trouw LA, Renault N, Miteva MA, Genel F, Zelazko M, Marquart H, Muller K, Sjöholm AG, Truedsson L, Villoutreix BO, Blom AM. Genetic, molecular and functional analyses of complement factor I deficiency. *Eur J Immunol*, 2009, 39: 310-323
93. Nilsson UR, Muller-Eberhard HJ. Isolation of BETA IF-globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. *J Exp Med*, 1965, 122:277-298
94. Pagliarunga S, Schrauwen P, Roy C, Moonen-Kornips E, Lu H, Hesselink MK, Deshaies Y, Richard D, Cianflone K. Reduced adipose tissue triglyceride synthesis and increased muscle fatty acid oxidation in C5L2 knockout mice. *J Endocrinol Diabetes*, 2007, 194:293-304
95. Pascual M, Plastre O, Montdargent B, Labarre D, Schifferli JA. Specific interactions of polystyrene biomaterials with factor D of human complement. *Biomaterials*, 1993, 14:665-670
96. Patrick M, Luckett JC, Yue L, Stover C. Dual role of complement in adipose tissue. *Mol Immunol*, 2009, 46:755-760
97. Ponten, F, Jirstrom, K, Uhlen M. Human Protein Atlas--a tool for pathology. *J Pathol*, 2010, 216:387-393
98. Praz, F. Growth-supporting activity of fragment Ba of the human alternative complement pathway for activated murine B lymphocytes. *J Exp Med*, 1986, 163:1349-1354
99. Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology*, 2007, 212: 151-157
100. Riley SP, Fish AI, Del PF, Martinez JJ. Immunity against the Obligate Intracellular Bacterial Pathogen *Rickettsia australis* Requires a Functional Complement System. *Infect Immun*, 2018, 86 : 00139-18
101. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 64:355-365
102. Sabbioni MEE, Siegrist HP, Bacchi M. Association between immunity and prognostic factors in early stage breast cancer patients before adjuvant treatment. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 59: 279-287
103. Sanchez-Gallego JJ, Groeneveld TW, Krentz S, Nilsson SC, Villoutreix BO, Blom AM. Analysis of binding sites on complement factor I using artificial N-linked glycosylation. *J Biol Chem*, 2012, 20: 13572-13583
104. Sarmitha S, Shin JA, Dipankar C. Boundaries of the Origin of Replication: Creation of a pET-28a-Derived Vector with p15A Copy Control Allowing Compatible Coexistence with pET Vectors. *PLoS One*, 2012, 7:e47259

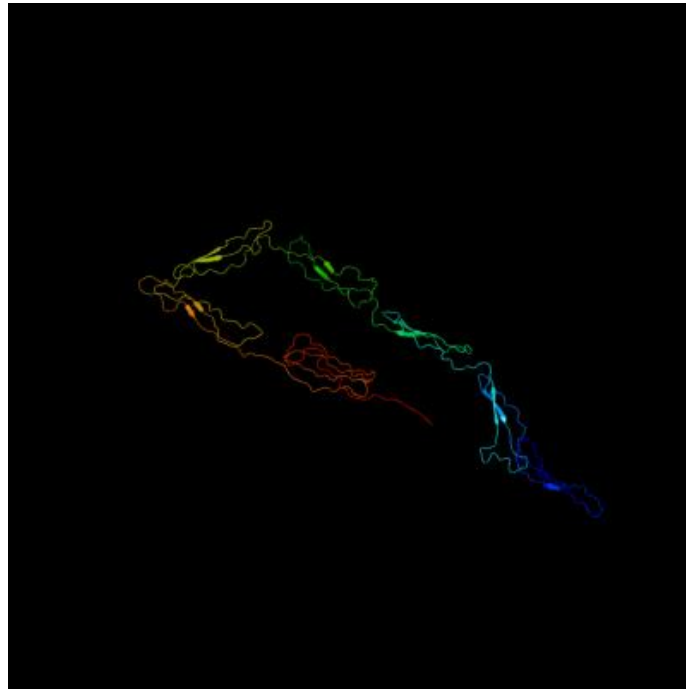
105. Schlaf G, Rothermel E, Oppermann M, Schieferdecker HL, Jungermann K, Gotze O. Rat complement factor I: Molecular cloning, sequencing and expression in tissues and isolated cells. *Immunology*, 2010, 98:464-474
106. Schwaeble W, Dippold WG, Schafer MK, Pohla H, Jonas D, Luttig B, Weihe E, Huemer HP, Dierich MP, Reid KB. Properdin, a positive regulator of complement activation, is expressed in human T cell lines and peripheral blood T cells. *J Immunol*, 1993, 151:2521-2528
107. Shin DH, Webb BM, Nakao M, Smith SL. Characterization of shark complement factor I gene(s): genomic analysis of a novel shark-specific sequence. *Mol Immunol*, 2009, 46:2299-2308
108. Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32:21-27
109. Sinh VK, Sharma OP, Suresh KM. Insight into the Intermolecular Recognition Mechanism Involved in Complement Component 4 Activation through Serine Protease-Trypsin. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, 36: 1-38
110. Stockhammer OW, Rauwerda H, Wittink FR, Breit TM, Meijer AH, Spaik HP. Transcriptome analysis of Traf6 function in the innate immune response of zebrafish embryos. *Mol Immunol*, 2010, 48:179-190
111. Sun G, Li H, Wang Y, Zhang B, Zhang S. Zebrafish complement factor I and its related genes: identification, evolution, and expression. *Funct Integr Genomics*, 2010, 10:577-587
112. Sunyer JO, Boshra H, Lorenzo G, Parra D, Freedman B, Bosch N. Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunol Res*, 2003, 27:549-564
113. Sunyer JO, Zarkadis I, Sarrias MR, Hansen JD, Lambris JD. Cloning, structure and function of two rainbow trout Bf molecules. *J Immunol*, 1998, 161:4106-4114
114. Tsiftoglou SA, Sim RB. Human Complement Factor I Does Not Require Cofactors for Cleavage of Synthetic Substrates 1. *J Immunol*, 2004, 173:367-375
115. Tsiftoglou SA, Willis AC, Li P, Chen X, Mitchell DA, Rao Z, Sim RB. The Catalytically Active Serine Protease Domain of Human Complement Factor I. *Biochemistry*, 2005, 44:6239-6249
116. Ullman CG, Perkins SJ. The Factor I and follistatin domain families: the return of a prodigal son. *Biochem J*, 1997, 326:939-941
117. Upasana S, Ioannis E. Evolution and Function of Thioester-Containing Proteins and the Complement System in the Innate Immune Response. *Front Immunol*, 2017, 8: 759
118. Van Kooyk Y, Rabinovich G. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 2008, 9:593-601
119. Volanakis JE, Barnum SR, Giddens M, Galla JH. Renal filtration and catabolism of complement protein D. *N Engl J Med*, 1985, 312:395-399
120. Volanakis JE, Narayana SV. Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci*, 2010,

5:553-564

121. Vyse TJ, Bates GP, Walport MJ, Morley BJ. The Organization of the Human Complement Factor I Gene (IF): A Member of the Serine Protease Gene Family. *Genomics*, 1994, 24: 90-98
122. Wang Y, Chen B, Ke Y, Wang C, Ye B. Molecular characterization and expression analysis of the complement factor I (CpFI) in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*). *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 40:414-423
123. Whaley K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med*, 1980, 151:501-516
124. Woo S, Denis V, Yum S. Transcriptional Changes Caused by Bisphenol A in *Oryzias javanicus*, a Fish Species Highly Adaptable to Environmental Salinity. *Mar Drugs*, 2014, 12:983-998
125. Xiang JS, Li XH, Chen YD, Lu Y. Complement factor I from flatfish half-smooth tongue (*Cynoglossus semilaevis*) exhibited anti-microbial activities. *Dev Comp Immunol*, 2015, 53:199-209
126. Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE. Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev*, 2001, 180: 123-135
127. Yano T, Nakao M. Isolation of a carp complement protein homologous to mammalian factor-D. *Mol Immunol*, 1994, 31:337-342
128. Yu H, Munoz EM, Edens RE, Linhardt RJ. Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. *BBA-General Subjects*, 2005, 1726:168-176
129. Zhang Y, Chen J, Yao F, Ji D, Li H, Zhang S. Expression and functional analysis of properdin in zebrafish *Danio rerio*. *Dev Comp Immunol*, 2013, 40:123-131
130. Zhou Z, Liu H, Liu S, Sun F, Peatman E, Kucuktas H, Kaltenboeck L, Feng T, Zhang H, Niu D, Lu J, Waldbieser G, Liu Z. Alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Molecular characterization, mapping and expression analysis of factors Bf/C2 and Df. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32: 186-195
131. Zipfel PF, Jozsi M. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*, 2008, 29: 380-387
132. Zipfel PF, Mihlan M, Skerka C. The alternative pathway of complement: a pattern recognition system. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 598:80-92
133. Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, Jokiranta ST, Meri S, Brade V, Kraiczy P, Noris M, Remuzzi G. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30:971-978
134. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Drug Discov*,

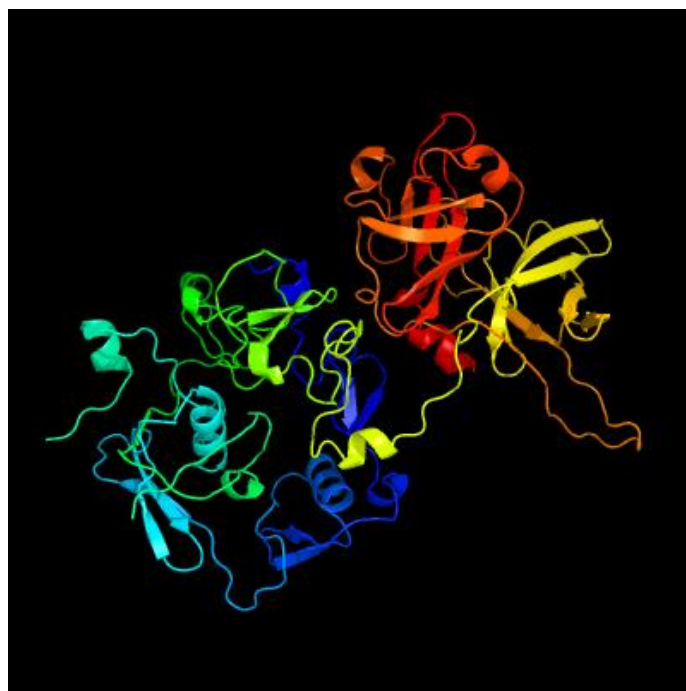
2009, 9:729-740

附录



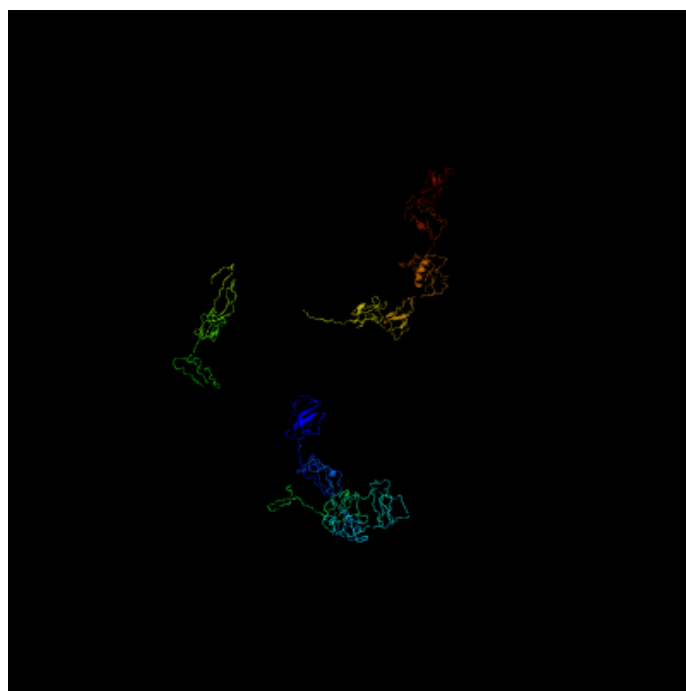
附图 2-1 Phyr2 预测的团头鲂 Pf 蛋白三级结构

Supplemental Fig.2-1 Pf protein tertiary structure prediction via the software of Phyr2 in blunt
Snout bream



附图 2-2 Phyr2 预测的团头鲂 If 蛋白三级结构

Supplemental Fig.2-2 If protein tertiary structure prediction via the software of Phyr2 in blunt
Snout bream



附图 2-3 Phyr2 预测的团头鲂 Hf 蛋白三级结构

Supplemental Fig.2-3 Hf protein tertiary structure prediction via the software of Phyr2 in blunt
Snout bream

附表 3-1 包涵体纯化溶液配制

Supplemental Table 3-1 Preparation of inclusion body purification solution

Buffer(100 mL)	Tris-HCl(g)	NaCl(g)	EDTA(g)	Triton-100(mL)	Urea (g)
Buffer 1	0.24228	2.922	0.0037224	-	-
Buffer 2	0.24228	2.922	0.0037224	0.5	-
Buffer 3	0.24228	2.922	0.0037224	-	6.006
Buffer 4	0.24228	2.922	0.0037224	-	12.012
Buffer 5	0.24228	2.922	0.0037224	-	48.048

附表 3-2 透析液的配制

Supplemental Table 3-2 Preparation of dialysate

透析液(1 L)	Tris-HCl (g)	NaCl (g)	EDTA (g)	Urea (g)	GSSG (g)	GSH (g)	Arg (g)	Glycerin (mL)
透析液 1	6.057	2.922	0.37224	240.24	0.01225	0.61464	10	100
透析液 2	6.057	2.922	0.37224	180.18	0.01225	0.61464	10	100
透析液 3	6.057	2.922	0.37224	120.12	0.01225	0.61464	10	100
透析液 4	6.057	2.922	0.37224	60.06	0.01225	0.61464	10	100
透析液 5	6.057	2.922	0.37224	30.03	0.01225	0.61464	10	100
透析液 6	6.057	2.922	-	-	-	-	-	-

附表 3-3 蛋白纯化缓冲液的配制

Supplemental Table 3-3 Preparation of protein purification buffer

Buffer (1 L)	Urea (g)	NaH ₂ PO ₄ (g)	Tris-HCl (g)	pH
Lysis Buffer	480.50	15.60	15.76	8.0
Wash Buffer	480.50	15.60	15.76	6.3
Elution Buffer	480.50	15.60	15.76	4.5

注：使用盐酸溶液调节 pH，之后用 0.22 或者 0.45 μ m 滤膜过滤除菌。

攻读学位期间发表论文情况

1. **Ming Ding**, Jun Fan, Weimin Wang, Huanling Wang, Hong Liu. Molecular characterization, expression and antimicrobial activity of complement factor D in *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 89:43-51

致谢

时光如白驹过隙，三年的研究生生活就要落下帷幕，除了知识和技能上的提高，更重要的是三年的时间我沉淀了自己，明确了自己未来的方向。成长总是让人欣喜的，这个过程中充满了艰难和苦涩，但是更多的是收获和憧憬。这一切的一切，首先要感谢我身处于其中的这个日新月异的伟大时代，让我拥有获取知识、追求理想的机会。我还要感谢我的母校--华中农业大学，她为成千上万的像我一样热爱水产事业的学生提供了良好的学习环境和实现梦想的舞台，让我们在其中发挥所长。学习生活中没有指引会迷失方向，没有鼓励会失去前进的动力，没有陪伴会丧失前行的勇气。我是何等的幸运，一直以来敬爱的老师、亲爱的师兄师姐师弟师妹和同学朋友们都给予了我及时的指导、亲切的鼓励和温暖的陪伴，没有他们的帮助，我想我很难走到终点。

回首三年的学习生活，我特别想感谢我的导师刘红教授。刘老师学识渊博，平易近人，是大家公认的好老师。在平时的科研中，刘老师总是耐心细致的指导我，遇到实验问题，刘老师总是会提供极有价值的意见，给我很大的启发。在生活中，刘老师就像我们的朋友一样，时常给我们鼓励和关怀。刘老师对学术科研的探索精神和对生活的乐观精神始终感染着我、激励着我，将使我终生受益。师恩难忘，在此，我谨向刘红老师致以最诚挚的敬意和由衷的感谢。

再来，我要感谢实验室各位亲爱的兄弟姐妹们，我真诚的感谢我的师兄王启军、丁祝进、范军、柴欣、吴凡、张峰、黄岩、王伟峰，师姐崔蕾、胡晓坤、詹柒凤、黄春筱、廖晨蕾，同学王济秀、孙千惠、涂佳鹏、鲍凯凯、周旭、秦向峰，师弟张建、肖杰、许晓辉、李博、陈康、杜景豪，师妹罗航、武佳琪、侯春秀等给我的帮助和鼓励，让我在一个团结和谐的氛围里度过了愉快的三年时光。

感谢我的舍友周洋和李创，从我进华农以来，一直给我生活和思想上的帮助，我们评论时事，探讨真理，这些都将成为我人生的宝贵财富。

最后，我要感谢我的父母和家人，他们无私的爱和支持，让我成长的每一步都走的坚实，谢谢你们，愿我爱的人一生平安。

感谢所有支持过我、帮助过我、鼓励过我和理解过我的人们！谢谢你们！

丁明 2019 年 6 月于狮子山下