

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00348

鲍免疫相关基因和蛋白的研究进展

任洪林^{1,2}, 柳增善¹, 王克坚²

1. 人兽共患病研究教育部重点实验室 吉林大学人兽共患病研究所, 长春 130062;
2. 近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005

摘要: 鲍是世界重要的海水养殖经济贝类, 但近年来时常发生的疾病给养鲍业带来了大量的经济损失。目前有关鲍免疫相关基因和蛋白的研究报道较少, 而这些功能分子对揭示鲍的免疫机制具有关键作用, 文章综述了鲍免疫相关基因和蛋白的研究进展, 以期防治鲍疾病的相关研究提供参考。

关键词: 鲍; 免疫机制; 抗氧化; 抗感染; 免疫相关分子

Progresses on immune-related genes and proteins of abalones

REN Hong-Lin^{1,2}, LIU Zeng-Shan¹, WANG Ke-Jian²

1. Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China;
2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Abalones, belonging to one of the largest marine gastropod mollusks, are economically important seafood in aquaculture worldwide. In recent years, bacterial epidemic infection has been reported in China and other countries, and mass mortality in abalones causes significant economic losses. Immune-related genes and proteins of abalones are seldom reported. However, these functional molecules may play a key role in resisting diseases and maintaining healthy status and are pivotal for studying immunological mechanisms. Here we summarized the advanced research and progresses in abalone immune-related genes and proteins with the purpose of facilitating future study of these target molecules involved in immunological mechanisms.

Keywords: abalone; immunological mechanism; antioxidant; antiinfective; immune-related molecular

鲍隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、前鳃亚纲(Prosobranchia)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae),以其丰富的营养价值在民间一直被认为是与鱼翅、燕窝齐名的营养食品。养殖鲍市场价格高且稳定,销路畅通,利润空间大,深受水产养殖户的欢迎,是我国重要的海水养殖经济物种。但近年来由于养殖海域水质影响及养殖鲍

种自身退化,使得人工养殖鲍抗病力低,时有疾病发生,带来很大的经济损失。因此,寻求免疫防治是保障鲍养殖业健康发展的重要措施。

与脊椎动物相比,有关软体动物免疫方面的研究工作报道较少,而且主要集中在双壳贝类,例如长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、贻贝(*Mytilus edulis*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等,有关鲍等腹足类的免疫

收稿日期: 2008-09-18; 修回日期: 2008-12-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863计划)(编号: 2007AA091406)资助

作者简介: 任洪林(1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子生物学与人兽共患病。Tel: 0431-87836716; E-mail: renhl@yahoo.cn

通讯作者: 王克坚(1964-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子生物学与分子毒理学。Tel: 0592-2184658; E-mail: wkjian@xmu.edu.cn

功能和机制的研究起步较晚。养殖鲍疾病的发生与环境因子变化密切相关, 环境中的生物因素和非生物因素均可引起鲍酚氧化酶、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、呼吸突发以及细胞吞噬等免疫学参数的变化。这些免疫学表现指标的变化, 涉及到相关基因和蛋白的表达变化。

1 免疫相关组织 cDNA 文库的构建和基因筛选

免疫相关基因的克隆最主要的一种方法, 是构建免疫组织器官 cDNA 文库, 然后通过筛库从文库中获得有意义的免疫相关基因进行深入的研究。国内仅见王艺磊等^[1]报道副溶血弧菌感染杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) 12 h 和 24 h 肝脏混合 cDNA 文库的构建。郑明刚等^[2]构建鳃弧菌攻毒皱纹盘鲍(*H. discus hannai*) 12 h、24 h 和 48 h 肝脏和肾脏混合 cDNA 文库, 并对文库做了较为大量的筛选工作。获得了 1 445 个 EST 序列, 高质量 EST 序列 1 282 个, 序列拼接后得到了多拷贝基因 244 个, 单拷贝基因 632 个。BLASTx 分析显示在 876 个基因聚类中共有 393 个获得了功能提示, 占总基因数的 45%; 537 个没有发现同源基因, 其功能不能确定, 占总基因数的 55%。任洪林等^[3, 4]构建细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞抑制性差减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)cDNA 文库, 克隆到 111 个血淋巴细胞表达基因, 证实 61 个基因受细菌攻毒的诱导在血淋巴细胞中上调表达。根据 GO (Gene ontology) 分类, 发现这些基因广泛分布于细胞代谢、信号传导、生物调控、免疫与应激等生物学过程中, 细菌可诱导鲍参与多种生物学过程的基因表达水平发生变化。Mah 等^[5]构建了桃红鲍(*H. corrugata*) 和红鲍(*H. rufescens*) 卵巢的 cDNA 文库, 并筛选到类穿孔素(Perforin-like) 基因 *abMpeg1*。Kim 等^[6]构建了盘鲍鳃和卵巢 cDNA 文库, 并从中筛选到 *Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 基因。De Zoysa 等^[7]构建了盘鲍(*H. discus discus*) 消化腺 cDNA 文库, 并陆续报道从文库中筛选到的铁蛋白、硫氧还蛋白^[8]、过氧化物酶^[9]等多个免疫相关基因。目前构建的免疫相关组织 cDNA 文库主要是细菌攻毒条件下的常规质粒^[2]和噬菌体^[1]文库, 以及利用 SSH 技术构建差减杂交 cDNA 文库^[3]。文库的筛选

方法趋向于利用大批量的测序, 高通量的获得免疫相关基因的结构信息, 利用互联网生物信息学工具预测基因功能, 为进一步研究鲍分子免疫机制提供靶标免疫相关基因。

2 鲍免疫相关基因和蛋白的结构及其功能

2.1 血蓝蛋白(Hemocyanin)

血蓝蛋白是一种高分子量的铜蛋白, 在许多软体动物血淋巴中作为细胞外运输氧的载体。研究最早、报道最多的是钥孔瓣血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)^[10], 它是一种海洋原始腹足类 *Megathura crenulata* 血淋巴液中的呼吸蛋白。20 世纪 60、70 年代, 研究人员就发现它可显著刺激人和动物的免疫功能, 60 年代常被用作免疫增强剂, 对人的细胞免疫和体液免疫都有很好的激活作用。在非免疫人体中, KLH 能够与淋巴细胞和人 IgG 结合。它可以作为小分子半抗原的载体, 刺激机体发生免疫反应, 产生相应的抗体。还可被特异的用于膀胱癌的治疗, 并且有望作为肿瘤神经苷脂和类粘液抗原表位的载体用于腺癌的治疗, 在临床上有着广泛的应用前景。由于 KLH 的免疫功能特性, 研究人员很早就阐明了它的基因和蛋白的结构特点。疣鲍(*H. tuberculata*) 血蓝蛋白(HtH)是目前研究最为清楚的鲍血蓝蛋白。它与 KLH 结构上相似, 同样发现了两种结构不同的血蓝蛋白异型体(HtH1 和 HtH2), 与 KLH 的两种异型体(KLH1 和 KLH2)相对应^[11]。每种血蓝蛋白由同一种大多肽链亚单位构成, 每个亚单位分子量大约为 400 kDa, 由 8 个不同的球型功能结构单位组成, 每个结构单位分子量大约为 50 kDa, 大约 20 个亚单位组成一个空心圆柱形四面体空间结构, 分子量大约为 8 MDa。

HtH1 cDNA 由 10 758 bp 组成, 编码 3 404 个氨基酸残基(缺少 5 非翻区和部分 5 端信号肽区), 分子量为 392 kDa; *HtH2* 编码 3 399 个氨基酸残基, 分子量为 392 kDa, 与 HtH1 氨基酸序列一致性为 66%。基因复制过程中由同一个祖先变异成两个不同的血蓝蛋白异型体, 这种分化大约出现在 3.2 亿年前。*HtH2* 基因全长 18 598 bp, 除分泌蛋白前的 5 区外, 内部还有 15 个外显子和 14 个内含子, 并含有多个微卫星丰富区^[12, 13]。KLH 与 HtH 有共同的进化祖先,

主要担负着血淋巴中氧气的运输, KLH 具有一定的免疫激活功能, 目前有稳定的产品和广泛的应用。比较他们相似的结构、生物化学和免疫学特性, HtH 可能同样具有相似的应用前景^[14]。

2.2 热休克蛋白(HSP)

热休克蛋白(Heat shock proteins)是高度保守的蛋白, 是所有生物体细胞主要的组成成份, 是细胞内蛋白正确折叠和定位的必要分子伴侣。在温度升高、组织受伤、重金属中毒、感染和放射性损伤等应激状态下, 以及正常细胞的发育和分化, 均可引起 HSP 的表达量升高。作为分子伴侣, 它可以保护蛋白避免变性, 还可以帮助错误折叠蛋白进行重折叠, 它靠细胞内蛋白水解作用除去。按照分子量将热休克蛋白分为 4 类: HSP90 家族、HSP70 家族(分子量约 66~78 kDa)、HSP60 家族以及小分子量 smHSP(分子量约 12~43 kDa)。在高等动物和一些低等动物中, HSP 报道的较多。在软体动物, HSP 与应激反应关系密切。

HSP70 家族分为组成型和诱导型的。哺乳动物、鱼类和软体动物体内均有组成型和诱导型的 HSP70 家族蛋白的报道。软体动物两个 HSP 异型体均可或多或少的被诱导表达, 正常细胞表达的组成型 HSP, 对蛋白折叠、运输和蛋白水解的调控有着重要的作用。这些蛋白很少被热诱导; 另一方面, 诱导型的正常情况下很少表达, 在应激情况下存在着过表达。例如温度达到 40 °C 时, 可诱导地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、菲律宾缀锦蛤(*Tapes philippinarum*)和不等壳毛蚶(*Scapharca inaequivalvis*)过表达 HSP70^[15]。软体动物 HSP90 的研究较少, HSP90 是二聚体, 结合固醇受体、蛋白激酶等细胞蛋白。另外, HSP90 也与肌动蛋白、微管蛋白(Tubulin)等细胞骨架蛋白结合。真核细胞内质网和细胞质中的 HSP70 和 HSP90 家族成员有一定的同源性^[16]。

Cheng 等^[17]克隆皱纹盘鲍 HSP70 cDNA (GenBank 登录号: DQ324856), 全长 2 631 bp, ORF 1 968 bp, 编码 655 个氨基酸残基。利用半定量 RT-PCR 的方法研究发现热休克和细菌攻毒后可使 HSP70 表达量提高, 表明 HSP70 与机体免疫反应有关。Farcy 等^[18]报道疣鲍原代培养血淋巴细胞 HSP70 和 HSP90 cDNA (AM283516 和 AM283515)。HSP70 cDNA 全

长 2 359 bp, 编码 651 个氨基酸残基, 分子量为 71 kDa, HSP90 cDNA 全长 2 600 bp, 编码 736 个氨基酸残基, 分子量为 84 kDa。利用实时定量 PCR (Real-time PCR)方法检测发现, 两种 HSP 在正常对照组存在着本底表达。但热应激后, 有明显的上调表达。除 HSP70 和 HSP90 以外, Wang 等^[4]报道了细菌攻毒可诱导 HSP40 基因上调表达, HSP 家族蛋白是生物体重要应激响应蛋白, 广泛的参与机体免疫防御、损伤修复、应激反应等过程。

2.3 抗氧化防御系统相关酶

抗氧化作用相关酶, 在机体防御系统中发挥重要的作用。呼吸突发是贝类免疫防御系统重要的免疫反应, 是机体对抗外来入侵物的有效手段。在呼吸突发过程中, 产生大量的超氧负离子、过氧化氢等活性氧, 发挥杀灭病原菌的作用。但就这些活性氧本身如果出现失控或泄露也可对机体造成损害。在这一系列过程中, 抗氧化防御系统在保证机体产生防御性活性氧和避免机体自身受到损害发挥重要的防御与保护功能。

除呼吸突发外, 需氧生物在机体内的酶促反应、呼吸链的电子传递以及小分子自身氧化等细胞正常代谢过程中也会产生活性氧等自由基。少量的自由基是生物体所必需的, 它们作为第二信使, 在信号传导过程中影响相关基因的表达, 具有重要的生理功能。但过多的自由基如果不能被及时清除, 它们会对生物体自身造成伤害, 引起 DNA 损伤、酶失活、脂质过氧化、细胞膜变性等一系列的过氧化损伤^[19]。为防止活性氧损伤机体, 生物体形成了一套完整的抗氧化系统来清除体内的活性氧。抗氧化系统包括非酶抗氧化剂和酶促抗氧化剂。非酶抗氧化剂是指维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽、胡萝卜素等有机或无机分子; 酶促抗氧化剂主要是指通过酶促反应清除过氧化物的酶类, 主要有超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)等。SOD 在清除活性氧反应过程中第一个发挥作用, 它将超氧阴离子自由基快速歧化为过氧化氢和分子氧, 过氧化氢在过氧化氢酶等酶的作用下, 转化为水和分子氧。因此, 在这一系列的过程中, 活性氧的产生和清除, 不但在免疫防御的

非特异免疫系统中发挥作用, 还在保护细胞免受氧化损伤过程中发挥作用。

2.3.1 超氧化物歧化酶(SOD)

Mann 等^[20]1938 年从牛(*Bos taurus*)血细胞中分离出铜蛋白。1969 年, McCord 等^[21]发现血铜蛋白具有将超氧化阴离子催化成过氧化氢的功能, 并正式命名为超氧化歧化酶。根据其包含的活性金属离子分为 6 种类型: Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD、Ni-SOD、Mn/Fe-SOD 和 Fe/Zn-SOD。SOD 基因在不同物种中大部分是以多基因家族形式存在。如在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中, 有 Cu/Zn-SOD 基因^[22]、线粒体 Mn-SOD 基因^[23]和细胞质 Mn-SOD 基因^[24]3 种类型。在鲍体内相继报道几种类型的 SOD, Kim 等^[6]克隆了盘鲍(*H. discus discus*)Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD cDNA (GenBank 登录号: DQ530214 和 DQ530210)。Cu/Zn-SOD cDNA 全长为 1 013 bp, 编码 154 个氨基酸残基, 推测分子量为 15 kDa, pI 值 5.74。Mn-SOD cDNA 全长 1 004 bp, 编码 226 个氨基酸残基, 预测分子量为 24 kDa, pI 值为 6.29。利用 real-time PCR 和半定量 PCR 方法分析, 在铜、锌和镉重金属暴露以及升高温度均可诱导 SOD 表达量提高。Ekanayake 等^[25]报道盘鲍线粒体 Mn-SOD (*mitMn-SOD*, GenBank 登录号: DQ821491) cDNA, 全长 960 bp, 编码 226 个氨基酸残基, 并使用 pMAL 载体与麦芽糖结合蛋白融合利用大肠杆菌 K12 表达。聚类分析与光滑双脐螺 Mn-SOD 亲缘关系最近。真核细胞线粒体 Mn-SOD 在细胞质中合成, 翻译后转移到线粒体基质中^[26]。线粒体是产生单价态氧的重要场所, 因此认为线粒体 Mn-SOD 是线粒体基质内主要的活性氧清除剂^[27]。Zhang 等^[28]报道杂色鲍胞质 Cu/Zn-SOD 及其响应三丁基锡(TBT)暴露差异表达的研究。该基因 cDNA 全长 984 bp, 编码 154 个氨基酸残基, 预测分子量为 15.7 kDa, pI 值为 6.3。基因组全长 5574 bp 包含 5 个外显子和 4 个内含子。肝胰腺内 Cu/Zn-SOD 表达量并没有随着 TBT 暴露的时间延长而有差异性表达变化。机体利用多种超氧化物歧化酶保护机体免受氧化损伤, 目前在真核生物体内发现 4 种 SOD, 分别是细胞质 Cu/Zn-SOD、糖基化细胞外 Cu/Zn-SOD、线粒体 Mn-SOD (mitMn-

SOD)和细胞质 Mn-SOD (cytMn-SOD)。目前在鲍体内除糖基化的 Cu/Zn-SOD 没有报道, 其他 3 种均有报道。

2.3.2 过氧化氢酶(CAT)

在抗氧化酶系统中, 过氧化氢酶在将有毒的过氧化氢转变为水和氧分子的解毒过程中发挥着重要的作用。另外 CAT 参与催化酚、甲醇、乙醇和亚硝酸盐发生转化的解毒过程。它广泛存在于真核和原核生物体内, 目前报道了 200 多种生物体的 CAT 基因序列。在许多软体动物中均可检测到 CAT 活性, 如一种褐贻贝 *Perna perna*、贻贝、长牡蛎、不等壳毛蚶、皱纹盘鲍和河蚬(*Corbicula fluminea*)等^[9]。Zhang 等^[29]克隆了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 CAT cDNA (GenBank 登录号: EU102287), 全长 1 892 bp, 编码 520 个氨基酸残基, 预测分子量为 58.8 kDa。人工感染虾白点病病毒后血淋巴细胞在感染后的 14 h CAT 表达量上升, 肝胰腺在感染后的 37 h, CAT 基因表达上调。从栉孔扇贝 (GenBank 登录号: DQ862859)、盘鲍 (GenBank 登录号: DQ530211)、大西洋舟螺 (*Crepidula fornicata*, GenBank 登录号: DQ087480)、美洲偏顶蛤 (*Modiolus americanus*, GenBank 登录号: AY580307)和一种胡桃蛤 *Nucula proxima* (GenBank 登录号: AY580231)体内均克隆到 CAT 基因。Ekanayake 等^[9]报道盘鲍 CAT cDNA, 全长 2 864 bp, 编码 501 个氨基酸残基, 预测分子量为 56 kDa, 具有多个典型的 CAT 结构域, 序列一致性分析显示与栉孔扇贝 CAT 氨基酸序列有最高的一致性为 80%, 在鳃、外套膜、性腺、血淋巴细胞、闭壳肌和消化管等器官内均检测到组成型的表达。首次注射 H₂O₂ 3 h 后, 可诱导血淋巴细胞和消化道组织内 CAT 的上调表达。并利用 pMAL 载体从事原核表达研究, 经纯化得到 30 000 U/mg 催化 H₂O₂ 分解活性的重组蛋白, 生化性质研究显示出很好的热稳定性和较广的催化反应 pH 作用范围。

过氧化氢酶是存在于所有需氧生物体内的抗氧化酶。它的主要作用就是除去体内多余的过氧化氢, 并保持细胞内氧化还原反应的平衡。最近研究果蝇^[30]胃肠道内宿主与微生物之间的相互作用, 显示了在宿主防御系统细胞外免疫调控过程中过氧化氢酶(IRC)的关键介导作用, 也再次说明过氧化氢酶在

无脊椎动物天然免疫系统中的重要性。

2.3.3 硫氧还蛋白(TRx)与硫氧还蛋白过氧化酶(TPx)

氧化应激是由于细胞内外活性氧增加造成组织内氧化失衡的应激状态。往往会引起机体脂质、蛋白和核酸的过氧化。为了控制过多的活性氧造成氧化应激, SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化酶(GPx)、硫氧还蛋白(TRx)和硫氧还蛋白过氧化酶(TPx)帮助机体清除过多的活性氧。哺乳动物硫氧还蛋白系统由硫氧还蛋白(抗氧化还原酶)和硫氧还蛋白还原酶(TRxR)组成。硫氧还蛋白是小分子的多功能蛋白, 有一个保守的 WCGPC 活性位点, 广泛的存在于真核和原核细胞内。它们是细胞内主要的含二硫键还原酶和硫氧还蛋白过氧化酶等的电子供体。此外 TRx 还有各种生物学功能, 例如氧化损伤蛋白的再生、ROS 等自由基的清除、DNA 合成、基因表达调控以及 NF- κ B 细胞凋亡途径的调控等。线粒体是 90% 以上氧气消耗的场所, 同时也是细胞内活性氧的主要来源。因此线粒体活性氧的产生严格被线粒体抗氧化系统调控。该系统主要组成成分是 TRx-2、TRxR 和 TPx。De Zoysa 等^[8]克隆盘鲍线粒体 TRx-2 cDNA, 全长 1 214 bp, 编码 173 个氨基酸残基, 利用 pMAL 载体原核表达重组 TRx-2, 活性分析显示出催化胰岛素还原和保护超螺旋 DNA 免受活性氧损伤的活性。组成型 TRx-2 在鳃、外套膜、性腺、闭壳肌、消化管、血淋巴细胞均可检测到。注射 H₂O₂ 3 h 后, 鳃和消化管的 TRx-2 mRNA 上调, 一直到 6 h 都保持较高的水平。结果显示 TRx-2 通过催化蛋白二硫键、清除 ROS、减少 DNA 损伤, 在线粒体氧化应激调控中发挥重要的作用。

TPx 是重要的半胱氨酸过氧化物酶, 它是一种小分子抗氧化蛋白, 作为氢供体通过 TRx 可快速清除体内产生的过氧化氢。它与通常所说的以金属原子为活性中心的过氧化物酶不同, 它在保守的半胱氨酸残基位点上以巯基作为电子供体, 将过氧化氢、有机过氧化物和过氧化氮(OONO⁻)分别还原为水、乙醇和亚硝酸盐, 以达到解毒的目的。此外, 除了过氧化物解毒作用, TPx 还作为分子伴侣调控过氧化氢介导的细胞信号转导过程。大多数小分子量的 TPx 作为过氧化物酶, 较高分子量的 TPx 作为分

子伴侣响应氧化应激。所有 TPx 都有相似的催化机理, 以活性位点的半胱氨酸作为氢供体, 被过氧化物氧化为胱氨酸, 从而清除过氧化物。然后胱氨酸再循环转变为半胱氨酸。Pushpamali 等^[31]报道盘鲍 TPx1 和 TPx2 cDNA, 全长分别为 1 315 bp 和 1 045 bp, 编码 251 和 199 个氨基酸残基。重组表达 TPx1 和 2 在体外均表现出防止氧化反应造成超螺旋 DNA 损伤的活性。大肠杆菌表达重组 TPx 可提高对 H₂O₂ 的抗性。组成型的 TPx 在鳃、外套膜、闭壳肌和消化管均有表达。注射 H₂O₂ 3 h 后, 鳃和消化管组织的 TPx 均有上调。TPx1 和 2 的表达均可被氧化应激诱导, 它们通过清除不同 ROS 以保持机体抗氧化防御功能。

ROS 虽然是需氧生物的副产品, 但是在细胞吞噬过程中, 它们在机体抗感染免疫防御系统中发挥着重要的作用。当机体被外来微生物入侵时, 宿主细胞吞噬功能被激活, 同时伴随耗氧增加, 产生大量的活性氧, 以清除入侵物, 发挥免疫防御的功能。但是大量的活性氧对细胞也有毒害作用, 可使细胞蛋白、脂质、核酸过氧化、酶失活、氧化还原敏感信号通路异常。机体抗氧化防御系统防止氧化应激对机体造成损伤。同时软体动物的氧化应激和抗氧化酶活性用于监测环境污染物和其他环境因子也是研究的热点。

2.4 离子代谢相关的基因

离子一直被广泛认为是所有活的生命体重要组成部分, 是许多蛋白发挥生物功能的重要活性基团, 参与机体的氧运输、离子转运、DNA 合成和许多酶促反应等过程。但是活细胞内自由离子的增加也有潜在的毒性效应, 可以引起氧化损伤。因此生物体进化出一整套调控离子运输、贮存、转移的代谢过程, 保持离子代谢平衡的机制, 以避免对机体的毒性损伤。许多蛋白参与到金属离子代谢过程中。

2.4.1 铁离子代谢相关基因

目前鲍相关金属离子代谢的基因研究报道较少。De Zoysa 等^[7]报道盘鲍铁蛋白两个亚单位的基因克隆。铁蛋白在离子贮存和解毒过程中起着重要的作用, 由微晶中心、磷酸羟基铁中心组成, 这个中心可容纳 4500 Fe³⁺形成无机复合体。中心核被去铁铁蛋白外壳围绕, 该外壳由 24 个亚单位组成, 对中

心基团起保护作用。脊椎动物铁蛋白由重链(H)和轻链(L)两个不同的多肽链组成, 分子量为 18~22 kDa。重链亚单位是铁氧化酶中心, 轻链包含矿核形成位点^[32]。在细胞分化和转化过程中以及响应某种环境刺激, 不同细胞表达的重链和轻链不尽相同, 这种差异可以发生在翻译水平和翻译后加工水平, 因此产生 H 链丰富或 L 链丰富铁蛋白家族。例如 H 链丰富铁蛋白主要在心脏表达, 轻链丰富的铁蛋白主要肝脏表达。铁蛋白的表达可以被不同类型的分子所诱导和控制, 例如离子、重金属、细胞因子、激素、药物、cAMP 等。在不同分子引起差异表达的铁蛋白其氨基酸组成不同, 发挥不同的功能^[7]。盘鲍铁蛋白包括两个亚单位, 亚单位 (*Abf1*) cDNA 全长 795 bp, 编码 207 个氨基酸残基, 预测分子量为 24 kDa, 等电点为 8.4。亚单位 (*Abf2*) cDNA 全长 901 bp, 编码 183 个氨基酸残基, 预测分子量为 21 kDa, 等电点为 6.1。大肠杆菌重组表达 *Abf1* 和 *Abf2*, 在纯化后重组蛋白浓度为 6 mg/mL 时表现出 44.2% 和 22.0% 螯合离子的活性。组织特异性差异表达分析发现, 两个亚单位在鲍鳃、外套膜、性腺、足、消化管有广泛的表达, 但 *Abf2* 表达量比 *Abf1* 高, 且没有发现 *Abf1* 在血淋巴细胞中表达^[7]。

2.4.2 钙离子代谢相关基因

钙离子(Ca^{2+})是许多有机体内重要离子, 它可作为第二信使调节许多细胞生理功能, 例如肌肉收缩、神经兴奋、细胞分化和死亡等。在质膜和细胞器膜上有许多钙能转运载体和 Ca^{2+} 通道。细胞内 Ca^{2+} 及其浓度水平介导钙能转运载体与 Ca^{2+} 通道发挥作用^[33]。许多 Ca^{2+} 结合蛋白在胞质内调节 Ca^{2+} 浓度。目前最大一群 Ca^{2+} 结合蛋白由 EF 手型超家族基因编码, 具有典型的 EF 手型结构域。研究显示钙调蛋白(Calmodulin)、肌钙蛋白 C (Troponin C) 和肌浆球蛋白轻链(Myosin light chain)等钙离子相关蛋白, 在细胞内保持 Ca^{2+} 的平衡或通过激活目标蛋白 Ca^{2+} 结合结构域, 进行 Ca^{2+} 信号的传递^[33]。

Nikapitiya 等^[34]克隆了盘鲍钙调素(Regucalcin) cDNA。钙调素是一种钙调节蛋白, 又被称作衰老标志蛋白-30(SMP-30)。1978 年首次在小鼠肝细胞内发现这一新的 Ca^{2+} 结合蛋白。钙调素与其他钙调蛋白等钙相关蛋白不同点在于它不含有 EF 手型钙结合

结构域。钙调素是一种多功能蛋白^[35], 可调节小鼠的肝、肾和脑神经细胞的生理功能。它通过提高质膜上钙泵的活性和肝肾皮层细胞线粒体钙依赖性 ATP 酶活性来调节细胞内钙平衡。钙调素还可逆的激活或抑制肝肾皮层细胞的 Ca^{2+} 依赖酶的活性。它还可以通过与 Ca^{2+} 结合来抑制各种蛋白激酶和蛋白磷酸酶的活性, 在细胞信号转导中起调控作用。许多脊椎动物和无脊椎动物的钙调素基因被克隆分析。盘鲍钙调素 cDNA 全长 1 321 bp, 编码 305 个氨基酸残基, 预测的分子量为 33 kDa, 与鸡和斑马鱼钙调素蛋白相似性 45%。基因在鳃、外套膜、消化腺和闭壳肌等组织内均有转录, 调钙素是组成型蛋白, 但是在肌内注射 CaCl_2 可显著诱导该基因在闭壳肌细胞中的表达^[33]。

钙离子除了调节蛋白激酶和蛋白磷酸酶活性以及细胞信号传导等生理功能外, 还参与到机体骨骼的形成和生长, 特别是对于贝类贝壳的形成更是非常重要。Weiss 等^[36]从绿唇鲍(*H. laevigata*)贝壳分离纯化出两种新的凝集素蛋白 Perlucin 和 Perlustrin, 分子量分别为 17 kDa 和 13 kDa。分析 Perlucin 前 32 个氨基酸序列显示它可能属于含单 C 型凝集素结构域蛋白家族, Perlucin 可提高溶液中 CaCO_3 的沉淀量, 它可能加速 CaCO_3 结晶和生长。Perlustrin 前 33 个氨基酸序列与珍珠质蛋白 lustrin A 有一定的相似性。Wang 等^[37]报道了盘鲍 Perlucin cDNA, 全长 1 038 bp, 编码 151 个氨基酸残基。大肠杆菌表达重组 Perlucin, 具有促进沉淀和定向改变方解石晶体形态的活性。该蛋白属于 C 型凝集素, 具有保守的糖识别结构域。该基因在外套膜、鳃和消化道内均有表达。

金属离子参与机体许多重要的生理过程, 它的代谢失衡势必会影响机体正常的生理状态和功能。细胞内的信号传导, 蛋白磷酸化与去磷酸化, 过氧化物的清除解毒等均有金属离子参与, 这些过程也与机体免疫功能有密切的联系。

2.5 其他抗感染免疫相关基因

2.5.1 鲍抗病原菌免疫相关基因

鲍血淋巴细胞是先天免疫防御系统的主要免疫细胞。Mah 等^[5]构建了红鲍和桃红鲍卵巢 cDNA 文库, 并克隆了巨噬细胞表达基因 *abmpegl* cDNA (AY485641 和 AY485640), 全长分别为 2 977 bp 和

2 595 bp, 编码 730 个氨基酸残基, 预测红鲍和桃红鲍 *abmpegl* 编码蛋白分子量分别为 77 378 Da 和 77 598 Da, 并认为该蛋白是类穿孔素(perforin)蛋白。Wang 等^[38]报道了九孔鲍(*H. diversicolor supertexta*) *mpegl* cDNA 的全长序列(EF529460), 全长 2 781 bp, 编码 728 个氨基酸残基。细胞毒性淋巴细胞的细胞外颗粒分泌途径, 在免疫系统发挥免疫监视和保持免疫功能平衡的过程中发挥着重要的作用。破膜蛋白穿孔素 perforin 是该细胞外分泌颗粒的主要成分之一, 通常它可能通过两种方式发挥杀死目标细胞的功能。它可以直接在目标细胞膜上形成孔洞, 以便粒酶进入目标细胞内, 从而杀死细胞。另一方面, 它可破坏目标细胞内涵体, 使目标细胞内源性的粒酶释放到细胞内, 而后引起细胞凋亡^[39]。Mah 等^[5]通过 Southern blot 和 Northern blot 方法分析, 发现该基因为单拷贝基因且没有内含子, 在血淋巴细胞、上足和鳃中存在着大量表达, 并推测其在组织滞留血淋巴细胞中的表达量要高于在循环血中血淋巴细胞内的表达量, 由此说明在软体动物中血淋巴细胞具有重要的免疫功能。同时研究证明在副溶血弧菌感染 8 h 和 96 h, 该基因在肝胰腺细胞中存在着明显的上调表达^[38], 也进一步说明该基因在鲍免疫功能中的重要性。

凝集素是所有免疫防御体液因子中重要的模式识别蛋白, 它通过结合病原表面特异糖基介导抗原识别。细菌和真菌细胞壁成份脂多糖、肽聚糖以及 β -1, 3-葡聚糖都是可被凝集素识别的重要抗原表位, 而且凝集素还可激活中和或清除病原的酶或蛋白。动物体中凝集素是凝集和调理病原的强力武器^[40]。许多无脊椎动物的凝集素可帮助机体识别和凝集病原微生物或寄生虫, 目前在美洲鲎(*Limulus polyphemus*)、南方滨对虾(*Litopenaeus schmitti*)、一种淡水蟹 *Paratelphusa jacquemontii*、偏顶蛤(*Modiolus modiolis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)以及长牡蛎等无脊椎动物体内均有凝集素的报道。鲍具有病原识别和清除功能的凝集素的基因报道较少。Wang 等^[41]首次克隆了盘鲍 C 型凝集素基因(*CLHd*), 全长 508 bp, 编码 151 个氨基酸残基。与从其他软体动物和鱼分离的 C 型凝集素相似, 都具有高度保守的糖基识别结构域。溶藻弧菌攻毒 24 h, 可诱导其达到最大的表达量。原核表达 *CLHd* 的重组蛋白以钙依赖途径特异性的凝集溶藻弧菌。实验表明,

CLHd 是鲍识别和清除病原的重要免疫相关基因。

2.5.2 鲍抗病毒免疫相关基因

干扰素(Interferon, IFN)系统是细胞防御的第一道防线, 可诱导机体提高抗病毒感染免疫力。脊椎动物先天免疫系统中干扰素是抗病毒免疫的重要因子, 但至今未见无脊椎动物干扰素基因或蛋白的报道。干扰素可诱导体内许多免疫相关基因上调表达, 发挥抗病毒感染功能, 通过寡核苷酸阵列(Oligonucleotide arrays)的方法, 鉴定了大约 300 多个干扰素诱导基因(ISGs)。这些基因表达产物有调控蛋白、转录因子、MHC 和 蛋白, 特定的细胞因子及其受体, 以及一些未知功能蛋白^[42]。最近的研究报道, 在鲍体内克隆了抗黏病毒蛋白(Myxovirus resistance protein, Mx)和 IFN- γ 诱导溶酶体巯基还原酶(Interferon gamma inducible lysosomal thiol reductase, GILT)的基因^[43, 44], 这两个基因均可被干扰素诱导表达, 在抗病毒感染免疫系统中发挥重要的作用。

Mx 是研究相对较多的抗病毒蛋白。它最初是在鼠抗流感细胞系中发现, 属于高分子量 GTP 酶动力蛋白(dynamin)超家族^[45]。序列分析发现它具有高度保守的 GTP 结合结构域, 以及动力蛋白家族保守的氨基末端, 这些结构域表现出很强的抗病毒活性。Mx 具有病毒特异性的抗病毒活性, 有效的抑制有包膜单链 RNA 病毒的复制^[43]。目前从人到鱼均有 Mx 的报道, 鼠 Mx1 和 Mx2、人 MxA 以及鸡 Mx 均表现出抗 RNA 病毒的活性^[46, 47], 但人 MxB、鼠 Mx3 和鸭 Mx 却没有抗病毒的活性, 由此推测 Mx 可能还具有其他的生物功能^[47]。鱼 Mx 的抗病毒机制还不清楚, 但已经发现 Mx 蛋白的表达与抗病毒感染有关。在大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*) 胚胎 CHSE-214 细胞内, Mx 蛋白表达和抗传染性胰腺坏死病毒(IPNV)的活性可被干扰素诱导增强^[48]。此外, 还报道牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Mx 对病毒性出血性败血症病毒(VHSV, Viral hemorrhagic septicemia virus)和弹状病毒(Hirame rhabdovirus, HIRRV)有一定的抗病毒活性^[49]。体内外实验均表明, Mx 可被聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸(polyI:C)、RNA 病毒和 IFN 诱导表达。De Zoysa 等^[43]报道盘鲍 Mx 的 cDNA 全长 1 664 bp, 编码 511 个氨基酸残基, 含有典型保守的 GTP 结合结构域和动力蛋白家族结构域, 与鲑鱼

Mx1、虹鳉鱼 Mx2 和大西洋大比目鱼 Mx 有 44% 氨基酸序列的相似性。基因差异表达分析实验表明, 在注射 polyI: C 之后 24 h 和 48 h, 鳃和消化腺中 Mx 表达量升高。在健康鲍的鳃、消化腺、外套膜和腹足均有该基因组成型的表达。该基因在鲍体内与抗病毒感染免疫的关系未见深入研究报道。

GILT 由 Luster 等首先报道。哺乳动物体内, GILT 作为巯基还原酶, 参与到机体 MHC II 抗原加工过程中, 催化未折叠的自然态抗原蛋白二硫键的还原断裂, 以便蛋白酶对抗原进行酶解加工^[50]。而且, GILT 氨基酸序列含有 C-XX-C 活性结构域, 与巯基蛋白的 WCGH/PCK 结构域相似^[51]。此外, 参与抗原加工的 GILT 还在中和细胞外抗原和感染细胞碎片清除过程中发挥作用^[52]。人和鼠 GILT 研究较为深入, 其他生物如牛(XM_607840)、小鼠(NM_001030026)、蛙(NM_001017196)、鲑鱼(DQ353791)等脊椎动物, 以及海胆(XM_786456)等无脊椎动物的 GILT 基因也相继得到克隆。De Zoysa 等^[44]报道盘鲍 GILT cDNA(*AbGILT*), 全长 807 bp, 编码 228 个氨基酸残基, 预测分子量 25 kDa, 等电点为 7.8。*AbGILT* 含有两个高度保守 C-XX-C 活性结构域(²³CLDC²⁶ 和 ⁴⁶CPYC⁴⁹), 和 GILT 特征序列 ⁹²CQHG X₂ECX₂NX₄C¹⁰⁷, 成熟肽含有占 5% 的 12 个半胱氨酸残基。RT-PCR 显示, 注射植物血凝素(PHA)后 24 h, 鳃、外套膜和消化道 *AbGILT* 表达上调, 溶藻弧菌诱导 48 h, 在鳃和消化道上调表达该基因。polyI: C 不能诱导 *AbGILT* 的上调表达。在鲍鳃、外套膜、消化道均发现该基因组成型的表达。推测 *AbGILT* 可能构成盘鲍基础水平的先天性免疫第一道防线。

2.5.3 鲍免疫相关转录因子

鲍免疫相关转录因子基因的研究报道更少, 目前仅见 Jiang 等^[53]报道了杂色鲍 Rel/NF- κ B 信号通路 *Ab-Rel* 的 cDNA。NF- κ B 是由 Rel/NF- κ B 家族的多肽成员组成的一组转录因子。它广泛的调控机体炎症相关基因表达、免疫反应、细胞凋亡、胚胎发育、细胞增殖和分化等生理病理的变化^[54]。NF- κ B 在组织细胞中广泛存在, 只是在不同类型和不同生理状态的细胞中, 其活性有所不同。NF- κ B 通常与其抑制蛋白 I κ B 相结合, 并以非活性状态贮存于细胞质中。在某些有效刺激的作用下, NF- κ B 可被

激活, 从而进入细胞核发挥作用。通过泛素化过程解除了 I κ B 的抑制, 活性 NF- κ B 因其核定位序列(NLS)的重新暴露而被迅速介导进入细胞核, 实现对相关基因表达的调控作用。受到 NF- κ B 调控的基因, 主要包括免疫功能和炎症刺激相关的细胞因子和生长因子基因, 如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1、IL-6、IL-8)等, 细胞增殖和细胞凋亡有关的基因, 编码细胞黏附分子的基因等^[55]。杂色鲍 *Ab-Rel* 全长 cDNA 1 943 bp, 编码 584 个氨基酸残基, Northern blotting 和 Real-time PCR 检测该基因在鲍体内各组织均有表达, 重组表达的 *Ab-Rel* 特异的与 DNA 基序结合, 该基序序列与 NF- κ B 结合位点相一致。在 mRNA 转录水平, 脂多糖诱导 *Ab-Rel* 的表达量变化不大, 但电泳迁移变动分析实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)分析表明, 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)可诱导血淋巴细胞内 NF- κ B 的 DNA 结合活性升高。NF- κ B 在鲍免疫反应调节通路中扮演重要的角色^[53]。

3 结语

鲍免疫相关基因和蛋白的研究才刚刚起步, 参与鲍免疫反应的基因和蛋白报道相对较少。目前研究主要集中在当鲍受到病原侵袭时, 有关 ACP、ALP、呼吸突发、细胞吞噬能力等免疫学参数变化的研究, 目的想能通过免疫学指标的变化来评判机体的免疫状态。但是血相生物学各免疫学参数的变化, 只是从表面上阐明了机体受到了病原影响, 表现出一定的免疫反应, 无法从根本上讨论这些机体表观免疫学指标变化背后的分子基础。而正是这些分子基础或高或低的变化, 直接关系到鲍机体健康状况以及对疾病的抵抗力。从筛选与免疫事件(细菌、病毒感染等)相关的基因文库入手, 无疑是高通量获得免疫相关基因的有效途径, 进而利用分子生物学、细胞生物学等技术研究该免疫相关基因的功能, 为进一步揭示鲍抗感染免疫的分子机制奠定基础。

参考文献(References):

- [1] 王艺磊, 张子平, 戴军, 邹志华, 王淑红. 副溶血弧菌感染 12h 和 24h 杂色鲍肝脏全长 cDNA 文库的构建. 中国水产科学, 2004, 11(3): 190-195.
- [2] 郑明刚, 孙修勤, 张进兴. 皱纹盘鲍肝和肾 cDNA 文库

- 的构建及免疫相关基因的初步分析. 高技术通讯, 2007, 17(3): 319-324.
- [3] 任洪林, 徐丹丹, 乔琨, 蔡灵, 黄伟滨, 张霖, 王克坚. 细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞抑制性差减杂交文库构建及巨噬细胞表达蛋白 cDNA 的克隆与差异表达. 遗传, 2008, 30(8): 1043-1050.
- [4] Wang KJ, Ren HL, Xu DD, Cai L, Yang M. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(11): 1326-1347.
- [5] Mah SA, Moy GW, Swanson WJ, Vacquiera VD. A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(2): 468-475.
- [6] Kim KY, Lee SY, Cho YS, Bang IC, Kim KH, Kim DS, Nam YK. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 1043-1059.
- [7] De Zoysa M, Lee J. Two ferritin subunits from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(3): 624-635.
- [8] De Zoysa M, Pushpamali WA, Whang I, Kim SJ, Lee J. Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 149(4): 630-639.
- [9] Ekanayake PM, De Zoysa M, Kang HS, Wan Q, Jee Y, Lee YH, Kim SJ, Lee J. Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (*Haliotis discus discus*) catalase. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(3): 267-278.
- [10] Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 1999, 30(6): 597-623.
- [11] Markl J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and hH. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(S)2: R3-R9.
- [12] Lieb B, Altenhein B, Markl J. The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5675-5681.
- [13] Altenhein B, Markl J, Lieb B. Gene structure and hemocyanin isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. *Gene*, 2002, 301(1-2): 53-60.
- [14] Harris JR, Scheffler D, Gebauer W, Lehnert R, Markl J. *Haliotis tuberculata* hemocyanin (HtH): analysis of oligomeric stability of HtH1 and HtH2, and comparison with keyhole limpet hemocyanin KLH1 and KLH2. *Micron*, 2000, 31(6): 613-622.
- [15] Piano A, Valbonesi P, Fabbri E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9(2): 134-142.
- [16] Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 1998, 79(2): 129-168.
- [17] Cheng P, Liu X, Zhang G, He J. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(1-2): 77-87.
- [18] Farcy E, Serpentine A, Fiévet B, Lebel JM. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 146(4): 540-550.
- [19] Jin LH, Bahn JH, Eum WS, Kwon HY, Jang SH, Han KH, Kang TC, Won MH, Kang JH, Cho SW, Park J, Choi SY. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(11): 1509-1519.
- [20] Keilin D, Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J*, 1940, 34(8-9): 1163-1176.
- [21] McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, 1969, 244(22): 6056-6063.
- [22] Cheng W, Tung YH, Liu CH, Chen JC. Molecular cloning and characterisation of copper/zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 21(1): 102-112.
- [23] Cheng W, Tung YH, Chiou TT, Chen JC. Cloning and characterisation of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 21(4): 453-466.
- [24] Cheng W, Tung YH, Liu CH, Chen JC. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide

- dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(4): 438–449.
- [25] Ekanayake PM, Kang HS, Zyosa MD, Jee Y, Lee YH, Lee J. Molecular cloning and characterization of Mn-superoxide dismutase from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2006, 145(3–4): 318–324.
- [26] Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*, 1987, 22(2): 111–180.
- [27] Ken CF, Lee CC, Duan KJ, Lin CT. Unusual stability of manganese superoxide dismutase from a new species, *Tatamella pyseos* sp. n.: its gene structure, expression and enzyme properties. *Protein Expr Purif*, 2005, 40(1): 42–50.
- [28] Zhang K, Wang G, Zou Z, Jia X, Wang S, Lin P, Chen Y, Zhang Z, Wang Y. Cloning, characterization and TBT exposure response of CuZn superoxide dismutase from *Haliotis diversicolor supertexta*. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(3): 583–594.
- [29] Zhang Q, Li F, Zhang X, Dong B, Zhang J, Xie Y, Xiang J. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(5): 584–591.
- [30] Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 2005, 310(5749): 847–850.
- [31] Pushpamali WA, De Zoysa M, Kang HS, Oh CH, Whang I, Kim SJ, Lee J. Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(3): 294–307.
- [32] Orino K, Eguchi K, Nakayama T, Yamamoto S, Watanabe K. Sequencing of cDNA clones that encode bovine ferritin H and L chains. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1997, 118(3): 667–673.
- [33] Osterloh D, Ivanenkov VV, Gerke V. Hydrophobic residues in the C-terminal region of S100A1 are essential for target protein binding but not for dimerization. *Cell Calcium*, 1998, 24(2): 137–151.
- [34] Nikapitiya C, De Zoysa M, Kang HS, Oh C, Whang I, Lee J. Molecular characterization and expression analysis of regucalcin in disk abalone (*Haliotis discus discus*): Intramuscular calcium administration stimulates the regucalcin mRNA expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 150(1): 117–124.
- [35] Kurota H, Yamaguchi M. Activatory effect of calcium-binding protein regucalcin on ATP-dependent calcium transport in the basolateral membranes of rat kidney cortex. *Mol Cell Biochem*, 1997, 169(1–2): 149–156.
- [36] Weiss IM, Kaufmann S, Mann K, Fritz M. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(1): 17–21.
- [37] Wang N, Lee YH, Lee J. Recombinant perlucin nucleates the growth of calcium carbonate crystals: molecular cloning and characterization of perlucin from disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 149(2): 354–361.
- [38] Wang GD, Zhang KF, Zhang ZP, Zou ZH, Jia XW, Wang SH, Lin P, Wang YL. Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(3): 346–359.
- [39] Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(12): 940–952.
- [40] Teizo F. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(5): 346–353.
- [41] Wang N, Whang I, Lee J. A novel C-type lectin from abalone, *Haliotis discus discus*, agglutinates *Vibrio alginolyticus*. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(9): 1034–1040.
- [42] Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH. Identification of genes differently regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15623–15628.
- [43] De Zoysa M, Kang HS, Song YB, Jee Y, Lee YD, Lee J. First report of invertebrate Mx: Cloning, characterization and expression analysis of Mx cDNA in disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(1): 86–96.
- [44] De Zoysa M, Lee J. Molecular cloning and expression analysis of interferon- γ inducible lysosomal thiol reductase (GILT)-like cDNA from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *J Invertebr Pathol*, 2007, 96(3): 221–229.
- [45] Levy DE, Garcia Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(2–3): 143–156.
- [46] Pavlovic J, Zurcher T, Haller O, Staeheli P. Resistance to

- influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol*, 1990, 64(7): 3370–3375.
- [47] Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiyama H, Ohara M, Tsuzuki M, Nishibori M, Mizutani M, Watanabe T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken *Mx* gene. *Genome Res*, 2002, 12(4): 595–601.
- [48] Larsen R, Rokenes TP, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol*, 2004, 78(15): 7938–7944.
- [49] Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter H. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol*, 1990, 64(12): 6263–6269.
- [50] Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: Characterization of a gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 745–750.
- [51] Phan TU, Arunachalam B, Cresswell P. Gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT) maturation, activity and mechanism of action. *J Biol Chem*, 2000, 275(34): 25907–25914.
- [52] Lackman RL, Cresswell P. Exposure of the promonocytic cell line THP-1 to Escherichia coli induces IFN-gamma-inducible lysosomal thiol reductase expression by inflammatory cytokines. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4833–4840.
- [53] Jiang Y, Wu X. Characterization of a Rel/NF-kappaB homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(2): 121–131.
- [54] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725–734.
- [55] 史艳晖, 卢圣栋. 转录因子 NF- κ B 的研究现状及其应用前景. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(4): 110–114.

• 综合信息 •

中国遗传学会植物遗传和基因组学专业委员会 2009 年学术研讨会

为促进我国从事植物遗传、植物基因功能基因组学以及育种等领域的科研人员之间的交流, 研讨相关领域中的最新成果和进展, 中国遗传学会植物遗传和基因组学专业委员会定于 2009 年 9 月 25–27 日在山东农业大学举办植物遗传与分子育种学术研讨会。热诚欢迎国内外同行参加研讨会, 会议详情请见第二轮通知。

主办单位: 中国遗传学会植物遗传和基因组学专业委员会

承办单位: 山东农业大学、植物基因组学国家重点实验室、作物生物学国家重点实验室、水稻生物学国家重点实验室
研讨会主席: 李家洋院士、张启发院士、许智宏院士

组织委员会:

主席: 薛勇彪、张宪省

成员: 白书农、曹晓风、种康、巩志忠、韩斌、李传友、刘宝、刘春明、马红、钱前、瞿礼嘉、宋纯鹏、薛红卫、杨洪全、杨维才、张桂权、郑成超、周俭民、左建儒

会议时间: 2009 年 9 月 25–27 日(暂定)

会议地点: 山东省泰安市 山东农业大学

注册费: 遗传学会会员 900 元/人; 非会员 1200 元/人; 学生: 600 元/人

注: 1、回执和论文摘要可通过 Email: yhzhang@genetics.ac.cn 提交

2、回执和论文摘要截止时间为: 2009 年 8 月 15 日

联系人: 中国遗传学会办公室 王长城

电话: 010-64889611; Email: ccwang@genetics.ac.cn

植物基因组学国家重点实验室 张银红

电话: 010-64873428; Email: yhzhang@genetics.ac.cn

山东农业大学生命科学学院 李祥

电话: 0538-8249767; E-mail: renmu1980@yahoo.com.cn