**分类号**  **密级**

**UDC**

**研** 究 生 学 位 论 文

凡纳滨对虾抗脂多糖因子 ALF-AVK

基因的克隆及其特性研究

**研究生姓名**  **王晓璐**

**指导教师姓名**  **战文斌** 教授

**申请学位级别**  **博士** **专业名称**  **水ThTh物学**

**论文答辩日期 2013 年 5 月 学位授予日期 2013 年 6 月**

**中 国 海 洋 大 学**

谨以此论文献给我亲爱的家人，敬爱的老师以及友爱的同学们

-------------王晓璐

凡纳滨对虾抗脂多糖因子 ALF-AVK基因的克隆

及其特性研究

学位论文答辩日期： 指导教师签字：

答辩委员会成员签字：

**独** 创 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，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 未 获 得

（注：如没有其他需要特别声明的，本栏可空）或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。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作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

---------------------------------------------------------------------

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，并同意以下事项：

1、学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。

2、学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同时授权清华大学“中国学术期刊(光盘版)电子杂志社”用于出版和编入 CNKI《中国知识资源总库》， 授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 导师签字：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

凡纳滨对虾抗脂多糖因子 *ALF-AVK*基因的克隆及其特性研究摘 要

甲壳动物在水产养殖业中占据十分重要的地位，特别是上世纪 80 年代以来兴起的对虾养殖行业，给我国沿海地区带来了可观的经济效益，但在养殖规模不断扩大的同时，各种疾病的爆发也给对虾养殖业带来了较多的困扰和巨大的经济损失。近年来，随着对虾病害与免疫学研究的深入，许多免疫相关因子的基因序列和 功 能 得 到 了 深 入 的 研 究 和 了 解 。 抗 脂 多 糖 因 子 (Anti-lipopolysaccharide factors ,ALF) 在甲壳动物固有免疫防御体系的识别和清除病原菌功能中起着重要的作用，对其深入的研究有助于甲壳动物疾病的防御和控制。在本论文的研究中， 以凡纳滨对虾为材料，围绕其 ALF（*ALF-AVK*）基因的克隆与其蛋白的特性分析展开了研究，主要包括以下几方面；

1.根据 NCBI 中一段类似 ALF 的 EST 序列设计引物，利用 RACE 技术克隆得到了凡纳滨对虾（*Litopenaeusvannamei*）的一段 ALF 序列并根据其蛋白序列特有的丙氨酸-缬氨酸-赖氨酸 3 个特别的氨基酸序列定名为 *ALF-AVK*序列，该序列全长 705bp，含有一个 43bp 的 5’端非编码区（UTR），之后为 396bp 的开放阅读框

（ORF），3’端包含有 293bp 的多聚赖氨酸的尾巴。*ALF-AVK*基因编码 122 个氨基 酸组成的蛋白序列，分子量约为 13.7kDa，等电点为 9.95.

2.利用荧光定量PCR 分析了*ALF-AVK*在凡纳滨对虾六种不同组织的转录水平发现，该基因在血细胞中转录水平最高，其次为鳃和心脏，而在肌肉、肝胰腺以及肠中转录处于较低的水平。同样利用 qPCR 技术对作为对虾体内主要免疫防御器官的血细胞在经过对虾白斑症病毒和鳗弧菌刺激之后*ALF-AVK*基因的转录水平变 化做了研究。WSSV 感染之后该基因可能由于应激作用在 6 h 前转录水平会有一定量的升高，之后开始下降知道 24 h 恢复正常水平，而之后随着 WSSV 的复制其转录水平又会出现上升直到 96 h。在鳗弧菌感染组，*ALF-AVK*的表达量会逐渐上升

直到 12 h 到达最高峰，之后缓慢下降直到 96 h。

3.构建了 pET-30a-ALF 的原核表达载体，并对其进行了原核表达。使用 IPTG 诱导法对重组蛋白 rALF-AVK 进行大量诱导表达，用 His 标签亲和层析柱对其进行了纯化。使用纯化 rALF-AVK 蛋白免疫 Balb/C 品系小鼠后制备了多克隆抗体血清，经 Western blotting 检测发现多抗血清可以识别分子量为 21kDa 的重组蛋白并

可在鳗弧菌及 WSSV 感染之后的对虾血细胞总蛋白 14kDa 的预期位置上检测到特异性条带条带。

4.利用间接酶联免疫反应（ELISA）和细菌-蛋白结合沉淀反应两个实验验证了ALF-AVK 重组蛋白与革兰氏阴性鳗弧菌(*Vibrioanguillarum*)的结合活性。ELISA结果显示随着rALF-AVK蛋白浓度的增加，吸光值也会相应增加，而细菌-蛋白结合沉淀实验显示鳗弧菌与rALF-AVK孵育之后的沉淀样品中含有重组蛋白。为了验证ALF是否会参与鳗弧菌与WSSV感染对虾的过程，我们还进行了对虾体内中和反应的实验，结果显示鳗弧菌与rALF-AVK孵育之后会对对虾的死亡率有一定的推迟作用，而WSSV与rALF-AVK的孵育对死亡率并没有明显的影响。上述的实验结果证明rALF-AVK对鳗弧菌有一定的结合活性。

5.以纯化的ALF-AVK重组蛋白为抗原制作的鼠源多抗血清为一抗，采用石蜡切片、免疫组化技术，研究了ALF在凡纳滨对虾血细胞、鳃、心脏、肠和肝胰腺等组织器官中的分布特点。结果表明：ALF主要表达并存在于血细胞中，在鳃丝小叶边缘微血腔、心肌束间隙、肝小管间隙以及肠壁边缘有阳性信号出现。结论认为凡纳滨对虾ALF主要存在于血细胞中，而其他血液流量大的组织器官间隙也会有ALF的分布。而对比健康凡纳滨对虾与经鳗弧菌刺激之后的对虾组织发现，经过刺激之后各组织中的ALF阳性信号量会明显上升。以上的实验结果证明ALF与鳗弧菌的感染有着密切的联系。

关键字：凡纳滨对虾； 抗脂多糖因子； 实时荧光定量； PCR 对虾白斑病； 鳗弧菌； 免疫组织化学

Molecular cloning and characterization of an anti- lipopolysaccharide factor ( *ALF-AVK*) from shrimp *Litopenaeus vannamei*

**Abstract**

Crustaceans in aquaculture occupy a very important position and shrimp aquaculture has increased rapidly from an insignificant base in the early 1980s, it has brought considerable economic benefits for coastal areas. But the shrimp diseases also attack the shrimp aquaculture and economy with the increase of scale. In recent years, shrimp immunological and pathology study has been progressed rapidly. The immune-related genes which have been cloned continuously were studied deeply.

1. Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) play crucial roles in innate immunity of crustaceans to recognize and eliminate pathogens efficiently. The deep research about ALF will benefit to the control of shrimp diseases. In the present paper, an ALF gene from shrimp *Litopenaeusvannamei* was cloned and the recombinant expression of ALF was studied, including the following several aspects.

The primers was designed according to ALF-like gene in NCBI Bank, and this gene from shrimp *Litopenaeus vannamei* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach and designated as *ALF-AVK*according to the AVK (Ala-Val-Lys) sequence containing in its encoded protein. The *ALF-AVK* full-length cDNA is 705 bp, consisting of a 43 bp 5' terminal untranslated region (UTR), a 293 bp 3' UTR with a poly (A) tail and a 369 bp open reading frame (ORF). *ALF-AVK* encodes a protein of

122 amino acids with a predical molecular mass of 13.7 kDa and a theoretical isoelectric point of 9.95.

2. The SYBR Green qPCR analysis was employed to study the *ALF-AVK* mRNA expression in the tissues of intestine, gill, hemocyte, heart, muscle, and hepatopancreas of healthy shrimps withβ-actin as internal control. The highest mRNA expression level of *ALF-AVK* was observed in hemocyte, while moderate expression levels were observed in gill and heart, and very low in muscle, intestine and hepatopancreas.

Hemocytes which are the main defense tissue in the shrimp were chosen to evaluate the variation of *ALF-AVK* expression post white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrioanguillarum*challenge by quantitative real-time PCR (qPCR)*.* A considerable up-regulation of *ALF-AVK*in hemocytes within 6 h post WSSV challenge was observed and exhibited a response of acute-phase; after a decrease to original level at 24 h, the expression of *ALF-AVK* increased until 96 h post challenge. In the *V. anguillarum* challenge group, the expression of *ALF-AVK* reached peak at 12h and decreased slowly until 96 h.

3. With the ALF-AVK was expressed in PET-30a plasmid and then induced by IPTG screening method. The purified recombinant protein rALF-AVK was purified by His-tag affinity column and was used as antigen to prepare antiserum in Balb/C mouse. We got a specific band in the expected position in the hemocytes of WSSV and *V. anguillarum* challenged *L. vannamei* at molecular weights of 14 kDa by Western Blot detection. The polyclonal antibodies against rALF-AVK could react specifically with a protein band at molecular weights of 21 kDa.

4. To determine whether the antibacterial activity of ALF-AVK requires the ability to bind to the bacterial cells, bacterial-protein pull-down assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out. The ELISA result showed that the experiment groups exhibited higher ELISA value with the amounts of purified rALF-AVK increased. In bacterial-protein pull-down assay, Coomassie Brilliant Blue G250 SDS-PAGE resolved samples were interpretable due to the presence of rALF-AVK observed in 21kDa and no band in negative control group. To identify whether ALF play roles in involving *V. anguillarum* and WSSV infection, the neutralization experiment was carried out in shrimp. The result showed that the mortality levels in groups injected with *V. anguillarum* pre-incubated with purified rALF-AVK were lower than that of control groups, which reach to 100% at 17th post

Challenge, but there was no effect in WSSV challenge group.

5. Using the antiserum of rALF-AVK as the primary antibody, paraffin method and immunohistochemistry were employed to observe distribution of ALF inhemocyte, gill, heart, intestine, and hepatopancreas of *L. vannamei*. Immunohistochemistry results

Showed that the ALF existed mainly in hemocyte and positive signals were also found in blood vessel of gill, lacunaes among myocardial bundles of heart, hepatopancreatic tubules and blood sinus in connective tissues of intestine. In conclusion, hemocyanin was mostly from the hemolymph rather than fundamental tissue, and widely distuibuted in various tissues of *L. vannamei*. The positive signal in the organizationg of shrimps calleaged by *V. anguillarum* will be significantly increased compare with untreated shrimps. These results indicated that ALF was involved in the immune defense against *V. anguillarum*.

**Keywords**: *Litopenaeus vannamei*; Anti-lipopolysaccharide; Factor; (ALF-AVK); Gene cloning; WSSV; *Vibrioanguillarum*; Immunohistochemistry

目 录

**[Abstract](#_Toc68692920)** 3

[第 一 章 文献综 述](#_Toc68692921) 5

**[1.1](#_Toc68692922)** [前言](#_Toc68692922) 5

**[1.2](#_Toc68692923)** [无脊椎动物的免疫系统](#_Toc68692923) 5

**[1.2.1](#_Toc68692924)** [细胞免疫](#_Toc68692924) 6

**[1.2.2](#_Toc68692925)** [体液免疫](#_Toc68692925) 6

**[1.3](#_Toc68692926)** [抗脂多糖因子的研究进展](#_Toc68692926) 7

**[1.3.1](#_Toc68692927)** [抗脂多糖因子的发现及结构分析](#_Toc68692927) 7

**[1.3.2](#_Toc68692928)** [抗脂多糖因子在甲壳动物中研究现状](#_Toc68692928) 7

**[1.3.3](#_Toc68692929)** [研究抗脂多糖因子的意义及其应用前景](#_Toc68692929) 7

**[1.4](#_Toc68692930)** [水产养殖对虾的重要病害](#_Toc68692930) 8

**[1.4.1](#_Toc68692931)** [对虾白斑症病毒病（](#_Toc68692931)**[White spot syndrome virus, WSSV](#_Toc68692931)**[）](#_Toc68692931) 8

**[1.4.2](#_Toc68692932)** [桃拉综合症病毒病（](#_Toc68692932)**[Taura syndrome virus disease, TSVD](#_Toc68692932)**[）](#_Toc68692932) 8

**[1.4.3](#_Toc68692933)** [鳗弧菌诱发的对虾疾病](#_Toc68692933) 8

**[1.5](#_Toc68692934)** [分子Th物学在研究中的应用](#_Toc68692934) 8

**[1.5.1](#_Toc68692935)** [实时荧光定量](#_Toc68692935)**[PCR](#_Toc68692935)**[技术分析基因转录变化](#_Toc68692935) 8

**[1.5.2](#_Toc68692936)** [体外重组表达功能基因蛋白的功能验证](#_Toc68692936) 8

**[1.5.3](#_Toc68692937)****[cDNA](#_Toc68692937)**[文库构建及分析](#_Toc68692937) 8

**[1.5.4](#_Toc68692938)****[RACE](#_Toc68692938)**[全长扩增技术](#_Toc68692938) 8

**[1.6](#_Toc68692939)** [本论文研究的目的及意义](#_Toc68692939) 8

[第二章](#_Toc68692940)[凡纳滨对虾血细胞](#_Toc68692940)**[A](#_Toc68692940)**[LLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK基因的克隆及序列分析](#_Toc68692940) 9

[2.1 凡纳滨对虾](#_Toc68692941)**[A](#_Toc68692941)**[LLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK基因的克隆](#_Toc68692941) 9

**[2.1.1](#_Toc68692942)** [实验材料与仪器](#_Toc68692942) 9

**[2.1.2](#_Toc68692943)** [实验方法](#_Toc68692943) 9

**[2.1.3](#_Toc68692944)** [实验结果](#_Toc68692944) 12

**[2.1.4](#_Toc68692945)** [讨 论](#_Toc68692945) 13

[第三章 凡纳滨对虾](#_Toc68692946)**[A](#_Toc68692946)**[LLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK基因的表达差异研究](#_Toc68692946) 14

**[3.1](#_Toc68692947)** [实验材料及仪器](#_Toc68692947) 14

**[3.2](#_Toc68692948)** [实验方法](#_Toc68692948) 14

**[3.2.1](#_Toc68692949)** [健康凡纳滨对虾不同组织总](#_Toc68692949)**[RNA](#_Toc68692949)**[抽提](#_Toc68692949) 14

**[3.2.2](#_Toc68692950)** [感染](#_Toc68692950)**[WSSV](#_Toc68692950)**[和鳗弧菌后凡纳滨对虾鳃组织](#_Toc68692950)**[RNA](#_Toc68692950)**[抽提](#_Toc68692950) 14

**[3.2.3](#_Toc68692951)** [实时荧光定量](#_Toc68692951)**[PCR](#_Toc68692951)**[分析](#_Toc68692951)***[ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK](#_Toc68692951)***[基因不同组织和](#_Toc68692951)**[WWSSSSSSSSVVVV](#_Toc68692951)**[及鳗弧菌感](#_Toc68692951)[染后差异表达情况](#_Toc68692951) 14

**[3.2.4](#_Toc68692952)****[Dot blotting](#_Toc68692952)**[检测凡纳滨对虾](#_Toc68692952)**[WSSV](#_Toc68692952)**[感染情况](#_Toc68692952) 15

**[3.3](#_Toc68692953)** [实验结果](#_Toc68692953) 15

**[3.3.1](#_Toc68692954)** [凡纳滨对虾](#_Toc68692954)***[ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK](#_Toc68692954)***[基因](#_Toc68692954) 15

**[3.3.2](#_Toc68692955)** [注射感染鳗弧菌或](#_Toc68692955)**[WSSV](#_Toc68692955)**[后凡纳滨对虾](#_Toc68692955)***[ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK](#_Toc68692955)***[基因](#_Toc68692955)[平在血细胞中的变化情况](#_Toc68692955) 16

**[3.3.3](#_Toc68692956)****[Dot-blot](#_Toc68692956)**[法检测凡纳滨对虾注射](#_Toc68692956)**[WSSV](#_Toc68692956)**[后感染情况检测](#_Toc68692956) 16

**[3.4](#_Toc68692957)** [讨论](#_Toc68692957) 16

[小 结](#_Toc68692958) 16

[第四章 凡纳滨对虾](#_Toc68692959)**[ALF-AVK](#_Toc68692959)**[蛋白的原核表达及其多克隆](#_Toc68692959) 16

**[4.1.1](#_Toc68692960)** [实验试剂及仪器](#_Toc68692960) 16

**[4.1.2](#_Toc68692961)** [实验方法](#_Toc68692961) 18

**[4.1.3](#_Toc68692962)** [实验结果](#_Toc68692962) 20

**[4.1.4](#_Toc68692963)** [讨 论](#_Toc68692963) 20

**[4.2](#_Toc68692964)** [重组蛋白](#_Toc68692964)**[rALF-AVK](#_Toc68692964)**[鼠源多克隆抗体的制备](#_Toc68692964) 21

**[4.2.1](#_Toc68692965)** [实验材料与仪器](#_Toc68692965) 21

**[4.2.2](#_Toc68692966)** [实验方法](#_Toc68692966) 21

**[4.2.3](#_Toc68692967)** [实验结果](#_Toc68692967) 21

**[4.2.4](#_Toc68692968)** [讨论](#_Toc68692968) 21

**[4.3](#_Toc68692969)** [免疫印迹法（](#_Toc68692969)**[Western blotting](#_Toc68692969)**[）检测](#_Toc68692969)**[ALF-AVK](#_Toc68692969)**[重组蛋白以及血细胞中](#_Toc68692969)**[ALF](#_Toc68692969)**[蛋白](#_Toc68692969) 22

**[4.3.1](#_Toc68692970)** [实验试剂及仪器](#_Toc68692970) 22

**[4.3.2](#_Toc68692971)** [实验方法](#_Toc68692971) 22

**[4.3.3](#_Toc68692972)** [实验结果](#_Toc68692972) 22

**[4.3.4](#_Toc68692973)** [讨 论](#_Toc68692973) 23

[小结：](#_Toc68692974) 23

[第五章 凡纳滨对虾](#_Toc68692975)**[ALF-AVK](#_Toc68692975)**[重组蛋白的活性研究](#_Toc68692975) 23

**[5.1](#_Toc68692976)** [实验方法](#_Toc68692976) 23

**[5.1.1](#_Toc68692977)** [间接](#_Toc68692977)**[ELISA](#_Toc68692977)**[检测](#_Toc68692977)**[rALF-AVK](#_Toc68692977)**[与](#_Toc68692977)**[LPS](#_Toc68692977)**[的结合试验](#_Toc68692977) 23

**[5.1.2](#_Toc68692978)** [鳗弧菌与](#_Toc68692978)**[rALF-AVK](#_Toc68692978)**[结合实验](#_Toc68692978) 23

**[5.1.3](#_Toc68692979)** [凡纳滨对虾体内检测重组蛋白](#_Toc68692979)**[ALF-AVK](#_Toc68692979)**[的结合活性](#_Toc68692979) 23

**[5.2](#_Toc68692980)** [实验结果](#_Toc68692980) 23

**[5.2.1](#_Toc68692981)****[ALF-AVK](#_Toc68692981)**[重组蛋白与](#_Toc68692981)**[LPS](#_Toc68692981)**[结合活性检测](#_Toc68692981) 23

**[5.2.2](#_Toc68692982)** [细菌](#_Toc68692982)**[-](#_Toc68692982)**[蛋白结合沉淀实验](#_Toc68692982) 24

**[5.2.3](#_Toc68692983)****[ALF-AVK](#_Toc68692983)**[重组蛋白与鳗弧菌中和实验](#_Toc68692983) 24

**[5.3](#_Toc68692984)** [讨论](#_Toc68692984) 24

[小结：](#_Toc68692985) 24

[第六章 免疫组化法研究凡纳滨对虾抗脂多糖因子](#_Toc68692986)**[ALF](#_Toc68692986)**[的组](#_Toc68692986) 24

**[6.1](#_Toc68692987)** [实验试剂及仪器](#_Toc68692987) 24

**[6.2](#_Toc68692988)** [实验方法](#_Toc68692988) 25

**[6.2.1](#_Toc68692989)** [处理防脱载玻片](#_Toc68692989) 25

**[6.2.2](#_Toc68692990)** [实验动物的组织固定](#_Toc68692990) 25

**[6.2.3](#_Toc68692991)** [石蜡处理及组织包埋](#_Toc68692991) 25

**[6.2.4](#_Toc68692992)** [修正组织蜡块及切片](#_Toc68692992) 25

**[6.2.5](#_Toc68692993)** [组织脱蜡复水](#_Toc68692993) 25

**[6.2.6](#_Toc68692994)** [组织抗原热修复反应及内源酶的清除](#_Toc68692994) 25

**[6.2.7](#_Toc68692995)** [背景封闭及抗原抗体反应](#_Toc68692995) 25

**[6.2.8](#_Toc68692996)** [衬染及封片](#_Toc68692996) 25

**[6.3](#_Toc68692997)** [实验结果](#_Toc68692997) 25

**[6.4](#_Toc68692998)** [讨论](#_Toc68692998) 26

[小结：](#_Toc68692999) 26

[总结](#_Toc68693000) 26

[参考文献](#_Toc68693001) 26

[个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果](#_Toc68693002) 31

# 第 一 章 文献综 述

## **1.1** 前言

世界对虾养殖业大约始于二十世纪七十年代，养殖对虾的主要产地集中在东南亚和美洲中南部，养殖对虾的迅速发展使其在水产养殖中所占的地位也越来越重要。而在我国对虾养殖同样也是水产养殖动物的重要组成部分，在2002年时

我国的对虾养殖产量已经超过30万吨，成为世界第一对虾养殖大国。对虾养殖业的持续快速发展大大缓解了食品供给和食物种类多样性带给陆地农业的压力， 同时促进了国家经济的发展。凡纳滨对虾，俗称南美白对虾万氏对虾等，原产地为太平洋沿岸一带水域。它具有含肉量高、生长速度快、繁殖周期长、抗逆性强、 便于鲜活运输等优点，属于世界养殖对虾的三大品种之一，在对虾养殖中有着重要的地位。该品种由张伟权于1988年引种，经过6年育成首批苗种。现已在全国沿海地区展开大面积的养殖，而由于其可耐低盐度环境的优点，许多内陆地区也引种成功，对虾养殖的产量也在逐年增高。然而自1993年对虾流行性疾病（对虾白斑综合症）大规模爆发以来，世界上包括我国的对虾产业遭受了重大的经济损失并一直受到了各种对虾疾病的困扰，使对虾养殖业严重受阻。拌随着养殖户对产量的追求，盲目增加养殖密度，破坏生态环境，随意投放渔药，使得养殖条件不断恶化。科学的养殖管理和疾病防治也就成了对虾养殖中亟待解决的重要问题。加强对虾抗病机制的研究，培育高产、抗病力强的苗种以及改善养殖环境条件都是解决对虾养殖过程中病害爆发的关键。要使对虾养殖业可持续、健康地发展就需要利用现代科学技术和研究成果来为对虾病害的防治提供扎实的理论基础，所以对虾病害以及基础免疫学的研究应当给予足够的重视。

目前国内外已经大量展开围绕对虾基因组以及对虾基础免疫防御机制的研究。国际上多个国家都纷纷斥以巨资建立了多种水产养殖经济动物的遗传基因图谱，通过图谱也定位和克隆到了多个与生产性状、抗逆性和抗病性相关的特殊功能基因。近年来对虾免疫系统的相关研究也取得了较多的成果，其中包括一系列免疫相关因子的分离纯化与基因克隆，例如凝集素（Cominetti et al.,2002）、抗菌肽（Destoumieux et al.,1997）、酚氧化酶（Soderhill et al.,1996）、蛋白酶抑制剂（Jiang et al.,1997）、溶菌酶（Millar and Ratcliffe,1994）、模式识别受体等，对虾的免疫调控机制也越来越受到科研人员的关注和重视。

由病原生物引起的疾病是病原、宿主和环境三者互相影响的结果，所以控制水产养殖动物的病害问题需要从控制病原侵入、优化改善养殖环境条件和提高养殖品种本身的机体免疫抗病能力三个方面同时入手（战文斌等，2004）。了解凡纳滨对虾的遗传结构和免疫防御机制，从分子水平展开免疫学研究，将为凡纳滨对虾的绿色健康养殖和抗病良种的培育提供丰富的理论基础。

## **1.2** 无脊椎动物的免疫系统

免疫是指机体识别自身以及非自身的物质，对自身物质可以形成天然免疫耐受，但会对非自身物质产生抵御清除作用的一种生理反应。生物体在生存过程中会受到外界环境中各种病原体的威胁，在于这些病原长期斗争的过程中生物体就逐渐的形成一种极为复杂的防御外界病原物质侵入机体的体系，这一体系就称之为生物体的免疫系统，其最主要的功能是在外源物质侵染机体时进行识别并随即通过产生某些信号物质刺激信号通路启动传导过程，之后借助于体液或细胞免疫反应达到抵御和清除外源入侵物质，保护机体免受外界伤害的目的。机体中的一般免疫防御机制分为两大类：先天性免疫（innate immunity）和获得性免疫

（acquird immunity）（金伯泉，2001）。甲壳类动物是无脊椎动物的一种，其机体抵御外源物质侵染时只能依赖于先天性免疫而并不存在可以依赖抗体介导的获得性免疫。先天性免疫主要包括机体表面上的粘膜、皮肤以及甲壳等物理屏障，机体内部的血细胞吞噬、包囊等作用和自然杀伤作用细胞，还有血清或者血淋巴中的一些补体成分、抗菌因子、酶类、干扰素以及白细胞介素等等这些机体固有的没有特异性的免疫防御机制。尽管无脊椎动物的先天性免疫系统被认为较脊椎动物的获得性免疫系统要简单，但它作为无脊椎动物赖以生存的免疫防御系统也能识别外源异己物质并以不用的方式加以抵御。

对虾等甲壳类动物同样也不具备免疫球蛋白并缺乏抗体介导的免疫反应，但其先天性免疫反应中具有被分为体液免疫和细胞免疫两大类的反应机制，两种反应机制是相辅相成密切相关的，细胞反应受到体液免疫因子的介导和调节，而体液因子又是从血细胞等组织中合成并释放的。

### **1.2.1** 细胞免疫

血细胞在对虾等甲壳动物体内的免疫系统中有着至关重要的作用，作为主导发挥着重要的防御作用。对虾的血细胞一般认为分为三类：半颗粒细胞

（semi-granular cells）、颗粒细胞（granular cells）以及透明细胞（hyaline）（Bartlett et al.,2002; Bauchau,1980）。颗粒细胞胞质中充满了颗粒，是体积最大的血细胞。透明胞质中不含或极少含有颗粒细胞，有较高的核质比。而半颗粒细胞则是以上两种细胞的中间过渡类型（Bauchau,1981; Soderhall and Cerenius,1992）。当病原体穿过作为第一道物理屏障的甲壳之后，就会进入血淋巴之中从而使细胞产生一系列的防御反应，主要包括4种作用和反应，首先是吞噬作用（phagocytosis），免疫细胞会利用其细胞内活性氧等将吞入到胞内的外源颗粒状物质杀灭（Song and Hsieh,1994; Munoz et al.,2000）。其他大量的免疫细胞会来协同作用当入侵机体的病原体数量过多或者颗粒体积过大时，来共同抵御病原体的入侵，这种现象可分别被称为包囊作用（Encapsulation）和结节形成（Nodule formation）。

下面具体介绍细胞免疫所发挥的几种作用首先是吞噬作用：它是细胞免疫的第一个环节，也是控制和清除外源物质的有效手段。由血细胞将外源物质吞入细胞内部，通过细胞内有着强大杀菌作用的活性氧（reactive oxygen species，

ROS），磷酸酶或者溶菌酶将其裂解消化。但活性氧的大量积累也会对机体造成损害，机体则会利用过氧化物酶和超氧化物歧化酶来进行清除。其次是包囊作用：它通常用于清除单个血细胞无法清除的较大异物，甲壳动物会在较大颗粒义务的周围以数层纤维细胞形成包囊，包囊细胞以致密的纤维状网络相连，用来防治入侵异物的逃逸。在包囊内产生的的黑色素会对真菌以及寄生虫等体积较大的病原体产生杀伤作用(Dubovskiy et al.,2008)。最后是结节形成：甲壳动物血细胞中的细胞粘附蛋白可以使外源物质与细胞之间形成紧密结合状的结节，结节形成后即在酚氧化酶的作用下产生可以将病菌杀死的黑化反应（Johansson et al.,1989）。

### **1.2.2** 体液免疫

体液免疫是指一些在血细胞受到刺激释放到血淋巴以及血淋巴中本身固有存在的一些免疫因子参与的免疫反应。其中包括各类抗菌、抗病毒因子、凝集素、 溶菌酶、识别因子等等各式各样具备免疫功能的物质。体液免疫与细胞免疫一样， 都在甲壳动物的先天性免疫系统中有着非常重要的作用。在动物机体状态良好、 健康稳定的情况下，一些免疫因子可能以极微量的形式存在于血细胞或者血淋巴中，一旦当有病原入侵时，就会促进这些免疫因子的合成与释放，有的用于识别异物；有的参与包被反应，催化黑色素的产生；有的参与凝血过程，促使伤口愈

合；有的甚至可以直接通过自身的抗菌作用来清除甲壳动物机体内的病原异物。

#### **1.2.2.1** 体液免疫中的效应分子

在甲壳动物体液免疫中，免疫效应因子发挥着非常重要的作用，这些存在于血淋巴细胞中的有着抗菌、溶菌以及凝集活性的效应物可以参与抑制病原体的生长，杀灭清除病原体或者参与凝集、创伤修复等免疫反应过程。抗菌肽作为一类广泛存在与甲壳动物中的小分子双亲性碱性多肽是各种效应因子中最为典型的代表，也是体液免疫的关键因子之一。抗菌肽是由特定基因序列编码翻译而成的一类小分子多肽的总称，通常有12-50个左右的氨基酸组成，有着广谱抗菌活性。最初的抗菌肽是上世纪八十年代在昆虫里发现的，而迄今为止已有超过1300多种的抗菌肽分子被鉴定发现，从高等的哺乳动物到低等的软体动物都有着发现抗菌肽的报道，说明该类免疫效应因子在生物界是广泛存在的。甲壳动物作为无脊椎动物的典型代表，研究人员也向后从鲎、蟹以及对虾等生物体内中分离得到了抗菌肽。抗菌肽分子的发现和深入研究对于无脊椎动物固有免疫的途径和机理奠定了扎实的理论基础。

##### （1）几种主要的抗菌肽

目前，在甲壳类动物中发现的抗菌肽分子主要包括抗脂多糖因子、Crustin家族蛋白质分子以及对虾素（Penaeidin）等。

对虾素（Penaeidin）是最早从凡纳滨对虾血淋巴中提纯得到的一类具有抗真菌、细菌作用的阳离子抗菌肽。对虾素的分子结构有两个功能区，一个是位于氨基酸C末端富含半胱氨酸的功能域CRD，另一个则是位于N末端富含脯氨酸残基的PRD功能域。CRD结构域形成二硫键含量丰富的α螺旋折叠，而PRD则是以伸展的构象存在。当机体受到刺激后，血细胞中的对虾素基因表达量会明显上升，血细胞也会同时向感染组织移动。目前，已发现4种对虾素，包括编号为对虾素2、3、4、5的4种，而在功能以及基因序列方面他们也表现出了一定的差异（Du et al.,2009）。现有的许多研究结果表明对虾素具有多种功能，首先是抗菌活性，既可以通过特定品系来抑制革兰氏阳性菌，也有对丝状真菌活性的抑制作用（Destoumieux et al., 1997）。其次是结合几丁质的能力，对虾素的CRD结构域有着几丁质结合蛋白的结构，可以使其参与对虾外骨骼的合成和愈伤。而在对虾蜕皮期，对虾素对机体本身的保护作用会更加明显（Destoumieux et al.，

2000）。另外，对虾素对于血细胞对于细菌的吞噬也会有一定的调理作用。

Crustin家族是一类含有50个氨基酸左右，富含半胱氨酸的抗菌肽，一般呈现亲水性。这一类抗菌肽具有一个WAP（whey acidic protein）的乳清酸性蛋白结构域，该结构域在氨基酸C末端含有8个保守半胱氨基酸形成的4对二硫键，并且在氨基酸N末端有一段信号肽序列。4对二硫键可以在分子的内部形成一个疏水核心，具有这种结构的分子一般都具有蛋白酶抑制活性或者抗菌活性（Smith et al,. 2001），天然纯化或者重组表达的Crustin蛋白分子都具有抑制或直接杀死革兰氏阳性菌的作用，但在机体受到细菌刺激时，却一般检测不到该蛋白基因序列的表达变化（Vargas-Albores, 2004）。根据WAP结构域序列和N端信号肽序列的不同，

Crustin可以分为3大种类：主要存在于龙虾和蟹中的Crustin I，其WAP结构域没有完整的4对二硫键结构但疏水核心是存在的，而与信号肽之间可变序列的半胱氨酸残基最多不超过六个，，该结构是较为保守的（Christie et al., 2007; Jiravanichpaisal et al., 2007）；主要存在于对虾中CrustinⅡ，该种类的特点是在靠近信号肽的一端含有一个40-80个甘氨酸的富集区（Bartlett et al., 2002; Supungul et al., 2004; Supungul et al., 2008）；CrustinⅢ目前只在中国对虾

（*Fenneropenaeuschinensis*, EF216349）、凡纳滨对虾（*L. vannamei*）（Jiménez-Vega et al., 2004）以及斑节对虾（*P. monodon*）（Supungul et al., 2004）有着少量的发现，其结构域中并没有其他两种类中的半胱氨酸富集区，而WAP结构域与信号肽序列之间的可变序列则富含精氨酸和脯氨酸残基。

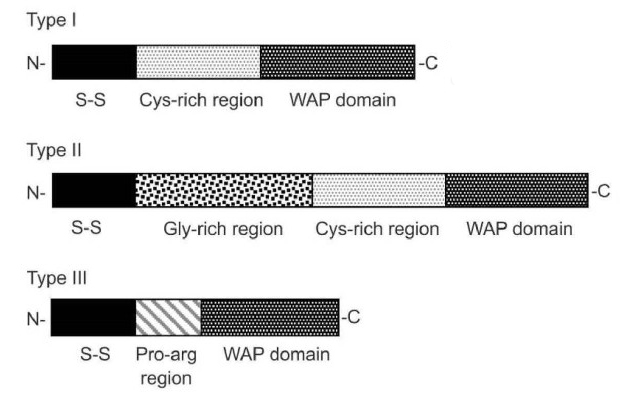


图1-1. Crustin家族三种结构类型

抗脂多糖因子同样是抗菌肽中极为重要的组成部分，也是本论文的研究重

点，故将在下一节中做具体的讲述。其他还有一些如组蛋白、血蓝蛋白及它们的衍生物等多功能蛋白在机体受到病原体侵染时也会发挥一定的抗菌作用，如淡水鳌虾 （*Pacifastacusleniusculus*）中的血蓝蛋白（Wang et al., 2001），其前体蛋白水解之后产生的多肽就具有抗菌活性的。

##### （2）抗菌肽的杀菌作用机理

抗菌肽与病原微生物之间的相互作用主要是通过细胞膜表面所携带电荷和膜电位的差异造成的。许多细菌细胞膜常含有磷脂酰丝氨 酸

（phosphatidylserine, PS）、二磷酯酰甘油（cardiolipin, CL）以及磷酯酰甘油（phosphatidylglycerol, PG）等，从而使细胞膜表面携带负电荷，因而许多阳离子抗菌肽就可以通过静电吸附力的作用集合到微生物表面，达到抑制微生物的作用。细菌与抗菌肽之间膜电位的差异则可以造成抗菌肽在细胞膜上形成穿孔的作用，破坏其完整性，导致细菌细胞的内容物外泄而死亡。在当前的研究中发现，抗菌肽的抗菌机理是多种多样的，而归结之后发现基本可以分为病原微生物的正常生理机能遭到抗菌肽的干扰而失去活性，另一类则为抗菌肽在病原微生物的细胞膜上形成穿孔来杀死细菌的两大类机理。迄今为止的研究中，已经有3种可以解释抗菌肽对微生物杀灭作用的模式模型：分别是毯式机制模型、桶板方式模型以及环形孔模型3种。在毯式机制模型中，依靠静电作用的相互吸引，抗菌肽会吸附到微生物的细胞膜表面，随着抗菌肽的不断吸附聚集，当到达某一个特定的阈值时，细胞膜会瞬间形成空洞从而破坏细胞膜的通透性，使细胞失去活性(pounyetal.1992)。在桶板方式模型中，抗菌肽不只是吸附于细胞膜的表面，在结合的过程中其构想也出现了一定变化，抗菌肽分子疏水部分会与脂质核心发生作用继而插入细胞膜中，逐渐形成孔洞或者水通道，以此来破坏微生物病原的膜通透性，最终将其杀灭(Oren etal.1999; Shai 1999)。环形孔模型最终目的也是在细胞膜表面形成孔洞，但其因为有着细胞膜成分磷脂分子和抗菌肽分子的共同参与形成而区别去以上两种模型。在这个模型中抗菌肽分子首先是以个体分子的形式与病原细胞膜平行结合，细胞膜上磷脂分子头部会被抗菌肽的疏水部分取代，当结合的比例达到一定的阈值时，抗菌肽就会转变为垂直与细胞膜的位置形态，从而形成孔洞，破坏细胞膜完整性。



图1-2 多细胞抗菌肽的膜结合特性（Zasloff M et al.,1987）

##### （3）抗菌肽的应用

抗菌肽作为生物体免疫反应过程中重要的多肽效应因子，对入侵到生物机体内的细菌、真菌甚至病毒都有着较强的抑制和消灭作用。近年来，对于养殖动物大量的抗生素的使用已经造成了非常严重的后果，一反面影响了养殖动物的食用健康，另一方面则使病原菌的抗药性不断增加，而抗菌肽有着不同于抗生素的独特的抗菌原理和作用，它是生物机体在受到外界病原菌侵入式产生的免疫反应的产物，有着较强的广谱抗菌作用。深入研究抗菌肽的作用机理以及机体在遭受病原入侵时抗菌肽的表达调控情况对于缓解养殖动物疾病，改善生态环境条件以及提高养殖食品安全都有着重要的意义（王海静等，2009）。近年来，在水产养殖对虾方面抗菌肽作为饲料添加剂也取得了就好的成果，在凡纳滨对虾的饲料中添加抗菌肽蛋白可是养殖对虾在抗病力以及成活率等方面有显著的提高（王广军等，2005）。

#### **1.2.2.2** 模式识别受体

先天性免疫较之获得性免疫缺乏如免疫球蛋白这类可以特异性识别入侵异物的功能，但其也有识别异物分子的能力，Medzhitov等在1997年提出了固有免

疫中的模式识别受体的理论（Medzhitov et al.,1997），揭示了宿主在机体受到具有相关模式分子结构的病原体入侵时会通过有限量胚系基因表达出来的模式识别受体来进行识别。与无脊椎动物的先天性免疫相关的模式识别受体通过结构被区分包括Toll样受体、革兰氏阴性菌结合蛋白、凝集素、硫脂蛋白、肽聚糖识别蛋白、以及清道夫受体的六种类型。

##### （1）Toll样受体

果蝇的免疫应答系统与Toll蛋白的关系最早是在研究其转录调控抗菌肽基因是被发现的，Toll蛋白基因在1988年时就已经完成了测序并分析出其跨膜受体的结构(Hashimoto et aL, 1988)，而在果蝇之外的其他物种体内发现了多种

Toll蛋白的同源物，及被称作了Toll样受体（Toll like receptor, TLR）并形成了

Toll家族。TLR家族中的蛋白成员结构比较一致，基本都是由行使识别病原相关分子模式的胞外区和胞内区以及用于激活信号转到蛋白的跨膜区三个部分组成。

Toll受体在无脊椎动物中并不与病原体直接进行接触，通长是作为信号跨膜转导分子来行使功能，其配体包括PGN、双链RNA分子、LPS等等。

##### （2）革兰氏阴性菌结合蛋白

最初对于革兰氏阴性菌结合蛋白（Gram negative bacteria binding protein，

GNBP）研究是发现其对于革兰氏染色呈现阴性的细菌有着极强的结合作用，但后来随着不断的研究深入发现GNBP也能与革兰氏阳性菌有一定的结合作用。无脊椎动物对于革兰氏阴性菌侵染时激发的免疫反应就起始于革兰氏阴性菌结合蛋白对于作为细菌细胞壁上主要成分的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的识别反应，之后即可参与激活蛋白酶级联反应或是诱导抗菌肽的表达合成等功能。另外，在甲壳动物的研究中，GNBP还能促进血细胞参与一些免疫反应如吞噬、包囊、凝集以及黑化反应等（Yu et al.,2003）。

##### （3）凝集素

凝集素是一类可以特异性与糖类结合蛋白，由于多糖是细菌表面的主要组成成分，就决定了凝集素可以识别这些糖类的分子结构，从而达到抵御细菌侵染的作用。在动物界中，凝集素的存在时十分广泛的，而进过研究可以根据它们对糖类识别的特异性以及序列的比对相似性分为较多的种类，无脊椎动物中主要存在的C型凝集素（C-type lectein）就是其中的一种。C型凝集素含有呈双环状结

构的糖识别结构域（Carbohydrate recognition domain, CRD），其中含有Ca2+的结合位点4个，有2个与糖类的结合有关（Drickamer et al.,1988,2003）。C型凝集素又分为两类，一类是膜表面型，在血细胞表面参与与入侵异物分子的结合和吞噬；另一类溶解在血淋巴中，可以与病原或异物表面的决定簇糖基结合从而达到凝集抑制的效果。此外C型凝集素还可以使血细胞加快向病原体入侵部位的运动，使红细胞可以轻易的清除外源异物，起到一定的调节作用（Pace et

al.,2002）。在无脊椎动物中除了C型凝集素，还有这另外一个大类，即是硫依赖型凝集素（Galectin, GALE）。这一类的凝集素不论在细胞内外都有分布，大都广泛的分布于后生动物（烟草天蛾、果蝇等）、真菌以及海绵当中。GALE的结构中由于存在着球状糖蛋白识别结构域，故可与半乳糖苷发生特异性的结合反应。硫依赖型凝集素根据其所含有的CRD结构的多少可分为：仅具有一个CRD结构的原始性；具有2个CRD结构的串联重复型以及杂有甘氨酸、脯氨酸和CRD结构的镶嵌型。在目前对于无脊椎动物GALE的研究中，其与先天性免疫、机体发育以及细胞凋亡的关系都已被证实。

##### （4）硫脂蛋白

蛋白内部包含硫脂区的一类超级蛋白家族即是硫脂蛋白（Thioester containing protein, TEP），在动物进化过程的较早期就已经出现，从高等的哺乳动物到较低等线虫都有这类蛋白的发现(Linetal., 2007)。该蛋白家族大多数都是有着较为保守硫脂基的序列，硫脂基在被水解活化以后可以与外来病原上的靶位进行共价结合，从而达到破坏清除病原的目的。编码表达TEP的基因在生物体的发育过程中表达水平是比较低的，但在接受病原体刺激以后会有明显的上升，并且TEP也具有多样性，在生物体受到不同的病原体刺激时其表达模式也是有差异的。在哺乳动物和节肢动物中有一种α2-M的硫脂蛋白，主要存在于血浆或者血淋巴中，就有一定的蛋白酶抑制剂活性，并可以通过调节酚氧化酶原激活系统来控制该系统过量有害物质的产生(Cerenius and Soderhall, 2004)，α2-M 也已从包括凡纳滨对虾、草鱼（*Ctenopharyngodonidellus*）等几种生物体内纯化得到。

##### （5）肽聚糖识别蛋白

最早纯化的肽聚糖识别蛋白（Peptidoglycan recognition proteins, PGRPs）

是从家蚕的血淋巴和表皮中得到(Yoshida, 1996)，并验证对肽聚糖（PGN）有着较高的结合活性。从青霉素可以通过抑制肽聚糖的合成而致死细菌就可以看出，肽聚糖是细菌赖以生存的组分，其在革兰氏阳性菌的细胞壁中含量接近50%(Rosellthal and Dziarski, 1994)，而在阴性菌种仅为脂多糖下的薄薄的一层，真菌则没有肽聚糖的存在。.肽聚糖识别蛋白正是通过肽聚糖这一固有免疫系统可以识别的良好靶标来激活免疫系统的，从而启动黑化、吞噬以及信号转导等免疫反应。PGRP可以大致可以分为分泌型胞外蛋白的短型肽聚糖识别蛋白和含有跨膜结构域的长型肽聚糖识别蛋白两个亚家族（王金星等，2004）。肽聚糖识别蛋白在果蝇中的研究是较为深入的，它可以通过12种PGRP的基因编码表达至少包括10种长型7种短型共17种的PGRP，并表达与如脂肪体、肠道和血细胞等免疫相关组织，果蝇可以通过肽聚糖识别蛋白来激活和介导Toll途径(Michel et al., 2001)和*Imd*途径（Choe et al., 2002）。迄今为止的研究中，包括对虾类等甲壳动物体内并未发现这类肽聚糖识别蛋白或者编码其基因的存在。

##### （6）清道夫受体

清道夫受体（Scavenger receptor, SCR）与Toll受体一样都是由巨噬细胞表达分泌的受体，是它主要存在于巨噬细胞膜表面的一种糖蛋白，可以不依赖于其他调理作用而直接起到吞噬作用或者参与介导细胞粘附。SCR最早被真正意义上分离和鉴定是由Kodama等在1990年从牛的内脏中分离纯化到的三聚体形式糖蛋白，并命名为牛巨噬细胞清道夫受体(Kodama et al.,1990)。随即人类清道夫受体的cDNA序列也得以克隆并深入研究。近几年来，研究人员发现SCR可以识别很多与病原关系密切的配体分子，如革兰氏阳性菌以及其细胞壁的主要成分肽聚糖、革兰氏阴性菌及其主要结构组分脂多糖以及多聚核苷酸，甚至是病毒等。因此认为SCR也是一种类的模式识别分子（Peiser et al.,2002）。

表1-1目前甲壳动物中纯化或克隆的模式识别蛋白，包括LBP、BGBP和LGBP. Table 1.1 The characteristics of pattern recognition proteins: LBP, BGBP, LGBP in crustaceans that



Have been purified and cloned so far.

## **1.3** 抗脂多糖因子的研究进展

抗脂多糖因子作为甲壳动物抗菌肽中的重要组成部分，有着较强的广谱抗菌活性以及识别结合脂多糖的能力，可以参与细胞脱粒作用的调节，也可以在病原体侵染机体是进行识别并引起之后细胞的级联反应，在先天性免疫反应中起着至关重要的作用，近年来也是抗菌肽类中研究的热点（Morita et al., 1985; Somboonwiwat et al., 2005）。

### **1.3.1** 抗脂多糖因子的发现及结构分析

早在1982年，Tanaka等研究人员就从美洲鲎又称为美洲马蹄蟹（*Limulus*

*polyphemu*）的阿米巴细胞（血细胞）中分离鉴定出一种可以结合某些内毒素（主要为脂多糖等）并且阻止内毒素对血液凝集作用的抗凝剂的类似物，并将其命名为了LALF。之后的一系列实验测定了LALF由102个氨基酸残基组成的分子量

约为为11.5kDa的单链蛋白质分子。其氨基酸一级结构的N端有20个氨基酸残基有高度疏水的特性，并在两个高度保守的半胱氨酸32与53之间形成二硫键，在二硫键包围β-折叠区域的环内集中着大量的带正电荷的氨基酸残基，这一结构可以大大提升LALF对于脂多糖的结合能力以及它的抗菌活性（Vietzen et

al.,2003）。随后，在东方鲎（*Tachypleustridentatus*）的血细胞中，同样作用和活 性的多肽也被发现并命名为TALF（Moritetal, 1985），其分子量与LALF基本一致，也是一种结构较为简单的碱性单链蛋白，二硫键也是在两个半胱氨酸之间形成。

近年来，针对ALF的研究基本上都是集中在ALF与LPS的结合活性以及其抗菌能力来展开的，现有的研究已经证明ALF对于革兰氏阴性菌有着较为强烈的抑制和杀灭作用。LALF作为发现较早的抗脂多糖因子也常作为模型用于研究，尤其是其在两个两个半胱氨酸之间形成的二硫键区域，已被认为是与LPS结合的活性功能区域。而体外人工合成的LALF的31-52的功能结合域也已证实可以与LPS结合，并可以有效的缓解内毒素对小鼠造成的伤害（Vallespi et

al.,2003）。人工合成的具有完整二硫键结构的环肽能够极好的抑制由于LPS侵染引起单核细胞的细胞因子（cytokine）的分泌产生(Andra et al.,2004)。

### **1.3.2** 抗脂多糖因子在甲壳动物中研究现状

最近，随着对ALF研究的深入，甲壳动物中也有越来越多的关于ALF的研出现。Gross在2001年公布了类似ALF的蛋白也存在于对虾中，之后越来越多的ALF基因被克隆得到，ALF在甲壳动物中的特性研究也得到了深入开展。目前，在对虾类的ALF研究中，许多物种的ALF基因得到了克隆鉴定并被表达分析，研究人员已先后从中国明对虾（*Fenneropenaeuschinensis*）（Liu et al.,2005）、斑节对虾

（*Penaeusmonodon*）(Tharntada et al.,2008; Supungul et al.,2004; Somboonwiwat et al.,2005)、日本囊对虾（*Marsupenaeusjaponicus*）(Nagoshi et al.,2006)、白滨对虾（*Litopenaeussetiferus*）（Gross et al.,2001）、圣保罗对虾（*Farfantepenaeus paulensis*）(EF601051, EF601054)、南方滨对虾（*Litopenaeusschmitti*）(DQ991357)以及南美蓝对虾（*Litopenaeusstylirostris*）(DQ010421)等几种对虾的血细胞中克 隆或鉴定出了抗脂多糖因子，而在凡纳滨对虾中已有5种ALF基因得到了克隆，包括*ALF-AAK*(ABB22833), *ALF-AVR*(ABB22832), *ALF-VVR*(ABB22831), *ALF1*

and *ALF2*（de la Vega E et al.,2006; 2008）。其他一些甲壳动物如几种蟹类的机体内也发现了ALF的存在。现有的研究结果表明，同一物种的甲壳动物体内也会存在着许多长度各异、DNA序列不完全相同，行使的生物活性功能也不尽相同的亚型抗脂多糖因子。除了上述在凡纳滨对虾中发现的5种ALF外，至少5中亚型的ALF也在斑节对虾的血细胞cDNA文库中被发现，分别被命名为ALFPm1-5，这5种亚型ALF的开放阅读框所编码的氨基酸长度也是有所不同的（Supungu et

al.,2004）。de la Vega等在（2008）凡纳滨对虾体内分别克隆到了2个亚型的ALF基因，一个为碱基长度为528bp，开放阅读框编码120个氨基酸的LvALF1和一个碱基长度为623bp，开放阅读框编码93个氨基酸的LvALF2，并具体对LvALF1对于对虾遭受病原菌侵染时的作用做了深入的探究。利用注射与LvALF1相关的双链RNA到对虾体内后使用实时荧光定量PCR发现该基因的转录量明显降低，将

LvALF1基因敲除后，在弧菌（*Vibriopenaeicida*）、尖孢镰刀菌（*Fusarium*

*oxysporum*）以及对虾白斑病（WSSV）攻毒下，对虾的死亡率会有明显的上升，从而证明了LvALF1在凡纳滨对虾体内所起的抗菌活性。Beale等（2008）在美国龙虾的机体内识别到了ALFHa-1和ALFHa-2两种亚型的ALF，通过实验发现在对龙虾进行弧菌免疫刺激后，ALFHa-1会参与到免疫防御反应中。Kunlaya等（2008） 对斑节对虾的ALFPm3通过免疫组化的方法进行了组织定位，发现经过哈维氏弧菌攻毒后的对虾，血细胞是ALFPm3的主要表达组织，并且会随着血细胞的流动进入机体的各个器官。其研究实验还对重组表达的ALFPm3与微生物细胞壁主要成分的脂多糖和磷壁酸进行了体外结合试验，结果发现两者均可以与ALFPm3发生结合反应。

以上这些研究都表明，甲壳动物的ALF存在着多种氨基酸序列各异，就有不同表达特征的亚型，但其中大部分的表达转录水平都会在机体遭受到细菌等病原微生物入侵时发生上调反应，并能有效的结合抑制各类细菌的生长分裂。先天性免疫作为甲壳动物赖以生存的免疫防御系统，有着识别并清除外源病原微生物，保护机体不受损伤的重要防御作用，而抗菌肽则是系统中清除病原微生物最重要的免疫效应因子，所以甲壳动物体内抗脂多糖因子形态与功能的多样性会对其免疫防御能力起到非常重要的作用。

### **1.3.3** 研究抗脂多糖因子的意义及其应用前景

随着世界范围内养殖动物的规模与种类的不断扩大，以及当今渔业所采取的高密度集约化养殖模式的运用，在养殖过程中所产生的各种病害问题也变得日益严重，疾病暴发的时间也开始日益频繁，造成了不可估量的经济损失，药品以及抗生素等的盲目使用也给养殖动物食品安全带了极大地风险。在诸多养殖动物疾病之中，白斑病和弧菌病由于有着传播快，范围广、致死率高等特点，是对虾养殖中危害最为严重病毒性疾病和细菌性疾病。目前养殖人员对于对虾病害的防治主要还是着手于免疫增强剂，中药以及疫苗等混合饲料来提高对虾自身的免疫能力。而对于ALF的深入研究已经证明了该种抗菌肽对于弧菌等革兰氏阴性菌有着极为强烈的结合和抑制作用，两个方面入手来实质应用ALF对于细菌的这种杀灭作用，首先可以通过改造基因的手段实现转ALF基因，以促进其在对虾机体内的表达而达到抗菌感染的目的；其次是可构建可重组表达ALF的工程菌，通过大量表达发酵来获得ALF蛋白与饲料混合后作为免疫增强剂投喂到养殖对虾中。此外，在医学界中如何解决由于病菌微生物的侵染而引起的败血休克症也一直是一个难题，引起脓血性休克和败血症的一个主要的原因就是革兰氏阴性菌细胞壁上存在主要成分脂多糖组分。当机体受到细菌侵染时，巨噬细胞就会受到脂多糖的刺激而活化，之后会出现一系列的级联炎症反应。如果可以阻止脂多糖对巨噬细胞的激活作用，就可以阻断或钝化之后引起的一系列炎症反应，也就不会引起败血症等疾病的发生。现有的抗生素试剂在最初期对细菌是有着良好的杀灭作用，但很快细菌就会产生耐药性等副作用，而象ALF这种有着中和内毒素作用的抗菌肽蛋白就极少有副作用的报道。研究表明，如鲎的ALF可以在机体遭受LPS等内毒素攻击时给予较好的保护作用。ALF大量的存在于无脊椎动物之中并且有着稳定的结构和功能，所以不论是从无脊椎动物中纯化天然的ALF制剂还是利用工程菌进行重组活性ALF都有望得以开发成为一种可取代抗生素的新型的抗内毒素药物或者成为其他生产中抗菌杀菌的有效制剂（周文杰，2007）。

虽然之前的许多研究都对抗脂多糖因子等抗菌肽的分子结构以及作用机理有着深入的研究，而且也通过各种结合试验等手段证明了ALF可以有效的抑制细菌等病原体的侵染，但在临床应用以及生产实践中的工作还有很大的不足，特别是体外重组ALF后可以大量得到有结合LPS活性的纯化短肽蛋白的技术尚需要

进一步的进行研究。低成本、高产量、绿色无公害的抗菌产品不论是在医学界还是水产养殖界都将有着非常广阔的发展前景。

## **1.4** 水产养殖对虾的重要病害

近年来，随着世界对虾养殖行业的兴起，多种对虾病害的发生也越来越频繁，如何预防和控制病害的发生受到了来自各界的广泛关注，下面介绍几种在对虾养殖过程中危害较为严重的几种对虾疾病。

### **1.4.1** 对虾白斑症病毒病（**White spot syndrome virus, WSSV**）

对虾白斑症病毒，病毒粒子杆状，具囊膜，无包涵体。完整的WSSV粒子呈现椭圆短杆状，一端有一尾状突出物。核酸为双链环状DNA，大小约为300kb左右，研究推测表明该病毒约有180个左右编码功能基因的开放阅读框。依据其较为独特的形态特征及遗传学特点，WSSV已被归类为Nimaviridae科, whispovirus属的新的病毒家族（Lo et al.,1996）。该病毒所引起的对虾白斑症于上世纪90年代最早爆发于台湾某些对虾养殖场，此后20年该病传染迅速，很快蔓延到世界各个对虾养殖地区，几乎每一年都造成巨大地经济损失，是现有世界对虾养殖业面临的比较严重的疾病之一(Lightner et al., 1996; Joryet al., 1999). WSSV的感染宿主十分广泛，多数甲壳类动物都会感染成为寄主。养殖对虾刚染病毒后，首先会停止摄食，反应迟钝，弹跳无力，静伏于池底或十分缓慢游动，迅速死亡。较为典型的病虾会在头胸甲内侧有白点，肉眼可见。该种病毒的主要传播方式是水平传播，经口或鳃感染进入宿主之后，通过宿主细胞膜表面的特异性受体结合病毒侵染进入细胞内开始增殖。带有病毒的水环境、鲜活饵料（沙蚕、卤虫）以及发病死亡的对虾都可以传播病毒（Zhan et al.，1998；黄倢等，1995；宋晓玲等，

2001；何建国等，1999；蔡生力等，1995；）。但目前尚未报到可以直接证明病毒进行垂直感染的证据。

### **1.4.2** 桃拉综合症病毒病（**Taura syndrome virus disease, TSVD**）

桃拉综合症病毒病是凡纳滨对虾特有的病毒性疾病，其病原随着我国从国外引种凡纳滨对虾的亲虾苗种而传播到我国。对虾养殖过程中一旦爆发该病会带来非常严重的经济损失，也是OIE规定的必须申报的疾病之一（OIE, 2002; Lighter et al.,1994; 1995）。由于该病首例发现是在1992年厄瓜多尔的Taura河河口附近，通过组织学等方法确认为一种新的病毒并命名为桃拉综合症病毒。分离纯化的

TSV病毒粒子经过电镜观察发现是一个无囊膜的十二面体的粒子，直径约为

31nm. TSV为正股单链RNA病毒，长度约为9kb，可以编码24、44和55kD三种主要多肽（Bonami et al.,1997）。TSV病在养殖对虾中主要发生在其蜕皮期，病虾极少进行摄食，游动缓慢，在急性感染期，其附足上会有红色色素沉积，有时整个虾体都会呈现红色。多数患病的对虾都会死于蜕皮期，少数幸存可以进入发病慢性期，并逐渐开始恢复，病虾在这个时期会出现分布不规则的斑点、坏死灶等，逐渐恢复的对虾就会成为无症状的TSV携带者。凡纳滨对虾的仔虾（幼虫晚期） 对TSV是高度易感的，成虾也会有较为严重的发病，但比幼虫晚期的仔虾之前更小的幼虫阶段尚未有可感染TSV的报道（Overstreet et al., 1997）。TSV的传播途径主要是水平传播，主要是由于换水后发现对虾患病死亡，之后健康的对虾由于蚕食感染的死虾而染病，进而造成病毒在种群中快速的传播，发病虾池从发现感染到对虾拒食到死亡只用10d左右，发病速度极快。TSV另一特点就是可以耐受多次冻融或者长期冰冻环境而不影响其感染能力，这就造成了被感染的冻虾或者携带病毒的冻虾会随着各个地区之间的贸易而传播的可能。

### **1.4.3** 鳗弧菌诱发的对虾疾病

鳗弧菌为有鞭毛的革兰氏阴性细菌，弧状。短弧状或杆状，极生单鞭毛能运动，无荚膜，不形成芽孢，氧化酶阳性，对O/129敏感。葡萄糖厌氧发酵，具有典型的弧菌属细菌特征。鳗弧菌可在25一30℃环境条件下，于含1.5%Nacl的脑心浸出液、TSA等营养丰富的培养基中快速生长，在固体培养基上生长时，会形成白色圆形菌落（陈吉祥等，2005）。鳗弧菌嗜盐，可以在较广盐度范围下存活，在海水中存活时间极长可达到50个月以上。鳗弧菌是条件致病菌，当水产养殖动物生活在不良的环境条件下，遭遇刺激或是受伤时，会诱发疾病的产生（张新忠等，2007）。该种致病菌流行区域较为广泛，可导致多种鱼类以及虾类的死亡，在对虾养殖中常出现的红腿病、烂鳃病以及幼体弧菌病等均是由鳗弧菌导致，是目前被报道和研究最多的弧菌，常给水产养殖业造成较大的经济损失。

在鳗弧菌所能诱发的对虾细菌病中，红腿病是较为常见的，其主要症状是对虾的附肢特别是游泳足变为红色，头胸甲的鳃区会呈现黄色或者淡红色，行动呆滞，不能控制方向，在水中垂直上下或者旋转游动，停止进食后不久死亡。此病在全国各地对虾养殖区的各个品种的养殖过程中都有发生，其流行主要与水质

不良和水底污染有关。其次是烂鳃病，主要症状是鳃丝会呈现灰色、脆弱、肿胀等状态，严重时会有部分鳃丝溃烂坏死，并在溃烂与未溃烂组织间形成一条黑褐色的分界线。此病常在温度较高的季节发生，其发病率较低，但一旦感染后鳃丝溃烂的对虾几乎无法成活。

## **1.5** 分子Th物学在研究中的应用

研究核酸等大分子物质的形态结构、功能特征的规律性和重要性的科学就被称为分子生物学（Molecular Biology），在分子生物学中，核酸的复制、表达与调控规律是主要的研究对象，生物机体所表现出的形态特征，功能结构等各方面的表象的决定基础就在于核酸，所以在生产养殖过程中，生物机体所表现出来的性状，抗逆性、抗病性等等就是由其遗传基因决定的，深入了解生物体的功能基因已经成为当今生物学研究的热点。随着分子水平研究的不断推进深入，许多与养殖品种优良性状相关的功能基因已经发现并进行了深入研究。分子生物学技术主要的研究方法包括：实时荧光定量PCR检测技术、体外重组表达功能基因蛋白的功能验证、Race全长扩增技术、cDNA文库构建以及基因敲除等。

### **1.5.1** 实时荧光定量**PCR**技术分析基因转录变化

荧光定量PCR（flurescent real-time quantitative PCR, qPCR）不同于一般PCR在程序扩增结束后再以琼脂糖凝胶电泳分析DNA扩增结果，而是可以通过反应体系中加入的荧光基团，利用检测荧光信号的积累程度，在反应程序进行之中即可对扩增产物进行分析，即为“实时”。该技术最早由Applied Biosystems公司于

1996年推广问世，相对于常规PCR而言，荧光定量PCR主要的优点是能准确的确定初始模板的拷贝数，较宽的动态范围和极高的灵敏度。qPCR可用于判断一段序列有无的定性试验，也可用于确定DNA拷贝数的定量试验，无需通过琼脂糖电泳进行分析，无需扩增后的实验操作，大大提高效率，减少样品污染几率。qPCR包括相对定量和绝对定量两种样品数据分析方式，相对定量可用来确定不同样品中目的基因转录表达差异；绝对定量则是为了计算起始模板的拷贝数量（Livak and Sehmittgen, 2001）。

qPCR在水产养殖动物免疫中检测某个免疫相关功能基因的不同机体组织中、不同生长阶段或者免疫刺激后不同时段的转录表达情况中，有着非常广泛的应用。Wang等（2011）年通过qPCR对栉孔扇贝Toll样信号转导通路中的CfTLR，

CfMyD88, CfTRAF6, CflB and CfNFB等5个基因在弧菌刺激后的表达量进行了检测分析，其结果表明5种基因在机体受到刺激时都能参与到免疫反应之中。在中华绒螯蟹酚氧化酶基因的研究中，Gai等（2008）检测了再慢弧菌刺激后该基因mRNA的转录表达情况，并阐明了该基因的组织表达丰度的差异性。Ma等

（2010）年在对中国明对虾巨球蛋白（alpha-2 macroglobulin）的研究中运用qPCR技术检测了该基因在受到WSSV和鳗弧菌刺激后，不同时间段和不同组织中的转录表达情况，证明了该基因参与了对虾免疫反应。而在人体、动植物甚至饰品中的各种病原微生物的检测中，qPCR也得到了较多应用（Rinttila et al., 2004; Jardi et al., 2001; Bohm et al., 1999）。

### **1.5.2** 体外重组表达功能基因蛋白的功能验证

在免疫研究中，将克隆得到的编码免疫相关功能基因片段通过酶切等作用插入到噬菌体或者环状质粒中形成重组载体，再转导进入细胞中，附加诱导条件得到功能基因表达的重组蛋白。从而将重组蛋白用于免疫反应来验证其功能基因的作用。重组表达系统中使用较为广泛、技术成熟的有酵母、哺乳动物细胞和昆虫细胞为载体的真核表达体系和以大肠杆菌为载体的原核表达体系两种。目前，由于原核表达体系有着易操作、产量高以及成本低的特点而得到早期基因工程产品的亲睐。但随着酵母真核表达系统的成熟，利用酵母作为工程菌载体发酵得到重组表达蛋白也日益增加，真核表达有着大肠杆菌表达系统所不具有的对重组蛋白的调控和修饰行为，是表达的外源蛋白活性更好，不需再复性等优点。

不论在医学领域还是水产养殖动物功能蛋白的研究中，将功能基因进行重组表达出蛋白的技术方法都有着多方面应用。在免疫学研究中，提取纯化病原微生物某些自然状态下的特异性或者致病性的关键蛋白是比较困难的，但是随着多数病原微生物全基因组的测序完成和体外重组蛋白技术的完善，对这些独特的蛋白进行大量体外表达后进行功能和活性的验证就变成了可能。一旦这些疾病的关键蛋白的致病能力等得到透彻的研究，就可以使它们成为至于该病的靶分子或者成为早期诊断的指示分子，而某些可以作为克服疾病的蛋白分子如抗菌肽等，同样也可以导入工程菌种进行大量发酵生产。中华绒螯蟹的脂多糖因子就由Li等（2008） 进行了体外重组表达，并对其抑制细菌活性进行了检测，得到了理想的效果。姜珊等（2011）对以大肠杆菌为载体进行的抗脂多糖因子的重组表达条件进行了优

化，为其工业化的大量发酵生产提供了理论基础。

### **1.5.3** **cDNA**文库构建及分析

生物机体的DNA中信息含量是非常大的，而通常可以转录表达为蛋白的序列只有一部分，仅将转录后的mRNA作为模板，通过反转录酶的作用而在体外形成稳定双链的cDNA，再以质粒或者噬菌体作为载体转导进入细菌中，通过保存可大量繁殖的细菌来保存多个小片段的cDNA序列，这些cDNA序列的集合就成为了该集体某一个组织的cDNA文库。cDNA文库大大缩小了DNA所携带的遗传信息量，仅仅只反映可以表达成蛋白的基因序列，就更有利于进行免疫、优良性状等相关基因的筛选和克隆。对从cDNA文库所包藏的菌种里随机挑取的单克隆进行测序后获得的基因序列，由于该基因序列可以代表生物机体组织的特定时间的表达情况，所以被称之为表达标签序列（Expressed sequence tag, EST）。EST序列的研究和应用已经成为当今分子生物学研究的首要技术手段，可以作为基因组学蛋白质组学之间相互联系的桥梁。在水产养殖动物中，通过从DNA文库和

EST序列的筛选鉴定，得到了包括中国明对虾的酚氧化酶元、抗脂多糖因子、整合素等许多免疫相关的基因（Dong et al.,2007; Tang et al.,2012）。

### **1.5.4** **RACE**全长扩增技术

快速cDNA末端扩增法（Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE），是除了cDNA文库以及EST方法克隆基因之外的另一种快速克隆基因的方法。RACE技术的概念和方法最早在1988年由Frohman提出，并经过多次修改和优化，目前分子生物学界应用最广的就是SMART RACE试剂盒所采用的扩增方法。RACE的基本原理中又分为分别扩增目的基因3‘末端的3‘RACE和5‘末端的5‘RACE，在3‘RACE的扩增中主要是利用3‘末端的polyA尾巴作为一个引物的结合位点与一个正向的特异性引物共同通过PCR完成中间位置部分序列的扩增。

5'RACE则是在反转录时利用通用引物5’RACE CDS来合成第二条正链，由于催化反转录合成的反转录酶有着末端转移酶活性，就会在反转录到达第一链的末端是自动加入3-5个dC残基，退火时dC残基会与接头引物的OligodG结合而在双链中加入接头引物序列，然后用接头引物(UPM)和设计好的序列特异性引物的共同作用下进行PCR扩增。两个末端的的扩增完成后就可以进行序列测序并根据重合部分拼接得到整个目的基因序列的全长。

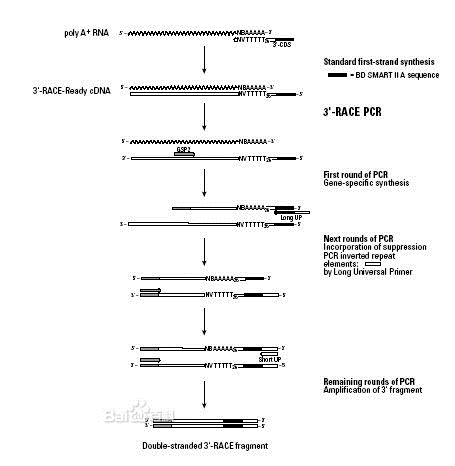
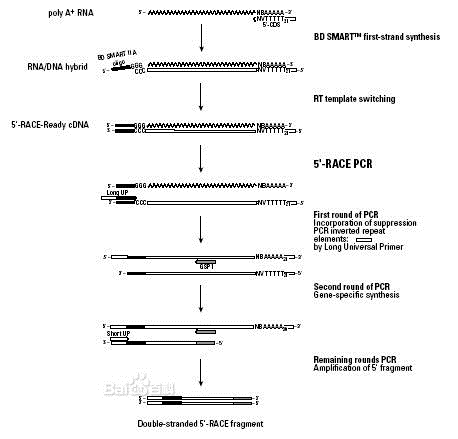


图1-3 RACE扩增技术示意图

RACE的方法主要是建立在PCR技术的基础上，其优点相对于其他两种获取基因序列的技术来说有很大的优势，首先其操作更易于掌握也更加的迅速省时；其次它的扩增片段更为完整，所得到的基因序列一般都可以正常表达；最后由于它所需的初始mRNA量比较低所以可以获得在生物机体内丰度较低的mRNA序列。但同样也有一定的制约性，比如RACE技术的使用时必须建立在有已知部分序列而去扩增剩余基因序列的基础上，所以就需要前期花大量的时间通过同源序列比对等方法根据基因保守区设计简并引物来扩增到目的基因部分序列后，再利用该技术得到剩余基因序列全长；再比如，由于RACE扩增中或出现由于引物不匹配而形成的非特异扩增，这样就需要进行一轮甚至多轮的巢式PCR反应才能获得目的基因片段，二者多轮扩增同样又会增加PCR反应中的错赔率，因此，这三种基因序列的获得方式都是各有所长，可以根据不同的科研目的来选取不同的实验技术。

## **1.6** 本论文研究的目的及意义

随着我国水产养殖行业的不断发展，如何有效、健康、环保的解决养殖动物的病害问题已经越来越受到研究人员和普通百姓的关注。在养殖过程发生病害时，化学药物以及抗生素的滥用都是目前国家发展绿色养殖所面临的巨大的问题，这不仅会带来病原体耐药性以及基因突变概率的增加，也会对人们食品的健康和安全带来风险。最近，研究人员从动物自身的一些免疫效应因子以及抗病机制入手进行研究，发现如甲壳动物抗菌肽等免疫防御因子具有较好的抑制病原体的作用，不论是在医学界还是水产养殖行业中，都可能开发成为一种绿色高效的免疫防治制剂。

抗脂多糖因子是天然小分子蛋白属于甲壳动物中抗菌肽的一种，在甲壳动物体内主要行使抗菌抑菌的作用，由于其与细菌结合方式特殊又属于动物机体天然存在，所以既不会使细菌产生抗药性又不会对养殖动物机体造成损害，所以利用抗脂多糖因子等抗菌肽类物质取代抗生素在水产养殖业病害防治中应用将有着非常广阔的应用前景。今后，随着绿色无公害水产养殖业的进行和深入，抗菌肽类物质作为免疫增强剂或者饲料添加剂的开发和推广将越来越受到人们的关注。

在本论文的实验中，我们以凡纳滨对虾作为研究材料，对其抗脂多糖因子ALF-AVK进行了基因克隆与原核表达，并对其与病原体的相互作用特性进行了研究，为抗脂多糖因子在参与对虾免疫防御过程中发挥的作用等研究提供了理论基础，以期为抗脂多糖因子在甲壳动物健康养殖以及资源环境保护中做出一定的贡献。

# 第二章凡纳滨对虾血细胞**A**LLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK基因的克隆及序列分析

## 2.1 凡纳滨对虾**A**LLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK基因的克隆

### **2.1.1** 实验材料与仪器

DEPC、LB培养基、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）、氨苄青霉素（AMP）及卡那霉素(Kan)均购于上海生物工程有限公司；异丙醇、氯仿等常规试剂购自国药生物公司；Trizol购于LifeTechnology公司；SMART RACE cDNA Amplification Kit 、DL2000 DNA marker、pMD19-T Vector、LA Taq DNA

Polymerase购于TAKARA公司；质粒小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化技术（北京）有限公司；实验中所用引物均由上海桑尼基因公司进行合成。大肠杆菌（*Escherichiacoli*）DH5α菌种购自北京托普塞试剂 公司。实验用健康凡纳滨对虾采自青岛南ft水产品批发市场，体长12-16 cm。

高压灭菌锅和-80℃超低温冰箱均购自三洋（SANYO）公司；凝胶成像系统、PCR仪均购自美国伯乐（Bio-Rad）公司；高速冷冻离心机购自SIGMA公司；空气浴恒温摇床、恒温水浴锅、电子天平、紫外分光光度计。

对虾血液抗凝剂配方：0.22 nm滤膜过滤除菌，9 mM EDTA, 27 mM柠檬酸钠，336 mM NaCl, 115 mM 葡萄糖，pH 6.8-7.2，4℃保存。

琼脂糖凝胶电泳50×TAE缓冲液配方：Tris 242 g, EDTA 37.2 g，醋酸37.1

ml，充分混匀后定容至1 L，室温保存，稀释50倍即为工作液直接使用。

### **2.1.2** 实验方法

#### **2.1.2.1** 凡纳滨对虾血细胞**mRNA**的抽提

实验之前提前使用0.1%的DEPC水浸泡所用的离心管、研磨棒等实验材料，并使用高温高压进行处理，以确保没有RNA酶的污染；

（1）由凡纳滨对虾头胸甲处抽取血淋巴并按2: 1的比例伴以抗凝剂，抽取的血淋巴置于冰浴的离心管中，800 g离心15 min分离血细胞和血浆，小心倾倒出上层血浆，留下沉淀的血细胞中加入1 ml的Trizol溶液，反复吹打血细胞使其裂解，最佳效果是溶液成为均一通亮无颗粒物存在的液体，如果所取样品为动物组织则可以剪下米粒大小的组织到0.5 mlTrizol中，使用无RNA酶的研磨棒进行研磨，待无大块组织后再加入0.5 mlTrizol溶液，样品处理完毕后可冻存于-80℃较长时间；

（2）样品由-80℃拿出后需在冰上放置直到溶液完全融化，每1ml Trizol加入200μl的氯仿，用手剧烈震荡离心管15 s之后冰上放置2-3 min, 12, 000 g 离

心15 min以使溶液完全分层清洗，注意在4℃条件进行。离心后混合物自上而下分成无色透明的水层，白色较薄的蛋白层以及为苯酚-氯仿层为红色。抽提的组织RNA主要溶解于最上面的水层中，约有0.5-0.6 ml。

（3）用200μl的黄色枪头吸取水样层（注意不要吸到蛋白层），将其转移至另一个DEPC处理的1.5 ml离心管中，迅速加入预冷的异丙醇500μl来沉淀RNA，将混合的样品在室温下静置10 min之后低温环境12, 000 g离心10

min将异丙醇固化的RNA沉淀到离心管底部，抽提出的RNA量较大的话肉眼可见管底有白色沉淀；

（4）不影响RNA沉淀的前提下尽量吸走上清液，再加入1ml左右的预冷

75%酒精溶液对抽提的RNA进行洗涤，尽量将RNA沉淀吹打均匀后并在低温条件下7, 500 g离心5 min；

（5）离心结束后在不影响RNA沉淀的前提下尽量吸走酒精溶液，适当干燥RNA沉淀以免酒精影响后续实验反应，RNA样品以20μl 70℃左右预热PCR水进行溶解；

（6）以溶解RNA的PCR水作为空白对照，将稀释50倍的RNA样品在微量核酸蛋白测定仪（nanodrop）下分别测定OD260和OD280，纯度质量达到标准的RNA抽提样品两者比值应在1.80—2.0之间，同时利用1%琼脂糖电泳检查RNA样品的完整程度。

#### **2.1.2.2** **RACE**引物设计

根据Genebank上已有与凡纳滨对虾的ALF基因序列非常相似的EST序列(GE325383)，分别设计特异性引物P1, P2 and P3 (Table 1)利用Race方法扩增LvALF-AVK基因全长。

表2-1 *ALF-AVK*基因RACE引物

Table 2-1 RACE primers for *ALF-AVK*

引物名称引物序列

Primer name Sequence

P1 5'- AAGCCAGGACACGCAGCCATT -3'

P2 5'- AGCCACCGCTTAGCATCTTGTTC -3'

5'-CDS 5′-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN -3′UPM(0.4μM UPM-L, 2μM UPM-S)

UPM-S: 5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′

UPM-L: 5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′3’-CDS 5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30) VN-3′

NUP 5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′

#### **2.1.2.3** **RACE**反应

（1）对虾血细胞总RNA反转合成cDNA：在5’RACE cDNA链模板合成管加入1μl 5'-CDS、2μl RNA和1μl SMART II A oligo；而在3’RACE cDNA模板链合成管内加入1μl 3'-CDS和2μl RNA，然后分别补加PCR水到上述两个PCR管中使反应体系终体积达到5μl。将两个PCR管的反应体系置于70℃金属浴上加热5 min，然后立即置于冰上冷却2 min后在两个PCR管内均加入1μl PowerScript Reverse Transcriptase、1μl dNTP(10 mM)、1μl DTT（20 mM）和2μl 5×First-Strand buffer，尽量混匀PCR管中的溶液稍加离心使溶液不会有挂壁现象，之后在42℃条件下使反应体系发生反应90min，反应结束之后加入100μl Tricine-EDTA缓冲液稀释产物，72℃金属浴放置7 min，反应产物置于-80℃保存备用（唐小千，2010）。

（2）3’RACE反应：分别将2.5μl 3'RACE模板cDNA、P1引物1μl、UPM 5μl、MasterMix 41.5μl在PCR管中混合总体积为50μl，震荡混匀之后稍离心。分别以1μl H2O代替P1引物，5μlH2O代替UPM作为扩增的阴性对照。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试 剂 | 无 UPM 阴性对照 | 无 P1 阴性对照 | 3'RACE |
| 3'RACE 模板 cDNA | 2.5 μl | 2.5 μl | 2.5 μl |
| P1 | 1 μl | --- | 1 μl |
| UPM | --- | 5 μl | 5 μl |
| Master Mix | 41.5 μl | 41.5 μl | 41.5 μl |
| H2O | 5 μl | 1 μl | --- |
| 终体积 | 50 μl | 50 μl | 50 μl |

按以上列表中体系加入试剂和模板进行PCR反应。反应条件设置为：

94℃变性5 min；

94℃变性30 s，56℃退火45 s，72℃延伸70 s，循环数为32个；

72℃延伸10 min；

16℃保存；

以上述PCR产物稀释100倍后作为模板，再以P1和NUP为引物进行巢式PCR，反应条件为：

94℃变性5 min；

94℃变性，30 s，57℃退火45 s，72℃延伸70 s，循环数为32个；

72℃延伸10 min；

16℃保存。

对PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

（3）5’RACE反应：分别将2.5μl 5'RACE模板cDNA、P2引物1μl、UPM

5μl、MasterMix 41.5μl在PCR管中混合总体积为50μl，震荡混匀之后稍离心。分别以1μl H2O代替P21引物，5μlH2O代替UPM作为扩增的阴性对照。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试 剂 | 无 UPM 阴性对照 | 无 P2 阴性对照 | 5'RACE |
| 5'RACE 模板 cDNA | 2.5 μl | 2.5 μl | 2.5 μl |
| P2 | 1 μl | --- | 1 μl |
| UPM | --- | 5 μl | 5 μl |
| Master Mix | 41.5 μl | 41.5 μl | 41.5 μl |
| H2O | 5 μl | 1 μl | --- |
| 终体积 | 50 μl | 50 μl | 50 μl |

按以上列表中体系加入试剂和模板进行PCR反应。反应条件设置为：

94℃变性5 min；

94℃变性，30 s，56℃退火45 s，72℃延伸70 s，32个循环；

72℃延伸10 min；

16℃保存。

以上述PCR产物稀释100倍后作为模板，再以P2和NUP为引物进行巢式PCR，反应条件为：

94℃变性5 min；

94℃变性，30 s，57℃退火45 s，72℃延伸70 s，32个循环；

72℃延伸10 min；

16℃保存。

对PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

（4）PCR产物的切胶纯化：将以上5‘和3‘Race反应之后的PCR产物在含4S Green（上海生工）染色剂的1%琼脂糖凝胶上进行电泳，电泳结束后将凝胶置于紫外光照射下激发凝胶中目的条带产生荧光，使用手术刀片对目的基因进行切割，注意切下目的条带时尽量减少杂胶，参照天根凝胶回收试剂盒说明书对带有目的条带的凝胶进行操作去除凝胶后，目的基因留在试管滤芯上，使用适量预热到60℃的PCR水将回收的目的基因溶解，再次进行琼脂糖电泳检验回收的纯度并使用nanodrop检测回收目的基因浓度，-20℃冻存。

（5）感受态大肠杆菌细胞制备：在50ml LB培养基中转接0.3 ml已经过夜培养的受体菌DH5α，在37℃摇床上220 rpm振荡培养约4小时。将50ml

菌液分在6个预冷的10ml离心管中，低温（4℃）条件下以4000 g离心5 min

来收集菌体。倒掉上清培养基后每个离心管中加入700μl预冷-20℃的0.1 M

CaCl2溶液重悬混匀，在冰上保持低温20 min使大肠杆菌菌体变为质粒可自由穿梭的通透状态。低温条件再次离心收集菌体，每个10ml离心管中再次加入700μl预冷的CaCl2溶液将通透后的菌体重悬，每100μl分装入预冷的1.5ml离心管中以便下一步转化实验的进行，通透后的菌体悬浮液可添加15%-30%作为甘油冷冻保护剂后-80 ℃冻存备用，也可立即进行转化实验。

（6）目的基因的连接与转化：根据pMD19-T质粒连接试剂盒（TAKARA）说明进行连接操作，连接体系为：

Solution buffer 5μl

纯化的PCR产物0.2 pmol 0.5μl pMD19-T Vector 0.5μl

加PCR水至终体积10μl

连接体系置于16℃反应4h。

100μl感受态细胞DH5α加入10μl连接反应产物，冰上放置30 min使质粒充分进入感受态细胞中。取出后立即置于42 ℃水浴中热激90 s使感受态

细菌细胞壁闭合整合质粒进入细菌中，然后立即将反应物放置冰上3 min，加入900μl液体LB培养基之后，置于37℃环境中220rpm振荡培养1 h。取振荡培养后的菌液200μl均匀涂布于含有100μg/ml氨苄青霉素固体LB培养基平板上直至平板完全吸收菌液，然后倒置于37 ℃恒温培养箱内过夜培养。

次日，将连接转化后的平板取出，挑取平板上的单菌落进行阳性克隆筛选，使用pMD19-T Vector质粒通用引物（Primer RV-M 5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'和 Primer M13-47

5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'）进行菌落PCR阳性检测，转接菌

落PCR显示阳性的菌株到5ml LB氨苄培养基中，37℃震荡培养10h左右，取出800μl菌液与200μl甘油混合作为保种置于-80℃冰箱中，为避免可能引物非特异扩增细菌基因组造成的假阳性，其余菌液离心后抽提质粒做为模板，再次使用RV-M与M13-47进行PCR扩增，琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物，

如产物中仍可扩增出目的片段的则为确定该菌株为阳性克隆，送上海桑尼基因测序有限公司进行测序。

（7）RACE产物序列拼接：将5’RACE和3’RACE扩增得到的产物序列根据重合部分进行拼接，再设计*LvALF-AVK* 序列全长扩增引物P3

( 5‘-ATGCGTGTCT CCGTGTTGA-3' )和 P4

（5'-GTTCAGCCACCGCTTAGCATCT-3'）进行全长扩增以验证拼接结果的正确性，PCR反应条件为：

94℃变性5 min；

94℃变性，30 s，58℃退火45 s，72℃延伸90s，32个循环；

72℃延伸10 min；

16℃保存。

琼脂糖电泳检测PCR产物，再进行切胶回收、连接、转化和测序确认。

#### **2.1.2.4** 凡纳滨对虾***ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK***基因序列生物信息学分析

（1）序列同源性比对与分析：所测序列的序列相似度比对以及同源性搜索在NCBI（http: // [www. ncbi. nlm. gov/blast](http://www.ncbi.nlm.gov/blast)）中的GeneBank数据库进行(Altschul et al.,1997)，并根据搜索到的同源序列进行同源性比对分析；选取Genebank中部分与目的基因同源性较高的ALF序列，采用[http: //www. ebi. ac. uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)/ [网站提供的](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)ClustalW软件进行多序列比对分析(Thompson et al.,1994)。

（2）蛋白基本参数分析：利用[http: //www. expasy. org/网站中的专业蛋白](http://www.expasy.org/%E7%BD%91%E7%AB%99%E4%B8%AD%E7%9A%84%E4%B8%93%E4%B8%9A%E8%9B%8B%E7%99%BD)分析系统对根据ALF-AVK的cDNA序列推导氨基酸序列进行序列分析，利用[http: //www. bio-soft. net/](http://www.bio-soft.net/) sms/网站提供的SMS程序推算蛋白的分子量和氨基酸组成，SMART软件（http: //smart. Embl-heidelberg. de/）预测功能域，利用在线分析工具NetPhos 2.0 Server和NetOGlyc 3.1 Server对该基因翻译出的氨基酸序列进行磷酸化位点和O-糖基化位点进行分析。

（3）系统进化树构建：将GeneBank数据库中下载的不同物种的抗脂多糖因子ALF的基因序列通过clustalx1.8程序创建多序列的比对结果，然后利用MEGA4.0 ([http: //www. megasoftware. net/](http://www.megasoftware.net/))软件采用邻位相连法构建系统树。

### **2.1.3** 实验结果

#### **2.1.3.1** 凡纳滨对虾血细胞中总**RNA**的提取

经nanodrop分析检测由购买的凡纳滨对虾分离出的血细胞中抽提的RNA，其A260与A280的比值约为2.0左右，再由琼脂糖电泳分析可清晰见到28s、18s以及5s三个条带，说明所提的RNA样品无污染，纯度较高。



图.2-1.凡纳滨对虾血细胞总RNA的琼脂糖电泳结果

Fig. 2-1 The profile of total RNA of haemocytes from *L. vanname*

#### **1.1.3.2 RACE**反应扩增***ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK***基因全长片段

根据NCBI里已提交的凡纳滨对虾ALF类似序列(GE325383)，设计特异性引物分别进行3’RACE和5’RACE扩增反应，经过PCR扩增得到基因片段大小分别为为409 bp（图2-2A）和405 bp（图2-2B），连接转化后测序得到的基因序列放入Blast中进行比对发现，5’RACE结果与凡纳滨对虾ALF基因同源性最高并在5’碱基末段具有有起始密码子ATG序列，3’RACE结果同样与凡纳滨对虾

ALF基因同源性最高并包含PolyA的尾巴序列。两端序列重合部分进行拼接后得到凡纳滨对虾ALF-AVK基因序列全长，其大小为705bp，通过全场引物再次扩增后电泳观察得到验证（图2-2C），证明凡纳滨对虾ALF-AVk基因cDNA全序列克隆成功（GeneBank登录号: **GQ227486**）。



图2-2 凡纳滨对虾ALF-AVK基因cDNA全长RACE法扩增琼脂糖电泳结果

A: ALF-AVK的3’RACE产物；B: ALF-AVK的5’RACE产物；C: ALF-AVK的全长扩增产物

Fig 2-2 Results of agarose gel electrophoresis in full length cDNA amplification of ALF-AVK A: product of 3'RACE; B: product of 5'RACE; C: full length amplification of ALF-AVK.

#### **2.1.3.3** 凡纳滨对虾***ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK***基因序列特征

经过Bioedit序列分析软件的分析，凡纳滨对虾*ALF-AVK*基因的cDNA序列全长为705bp，其中包含5’末端43bp的非编码区（UTR），3’末端的293bp的UTR，其中包含终止密码子TAA和一个poly A的加尾序列，中部有一个369bp的开放阅读框（ORF）序列。从氨基酸序列分析可以看出，凡纳滨对虾*ALF-AVK* 基因序列编码含有122个氨基酸残基的蛋白序列，其理论分子量与等电点（pI）分别为13.7kDa和9.95。

凡纳滨对虾ALF-AVK基因序列以及其编码的氨基酸序列如图所示：



图.2-3. ALF-AVK基因以及氨基酸序列。信号肽序列由下划线标出，与LPS结合相关的特定区域由黑色框体标出，3’末端非编码区中的多聚腺甘酸加尾信号有斜黑体标出。

Fig. 2-3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of ALF-AVK. The putative signal peptide is underlined and a putative LPS binding domain is marked by box. The classical polyadenylation signal in the 3'UTR, are marked in bold.

#### **2.1.3.4** 凡纳滨对虾**ALF-AVK**蛋白序列结构分析

通过在线分析工具SMART的氨基酸序列分析，推断出该氨基酸序列属于抗脂多糖因子系列，图2-3为凡纳滨对虾ALF-AVK蛋白结构示意图，该蛋白序列起始端为25氨基酸残基组成的信号肽序列（aa1-25），之后一段中有7个氨基酸组成的低复杂度序列（aa30-36），中段与末端分别含有两个LPS结合序列

（aa44-69,88-122），分析表明这两个结构可能可以特异性的抑制由于LPS介导而激活的对虾血淋巴的凝固等，并有很强的抗菌作用，可以对革兰氏阴性菌的生长起到抑制作用。而通过在线分析工具NetPhos 2.0 Serverβ-integrin和NetOGlyc

3.1 Server对ALF-AVK氨基酸序列进行磷酸化位点和糖基化位点分析发现其并不存在O-糖基化位，但含有6个磷酸化位点。



图2-4 凡纳滨对虾ALF-AVK蛋白结构示意图

Fig 2-4 Structure profile of ALF-AVK of *L. vannamei*



图2-5 凡纳滨对虾ALF-AVK蛋白序列磷酸化位点预测结果

Fig 2-5 Predicted phosphorylation sites in ALF-AVK amino acid sequence

#### **2.1.3.5** 其他同源序列与凡纳滨对虾**ALF-AVK**氨基酸序列的比对分析

将凡纳滨对虾ALF-AVK基因序列翻译的氨基酸序列通过NCBI数据库中

BlastP程序进行同源比对搜索，分析发现该序列与凡纳滨对虾中另外几种同源的ALF序列同源性极高，如与ALF-AAK(**ABB22833**)和ALF-AVR (**ABB22832**)同源性为99%，与ALF-VVR (**ABB22831**)为98%。与南方滨对虾中的ALF(**ABJ90465**)

同源性为94%，而与圣保罗对虾中的ALF4 (**ABQ96196)**、ALF1 (**ABQ96193**)、ALF2 (**ABQ96194**)以及ALF3 (**ABQ96195**)的同源性分别为93%、91%、90%和

87%。其他物种的ALF的同源性则相对较远，如斑节对虾（**ABP73289**, **ABP73292**，

**ACC8606**7)和中国明对虾(**AAX63831**)分别为77%，与美洲鳌虾（*Homarus*

*americanus*）的ALF1和ALF2(**AAAACCCCCCCC94269426942694268**)、日本囊对虾ALFLP (**BBBBAAAAEEEE92949294929492940**)以

及罗氏沼虾(*Macrobrachiumolfersii*) ALF的同源性分别为66%、58%、59%和56%. 比对的结果显示DUF3254这一可以与LPS产生特异性反应的ALF特征结构相

对来说较为保守，基因与凡纳滨对虾体内的其他同源的序列相似度极高。

根据凡纳滨对虾ALF-AVK氨基酸序列同源性搜索搜索的结果选择并利用

MEGA和CluxtalX1.8等软件对选取的不同物种的ALF氨基酸序列进行分子系统学分析，并构建了ALF的系统发生树（图2-7）以研究凡纳滨对虾ALF-AVK与其他物种ALF之间的同源和进化关系。从进化树上可以分析出，ALF-AVK与凡纳滨对虾体内其他同源发生的ALF序列更为相似，在同源性上与南方滨对虾和圣保罗对虾聚枝。



图2-6 凡纳滨对虾血细胞ALF-AVK蛋白全序列与其他同源序列的多序列比对

Fig 2-6 Multiple alignment of ALF-AVK, *L. vannamei*, with the homologous sequences of other animals.



图2-7 通过NJ法构建的不同物种的ALF蛋白系统进化树

Fig 2-7 Neighbor-joining phylogenic tree of ALF amino acid sequences.

### **2.1.4** 讨 论

抗脂多糖因子是广泛存在于甲壳动物机体内，具有广谱抗菌作用的一种抗菌肽，其在动物机体内的先天性免疫中有着举足轻重的地位和作用。随着抗脂多糖因子研究的深入，越来越多物种抗脂多糖因子的基因序列得到克隆，其抗菌的机理等也得到了深入的研究。抗脂多糖因子可以通过特殊的蛋白序列和空间构象与细菌细胞膜的主要成分脂多糖发生结合反应，从而进一步的抑制细菌的生长，阻止脂多糖介导激活的血淋巴凝集反应等等，达到清除外来侵入病原的目的。目前在多种甲壳动物中发现了不同类型的抗脂多糖因子，例如在三疣梭子蟹中已报道克隆得到完整基因序列的就有7种（刘媛，2011），而在凡纳滨对虾中，已得到克隆的也有5种。在本研究中，根据GeneBank中已提交的ALF基因类似序列结

合RACE全长扩增技术得到了凡纳滨对虾ALF-AVK基因序列的全长共705bp，含有可编码122个氨基酸残基的开放阅读框，编码蛋白分子量为13, 7kDa，等电点为9.95。与其他多个类型的ALF氨基酸序列进行比对后，发现他们均含有由

25个左右的氨基酸残基组成的信号肽序列，并具有两个保守度极高的半胱氨酸残基以及在其之间形成的二硫键模式，以发卡结构存在（Li et al., 2008; Liu et al., 2005; Supungul et al., 2004; Zhang et al., 2010）。而进过SMART软件分析的氨基酸结构中，可清楚的分析出ALF-AVK序列中含有两个较为保守的LPS 结合位点，其存在表明ALF\_AVK具有潜在的结合LPS的能力，并在凡纳滨对虾受到病原体感染时发挥一定的抵御和保护作用。而在凡纳滨对虾中发现的着多种不同空间结构的亚型ALF的共同存在可能预示着他们在保护对虾机体时在不同的时间或者空间中发挥着不同的生物学功能。

利用GeneBank中已公布的EST基因序列结合RACE全长扩增的方法得到感兴趣的某一种免疫相关基因的全长cDNA序列并对其进行研究，这样即可以克服cDNA序列在传统文库筛选法中经常会缺失部分遗传信息的，费时费力的弊端，又可以避免RACE技术中需要已知部分基因序列，需要设计简并引物多次扩增的困难，可以在节省时间和经费的前提下，获得准确的有研究价值的目的基因。在本研究中，通过搜索GeneBank中与凡纳滨对虾抗脂多糖因子相关的基因信息得到了一段类似的EST序列，再利用RACE技术对该段序列的全长加以扩增和分析，完善并证实了该段EST序列属于凡纳滨对虾ALF的一种亚型，有着

ALF特有的序列与蛋白结构，为下一步进行ALF的特性研究打下了基础。**小结**

本章从凡纳滨对虾血细胞中通过RACE技术克隆得到了一个抗脂多糖因子

（ALF-AVK）cDNA的全长序列，其全长为705bp，包含一个可以编码122个氨基酸残基的大小为369bp的ORF区域。经过氨基酸序列分析发现，该种ALF含有与其他种类亚型的ALF相同的信号肽序列和经典的LPS结合部分，该部分由

32位与53位的半胱氨酸之间形成的二硫键以及其他疏水氨基酸组成的环状区域。序列同源比对显示其与已报道的其他凡纳滨对虾的ALF相似度极高，可能是其中的一种亚型。

# 第三章 凡纳滨对虾**A**LLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK基因的表达差异研究

*ALF-AVK* 基因在凡纳滨对虾不同组织中及其在WSSV和鳗弧菌（*Vibrio*

*anguillarum*）两种不同病原体感染条件下表达差异情况的研究，对于了解该基因在病原体侵染宿主过程中所起的作用有着极为重要意义。本实验以健康凡纳滨对虾为研究材料，以β-actin做为内参基因，应用实时荧光定量PCR的方

法研究*ALF-AVK*基因在健康凡纳滨对虾不同组织内及WSSV 和鳗弧菌两种病原刺激下血细胞中表达量的变化。

## **3.1** 实验材料及仪器

WSSV单克隆抗体2E6（本实验室制备）；Trizol购自于Life Technology公司；Taq DNA Polymerase、M-MLV反转录酶以及荧光定量PCR扩增试剂盒等分子试剂购于TAKARA公司；异丙醇、氯仿、DEPC和PCR水均购于上海生工。超速离心机购自日本日立公司；实时荧光定量PCR仪购自美国eppendorf公司；超微量分光光度计Nanodrop2000购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

TNE缓冲液：100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA，PH=7.5. 梯度蔗糖：64%，52%,46%, 40%，33%以及25%, 6个不同浓度由TNE

缓冲液配制成的蔗糖溶液。

0.01M磷酸盐缓冲液（PBS）：1.44 g/L Na2HPO4, 0.24 g/L KH2PO4, 0.2 g/L KCl, 8 g/L NaCl, pH 7.4，0.45μm滤膜过滤除菌。

2216E细菌培养基：氯化钠30g，蛋白胨5g，磷酸高铁0.1g，酵母浸膏1g，琼脂20g，蒸馏水1L，pH7.6～7.8。

## **3.2** 实验方法

### **3.2.1** 健康凡纳滨对虾不同组织总**RNA**抽提

实验动物为养殖健康凡纳滨对虾购自青岛南ft水产品批发市场，在容积为50L的钢化玻璃水槽中暂养5 d，之后分别取样对虾的血、心脏、鳃、肠道、肝胰腺、肌肉6种组织，每种组织取样4尾，分别置于装有500μl Trizol试剂的DEPC处理的1.5 ml离心管内，使用微量研磨棒对组织进行研磨破碎，待无大块组织存在时再次加入500μl Trizol，放入-80℃保存用于之后总RNA 的

抽提。

### **3.2.2** 感染**WSSV**和鳗弧菌后凡纳滨对虾鳃组织**RNA**抽提

#### **3.2.2.1** **WSSV**精提液制备：

（1）选用自然感染白斑病的凡纳滨对虾鳃丝、附肢等病毒主要存在组织，称取1 g病料加入5-10 ml 25%（W/W）蔗糖溶液极少量石英砂。在冰浴条件下用研钵进行匀浆破碎3-5分钟，充分破碎组织细胞，使病毒游离出来。

（2匀浆液使用纱布进行粗滤，之后将溶液分别在4℃低温条件下进行

3000、5000、8000 rpm差速离心的，每次离心20分钟取上清。

（3）上清溶液在高速冷冻离心机上20000 rpm、4℃离心90 min。

（4）小心移去上清，沉淀以25%蔗糖溶液重悬混匀，小心加入不连续蔗糖密度梯度溶液中（64%, 52%,46%, 40%, 33%），25000 rpm、4 ℃超速离心120min。

（5）超速离心后病毒条带一般位于52%与46%梯度之间，使用1ml注射器小心吸取病毒带并按5: 1比例加入TNE缓冲液，混匀后20000 rpm、4℃超速离心90 min进行脱糖。脱糖结束后小心移去上清，加入适量PBS重悬沉淀，此即为病毒精提液母液，保存于-80℃。

#### 3.2.2.2 鳗弧菌培养：

以2216E培养基作为弧菌培养基，弧菌活化后划线培养于2216E固体培养基上，28℃培养24-36 h，用无菌PBS洗下，8000 g、4℃离心15 min，弃上清，洗涤2-3次，无菌PBS重悬，制成悬浊液，使用比浊仪调整菌液浓度至1×108

CFU/mL，置于4℃储存备用。

#### **3.2.2.3** **WSSV**、鳗弧菌感染及取样：

选取暂养7d后的凡纳滨对虾100尾分为两个实验组用于病原体感染实验，另外一组10尾对虾为阴性对照组，注射过滤除菌的PBS溶液。将之前制备储存的WSSV精提液稀释1×106倍以及1×108 CFU/mL的鳗弧菌，分别从腹节处进行注射感染对虾，每尾注射50μl，阴性对照组注射相同体积PBS。在注射感染后第3、6、12、24、、48、72、96 h从两个不同病原体感染组分别取5尾对虾，阴性对照组作为0 h也取5尾作为样品，佐以血液抗凝剂抽取对虾的血淋巴，

之后4摄氏度条件下800 g离心获得血细胞，再以Trizol试剂-80℃保存用于总

RNA的提取，另取WSSV感染组的对虾鳃组织以适量PBS悬起后研磨制备

WSSV粗提液，用Dot-blot的方法检测凡纳滨对虾WSSV感染情况。

### **3.2.3** 实时荧光定量**PCR**分析***ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK***基因不同组织和**WWSSSSSSSSVVVV**及鳗弧菌感染后差异表达情况

#### **3.2.3.1** **cDNA**链的合成：

设计qPCR扩增引物P3、P4（预计扩增长度约216 bp）以及内参基因β-actin扩增引物P5、P6（预计扩增长度约210 bp）进行qPCR分析*ALF-AVK* 基因不同组织和WSSV及鳗弧菌感染后差异表达情况。按之前2.1.2.1所叙述的对虾血细胞总RNA的提取方法对健康对虾6个组织、两个感染组以及其对照组血细胞的总RNA进行提取，之后在无RNA酶的薄壁PCR小管内加入2µl RNA模板(1µg/µl)，9µl H2O和2µl OligdT（0.5µg/µl），将PCR管于70℃温度条件下放置5 min，然后立即在冰上放置5 min，分别加入2µl dNTP(2.5 mM)、4µl

5×反转录buffer和1µl反转录酶混合均匀后稍加离心。将该反应体系在42℃条件下反应60 min，然后加热至95℃条件下放置10 min使反转录酶失活，合成的稳定cDNA链于-20℃保存备用。

#### **3.2.3.2** **PCR**扩增检测引物：

PCR反应为25µl体系，包含2.5µl 10×Taq buffer、15µl H2O、正反引物各1µl 2.5µl dNTP(2.5 mM)、2µl cDNA模板及1µl Taq DNA Polymerase。根据上下游引物的退火温度范围，在PCR反应中共设置8个不同退火温度，从53℃到60℃，间隔约1℃递增。经过优化后，PCR反应程序设定为：

94℃变性5 min；

94℃变性30 s，57℃退火45 s，72℃延伸45 s，32个循环；

72℃延伸10 min；

16℃保存。

PCR产物用4S Green的1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小，凝胶成像系统拍照观察确定引物是否能正确扩增目的基因，之后进行qPCR检测。

表3-1 荧光定量q-PCR实验所用引物

Table 3-1 Primers for q -PCR

引物名称引物序列

Primer name Sequence

P3 5'- GCGGTGTTCCTGGTGGCACTC -3'

P4 5'- AAACTATCAGCAGGTCGGCCC -3'

P5(β-actinF) 5'-CATCAAGGAGAAACTGTGCT-3'

P6(β-actinR) 5'-GATGGAGTTGTAGGTGGTCT-3'

#### 3.2.3.3 **qPCR**检测：

以β-actin基因作为内参，取转录合成的各个实验组的cDNA做为模板，使用Nanodrop 2000超微量核酸蛋白定量仪对cDNA模板进行定量，调整各个组织以及每个不用实验组的模板浓度均到100 ng/ml，按以下试剂量在荧光定量专用

200μlPCR管（Exygen）中配置反应体系（均在冰上进行）：

2×SYBR®Pre mix Ex TaqTM II(Tli RNa seH Plus)：12.5μl

cDNA模板：2μl

PCR For ward Primer(10μM)：1μl PCR Rev erse Primer(10μM)：1μl ddH2O（灭菌超纯水或PCR水）：8.5μl反应体系总体积为：25μl

反应体系配置完成后立即放入荧光定量PCR仪中按以下程序进行反应：95

℃预变性30 s；扩增进行40个循环95℃5 s，60 ℃30 s；解离95 ℃15 s，60

℃30 s，95 ℃15 s。扩增结束分析结果。

### **3.2.4** **Dot blotting**检测凡纳滨对虾**WSSV**感染情况

（1）WSSV注射感染3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h凡纳滨对虾剥取其鳃组织加入适量PBS和石英砂在研钵中进行研磨，研磨完全后4℃条件下3000 rpm离心20 min，取出上清液使用0.45μm的滤膜过滤，之后收集滤液，即为感染对虾鳃组织中WSSV的粗提液，取10μl粗提液点于在圆形硝酸纤维素膜上，待其自然晾干后放入96孔酶标板（或细胞培养板）中，每孔加入200µl含5%BSA的PBS，置于37℃封闭膜未结合蛋白区域1 h；

##### （2）加入PBST洗涤3次，每次5 min，每孔在加入100µl WSSV的单克隆抗体

2E6置于37℃孵育1h；

##### （3）同上洗涤3次后，分别对应加入碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠Ig抗体（Sigma）置于37 ℃孵育1h；

（4）同上洗涤3次后，加入NBT-BCIP显色液100μl，置于避光处发色，5-10min后观察是否有阳性出现并在蒸馏水中冲洗终止发色，取出后晾干后拍照保存结果。

（5）对照：以小鼠骨髓瘤上清液P3U1代替2E6作为阴性对照。

## **3.3** 实验结果

### **3.3.1** 凡纳滨对虾***ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK***基因

**mRNA的组织差异表达特征**

图3-1所示为未受外界病原刺激的凡纳滨对虾不同组织内ALF-AVK基因以β-actin基因作为内参实时荧光定量PCR产物的数据结果，根据柱状图可以分析出该基因在血淋巴中的血细胞转录水平为最高，约为肝胰腺和中肠的90倍左右，鳃组织和心脏的表达量次之，但也保持较高的转录水平，而在肌肉和肝胰腺以及中肠中转录水平则较弱。



图3-1 凡纳滨对虾*ALF-AVK*基因在6个不同组织中的mRNA表达差异情况

Fig 3-1 Result of *ALF-AVK*gene expression in six different tissues of *L. vannamei.*

### **3.3.2** 注射感染鳗弧菌或**WSSV**后凡纳滨对虾***ALLLLFFFF----AAAAVVVVKKKK***基因平在血细胞中的变化情况

**mRNA表达水**

图3-2所示分别是凡纳滨对虾在鳗弧菌以及WSSV感染之后血细胞中ALF-AVK基因以β-actin作为内参基因后的qPCR变化结果。从图中可以分析出与空白对照相比，感染鳗弧菌的对虾个体的*ALF-AVK*基因在感染3 h就开始上升，说明机体已对细菌的感染产生应激反应，之后表达量持续上升在12 h 时

mRNA表达量达到最高的14.88倍，而在之后开始缓慢下降直到96 h检测时已达到接近正常水平的2.34倍左右。在WSSV感染组中ALF-AVK基因的mRNA表达量则呈现出不同的趋势，感染之后的开始上升在6h达到较高的5.14倍，但之后的18 h内开始下降直到24 h降至最低的2.16倍，之后缓慢上升在96 h时达

到5.18倍。



图3-2 注射感染鳗弧菌或WSSV后凡纳滨对虾*ALF-AVK*基因的表达量变化情况

Fig 3-2 Time-courese expression of *ALF-AVK*mRNA of *L. vannamei*gill after *V. anguillarum*or WSSV challenge

### **3.3.3** **Dot-blot**法检测凡纳滨对虾注射**WSSV**后感染情况检测

凡纳滨对虾注射感染WSSV后，按照时间段，取鳃组织研磨后制备WSSV

粗提液并以本试验制备的抗WSSV的单克隆抗体2E6作为一抗检测感染情况，结果如图1所示，感染WSSV后的72h之前虾体病毒检测均呈阴性，但在96 h后的检测结果就已呈现较强的阳性，说明凡纳滨对虾已经成功的感染了WSSV，并且WSSV在对虾机体内已开始侵染并复制。



图3-3 Dot-blot检测WSSV注射后凡纳滨对虾感染情况

Fig 3-3 Detection of WSSV in *L. vannamei*after infection using Dot-blot.

## **3.4** 讨论

实时荧光定量PCR在扩增反应的过程中加入了荧光集团，从而可以实时监测到扩增反应的进行情况，相对于半定量PCR来说，qPCR有着更高的灵敏度、更简便的操作以及可以精确的进行样品目的基因表达量的相对定量。在本实验中就是利用qPCR 对未受病原体刺激的凡纳滨对虾组织中*ALF-AVK*基因进行了检测，同时对感染两种病原体后其血细胞中目的基因mRNA的表达趋势进行了绘制。柳峰松等（2005）对运用了Northern杂交的方法对中国明对虾中ALFFc基因的组织表达差异进行了检测，其结果发现ALF的基因会在血细胞中大量表达，并会在鳃与肠中也有中量的表达，其分析原因可能是血细胞会随着血淋巴流动到机体主要存在血淋巴的几个组织。这与我们在凡纳滨对虾体内检测 *ALF-AVK*基因的表达差异结果是基本一致的，在本次研究中同样发现目的基因会在血细胞中进行大量表达，并在血细胞聚集较多的鳃以及心脏组织中进行中量的表达反应。 鳃作为对虾机体中接触外界环境较多的组织，对虾机体中分泌的免疫相关因子在鳃组织中的mRNA表达量比其他组织应会相对高一些，如在WSSV侵染过程中，鳃组织就是重要的靶器官之一(Tan et al., 2001; Durand et al., 2002)。而Enrique 等

（2007）在凡纳滨对虾体内克隆到了ALF的另一种亚型LvALF1的基因并使用qPCR方法对其组织表达差异进行了检测，发现该种ALF表达量最高的为淋巴器官与心脏，其次是鳃、眼柄以及血细胞，而在肌肉和肝胰腺组织中几乎没有表达。这与我们检测的ALF-AVK基因的组织表达稍有差异，可能是由于在本实验中并

未对淋巴组织以及眼柄进行样品检测造成的，而其在血细胞、心脏与鳃中均有表达这一点是一致的，但这三者之间表达量高低比较与本实验中也存在一定差异，如LvALF1 在心脏中表达量最高，血细胞其次，鳃组织最少，而*ALF-AVK*的mRNA表达量则是血细胞较高，鳃组织和心脏稍低一些。两种同一物种体内的ALF的亚型在不同组织中表达量的差异正恰恰说明了不同亚型的ALF在机体对抵御外来病原体的入侵时所发挥的不同作用，体现了ALF等抗菌肽类序列和结构的多样性所带来的功能的多样性。

目前已有的报道中，多种对虾的ALF基因转录水平都会在细菌感染之后发生上调的反应(Liu et al., 2005; Nagoshi et al., 2006; Supungul et al., 2004)，而对小龙虾使用WSSV感染后对其ALF的变化进行检测发现其也有上调的趋势（Liu et al.,2006; Kim et al.,2007）。在本次研究中，我们用WSSV和鳗弧菌两种病原体对凡纳滨对虾进行了感染实验，并用qPCR的方法对*ALF-AVK*基因的表达变化趋势 做了分析，从结果我们发现在鳗弧菌感染之后，*ALF-AVK*的表达变化出现了正常 的上调变化，并在24h达到一定峰值，之后可能随着感染的深入机体血细胞已出现异常反应或数量减少，从而造成了目的基因表达量的逐渐减少。而在WSSV感染实验中，目的基因的表达量的变化趋势令人非常感兴趣，通常ALF被认为是一种广谱的抗菌因子，但在本研究中，在WSSV感染对虾机体时，ALF的表达量也会出现上调的趋势，这与sirinit等（2009）验证的斑节对虾的ALFPm3可以抵御WSSV对于体外培养的血细胞的侵染的结论是有共通处的，说明ALF在机体抵御WSSV等病毒病原体侵染时，又能会起到一定的作用。而在本实验中，WSSV感染之后*ALF-AVK*基因首先出现的上调趋势，我们理解为可能是病原体一进入机体 后，机体产生的应激反应，可能并不是特异性的针对WSSV感染而产生的上调， 之后的下调过程也说明了这一点，而在24h过后，目的基因的表达水平再次出现上升趋势，这里我们认为可能与对虾机体抵御WSSV的侵染有关，同时在本实验的检测中知道96h才检测出大量WSSV的存在也可以说明这一点，随着病毒的增值ALF-AVK基因的表达量也出现上调的趋势，以参与机体的固有免疫。我们通过比较两种不同的病原体感染后，*ALF-AVK*基因的表达水平变化趋势，可以发现 相对于鳗弧菌感染后的表达水平，WSSV感染的表达水平要低得多，这可能说明

ALF主要的功能作用还是在抵御和清除革兰氏阴性菌的侵染，对于WSSV可能只

是起到一定的辅助或者激活其他免疫途径的作用。

## 小 结

利用qPCR分析了*ALF-AVK*基因在凡纳滨对虾6 个不同组织内以及两种病原体刺激后血细胞组织中mRNA的转录情况，结果表明该目的基因在正常血细胞中表达量最高，鳃组织与心脏次之，在肌肉、肠道以及肝胰腺中表达量较低，而在鳗弧菌感染之后*ALF-AVK*基因会有一个明显的上调在下降的过程，在12h转录水平达到最高，而在WSSV感染组中，由于最初机体的应激反应，会使目的基因有短暂的上调，而之后很快下降，随着WSSV 的复制增殖，*ALF-AVK*又会出现一个上调趋势，以上的实验结果说明了 *ALF-AVK*不仅会在革兰氏阴性菌侵染机体的过程中产生作用，而且可能与WSSV等病毒感染后的免疫防御反应相关。

# 第四章 凡纳滨对虾**ALF-AVK**蛋白的原核表达及其多克隆

**抗体的制备研究**

**4.1 凡纳滨对虾ALF-AVK蛋白的原核表达及纯化**

### **4.1.1** 实验试剂及仪器

凝胶回收试剂盒，质粒小量抽提试剂盒和DNA片段回收试剂盒购于天根生化技术（北京）有限公司；测序载体pMD19-T连接试剂盒、LA *Taq* DNA聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA marker、限制性内切酶*EcoR* I和*Hand* Ⅲ、T4 DNA连接酶均购于TAKARA公司；碱性磷酸酶（AP）标记羊抗小鼠抗体购于SIGMA公司；聚偏氟乙烯（PVDF）膜购自Millipore，孔径0.45µm；96孔酶标板购自于COSTAR公司，原核表达载体pET-30a质粒载体为实验室保藏。

胰蛋白胨、酵母提取物、卡那霉素（Kan）、氨苄青霉素（Amp）、异丙基

-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）、琼脂糖、十二烷基硫酸钠（SDS）、N，N'-亚甲叉丙烯酰胺、丙烯酰胺、对硝基苯磷酸酯（pNPP）、Tris、4S Green（EB替代染料）、NaCl、蔗糖、过硫酸铵、TEMED等试剂均购于上海生物工程试剂公司。

恒温细菌培养箱、空气浴摇床、水浴锅、金属浴等均购自上海一恒、普通PCR仪、水平电泳仪以及垂直电泳仪均购自美国Bio-Rad。实验仪器及材料、安玛西亚ÄKTA *prime*蛋白质纯化系统、Heto-holten真空冻干机、GE Healthcare HisTrap HP Ni离子亲和层析预装柱5ml规格

大肠杆菌LB培养基配方：

NaCl 10 g

酵母提取物5 g

胰蛋白胨10 g

琼脂粉（固体）20 g

加水至1000ml，NaOH调解pH至7.0 SDS-PEAG样品缓冲液（Sample Buffer）：

0.5M Tris-HCl(pH 6.8) 2 ml

甘油2 ml

10%SDS 4 ml

β-巯基乙醇1.2 ml

超纯水0.1 ml

1%溴酚蓝数滴至深蓝色。

30%丙烯酰胺贮液 ：

丙烯酰胺（终浓度29%）29 g甲叉双丙烯酰胺（终浓度1%）1 g超纯水定容至100 ml

滤纸过滤后，棕色瓶4 ℃冰箱保存；

1.5 M Tris-HCl (pH8.8)：

Tris 90.86 g，先用超纯水溶解，再用HCl调pH8.8，再加水定容至500 mL，

0.45µm滤膜过滤，4℃冰箱保存；

0.5 M Tris-HCl (pH6.8)：

Tris 30.29 g，先用超纯水溶解，再用HCl调pH6.8，再加水定容至500 mL，

0.45µm滤膜过滤，4℃冰箱保存；

10%SDS：

SDS 5.0 g，加超纯水至50 mL，加热溶解，用0.45μm滤膜过滤溶液，16

℃以上储存；

饱和过硫酸铵（AP）：

取适量AP粉末，加超纯水，充分溶解，加入量以有晶体析出为准。在使用前配制，4℃保存一周，也可储存于-20℃备用；

SDS-PEGA电泳缓冲液：

甘氨酸（Gly）14.41 g

Tris 3.03 g

SDS 1.0 g

D. W 1000 mL

考马斯亮蓝G250染色系统：

a. 前固定液：甲醇400 ml，乙酸100 ml，蒸馏水500 ml。

b. 染色液：蒸馏水100 ml，加入117.65 ml 85%磷酸，再加入100 g硫酸铵至完全溶解。然后加入G250 1.2 g，溶解过夜（避光），加入甲醇200 ml，加入

蒸馏水至1000 ml，棕色瓶保存。

c. 脱色液：D. W

d. Bio-Rad小板胶（Mini Protean 3系统）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 15%分离胶 | | 4.75%浓缩胶 | |
| D.W | 2.3 ml | D.W | 2.8 ml |
| 30%丙烯酰胺 | 5 ml | 30%丙烯酰胺 | 0.8 ml |
| 1.5M Tris-HCl | 2.5 ml | 0.5M Tris-HCl | 1.25 ml |
| 10%SDS | 150 µl | 10%SDS | 50 µl |
| AP | 60 µl | AP | 60 µl |
| TEMED | 15 µl | TEMED | 15 µl |

亲和层析溶液：

a. Binding buffer: Na2HPO4 14.5 g; NaH2PO4 1.48 g; NaCl 29.3 g；尿素480 g；20—40mM(1.36 g—2.72 g)咪唑；PH 7.4，超纯水定容至1 L

B. Elution buffer: Na2HPO4 14.5 g; NaH2PO4 1.48 g; NaCl 29.3 g;尿素480

g；500mM(34g)咪唑；PH 7.4，超纯水定容至1 L

C. Stripping buffer: Na2HPO4 14.5 g; NaH2PO4 1.48 g; NaCl 29.3 g; 50mM

EDTA；PH7.4，超纯水定容至1 L

蛋白透析缓冲液：

Na2HPO4 17.91 g, NaH2PO4 1.31 g, NaCl 2.93 g, EDTA 0.37 g（以上为基本溶液）；

还原型谷胱甘肽0.62 g；氧化型谷胱甘肽0.12 g；甘油50 ml；甘氨酸10 g；尿素6M（360 g）

以上蛋白纯化系统所需溶液均需过滤（0.45μm滤膜）

### **4.1.2** 实验方法

#### **4.1.2.1** 重组**LvALF-AVK**蛋白表达的引物设计

根据pET-30（a）质粒的多克隆位点的特点，通过Primer 5.0软件分析*ALF-AVK*基因中的酶切位点，选择*EcoR* I 与*Hind* Ⅲ两个酶切位点作为目的基因片段的插入位置，设计*LvALF-AVK* 基因表达的引物P7和P8：

上游引物P7含有*EcoR* I酶切位点：

5'-CGGAATTCATGCGTGTCTCCGTGTTGA-3'

下游引物p8含有*Hind*Ⅲ酶切位点：

5'-CCAAGCTTGTTCAGCCACCGCTTAGCATCT-3'

#### **4.1.2.2** **ALF-AVK**蛋白表达基因的扩增、纯化及双酶切

（1）目的基因的PCR扩增：如以上描述方法抽提健康凡纳滨对虾的血细胞总mRNA ，使用引物P7、P8进行PCR扩增，PCR反应体系为25μl：

10×Taq buffer 2.5μl

DNA模板1μl dNTP(2.5 mM) 1μl正向引物1μl

反向引物1μl

Taq DNA Polymerase 1μl H2O 17.5μl

PCR反应程序为：94 ℃变性5 min；94 ℃变性30 s，57 ℃退火45 s，72 ℃

延伸45 s，进行32个循环，最后72℃延伸10 min，16℃保存。PCR结束后产物用含4S Green的1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带位置以及扩增效率。

（2）目的基因的切胶纯化：PCR产物在含4S Green的1%琼脂糖凝胶上进行电泳反应（使用孔径较大的梳子利于大量上样），凝胶置于紫外光线照射下显现条带，按照PCR产物凝胶回收试剂盒说明书的操作步骤将带有特异性目的条带的凝胶溶解后，回收目的基因，回收完成后将目的基因溶解于适量预热PCR水中， 再次经琼脂糖电泳，确定回收产物纯度并使用nanodrop测定并调节目的基因的浓度，然后以EcoR I和HindIII两种内切酶对产物进行双酶切，酶切体系20μl如下：

10×M buffer 2 μl

EcoR I 1 μl

HindIII 1 μl

回收 PCR 产物 1 μg

加 ddH2O 至终体积 20 μl

酶切体系置于37℃恒温酶切6-8 h。

为去掉切掉的小片段基因可利用PCR产物纯化试剂盒对稀释之后的酶切产物进行回收纯化，得到酶切后的目的片段，回收的目的片段经琼脂糖电泳确定纯度

和浓度后，置于-20冻存备用。

（3）表达质粒pET-30（a）的抽提及双酶切：含pET30a质粒的大肠杆菌接种在LB液体培养基，37℃振荡（220 rpm）过夜培养，取出后离心，去掉上清培养基，同样以*EcoRI*和*HindIII*对按质粒小量抽提试剂盒操作说明抽提的pET30a 质粒进行双酶切，酶切体系如下：

M buffer 10×2μl *EcoRI*1μl *HindIII*1μl

质粒1μg

加ddH2O至终体积20μl

37℃酶切6-8 h。

同样使用PCR产物纯化试剂盒对稀释之后的酶切产物进行纯化得到酶切后的线型质粒，回收的目的片段经琼脂糖电泳确定纯度和浓度后，置于-20℃冻存备用。

#### **4.1.2.3** 连接、转化与阳性菌株检测

将经过双酶切过的目的基因和pET30a质粒的浓度摩尔浓度调整至一致，将目的基因与质粒按照约5: 1的比例（摩尔比）加入混合连接体系，连接体系如下：

T4 DNA Ligase buffer 2μl

目的基因10μl

pET-30（a）质粒2μl T4 DNA Ligase 1μl ddH2O 4μl

连接体系置于16°C金属浴或PCR仪中连接过夜。

连接完成质粒转化入感受态细胞：

(1)将100μl感受态细胞BL-21 (DE3)内加入10μl连接反应产物，于冰上放置30 min，以使连接后的质粒完全进入感受态细菌中；

(2)孵育完成后将菌液置于42°C水浴中热激90 s，完成之后将反应体系移回至冰上放置2-3 min进行冷却。

(3)在100μl反应体系中加入900μl不含任何抗生素的LB液体培养基，37°C

空气浴恒温摇床上220 rpm振荡培养1 h。

(4)利用无菌涂布棒将振荡培养的200μl菌液均匀涂布在在含有50μg/ml卡那霉素的LB培养基平板上直至平板完全吸收菌液，然后倒置于37°C恒温培养箱内培养过夜。

第二天培养板上长出散布均匀的菌落，菌落PCR检测转化菌，分别使用引物

P7、P8进行扩增时得到的产物分子量约为370 bp，在菌落PCR检测中模板是以灭菌白枪头挑取得单菌落。在含卡那霉素的5 ml LB液体培养基加入检测为阳性的克隆菌落并置于37℃震荡培养过夜，次日取出800μl菌液与200μl灭菌甘油混合均匀后置于-80℃保种冻存，为确保PCR检测没有非特异扩增出现假阳性，剩余的菌液加入到质粒小量抽提试剂盒提取质粒。将提取的重组质粒加入之前用的两种内切酶进行双酶切反应，结束后1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物，如产物的电泳图谱即出现了目的基因又出现了质粒条带即可确定该菌株为阳性克隆株，取少量菌液送上海桑尼基因测序有限公司进行测序，测序验证读码正确的菌株即可进行下一步的诱导表达实验。

#### **4.1.2.4** **ALF-AVK**重组蛋白诱导表达

挑取经过检测呈现阳性重组菌BL21的单菌落接种至5 ml含50μg/ml卡那霉素的LB液体培养基中，37°C振荡培养过夜，次日在5 ml卡那霉素LB培养基中加入已活化好的菌液50μl再次37℃振荡培养5 h左右，之后对大肠杆菌进行化学诱导，即在5 ml菌液中加入100 mMol/L的IPTG50μl来刺激诱导大肠杆菌表达目的蛋白，继续诱导培养6 h，结束后离心，去除培养基，将细菌作为检测样品加入250μl PBS重悬，利用SDS-PAGE检测表达情况。

#### **4.1.2.5** 表达条件的优化

在之前的许多报道中都提到了由于ALF在原核表达过程中会对作为革兰氏阴性菌的大肠杆菌宿主产生一定的抑制作用，会使宿主产生“自杀”现象，所以在诱导表达重组ALF-AVK蛋白之前参照了多个成功诱导大肠杆菌表达ALF的的实验报道（李婷等，2010；姜珊等，2011）。最终确定在28℃下，加入10mmol/L

DTT和0.5mmol/L IPTG的条件下进行诱导，并对诱导时间进行了摸索优化。

对诱导时间进行确定，选取以上方法筛选中表达较好的一株菌，50μl接种于

5ml卡那霉素LB培养基中，200rpm，37℃培养过夜活化菌株，次日取出200μl菌液接种于20ml卡那霉素LB培养基中，200rpm，37℃振荡培养5h左右OD600达到

0.6，加入10μl 100 mM/L的IPTG和10mmol/L DTT以诱导大肠杆菌表达目的蛋白，培养10 h每2 h取出1 ml作为样品，最后与未加IPTG的对照组共同进行SDS-PEAG电泳检测表达量，确定诱导的最佳时间。

#### **4.1.2.6** **SDS-PAGE**（聚丙烯酰胺凝胶电泳）检测重组蛋白表达情况

##### （1）将3.1.2.4和5中收集的细菌样品以常温下4000 g离心5 min沉淀下来，用250μl

PBS重悬后等量加入SDS上样缓冲液重悬混合均匀，沸水中煮15 min是细菌充分破碎。

##### （2）进口BIO-RAD电泳系统中，下层分离不同分子量蛋白的15%分离胶

（Running gel）和上层浓缩样品的5%浓缩胶（Stacking gel）共同组成聚丙烯酰胺凝胶。首先在玻璃夹层倒入按配方配置的分离胶（倒入量要适中，速度要快以免胶过早凝结），上部缓慢使用毛细枪头加入超纯水封面使胶面保持平整，且不可加入过快冲散液面，待下层分离胶聚合凝固与水层出现明显分界线之后，倾出分离胶上水层并用滤纸吸干，然后加入配置好的浓缩胶，插入点样梳尽量不要产生气泡，待浓缩胶聚合凝固折光率明显变化时，双手均匀用力拔去点样梳，并以蒸馏水冲去上样孔内的残胶。

（3）凝胶制成后，将夹胶玻璃板垂直固定在电泳槽内，在内外贮槽内加入电泳缓冲液尽量使内外电泳液不要互相渗漏，在点样孔内用毛细微量枪头分别缓慢点入事先吸取的17μl左右待分析样品，在其中一个点样孔内加同体积的蛋白标准分子量Marker。接通电源之后，用0.03A的低电流稳流电泳使样品在浓缩胶中得到充分浓缩，样品充分浓缩成线型之后进入分离胶，即可使用0.06A的高电流继续电泳充分分离样品中不同分子量的蛋白，当样品缓冲液中的溴酚蓝指示剂电泳到达分离胶底部边缘或者刚刚溢出时即可停止电泳。

（4）电泳结束后，取下电泳装置撬动两层玻璃以取出凝胶，先用蒸馏水稍冲洗一下凝胶，再放入前固定液中固定30min，取出后在摇床上避光轻摇以少量考马斯亮蓝CBB-G250（索莱宝公司）染色液染色过夜，次日取出放入超纯水中中脱色8h，每隔2h换一次脱色液直到没有杂色。

SDS-PEAG电泳染色后，即可以根据与未加入IPTG诱导的阴性样品以及与

Marker比对后分析分子量来确定可以正常表达目的蛋白的阳性菌株。

#### **4.1.2.7** 重组蛋白的亲和层析纯化

取20μl筛选到的表达量较高的菌株加入2 ml卡那霉素LB液体培养基中，200 rpm、37℃空气浴摇床震荡过夜，次日进行大量诱导，将2 ml已培养好的菌株加入200 ml卡那霉素LB液体培养基中，200 rpm、37℃空气浴摇床震荡培养

5h左右，加入1ml100 mM/L的IPTG以诱导大肠杆菌表达目的蛋白，200 rpm、

30℃空气浴摇床振荡培养6h左右，取出菌液，4000 rpm，4℃离心15 min收集菌体，用一定量的PBS重悬菌体洗涤一次，4000 rpm，4℃离心15 min收集菌体，用10 ml PBS重悬菌体，振幅37 %，3 s间隔超声波破碎10 min, 12000 rpm离心15 min，沉淀用2 ml含8 mol/L尿素的Binding buffer重悬后，再次进行超声破碎至清亮的溶液使蛋白完全溶解，12000 rpm离心收集上清作为上样样品。参照GE Healthcare的HisTrap HP（5ml）亲和层析柱纯化说明说操作步骤对表达的产物进行纯化。操作步骤如下：

（1）以过滤超纯水清洗HisTrap HP 亲和层析柱，加入过滤的0.2 M的NiSO4

溶液进行Ni离子活化层析柱，通常清洗和活化的溶液体积为亲和柱体积5倍。

（2）活化完全后，再次使用超纯水清洗层析柱，之后用Binding buffer进行平衡，待吸光值和离子强度曲线稳定后，将之前准备的样品以注射器缓缓推入加样柱中进行上样操作。

（3）上样期会有杂蛋白紫外吸收峰出现，不必收集，待峰值下降并平稳一段时间后即可加入Elution buffer进行目的蛋白洗脱。

（4）Elution buffer注入一段时间后，紫外吸收峰开始出现时即可开始收集，收集结束后，使用Stripping buffer对柱子进行彻底清洗，完成后注入20%乙醇对柱子进行4℃保存。洗脱目的蛋白，洗脱产物经6 M/L、4 M/L、2 M/L、0 M/L、基本溶液、PBS的尿素浓度梯度复性液透析；

（5）透析结束后冷冻干燥除去多余水分以浓缩样品，取少量通过SDS-PAGE检测纯化情况并使用考马斯亮蓝法（Brodford 试剂盒上海生工）计算目的蛋白浓度，其他用PBS重悬-80℃保存备用。

### **4.1.3** 实验结果

#### **4.1.3.1** **ALF-AVK**基因重组表达质粒**pET-30a-ALF**的双酶切检测

分别在序列开放阅读两端设计引物之后，扩增的PCR产物片段约为372 bp，之后连接转化，菌落PCR随机检测了涂有转化后大肠杆菌的LB固体平板上的

12个菌落，在9个菌落PCR检测阳性的克隆中随即选取了1株植入LB培养基中进行了扩大培养，提取了离心收集的阳性克隆菌菌体质粒之后进行EcoR I和Hand III两种内切酶进行酶切检测，之后得到一条370 bp左右的条带，与目的基因大小相符，说明目的基因插入成功。



图4-1 表达载体pET-30a-ALF的菌落PCR检测M：DL2000 marker；1-12：菌落PCR检测结果Fig 4-1 Fungus PCR detect recombitant pET-30a-ALF



图4-2 表达载体pET-30a-ALF的双酶切检测

Fig 4-2 Double enzymes digestion of recombitant pET-30a-ALF

#### **4.1.3.2** 重组蛋白的诱导表达、纯化及**SDS-PAGE**分析

经过表达条件的优化，将IPTG与DTT混合诱导表达6 h的菌液与未进行诱

导表达的阴性对照以及经过HIS标签亲和层析纯化之后的最终目的蛋白进行SDS-PEAG，上述3种样品的电泳图谱在图3-1中进行了展示，对比未经诱导表达的大肠杆菌蛋白图谱，目的基因重组质粒在经过诱导后其细菌裂解液在21kDa左右的位置出现一条特异性的表达蛋白条带，本实验所设计引物可以扩增ALF-AVK基因片段长度为370 bp左右，可编码理论分子量约为13.7 kDa表达蛋白片段，连同目的片段共同表达的His标签蛋白在pET30（a）表达质粒中分子量约为7 kDa，重组之后电泳条带分子量与理论大小相符，而根据不同诱导时间的阳性表达菌电泳图谱显示在诱导6 h后蛋白表达量会有较为明显的提升之后再无变化，说明诱导6h表达蛋白的效率最高。

由于表达出的蛋白为包涵体，所以在8 mol/L尿素的作用下使包涵体蛋白变性溶解，之后经过His标签亲和层析进一步纯化之后，获得了纯度较高的重组表达目的蛋白，之后经过梯度尿素复性液使重组蛋白逐渐恢复构象，经 过

nanodrop测定后调整蛋白浓度至1 mg/ml,经过电泳之后其结果显示并无其他明显的蛋白杂带存在。



图4-3 SDS-PAGE检测ALF-AVK重组蛋白在大肠杆菌中的表达

M：蛋白分子量标准；1：阳性大肠杆菌诱导表达前的电泳图谱；2：阳性大肠杆菌诱导表达 后的电泳图谱；3：纯化的重组表达蛋白

Fig 4-3 Identification of fusion gene expressed in *E. coli*BL21(DE3) by SDS-PAGE

M: Marker; 1: SDS-PAGE of posivie clone before IPTG induction; 2: SDS-PAGE of posivie clone induced by IPTG; 3: Purified ALF-AVK protein.



图4-4 SDS-PAGE检测ALF-AVK重组蛋白在大肠杆菌中的不同诱导时间的表达情况

Fig 4-4 Identification of fusion gene expressed in6 different times after induction in *E. coli*BL21

(DE3) by SDS-PAGE

### **4.1.4** 讨 论

通过原核重组表达的方式来对所要进行研究的目的蛋白进行功能或者特性的鉴定是目前较为流行的研究手段，而选择合适的载体进行目的蛋白的表达以及纯化是首要需要进行的，在本实验中，由于需要表达的目的蛋白是抗脂多糖因子，其对于宿主本身有一定的抑制作用而且蛋白分子量较小仅有13.7kDa,所以在载体的选择就极为重要，pET-32a质粒的表达系统是一个高拷贝的质粒表达系统，但其上的Trx与His标签分子量较大，不利于之后重组蛋白的活性检测以及多克隆抗体的制作，而PGEX-4T-1质粒的表达虽然有利于表达出活性较好的重组蛋白，但仍有GST标签过大的弊端，故在本实验初期选取了pET-30a和28a两种质粒载体进行试验，两者均只含有6×His的连续组氨酸蛋白标签，可以利于诱导后蛋白的Ni离子亲和纯化而又不影响重组蛋白的结构和功能，但两者对于蛋白的表达能力却是稍弱的，在本实验中，我们首先使用了pET-28a载体，虽然可以检测到目的片段的插入但重组蛋白并没有预期的表达，推测可能是ALF基因在序列之前有一段25个碱基的信号肽会影响表达的进行也可能是由于ALF本身对于宿主的杀伤作用造成了重组蛋白无法正常表达。之后采用了pET-30a的质粒表

达系统，检测到9株插入目的片段阳性菌株，但在诱导表达时也仅有一株菌可以正确的表达重组蛋白，可能是由于该株个体合成重组蛋白速度更快而形成了没有正确折叠的无活性的包涵体，大大降低了对宿主的影响。

根据之前许多报道在原核表达抗脂多糖因子时，都会由于重组表达ALF蛋白会对其宿主产生强烈的抑制作用而影响正常的表达，所以在本实验采用的温度较低的环境来诱导蛋白的产生，因为在较低的温度环境下，虽然作为宿主的大肠杆菌会出现生长速度的下降，但对于质粒拷贝数的增加的影响不是很大，且在温度相对较低的时候所表达ALF蛋白活性会有一定的降低，从而减少对大肠杆菌的影响。而在诱导的同时加入一定量的DTT作为强还原剂，将ALF结合APS的活性中心的二硫键打开，从而破坏其空间结构，使表达的ALF重组蛋白丧失活性，缓解了表达过程中宿主的“自杀”现象，蛋白表达量有所增加。但过量的

DTT同时也会对宿主大肠杆菌本身的蛋白活性造成影响，使表达量降低。从以上的实验结果也可看出，ALF氨基酸序列中两个半胱氨酸之间形成的二硫键环形结构的构想对于其结合LPS的活性是极其重要的，而在环内存在的多个带有正电荷的氨基酸残基也会参与ALF实现其抗菌活性功能。

## **4.2** 重组蛋白**rALF-AVK**鼠源多克隆抗体的制备

利用原核表达系统成功表达并纯化的ALF-AVK蛋白免疫Balb/C品系的免疫缺陷性的小鼠，获得了鼠源抗ALF的血清，并测定了效价，为下一步研究ALF重组蛋白的抗菌活性与组织定位，准备了材料。之后通过Western-blot法利用纯化的鼠抗ALF重组蛋白的血清检测了重组蛋白以及凡纳滨对虾血细胞中自然状态的ALF的表达。

### **4.2.1** 实验材料与仪器

多克隆抗体制作所需的Balb/C品系小鼠购自ft东大学医学院。

pNPP、牛血清白蛋白及其他常规试剂购自上海生物工程公司。

聚96孔苯乙烯塑料板（酶标板）购自corning公司，ELISA酶标检测仪购自

TECAN公司，50-1200 ml排枪购自eppendorf公司37℃恒温孵育箱购自上海一恒仪器公司。

包被缓冲液(0.05 M碳酸盐缓冲液PH 9.6): NaCO3 1.59 g NaHCO3 2.93 g加蒸馏水至1000 ml；

洗涤缓冲液(PBST PH7.4):

0.15 M KH2PO4; 0.2 g Na2HPO4·12H2O 2.9 g; NaCl 8.0 g; KCl 0.2 g; Tween-20

0.5 ml加蒸馏水至1000 ml；封闭液:

3%-5%牛血清白蛋白(BSA) pNPP发色缓冲液:

Na2CO3 0.159 g, NaCHO3 0.294 g, MgCl.6H2O 0.0203 g加超纯水至200 ml, 调整至

pH9.8;

pNPP发色液：

将pNPP粉末溶于pNPP缓冲液中，0.5 g/ml，用前十分钟现用现配，配好避光。终止液：2 mol/L NaOH溶液

### **4.2.2** 实验方法

#### **4.2.2.1** 小鼠的注射免疫

将由Ni离子亲和层析柱纯化得到的重组蛋白样品分为4次免疫雌性Balb/c

小鼠，具体程序如下：

##### （1）基础免疫：以蛋白浓度为1 mg/ml的重组蛋白悬液200μl与弗氏完全佐剂

1: 1混和乳化，形成油包水的状态，腹腔注射0.2 mL；2周后进行第1次加强免疫，1 mg/ml的重组蛋白悬液200μl与弗氏不完全佐剂1: 1混匀乳化，腹腔注射0.2 mL；接下来两周，每周再加强免疫1次，每次小鼠尾静脉注射无佐剂

蛋白悬液0.1 mL；

##### （2）最后一次加强免疫后第7天，将小鼠乙醚麻醉后摘除眼球从眼部一次性采

血，将血液注入已灭菌的离心管中，室温下倾斜静置2 h，之后放置4℃静置过

夜；次日5000 rpm离心5 min去除红细胞沉淀后得抗血清。本次实验共免疫 5

只小鼠。

（3）由未免疫小鼠体内取血，同样室温放置2 h转入4℃过夜，次日离心取得正常血清作为下一步实验阴性对照，-80℃保存备用。

#### **4.2.2.2** 抗**ALF-AVK**重组蛋白多克隆抗体的效价测定

##### （1）包被酶标板孔内的抗原是用PBS按10倍稀释后的1 mg/ml的重组ALF-AVK蛋白，每孔100μl即每孔包被的抗原量为10μg，4°C冰箱中孵育过夜；

##### （2）先甩掉孔内大部分的液体再在多层滤纸上尽量拍干，每孔加入330μl 的

PBST溶液清洗未结合的蛋白，共清洗15 min，可分3个5 min清洗；在抗原孔

内加入5 %牛血清白蛋白（BSA）37°C封闭未结合蛋白的部分2 h，每孔300μl；

##### （3）除净孔内BSA溶液，加入PBST洗涤15 min，每5 min更换洗涤液一次；相应的抗原孔内分别加入100μl rALF的多克隆抗体用PBS按10倍、100倍、

1000倍、3000倍和5000倍的梯度稀释37°C 孵育1 h；

（4）除净孔内一抗液体，PBST洗涤15 min，每5 min更换洗涤液一次；抗原孔内加100μl稀释5000倍的碱性磷酸酶（AP）标记的羊抗鼠抗体（Sigma）37°C孵育1；

（5）除净孔内二抗液体，PBST洗涤15 min，每5 min更换洗涤液一次；抗原孔内加100μl pNPP显色液，37°C暗室孵育20 min后终止发色。

（6）将酶标板放入酶标仪设置程序在405 nm处读数，数据分析，确定抗原抗体的最佳使用稀释度（卢君辉，2012）。

### **4.2.3** 实验结果

#### **4.2.3.1** 鼠抗**ALF-AVK**重组蛋白多克隆抗体的制备与效价测定

本次试验共免疫了5只雌性balb/C品系小鼠，4次免疫结束后共采得鼠抗ALF-AVK重组蛋白血液5 ml左右，沉降过夜离心后共取得2ml的抗血清，ELISA法检测血清最大稀释倍数时，测得当稀释倍数为3000倍时，P/N值刚好等于2.1， 而当血清稀释倍数为5000倍时，P/N值明显小于2.1，所以经过ELISA法进行检测后得到鼠抗ALF-AVK重组蛋白多抗血清最大稀释倍数为3000倍，抗体效价为

3000倍，最佳稀释倍数应为1000-2000倍。

### **4.2.4** 讨论

多克隆抗体是动物机体接受某一种特定的抗原刺激后所产生的一组免疫球蛋白的混合物，其中每种免疫球蛋白能识别抗原的分子上的一个表位。相对于单克隆抗体，多抗制作的过程更为简单，耗费的时间更短，且可以与抗原的多个表位发生结合反应，对于一些在生物机体中丰度相对较低的功能蛋白进行研究时， 多克隆抗体由于其识别性更强的优势被采用的较多。本实验中由于ALF-AVK重组表达的蛋白其分子量非常小，抗原表位相对较少且在对虾血细胞等组织中的丰度相对来说要低一些，所以决定采用耗费时间更少、制备更为简便的多克隆抗体。

## **4.3** 免疫印迹法（**Western blotting**）检测**ALF-AVK**重组蛋白以及血细胞中**ALF**蛋白

### **4.3.1** 实验试剂及仪器

氯化硝基四氮唑蓝（nitroblue tetrazolium, NBT）、丽春红粉末、牛血清白蛋白粉末、5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸（5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, BCIP）等购自上海生工生物工程公司；甲醇、冰乙酸等购自国药试剂公司。湿法电泳转移系统以及垂直电泳系统均购自美国伯乐公司

电转移缓冲液配方：甘氨酸14.41 g

Tris 3.03 g.

甲醇 200 ml

蒸馏水 加至 1 L

丽春红染色液配方：丽春红0.5 g

冰乙酸 1 mL

蒸馏水 加至 100 mL 5% BSA 溶液配方：

牛血清白蛋白（BSA）：0.5 g

PBS: 10 ml

NBT-BCIP发色系统：

a. 发色底物缓冲液：10 mmol/L NaCL, 5 mmol/LMgCL2, 100 mmol/LTris-HCL, 调整pH至9.5;

b. NBT储存液：50 mg NBT溶于700µl DMF和300µl ddH20；避光存放于4℃；

c. BCIP储存液：50 mgBCIP溶于1ml DMF中，避光保存于4℃；

d. 混合液发色系统：需在临用前配置，取66µlNBT贮存液与10ml缓冲液混匀，再加入33µlBCIP贮存液，混合均匀后可放入37℃放置5 min左右利于发色。

### **4.3.2** 实验方法

#### **4.3.2.1** 采用免疫印迹技术来鉴定重组蛋白与多抗的结合反应进行鉴定

（1）每上样孔加17µl在沸水中煮过的已加入适量上样缓冲液纯化ALF-AVK重组蛋白样品。4℃条件下进行SDS-PEAG电泳。

（2）电泳结束后，将凝胶取出浸入转移缓冲液中至少15 min准备电转移，量取电泳凝胶的大小并剪下与电泳凝胶面积相同的一块聚偏氟乙烯（PVDF）膜，将PVDF膜浸泡入电泳转移缓冲液中5 min以上；

（3）将PVDF膜与凝胶互相贴合，分别在膜与凝胶的两侧贴合上以转移缓冲液湿润过的滤纸，轻轻按压去除滤纸、PVDF膜以及凝胶之间的气泡，即形成了两片滤纸在外，夹套凝胶与聚偏氟乙烯膜在内的夹心的“三明治”结构；

（4）用两块充分浸湿过转移缓冲液的泡沫垫夹住膜与胶，保证两者可以充分固定而又与外界缓冲液充分接触，用两块电泳系统的塑料板在最外层夹紧固定，插入盛有电转移缓冲液的电泳槽内，将聚偏氟乙烯膜朝向正极，而凝胶对向负极，稳压30 V，通电转移2 h；

（5）转移完结束后，取出PVDF膜晾干后就可看到较为明显的蛋白条带以及泳道，将目的蛋白条带与蛋白Marker分别剪下后，分别浸润甲醇15 s后进行下一步实验，蛋白Marker在丽春红作用下染色3-5 min后立即超纯水冲洗观察蛋白质条带；

（6）将转印有重组表达rALF-AVK蛋白的PVDF膜条浸入5 %的BSA溶液中

37℃封闭2 h, PBST清洗3次（可轻微摇晃），每次5 min；

（7）将PVDF膜置于稀释1000倍的rALF-AVK的多克隆抗体中，37℃中缓慢摇动孵育1 h, PBST清洗3次，每次5 min；

（8）将PVDF膜放入5000倍稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠Ig抗体中，37℃缓慢摇动孵育1 h, PBST清洗3次，每次5 min；

（9）把PVDF膜放入事先配置完成的NBT-BCIP发色液中避光发色，直到目的条带显色清晰为止。用超纯水漂洗终止反应，晾干后拍照保存实验结果；

（10）以健康小鼠的血清替代多克隆抗体作为阴性对照。

#### **4.3.2.2** 利用免疫印迹鉴定**WSSV**或鳗弧菌刺激前后凡纳滨对虾血细胞中

**ALF-AVK蛋白**

（1）分别抽取健康凡纳滨对虾与WSSV刺激24 h后对虾血细胞作为样品，加入少量同等浓度和体积的SDS进行超声波破碎并使所有血细胞蛋白完全溶解，之后使用Nanodrop进行蛋白含量测定并将两种样品的总蛋白浓度调为一致后进行SDS-PEGA电泳并进行电转移，其具体操作步骤可参照3.1.2.8部分进行；

（2）蛋白转移到PVDF膜上之后用5%的BSA溶液4℃封闭过夜；

（3）次日，PBST洗涤3次，每次5 min后加之前制备的rALF-AVK蛋白多克隆抗体到PVDF膜上，37℃孵育2 h；

（4）同上依旧洗涤3次，加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠Ig抗体中(1: 5000)，

37℃孵育1 h；

（5）PBST洗涤3次，NBT-BCIP发色液中避光发色，条带显色清晰后，以超纯水洗涤终止发色反应，晾干后拍照保存实验结果。

### **4.3.3** 实验结果

#### **4.3.3.1** 免疫印迹法检测**ALF**重组蛋白以及**WSSV**或鳗弧菌刺激后血细胞中**ALF**的变化

免疫印迹法检测的结果显示，制作的多克隆抗体可以与分子量为21kDa左右的重组蛋白结合，且阴性对照中未免疫的小鼠血清与ALF-AVK不发生任何反应。为了验证多克隆抗体可以与凡纳滨对虾血细胞中自然状态下表达的ALF蛋白发生结合反应，就尝试了使用对虾全血细胞蛋白裂解液电泳后进行免疫印迹反应，而在图3-2中我们发现利用免疫印迹法检测的健康凡纳滨对虾的血细胞时并没有产生预期的特异性条带的结合反应，但在经WSSV或鳗弧菌刺激之后的血细胞裂解液中，在大约13kDa的位置出现了一条较为明显的特异性结合条带，根据分子量分析确定其为血细胞中自然状态ALF与多克隆抗体发生的结合反应。



图4-5 多克隆抗体与ALF-AVK重组蛋白的Western blotting结合反应结果

M：蛋白分子量标准；L1-L3：表达蛋白阳性菌SDS-PAGE图谱；L4：抗血清与重组表达蛋白阳性菌结合图谱；L5：抗血清与重组表达蛋白结合图谱；L6：阴性对照。

Fig 4-5 Western blot of MAbs with recombinant ALF-AVK

M: marker; L1-L3: SDS-PAGE of positive clone; L4: result of MAbs with recombinant ALF-AVK positive clone; L5: result of MAbs with recombinant ALF-AVK; L6: negative control.



图4-6 ALF-AVK在不同处理对虾血细胞中的检测. M：标准分子量Marker；L1：未经刺激的对虾血细胞电泳图谱；L2：鳗弧菌刺激后对虾血细胞电泳图谱；L3: WSSV刺激后的对虾血细胞电泳图谱；L4-L6: L1-L3泳道样品相对应的western blotting结果。

Fig.4-6. Analysis of ALF-AVK protein expression. Lane M, molecular weight protein marker; Lane 1, the hemocytes of untreated shrimp; Lane 2, the hemocytes of *V. anguillarum*challenged shrimp; Lane 3, the hemocytes of WSSV challenged shrimp; Lane 4, western blotting result of untreated shrimp. Lane 5, western blotting result of *V. anguillarum*challenged shrimp hemocytes with a protein band; Lane 6, western blotting result of WSSV challenged shrimp hemocytes.

### **4.3.4** 讨 论

在目前的研究中，血细胞是多数物种的ALF蛋白等抗菌肽物质的主要表达器官，在机体正常的状态下不会进行转录翻译成蛋白，或者量很少的以颗粒的形式存在于血细胞内部，只有在机体受到外界病原体刺激时，机体可能才会激活或者提高抗菌肽的表达水平，转录翻译出更多的蛋白来清除病原保护机体，之前的多数研究也发现甲壳动物中的ALF表达水平的高低会受到细菌压力的诱导影响

（Beale et al.,2008; Liu et al.,2007; Yedery et al.,2009）。在本实验中，我们发现通过免疫印迹技术利用ALF重组蛋白对正常凡纳滨对虾血细胞总蛋白进行检测时， 并没有出现特异性的结合条带出现，更换样品进行重复试验之后发现多抗仍然无法识别到血细胞中自然表达的ALF的存在，于是我们认为可能在健康的状态下，

凡纳滨对虾ALF-AVK基因的表达量极少而是免疫印迹技术的灵敏度无法检测出ALF-AVK蛋白的存在，于是我们利用之前WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾进行了感染之后再抽取对虾的血细胞进行检测，发现在鳗弧菌刺激的对虾血细胞的大约14kDa出现一条较为明显的条带，而WSSV刺激之后虽然可以检测到条带，但较为模糊。这一结果与之前的qPCR检测这两种病原体刺激之后对虾血细胞中ALF表达水平变化的实验结果相对较为吻合，证明革兰氏阴性菌能够直接刺激机体大量表达ALF-AVK蛋白而刺激产生的蛋白也会直接参与到抵御病原体的功能中去，但病毒刺激后ALF-AVK蛋白的表达较为缓和，可能仅仅只会参与机体对于病毒抵御过程的较少部分。

## 小结：

本章实验在之前对ALF-AVK蛋白完成重组原核表达并纯化的基础上，用纯化的蛋白免疫小鼠，制备了重组蛋白的多克隆抗体并用ELISA的方法检测了该多抗与抗原重组蛋白的结合效价，确定了抗体血清最适合的稀释倍数。利用免疫印迹实验验证了多抗血清对ALF-AVK重组蛋白的结合作用，同时，也对多抗血清与血细胞自然表达的ALF-AVK蛋白之间的识别结合进行了验证，并在此基础上推测了ALF-AVK基因在正常对虾机体的血细胞中的表达水平要较病原体刺激之后的个体低。

# 第五章 凡纳滨对虾**ALF-AVK**重组蛋白的活性研究

利用间接ELISA、细菌-蛋白结合沉淀实验以及对虾体内中和试验3种实验技术来对凡纳滨对虾ALF-AVK重组蛋白与病原体之间的结合活性进行检测。

## **5.1** 实验方法

### **5.1.1** 间接**ELISA**检测**rALF-AVK**与**LPS**的结合试验

（1）脂多糖LPS是鳗弧菌主要的细胞壁结构成分，同时也是抗脂多糖因子的主要结合对象，购买商品化LPS（Sigma）以ELISA抗原结合包被液稀释为1mg/ml, 每孔100μl包被在ELISA酶标板底部，共包被24个孔，4°C过夜孵育；

（2）先甩掉孔内大部分的液体再在多层滤纸上尽量拍干，每孔加入330μl 的

PBST溶液清洗未结合的蛋白，共清洗15 min，可分3个5min清洗；在抗原孔内加入5 %牛血清白蛋白（BSA）37°C封闭未结合蛋白的部分2 h，每孔300μl；

（3）除净孔内BSA溶液，加入PBST洗涤15min；相应的抗原孔内分别加入100μl以无菌PBS按100、10-1、10-2、10-3、10-4、10-5梯度稀释的重组ALF-AVK蛋白梯度稀释后每孔加入的蛋白量相当于100μg、10μg、1μg、0.1μg、0.01μg以及0.001μg，室温孵育4 h，每个稀释梯度包被3个孔作为平行样品对照；

（4）除净孔内重组蛋白溶液，加入PBST洗涤15min，每5min更换洗涤液一次；相应的抗原孔内分别加入100μl稀释1000倍的rALF-AVK的多抗血清，37°C孵育1 h；

（5）除净孔内一抗液体，PBST洗涤15 min，每5 min更换洗涤液一次；抗原孔内加100μl稀释5000倍的碱性磷酸酶（AP）标记的羊抗鼠抗体（Sigma）37°C孵育1；

（6）除净孔内二抗液体，PBST洗涤15 min，每5 min更换洗涤液一次；抗原孔内加100μl pNPP显色液，37°C暗室孵育20 min后终止发色。

（7）将酶标板放入酶标仪设置程序在405 nm 处读数，数据分析。

### **5.1.2** 鳗弧菌与**rALF-AVK**结合实验

将上述培养的鳗弧菌洗脱后以无菌PBS重悬，调整浓度为至1×108 CFU，吸取1ml的菌液与1 ml浓度为1 mg/ml的重组蛋白rALF-AVK在10 ml灭菌离心管中混合后，室温条件下摇床轻微震荡孵育3-4h，同时，以实验室制备的同样以pET-30a表达的重组牙鲆CD-3蛋白作为阴性对照，加入另一管中，同时震荡孵

育，孵育结束后以4000 rpm，离心10 min，彻底沉淀菌体，保留实验组上清作为对照之一，沉淀细菌以无菌PBS冲洗2次之后，以少量的PBS悬起，按1: 1的比例加SDS-PEAG样品Buffer，准备进行电泳检测。分别将鳗弧菌与rALF-AVK混合反应的实验组、实验组上清溶液以及与CD-3混合反应的对照组分别点样到已配好的电泳凝胶板中，4℃条件下进行电泳反应，电泳结束后，切下部分泳道，使用前固定液固定凝胶之后，放入考马斯亮蓝（CBB）G250染液中，轻微摇动，染色8-10h，之后超纯水脱色，在凝胶成像仪下拍照分析结合反应结果。为验证与鳗弧菌结合反应的蛋白种类将剩余的部分凝胶泳道与同样大小的PVDF膜紧贴后进行电转移反应，反应结束后，5%BSA溶液封闭背景2h，PBST洗涤3次，加入rALF-AVK重组蛋白多抗孵育1 h，PBST洗涤3次，将PVDF膜放入5000倍稀释的

AP标记的羊抗小鼠Ig中孵育1 h，如上清洗后，使用NBT/BCIP发色系统进行发色反应，条带显色后超纯水终止反应，晾干PVDF膜分析结果。

### **5.1.3** 凡纳滨对虾体内检测重组蛋白**ALF-AVK**的结合活性

将培养的鳗弧菌使用无菌PBS调整浓度为1×108 CFU以及提纯的WSSV精提液浓度调整为106之后分别取两种病原体溶液1 ml与同等体积的1 mg/ml的ALF-AVK重组蛋白置于摇床上，在室温状态下（约20℃）摇晃孵育3h后注射已暂养7d的凡纳滨对虾。实验共分为5组，实验组2个分别注射之前与ALF-AVK重组蛋白孵育之后的两种病原体，阳性对照组2个分别直接注射与

BSA孵育3 h的WSSV或鳗弧菌，注射无菌PBS的作为阴性对照组，每尾对虾注射50μl溶液。之后每天换水吸底两次，每次换水体总量1/3，早晚各观察一次，统计每日对虾的死亡数量，最后计算死亡率。

## **5.2** 实验结果

### **5.2.1** **ALF-AVK**重组蛋白与**LPS**结合活性检测

ELISA检测ALF-AVK重组蛋白与LPS的结合作用，从图中可以看出随着重组蛋白浓度的增加，吸光值也会越来越高，说明包被酶标板的LPS能结合下来的重组蛋白量也就越多，当加入的重组蛋白高于100μg/ml时P/N的值不在变化，说明结合量达到上限，而在加入量低于1μg/ml时P/N值小于2.1，则认定为没有阳性。而两组阴性对照吸光值均在0.1左右说明本实验没有非特异结合的出现。



图5-1 ELISA检测ALF-AVK重组蛋白与LPS结合.

C1: PBS代替重组蛋白与LPS育组；C2：未免疫小鼠血清代替鼠抗ALF-AVK重组蛋白血清. C1

和C2为阴性对照组.

Fig 5-1 ELISA dected the binding of rALF-AVK with ALF.

C1: PBS instead of rALF-AVK incubated with LPS; C2: normal mouse serum instead of anti-rALF-AVK polyclonal antibody. C1 and C2 are negative control.

### **5.2.2** 细菌**-**蛋白结合沉淀实验

为了验证ALF-AVK重组蛋白是否是与鳗弧菌的细胞膜结合，我们又做了完整的鳗弧菌与重组蛋白的结合实验，两者孵育之后的沉淀经过SDS-PEAG电泳图谱显示与单一鳗弧菌蛋白图谱相比较，沉淀中在21kDa的位置出现了一条明显的条带，多抗血清检测该条带为ALF-AVK重组蛋白，在上清中也检测到了

21kDa的蛋白，推测可能是没有被结合沉淀的重组蛋白，从而得到ALF-AVK重组蛋白可以与鳗弧菌细胞膜结合的结论。



图5-2 细菌-蛋白结合实验.

M：蛋白标准分子量Marker；L1：鳗弧菌全菌蛋白图谱；L2：鳗弧菌与ALF-AVK重组蛋白孵 育离心后沉淀电泳图谱；L3：孵育液上清图谱；L4-L6：即为L1-L3泳道蛋白的Western blotting结果.

Fig 5-2. The binding of rALF-AVK to bacterial cells. Lane M, molecular weight protein marker; Lane 1, the SDS-PEAG result of the *L. anguillarum*incubated with PBS as negative control; Lane 2, the supernatant of *L. anguillarum*incubated with rALF-AVK; Lane 3, the sedimentation of *L. anguillarum*incubated with rALF-AVK; The binding was confirmed by Western blotting

Analysis using antisera specific to rALF-AVK, Lane 4,5,6 sample treated as Lane 1,2,3. The arrow indicates the rALF-AVK protein band.

### **5.2.3** **ALF-AVK**重组蛋白与鳗弧菌中和实验

分别将WSSV+BSA、WSSV+rALF-AVK、鳗弧菌+BSA、鳗弧菌+ rALF-AVK以及PBS腹腔注射至凡纳滨对虾体内并记录其死亡率，制作死亡曲线。根据曲线我们可以看出在注射之后的最初几天每组对虾都会有个别个体死亡，这可能是由于对虾个体较为脆弱、应激反应强烈造成；WSSV与WSSV+rALF-AVK实验组对虾的死亡曲线基本一致，说明ALF-AVK重组蛋白并没有对WSSV产生有效的抑制作用；而鳗弧菌组对虾的死亡曲线较WSSV组稍推后一些时间，说明鳗弧菌对于对虾也有较强的致死作用，但较WSSV要稍弱一些；而鳗弧菌+ rALF-AVK实验组的对虾死亡时间最晚，说明ALF-AVK重组蛋白对于鳗弧菌有了一定的抑制作用，但并不能完全抑制细菌的活性。



图5-3 ALF-AVK重组蛋白与WSSV和鳗弧菌体内中和试验. ■，WSSV与BSA孵育后注射对虾；

●，WSSV与rALF-AVK孵育后注射对虾；▲，鳗弧菌与BSA孵育后注射对虾；▼，鳗弧菌与rALF-AVK孵育后注射对虾，PBS注射对虾.

Fig 5-3 Neutralization of WSSV and *V. anguillarum*with purified rALF-AVK in vivo. ■, shrimp injected with WSSV pre-incubated with BSA;●, shrimp injected with WSSV

Pre-incubated with purified rALF-AVK;▲, shrimp injected with *V. anguillarum*pre-incubated with BSA;▼，shrimp injected with *V. anguillarum*pre-incubated with, shrimp injected with PBS.

## **5.3** 讨论

抗脂多糖因子自1982年在鲎中发现以来其可以结合LPS抵御细菌等病原微生物感染的功能和特性，得到了免疫学和医学研究人员的广泛关注，ALF多种不同亚型及其衍生物的基因克隆和抗菌活性的研究得到了不断的深入，多数研究认为ALF可以作为治疗或预防各种病原体感染而导致的多种病害产生的潜在药物。而在本研究中，我们克隆到了凡纳滨对虾体内ALF 的一种亚型*ALF-AVK*的基因序列，并成功的导入了pET-30a的质粒中进行了原核表达，虽然得到的表达产物是包涵体的形式，但纯化之后我们采用了梯度尿素复性液逐步透析的方法对纯化后的蛋白进行了尿素去除以及活性恢复，本实验中的ALF-AVK的蛋白分子量较小，就使其在复性时更易进行正确的折叠来恢复到原有的构想，再者，在纯

化之前由于使用了高浓度的尿素溶解包涵体破坏了蛋白二硫键，因此，我们在每个浓度的复性液中都加入了适当比例的还原型和氧化性的谷胱甘肽来辅助二硫键的形成恢复。为了检测复性后纯化ALF-AVK重组蛋白的结合细菌活性，我们使用了体外结合实验检测活性，并在对虾活体内进行了中和实验以验证重组蛋白的活性。

ELISA是目前较为通用的一种灵敏度较高免疫相关检测方法，以样品经过抗原抗体反应之后酶底物之间发色吸光值的比例做为阳性判定标准，能较为直观的判断实验结果和数据。其在抗体效价的测定以及蛋白间的体外结合反应等实验中应用较为广泛，如本实验中多克隆抗体效价的测定就应用了间接ELISA法准确的测定了血清中所含有的抗体的水平，同时也说明了重组表达的ALF-AVK蛋白具有良好的抗原性。而在本节实验中，则首先利用了酶标板孵育了细菌破碎液蛋白，再与重组表达的ALF-AVK蛋白孵育，最后使用该重组蛋白的多克隆抗体对两者是否能够相互结合进行了检测判定，数据直观明确，说明了ALF-AVK重组蛋白具有结合细菌某种组分的活性。在本实验中我们还采用了另一种检测重组ALF与细菌结合反应的实验，即将两者震荡孵育之后，利用细菌分子量及体积较大的特点以较低转速进行离心之后，如果细菌可以与ALF发生结合反应，ALF蛋白就会随着细菌的离心被沉淀下来，去掉上清后再以SDS-PEAG与western blotting技术共同检测沉淀的蛋白图谱，从而确定ALF重组蛋白是否与细菌结合并沉淀下来。从以上两个体外结合实验我们可以推断ALF对于细菌的抑制作用可能首先是来自于其对于细菌细胞膜的主要组分LPS的结合，之后再可能通过已报道的几种抗菌肽杀菌模型的方式来对细菌进行破坏，但我们所进行的实验对于ALF-AVK蛋白在结合细菌之后采用何种方式进行清除尚无法进行验证。

凡纳滨对虾所生活的水环境中充满了多种微生物其中不论是真菌、细菌还是病毒都会对对虾的机体造成侵染，这就需要对虾机体内固有免疫系统有着多种多样的抗菌肽来直接清除或是协作应对不同微生物病原体的入侵，ALF是抗菌肽的一种，而它在同一物种机体内可能又分为很多的亚型，这样多种ALF的存在也符合生物体要抵抗多累病原微生物的需要。在本实验中，成功获得了凡纳滨对虾ALF的一种亚型蛋白ALF-AVK，并原核表达后体外结合试验检测到其具有细菌集合活性，为了验证这一重组表达的ALF蛋白是否可以通过与病原体的结合起到

保护机体的作用，我们设计了体内中和活性试验，将事先与ALF-AVK重组蛋白孵育过的WSSV与鳗弧菌分别注射到凡纳滨对虾体内，与未孵育过蛋白的两种病原体直接注射的对虾进行了死亡率的比较。在实验结果中我们发现，ALF-AVK的重组蛋白对于WSSV注射组对虾的死亡率几乎没有影响，实验组与对照组一样都会在12d左右时全部死亡，根据结果我们推测，ALF与WSSV之间并不能有结合反应的产生，ALF也不能通过与病毒的结合作用来完成对病毒的清除作用，但我们在之前的qPCR检测反应中发现WSSV仍能刺激ALF-AVK基因表达水平的上调，这与我们之前推测的ALF-AVK在WSSV侵染机体过程中可能只是起到介导免疫信号传递或者辅助机体进行抵御作用的推论是相吻合的。而在鳗弧菌注射组我们发现实验组再注射之后会有一段死亡率的突然上升，分析这可能是由于注射刺激之后个别对虾个体应激反应过于强烈导致死亡，死亡率趋于平稳一段时间之后死亡率又会缓慢上升直至全部死亡，从死亡率曲线可以看出实验组鳗弧菌孵育过重组蛋白之后导致对虾死亡的时间明显要比阳性对照组推迟一些，说明ALF对于鳗弧菌确实存在一定抑制作用，但最终实验组对虾还是会死亡推测分析可能有两个原因：首先是重组的ALF-AVK蛋白无法完全结合溶液中全部的鳗弧菌，造成部分没有发生结合反应的鳗弧菌仍然会对对虾机体造成感染。其二我们推测可能仅仅只靠ALF体外对于鳗弧菌的结合并不能完全达到清除细菌的目的，ALF对于细菌的结合可能只是机体进行清除的第一步，之后可能还需要其他免疫防御因子的参与和协同来能达到清除细菌保护机体的作用。

## 小结：

在本节实验中，我们通过ELISA和蛋白-细菌结合沉淀两个实验方法来对重组的ALF-AVK蛋白是否对细菌有结合活性进行了验证，ELISA实验结果表明随着重组蛋白浓度的增加，底物发色的吸光值也会增加，说明ALF-AVK蛋白可以与鳗弧菌的破碎液发生结合反应，而蛋白-细菌结合沉淀实验中也在细菌沉淀中检测到了ALF-AVK蛋白，说明其可以与鳗弧菌的细胞膜发生结合反应。以上两个实验充分证明我们重组表达的ALF-AVK蛋白具有与鳗弧菌的结合活性，表达和复性是成功的。WSSV和鳗弧菌与重组蛋白孵育之后的攻毒实验结果说明ALF对于WSSV可能并没有结合作用，而对于鳗弧菌入侵时的抵御和清除作用可能需要除了ALF之外的其他免疫因子的协同作用。

# 第六章 免疫组化法研究凡纳滨对虾抗脂多糖因子**ALF**的组

**织分布特点**

之前的多数研究中均证明对虾抗菌肽物质多数是在血淋巴的血细胞中进行转录翻译表达出蛋白，并存在于胞浆之中，当外界出现病原刺激时，血细胞会随着血淋巴流动到感染部位，释放可以抑制抵御病原入侵的抗菌肽（王明昌等，

2008；郭振宇等，2002；徐红伟等，2007；Epand et al.,1999）。对虾抗脂多糖因子作为抗菌肽中重要的一类，也被证明是在血细胞中有表达的，柳峰松等（2005） 实验证明了中国明对虾的抗脂多糖因子ALFFc的mRNA在血细胞中专一性表达并会随着血淋巴的流动进入机体主要免疫防御器官如鳃，肠等部位，李婷（2010） 使用了Western-blot的方法对其加以了验证。Kunlaya等（2008）同样在斑节对虾中，利用免疫组化的方法阐述了ALFPm3的组织定位等特点。关于凡纳滨对虾抗脂多糖因子的蛋白水平上进行组织定位的实验尚未有报道。本研究中通过原核表达了凡纳滨对虾的ALF-AVK蛋白，纯化后成功的检测到了其与鳗弧菌的结合活性并制备了鼠源的多克隆抗体，利用免疫组化的方法检测了健康凡纳滨对虾以及鳗弧菌刺激24h后，ALF在对虾组织中的定位以及变化情况。这为研究ALF在机体中的合成、转运过程以及病原体刺激后的蛋白水平的变化提供了一定的理论基础。

## **6.1** 实验试剂及仪器

凡纳滨对虾购自青岛南ft水产品批发市场，体长12-15 cm；苦味酸、甲醛、无水乙醇、精密石蜡等均购自国药试剂公司；3-氨丙基三乙氧基硅烷（APES）购自Sigma公司；生物素化马抗小鼠Ig、链霉卵白素标记亲和素、AP-Red底物发色试剂盒等购自北京中杉金桥公司。

自动组织脱蜡脱水机（TP-1020）、组织石蜡包埋机（EG-1150）、组织切片机（RM-2016）、摊片机（HI-12100等均购自德国徕卡公司；甩片机购自日本

TOMY公司，显微拍摄系统购自日本奥林巴斯（Olympus）公司。波恩氏（Bouin's）组织固定液配方：

5 ml冰乙酸，25 ml 40%甲醛溶液，75 ml饱和苦味酸溶液混合而成，固定组织前可现用现配。

重铬酸钾洗液配方：

称取重铬酸钾粉末20 g，缓慢加热溶于40 ml蒸馏水中，在缓慢加入360 ml

浓硫酸。可用于去除载玻片污物与油迹等。组织抗原修复缓冲液配方：

A液：柠檬酸钠Na3C6H5O7·2H2O 29.4g 加蒸馏水至1L；

B液：柠檬酸C6H5O7·H2O 21.0g 加蒸馏水至1L；

使用前混合A液16.2 ml与B液3.8 ml再加蒸馏水稀释至200 ml调节PH至6.0

成为工作液。

## **6.2** 实验方法

### **6.2.1** 处理防脱载玻片

将盖玻片和载玻片在重铬酸钾洗液中浸泡充分约24 h以上，流水冲洗干净，再以蒸馏水浸泡一段时间，浸泡于95%乙醇可存放较长时间，使用之前取出用纱布擦拭干净。将清洁之后的载玻片进行防脱处理，放入丙酮-APES液（APES;8 ml;丙酮: 200 ml）中浸泡30 s后取出，之后再浸于丙酮中30秒洗去多余的APES液，分别经过两次蒸馏水冲洗每次30 s左右，不需要擦拭直接置于60°C恒温烘箱中烘干。

### **6.2.2** 实验动物的组织固定

购买的凡纳滨对虾在50L钢化玻璃水槽中暂养7-10 d，取出部分摘取其肝胰腺、鳃、心脏、中肠以及肌肉组织样品放入波恩氏液中固定12-18 h（波恩氏液体积约是浸泡组织体积的5-10倍），倒出固定液加入70%乙醇进行洗涤，最初可每2 h更换一次，带样品黄的褪去较多时可8 h更换一次，直至样品颜色基本褪为白色为止。抽取血淋巴，800 rpm离心15 min，无菌PBS重悬清洗一次再离心，结束后以少量PBS重悬后滴加在载玻片上，放入湿盒中使细胞沉降1 h左右，甩掉多余液体，将载玻片放入丙酮中进行固定10 min，拿出后晾干放入-20℃中备用。剩余部分对虾以腹腔注射1×108的鳗弧菌刺激，24 h后，也按上述步骤，固定组织以及血细胞。

### **6.2.3** 石蜡处理及组织包埋

将蜡块反复加热融化，可以使蜡质更为细腻，利于下一步切片时更好的形成蜡带，融化多次后在60 ℃以上的烘箱中进行过滤去除杂质。

浸泡在70%乙醇中的组织块需要逐步的脱去水分并充分浸入石蜡就需要脱水透明浸蜡的程序，我们使用徕卡自动脱水浸蜡机自动进行这一实验步骤，编程时间如下：

可根据实验时的环境温度以及组织体积适当做出时间调整。

将过滤的石蜡溶化后也滴加在提前折叠完成的包埋盒中，注意石蜡温度适中不要过热烫漏包埋盒或过冷凝固，待包埋盒下半层石蜡变得模糊凝固后即可小心放入已脱蜡完成的组织块到包埋盒中部，调整组织方向，等待石蜡凝固形成蜡块。

### **6.2.4** 修正组织蜡块及切片

剥除包埋组织蜡块的纸盒，用单面刀片轻修蜡块至方柱形，注意方柱形四边的平行，在包埋组织的外围至少留有3 cm的蜡块，在切片机持蜡器上滴加少量热蜡后将修完的组织蜡块固定在其上面，再以少量的石蜡涂抹在蜡块与持腊器相接位置，焊牢蜡块。将带有组织块的持腊器固定在切片机上，调整好切片刀的角度，调整切片厚度为7μm，进行连续切片。切出带有对虾组织的成型蜡带后可将蜡带光面向下平摊于展片机水面上，用水面张力使蜡带和组织充分舒展，将蜡带截取合适长度用防脱载玻片捞起后，放置入37 ℃烘箱烘干。

### **6.2.5** 组织脱蜡复水

切片完成后需要将组织中的蜡质脱除，以用于下一步的免疫组化反应，利用二甲苯可以将石蜡溶解的特点，将切好的组织片放入二甲苯中脱蜡15 min左右，再利用乙醇与二甲苯互溶的特点，将组织片分别顺序经过 100%、95%、80%、

70%、50%的乙醇进行复水反应，每个步骤3-5 min，最后以蒸馏水冲洗浸泡后，将组织切片置于-20℃中保存。

### **6.2.6** 组织抗原热修复反应及内源酶的清除

为了使被固定液中甲醛交联的抗原蛋白质充分打开并恢复组织蛋白的抗原性需要高温高压抗原修复的过程。

将组织片完全浸入组织抗原修复液中，调整高压灭菌锅程序为120℃，7

min，开始修复反应。反应结束后，将修复液自然冷却至室温后将组织玻片取出，在甩片机上甩干玻片液体。由于对虾体内有着较多的内源性的碱性磷酸酶等，会严重影响实验结果造成假阳性，采用0.5 mol/L的EDTA室温孵育30 min的方法

消除内源酶的影响。

### **6.2.7** 背景封闭及抗原抗体反应

（1）内源酶消除结束后，使用PBST清洗玻片3次，每次5 min，在组织玻片上有组织粘附的地方均滴加5%牛血清白蛋白（BSA）37℃孵育30 min，用于封闭玻片以及组织的背景颜色，防止玻片与抗体的非特异结合产生；

（2）甩干BSA，不用清洗，滴加稀释1000倍的rALF-AVK重组蛋白的多克隆抗体作为一抗在组织上，37℃在湿盒中恒温孵育60 min，结束后PBST洗涤3次，每次5 min，甩干；

（3）将3μl生物素化马抗小鼠Ig的抗体用PBS稀释至1 ml，作为二抗滴加在组织上，仍然37℃恒温孵育60 min，之后如上法洗涤；

（4）将3μl亲和素标记的链霉卵白素稀释于1 mlPBS中，37℃孵育60 min，如上清洗3次；

（5）按AP-Red发色试剂盒说明书操作，配置好发色液，滴加在组织上，显色

3-10 min，使用蒸馏水冲洗，终止发色；

### **6.2.8** 衬染及封片

发色结束后的组织玻片滴加少量的爱氏苏木精衬染2-5 min，冲掉苏木精染液，滴加少量稀氨水分色，待组织部分呈现天蓝色是即可冲掉，甩掉玻片上多余水分，滴加少量中性树胶进行长久封片，OLYMPUS显微成像系统观察并拍照。讨论

## **6.3** 实验结果

衬染封片结束后结束，在显微镜下观察组织阳性并拍照记录。对免疫组化的结果分析发现，对比鳗弧菌感染与健康的凡纳滨对虾组织，感染组的组织AIF阳性信号明显要更加强烈。在鳗弧菌刺激之后的对虾组织中，血细胞的阳性信号多出现在细胞核与细胞膜之间的细胞质中，说明血细胞是合成ALF的主要器官；鳃丝分支的末端微血腔中集中了较多的阳性信号；心脏的心腔内以及外膜结缔组织边缘阳性信号密度较大，而实质的心肌细胞束内则没有信号检出；肝胰腺中星形的肝小管之间的空腔有部分信号检出；肠中阳性信号主要出现在肠结缔组织的血窦中，内外壁的阳性并不明显。而在健康对虾组织中检出的阳性信号的量比较低，首先在血细胞中仅有较少的个体会有部分阳性信号出现在细胞质中，而在其

他组织中阳性信号多出现在组织外壁上且量极少，分析原因可能是由于对虾的开管式循环造成部分血细胞会在组织细胞壁上出现，而产生少量阳性。





**图6-1** 免疫组织化学观察凡纳滨对虾（*L. vannamei*）ALF的分布

**Fig.** **6-1.** Immunohistochemistry observation of ALF in *L. vannamei*

图版说明：A1-E1：鳗弧菌感染后对虾组织；A2-E2：未处理对虾组织；A1-A2：血细胞；B1-B2：鳃；C1-C2：心脏；D1-D2：肝胰脏；E1-E2：肠；F1：阴性对照（鳃）；F2阴性对照（肝胰腺）箭头所指为阳性信号；标尺=20μm

Explanation: A1-E1: Tissue of *V. anguillarum*challenged shrimp; A2-E2: Tissue of untreated shrimp; A1-A2: Hemocytes; B1-B2: Gill; C1-C2 Heart; D1-D2: Hepatopancreas; E1-E2: Intestine; F1: Negative control(Hemocytes)；F2: Negative control

(Hepatopancreas)；Positive signal was pointed with arrows; Bar=20μm

## **6.4** 讨论

为了进一步研究ALF在对虾免疫防御过程中所起的作用以及其组织分布特征，本实验中我们采用了免疫组织化学的实验方法对鳗弧菌感染刺激之后以及未经过处理的健康对虾的5种组织利用ALF-AVK重组蛋白的多抗血清进行ALF的组织定位。免疫荧光实验相对于免疫组化来说步骤要更为简单，耗费的时间也更短一些，而且可以较好的保持组织蛋白的抗原性，但也有着较为明显的缺点就是无法使组织保持良好的结构形态，且对于在组织中丰度较低的蛋白很难通过加入生物素亲和素的方式来对阳性信号进行放大，灵敏度较低。故在本实验中我们采用了石蜡切片之后在抗原复性液以及高温高压的作用下来对对虾组织的抗原进行热修复，这样既可以保持组织形态结构的完好，又能在ALF蛋白丰度相对较低的情况下准确检测到其在组织中的阳性信号。Zhan等（2004）在之前的研究中发现对虾体内存在着大量的如碱性磷酸酶（AP）等内源性酶，如果不对其加以抑制会在免疫组化实验中造成假阳性结果的出现，而0.5mol/L的EDTA溶液对于消除内源酶有着较好的效果，因此，在我们进行免疫组化的过程中会在抗原修复完毕后也加入EDTA并与组织孵育可成功的抑制对虾体内内源酶的非特异反应，从而保证了结果的可信性。

许多研究报道已证实，抗脂多糖因子等甲壳类抗菌肽会在血淋巴中的血细胞中进行表达，Nagoshi等（2006）报道M-ALF基因在弧菌刺激的早期几个小时里就会在血淋巴中出现表达量的上升，而Somboonwiwat等（2005）也通过免疫组化的方法证实斑节对虾中的ALFPm3蛋白定位在血细胞上，在凡纳滨对虾其他种类的抗菌肽中也发现其主要表达组织为血细胞，并会随着血淋巴流动渗透到机体各处（Munoz et al.,2004）。在本实验中，我们通过也免疫组化的方法对凡纳滨对虾体内ALF-AVK蛋白进行了定位，而且得到了几乎相同的结论，我们发现凡纳滨对虾ALF也是定位在对虾的血细胞中，但会随着血淋巴的循环流动渗透到几个较为主要组织器官中。鳃是对虾与外界接触最为频繁的器官，行使着运输氧气，交换气体等功能，同时它就成为了外界病原首要的侵染对象，在鳃丝的微血腔中会有大量的血细胞聚集随时抵御外界异物的入侵，所以在健康对虾的鳃中检到了ALF的较强阳性信号；心脏是促使血液在对虾机体中流动循环的主要器官，所以在心脏组织的空腔位置也出现了较强ALF的阳性信号，而在实质的心

肌中则没有阳性出现；肠道作为主要的消化器官，也应有血淋巴的循环流动，理论上也应有较强的阳性信号出现，但可能由于在处理样品时需要清除肠中残留物质，洗涤次数过多造成了其并没有表现出较强的阳性，这一原因也可能是导致qPCR中未能检出ALF在肠中表达的原因；而肝胰腺组织与心脏的状况类似，有血细胞流动的空腔以及与血细胞接触较多的组织边缘部分会有少量阳性信号的存在，而在实质组织中均呈现阴性。在鳗弧菌刺激之后组织检测中，可以明显的发现对虾血细胞ALF蛋白的表达量会上调，阳性信号出现增强的趋势，在其他的组织中与健康对虾组织相同，也会检出阳性信号增强的趋势，与western-blot等技术方法相比，由于经过生物素与亲和素进行信号放大之后，经过级联反应对其阳性信号会有较大的增强作用，所以即使健康对虾各个组织也会有一定的阳性信号出现。

## 小结：

本章实验通过免疫组化技术利用鼠抗ALF-AVK重组蛋白对凡纳滨对虾的血细胞、鳃、心脏、肠道以及肝胰腺5个组织中的ALF蛋白进行了定位，最终实验结果与之前报道的其他种类的ALF定位结果基本一致，都推测认为ALF主要表达器官是血淋巴中的血细胞，并随着血细胞在机体内的开管式循环流动到机体的几个主要功能器官中，这样可能更有利于控制和防止病原体在机体内的传播和扩散。

总**结**

本论文扩增并鉴定了凡纳滨对虾中抗脂多糖因子一种新的亚型，并根据其氨

基酸序列中所特有的Al（a

A）-Va(l

V）-Ly(s

K）三个氨基酸残基而命名为ALF-AVK

基因序列。对该基因的组织表达差异性以及病原体感染之后血细胞表达水平进行了分析。原核重组表达了该基因并制作了多克隆抗体，研究了重组蛋白与鳗弧菌的体外结合活性以及体内中和活性，并对凡纳滨对虾体内ALF进行了组织定位。具体总结如下：

1.从凡纳滨对虾血细胞中通过RACE技术克隆得到了一个抗脂多糖因子

（*ALF-AVK*）cDNA 的全场序列，其全长为705bp，包含一个可以编码122个氨基酸残基的大小为369bp的ORF区域。经过氨基酸序列分析发现，该种ALF含有与其他种类亚型的ALF相同的信号肽序列和经典的LPS结合部分，序列同源比对显示其与已报道的其他凡纳滨对虾的ALF相似度极高，可能是其中的一种亚型。利用qPCR分析了*ALF-AVK*基因在凡纳滨对虾6个不同组织内以及两种病原体刺激后血细胞组织中mRNA的转录情况，结果表明该目的基因在正常血细胞中表达量最高，鳃组织与心脏次之，在肌肉、肠道以及肝胰腺中表达量较低，而在鳗弧菌感染之后*ALF-AVK*基因会有一个明显的上调在下降的过程，在12h转录水平达到最高，在WSSV感染组中，目的基因在最初阶段有短暂的上调趋势，而之后很快下降，随着WSSV的复制增殖，又会出现一个上调趋势，结果表明*ALF-AVK*不仅会在革兰氏阴性菌侵染机体的过程中产生作用，而且可能与

WSSV等病毒感染后的免疫防御反应相关。

2.利用pET-30（a）作为原核表达质粒载体，对ALF-AVK蛋白进行了原核表达、纯化以给复性，并在此基础上，免疫小鼠，制备了鼠源的重组蛋白多克隆抗体。 用ELISA的方法检测了该多抗与抗原重组蛋白的结合效价，确定了抗体血清最适合的稀释倍数。利用免疫印迹实验验证了多抗血清对ALF-AVK重组蛋白的结合作用，同时，也对多抗血清与血细胞自然表达的ALF-AVK蛋白之间的识别结合进行了验证。

3.通过蛋白-细菌结合沉淀和ELISA两个实验方法来对ALF-AVK重组蛋白的鳗弧菌结合活性进行了检测，ELISA实验结果表明随着重组蛋白浓度的增加，底物发色的吸光值也会增加，而蛋白-细菌结合沉淀实验也检测到ALF-AVK蛋白可

以与鳗弧菌结合后被离心沉淀，说明其可以与鳗弧菌确实存在结合活性，原核表达和蛋白复性是成功的。WSSV和鳗弧菌与重组蛋白孵育之后的体内中和实验结果说明ALF对于WSSV可能并没有结合作用，而对于鳗弧菌入侵时的抵御和清除作用可能需要除了ALF之外的其他免疫因子的协同作用。

4.通过免疫组化技术对凡纳滨对虾的血细胞、鳃、心脏、肠道以及肝胰腺5个组织中的ALF蛋白进行了定位，最终实验结果与之前报道的其他种类的ALF定位结果基本一致，推测认为血细胞是ALF主要表达器官，随着血细胞在机体内以开管式进行流动渗透到机体的主要功能器官中，更有利于控制和防止病原体在机体内的传播扩散，并可以使ALF等抗菌肽类快速到达病灶出现部位。

参考文献

[1]. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389-402.

[2]. Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeusmonodon*. Mol. Immunol, 2008, 45: 1085-1093.

[3]. Aketagawa, J., Miyata, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Morita, T., Hayashida, H., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., Shimonishi, Y. Primary structure of *limulus* anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. J. Biol. Chem, 1986, 261: 7357-7365.

[4]. Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquaculture, 1995, 132: 17-32.

[5]. Bangrak, P., P. Graidist, W. Chotigeat, K. Supamattaya, and A. Phongdara. A syntenin-like protein with postsynaptic density protein (PDZ) domains produced by black tiger shrimp *Penaeusmonodon* in response to white spot syndrome virus infection. Dis. Aquat. Org, 2002, 49: 19-25.

[6]. Bartlett TC, Cuthbert son BJ, Shepard EF, Chapman RW, Gross PS, War GW. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeusvannamei*and *Litopenaeussetiferus*. Mar Biotechnol, 2002; 4: 278-293.

[7]. Bauchau AG. Crustaceans. In: Ratcliffe NA and Rowley AF (Eds.), Invertebrate Blood Cells. Academic Press, New York 1980: 385-420.

[8]. Bauchau AG. Crustaceans. In: Ratcliffe N. A. and Rowley, A. F. (editors). Invertebrate blood cells. Academic Press, London and New York 1981; pp. 385-420.

[9]. Beale KM, Towle DW, Jayasundara N, Smith CM, Shields JD, Small HJ, et al. Anti-lipopolysaccharide factors in the American lobster Homarus americanus: molecular characterization and transcriptional response to Vibrio fluvialis challenge. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2008, 3: 263-269.

[10]. Beale KM, Towle DW, Jayasundara N, Smith CM, Shields JD, Small HJ, et al. Anti-lipopolysaccharide factors in the American lobster Homarus americanus: Molecular

Characterization and transcriptional response to Vibrio fluvialis challenge. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2008, 3(4):263-69.

[11]. Bobek I A, Situ H. MUC7 20-Mer: Investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(2): 643-652.

[12]. Bonami J R, Hasson K W, Mari J, et al. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent [J]. J Gen Virol, 1997, 78: 313319.

[13]. Cerenius. L, Sodethall. K. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. Immunol, 2004. Rev. 198, 72--82.

[14]. Bohm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, et al. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus Glomus mosseae and monitoring of Phytophthora infestans and Phytophthora citricola in their respective host plants. JPhytopathol, 1999, 147: 409-416.

[15]. Choe, K. M., Wemer, T., Stoven, S., Hultark, D., Anderson, K. V. Requirement for a PePtidoglycan recognition Protein (PGRP) in relish aetivation and antibaeterial immune responses in *Drosophila*. Science 296, 2002, 359-362.

[16]. Christie AE, Rus S, Goiney CC, Smith C, Towle DW, Dickinson PS. Identification and characterization of a cDNA encoding a crustin-like putative antibacterial protein from the American lobster Homarus americanus, Mol Immunol 2007; 44: 3333-333.

[17]. Cominetti MR, Marques MRF, Lorenzini DM, Lofgren SE, Daffre S, Barracco MA. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp Litopenaeus schmitti. Developmental and Comparative Immunology, 2002; 26: 715-721.

[18]. Cong M, Song L, Wang L, Zhao J, Qiu L, Li L, et al.. The enhanced immune protection of Zhikong scallop Chlamys farreri on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008, 151(2): 191-196.

[19]. Cuthbertson B J, Shepard E F, Chapman R W, et al. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species [J]. Immunogenetics, 2002, 54: 442-445.

[20]. Destoumieux D, Bulet Plow D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachere E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp Penaeus vannamei (Decapoda). The Journal of Biological Chemistry, 1997; 272: 28398-406.

[21]. Destoumieux D, Mueoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, Comps M, Bachère E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released aftermicrobial challenge. Journal of Cell Science, 2000; 113: 461-469.

[22]. Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. Annual Review of Cell Biology, 2003; 9(1): 237-64.

[23]. Dhar, A. K., A. Dettori, M. M. Roux, K. R. Klimpel, and B. Read. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays. Arch, 2003, 148: 2381-2396.

[24]. Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. The journal of Biological Chemistry, 1988; 263(20): 9557-60.

[25]. Dubovskiy IM, Krukova NA, Glupov VV. Phagocytic activity and encapsulation rate of Galleria mellonella larval haemocytes during bacterial infection by Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology, 2008; 98(3): 360-62.

[26]. Du Z Q, Ren Q, Zhao X F, et al. A double WAP domain (DWD) -containing protein with proteinase inhibitory activity in Chinese white shrimp, Fenneropenaeus chinensis [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2009, 154(2): 203-210.

[27]. Durand, S. V, Lightner, D. V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. J. Fish Dis, 2002, 25: 381-389.

[28]. Dong B, Xiang J. Discovery of genes involved in defense/immunity functions in a haemocytes cDNA library from Fenneropenaeus chinensis by ESTs annotation. Aquacultur, 2007, 272: 208-215.

[29]. de la Vega E, García-Galaz A, Díaz-Cinco ME, Sotelo-Mundo RR.. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: Vibrio alginolyticus, Vibrio parahemolyticus, and Vibrio cholerae. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 405-408.

[30]. de la Vega E, O'Leary NA, Shockey JE, Robalino J, Payne C, Browdy CL, et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. Mol. Immunol, 2008, 45: 1916-1925.

[31]. Epand R M, Vogel H J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action [J] Biochem B iophys Acta, 1999, 1462(122): 112281.

[32]. Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide prime. Proc Nat AcadSci USA, 1988, 85: 8998～9002.

[33]. Gai Y, Zhao J, Song L, Li C, Zheng P, Qiu L, et al. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab Eriocheir sinensis: Gene cloning, expression and activity analysis. Fish Shellfish Immunol, 2008; 24: 156-16.

[34]. Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W., Warr, G. W. Immune gene discovery by

[35]. expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. Dev. Comp. Immunol, 2001, 25: 565-577.

[36]. Hashimoto, C. Hudson, K. L, Anderson, K. V. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal- ventral embryonic polarity, appear stoencodea trans membrane protein. Cell52(2), 1988, 269-279.

[37]. Jiang H and Kanost MR. Characterization and functional analysis of twelve naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from Manduca sexta. The Journal of Biological Chemistry, 1997; 272: 1082-1087.

[38]. He, N., Q. Qin, and X. Xu. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeusjaponicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. Antivir. Res, 2005, 66: 39-45.

[39]. Hongming Ma, Bing Wang, Jiquan Zhang, Fuhua Li, Jianhai Xiang. Multiple forms of alpha-2 macroglobulin in shrimp Fenneropenaeus chinesis and their transcriptional response to WSSV or Vibrio pathogen infection. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34: 677–684.

[40]. Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R., Liddington, R.. Crystalstructureofan endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor at 1.5Aresolution. EMBO J, 1993, 12: 3351-3356.

[41]. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Valdes A, et al. Quantitative detection of

Hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. J Viral Hepat, 2001,8:465-471.

[42]. Johansson MW, Soderhall K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today, 1989; 5(6): 171-76.

[43]. Jory DE and Dixon HM. Shrimp white spot virus in the Western Hemisphere. Aquaculture, 1999; 25: 83-89.

[44]. Jiravanichpaisal P, Lee SY, Kim Y-A, Andrén T, Soderhell I. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish Pacifastacus leniusculus: characterization and expression pattern. Dev Comp Immunol, 2007; 31: 441-455.

[45]. Jiravanichpaisal P. White spot syndrome virus interaction with freshwater crayfish. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations fromthe Faculty of Sciences and Technology, 2005, 47: 1-58.

[46]. Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia G, Soderhell K, Vargas-Albores F. A singleWAP domain-containing protein from Litopenaeus vannamei hemocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2004; 314: 681-687.

[47]. Kang C J, Wang J X, Zhao X F, et al. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin,

[48]. an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, Fenneropenaeus chinensis [J]. Fish Shellfish 49. Immunol, 2004, 16: 513–525.

[50]. Kim, C. S., Kosuke, Z., Nam, Y. K., Kim, S. K., Kim, K. H. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 242–246.

[51]. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J. et al. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. Nature, 1990, 343: 531-535.

[52]. Kunlaya Somboonwiwata, Evelyne Bachereb, Vichien Rimphanitchayakita, Anchalee Tassanakajona, Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, Penaeus monodon, and characterization of its binding properties. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32, 1170–1176.

[53]. Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB. Invertebrate immune systems–not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev, 2004, 198: 10-24.

[54]. Lin, Y. C, Vaseeharan, B, KO, C. F, Chiou, T. T, Chen, J. C. Moleeular cloning and eharaeterisation of a Protease inhibitor, alPha2-macroglobulin (alPha2-M) from the haemocytes of tigers *Penaeusmonodon*. Mol. Lmmunol, 2007, 44(6), 1065-1074.

[55]. Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 3: Viruses, World Aquaculture Society． Baton Rouge, Louisiana, 1996, USA.

[56]. Lightner D V, Jone L S, and Ware G W. Proceedings of the Taura Syndrome Workshop. 1994, Exxecutive summary, submitted reports, and transcribed notes.

[57]. Lightner D V, Redman R M, Hasson K W, et al. Taura Syndrome in Penaeus vannamei histropathology and ultrastiucture [J]. Dis Aquat Organ, 1995, 21: 53-59.

[58]. Liu Y, Liu C, Li F H, Dong B, Xiang J H. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Mar. Biotechnol, 2005, 7: 600-608.

[59]. Liu F, Liu Y, Li F, Dong B, Xiang J. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeuschinensis*). Mar Biotechnol, 2005, 7: 600-608.

[60]. Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Soderhall, I., Cerenius, L., Soderhall, K.

Anti-lipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *invitro*

And *invivo*in the crayfish *Pacifastacusleniusculus*. J. Virol, 2006, 80: 10365–10371.

[61]. Liu YC, Li FH, Dong B, Wang B, Luan W, Zhang XJ, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 598-607.

[62]. Liu H, Söderhäll K, Jiravanichpaisal P. Antiviral immunity in crustaceans. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 79-88.

[63]. Li C, Zhao J, Song L, Mu C, Zhang H, Gai Y, et al. Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of an antilipopolysaccharide factor from Chinese mitten crab Eriocheir sinensis. Dev Comp Immunol, 2008, 32: 784-794.

[64]. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-△△CT method. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[65]. Lo C. F, Ho C-H, peng S. E, Chen C. H, Hsu H. C, Chiu Y. L, et al. White spot syndrome

Baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 27:215-25.

[66]. Luo T, Li F, Lei K, Xu X.. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeusmonodon*. Mol Immunol, 2007, 44: 1516-1523.

[67]. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell, 1997; 91(3): 295-98.

[68]. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Current Opinion in Immunology, 1997; 9(1): 4-9.

[69]. Mengqiang Wang, Jialong Yang, Zhi Zhou, Limei Qiu, Lingling Wang, Huan Zhang, Yang Gao, Xingqiang Wang, Li Zhang, Jianmin Zhao, Linsheng Song, A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop Chlamys farreri. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35, 511–520.

[70]. Millar DA and Ratcliffe NA. Invertebrates. In: Turner RJ(editor). Immunology, a Comparative approach. John Wiley& Sons Ltd, England 1994; pp. 29-68.

[71]. Michel, T., Reichhart, J-M., Hoffinann, J. A., Royet, J. *Drosophila* Toll is Activated by Gram-Positive bacteria through a cireulating peptidogly can recognition Protein. Nature, 2001, 414, 756-759.

[72]. Munoz M, Cedeno R, Rodriguez J, Van der Knaap WPW, Mialhe E and Bachère E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeusvannamei*. Aquaculture, 2000; 191: 89-107.

[73]. Munoz M, Vandenbulcke F, Garnier J, Gueguen Y, Bulet P, Saulnier D, et al. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp Litopenaeus stylirostris to a pathogenic Vibrio. Cell Mol Life Sci, 2004, 61: 961–72.

[74]. Muta, T., Miyata, T., Tokunaga, F., Nakamura, T., Iwanaga, S. Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limuluspolyphemus*. J. Biochem, 1987, 101: 1321-1330.

[75]. Nagoshi H, Inagawa H, Morii K, Harada H, Kohchi C, Nishizawa T, et al. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeusjaponicus*. Mol Immunol, 2006,, 43: 2061-9.

[76]. OIE Fish Disease Commission. International Aquatic Animal Health Code. 5Th ed. Office International des Epizooties, 2002.

[77]. Oren, Lerman, J. C., Gudmundsson, GH., Agerberth, B., Shai, Y. Strueture and organization of the human antimierobial peptide LL-37 in phospholipids Membranes: relevance to the moleeular basis for its non-eell-seleetive aetivity. Biochem, 1999, 341 (Pt3) 501-513.

[78]. Overstreet, R M, Cightner, D V, Hassan, K W, et al. Susceptibility to Taura Syndrome Virus of Some Penaeid Shrimp Species Native to the Gutf of Mexico and the Southeastern United States [J]. J Invert Path, 1997, 69: I65-I76.

[79]. Pace KE, Lebestky T, Hummel T, Arnoux P, Kwan K, Baum LG. Characterization of a novel Drosophila melanogaster galectin. The Journal of Biological Chemistry, 2002; 277(15): 13091-98.

[80]. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S, Scavenger receptors in innate immunity. Curr. Opin. Lmmuno, 2002, 14: 123-128.

[81]. Pouny, Y, RaPaPort, D., Mor, A., Nieolas, R, Shai, Y. Interaetion of Antimierobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. Biochemistry, 1992, 31, 12416-12423.

[82]. Rosenthal, R. S., Dziarski, R.. Isolation of peptidoglyean and soluble peptidogiycan fraglnents. Meth. Enzylnol, 1994, 235, 253-285.

[83]. Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF, et al. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Tissue-specific expression profiles andtranscriptomic responses to immune challenge. Physiol. Genomics, 2007, 29: 44-56.

[84]. Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samplesby real-time PCR. J Appl Microbio, 2004, 97: 1166-1177.

[85]. Shai, Y. Meehanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayermembranes by alpha-helieal antimierobial and cell Non-seleetive membrane-lytie peptides. Bioehim Biophys Aeta, 1999, 1462, 55-70.

[86]. Smith V J, Chisholm J R. Antimicrobial proteins in crustaceans [J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 484: 95-112.

[87]. Soderhall K and Cerenius L. Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases 1992;

2:3-23.

[88]. Song YL and Hsieh YT. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology, 1994; 18: 201-209.

[89]. Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G., Bachere, E. Recombinant expression and anti-microbial activity of antilipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeusmonodon*. Dev. Comp. Immunol, 2005, 29, 841-851.

[90]. Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeusmonodon* using the EST approach. Dis Aquat Org, 2004; 6: 123-135.

[91]. Tan, L. T., Soon, S., Lee, K. L., Shariff, M., Hassan, M. D., Omar, A. R. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeusmonodon* Fabricus using competitive polymerase chain reaction. J. Fish. Dis, 2001, 24: 315-323.

[92]. Tanaka S, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of Limulus coagulation system. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 105: 717-23.

[93]. Tharntada S, Somboonwiwat K, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A. Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeusmonodon*, are encoded by two genomic loci. Fish Shellfish Immunol, 200824: 46-54.

[94]. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol, 2007, 24: 1596-1599.

[95]. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T., Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res, 1994, 22: 4673-4680.

[96]. Tyagi, A., Khushiramani, R., Karunasagar, I. Antivibrio activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeusmonodon*. Aquaculture, 2007, 272: 246-253.

[97]. Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G, Jimeénez-Vega F, Avila-Villa A. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2004; 138: 415-422.

[98]. Wang R, Lee SY, Cerenius L. Soderhall K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, Pacifastacus leniusculus. Eur J Biochem, 2001; 268: 895-902.

[99]. Wang D, Liu C, Liu J, He Z, Zhang W, Wu X. The native gene of anti-LPS factor from *Tachypleus tridentatus*: cloning, expression and its bacteriostatic activity in vitro. Protein Pept Lett, 2001, 8: 273-80.

[100]. Xiaoqian Tang, Xiaolu Wang, Wenbin Zhan, An integrinβsubunit of Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis involved in WSSV infection. Aquaculture, 2012, 368-369 1–9.

[101]. Yoshida, H., Kinoshita, K., Ashida, M. Putification of a peptidoglyean Reeognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyxmori.* J. Biol, 1996. Chem. 271(23), 13854-13860.

[102]. Xiaojie Wang, Wenbin Zhan. Development of an immunochromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. Aquaculture, 2006, 255: 196-200.

[103]. Yu XQ, hu YF, a C, abrick JA, anost MR. Attern recognition proteins in Manduca sexta plasma. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002; 32(10): 1287-93.

[104]. Yedery RD, Reddy KVR. Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, Scylla serrata. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 275-84.

[105]. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987, 84 (15): 5449-5453.

[106]. Zhang Y, Wang L, Wang L, Yang J, Gai Y, Qiu L, Song L. The second anti-lipopolysaccharide factor (EsALF-2) with antimicrobial activity from Eriocheir sinensis. Dev Comp Immunol, 2010, 34: 945-952.

[107]. Zhan WB, Wang YH, John LF. White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. Journal of Aquatic Animal Health, 1998; 10: 405-410.

[108]. Zhan, W. B., Wang, X. J., Chen, J., Xing, J., Hideo, F. Elimination of shrimp endogenous alkaline phosphatase background and development of enzyme immunoassays for the detection of white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 2004, 239: 15~21.

[109]. 陈吉祥, 李彩凤, 严显辉等, 大菱鲆病原鳗弧菌生物学及分子特征研究． 高技术通讯, 2005, 15(6): 372-375．

[110]. 蔡生力, 黄倢, 王崇明, 等． 1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究． 水产学报, 1995, 19(2): 112-119．

[111]. 曹剑香, 简纪常, 吴灶和． 虾类体液免疫研究进展[J]． 湛江海洋大学学报, 2006, 26(1): 89-92．

[112]. 郭振宇． 中国对虾免疫相关分子抗菌肽和热休克蛋白的研究[D]． 南京: 中国科学院研究生院, 2002．

[113]. 何建国, 周化民, 姚伯, 等． 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类． 中ft大学学 报（自然科学版）, 1999, 38（2）: 65-69．

[114]. 黄倢, 于佳, 宋晓玲, 等． 1994年对虾暴发性流行病病原及传播途径的初步调查． 海洋水产研究, 1995, 16(1): 91-97．

[115]. 姜珊, 刘梅, 王宝杰, 蒋克勇, 王雷． 大肠杆菌表达抗脂多糖因子的发酵条件优化[J]． 中国农业科技导报, 2011, 13（4）: 128-134．

[116]. 柳峰松． 中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis)抗菌因子及模式识别蛋白的研究[D]． 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005．

[117]. 李婷． 中国明对虾抗脂多糖因子（*ALFFc*）基因的重组表达[D]． 河北: 河北大学, 2010．

[118]. 刘媛． 三疣梭子蟹(Portunus trituberculatus) cDNA文库构建、EST分析及抗脂多糖因子研究[D]． 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011．

[119]. 卢君辉． 中国明对虾血蓝蛋白的组织分布特点及白斑症病毒感染后血蓝蛋白含量的变化[D]． 青岛: 中国海洋大学, 2012．

[120]. 李光友, 王青． 中国明对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591-597.

[121]. 饶辉． 抗菌肽的研究现状及其在家禽生产中的应用前景[J] ． 浙江畜牧兽医, 2008, 6: 7-8．

[122]. 宋晓玲, 史成银, 黄倢, 等． 用DNA斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查, 2001． 中国水产科学, 8: 36-40．

[123]. 孙杰． 中国明对虾（Fenneropenaeus chinensis）几种免疫相关因子的分离纯化、基因克隆及相互关系研究[D]． 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009．

[124]. 唐小千． 中国对虾白斑症病毒（WSSV）血细胞受体蛋白的研究[D]． 青岛: 中国海洋大学, 2010．

[125]. 徐红伟, 臧荣鑫, 马小明． 抗菌肽及其在动物营养学中的应用[J]． 西北民族大学学报(自 然科学版), 2007, 28(68): 60-64．

[126]. 王海静, 王福生, 边艳青, 赵宝华． 水产动物基因工程抗菌肽及其应用前景的研究．水 生态学杂志． 2009; 2: 100-10．

[127]. 王广军, 谢骏, 余德光． 抗菌蛋白在南美白对虾养殖中的应用试验． 饲料工业, 2005; 26: 33-34．

[128]. 王金星, 赵小凡． 无脊椎动物先天免疫模式识别受体研究进展． 生物化学与生物物

[129]. 理进展, 2004; 31: 112-17．

[130]. 王明昌, 侯林, 董长永, 等． 动物抗菌肽的研究进展[J] 安徽农学通报, 2008, 14(5): 25-27．

[131]. 薛清刚, 张学雷, 王雷, 等． 虾、贝类免疫反应基础及作用. 相建海主编: 海水养殖生物病害发生与控制[M]． 青岛: 海洋出版社, 2001．

[132]. 杨昌健． 中国明对虾Toll样受体基因的克隆和表达分析[D]． 青岛: 中国科学院海洋研究所,

[133]. 周文杰． 中国明对虾抗脂多糖因子基因克隆及其在大肠杆菌中的重组表达[D]． 济南: ft东大学硕士论文, 2007: 15: 43-44．

[134]. 张新中, 张世秀, 李海平, 谢珍玉, 周永灿． 海水养殖动物致病性(Pathogenicity)鳗弧菌(Vibro anguillarum)的研究综述[J]． 现代渔业信息, 2007．

致 谢

本论文在导师战文斌教授的悉心指导下完成，由衷地感谢我的导师战文斌教授五年来对我的培养，进入实验室五年来不论是实验的每个细节，撰写文章的每个字句，生活中的每个问题战老师都在将他人生的哲理融入其中教给我们。战老师渊博的知识，敏捷的学术思维，深邃的人生思想和灵活解决实际问题的处世方法都是非常另人敬佩和值得学习的。感谢战老师为我们创造的优越的实验条件、宽松的实验氛围，使我能够毫无后顾之忧地进行科研工作。战老师在这五年中给我们的每一句话，每一次教诲我都会当做一把的标尺，走好人生的每一步。

感谢周丽老师、绳秀珍老师和邢婧老师在我实验和生活过程中给予我的关心和帮助，他们是难得的良师益友，在五年的陪伴中，他们的支持和鼓励让我感受到了实验室的亲情和温暖。特别感谢唐小千老师，我实验中的好老师，我生活中的好兄弟，这五年来是他帮我度过每个难关。

感谢已经毕业的韦秀梅师姐和迟妍妍同学在我实验中所给予的无私的指导和帮助！感谢实验室钟汝杰、谈艳苗、冯继兴、张伟、陈孔茂、李微、吴荣华、张冬冬、丁冰洁、陈书伟、赵建梅以及各位师弟师妹们这五年来的陪伴，关心和帮助，是你们让我的实验生活不再枯燥，是你们让我的青春如此绚烂，如此精彩， 和你们在实验室度过的每个日夜都将成为我人生最美好的回忆和最宝贵的财富。

衷心感谢我的家人，感谢你们为我付出的心血和关爱，你们一直是我在人生中不断前行的坚实后盾和动力。感谢我的女友丁弘叶，感谢与你相识这九年来的陪伴、鼓励和无微不至的关怀。

最后衷心感谢所有关心和帮助过我的人们，谢谢你们！

### 个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果

1985年8月25日出生于ft东省青岛市。

2004年9月考入ft东省潍坊学院生物工程学院生物科学专业，2008年本科毕业并获得理学学士学位。 2008年9月考入中国海洋大学水产学院水生生物学专业攻读博士学位至今。

Wenbin Zhan, Xiaolu Wang, Yanyan Chi, Xiaoqian Tang. The VP37-binding protein F1ATP synthaseβsubunit involved in WSSV infection in shrimp *Litopenaeus vannamei.* Fish and shellfish immunology, 2013, 34; 228-235.