学校代码： 10289

半 分 类 号 ：

滑 密 级 ：

舌

鳎 学 号 ：

HIF-1α

、

**江 苏 科 技 大 学**

Hb-α1

和

基 **博 士 学 位 论 文**

Tf

因克隆及

在 半滑舌鳎 HIF-1α、Hb-α1 和 Tf 基因克隆及

低

氧 在低氧胁迫下的表达分析

胁

迫下的表达分析

|  |  |
| --- | --- |
| 研究生姓 名 王 资 T h | 导 师 姓 名 郭锡杰 |
| 申请学位类别 畜牧学 | 学位授予单位 江 苏 科 技 大 学 |
| 学 科 专 业 特种经济动物饲养 | 论文提交日期 2011 年 12 月 15 日 |
| 研 究 方 向 鱼类分子Th物学 | 论文答辩日期 2012 年 3 月 9 日 |
| 答辩委员会主席 | 评 阅 人 |

王资Th

江苏科技大

学 2012 年 3 月 10 日

分类号：

密 级：

学 号：

农学博士学位论文

半滑舌鳎 HIF-1α、Hb-α1 和 Tf 基因克隆及在低氧胁迫下的表达分析

|  |  |
| --- | --- |
| 学Th姓名 | 王资Th |
| 指导教师 | 郭锡杰 研究员 |

江苏科技大学 二 O 一二年三月

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Agriculture

Cloning of HIF-1α, Hb-α1 and Tf from the half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and expression analysis under hypoxia

Submitted by Wang Zi Sheng

Supervised by Guo Xi Jie

Jiangsu University of Science and Technology

March, 2012

**江苏科技大学学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

年 月 日

**江苏科技大学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，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权江苏科技大学可以将本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和汇编本学位论文。

本学位论文属于：

(1)保密□，在 年解密后适用本授权书。

(2)不保密□。

学位论文作者签名： 指导教师签名：

年 月 日 年 月 日

**缩略语表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AGE | Agarose gel electrophoresis | 琼脂糖凝胶电泳 |
| AHSP | hemoglobin stabilizing protein | 血红蛋白稳定蛋白 |
| ARNT | aryl hydrocarbon nuclear translocator | 芳香烃受体核转位蛋白 |
| bHLH | basic helix-loop-helix | 碱性螺旋－环－螺旋 |
| C-TAD | carboxyl-transactivation domains | 羧基端转录激活功能域 |
| DEPC | diethyl pyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| HO | heme oxygenase | 血红素氧化酶 |
| EPO | erythropoietin | 促红细胞生成素 |
| HRE | hypoxia response element | 低氧反应元件 |
| IPAS | inhibitory PAS donmain protein | PAS 结构域抑制蛋白 |
| NEPAS | neonatal and embryonic PAS protein | 新生儿和胚胎 PAS 蛋白 |
| NJ | neighbor joining | 相邻法 |
| N-TAD | amino-transactivation domains | 氨基端转录激活功能域 |
| ODD | oxygen-dependent degradation domain | 氧依赖降解区 |
| ORF | open reading frame | 开放阅读框 |
| PAGE | polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PCR | polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| qPCR | realtime fluores-cence quantitative PCR | 实时荧光定量 PCR |
| RT-PCR | reverse transcription PCR | 逆转录 PCR |
| SDS | sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| TAD | transactivation domains | 转录激活功能域 |
| TfR | transferrin receptor | 转铁蛋白受体 |
| TNF | tumor necrosis factor | 肿瘤坏死因子 |
| TRAIL | tumor necrosis factor-related  apoptosis-inducing ligand | 凋亡诱导配体 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |

摘 要

近年来，随着沿河（海）地带的工业化和城市化进程的加快，工业和生活污水的大量排放，导致养殖水体环境不断恶化，低氧水体面积不断增加。鱼类作为水体中的主要动物群体，水体低氧对鱼类的生长和代谢及胚胎发育有明显的影响。半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是近海名贵的大中型经济鱼类，常栖息于泥沙质海底，并常常钻到泥沙里，提示半滑舌鳎有着独特的低氧适应机制。开展半滑舌鳎低氧反应分子相关基因的克隆并探讨这些基因在低氧胁迫下的反应规律，可为进一步揭示鱼类低氧适应机制提供理论基础。

本研究首先运用3′和5′RACE方法在半滑舌鳎肝脏中克隆到低氧诱导因子(Hypoxia-inducible factor, HIF) -1α、Transferrin (Tf)和haemoglobin (Hb) -α1三个基因，分别命名为CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1，这些基因cDNA全长分别为分别为3460 bp、2281 bp和594 bp；开放阅读框（ORF）长度分别为2208 bp、2034 bp和432 bp，分别编码735、677和143个氨基酸，预测分子量大小分别为82.2 kDa、74.9 kDa和16.3 kDa，理论等电点分别为5.04、6.15和8.59；其5′非翻译区长度分别为243 bp、28 bp和41 bp，

3′非翻译区长度分别为1009 bp、219 bp和121 bp. 在CsHIF-1α3′非翻译区发现5 个

mRNA 不稳定信号（attta）。在CsTf 3′非翻译区发现存在一个多聚腺苷酸加尾信号

（aataaa）和一个mRNA不稳定信号(attta). CsHb-α1的3′非翻译区发现存在一个多聚腺苷酸加尾信号(aataaa)。

分别对这三个基因编码的氨基酸序列进行结构、潜在功能位点、同源性和系统进化分析。结果显示，CsHIF-1α与其他脊椎动物的同源性在52.3-81.8%之间，与鼠(*Mus musculus*) HIF-1α(MmHIF-1α)相似性最低，为52.3%，与鲈鱼(*Perca fluviatilis*) HIF-1α(PfHIF-1α)相似性最高，为81.8%. CsHIF-1α含有保守的bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、

ODD、N-TAD和C-TAD结构域。此外，在其他物种中存在的一些重要的氨基酸位点也在CsHIF-1α中存在。CsTf与其他物种的同源性在25.2-63.3%之间，与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的TF (PoTF)最高(63.3%)，与果蝇(*Drosophila melanogaster*)的Tf (DmTf)最低(39.1%). CsHb-α1与其他脊椎动物的Hb-α1序列相似性在46.2% -

58%之间，其中与人Hb-α1相似性最低，为46.2%；与日本青鳉(*Oryzias latipes*)的Hb-α1相似性最高，为58%。系统进化分析显示CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1均与鱼类中相应的同源分子聚为一支；而鸟类、两栖类和哺乳动物的也分别与相应的同源分子聚类。上述结果证实了CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1为哺乳类HIF-1α、Tf和Hb-α1的同源物。

为了探讨上述三个基因在低氧胁迫下的反应规律，我们首先建立了半滑舌鳎

β-actin（内参）、CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1基因相对定量方法，通过融解曲线、峰

图分析，显示所建立的方法符合相对定量的要求。随后，以SYBR green I为荧光信号，检测了正常半滑舌鳎各组织HIF-1α、Tf和Hb-α1基因mRNA表达水平，研究结果显示在所检测的正常组织都能检测到这些基因的表达，表明它们在所检测组织中呈组成型表达.。CsHIF-1α和CsTf主要在肝脏中表达，CsHb-α1主要在心、肝、脾脏、肾和血液中表达。在低氧胁迫后，CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1均在不同的组织中上调表达，其中CsHIF-1α在所选取的组织中的表达具有明显的时间依赖关系(*P*<0.05)，CsTf在低氧胁迫的初期也明显上调，但当低氧胁迫90 min和120 min时，血、腮和胃中的CsTf回复到正常水平(*P*> 0.05). CsHb-α1则在心、肝、脾、肾、血、腮中的出现了明显的上调（*P*<0.05）。结果提示上述三个基因在鱼类低氧胁迫中，尤其是在低氧胁迫的初期具有重要的作用。

最后，应用原核表达系统pET30a构建pET30a-CsHIF1α表达载体，转化宿主菌BL21，在IPTG诱导下表达并纯化了CsHIF-1α融合蛋白，通过将CsHIF1α融合蛋白免疫日本大耳白兔，制备了兔抗CsHIF-1α多克隆抗体，通过Western blotting检测了抗体的特异性，为进一步研究CsHIF-1α的生物学功能奠定了基础。

**关键词：**半滑舌鳎； HIF-1α； Tf； Hb-α1；基因克隆；低氧胁迫；基因表达

Abstract

Abstract

With the increased industrialization and urbanization of coastal zones in recent years, there have been increased discharges of domestic, agricultural and industrial wastes, and aquatic hypoxia has become more widespread. The fish was the main habitats in water, its metabolism, growth and reproductive development was significantly affected by aquatic hypoxia. The half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), a kind of economical fish lives in the offshore, often inhabits in the sandy seabed which suggest this species possesses special hypoxia-adapting mechanism. The research on the molecular response under hypoxia in fish will provide the basis for further study of the mechanism of hypoxia adapting.

In present study, the full-length cDNA of CsHIF-1α, CsTf and CsHb-α1 were first cloned from liver of half-smooth tongue sole using 3'and 5' RACE method and their full length were 3460 bp, 2281 bp and 594 bp, with putative open reading frame (ORF) of 2208

Bp, 2034 bp and 432 bp encoding 735、677and 143 amino acids respectively. The

5'-untranslated regions (UTR) for those genes were 243 bp、28 bp and 41 bp, and the 3′-UTR were 1009 bp, 219 bp and 121 bp, respectively. The 3′-UTR of CsHIF-1αpossessed five mRNA instability motifs (attta). The 3′-UTR of CsTf possessed one polyadenylation signal (aataaa) and one mRNA instability motifs (attta) and CsHb-α1 only possessed one polyadenylation signal (aataaa) at 3′-UTR. The predicted molecular weight of the putative CsHIF-1α, CsTf and CsHb-α1 protein were 82.2 kDa, 74.9 kDa and 16.3 kDa, and their predicted theoretic isoelectric point are 5.04, 6.15 and 8.59, respectively. The analysis of structure, putative functional sites and identities with their counterparts in other vertebrates showed CsHIF-1α shared 52.3-81.8% with other species HIF-1α, the lowest with *Mus musculus* HIF-1αfor 52.3% and the highest with *Perca fluviatilis* HIF-1αfor 81.8%. The CsHIF-1αalso possessed the conserved bHLH, PAS-A, PAS-B, PAC, ODD, N-TAD and C-TAD motif. Meanwhile, the conserved functional sites found in other species were also found in CsHIF-1α. CsTf shared 25.2-63.3% identities with other Tf, with the highest with *Paralichthys olivaceus* Tf for 63.3% and the lowest with *Drosophila melanogaster* Tf for 25.2%. CsHb-α1 shared 46.2% -58% identities with other Hb-α1, with the lowest with human Hb-α1 for 46.2% and the highest with *Oryzias latipes* Hb-α1 for 58%. Phylogenetic analysis showed that the cloned genes mentioned above, were clustered with their picine homologues, and the genes in birds, amphibians and mammals were clustered with their

Counterparts, respcectively. Those results further confirm that CsHIF-1α, CsTf and CsHb-α1 were the mammalian homologues.

After analyzing the molecular characteristics of CsHIF-1α, CsTf and CsHb-α1, we further investigated these genes' expression patterns under normoxia and hypoxia. We established a relative quantification qPCR method for investigating Csβ-actin (internal reference), CsHIF-1α, CsTf and CsHb-α1 gene mRNA expression. The melting curves and melting peaks analysis showed the qPCR method consistent with the quantitative requirements. Using this qPCR method (SYBR green I as the fluorescence signal), we found that these genes were expressed in all tested tissues, indicating that they were constitutive expressions. CsHIF-1αand CsTf were mainly expressed in the liver, and CsHb-α1 was mainly expressed in the heart, liver, spleen, head kidney and blood. Under hypoxia, CsHIF-1α, CsTf and CsHb-α1 were up-regulated in different tissues. CsHIF-1α was up-regulated and exerted a time related relation (*P*<0.05). During the early stage of hypoxia, CsTf was also up-regulated, while as the time prolong to 90 min and 120 min, the CsTf in blood, gill and stomach were back to the normal expression level (*P*> 0.05). CsHb-α1 was also up-regulated in heart, liver, spleen, head kidney, blood and gill (*P*<0.05). Our results indicated that those genes play an important role under hypoxia, especially at the early stage of hypoxia.

Finally, we used prokaryotic expression system pET30a to constructe the pET30a-CsHIF1αexpression plasmid and transformed into host *E. coli* BL21. The fusion protein of CsHIF-1αwas expressed and purified after IPTG induction. Then the anti-CsHIF1αpoly-antibody was prepared by immunizations to rabbit. The specificity was analyzed using western blot method. The resulst showed that there was specific band at the theoretical site, indicating the poly-antibody had good Ag-Ab reaction. These will facilitate our further research for CsHIF-1αfucntion.

**KEY WORDS**: *Cynoglossus semilaevis*; HIF-1α; Tf; Hb-α1; Gene clone; Hypoxia; Gene expression

目 录

[摘 要](#_Toc686823342) 6

[Abstract](#_Toc686823343) 6

[Abstract](#_Toc686823344) 6

[第一章 绪 论](#_Toc686823345) 8

[1 水体低氧](#_Toc686823346) 8

[2 低氧诱导因子家族成员](#_Toc686823347) 8

[2.1 HIF-1](#_Toc686823348) 9

[2.2 HIF-2](#_Toc686823349) 10

[2.3 HIF-3](#_Toc686823350) 10

[2.4 鱼类HIFs家族成员](#_Toc686823351) 10

[3 转铁蛋白](#_Toc686823352) 10

[3.1 Tf的理化性质和结构](#_Toc686823353) 10

[3.2 Tf循环及Tf受体](#_Toc686823354) 11

[3.3 Tf Th理功能](#_Toc686823355) 11

[4 球蛋白](#_Toc686823356) 11

[4.1 球蛋白的组织分布与定位](#_Toc686823357) 11

[4.2 球蛋白的结构特征与Th物学功能](#_Toc686823358) 11

[5 本课题的研究内容](#_Toc686823359) 11

[6 本课题的目的及意义](#_Toc686823360) 12

[第二章 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因的克隆与序列分析](#_Toc686823361) 12

[1 前言](#_Toc686823362) 12

[2 材料与方法](#_Toc686823363) 12

[2.1 主要仪器](#_Toc686823364) 12

[2.2 主要试剂](#_Toc686823365) 12

[2.3 载体、菌株和实验鱼](#_Toc686823366) 12

[2.4 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-1α全长cDNA的获得](#_Toc686823367) 13

[2.5 Th物信息学分析](#_Toc686823368) 15

[3 结果](#_Toc686823369) 17

[3.1 总RNA质量检测](#_Toc686823370) 17

[3.2 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因中间片段的扩增](#_Toc686823371) 18

[3.3 3′RACE-PCR扩增结果](#_Toc686823372) 18

[3.4 5′RACE-PCR扩增结果](#_Toc686823373) 18

[3.5 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因全长cDNA序列及氨基酸特征](#_Toc686823374) 18

[3.6 系统进化分析](#_Toc686823375) 26

[4 讨论](#_Toc686823376) 27

[第三章 低氧胁迫下半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1表达分析](#_Toc686823377) 28

[1 前言](#_Toc686823378) 28

[2 材料与方法](#_Toc686823379) 28

[2.1 主要仪器](#_Toc686823380) 28

[2.2 主要试剂与菌种](#_Toc686823381) 28

[2.3 半滑舌鳎耗氧率和窒息点的检测](#_Toc686823382) 28

[2.4 半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α1荧光定量检测方法的建立](#_Toc686823383) 28

[3 结果](#_Toc686823384) 31

[3.1 半滑舌鳎耗氧率和窒息点的研究](#_Toc686823385) 31

[3.2 建立半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α和β-actin标准曲线的结果](#_Toc686823386) 32

[3.3 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1在正常组织中的分布](#_Toc686823387) 34

[3.4 低氧胁迫后半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1表达变化](#_Toc686823388) 35

[5 min](#_Toc686823389) 36

[\*](#_Toc686823389)

[\* \*](#_Toc686823389)

[\*](#_Toc686823389)

[\*](#_Toc686823389)

[\*](#_Toc686823389)

[4 讨论](#_Toc686823390) 36

[第四章 半滑舌鳎HIF-1α基因的原核表达与多克隆抗体的制备](#_Toc686823391) 37

[1 前言](#_Toc686823392) 37

[2 材料与方法](#_Toc686823393) 37

[2.1 仪器设备](#_Toc686823394) 37

[2.2 实验试剂](#_Toc686823395) 37

[2.3 感受态细胞的制备](#_Toc686823396) 37

[2.4](#_Toc686823397) **[CsHI](#_Toc686823397)**[F-1α](#_Toc686823397)**[cDNA](#_Toc686823397)**[表达载体的构建](#_Toc686823397) 37

[2.5 重组蛋白的诱导表达](#_Toc686823398) 37

[2.6 SDS-PAGE电泳](#_Toc686823399) 37

[2.7 目的蛋白的纯化](#_Toc686823400) 38

[2.8 兔抗CsHIF-1α多克隆抗体的制备](#_Toc686823401) 38

[2.9 免疫印迹检测表达的蛋白](#_Toc686823402) 38

[3 结果](#_Toc686823403) 38

[3.1 CsHIF-1α基因的扩增与克隆](#_Toc686823404) 38

[3.2 原核表达载体的构建](#_Toc686823405) 39

[3.3 重组蛋白的诱导表达](#_Toc686823406) 39

[3.4 重组蛋白的Western blot分析](#_Toc686823407) 39

[4 讨论](#_Toc686823408) 40

[结论](#_Toc686823409) 40

[参考文献](#_Toc686823410) 40

# 第一章 绪 论

近年来，随着沿河（海）地带的工业化和城市化进程的加快，工业和生活污水的大量排放，以及水产养殖业集约化程度的提高，导致养殖水体环境不断恶化，低氧问题日益突出。此外，由于水体中的溶氧量（仅是相同体积空气中的1/30）和溶氧扩散率较低，因此水体低氧比较容易发生并对整个水体生态系统造成较大的影响[1, 2]。

鱼类作为水体中的主要动物群体，水体中溶氧浓度的大幅度变化，对鱼类的生长和进化有明显的影响。水中溶解氧减少可导致鱼类摄食量减少，生长速度减慢，生殖力下降，甚至死亡[3]。鱼类已成为研究低氧适应的细胞和分子机制的理想模型[4]。研究显示，鱼类在长期进化的过程中获得了许多抵抗低氧的适应机制。鱼类可通过增强氧的运送能力、降低能量消耗、保证能量供应和提高免疫力来对低氧产生适应性反应[2]。但有关鱼类低氧反应基因的克隆及其表达调控机制等方面的研究还相对较少，对产生低氧反应的分子机理还缺乏了解。

## 1 水体低氧

水体低氧（Aquatic hypoxia）是指水体中的溶解氧低于2.8mg/L [1]。由于水体中的溶氧量和溶氧扩散率较低，因此水体低氧比较容易发生并对整个水体生态系统造成较大的影响[1, 2]。自然和人为因素是引起水体低氧的主要原因。自然原因主要是由于水体盐度和温度的垂直分布所造成的。此外，生活在因潮汐而产生的浅水中的一些高耗氧生物如珊瑚也能够造成水体低氧[5]。由于生物的高呼吸率、有机物质的迅速积累和水体表面厚厚的植物导致热带的淡水更容易发生低氧[6]。另外，由于深水阳光照射的有限性而导致光合作用产生的氧气不足以弥补生物体代谢所消耗的氧气，进而导致深水缺氧[7-10]。

近年来，随着沿河（海）地带的工业化和城市化进程的加快，工业和生活污水的大量排放，以及水产养殖业集约化程度的提高，导致养殖水体环境不断恶化，低氧问题日益突出。高磷、高氮等有机物质的大量排放造成了水体富营养化，进而加剧了蓝藻、水体大型植物和其他微生物的生长[11]。我国ft东省青岛市曾于在2008年的5月到7月间发生了一次面积约13000~30000 km2的水体蓝藻爆发事件。这次事件甚至对奥运会帆船赛的进行造成了影响[12]。在蓝藻爆发过程中，大量的水体溶解氧被蓝藻的生长和有机物质的沉积所消耗，进而加剧了该区域的水体低氧。这种情况严重威胁到了水体中的鱼类、贝类、甲壳动物、甚至蓝藻本身的生存，腐烂的蓝藻和生物又进一步加剧了水体氧气的消耗，甚至将这片区域形成“死区”[13]。

随着低氧水体面积的日益增多，水体低氧已严重威胁河、海生态系统[14]。最近的

报告显示全球有超过245000 km2面积的水体形成了“死区”(图1-1)[1]。水体长期缺氧将造成水生生物的大量死亡和水体生物多样性降低，进而造成水体生态系统结构的改变[4, 15]。

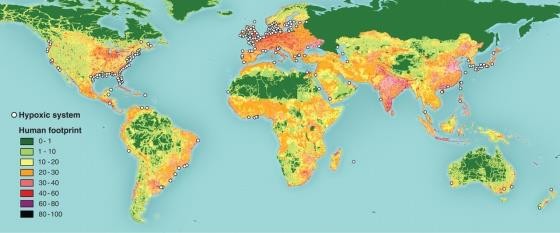


图1-1 全球水体低氧分布图。图片引自Diaz和Rosenberg[1]。

Fig. 1-1 Global distribution of eutrophication- associated dead zones. The figure was cited from Diaz

And Rosenberg [1].

## 2 低氧诱导因子家族成员

低氧诱导因子（Hypoxia-inducible factor, HIF）是广泛存在于动物体内的一种转录因子，可以上调多种靶基因的表达，在动物体内的氧平衡调节中发挥重要的作用[16]。

HIF是由一个可变的α亚基和一个共有的β亚基所构成的异二聚体。其中，α亚基主要有三种亚单位结构，分别为HIF-1α、HIF-2α和HIF-3α[17]。研究显示，α亚基主要参与低氧应答。β亚基又称为芳香烃受体核转位蛋白（Aryl hydrocarbon nuclear translocator,

ARNT），除参与低氧应答以外，也参与其它基因的表达调控。此外，β亚基与保持HIF

结构的稳定性及二聚化引起的活性构象转变有关[18]。根据α 亚基的不同，将哺乳类

HIF家族成员分别命名为HIF-1、HIF-2和HIF-3 [19]。

### 2.1 HIF-1

#### 2.1.1 HIF-1的分子结构

HIF-1是在研究哺乳动物肝癌Hep3B细胞促红细胞生成素（Erythropoietin, EPO）基因表达时被发现，由HIF-1α和HIF-1β亚基组成[17]。α亚基和β亚基均含有碱性螺旋－环－螺旋（Basic helix-loop-helix, bHLH）和PAS（Per/ARNT/Sim）结构域，其中HIF-1α亚基是HIF-1的调节和活性亚基，O2 对HIF-1活性的调节主要是通过该亚基

作用[18, 20, 21]。人HIF-1α基因定位于14q21～24上，由15个外显子和14个内显子构成，不同的外显子编码不同的功能结构域。cDNA全长为3.7 kb，其开放阅读框(Open reading frame, ORF)为2478 bp，编码826个氨基酸。HIF-1β，又称为芳香烃受体核转位蛋白（aryl hydrocarbon nuclear translocator, ARNT）基因定位于lq21上，cDNA全长为2.6 kb，其开放阅读框有2367 bp和2322 bp两种，分别编码789个和774个氨基酸[22]。

HIF-1α通常持续表达，但在常氧状态下会被迅速降解。这起始于HIF-1αC末端的氧依赖降解区（Oxygen-dependent degradation domain, ODD）中的保守脯氨酸残基

（Pro402和Pro564）被脯氨酸羟化酶共价修饰。羟化的HIF-1α随后被肿瘤抑制蛋白

pVHL识别并由泛肽标记，进入蛋白降解途径。而HIF-1β在常氧和缺氧状态下均可表达。它与HIF-1α结合成二聚体形成有活性的HIF-1，抵抗蛋白水解酶的降解(图1-2) [23]。



图1-2 氧浓度和脯氨酸羟化双向调节HIF-1α活性。图片引自Schofield和Ratcliffe [23]。

Fig. 1-2 Dual regulation of HIF-1αby O2 and prolyl hydroxylation. The figure was cited from

Schofield and Ratcliffe [23].

#### 2.1.2 HIF-1的信号传导

在HIF-1α和HIF-1β形成异二聚体复合物后，通过与HIF靶基因的5`-/3`侧翼序列上的低氧反应原件（Hypoxia responsvie elements, HREs）或HIF-1结合位点结合而调控靶基因的表达[24-26]. HRE首次在人促红细胞生成素（Erythropoietin, EPO）基因得3`端侧翼序列中被报道，位于PolyA上游120bp处[27]。将HIF的靶基因启动子区域进行序列比对分析发现，HRE含有一个共有的五核甙酸核心序列5`-(A/G) CGTG-3`[28]。但仅仅含有一个五核甙酸的HRE在活化低氧诱导转录中效率较低。HIF-1结合位点主

要有活化蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)[29]、GATA-2、CAAT结合因子[30]、Smad3 [31]和肝细胞核因子-4 (hepatocyte nuclear factor 4, HNF4)[32]. 在复合物与HREs或HIF结合位点结合后，通过与转录因子激活因子cAMP-反应原件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CBP) /p300结合而调节HIF靶基因的表达(图1-3)[33, 34]。

目前发现有100多个基因受HIF的调控[35]。这些基因功能多样，涉及机体的各种反应，如调节血管（如内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)血红素氧化酶-1 (heme oxygenase, HO-1)、一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, Inos)；调节血管（血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)；能量代谢(葡萄糖转运蛋白-1和-3glucose transporter-1, -3, GLUT-1, GLUT-3) [36]；凋亡[37]和B淋巴细胞发育[38]等（图1-4）。



图1-3 HIF-1α信号传导通路。图片引自Ruas等[34]。

Fig. 1-3 The singal pathway of HIF-1α. The figure was cited from Ruas et al[34].



图1-4 HIF调节的靶基因。图片引自Hirota 和Semenza [35]。

Fig. 1-4 The target genes regulated by HIF. The figure was cited from Hirota and Semenza[35].

#### 2.1.3 HIF-1表达的调节

由于HIF-1α决定了HIF-1的活性，因此对于HIF-1表达的调节多依赖于对HIF-1α的调节。HIF-1α的表达和活性调节可体现在多级水平，包括基因转录、蛋白表达、核定位及激活。对HIF-1α表达调节因素进行总结，见表1-1。

表1-1 HIF-1α表达调节因素

Tab. 1-1 The factors that regulate the expression of HIF-1α

| HIF-1α 表达调节因素 | 举例 |
| --- | --- |
| 上调（激活） |  |
| 氧浓度 | ≤1% O2 |
| 二价阳离子可以模拟低氧诱导 HIF-1α 表达 | 铁、镍、钴 |
| 癌基因 | V-Src、胰岛素样生长因子 |
| 细胞因子 | IL-2、EGF |
| 下调（抑制） |  |
| 一氧化合物，可以阻止 HIF 与 DNA 结合活性  某些抑癌基因促进 HIF-1α 降解，降低其活性 | CO, NO  P53、VHL |

### 2.2 HIF-2

HIF-2是由HIF-2α和HIF-1β亚基组成的异源二聚体。当HIF-2α与HIF1β结合形成复合物后，可通过缺氧作用元件HRE激活靶基因[39]。尽管HIF-2α与HIF-1α的同源性达到了48%，但二者在组织表达和诱导靶基因表达上明显不同。HIF-1α在多种细胞中均有表达，而HIF-2α 表达相对局限。HIF-2α 能够特异性诱导转化生长因子-α

（transforming growth factor-α, TGF-α）、EPO、Oct-4和TWIST1[40, 41]，这提示HIF-2α在功能上与HIF-1α存在不同。HIF-2α敲除鼠表现出胚胎肺成熟度降低、血管发育障碍，表明HIF-2α可能在血管生成、呼吸系统发育上起主要作用[42]。

### 2.3 HIF-3

HIF-3是最新发现的HIF家族成员[43]。由于HIF-3α缺少羧基端转录基序(Carboxyl-terminal transactivation domain, CTAD)，因此其转录因子活性要弱于其他HIF-α成员。与HIF-1α和HIF-2α不同的是，HIF-3α具有PAS结构域抑制蛋白（Inhibitory PAS donmain protein, IPAS）、新生儿和胚胎PAS蛋白（Neonatal and embryonic PAS protein, NEPAS）等多个形式的剪切体。IPAS可以通过与HIF-1α和HIF-2α形成复合物而导致HIF-1α和HIF-2α转录活性丧失[44]；NEPAS在心和肺的发育方面具有重要的

功能[45]。

### 2.4 鱼类HIFs家族成员

目前，在鱼类中共发现了三个HIF-α成员，分别是HIF-1α、HIF-2α和HIF-4α，对应的HIF家族成员分别为HIF-1、HIF-2和HIF-4。其中HIF-1α已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)[46]、草鱼(*Ctenopharyngodon idel*)[47]、细须石首鱼(*Micropogonias undulatus*)[48]和斑马鱼(*Danio rerio*)[49]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)[50]中得到报道，HIF-2α已在细须石首鱼[51]、斑马鱼[49]和团头鲂[50]中得到报道。HIF-4α是通过对鱼类基因组进行同源搜索时所获得的，由于其C-末端与其他HIF-α相似性较低，而命名为HIF-4α[52]。由于HIF-4α与HIF-lα、HIF-2α的亲缘关系较远，在系统进化分析时构成单独的一支；同时，它与哺乳动物HIF-3α也缺乏同源性，是否是鱼类所特有的亚基尚需要进一步的研究。

尽管HIF已从多种鱼类中得到了克隆、鉴定，但是关于HIF在低氧胁迫下的反应变化以及其功能的信息仍然有限。目前，低氧胁迫下HIF-1αmRNA表达变化情况已在虹鳟、草鱼和细须石首鱼中得到研究。在虹鳟的性腺中检测到了HIF-1αmRNA，但低氧2 h和4 h后其表达无明显变化[46]。与虹鳟HIF-1α一致的是，尽管武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)的HIF-1α在肝、腮和睾丸中高表达，但在低氧情况下其表达量并无明显变化[53]。草鱼HIF-1α在低氧4 h后在眼和肾脏中高度表达，在脑中呈中度表达，在腮、心、肝和肌肉中低度表达。而低氧96 h后，草鱼HIF-1α在所有的检测组织中表达量均降低。在低氧胁迫4 h，草鱼HIF-1α在腮和肾脏中呈上调表达，而在脑、心和肝脏中呈下调表达[47]。与上述三种鱼类HIF-1α表达不同的是，细须石首鱼的HIF-1α在低氧7天后在脑和性腺中高表达，在心、肝和肌肉中中度表达。在低氧胁迫3天、7天和3周后，发现细须石首鱼的HIF-1α在其卵巢中呈上调表达状态[48]。细须石首鱼的HIF-2α在脑和性腺中高度表达，在心、肝和肌肉中呈中度表达。在

低氧1周和3周后发现，细须石首鱼HIF-2α在卵巢中呈上调表达，但是在低氧3d的情况下HIF-2α表达量并无显著变化，提示HIF-2α可能在低氧反应的早期阶段并无调节作用[48]。武昌鱼HIF-2α在所检测的组织（脑、心、肝、肾、眼、卵巢、睾丸等）均呈高度表达，在低氧4 h后武昌鱼HIF-2α在肝和肾中显著上调，提示HIF-2α可能与HIF-1α具有某些互补的功能，同时在低氧反应的早期就已发挥作用[53]。上述研究表明HIF-2α可能具有更加复杂的功能。

草鱼HIF-4α在低氧4 h后，HIF-4αmRNA在眼、肾、和肌肉中呈高表达，在脑、腮和心中呈低度表达。在低氧96 h后，HIF-4αmRNA在脑、眼、心、肾和肌肉中高度表达，而在腮和肝中呈低度表达。实时定量PCR发现在低氧4 h和96 h后，HIF-4α在眼、腮、心、肾、肝和肌肉中呈明显的上调表达[47]。

低氧胁迫能够在鱼类的不同组织中诱导不同类型的HIF-α表达，说明不同类型的HIF-α在鱼类适应低氧时具有不同的调节作用。而鱼类的三种HIF-α在急性或慢性低氧下反应的不同表明他们在低氧的不同时期发挥不同的作用。

除了研究鱼类HIF-α的表达及低氧胁迫下反应情况外，鱼类HIF-α与其调节的同源DNA序列相互作用的研究也相继报道。在青鳉中报道了HIF-α2蛋白能够与ARNT2和人ARNT1相互作用[54]。同时，在虹鳟细胞中，低氧激活的HIF-1α能够与人红细胞生成素(Erythropoietin, EPO) HRE序列相结合[46]。在草鱼中同样发现在ARNT存在的情况下，人EPO HRE序列能够被草鱼的HIF-1α和HIF-4α蛋白反式激活[47]，表明鱼类和人类的HIF转录激活功能具有保守性。此外，在斑马鱼中还研究了HIF-1α和-2α在胚胎发育过程中的时空表达，结果显示胚胎形成早期HIF-1α和-2α就已普遍表达。而在胚胎形成后期，HIF-1α和-2α的表达则局限于中枢神经系统、脊索、体节和血管[49]。

## 3 转铁蛋白

转铁蛋白(Transferrin, Tf)，又称为铁传递蛋白、运铁蛋白，是一种重要的β2球蛋白，在机体的离子转运与储存、抗菌和细胞的增殖中具有重要的作用[55, 56]。

### 3.1 Tf的理化性质和结构

人Tf基因定位于3q21-qter，基因大小为33.5 Kb，包含17个外显子和16个内含子，mRNA长2318 bp [57]。人Tf是一种非血红素结合铁的β-球蛋白单体，分子量在76~81 kDa之间。不同种类的Tf具有不同的物理、化学和免疫特性，但是均含有两个三价铁离子结合位点。根据含铁数目的不同，Tf可以分为普通Tf (Normal-TF)或铁饱和Tf (saturated-Tf，Tf(Fe) 2)、单铁Tf (single-ferric-Tf, Tf (Fe))和脱铁Tf (apo-Tf, 即

Tf蛋白部分）三种类型。按构型不同可以分为普通型Tf (Tfc, common Tf)和异构型Tf (Tfs, iso-TF)两种类型。

所有的Tf家族成员均具有相同的蛋白质结构。目前，人(sTf)[58]和鸡的Tf(oTf)[59]的X-射线衍射晶体图已经得到阐明。Tf由序列上相似的两个片段组成，即N-端和C-端片段。这两个片段具有相似的空间结构：均含有两个α/β混合结构域，在这两个结构域中间为离子结合位点。两个片段之间由两个反平行的α-螺旋结构所连接（图1-5）。研究显示，与N-末端片度相比，C-末端片度与离子的结合力更强，离子释放速度相对缓慢[60, 61]。



图1-5 Tf家族成员蛋白质3D结构。Tf可以分成N-端和C-端片段，每个片段中的结构域1用金色标注，结构域2用绿色标注；连接N-端和C-端的片段的α-螺旋结构用蓝色标注；红色圆球表

示Fe3+离子。图片引自Bailey等[58]。

Fig. 1-5 Two-lobe, four-domain polypeptide folding pattern characteristic of proteins of the transferrin family. Shown here is the iron-bound form of human Lf with the N-lobe on the left and the

C-lobe on the right. In each lobe, domain 1 is in gold and domain 2 in in green. The a-helix that joins the two lobes is in cyan; in sTf and oTf, this linker is nonhelical. The C-terminal helix, which may mediate cooperative interactions between the lobes, is in dark blue. The two Fe3+ ions, bound in the interdomain cleft of each lobe, are shown as red spheres. The figure was cited from Bailey et al [58].

Tf家族成员具有保守的Fe3+离子结合位点，这些位点包括两个酪氨酸残基(Tyr92和Tyr192)、一个天冬氨酸残基(Asp 60)和一个组氨酸残基(His 253)以及来自协同阴离子CO32-的两个氧原子（图1-6）。由Tyr92、Tyr192和Asp 60所形成的3-电荷恰好中和了铁离子的3+电荷，而CO32-的阴离子电荷由Tf中的精氨酸侧链和N-末端α-螺旋结构所中和[62]。Fe3+离子结合位点周围的氨基酸残基，如Gly65、Glu83、Tyr85、Arg124、Lys206、Ser248和Lys296形成一个二级氢键网，它可以起到稳定铁离子结合位点的作用[63]。除了在昆虫Tf中His被Gln所取代外，其他Fe3+离子结合位点在进化的过程中非常保守[64]。



图1-6 人Tf N-末端的离子结合位点。Fe3+ (红色圆球) 与Tyr92、Tyr192、Asp 60 (洋红色) 和

CO3 （金色） 结合，而CO3 则与Arg 121（紫色）和N-末端上肽链的NH集团相结合。图片引自Baker

2- 2-

等[62]。

Fig.1-6 N-lobe iron-binding site of human Tf. The Fe3+ ion is bound to the side chains of Asp60, Tyr92, Tyr192, and His253 (all shown in magenta) and the bidentate CO3 ion (gold), which is hydrogen bonded to Arg121 (purple) and to peptide NH groups from the N-terminus of an-helix. The figure was cited from Baker et al[62].

2-

### 3.2 Tf循环及Tf受体

细胞内铁离子的运输是由受体介导的胞吞完成的。Aisen et al用Fe3+ NTA（氨三乙酸）复合物测定盲鳗血清Tf的铁结合能力，证实了含铁Tf必需与细胞膜上的受体形成复合物，才能完成铁离子转移的生理过程[60]。研究发现，细胞表面一共含有两种Tf受体(Tf receptor, TfR): TfR1和TfR2. TfR1在红细胞、红细胞样细胞、肝细胞、单核细胞和血脑屏障等大多数细胞中表达。TfR2含有两种转录体（α-TfR2和β-TfR2），其中α-TfR2主要在肝细胞上表达，而β-TfR2在多数细胞中呈低水平表达。两种受体均以pH值依赖的方式结合带有两个铁原子的Tf，其中TfR2与Tf的亲和力要比TfR1低25倍。TfR1是由760个氨基酸组成的糖基化蛋白，分子量约为180 kDa，每一个

TfR1的同型二聚体可以结合两个转铁蛋白。在生理条件下TfR与含有两个铁的转铁蛋白结合并形成Tf-2Fe-TfR复合物，然后Tf-2Fe-TfR复合物通过细胞膜网格蛋白包被的凹陷进入特定的内涵体[56, 65]。之后，内涵体成熟并失去包被，吸收质子，使内涵体中的pH值迅速降到5.5左右，从而引起TfR和转铁蛋白的结构变化，导致铁和转铁蛋白的结合减弱，最终铁释放到细胞中(图1-7) [66]。



图1-7 Tf 循环。图片引自Qian等[66]。

Fig.1-7 The cycle of transferring. The figure was cited from Qian et al[66].

### 3.3 Tf Th理功能

Tf是体液中不可缺少的成分，不仅参与铁的运输与代谢，参与呼吸、细胞增殖和免疫系统的调节，还具有调节铁离子平衡和能量平衡，以及抗菌杀菌功能。

#### 3.3.1 离子结合与运输

铁是生物系统的重要组成部分，在生理条件下以Fe3+形式存在。机体中绝大部分铁都是由血清中的Tf供给的。Tf的铁结合量为2mol Fe3+/mol Tf。在生理情况下，Tf分子仅有三分之一被铁饱和。由于两个半分子在结构、序列和功能上存在区别，因此Tf的两个铁离子位点的结合能力是不同的。Bates et al[67]阐明了血清Tf的Fe3+-Tf-CO32 -复合物的形成过程以及铁离子交换反应中质量与能量的平衡。研究发现，牛Tf对细胞的转铁能力很强，但其C端结构域片段只有微弱的转铁能力，N-端结构域片段几乎不对细胞转铁；当温度降为4℃时，Tf和C端结构域片段均不再向细胞内转铁，与细胞的结合量也随之减少，而N端结构域片段与细胞的结合却不受温度的

影响；若细胞与C端结构域片段一起保温，能使Tf 对细胞的转铁受到部分抑制，与

N端结构域片段一起保温却无此现象[68]。

#### 3.3.2 Tf抗菌活性

铁是许多细菌和病毒生长的重要因子。高浓度的游离铁离子能够促进病菌的生长。细菌能够通过（i）释放低分子量的铁离子螯合剂(ii)吸收亚铁血红素(iii)通过TfR样受体与homo-Tf结合而捕获游离的铁离子[69]。由于Tf具有螯合铁的能力，因此Tf可抑制细菌的生长。Parkkinen et al[70]发现用apo-Tf捕获游离铁离子能够降低细菌感染。研究发现，apo-Tf抗菌功能不仅仅通过降低铁离子的浓度而完成的，同时apo-Tf还能降低G+和G-细菌粘附到细胞表面。

#### 3.3.3 Tf在细胞Th长和增殖中的作用

Tf是细胞生长和增殖所必需的生长因子。研究发现，Tf参与了肌细胞[71]、胚胎形成[72]、有丝分裂[73]、神经细胞[74]等细胞的生长和分化过程。上述功能至少有一部分是依赖于apo-Tf而完成的[75]。此外，Tf具有旁分泌和自分泌活性。如骨细胞及其他未分化的细胞能够合成大量的Tf[76]。对大鼠颅内注射apo-Tf后能够迅速增加少突神经胶质细胞的分化。此外，在肿瘤和癌细胞中Tf的含量显著高于其相应的正常细胞[77]。

结合铁离子的Tf能够抑制卵巢癌细胞的凋亡。凋亡细胞通路中的Myc、Fas配体(Fas ligand, FasL)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factorα, TNF-α)、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的激活要依赖于铁蛋白的上调表达来完成，这同时也导致了胞内铁离子浓度的降低。结合铁离子的Tf则恰恰恢复了胞内铁离子浓度，因而阻止了细胞死亡[78]。Tf还能够保护肝细胞免受Fas介导的细胞凋亡[79]。

## 4 球蛋白

球蛋白(globin)是一类能够通过铁卟啉环可逆性结合氧的呼吸性蛋白质，广泛存在于细菌、真菌、植物和动物体内，并显示出巨大的结构和功能多样性[80]。目前在脊椎动物体内已有7种类型的球蛋白，分别是血红蛋白(haemoglobin, Hb)、肌红蛋白(myoglobin, Mb)、脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)、细胞球蛋白(cytoglobin, Cygb)，球蛋白E (globin E)、globin X和globin Y，共同组成了“球蛋白超家族(globin superfamily)”。

### 4.1 球蛋白的组织分布与定位

Hb主要分布于脊椎动物的红细胞内；Mb主要分布于心肌和骨骼肌细胞，定位于胞质[81]；Ngb主要分布于神经细胞中，在视网膜、睾丸及某些内分泌组织细胞中亦有

分布，主要定位于胞质[82]；Cygb主要分布于结缔组织成纤维细胞、肝星形细胞、成软骨细胞和成骨细胞，定位于胞质，cygb亦分布于神经系统的某些特殊神经细胞亚群及视网膜的某些特殊类型细胞内，且定位于胞质和胞核中[83]。Globin E仅在鸟类中发现，与Mb和Cygb进化关系较远[84]。Globin X仅在鱼类和两栖类中发现，并在不同组织中呈低度表达[80]。Globin Y仅在存在于两栖类中，在不同的组织中呈组成型表达模式[85]。

### 4.2 球蛋白的结构特征与Th物学功能

尽管目前已经得到了7种类型的转蛋白，但是关于球蛋白的结构和功能方面的研究主要集中在Hb、Mb、Ngb和Cygb上。

#### 4.2.1 球蛋白的结构特征

Hb是由两条α-球蛋白多肽链和两条β-球蛋白多肽链组成的异源四聚体，每条多肽链各与1个血红素相连接，4个亚单位之间和亚单位内部由盐键连接；Hb与O2的结合或解离可影响盐键的形成或断裂，从而使其四级结构的构型发生改变，导致与O2的亲和力随之改变[86]。Mb是只有三级结构的单链蛋白质，与Hb各亚基的三级结构极为相似。

Hb和Mb的血红素辅基（铁卟啉化合物）由4个吡咯环通过甲炔基相连形成环形，Fe2+居于环中，Fe2+的6个配位键中有4个与吡咯环的N配位结合，1个与近端的HisF8结合，第6个用来结合O2等外源性配体，该配体同时以氢键与远端的HisE7结合，未结合配体时该配位键是空的，故生理状态下Hb和Mb的血红素-铁是“五配位”形式[87, 88]。

Ngb和cygb亦拥有经典的“three-over-three”α-螺旋三明治折叠结构，对携氧球蛋白结构和功能有重要作用的PheCD1、HisE7和HisF8等关键氨基酸残基，在Nsb和Cygb依然存在。但Ngb和Cygb的HisE7却直接与血红素-铁第6个配位键结合而形成“六配位”形式[88]。

#### 4.2.2 球蛋白的Th物学功能

Hb能够可逆性的结合O2，在循环系统起运输O2的功能。Mb有储存O2和促进O2向线粒体扩散的作用。另外，Hb和Mb亦有双加氧酶的作用，以清除有毒性作用的NO. Ngb和Cygb的生物学功能目前并不完全清楚，可能的功能主要有：（1）在氧代谢方

面有类似Mb的功能：储存O2，和促进O2向线粒体扩散。Ngb的氧结合动力学参数和它在神经细胞及内分泌细胞的表达水平表明Ngb可能有氧供功能[88]。Ngb在脑内不同区域的表达程度与对缺血缺氧的耐受程度呈正相关，Ngb在缺血缺氧状态下表达增加，且Ngb过度表达能够使培养的神经元在缺氧的情况下存活率升高和急性缺血状态下大鼠脑梗死体积缩小等[89]，提示Ngb在脑缺血缺氧性损伤中对神经元有保护作用。Mammen et al研究发现，慢性缺血缺氧条件下小鼠脑内Ngb的表达并无明显增加，提

示Ngb可能只在急性缺血缺氧时发挥作用[90]。缺氧诱导Ngb表达上调的机制目前仍未阐明，缺氧诱导转录因子HIF-1可能在其中起介导作用。缺氧条件下Cygb亦表达上调，表明Cygb也可能有类似的功能[91]；(2) O2感受器功能：结合配体时六配位球蛋白血红素袋的构象变化较大，提示Ngb和Cygb可能作为O2感受器，根据O2浓度的变化参与细胞内信号传导通路调节[92]；(3) NADH氧化酶作用：在半缺氧条件下促进糖酵解，产生ATP供能。Cygb亦可能具有过氧化氢酶活性[93]；（4）作为活性氧和NO基团的清道夫，以清除组织缺血再灌注时产生的毒性物质；（5）参与胶原合成：NIH 3T3成纤维细胞转染Cygb基因后，TGF-β诱导胶原α1（I）合成，从而使胶原合成增多，提示Cygb与胶原合成有关[94]。

## 5 本课题的研究内容

本课题将系统研究低氧环境对近海底层名贵经济鱼类－半滑舌鳎(*C. semilaevis*)生理机能的影响，克隆低氧诱导因子(HIF-1α)、血红蛋白(Hb)和血清转铁蛋白(Tf)基因，并系统分析这些基因的分子进化及在低氧胁迫下的表达特征，探讨血红蛋白、血清转铁蛋白以及低氧诱导因子在半滑舌鳎低氧适应中的生理生化作用及机制，从分子水平上认识和了解半滑舌鳎的耐氧生理代谢和环境适应机制，为揭示海洋底层经济鱼类的生存特性和对水中溶解氧的需求特点提供科学依据，也为今后进一步研究耐低氧鱼、预防鱼类低氧损伤和抗低氧鱼类分子育种工作提供理论依据。

具体研究内容如下：

(1)半滑舌鳎耗氧率及影响因素；

(2)半滑舌鳎低氧诱导因子(HIF-1α)、血红蛋白(Hb)和血清转铁蛋白(Tf)的基因克隆与分子进化分析；

(3)低氧胁迫下半滑舌鳎低氧诱导因子(HIF-1α)、血红蛋白(Hb)和血清转铁蛋白(Tf)的反应规律。

## 6 本课题的目的及意义

鱼类作为水体中的主要动物群体，水体中溶氧浓度的大幅度变化，对鱼类的生长和进化有明显的影响。水中溶解氧减少可导致鱼类摄食量减少，生长速度减慢，生殖力下降，甚至死亡[3]。鱼类已成为研究低氧适应的细胞和分子机制的理想模型[4]。研究显示，鱼类在长期进化的过程中获得了许多抵抗低氧的适应机制。鱼类可通过增强氧的运送能力、降低能量消耗、保证能量供应和提高免疫力来对低氧产生适应性反应[2]。但有关鱼类低氧反应基因的克隆及其表达调控机制等方面的研究还相对较少，对产生低氧反应的分子机理还缺乏了解。

半滑舌鳎（*C. semilaevis*）属鲽形目，舌鳎科，舌鳎属，三线舌鳎亚属。分布于朝鲜、中国和日本的近海，为近海名贵的大中型经济鱼类。我国主要集中于渤海、黄海海域。半滑舌鳎栖息于泥沙质海底，具有活动范围小、洄游距离短、围捕率高、生长迅速、初次性成熟早、对环境的适应能力强等特点。其肉嫩味美、营养丰富，深受人们的喜爱，经济价值很高，作为近海海水养殖对象已引起了人们的关注[95]。此外，半滑舌鳎栖息于泥沙质海底，并常常钻到泥沙里，这些均提示半滑舌鳎有着独特的低氧适应调节机制。因此，以半滑舌鳎为模型系统地研究低氧胁迫对其HIF-1α、Hb和Tf的影响，探讨这些基因在半滑舌鳎低氧胁迫下的功能及作用，从分子水平了解半滑舌鳎适应低氧环境的机制及相关功能基因在进化上所具有的特征，为深入研究鱼类耐受低氧的分子机制提供理论基础。同时，在鱼类低氧损伤预防和抗低氧鱼类品系的分子遗传育种工作方面亦具重要的指导意义。

# 第二章 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因的克隆与序列分析

## 1 前言

低氧是一个通过氧敏感因子在细胞内传递信号并导致转录因子活化的一个细胞水平上的反应。研究发现，有许多转录因子能够被低氧所调节并且影响低氧反应的基因表型[96]。HIF是低氧反应的核心调节因子，其α亚基主要参与低氧应答。在氧浓度较低的情况下，α亚基与HIF-β结合形成异二聚体复合物后，通过与HIF靶基因的5`-/3`侧翼序列上的HREs或HIF-1结合位点结合而调控靶基因（如Tf、Globins、免疫因子等）的表达[24]。

半滑舌鳎（*C. semilaevis*）为近海名贵的大中型经济鱼类，已成为沿海地区重要的养殖鱼类。随着半滑舌鳎基因组测序的完成，该鱼已成为研究鱼类生理、病理的重要品种[95]。但目前关于半滑舌鳎低氧胁迫下的反应研究几乎呈空白状态。本章首先应用RT-PCR和RACE-PCR技术，克隆了半滑舌鳎HIF-1α、Tf以及Hb-1α基因的cDNA全长，通过生物信息学方法分析其分子结构特征及其进化规律，有助于为深入研究鱼类低氧反应因子的进化与功能奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 主要仪器

分光光度仪(BioPhotometer): 德国Eppendorf公司；

PCR扩增仪(PTC-100 Programmable thermal controller): 美国MJ Research公司；台式冷冻离心机(Centrifuge 5417R型)：德国Eppendorf公司；

台式高速离心机(Centrifuge 5415D型)：德国Eppendorf公司；电泳仪(Power Pac-200型)：美国Bio-Rad公司；

恒温孵育器(Thermo Stat plus)：德国Eppendorf公司；超净工作台：苏州净化设备有限公司；

高压灭菌锅：日本SANYO公司；

超低温冰箱(U570-86)：美国NBS公司；

凝胶成像系统(White/Ultraviolet Transilluminator GDS8000型)：UVP公司；

### 2.2 主要试剂

逆转录试剂盒RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit: Fermentas公司；

SMART cDNA synthesis Kit: Clontech公司；

dNTP Mix (2.5 mM, 10 mM): TaKaRa公司；

DNA聚合酶：TaKaRa Ex TaqTM (5 U/μL): TaKaRa公司；

Taq DNA Polymerase (5 U/μL): Fermentas公司；

PCR产物胶回收试剂盒(TIANgel Midi purification kit): 天根公司TRIzol®Reagents: Invitrogen公司；

琼脂糖：西班牙进口；

DL2000 Marker: TaKaRa公司；

Marker5000: 天根公司；

实验中其它化学试剂除特别注明外，均为国产分析纯。

### 2.3 载体、菌株和实验鱼

pMD18-T载体：TA克隆。TaKaRa公司；

大肠杆菌(*E. coli*) DH5α菌株：克隆载体宿主菌；大肠杆菌(*E. coli*) TOP10菌株：克隆载体宿主菌；

半滑舌鳎（体重约70 g） 购自江苏省盐城市一个鱼种场，用于核酸提取。

实验有关溶液和缓冲液：除特别注明外，均参照《分子克隆》（第四版）所述方法配制。

实验中所用引物：由上海生工合成。序列测定：由上海生工完成。

### 2.4 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-1α全长cDNA的获得

#### 2.4.1 核酸的提取和纯化

取半滑舌鳎新鲜的肝脏组织100 mg混合匀浆，使用TRIzol®Reagents提取总RNA，用于RT-PCR和RACE-PCR。提取总RNA相关操作过程所用枪头、离心管及溶液预先经过处理，如0.1%焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水处理过夜，金属器械和玻璃器皿用200℃高温烘烤3 h以上，使RNase彻底失活。使用TRIzol®Reagents提取组织总RNA，主要步骤如下：

(1)于冰上用电动匀浆器将置于EP管中100 mg左右的组织块充分匀浆；

(2) 4℃、12000 g离心10 min，将上清液转移到无RNase的离心管中，室温静置

10 min；

(3)加入总体积0.2mL的氯仿，剧烈摇动15 sec，室温静置5 min；4 ℃、12000 g

离心15 min；

(4)吸取上清至新的离心管，加入0.5 mL异丙醇，混匀，室温静置10 min；4 ℃、

12000 g离心10 min；

(5)弃上清，沉淀用75%乙醇洗涤，4 ℃7500 g离心5 min。

(6)小心倒掉乙醇，待其完全挥发后加入适量DEPC水溶解。于℃冰箱中保存备用。

(7)检测提取的总RNA的质量。应用紫外分光光度计检测OD260、OD280及其比值，以检验总RNA浓度与纯度。同时，通过1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。

#### 2.4.2 目的基因中间片段的扩增

使用逆转录试剂盒RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit将RNA逆转录成

cDNA，接着进行RT-PCR扩增特异性中间片段。反转录根据RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒说明书进行。20μL逆转录组分及反应程序为：

(1)取总RNA 2μg，加入oligo(dT) 18引物1μL，加DEPC水至终体积12μL，混匀，短暂离心，70℃反应5 min，冰上速冷；

(2)加入5×反应缓冲液4μL, RNA酶抑制剂(Ribonuclease Inhibitor) 1μL，10

mmol/L的dNTP mix 2μL, M-MuLV反转录酶1μL，42℃反应60 min，70℃10 min终止反应。cDNA保存于-80℃冰箱，作为模板用于扩增目基因的特异性中间片段。

分别根据草鱼(GenBank 登录号：AAR95697) 、鲤鱼(GenBank 登录号：

ABV59209) 、武昌鱼(GenBank 登录号：ADF50043)、斑马鱼(GenBank 登录号：

AAQ91619)的HIF-1α核苷酸序列，斑马鱼(GenBank登录号：NM\_001015057)、牙鲆(GenBank 登录号：HM537150)、日本白鲫(GenBank 登录号：AY323916)和人(GenBank登录号：NM\_001063)的Tf核苷酸序列，分别设计简并引物，同时采用BLAST对半滑舌鳎EST数据库(www. ncbi. nlm. nih. gov)进行搜索，对得到的EST数据进行分析，设计HB的特异性引物（引物序列详见表2-1），进行RT-PCR. HIF-1α的PCR扩增反应体系(25μL)为：cDNA模板1μL；引物HIF1DF1和HIFDR1各1μL；H2O 19μL；dNTPs 0.25μL；TaP酶0.25μL；10×buffer 2.5μL. PCR 反应条件：94℃4 min，94℃

30 s、64℃30 s、72℃60 s，35个循环，72℃10 min. 扩增Tf和Hb-1α的体系只需更换引物为TfDF1/TfDR1和HbDF1/HbDR1即可，其它条件不变。

#### 2.4.3 SMART cDNA第一链的合成

采用SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech公司)分别合成5`和3` SMART cDNA，用于扩增cDNA的5`和3`末端。SMART cDNA的合成原理见图2-1. SMART cDNA第一链合成参照参照SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit说明书进行。5`SMART cDNA合成具体操作为（终体积为20μL的反应体系） ：

(1)在无RNase的PCR反应管中加入总RNA 2μg；

(2)将5' CDS引物和Smart II引物各1μL加入其中；

(3)加RNase-free水补足11μL，于PCR仪70℃作用5 min后，冰上速冷2 min；

(4)加入9μL反应混合物(含4μL 5×第一链反应缓冲液(375 mmol/L KCl; 250 mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 30 mmol/L MgCl2)，2μL DTT (20 mmol/L)，1μL Ribonuclease Inhibitor (40 U/μL)，1μL dNTPs (10 mmol/L)，1μL逆转录酶Super ScriptTMⅡRT (200 U/μL)) ；

(5)混匀，离心，在PCR扩增仪中42℃反应1 h，70℃15 min合成第一链5’SMART

cDNA。反应结束后保存于-80℃冰箱，用于5’RACE-PCR。

3` SMART cDNA合成（20μL的反应体系）与5’SMART cDNA合成类似，具体操作为：

(1)在无RNase的PCR反应管中加入总RNA 2μg；

(2)加3' CDS引物1μL；

(3)加RNase-free水补足11μL，于PCR仪70℃作用5 min后，冰上速冷2 min；其它的步骤与5′SMART cDNA合成操作相同。



图2-1 SMART 技术流程图

(引自clontech公司SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit手册)

Fig. 2-1 Flow chart of SMART Technology

(From Manual of Clontech SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit)

#### 2.4.4 RACE-PCR技术扩增HIF-1α、Tf和Hb-α1基因cDNA末端

根据HIF-1α、Tf和Hb-α1扩增到的特异性片段并测序验证后，采用Primer Premier

5.0软件设计巢式引物，引物Tm>68℃。RACE-PCR分两轮反应进行。

以SMART cDNA为模板，使用基因特异引物和通用引物UPM进行第一轮扩增。

25μL反应体系包括：10×Taq buffer 2.5μL；dNTP mixture (各10 mM) 2.5μL；cDNA

模板1μL；引物(10μM)各1μL；Taq酶(5 U/μL) 0.25μL，补水至终体积25μL。

PCR反应条件为：94℃预变性5 min后；按照94℃变性30 sec, 66℃退火30 sec，

72 ℃延伸1.5 min的循环参数运行5个循环；然后以94 ℃30 sec, 64 ℃30 sec, 72 ℃

1.5 min的参数运行30个循环；最后72 ℃延伸10 min。

第一轮PCR扩增产物用无菌蒸馏水稀释10倍后，取1μL用作第二轮扩增反应的模板。使用下游引物和UPM进行第二轮PCR反应，反应条件同上。

RACE-PCR分别扩增得到3′和5′端序列，与cDNA的中间片段拼接得到半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因全长cDNA. RACE-PCR技术克隆基因cDNA全长流程图详见图2-2。



图2-2 SMART RACE流程图

(引自clontech公司SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit操作手册)

Fig. 2-2 Overview of SMART RACE Procedure

(From Manual of Clontech SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit)

表2-1 扩增半滑舌鳎HIF-1α、Tf及Hb-α1基因所用引物

Tab. 2-1 Primers used for HIF-1α, Tf and Hb-α1cloning

| Primer | Sequence (5′ to 3′) | Usage |
| --- | --- | --- |
| HIF1DF1 HIF1DR1 TfDF1 TfDR1 HbDF1  HbDR1 | TGAGCTCGGAG(C)CGG(C)AGA(G)AAG A(G)TG(A)CCACTGAGC(A)ACA(G)T(A)AGTT TA(C)TTATGC(T)TGTT(G)GCTG(T)TGGTC(A)A GGCT(C)A(C)AT(G)G(A)T(C)ACACCAT(C)TTA CAGGTTGTTCGCGGCGCACCC  GCTGGGATCCACTCTCAGGG | 扩增中间片段 |
| HIF1-5out HIF1-5in  HIF1-3out HIF1-3in  Tf-5out Tf-5in Tf-3out Tf-3im Hb-5out Hb-5in Hb-3out  Hb-3in | GGTGAGTCTCATGATGGAAGCC TGGGCCAGCTCGTAGAAAACCT CTGGCTCCTGCAGCTGGAGAC CAGAGATTCAGTTGCTGAATG CTTCCCCAACCCAGTGTGACAAG GATGCAATTGGTAGTCGTCCAG TCCAGTGGGTGTCAAGTACATGAG CCAAAGCCTGAAGAGAGTCAC CTTGGTTTGGGGGTGCGCCG GGGTGCGCCGCGAACAACCTG CACGCCTTCACCCTGAGAGTGG  CCCTGAGAGTGGATCCCAGC | RACE PCR |
| UPM |  |  |
| Long  Short | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG  TATCAACGCAGAGT CTAATACGACTCACTATAGGGC |  |

#### 2.4.5 PCR产物电泳与回收

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后，于凝胶成像系统中切下含有目的DNA片段的胶条，使用天根公司的凝胶回收试剂盒回收DNA。主要步骤如下：

(1)柱平衡，向吸附柱中加入500μL平衡液，12000g，离心1 min；

(2)切胶后，向胶块中加入3倍体积500μL溶胶液，50℃，温浴5 min；

(3)将溶胶液放入吸附柱，定温放置2 min, 12000 g离心0.5 min；

(4)漂洗，向吸附柱中加入500μL漂洗液PW，12000g，离心0.5 min，静置1 min；

(5)重复步骤4；

(6) 12000 g离心2 min；

（7）洗脱，加适量ddH2O，室温静置2 min, 12000 g离心1.5 min洗脱DNA。

#### 2.4.6 PCR产物与克隆载体的连接

PCR产物与克隆载体为pMD18-T，连接反应参照产品说明书进行。具体反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 2×Buffer PCR 胶回收产物pMD18-T  Total volume | 2.5 μL  2.0 μL  0.5 μL  5.0 μL |

混匀后，于4℃连接过夜，取出后立即用于转化或于-20℃保存备用。

#### 2.4.7 感受态细胞的制备与转化

从-80℃冰箱取大肠杆菌(*E. coli*) DH5α，划线接种于LA平板上，37℃培养15 h，挑取单个菌落接种于装有2 ml LB培养液的EP管中，以37℃、180 rpm培养条件培养15 h，取0.6 ml菌液接种于60 ml LB培养，37℃、180 rpm 培养2-3h, OD600值达0.4-0.6时，冰浴5 min后转移到离心管内，4℃4000 rpm离心5 min，弃上清，加10 ml 0.1 M

MgCl2 重悬，4℃4000 rpm离心5 min，弃上清，加10 ml 0.1 M CaCl2重悬，冰浴20 min, 4℃，4000 rpm离心5 min. 弃上清，加12 ml 12.8%甘油溶液重悬。分装EP管(200μL/管)，-80℃保存备用。

转化时从-80℃冰箱将感受态细胞取出，于手中迅速溶解；溶解后将5μL连接液加入100μL的感受肽细胞中，冰浴30 min；42℃热激活90 s，迅速冰浴2min；加入到700μL 37℃预热LB培养基中，37℃，150rpm摇床复苏45 min；将200μL菌液涂布于含有Amp的LA培养平板上；铺菌的LA平板于37℃平放2~3 h，然后倒置培养16-22 h。用灭菌牙签挑取单个菌落，放入400μL含有Amp的LB液内，放入37℃ ，

200 rpm摇床，震荡培养5 h。

#### 2.4.8 阳性鉴定与测序

用M13+和M13-通用引物对菌液进行PCR扩增，鉴定阳性克隆。25μL反应体系为：Mix 10μL；H2O，7.4μL；Tap酶，0.2μL；M13+，0.2μL；M13-，0.2μL；菌液，2μL. PCR反应条件为：94℃预变性5 min；以94℃，68 ℃，72 ℃，都以30秒的参数运行32个循环；最后72℃延伸10 min。反应结束后对PCR产物进行电泳，观察。将鉴定为阳性克隆的菌液送上海生工测序。

### 2.5 Th物信息学分析

使用NCBI网站[(http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/blast)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast))的BLASTN和BLASTX软件进行同源基因的搜索；使用ExPASy网站([http: //expasy. org/tool)](http://expasy.org/tool))有关软件进行开放阅读框的搜索、氨基酸序列的推断等。DNAstar 预测蛋白分子量；SignalP 3.0

（[http: //www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/）](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/))推断蛋白的信号肽。用PROSITE预测氨基酸可能含有的结构域和功能位点。

氨基酸的多序列排列比较使用ClustalW1.8分析，用GenDoc进行排列。不同物种同源基因的相似性用DNAStar软件包中的MegAlign程序分析。

系统发育树的构建使用MEGA 3.1软件的邻接法构建NJ系统树(Neighbor-Joining tree)，设置1000次bootstraps进行评估。

表2-2 用于HIF-1α系统进化树分析序列

Tab. 2-2 The sequences used for HIF-1αphylogenetic tree

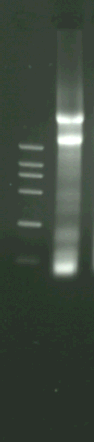
| Species | GenBank  Accession no. | Species | GenBank accession  no. |
| --- | --- | --- | --- |
| Homo sapiens (Hs) | NP\_001521 | Mus musculus (Mm) | CAA70306 |
| Gallus gallus (Gg) | NP\_989628 | Xenopus laevis (Xl) | ABF71072 |
| Meleagris gallopavo (Mg) | XP\_003206838 | Anolis carolinensis (Ac) | XP\_003214336 |
| Danio rerio (Dr) | AAQ91619 | Salmo salar (Ss) | ACN11019 |
| Micropogonias undulates (Mu) | ABD32158 | Zoarces viviparus (Zv) | AAZ52832 |
| Gasterosteus aculeatus (Ga) | ABO26719 | Pachycara brachycephalum (Pb) | AAZ52828 |
| Dicentrarchus labrax (Dl) | AAZ95453 | Gymnocephalus cernuus (Gc) | ABO26716 |
| Perca fluviatilis (Pf) | ABO26717 | Ctenopharyngodon idella (Ci) | AAR95697  AAR95698 (HIF-4α) |

## 3 结果

### 3.1 总RNA质量检测

应用Trizol试剂提取半滑舌鳎肝脏总RNA。在反转录制备cDNA前，分别采用电泳与OD值检测检验肝脏总RNA的完整性与纯度，电泳结果显示所提取的RNA分别有28s、18s两条带（图2-3），紫外分光光度仪检测OD280/OD260比值为1.98。结果表明提取的RNA完整性好，蛋白污染少，纯度高，符合反转录制备cDNA模板的要求。

M 1



M 1

图2-3 肝脏总RNA电泳检测

M: Marker 2000；1：总RNA

Fig. 2-3 Electrophoresis of total RNA isolated from liver M：Marker 2000；1：Total RNA

表2-3 用于Tf系统进化树分析序列

Tab. 2-3 The sequence used for Tf phylogenetic tree

| Species | GenBank  Accession no. | Species | GenBank accession  no. |
| --- | --- | --- | --- |
| Homo sapiens (Hs) | AAH59367 | Mus musculus (Mm) | AAL34533 |
| Acanthopagrus schlegelii (As) | AAQ63949 | Xenopus laevis (Xl) | AAH43632 |
| Paralichthys olivaceus (Po) | ACZ92269 | Pagrus major (Pm) | AAP94279 |
| Oryzias latipes (Ol) | NP\_001116384 | Sparus aurata (Sa) | AEA41139 |
| Larimichthys crocea (Lc) | CAM96032 | Notothenia coriiceps (Nc) | CAL92189 |
| Trematomus bernacchii (Tb) | CAL92188 | Dicentrarchus labrax (Dl) | ACN80997 |
| Sus scrofa (Ss) | CAQ34904 | Oncorhynchus mykiss (Om) | BAA84103 |
| Apis mellifera (Am) | AAO39761 | Drosophila melanogaster (Dm) | AAC67389 |

### 3.2 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因中间片段的扩增

根据GenBank中已有的鱼类相关序列以及半滑舌鳎EST库搜索的结果，设计简并

/特异性引物，以半滑舌鳎肝脏总RNA为模板，采用RT-PCR扩增半滑舌鳎HIF、Tf和Hb-α1基因中间片段，扩增产物电泳鉴定，结果表明PCR扩增片段大小与预计的（预计扩增片段大小分别为1060 bp、750bp和200 bp）一致（图2.4） 。

胶回收纯化相应的目的片段并与pMD18-T载体连接，转化，涂布培养，挑单个菌落培养4-5 h，进行PCR阳性克隆鉴定，电泳鉴定PCR扩增片段大小与预计的相同。将初步鉴定含阳性质粒的菌液送上海生工测序，cDNA片段大小分别为1041 bp、745 bp和198 bp，测序结果以Blast X同源检验，确定为相应基因的cDNA。

M

1 2

M

1 2

3 M



M

1

2



3

M

图 2-4 CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1基因中间片段的RT-PCR扩增电泳图

M: Marker 2000；1、2和3分别为CsTf、CsHIF-1α和CsHb-α1中间片段

Fig. 2-4 Electrophoresis of amplified fragments of internal regions of CsHIF1α, CsTf and CsHb-α1 gene by RT-PCR

M: Marker 2000; lane 1, 2 and 3 are internal regions of CsHIF1α, CsTf and CsHb-α1 gene

### 3.3 3′RACE-PCR扩增结果

根据半滑舌鳎HIF、Tf和Hb-α1特异性中间片段cDNA序列，各设计两对引物，以SMART cDNA作为模板进行3′RACE-PCR，电泳鉴定PCR扩增片段（图2-5），对与预计大小相一致的片段进行切胶、回收、纯化相应的目的片段并克隆于pMD18-T载体，转化，涂布培养，挑单个菌落培养4-5 h，对菌液进行PCR检测与电泳鉴定，扩增片段大小与回收前的基本相同。将初步鉴定含阳性质粒的菌液送上海生工测序，

cDNA片段大小分别为1950 bp、1300 bp和200 bp。

M 3

1 M

2

M



1

M



M

2



M

3

图 2-5 3′RACE-PCR扩增产物电泳图

M: Marker 2000; 1、2和3分别为HIF1α、Tf和Hb-α1 3′RACE-PCR扩增片段Fig.2-5 Electrophoresis of amplified fragments of HIF1α, Tf and Hb-α1 gene by 3′RACE-PCR M: Marker 2000; lane 1, 2 and 3 are 3′RACE-PCR amplified fragments of HIF1α, Tf and Hb-α1

Gene, respectively

### 3.4 5′RACE-PCR扩增结果

以5′RACE-PCR第一轮扩增产物为模板，进行5′RACE-PCR第二轮扩增，扩增结果见图2-6。胶回收纯化上述各目的片段并与克隆于pMD18-T载体，转化，涂布培养，挑单个菌落培养4-5 h，进行PCR扩增，电泳，各扩增片段大小与回收前的片段大小一致。将初步鉴定含阳性质粒的菌液送上海生工测序，得到的HIF1α、Tf和Hb-α1 cDNA片段大小分别为450 bp、390 bp和150 bp。



1 M



2

M



3 M

1

M

2

M

3 M

图 2-6 5′RACE-PCR扩增产物电泳图

M: Marker 2000; 1、2和3分别为HIF1α、Tf和Hb-α1第二轮5′RACE-PCR扩增片段Fig.2-6 Electrophoresis of amplified fragments of HIF1α、Tf and Hb-α1gene by 5′RACE-PCR M: Marker 2000; lane 1, 2 and 3 and 5 are amplified fragments of HIF1α、Tf and Hb-α1 cDNA by

The second-round 5′RACE-PCR, respectively.

### 3.5 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1基因全长cDNA序列及氨基酸特征

将HIF-1α、Tf和Hb-α1各扩增片段（测序所得的核苷酸序列）进行拼接，获得了半滑舌鳎HIF1α、Tf和Hb-α1基因cDNA全长，分别为3460 bp、2281 bp和594 bp，

GenBank登录号分别为：HQ909440 (CsHIF-1α)、HQ909442 (CsTf)、HQ219034 (CsHb-α1)。采用ExPASy网站[(http: //](http://expasy.org/tool))e[xpasy. org/tool)](http://expasy.org/tool))的Translate在线软件，预测其所编码的蛋白，结果显示CsHIF-1α基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)为2208 bp，推定编码735个氨基酸残基，5′和3′非翻译区长度分别为243 bp和1009 bp；在3′非翻译区发现有4个mRNA不稳定信号(attta) (图2-7); CsTf基因的cDNA ORF

为2034 bp，推定编码编码677个氨基酸残基，其5′和3′非翻译区长度为28 bp和219 bp，在3′非翻译区发现存在一个多聚腺苷酸加尾信号(aataaa)和一个mRNA不稳定信号(attta) (图2-8)；CsHb-α1基因的ORF为432 bp，其5′和3′非翻译区长度分别为41 bp和121 bp，在3′非翻译区发现一个多聚腺苷酸加尾信号(aataaa) (图2-9)。

采用ExPASy网站的Compute pI/Mw软件分别计算上述基因推定编码氨基酸的分子量和理论等电点，结果显示：CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1蛋白的分子量大小分别为

82.2 kDa、74.9 kDa和16.3 kDa；理论等电点分别为5.04、6.15和8.59。分别以SignalP

3.0 [(http: //www. cbs. dtu. dk/s](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/))e[rvices/SignalP/)](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) 和 TMHMM

（[http: //www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM/）](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/))对上述蛋白质进行信号肽和跨膜区结构预测，结果显示：CsHIF-1α无信号肽和跨膜区结构(图2-10和图2-11). CsTf序列N端存在信号肽序列，分裂位点在21与22位氨基酸之间，其信号肽序列为MKSLLVAALLGCLIAVLVDGE (图2-12), CsTf无跨膜区结构(图2-13). CsHb-α1 无

信号肽和跨膜区结构（图2-14和图2-15）。

运用Clustal W 2.0将CsHIF-α1、CsTf和CsHb-α1推定的氨基酸序列与其他物种的相应序列进行多重序列比对，然后经GeneDoc进行修饰。图2-16显示CsHIF-1α含有保守的bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、ODD、N-TAD和C-TAD结构域。此外，在其他物种中存在的一些重要的氨基酸位点也在CsHIF-1α中存在，如位于N-端17-64位氨基酸的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、脯氨酸-402、脯氨酸-564、酪氨酸-565、异亮氨酸-566以及C-TAD亮氨酸的疏水区的Asn-803、Leu-795、Cys-800、Leu-818和Leu-822。与人Tf相类似，CsTf同样可以分为N端和C端两个结构域，分别位于第23-326位氨基酸和337-656位氨基酸(图2-17). N端和C端两个结构域由一条短铰链区连接，每个结构域包含两个亚基，他们均由一系列α-螺旋及中心的β-折叠构成。两个亚基相互作用形成一个深的、亲水的金属离子结合位点（图2-18）。列比对显示CsTf的半胱氨酸都非常保守，其信号肽后的32个半胱氨酸中有24个参与二硫键的形成，共形成了12个二硫键结构，其中6个分布在N端，分布位于26-56、36-47、124-204、169-183、180-187和231-245位氨基酸处；另外6个分布在C端，分布位于

340-370、349-361、443-518、477-491、488-501和554-568位氨基酸处。经ScanProsite软件分析，CsTf铁结合位点位Asp71/385、Tyr101/198/420/512和His253/576. CsTf的转铁蛋白家族结构域分别为YYAVAVAKKE(101-110)、YFAVAVIKRD (420-429)、YDGAFRCLKEKGDVAF (198-213)和YTGALKCLADGVGDVAF (512-528) (图2-17)。

图2-19显示CsHb-α1具有6个保守的α结构(A-H)。人α1-β1界面结合的15个氨基酸位点在CsHb-α1发现了7个，而人α1-β2界面结合的13个氨基酸有12个在CsHb-α1中存在。此外，人α-血红蛋白稳定蛋白（α-Hemoglobin stabilizing protein, α-AHSP）结合部位在CsHb-α1中同样保守（3/6）。

1 aaaagtaacgctgtctccagcgtggcatttaatgtgaagaaaagaagaggacactggtta

61 atttcgcggacggaggcttaattatttgaagaaatacacgccgtgggtacttgtatgcta

121 atagtttgaggcttcacagactcaagctgttccaaaagcgcggattttgagttaatttct

181 cgacgggcccggacacagctgaatatcgaaagagaggctcaactcaggttcttcagtcct

241 gacATGGACACAGGAATTGTACCCGAAAAGAAAAGAGTGAGCTCAGAGCGGAGGAAGGAG

1 M D T G I V P E K K R V S S E R R K E

301 AAGTCGAGGGATGCAGCGCGATGCCGTCGTGGGAAAGAGTCAGAGGTTTTCTACGAGCTG

20 K S R D A A R C R R G K E S E V F Y E L

361 GCCCAGCAGCTGCCTCTGCCCCACAGCATCAGCTCCAGCCTGGATAAGGCTTCCATCATG

40 A Q Q L P L P H S I S S S L D K A S I M

421 AGACTCACCATCAGCTACCTGCGCATCAGGAAGCTGCTCAACCCAGATGACATGATGGCC

60 R L T I S Y L R I R K L L N P D D M M A

481 AAGGAGGAGACAGAGCTAGATATCCAGCTCAACAGCTCCTACCTGAAGGCTCTGGACGGC

80 K E E T E L D I Q L N S S Y L K A L D G

541 TTCCTGATGGTGTTGTCTGAAGGTGGAGATATCATTTATCTCACCGAGAATGTCAACAAA

100 F L M V L S E G G D I I Y L T E N V N K 601 TGCCTGGGGTTGGCACAGTTTGACCTGACGGGACACAGCGTCTTTGACTTCACACATCCC

120 C L G L A Q F D L T G H S V F D F T H P 661 TGTGACCAAGAGGAGCTGCGAGAGATGCTCATCCACAGATCGGGCTCCAAAAAGAACAAG

140 C D Q E E L R E M L I H R S G S K K N K 721 GAACAAAACACCGAGCGCAGCCTTTTTCTTCGTATGAAATGCACTCTGACAAGCAGGGGC

160 E Q N T E R S L F L R M K C T L T S R G 781 CGCACGGTTAATGTCAAGTCTGCTACATGGAAGGTTCTTCACTGCTCAGGTCACGTTCGT

180 R T V N V K S A T W K V L H C S G H V R 841 GTTTATGACAACAACACTGAGCAGACAAATGGCCACAAAGATCCTCCTGTCCCATACCTG

200 V Y D N N T E Q T N G H K D P P V P Y L 901 ATCCTGATCTGTGACCCCATTCCCCATCCCTCCAACATCGAGGCCCCTCTGGACACCAAG

220 I L I C D P I P H P S N I E A P L D T K 961 ACCTTTCTCAGCCGCCACACGATGGACATGAAGTTCACATATTGTGACGAGAGGATCACT

240 T F L S R H T M D M K F T Y C D E R I T 1021 GAGCTGATGGGCTATGATCCAGAGGACCTGTTGAACCGCTCTGTCTACGAGTACTATCAT

260 E L M G Y D P E D L L N R S V Y E Y Y H 1081 GCTCTGGACTCTGACCATCTCAACAAGACTCACCACAGTTTGTTTGCAAAGGGCCAAGTG

280 A L D S D H L N K T H H S L F A K G Q V

1141 AGCACAGGACAGTACAGGATGTTGGCCAAGAGAGGAGGCTTTGTGTGGGTGGAAACTCAA

300 S T G Q Y R M L A K R G G F V W V E T Q 1201 GCCACAGTCATCTACAACAACAAGAACTCACAGCCACAGTGTGTTGTCTGCGTCAACTTT

320 A T V I Y N N K N S Q P Q C V V C V N F 1261 GTTCTCAGCGGCATTCAGGAGGAGAAACTGATCCTGTCTCTGGAGCAGACGGAGGATGTG

340 V L S G I Q E E K L I L S L E Q T E D V 1321 AAGCCAGTGAAGGAGGAGCAGGAGGAAGAAAAGGCAGAGGTGTTGAGCGGTCTGTCTGAC

360 K P V K E E Q E E E K A E V L S G L S D 1381 ATGCCTCTTACCCTGCTGAAGGAAGAGGAAGATACTAAAGTCCCAGAGTTGGACGTGACC

380 M P L T L L K E E E D T K V P E L D V T 1441 AAAGTGTTTACCCAGTCGGTGGACACCTCATCAAGTCTGTACGACCAGCTGAAGGGTGAG

400 K V F T Q S V D T S S S L Y D Q L K G E 1501 CCTGAGGCTCTCACTCTCCTGGCTCCTGCAGCTGGAGACACGATCATCTCCCTGGACTTC

420 P E A L T L L A P A A G D T I I S L D F 1561 AGCTGCAGCCCTGATTCAGAGATTCAGTTGCTGAATGACGCCCCCCTCTACAACGACGTG

440 S C S P D S E I Q L L N D A P L Y N D V 1621 ATGCTTCCACCCAGTGAGCCTCTCAACATCACTGTCACCACCGGCTCTGACAATTCCAAA

460 M L P P S E P L N I T V T T G S D N S K 1681 TCTGAGAGCTACGCTCCACCTCCACCTGCTGCAACAACCAGCAACTGCTCCTCAGAGACT

480 S E S Y A P P P P A A T T S N C S S E T 1741 GACAGTCAGTTGGACTTCTGCTTCCCCATGGACTCGGACTTCAAACTAGACTATGTGGAG

500 D S Q L D F C F P M D S D F K L D Y V E 1801 AAGTTGTTTGCCATCGACACAGAGCCCAAAACCAGCTTCAACTCAGAGATAATGGCGGAC

520 K L F A I D T E P K T S F N S E I M A D 1861 ATAGACCTGGAGATGTTGGCTCCCTACATCCCCATGGACGATGACTTTCAGCTGCGCTGT

540 I D L E M L A P Y I P M D D D F Q L R C 1921 CTGACCCCAGAGGAGCCACTGACGGGTGTCCAGGTCAAATCCCAACACAGTTCGCCACTT

560 L T P E E P L T G V Q V K S Q H S S P L 1981 CATATCAAACAGGACCTGACGGGCAGTTATCCCAGCTCACCGGCCAGTCGCACAGCTTCA

580 H I K Q D L T G S Y P S S P A S R T A S 2041 CCGGCTTTACCAGAACCAGTGAACTCATTAAATCTTGCCAGGCTCATTGGTAAAAGGTCG

600 P A L P E P V N S L N L A R L I G K R S

2101 CCACAGTCGGACAAAGACGTCTCACTGAGAACACTGGTCGCTCAGAACACACAGCGCAAA

620 P Q S D K D V S L R T L V A Q N T Q R K

2161 AGAAAACTGTGTGACCTCAAAGAGATCATAGAACAGGGAACTTTGCTGGAAGGACAAGGG

640 R K L C D L K E I I E Q G T L L E G Q G

2221 GAACAAGGGAAGAAGTTAAAAGCTACAGAGCTGGGATCAACTACCACCATCCTCCTGCTG

660 E Q G K K L K A T E L G S T T T I L L L

2281 CCTTCAGATCTGGCGAGTCGTCTGCTGGGCAGCACCTCGGACGGCACCGGTTCTCTCTTC

680 P S D L A S R L L G S T S D G T G S L F

2341 ACGCTGCCGCATCTTACCCGCTACGACTGCGAGGTCAACGCACCACTGCAGGGCCGTCAG

700 T L P H L T R Y D C E V N A P L Q G R Q

2401 TACCTGCTGCAGGGGGAGGAGCTGCTGCGCGCACTGGACCATGTCATCTGAggcatagct

720 Y L L Q G E E L L R A L D H V I \*

2461 gagcctgctcactgttggactagactggacactacaatttatcccctctcctagactcct

2521 acccatataccctcccacccccgctgccctttatttaagtatccatatgaattttgagta

2581 tagtttggctgctgtttgtgcacatcatgtgatatctgcagcattccaccgtgacaaacg

2641 ccatagcagcatccagttttttggtgcaagggattcacgcatcgtcagatgtccactcgt

2701 tgttgttgttcctgcgctctccaccagggggagtctctcagcacacagcgcctccagatg

2761 actcttctccagcaggtcaccacagaccctggcgctactgccagcagtgtattgtaagct

2821 tcagtcgcacaatttatattttcttaaaaagaaaaatattaccagcaatatatattgagt

2881 ctttttaaaagtagttttaatgggattcgaacagttttatttttttccccttcccatact

2941 tgtatgttgtagtacttgtacgtaacaagacgtctttagtcgacaaaagtatgaaaacat

3001 tgttgtaatgttagcctcctttattagccaccagtcgttggggtgaaaacataattgtgt

3061 agcagtccagcacatgtcactttattactttactgtaagtgtgtgtcactgtacatacca

3121 gggagattttactctatccagtatggcttcactgctttcaagtcaattatctttagtttt

3181 gcttctcctcatggaggagagggagaaaatgctctctctacatgaaggcagatcgtgttt

3241 ttaactgtgtcaaacacaggaatgtgtttaaataagtggaatcgcagcagttcagagatt

3301 taaaattgtgtgattgtcttcatcaaagtaacattggtgagttgtttgttttctcattta

3361 atggtagtcgctaacaacatcgcttcatgacataatgttgtcccatgcttattgttgtta

3421 tctaacattaaacggctttattaaagcaaaaaaaaaaaaa

图 2-7 CsHIF-1α核苷酸及推定的氨基酸序列

CsHIF-1α的GenBank登录号为HQ909440。推定的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方，为大写字母。左边的数字为核苷酸或氨基酸的位置。起始密码子加框，终止子用星号表示。mRNA不稳定信号(attta)以下划线表示。

Fig. 2-7 Nucleotide and deduced amino acid sequence of HIF-1αfrom half-smooth tongue sole (*C. semilaevis*)

The full-length cDNA sequences of CsHIF-1αwere deposited to GenBank and GenBank accession

No. was HQ909440. Translated amino acid sequence is shown under nucleotide sequence. Numbers to the left of each row refer to nucleotide or amino acid position. The initiation codon (ATG) is boxed and the translational stop site (TGA) is indicated by an asterisk. The mRNA unstable signal (attta) is underlined.

1 gggggtctgctgaatttcagactccaacATGAAGTCTCTTCTCGTTGCAGCGCTGCTCGG

1 M K S L L V A A L L G

61 ATGCCTCATTGCGGTTTTGGTGGACGGTGAAAGGGTGAAGTGGTGCGTCACCTCACCTGC

12 C L I A V L V D G E R V K W C V T S P A

121 GGAGCTTGCAAAGTGTCGGAGTTTGGAGGGCTCTACAAAACTCACCTGCGTGGACAGAGC

32 E L A K C R S L E G S T K L T C V D R A

181 AAGCATCATCGATTGTCTGACTGCAATTAAGAATTCCGAGGCAGATGCCATCACCTTGGA

52 S I I D C L T A I K N S E A D A I T L D

241 CGGTGGAGAAATCTACACTGCTGGACTGGACGACTACCAATTGCATCCCATTATTGCTGA

72 G G E I Y T A G L D D Y Q L H P I I A E

301 AGAGTACAAATCTGCTTCAGAAACATGTTACTATGCTGTTGCTGTGGCAAAGAAGGAAAC

92 E Y K S A S E T C Y Y A V A V A K K E T

361 TAACTTCGTCTTCAAAGACCTCAAGGGAAAGAAATCTTGTCACACTGGGTTGGGGAAGTC

112 N F V F K D L K G K K S C H T G L G K S

421 TGCTGGATGGAACATTCCCATTGGAACGCTGCTGTCCAGGAGTTATTTAAGCTGGAATGG

132 A G W N I P I G T L L S R S Y L S W N G

481 TAGTGACAGCAAATCCTTGGAAACTGCTGTCAGTGAATTCTTTGGAGGCAGCTGTGTTCC

152 S D S K S L E T A V S E F F G G S C V P

541 TGGAGCTAAAAATCACCCCAGACTCTGTGAACTGTGTAATACAGACTGCAGCATGACTAG

172 G A K N H P R L C E L C N T D C S M T S 601 TACTAACAGATACTATAACTATGATGGTGCTTTCAGGTGTCTGAAGGAGAAAGGAGATGT

192 T N R Y Y N Y D G A F R C L K E K G D V 661 GGCTTTCATTAAGCACCTCACCATACCTGACGGGGAAAAGGACCAATACGAGCTGCTGTG

212 A F I K H L T I P D G E K D Q Y E L L C 721 CTTGGATAACACCAGAGCACCTATAGACAATTATAAAAGCTGTAACCTGCAGAGAGTACC

232 L D N T R A P I D N Y K S C N L Q R V P 781 AGCTCATGCTGTTGTCACACGAAAAGACAAGGATCTTGAGGATCTCATTTGGAATGCTCT

252 A H A V V T R K D K D L E D L I W N A L 841 CGATGAGACTCAAAGACAGCATCTAGGCGTCCTTTTCAAAACTGACCACGGAAAGAACCT

272 D E T Q R Q H L G V L F K T D H G K N L 901 GATGTTCAAGGATTCAACAGAGAAATTGGTCAGGCTCCCCCCGAACACAGACGCCTTCAC

292 M F K D S T E K L V R L P P N T D A F T 961 GTATCTGGGTGTCAAGTACATGAGAATCCTCCAAAGCCTGAAGAGAGTCAATATTCCCAC

312 Y L G V K Y M R I L Q S L K R V N I P T

1021 CAGTTCACCTGAAGGCCTCAGATGGTGTGTTTTGGGTGAGGAGACATCAAAGTGTGACGA

332 S S P E G L R W C V L G E E T S K C D D 1081 TTGGAATATCAAAACAATGGAACTGACATGCGTAAAAGGAGAATCACCTGAACATTGTCT

352 W N I K T M E L T C V K G E S P E H C L 1141 GAAGTTAATTATGCGTTCAGATGCTGATGCAGCAACAGTAGATGGTGGACAAGTGTACAC

372 K L I M R S D A D A A T V D G G Q V Y T 1201 AGCCGGAAAGTGTGGTCTGGTTCCTGCTATGGTGGAGCAGTATGATGCAGAAAAGTGCAG

392 A G K C G L V P A M V E Q Y D A E K C S 1261 CAGCGCTCGGGATTCTGGATCCCATTACTTTGCTGTGGCTGTGATAAAGAGAGACTCAGG

412 S A R D S G S H Y F A V A V I K R D S G 1321 TATCACCTGGGACAATCTGCAGAACAAGAAGTCCTGCCACACAGGCATTGGTAGAACTGC

432 I T W D N L Q N K K S C H T G I G R T A 1381 TGGCTGGAACATTCCCATGGGTCGCATTCACGAAAATACTCAGAGCTGTGACTTCAAGTC

452 G W N I P M G R I H E N T Q S C D F K S 1441 CTTCTTCAGTCAAAGTTGTGCCCCTGGAGCAGATGTGAGCTCCACGCTCTGTTCTCTCTG

472 F F S Q S C A P G A D V S S T L C S L C 1501 TGTTGGTGATACAGAGAATCAGCACAAGTGCAAACCCACAAGTGAAGAGCGGTACAACGG

492 V G D T E N Q H K C K P T S E E R Y N G 1561 CTACACTGGAGCCTTAAAATGTCTTGCGGATGGTGTTGGTGATGTTGCCTTCACCAAATA

512 Y T G A L K C L A D G V G D V A F T K Y 1621 CTCAGTCCTAATTGACAACAGCAATGGCATGGGTCTAAACTTAAATCTTGATGACTACCA

532 S V L I D N S N G M G L N L N L D D Y Q 1681 ATTGATCTGCCCTGGAAGAGCTCCAGTGCCAATAGACAAGTTTTCTGAATGTCATTTGGC

552 L I C P G R A P V P I D K F S E C H L A 1741 TAAAGTGCCAGCACATGCTGTTGTGACTCGTCCAGAGAAGAGGGATGATGTGGTTAAATT

572 K V P A H A V V T R P E K R D D V V K F 1801 TCTGAAGACGGAGCAGGGTAAATACGGAACCAGTGACGGTAACGCCGAATTTCAGATGTT

592 L K T E Q G K Y G T S D G N A E F Q M F 1861 CAGTTCAGCTTCTTACGCTGCCAAAAATATGCTGTTCAAGGACCGTACACAGTGTCTCCA

612 S S A S Y A A K N M L F K D R T Q C L Q

1921 AGAGATTCCAATTGGACAAAACTTTGAACAGTTTTTGGGAGAGGAGTACATGAAAGTCAT

632 E I P I G Q N F E Q F L G E E Y M K V M

1981 GAAATCCCTCCGAAAATGTGAAGAAAACACTTCAGAACTGGAGAGGTCCTGCACTTTCCA

652 K S L R K C E E N T S E L E R S C T F H

2041 CCCATGCCAGAATAACATATAAtaatcatggacgttgtggtacctcagatgattcatgat 672 P C Q N N I \*

2101 gaaacatctgtcctttcaaccacacatacagtatttcaatactgctcttcaaaccattat

2161 tttctgtaaacctgtaatagattaagttgcaattcaatttacatcaacaagtgaaaaaga

2221 atgtgtttcactgtttaaataaaatatttctttcatttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

图 2-8 CsTf核苷酸及推定的氨基酸序列

CsTf的GenBank登录号为HQ909442。推定的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方，为大写字母。左边的数字为核苷酸或氨基酸的位置。起始密码子加框，终止子用星号表示。mRNA不稳定信号(attta) 以单下划线表示；多聚腺苷酸加尾信号(aataaa) 以双下划线表示。

Fig. 2-8 Nucleotide and deduced amino acid sequence of Tf from half-smooth tongue sole

(*C. semilaevis*)

The full-length cDNA sequences of CsTf were deposited to GenBank and GenBank accession No. was HQ909442. Translated amino acid sequence is shown under nucleotide sequence. Numbers to the left

Of each row refer to nucleotide or amino acid position. The initiation codon (ATG) is boxed and the translational stop site (TGA) is indicated by an asterisk. The mRNA unstable signal (attta) is single and polyadenilation signal site (aataaa) is double underlined.

1 ggggaattccagttgttagcagcacaggaaccgaagccaaaATGAGTCTGAACAGCATTG

1 M S L N S I D

61 ACAAGGAGCGCATCAGGATCCTCTGGAGCAAAATCTCCAAAGACTCTGACGCCATCGGCG

8 K E R I R I L W S K I S K D S D A I G A

121 CAGAGGCTCTGGGCAGGTTGTTCGCGGCGCACCCCCAAACCAAGACCTACTCCACCCACT

28 E A L G R L F A A H P Q T K T Y S T H F

181 TTAAGGATTTTACTTACAACAGCCCTCAGGTGAAGGAGCATGGGAAGCTGGTGATGAAAG

48 K D F T Y N S P Q V K E H G K L V M K G

241 GAATCAAGCAGGCCTACGAGAACATCGACGACATGGTCACCGGGCTGTTGGACCTCAGCG

68 I K Q A Y E N I D D M V T G L L D L S E

301 AGAAGCACGCCTTCACCCTGAGAGTGGATCCCAGCAACTTCAAGTTGCTGTCTAGTTGCT

88 K H A F T L R V D P S N F K L L S S C F

361 TCCACGTGGTCCTTTCCAAGAGGTACCCCAACGACTACACCGACGAGGCCCACCTCTCCT

108 H V V L S K R Y P N D Y T D E A H L S F

421 TCGACAAATTCCTTGCCAACGTGGCTCTGGCTCTGTCCGAGAAATACCGCTAAactgcac

128 D K F L A N V A L A L S E K Y R \*

481 ccagtcagcgacaggcatattggcatagcgccaccacatggacgctgccgaaaaatgtca

541 aatataagaagatacaaataaacttcacattaactaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

图 2-9 CsHb-α1核苷酸及推定的氨基酸序列

CsHb-α1的GenBank登录号为HQ219034。推定的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方，为大写字母。左边的数字为核苷酸或氨基酸的位置。起始密码子加框，终止子用星号表示。多聚腺苷

酸加尾信号(aataaa) 以双下划线表示。

Fig. 2-9 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CsHb-α1 from half-smooth tongue sole

(*C. semilaevis*)

The full-length cDNA sequences of CsH-α1 were deposited to GenBank and GenBank accession No. was HQ219034. Translated amino acid sequence is shown under nucleotide sequence. Numbers to the left

Of each row refer to nucleotide or amino acid position. The initiation codon (ATG) is boxed and the translational stop site (TAA) is marked as asterisk. The polyadenilation signal site (aataaa) is double underlined.



图 2-10 SignalP软件分析CsHIF-1α蛋白的信号肽

Fig. 2-10 Prediction of signal peptide within CsHIF-1αprotein by SignalP software



图 2-11 TMHMM软件分析CsHIF-1α蛋白的跨膜区结构

Fig. 2-11 Prediction of transmembrane region within CsHIF-1αprotein by TMHMM software



图 2-12 SignalP软件分析CsTf蛋白的信号肽

Fig. 2-12 Prediction of signal peptide within CsTf protein by SignalP software



图 2-13 TMHMM软件分析CsTf蛋白的跨膜区结构

Fig. 2-13 Prediction of transmembrane region within CsTf protein by TMHMM software



图 2-14 SignalP软件分析CsHb-α1蛋白的信号肽

Fig. 2-14 Prediction of signal peptide within CsHb-α1 protein by SignalP software



图2-15 TMHMM软件分析CsHb-α1蛋白的跨膜区结构

Fig. 2-15 Prediction of transmembrane region within CsHb-α1 protein by TMHMM software



N-NLS bHLH

PAS-A

PAS-B

PAC

ODD

N-TAD

C-NLS

C-TAD

Fig. 2-16 不同脊椎动物HIF-1α氨基酸序列比对分析

序列比对用ClustalW v2.0和GeneDoc进行分析。氨基酸序列比对中的缺口用破折号表示。

HIF-1α的重要功能区(bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、N-TAD和C-TAD)加框。各结构域标注于序列上方。

Fig. 2-16 Alignment of amino acid sequences of HIF-1αfrom different species of vertebrates The alignment was performed using ClustalW v2.0 and GeneDoc. Gaps are marked by dashes in the

Amino-acid sequences. The HIF-1αfuntional regions (bHLH, PAS-A, PAS-B, PAC, N-TAD and C-TAD) are boxed. Domains are labeled above the alignments.



N-端C-端

图2-17 不同脊椎动物Tf氨基酸序列比对分析

序列比对用ClustalW v2.0和GeneDoc进行分析。氨基酸序列比对中的缺口用破折号表示。保守的半胱氨酸残基用箭头标注。Tf家族结构域以方框标注。

Fig. 2-17 Alignment of amino acid sequences of Tf from different species of vertebrates

The alignment was performed using ClustalW v2.0 and GeneDoc. Gaps are marked by dashes in the amino-acid sequences. The conserved cystines are marked by arrows. The Tf family motifs are boxed.



N-term

图2-18 CsTf的三级结构

α螺旋表示为绿色；β折叠表示为红色；其他残基的颜色为白色。N端和C端金属离子结合位点用灰色圆球代表，并分别标注位FE1和FE2。

Fig. 2-18 The tertiary structure of the CsTf

Theαhelix was marked as green. Theβfold was marked as red; other residues were marked as white. The iron-binding sites were marked as gray dot and expressed as FE1 and FE2.



图2-19 不同脊椎动物Hb-α1氨基酸序列比对

序列比对用ClustalW v2.0和GeneDoc进行分析。氨基酸序列比对中的缺口用破折号表示。保守的α螺旋结构以双箭头标注；序列上方的标注表示人Hb-α1重要的氨基酸位点，其中AHSP结合位点用三角形箭头表示。在α1β1界面与β球蛋白结合部位用圆黑点（ ）表示；在α1β1界面与β球蛋白结合部位用黑方框（ ）表示。序列下方相应的标注表示半滑舌鳎中的保守位点。氨基酸位点

发生改变的以三角形( )在序列下方标注。



Fig.2-19 Alignment of amino acid sequences of Hb-α1 from different species of vertebrates The alignment was performed using ClustalW v2.0 and GeneDoc. Gaps are marked by dashes in the amino-acid sequences. The conservedαhelices are marked as double arrow above the sequence

Comparisons. The triangle arrow above a sequence comparison shows the predicted AHSP-binding sites of human Hb-α1. Circles above a sequence show residues that come into close contact withβglobin atα1β1 interface in human Hb-α1. Squares above a sequence showβglobin contact sites at theα1β2 interface of human Hb-α1. The symbols below the sequence comparisons show the conserved amino acids in CsHb-α1. Changes at amino acids sites are marked as triangles below sequence comparisons.

通过DNAStar中的MegAlign程序进行蛋白同源性分析，结果表明不同物种的HIF-1α相似性为39.2%-91.6%. 其中CsHIF-1α与其他脊椎动物的同源性在52.3-81.8%之间，与鼠(*Mus musculus*) HIF-1α(MmHIF-1α)相似性最低，为52.3%，与人(*Homo sapiens*) HIF-1α(HsHIF-1α)序列相似性为52.7%，与鲈鱼(*Perca fluviatilis*) HIF-1α(PfHIF-1α)相似性最高，为81.8% (图2-20). 进一步将CsHIF-1α结构域与人和斑马鱼HIF-1α的结构域进行相似性分析，结构显示CsHIF-1α的bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、ODD、N-TAD和C-TAD结构域与人HIF-1α的bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、ODD、

N-TAD和C-TAD结构域相似性分别为85.7%、75%、82.7%、78.2%、35.1%、63%和66%，与斑马鱼HIF-1α的bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、ODD、N-TAD和C-TAD 结

构域相似性分别为87.5%、76.8%、88.5%、80%、50.2%、72.2%和68% (图2-21)。



图2-20 推定的CsHIF-1α氨基酸序列与其它序列的相似性比较

Fig. 2-20 Sequence identity of putative CsHIF-1αamino acid sequence in comparison with their respective counterparts



图 2-21 半滑舌鳎HIF-1α与人和斑马鱼HIF-1α结构域相似性比较

Fig. 2-21 Comparison of identity between domain of the HIF-1αfrom human, zebrafish and

Half-smooth tongue sole

CsTf蛋白与其他物种的同源性在25.2-63.3%之间，与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的TF (PoTf)最高(63.3%)，与果蝇(*Drosophila melanogaster*)的TF (DmTF)最低(39.1%) (图2-22)。

CsHb-α1与其他脊椎动物的Hb-α1序列相似性在46.2% - 58%之间，其中与人Hb-α1相似性最低，为46.2%；与日本青鳉的Hb-α1相似性最高，为58%。



图 2-22 推定的CsTf氨基酸序列与其它序列的同源性比较

Fig. 2-22 Sequence identity of putative CsTf amino acid sequence in comparison with their respective counterparts

### 3.6 系统进化分析

为进一步了解半滑舌鳎HIF-1α与其他脊椎动物相应蛋白的进化关系，以草鱼HIF4α(CiHIF4α)为外类群，应用Mega 4.1软件构建了HIF-1α蛋白的系统发育树(N-J树)。结果显示，该系统进化树可以分为两个大枝，一枝包括所有鱼类的HIF-1α，另外一枝包括鸟类、爬行类、和哺乳类的HIF-1α。而在鱼类HIF-1α这一枝中，又分为两个亚枝，其中一枝包括斑马鱼和草鱼的HIF-1α，另外一枝包括半滑舌鳎和其他鱼类的HIF-1α。该系统进化树的Bootstrap值均高达90%以上（图2-23）。

Tf系统进化树可以分为三个大枝，一枝包括了昆虫类的Tf，一枝包括鸟类和哺乳类的Tf，另外一枝包括了所有鱼类的Tf。其中昆虫类的Tf与哺乳类、鸟类和鱼类的Tf之间的Bootstrap值较低(<50%)。半滑舌鳎的Tf与其他鱼类的Tf聚在一起，具有较高的Bootstrap值(图2-24)。



PbHIF1αZvHIF1α

GaHIF1αPfHIF1α

GcHIF1αDlHIF1α

MuHIF1α

CsHIF1αSsHIF1α

DrHIF1αCiHIF1α

XlHIF1αHsHIF1α

MmHIF1αAcHIF1α

MgHIF1αGgHIF1α

Fish HIF1α

CiHIF4α



图2-23 HIF进化树

进化树上的Bootstrap值为1000重复计算所得，CsHIF-1α用实心的三角形（▲） 标注。各序列

GenBank登录号见表2-2. Fig.2-23 Phylogenetic tree of HIF

Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. CsHIF-1αwas indicated with solid triangle (▲). The sequences used for this analysis were listed in Table 2-2.



AsTF SaTF

PmTF

LcTF DlTF

OlTF

NcTF TbTF OmTF

PoTF

XlTF

CsTF

SsTF MmTF

AmTF

HsTF

DmTF



图2-24 Tf进化树

进化树上的Bootstrap值为1000重复计算所得，CsTf用实心的三角形（▲） 标注。各序列

GenBank登录号见表2-3.

Fig. 2-24 Phylogenetic tree of putative Tf

Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. CsTf was indicated with solid triangle（▲）.

The sequences used for this analysis were listed in Table 2-3

## 4 讨论

在本章实验中，我们克隆得到了半滑舌鳎(*C. semilaevis*) 中三个新基因：

CsHIF-1α、CsTf和Cs Hb-α1，相应的序列提交到GenBank数据库中。CsHIF-1αcDNA

（GenBank登录号：HQ909440）全长为3460 bp，其中ORF为2208 bp，编码735个氨基酸。CsTf cDNA (GenBank登录号：HQ909442) 全长为2281 bp，其中ORF为2034 bp，编码677个氨基酸。CsHb-α1 cDNA (GenBank登录号：HQ219034)全长为594 bp，其中ORF为432 bp，编码144个氨基酸。序列比对显示CsHIF-1α与其他物种的HIF-1α的氨基酸序列相似性为52.3-81.8%. CsHIF-1α含有保守的bHLH、PAS-A、PAS-B、PAC、

ODD、N-TAD和C-TAD结构域，其中bHLH是HIF结合DNA和二聚化的重要部位，PAS-A、PAS-B主要参与配体的结合、二聚化和其他生物学功能[97]。值得一提的是，大西洋黄花鱼(*Micropogonias undulatus*)的HIF-1αPAS-A结构域中缬氨酸(Val)被异亮氨酸所取代[48]。通过序列比对我们发现Val位点存在于包括半滑舌鳎、斑马鱼等鱼类的HIF-1α中，提示该位点的突变对于HIF-1α的功能可能并无影响。更为重要的是，在人类HIF-1α发现的一些重要的氨基酸位点在CsHIF-1α中同样存在。位于N-端17-64位氨基酸的NLS对于调节HIF-1α核质交换具有重要的作用[98, 99]。Pro-402是一个重要的羟基化位点，主要调节HIF-1α在常氧状态下的降解[100]。Pro-564、Tyr-565、Ile-566是pVHL识别序列PYIXXDDDFXL中的保守氨基酸位点[101]，主要控制HIF-1α在常氧状态下的泛素/蛋白酶体降解[102]。Leu-574起到决定Pro-564是否发生羟基化，进而调节HIF-1α蛋白水解[103]。C-TAD的富含亮氨酸的疏水区中的的Asn-803、Leu-795、Cys-800、Leu-818和Leu-822是HIF-1α与转录因子CBP/p300相互作用的氨基酸位点[104, 105]。上述结果说明，在HIF进化的过程中，一些重要的位点具有高度的保守性。同时，也提示在脊椎动物进化的早期就已出现了耐受低氧的分子机制，这些机制一直保留到了现代，在长期的进化过程中并未出现较大的突变。

近年来，随着不同物种基因组测序的完成，Tf已在昆虫、两栖类、爬行类、鱼类、鸟类和哺乳类得到克隆鉴定。不同种类昆虫的Tf长度变化较大，同时C-端Tf片段已经失去了结合铁离子的特性。文昌鱼(*Ciona intestinalis*)的Tf还有2个Tf片段[106]，而海鞘的Tf却不含C端Tf片段[107]。此外，从海藻类中还发现了3个Tf片段的Tf-样蛋白[108]，表明Tf家族在进化的过程中的复杂性。鱼类Tf多为669-673个氨基酸。本文所克隆得到的CsTf编码677个氨基酸，比其他鱼类多了4-8个氨基酸残基，与两栖类的Tf (679个氨基酸)长度较为接近[109]。CsTf蛋白与其他物种的同源性在25.2-63.3%之间。序列比对显示一些重要的氨基酸位点在CsTf中同样存在，如N端的Asp-63、Tyr-95、Tyr-188和His-249在CO32-的协助下能够与铁离子结合。上述位点的

保守性提示CsTf在某些功能上与与高等脊椎动物的Tf相一致。在CsTf信号肽后有

12个二硫键结构，其中6个分布在N端，6个分布在C端。大多数脊椎动物中通常形成15对二硫键，如鸡和人的转铁蛋白中有6个二硫键分布在N端，9个分布在C端，表明部分二硫键在半滑舌鳎中缺失。

Terwilliger将动物中的呼吸蛋白分为Hb、血蓝蛋白(hemocyanin, Hc)和蚯蚓血红蛋白(hemerythreins, Hr)三种[110]。Hb分布最为广泛，存在于脊椎动物和部分无脊椎动物中（如部分软体动物、部分节肢动物）。Hc是存在于节肢动物和部分软体动物血淋巴中的的一种含铜的胞外呼吸蛋白，其氨基酸序列和空间结构差异较大。Hr又称血紫蛋白，是现存于星虫、鳃曳动物、腕足类和部分多毛纲环节动物等少数原始海洋无脊椎动物中的一类呼吸蛋白[111]。Hb作为球蛋白家族的主要成员，在氧气的运输和二氧化碳的排放过程中具有重要的作用。本文克隆得到的半滑舌鳎Hb-α1与其他物种的Hb具有较高的序列相似性。同时，一些重要的位点如在α1β1和α1β2界面的氨基酸位点在CsHb-α1中存在，表明我们得到的序列的确为半滑舌鳎的Hb-α1基因。序列比对显示，在CsHb-α1中存在一些氨基酸位点的改变、插入及缺失。如在CsHb-α1 47位氨基酸为

Lys，而在斑马鱼Hb-α1为Ala，青鳉为Pro，人Hb-α1 47位氨基酸则缺失。Miyata et al

[112]发现在47位插入氨基酸残基对于鲤鱼Hb-α1的结构和功能并无显著影响。此外，在人Hb-α1 39位氨基酸为Thr，而在半滑舌鳎及其他硬骨鱼类Hb-α1中该位点为Gln. Thr 39可能在Hb-α和Hb-β亚基之间形成氢键具有重要的作用。但将Thr 39突变为

Ser或Val对Hb的结构并无影响[113]。上述分析提示在进化的过程中Hb-α1中氨基酸的改变多发生在一些对于其结构或功能无直接影响的位点处。

CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1分子的克隆与特征分析为我们后期的实验奠定了基础。

# 第三章 低氧胁迫下半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1表达分析

## 1 前言

继了解了半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1分子的基因特征后，更让我们感兴趣的是这些基因在低氧胁迫下的反应变化规律。因此，本章中我们首先对半滑舌鳎耐受低氧的能力进行了研究，之后通过荧光定量PCR检测了半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1在低氧胁迫下的基因表达变化，为深入研究鱼类耐受低氧机制奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 主要仪器

荧光定量PCR扩增仪：ABI 7500；

溶解氧检测仪：YSI 556 Multiprobe system；其他未注明的仪器设备同第二章。

### 2.2 主要试剂与菌种

PrimeScriptTM 1st strand cDNA synthesis kit: 购自TaKaRa公司

SYBR Premix ExTaq：购自TaKaRa公司其他未注明的试剂及配制同第二章

### 2.3 半滑舌鳎耗氧率和窒息点的检测

#### 2.3.1 实验鱼

实验鱼购买自盐城市陈港渔场。运回实验室后，放入鱼池内进行驯养，鱼体健壮无伤痕，体重19.41-94.31 g，体长16.3-26.8 cm。

#### 2.3.2 实验用水

实验用水取自盐城市陈港的天然海水，经过12 h以上沉淀后，再用脱脂棉过滤。不同梯度的盐度，用经曝气24 h以上的自来水、粗海盐和自然海水调节，并用SYC2-2型海水盐度计测量盐度。

#### 2.3.3 实验方法

根据参考文献制成的呼吸仪，呼吸仪的体积为22 L，水由贮水缸流出，经水位稳

定器，从呼吸仪的下进水口流入呼吸仪，最后由呼吸仪的上出水口流出，其周围贴满灰色即时贴，用于遮光，使鱼处于黑暗状态，以排除光照对鱼生理活动的影响。实验时将各呼吸仪置于一只大水族箱内，同时用加热器和温控仪控制贮水缸和水族箱的水温，以充分保证呼吸仪内的水温恒定，并用增氧泵对贮水缸的水进行充氧，使进水口的溶氧量维持在5.5 mg/L以上。贮水缸内采用一根总进水管，再多管分流进入各呼吸仪，以保证各呼吸仪进水口的溶氧量相同。每个呼吸仪内放规格基本一致的试验鱼3-4尾。

实验前，根据实验盐度要求，将试验鱼随机分为6组（每组20尾），在不同的盐度下训养6-8 d (盐度每天升降1-2)，再禁食2 d。待排尽粪便后，放入呼吸仪适应2-3 h，然后将呼吸仪密封，每次试验均设一个空白对照组。在各呼吸仪的上出水口处取样，每1 h取样1 次，重复（连续）测定3 次，每次取3 个平行样，测定溶氧量，取其平均值。水中的溶氧量采用YSI溶解氧测定仪进行测定。整个实验过程中，呼吸仪的水温控制为22.0±0.5℃，出水口的流量为167±3ml/min。试验结束后，立即用纱布吸干鱼体表水分，并用电子天平称重（精确至0.01g）。同时，为了排除耗氧率昼夜变化的影响，不同水平梯度的实验均于当天的同一时间内进行。

窒息点的测定也采用上述装置，将呼吸室的进、出水口截断，每一呼吸室准确加入5 L海水，放鱼4尾，然后放入培养箱（用于控制温度），用增氧泵充氧，等水温达到要求后，立即用保鲜膜封好，并开始计时，同时观察鱼的呼吸活动情况，当呼吸室内的试验鱼死亡半数时，立即取样，并停止计时，测定其溶氧量即为窒息点。

耗氧量和耗氧率按下式计算：

Qc (耗氧量mg/p·h) = (D1 -D2)·F /N QR (耗氧率mg/kg·h) = (D1 -D2)·F /W

式中：D1为空白呼吸室出水口的溶氧量(mg/L)；D2为有鱼呼吸室出水口的溶氧量(mg/L)；F为流量(L/h)；W为鱼总重(kg)；N为鱼尾数（p）。

### 2.4 半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α1荧光定量检测方法的建立

#### 2.4.1 HIF-1α、Tf、Hb-α1定量引物的设计与特异性检测

荧光定量引物根据软件Premier Express 2.0进行设计，引物应尽可能避免二级结构，如发夹、二聚体等结构。引物所扩增的目的片段大小在100-300 bp范围。为确保引物的特异性，将设计好的引物再用PCR Design软件进行核实，如果发现存在非特异性互补区，则重新设计引物。接着对引物进行预试验，检测引物扩增的特异性。经验证符合要求并最后用于定量的引物见表3-1。

表3-1 荧光定量引物

Tab. 3-1 Primers used for Quantitative PCR

| Primer | Sequence (5′ -3′) | Sizes of product (bp) |
| --- | --- | --- |
| QHIF1-F1 QHIF1-R1 QTF-F1 QTF-R1 QHb-F1 QHb-R1  Qactin-F1  Qactin-R1 | TGAGCTCGGAGCGCAGAAAG CTGGGTTGAGCAGCTTCCTG GGTGAAAGGGTGGAGTGGTG CTCTTCAGCAATAATGGGATG AACCAAGACCTACTCCACCCA CTTCTCGCTGAGGTCCAACA CAGCCATACTGTGCCCATCT  TCCTTGATGTCACGCACGAT | 189  213  147  165 |

#### 2.4.2 CsHIF-1α、Tf、Hb-α1质粒制备

用所设计的引物QHIF1-F1/ QHIF1-R1、QTF-F1/ QTF-R1、QHb-F1/ QHb-R1 和

Qactin-F1/ Qactin-R1，以半滑舌鳎肝脏cDNA为模板进行PCR，分别对目的基因片段进行扩增。PCR反应的循环条件：94℃预变性4 min；94℃变性30 s、63℃退火20 s、72℃延伸20 s，38个循环；72℃延伸10 min。将PCR产物琼脂糖凝胶电泳，切取目的片段，回收，并与pMD18-T载体(TaKaRa)连接，转化，PCR检测筛选阳性克隆，将阳性克隆送上海生工测序。

测序结果比对证实为目的基因片段后，接种培养阳性克隆菌株，利用质粒小量制备试剂盒（天根）提取质粒，参照产品说明书进行。将所获得的质粒-20 ℃冻存。

#### 2.4.3 标准曲线建立

把质粒原液进行10倍系列稀释，稀释到原液的10-1-10-8，实时荧光定量PCR在ABI 7500上完成。20µL PCR反应体系包括1µL cDNA模板，10µL 2×SYBR®*Premix Ex Taq*TM (TaKaRa)，引物各0.4µL, Rox Reference Dye 0.4µL，7.8µL H 2O。反应条件是：95℃30 s后，95℃5 s，60℃31 s，共40个循环，每次于60℃进行荧光读板。最后从70-95℃进行溶解曲线分析，检测反应的特异性。每个样品均设三个重复。

#### 2.4.4 半滑舌鳎的低氧胁迫与采样

在研究了半滑舌鳎耗氧率和窒息点的基础上，进行半滑舌鳎低氧胁迫方面的研究。实验用半滑舌鳎购自盐城市陈港渔场，实验前在室内充气驯养，保持水温18±2℃，整个实验过程每天投喂两次饲料（由陈港渔场提供）。一周后用于低氧胁迫实验。

将60条体重为77.44±8.21 g的半滑舌鳎分为6组，每组10尾鱼。其中对照组使

用正常冲氧棒进行冲氧（水体溶解氧浓度：6.2 mg/L），其余5组分别对应不同的取样时间，以氮气代替氧气，采用冲氧棒将氮气注入水中（溶解氧浓度：0.8 mg/L）。同时，分别将每组水槽表面以保鲜膜进行密封，采用YSI溶解氧检测仪进行水体溶解氧监测。待溶解氧浓度稳定后，分别不同的时间段（5、30、60、90和120 min）选取3条半滑舌鳎进行组织采样，选取的组织有血液、鳃、心脏、脾脏、肾脏、肠、胃和肝脏。

以上每个样品都加入1 mL TRIzol，并立即放入液氮中冻存备用。

#### 2.4.5 总RNA的提取

与第二章2.4.1相同

#### 2.4.6 RNA样品中DNA的去除

(1)取出-80℃保存的RNA样品，倒掉乙醇，将残留在管壁上的乙醇除干净

(2)用20μL DEPC水将RNA溶解，在紫外分光光度计上测出RNA样品的浓度，根据所测RNA的浓度，取2μg溶解的RNA进行DNA处理。反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×DNase I Buffer | 1 μL |
| DNase I (RNase-free, 5 U/μL, Takara) | 1 μL |
| RNase Inhibitor (40 U/μL, Takara) | 0.5 μL |
| RNA | 4 μg |
| DEPC-treated H20 | up to10 μL |

将反应液短暂离心以混匀，放入37 ℃水浴锅温育30 min。然后向离心管加入1μL

EDTA，70℃作用10min，用于反转录。

#### 2.4.7 cDNA合成

按照SYBR®PrimeScriptTM RT-PCR Kit（TaKaRa公司）使用说明，进行RT反应，

RT反应体系如下：

Total RNA≤0.5μg

5×PrimeScript TM Buffer 2.0μL

PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 0.5μL

Oligo dT Primer (50μmol/L) 0.5μL

Random 6 mers (100μmol/L) 0.5μL

DdH2O (RNase free) up to 10μL

反应条件：30℃10min, 42℃60 min, 70℃15 min。

#### 2.4.8 实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR在ABI 7500上完成。20µL PCR反应体系包括：

2×SYBR®*Premix Ex Taq*TM 10μL

Forward Primer (10μmol/L) 0.4μL

Reverse Primer (10μmol/L) 0.4μL

Rox Reference Dye 0.4μL

模板(cDNA溶液) 1.0μL

ddH2O up to 20μL

反应条件是：95℃30 s后，95℃5 s，60 ℃31 s，共40个循环，每次于60 ℃进行荧光读板；最后进行溶解曲线分析，检测反应的特异性。每个样品均设三个重复。

#### 2.4.9 数据分析

采用张鋆报道的方法[112]，根据标准曲线确定样品中目的基因的含量，以β-actin

基因的表达量对目的基因表达量进行归一化，通过下列公式得到目的基因在不同

cDNA样品中的相差倍数（Folds）。实验结果通过Excel 2007 *t*-test分析，*P*≤0.05为显著性差异。

Folds＝

C1(处理样品，待测基因)

C2(处理样品，持家基因) **÷**

C3（对照样品，待测基因）

C4（对照样品，持家基因）

C值指根据标准曲线将Ct转换成的模板原始浓度。

## 3 结果

### 3.1 半滑舌鳎耗氧率和窒息点的研究

#### 3.1.1 不同盐度对半滑舌鳎耗氧率的影响

在各个盐度水平下，半滑舌鳎的耗氧量、耗氧率与体重之间的关系可用幂函数

Q=aWb表示，且所有拟合曲线的相关关系均达高度显著水平(*P*<0.01)，协方差分析表明，不同盐度下半滑舌鳎耗氧率的组间均数差异高度显著（F5.65=9.23, *P*<0.01），回归方程的体重指数b（F5.65=3.65, *P*<0.05）和截距a（F5.65=4.38, *P*<0.05）之间的差异显著。

另外，不同规格体重半滑舌鳎的耗氧率的最高值都出现在盐度20.08组，半滑舌鳎的耗氧率反而降低。而耗氧率的最低值则因体重不同略有区别，试验中最大规格组和最小规格组耗氧率的最低值分别出现在盐度30.29组和23.85组，另两组试验鱼耗氧率的

最低值在盐度27.46组（图3-1）。



图3-1 盐度对半滑舌鳎耗氧率的影响

Fig. 3-1 The effect of salt concentration on the oxygen consumption rate of*C. semilaevis*

#### 3.1.２半滑舌鳎昼夜耗氧率的变化

图3-２为两种规格体重半滑舌鳎的昼夜耗氧率的测定结果，大体重组最低耗氧率为42.81 mg/kg·h，出现在18: 00时；最大耗氧率为66.19 mg/kg·h，出现在04: 00时。小体重组最低耗氧率为48.25 mg/kg·h，出现在14: 00时；最大耗氧率为80.57 mg/kg·h，出现在02: 00时。将测定值按8: 00-18:00时划为白天和20: 00-6:00时划为夜间两个阶段，取其平均值，结果见表3-2，经单尾检验，*t*=5.948，*t*值小于*t*0.05，说明昼夜两阶段耗氧率差异不显著。



图3 -２半滑舌鳎耗氧率的昼夜变化

Fig. 3 -２Day-night change of the oxygen consumption rate of *C. semilaevis*

表3-2 半滑舌鳎昼夜的平均耗氧量和耗氧率

Tab. 3-2 The average day-night oxygen consumption and oxygen consumption rate ofC. semilaevis

|  | 昼 |  | 夜 | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 体重/g | 耗氧量  （mg/p•h） | 耗氧率  （kg/p•h） | 耗氧量  （mg/p•h） | 耗氧率  （kg/p•h） |
| 84.76±7.35 | 4.46±0.49 | 50.25±5.56 | 5.01±0.61 | 56.41±6.82 |
| 37.25±8.21 | 1.75±0.31 | 64.22±11.32 | 1.99±0.22 | 72.87±7.98 |

#### 3.1.4 半滑舌鳎的窒息点

半滑舌鳎的窒息点随着水温的升高而略有增加，但窒息时间相应提早；在相同的水温条件下，窒息点随着鱼个体的增大而相应增加（表3-3）。开始时鱼静卧于缸底，呼吸频率很慢；随着水中溶氧的不断减少，呼吸频率明显加快，达到约80次/min，这时试验鱼变得不安份，围绕缸底不停游动，并不时将头从水中昂出，且鱼体有抽搐现象；随着水中溶氧进一步降低，试验鱼呼吸受阻，呼吸频率下降，时而翻转，时而下窜，有时静卧底部，尾部不停地摆动，最后沉底不动，继而死亡。死亡时，口和鳃盖都明显张开。

表3-3 水温对半滑舌鳎窒息点的影响

Tab. 3-3 The effect of water temperature on the suffocation point ofC. semilaevis

| 温度（℃） | 平均体重(g) | 窒息时间 (h) | 窒息点 (mg·L-1) |
| --- | --- | --- | --- |
| 14 | 31.29±5.18 | 105.23 | 0.834 |
|  | 63.34±7.86 | 91.6 | 0.865 |
| 21 | 29.62±8.41 | 21.42 | 0.875 |
|  | 58.15±4.94 | 18.38 | 0.912 |
| 27 | 32.78±5.30 | 3.80 | 1.095 |
|  | 66.69±9.16 | 3.15 | 1.113 |

### 3.2 建立半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α和β-actin标准曲线的结果

#### 3.2.1 定量片段的扩增与克隆

1

A

B



1 M 2 3



M 4

图 3-3 HIF-1α、Tf、Hb-α1和β-actin RT-PCR扩增电泳图

M: Marker 2000; 1到4分别为HIF-1α、Hb-α1、Tf和β-actin扩增片段。

Fig. 3-3 Electrophoresis of amplified fragments of HIF-1α, Hb-α1, Tf and by RT-PCR

M: Marker 2000; lane 1, 2, 3 and 4 are amplified fragments of HIF-1α, Hb-α1, Tf andβ-actin.

以半滑舌鳎肝脏总RNA为模板，应用RT-PCR扩增半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α1和β-actin荧光定量片段，预计长度分别为189 bp、213 bp、147 bp和165 bp，电泳鉴定PCR扩增片段大小与预计片段大小一致（图3-3）。胶回收纯化相应的目的片段并克隆于pMD18-T载体，转化，涂布培养，挑单个菌落培养4-5 h，对重组菌进行PCR阳性检测，将阳性质粒的菌液送上海生工进行测序，cDNA片段大小分别为189 bp、213

bp、147 bp和165 bp，序列比对证实为相应基因的cDNA。

#### 3.2.2 半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α1和β-actin定量的标准曲线

将含有半滑舌鳎HIF-1α、Tf、Hb-α1和β-actin片段的质粒标准样品按10倍系列稀释，进行qPCR扩增，由扩增仪分别自动获得针对各基因的扩增曲线、标准曲线、扩增效率、溶解曲线和溶解峰图。图3-4A为β-actin的扩增曲线，显示该基因在扩增过程中能检测到不断增加的荧光信号，表明扩增产物在有效扩增。图3-4B为β-actin扩增的溶解曲线分析，显示在在溶解温度为86℃时出现单一峰，表明了扩增产物的特异性。根据扩增曲线结果，得到了β-actin的标准曲线方程：Y=-2.848x+7.996。标准曲线回归系数R2为0.975，显示出极好的线性关系。HIF-1α、Tf和Hb-α1扩增曲线和溶解曲线分析见图3-5, 3-6和3-7，均符合定量要求。

A



B



标准曲线方程：Y=-2.848x+7.996 R2=0.975

图3-4 β-actin qPCR扩增的特异性和标准曲线的建立

A：扩增曲线B：溶解峰

Fig. 3-4 The test of amplification specificity forβ-actin and the construction of standard curves forβ-actin gene

A: amplification curve. B: melt curve.

A



B



标准曲线方程：Y=-2.8182x+5.336 R2=0.995

图 3-5 CsHIF-1αqPCR扩增的特异性和标准曲线的建立

A：扩增曲线B：溶解峰

Fig.3-5 The test of amplification specificity and the construction of standard curves for HIF-1αgene A: amplification curve. B: melt curve.

A



B



标准曲线方程：Y=-2.5196x+6.6771 R2=0.988

图 3-6 CsTf qPCR扩增的特异性和标准曲线的建立

A：扩增曲线B：溶解峰

Fig.3-6 The test of amplification specificity and the construction of standard curves for Tf gene A: amplification curve. B: melt curve.

A



B



标准曲线方程：Y=-2.8051x+2.9073 R2=0.986

图3-7 CsHb-α1 qPCR扩增的特异性和标准曲线的建立

A：扩增曲线B：溶解峰

Fig.3-7 The test of amplification specificity and the construction of standard curves for Hb-α1 gene A: amplification curve. B: melt curve.

### 3.3 半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1在正常组织中的分布

应用实时荧光定量PCR检测HIF-1α、Tf和Hb-α1在正常半滑舌鳎各组织中基因表达情况。图3-8A显示在所选取的组织中均能够检测到HIF-1α的表达，其中在肝脏中表达最高，在心、脾脏、肾、胃、血和腮中呈中度表达，在肠中表达量最低。Tf也在所选取的组织中呈组成型表达，其中在肝脏中表达量最高，在心、脾脏和肾中呈中度表达，在肠、胃、血和腮中表达量最低（图3-8B）。与HIF-1α和Tf的表达分布有些不同，Hb在心、肝、脾脏、肾和血中表达量较高，而在胃、肠中则呈低度表达（图3-8C）。

C

A

A



A

B

B

B





C

图3-8 qPCR检测HIF-1α、Tf和Hb-α1在健康半滑舌鳎各组织中基因表达情况

A. HIF-1α在不同组织分布表达；B. Tf在不同组织分布表达；C. Hb-α1在不同组织分布表达。

Fig. 3-9 Tissue distributions of HIF-1α, Tf and Hb-α1 in healthy*C. semilaevis*

A: Tissue distribution of HIF-1α; B: Tissue distribution of Tf; C: Tissue distribution of Hb-α1.

### 3.4 低氧胁迫后半滑舌鳎HIF-1α、Tf和Hb-α1表达变化

采用实时定量PCR检测了半滑舌鳎的HIF-1α、Tf和Hb-α1在低氧胁迫后的不同时间段不同组织的基因表达变化情况。与对照组相应组织比较显示，CsHIF-1α在低氧胁迫30 min后在所有的组织中表达量显著上调(*P*<0.05)，随着低氧胁迫时间的延长，CsHIF-1α在不同组织中的表达量也明显增加（*P*<0.05），在低氧胁迫90 min和120 min后，肝脏HIF-1α增加了28.99和28.78倍，腮HIF-1α增加了17.08和19.18倍(图3-9A)。在低氧胁迫后，Tf同样在不同的组织中表现为表达量上调（*P*<0.05）。但随着低氧胁迫时间的延长，CsTf在心、肠中出现下降的趋势，但仍然高于对照组（*P*<0.05）。当低氧胁迫90 min和120 min时，血、腮和胃中的CsTf回复到正常水平(*P*> 0.05)（图3-9B）。低氧胁迫后，心、肝、脾、肾、血、腮中的Hb-α1同样出现明显的上调表达(*P*<0.05)，并表现出了明显的时间依赖关系。而肠的Hb-α1仅在低氧胁迫5 min和30 min出现上调表达(*P*<0.05)，胃中的Hb-α1并未出现明显的上调表达（*P*> 0.05）（图3-9C）。

A

35

30

25

\* \*

\*

0

Heart

Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood

Gill

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood

Gill

5 min

25

30 min

20 60 min

90 min

s

15 120 min

g

ha 10

ldF 5

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

C

5 min

25

30 min

\*

20 60 min

\* \* \* 90 min

e 15 \* \* 120 min

s

g \* \* \* \*

n \* \* \* \*

ha 10 \* \* \* \*

c \* \* \*

\* \*

ldF \* \*

o 5 \*

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

5 min

25

30 min

20 60 min

90 min

s

e 15 120 min

g n

ha 10

c

ldF o 5

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

5 min

25

30 min

\*

20 60 min

\* \* \* 90 min

e 15 \* \* 120 min

s

g \* \* \* \*

n \* \* \* \*

ha 10 \* \* \* \*

c \* \* \*

\* \*

ldF \* \*

o 5 \*

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

5 min

25

30 min

20 60 min

90 min

s

e 15 120 min

g n

ha 10

c

ldF o 5

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

B 5 min

14 30 min

12 \* 60 min

10 \* \* 90 min s \* \*

e \*

ng \* \* \* 120 min

ha 8 \* \* \* \*

c

ol 6

d

F \*

4 \* \* \* \* \* \* \*

2 \* \*

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

5 min

14 30 min

12 \* 60 min

10 \* \* 90 min s \* \*

e \*

ng \* \* \* 120 min

ha 8 \* \* \* \*

c

ol 6

d

F \*

4 \* \* \* \* \* \* \*

2 \* \*

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

8

\*

6

4

2

\* \*

\*

\*

Fold changes

25



20

oFolcd chnaneges

15

\* \*

10 \*

\*

5

\* \* \*

\*

\*

\* \* \*

\* \*

\* \*

\* \* \* \*

\*

\*

\* \* \*

\*

## 5 min

\*

\* \*

\*

\*

\*

30 min

60 min

90 min

120 min

5 min

35

A \* \* \* 30 min

30 \* 60 min

25 \* 90 min

s

ng \* 120 min

e

ha 20 \* \* \* \*

d \*\*

c

ol 15 \* \* \* \* \* \*

F \* \* \* 10 \* \* \* \*

\* \* \*\* \* \*

5

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

5 min

35

\* \* \* 30 min

30 \* 60 min

25 \* 90 min

s

ng \* 120 min

e

ha 20 \* \* \* \*

d \*\*

c

ol 15 \* \* \* \* \* \*

F \* \* \* 10 \* \* \* \*

\* \* \*\* \* \*

5

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

\*

\* \*

20

\*

\*

5 min

30 min

60 min

90 min

120 min

\*

\*

15

\*

\*

\*

\*

\*\*

10

5

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

B

14

12

10

\*

\*

\*

\*

\* \*

\*

\*

\*

5 min

30 min

60 min

90 min

120 min

\*

\*

\*

Fold changes

0

Heart Liver Spleen Kidney Intestine Stomach Blood Gill

图 3-9 半滑舌鳎低氧胁迫作用后HIF-1α、Tf和Hb-α1的表达变化

A: HIF-1α在组织中的表达变化；B: Tf在组织中的表达变化；C: Hb-α1在组织中的表达变化。

Fig. 3-9 Expression patterns of HIF-1α, Tf and Hb-α1 in different tissues of*C. semilaevis* under

hypoxia

A: Expression patterns of HIF-1αin different tissues. B: Expression patterns of Tf in different tissues. C: Expression patterns of Hb-α1 in different tissues.

## 4 讨论

鱼类作为水体中的主要生物，受到水体中的溶解氧浓度的影响最为明显。在长期的进化过程中鱼类产生了一系列低氧适应机制。耗氧率是评价鱼类耐受低氧能力的一个重要指标。研究发现，对同种鱼来说，影响耗氧率的因素很多。一是不同发育阶段耗氧率不同，二是不同的生理状态耗氧率也不同，三是环境因素对耗氧率有影响[113,

114]. 此外，可能还存在一些其它因素影响鱼的耗氧率，如昼夜变化的影响等。本实验

严格保持了各种实验条件的一致性，同一因素下不同梯度和水平的实验都是于每一天的同一时间内进行，以保证实验结果的准确性和科学性。另外，耗氧率因种而异，这与各种鱼类的生态习性不同有关。半滑舌鳎属底层鱼类，其喜静，游动缓慢，故其耗氧率相对较低。

鱼类的呼吸耗氧是否存在昼夜变化，许多学者对不同种类的鱼做过研究。一般认为鱼类代谢水平的昼夜变化有三种类型[115]：（1）白天大于夜间；（2）夜间大于白天；（3）昼夜差异不明显。鱼类耗氧率昼夜节律性的变化，代表着鱼类在自然环境中的活动周期，耗氧率大的时期表示进食或其它活动。半滑舌鳎耗氧率表现出一定的昼夜变化规律，但夜间的平均耗氧率仅比白天略高，昼夜差异并不显著，代谢水平应属于第3种类型，这与真鲷的特性相似[115]。出现这种结果除了与试验条件有关外，主要是由半滑舌鳎呼吸生理特性决定的。

体重对鱼类标准耗氧率的影响一直为研究者所关注，大量研究表明，随着体重的增大，同种鱼类的耗氧量也相应增加，而耗氧率则下降。耗氧量与体重关系式(Qc=aWb)中的b值被称为体重指数，它的大小及变化规律反映了体重对鱼类代谢影响的程度和方式。Winberg在总结以往文献资料的基础上，发现20℃下30种鲑科鱼类标准代谢的b值平均为0.8左右[116]，而Jobling指出b值在0.65-0.90之间[117]。半滑舌鳎在22℃时不同盐度下的b值为0.725±0.045。当b值小于1，表明大多数情况下同种小体重鱼单位体重的氧消耗高于大体重鱼。以往的研究资料表明，只有极少数种鱼的b值大于1，如草鱼。

有关鱼类窒息点测定的文献报道中，淡水鱼类要多于海水鱼类。半滑舌鳎的窒息点随着温度和体重的增加而略有升高，这与杨春等研究潘阳湖鳜鱼的结论相似[118]，但与长薄鳅和月鳢等鱼的窒息点与体重关系的结论相反[115]。本试验测得半滑舌鳎的窒息点为1 mg/L左右，低于真鲷的窒息点(1.55-1.65 mg/L)，略高于青石斑鱼的窒息点（0.816

mg/L左右），远高于鲫鱼、青鱼、草鱼、中华乌塘鳢等鱼的窒息点(分别为0.59、0.58、0.39和0.3 mg/L左右)[119]，表明其耐低氧的能力一般。但在较低的温度下，半滑舌鳎呼吸缓慢，致死时间较长，说明半滑舌鳎在低温下有很强的耐低氧能力。

HIF-1α作为低氧胁迫下的主要反应因子，已从多种鱼类中得到了克隆、鉴定。研究表明，不同种类的鱼类HIF-1α在低氧胁迫下的表达具有种属特异性。虹鳟HIF-1α在低氧2 h和4 h后表达量无明显变化[46]。与虹鳟HIF-1α一致的是，尽管武昌鱼的HIF-1α在肝、腮和睾丸中高表达，但在低氧情况下其表达量并无明显变化[53]。草鱼HIF-1α在低氧4 h后在眼和肾脏中高度表达，在脑中呈中度表达，在腮、心、肝和肌肉中低度表达。而低氧96 h后，草鱼HIF-1α在所有的检测组织中表达量均降低。在低氧胁迫4h，草鱼HIF-1α在腮和肾脏中呈上调表达，而在脑、心和肝脏中呈下调表达[47]。与上述三种鱼类HIF-1α表达不同的是，细须石首鱼的HIF-1α在低氧7天后在脑和性腺中高表达，在心、肝和肌肉中中度表达。在低氧胁迫3天、7天和3周后，发现细须石首鱼的HIF-1α在其卵巢中呈上调表达状态。半滑舌鳎HIF-1α在低氧胁迫后在不同的组织中均呈明显的上调表达，这与细须石首鱼的研究结果相一致[48]。同时，半滑舌鳎HIF-1α在低氧胁迫5 min到120 min的过程中呈现明显的上调表达，说明半滑舌鳎HIF-1α在低氧胁迫初期就已发挥重要的作用。

不同鱼类的Hb基因在低氧胁迫下具有不同的表达变化情况。斑马鱼和日本青鳉(*Oryzias latipes*)的Hb在低氧胁迫下在胚胎中呈下调表达[120, 121]，茉莉花鳉的Hb则在慢性低氧胁迫(DO=1.0 mg/L, 六周)下在血液中呈上调表达，Wawrowski et al[121]也发现日本青鳉Hb mRNA在低氧胁迫后在脑和全鱼中表达量升高。而金鱼的Hb在低氧胁迫下则无明显变化[122]。因此，低氧胁迫下Hb的反应情况具有种属特异性。鱼类适应低氧过程的一个重要机制是降低自身的新陈代谢率，满足机体中一些重要器官的功能的维持。在低氧胁迫早期CsHb-α1在造血组织，如肝脏、脾脏和肾脏中表达量增加，表明鱼类在低氧情况下可以通过激活造血进程来增加Hb水平来增加O2的运输。同时，CsHb-α1肠、胃中表达量并无显著变化，提示在低氧胁迫下鱼体通过自身的调节作用而降低了这些器官中相关基因的合成，进而节省能量用于肝脏、腮腺等重要器官中的基因合成，维持自身的生理活性[120]。

虽然，关于Tf基因的研究和报道较多，但有关Tf基因在动物各组织中的表达及低氧胁迫后的表达变化的研究还较少。本文实验结果显示，CsTf基因在所检测的组织中呈组成型表达模式，在肝脏的表达量最高，其次为心脏、肾脏、脾脏，在胃、肠、血液和鳃中表达量较低，这与其他脊椎动物和鱼类的Tf表达情况类似。肝脏中表达量最高也进一步证明了肝脏是鱼类转铁蛋白的主要合成器官。CsTf在低氧胁迫下30 min后在肝脏、脾脏等组织中表达量显著增加，提示在低氧胁迫早期鱼体将依靠Tf转运更多的铁离子Hb的合成及携氧。CsTf的表达变化也进一步验证了在低氧胁迫下鱼体为了节约能量，将通过维持主要器官功能进而维持机体的基本生理活动这一观点。

# 第四章 半滑舌鳎HIF-1α基因的原核表达与多克隆抗体的制备

## 1 前言

HIF-1α作为低氧胁迫下的核心反应因子，通过与HIF靶基因的5`-/3`侧翼序列上的HREs或HIF-1结合位点结合而调控多种靶基因的表达，在动物体内的氧平衡调节中发挥重要的作用[26]。此外，HIF-1α在肿瘤的发生、免疫系统调节等方面同样具有重要的调节作用[123, 124]。半滑舌鳎是我国沿海地区重要的名贵的大中型经济鱼类。本章应用pET30a构建HIF-1α原核表达系统，进行诱导表达与并纯化重组蛋白，制备抗体，以期为进一步研究半滑舌鳎HIF-1α在低氧胁迫下的调节作用奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器设备

电泳转移系统(Mini Trans-Blot○R Cell): 美国Bio-Rad 公司；垂直板电泳系统(Mini-PROTEANRⅡ型)：美国Bio-Rad公司；脱色摇床(WD-9405A型)：北京市六一仪器厂；

超声波破碎仪(Ultrasonic Homogenizer 4710型)：美国Cole-Parmer公司；其他未注明的仪器设备同第二章。

### 2.2 实验试剂

NBT/BCIP染色试剂盒：华美生物工程公司；羊抗兔IgG-AP: Sigma公司；

尿素：Sanland进口分装；

蛋白纯化树脂(His·Bind Resin): Novagen公司；预染蛋白质Marker: 晶美Fermentas；

β-磷酸甘油、HEPES、β-巯基乙醇：Sigma公司；

IPTG: Promega进口分装；

PVDF膜：美国Millipore公司;

30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺：购于上海生工；

甘氨酸、Tris、牛血清白蛋白、脱脂奶粉、咪唑和Tris-Hcl (pH8.8, pH6.8) 购于

Solarbio公司；

pET-30a载体：用于表达重组蛋白的原核表达，Novagen公司；

大肠杆菌(*E. coli*) TOP10菌株：克隆载体宿主菌；

大肠杆菌(*E. coli*) BL21 (DE3)菌株：pET-30a表达载体的宿主菌；实验中其它试剂除特别注明外，均为国产分析纯。

### 2.3 感受态细胞的制备

方法见2.4.7.

### 2.4 **CsHI**F-1α**cDNA**表达载体的构建

采用特异性引物CsHIF1α-F1 (5`-TCGGATCCAAAGTGTTTACCCAGTCGGT-

G-3`) 和CsHIF1α-R1 (5`-TGCTCGAGTATGATCTCTTTGAGGTCAC) 扩增xePGRP-L

cDNA 序列中的部分序列。其中上游引物含有*Kpn* I 酶切位点（GGATCC），下游引物含有*Xhol* I酶切位点（CTCGAG）。PCR 反应条件为：94°C预变性5 min；94°C 30 s，58°C 40 s，72°C 90 s，35个循环；72°C延伸10 min。对扩增的目的片段进行回收纯化。经*Kpn* I和*Xhol* I双酶切后，回收DNA片段。

同时，将pET-30a质粒以*Kpn* I和*Xhol* I双酶切，经琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。以DNA连接酶将目的基因片段与载体连接，10μl连接体系包括：CsHIF-1α酶切产物6μl, pET-30a酶切产物2μl，10×T4 ligase buffer 1μl，T4 DNA连接酶1μl，16°C 连接过夜。分别将质粒pET-30a-HIF1α和pET-30a转化大肠杆菌BL21 (DE3)，阳性鉴定后直接用于表达或冻存于-80℃冰箱，阳性克隆标记为pET30a-CsHIF1α。

### 2.5 重组蛋白的诱导表达

将2.4中得到的pET30a-CsHIF1α阳性克隆菌液接种于10 ml含氨苄青霉素(ampicillin, Amp) 100μg/ml、卡那霉素（kanamycin, Kan）15μg/ml的LB培养液，在37℃条件下培养至OD600 为0.6-1.0时，取出1 ml 作为阴性对照。诱导组加入IPTG

至终浓度为1 mmol/l，37℃继续诱导，于诱导后2 h、4 h和6 h取菌液各1 ml。将不同时间诱导的菌液5000 rpm 离心5 min，收集沉淀，用原体积的1/10 PBS 缓

冲液重悬菌体。重悬的菌体用超声波处理（15 W，超声10 s，间隔10 s）5 min，收集上清，沉淀重悬于原体积的PBS中。取样品与5×蛋白上样buffer混合，沸水中变性10 min。表达产物采用SDS-PAGE电泳进行分离鉴定。

将SDS-PAGE电泳鉴定的单克隆阳性菌落接种到含氨苄青霉素和卡那霉素的TB培养液中，30°C、200 rpm震荡培养3.5 h。加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/l，30°C、200 rpm震荡培养4 h。4°C、8000 rpm离心20 min，收集菌体。-20°C保存备用。

### 2.6 SDS-PAGE电泳

进行SDS-PAGE电泳分析前要对样品进行上样处理。具体方法：将待检菌液1ml，

10000 rpm离心4 min，弃掉上清，加入2×SDS -PAGE上样缓冲液（20%甘油；2%SDS；

0.09mol/L Tris. Cl，pH6.8; 0.02%溴酚兰；0.1mol/L DTT）100μL重悬细菌沉淀，煮沸

5 min，使细菌悬浮液充分破碎，裂解，-20℃保存备用或立即进行SDS-PAGE电泳分析。具体的操作步骤如下：

(1)洗干净做胶的玻璃板，烘干，按照说明书先安装好做胶的模具；

(2)配制12%的分离胶，缓慢加入到安装好的模具中，用无水乙醇封边，室温放置30 min；

(3)吸掉封边的无水乙醇，将配制好的5%的浓缩胶缓慢加入到分离胶上部，小心的插入梳子，室温放置30 min；

(4)凝胶凝固后，安装到盛有Tris-Glycine电泳缓冲液的电泳槽中，并将梳子小心拔出；

(5)将处理好的样品每孔上样10微升进行电泳；

(6)电泳先用80 V跑30 min，跑过浓缩胶后改为电压120 V，直到蛋白质分子量标准与目标蛋白溴酚蓝示踪染料到达凝胶的底部。电泳结束后，将凝胶取下，做染色或免疫印迹；

(7)考马斯亮蓝染色：将凝胶放到染色液（含0.1%的考马斯亮蓝G-250的甲醇：蒸馏水：冰醋酸=9: 9: 2的混合液）中染色4 h；

(8)脱色：将胶取出放到脱色液（蒸馏水：甲醇：冰醋酸=8: 1: 1）中脱色6-10 h或置于沸水中煮20 min，充分脱色；

(9)照像：脱色后电泳图用美国UVP凝胶成像系统进行扫描保存。

### 2.7 目的蛋白的纯化

(1)收集菌体：将50 ml诱导表达的重组菌液放入离心管中，4°C, 5000 *g*离心5 min，去掉上清；

(2)菌体的超声波破碎与溶解包涵体：加入5 ml 1×binding buffer (0.5 mol/lNaCl, 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l咪唑，pH 7.9, 不含尿素)，冰浴30 min，超声波破碎(15 W，超声10 s，间隔10 s) 30 min，重悬菌体。4°C, 13000 *g*离心15 min，去掉上清（包涵体位于沉淀中）。在沉淀中加入5 ml 1×binding buffer，超声波破碎30 min.4°C, 13000 *g* 离心15 min，移去上清，加入3 ml 含 6

mol/l尿素的1×binding buffer重悬沉淀。置于冰上1 h，彻底溶解包涵体。最后，4°C 12000 g离心30 min，收集上清液；

(3)装柱：用灭菌的去离子水润湿、清洗蛋白纯化柱后，将1 ml His**·**Bind Resin树脂悬液装入层析柱，待自然沉降后，用至少三个柱体积的灭菌双蒸水以工作流速压实柱料；

(4)柱离子化：加入3 ml 1×离子化缓冲液(50 mM NiSO4)，对柱料进行挂镍；

(5)柱平衡：用3 ml含6 mol/l尿素的1×Binding buffer (5mM咪唑，0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9)对柱料进行平衡。

(6)上样：待Binding buffer下降至层析介质(His**·**Bind Resin树脂)表面，小心加入经过上述处理好的包涵体溶液，控制流速5 ml/h，让液相缓慢流出；

(7)淋洗：用5 ml含6 mol/l尿素的1×Binding buffer和3 ml含6 mol/l尿素的1×washing buffer (0.5 mol/l NaCl, 20 mmol/l Tris-HCl, 60 mmol/l咪唑，pH 7.9)依次淋洗柱料，以去除非特异结合的蛋白；

（8）洗脱：用2.5 ml 100, 150, 200, 250, 500mM咪唑的梯度洗脱液(20 mmol/l Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.9, 6 mol/l尿素)依次洗脱，并分别收集洗脱液；

(9)再生：洗脱完成后，将3 ml 1×剥离缓冲液(80 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 mol/l NaCl, 100 mM EDTA) 清洗树脂，完成树脂的再生。

(10)柱保存：20%的乙醇平衡的柱料后保存于4℃。

(11)将收集纯化的蛋白应用SDS-PAGE进行分离，检测纯化结果。

### 2.8 兔抗CsHIF-1α多克隆抗体的制备

免疫动物为日本大耳白兔，体重2 kg左右。初次免疫时，将400μl纯化蛋白（约300-500μg）与400μl弗氏完全佐剂充分混匀乳化，于背部、脚掌皮下多点注射。待初次免疫2周后加强免疫2次，每次剂量为首免的1/2，以弗氏不完全佐剂乳化样品，每次间隔10天。第三次注射10天后自颈动脉取血液。将兔血于37°C放置1 h后再在4°C 放置过夜，2000 *g*离心10 min，吸取上层的多抗血清，分装，-80°C 冻存。

### 2.9 免疫印迹检测表达的蛋白

(1)将蛋白样品和5×loading buffer按适当的比例混合，沸水浴中变性5 min后上样，12% SDS-PAGE分离；

(2)聚偏氟乙烯(Polyvinylidene-Fluoride, PVDF)膜先用甲醇处理后，与电泳后胶块一起用转膜缓冲液(192 mmol/L 甘氨酸；20%甲醇；25 mmol/L Tris, pH 8.3)中平衡10 min；

(3)根据Mini Trans-Blot转移系统操作手册，装配转膜Sandwich，应用Mini Trans-Blot转移仪，以80V进行电转1 h。

(4)用TBS溶液(0.1 mol/L NaCl; 0.1 mol/L Tris, pH 7.5) 轻轻漂洗PVDF膜3次；

(5)用5%脱脂奶粉（溶于TBS）室温封闭2 h ；

(6)用TBST（含1%脱脂奶粉和0.1%吐温）按1:3000稀释抗His标签的单克隆抗体，

室温孵育PVDF膜1 h或4℃过夜；

(7) PVDF膜用TBST室温洗膜3次，每次10 min，

(8)用碱性磷酸酶标记的二抗(1: 500的稀释)室温孵浴1 h；

(9)室温下用TBST洗膜3次，每次10 min。

(10)使用NBT/BCIP显色系统避光显色15-30 min；

(11)用水漂洗后凉干，扫描仪扫描，保存图像。

## 3 结果

### 3.1 CsHIF-1α基因的扩增与克隆

以半滑舌鳎肝脏总RNA为模板，采用RT-PCR方法扩增半滑舌鳎HIF-1α用于原核表达的cDNA片段，电泳结果表明PCR扩增片段大小与预计的一致(750 bp)（图4-1）。胶回收纯化目的片段，与pMD18-T载体连接，转化，涂布培养，挑单个菌落培养4-5 h，进行PCR阳性鉴定，电泳鉴定PCR扩增片段大小与回收前的片段大小一致。将阳性克隆的菌液送上海生工测序，测序结果通过序列比对，确定为半滑舌鳎HIF-1α

cDNA。

M 1



M 1

图 4-1 CsHIF-1α扩增片段的电泳图

M: Marker DL2000; 1：CsHIF-1α扩增片段。

Fig. 4-1 Electrophoresis of amplified fragments of CsHIF-1αM: Marker DL2000; 1: amplified fragments of CsHIF-1α

### 3.2 原核表达载体的构建

将3.1中测序正确的阳性克隆进行质粒DNA回收，采用*Kpn* I和*Xhol* I双酶切，电泳，胶回收目的片段（图4-2），与以同样双酶切后的pET30a (图4-3)连接得到pET30a-HIF1α)，转化，涂布培养，挑单个菌落培养，进行PCR鉴定。测序结果证实表达框正确，可用于诱导表达。

1 M



1 M

图4-2 CsHIF-1α经*Kpn* I和*Xhol* I双酶切后回收产物电泳检测M: Marker DL2000; 1：CsHIF1α质粒经*Kpn* I和*Xhol* I双酶切回收产物。Fig.4-2 Electrophoresis of CsHIF-1αdigested with *Kpn* I and *Xhol* I

M: Marker DL2000; 1: CsHIF1α

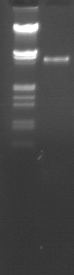
A B

M1 1

M2 2



M1 1



M2 2

图 4-3 pET30a质粒(A)及*Kpn* I和*Xhol* I双酶切回收产物(B)电泳检测

M1: Marker DL2000; M2: Marker 5000; 1：pET30a 质粒；2：*Kpn* I和*Xhol* I双酶切产物。

Fig. 4-3 Electrophoresis of pET30a

(A) pET30a plasmid and digestion with *Kpn* I and *Xhol* I (B). M1: Marker DL2000; M2: Marker 5000; 1: plasmid of pET30a; 2: plasmid of pET30a digested with *Kpn* I and *Xhol* I

### 3.3 重组蛋白的诱导表达



图 4-4 重组蛋白CsHIF-1α在BL21重组菌中表达产物的SDS-PAGE凝胶电泳

泳道1为蛋白Marker；泳道2,3为300mM咪唑洗脱；泳道4为60mM咪唑洗脱；泳道5 为

15mM咪唑洗脱；泳道6-8为IPTG诱导2h、4 h和6h。

Fig. 4-4 SDS-PAGE analysis of rcombinant protein Expression CsHIF-1αin BL21

Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2, 3: the protein washed by 300mM iminazole; Lane 4: the protein washed by 60mM iminazole; Lane 5: the protein washed by 15mM iminazole; Lane 6-8: 1mM

IPTG induced for 2 h, 4h and 6h, respectively.

将pET30a-HIF1α重组质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3)菌株，以1 mmol/L IPTG对重组菌进行诱导，分别于诱导后2 h、4 h和6 h取样，对菌体处理后的裂解物进行SDS-PAGE电泳分析，结果显示重组质粒pET30a-HIF1α转化大肠杆菌BL21后经IPTG诱导后在45KDa位置上方出现一条新的明显的蛋白条带，未经诱导的重组菌未见此蛋白条带。HIF1α表达部分的蛋白分子量为22.5 KDa, pET30a融合标签约为26KDa，因此融合蛋白的分子量为48 KDa左右（图4-4）。

### 3.4 重组蛋白的Western blot分析

Western blot分析显示，pET30a-CsHIF1α重组质粒转化大肠杆菌BL21经IPTG诱导表达后的菌体裂解物与多克隆抗体反应，在相对分子质量约48 KDa位置处出现了特异表达的蛋白条带，而pET30a空质粒转化大肠杆菌BL21后，其菌体裂解物无此反应。结果见图4-5。



图 4-5 CsHIF-1α基因在BL21中表达产物的Western blot分析

M：蛋白标准分子量；1：空质粒pET32a转化BL21诱导6h；2：重组质粒pET30a-CsHIF1α

转化BL21经IPTG诱导后6 h。

Fig. 4-5 Western blot analysis of the fusion protein CsHIF-1αexpresed in *E. coli* BL21

M: molecular weight marker 1: *E. coli* BL21 containing pET30a induced by IPTG for 6h; 2: *E. coli*

BL21 containing pET30a-CsHIF1αinduced by IPTG for 6 h.

## 4 讨论

在进化的过程中，单细胞生物和多细胞生物均具有检测氧浓度以及在低氧情况下改变一系列基因的表达来适应低氧环境的机制[125]。HIF-1α是机体调节氧平衡的主要转录因子。同时，HIF-1α对于发育过程中血管生成等生理系统的形成是必需的[126]。此外，HIF-1α在心血管疾病、肿瘤、关节炎等疾病的发生发展过程中起调节作用[124]。但是，目前关于HIF-1α的研究多集中在哺乳类上，而鱼类HIF-1α的研究相对较少，并且多集中在基因克隆和序列分析上。

本章中采用RT-PCR方法，对半滑舌鳎HIF1α基因进行了克隆。在构建表达载体所用的上、下游引物的5`端分别引入两个不同的限制性内切酶的识别序列，保证了表达序列正确插入到表达载体的表达框中。同时，由于HIF家族成员在N-端具有较高的序列相似性，因此本文选用半滑舌鳎HIF1α的C-端序列进行原核表达，从而保证了后期实验的特异性。此外，本章选择了pET系列表达载体-pET30a为表达载体，pET30a不仅是一种高效的原核表达载体，可使目的基因高效表达，在构建重组载体时不存在读码框的移位问题，而且可利用其带有6个组氨酸标签，便于目的蛋白的亲和纯化与鉴定[127]。将HIF1α特异性区域克隆到pET30a后，成功构建了pET30a-CsHIF1α原核表达质粒。在大肠杆菌BL21中经IPTG诱导后均高效表达相对分子量约为48 kDa的融合蛋白，与预期目的蛋白的大小一致。进一步，将目标蛋白免疫兔获得了兔抗HIF1α

的多克隆抗体，采用Western blot 方法检测了pET30a-CsHIF1α重组质粒转化大肠杆菌

BL21经IPTG诱导表达后的菌体裂解物与该多克隆抗体及相应二抗免疫杂交后，在相对分子质量约48 KDa位置处出现了蛋白条带，而pET30a空质粒组无此反应，表明重组质粒pET30a-CsHIF1α在大肠杆菌BL21中成功表达了CsHIF-1α蛋白。

本研究成功构建了半滑舌鳎的HIF-1α重组表达载体，在大肠杆菌中有效表达并制备了兔抗HIF-1α的多克隆抗体，为深入研究HIF-1α蛋白生物学特性以及结构和功能提供了实验依据。

结论

本文以沿海重要的经济养殖鱼类半滑舌鳎为研究对象，通过对其HIF-1α、Tf和Hb-α1进行克隆与序列分析，探讨了低氧反应因子的分子进化机制；并检测了HIF-1α、Tf和Hb-α1在低氧胁迫下表达变化情况，探讨了上述基因在低氧下的反应规律，为进一步解析鱼类对低氧胁迫适应的分子机制提供了理论基础。本文的结论主要有：

(1)克隆得到的CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1 cDNA全长分别为3460 bp、2281 bp和594

bp；ORF分别为2208 bp、2034 bp和432 bp，分别编码735、677和143个氨基酸。蛋白质氨基酸序列比对分析显示，三者均具有其蛋白家族典型的结构和序列特征，一些重要的氨基酸位点在进化的过程中比较保守。系统进化树分析显示三者均与鱼类中相应的基因聚为一枝，具有较高的枝值，表明上述基因在进化的过程中具有较高的保守性。

(2)荧光定量PCR分析显示，上述三个基因在所检测的正常组织均能表达，表明它们在所检测组织呈组成型表达.。其中，CsHIF-1α和CsTf主要在肝脏中表达，CsHb-α1主要在心、肝、脾脏、肾和血中表达。在低氧胁迫5 min到120 min后，CsHIF-1α、CsTf和CsHb-α1均在不同的组织中上调表达，提示上述三个基因在鱼类低氧胁迫中，尤其是在低氧胁迫的初期具有重要的作用。

(3)采用原核表达载体pET30a构建pET30a-CsHIF1α表达载体，转化宿主菌BL21，在1mM IPTG诱导下具有较高的蛋白表达。进一步通过纯化得到CsHIF-1α融合蛋白并制备了兔抗CsHIF-1α多克隆抗体。Western blotting检测显示了该多克隆抗体具有较强的抗原－抗体反应性，能够与pET30a-CsHIF1α转化的BL21细胞的特异蛋白结合。

参考文献

[1] R. J. Diaz, R. Rosenberg. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems [J]. Science. 2008, 321: 926-929.

[2] J. G. Richards. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia [J]. J Exp Bio. 2011, 214: 191-199.

[3] B. Guan, H. Ma, Y. P. Wang, et al. Vitreoscilla hemoglobin (VHb) overexpression increases hypoxia tolerance in zebrafish (Danio rerio) [J]. Mar Biotechnol. 2010, DOI: 10.1007/s10126-10010-19305-z.

[4] M. Nikinmaa, B. B. Rees. Oxygen-denpendent gene expression in fishes [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005, 288: 1079-1090.

[5] G. E. Nilsson, S. Ostlund-Nilsson. Hypoxia in paradise: widespread hypoxia tolerance in coral reef fishes [J]. Proc Royal Soc London B-Biol Sci. 2004, 271: S30-33.

[6] A. E. Rosenberger, L. J. Chapman. Hypoxic wetland tributaries as faunal refugia from an introduced predator [J]. Ecol Freshw Fish. 1999, 8: 22-34.

[7] R. Rosenberg, B. Hellman, B. Johansson. Hypoxia tolerance of marine benthic fauna [J]. Mar Ecol Prog Ser. 1991, 79: 127-131.

[8]. L. Pihl, S. P. Baden, R. J. Diaz, et al. Hypoxia-induced structural changes in the diet of bottom-feeding fish and crustacean [J]. Mar Biotechnol. 1992, 113: 349-361.

[9] R. N. Winn, D. M. Knott. An evaluation of the survival of experimental populations exposed to hypoxia in Savannah river estuary [J]. Mar Ecol Prog Ser. 1992, 88: 161-179.

[10] W. W. Hotback, M. C. Barnhart. Lethal limits and sublethal effects of hypoxia on the amphiopod *Gammarus pseuddimnaeus* [J]. J N Am Benthol Soc. 1996, 1: 117-126.

[11] L. A. Harris, C. M. Duarte, S. W. Nixon. Allometric laws and prediction in estuarine and coastal ecology [J]. Estuaries Coasts. 2006, 29: 340-344.

[12] S. Sun, F. Wang, C. Li, et al. Emerging challenges: Massive green algae blooms in the Yellow Sea [J]. Nat Preced. 2008, hdl: 10101/npre. 12008.12266.10101.

[13] S. Joyce. The dead zones: oxygen-starved coastal waters [J]. Environ Health Perspect. 2000, 108: A120-125.

[14] J. S. Gray, S. S. R. Wu, Y. Y. Or. Review: Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment [J]. Mar Ecol Prog Ser. 2002, 238: 249-279.

[15] R. S. Wu. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses [J]. Mar Pollut

Bull. 2002,45:35-45.

[16] B. Manolescu, E. Oprea, C. Busu, et al. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway [J]. Biochimie. 2009, 91: 1347-1358.

[17] G. Wang, G. Semenza. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Biol Chem. 1995, 270: 1230-1237.

[18] M. A. Maynard, M. Ohh. von Hippel-lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kideny cancer [J]. Am J Nephrol. 2004, 24: 1-13.

[19] X. H. Zhang, M. H. Wang, G. F. Tan, et al. Molecular selection and functional divergence of HIF-αproteins in vertebrates [J]. Genetica. 2010, 138: 1241-1250.

[20] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue, et al. Hypoxia inducible factor 1 is a bassic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular O2 tension [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 5510-5514.

[21] R. J. Kewley, M. L. Whitelaw, A. Chapman-Smith. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators [J]. Int J Biochem Cell Biol. 2004, 36: 189-204.

[22] M. Gassmann, D. Chilov, R. H. Wenger. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1 alpha. ARNT is not necessary for hypoxia induction of HIF-1alpha in the nucleus [J]. Adv Exp Med Biol. 2000, 475: 87-99.

[23] C. J. Schofield, P. J. Ratcliff. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004, 5: 347.

[24] G. L. Wang, G. L. Semenza. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia [J]. J Biol Chem. 1993, 268: 1147-1152.

[25] N. Jiang, T. C. He, A. Miyajima, et al. The box1 domain of the erythropoietin receptor sepcifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin-2 beta-receptor chimera [J]. J Biol Chem. 1996, 271: 16472-16476.

[26] C. P. Bracken, M. L. Whitelaw, D. J. Peet. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxia responses [J]. Cell Mol Life Sci. 2003, 60: 1376-1393.

[27] I. Beck, S. Ramirez, R. Weinmann, et al. Enhancer element at the 3`-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene [J]. J Biol Chem. 1991, 266: 15563-15566.

[28] G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Biol Chem. 1996, 271: 32529-32537.

[29] A. Damert, E. Ikeda, W. Risau. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells [J]. Biochem J. 1997, 327: 419-423.

[30] K. Yamashita, D. J. Discher, J. Hu, et al. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia: contributions of HIF-1, AP-1, GATA-2, and CBP/p300 [J]. J Biol Chem. 2001, 276: 12645-12653.

[31] T. Sanchez-Elsner, L. M. Botella, B. Velasco, et al. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression [J]. J Biol Chem. 2001, 276: 38527-38535.

[32] W. Zhang, T. Tsuchiya, Y. Yasukochi. Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia [J]. J Hum Genet. 1999, 44: 293-299.

[33] P. J. Kallio, K. Okamoto, S. O`Brien, et al. Singal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 alpha [J]. EMBO J. 1998, 17: 6573-6586.

[34] J. L. Ruas, L. Poellinger, T. Pereira. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription [J]. J Cell Sci. 2005, 118: 301-311.

[35] K. Hirota, G. L. Semenza. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. Crit Rev Oncol Hamatol. 2006, 59: 15-26.

[36] R. H. Wenger. Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression [J]. FASEB J. 2002, 16: 1151-1162.

[37] J. P. Piret, D. Mottet, M. Raes, et al. Is HIF-alpha a pro- or an anti-apoptotic protein[J]. BiochemPharmacol. 2002, 64: 889-892.

[38] H. Kojima, H. Gu, S. Nomura, et al. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 alpha deficient chimeric mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99: 2170-2174.

[39] H. Tian, S. L. McKnight, D. W. Russel. Endothelial PAS domain protein 1(EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells [J]. Genes Dev. 1997, 11: 72-82.

[40] K. L. Covello, J. Kehler, H. Yu, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth [J]. Genes Dev. 2006, 20: 557-570.

[41] E. H. Gort, G. Haaften, L. Verlaan, et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of

Hypoxia-inducible factor-2alpha [J]. Oncogene. 2008, 27:1501-1510.

[42] M. Scortegagna, K. Ding, Y. Oktay, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1-/- mice [J]. Nat Genet. 2003, 35: 331-340.

[43] Y. Z. Gu, S. M. Moran, J. B. Hogenesch, et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha [J]. Gene Exp. 1998, 7: 205-213.

[44] Y. Makino, R. Cao, K. Svensson, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression [J]. Nature. 2001, 414: 550-554.

[45] T. Yamashita, O. Ohneda, M. Nagano, et al. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS [J]. Mol Cell Biol. 2008, 28: 1285-1297.

[46] A. J. Soitamo, C. M. I. Rabergh, M. Gassmann, et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) from rainbow trout [J]. J Biol Chem. 2001, 276(19699-19705).

[47] S. H. W. Law, R. S. S. Wu, P. K. S. Ng, et al. Cloning and expression analysis of two distinct HIF-alpha isoforms -gcHIF-1alpha and gcHIF-4alpha -from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. BMC Mol Bio. 2006, 7: 15-28.

[48] M. S. Rahman, P. Thomas. Molecular cloning, characterization and expression of two hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1alpha and HIF-2alpha, in a hypoxia-tolerant marine teleost, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) [J]. Gene. 2007, 396: 273-282.

[49] D. A. Rojas, D. A. Perez-Munizaga, L. Centanin, et al. Cloning of hif-1alpha and hif-2alpha and mRNA expression pattern during development in zebrafish [J]. Gene Expr Patterns. 2007, 7: 339-345.

[50] R. J. Shen, X. Y. Jiang, J. W. Pu, et al. HIF-1alpha and -2alpha genes in a hypoxia-sensitive teleost species Megalobrama amblycephala: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia [J]. Comp Biochem Phys B. 2010, 157: 273-280.

[51] M. S. Rahman, P. Thomas. Molecular cloning, characterization and expression of two hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1alpha and HIF-2alpha, in a hypoxia-tolerant marine teleost, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) [J]. Gene. 2007, 396: 273-282.

[52] S. H. W. Law, R. S. S. Wu, P. K. S. Ng, et al. Cloning and expression analysis of two distinct HIF-alpha isoforms -gcHIF-1alpha and gcHIF-4alpha -from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. BMC Mol Bio. 2006, 7: 15-28.

[53] R. J. Shen, X. Y. Jiang, J. W. Pu, et al. HIF-1alpha and -2alpha genes in a hypoxia-sensitive teleost species Megalobrama amblycephala: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia [J]. Comp Biochem Phys B. 2010, 157: 273-280.

[54] W. H. Powell, M. E. Hahn. Identification and functional characterization of hypoxia-inducible factor 2 alpha from the estuarine teleost, Fundulus heteroclitus: interaction of HIF-2 alpha with two ARNT2 splice variants [J]. J Exp Zool. 2002, 294: 17-29.

[55] H. A. Huebers, C. A. Finch. The physiology of transferrin and transferrin receptors [J]. Physiol Rev. 1987, 67: 520-582.

[56] M. E. Brandsma, A. M. Jevnikar, S. W. Ma. Recombinant human transferrin: beyond iron binding and transport[J]. Biotechnol Adv. 2011, 29: 230-238.

[57] M. Lucero, E. Schaeffer, G. N. Cohen, et al. The 5` region of the human transferrin gene: structure and potential regulatory sites [J]. Nucleic Acids Res. 1986, 14: 8692.

[58] S. Bailey, R. W. Evans, R. C. Garratt, et al. Molecular structure of serum transferrin at3.3 A resolution [J]. Biochemistry. 1998, 27: 5804-5812.

[59] H. Kurokawa, B. Mikami, M. Hirose. Crystal structure of diferric hen ovotransferrin at2.4 A resolution [J]. J Mol Biol. 1995, 254: 196-207.

[60] P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin [J]. J Biol Chem. 1978, 253: 1930-1937.

[61] P. Aisen. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells [J]. Met Ions Biol Syst. 1998, 35: 585-631.

[62] E. N. Baker, H. M. Baker, R. D. Kidd. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structrural framework [J]. Biochem Cell Biol. 2002, 80: 27-34.

[63] R. T. A. MacGillivray, S. A. Moore, J. Chen, et al. Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release [J]. Biochemistry. 1998, 37: 7919-7928.

[64] H. M. Baker, A. B. Mason, Q. Y. He, et al. Ligand variation in the transferrin family: the crystal structure of the H249Q mutant of the human transferrin N-lobe as a model for iron binding in insect transferrins [J]. Biochemistry. 2001, 40: 11670-11675.

[65] M. B. Omary, I. S. Trowbridge. Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells [J]. J Biol Chem. 1981, 256: 12888-12892.

[66] Z. M. Qian, H. Li, H. Z. Sun, et al. Targeted drug delivery via the transferrin receptormediated endocytosis pathway [J]. Pharmacol Rev. 2002, 54: 561-587.

[67] G. W. Bates. The Biochemistry and physiology of iron, Section I: Structure and function of transferrins [M]. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc, 1982.

[68] S. Tsuji, H. Kato, Y. Matsuoka, et al. Molecular weight heterogeneity of bovine serum transferrin [J]. Biochem Genetics. 1984, 22: 1145-1159.

[69] 龙华, 曾勇, 郑英. 转铁蛋白的研究进展. 生物工程进展. 2001, 21: 32-39.

[70] J. Parkkinen, L. Bonsdorff, S. Peltonen, et al. Catalytically active iron and bacterial growth in serum of haemodialysis patients after i. v. iron-saccharate administration [J]. Nephrol Dial Transplant. 2000, 15: 1827-1834.

[71] T. Shimo-Oka, Y. Hagiwara, E. Ozawa. Class specificity of transferrin as a muscle trophic factor [J]. J Cell Physiol. 1986, 126: 341-351.

[72] N. Ohtsuka, K. Urase, T. Momoi, et al. Induction of bud formation of embryonic mouse tracheal epithelium by fibroblast growth factor plus transferrin in mesenchyme-free culture [J]. Dev Dyn. 2001, 222: 263-272.

[73] D. A. Sirbasku, R. Pakala, H. Sato, et al. Thyroid hormone dependent pituitary tumor cell growth in serum-free chemically defined culture [J]. Biochemistry. 1991, 30: 7466-7477.

[74] A. Bruinink, C. Sidler, F. Birchler. Neurotrophic effects of transferrin on embryonic chick brain and neural retinal cell cultures [J]. Int J Dev Neurosic. 1996, 14: 785-795.

[75] C. I. Garcia, P. Paez, E. F. Soto, et al. Differential effects of apotransferrin on two populations of oligodendroglial cells [J]. Gila. 2003, 42: 406-416.

[76] C. Gentili, R. Doliana, P. Bet, et al. Ovotransferrin and ovotransferrin receptor expression during chondrogenesis and endochrondral bone formation in developing chick embryo [J]. J Cell Biol. 1994, 124: 579-588.

[77] D. G. Menter, J. L. Herrmann, G. L. Nicolson. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis [J]. Clin Exp Metastasis 1995, 13: 67-88.

[78] V. Lesnikov, M. Lesnikova, H. J. Deeg. Pro-apoptotic and anti-apoptotic effects of transferrin and transferrin-derived glycans on hematopoietic cells and lymphocytes [J]. Exp Hematol. 2001, 29: 477-489.

[79] V. A. Lesnikov, M. P. Lesnikova, H. M. Shulman, et al. Prevention of Fasmediated

Hepatic failure by transferrin [J]. Lab Invest. 2004,84:342-352.

[80] A. Roesner, C. Fuchs, T. Hankeln, et al. A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals [J]. Mol Biol Evol. 2005, 22: 12-20.

[81] J. B. Wittenberg, B. A. Wittenberg. Myoglobin function reassessed [J]. J Exp Biol. 2003, 206: 2011-2020.

[82] T. Burmester, T. Hankeln. Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system [J]. News Physiol Sci. 2004, 19: 110-113.

[83] T. Burmester, B. Ebner, B. Weich, et al. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues [J]. Mol Biol Evol. 2002, 19: 416-421.

[84] D. Kugelstadt, M. Haberkamp, T. Hankeln, et al. Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2004, 325: 719-725.

[85] C. Fuchs, T. Burmester, T. Hankeln. The amphibian globin gene repertoire as revealed by the Xenopus genome [J]. Cytogenet Genome Res. 2006, 112: 296-306.

[86] R. C. Hardison. A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93: 5675-5679.

[87] T. Hankeln, B. Ebner, C. Fuchs, et al. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family [J]. J Inorg Bio. 2005, 99: 110-119.

[88] A. Pesce, M. Bolognesi, A. Bocedi, et al. Neuroglobin and cytoglobin, fresh blood for the vertebrate globin family [J]. EMBO Reports. 2002, 3: 1146-1151.

[89] Y. Sun, K. Jin, A. Peel, et al. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100: 3497-3500.

[90] P. P. Mmmmen, J. M. Shelton, S. C. Goetsch, et al. Neurnglobin, a novel member of theglobin family, is expressed in focal regions of the brain [J]. J Histochem Cytochem. 2002, 50: 1591-1598.

[91] E. Fordel, E. Geuens, S. Dewilde, et al. Cytoglobin expression is up-regulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2004, 319: 342-348.

[92] J. M. Kriegl, A. J. Bhattacharyya, K. Nienhaus, et al. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99: 7992-7997.

[93] N. Kawada, D. B. Kristensen, K. Asahina, et al. Charaeterization ofa stelate cell activation-associated protein (STAP) witll peroxidase activity found in rat hepatic stelate cells [J]. J Biol Chem. 2001, 276: 25318-25323.

[94] K. Nakatani, H. Okuyama, Y. Shimahara, et al. Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis [J]. Lab Invest. 2004, 84: 91-101.

[95] C. W. Shao, S. L. Chen, C. F. Scheuring, et al. Construction of two BAC libraries from hafl-smooth tongue sole Cynoglossus semilaevis and identification of clones containing candidate sex-determination genes [J]. Mar Biotechnol. 2010, 12: 558-568.

[96] E. P. Cummins, C. T. Taylor. Hyooxia-responsive transcription factors [J]. Pflugers Arch. 2005, 450: 363-371.

[97] B. H. Jiang, E. Rue, G. L. Wang, et al. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Biol Chem. 1996, 271: 17771-17778.

[98] M. Ema, S. Taya, N. Yokotani, et al. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor I alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94: 4273-4278.

[99] J. Luo, M. Shibuya. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (I alpha, 2 alpha and 3 alpha) [J]. Oncogene. 2001, 20: 1435-1444.

[100] N. Masson, C. Willam, P. Maxwell, et al. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation [J]. EMBO J. 2001, 20: 5197-5206.

[101] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing [J]. Science. 2001, 292: 464-468.

[102] T. Pereira, X Zheng, J. L. Ruas, et al. Identification of residues critical for regulationof protein stability and the transactivation function of the hypoxia-inducible factor-1alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product [J]. J Biol Chem. 2003, 278: 6816-6823.

[103] Y. Kageyama, M. Koshiji, K. K. W. To, et al. Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation [J]. FASEB J. 2004, 18: 1028-1030.

[104] J. Gu, J. Milligan, L. E. Huang. Molecular mechanism of hypoxiainducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine [J]. J Biol Chem. 2001, 276: 3550-3554.

[105] J. L. Ruas, L. Poellinger, T. Pereira. Functional analysis of hypoxiainducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein [J]. J Biol

Chem. 2002,277:38723-38730

[106] Y. Abe, R. Nagata, Y. Hasunuma, et al. Isolation, characterization and cDNA cloning of a one-lobed transferrin from the ascidian Halocynthia roretzi [J]. Comp Biochem Physiol B. 2001, 128: 73- 79.

[107] J. M. Brooks, G. M. Wessel. The major yolk protein in sea urchins is a transferrin-like, iron binding protein [J]. Dev Biol. 2002, 245: 1-12.

[108] Z. Liang, L. Sottrup-Jensen, A. Aspan, et al. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94: 6682-6687.

[109] L. A. Lambert, H. Perri, T. J. Meehan. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins [J]. Comp Biochem Physiol B. 2005, 140: 11-25.

[110] N. B. Terwilliger. Function adaptations of oxygen transport proteins [J]. J Exp Biol. 1998, 201: 1085-1098.

[111] C. P. Mangum. Respiratory function of the red blood cell hemoglobins of six animal phyla [J]. Adv Comp Environ Physiol. 1992, 13: 117-149.

[112] 张鋆. 荧光实时定量PCR 技术初探. 生命科学趋势. 2003, 12: 1-28.

[113] 邹桂伟, 罗相忠, 胡德高, 等. 长薄鳅耗氧率与窒息点的研究. 湖泊科学. 1998, 10: 49-54.

[114] 雷思佳. 盐度与体重对台湾红罗非鱼耗氧率的影响. 应用生态学报. 2002, 13: 739-742.

[115] 王艺磊, 张子平, 张殷鹏, 等. 真鲷耗氧率的初步研究. 集美大学学报. 2002, 7: 193-197.

[116] G. G. Winberg. Rate of metabolism and food requirements of fishes[J]. Canada: Fisheries research board of Canada. 1956, 194: 1960.

[117] M. Jobling. Fish ecophysiology. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning[J]. London: Chapman and Hall. 1993: 1-44.

[118] 杨春, 李达, 徐光龙, 等. 鄱阳湖鳜鱼窒息点与耗氧率的初步研究. 江西农业学报. 1998, 10: 96-98.

[119] 李生武, 蒋国民, 王宾贤. 蓝鳃太阳鱼种耗氧率与窒息点的研究. 湖北农学院学报. 2002, 22: 504-506.

[120] A. Roesner, T. Hankeln, T. Burmester. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. J Exp Bio. 2006, 209: 2129-2137.

[121] A. Wawrowski, F. Gerlach, T. Hankeln, et al. Changes of globin expression in the japanese medaka (Oryzias latipes) in response to acute and chronic hypoxia[J]. J Comp

Physiol B. 2010: DOI:10.1007/s00360-00010-00518-00362.

[122] A. Roesner, S. A. Mitz, T. Hankeln, et al. Globins and bypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*[J]. FEBS J. 2008, 275: 3633-3643.

[123] T. Acker, K. H. Plate. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology[J]. J Mol Med. 2002, 80: 562-575.

[124] J. J. Haddad, H. L. Harb. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) -1alpha[J]. Int Immunopharm. 2005, 5: 461-483.

[125] P. T. Schumacker. Current paradigms in cellular oxygen sensing[J]. Adv Exp Med Biol. 2003, 543: 57-71.

[126] P. B. Freeburg, D. R. Abrahamson. Hypoxia-inducible factors and kideny vascular development[J]. J Am Soc Nephrol. 2003, 14: 2723-2730.

[127] Ribas A. V., Ho P. L., M. Tanizaki M., et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem 2000, 31: 91-94.

#### 攻读博士学位期间发表的学术论文

（1）Wang Z. -S., Qi Z. -T., Qiu M., et al. Changes of globins expression in the half-Smooth tongue sole (*Cynoglossus Semilaevis*) in response to short-term hypoxia. Acta Ichthyologica et Piscatoria. 2011, 41(3): 179-184

（2）Wang Z. -S., Qi Z. -T., Tian J-Y., et al. Cloning of hemoglobin-α1 from half-smooth

Tongue sole (*Cynoglossus Semilaevis*) and its expression under short-term hypoxia. Zoological Research. 2011, 32(6): 641-646

（3）王资生，郭锡杰，黄金田，等.盐度和体质量对半滑舌鳎标准代谢率的影响.海洋科

学,2011,35(3):83-86

致谢

本文是在导师郭锡杰研究员的悉心指导下完成的。在近四年的学习生涯中，从我学位课程的拟定、研究方向的落实以及论文选题、实验设计与实施、直至最后文稿的修改审定无不凝聚着导师的智慧和心血。在此，谨向导师表示最诚挚的敬意和谢意！几年来，导师渊博的学识、严谨治学的作风和谦逊儒雅的为人，将在今后的人生道路上永远激励我克服困难、不断攀登。衷心感谢导师对我的培养与教诲！

本文的实验工作得到蚕研所多位老师、同学的热情帮助和支持。衷心感谢沈中元研究员、李木旺博士为论文实验工作所提供的实验室！感谢吴萍老师和侯成香、黄勇、张月华等同学以及高坤、王秀、沈小娟、王小强等研究生在实验技术方面给我的诸多帮助与关心！

感谢研究生部的领导和老师为我学习与生活提供的帮助与关心！感谢学位课程所有任课老师的辛勤付出！

感谢我的同事齐志涛博士和他的爱人张启焕老师！在本课题的实验、论文撰写以及平时的工作中，始终得到他们热情的支持与帮助。

感谢我的家人！多年来，他们对我的工作和学习一直给予鼓励、理解和支持。尤其是我的爱人，她的敬业以及对家庭的付出，让我敬重有加。

另外，在学习期间，我工作单位------盐城工学院的领导、同事也给与了很多支持与关心。化学与生物工程学院的黄金田教授、王爱民博士、赵卫红博士、吕林兰博士、吕富老师、仇明老师以及2007级海洋技术专业的赵志芳、丁力、姚益明等同学也为本文的实验工作提供了很多帮助，在此一并致以诚挚的谢意。

恩师难忘，无以回报。所有关心、指导和帮助过我的老师、专家、领导以及同事挚友，我将铭记在心，永怀感恩！

**王资生**

2012年3 月