

对虾免疫相关基因的克隆、表达及功能研究

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 200226068

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

\_\_\_\_\_硕士\_\_\_\_\_学 位 论 文

# 对虾免疫相关基因的克隆、表达及功能研究

Cloning, expression and functional research of  
immune-relevant genes of shrimp

何南海

指导教师姓名: 徐洵 教授

专业名称: 生物化学及分子生物学

论文提交日期: 2005年1月

论文答辩时间: 2005年1月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 杨丰

评 阅 人: 章晓波

2005年1月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文,是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果,均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名): 何南海

2005 年 1 月 18 日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
主要实验仪器.....	3
前言	
一、 我国对虾的养殖现状.....	4
二、 对虾的免疫系统.....	4
三、 对虾的免疫机理.....	5
四、 脊椎动物天然免疫系统研究进展.....	8
五、 抑制性差减杂交技术.....	13
第一部分 对虾免疫相关基因的克隆	
材料与方法	
一、 材料.....	17
二、 常用溶液的配制.....	18
三、 实验方法.....	21
结果与分析	
一、 SMART cDNA 的合成.....	29
二、 PCR 循环圈数的优化.....	30
三、 Rsa I 的酶切分析.....	31
四、 接头连接效率的检测.....	32
五、 SSH 的结果.....	33
六、 差减效率的检测.....	33
七、 差异表达基因（片断）的 T 载体克隆.....	34
八、 对差异基因的进一步筛选.....	34
九、 差异克隆子的测序与同源比较.....	36
十、 虚拟 Northern 杂交和半定量 RT-PCR 的方法验证基因的差异性.....	41
讨论.....	43
小结.....	46

## 第二部分 免疫相关基因的表达、纯化及功能研究

<b>材料与方法</b>	
一、 材料.....	47
二、 常用溶液的配制.....	49
三、 实验方法.....	51
<b>结果与分析</b>	
一、 PI 和 IntIP 的克隆及重组质粒的构建.....	56
二、 重组质粒的小量诱导表达以及可溶性鉴定.....	57
三、 包含体蛋白的复性.....	59
四、 GST 融合蛋白的纯化.....	60
五、 重组蛋白的抗病毒分析.....	61
<b>讨论</b> .....	64
<b>小结</b> .....	64
<b>参考文献</b> .....	65
<b>致谢</b> .....	72

## 摘要

对虾是海产品中产值最高的品种之一，但自从 90 年代以来，一直受到病害（微生物和病毒）的严重威胁。为了更好的了解对虾的非特异性免疫系统，探索对虾防治的新途径，我们采用了抑制性差减杂交（Suppression subtractive hybridization, SSH）的方法，分别从注射了微生物的和对病毒有抗性的日本对虾的血细胞当中克隆到了许多与之相关的基因，并进行了初步的功能研究。

利用 SSH, 用注射了微生物悬液的对虾和正常的日本对虾（*Penaeus japonicus*）来对比，获得了 25 个可能与免疫相关的基因，其中的 8 个基因是首次在对虾体内发现的，如 Ras 相关的核蛋白 Ran（Ras-related nuclear protein, Ran），生长因子结合蛋白 Grb, TGF- $\beta$  受体作用蛋白等等。同样，用抗病虾和正常的虾进行对比，发现其中的 30 个基因可能参与了对虾的免疫反应。而其中的 22 个基因（或片断）是第一次在对虾当中报道，如 ubiquitin 蛋白，干扰素类似蛋白（Int1P）以及一些与高等动物的补体和细胞因子具有一定同源性的基因（片断）。为了进一步确定这些基因是否在表达上具有差异性，利用虚拟的 Northern 杂交的方法（Virtual Northern Hybridization）对随机选取的 9 个基因进行了进一步的验证，结果与 SSH 相符，确实具有差异性。

将其中具有完整 ORF 的两个基因（PI 和 Int1P）克隆到原核载体当中进行表达，用纯化的蛋白进行体外的抗病毒试验，结果显示这两个蛋白具有一定的非特异性抗病毒功能。

应用 SSH 技术，从对虾体内得到了众多与免疫相关的基因，对其中一些基因的深入研究，不但能将对虾的疾病防治产生积极影响，同时也将深化我们对非特异性免疫的进一步认识。

**关键词：**抑制性差减杂交（SSH）；日本对虾；非特异性免疫；蛋白酶抑制剂（PI）

## Abstract

Shrimp is one of the most economic species in aquaculture, but it has been seriously threatened by diseases (microbial and viral diseases) since 1990's. In order to further understand the innate immunity of shrimp and explore new approaches against the diseases, suppression subtractive hybridization (SSH) was employed to isolate immune-relevant genes which differentially express in the microbial-challenged and virus-resistant hemocytes of shrimp, *Penaeus japonicus*. The primary function research was conducted.

Using SSH, we compared the microbial-challenged shrimp with the normal shrimp and obtained 25 genes which may be involved in the immune responses, of which eight are found in shrimp for the first time, such as Ras-related nuclear protein Ran, growth factor bound protein Grb, TGF- $\beta$  receptor interacting protein. Similarly, 30 genes isolated from the virus-resistant shrimp were considered as immunity-related, of which 22 are firstly reported in shrimp, such as ubiquitin, interferon-like protein (IntIP) and some proteins which hold certain similarities with the components of the complement and cytoskeleton system. To confirm the results of SSH, nine different clones were randomly selected for virtual northern blotting. The result confirms the efficiency of SSH.

Two of the genes with complete ORFs were cloned into prokaryotic vectors to express. The functions of the proteins were assayed by cytotoxicity experiment. The results indicate that both the two proteins have non-specific antiviral activities.

A number of differentially expressed genes have been isolated from the hemocytes of the shrimp by SSH and the functions of some proteins have been primarily conducted. The results may provide new ideas against the diseases and will facilitate the overall understanding of the immunity of the shrimp, as well as the innate immunity of invertebrates.

**Key Words:** SSH; *Penaeus japonicus*; innate immunity; protease inhibitor (PI)

## 本论文所用主要实验仪器

仪器名称	型号	生产商
PCR 仪	T3 Thermocycler	Biotron
凝胶成像仪	white/ultraviolet Transilluminator8000	UVP
倒置荧光显微镜	IX70	Olympus
台式离心机	Minispin	Eppendorf
加样器	Labmate	HTL
漩涡振荡器	Vortex-genie2	Scientific industries
高速冷冻离心机	J2-M1	Beckman
台式高速冷冻离心机	64R centrifuge	Beckman
紫外分光光度计	Ultrospec2100 pro	Amersham pharmacia
蛋白电泳装置	Hoefer MiniVE	Amersham pharmacia
电转膜装置	Minive Blotter	Amersham pharmacia
电子分析天平	AE240	Mettler
pH 计	320	Mettler
冷冻干燥机	CD4	Heto
超低温冰箱	Scientific Bio-freezer	Forma
制冰机	AF10AS	Scotsman
超声波破碎仪	VC750	Sonics
分子杂交炉	1004-20	Shellab
紫外交联仪	BLX-254	EEC
烘箱	1350FX	Shellab
水浴摇床	1217-20	Shellab
超纯水制备装置	HPLC/UF	Labconco
酶标仪	MK3	Labsystems
透射电镜	CX100	JEOL

## 前 言

20 世纪 80 年代以来,随着养殖业的迅速发展,虾类的人工养殖得到了很大的收益,同时,也受到了前所未有的养殖病害的侵袭。由于使用抗生素等药物有安全性和抗药性等方面的考虑,因此研究甲壳类动物的免疫机制,有效的提高虾类本身的抗病能力,是解决病害问题的一条非常有效的途径。自 60 年代以来,瑞典,美国,日本等国的学者发表了大量的论文集专著,对甲壳动物免疫机制等问题进行了有益的探索。近十年来,甲壳动物的免疫学得到了迅速的发展,正逐步形成了一门新的学科,其中虾类的免疫学的发展组最快。这就为解决虾类病害问题打下了坚实的理论基础。

### 一、 我国对虾的养殖现状

对虾是人们最喜欢的海产食品之一,因此对虾养殖具有较高的经济价值。世界对虾的养殖业从 50 年代开始,就以惊人的速度增长,而对对虾的消费量也逐年递增[1]。我国对虾养殖业虽从近二十年才发展起来,但已成为养殖业中最具经济价值的水产品之一。我国当前的对虾养殖品种主要有斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 和日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 等[2]。自从 80 年代以来,对虾病害的频繁发生给对虾养殖业带了很大的影响,特别是从 1993 年在全世界范围爆发的由对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 引起的病毒性疾病以来,使对虾养殖业遭受了前所未有的打击。而至今,对虾白斑病毒仍是对虾养殖业最主要的威胁[3]。

### 二、 对虾的免疫系

一般认为,无脊椎动物的免疫系统只生成原始的、非特异性的防御系统[4]。对虾的免疫系统主要包括免疫器官、免疫细胞和各种免疫因子。免疫器官包括甲壳、鳃、血窦和淋巴器官等,免疫细胞包括血细胞和淋巴细胞[7],免疫因子指各种与免疫相关的多肽和蛋白。

#### 1. 免疫器官



虾类的免疫器官包括甲壳, 鳃, 血淋巴和淋巴器[5, 6]。甲壳和鳃除具有其他功能外, 还具有免疫功能或说既有抵抗病毒微生物侵染和保护机体的功能, 在非特异免疫中也具有一定的作用。而虾类主要的免疫组织和器官为血淋巴和淋巴器官。淋巴器官位于虾体胃的腹侧, 左右 1 叶, 长约 5-7mm, 为膜包被的管状结构, 又内皮细胞, 基质细胞和血细胞 3 种细胞组成。淋巴器为一造血器官, 能产生无颗粒细胞和颗粒细胞。

## 2. 免疫细胞

虾的免疫细胞主要是通过血淋巴中的血细胞来完成的。Söderhall 等[7]用 EDTA-柠檬酸钠盐缓冲液作为抗凝剂采用密度梯度离心 *Carcinus maenas* 的血细胞得到 3 中血细胞即透明细胞, 半颗粒细胞和颗粒细胞。有关虾的国内外文献均依据颗粒有无作为分类的依据。中国对虾根据颗粒的大小既有分为透明细胞, 小颗粒细胞和大颗粒细胞。小颗粒细胞富含线立体, 使其在防御反应中具有活跃的包吐作用和识别异物的能力, 是防御的关键细胞。颗粒细胞无吞噬能力, 但活化得酚氧化酶系统组分可迅速使之发生包吐作用释放出来有活性的酚氧化酶参与体液反应。

## 三、 虾的免疫机理

到目前为止, 有关虾的免疫都是非特异性免疫机理。已有的研究分为两种, 一种是体液免疫, 主要包括了血淋巴的溶菌作用, 凝集作用, 机体对脊椎动物红细胞的溶解作用及血淋巴中与免疫相关的一些酶类。另一种是细胞免疫, 指血淋巴中血细胞对异物的吞噬, 杀死和排除作用。虾的免疫机理是由体壁(甲壳)的防护, 阻挡作用构成机体的第一道防线, 当异物突破第一道防线后或经食道, 鳃等与外界相通的器官或体腔进入机体后, 通过血淋巴的循环进行滤过作用, 这种滤过作用将异物固定在一定的组织器官内, 以免扩散。最后在血细胞, 淋巴细胞, 血清免疫因子的联合作用下, 这些部位的病原或异物被杀死, 清除或随蜕皮排出体外, 达到抗感染或免除疾患的目的。

### 1. 屏障作用

虾的甲壳充当外骨骼, 除了具有支持的机体的作用外, 还兼具了阻挡

异物的功能，在免疫过程中起第一道防线的作用。同时蜕皮也是虾排除体内和体表异物的重要途径，是虾抵抗病原菌感染和自洁的有效方法。

## **2. 滤过作用**

### **2.1 鳃的滤过作用**

进入机体的大分子和微生物，通过血淋巴液的流动而被滤在鳃血窦和鳃丝末端膨大的结构中。此时鳃丝腔中的血细胞游走到顶端囊状结构中进行吞噬作用，清除异物或到蜕皮是一同蜕掉。

### **2.2 血窦的滤过作用**

虾的血窦在全身形成网络，进行动静脉血的交换，交换的过程中异物被限制在血窦中。此时，血细胞的数量会明显增加，吞噬作用也加强，会表现出炎症反应，吞噬后的产物、毒物等主要通过蜕皮清除。

### **2.3 淋巴器官的滤过作用**

相比前两种滤过作用，淋巴器官的滤过作用则表现为专一的滤过杀菌功能，吞噬后的残余物是通过输出淋巴管被排到肝胰脏。

## **3. 杀菌作用**

虾的病原或异物突破机体的防御屏障进入机体后被快速滤入具有滤过作用的组织后器官，在这些部位的病原体的清除或消灭由血清和血细胞共同作用完成。参与这种过程的细胞主要是吞噬细胞，还包括淋巴中的血细胞和淋巴器官中的淋巴细胞[5]。

## **4. 液性免疫因子**

### **4.1 酚氧化酶（PO）及酚氧化酶原（proPO）激活系统**

虾类中的 proPO 系统是一种与脊椎动物补体系统类似的酶级联系统。国内外研究表明，酚氧化酶原激活系统是由丝氨酸蛋白酶和其他因子组成的。研究表明，proPO 系统可以被  $\beta$ -1, 3-葡聚糖（ $\beta$ G）[8], 脂多糖（LPS）[9], 肽聚糖（PG）[10], 胰蛋白，十二烷基硫酸钠，加热或钙浓度下降所活化[11]。活化过程产生一系列活性物质，可通过多种方式参与宿主防御反应，包括提供调理素，促进血细胞吞噬作用，包囊作用和结节形成以及介导凝集和凝固，产生杀菌物质。但其激活机制目前尚不清楚。Johansson 等[12]从螯虾中发现一种血细胞附着因子，该因子是 76KD 的单

一蛋白，伴随着 proPO 系统的激活而活化，具有多种功能。1993 年在几种螯虾的血浆中检测到  $\beta$ -1, 3-葡聚糖结合蛋白 ( $\beta$  GBP)，其本身不具任何酶活性，但与  $\beta$  G 结合后，便可通过增强 ppA 与 PO 的活性而激活 proPO 系统。虾等甲壳动物在受伤或杀死病原体入侵时，可迅速在伤口附近和病原体周围产生黑色素来抑制或杀死病原体。此黑色素也是由 proPO 系统中的 proPO 转化而来。大量实验表明，酚氧化酶活力与机体免疫有直接相关性，可以作为一个衡量虾免疫功能大小的指标。

#### 4.2 凝集素

目前一般认为在无脊椎动物体液中不具免疫球蛋白等高度特异性免疫因子，因此，对外界异物分子不可能通过抗原抗体结合反应来实现。已有的资料证明，凝集素在对虾等无脊椎动物的体液反应中起着极为重要的作用[13]。甲壳动物的凝集素主要有两种：一种是存在于血清中的可溶性的凝集素；另一种凝集素分子则存在于透明细胞等血细胞里或结合在细胞膜表面。血细胞可通过这种凝集分子同异物分子表面进行结合，以便对异物的进一步吞噬或包裹。同时，陈皓文认为其又具调节素功能，促进吞噬细胞的吞噬和识别作用。Sharon 等[14]认为凝集素能够选择异物凝集并充当识别因子，这是由于凝集素表面携带有特异性糖基决定受体，它根据颗粒物质表面的糖基组成来区分“自己”和“异己”。凝集素的活性与虾的抗病害密切相关，它可以作为虾类健康与否的一个血液学指标。

#### 4.3 溶血素

关于甲壳动物溶血素的报道较少，仅在对虾、龙虾、蟹等动物内有所发现。溶血素也是无脊椎动物免疫防御系统中的一种重要的非特异性免疫因子，其作用可能类似脊椎动物的补体系统，可溶解破坏异物细胞，参与调理[15]，并可能与无脊椎动物体液的杀菌作用以及 proPO 激活系统有关[16]，由于其在免疫防御中发挥着重要的作用，因此其活性也被用来检测对虾等甲壳类动物健康状况的一项定量指标。

#### 4.4 蛋白酶抑制剂

Hall 等, Aspan 等在螯虾中分离出几种蛋白酶抑制剂，并发现它与其他血浆因子一起参与对抗异物入侵，且对免疫应答起调节作用。

#### 4.5 抗菌肽

Destonmieux D. 等[17, 18]从对虾 (*Penaeus vannamei*) 的血淋巴中分离 3 种不同的抗菌肽, 并证明其分子量为 5.5-6.6 KD, 由颗粒细胞的颗粒合成和分泌, 并对革蓝氏阳性菌和真菌具有明显的抗菌活力, 而且经微生物刺激后, 其在血浆中的含量明显提高。

### 四、无脊椎动物天然免疫系统研究进展

免疫系统保护生物免遭外源异己物质的侵袭, 在进化上分为先天性(天然)免疫和适应性(获得性)免疫。先天性免疫系统是一个更古老的防卫机制, 发现于所有的多细胞生物中, 这个系统是在早期限制感染的第一道防线, 它依赖于宿主的受体识别入侵微生物表面的保守分子模式[19-21]。尽管无脊椎动物不能够产生抗体, 没有免疫记忆, 但先天性免疫系统同样能在被感染后产生有效而快速的免疫反应, 从而有效保护它们免受微生物的侵袭。人们已经在先天性免疫系统的机制方面做了大量工作, 不仅在无脊椎动物中, 也在所有的多细胞生物中(从人到植物)。现在已经知道即使在脊椎动物中先天免疫系统对自己或异己的识别也是非常重要的, 它增强了适应性免疫系统的免疫原性。

#### 1. proPO 系统

酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase system)在无脊椎动物中起着重要的异物识别和防御功能[22, 23]。该系统中的各种因子以非活性状态存在于血细胞中, 外来信号按一定的顺序最终激活了酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)而成为有活性的酚氧化酶(phenoloxidase, PO), 活性的酚氧化酶诱导有关底物由酚变成醌, 最终产生黑色素, 黑色素沉积到外来物上, 通过包被和黑化将外来物限制和隔离开来, 已达到免疫效果; 而黑色素及其代谢中间产物还可以抑制病原菌胞外蛋白质和几丁质酶的活性, 从而杀死微生物及寄生虫, 起到免疫作用[24, 25]。

甲壳动物的 proPO 系统位于颗粒细胞或半颗粒细胞的颗粒中, 半颗粒细胞通过与微生物多糖(LPS 或  $\beta$ G)结合而导致该系统的释放; 在颗粒细胞中, 该系统的释放主要由 76KD 因子或  $\beta$ -1,3-glucan 结合蛋白( $\beta$ -1,3-glucan

binding protein,  $\beta$ GBP) 引起。PRPs 是 proPO 系统的触发分子, 它们结合于微生物成分, 并诱导 proPO 系统中蛋白酶的活化, 最后 proPO 被一种内源的胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶 (即所谓的 proPO 活化酶, ppA) 裂解, 转化成 PO。另一方面, 血浆中存在蛋白酶抑制剂来防止血细胞中 proPO 系统的自发释放 (如通过自溶作用) 后的激活, 从而起到保护自身的作用。Aspan 等[26]在螯虾 (*P. leniusculus*) 中分离纯化出 3 种蛋白酶抑制剂。155KD 的胰蛋白酶抑制剂和  $\alpha_2$ -巨球蛋白能够抑制 ppA 的活性, 避免 proPO 系统的自发释放。

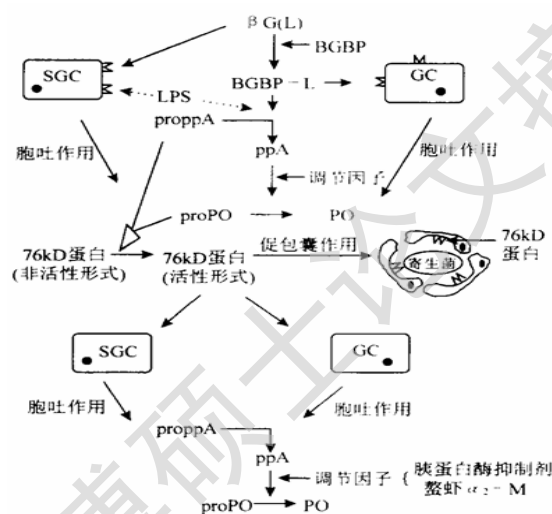


图 1 甲壳动物中 proPO 系统的激活模式

$\beta$ G(L) 为  $\beta$ -1,3-glucan, BGBP 为  $\beta$ -1,3-glucan binding protein, BGBP-L 为结合有  $\beta$ -1,3-glucan 的  $\beta$ -1,3-glucan binding protein, LPS 为 lipopolysaccharide, proppA 为非活性的 propophenoloxidase activating enzyme, ppA 为被激活的 propophenoloxidase activating enzyme, proPO 为 propophenoloxidase, PO 为 phenoloxidase. SGC 为 semigranular cell, GC 为 granular cell. 图中虚线表示激活细节尚不清楚。(根据文献 Söderhäll, 1992; Aspán *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990, 综合而来)

## 2. 模式识别蛋白 (pattern-recognition proteins, PRPs)

无脊椎动物缺乏特异性的免疫系统, 在识别外源异物的特异性上无法跟脊椎动物的抗体的相比。但是在无脊椎动物体内同样存在着一些能够识别

某一类分子的蛋白，这类蛋白被称之为模式识别蛋白 (pattern-recognition proteins, PRPs) [27]。这些模式分子包括细菌细胞壁的脂多糖或肽聚糖，真菌细胞壁的 $\beta$ -1,3-葡聚糖苷和病毒的双链 RNA。到目前为止，已经在多种的无脊椎动物中发现了 LPS 和 $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白 (LBP,  $\beta$ GBP 或 LGBP), 肽聚糖结合蛋白 (PGRP) 以及一些 lectin 和 hemolin。表 1 中列出了一些无脊椎动物中的模式识别分子[28]。

凝集素通常是糖蛋白，没有催化活性，有结合特定糖类的能力，它们存在于几乎所有生物中。它们与细胞结合，引发凝集反应。凝集素和糖类之间的反应有不同的生物学功能，如糖类和糖蛋白的细胞和组织转运[29-31]，细胞粘附[32-34]，调理作用[35]和结节形成[36]。一些无脊椎动物的 PRP 增强 proPO 系统的活化。例如 LGBP 和 $\beta$ GBP 既能介导 proPO 系统的活化，也能介导抗菌肽的诱导。螯虾 $\beta$ GBP 存在于血浆中，可与 $\beta$ -1,3-葡糖苷反应，增强 proPO 系统的活化，还可作为调理素增强吞噬[37,38]。 $\beta$ GBP 和糖苷复合物能通过其 RGD(Arg-Gly-Asp)结构域结合于螯虾颗粒细胞表面，RGD 结构域与整合素 (integrin) 样蛋白结合并诱导血细胞扩散和去颗粒。integrin 的 $\beta$ 亚单位被认为是 $\beta$ GBP 和糖苷复合物的可能受体。最近斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的 $\beta$ GBP 和太平洋蓝虾 (*Penaeus stylirostris*) 的 LGBP 也分别从血细胞和肝胰腺 cDNA 文库中被克隆。其序列与具有糖苷酶结构域的无脊椎动物 PRP 高度同源，如螯虾 LGBP、蚯蚓 *Eisenia foetida* 的体细胞溶解因子 1、蚊子 *Anopheles gambiae* 的革兰氏阴性细菌结合蛋白和海胆 $\beta$ -1,3-葡糖苷酶等。它也是在血细胞中组成型表达，给对虾注射 $\beta$ -1,3-葡糖苷或灭活弧菌后未发现其表达有明显改变[39]。鉴于丝氨酸蛋白酶在无脊椎动物先天性酶原反应中的作用，从螯虾血细胞 cDNA 文库中分离了几个编码保守丝氨酸蛋白酶的克隆，发现其中一个是 masquerade 样蛋白，此蛋白能结合 LPS,  $\beta$ -1,3-葡糖苷，革兰氏阴性细菌和酵母，但不识别革兰氏阳性细菌。此蛋白也有调理作用和细胞粘附活性，因此也是多功能蛋白[40, 41]。

表 1 无脊椎动物中发现的模式识别分子

蛋白 (Proteins)	活性 (Properties)
<b>LPS-binding proteins</b>	
Cockroach <i>Periplaneta americana</i> LBP	Opsonin
Fall webworm <i>Hyphantria cunea</i> GGBP	Binding to LPS
Horseshoe crab <i>T. tridentatus</i> Factor C	Initiation of the coagulation system
Horseshoe crab LPS-binding protein	Negative regulator of coagulation
Mosquito <i>Anopheles gambiae</i> GGBP	LPS binding activity
Silkworm <i>bombyx mori</i> BmLBP	Hemocyte nodule formation; bacterial clearance
Silkworm <i>bombyx mori</i> GGBP	Binding to G <sup>-</sup> bacteria
<b><math>\beta</math>-1,3-glucan binding proteins</b>	
Black tiger shrimp <i>P. monodon</i> $\beta$ GBP	Binding to $\beta$ -1,3-glucan
Brown shrimp <i>P. californiensis</i> $\beta$ GBP	Involvement in proPO system
Cockroach <i>Blaberus craniifer</i> $\beta$ GBP	Involvement in proPO system
Crayfish <i>P. leniusculus</i> $\beta$ GBP	Involvement in proPO system; plasma high-density lipoprotein; opsonin; degranulation factor
Horseshoe crab <i>T. tridentatus</i> Factor G	Initiation of the coagulation system
Silkworm <i>Bombyx mori</i> $\beta$ GRP	Involvement in proPO system <sup>l</sup>
Tobacco hornworm <i>M. sexta</i> $\beta$ GBP	Involvement in proPO system, agglutinin <sup>l</sup>
<b>LPS &amp; <math>\beta</math>-1,3-glucan binding proteins</b>	
Crayfish <i>P. leniusculus</i> LGBP	Involvement in proPO system
Crayfish <i>P. leniusculus</i> mas-like protein	Opsonin; cell adhesion
Earthworm <i>Eisenia foetida</i> CCF-1	Involvement in proPO system; cytolytic factor; opsonin; TNF- $\alpha$ function
Fruit fly <i>Drosophila melanogaster</i> GGBP	Induction of antimicrobial peptide production
<b>Peptidoglycan binding proteins (T3-lysozyme-like protein)</b>	
Fruit fly <i>D. melanogaste</i> PGRP-SA	Binding to PG
PGRP-SC1B	Binding to PG
Moth <i>Trichoplusia ni</i> PGRP	Binding to PG and G(+) bacteria
Silkworm <i>Bombyx mori</i> PGRP	Involvement in proPO system
<b>Lectins</b>	
Cockroach <i>Blaberus craniifer</i> BDL 1	Binding to mannose
BDL 2	Opsonin; binding to D-GlcNAc/D-GalNAc

	BDL 3	Opsonin; binding to D-GalNAc
	GSL	Binding to $\beta$ -1,3-glucan
Fruit fly <i>Drosophila melanogaster</i>	Lectin	Binding to galactos
Flesh fly <i>S. peregrina</i>	Granulocytin	Agglutinin; binding to mucin
Horseshoe crab <i>T. tridentatus</i>	Lectin	Antibacterial activity against G(-); binding to 2-keto-3-deoxyoctanate disaccharide, agarose, and dextran
	Tachylectin 1 (L6)	Haemagglutinin activity; recognition of G(-) bacteria; binding to D-GlcNAc/D-GalNAc, staphylococcal lipoteichoic acid and LPS
	Tachylectin 2 (L10)	Haemagglutinin activity; binding to S-type LPS through O-specific polysaccharide
	Tachylectin 3 and 4	Enhancing the antibacterial activity of big defensin; binding to N-acetyl group
	Tachylectin 5	Haemagglutinin activity; presence in perivitelline fluid
	Tachylectin-P (TL-P)	Sepharose CL-4B binding activity
	Plasma lectin 1 (TPL-1)	LPS and protein A binding activity
	Plasma lectin 2 (TPL-2)	Agglutinin; Involvement in proPO system <sup>l</sup>
Tobacco hornworm <i>M. sexta</i>	immulectin1	Agglutinin; Involvement in proPO system
	immulectin 2	

### 3. 凝集系统(clotting system)

凝集系统无论是在脊椎动物还是无脊椎动物中，都是一个防止血液过多流失的重要的反应。鲎 *Tachypleus tridentatus* 的凝集系统已经被详细定性，它由五个蛋白质组成一个级联系统[42, 43]，分别是丝氨酸蛋白酶原分子 C, B, G, 促凝酶，以及蛋白凝集原。因子 C 和 G 分别是脂多糖 (LPS) 和  $\beta$ -1,3 葡萄糖苷 ( $\beta$ G) 的高度敏感的识别因子，入侵病原释放的糖类结合于这些蛋白质，引起凝集因子活化和凝块形成。此凝集系统对 LPS 的高度敏感性被用于临床检验中的鲎试验 (Limulus test)，一个广泛应用的探测细菌内毒素 (或 LPS) 的分析方法。与鲎相反，甲壳类的凝集反应是通过血浆凝集蛋白的聚合，由创伤时从血细胞中释放的  $Ca^{2+}$  依赖的谷氨酰胺转移酶所催化的[44-46]。在甲壳类中，凝集蛋白首先在淡水螯虾 *Pacifastacus leniusculus* 中，然后在斑节对虾[47,48]中被克隆和定性。目前，甲壳类只有这两种凝集蛋白被完全测序，螯虾凝集蛋白的一级结构显示它属于卵黄生



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库