

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) NF κ B 抑制因子 α 基因 *PaIkBa* 克隆及表达

张文青, 龚一富*, 章 丽, 李 军, 刘晓丹

宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘要: 核转录因子 κ B 抑制因子 α (IkBa) 是 NF κ B/IkB 信号传导通路的重要成员, 参与机体抗细菌感染等多种免疫反应, 可通过蛋白质间的相互作用结合核转录因子 NF κ B, 从而调控生物体多种免疫基因表达。该研究采用 RACE 技术从香鱼中克隆得到核转录因子 κ B 抑制因子 *PaIkBa* 基因的 cDNA 全长序列 (1 341 bp, GenBank Accession No.JN801027), 开放阅读框 ORF 为 936 bp, 编码 311 个氨基酸, 5'非编码区为 64 bp, 3'非编码区为 341 bp。生物信息学分析表明, 香鱼 IkBa 蛋白的序列中包含 5 个保守的锚蛋白重复序列, N 末端含有信号诱导蛋白, C 末端含有 PEST 序列。同源性比对结果表明, 香鱼 IkBa 蛋白与胡瓜鱼 IkBa 的同源性最高, 为 95%; 其次是大西洋鲑、虹鳟、尼罗罗非鱼和鳊鱼等, 同源性分别为 76%、75%、70% 和 68%。系统进化树分析表明, 香鱼 IkBa 蛋白与胡瓜鱼、虹鳟、尼罗罗非鱼、鳊鱼和大西洋鲑等亲缘关系最近。RT-PCR 分析表明, *PaIkBa* 基因在香鱼肝脏、肾脏、脾脏和鳃中表达水平较高, 其次是肠、脑和肌肉, 在心脏中表达极少。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophil*) 感染香鱼后, *PaIkBa* 基因表达增强, 感染 24 h 达最大值, 表明 *PaIkBa* 基因在香鱼受到嗜水气单胞菌刺激的免疫过程中可能发挥着重要作用。

关键词: 香鱼; IkBa; 克隆; 嗜水气单胞菌; 基因表达

中图分类号: Q786; S917.4 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)04-0399-07

Cloning and expression analysis of the NF κ B inhibitor *IkBa* of ayu (*Plecoglossus altivelis*)

Wen-Qing ZHANG, Yi-Fu GONG*, Li ZHANG, Jun LI, Xiao-Dan LIU

School of Marine Sciences, Ningbo University, Zhejiang 315211, China

Abstract: The NF κ B inhibitor (IkBa) is an integral part of NF κ B/IkB signaling pathways, which plays roles in a variety of immune responses, such as bacterial infection resistance. By interacting with nuclear transcription factor NF κ B, IkBa controls a variety of biological immune gene expressions. In this study, full-length cDNA (1341 bp) of the NF κ B inhibitor IkBa (*PaIkBa*, GenBank Accession No. JN801027) of *Plecoglossus altivelis* was obtained by RACE and PCR, and included a 5' untranslated region (UTR) (64 bp), a 3' untranslated region (UTR) (341 bp) and an open reading frame (ORF) (936 bp) encoding a polypeptide of 311 amino acids. *PaIkBa* had high homology with other IkBas, containing a conserved ankyrin repeat domain, which was required for interacting with NF κ B, a PEST sequence in the C-terminus and a signal responsive domain in the N-terminus. The deduced amino acid sequence of *PaIkBa* shared 95% homology with *Osmerus mordax*, and 76%, 75%, 70%, and 68% homology with *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Nile tilapia*, and *Siniperca chuatsi*, respectively. Phylogenetic analysis revealed that IkBa of ayu and *Osmerus mordax*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Nile tilapia*, and *Siniperca chuatsi* were in the same phylogenetic tree. RT-PCR analysis showed that *PaIkBa* mRNA expression was highest in the liver, kidney, intestine, and gills, then followed by the spleen, brain and muscle, and was lowly expressed in the heart. Likewise, after *Aeromonas hydrophila* infection, the mRNA level of ayu *PaIkBa* in the liver was also up-regulated.

Keywords: *Plecoglossus altivelis*; IkBa; Clone; *Aeromonas hydrophila*; Gene expression

收稿日期: 2013-03-01; 接受日期: 2013-05-07

基金项目: 浙江省海洋生物技术产业创新团队项目 (2012R10029; 2012R10029-07); 宁波市科技厅项目(2010C91050; 2010C10051; 2010C10057); 宁波大学学科项目 (XKL121 和 XKL11D2099)

*通信作者(Corresponding author), Email: gongyifu@163.com

第一作者简介: 张文青(1985—), 女, 河北石家庄人, 硕士, 研究方向: 海洋鱼类病害防治及机理研究, E-mail: zwqtkx@163.com

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 又称瓜鱼、鲑鱼、细鳞鱼、海胎鱼及秋生子等, 属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鲑亚目 (Salmoniformes) 香鱼科 (Plecoglossidae) 香鱼属。其肉质细嫩、营养丰富且清香无腥, 是我国重要的小型名贵经济鱼类 (Li et al, 2011), 1993年起被多个省列为二级保护动物。近年来, 由于非法滥捕及河流环境污染等原因, 野生香鱼濒临灭绝, 为适宜市场需求, 人工养殖规模不断扩大 (Kong et al, 2012)。香鱼极易染病, 尤其是人工养殖密度大, 容易引发香鱼细菌性病害 (Chen et al, 2010)。2007年以来, 宁波等地区发生的由强致病性菌株—嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 引起的香鱼爆发性出血症给养殖户造成了经济损失 (Zhang et al, 2009)。研究香鱼免疫系统作用机理, 通过深入了解免疫相关基因进而指导香鱼病害防治, 是从根本上解决香鱼病害问题的重要措施 (Huang et al, 2011)。

NFκB/IκB (nuclear factor-kappa B/inhibitor kappa B) 信号通路是生物体重要的免疫反应通路, 进化保守, 在机体免疫和抗感染中起关键作用。机体未受外界刺激时, NFκB蛋白与IκB蛋白相结合, NFκB以抑制状态存在于细胞质中。当机体受到外界因素如病毒、细菌、氧化剂、脂多糖、紫外线及化学试剂等刺激后, NFκB蛋白就会从IκB蛋白上释放出来。IκB激酶IκK将IκB蛋白泛素化, 进而IκB蛋白被磷酸化, 随后IκB蛋白被26S蛋白酶降解。NFκB蛋白转移到细胞核, 形成NFκB/DNA 复合物 (Tergaonkar et al, 2006), 进而激活细胞内数个免疫基因的转录。IκBα蛋白是IκB家族的重要成员 (Chen et al, 1996), 从低等无脊椎动物到高等哺乳动物, 绝大多数种类生物的IκBα均由三部分组成。IκBα蛋白的中间有5~7个锚蛋白重复序列与NFκB蛋白相结合; N端有一段信号传导序列DSGXXS, 其中, 两个丝氨酸残基高度保守, 可被IκB激酶磷酸化, 是重要的信号接收单元; C端的PEST序列能够调控NFκB与DNA的结合 (Cramer et al, 1999)。目前, 人们已从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Sangrador et al, 2005)、太平洋牡蛎 (*Meretrix meretrix*) (Yang et al, 2011) 及海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) (Mu et al, 2010) 等贝类和鱼类中克隆了核转录抑制因子IκBα, 但目前香鱼中还未见IκBα基因克隆的报道。本研究采用RACE技术从香鱼中克隆IκBα的序列全长, 并对PaIκBα进行生物信息学分

析, 研究嗜水气单胞菌对香鱼IκBα基因表达的影响, 为进一步研究IκBα在香鱼免疫中发挥的作用, 解释香鱼细菌性疾病的潜在机理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用香鱼购自浙江宁海鳊溪香鱼养殖场, 体长为 (17±1.5) cm, 体重为 (45±3.5) g。饲养水温为 (18±2) °C, 每天喂食一次, 不间断充氧。暂养两周后, 选取无任何生长异常情况的三尾健康香鱼进行解剖, 分别取肝脏组织迅速冻存于液氮中, 置于-80 °C冰箱保存备用。香鱼肝组织总 RNA 采用RNAPlus (Takara, Japan) 提取。

将香鱼注射嗜水气单胞菌进行侵染实验, 感染用嗜水气单胞菌 (GIM1.172) 来自广东省菌种微生物保藏中心。将嗜水气单胞菌转接于 LB 固体培养基进行活化, 在 28 °C摇床上 120 r/min 振荡培养 24 h, 用无菌生理盐水稀释至 5.0×10⁷ cfu/mL 菌悬液。

1.2 香鱼 IκBα 的 cDNA 全长序列克隆

取健康香鱼的肝组织总 RNA, 采用随机引物法合成 cDNA, 利用反转录酶 M-MLV 按照说明书进行反转录反应。反转后的 cDNA 冻存于-20 °C冰箱中备用。根据 GenBank 已公布的 IκBα 基因的保守区域设计兼并引物 PaIκBαF 和 PaIκBαR, 以冻存的香鱼 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 法克隆香鱼 IκBα 基因的核心片段。琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, DNA 回收试剂盒对分离产物进行纯化, 连接到 pMD 19-T vector (Takara, Japan),

表 1 引物及序列

Table 1 Oligonucleotide primer sequences	
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
PaIκBαF	GAG ACA GAC KSC BCY CCA YCT GGC
PaIκBαR	CAG RTG GRG VGW MGT CTG TCT CTG
PaIκBα5-1	GAT GGA GCT GAG GTG TTG GTG GC
PaIκBα5-2	GGT CAC AAC CAG CCT TCA ACA GC
PaIκBα3-1	TAC GGA GGC TTC GCA CCA TAC CA
PaIκBα3-2	TGG TGG AGA ATC TTG TTC AGT TGG
β-actinF	TCG TGC GTG ACA TCA AGG AG
β-actinR	CGC ACT TCA TGA TGC TGT TG
PaIκBαF2	TGC CTG CTT CAG CGT CCT TAC
PaIκBαR2	CAG ATT GTA TGC CTC CGA AGC G

K=G/T; S=G/C; Y=C/T; R=A/G; V=G/A/C; W=A/T; M=A/C。

转化感受态细胞, 扩大培养, 菌液测序。根据测序结果, 设计合成 5'端扩增引物 PaIkBa5-1 和 PaIkBa5-2 以及 3'端扩增引物 PaIkBa3-1 和 PaIkBa3-2(表 1), 使用 SMART RACE(Clontech, Japan) 克隆 PaIkBa 的 5'端序列和 3'端序列。克隆 PaIkBa 5'端序列和 3'端序列的 PCR 反应产物经纯化后, 连接到 pMD 19-T vector(Takara, Japan), 转化到 DH5 α 感受态细胞, 扩大培养的菌液由上海生物工程公司克隆测序。

1.2 香鱼 *IkBa* 序列及生物信息学分析

应用 Vector NTI Suite7 软件的 Assemble 程序拼接香鱼 *IkBa* 基因的核心片段序列、5'序列和 3'序列, 得到香鱼 *IkBa* 基因 cDNA 的序列全长, 并用 DNAMAN 软件推导 PaIkBa 的氨基酸序列; PaIkBa 的锚蛋白重复序列 ANK 用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行分析; PESTfind 软件预测 PaIkBa 的 PEST 区 (<http://www.es.emblnet.org/Services/EMBNAT/htdoc/pestfind/>); 利用 BlastX 程序对香鱼 *IkBa* 基因编码的氨基酸序列与其他鱼类的 *IkBa* 基因编码的氨基酸序列进行多重比对; 使用 ClustalX 软件和 MEGA 5.0 中的 Neighbor- Joining (邻位相连法) 构建香鱼 *IkBa* 和 GenBank 上不同来源 *IkBa* 氨基酸序列的系统发生进化树。

1.3 香鱼 *IkBa* 的 mRNA 表达特征分析

解剖健康香鱼三尾, 分别取其肝、肾、脾、鳃、心、肠、肌肉和脑, 使用 RNAPlus (Takara, Japan) 提取这 8 种组织的总 RNA。根据得到的 PaIkBa 的 cDNA 序列全长设计一对特异性引物 PaIkBaF2 和 PaIkBaR2, 选用 β -actin 基因作为内参, 内参引物为 β -actinF 和 β -actinR(表 1)。使用 One-step RT-PCR 技术分析香鱼 *IkBa* 在各组织中的表达情况。PCR 反应在 Thermocycler PCR (Biometra) 仪上操作。反应程序为: 50 $^{\circ}$ C 加热 30 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪拍照。

为检测嗜水气单胞菌刺激香鱼后 PaIkBa 的表达特征, 给健康香鱼注射菌液浓度为 5.0×10^7 cfu/mL 嗜水气单胞菌 200 μ L。在注射后 0 h、2 h、6 h、12 h、24 h 及 36 h 取样, 每一个时间点各取三尾香鱼解剖, 取肝脏组织用于提取总 RNA。使用 One-step RT-PCR 技术检测注射嗜水气单胞菌的香鱼肝脏组织中 PaIkBa 在不同时间的表达。

2 结果

2.1 香鱼 *IkBa* 全长 cDNA 序列

以香鱼肝组织 cDNA 为模板, 用简并引物 PaIkBaF 和 PaIkBaR 克隆得到香鱼 *IkBa* 核心片段长 618 bp, NCBI 的 BlastX 程序分析显示, 香鱼 *IkBa* 与胡瓜鱼 (ACO09905)、大西洋鲑 (ACI69528)、虹鳟 (ACO08648)、尼罗罗非鱼 (XP003440739) 和鳊鱼 (ABO40445) 等的核转录抑制因子具有较高同源性。依据核心片段序列设计引物 PaIkBa5-1、PaIkBa5-2、PaIkBa3-1 和 PaIkBa3-2, 使用 SMART RACE 试剂盒扩增得到 PaIkBa 的 5'和 3'片段序列, 使用 Vector NTI Suite7 软件将核心片段、5'片段和 3'片段拼接, 得到香鱼核转录抑制因子 *PaIkBa* 基因的序列全长为 1 341 bp, 开放阅读框 ORF 为 936 bp, 编码 311 个氨基酸, 5'-UTR (非编码区) 为 64 bp, 3'-UTR 为 341 bp, 包括一个终止密码子 (TAA), 一个多聚腺苷酸加尾信号 (CTAGAC) 和 PolyA 尾。PaIkBa 核苷酸及翻译的氨基酸序列如图 1 所示, 序列递交到 NCBI (GenBank Accession No. JN801027)。

基因序列特征分析表明, PaIkBa 有三个典型的特征区域, N 端含有降解单元 DSGLES, 可在信号刺激下发生磷酸化, 是调控 NF- κ B 的活性基础, 其中 Ser₃₅ 和 Ser₃₉ 是核转录抑制因子磷酸激酶 IkK 的磷酸化位点; 中间部分包含五个锚蛋白重复序列, 分别位于 79-109、115-144、148-178、186-215 和 220-249, 锚蛋白重复区通过与 NF κ B 的 Rel 同源结构域 RHD 结合, 掩盖 NF κ B 的核定位序列 NLS, 从而调节 NF κ B 的亚细胞定位, 使 NF κ B 以非活性形式存在于细胞质中, 直至有信号激活 NF κ B 为止; C 端含有一个由 32 个氨基酸组成的 PEST 区, 与蛋白的快速降解有关, 香鱼核转录抑制因子的 PEST 区包括一个 P (脯氨酸), 10 个 E (甘氨酸), 4 个 D (天冬氨酸), 4 个 S (丝氨酸) 和一个 T (苏氨酸), 这五种氨基酸在 PEST 区域所占比例高达 62.5%, PEST 序列内部不存在任何正电荷氨基酸残基, 两侧是带正电荷的 K (赖氨酸) 和 R (精氨酸)。

2.2 香鱼 *IkBa* 同源性分析及系统进化树构建

使用 BLAST 软件分析香鱼 *IkBa* 基因与其它物种 *IkBa* 的同源性, 结果表明, PaIkBa 与胡瓜鱼 (*Osmerus mordax*; ACO09905)、大西洋鲑 (*Salmo salar*; ACI69528)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*; ACO08648)、尼罗罗非鱼 (*Nile tilapia*;

的作用效果显示, 香鱼腹腔注射嗜水气单菌后, *Pal κ B α* 基因表达随着时间的增加而逐渐增强, 感染24 h表达量最大 (图4), 表明*Pal κ B α* 基因表达量

受嗜水气单胞菌诱导。与对照组相比, 在感染24 h和36 h时, 香鱼肝脏中*Pal κ B α* mRNA表达量显著高于对照组 ($P<0.05$)。

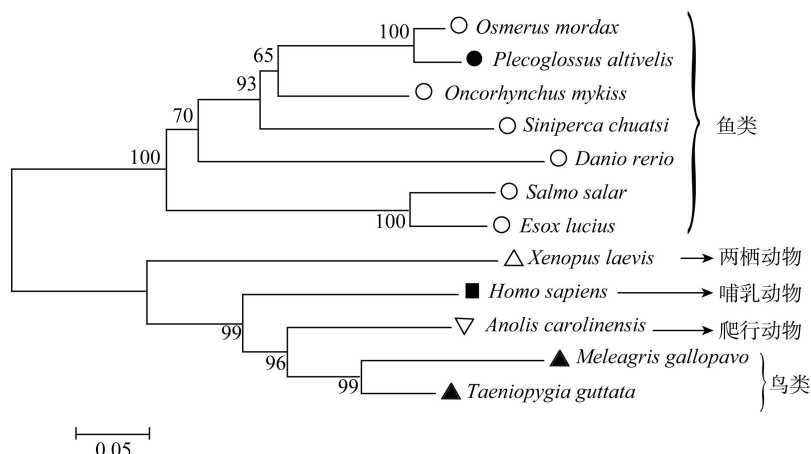


图2 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) *IkB α* 基因的系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of proteins encoded by ayu (*Plecoglossus altivelis*) *IkB α* genes

■哺乳动物, ▽爬行动物, ▲鸟类, △两栖动物, ○鱼, ●香鱼 (■mammals, ▽reptiles, ▲bird, △amphibians, ○fish, ●ayu)。

Homo sapiens 人 (NP_065390); *Anolis carolinensis* 变色蜥蜴 (XP003216628); *Meleagris gallopavo* 火鸡 (XP003206627); *Taeniopygia guttata* 斑胸草雀 (XP002200554); *Xenopus laevis* 非洲爪蟾 (NP001086998); *Danio rerio* 斑马鱼 (AAW68010); *Salmo salar* 大西洋鲑 (ACI69528); *Esox lucius* 白斑狗鱼 (ACO14016); *Siniperca chuatsi* 鳊鱼 (ABO40445); 尼罗罗非鱼 (XP003440739); *Oncorhynchus mykiss* 硬头鲮 (ACO08648); *Osmerus mordax* 胡瓜鱼 (ACO09905); *Plecoglossus altivelis* 香鱼 (JN801027)。

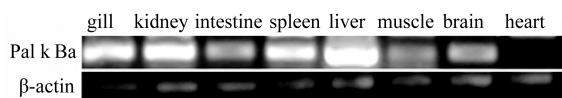


图3 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) *IkB α* 组织表达检测

Figure 3 Tissue transcription distribution of ayu (*Plecoglossus altivelis*) *Pal κ B α*

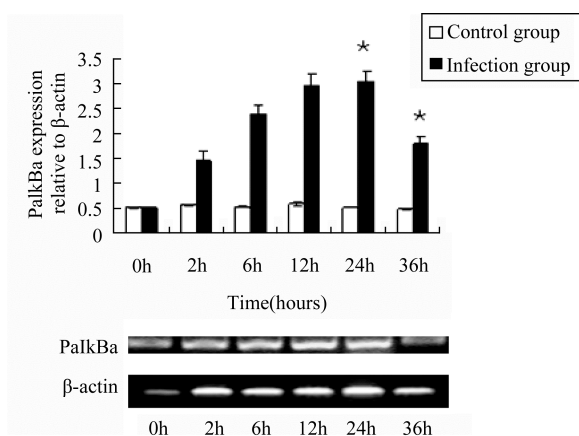


图4 嗜水气单胞菌感染对香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) *Pal κ B α* 基因表达的影响

Figure 4 *Pal κ B α* expression in *A. hydrophila* infected ayu (*Plecoglossus altivelis*)

*: $P<0.05$ 。

3 讨论

NF κ B 信号通路可调节细胞核内一百多个免疫基因的表达, 参与诱导抗感染因子和白介素的表达, 与先天免疫有重要关系。*IkB α* 基因编码NF κ B 信号通路中的抑制蛋白, 已在多种脊椎和无脊椎动物中被克隆。*Pal κ B α* 与其他物种克隆得到的*IkB α* 基因具有较强的序列相似性。核转录因子*IkB α* 有一段高度保守的信号响应域DSGX₃₅XS, 该区域磷酸化后可被泛素连接酶识别。*Pal κ B α* 的N端含有降解单元DS₃₅GLE₃₉S, 其中Ser-35和Ser-39残基可能与信号传导有关, 通过Ser-35和Ser-39的磷酸化导致*IkB α* 降解。该观察表明鱼类与哺乳动物的丝氨酸残基磷酸化激活*IkB α* 降解具有相似性。SMART分析表明香鱼、文蛤 (*Meretrix meretrix*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 及哺乳动物的 *Pal κ B α* 均包含五个锚蛋白重复序列 (Yang et al, 2011; Wang et al, 2009)。然而, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 的*IkB α* 含有6个锚蛋白重复序列 (Sangrador et al, 2005; Mu et al, 2010; Montagnani et al, 2008; Zhang et al,

2009)。锚蛋白重复序列决定了蛋白间的相互作用,作用蛋白可结合到NF- κ B蛋白的RHD区(Sedgwick et al, 1999)。IkB α C端的PEST区包含~30个氨基酸,富含脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸。PEST序列与核蛋白稳定性密切相关,含有PEST序列的蛋白会被快速降解(Shumway et al, 1999; Luque et al, 1998; Phelps et al, 2000)。一部分无脊椎动物的IkB α 缺乏PEST单元,如海湾扇贝和太平洋牡蛎的PEST位点被保守的casein激酶所取代(Wang et al, 2009; Montagnani et al, 2008)。

IkB α 蛋白的组织表达水平显示,香鱼IkB α 在肝、肾、脾和鳃中表达较高,而在肌肉、脑和肠中表达较少,在心脏中表达最少。同时,已有研究表明IkB α 广泛存在于无脊椎及脊椎动物。文蛤、海湾扇贝和合浦珠母贝的IkB α 在血细胞、血清、外套膜、肝胰腺和鳃等免疫相关器官中表达较高,在肌肉和消化系统中表达较低(Yang et al, 2011; Wang et al, 2009; Zhang et al, 2009);兀鹫(*Griffon vulture*)的IkB α 蛋白在心脏、肺、血液和外周单核细胞中高水平表达,而在大肠、小肠和肾脏中表达较低(de la Lastra et al, 2008);鳊鱼和牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的IkB α 主要在肾脏、鳃

及肝脏中高水平表达,而在脑、肌肉、心脏和胃中表达量较低,在皮肤中不表达(Wang et al, 2009; Yazawa et al, 2007)。IkB α 在机体多个组织的表达表明了它的广泛作用,而其在免疫组织中的高表达量表明,IkB α 可能与生物免疫功能有重要联系。当香鱼遭受嗜水气单胞菌感染后,检测PaIkB α mRNA水平在不同时间点的表达,可以深入了解香鱼PaIkB α 蛋白的生物学功能。在圆尾鲈(*Carcinocorpius rotundicauda*)中,革兰氏阳性菌感染造成IkB α 快速降解(Wang et al, 2006);文蛤(*Meretrix meretrix*)注射鳃弧菌后,鳃中IkB α 的表达在12 h升高18.4倍;在海湾扇贝(*Argopecten irradians*)中,IkB α 的表达水平经注射细菌后,从3 h开始表达显著上升,在9 h达到最大值(Yang et al, 2011; Mu et al, 2010);病毒感染后斑马鱼(*Danio rerio*)IkB α 表达上调(Levrud et al, 2007)。本实验中,香鱼腹腔注射嗜水气单胞菌2 h后,PaIkB α 表达开始显著上升,12 h后下调,揭示NF- κ B/IkB α 信号通路可能与香鱼感染细菌有关,PaIkB α 通过抑制NF- κ B的激活,调控香鱼免疫防御系统中抗细菌分子基因表达,具体调控机理需作进一步研究。

参考文献:

- Chen CG, Malliaros J, Katerelos MD, Apice AJ, Pearse MJ. 1996. Inhibition of NF- κ B activation by a dominant-negative mutant of IkB α [J]. *Molecular immunology*, **33**(1): 57-61.
- Chen MZ, Chen J, Lu XJ, Shi YH. 2010. Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern of *hepcidin* gene in ayu (*Plecoglossus altivelis*) [J]. *Zoological Research*, **31**(6): 595-600.[陈梅珍, 陈炯, 陆新江, 史雨红. 2010. 香鱼 *hepcidin* 基因的克隆、序列分析及组织表达特征 [J]. 动物学研究, **31**(6): 595-600.]
- Cramer P, Müller CW. 1999. A firm hand on NF κ B: structures of the IkB α -NF κ B complex [J]. *Structure*, **7**(1): 1-6.
- de la Lastra JMP, de la Fuente J. 2008. Molecular cloning and characterisation of a homologue of the alpha inhibitor of NF- κ B in the griffon vulture (*Gyps fulvus*) [J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, **122**(3): 318-325.
- Huang ZA, Chen J, Lu XJ, Shi YH, Li MY. 2011. Alteration on the expression of ayu coagulation factor X gene upon *Listonella anguillarum* infection [J]. *Zoological Research*, **32**(5): 492-498.[黄左安, 陈炯, 陆新江, 史雨红, 李明月. 2011. 香鱼凝血因子 X 基因表达与鳃利斯顿氏菌感染的相关性[J]. 动物学研究, **32**(5): 492-498.]
- Kong CJ, Huang ZA, Chen J, Shi YH, Lu XJ. 2012. Molecular cloning, sequence analysis and expression of ayu complement component C9 gene [J]. *Zoological Research*, **33**(2): 151-157.[孔铖将, 黄左安, 陈炯, 史雨红, 陆新江. 2012. 香鱼补体成分 C9 基因的克隆、序列分析及表达[J]. 动物学研究, **33**(2): 151-157.]
- Levrud JP, Boudinot P, Colin I, Benmansour A, Peyrieras N, Herbolmel P, Lutfalla G. 2007. Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system [J]. *The Journal of Immunology*, **178**(7): 4385-4394.
- Li MY, Zhang CN, Miao L, Wang CY, Chen J, Shi YH. 2011. Histopathological changes in main target organs of ayu (*Plecoglossus altivelis*) infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, **24**(3): 370-373. [李明月, 张呈念, 苗亮, 王成义, 陈炯, 史雨红. 2011. 香鱼嗜水气单胞菌感染后主要靶器官组织病理学观察 [J]. 宁波大学学报(理工版), **24**(3): 370-373.]
- Luque I, Gélina C. 1998. Distinct domains of IkB α regulate c-Rel in the cytoplasm and in the nucleus [J]. *Molecular and cellular biology*, **18**(3): 1213-1224.
- Montagnani C, Labreuche Y, Escoubas JM. 2008. CgIkB, a new member of the IkB protein family characterized in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, **32**(3): 182-190.
- Mu CK, Yu YD, Zhao JM, Wang LL, Song XY, Zhang H, Qiu LM, Song LS. 2010. An inhibitor κ B homologue from bay scallop (*Argopecten irradians*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology* **28**(4): 687-694.
- Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Huxford T, Ghosh G. 2000. Mechanism

- of I κ B α binding to NF- κ B dimmers [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(38): 29840-29846.
- Sangrador-Vegas A, Smith TJ, Cairns MT. 2005. Cloning and characterization of a homologue of the alpha inhibitor of NF- κ B in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, **103**(1): 1-7.
- Sedgwick SG, Smerdon SJ. 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework [J]. *Trends in biochemical sciences*, **24**(8): 311-316.
- Shumway SD, Maki M, Miyamoto S. 1999. The PEST domain of I κ B α is necessary and sufficient for *in vitro* degradation by μ -calpain [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(43): 30874-30881.
- Tergaonkar V. 2006. NF κ B pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target[J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **38**(10): 1647-1653.
- Vu HY, Juvekar A, Ghosh C, Ramaswami S, Le DH, Vancurova I. 2008. Proteasome inhibitors induce apoptosis of prostate cancer cells by inducing nuclear translocation of I κ B α [J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, **475**(2): 156-163.
- Wang L, Zhou ZC, Guo CJ, RaoXY, Xiao J, Weng SP, Yin ZX, Yu XQ, He JG. 2009. The alpha inhibitor of NF- κ B (I κ B α) from the mandarin fish binds with p65 NF- κ B [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**(3): 473-482.
- Wang XW, Tan NS, Ho B, Ding JL. 2006. Evidence for the ancient origin of the NF- κ B/I κ B cascade: its archaic role in pathogen infection and immunity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(11): 4204-4209.
- Yang Q, Yang Z, Li H. 2011. Molecular characterization and expression analysis of an inhibitor of NF- κ B (I κ B) from Asiatic hard clam (*Meretrix meretrix*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, **31**(3): 485-490.
- Yazawa R, Kondo H, Hirono I, Aoki T. 2007. Cloning and characterization of the I κ B α gene from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, **23**(4): 808-814.
- Zhang CN, Shi YH, Li MY, Chen J. 2009. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a bacterium *Aeromonas hydrophila* causing ayu (*Plecoglossus altivelis*) hemorrhage disease [J]. *Fisheries Science*, **28**(7): 1-4. [张呈念, 史雨红, 李多云, 陈炯. 2009. 一株引起香鱼出血症的嗜水气单胞菌的鉴定 [J]. 水产科学, **28**(7): 1-4.]
- Zhang DC, Jiang SG, Qiu LH, Su TF, Wu KC, Li YN, Zhu CY, Xu XP. 2009. Molecular characterization and expression analysis of the I κ B gene from pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**(1): 84-90.