

大鲵泛素结合酶 *cgsUBE2L3* 基因克隆及其在免疫应答中的表达分析

刘榴, 石君玲, 尤修玲, 廖志勇*

(温州大学生命与环境科学学院, 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室, 浙江温州 325035)

摘要 [目的] 研究泛素结合酶 *UBE2L3* 基因在大鲵免疫应答过程中的作用。[方法] 克隆大鲵泛素结合酶基因(*cgsUBE2L3*), 进行相关生物信息学分析, 并通过 qRT-PCR 对其组织分布及免疫刺激下的表达谱进行分析。[结果] 成功克隆了 *cgsUBE2L3* 基因, 该基因全长包含一个 462 bp 的开放阅读框, 编码 154 个氨基酸, 预计蛋白分子量为 21.2 ku; *cgsUBE2L3* 氨基酸序列保守性很高, 与非洲爪蟾的同源性高达 97.4%; 此外, qRT-PCR 结果显示, *cgsUBE2L3* 基因在大鲵组织中广泛分布, 且被 LPS 感染的大鲵多个免疫组织中 *cgsUBE2L3* 的 mRNA 水平均发生了明显变化。[结论] *cgsUBE2L3* 基因具有高度保守的结构特征, 其组织分布具有特异性且参与大鲵抵抗 LPS 刺激的免疫应答。

关键词 大鲵; *UBE2L3*; 序列分析; 免疫应答

中图分类号 S966.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)22-0093-05

Cloning and Expression of Ubiquitin-Conjugating Enzyme *cgsUBE2L3* Gene in Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) During the Immune Response

LIU Liu, SHI Jun-ling, YOU Xiu-ling, LIAO Zhi-yong* (College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Zhejiang Provincial Key Laboratory for Water Environment and Marine Biological Resources Protection, Wenzhou, Zhejiang 325035)

Abstract [Objective] To study the role of ubiquitin-conjugating enzyme *cgsUBE2L3* gene during the immune response in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). [Method] To clone ubiquitin-conjugating enzyme gene from Chinese giant salamander (*cgsUBE2L3*) and analyzed its amino acids by bioinformatics software, the tissue distribution and expression profile with the stimulation of lipopolysaccharide (LPS) were detected by qRT-PCR. [Result] Successfully, we cloned *cgsUBE2L3* gene. The full-length cDNA of *cgsUBE2L3* contained an open reading frame of 462 bp, encoding a protein of 154 amino acids with a putative weight of 21.2 ku. The *cgsUBE2L3* had a highly conserved amino acid sequence and shared the highest identity of 97.4% with African clawed frog. Quantitative real time PCR results showed that the *cgsUBE2L3* gene was widely distributed in the Chinese giant salamander tissues and the mRNA levels of *cgsUBE2L3* were significantly changed in the immune-associated tissues of LPS-infected Chinese giant salamander. [Conclusion] The *cgsUBE2L3* gene has highly conserved structural feature and tissue-specific of mRNA expression. Moreover, it participates in the immune response of Chinese giant salamander to resist LPS stimulation.

Key words Chinese giant salamander; *UBE2L3*; Sequence analysis; Immune response

泛素 (Ubiquitin, Ub) 是一种由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白质, 因在真核生物中广泛存在而得名, 它的主要作用是对需要分解的蛋白质进行标记, 使其能够被 26S 蛋白酶体降解^[1]。通过泛素化修饰靶蛋白, 降解异常或者半衰期短的蛋白, 是真核生物体蛋白降解的主要途径, 对维持真核生物体内环境稳定有重要作用。此外, 泛素化还参与调控多种细胞的生理过程, 包括细胞周期、信号转导, 转录调节及炎症反应等^[2-5]。泛素化过程至少涉及 3 种酶的参与: 泛素激活酶 (Ubiquitin-Activating Enzyme, E1)、泛素结合酶 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme, E2) 和泛素连接酶 (Ubiquitin-Protein Ligase, E3)。E1 利用 ATP 提供的能量将 Ub 活化, 通过转硫醇作用将活化的 Ub 传送到 E2 的半胱氨酸残基活化位点, 最后 E3 与 E2-Ub 复合物结合对靶蛋白进行泛素修饰, 泛素化的蛋白随后被 26S 蛋白酶体降解。其中, E2 是泛素化中间环节的酶, 主要参与转硫醇作用和氨解作用, 在整个泛素过程是十分重要的。

E2 家族成员大多包含一个催化域 (Ubiquitin-Conjugating enzyme, Catalytic domain, UBC), 约由 150 个氨基酸组成, 同时还有一个简单的活性部位, 可直接接触靶蛋白发挥修饰

作用, 此过程不需要 E1 或 E3 的参与^[6-7]。UBC 由 4 个 α 螺旋和 4 个反向平行的 β 折叠组成, 结构十分紧凑且高度保守。尽管大多数 E2 只含有一个结构功能域 UBC, 但是许多在 N 或 C 端都有用来实现特殊功能的相应的扩展结构, 用于调节其他酶的活性^[8-9]。泛素结合酶 E2L3 (UBE2L3, 也称 E2-F1, L-UBC 和 UBCH7 等) 是 E2 泛素结合酶家族成员, 在体外参与 p53、c-Fos 和 NF- κ B 前体蛋白 p105 的泛素化^[10]。目前, 关于 *UBE2L3* 基因的研究主要集中在人和植物中, 在其他物种中的研究少见报道。

大鲵 (*Andrias davidianus*), 俗称“娃娃鱼”, 属于两栖纲有尾目隐鳃鲵科, 是我国特有的大型珍稀两栖类动物, 与蝾螈、蛙并称为现存的三大主要两栖类动物。大鲵起源于泥盆纪时期, 由水生鱼类演变而成^[11], 其心脏构造特殊, 已出现了一些爬行类的特征, 因此在研究物种起源和基因家族进化上具有极高的科研价值^[12-13]。此外, 大鲵肉质鲜美, 富含多种人体必需的氨基酸及微量元素, 被誉为水中“活人参”, 具有极高的营养价值和药用价值。然而, 随着栖息地的减少、传染病^[14]和环境污染等一系列因素的影响, 大鲵一度濒临灭绝, 因此被列为国家二级保护动物。为保护大鲵得以生存和繁衍, 人们研究的首要任务是提高大鲵的种群数量, 为此应着眼于野生大鲵保护工作的加强和人工养殖技术的推广, 但在这 2 个过程中势必面临着疾病防治的问题。对大鲵免疫系统进行研究不仅有助于了解进化免疫学的信息, 还能为

基金项目 国家重点基础研究计划 (973 计划) 子课题 (2013CB835301)。
作者简介 刘榴 (1992—), 女, 安徽亳州人, 硕士研究生, 研究方向: 活性大分子化学生物学。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事分子免疫学研究。
收稿日期 2017-05-26

大鲵人工养殖过程中的疾病防治提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 试验试剂 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 德国), SMART cDNA library construction kit (Clontech, 美国), DH10B Competent cell (Tiangen, 北京), Vitagene 96 - easy plasmid Miniprep kit (Vitagene, 意大利), THERMO script OneStep qRT - PCR Kit (Thermo Scientific, 美国), LPS (Sigma, 美国), 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 大鲵与免疫刺激 子二代大鲵, 体重(250 ± 25)g, 购自浙江省温州市乐清市高塘大鲵养殖基地, 饲养在干净的水槽中。每3尾大鲵为1组, 用200 μL 0.5 mg/mL 的LPS 通过腹腔注射刺激大鲵, LPS 溶解在PBS 溶液中。分别刺激0、12、24、48、72 h 后, 从预先麻醉的大鲵中分离脾脏、肝脏、肾脏、心脏、小肠、肌肉、脂肪、骨和脑组织, 立即冻存在液氮中, 用于组织RNA 提取和实时定量PCR (qRT - PCR) 检测。以200 μL PBS 处理大鲵组作为阴性对照。

1.3 RNA 抽提, cDNA 文库构建及 EST 测序 根据说明书, 使用RNeasy Plus Mini Kit 提取大鲵脾脏总RNA, 通过分析28S 和18S 及测量的OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值鉴定提取RNA 的质量。随后使用SMART cDNA library construction kit 构建大鲵脾脏全长cDNA 文库。将所有长度大于500 bp 的cDNA 片段连接至pDNR - LIB 载体, 转化DH10B 感受态细胞。随机挑取不同的cDNA 阳性克隆菌, 直接接种到含有1 mL YT 培养基的96 孔板中, 37 °C 孵育过夜。利用Vitagene 96 - easy plasmid Miniprep kit 抽提菌液中的DNA, 送往上海生工生物公司进行测序。使用T7 引物, 从5' 端测序, 筛选*cgsUBE2L3* 基因cDNA 序列。

1.4 生物信息学分析 通过BioM 2.6 软件分析*cgsUBE2L3* 基因cDNA 序列; 其功能结构域通过SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行在线分析; *cgsUBE2L3*

氨基酸同源性比对及保守结构的分析通过BioEdit 软件完成; 利用SWISS - MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线预测*cgsUBE2L3* 蛋白空间结构模型; 使用MEGA6.0 软件构建N - J 系统发育树。

1.5 qRT - PCR 分析 根据RNeasy Plus Mini Kit 提取大鲵脾脏、肝脏和肌肉等组织总RNA, 用RNase - free DNase I 进行处理。取同等质量的各组织总RNA 通过THERMO script OneStep qRT - PCR Kit 进行qRT - PCR 检测。反应体系25 μL, 以β - actin 为标准内参, 每个反应重复3次。程序如下: 50 °C 30 min; 94 °C 3 min; 94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 38 个循环。在每个PCR 反应结束后分析扩增产物的熔解曲线, 确保只有一个PCR 产物被扩增并检测。通过循环阈值比较法(Δ ct) 分析*cgsUBE2L3* 基因的表达水平。试验过程涉及到的引物信息见表1。

表1 *cgsUBE2L3* 基因克隆与定量分析中用到的引物

基因 Gene	引物编号 Primer ID	引物序列(5' - 3') Primers sequence(5' - 3')	目的 Purpose
<i>cgsUBE2L3</i>	<i>cgsUBE2L3</i> - qF	GAAGTCCATACCCAAGAGGC	qRT - PCR
	<i>cgsUBE2L3</i> - qR	CGATGTTTGGGTGCTAGATT	qRT - PCR
β - actin	Actin - qF	GAGACCCGACAGACTACCT	qRT - PCR
	Actin - qR	AGGATGATGAAGCAGCAGT	qRT - PCR

1.6 统计学分析 试验数据用SPSS 6.0 软件通过单因素变量比较法进行分析。

2 结果与分析

2.1 *cgsUBE2L3* 基因 cDNA 序列及功能域分析 *cgsUBE2L3* 基因全长包含一个462 bp 的开放阅读框, 编码154 个氨基酸(图1), 预计蛋白分子量为21.2 ku, 等电点为9.36。SMART 结构预测结果显示(图2), *cgsUBE2L3* 蛋白含有一个E2 家族共有的、完整的泛素结合酶结构域(UBC), 该结构域由145 个氨基酸组成, 是*cgsUBE2L3* 的主要功能结构。

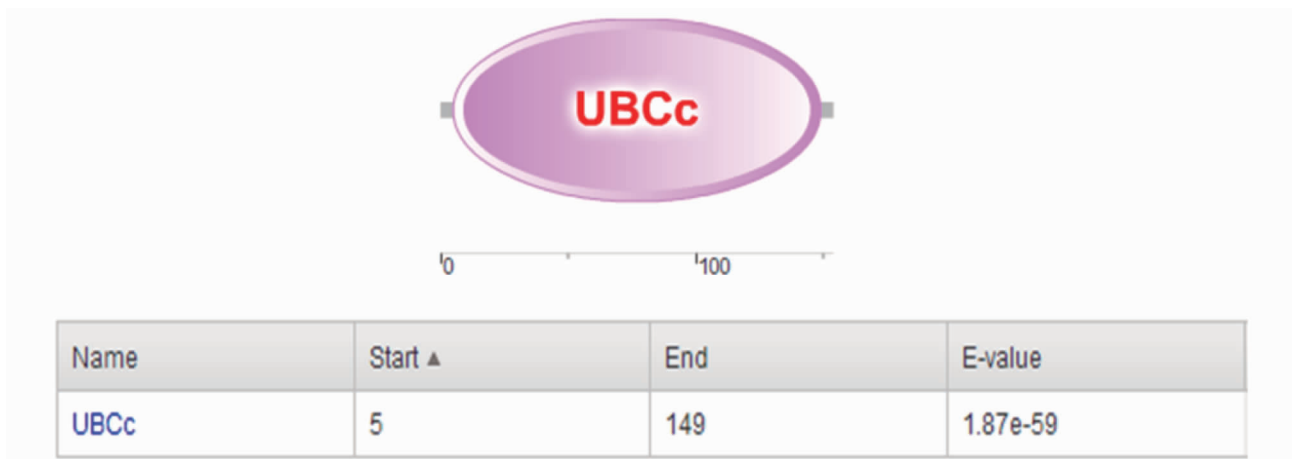
-29		GGGGGAAGCAAAATCCAGCAGAATCCAAG	
1	ATG CGCGCCAGCAGGAGGCTGATTAAGGAGCTCGATGAAATCCGCAAATCTGGGATGAAA		
	M A A S R R L I K E L D E I R K S G M K		20
61	AACTTCGCAACATCCAGGTTGATGAAGCTAATTTGTTGACTCGCAAGGGCTCATTGTT		
	N F R N I Q V D E A N L L T R Q G L I V		40
121	CCTGATAACCCCTCCCTATGACAAGGGGGCCTTCAGGATTGAAACCAACTCCCTGCAGAG		
	P D N P P Y D K G A F R I E T N F P A E		60
181	TACCCATTCAAACCGCCTAAGATCACATTAAGACAAAATCTACCACCAAAACATCGAT		
	Y P F K P P K I T F K T K I Y H P N I D		80
241	GAGAAAGGTGAGGTGTGCTTGCCTGTAATTAGCGCAGAAAAGTGAAGCCAGCTACCAAA		
	E K G Q V C L P V I S A E N W K P A T K		100
301	ACTGACCAAGTCATCCAGTCCCTCATAGCACTGGTAAACGACCCCAACCCGAGCATCC		
	T D Q V I Q S L I A L V N D P Q P E H P		120
361	TTGCGGGCAGACCTAGCTGAAGAATACTCAAAGACCGTAAAAAATTCTGTAAGAAGCCT		
	L R A D L A E E Y S K D R K K F C K N A		140
421	GAAGAGTTTACAAAGAAATATGGTGAAGGACCGACAGTGGACTAA		
	E E F T K K Y G E K R P V D *		154
466	ATTCTGACGCGTGGCGTTAGCAAAAATGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAGAGAAAGAGG		
526	GGGGGAAAACAGTGACTGAAGACCGGGAGCAGTGACTACAGATGCCACCCCTCACCAA		

注: 加粗碱基为起始密码子

Note: Start codes are marked in bold

图1 *cgsUBE2L3* 基因 cDNA 序列及氨基酸序列分析

Fig. 1 Analysis of the cDNA and deduced amino acid sequences of *cgsUBE2L3*

图2 *cgsUBE2L3* 功能域分析Fig. 2 Functional domain analysis of *cgsUBE2L3*

2.2 *cgsUBE2L3* 氨基酸序列分析 通过 BioEdit 软件将 *cgsUBE2L3* 氨基酸序列与其他已知物种的 *UBE2L3* 进行两两比对,结果如表 2 所示。*cgsUBE2L3* 与非洲爪蟾的 *UBE2L3*

氨基酸序列同源性高达 97.4%,与鸡的同源性次之,为 96.7%,与绿海龟的同源性最低,为 88.9%,说明 *UBE2L3* 氨基酸在物种进化过程中是非常保守的。

表 2 *cgsUBE2L3* 与已知物种 *UBE2L3* 氨基酸序列一致性对比Table 2 Amino acid consistency comparison of the *cgsUBE2L3* protein with other known *UBE2L3*

序号 No.	物种 Species	拉丁名 Latin name	登录号 Accession No.	常用名 Common name	同源性 Homology//%
1	非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001086444	African clawed frog	97.4
2	鸡	<i>Gallus gallus</i>	NP_001006180	Chicken	96.7
3	扬子鳄	<i>Alligator sinensis</i>	XP_006021584	Chinese alligator	96.1
4	松狮蜥	<i>Pogona vitticeps</i>	XP_020666755	Central-bearded dragon	96.1
5	人	<i>Homo sapiens</i>	NP_003338	Human	95.4
6	猕猴	<i>Macaca mulatta</i>	XP_014983264	Rhesus monkey	95.4
7	多疣壁虎	<i>Gekko japonicus</i>	XP_015264777	Gekko japonicas	95.4
8	蓝鲶鱼	<i>Ictalurus furcatus</i>	ADO28362	Blue catfish	94.8
9	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_001002072	Zebrafish	94.8
10	家鼠	<i>Mus musculus</i>	XP_001477949	Mouse	94.8
11	大西洋鲑鱼	<i>Salmo salar</i>	NP_001134756	Atlantic salmon	94.1
12	美国牛蛙	<i>Rana catesbeiana</i>	AC051619	American bullfrog	92.8
13	大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	KKF26295	Large yellow croaker	92.8
14	黄鳝	<i>Monopterus albus</i>	XP_020454988	Swamp eel	91.5
15	跳跳鱼	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	XP_020793954	Great blue-spotted mudskipper	90.2
16	绿海龟	<i>Chelonia mydas</i>	EMP40267	Green sea turtle	88.9

UBE2L3 氨基酸多序列比对结果(图 3)同样能够说明,*UBE2L3* 氨基酸在进化上是高度保守的,并且含有一个保守的半胱氨酸活性位点(C₈₆,用竖框表示),负责结合活化的泛素分子。

基于序列保守性的前提,模拟了 *cgsUBE2L3* 的三维结构模型(图 4)。结果显示,*cgsUBE2L3* 蛋白主要由 4 个 α 螺旋和 4 个反向平行的 β 折叠组成,与数据库中已有的 *UBE2L3* 结构是一致的。

2.3 系统进化树分析 为了研究 *cgsUBE2L3* 氨基酸的进化关系,利用 MEGA 6.0 软件构建了 N-J 系统进化树(Bootstrap:1 000),结果显示(图 5),*cgsUBE2L3* 的氨基酸序列在鱼类(大西洋鲑鱼)和蛙类(非洲爪蟾)之间,与两栖类归为一簇,符合大鲵物种在进化上的规律。

2.4 *cgsUBE2L3* 组织分布及免疫刺激应答分析 通过 qRT-PCR 检测 *cgsUBE2L3* 基因在大鲵各个组织中的表达分布,结果发现,*cgsUBE2L3* 在大鲵组织中广泛存在,且相对表达水平较高(图 6)。用 LPS 刺激一定时间后,检测被感染的大鲵组织中 *cgsUBE2L3* 的 mRNA 表达变化,结果显示,在 LPS 感染 48 h 后,大鲵肾脏、心脏、脾脏、小肠及骨中 *cgsUBE2L3* 的 mRNA 表达均发生明显上调,而肌肉和脂肪组织中的表达几乎无变化(图 7)。

3 结论与讨论

通过分子生物学手段,从构建的大鲵脾脏 cDNA 文库中鉴定了大鲵泛素结合酶基因(*cgsUBE2L3*),该基因 cDNA 序列全长包含一个 462 bp 的开放阅读框,可编码 154 个氨基酸。与已知物种的 *UBE2L3* 氨基酸序列进行对比,发现

Ho.	MAASRRLMKE	LEEIRKCGMK	NFCNIQVDEA	NLLTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEINFPAE	60
Mu.	MAASRRLMKE	LEEIRKCGMK	NFRNIQVDEA	NLLTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEINFPAE	60
Ga.	MAASRRLMKE	LEEIRKCGMK	NFRNIQVDEA	NLLTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEINFPAE	60
Al.	MAASRRLMKE	LEEIRKCGMK	NFRNIQVDEA	NLLTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEINFPAE	60
Ge.	MAASRRLMKE	LEEIRKCGMK	NFRNIQVDEA	NLLTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEINFPAE	60
Xe.	MAASRRLMKE	LEEIRKSGMK	NFRNIQVDEA	NLLTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEINFPAE	60
An.	MAASRRLIKE	LDEIRKSGMK	NFRNIQVDEA	NLLTRQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIETNFPAE	60
Da.	MAASRRLHKE	LDEIRKSGMK	NFRNIQVDES	NILTWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEITFPAE	60
La.	MAASRRLAKE	LDEIRKSGMK	NFRNIQVDES	NLLSWQGLIV	PDNPPYDKGA	FRIEIIFPAE	60
	***** * **	*:****.***	** *****:	*:*: *****	*****	*****	60
Ho.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPKHP	120
Mu.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQFFIA	LVNDPQPEHP	120
Ga.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
Al.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
Ge.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNIN	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
Xe.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
An.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
Da.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SAENWKPATK	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
La.	YPFKPPKITF	KTKIYHPNID	EKGQVCLPVI	SPENWKPATR	TDQVIQSLIA	LVNDPQPEHP	120
	*****	*****:	*****	*.*****:	*****	:** *****:	120
Ho.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYGEK	RPVD	154		
Mu.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYGEK	RPVN	154		
Ga.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYGEK	RPVD	154		
Al.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYGEK	RPVD	154		
Ge.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYREK	RPVD	154		
Xe.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYGEK	RPVD	154		
An.	LRADLAEYS	KDRKKFCKNA	EEFTKKYGEK	RPVD	154		
Da.	LRADLAEYS	KDRKKFFKNA	EEFTKKHGEK	RPVD	154		
La.	LRADLAEYS	KDRKKFLKNA	EEFTKKHGEK	RPMD	154		
	*****	***** **	*****:	** **:			

注:Ho 为人;Mu 为家鼠;Ga 为鸡;Al 为扬子鳄;Ge 为多疣壁虎;Xe 为非洲爪蟾;An 为大鲵;Da 为斑马鱼;La 为大黄鱼

Note:Ho is *Homo sapiens*;Mu is *Mus musculus*;Ga is *Gallus gallus*;Al is *Alligator sinensis*;Ge is *Gekko japonicus*;Xe is *Xenopus laevis*;An is *Andrias davidianus*;Da is *Danio rerio*;La is *Larimichthys crocea*

图3 cgsUBE2L3 氨基酸多序列对比

Fig. 3 Amino acid multi-sequence comparison of cgsUBE2L3

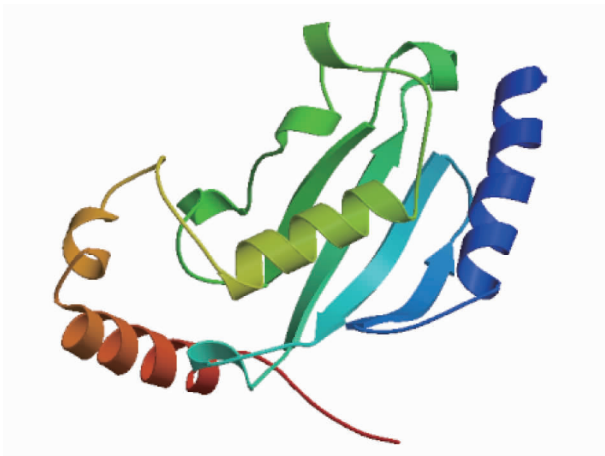
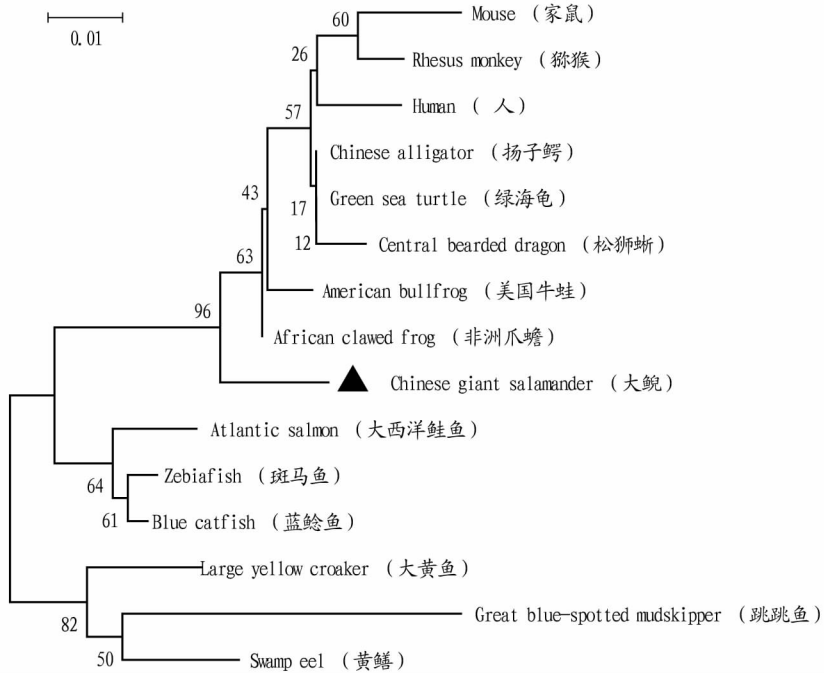


图4 cgsUBE2L3 结构模型

Fig. 4 Crystal structure of cgsUBE2L3

cgsUBE2L3 氨基酸与非洲爪蟾的 UBE2L3 同源性最高,达

97.4%,与鸡的同源性次之(96.7%),之后是爬行类的扬子鳄与松狮蜥,两者均为96.1%。虽然大鲵是远古水生鱼类演化而来的两栖纲物种,但是由于大鲵心脏构造特殊,已经出现了一些爬行类的特征,因此某些基因在进化上与爬行类的较为接近。氨基酸多序列对比及功能域分析结果显示,UBE2L3 在物种进化过程中是高度保守的,cgsUBE2L3 与其他物种的 UBE2L3 一样,都具有 E2 家族共有的催化功能域(UBC)及保守的半胱氨酸活性位点(C_{86}),通过与泛素分子及 E1、E3 相互作用,参与泛素化降解过程,维持细胞正常的生命活动。cgsUBE2L3 的空间结构较为简单,主要包括 4 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠,C 端及 N 端均没有拓展氨基酸,或许在一定程度上使泛素结合酶的活性更加专业。根据已有 UBE2L3 氨基酸序列构建的 N-J 系统进化树结果表明,大鲵与非洲爪蟾的亲缘关系最近,其次为扬子鳄、松狮蜥和美国牛蛙,而与鱼类的亲缘关系相对较远,大鲵 UBE2L3 氨基酸



注:进化树节点处数值表示 1 000 次评估的自举检验置信度

Note: Number at tree noded indicated the bootstrap values from 1 000 replicates

图 5 *cgsUBE2L3* 的 N-J 系统进化树

Fig. 5 N-J phylogenetic tree of *cgsUBE2L3*

进化的顺序与其物种进化的顺序是一致的。

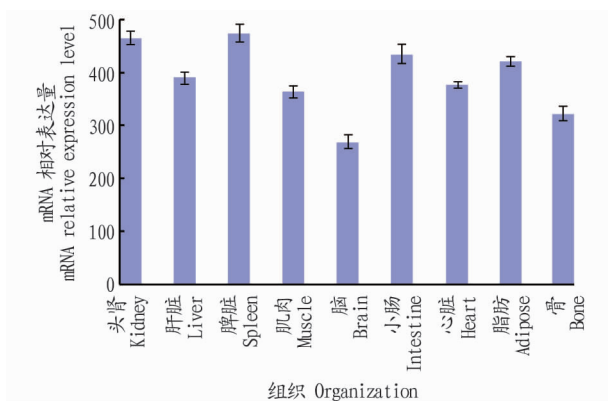


图 6 *cgsUBE2L3* 的组织分布

Fig. 6 Tissue distribution of *cgsUBE2L3*

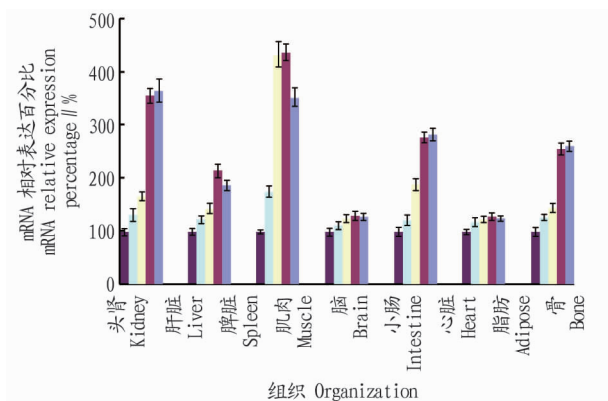


图 7 LPS 刺激后 *cgsUBE2L3* 的表达变化

Fig. 7 The changes of *cgsUBE2L3* expression after LPS stimulus

此外,在 mRNA 水平研究了 *cgsUBE2L3* 的组织分布及其在细菌感染的大鲵组织中表达量的变化,结果发现, *cgsUBE2L3* 在大鲵组织中广泛分布,且表达量相对较高。当受到 LPS 刺激时,24 h 内,大鲵各组织中 *cgsUBE2L3* 的 mRNA 表达量无明显变化,48 h 后,脾脏、头肾、小肠和骨等免疫器官中 *cgsUBE2L3* 的表达量明显升高,而脂肪和肌肉等非免疫器官中的 *cgsUBE2L3* 的表达几乎未变,预示 *cgsUBE2L3* 与免疫相关,参与了大鲵抵抗 LPS 产生的免疫应答。

泛素蛋白酶体系统是细胞内一系列生命进程的调节方式,与疾病密切相连,该文以进化上具有代表性的两栖类大鲵为研究对象,鉴定了一种大鲵泛素结合酶基因——*cgsUBE2L3*,该基因在进化上具有高度的保守性,且参与大鲵抵抗 LPS 刺激产生的免疫应答,为进一步研究大鲵免疫系统与疾病防治提供了理论支持。

参考文献

- [1] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system[J]. Annual review of biochemistry, 1998, 67(1): 425-479.
- [2] TYERS M, JORGENSEN P. Proteolysis and the cell cycle: With this RING I do thee destroy[J]. Current opinion in genetics development, 2000, 10(1): 54-64.
- [3] STROUS G J, VAN KERKHOFF P, GOVERS R, et al. Growth hormone-induced signal transduction depends on an intact ubiquitin system[J]. The journal of biology chemistry, 1997, 272(1): 40-43.
- [4] HOCHSTRASSER M, ELLISON M J, CHAU V, et al. The short-lived MAT α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1991, 88(11): 4606-4610.
- [5] CHEN Z, HAGLER J, PALOMBELLA V J, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Genes development, 1995, 9: 1586-1597.

企业等新型经营主体,抵押土地规模在百亩级别以上,每笔贷款规模在10万元以上。三是租赁期限条件。已流转的土地承包经营权进行抵押,流转期限不低于3年且贷款合同签订日剩余流转期限不低于2年。就抵押价值高低的评估方面,已流转土地的价值为贷款期限内已付土地租金和贷款期限内预期纯收入之和;自有土地的价值按贷款期限内土地预期纯收入的10倍或当地近3年土地平均租金水平的10倍进行估算。贷款(或授信)额度原则上不超过农村土地承包经营权抵押确认价值的70%,土地确权后可以减少金融机构开展此类贷款业务面临的风险及不确定性。限制金融机构接受农地承包经营权抵押的因素如下:尽管调研地的土地确权工作已经开展,土地证也开始发放,但还未能做到全面覆盖;尽管调研地金融机构已有可参考的定价公式,但缺乏公正的第三方专业评估机构;土地承包经营权性质和用途的不可更改性、没有完备的市场而造成的买卖双方沟通的不畅通性、缺少公正的土地评估体系而造成定价的不合理性、土地细碎化无法形成规模效益等因素都使得土地承包经营权的变现能力差,违约时难以处置,银行面临较大风险,同时金融机构缺乏相应的机制和资金拨备来应对。

4 结论与建议

该研究通过对泗洪、江都、仪征地区农户的调查发现,接近50%的样本农户有意愿参与土地承包经营权抵押贷款。进一步构建二元Probit回归模型分析农户土地承包经营权抵押贷款的影响因素,发现农户户主年龄越大、农地肥沃程度越差,农户参与土地承包经营权抵押贷款的意愿就越弱。而家庭非农收入越高,现有贷款规模越大,有退出土地经营的计划,曾参与过土地流转,参与土地承包经营权抵押贷款业务的意愿越强。此外,家庭人口数、耕地与县城的距离对抵押贷款意愿的负向影响不显著,户主的务农年数、经营地块规模和离散程度、农地的灌溉水平、每公顷农地的毛收入

对抵押意愿的正向影响不显著。

土地承包经营权抵押贷款业务,在农村的推行有其现实需求,但农户参与这一业务也存在诸多顾虑与制约因素,为此,在实践中首先要因地因农户制宜,同时扶持乡镇企业的发展,增加农户的非农收入来源,减少农地的保障职能。金融机构接受农地承包经营权抵押贷款对农地产权、规模、流转期限提出要求。因此要全面覆盖土地确权,还要搞活农地流转,使其形成有效的市场,鼓励新型农业经济主体的发展,尝试建立由农户牵头政府支持的农地入股合作社。

参考文献

- [1] 王兴稳,纪月清. 农地产权、农地价值与农地抵押融资:基于农村信贷员的调查研究[J]. 南京农业大学学报(社会科学版),2007,7(4):71-75.
- [2] GUILING P, BRORSEN B W, DOYE D. Effect of urban proximity on agricultural land values[J]. Land economics, 2009, 85(2):252-264.
- [3] PLANTINGA A J, MILLER D J. Agricultural land values and the value of rights to future land development[J]. Land economics, 2001, 77(1):56-67.
- [4] KHANTACHAVANA S V, TURVEY C G, KONG R, et al. On the transaction values of land use rights in rural China[J]. Journal of comparative economics, 2013, 41(3):863-878.
- [5] CHICOINE D L. Farmland values at the urban fringe: An analysis of sale prices[J]. Land economics, 1981, 57(3):353-362.
- [6] 郑杰,喻志雄,余燕星,等. 对发展农村土地金融业务的思考:以永安为例[J]. 福建金融,2007(2):36-37.
- [7] 中国人民银行泉州市中心支行课题组. 我国农地金融制度构建的现实约束及障碍破解[J]. 上海金融,2007(6):9-14.
- [8] 叶剑平,丰雷,蒋妍,等. 2008年中国农村土地使用权调查研究:17省份调查结果及政策建议[J]. 管理世界,2010(1):64-73.
- [9] 路婕,江辉,吴克宁. 土地承包经营权流转价格探讨:以河南省为例[J]. 安徽农业科学,2010,38(34):19661-19667.
- [10] 韩芳,华玉武. 农村土地价值的影响因素分析[J]. 河北农业科学,2011,15(1):92-94.
- [11] 兰庆高,惠献波,于丽红,等. 农村土地经营权抵押贷款意愿及其影响因素研究:基于农村信贷员的调查分析[J]. 农业经济问题,2013(7):78-84.
- [12] 罗剑朝,赵雯. 农户对村镇银行贷款意愿的影响因素实证分析:基于有序Probit模型的估计[J]. 西部金融,2012(2):18-24.
- [6] WENZEL D M, STOLL K E, KLEVIT R E. E2s: Structurally economical and functionally replete[J]. Biochemical journal, 2011, 433(1):31-42.
- [7] MCGINTY R K, HENRICI R C, TAN S. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome[J]. Nature, 2014, 514(7524):591-596.
- [8] SCHELPE J, MONTÉ D, DEWITTE F, et al. Structure of UBE2Z provides functional insight into specificity in the FAT10 conjugation machinery[J]. Journal of biology chemistry, 2016, 291(2):630-639.
- [9] PRUNEDA J N, SMITH F D, DAURIE A, et al. E2~Ub conjugates regulate the kinase activity of Shigella effector OspG during pathogenesis[J]. The EMBO journal, 2014, 33(5):437-449.
- [10] STANCOVSKI I, GONEN H, ORIAN A, et al. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system *in vivo* and *in vitro*: Identification and characterization of the conjugating enzymes[J]. Molecular and cellular biology, 1995, 15(12):7106-7116.
- [11] GAO K Q, SHUBIN N H. Earliest crown-group salamanders[J]. Nature, 2003, 422(6930):424-428.
- [12] WANG L X, YANG H, LI F G, et al. Molecular characterization, tissue distribution and functional analysis of macrophage migration inhibitory factor protein (MIF) in Chinese giant salamanders *Andrias davidianus*[J]. Developmental and comparative immunology, 2013, 39(3):161-168.
- [13] ROBERT J, COHEN N. The genus *Xenopus* as a multispecies model for evolutionary and comparative immunobiology of the 21st century[J]. Developmental and comparative immunology, 2011, 35(9):916-923.
- [14] CHEN Z Y, GUI J F, GAO X C, et al. Genome architecture changes and major gene variations of *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV)[J]. Veterinary research, 2013, 44:101.

(上接第97页)

科技论文写作规范——结果

利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据,只需强调或阐述其重要发现及趋势。