

虹鳟 LECT2 的酵母表达、纯化及生物活性分析

史雨红, 章瑞程, 杨旦阳, 陆新江, 陈 焰*, 李明云

宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211

摘要: 白细胞衍生趋化因子 2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2, LECT2)是一个参与多种生理和病理过程的分泌型细胞因子。该文采用毕赤酵母表达体系分泌表达虹鳟 LECT2, 用阳离子交换柱结合分子筛层析方法分离纯化目的蛋白, 并获得纯度为 96%, 得率为 120 mg/L 的重组虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)LECT2 酵母培养物。生物学活性验证表明该重组蛋白能趋化虹鳟头肾来源的巨噬细胞, 增强其呼吸爆发和杀菌能力, 并改变其细胞因子等基因的表达。综上, 该实验建立了一种快速有效的虹鳟 LECT2 活性重组蛋白的制备方法, 为后续相关蛋白的功能研究奠定了基础。

关键词: LECT2; 毕赤酵母; 纯化; 生物活性; 虹鳟

中图分类号: Q503; Q959.4 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)01-0033-06

Yeast-based production, purification and bioactivity assay of rainbow trout LECT2

Yu-Hong SHI, Rui-Cheng ZHANG, Dan-Yang YANG, Xin-Jiang LU, Jiong CHEN*, Min-Yun LI

Key laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) is a secretory cytokine that functions in many physiological and pathological processes. We used a *Pichia pastoris* expression system for the recombinant expression of rainbow trout LECT2. The recombinant LECT2 was purified by UNOsphere S Cation exchange and size-exclusion chromatography columns. The obtained target protein was highly pure (>96% homogeneity) and the yield was >120 mg/L of yeast cultures. An *in vitro* chamber assay revealed that recombinant LECT2 could induce chemotactic responses in rainbow trout head kidney-derived macrophages. Recombinant LECT2 not only enhanced macrophage respiratory burst activity and bactericidal activity, but also changed macrophage gene expression. In summary, we established a rapid and efficient method to prepare active recombinant rainbow trout LECT2 using a yeast expression system and column chromatography. Bioactive recombinant LECT2 is essential for studies on protein functions.

Keywords: LECT2; *Pichia pastoris*; Purification; Bioactivity; *Oncorhynchus mykiss*

白细胞衍生趋化因子 2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2, LECT2)是一个多功能细胞因子, 参与肝移植及再生(Sato et al, 2004; Ohtomi et al, 2007)、类风湿性关节炎(Okumura et al, 2008)、肾淀粉样病变(Larsen et al, 2010)以及肿瘤细胞生长和迁移(Ong et al, 2011)等多种病理和生理过程。近年来, 鱼类 LECT2 的研究发展迅速, 且主要集中于其与病原微生物感染免疫反应的相关性。目前已克隆了鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) (Fujiki et al, 2000)、虹鳟

(*Oncorhynchus mykiss*, rainbow trout) (Bayne et al, 2001)、斑马鱼(*Danio rerio*) (Lin et al, 2007)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (Li et al, 2008)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (Yang et al, 2009)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) (Shi et al, 2010)、斜带石斑鱼(*E. coioides*) (Wei et al, 2011)和褐石斑鱼(*E. bruneus*) (Harikrishnan et al, 2012)的 LECT2 基因。文献报道揭示, 斑马鱼在感染杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

收稿日期: 2012-10-11; 接受日期: 2012-11-29

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-08-0928); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20093305110001)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jchen1975@163.com

第一作者简介: 史雨红 (1979-), 女, 浙江富阳人, 讲师, 研究方向: 水产分子免疫学; E-mail: shiyuhong0517@163.com

aureus)后, 肝脏 LECT2 基因 mRNA 表达量增加 1000 倍(Lin et al, 2007); 大黄鱼在感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)后, 肝脏 LECT2 基因 mRNA 表达量增加 82.82 倍, 在脾脏中表达量增加 58.56 倍(Li et al, 2008); 斜带石斑鱼感染金黄色葡萄球菌、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)后, 肝脏 LECT2 基因 mRNA 表达均上调(Wei et al, 2011); 褐石斑鱼感染海豚链球菌(*Strptococcus iniae*)后, 肝脏、脾脏和心脏 LECT2 基因 mRNA 表达量急剧上升(Harikrishnan et al, 2012)。新近, 我们采用酵母双杂交和免疫共沉淀技术鉴定发现 LECT2 能与一种免疫细胞上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)—C 型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR)(Chen et al, 2010)相互作用, 推测 LECT2 可能与鱼类免疫细胞调控有关。

虹鳟不仅是重要的冷水性养殖鱼类, 也是鱼类免疫学研究的重要实验生物(Pérez-Sánchez et al, 2011; Wenger et al, 2011)。本文采用毕赤酵母表达系统分泌表达了虹鳟 LECT2, 采用柱层析方法分离纯化目标蛋白, 并验证其生物学活性, 为相关蛋白的后续功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 TOP10 菌株、毕赤酵母 X33 和真核表达载体 pPICZαA 由本实验室保存。AMV 逆转录酶、Ex Taq DNA 聚合酶、DNA Ligation Kit Ver.2.0、限制性内切酶 EcoRI、KpnI 和 Sac I 为 Takara 公司产品; 1 kb DNA ladder 为 Fermentas 公司产品; Gel Extraction Kit 为 Omega 公司产品; YPD 培养基为 Clontech 公司产品; Zeocin、DMEM 培养基和庆大霉素为 Invitrogen 公司产品; UNOsphere S 阳离子交换柱和 P6 填料为 Bio-rad 公司产品; BCA-200 蛋白含量测定试剂盒为 Pierce 公司产品; 含有 BSA 的免疫原 EDC 试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; 二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG)为北京中山金桥生物技术有限公司产品; ECL 化学发光试剂盒、显影定影试剂盒购自碧云天生物技术研究所; 硝基四氮唑蓝(NBT)和牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司; 趋化小室法为 Corning 公司产品。其他常规化学药剂均为国产分析纯。引物由上海英俊

生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 虹鳟 LECT2 N 端多肽的多克隆抗体制备

取虹鳟 LECT2 N 端 20 个氨基酸残基(EDIENYTSQEFTEDISHCG), 由吉尔生化(上海)有限公司合成多肽。再取合成多肽和 BSA 各 5 mg, 采用 EDC 法进行偶联。确定偶联成功后, 每 7 d 免疫注射小鼠 1 次, 共注射 3 次。于最后一次注射 3 d 后眼动脉取血, 4 °C 放置 6 h 离心取血清, 用于 Western blot 检测。

1.2.2 重组虹鳟 LECT2 真核表达载体的构建

根据已发表虹鳟 LECT2 基因序列(EMBL 登录号 AF363272) (Kokkinos et al, 2005) 设计引物:pPI-rt-LECT2(+)/pPI-rt-LECT2(-)(表 1), 扩增片段为虹鳟 LECT2 去除信号肽的成熟蛋白(LECT2m)。取 1 μg 虹鳟肝脏总 RNA 为模板, oligo(dT)₃₀ 为引物, 42 °C 下 AMV 逆转录酶合成 1.5 h, 获得第一链 cDNA。以此为模板, PCR 扩增获得目的片段。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化后, 经限制性内切酶 EcoRI 和 KpnI 双酶切后, 插入相同酶切的 pPICZαA 载体, 克隆获得 pPICZαA-LECT2m 重组质粒。

表 1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5'~3') Nucleotide sequence	扩增片段长度(bp) Length of amplicons
pPI-rt- LECT2(+)	GGAATTCGAGATGGTCAAGTTGG TCA EcoR I	
pPI-rt- LECT2(-)	GGGTACCTTAGAAGAACCTGGTGG GGT Kpn I	426
CK2-test(+)	CAACTCAGCAGTCACATCC	
CK2-test(-)	ACCCATTGAACATGATTATG	170
CCR9-test(+)	AGCGCCATTGTGGACTATCTA	
CCR9-test(-)	ATGGATAGAGGGTTCCTTGCG	151
Ctsd-test(+)	GTGGATC CTGGGAGATGTAT	
Ctsd-test(-)	ACTTCAGGAAAAGGGAAAGATG	150
18S(+)	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	
18S(-)	CTCTAAGAAGTTGGACGCCG	115

1.2.3 重组虹鳟 LECT2 基因在毕赤酵母 X33 中表达

采用电转方法导入毕赤酵母 X33 中, 转化液涂布含 Zeocin (100 μg/mL) YPDS 培养基上, 30 °C 培养 3~4 d。将这些转化子点到 Zeocin 含量分别为 500、1 000、2 000 μg/mL 的 YPDS 培养基上, 筛选获得高抗性工程菌株。取 Zeocin 高抗性菌株的菌落进行菌落 PCR, 引物为 pPI-rt-LECT2(+)/pPI-rt-LECT2(-) 和 5'AOX1/3'AOX1。高抗性工程菌株进行甲醇诱导(Jin et al, 2011), 使毕赤酵母分泌表达重组

虹鳟 LECT2。

1.2.4 重组虹鳟 LECT2 的柱层析纯化

收集 1.2.3 节中的培养上清, 上样至 UNOsphere S 阳离子交换柱, 以 3.0 mL/min 的流速洗脱, 洗脱液为 1 mol/L 氯化钠溶液。分段收集洗脱组分, 并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳及 Western blot 检测。Western blot 检测参考 Huang et al (2011) 的方法, 所用一抗为制备的虹鳟 LECT2 N 端多肽的多克隆抗体。最后将含有目的蛋白的洗脱组分用脱盐层析柱(P6 填料)脱盐处理, 目的组分真空冷冻干燥目的组分采用 BCA-200 蛋白含量测定试剂盒测定总蛋白量, 并用 12% SDS-PAGE 检测纯化效果, 通过电泳条带的积分光密度计算蛋白纯度。

1.2.5 对巨噬细胞的趋化活性

健康虹鳟个体体重 227~250 g, 购自杭州近江农都水产品市场。头肾来源的巨噬细胞的分离参考 Ryckaert et al (2010) 的方法, 取虹鳟头肾组织, 100 目筛网过滤后用培养基 I(DMEM 含 5% 牛血清, 1% 非必需氨基酸和谷氨酰胺, 100 mg/mL 链霉素、青霉素和卡那霉素以及 10 IU/mL 肝素)冲洗细胞悬液。Percoll 室温梯度离心(400 r/min, 25 min, 4 °C), 取位于密度为 34%~51% 区域的细胞并用 DMEM 洗涤, 细胞计数及台盼蓝染色观察后, 细胞重悬于培养基 II (DMEM, 不含抗性及牛血清, 含 0.1% 热灭活血清)中, 细胞悬液浓度为 1×10^6 cells/mL。纯化后的重组虹鳟 LECT2 以及其高温变性蛋白用培养基 II 配制 5 个浓度梯度(0、0.1、1、10、100 μg/mL)。利用趋化小室体外验证重组蛋白的趋化活性, 具体步骤见 Zhang et al (2011)。吉姆萨染液染色后显微镜观察, 随机选择 5 个视野进行计数, 表示为 mean \pm SD。趋化指数(chemotactic index, CI) 指细胞迁移到待测样品液及对照液的数目比值。

1.2.6 对巨噬细胞呼吸爆发的影响

采用 NBT 法测定巨噬细胞呼吸暴发, 具体方法见 Hsieh et al (2008)。虹鳟巨噬细胞(2×10^6 cells/mL)中加入 500 μL PBS (含 0.1% NBT, 5 μg/mL LECT2), 17 °C 孵育 12 h 后用 400 μL 甲醇终止反应。产生的甲臜由 130 μL 2 M KOH 和 150 μL DMSO 溶解。KOH/DMSO 为空白对照, 分别添加 PBS(含 0.1% NBT)和 PBS(含 0.1% NBT, 5 μg/mL BSA)与头肾来源的巨噬细胞进行孵育, 作为空白对照和阴性对照。分光光度计在 620 nm 波长读取光密度值。

1.2.7 对巨噬细胞杀菌能力的影响

虹鳟头肾来源巨噬细胞(2×10^6 cells/mL)经 5 μg/mL LECT2 预处理 12 h 后, 与 *E. coli* DH5α 共培养, MOI 为 10。30 min 后加入 100 μg/mL 庆大霉素除去培养基上清中未被吞噬的 *E. coli* DH5α。此后, 用含 12.5 μg/mL 庆大霉素的 PBS 清洗细胞。将该样品分成两组, 一组细胞共培养后用 0.1% Triton X-100 溶液裂解后在 LB 培养基上涂布, 培养 18 h, 计算菌落数作为摄入细菌数; 另一组加入无血清培养基后培养 2 h, 再裂解并在 LB 培养基上涂布, 培养 18 h, 计算菌落数作为存活细菌数。存活率=(存活细菌/摄入细菌数) $\times 100$ 。PBS 和 PBS (5 μg/mL BSA)溶液处理头肾来源巨噬细胞作为空白对照和阴性对照。

1.2.8 对巨噬细胞基因表达的影响

按 1.2.5 分离头肾来源的巨噬细胞备用。将重组虹鳟 LECT2 配成溶液(5 mg/mL, 培养基 II), 取 1 mL 上述细胞悬浮液(1×10^6 cells/mL)加入到 24 孔细胞培养板中, 将 24 孔板转移至细胞培养箱(17 °C, 5% CO₂)中培养 24 h。用不含 LECT2 的培养基 II 作为阴性对照, 对照组和实验组分别设置 3 个技术重复。根据 NCBI 数据库中趋化因子 2 (CC chemokine with stalk, CK2, AF418561)、CC 趋化因子受体型 9(CC chemokine receptor type 9, CCR9, NM_001124610)以及组织蛋白酶 D (Cathepsin D, Ctsd, U90321)设计扩增引物(表 1)。mRNA 抽提、cDNA 合成及荧光定量 RT-PCR 方法见 Huang et al (2011)。

2 结 果

2.1 虹鳟 LECT2 真核表达载体构建、诱导表达及纯化

测序表明, pPICZαA-LECT2m 重组质粒插入片段开读框正确, 且与已获得的虹鳟成熟 LECT2 基因核苷酸序列同源性为 100%。该重组质粒转化毕赤酵母 X33 后, 低抗培养基上得到>1 432 个转化子。这些转化子在 1 000 μg/mL Zeocin 的 YPDS 培养基上获得 6 个菌株。这些菌株用 pPI-rt-LECT2(+) / pPI-rt-LECT2(-) 引物进行菌落 PCR, 均扩增出 426 bp 的条带, 而阴性对照中无扩增条带; 用 5'AOX1 和 3'AOX1 引物扩增出~1.0 kb LECT2 表达单元和 2.2 kb 的野生型 AOX1 基因。因此, 这些克隆均为阳性重组工程菌株 X33/pPICZαA-LECT2m。工程

菌 X33/pPICZ α A-LECT2m 经甲醇诱导表达, SDS-PAGE 电泳结果显示一条诱导表达条带, 相对分子质量为 $\sim 15.9 \times 10^3$, 与预测大小相符。

选择 6 号工程菌进一步扩大诱导表达, 诱导培养上清经 UNOsphere S 阳离子交换柱分离后, 出现杂峰和明显主峰各一(图 1A), 分别命名为峰 1 和峰

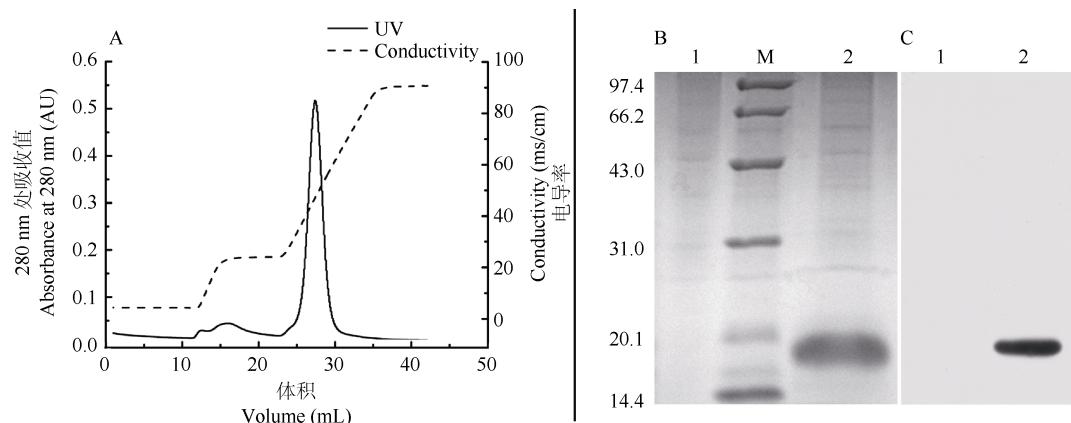


图 1 阳离子交换柱纯化重组虹鳟 LECT2

Figure 1 Purification of recombinant rainbow trout LECT2 using cation-exchange chromatography

A: 重组虹鳟 LECT2 UNOsphere S 阳离子交换柱分离纯化洗脱峰; B: 洗脱峰 SDS-PAGE 检测; C: 洗脱峰 Western blot 检测; 1: 洗脱峰 1; 2: 洗脱峰 2。
A: Elution profile of purified recombinant rainbow trout LECT2 on UNOsphere S Cation exchange column; B: Coomassie blue stained SDS-PAGE of eluate from (A) step; C: Western blot analysis of eluate from (A) step; 1: peak 1; 2: peak 2.

2.2 重组虹鳟 LECT2 对巨噬细胞趋化活性验证

当重组 LECT2 浓度为 0.1~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 浓度越高, 趋化活性越强, 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时趋化指数(CI)达到 7.92, 之后无显著变化(图 2)。重组虹鳟 LECT2 较其高温变性蛋白对照组具有显著的趋化活性(图 2)。即纯化的重组虹鳟 LECT2 对头肾来源的巨噬细胞具有趋化活性, 并在一定范围内具有浓度依赖性。

2.3 重组虹鳟 LECT2 对巨噬细胞呼吸爆发和杀菌能力的影响

与阴性对照相比, 添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LECT2, OD 值显著升高 3.1 倍(图 3A), 说明头肾来源的巨噬细胞产生大量超氧阴离子, 将 NBT 还原, 呼吸爆发增强($P < 0.001$)。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LECT2 处理虹鳟头肾来源巨噬细胞 12 h 后, *E. coli* DH5 α 与细胞共培养 30 min, 测定 *E. coli* DH5 存活率。结果显示, LECT2 处理的头肾来源巨噬细胞中 *E. coli* DH5 α 存活率显著下降, 为阴性对照的 0.51 倍(图 3B), 说明 LECT2 处理使虹鳟头肾来源巨噬细胞杀菌能力增强($P < 0.01$)。

2, 经 SDS-PAGE 蛋白电泳及 Western blot 检测, 确定峰 2 为目的组分重组虹鳟 LECT2(图 1B, C)。经脱盐处理后, 目的组分纯度为 96%, 该重组工程菌株 X33/pPICZ α A-LECT2m 的表达水平为 $\sim 120 \text{ mg/L}$ 酵母培养物。

2.4 重组虹鳟 LECT2 对巨噬细胞基因表达的影响

为了验证重组虹鳟 LECT2 的对巨噬细胞基因转录活性的影响, 我们参考了 Zhang et al (2011) 的重组香鱼 LECT2 对头肾来源巨噬细胞基因表达影响实验, 选择了变化显著的 CK2、CCR9 以及 Ctsd 基因进行荧光定量 PCR 检测。结果表明, CK2、CCR9 以及 Ctsd 基因 mRNA 表达分别上调 6.25、4.55 及 5.80 倍(图 4)。

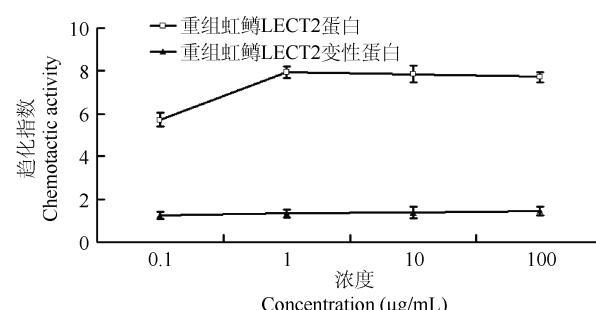


图 2 不同浓度重组虹鳟 LECT2 和重组虹鳟 LECT2 变性蛋白对头肾来源巨噬细胞趋化活性的影响 ($n=3$)

Figure 2 Dose-response relationship of rainbow trout refolded and denatured-reduced LECT2 to attract head kidney-derived macrophages, respectively

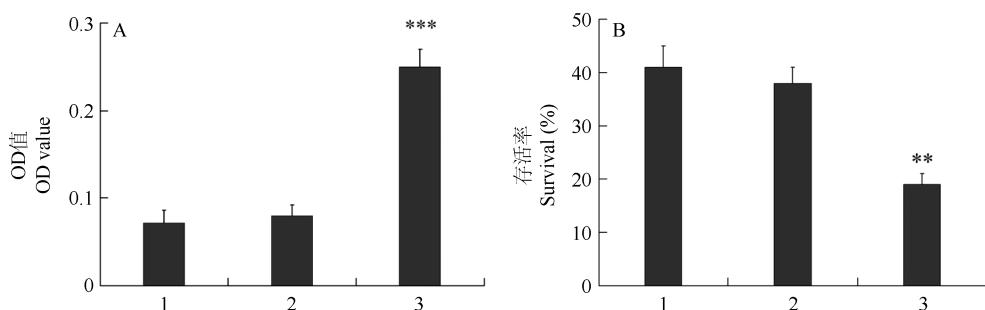


图 3 重组虹鳟 LECT2 对头肾来源单巨噬细胞呼吸爆发(A)和杀菌能力(B)的影响

Figure 3 Effects of rainbow trout LECT2 on respiratory burst activity (A) and bactericidal activity of rainbow trout head kidney-derived macrophages (B)

1: PBS, 2: PBS (5 μg/mL BSA), 3: PBS (5 μg/mL LECT2); n=3, **: P<0.01, ***: P<0.001.

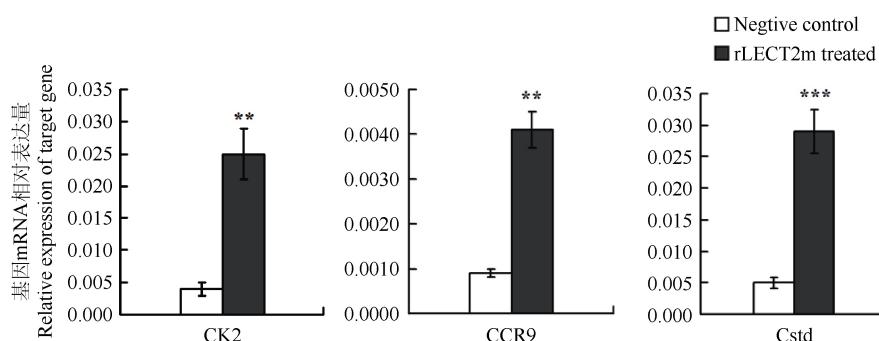


图 4 重组虹鳟 LECT2 对头肾来源巨噬细胞 CK2、CCR9 和 Ctsd 表达的影响

Figure 4 Effect of LECT2 on the expression of CK2, CCR9 and Ctsd genes in primary cultured head kidney-derived macrophages of rainbow trout

以 18S rRNA 为内参; n=4, **P<0.01; ***P<0.001。

Relative expression levels of mRNA are normalized against 18S rRNA. n=4, **: P<0.01; ***: P<0.001.

3 讨 论

本研究构建了虹鳟 LECT2 酵母真核表达载体 pPICZαA-LECT2m，并转化毕赤酵母 X33，经甲醇诱导表达获得目的蛋白，采用阳离子交换柱和分子筛层析方法进行纯化，获得纯度为 96%，得率为 120 mg/L 酵母培养物目的蛋白。由于虹鳟 LECT2 的 4 个半胱氨酸，由两对二硫键相连，呈发夹结构(Okumura et al, 2009)，其活性依赖于形成正确的二硫键并折叠成高级结构。毕赤酵母表达系统具备真核系统所特有的二硫键修饰作用，所表达的目的蛋白无需繁琐的复性操作，有利于提高蛋白的稳定性和活性蛋白得率。

LECT2 最初因具有嗜中性粒细胞体外趋化活性，因而被定义为新型趋化因子(Yamagoe et al, 1996)。本研究表明，重组虹鳟 LECT2 对头肾来源巨噬细胞也具有趋化活性。这一结果与已报道的重组香鱼 LECT2 的作用一致 (Zhang et al, 2011)。进一步研究显示，该重组蛋白可使巨噬细胞呼吸爆发

和杀菌能力增强。呼吸爆发是免疫细胞遇到免疫刺激物以后，氧消耗增加或者产生超氧离子而发生，而具有机体防御功能的一些细胞因子也可以诱导呼吸爆发，诸如 TNF α 、IFN γ 和 IL-8 (Rieger et al, 2011)。巨噬细胞直接杀灭病原微生物，一方面可以抑制病原微生物的生长，另一方面还可以将抗原递呈给 T 细胞激活获得性免疫 (Martinez-Pomares and Gordon, 2012)。巨噬细胞这两种功能的增强，揭示 LECT2 不仅趋化巨噬细胞作定向移动，而且可增强巨噬细胞清除病原菌的作用。在分子水平上进一步研究发现，巨噬细胞功能的发挥离不开细胞因子的分泌和调控。CK2 是在虹鳟中发现的 CC 趋化因子，与 CK1 不同的是具有一个 91 氨基酸组成的柄状结构(Liu et al, 2002)。巨噬细胞分泌并参与宿主免疫防御过程，特别是炎症反应。CCR9 为趋化因子 CC 亚族的受体，在介导趋化因子参与的免疫调节、器官形成、调节造血和神经元通讯中起重要作用(Schmutz et al, 2010)。Ctsd 是一种天冬氨酸类溶酶体的肽链内切酶，在免疫识别和炎症状态等病理变化中具重

要作用(Park et al, 2009)，它在鱼类中的免疫相关性已得到证实。重组虹鳟 LECT2 处理巨噬细胞后，这 3 个基因表达上调，与重组香鱼 LECT2 的实验结果一致(Zhang et al, 2011)。因此，鱼类 LECT2 可能对头肾来源的免疫细胞具有免疫调节作用。

参考文献：

- Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao M, Yano T. 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol*, **25**(3): 205-217.
- Chen J, Lu XJ, Yang HY, Shi YH. 2010. An interaction between a C-type lectin receptor and leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol*, **28**(1): 245-248.
- Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T. 2000. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leukocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor b, CD45, and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridization. *Fish Shellfish Immunol*, **10**(7): 643-650.
- Harikrishnan R, Kim JS, Kim MC, Balasundaram C, Heo MS. 2012. Expressed sequence tags (ESTs) based identification of genes and expression analysis of leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2) from *Epinephelus bruneus*. *Gene*, **491**(1): 88-101.
- Hsieh SL, Ruan YH, Li YC, Hsieh PS, Hu CH, Kuo CM. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, **275**(1-4): 335-341.
- 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. *Zool Res*, **32**(5): 492-498. [黄左安, 陈炯, 陆新江, 史雨红, 李明云. 2011. 香鱼凝血因子 X 基因表达与鳗利斯顿氏菌感染的相关性. 动物学研究, **32**(5): 492-498.]
- Jin JY, Zhou L, Gui JF. 2011. The yeast expression of grouper β -defensin and antibacterial activity of the recombinant protein. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **35**(5): 739-744. [金俊琰, 周莉, 桂建芳. 2011. 石斑鱼 β -防御素的酵母表达及其产物抗菌活性分析. 水生生物学报, **35**(5): 739-744.]
- Kokkinos PA, Kazantzzi A, Sfyroera G, Zarkadis IK. 2005. Molecular cloning of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*, **18**(5): 371-380.
- Larsen CP, Walker PD, Weiss DT, Solomon A. 2010. Prevalence and morphology of leukocyte chemotactic factor 2-associated amyloid in renal biopsies. *Kidney Int*, **77**(9): 816-819.
- Li MY, Chen J, Shi YH. 2008. Molecular cloning of leucocyte cell-derived chemotaxin-2 gene in croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish Shellfish Immunol*, **24**(2): 252-256.
- Lin B, Chen SW, Cao Z, Lin YQ, Mo DZ, Zhang HB, Gu JD, Dong ML, Liu ZH, Xu AL. 2007. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Mol Immunol*, **44**(4): 295-301.
- Liu L, Fujiki K, Dixon B, Sundick RS. 2002. Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragments containing AU-rich elements. *Cytokine*, **17**(2): 71-81.
- Martinez-Pomares L, Gordon S. 2007. CD169⁺ macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends Immunol*, **33**(2): 66-70.
- Ohtomi M, Nagai H, Ohtake H, Uchida T, Suzuki K. 2007. Dynamic change in expression of LECT2 during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Biomed Res*, **28**(5): 247-253.
- Okumura A, Suzuki T, Dohmae N, Okabe T, Hashimoto Y, Nakazato K, Ohno H, Miyazaki Y, Yamagoe S. 2009. Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biosci Trends*, **3**(4): 139-143.
- Okumura A, Saito T, Otani I, Kojima K, Yamada Y, Ishida-Okawara A, Nakazato K, Asano M, Kanayama K, Iwakura Y, Suzuki K, Yamagoe S. 2008. Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **58**(2): 413-421.
- Ong HT, Tan PK, Wang SM, Hian Low DT, Ooi LL, Hui KM. 2011. The tumor suppressor function of LECT2 in human hepatocellular carcinoma makes it a potential therapeutic target. *Cancer Gene Ther*, **18**(6): 399-406.
- Park EM, Kim YO, Nam BH, Kong HJ, Kim WJ, Lee SJ, Kim KK. 2009. Cloning and expression analysis of cathepsin D in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**(8): 1856-1859.
- Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, Merrifield DL, Carnevali O, Gioacchini G, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol*, **31**(2): 196-201.
- Rieger AM, Barreda DR. 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Dev Comp Immunol*, **35**(12): 1238-1245.
- Ryckaert J, Bossier P, D'Herde K, Diez-Fraile A, Sorgeloos P, Haesebrouck F, Pasmans F. 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol*, **29**(4): 648-655.
- Sato Y, Watanabe H, Kameyama H, Kobayashi T, Yamamoto S, Takeishi T, Hirano K, Oya H, Nakatsuka H, Watanabe T, Kokai H, Yamagoe S, Suzuki K, Oya K, Kojima K, Hatakeyama K. 2004. Changes in serum LECT2 levels during the early period of liver regeneration after adult living related donor liver transplantation. *Transplant Proc*, **36**(8): 2357-2358.
- Schmutz C, Cartwright A, Williams H, Haworth O, Williams JH, Filer A, Salmon M, Buckley CD, Middleton J. 2010. Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. *Arthritis Res Ther*, **12**(4): R161.
- Shi JF, Qu M, Wang HJ, Zhang ZW, You YZ, Ding SX. 2010. Cloning and tissue expression of LECT2 gene from *Epinephelus akaara*. *J Xiamen Univ (Nat Sci)*, **49**(5): 694-700. [施晓峰, 曲朦, 王航俊, 张之文, 尤颖哲, 丁少雄. 2010. 赤点石斑鱼 LECT2 基因的克隆与组织表达分析. 厦门大学学报(自然科学版), **49**(5): 694-700.]
- Wei JG, Guo MG, Cui HC, Yan Y, Ouyang ZL, Qin QW. 2011. A new leukocyte cell-derived chemotaxin-2 from marine fish grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol*, **31**(4): 600-605.
- Wenger M, Sattler U, Goldschmidt-Clermont E, Segner H. 2011. 17Beta-estradiol affects the response of complement components and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged by bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*, **31**(1): 90-97.
- Yamagoe S, Yamakawa Y, Matsuo Y, Minowada J, Mizuno S, Suzuki K. 1996. Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor LECT2. *Immunol Lett*, **52**(1): 9-13.
- Yang HY, Chen J, Shi YH, Li MY. 2009. Molecular cloning and mRNA expression profiles of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 gene (LECT2) in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Chin J Cell Biol*, **31**(2): 277-280. [杨红艳, 陈炯, 史雨红, 李明云. 2009. 香鱼 LECT2 基因的克隆及其组织表达差异. 细胞生物学杂志, **31**(2): 277-280.]
- Zhang RC, Chen J, Li CH, Lu XJ, Shi YH. 2011. Prokaryotic expression, purification, and refolding of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 and its effect on gene expression of head kidney-derived macrophages of a teleost fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Shellfish Immunol*, **31**(11): 911-918.