

[文章编号] 1671-587X(2014)01-0204-06

DOI:10.7694/jldxyxb20140144

## 建鲤重组 Cystatin 蛋白的原核表达、鉴定及多克隆抗体制备

李松<sup>1</sup>, 杨立彬<sup>2</sup>, 张舒岩<sup>3</sup>, 金羽<sup>1</sup>, 陈秀华<sup>1</sup>, 李新<sup>1</sup>, 刘玲<sup>1</sup>, 李树蕾<sup>4</sup>, 李树红<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学食品学院水产品加工理论与技术实验室, 四川雅安 625000; 2. 吉林大学第一医院儿科, 吉林长春 130021; 3. 吉林大学第一医院神经外科, 吉林长春 130021; 4. 吉林大学基础医学院组织学与胚胎学系, 吉林长春 130021)

**[摘要]** 目的: 对建鲤半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CPIs) Cystatin 进行原核表达和纯化鉴定, 并以重组 Cystatin 为抗原制备多克隆抗体。方法: 用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导转入 pET-30a-Cystatin 的 *E. coli* BL21 (DE3) 表达重组蛋白, 经过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 镍离子亲和层析纯化重组 Cystatin, 高效液相色谱鉴定重组 Cystatin 的纯度, Azocasein 法测定其对木瓜蛋白酶的抑制作用。利用 QuickAntibody-Mouse5W 快速佐剂和纯化的重组 Cystatin 免疫 Balb/C 小鼠获得抗血清, 采用夹心 ELISA 法鉴定抗血清的效价, Western blotting 和免疫组织化学法鉴定抗血清的抗原识别特异性。结果: 原核表达的目的蛋白相对分子质量约 20 000; 镍亲和层析纯化后重组 Cystatin 在 SDS-PAGE 上显示单一条带, 纯度 >95%; Azocasein 法检测, 0.014 μg 重组 Cystatin 抑制木瓜蛋白酶活性达 50% 以上; ELISA 夹心法检测获得的 Cystatin 抗血清效价达到 1:512 000; Western blotting 检测, 转入 pET-30a 空质粒的全菌蛋白中未检测到 Cystatin 存在, 而在转入 pET-30a-Cystatin 的全菌蛋白及纯化各步样品中均检测到 Cystatin 信号, 且均为单一条带; 免疫组织化学检测, 建鲤各组织呈现不同强度的 Cystatin 阳性染色, 抗血清中的多克隆抗体与原核和真核表达的 Cystatin 均特异性结合。结论: 成功表达和纯化了建鲤 Cystatin; 获得含高效价多克隆抗体的 Cystatin 抗血清, 具有高特异性和灵敏性。

**[关键词]** 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 原核表达; 多克隆抗体

**[中图分类号]** Q78 **[文献标志码]** A

## Prokaryotic expression and identification of recombinant Cystatin of *Cyprinus carpio* var. Jian and preparation of its polyclonal antibody

LI Song<sup>1</sup>, YANG Li-bin<sup>2</sup>, ZHANG Shu-yan<sup>3</sup>, JIN Yu<sup>1</sup>, CHEN Xiu-hua<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>,  
LIU Ling<sup>1</sup>, LI Shu-lei<sup>4</sup>, LI Shu-hong<sup>1</sup>

(1. Department of Theory and Technology of Fishery Product Processing, Food Institute, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625000, China; 2. Department of Pediatrics, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Department of Neurosurgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 4. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract:** **Objective** To perform the prokaryotic expression, purification and identification of Cystatin of *Cyprinus carpio* var. Jian, and to further prepare a polyclonal antibody targeting Cystatin as the antigen. **Methods** The *E. coli* BL21 (DE3), in which the pET-30a-Cystatin plasmid had been transferred, was induced by IPTG to

**[收稿日期]** 2013-08-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助课题 (31101249)

**[作者简介]** 李松 (1988—), 男, 四川省达县人, 在读农学硕士, 主要从事半胱氨酸蛋白酶抑制剂的纯化鉴定及生理作用研究。

**[通信作者]** 李树红 (Tel: 0835-2882187, E-mail: xiaoshu.928@126.com)

express the recombinant protein, which was purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography. Then the purity of recombinant Cystatin and inhibitory activity was identified using high performance liquid and Azocasein respectively. The QuickAntibody-Mouse5W fast adjuvant and purified recombinant Cystatin were used to immunize Balb/C mice to get antiserum, whose titer was identified with sandwich ELISA and whose specificity to recognize antigens was assessed with Western blotting and immunohistochemistry. **Results** The molecular weight of interest protein of prokaryotic expression was approximately 20 000. After  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography, the recombinant Cystatin was shown as a single band on the SDS-PAGE and its purity was above 95%. Azocasein assay showed that 50% activity of papain was inhibited by the recombinant Cystatin of 0.014  $\mu\text{g}$ . ELISA showed Cystatin antiserum with titer of 1 : 512 000 was obtained. The results of Western blotting showed the Cystatin was absence in the total protein of *E. coli* BL21 (DE3) with transferred plasmid pET-30a, in contrast with transferred plasmid pET-30a-Cystatin and the sample in every process of purifying, the Cystatin was presence and showed a single band, and immunohistochemistry indicated the different tissues of *Cyprinus carpio* var. Jian showed different positive staining, the antiserum could specifically bind to the Cystatin expressed in both prokaryotic and eukaryotic systems. **Conclusion** The recombinant Cystatin of *Cyprinus carpio* var. Jian is expressed and purified successfully. And finally, the antiserum with high titer polyclonal antibody recognizing Cystatin of *Cyprinus carpio* var. Jian is obtained, which owns the high specificity and sensitivity.

**Key words:** Cystatin; prokaryotic expression; polyclonal antibody

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine protease inhibitors, CPIs) 是一类专门抑制活性中心为半胱氨酸残基的蛋白水解酶的抑制因子。目前对陆生哺乳动物来源的 CPIs 研究相对较透彻, 根据结构、相对分子质量及序列相似性可分为: ①Stefin (家族 I) 相对分子质量约 10 000, 无二硫键和糖侧链; ②Cystatin (家族 II) 相对分子质量约 12 000~14 000, 有 2 对二硫键, 无糖侧链; ③Kininogen (家族 III) 相对分子质量约 50 000~120 000, 有 9 对二硫键及糖侧链<sup>[1]</sup>。其中 Cystatin 主要作为一种分泌型抑制剂, 在胞外发挥作用<sup>[1]</sup>, 其在免疫调节<sup>[2]</sup>、肿瘤的浸润与转移<sup>[3]</sup>、细胞凋亡<sup>[4]</sup>、胚胎发育<sup>[5]</sup>以及骨组织再生<sup>[6]</sup>等方面起着非常重要的作用。目前有研究<sup>[7-8]</sup>表明: 鱼类的鱼肠、鳃、心、肌、脾、肝、血液、肾和卵等均转录 Cystatin (家族 II) mRNA。但是鱼类 Cystatin 是否具有与哺乳动物 Cystatin 相同的生理功能尚不清楚。此外, 还有研究<sup>[9]</sup>表明: 鱼类 Cystatin 有着极好的 pH 稳定性和热稳定性, 在 pH3~7 范围内或 80℃ 时仍能保留 60% 以上残余活性。Cystatins 超家族成员经胃蛋白酶消化后的短肽仍具有活性<sup>[10]</sup>, 而短肽是人体吸收蛋白质的主要形式, 本文作者推测鱼类的 Cystatin 也具有潜在的口服药品或药用食品开发价值。因此, 为进一步研究鱼类 Cystatin 生理功能和作用机制, 以便充分利用鱼类 Cystatin 资源, 将其开发为保健食品或医药制品, 本研究首次对建鲤 Cystatin 进行了原核表达及纯化, 并通过

免疫动物获得具有活性的 Cystatin 多抗血清, 旨在为进一步深入研究鱼类 Cystatin 短肽的功能和活性提供检测手段。

## 1 材料与方法

**1.1 动物、试剂与仪器** 雄性 Balb/C 小鼠, 体质量(20±2) g, 由吉林大学动物实验中心提供。建鲤 (*Cyprinus carpio* var. Jian), 约 500 g/尾, 鲜活健康, 购于吉林省长春市农贸市场。转入 pET-30a-Cystatin 的工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) 由四川农业大学食品学院水产品加工理论与技术实验室保存。 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 镍离子亲和层析柱 (德国 Qiagen 公司), Jupiter C18 柱 (4.6 mm×150.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å) (美国 Phenomenex 公司); 肠激酶 (1 U· $\mu\text{L}^{-1}$ ) (上海近岸科技有限公司), 木瓜蛋白酶 (P4762, 10 U· $\text{mg}^{-1}$ ) 和偶氮酪蛋白 (Azocasein) (美国 Sigma 公司), 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、聚偏氟乙烯膜 (PVDF, 0.22  $\mu\text{m}$ ) 和 BCA 蛋白检测试剂盒 (江苏碧云天生物技术研究院), 预染蛋白 marker (美国 Thermo scientific 公司), QuickAntibody-Mouse 5W 标准鼠多抗制备佐剂 (北京康碧泉生物科技有限公司), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、TMB 显色液 (北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司), S-P 超敏试剂盒、DAB 显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司)。Biologic Duo Flow 全自动中高压层析系统和 Gel Doc 2000 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad),

Ultra-8050 超滤杯(美国 Millipore 公司), LC-2010 HT 高效液相色谱系统(日本岛津公司)。

**1.2 重组菌的表达** 将转入 pET-30a-Cystatin 的 *E. coli* BL 21 (DE3) 工程菌接种在 LB 液体培养基(含  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素),  $37^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养过夜。次日将菌液按 1:50 接入 LB 液体培养基(含  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素),  $37^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 3 h。当  $A_{600}$  为 0.6 时, 加入  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 继续培养 6 h。离心收集菌体, 加入  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(含  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF, pH8.5) 重悬沉淀; 加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶菌酶, 反复冻融 3 次, 超声破碎菌体,  $8000 \times g$  离心 10 min, 收集沉淀用于纯化。

**1.3 重组 Cystatin 蛋白的纯化** 用  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素(含  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 和 2% Triton X-100) 洗涤收集的蛋白沉淀。洗涤上清经过  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(含  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素和 5% 甘油, pH 8.5) 透析去除 EDTA; 经浓缩后, 用镍柱亲和和层析进一步纯化目的蛋白; 以  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(含  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素、5% 甘油和  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  咪唑, pH 8.5) 洗脱, 洗脱流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 收集蛋白峰部分。采用 12% 分离胶和 4% 浓缩胶, 对纯化各步中的样品进行 SDS-PAGE 鉴定。采用 BCA 试剂盒检测层析后蛋白浓度。在 562 nm 处可见光下测定标准蛋白(BSA)和纯化后 Cystatin 的吸光度(A)值, 绘制 BSA 蛋白标准曲线, 根据标准曲线计算 Cystatin 的浓度。

**1.4 纯度鉴定** 层析纯化后的重组 Cystatin 经超纯水透析、微滤后, 以反相高效液相法鉴定其纯度, 其主要峰面积比例表示蛋白纯度。色谱柱 Jupiter C18, 用含 0.1% 三氟乙酸的乙腈进行梯度洗脱, 柱温  $25^\circ\text{C}$ , 流速  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 280 nm 处进行检测。

**1.5 重组 Cystatin 蛋白抑制活性测定** 根据 Li 等<sup>[11]</sup>的方法, 以 Azocasein 为反应底物检测纯化后 Cystatin 的抑制活性。调节 Cystatin 的加入量, 使其对木瓜蛋白酶水解 Azocasein 活性的抑制率处于 30%~70%<sup>[12]</sup>, 以抑制率高低表示 Cystatin 的抑制活性强弱。1 个抑制活性单位定义: 在反应条件 ( $37^\circ\text{C}$ , pH7.0) 下, 440 nm 波

长处 A 值降低 0.01。

**1.6 免疫动物** 用 QuickAntibody-Mouse5W 多抗制备佐剂制备重组 Cystatin 多克隆抗体。取雄性 Balb/C 小鼠免疫前血清作为对照。无菌条件下, 取  $50 \mu\text{L}$  层析后的重组 Cystatin ( $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与佐剂, 按体积比 1:1 迅速混匀, 后腿小腿肌肉注射; 第 21 天加强免疫 1 次; 第 35 天采微量尾血进行 ELISA 测定, 抗体滴度大于 1:10 000 以上时, 即采全血并分离抗血清, 加入等体积的甘油后  $-20^\circ\text{C}$  分装保存备用。

**1.7 间接 ELISA 法测定抗血清效价** 肠激酶裂解后的 Cystatin 经透析、浓缩后, 用包被缓冲液 ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释至  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每孔加入  $100 \mu\text{L}$ ,  $4^\circ\text{C}$  包被过夜。以不加样品孔为空白对照, 加免疫前血清孔为阴性对照。次日移除包被液, 用 PBST ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS, 含 0.1% Tween20) 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 2% BSA  $150 \mu\text{L}$  室温封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次后, 分别加入稀释的免疫前血清及抗血清, 选择倍比稀释, 每孔加样量为  $100 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠抗体,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h; 移除酶标二抗, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加 TMB 底物液室温避光显色 5~20 min, 加入  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓硫酸终止反应后, 用酶标仪测定  $A_{450\text{nm}}$  值。当  $(\text{样品孔 A 值} - \text{空白对照孔 A 值}) / (\text{阴性对照孔 A 值} - \text{空白对照孔 A 值}) > 2.1$  即认为是阳性。

**1.8 免疫蛋白印记法检测原核表达的 Cystatin** 处理好样品经 10% 分离胶和 4% 浓缩胶进行 SDS-PAGE, 湿转至 PVDF 膜。PVDF 膜于封闭液(含 5% BSA 的 TBST) 中室温封闭 3 h; 加入 1:2 000 稀释的 Cystatin 小鼠抗血清,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入 1:5 000 稀释辣根酶标记的羊抗小鼠抗体,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h; TBST 洗液漂洗 3 次, 每次 10 min; 取出膜进行 DAB 显色。

**1.9 免疫组织化学检测真核表达的 Cystatin** 取建鲤卵、背肌、肝脏、脾脏和小肠, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 梯度蔗糖脱水, OCT 包埋, 切片  $10 \mu\text{m}$  厚, 晾干, 进行 SP 染色。切片经内源性过氧化物酶阻断剂(A液)孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 滴加山羊非免疫血清(B液)封闭 10 min; 甩去血清, 滴加 1:2 000 稀释的抗



2.4 Cystatin 抗血清特异性识别原核表达的重组 Cystatin Western blotting 法检测抗血清识别原核表达 Cystatin 的特异性。在转入 pET-30a 空质粒的全菌蛋白中,未检测到 Cystatin 存在。而转入 pET-30a-Cystatin 的大肠杆菌,经 IPTG 诱导后,检测到了 Cystatin 表达。此外,层析前后的样品中,也检测到非常强的 Cystatin 信号,且均为单一条带。见图 4。

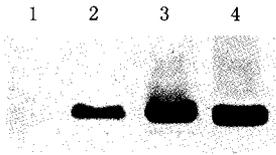


图 4 Western blotting 法检测 Cystatin 的原核表达

Fig. 4 Prokaryotic expression of Cystatin detected by Western blotting method

Lane 1: Total protein of *E. coli* BL21(DE3) with transferred plasmid pET-30a; Lane 2: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) with transferred plasmid pET-30a-Cystatin; Lane 3: Sample washed with urea; Lane 4: Sample purified with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography.

2.5 Cystatin 抗血清特异性识别建鲤真核表达的 Cystatin 免疫组织化学方法检测抗血清中多克隆抗体对建鲤不同组织中 Cystatin 的特异性识别,结果显示:对照组呈阴性结果(图 5A,见插页四);建鲤肝脏、肌肉、小肠、脾脏和鱼卵中显示不同强度的阳性染色(箭头所示)(图 5B~F,见插页四)。

### 3 讨论

目前对陆生动物来源的 Cystatins 研究较多,其在生理进程中的重要作用和潜在医学价值也逐渐被人们所认识,如参与肿瘤血管新生<sup>[3]</sup>、调节细胞凋亡<sup>[4]</sup>和骨重建<sup>[6]</sup>等。然而,关于鱼类 Cystatins 的研究很少。已经有初步研究<sup>[13-15]</sup>表明:鱼类 Cystatin (家族 II)可能参与鱼类免疫调节、保护胚胎发育以及具有抑菌作用。

虽然鱼类多个器官都转录 Cystatin mRNA<sup>[7-8]</sup>,但鱼类各组织表达 Cystatin 蛋白的水平尚不十分清楚。本文作者首先对鱼类 Cystatin 进行了克隆表达和纯化,成功获得了重组 Cystatin;经过尿素洗涤和  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 镍离子亲和层析,样品在 SDS-PAGE 中呈现单一条带,说明

已经去除了大量的杂蛋白。此外,由于带有  $6 \times \text{His}$  标签和 S 蛋白标签,纯化的重组蛋白相对分子质量接近 20 000,与 Quantity One 软件分析目的蛋白相对分子质量为 19 000 的结果一致。经肠激酶裂解去掉  $6 \times \text{His}$  标签和 S 标签后,该蛋白的相对分子质量为 15 000 (资料未显示),与天然蛋白的分子量相同<sup>[16]</sup>。Azocasein 法显示:His 标签和 S 蛋白标签并未影响重组 Cystatin 的抑制活性。同时,高效液相色谱分析层析纯化的重组 Cystatin 纯度大于 95%。以上结果提示:该重组蛋白不仅纯度高,而且具有活性,对于深入研究鱼类 Cystatin 的生理作用具有重要意义。

由于水生动物和哺乳动物 Cystatin 同源性差<sup>[7-8,17]</sup>,市售抗体多针对哺乳动物,缺乏灵敏、专一检测鱼类 Cystatin 的抗体,至今尚未见关于鱼类组织中 Cystatin 蛋白表达水平的检测研究。为了弥补这个空白,本课题组采用 QuickAntibody-Mouse5W 多抗制备佐剂,制备重组 Cystatin 多克隆抗体。该佐剂具有免疫针次少、抗原用量低、不破坏抗原天然构象、抗体产生快和抗体亲和力高的优点。ELISA 结果说明本研究成功获得高效价的 Cystatin 多克隆抗血清。由于蛋白质的抗原决定簇包括线性表位和构象表位,原核表达蛋白质在保留天然蛋白质的线性表位的同时,仅能保留部分构象表位<sup>[18]</sup>。为了检测抗血清中多克隆抗体是否能同时特异性识别 2 种表位,本课题组进行了 Western blotting 和免疫组织化学方法检测,结果提示:抗血清中多克隆抗体能够特异性识别原核/真核表达 Cystatin 的表位。在 Western blotting 检测中,抗血清在镍离子亲和层析前后的样品中均检测到重组 Cystatin 单一条带,说明制备的多克隆抗体不仅灵敏度高,而且具有很强的特异性;免疫组织化学结果显示:建鲤肝脏、背肌、小肠、脾脏以及鱼卵均呈现阳性染色,提示 Cystatin 作为一种蛋白酶抑制剂在建鲤组织中广泛存在,且建鲤不同组织中 Cystatin 的分布和含量不同,而对照组呈阴性染色,进一步说明制备的 Cystatin 具有良好的特异性。

本研究利用原核表达系统和镍柱亲和层析系统成功表达并纯化了重组建鲤 Cystatin,并通过简易快捷的方法制备了建鲤 Cystatin 多克隆抗体。本文作者将进一步研究鱼类 Cystatin 组织分布和生理活性,为以鱼类 Cystatin 作为功能因子的保健食品或医药制品的开发研究奠定前期实验基础。

## [参考文献]

- [1] Ochieng J, Chaudhuri G. Cystatin superfamily [J]. *J Health Care Poor Underserved*, 2010, 21 (1): 51-70.
- [2] Staun-Ram E, Miller A. Cathepsins (S and B) and their inhibitor Cystatin C in immune cells; modulation by interferon- $\beta$  and role played in cell migration [J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 232 (1-2): 200-206.
- [3] Stojan P, Anicin A, Svetic B, et al. Stefin A and stefin B: markers for prognosis in operable squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Int J Radiation Oncol Biol Physics*, 2007, 68 (5): 1335-1341.
- [4] Liang X, Nagai A, Terashima M, et al. Cystatin C induces apoptosis and tyrosine hydroxylase gene expression through JNK-dependent pathway in neuronal cells [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 492 (2): 100-105.
- [5] Wang SC, Huang FL. Carp ovarian cystatin binds and agglutinates spermatozoa via electrostatic interaction [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66 (5): 1318-1327.
- [6] Brand HS, Lerner UH, Grubb A, et al. Family 2 cystatins inhibit osteoclast-mediated bone resorption in calvarial bone explants [J]. *Bone*, 2004, 35 (3): 689-696.
- [7] Ylonen A, Helin J, Bogwald J, et al. Purification and characterization of novel kininogens from spotted wolffish and Atlantic cod [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269 (11): 2639-2646.
- [8] Okamoto E, Kasahara H, Chiba A, et al. Purification and characterization of two novel cysteine protease inhibitors, Eel-Cystatin-2 and Eel-Cystatin-3, in the skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Fisheries Sci*, 2009, 75 (2): 463-471.
- [9] 宋 川. 鲢鱼卵 CPIs 的纯化鉴定及其抑制鱼糜凝胶软化的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [10] Yamamura J, Morita Y, Takada Y, et al. The fragments of bovine high molecular weight kininogen promote osteoblast proliferation in vitro [J]. *J Biochem*, 2006, 140 (6): 825-830.
- [11] Li DK, Lin H, Kim SM. Purification and characterization of acysteine protease inhibitor from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) plasma [J]. *J Agricultural Food Chem*, 2008, 56 (1): 106-111.
- [12] Wu JW, Haard NF. Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate treated tomato plants [J]. *Comparat Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol*, 2000, 127 (2): 209-220.
- [13] 李淑英. 大黄鱼两种半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分子特征与功能研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [14] Kestemont P, Cooremans J, Abi-Ayad A, et al. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *perca fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1999, 21 (1): 59-64.
- [15] Nordahl EA, Rydengård V, Mörgelin M, et al. Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (10): 34832-34839.
- [16] Dubin G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62 (6): 653-669.
- [17] Li F, An H, Seymour TA, et al. Molecular cloning, sequence analysis and expression distribution of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C [J]. *Comparat Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol*, 1998, 121 (2): 135-143.
- [18] Hajighasemi F, Khoshnoodi J, Shokri F, et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing human pan-IgG specific conformational or linear epitopes [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2012, 4 (4): 170-177.

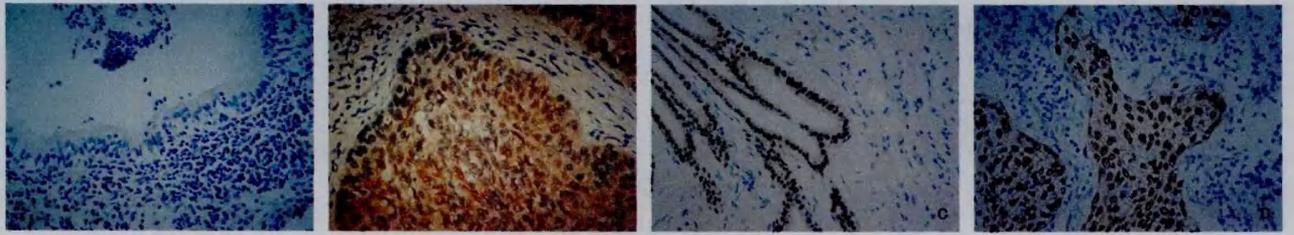


图1 Musashi (A,B)和 Sox2 (C,D)在不同组织中的表达(免疫组织化学, × 400)

Fig.1 Expressions of Musashi (A,B) and Sox2 (C,D) in different tissues (Immunocytochemistry, × 400)

A,C: Cancer-adjacent lung tissue; B,D: Squamous cell carcinoma tissue.  
(seen on page 143 in paragraph)

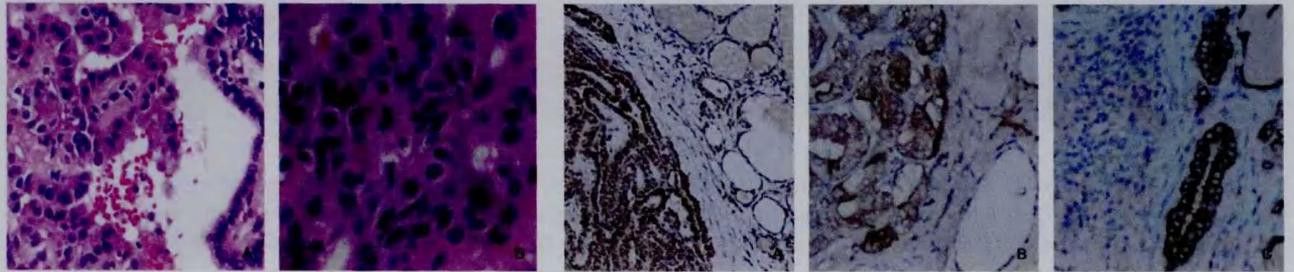


图1 PTMC 组织 HE 染色结果

Fig.1 HE staining results of PTMC tissue

A: ×200; B: ×400.

(seen on page 151 in paragraph)

图2 survivin(A)、Gal-3(B) 和 TPO(C)蛋白在 PTMC 组织中的表达 (免疫组织化学, ×200)

Fig.2 Expressions of survivin (A), Gal-3 (B), and TPO (C) in PTMC tissue (Immunohistochemistry, × 200)

(seen on page 151, 152 in paragraph)

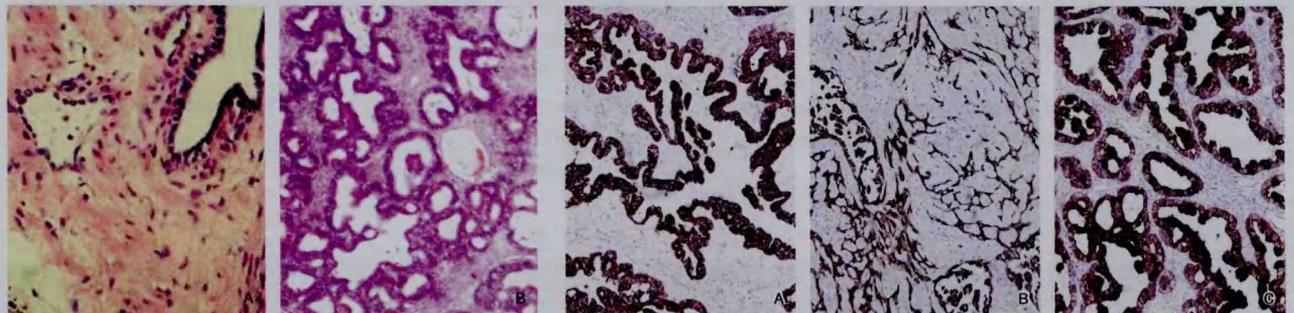


图1 正常卵巢组织(A)和卵巢上皮样癌组织(B) HE 染色结果(×200)

Fig.1 Results of HE staining of normal ovarian tissue(A) and epithelial ovarian carcinoma tissue(B) (× 200)

(seen on page 155 in paragraph)

图2 OPN 在卵巢上皮性癌组织中的表达(免疫组织化学, ×200)

Fig.2 Expression of OPN in epithelial ovarian cancer tissue (Immunohistochemistry, × 200)

A: Ovarian serous adenocarcinoma tissue; B: Ovarian mucinous cystadenocarcinoma tissue; C: Ovarian endometrioid carcinoma tissue.

(seen on page 156 in paragraph)

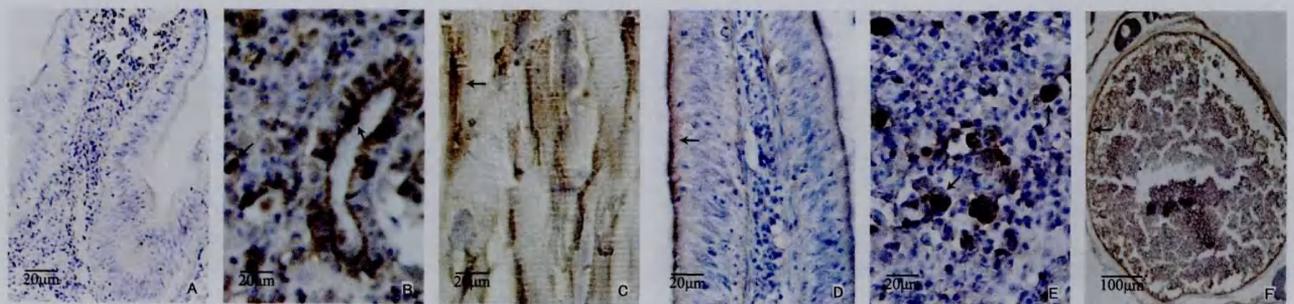


图5 免疫组织化学法检测 Cystatin 的真核表达

Fig.5 Eukaryotic expression of Cystatin detected by immunohistochemistry

A: Negative control (small intestine) group (× 200); B - F: Experimental group; B: Liver (× 200); C: Dorsal muscles (× 200); D: Small intestine (× 200); E: Spleen (× 200); F: Fish eggs (× 40).

(seen on page 208 in paragraph)