

经密码子优化的猪 Ficolin α 在昆虫细胞的表达及其体外抗病毒作用初步分析

李 兰¹, 乔绪稳¹, 张元鹏¹, 陈 瑾¹, 郑其升^{1*}, 侯继波^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 南京 210014;

2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

摘 要: 利用 Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统表达具有天然构象的猪 Ficolin α 。首先构建重组穿梭质粒 rBacmid-Ficolin α , 转染 sf9 细胞获得重组杆状病毒 rBV-Ficolin α ; 通过 Image J 软件对优化表达的 Western blot 图片进行灰度分析确定较佳表达条件; 纯化目的蛋白质后, 进一步评价其体外抗病毒活性。Western blot 结果显示以 7.5 MOI 接种量感染的 sf9 细胞在 96 h 时获得了较高的表达, 同时获得的重组猪 Ficolin α 具有抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 活性。猪 Ficolin α 在 sf9 昆虫细胞中获得成功表达, 且具有良好的抗 PRRSV 活性。本研究可以为猪 Ficolin α 的抗病毒活性及作用机制研究提供物质基础。

关键词: 猪 Ficolin; 杆状病毒-昆虫细胞表达系统; 抗病毒作用

中图分类号: S852.42

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)12-2358-07

Expression of Codon-optimized Porcine Ficolin α in Insect Cell and Its Antiviral Activity *in vitro*

LI Lan¹, QIAO Xu-wen¹, ZHANG Yuan-peng¹, CHEN Jin¹, ZHENG Qi-sheng^{1*}, HOU Ji-bo^{1,2*}

(1. Institute of Animal Immunology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

Abstract: To get native porcine Ficolin α , Bac-to-Bac baculovirus expression system was used. Firstly, rBacmid-Ficolin α was constructed, and then transfected into sf9 insect cells to obtain recombinant baculovirus rBV-Ficolin α . The optimized expression conditions were detected by Western blot and analyzed by gray level using Image J software. Followed by purification, antiviral activity of target protein was assessed *in vitro*. Western blot results showed that the expression level of Ficolin α in transfected sf 9 insect cells was higher at the infection (MOI) of 7.5 when they were harvested at 96 h, and porcine Ficolin α had the antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In conclusion, porcine Ficolin α was successfully expressed in sf9 insect cells and showed strongly anti-PRRSV activity. This study provided a material basis for the study of antiviral activity and its mechanism of porcine Ficolin α .

Key words: porcine Ficolin; baculovirus-insect cell system; antiviral activity

Ficolin 最初是在猪的子宫内膜细胞上发现的转化生长 β 因子结合蛋白^[1-2],存在于人及多种动物体内。猪体内发现了 2 种类型的 Ficolin,分别为 Ficolin α 和 Ficolin β ,相似性高达 80%^[3-4]。本研究中的蛋白 Ficolin α 主要存在于血清中,相对分子质量为 35 ku^[5]。作为一种胶原样凝集素,其单体也具有类似的结构:富含半胱氨酸的 N 端结构域、胶原样结构域(CLR)、颈区和 C 端的糖识别结构域(CRD)^[6]。大量研究表明胶原样凝集素的 CRD 能够与存在于病毒、细菌及真菌等病原微生物表面的糖基特异性结合^[6-9],从而抑制病原微生物的感染,这种高度特异性的结合决定了凝集素在实际应用中有着很大的发展空间。

Ficolin 是一种 N-乙酰基特异性的凝集素,尤其与 N-乙酰葡糖胺的亲合力最高^[10],可以通过与病毒表面糖蛋白的结合而发挥其抗病毒作用。关于 Ficolin 抗病毒作用的研究在人医领域较多,如人 L-Ficolin、H-Ficolin 及 L-Ficolin/MBL 嵌合凝集素与人类免疫缺陷病毒、肝炎病毒、流感病毒、埃博拉病毒和立百病毒的相互作用都有大量报道^[11-14],而在兽医领域的研究资料非常匮乏,仅 N. D. Keirstead 等^[10]于 2008 年报道利用 CHO 细胞瞬时表达的猪 Ficolin 可以与猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)结合,并且可以降低 PRRSV 在 Marc-145 细胞的感染。

因此,本研究拟采用 Bac-to-Bac 系统,构建重组杆状病毒,感染 sf9 细胞制备重组猪 Ficolin α ,并对其抗病毒活性进行初步分析,为猪 Ficolin α 的抗病毒活性及机制研究提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pUC57-Ficolin α (经金斯瑞生物科技有限公司进行密码子优化后而人工合成)由本实验室构建并保存;大肠杆菌 DH10Bac、转移载体 pFast-BacTM1、草地贪夜蛾卵巢细胞 sf9 由本实验室保存;DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、Premix Taq PCR 试剂、T4 DNA 连接酶、pMD-19T 载体等购自 TaKaRa 公司;质粒 DNA 小量试剂盒、胶回收纯化试剂盒购自 Axygen 公司;Bacmid DNA 提取试剂盒购自 OMEGA Biotek 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;Grace 培养液和 Cellfectin^R II Reagent 购自 Invitrogen 公司;鼠源抗 His 标签的单克隆抗

体,购自南京生兴生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据猪 Ficolin α 基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物,基因两端分别引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 两个酶切位点,同时上游引物 5'端引入 His Tag 便于纯化,上游引物 F1 为 5'-GAATTCATGCAT-CACCATCACCATCACCATCACGGATCCGCTG-ACACCTG-3',下游引物 F2 为 5'-AAGCTTT-TAGGTCAGGCGGACTTTC-3'。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 重组质粒 19T-Ficolin α 的构建

扩增目的基因,25 μ L PCR 反应体系:Premix Taq 12.5 μ L,引物 F1 1 μ L,引物 F2 1 μ L,质粒 pUC57-Ficolin α 0.2 μ L, MQ 水 10.3 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。获得的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收凝胶中的目的片段,克隆至 pMD-19T 载体,获得的重组质粒 19T-Ficolin α ,采用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 19T-Ficolin α 重组质粒进行双酶切鉴定和测序分析,确定基因序列的正确性。

1.4 重组转移载体 pFast-Ficolin α 的构建

重组质粒 19T-Ficolin α 和转移载体 pFast-BacTM1 进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,回收所需片段,利用 T4 DNA 连接酶将 pFastBacTM1 和目的片段进行连接,转化至 DH5 α 感受态细胞,提取质粒并进行双酶切鉴定,得到阳性重组转移载体 pFast-Ficolin α 。

1.5 重组转移载体 pFast-Ficolin α 与 DH10Bac 感受态细胞的转座反应

pFast-Ficolin α 和 pFastBacTM1 分别转化 DH10Bac 感受态细胞,经三轮蓝白斑筛选得到重组穿梭质粒,利用通用引物 pUC/M13 进行 PCR 鉴定,PCR 反应条件:93 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 5 min,循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。获得的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,正确的命名为 rBacmid-Ficolin α 和 rBacmid-pFast。

1.6 重组杆状病毒的构建和鉴定

参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册,以 Cellfectin^R II 为转染试剂,转染 sf9 单层细胞,转

染后每 24 h 观察 1 次,直到细胞出现病毒感染现象,收获培养上清,提取病毒 DNA,利用通用引物 M13F/R 进行 PCR 鉴定,得到的重组病毒命名为 rBV-Ficolin α 和 rBV-pFast。

1.7 重组蛋白质的表达优化及纯化

重组病毒经传代提高滴度,用于蛋白质的表达,按最适密度将对数生长期的昆虫细胞接种于六孔板,分析种毒接种量(2.5、5.0、7.5、10.0 MOI)和表达时间(48、72、96、120 h)对目的蛋白质表达量的影响,待细胞完全出现病变,收获细胞,裂解后通过 Western blot 检测其表达情况,进一步利用 Image J 软件对优化表达的 Western blot 图片进行灰度分析,确定较佳表达条件。

按较佳种毒接种量感染昆虫细胞,于 96 h 收获细胞,加入裂解液,冰浴 30 min 后进行离心,使用 Ni^{2+} -Sepharose HisTrap HP™ 镍柱纯化上清,收集蛋白峰对应的洗脱液,进行 SDS-PAGE 检测。

1.8 重组蛋白质抗病毒作用初步分析

对上述纯化的重组蛋白质经脱盐、过滤及浓度测定后进行抗 PRRSV 作用的初步分析。

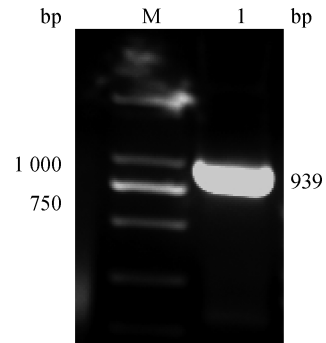
预先将不同浓度的猪 Ficolin α 与 PRRS 病毒液于室温孵育 20 min,然后于 Marc-145 细胞中测定病毒滴度,同时设立病毒对照和细胞对照,37 °C CO_2 培养箱吸附 1 h,经 PBS 洗涤后更换成细胞维持液,观察并记录 CPE 形成情况,利用 Reed-Muench 法计算 TCID_{50} ,进一步利用 GraphPad Prism 6 软件对 TCID_{50} 进行 Student's *t* 检验分析。

同样的,预先将不同浓度的猪 Ficolin α 与 PRRS 病毒液于室温孵育,加于预先铺好的 96 孔板内,同时设立病毒对照和细胞对照,37 °C CO_2 培养箱吸附 1 h,经 PBS 洗涤后更换成细胞维持液,48 h 后倒掉上清,用冷甲醇固定 15 min,以 PRRSV GP5 单抗及 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 进行间接免疫荧光检测。

2 结果

2.1 重组质粒 18T-Ficolin α 的构建

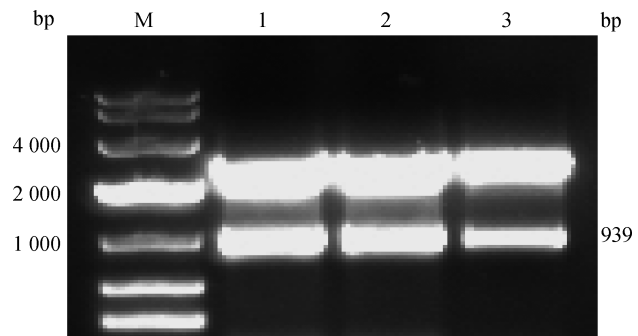
PCR 扩增带 His 标签的猪 Ficolin α 基因,产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中显示约 939 bp 的片段(图 1),目的基因与 T 载体连接后,进行双酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳检测,得到与预期大小一致的特异性条带(图 2),测序结果显示扩增片段与设计完全相符,成功构建了重组质粒 18T-Ficolin α 。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. 目的基因
M. DL2000 DNA marker;1. Target gene

图 1 猪 Ficolin α 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of pig Ficolin α gene



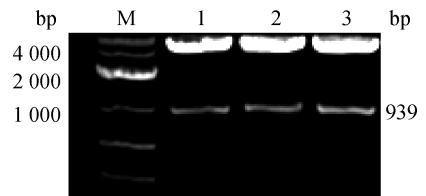
M. DL10000 DNA 相对分子质量标准;1~3. 双酶切产物
M. DL10000 DNA marker;1-3. Products after double-enzyme digestion

图 2 重组质粒 18T-Ficolin α 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid 18T-Ficolin α by double-enzyme digestion

2.2 重组转移载体 pFast-Ficolin α 的构建

pFastBac™1 和目的片段进行连接,转化 DH10-Bac 感受态细胞,提取质粒,进行双酶切鉴定,得到与预期大小一致的特异性条带(图 3),说明猪 Ficolin α 基因被正确插入到转移载体 pFastBac™1 中。



M. DL10000 DNA 相对分子质量标准;1~3. 双酶切产物
M. DL10000 DNA marker;1-3. Products after double-enzyme digestion

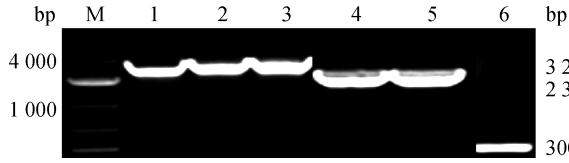
图 3 重组质粒 pFast-Ficolin α 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pFast-Ficolin α by double-enzyme digestion

2.3 重组 Bacmid 的筛选及 PCR 鉴定

经三轮蓝白斑筛选制备重组 Bacmid DNA,利

用通用引物 PUC/M13 进行 PCR 鉴定,结果如图 4, rBacmid-Ficolin α 、rBacmid-pFast 及野生型 Bacmid 的 PCR 产物长度分别为 3 239、2 300、300 bp, 与预期大小一致,证明转座成功。



M. DL10000 DNA 相对分子质量标准; 1~3. rBacmid-Ficolin α DNA 的 PCR 扩增产物; 4~5. rBacmid-pFast DNA 的 PCR 扩增产物; 6. 野生型 Bacmid DNA 的 PCR 扩增产物

M. DL10000 DNA marker; 1-3. PCR product of rBacmid-Ficolin α DNA; 4-5. PCR product of rBacmid-pFast DNA; 6. PCR product of wild Bacmid DNA

图 4 重组 Bacmid DNA 的 PCR 产物

Fig. 4 PCR product of Bacmid DNA

2.4 重组杆状病毒的构建及鉴定

将 rBacmid-Ficolin α 和 rBacmid-pFast 转染 sf9 昆虫细胞 144 h 后细胞出现明显的病变,主要表现为细胞变圆变大,生长停止,细胞内出现颗粒状物质,细胞脱落,见图 5。

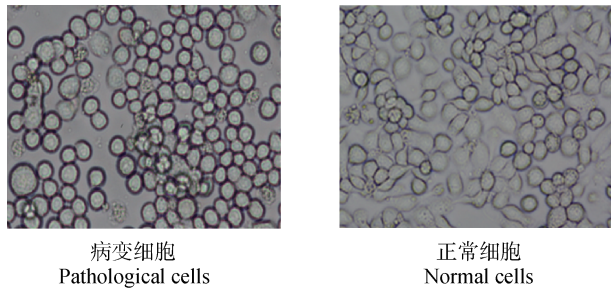


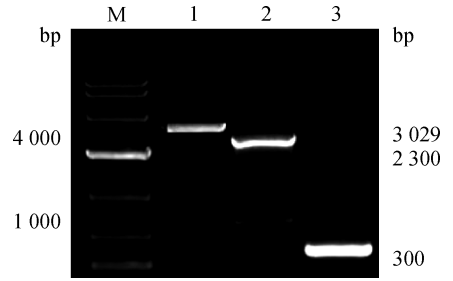
图 5 sf9 正常细胞及病变细胞形态图片

Fig. 5 Morphological features of sf9 cells infected with recombinant baculovirus and normal sf9 cells

提取重组杆状病毒 DNA,以 M13 引物进行 PCR 扩增, Ficolin α 重组病毒 (rBV-Ficolin α)、pFast 病毒 (rBV-pFast)、野毒扩增分别得到了 3 029、2 300、300 bp 的特异性片段,条带大小与预期一致,证明转染成功,可以用于蛋白质的表达(图 6)。

2.5 重组蛋白的优化表达及纯化

利用鼠源抗 His 标签单克隆抗体,通过 Western blot 对表达产物进行鉴定,结果表明:重组猪 Ficolin α 为可溶性表达,破碎后上清在预期大小 35 ku 处有一条特异性条带, rBV-pFast 及野毒感染的 sf9 细胞破碎后上清未出现该条带。为提高目的蛋



M. DL10000 DNA 相对分子质量标准; 2. 重组毒株 Ficolin α 的 PCR 产物; 3. 重组毒 pFast 的 PCR 产物; 4. 野毒株的 PCR 产物

M. DL10000 DNA marker; 2. PCR product of rBV-Ficolin α ; 3. PCR product of rBV-pFast; 4. PCR product of wild virus

图 6 重组杆状病毒 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of recombinant baculovirus by PCR

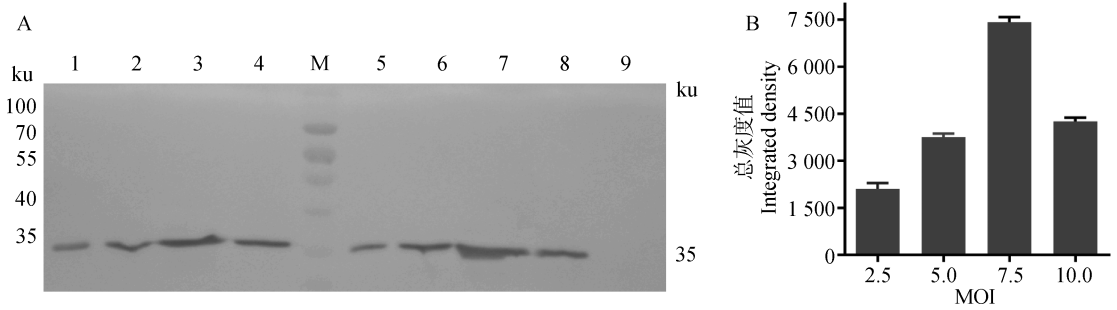
白质表达量,对重组病毒感染量及表达时间进行了优化,通过 Image J 软件对优化表达的 Western blot 图片进行灰度分析,结果显示在接种量为 7.5 MOI,收获时间为 96 h 的条件下目的蛋白质表达量最高,见图 7。

含有目标蛋白质的裂解后上清通过镍柱在 AKTApurifier™ 10 纯化系统上进行纯化,结果表明以 400 mmol \cdot L⁻¹ 咪唑进行洗脱时,得到了单一的洗脱峰,对应的洗脱液经 SDS-PAGE 检测出现了单一的条带,由此获得了纯度较高的可溶性猪 Ficolin α ,见图 8。

2.6 重组猪 Ficolin α 抗病毒作用初步分析

结果表明重组猪 Ficolin α 能够与 PRRSV 结合且降低其对 Marc-145 细胞的感染。统计分析显示 40 μ g \cdot mL⁻¹ 重组猪 Ficolin α 呈现出较强的抗病毒作用,能够使病毒滴度从 1.55 \times 10⁶ \cdot mL⁻¹ 下降到 0.28 \times 10⁶ \cdot mL⁻¹ ($P < 0.001$); 20 μ g \cdot mL⁻¹ 重组猪 Ficolin α 也表现出一定的抗病毒效果,能够使病毒滴度下降到 0.71 \times 10⁶ \cdot mL⁻¹ ($P < 0.01$); N-乙酰葡萄糖胺已被证明可以与 Ficolin α 进行结合, Ficolin α 预先被 N-乙酰葡萄糖胺饱和后,失去与 PRRSV 结合的能力,没有表现出抗病毒作用,与预期结果一致(图 9)。

间接免疫荧光试验进一步表明猪 Ficolin α 能够降低 PRRSV 对 Marc-145 细胞的感染。病毒对对照组在显微镜下观察可见很强的绿色荧光; 40 μ g \cdot mL⁻¹ 重组猪 Ficolin α 组仅见零星散在的荧光; 细胞对照组未见非特异性荧光; Ficolin α 预先被 N-乙酰葡萄糖胺饱和后失去抗病毒作用,也出现了较强的绿色荧光,与前面的结果一致(图 10)。

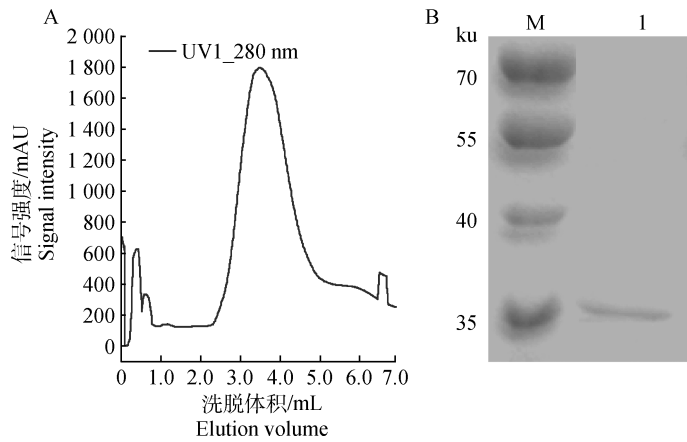


A. Western blot 图片(1~4. 感染重组病毒 rBV-Ficolin α 的 sf9 细胞破碎后上清, 感染量分别为 2.5、5.0、7.5、10.0 MOI; M. 蛋白质相对分子质量标准; 5~8. 感染重组病毒 rBV-Ficolin α 的 sf9 细胞破碎后上清, 表达时间分别为 48、72、96、120 h; 9. 感染重组病毒 rBV-pFast 的 sf9 细胞破碎后上清, 阴性对照); B. 灰度分析

A. Picture of Western blot (1-4. Supernant of sf9 cells infected with rBV-Ficolin α at MOI of 2.5, 5.0, 7.5, 10.0; M. Protein molecular weight marker; 5-8. Supernant of sf9 cells infected with rBV-Ficolin α harvested at 48, 72, 96, 120 h; 9. Supernant of sf9 cells infected with rBV-pFast, negative control); B. Gray level analysis

图 7 重组猪 Ficolin α 的 Western blot 检测

Fig. 7 Dedection of porcine Ficolin α by Western blot

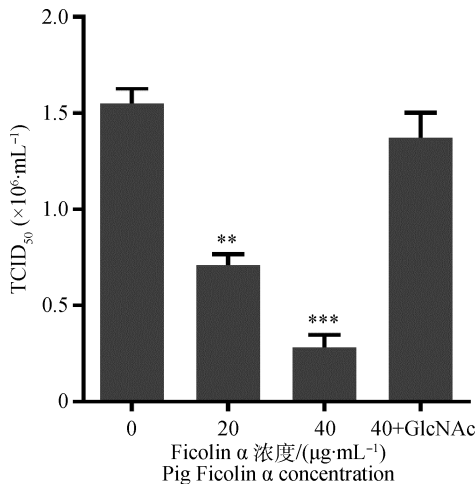


A. 洗脱峰; B. SDS-PAGE 检测 (M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 经镍柱纯化的猪 Ficolin α)

A. Elution peak; B. SDS-PAGE analysis (M. Protein molecular weight marker; 1. Porcine Ficolin α purified by a Ni^{2+} affinity column)

图 8 利用 Ni^{2+} 亲和柱在 AKTA purifier™ 10 系统分离纯化重组猪 Ficolin α 及 SDS-PAGE 检测

Fig. 8 Isolation of Ficolin α by AKTA purifier™ 10 on a Ni^{2+} affinity column and SDS-PAGE detection

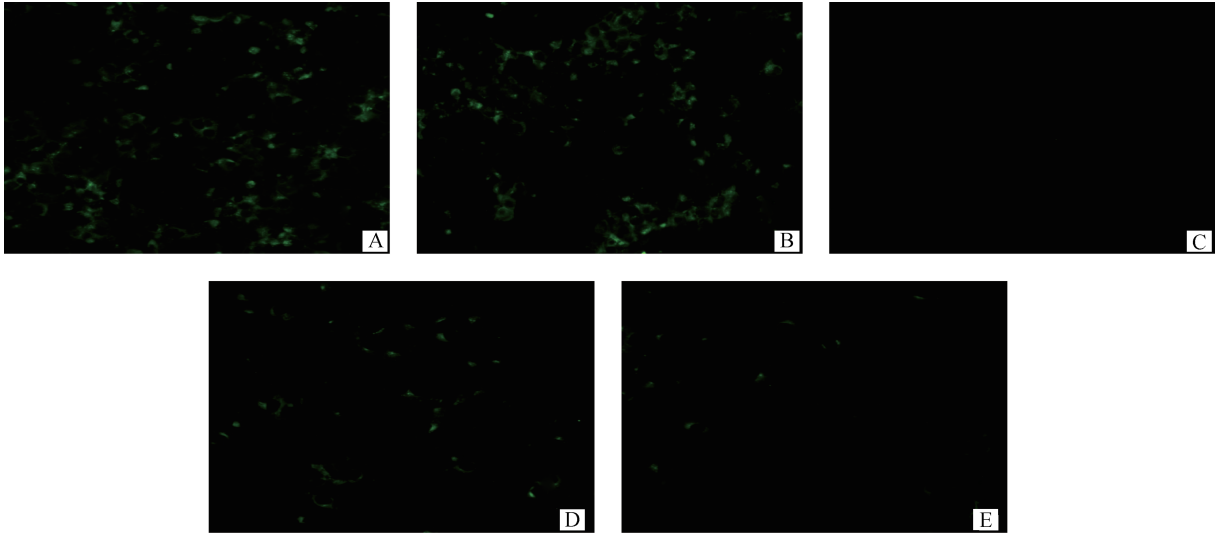


* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图 9 利用 TCID_{50} 评价重组猪 Ficolin α 的体外抗 PRRSV 作用
Fig. 9 Antiviral activity of porcine Ficolin α against PRRSV *in vitro* by TCID_{50}

3 讨论

Ficolin 在机体的天然免疫中发挥着重要的作用, 对于其功能的研究主要集中于补体激活、调理吞噬及炎症反应^[15]。越来越多的研究显示 Ficolin 具有不依赖补体的抗病毒作用, 其 C 端的糖识别结构域 CRD 作为一种糖类模式识别受体参与对病毒表面糖基的识别及结合。研究显示人体内 3 种 Ficolin 与 GlcNAc 都有较高的亲和性, 但也存在着差异, L-Ficolin 对葡萄糖无明显的亲和性, 而 H-Ficolin 却能结合葡萄糖^[15]; 大量研究显示人体内 Ficolin 可与人类免疫缺陷病毒、肝炎病毒、流感病毒、埃博拉病毒及立百病毒等多种病毒表面糖基结合而起到抗病毒作用, 也能够与金黄色葡萄球菌、链球菌、胸膜肺



A. 病毒对照; B. $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ficolin α + N-乙酰葡萄糖胺; C. 细胞对照; D. $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ficolin α ; E. $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ficolin α
 A. Virus control; B. $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ficolin α + GlcNAc; C. Cell control; D. $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ficolin α ; E. $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ficolin α
 图 10 利用间接免疫荧光方法评价重组猪 Ficolin α 体外抗 PRRSV 作用

Fig. 10 Antiviral activity of porcine Ficolin α against PRRSV *in vitro* by indirect immunofluorescence assay

炎放线杆菌及蜂房哈夫尼菌等 G^+ / G^- 菌结合而起抑制作用^[16], 综上, 人 Ficolin 具有较广泛的抗微生物谱。而兽医领域关于猪 Ficolin 的糖结合谱、微生物识别谱及其抗病毒活性和机制研究甚少。

许多研究^[6,10]中多采用从猪血浆中提取的方法获取 Ficolin α , 该方法操作繁琐, 制备量小, 不能满足长期研究需要, 也有研究^[17]利用中国仓鼠卵巢细胞(CHOK1)进行瞬时表达, 由于转染效率存在差异, 制备的目的蛋白质不适合进行长期研究; 昆虫杆状病毒表达系统是一种有效的真核基因表达载体, 系统操作简便、生产周期短; 杆状病毒具有严格的宿主专一性, 宿主仅限于昆虫和少数的无脊椎动物, 无论对于操作本系统的科研人员还是应用重组蛋白质的靶动物本身都是安全的; 另外昆虫细胞具有翻译后加工修饰的能力(如糖基化、磷酸化等), 据文献统计, 已有 1 000 余种外源基因在昆虫杆状病毒表达系统中得到了成功表达, 其中约有 95% 的外源重组蛋白质能够被正确翻译后加工修饰, 具有与天然蛋白质相同的生物活性。

用于本研究的目的蛋白质猪 Ficolin α 来源于哺乳动物, 有糖基化位点, 因此, 为了获得有正确结构和修饰的活性蛋白质, 选用昆虫杆状病毒表达系统。通过 Western blot 证明本研究制备的重组猪 Ficolin α 获得了成功表达, 进一步研究显示重组猪 Ficolin α 具有与 PRRSV 结合的活性, 并且能够降低 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的感染。在人医领

域包括 Ficolin 在内的多种凝集素已被列为抗 HIV 的潜在药物, 也因此凝集素作为一类新型抗病毒药物越来越受到药物开发者的青睐。

4 结 论

成功构建猪 Ficolin α 的重组杆状病毒, SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明猪 Ficolin α 在 sf9 昆虫细胞中获得可溶性表达, 并且具有抗 PRRSV 的活性, 这为后期猪 Ficolin α 的抗病毒活性及抗病毒机制研究提供了物质基础。

参考文献 (References):

- [1] ANDRES J L, RÖNNSTRAND L, CHEIFETZ S, et al. Purification of the transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteoglycan betaglycan[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(34): 23282-23287.
- [2] ICHIJO H, HELLMAN U, WERNSTEDT C, et al. Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(19): 14505-14513.
- [3] KILPATRICK D C, CHALMERS J D. Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 138797.
- [4] BROOKS A S, HAMMERMUELLER J, DELAY J P, et al. Expression and secretion of ficolin β by porcine neutrophils [J]. *Biochim Biophys Acta Gen*

- Subj, 2003, 1624(1-3): 36-45.
- [5] MATSUSHITA M, ENDO Y, TAIRA S, et al. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(5): 2448-2454.
- [6] MICHALSKI M, ST SWIERZKO A, LUKASIEWICZ J, et al. Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, *Hafnia alvei*[J]. *Immunobiology*, 2015, 220(1): 117-123.
- [7] LOZANO V, AGUADO L, HOORELBEKE B, et al. Targeting HIV entry through interaction with envelope glycoprotein 120 (gp120): synthesis and antiviral evaluation of 1,3,5-triazines with aromatic amino acids [J]. *J Med Chem*, 2011, 54 (15): 5335-5348.
- [8] BERTAUX C, DAELEMANS D, MEERTENS L, et al. Entry of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus is selectively inhibited by carbohydrate-binding agents but not by polyanions[J]. *Virology*, 2007, 366(1): 40-50.
- [9] HILLAIRES M L B, VAN EIJK M, VOGELZANG-VAN TRIERUM S E, et al. Assessment of the antiviral properties of recombinant surfactant protein D against influenza B virus *in vitro* [J]. *Virus Res*, 2015, 195: 43-46.
- [10] KEIRSTEAD N D, LEE C, YOO D, et al. Porcine plasma ficolin binds and reduces infectivity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro* [J]. *Antiv Res*, 2008, 77 (1): 28-38.
- [11] HAMED M R, BROWN R J P, ZOTHNER C, et al. Recombinant human L-Ficolin directly neutralizes hepatitis C virus entry[J]. *J Innate Immun*, 2014, 6 (5): 676-684.
- [12] TAKAHASHI K, MOYO P, CHIGWESHE L, et al. Efficacy of recombinant chimeric lectins, consisting of mannose binding lectin and L-ficolin, against influenza A viral infection in mouse model study[J]. *Virus Res*, 2013, 178(2): 495-501.
- [13] VERMA A, WHITE M, VATHIPADIEKAL V, et al. Human H-ficolin inhibits replication of seasonal and pandemic influenza A viruses [J]. *J Immunol*, 2012, 189(5): 2478-2487.
- [14] MICHELOW I C, DONG M D, MUNGALL B A, et al. A novel L-ficolin/Mannose-binding lectin chimeric molecule with enhanced activity against ebola virus [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(32): 24729-24739.
- [15] 张家忠, 章晓联. 纤维胶凝蛋白(ficolin)在非特异性免疫中的作用[J]. 襄樊职业技术学院学报, 2006, 5 (5): 8-9.
ZHANG J Z, ZHANG X L. The role of ficolin in innate immunity[J]. *Journal of Xiangfan Vocational and Technical College*, 2006, 5(5): 8-9. (in Chinese)
- [16] 李 兰, 郑其升, 付言峰, 等. 几种胶原样凝集素的生物学特性及其抗病原微生物的作用[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(11): 76-78.
LI L, ZHENG Q S, FU Y F, et al. Biological characteristics and antimicrobial activity of several collagen lectins[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(11): 76-78. (in Chinese)
- [17] ENDO Y, IWAKI D, ISHIDA Y, et al. Mouse Ficolin B has an ability to form complexes with mannose-binding lectin-associated serine proteases and activate complement through the lectin pathway[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 105891.

(编辑 白永平)