

花鲈肿瘤坏死因子基因 cDNA 的克隆、分析与表达

邱丽华^{1,2}, 宋林生¹, 蔡中华¹, 吴龙涛¹, 江世贵²

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:采用同源克隆法, 结合锚定 PCR 技术, 获得了花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) *TNF α* 基因 cDNA 的部分序列。BLAST 分析表明, 该序列与其他鱼类的 *TNF α* 基因具有很高的相似性与同源性。同时利用 RT-PCR 技术, 对该基因在鱼体内不同组织之间的表达差异进行了分析研究, 结果表明, 该基因在花鲈免疫器官头肾、脾脏、肝脏中的表达较强, 而在脑中的表达较弱, 在肌肉中几乎不表达。而且在经特异性病原刺激前、后的组织对比分析中, 发现鱼体经 LPS (lipopolysaccharide) 刺激后, 目的基因在免疫器官中的表达明显增强。该基因的克隆与表达为进一步深入研究海水鱼类的抗逆机理以及指导鱼类的遗传选育和遗传改良都具有重要的理论意义。

关键词:花鲈; 肿瘤坏死因子 (*TNF α*); 同源克隆; RT-PCR 表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)05-0370-06

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, 简称 *TNF α*) 是机体在受到病原入侵时, 由单核细胞或巨噬细胞产生的炎症细胞因子, 可以杀死肿瘤细胞, 并在细胞间起着信号传导的作用^[1]。另外还在抵御寄生虫、细菌和病毒感染中起着重要介质的作用^[2-4]。肿瘤坏死因子在机体内还起到治疗的作用, 包括抗肿瘤^[5]、休克^[6]和胚胎发育^[7]等。*TNF α* 是单一拷贝基因, 属于 II 型跨膜蛋白或糖蛋白。*TNF α* 具有 2 种存在形式^[8], 即跨膜型和游离型。游离型 *TNF α* 与全身性免疫反应有关, 而跨膜型 *TNF α* 导致了寄主体局部的炎症反应^[9]。

随着分子生物学技术和生物信息学技术的不断发展和完善, 近年来在克隆鱼类功能基因方面取得了显著的进步, 尤其是对 *TNF α* 的研究。2000 年日本学者最早利用 EST 标签法克隆出牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 的 *TNF α* 全基因序列^[10], 随后中国留英学者 Zou^[11] 又克隆出虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)

的 *TNF α* mRNA 序列, 2001 年法国学者 Bobe^[12] 对河鲈 *TNF* 基因进行了克隆, 并在 GenBank 注册。2002 年法国学者 Jesus^[11] 又对金头鲷 (*Sparus aurata* L.) *TNF α* 基因进行了克隆及表达的研究, 2003 年中国学者宋林生等对真鲷进行了研究, 并克隆到部分 *TNF α* mRNA 序列。

花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 属于鲈科鱼类, 在我国南、北方海域均有分布, 因其广温、广盐 (有人曾在盐度为 35 的水域中发现过花鲈^[13])、适应性强、生长快、肉质细嫩、适合于各种形式的养殖等特点, 成为我国重要的增养殖对象之一。随着海水养殖规模及密度的不断增大, 病害问题日趋严重, 已成为制约我国海水养殖业健康、可持续发展的重要因素之一。传统的防病、抗病方法很易造成抗生素类等药物的积累, 从而破坏生态平衡。本研究从鱼体自身抗病、抗逆的遗传学基础入手, 采用同源克隆技术, 对鱼类天然免疫中重要的细胞因子 *TNF α* 基因进行分离、克隆及表达, 旨在研究鱼类免疫防御的遗传学基础, 探讨其免疫防御机理, 为寻找海水鱼类病害防治新途径奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

收稿日期: 2003-06-02; 修订日期: 2003-07-14.

基金项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划项目 (2001AA62B180).

作者简介: 邱丽华 (1971-), 女, 助理研究员, 博士研究生, 从事实验海洋生物技术研究.

通讯作者: 宋林生. E-mail: lshseng@ms.qdio.ac.cn

取新鲜健康的花鲈(体重约 500 g)在实验室内暂养 2 天,以 LPS (lipopolysaccharide) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行胸腔注射,刺激 4 h 后,解剖鱼体,取头肾、肝脏、脾脏、脑、肌肉 5 种组织各约 100 mg,立即放入 1 mL Trizol 中进行匀浆,按照试剂盒程序说明进行总 RNA 的提取。

同时解剖未受 LPS 刺激的大小相似的健康花鲈,取出免疫器官,包括头肾、肝脏及脾脏,用 Trizol 提取总 RNA 作为参照,步骤同上。以上实验均设平行样作为参照。

1.2 cDNA 一链的合成

取花鲈总 RNA 5 μL 与反转录引物 1 μL (10 pmol/L) 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min 后,立即转入冰上,然后加入 5 $\times$ buffer, dNTP 混合液, Ribonuclease Inhibitor, M-MLV 反转录酶, 25 μL 体系, 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$, 15 min。最后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

反转录引物即 oligo-dT 接头引物序列为: GGC-CACGCCACTAGTAC(T)₁₆

1.3 兼并引物的设计

在 NCBI 的 GenBank 上将人、鼠、兔、虹鳟、牙鲈、金头鲷和河鲈的 *TNF α* 基因的 CDS 序列在 EBI 网站进行 ClustalW 分析,找出保守区域,根据保守区域序列用 Primer5 软件进行引物设计,将最合适的一对正反向兼并引物(TF1、TR1)序列交由上海生工公司进行 DNA 合成。

1.4 *TNF α* 基因 cDNA 片段的克隆

用上述合成的 cDNA 一链作为模板和兼并引物进行 PCR 扩增,反应参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 50 s, 56 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 50 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 8 min 延伸。所扩增的 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

1.5 cDNA 的连接转化

将 PCR 产物在 T4DNA 连接酶的作用下克隆入 pMD-18T 载体中,然后转入大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞中,铺入含有氨苄青霉素和 X-Gal 的固体培养基平板中,通过 IPTG 诱导作用,经过蓝白斑筛选,挑取阳性单克隆菌株。根据“碱裂解法小规模提取质粒 DNA”的方法^[14],提取菌液 DNA,经兼并引物 PCR 检测后,将具有插入片段的质粒 DNA 送往测序公司测序。

1.6 同源性分析

测序结果在 NCBI 网站上进行 Blast 分析,根据分析结果及 E-Value 值的大小确定基因是否属于

TNF 家族。

1.7 基因在体内的表达

利用 RT-PCR 技术检测基因在各组织内的表达的差异,及是否特异性病原可以引起目的基因在组织内的表达量的改变。因 β -actin 基因在各个物种及组织内的高度保守性,所以将 β -actin 在组织内的 PCR 扩增产物作为内参照,根据测序所得序列设计特异性引物对目的基因进行特异性扩增,通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

β -actin 正向引物:

5'-ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC-3';

β -actin 反向引物:

5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。

反应参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 50 s, 58 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 50 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 8 min 延伸。

2 结果

2.1 EST 序列同源性分析

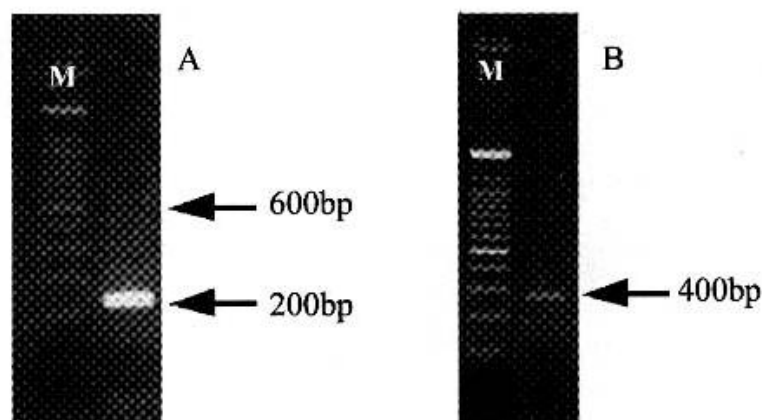
兼并引物 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离,结果见图 1。扩增产物大小 250 bp 左右,与预期相近。经测序后所得核酸序列与相应的氨基酸序列(见图 2),经过 Blast 分析后发现都与其他鱼类的 *TNF α* 氨基酸序列具有极高的相似性。尤其是与金头鲷 *TNF α* 具有高度同源性(e 值为 -32),而且相似性达到 80% 以上(见表 1)。

2.2 锚定 PCR 扩增

利用 oligo-dT 接头引物(同上反转录引物)将带有 polyA 的 mRNA 反转录为 cDNA,用末端转移酶(TdT; Promega)在 cDNA 3'末端加上 polyC 尾,设计锚定引物 Oligo-dG: 5'GGGGGGGIGGGHIGGGHIG 3',及基因特异性引物 TR2: 5'CCTCCTGGGTACTGCTTTGG 3',利用 5'RACE 方法,对基因 5'末端进行 PCR 扩增。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,见图 1。测序结果经过 Blast 分析后,与其他物种的 *TNF α* 基因具有较高的同源性。与兼并引物所得序列进行拼接,结果见图 2。

2.3 基因在体内的表达

利用 RT-PCR 技术来检测花鲈 *TNF α* 基因在不同组织内的表达情况。通过 β -actin 的 PCR 扩增来调节各个组织的 cDNA 模板量,使各个组织在进行 PCR 反应时所含的模板量(即 cDNA)相同,电泳检测图如图 3、图 4 所示。

图1 RT-PCR 扩增 *TNFα* 基因的凝胶电泳图Fig. 1 RT-PCR amplification of *TNFα* gene

A: 兼引物扩增; B: *TNFα* 5'末端 PCR 扩增 M: 100bp Marker
A: amplification with non-specific primers; B: amplification of *TNFα* 5' end

```

1 TCCTGGGTAGTGCTTTGGAGAGAAGAATCAAGGTGTTTCAAGCCTGTATCAGCGCTTCTT
  S W V V L W R E E S R C F K P V S A L L
61 CTCGCTCTGTTTCCAGGTAGCTACGAAGAAGGCGAGATTGTGAAAGACCAGCTGGAGTGG
  L A L F P G S Y E E G E I V K D Q L E W
121AAAAACGGCCAGGGCCAGGCGTTCGCTCAGGGCGGCTTCCGACTTGTGAACAACCAGATC
  K N G Q G Q A F A Q G G F R L V N N Q I
181GTCATCCACAAACCGGCTCTACTTCGCTACTGCCAGGCGTCGTTCAAGGTCTCCTGC
  V I P Q T G L Y F V Y S Q A S F R V S C
241AGCAATGGCGACGAGGAGGGAGCGGGAAGGCCTCACACCTCTCAGCCACCGAATCTGG
  S N G D E E G A G K G L T P L S H R I W
301CGCTACTCGGACTCCATAGGCAGCAAAGCCTCCCTGGTGAGCGCGGTGAGGTGCGCGTGC
  R Y S D S V G S K A S L M S A V R S A C
361CAAAGCACTACCCAGGAGGACAGCTACAGAGCCGGACAGGGCTGGTACAACACCATTTAT
  Q S T T Q E D S Y R A G Q G W Y N T I Y
421CTTGGTGCAGTCTTCCAGCTG
  L G A V F Q L
  
```

图2 克隆的花鲈 *TNFα* 部分 cDNA 序列及相应的氨基酸序列Fig. 2 Partial *TNFα* cDNA sequence and deduced amino acid sequence表1 花鲈 *TNFα* 核酸及氨基酸序列与其他已知 *TNF* 基因的比对结果Table 1 Comparison of nucleotide and amino acid sequence of sea perch *TNFα* with other known fish *TNFα*

种类 Species	GenBank 注册号 Accession Number	核苷酸相似性/% Nucleotide identity	<i>E</i>	氨基酸相似性/% Aminoacid identity	<i>E</i>
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AJ401377	89	$6e-12$	59	$6e-20$
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AB040448	95	$3e-11$	65	$8e-25$
河鲈 <i>Salvelinus fontinalis</i>	AF276961	87	$4e-14$	61	$5e-21$
斑尾鲆 <i>Ictalurus punctatus</i>	AJ417565	92	$e-1.5$	45	$1e-11$
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> L.	AJ413189	86	$4e-47$	81	$4e-32$
真鲷 <i>Pagrus major</i>	AY243108	84	$2e-43$	76	$2e-28$

注: $e = -32$

根据所克隆到的花鲈 $TNF\alpha$ cDNA 部分序列,用 Primer5 软件设计一对特异性引物,对基因片段进行 PCR 扩增。引物序列为:正向引物 5' - GTCTACTGCCAGGCGTCGTT - 3';反向引物 5' - TCCGGCTCTGTAGCTGTCT - 3'。反应参数为:94 °C, 5 min; 94 °C, 50 s, 59 °C, 1 min, 72 °C, 50 s, 28 个循环; 72 °C, 8 min 延伸。

$TNF\alpha$ 在不同组织包括头肾、肝脏、脾脏、肌肉及脑的表达情况见图 3。由图 3 可见基因在头肾中的表达量最强,其次为脾脏及肝脏,在脑中有较弱的表达量,而在肌肉中几乎难观察到。同时在对照组中发现 $TNF\alpha$ 在被 LPS 刺激后的组织中的表达量明显高于正常的鱼体组织,可见肿瘤坏死因子在机体抗细菌感染中发挥着作用。我们从图 4 中还发现,正常鱼体的头肾和脾脏可以表达 $TNF\alpha$,而肝脏却未见表达。

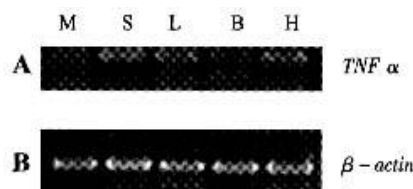


图 3 花鲈 $TNF\alpha$ 基因在不同组织内的表达情况

Fig. 3 $TNF\alpha$ expression in tissues of fish injected with LPS

M:肌肉;S:脾脏;L:肝脏;B:脑;H:头肾

M, muscle; S, spleen; L, liver; B, brain; H, head-kidney

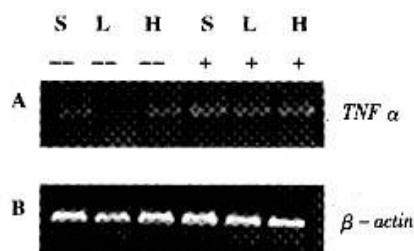


图 4 花鲈经病原刺激前后 $TNF\alpha$ 基因在组织内的表达情况

Fig. 4 Comparison of $TNF\alpha$ expression in tissues of fish stimulated and unstimulated with LPS

S:脾脏;L:肝脏;H:头肾。“+”刺激,“-”未刺激

S, spleen; L, liver; H, head-kidney; ‘+’, stimulated;

‘-’, unstimulated

3 讨论

本研究从鱼类的抗逆抗病相关因子入手,采用

同源克隆法,选取与鱼类天然免疫密切相关的细胞因子 $TNF\alpha$ 基因进行分离与克隆,并获得了部分 cDNA 序列。根据 Isobel 和 Andy 等^[15]的统计学研究结果,当核酸序列比对的 E 值小于 0.005 时,认为比对的 2 个序列之间有显著的相似性。因此将所克隆到的序列用 BLAST 程序与 GenBank 核酸数据库进行序列比对后,发现核酸及氨基酸与已知鱼类 $TNF\alpha$ 基因比对的 E 值都小于 0.005,尤其是与金头鲷 $TNF\alpha$ 的比对 E 值最小为 $4e-47$ (详见表 1)。从表 1 的基因与已知鱼类 $TNF\alpha$ 基因序列的 Blast 分析结果中可见,核酸的相似性达到 90% 左右,而氨基酸的同源性也达到 80%,从此可见所克隆到的序列与已知鱼类 $TNF\alpha$ 基因具有明显的相似性与同源性,属于 $TNF\alpha$ 家族。

作为参与鱼类天然免疫的重要的细胞因子, $TNF\alpha$ 基因的克隆与表达具有重大的理论和应用价值。Secombes 等^[16-17]指出,鱼类天然免疫是鱼类抗感染的第一道防线,而且在鱼类天然免疫中,当机体受到病原或其他不良环境因素侵害时,体内最早释放的免疫因子就是 $TNF\alpha$,随后才是 $IL-1\beta$ 等,而且它可以调节其他细胞因子和免疫因子的释放,参与细胞因子的网络反应等。Laing 等^[11]研究虹鳟的 $TNF\alpha$ 基因时发现,经过细菌(LPS)刺激后,鱼体的免疫器官可以大量表达 $TNF\alpha$ 基因。Jesus Garcia 等^[1]在研究金头鲷 $TNF\alpha$ 基因表达中发现,弧菌和病毒都可以引起体内的 $TNF\alpha$ 基因的大量表达。在本研究中也发现,免疫器官经过病原刺激后表达量会显著增加,而且正常情况下原本不表达的肝脏也大量表达。说明 $TNF\alpha$ 在抵抗外原入侵,以及抗感染防御中起着重要作用。尤其有趣的是,脑作为非免疫器官,较肌肉敏感,在刺激后也会表达 $TNF\alpha$ 基因。据报道, $TNF\alpha$ 基因在哺乳类中具有参与调节睡眠休克的作用^[1],那么在鱼类受到病原刺激后,是否也会产生大脑休克现象还需进一步探讨。在本实验所取的组织中肌肉无明显表达,推测因为肌肉不属于免疫器官,不会立刻参与天然免疫反应,所以表达会相对滞后些。在免疫器官中,头肾较脾脏的表达量大,可见头肾是鱼类重要的免疫器官。综合以上研究可以看出, $TNF\alpha$ 基因在鱼体组织内的表达调控规律和哺乳类一样复杂,还需要更深入的研究^[1]。

目前进行功能基因分离克隆的方法很多,其中同源克隆法是近几年发展起来的进行目的基因筛选

的新方法。该方法通过对已知的其他种类的基因的比对后,根据相对保守区域设计兼并引物,进行PCR扩增,从而找到目的基因的部分序列。该方法简便快速,目前已被广泛应用于功能基因的筛选及克隆,并且也在参与免疫防御功能的基因的筛选及克隆方面发挥着重要的作用^[18]。

花鲈 *TNF α* 基因的克隆成功,为进一步深入研究细胞因子介导的生物抗病、抗逆能力,探索 *TNF α* 基因的作用途径和机理打下了基础。通过对抗病基因表达调控规律的研究,还可以探讨海洋生物的免疫防御机理,分析鱼类病害发生的可能原因,探索提高机体免疫防御能力,筛选和培育抗病优良养殖品种。同时细胞因子是一种非特异性免疫活性物质,不仅可以直接杀伤抗原物质,并作为免疫增强剂使用,增加机体的免疫保护力。因此,它将是取代抗生素的一种新型的防病、治病药物,从而减少环境污染,适应国际药品市场的需求。克隆基因的出现还可以从微观上为生物进化提供理论依据。

在哺乳类的免疫因子的研究过程中,人们发现细胞内具活性的 *TNF α* 基因是以三聚体的形式存在的,它通过与细胞表面的受体的结合而发挥其生物学作用。这些受体分别是分子量为 55 kD 的 TNFR-I 和 75 kD 的 TNFR-II,与受体 I 结合可以引起细胞凋亡,与受体 II 结合可以起到信号传导的作用^[19-21]。而目前关于鱼类受体及传播途径方面的研究还属空白,也是当今鱼类免疫学研究的趋势。

参考文献:

- [1] Jesus Garcia, Jose Meseguer, Pablo Pelegrin, et al. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature[J]. Immunogen, 2002,54:200-207.
- [2] Czarniecki C W. The role of tumor necrosis factor in viral disease[J]. Antiviral Res, 1993,22:223-258.
- [3] Goldfeld A E, Tsai E Y. TNF-alpha and genetic susceptibility to parasitic disease[J]. Exp Parasitol, 1996,84:300-303.
- [4] Steinshamn S, Bemelmans M H, Borgh K, et al. TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defence[J]. J Immunol, 1996, 157:2155-2159.
- [5] Vilcek J, Lee T H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions[J]. J Biol Chem, 1991,266:7313-7316.
- [6] Krueger J M, Fang J, Taishi P, et al. A physiologic role for IL-1 Beta and TNF alpha[J]. Ann NY Acad Sci, 1998,856:148-159.
- [7] Wride M A, Sanders E J. Potential roles for tumor necrosis factor alpha during embryonic development[J]. Anat Embryol, 1995, 191:1-10.
- [8] Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J, et al. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. Cell, 2001,104(4):487-501.
- [9] 王鼎,许家喜. 肿瘤坏死因子及其抑制剂[J]. 生命的科学, 1999,19(4):15-19.
- [10] Hirano I, Nam B H, Kurobe T, et al. Molecular cloning, characterization and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder[J]. J Immunol, 2000,165:4423-7.
- [11] Laing K J, Wang T, Zou J, et al. Cloning and expression analysis of rainbow trout tumor necrosis factor alpha[J]. Eur J Biochem, 2001, 268:1315-1322.
- [12] Julien Bobe, Frederick William Goetz. Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary[J]. Compar Biochem Physiol, 2001,129:475-481.
- [13] 庄度增,孙松山,冯宝柱,等. 鲈鱼养殖与病害防治[M]. 济南:山东科学技术出版社,1997.2-3.
- [14] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2002.27.
- [15] Iobal A, Andy B. The studies of statistics in homology[J]. Bioinformatics,1998,14(4):349.
- [16] Secombes C J, Wang T, Hong S, et al. Cytokines and innate immunity of fish developmental and comparative[J]. Immunol, 2001,25:713-723.
- [17] 伏爽. 肿瘤坏死因子的研究进展[J]. 国外医学免疫学分册,1993,5:252-257.
- [18] 周国岭,杨光圣. 基因克隆技术[J]. 华中农业大学学报, 2001,20(6):584.
- [19] Brockhaus M, Lesslauer W. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences[J]. Cytokine, 1990,2:231-237.
- [20] Loetscher H, Gentz R, Zulauf M, et al. Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor receptor[J]. J Biol Chem, 1991,266:18324-18329.
- [21] Guo Chen, David V. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway[J]. Science, 2002,296(31):1634-1635.

Cloning and expression analysis of tumor necrosis factor α in Japanese sea perch *Lateolabrax japonicus*

QIU Li-hua^{1,2}, SONG Lin-sheng¹, CAI Zhong-hua¹, WU Long-tao¹, JIANG Shi-gui²

(1. Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071, China;

2. The South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Tumor necrosis factor α (TNF α) is an inflammatory cytokine produced by monocytes or macrophages during acute inflammation and is responsible for a diverse range of signaling events within cells. The partial cDNA of TNF α in Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*) was cloned and sequenced with the method of homology cloning. The nucleotide and the deduced protein sequence of the cloned cDNA shows a high degree of homology (>80%) with other known TNF α gene of the fishes, such as *Oncorhynchus mykiss* (89%), *Paralichthys olivaceus* (95%), *Salvelinus fontinalis* (87%), *Ictalurus punctatus* (92%), *Sparus aurata* (86%), and *Pagrus major* (84%). The expression analysis using RT-PCR shows that the sea perch TNF α gene is constitutively expressed in the head-kidney and spleen of the unstimulated fish. The sea perch TNF α gene expression in various tissues can be up-regulated by stimulation with lipopolysaccharide (LPS). The TNF α gene can be expressed in brain after the stimulation with LPS. In the stimulated tissues (head-kidney, liver, spleen, brain, and muscle), a strong TNF α expression happens in the head-kidney, and follows the spleen and the liver. But there is few expression in the muscle.

Key words: Tumor necrosis factor α ; cDNA; RT-PCR expression; *Lateolabrax japonicus*

Corresponding author: SONG Lin-sheng. E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn

2004 年《水产科学》杂志征订启事

《水产科学》杂志是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊,1982 年创刊,国内外发行。《水产科学》主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产生物病害及防治、水产品保鲜与加工综合利用、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面研究的新进展、新技术、新方法等。设有科学实验、实用技术、渔业管理、综合述评、问题探讨与建议、科普讲座、科技信息等栏目。读者对象为水产科技人员、大中专院校水产、生物、环保等专业师生,渔业行政事业和企业单位有关管理和技术人员,以及广大知识渔民。

《水产科学》为月刊,A4 开本,48 页,每月 25 日出版,定价 5.00 元,全年 60.00 元。邮发代号 8-164,读者请到邮局订阅,也可直接汇款到本刊编辑部订阅。编辑部地址:辽宁省大连市沙河口区黑石礁街 50 号,辽宁省海洋水产研究所《水产科学》编辑部,邮政编码:116023,电话:0411-4679512。还可通过银行汇款,开户行:工商银行大连星海支行,帐号:3400202309008900681。