

文章编号:1000-0615(2008)06-0831-07

鲤外周血白细胞蛋白酶体激活因子 PA28 β 全长 cDNA 的克隆、 鉴定及其差异表达分析

付保忠, 卢强, 谭业平, 孙晓义, 李伟, 刘相叶, 邓洪宽

(吉林大学人兽共患病研究所人兽共患病教育部重点实验室, 吉林 长春 130062)

摘要: 采用基因文库筛选方法, 克隆了鲤外周血白细胞蛋白酶体激活因子 PA28 β cDNA, 对其序列进行了分析, 同时利用半定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测了不同外界因子刺激下鲤外周血白细胞 PA28 β 的表达情况。结果显示, 用 DD-RT-PCR 的方法获得差异显示片段 A₁₈, 经地高辛标记作为探针对有丝分裂原刺激的鲤外周血白细胞 cDNA 文库进行核酸杂交筛选, 从 0.8×10^4 个重组噬菌体中, 经过两轮筛选获得阳性克隆。序列分析表明, 该阳性克隆长 1 175 bp, 含有一个大小为 735 bp 编码 244 个氨基酸的完整开放阅读框, 为编码鲤鱼蛋白酶体激活因子 PA28 β 的全长 cDNA。系统发生分析其与已报道的斑马鱼蛋白酶体激活因子 PA28 β 亲缘关系最近, 基因序列的同源性达 95%。分离培养鲤外周血白细胞, 在不同条件下经 PHA 和 ConA 刺激后, 利用 Trizol 提取总 RNA, 根据得到的 PA28 β 全长 cDNA 序列和鲤鱼 β -actin 序列设计引物, 利用 RT-PCR 方法对鲤外周血白细胞 PA28 β 进行差异表达分析, 结果表明: 经有丝分裂原刺激后前期(4 h)白细胞中 PA28 β 的表达量明显增大, 但随着时间的推移(12 h, 24 h)表达增加量有所降低, 并不随时间的延长而持续增加。在刺激的和正常的白细胞中 PA28 β 表达趋势都成抛物线图, 不同的是经刺激的比正常的 PA28 β 的表达量提前达到峰值。首次报道鲤蛋白酶体激活因子 PA28 β 的全长 cDNA 序列, 鲤 PA28 β 的 cDNA 序列 GenBank 注册号为 EU255233, 并对其进行差异表达分析, 这些结果可为 PA28 β 在鱼类免疫应答中的作用研究提供参考和依据。

关键词: 鲤; PA28 β ; cDNA 克隆; 鉴定; 差异表达分析

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

随着水产养殖业的发展, 与鱼病防治紧密相关的鱼类免疫机制的研究越来越显示出其重要的理论与应用价值。硬骨鱼类在免疫系统的进化中处于特殊的地位, 虽然其免疫系统不及哺乳动物发达, 但其外周血白细胞已具有类似 T、B 淋巴细胞的分类, 抗体开始出现, 但是有关鱼类在分子水平上的免疫应答研究还处于初级阶段^[1-2]。蛋白酶体(proteasome)是依赖 ATP 的蛋白水解酶复合体, 它分布于细胞质和细胞核内, 有些与内质网和细胞骨架相结合, 是真核生物细胞中分解内源蛋白质的

主要酶系统^[3]。它可占细胞蛋白质的 1%, 在真核生物进化中, 蛋白酶体高度保守, 其简单形式甚至存在于古细菌和真细菌中^[4]。PA28 作为蛋白酶体激活物, 因为其亚基的分子量约为 28 ku, 所以被命名为蛋白酶体激活因子 PA28 (Proteasome activator 28, PA28)^[5], PA28 又叫 11 S 调节因子, 与 20S 蛋白酶体结合后使其活化, 水解进入细胞内的抗原, 在内质网和高尔基体内加工成 8~9 个氨基酸残基的小肽, 与 MHC I 类分子结合后递呈到细胞表面, 加工后的抗原被 CD⁸⁺ T 细胞识别, 从而完成

收稿日期: 2007-11-15

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(30200210; 30571433)

作者简介: 付保忠(1985-), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 从事微生物学与免疫学研究。E-mail: zhongguo999@msn.com

通讯作者: 卢强, Tel: 0431-87836717; E-mail: luq@jluph.edu.cn

一个免疫应答过程^[6-7]。PA28 不影响 20 S 蛋白酶体降解蛋白质的速率,但可以增大与多种底物肽的结合能力,提高最大反应速度,在 MHC I 类抗原分子呈递中有重要意义^[8-9]。

在哺乳动物中,PA28 在 I 型主要组织相容性复合体抗原递呈过程中的功能和特性已经被广泛和透彻的研究^[10-12]。虽然 PA28 β 基因已经在斑马鱼、石首鱼和比目鱼中分别得到了鉴定^[13-14],但是在鱼类中 PA28 β 的表达方式和功能特点都没有得到深入的研究。本研究在构建鲤外周血白细胞 cDNA 文库和通过 DD-RTPCR 获得鲤白细胞经有丝分裂原刺激后的差异表达基因片断 A18 的基础上^[15-16],在国内外首次克隆了鲤蛋白酶体激活因子 PA28 β 的全长 cDNA。试验还初步研究了 PA28 β 亚单位基因在鲤白细胞中表达量的变化,为进一步研究鲤 PA28 β 体内表达的调控机理,分析 PA28 β 在鲤 MHC I 类抗原应答和递呈中的作用机制奠定了基础,为开发鱼用新型基因工程疫苗提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和材料

地高辛试剂盒(Roche 公司),Hybond-N + 尼龙膜(Amersham 公司),Trizol(Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.2 cDNA 文库的构建

有丝分裂原刺激的鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建见文献^[15-16]

1.3 探针的筛选与标记

经 DD-RTPCR 获得差异显示片段后,再扩增克隆,测序分析表明 A₁₈ 克隆含有 PA28 β 部分序列^[17],以此克隆为模板,利用 PF β 引物(5' - GATAAAAATGAAGATGATGAG - 3')及 PR β 引物(5' - ATATGCTGCTTCATCCTTC - 3')扩增出 PA28 β 的 cDNA 片段,按地高辛标记试剂盒操作说明标记后作为探针。

1.4 PA28 β 亚单位全长 cDNA 的筛选

杂交膜的制备与杂交 从有丝分裂原刺激的鲤外周血白细胞 cDNA 文库取 0.8×10^4 pfu 铺于 NZY Agar 平板,37 °C 培养 6~8 h 后,将噬菌体转移至 Hybond-N + 尼龙膜,经变性、中和、洗涤、干燥后交联。将尼龙膜置于杂交管中,68 °C 预杂交 2 h,加入含有探针的杂交液(探针浓度

$20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),68 °C 杂交 16 h。

洗膜、检测、显色 用足量的洗液将杂交后的尼龙膜洗膜。封闭后将膜放在 anti-DIG-AP 复合物溶液中孵育 30 min,然后用足量的马来酸洗液洗膜 2 次,每次 15 min。再将尼龙膜放入 AP 检测液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl (pH 9.0)、 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂)中平衡 3 min 后,放入显色液中,暗室中显色 12 h,观察结果。

阳性克隆的筛选及插入片段大小鉴定 从琼脂平板上挑出与尼龙膜阳性斑相对应的噬菌斑,溶解于含有 20 μL 氯仿的 500 μL SM 缓冲液中,然后重新铺板,继续第二轮杂交筛选,再挑选出单个阳性噬菌斑。并以其为模板,以引物 5'AD (5' - AGGGATGTTTAATACCACTAC - 3')、引物 3'AD(5' - GCACAGTTGAAGTGAACCTGC - 3')进行 PCR 扩增鉴定其片段大小。

嗜菌粒的切割 取阳性克隆 250 μL ($> 1 \times 10^5$ 噬菌体颗粒)加到 200 μL XL1-Blue (OD₆₀₀ = 1) 中,并加入 1 μL ExAssist helper phage ($> 1 \times 10^6$ pfu $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 37 °C 孵育 15 min 后,加入 3 mL NZY 液体培养基中振荡培养 8 h,取出放在 68 °C 水浴中灭活 20 min,1 000 $\times g$ 离心 15 min,收集上清,即为噬菌粒。

序列测定及分析 将提取的噬菌粒转入宿主菌 XL1LR(OD₆₀₀ = 1)培养后,提取质粒测序,利用生物信息学软件进行序列分析和同源性比较。

1.5 PA28 β 亚单位 mRNA 在鲤外周血白细胞中的差异表达分析

鲤外周血白细胞总 RNA 的提取 参见文献^[15-16]。分离的鲤外周血白细胞体外培养,分别加入有丝分裂原 PHA 和 ConA 刺激不同时间,提取总 RNA。

RT-PCR 引物的设计 根据编码 PA28 β 全长 cDNA 序列,设计引物,PF β_1 : 5' - GAAATGAGAGGATTGTGAAGT - 3',PR β_1 : 5' - GCATAGAAACCGCGTATATC - 3',扩增长度为 355 bp;根据 GenBank 数据库 M24113 的序列设计扩增鲤 β -actin 的引物,PF β_2 : 5' - CGTGATGGACTCTGGTGA - 3',PR β_2 : 5' - GGGTACATGGTGGTACCA - 3',扩增长度为 450 bp。

RT-PCR 反应体系为 20 μL ,其中总 RNA ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL ,10 \times RT 缓冲液 2 μL ,dNTPs

(10 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, RNase 抑制剂 (40 U \cdot μ L⁻¹) 0.4 μ L, AMV-Optimized Taq 0.4 μ L, AMV RTase XL(5 U \cdot μ L⁻¹) 0.4 μ L, 无 RNA 酶水 9 μ L, MgCl₂ (2.5 mmol \cdot L⁻¹) 4 μ L, 上游和下游引物 (20 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.4 μ L。反应条件为:50 $^{\circ}$ C, 30 min; 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 共 35 个循环。

mRNA 表达水平的检测 取 RT-PCR 扩增产物 10 μ L, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪对目的条带灰度扫描 (integrated optical density, IOD) 后进行半定量分析。将 PA28 β 的 IOD 值与 β -actin 的 IOD 值相比表示 PA28 β 基因的相对表达量。

2 结果

2.1 PA28 β 全长 cDNA 克隆的筛选及序列分析

用地高辛标记的 A₁₈ 探针对有丝分裂原刺激的鲤外周血白细胞 cDNA 文库进行核酸杂交筛选, 从 0.8×10^4 个重组噬菌体中, 经过 2 轮筛选获得 6 个阳性克隆 (MC1-MC7), PCR 后经琼脂糖电泳, 结果显示其大小为 1 000~1 200 bp。经核苷酸测序、ExpASY tools 及 NCBI/BLAST 分析, 结果表明: 这 6 个阳性克隆均为同一基因不同长度的转录产物, 其中以 MC3 为最长 cDNA, 它们均编码相同的氨基酸序列, MC3 大小为 1 175 bp, 含一个 735 bp 编码 244 个氨基酸的完整开放阅读框 (ORF), 92~94 位核苷酸为起始密码子 ATG, 第 824~826 位核苷酸为终止密码子 TGA, 第 1101~1106 位核苷酸为加 poly(A) 信号 (AATAAA), 核苷酸序列 5' 非编码区 (5' UTR) 长 91 个核苷酸, 3' 端非编码区 (3' UTR) 长 349 个核苷酸, 且 3' 有 poly(A) 尾 (图 1)。鲤 PA28 β 的 cDNA 序列 GenBank 注册号为 EU255233。

2.2 PA28 β 功能结构域、同源性、系统发生分析

Motif Scan 分析表明编码的 PA28 β 蛋白序列由 244 个氨基酸组成, 大约有 27 ku 的分子量, 含有蛋白酶体激活因子 PA28 的 β 亚单位功能结构域。PSORT II 程序预测表明 PA28 β 亚单位存在内质网膜保留信号 KPSM。NCBI Blast 分析显示, 鲤 PA28 β 蛋白分别与斑马鱼、石首鱼、比目鱼、河豚、短尾猴、狗、猕猴、牛、人和非洲蟾蜍的 PA28 β 蛋白具有同源性并有着 95%、78%、73%、70%、65%、63%、63%、63%、63% 和 55% 序列相

似性。用 DNASTar 软件对 16 个不同物种 PA28 β 的氨基酸序列比对发现, 人、猩猩、猪、狗等哺乳动物保守序列比例约占 70%, 而鱼类则相对较低, 与哺乳动物比较约只有 30% 保守。用 DNASTar 软件对不同物种的 PA28 β 进行系统进化分析, 由低等的鱼类到高等的哺乳动物的 16 个物种中鲤与斑马鱼的亲缘关系较近, 其次是石首鱼、比目鱼和河豚等, 而与哺乳动物亲缘关系较远, 人最远。在相同的进化距离下比较哺乳动物和鱼类, 鱼类的分子进化要比哺乳动物快。鲤与石首鱼、比目鱼、河豚相比, 和斑马鱼的亲缘关系更大, 这可能是鲤和斑马鱼同属淡水鱼而石首鱼、比目鱼和河豚属于海水鱼的原因了 (图 2)。

2.3 PA28 β 的差异表达分析

鲤外周血白细胞在不同条件下经 PHA 和 ConA 刺激后提取总 RNA, 以 β -actin 为内参进行半定量 RT-PCR, 对 PA28 β 进行差异表达分析, 结果见图 3、4。鲤外周血白细胞经 PHA 刺激培养 4 h 比正常培养 4 h 的 PA28 β 表达量升高 ($P < 0.01$), PHA 刺激培养 12 h 比正常培养 12 h 的 PA28 β 表达量升高, 但比 PHA 刺激 4 h 有所降低。ConA 刺激培养 4 h 比正常培养 4 h 的 PA28 β 表达量高 ($P > 0.05$), ConA 刺激 24 h 比正常培养 24 h 的 PA28 β 表达量略大 ($P > 0.05$)。在刺激的和正常的白细胞中 PA28 β 表达趋势都成抛物线图, 不同的是经刺激的比正常的 PA28 β 的表达量提前达到峰值。

3 讨论

DNA 是物种进化的记录者, 直接研究遗传物质的组成 (DNA 碱基构成) 可以再现物种的进化历程, 为物种的系统演化提供有益的线索。PA28 β 基因在许多物种中得到了广泛的研究, 包括短尾猴、人、大鼠、小鼠狗、猕猴、牛、非洲蟾蜍、斑马鱼、石首鱼、比目鱼和河豚等, 但在鲤中的研究还不够深入。鱼类在免疫系统的进化中处于一个关键的时期, 抗体在这一时期出现, 而且白细胞也开始分化出功能不同的群, 有了类似哺乳动物 T、B 淋巴细胞的免疫细胞分群。在真骨鱼参与免疫应答的白细胞中, PA28 β 的基因结构和蛋白序列有何特点, 其表达调控如何是本研究关注的重点。该实验利用 DD-RTPCR 获得的差异显示片段 A₁₈ 作为探针, 通过筛选经有丝分裂原刺激

GGCACGAGGC TAGTGCAGAGA GGCACCTGAA CGTCTGCTGC TCACAGTACC GCGATCTCTT	60
TGCTCTGAAAA TAACGAACAC TTACATTCAT TATGTCT AAA ACT AGT GTA CTG AAG	115
M S K T S V L K	8
ATA AAC TCT GAT AAT GCA GTG AGG ATA GAA AAC TAC CGC CAG TCA CTG TAT AAG	169
I N S D N A V R I E N Y R Q S L Y K	26
CAG GCA GAA AAG CTG TTC TCC GAT CAC ATA CCT CTG AAG ATC TCA CAG CTT GAC	223
Q A E K L F S D H I P L K I S Q L D	44
AAC CTG CTG AAG GGG GAT GAC TTA AGT ATC ACT GAC CTC TCA TCT CTC CAT GCA	277
N L L K G D D L S I T D L S S L H A	62
CCC CTG GAC ATT CCC ATT CCT GAC CCC CCT GCT CCA GAA GAT GAG GAG ATG GAG	331
P L D I P I P D P P A P E D E E M E	80
ACA GAT AAA AAT GAA GAT GAT GAG AAA AAG AAG AAA GCT CCC AAG TGT GGC TTC	385
T D K N E D D E K K K K A P K C G F	98
ATC AAA GGA AAT GAG AGG ATT GTG AAG TTG CTG GAT ATT GTA AAA CCA GAG ATA	439
I K G N E R I V K L L D I V K P E I	116
ATG GCT TTG AAG GAG ACC TGC ATC ACT GTT TCT TGC TGG ATT TCT CAT CTA ATT	493
M A L K E T C I T V S C W I S H L I	134
CCA AAA ATA GAG GAT GGA AAT GAT TTT GGA GTT GCT ATT CAG GAA AAG ATC CTT	547
P K I E D G N D F G V A I Q E K I L	152
GAG CGA ATT ACT GCT GTG AAG ACC AAG GTG GAG GGT TTT CAG ACC AAC ATT AAC	601
E R I T A V K T K V E G F Q T N I N	170
AAG TAC TTC TCA GAG AGA GGT GAT GCA GTG GCC AAA GCT TCC AAA GAC ACA CAC	655
K Y F S E R G D A V A K A S K D T H	188
GTG ATG GAT TAT CGC TCT CTG GTG CAC GAG AAG GAT GAA GCA GTA TAT TCT GAG	709
V M D Y R S L V H E K D E A V Y S E	206
ATT AGA GTG ATT GTG CTT GAT ATA CGC GGT TTC TAT GCT GAA CTC TAT GAT GTC	763
I R V I V L D I R G F Y A E L Y D V	224
ATC AGC AAG AAC CTG GAG AAA GTG ACG AAT CCT AAA GGA GAA GAG AAG CCC TCC	817
I S K N L E K V T N P K G E E <u>K P S</u>	242
ATG TAC TGAGACA GATGCTTACT GGGACCAGCG CAGTTCTACA ACTAGACCGG TTTTCAGAAT	880
<u>M</u> Y *	244
TTCTCATTTC TTCACATGAT TTCTGACGCT CTACAGATGC ATCTTTAAAG TAGTTTGTTA	940
ATAATCTTAA ATCAGTCATA AACATACAGT GAGTTGTGGT ACAAATGATG AGTTCATGTA	1000
AATCTACATT CACATTTATT TCAGCATATA CAAAATAAAT CAGGAAAATG CACAAATTCA	1060
CAAATGTGAC ATTCTTAAAG CAAAGAACCA CATTAAAACC <u>AATAAAGATG</u> ACTTCAAAAA	1120
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	1175

图1 鲤 PA28 β cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 1. Coding sequence and deduced amino acid sequence of the carp PSME2 cDNA

起始密码子和终止密码子用加粗的斜体字母表示,推导的氨基酸用单字母符号写在密码子的下面,polyA 加尾信号用下划线表明,3个半胱氨酸残基用粗体表明,内质网膜保留信号 KPSM 用双下划线表示

Initiation and termination codons are represented by black italic letters. The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence in a standard single-letter code. The underlined sequence, aataaa, indicates the putative polyadenylation signal. The three of cysteine residue is shown in bold letters. The endoplasmic reticulum (ER) retention signal KPSM is double underlined

的鲤外周血白细胞 cDNA 文库,克隆了编码鲤鱼蛋白酶体激活因子 PA28 β 亚单位的全长 cDNA,发现其编码的 244 个氨基酸与已报道的斑马鱼的蛋白酶体激活因子 PA28 β 的同源性达 95%。文中 PA28 β 系统发生分析表明,与斑马鱼的同源性最高,其次和石首鱼、比目鱼和河豚聚类较近,这

可能是鲤和斑马鱼同属淡水鱼而石首鱼、比目鱼和河豚属于海水鱼的原因了;而与牛、人、猪和狗聚类较远,最远的是非洲蟾蜍,其同源性只有 55%,说明蛋白酶体激活因子 PA28 β 淡水鱼类的进化比海水鱼类的进化快,哺乳动物进化最慢。在分子进化过程中 PA28 α 和 PA28 β 发生了分支

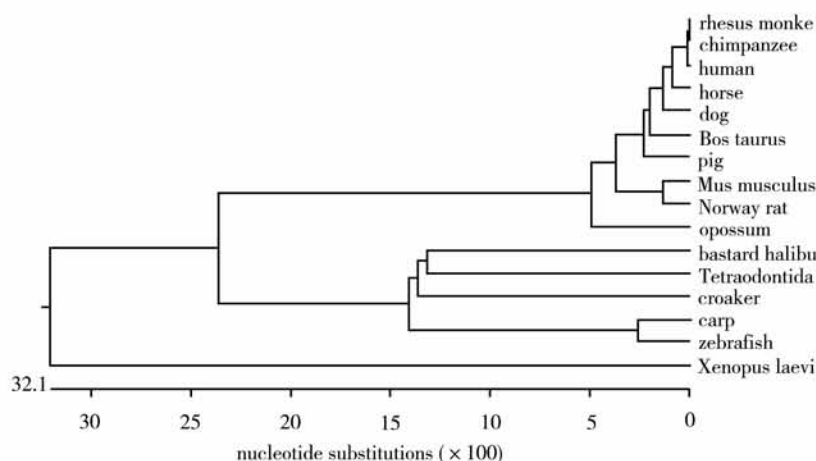
图 2 不同物种 PA28 β 蛋白序列的系统发生树

Fig. 2 A phylogenetic tree of the PA28 β gene family based on the full length protein sequences of the diverse species

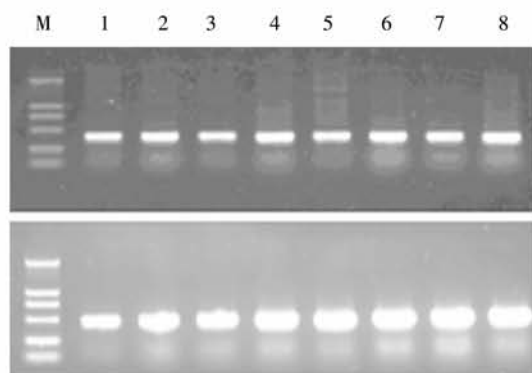
图 3 鲤外周血白细胞 β -actin 及 PA28 β 的 RT-PCR 结果

Fig. 3 The picture result of the PA28 β and β -actin RT-PCR on peripheral blood

M. DL2000 DNA Marker 1. N4h;2. PHA4h;3. N12h;4. PHA12h;5. N4h;6. ConA 4h;7. N 24h;8. ConA24h(N 为对照, h 为小时)

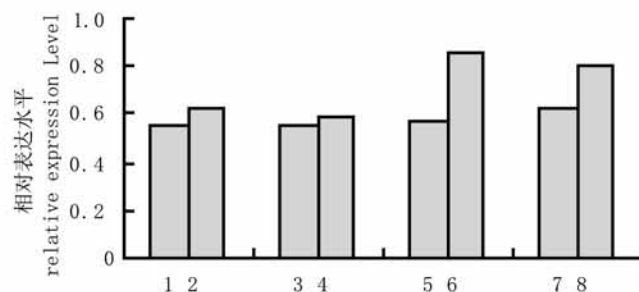
图 4 鲤外周血白细胞经过 PHA 和 ConA 刺激前后的 PA28 β mRNA 表达的图像分析结果

Fig. 4 The picture result of the PA28 β of the differential expression of mRNA on peripheral blood leukocyte stimulated by mitogen

1. N 4 h;2. PHA 4 h;3. N 12 h;4. PHA 12 h;5. N 4 h;6. ConA 4 h;7. N 24 h;8. ConA 24 h (N 为对照, h 为小时)

(PA28 β 进化距离较远), 而小鼠系统发生分析表明 PSME1 基因和 MHC 基因最初都是在软骨鱼中检测到的, 而在软骨鱼中并没有检测到 PSME2 基因, 据 Murray 等^[18] 报道 PSME2 基因已在属于硬骨鱼类的斑马鱼中分离得到, 可以推测 PSME1 基因可能在软骨鱼类向硬骨鱼类进化的过程中通过横向复制而产生了 PSME2 基因。另外, 在克隆到的鲤鱼 PA28 β 亚基中存在着和别的 PA28 β 有着高度同源性的脯氨酸富积区 (Region A) 和蛋白酶 C 识别位点 (Region D), 在 PA28 α 亚基中也发现了它们的同源序列。脯氨酸富积区

的功能到现在为止还没有被发现^[14], 而蛋白酶 C 识别位点可能与 PA28 蛋白的磷酸化有关, PA28 蛋白的磷酸化已被证明是蛋白酶体激活所必需的^[19]。到目前为止, 从硬骨鱼类和哺乳动物中克隆到的 PA28 β 亚基都有着高度的序列同源性和保守的功能区, 这表明它们在 I 型抗原处理和递呈中有着相似的作用。

丝裂原是一类非特异性的淋巴细胞激活剂, PHA (植物凝集素) 和 ConA (刀豆素) 为 T 细胞丝裂原, LPS (细菌脂多糖) 为 B 细胞丝裂原, 这些刺激物可以促进体外培养的哺乳动物淋巴细胞

DNA 和蛋白质合成增加,出现一系列增生性变化使淋巴细胞增生为淋巴母细胞^[20]。这些非特异性的淋巴细胞转化与特异性抗原所致的转化过程是相同的,据此可间接的研究淋巴细胞对特异性抗原的应答增殖反应。试验还初步研究了有丝分裂原刺激鲤外周血白细胞后,蛋白酶体激活因子 PA28 β 亚单位 mRNA 的表达量变化,结果表明经有丝分裂原刺激的比不刺激的鲤外周血白细胞 PA28 β 亚单位 mRNA 的表达量升高,但不随着时间的延长而持续升高,在刺激的和正常的白细胞中 PA28 β 表达趋势都成抛物线图,不同的是经刺激的比正常的 PA28 β 的表达量提前达到峰值,达到峰值后 PA28 β 亚单位 mRNA 的表达量就开始下降,可能是由于产生了免疫耐受。同时发现 ConA 刺激比 PHA 刺激更容易增强 PA28 β 基因的转录,说明 PA28 β 基因的转录对不同诱导物的敏感度不同,ConA 比 PHA 更容易诱导。有丝分裂原的刺激可以模拟抗原使鱼类白细胞激活,产生相应的抗体和细胞因子,诱导 PA28 β 基因的转录,使 PA28 β 的表达量增高,说明 PA28 β 在鱼类抗原递呈和免疫应答的早期发挥着重要作用。本研究为进一步研究 PA28 β 在体内的表达方式、功能特点与调控机理以及在抗原递呈和免疫应答的作用机制奠定了基础,从理论上为水产养殖鱼类新型基因工程疫苗的开发提供参考。

参考文献:

- [1] Plouffe D A, Hanington P C, Walsh J G, *et al*. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals [J]. *Xenotransplantation*, 2005, 12 (4):266 - 277.
- [2] Secombes C J, Bird S, Zou J. Adaptive immunity in teleosts; cellular immunity [J]. *Dev Biol (Basel)*, 2005, 121:25 - 32.
- [3] Ostrowska H, Ostrowska J K, Worowski K, *et al*. Human platelet 24S proteasome: Inhibition of its chymotrypsin-like activity and identification of the proteasome activator PA28 [R]. A preliminary Report Platelets, 2003, 14: 151 - 157.
- [4] Rock K L, York I A, Saric T, *et al*. Protein degradation and the generation of MHC class I presented peptides [J]. *Adv Immunol*, 2002, 80: 1 - 70.
- [5] Ma C P, Slaughter C A, Demartino G N. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain) [J]. *Biol Chem*, 1992, 267:10515 - 10523.
- [6] Niedermann G. Immunological functions of the proteasome [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 268:91 - 136.
- [7] Groett rup M, Soza A, Eggers M, *et al*. A role for the proteasome regulator PA28 alpha in antigen presentation [J]. *Nature*, 1996, 381 (6 578): 166 - 168.
- [8] Sijts A, Sun Y, Janek K, *et al*. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing [J]. *Mol Immunol*, 2002, 39 (324): 165 - 169.
- [9] Kloetzel P M, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-2mediated antigen presentation [J]. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16 (1):76 - 81.
- [10] Dick T P, Ruppert T, Groettrup M, *et al*. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands[J]. *Cell*, 1996, 86:253 - 262.
- [11] Sijts A, Sun Y, Janek K, *et al*. The role of proteasome activator PA28 in antigen processing [J]. *Mol Immunol*, 2002, 39:165 - 172.
- [12] Rechsteiner M, Hill C P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors[J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15: 27 - 33.
- [13] Murray, Stltmann, Klein. Identification and linkage of the proteasome activator complex PA28 subunit genes in zebrafish[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2000, 51:571 - 576.
- [14] Kim D H, Lee S M, Hong B Y, *et al*. Cloning and sequence analysis of cDNA for the proteasome activator PA28 - β subunit of flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Mol Immunol*, 2003, 40: 611 - 616.
- [15] 卢强, 丰培金, 李莲瑞, 等. 正常鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建 [J]. *水产学报*, 2004, 28 (5): 585 - 588.
- [16] 卢强, 丰培金, 李莲瑞, 等. 有丝分裂原刺激的鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建 [J]. *中国兽医学报*, 2004, 24 (6): 568 - 570.
- [17] 丰培金. 鲤鱼白细胞 cDNA 文库的构建及免疫相关基因的克隆 [D]. 长春: 解放军军需大学, 2003. 61 - 67.

- [18] Murray B W, Sultmann H, Klein J. Identification and linkage of the proteasome activator complex PA28 subunit genes in zebrafish [J]. Scand J Immunol, 2000, 51, 571 - 576.
- [19] Li N, Lerea K M, Etlinger J D. Phosphorylation of the proteasome activator PA28 is required for proteasome activation. Biochem[J]. Biophys, 1996, 225: 855 - 860.
- [20] 何 维. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:60.

Cloning, identification and differential expression analysis of the proteasome activator subunit 2 full-length cDNA from carp (*Cyprinus carpio* L.)

FU Bao-zhong, LU Qiang, TAN Ye-ping, SUN Xiao-yi, LI Wei,
LIU Xiang-ye, DENG Hong-kuan

(Ministry of Education Key Laboratory for Zoonosis, Institute of Zoonosis, Jilin University,
Changchun 130062, China)

Abstract: In order to research the effectiveness of proteasome activator subunit 2 in carp's immunologic response, we cloned the cDNA of proteasome activator subunit 2 from peripheral blood leukocyte of carp. Moreover, we also researched the expression information of PA28 β in carp's peripheral blood leukocyte. The cDNA library of peripheral blood leucocytes which were isolated from carp (*Cyprinus carpio* L) and stimulated with mitogen PHA and ConA was screened by a probe labelled with DIG. Using DD-RT-PCR, the probe considered as the differential expression fragment which is partial sequence of proteasome activator subunit 2 was obtained. After two rounds of screening from 8 thousand recombinant phages, the positive clone was obtained. Sequence analysis indicates that it contains an insert sequence of 1 175 bp in length with full ORF encoding 244 amino acids of proteasome activator subunit 2, including PA28 β and part of α subunit motifs. The protein sequence showed significant homologues (95% identity) with zebrafish proteasome activator PA28 β , which has 244 amino acids. Multiple sequence alignment with other species showed that carp PA28 β sequence has the highest homologue with that of zebrafish, and has the lowest homologue with *Xenopus tropicalis*, which is 55 % identity. Using the total RNA extracted from peripheral blood leukocyte which was isolated, cultured and stimulated with mitogen PHA and ConA, this paper did semi-quantitative RT-PCR. It displays that the quantity of PA28 β in leucocyte stimulated with mitogen PHA and ConA is obviously larger than that in normal carp leucocytes in the prophase (4 h). However, it is not always much more than that of the normal leucocyte at the same time with the time going, the expression of PA28 β mRNA in carp leucocytes stimulated by PHA for 4 h is higher than that stimulated for 12 h, and the expression of PA28 β mRNA stimulated by ConA for 4 h is higher than that for 24 h. This is the first report for full length cDNA sequence of the PA28 β from carp. The GenBank accession number for the sequence is EU255233.

Key words: *Cyprinus carpio* L; PA28 β ; cDNA cloning; identification; differential expression analysis