

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01179

鲤免疫应答相关基因的克隆与鉴定

丰培金¹, 王文东², 李伟², 卢强²

1. 临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276005;

2. 吉林大学 人兽共患病研究所, 吉林 长春 130062

摘要: 为研究鲤(*Cyprinus carpio* L.)白细胞免疫应答相关的分子机理, 以体外培养的鲤外周血白细胞为实验材料, 用荧光标记的 mRNA 差异显示(FluoroDDRT-PCR)技术, 研究丝裂原(50 μ g/mL LPS、50 μ g/mL PHA 和 50 μ g/mL ConA)在刺激白细胞 4、12 和 24 h 内诱导白细胞免疫应答相关基因的 mRNA 表达差异, 共获得 92 个差异片段, 其中 87 个片段有再扩增产物, 再扩增率为 94.6%; 将差异片段克隆, 经 PCR 鉴定, 获得 81 个阳性克隆, 鉴定率为 93.1%; 差异片段序列同源性功能分析结果表明, 本研究共获得 3 个免疫应答相关的 cDNA 克隆, 它们分别编码鲤的蛋白酶体激活因子 PA28 α 亚基、翻译延伸因子(EF-1 α)和基质金属蛋白酶 13(Mmp13)部分序列, 为进一步研究这些差异表达基因在鱼类免疫中的作用机制奠定了基础。

关键词: 荧光 mRNA 差异显示; 鲤; 白细胞; 免疫应答相关基因

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1179-10

近年来世界水产养殖业逐步向集约化、产业化方向发展, 大规模、高密度养殖和水环境污染造成的水产养殖病害日趋严重, 与鱼病紧密相关的鱼类免疫机制的研究和环境因素对鱼类免疫应答影响的研究已成为研究热点。

目前, 鱼类分子免疫学的研究获得重要进展, 如克隆了鲤(*Cyprinus carpio* L.)补体 C3 和 C4 基因并进行了蛋白分析^[1-2], 已对罗非鱼热休克蛋白 HSP70^[3]、鲤的金属硫因基因^[4]cDNA 进行了克隆和表达研究, 此外, 还克隆了干扰素诱导产生的黏病毒抗性蛋白基因^[5], 其 mRNA 表达水平的高低和基因组限制性酶切图谱多样性(RFLP)结果被用于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)对传染性造血器官坏死病毒(IHNV)的敏感性研究^[6]。而分析病原微生物攻击鱼体后, 免疫应答相关分子的表达情况成为目前研究的热点^[7-8]。不论是细菌还是病毒, 甚至寄生虫的感染, 在参与鱼类早期免疫应

答方面, 炎症相关细胞因子都起着重要的作用。目前已克隆了鱼类肿瘤坏死因子 α ^[9-10]、白细胞介素 1 β ^[11]等炎症相关细胞因子基因, 并进行了表达分析。2001 年韩国学者 Lee 等^[12]报道克隆了鳊(*Paralichthys olivaceous*)的 IL8 基因, 2003 年日本学者又报道克隆了角鲨(*Triakis scyllia*)的 IL8 基因^[13], 中国学者在 2005 年分析了斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的 IL8 cDNA 序列, 研究了感染爱德华氏菌后斑点叉尾鲷 IL8 的表达情况^[14]; 对于虹鳟浸泡感染杀鲑气单胞菌后肠道中炎症相关细胞因子的表达^[15]也有研究, 虹鳟感染多子小瓜虫后炎症相关细胞因子的表达也有报道^[16], Seppola 等^[17]进行了大西洋鳕(*Gadus morrhua*) IL-1 β 、IL-8 和 IL-10 的特性和表达分析研究, 此类细胞因子在鱼类免疫应答中占有重要的地位。

鱼类外周血白细胞同高等脊椎动物血液中的白细胞一样, 是机体体液免疫和细胞免疫的重要

收稿日期: 2010-08-06; 修订日期: 2010-10-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972277).

作者简介: 丰培金(1968-), 男, 博士, 副教授, 从事鱼类免疫学研究. E-mail: fengpeijin@yahoo.com.cn

通信作者: 卢强, 教授. Tel: 0431-87836717; E-mail: qlu@jlu.edu.cn

组成部分^[18-19], 这些免疫细胞接受适当异种抗原或丝裂原刺激, 能特异性地识别抗原决定簇, 发生活化、增殖和分化, 产生效应分子(抗体、细胞因子等)和效应细胞(细胞毒性 T 细胞等)。但迄今为止, 人们对鱼类免疫应答调控的分子机理还不甚清楚, 因此利用分子生物学技术克隆免疫应答相关基因, 进而研究这些基因表达产物的生物学特性与信号传导途径, 对深入理解免疫应答调控机制具有重要意义。

mRNA 差异显示技术是近年来迅速发展起来的快速有效地克隆差异表达基因的新方法^[20]。差异显示反转录 PCR(DDRT-PCR)技术具有快速、简便、灵敏、效率高、所需 RNA 量少、重复性好和同时检测多个时空特异性表达基因的特点, 它为研究鱼类外周血白细胞在丝裂原刺激下, 基因差异表达及基因克隆提供了切实可行的技术路线。

1 材料与方法

1.1 鲤外周血白细胞的分离

选择健康、体表鳞片完整且无脱落、体质量 500~750 g 的鲤, 在水温 25℃ 的水族箱内充气饲养, 水体积为 200 L, 按正常饲养条件进行饲喂。观察 7 d, 证实无病后, 从尾动脉采取外周血, 加肝素抗凝, 用等体积的鲤白细胞 RPMI1640 培养液(cRPMI1640)^[21]进行分离和体外培养, 鲤外周血白细胞的分离操作见参考文献[21-22]。

1.2 外周血白细胞的分组与体外培养

将分离的鲤外周血白细胞用 cRPMI 1640 培养液重悬, 密度调整为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$, 分成 8 个组, 置于细胞培养瓶中进行实验, 分组如下: 对照组 I、III、V 和 VII 分别为正常白细胞, 不加任何刺激物体外分别培养 4、12、4 和 24 h; 实验组 II 和 IV 用 LPS(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+PHA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别刺激 4 h 和 12 h; 实验组 VI 和 VIII 用 ConA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别刺激 4 h 和 24 h。将各组的细胞培养瓶置于 25℃、5%的 CO_2 培养箱内, 按规定的时间培养, 进行细胞计数和活细胞百分率计算。

1.3 外周血白细胞总 RNA 提取

采用试剂盒提取 1.2 中 I-VIII 组中的鲤外周

血白细胞总 RNA, 所用白细胞数量为 $1 \times 10^8/\text{组}$, 具体方法按 TRIZOL Reagent 说明书操作。用无 RNase 的 DNase I 处理总 RNA, 以消化基因组 DNA。用 1%琼脂糖凝胶检测 RNA 的质量, 分光光度计测量 RNA 浓度。

1.4 样品总 RNA 的逆转录反应

采用 HIEROGLYPHTM mRNA Profile System Kit, 用于反转录的为 $\text{T}_7(\text{dT}_{12})$ 锚定引物(Anchored Primers, AP), 即 $\text{T}_{12}\text{MN}(\text{M}=\text{A/C/G}, \text{N}=\text{A/G/C/T})$, 共 12 条引物, 其序列见试剂盒说明书。

取 8 个 200 μL PCR 反应管, 在每个反应管中加入 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的总 RNA 1 μL , 2 $\mu\text{mol/L}$ $\text{T}_7(\text{dT}_{12})$ AP 2 μL , DEPC 水 8.7 μL 。小心混匀, 在 PCR 仪上 72℃ 保温 5 min, 冰浴 5 min, 离心, 将管内液体收集至管底。在冰上依次加入以下试剂: 5×SuperScript II RT Buffer 4.0 μL , 250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP (1:1: 1:1) 2.0 μL , 0.1 mol/L DTT 2.0 μL , SuperScript II RT 酶 (200 U/ SuperScript II RT) 0.3 U。反应条件: 25℃ 5 min, 42℃ 10 min, 50℃ 50 min, 70℃ 15 min; 反应完成后, 从每个反应管取出 2 μL 做模板, 进行 PCR 扩增。

1.5 荧光 DDRT-PCR 反应

采用 Fluoro DDRT-PCR Kit, 以 $\text{M}_{13}\text{r-ARP}$ 为 5'端随机引物, 以 $\text{TMR-T}_7(\text{dT}_{12})\text{AP}$ 为 3'端锚定引物[荧光标记引物, 序列同反转录 $\text{T}_7(\text{dT}_{12})\text{AP}$ 引物]。

反应体系 10.0 μL : ddH₂O 0.7 μL , 10×PCR buffer II (with out MgCl_2) 1.0 μL , MgCl_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.75 μL , dNTP (250 $\mu\text{mol/L}$) 2.0 μL , TMP- T_7 (dT_{12}) AP (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.7 μL , ARP (2 $\mu\text{mol/L}$) 1.75 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.1 μL , RT-mix 3.0 μL 。反应条件: 95℃, 2 min; 94℃ 15 s, 50℃ 30 s, 70℃ 2 min, 4 个循环; 94℃ 15s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 25 个循环; 72℃, 7 min; 4℃ 保温。

1.6 荧光 DDRT-PCR 产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、荧光扫描及其分离

采用 Genomyx LRS 荧光差异显示分析系统(Beckman, 含 Genomyx LR 电泳仪, 33 cm×61cm 凝胶板, Genomyx SC 扫描系统, 切胶工作台及定位刻度仪), 按照操作说明进行。电泳条件: 5.6% 的变性 HR-1000 胶在电压 3 000 V、功率 100 W 和 55℃ 电泳 4.5 h。将分离的胶溶于 30 μL TE(pH

8.0)中, 37°C孵育 3 h, 备用。

1.7 差异条带再扩增

以上述回收差异条带溶液为模板, 利用通用引物 T₇ 启动子 22-mer(5'-GTAATACGACTCACT ATAGGGC-3')和反 M₁₃(-48)24-mer(5'-AGCGGATA ACAATTTTCACACAGGA-3')进行再扩增反应, 反应体系 40 μL: ddH₂O 18.5 μL, 10×PCR 缓冲液 II (含 MgCl₂) 4.0 μL, dNTP (250 μmol/L) 6.0 μL, T₇ (10 pmol/μL) 3.0 μL, M_{13r} (10 pmol/μL) 3.0 μL, Taq DNA 聚合酶 (2 U/μL) 1.0 μL, 模板 4.5 μL。反应条件同 1.5。取 PCR 反应产物 5 μL, 1.0%琼脂糖电泳观察扩增结果。

1.8 差异显示片段的纯化与克隆

采用 Vitagene 公司提供的 DNA 清洁试剂盒进行差异条带 PCR 扩增产物纯化操作, 纯化后用 pMD 18-T 载体进行连接反应, 取连接产物 10 μL 加入到 100 μL 的 DH5α感受态细胞中, 42°C热激活 90 s, 涂布于 LB 琼脂平板上(含氨苄青霉素 50 μg/mL), 于 37°C培养箱中倒置培养 12~16 h, 观察菌落生长情况。

1.9 重组质粒的 PCR 鉴定

将单个白色菌落接种至相应编号、含 5 mL LB 液体培养基(含氨苄青霉素 50 μg/mL)的试管中, 于 37°C剧烈振荡培养过夜。采用 T₇ 和 M_{13r} 引物鉴定阳性克隆, PCR 反应体系(10 μL)如下: 10×PCR 缓冲液 1.0 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL, T₇ (10 pmol/μL) 0.7 μL, M_{13r} (10 pmol/μL) 0.7 μL, Taq DNA 聚合酶(2 U/μL)0.3 μL, 菌液 0.5 μL, ddH₂O 4.8 μL。反应参数为: 95°C 2 min; 92°C 15 s, 50°C 30 s, 72°C 2 min, 5 个循环; 92°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 2 min, 27 个循环; 72°C 10 min; 4°C保存备用。

1.10 阳性克隆片段的核苷酸序列测定及同源性分析

将鉴定后的阳性重组质粒测序, 采用生物信息学软件 BLAST、DNAtools5.1 进行序列比对和同源性比较。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 完整性

紫外分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2,

表明各组所提取的 RNA 质量较好。1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 可以观察到典型的 28S、18S 和 5S 条带, 说明所提取的 RNA 完整性良好, 可以用于进一步的差异显示分析, 如图 1 所示。

2.2 差异片段的获得

以 12 条锚定引物 T₇(dT₁₂)-AP, 即 T₁₂MN(M=A/C/G, N=A/G/C/T)和 10 条随机引物 M_{13r}-ARP, 对上述 2 个样品 RNA 进行 120 种引物组合的差异显示分析, 共分离出 92 个差异片段, 部分差异显示电泳图谱如图 2 所示。

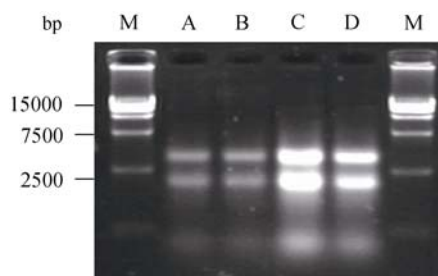


图1 总RNA电泳结果

A和C为刺激的白细胞总RNA; B和D为正常的白细胞总RNA; M: DL15000分子量标准。

Fig 1 Result of total RNA electrophoresis
A, C: total RNA of stimulated leucocytes; B, D: total RNA of normal leucocytes; M: DL15000 marker.

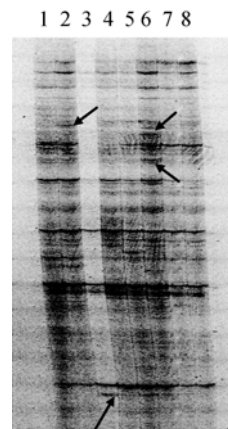


图2 荧光 mRNA 差异显示电泳结果

1、3、5、7: 对照组白细胞总 RNA; 2、4、6、8: 受刺激白细胞总 RNA. 箭头表示差异条带。

Fig. 2 Results of fluorescent mRNA differential display electrophoresis

1, 3, 5 and 7 indicate total RNA isolated from control leucocytes; 2, 4, 6 and 8 indicate total RNA isolated from stimulated leucocytes. Arrows show differential display fragments.

2.3 差异条带的再扩增结果

将获得的 92 个差异片段进行 PCR 再扩增, 发现其中 87 个片段有再扩增产物, 再扩增率为 94.6%。部分差异条带的再扩增图谱如图 3 所示。

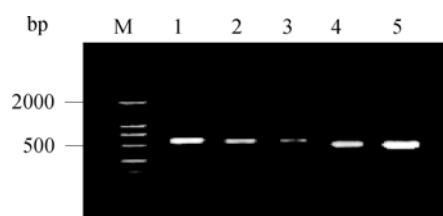


图 3 部分差异片段再扩增产物的电泳图

M: DL2000 分子量标准; 1~5: 差异片段再扩增产物。

Fig. 3 Electrophoregram of the second PCR amplification products of partial differential fragments

M: DL2000 marker; 1~5: The second PCR amplification products of differential display fragments.

将 87 个再扩增片段经纯化后, 与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 发现有 81 个阳性克隆得到初步鉴定, 鉴定率为 93.1%, 鉴定图谱如图 4 所示。

2.4 差异片段测序及生物信息学分析结果

将 81 个阳性差异片段进行测序, 经 BLAST、DNAtools5.1 软件包分析后, 合并同源片段, 结合差异显示电泳图谱, 获得 3 个免疫应答相关基因的 cDNA 序列片段。经同源搜索(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 结合 ScanProsite Tool(<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>)分析蛋白保守结构域, 结果如下:

(1)T37 长度为 586 bp, 其 4~562 nt 与鲤 EF1- α mRNA (gb|AF485331.1|)1162~1752 nt 核苷酸

序列同源性为 93%; 其推测蛋白 1~94 氨基酸序列与鲤 EF1- α (gb|AAO49408.1|AF485331_1) 369~462 氨基酸序列有 97%的同源性, 在 1~75 氨基酸区域存在 EF1_alpha_III 保守域, 因此可推断, T37 克隆为编码鲤 EF1- α 的部分序列。T37 核苷酸序列及推测的氨基酸序列如图 5 所示。

(2)C15 长度为 568 bp, 1~568 nt 与鲤蛋白酶体激活因子亚基(proteasome activator PA28 subunit, Psme)mRNA(gb|DQ453126.1|)的 524~1091 nt 有 98%同源性, 其推断的氨基酸序列在 1~127 氨基酸区域同鲤 Psme1(gb|ABE60902.1|ABK41199.1|)氨基酸序列的 123~249 区域有 100%的同源性, 在 1~127 区域存在 PA28_BETA 保守性结构域。同源性分析可知, C15 为鲤蛋白酶体激活因子 α 亚基的部分编码序列, 其核苷酸序列及推断的氨基酸序列如图 6 所示。

(3)D85 序列长 603 bp, 其 2~603 nt 与斑马鱼基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase, Mmp13) mRNA(gb|BC049472.1|)的 1036~1608 nt 有 73%的同源性, 其推断的氨基酸序列在 5~116 氨基酸区域与斑马鱼 Mmp13(gb|AAQ07962.1|)的 363~474 氨基酸序列区域有 72%的同源性, 在 6~116 氨基酸区域均存在类血红素蛋白基序(hemopexin-like repeats)。推断 D85 为鲤 Mmp13 的编码序列, 其核苷酸序列及推测的氨基酸序列如图 7 所示。

3 讨论

3.1 mRNA 差异显示技术

DDRT-PCR 已被广泛应用于生物学和医学领

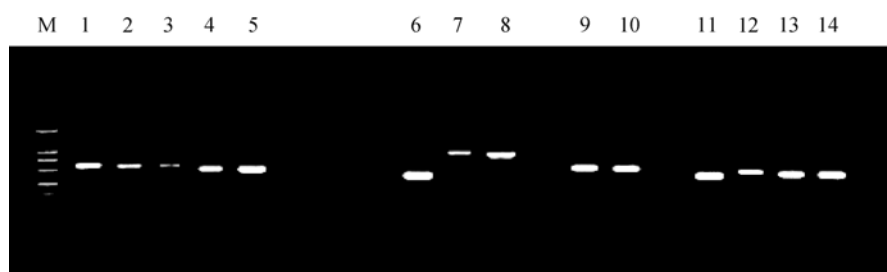


图 4 重组质粒的 PCR 鉴定

M: DL2000 分子量标准; 1~14: 重组质粒。

Fig.4 PCR identification of recombinant plasmids containing cDNA inserts

M: DL2000 marker; 1~14: recombinant plasmids.

1	TTC	GCC	TGC	AAA	TTT	TCT	GAG	CTC	AAG	GAG	AAG	ATC	GAC	CGT	CGT	TCT	GGC	AAG	AAG	CTT	GAG	63
1		A	C	K	F	S	E	L	K	E	K	I	D	R	R	S	G	K	K	L	E	20
64		GGC	AAC	CCC	AAG	GCT	CTC	AAA	TCT	GGA	GAT	GCT	GCC	ATT	GTT	GAG	ATG	ATC	CCT	GGC	AAG	123
21		G	N	P	K	A	L	K	S	G	D	A	A	I	V	E	M	I	P	G	K	40
124		CCC	ATG	TGT	GTG	GAG	AGC	TTC	TCT	ACC	TAC	CCC	CCT	CTT	GGT	CGC	TTT	GCT	GTG	CGT	GAT	183
41		P	M	C	V	E	S	F	S	T	Y	P	P	L	G	R	F	A	V	R	D	60
184		ATG	AGG	CAG	ACC	GTT	GCT	GTT	GGT	GTC	ATC	AAG	AGC	GTT	GAG	AAG	AAA	GTT	GGT	GGT	TCT	243
61		M	R	Q	T	V	A	V	G	V	I	K	S	V	E	K	K	V	G	G	S	80
244		GGC	AAG	GTC	ACA	AAA	TCT	GCA	CAG	AAG	GCT	GCC	AAG	ACC	AAA	TGA	ATT	TCC	CTT	CAA	GCT	303
81		G	K	V	T	K	S	A	Q	K	A	A	K	T	K	*						94
304		GTT	CCA	AAG	GTT	GTG	GTA	TGC	TCT	TCC	CAA	CCT	CCT	GGA	ATT	TCT	CTA	AAC	CTG	GGC	ACT	363
364		CTA	CTT	AAG	GAC	TGG	CTT	ATG	CTG	ATT	AAA	ACC	CAT	CGG	AAA	AGT	TTT	CGC	AGG	AAA	GGA	423
424		AAC	CAA	CTT	GGA	TTT	AAG	TGT	GGC	TTC	ATT	TGA	CTG	ATA	GTG	CCT	CTT	TCA	GTT	GTT	AAA	483
484		TTT	GTT	GAT	GGT	TTA	GAA	CTG	CAC	CTG	ATG	CCA	CAG	TAA	AAT	TTC	GAA	AGA	AGC	TGC	TGA	543
544		ATA	AGA	AAC	TAA	TAA	AGG	TTT	TGG	AAA	TTG	AAA	AAA	AAA	AAA	A						586

图 5 *T37* 基因片段的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列
方框表示 poly(A)加尾信号.

Fig.5 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *T37* cDNA
Box indicates the putative signal of poly (A) tail.

1	TG	AAG	GAG	TGT	CTT	AAC	ACG	GTG	TCG	ATG	TGG	ATA	CAG	CTA	CAG	ATT	CCC	AGA	ATT	GAA	GAT	62
1	K	E	C	L	N	T	V	S	M	W	I	Q	L	Q	I	P	R	I	E	D		20
63	GGG	AAC	AAC	TTT	GGA	GTT	TCT	GTA	CAG	GAA	AAA	GTT	TTT	GAA	CTG	CTT	ACC	AAC	ACC	CGC		122
21	G	N	N	F	G	V	S	V	Q	E	K	V	F	E	L	L	T	N	T	R		40
123	ACC	AAG	ATC	GAG	GGA	TTC	CAG	ACA	CAG	ATT	TCC	AAG	TAC	TAC	AGT	GAG	AGA	GGA	GAT	GCT		182
41	T	K	I	E	G	F	Q	T	Q	I	S	K	Y	Y	S	E	R	G	D	A		60
183	GTA	GCC	AAG	GCT	TCC	AAA	CAA	CCA	CAC	GTG	GGA	GAT	TTC	AGA	CAG	CTT	GTC	CAT	GAA	CTG		242
61	V	A	K	A	S	K	Q	P	H	V	G	D	F	R	Q	L	V	H	E	L		80
243	GAT	CAG	CAC	CAG	TAC	TGT	GAG	TTA	CGC	ATC	ATA	GTC	CTG	GAG	ATT	CGC	AAC	ACT	TAT	GCT		302
81	D	Q	H	Q	Y	C	E	L	R	I	I	V	L	E	I	R	N	T	Y	A		100
303	GTG	CTG	TAT	GAC	GTC	ATC	ATC	AAG	AAT	TGT	GAC	AAG	ATT	AAG	AAG	CCC	AGA	GGA	GAC	TTA		362
101	V	L	Y	D	V	I	I	K	N	C	D	K	I	K	K	P	R	G	D	L		120
363	TCT	TCA	AAA	GCA	CTT	ATC	TAC	TGA	GTG	CCG	CAA	CCG	ATC	TGC	ACT	GAC	AAG	ACA	CAC	AAA		422
121	S	S	K	A	L	I	Y	*														127
423	CAC	ACA	TTT	GCT	GAA	AAG	TAA	AAA	CAT	GTC	ATA	TTG	CGT	TTC	ACA	TCC	ACA	GTG	CAT	TGA		482
483	CTT	GAA	CTT	CAA	TTA	CAT	CAA	CAA	AAC	CTC	CTG	TAA	TAC	AAT	TTT	TAC	TCA	ATA	AAA	ACT		542
543	TTT	TCT	AAA	TGC	GAA	AAA	AAA	AAA	AA													568

图 6 *C15* 基因片段的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列
方框表示 poly(A)加尾信号.

Fig.6 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *C15* cDNA
Box indicates the putative signal of poly (A) tail.

域。然而, 该技术也存在着一些缺陷, 主要表现为: cDNA 产物的质量较低, 在序列胶中往往呈不清晰状态^[23]; 所得 cDNA 片段通常小于 500 bp, 往往是 3'端的非翻译(编码)序列; 所得差异片段的假阳性高, 可高达 85%^[24]。

荧光标记的 mRNA 差异显示技术是 Ito 等^[25]于 1994 年首次报道的, 它主要是基于荧光素用于测序的原理, 在原有的 DDRT-PCR 技术基础上加以改进, 从而成为一种快速、安全、可靠、敏感并且能同时检测大量样本的 mRNA 差异显示方法^[26-27]。

1	GGG CTC TCT ATG GGC TAT GAA ATG GCA CAG GGA TAT CCC AAG AGT CTC AGC ATG TTC CGT	61
1	G L S M G Y E M A Q G Y P K S L S M F R	20
62	TTG CCA AGA AAA GGG CAG AAA GTC GAC GCA GTC CTC TAC GAT GAG ACC AGC TAC AAA ATC	121
21	L P R K G Q K V D A V L Y D E T S Y K I	40
122	CTG TTT TTC GTT AAC AAA CAG ATA TAT AGT TTC AAT GAG GAA CAA CGC AGA TTA GAG AAA	181
41	L F F V N K Q I Y S F N E E Q R R L E K	60
182	GGT TAT CCT AAA CCG GTG GAA GTC GTT TTC CCT GGA ATG AAA GGG AAG GTG ACC GCA GCC	241
61	G Y P K P V E V V F P G M K G K V T A A	80
242	TTC CAG TAT CAA GGT TTC AAC TAT CTC TTC AGT GGA TCA AAG ATG TTT GAG TTT GGC ACC	301
81	F Q Y Q G F N Y L F S G S K M F E F G T	100
302	TAC AAC AAG GTA CGC CGT GTT CTC AAC AAC AAT TAT TTC CTG CCC TGT TAG TCA AAG TTG	361
101	Y N K V R R V L N N N Y F L P C *	116
362	AGT TTT TCT TTA AAG CTC AGC AAA ATA CTG CCT GCA TGA AGG AGA ATT TGG CCT GTC AGT	421
422	ATT TGA AAG TAA ATT ATT AAG TAA TGT ATT AAT TGT CTA ACT TAT TTT ACA GTA AAG TAG	481
482	GCT GTT TAG TAT CCT TTA AAG TAT TAT GTG CAA CCC AAG AAC ATA AAA CAT GTC CTA	541
542	TGA TTG ATG CAA TTT CAA AAT AAA GAT TTA AAC AGT TTG ATG TAA AAA AAA AAA AAA	601
602	AA	603

图 7 *D85* 基因片段的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

方框表示 poly(A)加尾信号。

Fig. 7 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *D85* cDNA

Box indicates the putative signal of poly (A) tail.

荧光标记差异显示技术是通过对引物设计、PCR 条件、凝胶电泳条件以及标记物的改进来减少上述不足的。

3.2 鱼类的蛋白酶体及其激活因子

蛋白酶体(proteasome)是一种存在于细胞质和细胞核内的蛋白水解酶复合体,主要降解细胞内蛋白质,它对维持细胞正常的新陈代谢以及在 MHC I 类分子的表达和抗原递呈过程中均起重要作用^[28]。

细胞内蛋白的降解需要多个程序共同调节,包括细胞周期调节、信号转导、蛋白质量控制和细胞介导的免疫反应。大部分细胞内蛋白降解的过程是由蛋白酶体来完成的,蛋白酶体是种大分子、多亚基、自我划分、多酶触反应的复合物,主要由 1 个圆柱形的 20 S 蛋白酶体中心和 2 个 V 形的末端模块(PA700 或 PA28)组成,PA28 或 PA700 以相反方向连接在中央的 20 S 蛋白酶体的两端,形成 PA700-20S-PA700、PA28-20S- PA28、PA700-0S- PA28 等几种构型。这个结构就是 26 S 蛋白酶体。20 S 蛋白酶体构成 26S 蛋白酶体的催化活性

部分,而 PA700 具有调节其酶活性的作用^[29]。

PA28 有 2 种构型: 1 种由 PA28- α 和 PA28- β 亚基构成 PA28($\alpha\beta$)3 的复合体,另外 1 种是由 6 个 PA28- γ 亚基构成的复合体;PA28($\alpha\beta$)3 主要存在于细胞质中,其功能与产生适合 MHC I 提呈的多肽有关;PA28 作为蛋白酶体激活因子,也叫 11S 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 MHCI 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,从而完成一个免疫应答过程^[30-31]。

人们对鱼类 PA28 也进行了不同程度地研究,课题组以本实验获得的差异显示片段 *C15* 作为探针,通过筛选经有丝分裂原刺激的鲤外周血白细胞 cDNA 文库,克隆了编码 PA28 α 亚单位的全长 cDNA,其编码 249 个氨基酸,含有 PA28 的 α 和 β 亚单位功能结构域^[32]。Murray 等^[33]筛选斑马鱼 cDNA 文库,获得了编码 PA28- α 、PA28- β 和 PA28- γ 亚基的全长 cDNA 序列,即 PSME1、PSME2 和 PSME3;系统发生分析结果提示,这 3

种基因的祖先在四足动物和硬骨鱼发生趋异前就已存在, PA28- α 和 PA28- β 比 PA28- γ 进化快; PSME2 和 PSME3 的连锁距离小于 2.4 cM, 提示染色体复制事件创造出 IFN- γ 诱导的基因前体物, 该前体物是一种 PA28- γ 祖先类似物, 较早地参与 MHC-I 类分子的抗原多肽递呈途径。

3.3 鱼类的翻译延伸因子

真核生物的翻译延伸因子分别为 EF₁ 和 EF₂。EF₁ 又可分为 2 种, 即 EF-1 α 和 EF-1 $\beta\gamma$, EF-1 $\beta\gamma$ 是一个异源多肽复合物, 它由 1 条 EF-1 β 和 1 条 EF-1 γ 链组成。EF 参与 mRNA 翻译过程中的延伸步骤。翻译延伸因子 EF-1 α 是参与蛋白翻译延伸的重要蛋白质, 有 3 个结构域, 结构域 I 与 GTP 结合, 结构域 II 和 III 结合 tRNA。EF-1 α 在细胞内的含量仅次于肌动蛋白, 在不同的物种中它的基因及表达调控有高度保守性。EF-1 α 参与许多重要的细胞过程和疾病, 包括信号转导、翻译控制、凋亡、细胞骨架组成、病毒复制及癌基因转化等^[34]。

Nordnes 等^[35]从斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎 cDNA 文库获得了编码 EF-1 α 的全长 cDNA 克隆, 展示了基于已知的 EF-1 α 和 EF-Tu 蛋白序列的二级结构和 EF-1 α 环区保守的推断蛋白激酶 C 磷酸化位点, 并对真核生物 EF-1 α 的分子系统发生进行了研究。而 Gao 等^[36]则从斑马鱼噬菌体基因组文库分离到 EF-1 α 基因, 发现每个单倍体组合 1 个 EF-1 α 基因拷贝, 而未发现被加工的假基因; 发现在 1 个含 PstI/PvuII 的 277 bp 的片段上, 存在 1 个高活性的启动子区, 该片段开始于 tsp 上游的 240 bp 处, 在距启动子 1 kb 的下游或上游, 未发现转录增强或沉默活性。Tokumoto 等^[37]从金鱼 (*Carassius auratus*) 卵巢分离到编码 EF-1 α 的 cDNA 克隆, 其推断的氨基酸序列同其他物种的 EF-1 α 高度同源, 实验还发现其 1.7 kb 的 mRNA 广泛分布于不同组织中。Yin 等^[38]等运用差异筛选从 ConA 活化的鲤头肾白细胞 cDNA 文库获得编码 EF1- β 和 16S rRNA 的克隆。可见, 丝裂原刺激白细胞可导致 EF-1 α 和 EF-1 β 基因的表达, 从而使之参与 mRNA 翻译过程, 而 16S rRNA 也参与蛋白质的合成, 这些合成蛋白在白细胞分化、

增殖及信号转导等生理过程中起重要作用。

3.4 鱼类的基质金属蛋白酶

基质金属蛋白酶(MMPs)是一个大家族, 因其需要 Ca²⁺、Zn²⁺等金属离子作为辅助因子而得名, 其家族成员具有相似的结构, 一般由 5 个功能不同的结构域组成: (1)疏水信号肽序列; (2)前肽区, 主要作用是保持酶原的稳定, 当该区域被外源性酶切断后, MMPs 酶原被激活; (3)催化活性区, 有锌离子结合位点, 对酶催化作用的发挥至关重要; (4)富含脯氨酸的铰链区; (5)羧基末端区, 与酶的底物特异性有关。其中酶催化活性区和前肽区具有高度保守性。MMPs 广泛分布于脊椎动物组织, 形成至少由 4 个不同亚家族构成的大家族。目前 MMPs 家族已分离鉴别出 26 个成员, 编号分别为 Mmp1 ~ 26; Mmp-13 为胶原蛋白酶-3(collagenase-3), 它是胶原蛋白酶亚家族第 3 个成员。MMPs 几乎能降解细胞外基质中的各种蛋白成分, 破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障, 在肿瘤侵袭转移中起关键性作用, 被认为是该过程中主要的蛋白水解酶。

Cho 等^[39]从受伤鲇的皮肤黏膜上分离得到 Mmp-2, 其对损伤的表皮起前组织蛋白酶 D 转化酶(procathepsin D convertase)的作用, 它可诱导组织蛋白酶 D 活化, 使受伤鱼的表皮黏膜组蛋白 H2A 分解产生 1 个由 14 个氨基酸构成的抗菌肽 Parasin I。可见 MMPs 也参与了机体的免疫调节。Saito 等^[40]从虹鳟成纤维细胞 cDNA 文库获得一种编码 Mmp-13 的 cDNA 克隆, 它长 2.1 kb, 开放阅读框编码由 475 个氨基酸构成的蛋白, 该蛋白的催化区同人类 Mmp-13 相应部位具有 66%同源性, 其中的锌结合部位具有最高的同源性; 具有胶原酶亚家族含 3-氨基酸残基的特征(含 Tyr122, Asp233 and Gly235), 其重组蛋白具有分解明胶和 I 型胶原质的作用。Kimura 等^[41]从青鳉卵巢获得 MT5-Mmp 及其相关蛋白 MT5-Mmp-del 的 cDNA 克隆, MT5-Mmp 克隆编码 1 个由 546 个氨基酸构成的蛋白, 但 MT5-Mmp-del 克隆编码 431 个氨基酸构成的蛋白; 与哺乳动物的对应物相比较, 二者均缺乏信号肽和部分优势域序列, 但后

者还缺乏 stem/transmembrane/cytoplasmic 域; 这 2 种鱼的 MMPs 均表达于卵巢、睾丸、脑和肠; MT5-Mmp/白明胶酶 A 可能在鱼的产卵、受精中起作用。后来的研究也证实青鳉卵巢存在白明胶酶 A 和白明胶酶 B^[42]。Zhang 等^[43]从斑马鱼分离到 MT-Mmp2 种亚型即 MT-Mmp α 和 MT-Mmp β , MT-Mmp β 在脊椎动物 MT-Mmps 中的独特性体现在其连接区含一个 Arg-Glu-Asp 多重复序列基序, 实验结果提示斑马鱼 MT-Mmp 在胚胎发育过程中起作用。

参考文献:

- [1] Nakao M, Mutsuro J, Obo R, et al. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(3): 858–866.
- [2] Kuroda N, Naruse K, Shima A, et al. Molecular cloning and linkage analysis of complement C3 and C4 genes of the Japanese medaka fish [J]. *Immunogenetics*, 2000, 51(2): 117–128.
- [3] Molina A, Biemar F, Müller F, et al. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish [J]. *FEBS Lett*, 2000, 474(1): 5–10.
- [4] Ren H W, Itoh N, Kanekiyo M, et al. Two metallothioneins in the fresh-water fish, crucian carp (*Carassius auratus*): cDNA cloning and assignment of their expression isoforms [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(2): 145–148.
- [5] Lee J Y, Hirono I, Aoki T. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(4): 407–415.
- [6] Trobridge G D, LaPatra S E, Kim C H, et al. Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHNV [J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, 40(1): 1–7.
- [7] Lindenstrøm T, Secombes C J, Buchmann K. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 97(3-4): 137–148.
- [8] Tafalla C, Coll J, Secombes C J. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout after viral haemorrhagic septicemia virus infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(7): 615–626.
- [9] Jesus G C, Pablo P, Victoriano J M. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature [J]. *Immunogenetics*, 2002, 54(3): 200–207.
- [10] Savan R, Sakai M. Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio* L.): genomic and expression analysis [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17(1): 87–94.
- [11] Pleguezuelos O, Zou J, Cunningham C, et al. Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1beta gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunogenetics*, 2000, 51(12): 1002–1011.
- [12] Lee E Y, Park H H, Kim Y T, et al. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Gene*, 2001, 274(1-2): 237–243.
- [13] Inoue Y, Haruta C, Usui K, et al. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 14(3): 275–281.
- [14] Chen L, He C, Baoprasertkul P, et al. Analysis of a catfish gene resembling interleukin 8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(2): 135–142.
- [15] Singh J, Lindenstrøm T, Buchmann K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17(1): 75–86.
- [16] Mulder I E, Wadsworth S, Secombes C J. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(4): 747–759.
- [17] Seppola M, Larsen A N, Steiro K, et al. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(4): 887–897.
- [18] 李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 鱼类免疫学研究进展[J]. *动物学研究*, 1995, 16(1): 83–94.
- [19] 陈怀青, 陆承平. 从比较免疫学看鱼类的免疫特性[J]. *动物学杂志*, 1994, 29(4): 56–60.
- [20] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(5072): 967–971.
- [21] 丰培金, 卢强, 李莲瑞, 等. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(4): 369–371.
- [22] 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.
- [23] Shoham N G, Arad T, Rosin-Abersfeld R, et al. Differential display assay and analysis [J]. Biotechniques, 1996, 20(2): 182–184.
- [24] Zegzouti H, Marty C, Jones B, et al. Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages [J]. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15: 236–245.
- [25] Ito T, kito K, Adati N, et al. Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer [J]. FEBS Lett, 1994, 351(2): 231–234.
- [26] Jones S W, Cai D, Weislow O S, et al. Generation of multiple mRNA fingerprints using fluorescence-based differential display and an automated DNA sequencer [J]. Biotechniques, 1997, 22(3): 536–539.
- [27] Smith N R, Aldersley M, Li A, et al. Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer [J]. Biotechniques, 1997, 23(2): 274–276.
- [28] Bochtler M, Ditzel L, Groll M, et al. The proteasome [J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1999, 28: 295–317.
- [29] Tanaka K. Proteasome: structure and biology [J]. J Biochem, 1998, 123 (2): 195–204.
- [30] Niedermann G. Immunological functions of the proteasome [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2002, 268: 91–136.
- [31] Groettrup M, Soza A, Eggers M, et al. A role for the proteasome regulator PA28 alpha in antigen presentation [J]. Nature, 1996, 381(6578): 166–168.
- [32] 李莲瑞, 卢强, 付宝全, 等. 鲤鱼外周血白细胞蛋白酶体激活因子 PA28 全长 cDNA 的克隆与差异表达分析[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(5): 544–546.
- [33] 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(6): 571–576.
- [34] 周冰, 曹诚, 刘传暄. 翻译延伸因子 1A 的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 281–284.
- [35] Nordnes S, Krauss S, Johansen T. cDNA sequence of zebrafish (*Brachydanio rerio*) translation elongation factor-1 alpha: molecular phylogeny of eukaryotes based on elongation factor-1 alpha protein sequences [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1219(2): 529–532.
- [36] Gao D, Li Z, Murphy T, et al. Structure and transcription of the gene for translation elongation factor 1 subunit alpha of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1350(1): 1–5.
- [37] Tokumoto M, Nagahama Y, Tokumoto T. Molecular cloning of cDNA encoding polypeptide chain elongation factor 1alpha from goldfish (*Carassius auratus*) [J]. DNA Seq, 2001, 12(5-6): 419–424.
- [38] Yin Z, He J Y, Gong Z, et al. Identification of differentially expressed genes in Con A-activated carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes [J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 1999, 124(1): 41–50.
- [39] Cho J H, Park I Y, Kim M S, et al. Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa [J]. FEBS Lett, 2002, 531(3): 459–463.
- [40] Saito M, Sato K, Kunisaki N, et al. Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen [J]. Eur J Biochem, 2000, 267(23): 6943–6950.
- [41] Kimura A, Shinohara M, Ohkura R, et al. Expression and localization of transcripts of MT5-MMP and its related MMP in the ovary of the medaka fish *Oryzias latipes* [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1518(1-2): 115–123.
- [42] Matsui H, Ogiwara K, Ohkura R, et al. Expression of gelatinases A and B in the ovary of the medaka fish *Oryzias latipes* [J]. Eur J Biochem, 2000, 267(15): 4658–4668.
- [43] Zhang J, Bai S, Zhang X, et al. The expression of novel membrane-type matrix metalloproteinase isoforms is required for normal development of zebrafish embryos [J]. Matrix Biol, 2003, 22(3): 279–293.

Cloning and identification of immune response related genes in common carp, *Cyprinus carpio* L.

FENG Peijin¹, WANG Wendong², LI Wei¹, LU Qiang²

1. College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China;

2. Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: mRNA differential-display reverse-transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) is an effective and quick method to study gene different expression in the same cell under different physiological status and different stages of growth and development. In order to study immune response related genes in carp leucocytes, fluorescence DDRT-PCR was used to compare mRNA from leucocytes from peripheral blood of carp with LPA (50 µg/mL), ConA (50 µg/mL) and PHA (50 µg/mL) stimulation and non mitogens stimulation in different time such as 4h, 12h and 24h. The results as following, 92 different fragments were obtained altogether, of which the re-amplified fragments were found in 87 different cDNAs and the re-amplification rate was 94.6%. Cloning and PCR testing showed that 81 fragments were positive and the positive rate was 93.1%. Analysis with BLAST and DNATools software revealed 3 cDNA fragments were immune response related genes which encoded proteasome activator complex PA28α subunit, translation elongation factor-1α(EF-1α) and matrix metalloproteinase 13 (Mmp-13) of common carp. Bioinformatics analysis showed that the genes encoded by these different fragments were involved in various functions such as MHC class I antigen, signal transduction, translational control, apoptosis, degradation of the extracellular matrix. It is essential for further studying the mechanisms of these differentially expressed genes in fish.

Key words: fluorescence DDRT-PCR; *Cyprinus carpio* L.; leucocytes; immune response related genes

Corresponding author: LU Qiang. E-mail: qlu@jlu.edu.cn