

文章编号: 1000-0615(2007)04-0545-06

·研究简报·

鲤蛋白酶体激活因子 PA28 α 亚单位基因组 DNA 的克隆及序列分析

谭业平¹, 卢强¹, 孙晓义¹, 付保忠¹, 祝艳蕾¹, 付宝权²

(1. 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;

2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

关键词: 鲤; PA28 α ; 基因组 DNA 克隆; 序列分析

中图分类号: Q 785; S 917 文献标识码: A

Cloning and sequence analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) proteasome activator PA28 α subunit genomic DNA

TAN Ye-ping¹, LU Qiang¹, SUN Xiao-yi¹, FU Bao-zhong¹, ZHU Yan-lei¹, FU Bao-quan²

(1. Ministry of Education Key Laboratory for Zoonosis, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: PA28 α can activate the latent 20S proteasome together with PA28 β , playing an important role in the processing of MHC class I antigen. PMSE1 gene encoding this activator has been characterized and documented in mammals, whereas, few reported among piscine. In the present study, two pairs of primer were designed and synthesised according to the full-length cDNA sequence of proteasome activator PA28 α subunit which we had found in common carp. Using PCR two specific gene fragments of PA28 α subunit were amplified from total genomic DNA extracted from the spleen of common, PCR products cloned into pMD18-T vector. The recombinant plasmids were verified by sequencing. The PA28 α subunit gene (PSME1) of common carp had been successfully cloned. The sequence results were analysed with DNASTar, DNAMAN and BLAST software. Result indicated that carp PSME1 gene encompassed 3 602 nucleotides, 11 exons, 10 introns, which was very similar to the known PSME1 genes of other species with the same exon/intron arrangement. Three forms are shown at intron/exon boundaries of carp PSME1 gene, exon 5/intron 5 boundary belongs to class 1 (GAA/G), exon 8/intron 8 boundary belongs to class 2 (TCC/AA), the rest belong to class 0. The splice sites have been well conserved through evolution, and observe the regulation of GT-AG completely. A phylogenetic analysis using PA28 α and PA28 β protein sequences from the GenBank verifies the presumed orthologous relationships of the carp gene to their mammalian counterparts, and reveals a closer relationship between carp PA28 α and zebrafish PA28 α than between carp PA28 α and mammalian PA28 α . Comparing with human, pig, mouse, zebrafish, the structure of carp PSME1 gene has been also well conserved through evolution. The base number of

收稿日期: 2006-09-08

资助项目: 国家自然科学基金(30200210, 30571433)

作者简介: 谭业平(1980-), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物学与免疫学研究。E-mail: typ@jljhp.edu.cn

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

all exons is almost stable, although few introns (introns 1, 5, 7 in carp; introns 1, 4, 7, 8 in zebrafish) more variable than other three mammals, especially, the base number of intron 8 in zebrafish PSME1 gene. Our studies have demonstrated the carp PMSE1 gene, moreover, we have done a further work on the distinctions of PMSE1 genes among different species. However, further extensive study on this kinds of subunit genes will be necessary for more information about their molecular properties and functions.

Key words: *Cyprinus carpio*; PA28 α ; genomic DNA clone; sequence analysis

近年来 PA28 基因的功能研究一直是蛋白酶体功能研究中的一个热点。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。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。目前对蛋白酶体系统的研究表明, 蛋白酶体能够依赖于 ATP 选择性地降解胞内的短命蛋白 (包括细胞周期蛋白, 细胞周期抑制蛋白, 致癌基因的产物等) 和大量的长命蛋白, 产生适合于 MHC I 类分子结合的抗原肽^[1]。其次它还可以调节许多重要的过程, 如细胞周期过程, 转录, 分化, 细胞凋亡和应激反应等^[2]。选择性降解蛋白的水解酶的核心是 26S 蛋白酶体。26S 蛋白酶体复合体由两个成分组成, 一个是存在水解活性部位的 20S 蛋白酶体核心, 另外一个 19S 激活因子 (proteasome activator 700, PA700)^[3], 在 ATP 存在下它与 20S 紧密结合, 形成所谓的 26S 复合物 (26S 蛋白酶体), 表现出很强的蛋白水解活性, 能降解泛素化的蛋白质。在电镜下 26S 复合物呈现旋转对称的哑铃状结构。PA700 (包括一个大的粗糙的 V 形“口袋”, 可能是底物入口) 结合在 20S 两端^[3]。还有一个激活因子, 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)^[4], PA28 又叫 11S 调节因子, 它不影响 20S 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。在电镜下, PA28 是一个环状颗粒, 无 ATP 存在时即可与 20S 结合, 形成 PA28-20S 复合物。PA28 由两种亚基组成: PA28 α 和 PA28 β , 研究认为它是 PA28 α 和 PA28 β 相间排列形成的六聚体。PA28 α 亚基 C 端的 Tyr 对其活性影响巨大, 在 α 链中部有一个独特的“KEKE” motif, 可能是, Ca²⁺ 结合位点, 与 PA28 对 20S 的活化有关^[5]。20S 蛋白酶体与 PA28 结合后

被活化, 蛋白酶体水解进入细胞内的抗原, 在内质网和高尔基器内加工成平均长度为 8~9 个氨基酸残基的小肽, 与 MHC I 类分子结合后被递呈到细胞表面, 加工后的抗原被 CD⁸⁺ T 细胞识别, 完成一个免疫应答过程。我们前期在国内外首次克隆了鲤鱼蛋白酶体激活因子 PA28 α 亚单位全长 cDNA^[6], 本文对 PA28 α 亚单位全长基因组 DNA 进行了克隆及序列分析, 研究了该基因的结构, 分析了其物种间系统进化及同源性。

1 材料与方法

1.1 鲤脾脏全基因组 DNA 的提取

参照参考文献^[7]。

1.2 工具酶及质粒

Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、DL2000 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计与合成

根据我们已得到的 PA28 α 亚单位 cDNA 全长序列 (GenBank 注册号: DQ453126) 和 GenBank 中查找的 zebrafish PA28 α 亚单位基因组 DNA 全长序列 (NC_007135), 通过 NCBI 中 BLAST 软件里的 BLAST 2 sequences 作序列比对, 大致得出各个外显子的拼接位点。根据这些位点在合适的外显子和非翻译区设计两对引物。一对是 P1: 5'-GTTTCGTCGATAACAACACTGGA-3', P3: 5'-TAGCTGTATCCACATTGACA-3'; 一对是 P2: 5'-ATCAAGCCTGAGATTCAGAC-3', P4: 5'-GCACTGTGGATGTGAAACGCA-3' 均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 全基因组中 PA28 α 亚单位基因片段的 PCR 扩增及其产物回收纯化

P₁P₃ 和 P₂P₄ 两片段 PCR 反应体系相同, 均为 50 μ L, 各反应成分和用量如下: 1 μ L dNTP (10 mmol·L⁻¹); 5 μ L 10 \times *Taq* Buffer (含 Mg²⁺); 1 μ L 上游引物 (10 pmol· μ L⁻¹); 1 μ L 下游引物 (10 pmol· μ L⁻¹); 40 μ L 水; 1 μ L 全基因组 DNA 模板; 1 μ L *Taq* DNA 聚合酶

($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)。反应程序是 $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; $54 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; 32 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min。以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增效果。采用 DNA Gel Extraction Kit (购自 V-gene Biotechnology Limited) 回收纯化 PCR 扩增的 PA28 α 亚单位基因组 P_1P_3 和 P_2P_4 两片段。

1.5 PA28 α 亚单位基因片段的克隆、鉴定

将纯化的 P_1P_3 和 P_2P_4 两基因片段分别与 T 载体连接,连接体系均为: $0.5 \mu\text{L}$ T 载体, $1 \mu\text{L}$ 外源片段, $3.5 \mu\text{L}$ 水, $5 \mu\text{L}$ 连接缓冲液。详细操作方法参照 TaKaRa 的 pMD18-T Simple Vector 说明书。用常规方法转化至受体菌 DH5 α 中,转化菌经 IPTG/X-Gal 琼脂平板蓝白菌落筛选,挑取白菌落,振荡培养,进行 PCR 鉴定。阳性克隆送上海鼎安生物科技有限公司测序。将所测得的 P_1P_3 和 P_2P_4 两片段核苷酸序列用 DNASTar 中的 SeqMan 程序构建基因的全长基因组 DNA 序列,并与其 cDNA 序列相对比分析结构特点。通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站的 BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) 软件,将构建的全长基因组 DNA 序列在 GenBank 数据库中进行序列同源性比较。之后,在 GenBank 数据库中查找 zebrafish (PA28- α : NP_571450; PA28- β : NP_571449), mouse (PA28- α : NP_571450; PA28- β : NP_571449), pig (PA28- α : Q64L94; PA28- β : NP_999444), cattle (PA28- α : NP_001019680), human (PA28- α : NP_006254; PA28- β : NP_0028809) 的蛋白序列,用 DNAMAN 软件进行系统发生分析。在 GenBank 数据库中查找人 (NC_000014)、猪 (AY_317124)、小鼠 (NC_000080)、斑马鱼 (NC_007128) 的 PA28 α 亚单位基因组 DNA 序列,与我们获得的鲤鱼 PA28 α 亚单位基因组 DNA 进行结构及进化特点比较分析。

2 结果

2.1 全基因组中 PA28 α 亚单位基因片段的 PCR 扩增

利用设计的两对引物以提取的脾脏全基因组 DNA 为模板进行 PCR,扩增出一条大小为 2 046 bp 的目的片段为 P_1P_3 ,另一条大小为 1 962 bp 的目的片段为 P_2P_4 (图 1)。

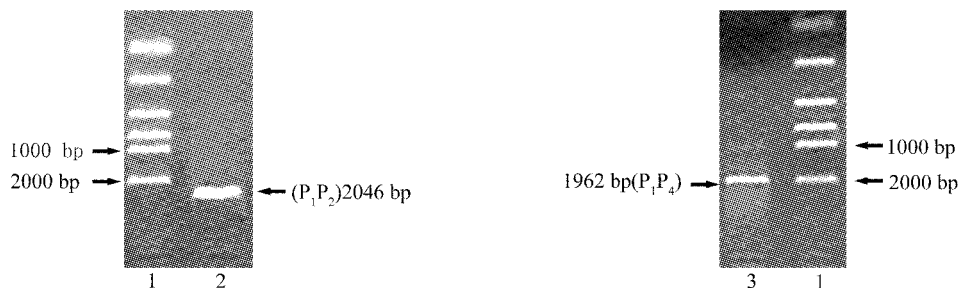


图 1 PCR 扩增 P_1P_3 和 P_2P_4 电泳结果

Fig.1 PCR results of P_1P_3 and P_2P_4

1. DL2000 DNA marker; 2. P_1P_3 片段; 3. P_2P_4 片段

1. DL2000 DNA marker; 2. P_1P_3 gene fragment; 3. P_2P_4 gene fragment

2.2 PA28 α 亚单位基因片段的克隆、鉴定

将 PCR 扩增的 P_1P_3 和 P_2P_4 两片段分别切胶回收纯化,将回收纯化后的 P_1P_3 和 P_2P_4 片段分别连接到 pMD18-T 载体上,再转化到 DH5 α 感受态细胞中,用 IPTG/X-Gal 琼脂平板蓝白菌落筛选,各挑取其中 4 个白菌落,振荡培养,进行 PCR 扩增鉴定,结果均为阳性克隆。

2.3 测序结果分析

测序结果分析表明, P_1P_3 片段大小为 2 046 bp, P_2P_4 片段大小为 1 962 bp,应用 DNASTar 中的 SeqMan 程序构建基因组 DNA 全长序列之后在 GenBank 数据库中作 BLAST/nr 比对,证实我们获得了鲤鱼 PA28 α 基因组 DNA 全长序列,其与斑马鱼同源性达 90%,大小为 3 602 bp,该基因序列 GenBank 注册号为 EF_051469。将得到的基因组

DNA 序列与其 cDNA 序列比对后,得知该基因是由 11 个外显子和 10 个内含子组成,外显子的范围在 33 ~ 102 bp 之间,内含子的范围在 87 ~ 805 bp 之间,其外显子拼接位点非常保守,所有外显子都遵守 GT-AG 规则,按照三联密码子决定一个氨基酸,任何基因的外显子和内含子交界处会有三种情况出现,0、1、或 2。鲤 PSME1 基因外显子 5 与内含子 5 交界处属于 1 类(GAA/G),外显子 8 与内含子 8 交界处属于 2 类(TCC/AA)外,其余的外显子内含子交界处都属于 0 类(表 1)。该基因中 GC 含量为 34.16%。系统发生分析结果显示 PA28 α 和 PA28 β 在物种的分子进化过程中产生了两条分支,之后,PA28 α (PA28 β 也一样)在由鱼类向哺乳动物的分子进化过程中又进一步分支,鲤 PA28 α 与斑马鱼 PA28 α 的亲缘关系较近,与哺乳

动物 PA28 α 亲缘关系较远(图 2)。通过人、猪、小鼠、鲤、斑马鱼的 PA28 α 基因组结构比较发现 PA28 α 基因由鱼类到哺乳动物的分子进化过程中较为保守,均有 11 个外显子和 10 个内含子组成,剪切位点基本遵守 GT-AG 规则,三种哺乳动物各个外显子碱基数完全相同,鲤 PA28 α 基因中外显子 4、5、11 和斑马鱼 PA28 α 基因中外显子 3、5、11 与三种哺乳动物相差几个碱基,其余外显子相同,而鲤与斑马鱼 PA28 α 基因的外显子 3、4、5 相差几个碱基,二者其他外显子碱基数相同。但是,鲤 PA28 α 基因中内含子 1、5、7,斑马鱼 PA28 α 基因中 1、4、7、8 的碱基数在鱼类到哺乳动物的进化过程中变化较大,而其他三种哺乳动物内含子碱基数变化相对较小(图 3)。

表 1 鲤 PSME1 基因的外显子/内含子的保守拼接位点

Tab.1 Intron/exon boundaries of carp PSME1 gene

外显子 exon	内含子 intron	外显子及其大小 exon and size	内含子 intron	内含子 intron	内含子大小(bp) size
1		ATG/ACT...39bp...AAA/CAG	GTAGAGCGC...	1	163
2	...ATTTGCGAG	GTG/GAT...33bp...AAG/GAG	GTAACGTTA...	2	277
3	...TTTACACAG	GCT/GAA...63bp...TTA/CAG	GTATAAAGT...	3	254
4	...CTTATTTAG	GAT/TCC...102bp...GAG/GAG	GTAATCGCA...	4	140
5	...TTC AACAG	AAA/GAG...49bp...GAA/G	GTAAATGTT...	5	306
6	...ATCTGAAAG	GT/CCT...98bp...AAC/ACG	GTGAGGAAG...	6	227
7	...CCTGTGCAG	GTG/TCA...69bp...GTA/CAG	GTCAGTTAA...	7	803
8	...TTCCTACAG	GAA/AAA...68bp...TCC/AA	GTAAGTGAC...	8	129
9	...TTTCCTCAG	G/TAC...55bp...CAC/GTG	GTCAGTTTA...	9	101
10	...TGGCAACAG	GGA/GAT...87bp...ACT/TAT	GTAAGTTCA...	10	85
11	...CAACTCTAG	GCT/GTG...87bp...TAC/TGA			

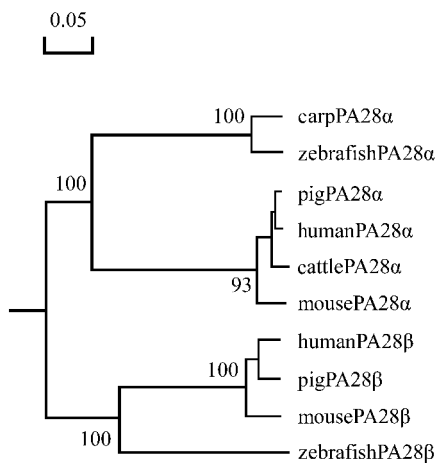


图 2 不同物种的 PA28 α 和 PA28 β 蛋白序列的系统发生分析

Fig.2 A phylogenetic tree with bootstrap values based on the full-length protein sequences of the PA28 α and PA28 β

3 讨论

PA28 首先在人类和牛红细胞中被证明和纯化,又叫 11S 调节因子。它主要分布于细胞质和细胞核中。Ostrowdka 等通过 Western blotting 发现在人类的血小板中也存在 PA28 激活因子^[8]。哺乳动物中 PSME 基因是一个基因家族,包括 PSME1, PSME2 和 PSME33 个成员。这 3 个基因分别编码 PA28 α 、PA28 β 和 PA28 γ 亚基。PSME1 和 PSME2 基因在许多物种中得到了广泛的研究,包括人,小鼠,大鼠,斑马鱼、比目鱼等^[9-14]。基因物理定位显示 PSME1 和 PSME2 基因与 TCRA 基因紧密连锁。加之它们的基因结构又非常相似,由此推测 PSME1 和 PSME2 基因可能是通过它们的始祖基因复制(duplication)而出现的。文

中系统发生分析表明,在分子进化过程中 PA28 α 和 PA28 β 发生了分支(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,据文献[13]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,PSME1 基因与 MHC 一起出现,这也预示着这个基因在免疫系统中发挥着某种作用。Kohda 等^[15]对小鼠,王彦芳^[16]对猪的 PSME1 基因的结构及序列进行了分析,发现它们有相同数目的外显子和内含子(均有 11 个外显子和 10 个内含子),我们所分析鲤的 PSME1 基因的结果也是如此。另外在 5 种 PSME1 基因的结构比较发现,人、猪、小鼠各相对应的外显子碱基数完全相同,鲤外显子 4、5、11,斑马鱼外显子 3、5、11 与 3 种哺乳动物只相差几个碱基,其余外显子碱基数都相同,鲤与斑马鱼比较外显子 3、4、5 也相差几个碱基,差异可能源于进化过程蛋白某些基序的结构和功能进一步完善的需要,总体来看外显子大小变化相对保守,加之对其蛋白序列系统发生分析结果,可以看出该基因进化过程中结构和功能区域是相对

保守的,进一步推断 PA28 α 亚单位在动物体内的功能和作用机制可能亦延续了较为保守的进化途径。但是,鲤 PSME1 基因中内含子 1、5、7,斑马鱼 PSME1 基因中内含子 1、4、7、8 的碱基数在进化过程中变化很大,而其他三种哺乳动物内含子碱基数变化相对较小,显示了 PSME1 基因的分子进化主要集中在内含子的变化上,另外,比较鱼类和哺乳动物 PSME1 基因的进化特点可以看出同样的进化距离情况下鱼类的进化要比哺乳动物的进化快的多。小鼠和猪 PSME1 基因的第 4 个内含子 5' 端并非 GT,而是 GC,这个很稀少的剪接位点经实验证明,在 mRNA 的剪接过程中能够被准确地切开,尽管比切开 GT 序列的速度要慢得多。在人类的 PSME1 基因中,也有相同的现象存在^[12,15]。而我们获得的鲤 PSME1 基因的 10 个内含子剪切位点却完全遵守 GT-AG 规则,不存在上述现象可以快速准确的剪切。本文成功克隆了鲤 PA28 α 基因组 DNA 并对其序列及结构特点进行了分析,基于 PA28 激活因子在 MHC I 类抗原递呈和免疫应答中的重要地位,相信这类激活因子的基因结构、功能特点及调控作用机制等方面将会有更广阔的研究前景。

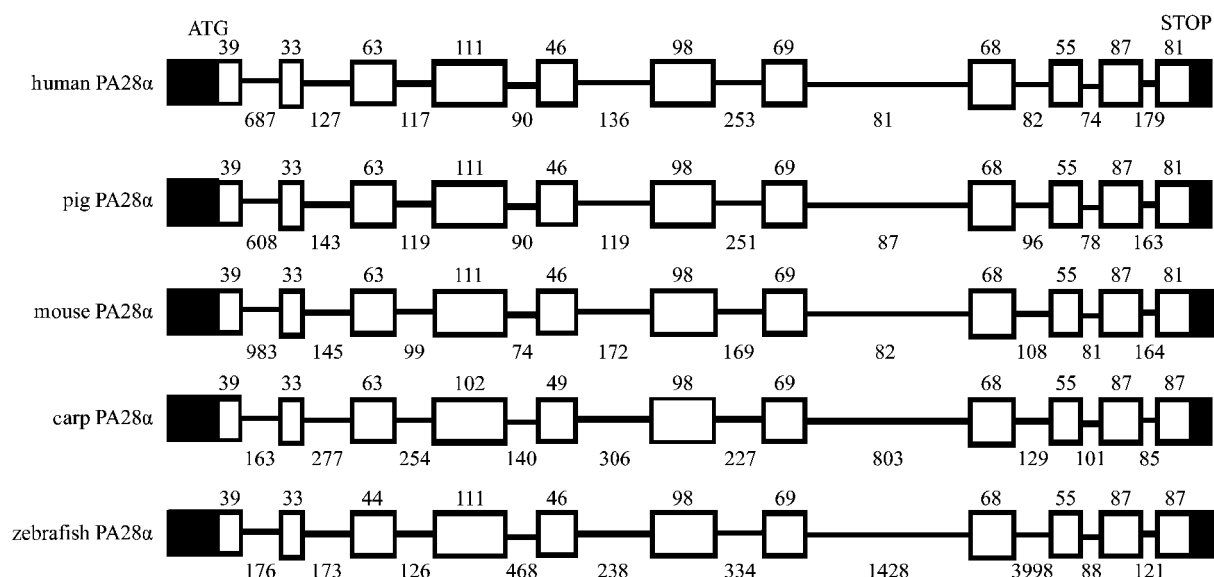


图 3 人、猪、小鼠、鲤、斑马鱼 PA28 α 基因结构的比较

Fig. 3 Genomic structure of the carp PA28 α gene compared with those of human, pig, mouse and zebrafish

矩形表示外显子,细线表示内含子,阴影部分表示非翻译区域,翻译起始和终止密码子被标明

The eleven exons are indicated by rectangles and ten introns by lines. The sizes of exons are indicated above the exons, and the sizes of introns are indicated below the introns. The translation start and termination codons are indicated. Shaded areas indicated untranslated regions (UTRs)

参考文献:

- [1] Kloetzel P M, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-Class-I-mediated antigen presentation [J]. *Immunol*, 2004, 16: 76 – 81.
- [2] 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.
- [3] Chu-Ping M, Vu J H, Proske R J, *et al.* Identification, purification, and characterization of a high-molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome [J]. *Bio Chem*, 1994, 269: 3539 – 3547.
- [4] Ma C P, Slaughter C A, Demartino G N. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain) [J]. *Bio Chem*, 1992, 267: 10515 – 10523.
- [5] Song X L, Joni D M, Jan von K, *et al.* A model for the quarternary structure of the proteasome activator PA28 [J]. *Biol Chem*, 1996, 271, 26410 – 26417.
- [6] 李莲瑞, 卢强, 付宝权, 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.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 (第三版) [M] // 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 463 – 471.
- [8] Ostrowska H, Ostrowska J K, Worowski K, *et al.* Human platelet 24S proteasomev inhibition of its chymotrypsin-like activity and identification of the proteasome activator PA28. A preliminary report [J]. *Platelets*, 2003, 14: 151 – 157.
- [9] Ahn J Y, Tanahashi N, Akiyama K, *et al.* Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome [Z]. *FEBS Letters*, 1995, 366: 37 – 42.
- [10] Kandil E, Kohda K, Ishibashi T, *et al.* PA28 subunits of the mouse proteasome: primary structures and chromosomal localization of the genes [J]. *Immunogenetics*, 1997, 46: 337 – 344.
- [11] Kim D H, Lee S M, Hong B Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNA for the proteasome activator PA28-beta subunit of flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Mol Immunol*, 2003, 40: 611–616.
- [12] McCusker D, Wilson M, Trowsdale J. Organization of the genes encoding the human proteasome activators PA28alpha and beta [J]. *Immunogenetics*, 1999, 49: 438 – 445.
- [13] Murray B W, Sültnann H, Klein J. Identification and linkage of the proteasome activator complex PA28 subunit genes in zebrafish [J]. *Scand J Immunol*, 2000, 51, 571 – 576.
- [14] Yawata M, Murata S, Tanaka K, *et al.* Nucleotide sequence analysis of the approximately 35-kb segment containing interferon-gamma-inducible mouse proteasome activator genes [J]. *Immunogenetics*, 2001, 53: 119 – 129.
- [15] Kohda K, Ishibashi T, Shimbara N, *et al.* Characterization of the mouse PA28 activator complex gene family: complete organizations of the three member genes and a physical map of the approximately 150-kb region containing the alpha- and beta-subunit genes [J]. *Immunol*, 1998, 160: 4923 – 4935.
- [16] 王彦芳. 猪 PA28 和 PA700 基因家族相关基因的分 离、定位、SNPs 检测及其与性状的关联分析 [D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2004: 49 – 51.