

池蝶蚌 *I κ B α* 和 *c-Rel* 的结构特征及在 LPS 刺激下的表达分析

王小敏 周叶 马慧妹 ZAHID Anwar 胡蓓娟 彭扣 洪一江

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF *IKBA* AND *C-REL* AND EXPRESSION ANALYSIS UNDER LPS STIMULATION IN *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

WANG Xiao-Min, ZHOU Ye, MA Hui-Mei, ZAHID Anwar, HU Bei-Juan, PENG Kou, HONG Yi-Jiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2020.063>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

池蝶蚌 β -连环蛋白基因 cDNA 的克隆及表达特征分析

THE STRUCTURAL FEATURE AND EXPRESSION ANALYSIS OF *HS β -CATENIN* cDNA AND PROTEIN FROM *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

水生生物学报. 2017, 41(5): 972–976 <https://doi.org/10.7541/2017.121>

池蝶蚌 *STAT* 基因的克隆及功能分析

CLONING AND FUNCTION ANALYSIS ON SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION IN *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

水生生物学报. 2018, 42(2): 284–292 <https://doi.org/10.7541/2018.036>

基于转录组的池蝶蚌系统发育及其遗传分析

THE PHYLOGENY AND GENETIC ANALYSIS OF THE *HYRIOPSIS SCHLEGELII* BASED ON TRANSCRIPTOME

水生生物学报. 2021, 45(3): 514–522 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.208>

三疣梭子蟹 *NF- κ B* 家族基因 *Relish* 和 *Dorsal* 的克隆及表达特征

CLONING AND EXPRESSION OF *NF- κ B* FAMILY GENES IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

水生生物学报. 2019, 43(2): 298–304 <https://doi.org/10.7541/2019.037>

三角帆蚌热休克蛋白 70 基因克隆及其表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 GENE FROM *HYRIOPSIS CUMINGII*

水生生物学报. 2017, 41(1): 50–55 <https://doi.org/10.7541/2017.7>

卵形鲳组织蛋白酶 B 基因的克隆及表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF CATHEPSIN B GENE OF GOLDEN POMPANO (*TRACHINOTUS OVATUS*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 289–295 <https://doi.org/10.7541/2020.035>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2020.063

池蝶蚌 *IκBα* 和 *c-Rel* 的结构特征及在 LPS 刺激下的表达分析

王小敏^{1,2} 周叶^{1,2} 马慧妹^{1,2} ZAHID Anwar^{1,2} 胡蓓娟^{1,2}
彭扣^{1,2} 洪一江^{1,2}

(1. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031; 2. 江西省水产动物资源与利用重点实验室, 南昌 330031)

摘要: 为研究淡水贝类 NF-κB/Rel 信号通路中核因子 κB (Nuclear factor-κappaB, NF-κB) 和 NF-κB 抑制因子 (Inhibitors of NF-κB, IκB) 的功能, 对池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) *IκBα* 和 *c-Rel* (以下简称 *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel*) 的序列结构、表达特征及 *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel* 之间的相互关系进行了分析。结果表明, *HsIκBα* 的 cDNA 全长为 1783 bp, 其开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 为 1083 bp, 编码 360 个氨基酸。*Hsc-Rel* 的 cDNA 为 2414 bp, ORF 为 2298 bp, 编码 765 个氨基酸。通过构建 *HsIκBα*-ORF-GST 和 *Hsc-Rel*-RHD-HIS 重组质粒、原核诱导表达和纯化, 进行 GST-pull down, 通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测研究, 发现 *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel*-RHD 存在直接的相互作用。通过对池蝶蚌进行脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激后, 分别在 7 个时间点 (0、6h、12h、24h、36h、48h 和 72h) 对 10 个组织中 *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel* 的 mRNA 表达差异性进行分析, 结果显示: *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel* 的 mRNA 在所有组织都有表达, 且在肝胰腺组织表达最高, 在血细胞表达最低。在 6h 时, *HsIκBα* 在 8 个组织和 *Hsc-Rel* 在 7 个组织中的表达水平都出现下调; 在 12h 时, *HsIκBα* 在 10 个组织中的表达量都上调, 并且都达到了峰值。*Hsc-Rel* 只有血细胞、心脏、肝胰腺和肠出现上调; 在 24h 时, *HsIκBα* 在 10 个组织中的表达值呈现下调, *Hsc-Rel* 却都出现上调 (肾组织除外), 其中血细胞、斧足、肠的表达值达到峰值; 在 36—72h, *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel* 的部分组织的表达值逐渐恢复到基础水平, 以上结果表明, *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel* 的表达量随着 LPS 的诱导而产生明显变化, 说明其参与免疫应答反应, 且可能存在应答 LPS 的 NF-κB 通路。

关键词: *HsIκBα*; *Hsc-Rel*; 克隆; 蛋白互作; LPS 刺激; 池蝶蚌

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)05-0786-10



在哺乳动物中, 作为重要的核因子 κB (Nuclear factor-κB, NF-κB) 的家族成员有 5 个, 即 RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF-κB1 (p50) 和 NF-κB2 (p52)。NF-κB 二聚体形式多样化, 其中 p65/p50 复合物是最常见的形式^[1-3]。它们的 N 端都有一个包含 300 个左右氨基酸的保守结构域, 即 REL 同源域 (Rel homology domain, RHD), 其作用是与 DNA 结合, 二聚化及和 IκB 家族成员相互作用^[4]。在 RelA、RelB 和 c-Rel 的 C 端还有一个转录激活域 (Transcription activation domain, TAD), 其作用是激活 NF-κB 从而刺激一些靶基因的转录, 比如细胞黏附分子基因^[5] 和急性蛋白基因^[6] 等, 因此 NF-κB 在细胞增殖和凋亡、

炎症反应等起到关键作用。通常 NF-κB 与 NF-κB 抑制因子 (Inhibitors of NF-κB, IκB) 在静态细胞中以非活性形式绑定从而相互作用^[7]。但当细胞受到脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、病毒、紫外线辐射和促炎细胞因子 (例如白介素-1) 等刺激后, IκB 被磷酸化和泛素化后发生降解^[8]。IκB 家族成员有 8 个, 即 IκBα、IκBβ、κBγ、IκBδ、IκBε、IκBζ 和 Bcl-3 等^[9], 含有 5—7 个锚蛋白重复结构域 (Ankyrin repeats, ANK), 起到与 RHD 结合和掩盖核定位信号 (Nuclear localization sequence, NLS)^[4] 的作用。

IκB 在很多软体动物都有所研究, 包括长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、海湾扇贝 (*Argopecten irra-*

收稿日期: 2022-04-01; 修订日期: 2022-07-24

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901400); 国家自然科学基金 (31660337 和 31860737); 现代农工技术研究体系 (CARS-49) 资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901400); the National Natural Science Foundation of China (31660337 and 31860737); the Modern Agricultural and Industrial Technology Research System (CARS-49)]

作者简介: 王小敏 (1995—), 女, 硕士研究生; 主要研究方向为水生生物分子免疫学。E-mail: ncuskwangxiaomin@163.com

通信作者: 洪一江 (1963—), 男, 教授; 主要研究方向为水生生物学遗传育种。E-mail: yjhong2008@163.com

dians)、马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)、文蛤(*Meretrix lyrata*)和盘鲍(*Haliotis discus hannai*)等^[10-16], 其中发现IκB在外界刺激后都会产生一些免疫应答反应, 比如在LPS和溶藻弧菌刺激后, 马氏珠母贝*poIκB*的转录水平有明显的变化^[14]; 在LPS、polyI:C等多种刺激后, 长牡蛎*CgIκB3*的表达水平随着刺激时间的递增而上调^[12]。以上结果表明IκB是刺激性急性蛋白, 很有可能参与贝类的免疫防御。因此, 本研究通过在LPS刺激下*HsIκBα*的mRNA表达变化, 来探究其是否参与免疫应答。关于脊椎动物中的*c-Rel*, 科学家发现*c-Rel*的敲除虽然不影响小鼠(*Mus musculus*)的正常发育和造血细胞的发育, 但也导致几种淋巴细胞的变化, 包括成熟B和T细胞的增殖和活化出现减少等现象^[17]; 在鱼类动物中, Correa等^[18]验证出斑马鱼(*Danio rerio*) *c-Rel*可以与哺乳动物IκBα发生相互作用。由于在贝类动物中, 关于*c-Rel*的功能探究不多, 所以本研究通过LPS刺激下*Hsc-Rel*的mRNA表达情况, 来探索*Hsc-Rel*是否和免疫机制有关, 并且通过GST-pull down实验来探索*HsIκBα*和*Hsc-Rel*之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

池螺蚌*Hyriopsis schlegelii*均取自江西省抚州市池螺蚌良种场。选取3龄、体质健壮和张闭有力的健康蚌放在经曝气的水族箱暂养1周, 每日换水1次(水温22—25℃)。本研究中所用的LPS购于北京Solarbio公司, 其来源是血清型大肠杆菌O55:B5。

1.2 实验方法

池螺蚌总RNA的提取与cDNA的合成 使用日本TaKaRa公司的RNAiso Plus提取池螺蚌的肝组织的总RNA, 用于普通PCR和RACE-PCR, 同样提取池螺蚌10个组织的总RNA用于qPCR。使用美国Clontech公司的SMARTer RACE 5'/3'Kit试剂盒合成用于5'和3'RACE-PCR的5'RACE-cDNA和3'RACE-cDNA; 使用美国Clontech公司的PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser合成用于qPCR的cDNA。

引物的设计 根据本实验室的池螺蚌转录组数据库中筛选到*HsIκBα*和*Hsc-Rel*的部分序列, 并使用oligo7设计RACE-PCR引物和构建用于GST-pull down重组质粒的引物(表1)。

***HsIκBα*和*Hsc-Rel*基因的克隆和生物信息学分析** 通过普通PCR检验转录组筛选出的*HsIκBα*和*Hsc-Rel*部分序列, 然后以5'和3'特异性引物分别和通用性引物作为上下游引物, 运用RACE-PCR技

术, 进行两轮PCR扩增, 在第二轮获得与预测大小一致的PCR产物。使用日本TaKaRa公司的LA Taq®产品进行PCR, 其PCR反应体系为25 μL: 上下游引物1 μL, cDNA 1 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μL, 10× LA PCR Buffer 2.5 μL, LA Taq 0.5 μL, ddH₂O 17 μL。其反应条件为94℃预变性5min; 94℃变性30s, T_m退火30s, 72℃ 1—2min, 35个循环; 72℃延伸10min。随后, PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳, 进行切胶回收、过夜4℃孵育连接后, 转化到感受态*E. coli* DH5α中; 在含AMP⁺终浓度为100 μg/mL培养皿培养12h后, 挑取单个菌落进行菌液PCR验证阳性菌, 送到上海生物工程技术有限公司测序。

使用MEGA软件将5'和3'RACE序列进行拼接

表1 实验中所用引物信息
Tab. 1 Primers used for the study

引物名称 Name	引物序列 Sequence (5'—3')	引物用途 Usage
HsIκBα-medium-F	GATAAAGATGGCGACACGTTT	普通PCR
HsIκBα-medium-R	GTGATACGTCGTTTAAGACGTT	普通PCR
Hsc-Rel-medium-F	AATGGGGAATCGTGGGAACAA	普通PCR
Hsc-Rel-medium-R	TGGGAACCTCAGCTTCATCTTG	普通PCR
HsIκBα-5GSP1	TTGCACGGCGAAATCAATTACT	5'RACE-PCR
HsIκBα-5GSP2	TCCTCACTGACTCTCCCTGTCG	5'RACE-PCR
HsIκBα-3GSP1	CGATTATAACGTCTTAAACGAC	3'RACE-PCR
HsIκBα-3GSP2	TAGGCAGCAAACAGATCAATG	3'RACE-PCR
Hsc-Rel-5GSP1	CAGATAAAATGGGTGAGGTCTT	5'RACE-PCR
Hsc-Rel-5GSP2	CATCGTGGTTTTCAAAGACTC	5'RACE-PCR
Hsc-Rel-3GSP1	CTACACAAAAGACCGAGACAT	3'RACE-PCR
Hsc-Rel-3GSP2	GCAAGATGAAGCTGAAGTTCC	3'RACE-PCR
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'/3'RACE-PCR
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGA	5'/3'RACE-PCR
HsIκBα-ORF-GST-F	cgggatccATGGCCGACTTTGAGG	GST-pull down
HsIκBα-ORF-GST-R	ACGAC	GST-pull down
Hsc-Rel-RHD-HIS-F	ccgctcgagTTACGCGTCTCTTCGT	GST-pull down
Hsc-Rel-RHD-HIS-R	CTGA	GST-pull down
HsIκBα-qPCR-F	ggggatccATGGATGATCTTGAGG	GST-pull down
HsIκBα-qPCR-R	TGATTGG	GST-pull down
Hsc-Rel-qPCR-F	ccgctcgagtGTCCTGCAATGAATCC	GST-pull down
Hsc-Rel-qPCR-R	AGTTTCC	GST-pull down
β-actin-F	ACGGAGGGCGTTACAATGTT	qPCR
β-actin-R	CGAACAAGCTCCATGTCCCT	qPCR
β-actin-F	GGAAACTGGATTTCATTGCAGG	qPCR
β-actin-R	AC	qPCR
β-actin-F	TTGGGAACCTCAGCTTCATCTT	qPCR
β-actin-R	G	qPCR
β-actin-F	GAGAGATTCAGGTGCCCAGA	qPCR
β-actin-R	CTGCATACGGTCAGCGATTC	qPCR

后,将完整序列在NCBI网址(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)预测得到*HsIkBa*和*Hsc-Rel*的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),氨基酸推测序列和氨基酸的同源比对,及相应结构域的预测。使用序列操作工具箱(http://www.detaibio.com/sms2/protein_stats.html)分析蛋白分子量和氨基酸组成分析。使用MEGA软件构建NJ系统进化树,Bootstrap重复1000次。使用Epestfind网址(<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epstfind>)进行PEST区域查找,使用NetPhos服务器预测了丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>),使用NLS Mapper网址预测NLS(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi#opennewwindow)。

在LPS刺激下*HsIkBa*和*Hsc-Rel*的mRNA表达分析 取21只3龄池螺蚌分成7组,每组3只,其中在6组实验组蚌的闭壳肌注射100 μ L的LPS溶液(其浓度为10 mg/mL),刺激时间分别为6h、12h、24h、36h、48h和72h。对照组则注射相同剂量的PBS溶液,分别每3只蚌混合取血细胞、心脏、肝胰腺、外套膜、肾脏、闭壳肌、斧足、性腺、肠和鳃10个组织,按照此方法重复3次,总共21组。按上述获得定量分析的cDNA模板。使用日本TaKaRa公司的嵌合荧光制品进行qRT-PCR检测。其PCR反应体系为20 μ L: TB Green Premix Ex *Taq* 10 μ L,上下游引物1 μ L, cDNA模板1 μ L, ddH₂O 7 μ L。其反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性5min; 95 $^{\circ}$ C变性30s, 55 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10min。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,使用EXCEL软件进行统计分析。

GST-pull down 以池螺蚌cDNA为模板,分别构建*HsIkBa*基因ORF的重组质粒,即*HsIkBa*-ORF-GST(碱基位置为234—1316)和*Hsc-Rel*基因RHD结构域的重组质粒,即*Hsc-Rel*-RHD-HIS(碱基位置为117—1592),其质粒载体分别为pGEX-4t-1和pet32a。将测序碱基无突变的菌液进行扩培后提取质粒,将其转到感受态*E.coli* BL21中。通过在不同温度的刺激条件下,确定*HsIkBa*-GST和*Hsc-Rel*-RHD-HIS蛋白、GST蛋白和HIS蛋白的最佳刺激条件,并使用购于武汉汇研生物公司的GST标签树脂和购于美国Bio-RAD公司的HIS标签树脂分别进行蛋白纯化,通过10%SDS-PAGE检测蛋白诱导和纯化结果。

将纯化后*HsIkBa*-GST蛋白加入GST-Beads孵育4h后用PBS清洗3次,离心,加入*Hsc-Rel*-RHD-HIS孵育4h,再用PBS清洗3次,然后加上蛋白缓冲液处理孵育样品,通过SDS-PAGE和Western Blot法

使用购于康为世纪的含HRP标记的抗HIS标签的鼠单抗体检测实验结果作为实验组。同理,3组阴性对照组GST蛋白和HIS蛋白、*HsIkBa*-GST蛋白和HIS蛋白、*Hsc-Rel*-RHD-HIS蛋白和GST蛋白也按上述操作处理。

2 结果

2.1 *HsIkBa*和*Hsc-Rel*的cDNA序列及其氨基酸序列特征

*HsIkBa*的cDNA全长为1783 bp,其ORF为1083 bp,5'端非翻译区(5'Untranslated Regions, 5'UTR)为233 bp,3'端非翻译区(3'Untranslated Regions, 3'UTR)为467 bp,含有典型的加尾信号序列“AATAAA”和1个PloyA尾。*Hsc-Rel*的cDNA全长为2414 bp,其ORF为2298 bp,5'UTR为116 bp(图1)。

*HsIkBa*编码360个氨基酸,分子量为40.08 kD,其亮氨酸(Leu)含量最高,占10.83%,色氨酸(Trp)含量最低,占0.28%。*Hsc-Rel*编码765个氨基酸,预测分子量为86.75 kD,其丝氨酸(Ser)含量最高,占8.37%,色氨酸(Trp)含量最低,占0.78%。

经过NCBI预测,发现*HsIkBa*从N端的第130到第340个氨基酸有6个ANK保守的结构域,每个ANK结构域大概有33个氨基酸。*HsIkBa*有保守基序“D₄₃SGIHS₄₈”(DSGX₄₈),通过Epestfind网址预测无PEST区域。*Hsc-Rel*从N端的第210到492个氨基酸含有保守的RHD结构域,RHD含有DNA结合基序“G₂₀₈YHRFRYMS₂₁₆”(XXXRF₂₁₆RYXX)和Rel蛋白特征基序“F₂₁₂RYMSE₂₁₇”(FRYXXE),以及由4个氨基酸组成的NLS“K₄₈₃KRK₄₈₆”(KKXK)。推测*Hsc-Rel* C端的第493到765是TAD结构域,原因是其中含有48个磷酸化位点,包括27个丝氨酸(Ser),17个苏氨酸(Thr),4个酪氨酸(Tyr)。

2.2 *HsIkBa*和*Hsc-Rel*的同源比对和系统进化分析

*HsIkBa*通过NCBI网址中的蛋白比对,发现*HsIkBa*与美洲牡蛎(*Cassostrea virginica*)的IkBa同源性最高,为41.3%。同长牡蛎、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)的IkBa同源性达到39.83%和39.17%,都超过了35%,虽然*HsIkBa*和其他物种的同源性都较低,但海湾扇贝*AiIkB*^[13]和其他物种的同源性最高也才达到34.8%,说明贝类IkB和其他物种的同源性都不会很高。进一步对氨基酸序列进行多重比对,发现有保守基序“D₄₃SGIHS₄₈”(DSGX₄₈)^[12],且含有ANK结构域在贝类中都较为保守。最后,对*HsIkBa*和其他14个物种进行系统进化分析,结果显示*HsIkBa*与软体动物的美洲牡蛎、长牡蛎、光滑双脐螺在同一支,与鸟类、鱼类、昆虫类、哺乳

动物都不在一支(图 2)。

Hsc-Rel蛋白同源性比对, 发现Hsc-Rel与大西洋鳕(*Gadus morhua*)同源性最高为26.55%, 同其他鱼类, 比如龟壳攀鲈(*Anabas testudineus*)、赤锯鳞鱼(*Myripristis murdjan*)和黄鳝(*Monopterus albus*)的同源性达到26.30%、25.74%和25.46%, 虽然和其他物种的同源性很低, 其原因是目前在其他贝类动物中没有克隆证实的*c-Rel*。进一步对其氨基酸分析, RHD含有DNA结合基序“G₂₀₈YHRFRYMS₂₁₆”和Rel蛋白特征基序“F₂₁₂RYMSE₂₁₇”, 以及由4个氨基酸组成的NLS“K₄₈₃KRK₄₈₆”^[19, 20]。最后, 对Hsc-

Rel和其他9个物种的*c-Rel*进行系统进化分析, 发现Hsc-Rel单独一支, 不在鱼类和哺乳动物的两大支(图 3)。

2.3 在LPS刺激下*HsIkBa*和*Hsc-Rel*在池蝶蚌各个组织的mRNA表达变化

如图 4和图 5, 采用2^{-ΔΔCt}方法处理数据, 结果显示: 在0时, 血细胞的表达量最低, 设为参照值1, *HsIkBa*的mRNA在胰腺的表达最高, 是0时血细胞的18.82倍。在6h时, *HsIkBa*的mRNA除了血细胞和性腺轻微上调, 其他8个组织的表达都出现轻微下调, 之后在12h所有组织的表达都出现上调, 并且达到

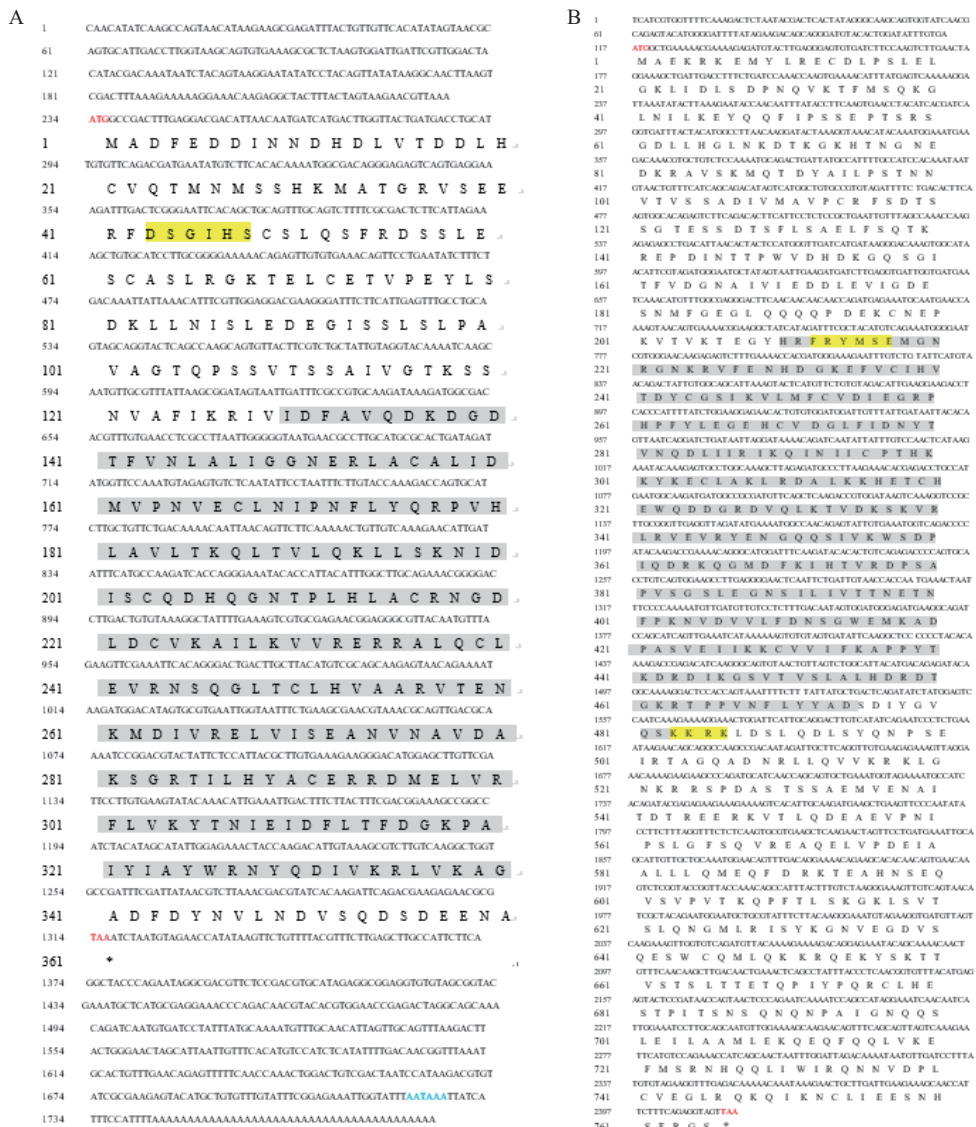


图 1 *HsIkBa*(A)(GenBank 登录号: KY411923)和*Hsc-Rel*(B)核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HsIkBa*(A)(GenBank: KY411923) and *Hsc-Rel*(B)

左边数字表明的是核苷酸序列所对应的顺序和氨基酸所对应的顺序, 起始密码子和终止密码子用红色字体表示, 保守氨基酸基序用黄色表明

The numbers on the left of Fig. 1 indicate the sequence corresponding to the nucleotide sequence and the sequence corresponding to the amino acid. The start and stop codons are shown in red font, and the conservative amino acid motifs are shown in yellow

峰值, 其中肝胰腺、鳃和肠的表达较高。但在24h, 所有组织表达出现下调趋势。在36—72h, 闭壳肌、斧足、鳃、肠、肾脏和肝胰腺都在逐渐恢复到0的表达值。

*Hsc-Rel*的mRNA结果显示: 在0时, 血细胞的表达量最低, 设为参照值1, 肝胰腺的相对表达量最高(15.28倍), 较高的组织为肾(8.15倍), 性腺(8.14倍)。

在6h时, 除了闭壳肌、鳃和斧足的其他7个组织都出现下调, 同时血细胞、心脏、肝胰腺和肠在12h出现明显上调趋势, 而其他组织在12h出现明显下降趋势。在24h时, 除了肾以外的所有组织都出现上调趋势, 其中血细胞、斧足和肠的表达达到峰值。在36h时, 也是除了肾的所有组织开始下调, 在48—72h, 血细胞、肝胰腺、闭壳肌、性腺和肠也

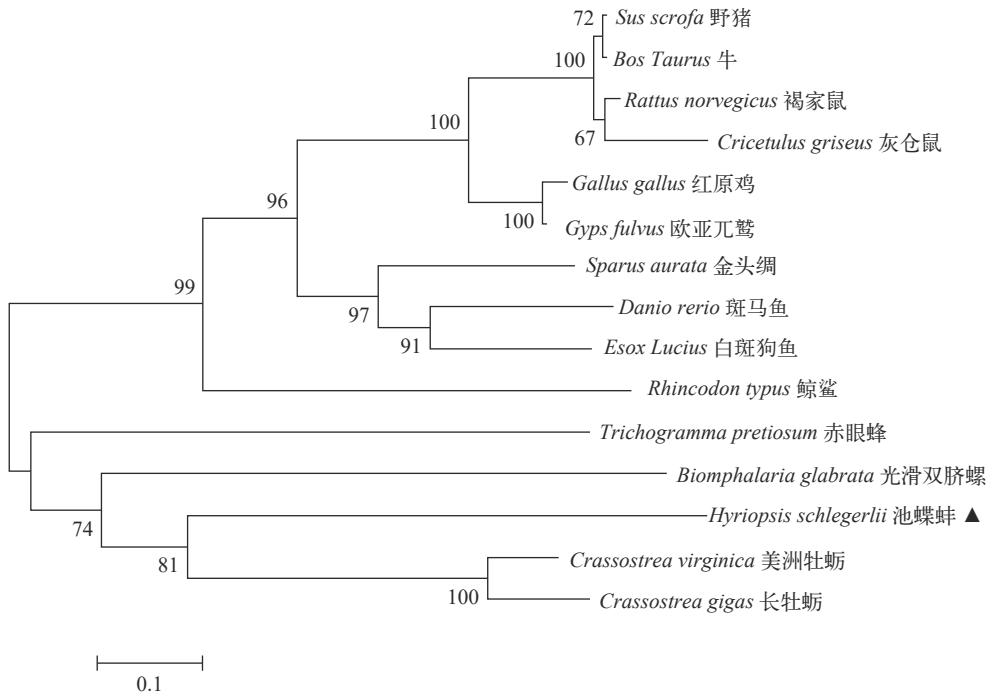


图2 HsIkBa氨基酸序列的系统进化树(三角形所指HsIkBa在进化位置)

Fig. 2 Phylogenetic tree of HsIkBa system (triangle represents the position of HsIkBa)

Sus scrofa IkBa (NP_001005150.1); *Bos taurus* IkBa (NP_001039333.1); *Rattus norvegicus* IkBa (NP_001099190.2); *Cricetulus griseus* IkBa (ERE92523.1); *Gallus gallus* IkBa (NP_001001472.2); *Gyps fulvus* IkBa (ABX09998.1); *Sparus aurata* IkBa (XP_030261588.1); *Danio rerio* IkBa (NP_955923.1); *Esox lucius* IkBa (NP_001291017.1); *Rhincodon typus* IkBa (XP_020372164.1); *Trichogramma pretiosum* IkBa (XP_014220563.2); *Biomphalaria glabrata* IkBa (NP_001298198.1); *Crassostrea virginica* IkBa (XP_022334190.1); *Crassostrea gigas* IkBa (NP_001292264.1)

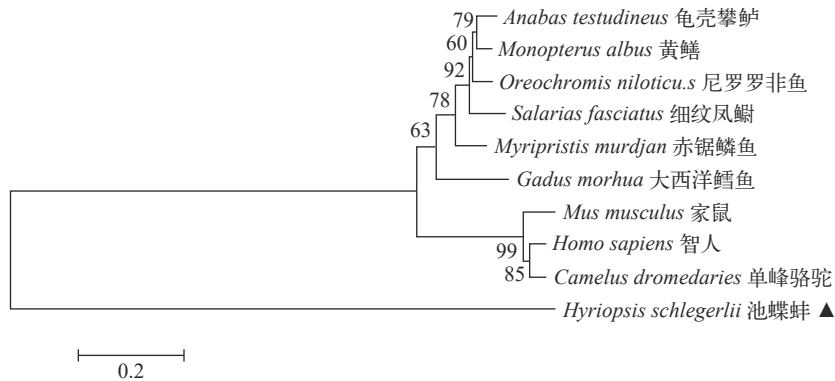


图3 Hsc-Rel氨基酸序列的系统进化树(三角形所指Hsc-Rel在进化位置)

Fig. 3 Phylogenetic tree of Hsc-Rel system (triangle represents the position of Hsc-Rel)

Anabas testudineus c-Rel (XP_026210423.1); *Monopterus albus* c-Rel (XP_020478956.1); *Oreochromis niloticus* c-Rel (XP_019222126.1); *Salarias fasciatus*; c-Rel (XP_029963152.1); *Myripristis murdjan* c-Rel (XP_029927051.1); *Gadus morhua* c-Rel (XP_030234343.1); *Mus musculus* c-Rel (CAA42817.1); *Homo sapiens* c-Rel (CAA52954.1); *Camelus dromedarius* c-Rel (KAB1266826.1)

都逐渐恢复到0的表达值。

2.4 *HsIκBα*和Hsc-Rel相互作用——GST-pull down

HsIκBα-ORF-GST预测目的蛋白大小为40.08 kD, 加上GST标签蛋白后约为66 kD。Hsc-Rel-RHD-HIS预测目的蛋白大小为55.76 kD, 加上HIS标签蛋白约为72 kD。*HsIκBα*-ORF-GST和Hsc-Rel-RHD-HIS在大肠杆菌BL21小量诱导发现, 以0.5 mmol/L的IPTG、25°C的诱导条件最佳, 230 r/min摇床上培养4h和5h获得诱导目的蛋白量最多(图6和图7)。在大量诱导后, 分别用GST标签和HIS标签树脂纯化*HsIκBα*-ORF-GST和Hsc-Rel-RHD-HIS蛋白, 得到比较单一的蛋白条带(图8)。

GST-pull down则结合SDS-PAGE和Western Blot展示。SDS-PAGE结果图中的泳道3显示*HsIκBα*-ORF-GST和Hsc-Rel-RHD-HIS大小对应的2个蛋白条带, 表明*HsIκBα*-ORF-GST作为诱饵蛋白将有相互作用的Hsc-Rel-RHD-HIS捕获下来(图9)。Western Blot结果图中的1.1泳道有较强的阳性条带, 而阴性对照组1.2、2.1和2.3泳道均没有条带, 表明

HsIκBα-ORF-GST和Hsc-Rel-RHD-HIS蛋白发生相互作用, GST和Hsc-Rel-RHD-HIS、HIS和*HsIκBα*-ORF-GST、GST和HIS蛋白均不发生作用(图10)。

3 讨论

3.1 *HsIκBα*序列的保守性和蛋白降解因素分析

本研究首次获得*HsIκBα*和*Hsc-Rel*的cDNA序列。在IκB家族中, ANK结构域的作用是可以和NF-κB的RHD结合, 及掩盖NLS的作用^[4]。通过结构域分析, 发现在池蝶蚌*HsIκBα*含有6个ANK。同时, 其他软体动物的IκB很多都是含有6个ANK, 比如长牡蛎的2个IκB同源物CgIκB1和CgIκB2、海湾扇贝的AiIκB、盘鲍的HdIκB^[11, 13, 16], 说明*HsIκBα*在软体动物中具有一定的保守性。

当细胞受到脂多糖、病毒和促炎细胞因子等刺激后, 与NF-κB绑定的IκB蛋白被降解后, NF-κB被激活进入核内, 从而启动相关靶基因的转录^[21]。研究发现, IκB降解的必需基序是IκB的N末端基序“DSGXSS”和C末端PEST区域^[22-24]。其中

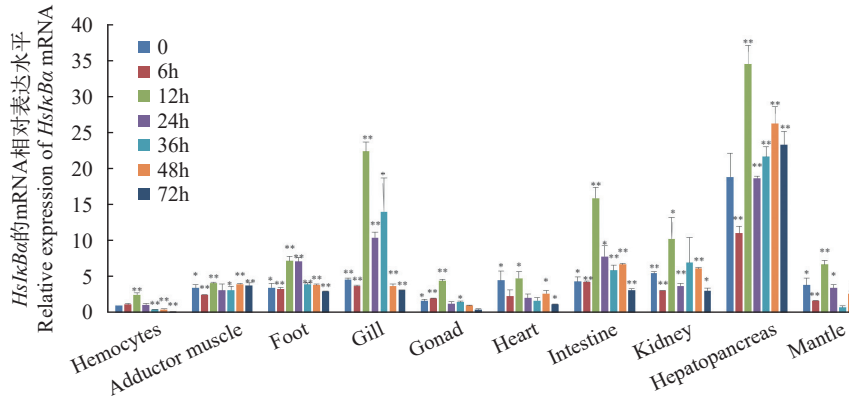


图4 LPS刺激下*HsIκBα*在各个组织的mRNA相对表达水平(当 $P<0.01$ 标记为**; 当 $P<0.05$ 标记为*)

Fig. 4 Relative expression of *HsIκBα* mRNA in various tissues under LPS stimulation (When $P<0.01$ is marked as**, when $P<0.05$ is marked as *)

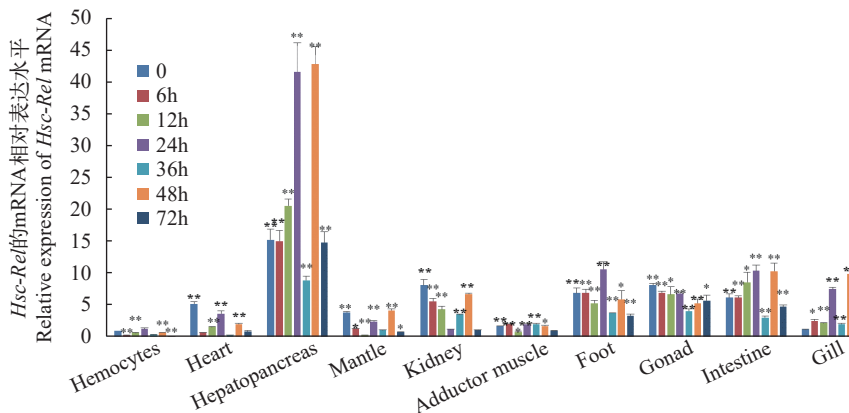


图5 LPS刺激下*Hsc-Rel*各个组织的mRNA相对表达水平(当 $P<0.01$ 标记为**; 当 $P<0.05$ 标记为*)

Fig. 5 Relative expression of *Hsc-Rel* mRNA in various tissues under LPS stimulation (When $P<0.01$ is marked as**, when $P<0.05$ is marked as *)

“DSGXXS”的两个丝氨酸之间形成一个能接收来自不同刺激的信号并控制IκBα降解的调节域。而池蝶蚌HsIκBα含有“DSGIHS”(DSGXSS),这和已报道的长牡蛎CgIκB3存在“DSGXXS”的结果相一致^[12]。C末端PEST区域主要存在于哺乳动物IκB中,富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)^[25],其作用是在响应细胞外信号的刺激后可以

导致IκB迅速降解^[26]。然而,软体动物IκB的降解似乎与PEST区域无关,因为很多软体动物如海湾扇贝、长牡蛎、合浦珠母贝和夏威夷短尾鱿鱼IκB均没有PEST区域^[12-14,27]。HsIκBα也无PEST区域,从而推测软体动物中控制IκB蛋白降解的主要基序可能是“DSGXXS”。

3.2 Hsc-Rel的保守性和NLS作用分析

NF-κB的RHD结构域可以分为3个结构区域:

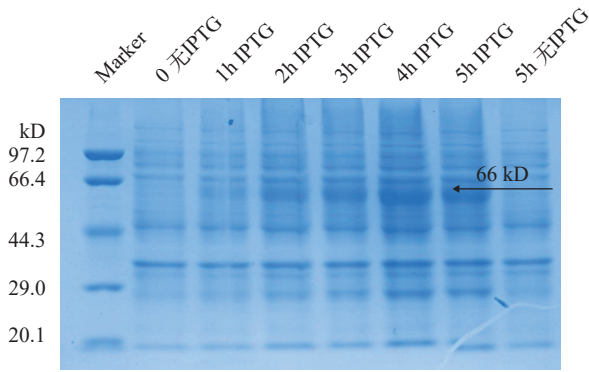


图6 HsIκBα-ORF-GST蛋白诱导表达

Fig. 6 Inducible expression of HsIκBα-ORF-GST protein

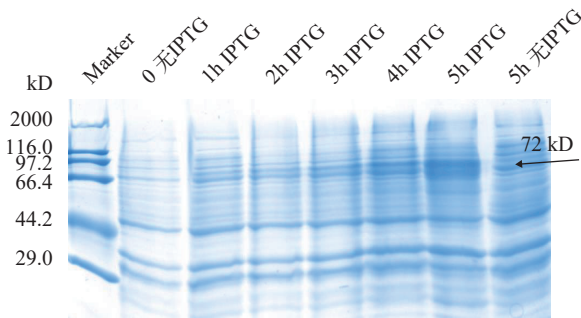


图7 Hsc-Rel-RHD-HIS蛋白诱导表达

Fig. 7 Inducible expression of Hsc-Rel-RHD-HIS protein

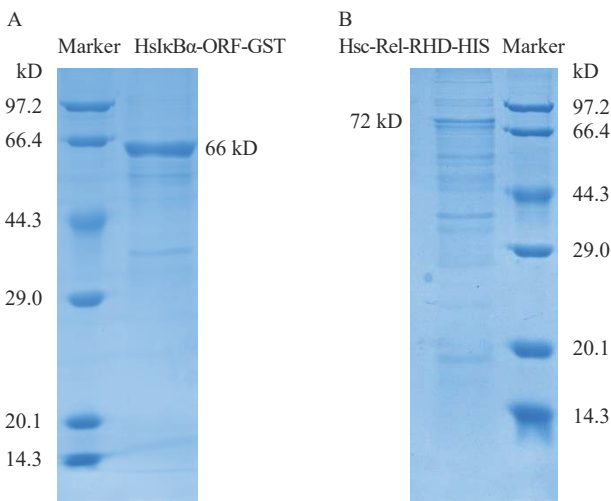


图8 HsIκBα-ORF-GST(A)和Hsc-Rel-RHD-HIS(B)蛋白纯化

Fig. 8 The protein purification of HsIκBα-ORF-GST (A) and Hsc-Rel-RHD-HIS (B)

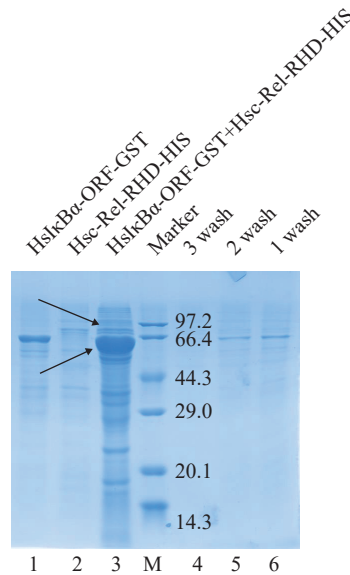


图9 GST-pull down结果SDS PAGE

Fig. 9 SDS PAGE with GST-pull down result

1、2泳道分别是HsIκBα-ORF-GST和Hsc-Rel-RHD-HIS纯化蛋白;3泳道是GST-pull down的实验组;4—6泳道是PBS清洗杂蛋白效果

Lanes 1 and 2 are HsIκBα-ORF-GST and Hsc-Rel-RHD-HIS purified proteins; lane 3 is the experimental group of GST-pull down; lanes 4—6 are PBS-washed proteins

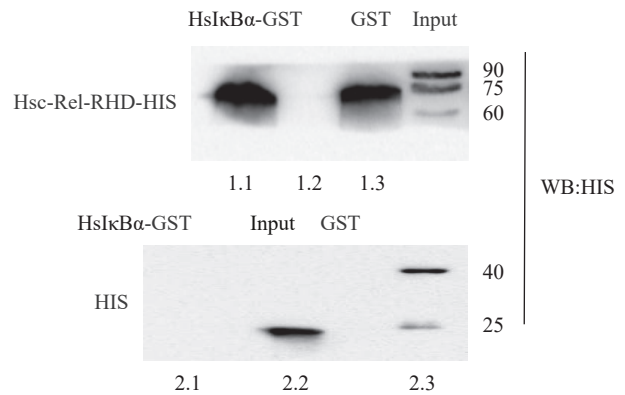


图10 GST-pull down结果-Western Blot

Fig. 10 Western Blot with GST-pull down samples

Western Blot用的是his标签的含HRP的鼠单抗
Western Blot use HRP conjugated anti His-Tag mouse monoclonal antibody

N端结构域(N-terminal domain, NTD)、二聚体结构域(Dimer domain, DD)和NLS^[28]。在脊椎动物中NF-κB-p65-RHD非常保守,如草鱼Cip65^[20]和牙鲈po-p65^[29]的RHD都有DNA结合基序“RGMRFRYKC”和Rel蛋白特征基序“FRYXCE”,以及NLS“KRKR”^[29]。但在池蝶蚌中,Hsc-Rel的DNA结合序列“GYHRFRYMS”(XXXRFRYXX)和Rel蛋白特征序列“FRYMSE”(FRYXXE)有一定的变化,没有p65-RHD在脊椎动物中的保守性高。但是作为*c-Rel*的NLS“KRKR”(KKXK)^[19]高度保守,进一步说明本研究克隆的*Hsc-Rel*是*c-Rel*同源基因,而非其他家族成员。

RHD末端的NLS的作用是当NLS被暴露后会被NLS受体蛋白识别,并随后将带有NLS的蛋白通过核孔转运到细胞核中^[30]。除此之外,Beg等^[19]发现NLS对于IκBα识别NF-κB家族成员中的p65和*c-Rel*并参与结合极其重要,删除NLS的p65和*c-Rel*蛋白不再具有结合IκBα的能力,且发现NLS及其附近有大量带电荷的氨基酸,从而推测氨基酸的带电作用导致了NF-κB和IκBα相互作用。所以在HsIκBα和Hsc-Rel发生互作的实验中Hsc-Rel-RHD-HIS重组质粒保留了NLS信号,并且发现Hsc-Rel的NLS及其附近的10个氨基酸中有6个带电荷。本研究通过GST-pull down实验证明HsIκBα和Hsc-Rel-RHD能发生互作,但是Wang等^[20]发现RHD和TAD的联合能更有效的结合IκBα,Hsc-Rel是否也具有类似作用仍有待进一步研究。

3.3 *HsIκBα*和*Hsc-Rel*基因的表达分析

*HsIκBα*和*Hsc-Rel*在池蝶蚌所检测的各个组织都有表达,两者在肝胰腺表达水平均为最高,这与大多数免疫相关基因在肝胰腺中均有较高表达的相一致^[31, 32],表明肝胰腺在无脊椎动物中是重要的免疫组织^[33]。软体动物血细胞在机体防御反应中发挥重

要作用,特别是血淋巴中的一些酶和调节因子,如溶菌酶、葡萄糖苷酶和凝集素等。本研究检测发现*HsIκBα*和*Hsc-Rel*在血细胞的表达水平最低,较为例外,但IκB在血细胞的表达水平较低的结果在文蛤中也是如此^[15]。此外,*HsIκBα*与其他软体动物中IκB的表达水平不尽相同,比如马氏珠母贝^[14]*poIκB*和文蛤^[15]*Mm-IκB*的mRNA在鳃组织的表达量较高,在闭壳肌表达量相对较低,而在长牡蛎^[11]*CgIκB1*在血细胞和性腺表达较高,而在闭壳肌、外套膜和心脏表达较低,*CgIκB2*在性腺表达最高,其他组织比较低。这表明IκB的组织表达特征存在物种差异性。

在鳃利斯顿氏菌刺激海湾扇贝后,*AiIκB*的表达水平在3h时明显低于对照组,在6h时则高于对照组^[13]。然而,通过对盘鲍进行了LPS、李斯特菌和poly I:C等刺激,发现*HdIκB*的mRNA是在3h时出现上调,在6h时则下降^[16]。对比起来,*HsIκBα*在6h时先下调,在12h时后上调的结果,与海湾扇贝*AiIκB*先下调后上升的情况类似,且这种随着诱导时间的递增而表达水平也发生变化的结果,说明*HsIκBα*在LPS诱导后产生免疫应答的反应。*HsIκBα*在6h时出现表达水平下降,推测是当细胞受到外界刺激后,触发信号级联,从而激活IκB激酶复合物(IKK),使其磷酸化IκB,随后E3泛素连接酶识别后使IκB发生泛素化降解,导致*HsIκBα*的表达水平在刚开始受到抑制。但是*Hsc-Rel*的表达也在6h下调,可能当细胞受到外界刺激后,IκB降解,解除绑定的NF-κB被激活进入核内消灭病原体,但太强或太长时间激活NF-κB会使靶基因如细胞因子过度产生,影响细胞机能运行,进而细胞严格控制NF-κB的活动^[34],使其表达水平下降,推测机制如图11。通过以上的LPS刺激实验,表明*HsIκBα*和*Hsc-Rel*参与了贝类的免疫防御作用,且贝类免疫系统易受外界各种因子胁迫影响。

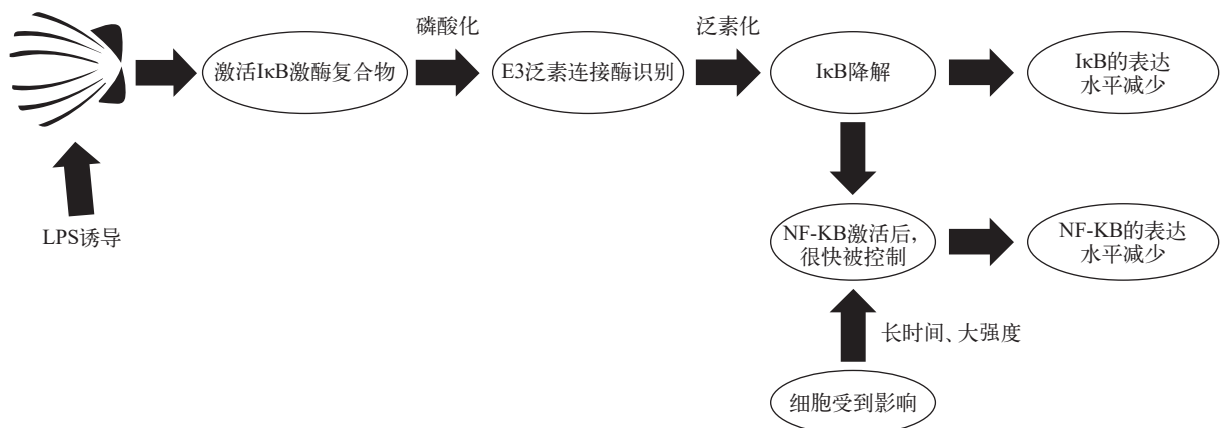


图 11 在LPS刺激下 *HsIκBα* 和 *Hsc-Rel* 的推论机制

Fig. 11 Inference mechanism of *HsIκBα* and *Hsc-Rel* induced under LPS stimulation

参考文献:

- [1] Kopp E B, Ghosh S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity [J]. *Advances in Immunology*, 1995, **58**(1): 1-27.
- [2] Verma I M, Stevenson J K, Schwarz E M, *et al.* Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation [J]. *Genes & Development*, 1995, **9**(22): 2723-2735.
- [3] Grilli M, Chiu J J, Lenardo M J. NF-kappa B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system [J]. *International Review of Cytology*, 1993, **143**(1): 1-62.
- [4] Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses [J]. *Annual Review of Immunology*, 1998, **16**(1): 225-260.
- [5] Lee K, Yim J H, Lee H K, *et al.* Inhibition of VCAM-1 expression on mouse vascular smooth muscle cells by lobastin via downregulation of p38, ERK 1/2 and NF-kappaB signaling pathways [J]. *Archives of Pharmacological Research*, 2016, **39**(1): 83-93.
- [6] Masso-Silva J, Diamond G, Macias-Rodriguez M, *et al.* Genomic organization and tissue-specific expression of hepcidin in the pacific mutton hamlet, *Alphestes immaculatus* (Breder, 1936) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, **31**(6): 1297-1302.
- [7] Baldwin A S, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights [J]. *Annual Review of Immunology*, 1996, **14**(1): 649-683.
- [8] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity [J]. *Annual Review of Immunology*, 2000, **18**(1): 621-663.
- [9] Maruyama T. The nuclear IkappaB family of proteins controls gene regulation and immune homeostasis [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, **28**(2): 836-840.
- [10] Montagnani C, Labreuche Y, Escoubas J M. Cg-IkappaB, a new member of the IkappaB protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, **32**(3): 182-190.
- [11] Zhang Y, He X, Yu Z. Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (IkappaB) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, **30**(6): 1354-1361.
- [12] Xu F, Li J, Zhang Y, *et al.* CgIkappaB3, the third novel inhibitor of NF-kappa B (IkappaB) protein, is involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, **46**(2): 648-655.
- [13] Mu C, Yu Y, Zhao J, *et al.* An inhibitor kappaB homologue from bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, **28**(4): 687-694.
- [14] Zhang D, Jiang S, Qiu L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of the IkappaB gene from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, **26**(1): 84-90.
- [15] Yang Q, Yang Z, Li H. Molecular characterization and expression analysis of an inhibitor of NF-kappaB (IkappaB) from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, **31**(3): 485-490.
- [16] Kasthuri S R, Whang I, Navaneethaiyer U, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of IkappaB from *Haliothis discus discus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, **34**(6): 1596-1604.
- [17] Gilmore T D, Gerondakis S. The c-Rel transcription factor in development and disease [J]. *Genes & Cancer*, 2011, **2**(7): 695-711.
- [18] Correa R G, Tergaonkar V, Ng J K, *et al.* Characterization of NF-kappa B/I kappa B proteins in zebra fish and their involvement in notochord development [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24**(12): 5257-5268.
- [19] Beg A A, Ruben S M, Scheinman R I, *et al.* I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention [J]. *Genes & Development*, 1992, **6**(10): 1899-1913.
- [20] Wang H, Zhu Y, Xu X, *et al.* Ctenopharyngodon idella NF-kappaB subunit p65 modulates the transcription of IkappaBalpha in CIK cells [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, **54**(1): 564-572.
- [21] Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death [J]. *Nature Immunology*, 2002, **3**(3): 221-227.
- [22] Li J, Peet G W, Pullen S S, *et al.* Recombinant IkappaB kinases alpha and beta are direct kinases of IkappaBalpha [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(46): 30736-30741.
- [23] Bender K, Gottlicher M, Whiteside S, *et al.* Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV [J]. *The EMBO Journal*, 1998, **17**(17): 5170-5181.
- [24] Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(22): 13012-13017.
- [25] Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis [J]. *Science (New York, NY)*, 1986, **234**(4774): 364-368.
- [26] Packman L C, Kubota K, Parker J, *et al.* Casein kinase II phosphorylates Ser468 in the PEST domain of the Drosophila IkappaB homologue cactus [J]. *FEBS Letters*, 1997, **400**(1): 45-50.
- [27] Goodson M S, Kojadinovic M, Troll J V, *et al.* Identifying components of the NF-kappaB pathway in the beneficial Euprymna scolopes-Vibrio fischeri light organ symbiosis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11): 6934-6946.

- [28] Ghosh G, Wang V Y, Huang D B, *et al.* NF-kappaB regulation: lessons from structures [J]. *Immunological Reviews*, 2012, **246**(1): 36-58.
- [29] Kong H J, Moon J H, Moon J Y, *et al.* Cloning and functional characterization of the p65 subunit of NF-kappaB from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, **30**(1): 406-411.
- [30] Nigg E A, Baeuerle P A, Luhrmann R. Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms [J]. *Cell*, 1991, **66**(1): 15-22.
- [31] He S, Peng K, Hong Y, *et al.* Molecular properties and immune defense of two ferritin subunits from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, **34**(3): 865-874.
- [32] Peng K, Wang C Y, Wang J H, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis, and cadmium stress-rated expression changes of BTG1 in freshwater pearl mussel (*Hyriopsis schlegelii*) [J]. *Zoological Research*, 2014, **35**(5): 389-397.
- [33] Roszer T. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism [J]. *Cell and Tissue Research*, 2014, **358**(3): 685-695.
- [34] Yamazaki S, Muta T, Takeshige K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(29): 27657-27662.

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF *IKBA* AND *C-REL* AND EXPRESSION ANALYSIS UNDER LPS STIMULATION IN *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

WANG Xiao-Min^{1,2}, ZHOU Ye^{1,2}, MA Hui-Mei^{1,2}, ZAHID Anwar^{1,2}, HU Bei-Juan^{1,2},
PENG Kou^{1,2} and HONG Yi-Jiang^{1,2}

(1. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Animal Resources and Utilization of Jiangxi, Nanchang University, Jiangxi 330031, China)

Abstract: The functions of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and inhibitors of NF- κ B (I κ B) in freshwater shellfish are still unclear. In this study, we analyzed the sequence structure and expression characteristics of *IκBα* and *c-Rel* (*HsIκBα* and *Hsc-Rel*) and the correlation between *HsIκBα* and *Hsc-Rel* in *Hyriopsis schlegelii*. The results showed that the full-length cDNA of *HsIκBα* was 1783 bp with an 1083 bp open reading frame that encoded a total of 360 amino acids. The cDNA of *Hsc-Rel* gene was 2414 bp with the ORF of 2298 bp that encoded a total of 765 amino acids. The GST-pull down experiment was completed by constructing *HsIκBα*-ORF-GST and *Hsc-Rel*-RHD-HIS recombinant plasmids, prokaryotic expression and purification of two fusion proteins. The direct interaction between *HsIκBα* and *Hsc-Rel*-RHD was found. *HsIκBα* and *Hsc-Rel* mRNA level was the highest in hepatopancreas tissues and the lowest in hemocytes. At 6h after LPS stimulation, the expression of *HsIκBα* in 8 tissues and *Hsc-Rel* in 7 tissues were down-regulated; At 12h after LPS stimulation, *HsIκBα* was upregulated in 10 tissues, and all reached the peak. *Hsc-Rel* was only upregulated in hemocytes, heart, hepatopancreas and intestine. At 24h after LPS stimulation, *HsIκBα* was down-regulated in 10 tissues, but *Hsc-Rel* was up-regulated in all tissues except kidney, where the expression of hemocytes, foot, and intestine reached its peak. Between 36h—72h after LPS stimulation, the expression of *HsIκBα* and *Hsc-Rel* in some tissues gradually returned to basic levels, the results showed that the expression of *HsIκBα* and *Hsc-Rel* significantly changed with LPS stimulation, indicating that they were involved in the immune response, and there may be a NF- κ B pathway in response to LPS.

Key words: *HsIκBα*; *Hsc-Rel*; Cloning; Protein interaction; LPS stimulation; *Hyriopsis schlegelii*