

研究报告

Research Report

马氏珠母贝 *IKK ϵ* 同源基因的克隆及表达分析

焦钰 杜晓东* 王庆恒 黄荣莲 邓岳文

广东海洋大学水产学院, 湛江, 524025

* 通讯作者, gdhddxd@hotmail.com

摘要 *IKK ϵ* (inhibitor of NF- κ B kinases ϵ)是 NF- κ B (nuclear factor κ B)信号通路中的关键成员,参与调控细胞的分化、发育、凋亡及免疫反应。本研究根据马氏珠母贝转录组数据库中注释为 *IKK ϵ* 的 unigene 序列设计引物,应用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆获得了马氏珠母贝(*Pinctada martensii*) *IKK ϵ* 基因 cDNA 的全长序列(Pm*IKK ϵ*)并对其序列特征进行分析,同时利用荧光定量 PCR (Real-time PCR)技术检测了马氏珠母贝六个组织中 Pm*IKK ϵ* 基因 mRNA 的表达。结果表明 Pm*IKK ϵ* 基因 cDNA 全长 2 843 bp,其中 5' UTR 为 116 bp,3' UTR 为 516 bp,含有 27 bp polyA,开放阅读框为 2 211 bp,编码 737 个氨基酸残基。预测其分子量为 85.07 kD,等电点为 6.17。多序列比对显示 Pm*IKK ϵ* 与其它物种 *IKK ϵ* 有较高的同源性,与牡蛎的序列相似性有 45%。软件分析结果显示 Pm*IKK ϵ* 的 N 端含有一个蛋白激酶功能结构域和一个 MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase)的激活位点,C 端含有一个亮氨酸拉链(leucin zipper, LZ)和一个螺旋-环-螺旋结构(helix-loop-helix, HLH)。荧光定量 PCR 分析表明 Pm*IKK ϵ* 在马氏珠母贝肝胰脏、性腺、血淋巴、鳃、外套膜、闭壳肌六个组织中均有表达,肝胰脏中表达量最高。本研究为进一步阐述 Pm*IKK ϵ* 在马氏珠母贝生长、发育及先天性免疫中的作用提供理论基础。

关键词 *IKK ϵ* , *Pinctada martensii*, 基因克隆, 荧光定量 PCR

Molecular Characterization and Expression Analysis of *PmIKK ϵ* cDNA from *Pinctada martensii*

Jiao Yu Du Xiaodong* Wang Qingheng Huang Ronglian Deng Yuewen

Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025

* Corresponding author, gdhddxd@hotmail.com

DOI: 10.13417/j.gab.033.000266

Abstract *IKK ϵ* (inhibitor of NF- κ B kinases ϵ) is an important component in the NF- κ B (nuclear factor κ B) signal pathway and plays crucial roles in the differentiation, development, apoptosis and immune response. In this study, based on the unigene sequence annotated as *IKK ϵ* in the transcriptome database of *Pinctada martensii*, using rapid amplification of cDNA ends technology, the full length of *IKK ϵ* gene was obtained from *Pinctada martensii* (Pm*IKK ϵ*). The obtained full length of Pm*IKK ϵ* cDNA was 2 843 bp, containing a 5' untranslated region (UTR) of 116 bp and a 3' UTR of 516 bp with 27 bp polyA tail. The open reading frame (ORF) was 2 211 bp encoding 737 amino acid residues. The predicted molecular weight was 85.07 kD, isoelectric point was 6.17. Multiple sequence alignment indicated that *IKK ϵ* was highly conservative among species and Pm*IKK ϵ* had 45% sequence identity with that from *Crassostrea gigas*. The N-terminal region contained a kinase domain and a mitogen-activated protein kinase kinase (MAPK), The C-terminal region contained a leucine zipper (LZ) domain and a helix-loop-helix (HLH) motif. Real-time PCR analysis demonstrated that Pm*IKK ϵ* was constitutively expressed in all studied tissues (adductor muscle, gonad, hepatopancreas, mantle, hemocytes, gill) in *P. martensii* with the most abundant mRNA in the hep

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(31272635, 41206141, 31372526)、广东省自然科学基金(S2012040008042)、广东省教育厅育苗工程(2012LYM_0074)和广东海洋大学博士启动项目(1212318)共同资助

atopancreas. These studies provide the basis for the further study of the function of PmIKK ϵ in growth, development and innate immunity in mollusk.

Keywords IKK ϵ , *Pinctada martensii*, Gene clone, Real-time PCR

核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 是一种广泛存在于真核细胞内的核内转录因子, 是多种信号途径的汇聚点, 参与调控细胞的增殖、凋亡、分化、应激和免疫反应(曾朋等, 2007; 杨建营等, 2011; Huang et al., 2012)。在未受刺激的细胞中, NF- κ B 与 I κ B (inhibitor of NF- κ B) 蛋白结合, 使 NF- κ B 无法进入细胞核发挥转录因子的功能(Zhang et al., 2009; 杨建营 et al., 2011)。I κ B 激酶(I κ B kinases, IKKs) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 目前发现 IKKs 由具有催化活性的 IKK α 、IKK β 、IKK ϵ 和没有催化活性的 IKK γ 和 IKAP (IKK complex-associated protein) 五个成员组成。IKKs 能磷酸化 I κ B 上的特定位点, 使 I κ B 泛素化并最终被蛋白酶体降解, 解除 I κ B 对 NF- κ B 的抑制作用, 从而使 NF- κ B 入核发挥转录因子的功能(Xiong et al., 2008)。IKK ϵ (I κ B kinase epsilon) 为 IKK 家族新发现的成员之一, 与较早发现的 IKK 家族成员 α/β 一样, 在 N 末端都包含一个丝氨酸/苏氨酸激酶结构域(李会兵, 2012)。研究发现 IKK ϵ 不仅可以通过磷酸化 I κ B 来激活 NF- κ B, 在果蝇中, IKK ϵ 过表达达到一定的程度时, 能够直接与 IAP1 (inhibitor of apoptosis proteins 1, IAP1) 结合并使之磷酸化, 使 IAP1 失去了抑制 caspases 的能力, 以间接的方式影响细胞正常形态的发生以及其它生理进程(Bergmann, 2006)。

马氏珠母贝是我国培育海水珍珠的主要贝类。已有学者对马氏珠母贝的 NF- κ B 同源物(Wu et al., 2007; Huang et al., 2012) I κ B (Zhang et al., 2009) 进行了序列分析并检测了它们在脂多糖 LPS 和溶藻弧菌刺激下的反应。Xiong 等(2008) 在马氏珠母贝中发现了 IKK 同源物(Pf-IKK), 其序列与老鼠(mouse)的 IKK- α 有 39% 的同源性, 与牡蛎(*Crassostrea gigas*) 的 IKK- α 有 66% 的同源性。这些研究均表明在马氏珠母贝体内存在典型的 NF- κ B 信号通路。IKK ϵ 作为 IKK 家族新发现的成员之一, 在马氏珠母贝中还未见报道。本研究采用 RACE 技术获得了马氏珠母贝 IKK ϵ 基因全长序列(PmIKK ϵ), 同时利用荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术检测了 PmIKK ϵ 在马氏珠母贝六个组织中的表达量, 旨在为进一步阐述 NF- κ B 信号通路在马氏珠母贝体内各种生理进程中的作用提供理论基础。

1 结果与分析

1.1 PmIKK ϵ 基因的克隆及序列分析

根据马氏珠母贝珍珠囊的转录组数据库中注释为 IKK ϵ 的 unigene 序列设计 IKK ϵ 基因的特异性引物, 采用 5' RACE 扩增 IKK ϵ 基因的 5' 上游序列, 3' RACE 扩增 IKK ϵ 基因的 3' 下游序列, 分别获得了 186 bp 的 5' 端上游序列和 2 282 bp 的 3' 端下游序列, 序列经拼接后获得 2 843 bp 的马氏珠母贝 IKK ϵ (PmIKK ϵ) 基因 cDNA 全长序列(图 1)。该序列 5' UTR 为 116 bp, 3' UTR 为 516 bp, 包含 27 bp 的 polyA 尾巴, 开放式阅读框为 2 211 bp。预测其分子量为 85.07 kD, 等电点为 6.17。

1.2 PmIKK ϵ 基因氨基酸序列分析

PmIKK ϵ 可编码 737 个氨基酸, 软件分析结果显示 PmIKK ϵ 的 N 端含有一个蛋白激酶功能结构域, 一个 MAPKK 的激活位点, 在 C 端含有一个亮氨酸拉链(leucine zipper, LZ) 和一个螺旋-环-螺旋结构域(helix-loop-helix, HLH) (图 1)。采用 ClusterW5.0 将马氏珠母贝的 IKK ϵ 与其它物种 IKK ϵ 蛋白序列进行多序列比对分析, 结果表明, 各物种间的 IKK ϵ 有较高的保守性, PmIKK ϵ 与牡蛎的序列相似性有 45%, 保守性区域多位于 IKK ϵ 蛋白 N 端的蛋白质激酶结构域部分。PmIKK ϵ 同已报道的马氏珠母贝 IKK 同源物的相似性仅为 27% (图 2), 说明 PmIKK ϵ 与已报导的 IKK 同源物属于不同的 IKK 家族。采用 MEGA5.1 软件将马氏珠母贝、牡蛎、凡纳滨对虾、果蝇、罗非鱼、鼠和人的 LST8 蛋白序列进行聚类分析, 如图 3 所示, 马氏珠母贝与牡蛎聚在一起, 人、鼠和罗非鱼聚在一个分支, 果蝇和凡纳滨对虾聚在一个分支, 聚类结果与传统的分类吻合。

1.3 PmIKK ϵ 的组织定量分析

采用荧光定量 PCR 检测了马氏珠母贝 IKK ϵ 基因 mRNA 在六个组织中的表达, 结果显示 PmIKK ϵ 在马氏珠母贝的外套膜、肝胰脏、鳃、珍珠囊、闭壳肌和性腺中均有表达, 但表达量存在显著性的差异, 在肝胰脏中的表达显著高于其它组织, 其次是性腺和鳃(图 4)。


```

1  acatggggacccattttttacgtttatcagactcgaaatteccttcttctatttttttcttcaatgataaataagttttataacat
1  M A F Y R D T E N H V Y S Q E D C L G R G A
91  gacatagcgcgacagattatttcaaaATGGCTTCTACCGAGATACTGAAACCATTGTATACAGTCFAAGAAGATTGTCTTGGAAAGGGG
23  T G D V Y L G I N K I T G E K R A L K M F D P R Y T A Q I A
181 CAACAGGTGACGTTTACTTGGGGATCAACAAGATACTGGAGAGAAAAGGGCCTTAAAGATGTTTGACCCCAATACACAGACAAAATTG
53  R E V D A L L K L Q H P N I T K F Y O I E Q D F S T K K S V
271 CCAGAGAGGTGGATGCCCTCCTCAAGCTACAGCACCCAAAATATAACAAAGTTCTACCAAATTGAGCAAGATTTTTCAACCAAGAAATCTG
83  L V M E L C E R F G N L L E L L R E P Q N N L G L S E E F E F V
361 TGCTGGTTATGGAGCTATGTGAGAAAAGAAATCTGCTGGAATTTGCTGAGAGAGCCACAGAACAACCTGGGGCTCTCTGAAGAAGAATTTG
113 H F F R H L V S G M K H L R Q Q G F S H R D I K P G N I L V
451 TACATTTCTTACAGACATTTAGTTTCTGGAATGAAACATCTACGACAGCAAGGTTTTTCTCATCTGACATAAAGCCTGGTAACATCTTGG
143 C V D P D G S L V Y K L S D F G T A K P L N D A K P L F Q S L
541 TTTGTGTCGACCCAGATGGCAGCCTGGTGTACAAGCTCTCAGACTTTGGTACAGCTAAGCCTCTAAATGATGGGGATTCTTCCAGTCTC
173 V G T E E Y L H P D I F R A A F I D N R R Q R E F N I S A D
631 TGGTGGGAACAGAGGAATATTTGCACCCCTGATATATTTAGAGCGGGCTTCAATGACAACAGAGGCAGCGTGAGTTTAACATTTCCGGCAG
203 L W A T F H A C T E R G V V Q E Q T Y S Q S T K H I D C
721 ACCTTTGGAGTTTAGGTGCCACTGTTTCATCGCTGCACAGGTAGAGTTCCTTTCCAGCCGACTCGGGACGATGGACAAGCCAACAA
233 Y N M T S K K E S G V I S G I Q S S Q G G E I E W C R E L P
811 TGTACAACATGACATCAAGAAGAGTCAGGTGTAATATCAGGTATCCAGTCAAGTCAGGGTGGAGAGATAGAATGGTGTAGGGAGCTCC
263 H T C R Y S K Y L K R D V L T E M L V R L L E C H G Y R M W T
901 CACATACATGTAGATACTCAAAATATCTGAAAGACGTACTGACAGAGATGCTCGTTCGCTACTTGAATGTCATGGTTACCGCATGTGGA
293 F D G G F F V E A D E L L N M K R I H V F T T I D F R H S Y V
991 CGTTGACGGATTTTGTGGAAGCAGATGAACLTAAACATGAAGCGGATCCATGTCTTCAACAACATTTAGACATTTCTTATG
323 Y I N P K A S V K E F K E V V Q E Q T Y S Q S T K H I D C
1081 TTTATATAAACCCAAAAGCAAGCGTTAAAGAATTCAAAGAAGTGGTCCAGGAGCAGACATACAGTCACTACAAAACACCACATTGATT
353 R G H G V M V F G S G H D K C S D G F L V S D I P S T S P E
1171 GCCCGGACATGGCGTAATGGTTTTTCGGAAGCGGGCATGACAAATGTAGTGACGGTTTTTCTGTAAGTGATATCCCGTCAACGTCACCCAG
383 S P L V I S D T E C K Q C A H V Q T D S V F W T Q Y A E V S
1261 AATCACCCTGGTTATATCAGACACTGAGTGTAACAGTGTGCACATGTACAGACAGATTCGCTTCTCGGACACAGTATGCTGAAGTGT
413 S L D F N G E S S L H Q T E E D Y R T A K R M C M M M S K L
1351 CATCTTTAGATTTCAATGGAGAATCGGCTTACATCAGACTGAGGAGGATTACAGAACGGCAAAGCGTATGTGCATGATGATGCTAAAC
443 S S I V I S D T E C K Q C A H V Q T D S V F W T Q Y A E V S
1441 TTAGCAGTATTGCTCTCAGACAAATCGCTCTGTGGCATTAGCTAATGAGGCTATGTTATCTTGCAGGTGTGAAC TACAACACCCGGATTA
473 K L C S E R E Y L R H R F Y D V D T L I Q K D K K S V A E E
1531 AGAAACTGTCTCTGAGAGGGGAATATTTACGTCATCGTTTTTATGATGTAGTACTCTGATACAGAAAAGCAAAAATCCGTAGCGGAGG
503 F T T V I S D T E C K Q C A H V Q T D S V F W T Q Y A E V S
1621 AATTTACAACAGTGAAGTGTCAACGGTGAATTTGTTGGAGGATGATAGGTCTAAGGCGGAAGCAAGCTGAACGAGTGTCTCATTGAAAC
533 F T K K L H H E R S S I L D E K N T E D L K K K T R Q A L R
1711 ACTTTACAAAAGAACTTCATGAGCGGCTTATCTTCTAGATGAGAAAATACAGAGGATCTCAAGAAAAGAGACGAGACAAAGCTTTAC
563 L Y E E S E S L L A K F S E R R K K P I L K Y H E Q Q F Q I
1801 GTCTGTATGAAGAAAGTGAATCACTCTTGGCAAAGTTTTTCGGAAGACGAAAGAACCCATCTGAAATACCACGAGCAACAGTTCCAAA
593 F D R L T M K K L Y D N V L S I A E K A R D I S N E L N I F
1891 TATTCAGACAGATGCAATGAAGAGCTGTATGACAGCTATTGAGTATTGCTGAGAAAAGCCAGAGATATTTCAAATGAACATGAATATT
623 Y I A W N N K H R I S Y M E V C D T Y E E E L D C I R S S I
1981 TCTACATTTGCTTGGAAATCAACAACATCGTATAAGTTATATGGAGGTCTGTGATACGTACGAGGAGGAGTTAGACTGTATCAGAAGTTCCA
653 A E I V Q N M K G I H D P P L P S I S Q R K L A Y D V K K A R
2071 TCGCCGAAATGTACAGAAATGAAGGGTATTCATCTCCCGTACCATCTCAGAGCCTAAGCTGAGTGGCTTACGACGTAAGCTGCTGTCACG
683 V N S I L E T E I S E S K S L L Q E S R L Q I E S L S S L M
2161 GGGTAAACTCTATTTTGGAAACAGAAATATCAGAATCAAAGTCCCTGCTTCAAGAAAAGTCACTACAAATGAAAGTTTATCATCACTGA
713 A D L P T L N D S I T E D L T T L K P A D S N H S
2251 TGGCAGATCTGCCACATTAACGACTCTATAACAGAGGACCTTACCACATAAAAACCTGCTGACTCAAAACACAGCgtgacctgtcata
2341 cggcaggctgaacatttgttttagagctatcgatcgttgcctcttcttacagtatcttcaatttatatttgaagcttcatgatgaacaga
2431 atgtacatgtaaattatttttagtgattgttttagctatgcagggttgtttgaaactacgtgtaattcagttttagaattgagctttaca
2521 tgcacatgaattcagaccttcttactctctgtatttgaccgtatattatgcatactctttgaaaaaatatttactgaattcagactgaaat
2611 agaaaaatattgatacctcaaatccagaggataagcaacttgttttagtgacagctgaatgcatacgaaaaaaattatcatgctgtcacg
2701 atttagatttacacacaactcttagcaaatccaacttgggttggtatattcttctattttctataatttcccacatcacacactgacatccc
2791 aaatggaaaattcttgggtggttgcacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 1 马氏珠母贝 *PmIKKε* 基因序列分析

注: 大写字母代表编码序列(ORF); 小写字母代表非编码序列(UTR); 灰色框显示蛋白激酶结构域(13~283); 其中的 MAPKK 激活位点用下划线标记(237~241); 斜体及下划线标识的是亮氨酸拉链的结构域(513~566); 无色框标记螺旋环螺旋结构域(587~661)

Figure 1 Sequence analysis of *PmIKKε* gene

Note: Open reading fragment are shown in capital letters; 5' and 3' UTR regions are shown in small letters; Protein kinase domain is shown in grey box (13~283); The underlined sequence (237~241) is MAPK active site; The underlined italic letters (513~566) is leucine zipper (LZ) domain; Helix-loop-helix (HLH) motif is shown in colorless box (587~661)

2 讨论

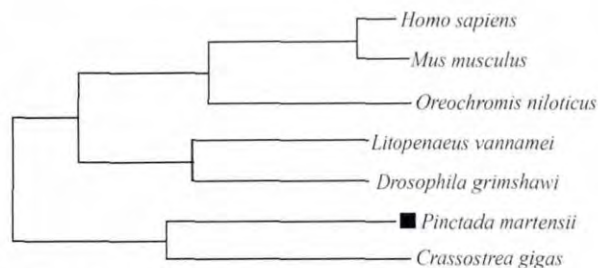
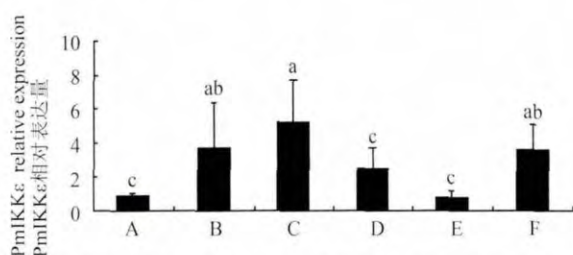
真核生物细胞核转录因子 NF- κ B 广泛存在于从昆虫到人类的各种生物细胞中, 参与调控细胞的分化、发育、凋亡、黏附及炎症反应。IKKs 在 NF- κ B

的活化过程中发挥重要作用。当细胞受到外部信号刺激时, 激活的 IKKs 使 I κ B 磷酸化, 磷酸化的 I κ B 被泛素化和降解, 从而使 NF- κ B 解除了 I κ B 的抑制作用。IKKs 家族有五个组成成员: IKK α 、IKK β 、IKK ϵ 和 IKK γ 和 IKAP。在哺乳动物内, IKK ϵ 同 IKK α 和

	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Pinctada martensii</i>	-MAFYRDTEN	HVYSQEDCLG	RGATGDVVLG	INKITGEKRA	LKMFDP----	RYTAQIAREV	DALLKLOHPN	ITKFYQIEQD
<i>Crassostrea gigas</i>	-MSTYRATEN	VYVKTDECIG	RGATGDVYKQ	VHKVIGEHEA	LKLCDS----	RFTQQLQREV	EAMRQLOHPN	ITKFYQIEYD
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-MAFLRGSAN	YVWCTTSVLG	KGATGAVFQG	VNRHTEGEPVA	VKTFNQLSHM	RPHEVQMRFE	EVLKRVNHNH	IVKLLAIEEEE
<i>Drosophila grimshawi</i>	-MSFLRGLSN	YVWCTTSVLG	KGATGAVFQG	VNKITGESVA	VKTFNFPYSHM	RPADVQMRFE	EALRKNVHNH	IVKLLAIEEED
<i>Oreochromis niloticus</i>	MSGMTASTIS	YLWSLDDVLG	QGATASVYKA	RHKRSQELVA	VKVFNIMSYN	RPHEVQMRFE	EMLRKLHNHN	IKLFTVEELE
<i>Homo sapiens</i>	-----MQSTAN	YLWHTDDLLG	QGATASVYKA	RNKKSQELVA	VKVFNTTSYL	RPREVQVREF	EVLRLNHNQN	IVKLFAVEET
<i>Mus musculus</i>	-----MQSTTN	YLWHTDDLLG	QGATASVYKA	RNKKSQEVVA	VKVFNSASYSR	RPREVQVREF	EVLRLNHNQN	IVKLFAVEET
	90	100	110	120	130	140	150	160
<i>Pinctada martensii</i>	FSTKKSVLVM	ELCEKGNLLE	LLREPOQNLG	LSEEEFVHFF	RHLVSGMKHL	RQQGFSHRDI	KPGNILVCVD	PDGSLVYKLS
<i>Crassostrea gigas</i>	KESAKPILVM	ELCEKGNLLE	LLREPSNAFG	LPEEYLRF	SHLVSGMKHL	RQNGFSHRDI	KPGNILVCI	DDGSYVYKLS
<i>Litopenaeus vannamei</i>	QEGRGKIVM	ELCTGGSLFN	ILDDPENSHG	LEEDEFILVL	SHLAAGMKHL	RDNLSLVHRDL	KPGNIMKFTD	VDDGTTIYKLT
<i>Drosophila grimshawi</i>	QEGRGKIVM	ELCTGGSLFN	ILDDPENSHG	LEEDEFILVL	EHLGAGMKHL	RDNKLVHRDL	KPGNIMKFTD	EDGQTIYKLT
<i>Oreochromis niloticus</i>	P-SKQKVLVM	EYCSGGSLLS	LLEEPENAFG	LAETEFLLVL	QCIVQGMNHL	RENGVVHRDI	KPGNIMRQVQ	EDGRSVYKLT
<i>Homo sapiens</i>	GGSRQKVLVM	EYCSGGSLLS	VLESPENAFG	LPEDDEFVLV	RCVVAGMNH	RENGIVHRDI	KPGNIMRQVQ	EEGQSTIYKLT
<i>Mus musculus</i>	GGSRQKVLIM	EYCSGGSLLS	VLEDPENFG	LSEEEFLVVL	RCVVAGMNH	RENGIVHRDI	KPGNIMRQVQ	EEGQSTIYKLS
	170	180	190	200	210	220	230	240
<i>Pinctada martensii</i>	DFGTAKPLND	GDFPFQSLVGT	EYELHPDIFR	AAFIDNRRQR	EFNISADLWS	LGATLPHACT	GRVPFPQVSG	-RLDKPTMYN
<i>Crassostrea gigas</i>	DFGTAKPLND	GDFPFQSLVGT	EYELHPDIFR	AAFIERHRPR	EFDISVDLWS	LGATLPHACT	GRVPFPQVSG	-RGDKQTMFQ
<i>Litopenaeus vannamei</i>	DFGAARELQD	DQDFMSLYGT	EYELHPDIME	RAVLRKPVQK	TFGARVDLWS	IGVTLYHVAT	GQLPFRPYGG	-RRNKREIMYH
<i>Drosophila grimshawi</i>	DFGAARELED	NQPFASLYGT	EYELHPDLYE	RAVLRKSIQR	SFTANVDLWS	IGVTLYHVAT	GQLPFRPYGG	-RKNREIMYH
<i>Oreochromis niloticus</i>	DFGAARELED	DEKFSVIYGT	EYELHPDIME	RAVLRKPHKQ	SYGVSVDLWS	IGVTLYHAAT	GSLPFTPYEG	PRRNKPIMFQ
<i>Homo sapiens</i>	DFGAARELDD	DEKFSVSYGT	EYELHPDIME	RAVLRKPPQK	AFGVTVDLWS	IGVTLYHAAT	GSLPFTPYEG	PRRNKEIMYR
<i>Mus musculus</i>	DFGAARKLDD	DEKFSVSYGT	EYELHPDIME	RAVLRKPPQK	AFGVTVDLWS	IGVTLYHAAT	GSLPFTPYEG	PRRNKEIMYR
	250	260	270	280	290	300	310	320
<i>Pinctada martensii</i>	MTSKKESGVI	SGIQSSQGGE	IIEWCRELPH	CRYSKYLKDV	LTEMLVRLLE	CHGYRMWTFD	GFFVEADELL	NMKRIHVFTT
<i>Crassostrea gigas</i>	MISHKDPGVI	SGEQTSATGD	IIEWSKELPKT	CRLSKYLKDV	LTEFLVRLLE	CQANRMWTFD	GFFVAAADLL	QKHLRYLFSV
<i>Litopenaeus vannamei</i>	ITTEKAPGVI	SGVQTSSENGP	IDWCTELPTE	CQLSLGLRKL	VTPLLAGLLE	VDPQRMWTFE	RFFQEVITML	SKKVVHIFV
<i>Drosophila grimshawi</i>	ITTKKASGVI	SGTQLAENGP	IWESTLPPH	AHLSQGLKTL	VTPLLAGLLE	ENRDKTWSEF	RFFQEVITML	RKNSVHVFET
<i>Oreochromis niloticus</i>	ITTEKPMGAI	AGIQRAEAGP	IIEWSYHLPHS	CQLSLQGLRVQ	LVPVLAGIME	ADQEKWCWFD	QFFATTDIL	QRQAVHLFSL
<i>Homo sapiens</i>	ITTEKPAAGI	AGAQRRENGP	LEWSYTLPI	CQLSLGLQSQ	LVPILANILE	VEQAKCWGFD	QFFAETSDDL	QRVVHVHVSF
<i>Mus musculus</i>	ITTEKPAAGI	SSTQRQENGP	LEWSYSLPIT	CRLSMGLQSQ	LVPILANILE	VEEDKWCWFD	QFFAETSDDL	QRVVHVHVSF
	330	340	350	360	370	380	390	400
<i>Pinctada martensii</i>	IDFRHSYVYI	NPKASVKEFK	EVVQEQYTSQ	STKHHIDCRG	HGVMVFGSGH	DKCSDGFLVS	DIPSTSPESP	LVISDTECKQ
<i>Crassostrea gigas</i>	VDSLELHYIM	DPTHRFSLELQ	KCIQEQTYTH	CRISQPFMFHN	QDLKESVSLN	EP-----VR	SPVPTSAEPE	IVVLPLREGT
<i>Litopenaeus vannamei</i>	NKRVQPLTVM	DEPEHRVEELQ	YLICQEQTMN	PNVQLLLYDK	RHLSLDIVADP	QPSSS----	YYPSTTPRTP	LVLFQSKQDN
<i>Drosophila grimshawi</i>	NRATSEVFL	EPDEQIDNFR	ERIFLQTEVP	LEKQIMLFNN	EHLKRVSPR	TLVNA----	-FPSTIMDQP	IFLYSNDNN
<i>Oreochromis niloticus</i>	QQTMACHYI	HHYNTVSIF	EVAASQGTG	VQQQHLMYLG	HDLLLEGS	MKVM-----	-LPRTPSPQF	LLLLTYASEA
<i>Homo sapiens</i>	SQAVLHHIYI	HAHNTIAIFQ	EAVHKQTSVA	PRHQEYLFE	HLCVLEPS	VSAQH----	-LAHTTASSP	LTLFSTA--I
<i>Mus musculus</i>	PQAVLHHVYI	HAHNTIAIFL	EAVYEQTNTV	PKHQEYLFE	HPCVLEPS	LSAQH----	-LAHTAASSP	LTLFMSDST
	410	420	430	440	450	460	470	480
<i>Pinctada martensii</i>	CAHVQDTSVF	WTQYAEVSSL	DFNGESSLHQ	TEEDYRTAKR	MCMMMSKLS	IVSQTNRSVA	LANEAMLSR	CELQHRIRKL
<i>Crassostrea gigas</i>	SLTTRIPVDS	IVNLVNLNLP	RFESDSSSR	-DDDYRAARS	MCSTTALILK	AISQASACR	LLSKSSRDCR	YSTARQKYSL
<i>Litopenaeus vannamei</i>	ITLTLPL---	-----ETPAV	KFGSFPPLVS	VEHDAAVGKS	MCSVGHAIKR	KIDYFSKCVH	LMDYGVLMFI	EVIVTQLITL
<i>Drosophila grimshawi</i>	QVLPH---	-----QLELP	KFPVFPNVS	VENDASLAKA	ACSVGHECKR	RVDIFPTMDI	LIKKGVEQFI	EMLITITLITL
<i>Oreochromis niloticus</i>	NLTLSE---	-----REP-	ESPVIIPARF	VMADYNFSKI	VVGVVHQYLR	IVKLLHRHRE	LLLQGYYSYI	MKLNRECREA
<i>Homo sapiens</i>	PKGLAF---	-----RDPAL	DVPKFPVKVD	LQADYNTARG	VLGAGYQALR	LARALLDQGE	LMFRGLHWVM	EVLQATCRRT
<i>Mus musculus</i>	PKGLAF---	-----RDPAL	DVPKFPVKVD	LQADYSTARG	VLGAGYQALW	LARVLLDQGA	LMRLGLHWVL	EVLQDTCQQT
	490	500	510	520	530	540	550	560
<i>Pinctada martensii</i>	CSEREVLHRH	FYDVTDLIQK	DKKSVAEEFT	TVSVNGDIVE	DDRSKARSKL	NECSSFEHFT	KKLHHE----	-----RSSILD
<i>Crassostrea gigas</i>	KSSVKNIEDR	YGDIRQIVDS	DRTKSTTLFT	TIALDGHVAE	EKFEQINNKL	EACASLLGDC	KERHK-----	-----LEELTR
<i>Litopenaeus vannamei</i>	QDRVGHVQSL	TSAVSDRFSQ	LVANRRFLM	LTMQCGNQG	SSSQPLRERL	EDLVNKKVDA	EKAARDSLNA	MLPVMQVLYE
<i>Drosophila grimshawi</i>	LKRTESFDNL	LSTVVD-YAD	VVQST----	-ASMTKGDQE	-----LRSLA	SSLDVSKTEF	DGAA-----	-----DVTQMYK
<i>Oreochromis niloticus</i>	LHSIAMVTR	LQSCLNAEHT	IKTLG-PYSS	ENQGSAAANG	R-----LRQVH	QHLPVYSAGI	QEFQNR----	-----LDQLQI
<i>Homo sapiens</i>	LEVARTSLLY	LSSSLGTERF	SSVAGTPEIQ	ELKAAELRS	R-----LRTL	EVLRSQSNM	TETQES----	-----LSSLNR
<i>Mus musculus</i>	LEVVRTALLY	LSSSLGTERF	SSGAGMPDVQ	ERKEATELRT	R-----LQTL	EILSRCSHMV	TETQRS----	-----LSSLGE
	570	580	590	600	610	620	630	640
<i>Pinctada martensii</i>	EKNTEDLKK-	-----KTRQ	ALRLYEESES	LLAKFSERRK	KPILKYHEQQ	FQIFDRLIMK	KLYDNVLSIA	
<i>Crassostrea gigas</i>	LMDCFRQEN-	-----LRSS	VERTSSQMSD	ILLKFSEYRK	SPRLSVHERK	LYGFDKTSMT	YHYQRAVSYA	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	RVRVGGQLRR	QWQ--QTGNN	ALAVRAPNK	ASTYVIKLR	SWQHLLDRDRA	ARTLTFNDEQ	FHLEKMKMK	ETAKSLETLL
<i>Drosophila grimshawi</i>	HYVTDELND	QWSSLMHGKK	CPCTRASAQ	AKYVLERLD	SWQHLLDRDRA	TRTLTYNDEQ	PHALEKIKVD	HNGKRIKQLL
<i>Oreochromis niloticus</i>	EQAKLAETLA	ND-----KSCQ	IEMLLQKITA	IHQYRKRDL	TGKLAYNDEQ	IHKFEKIHLS	SHIKRVKSLF	
<i>Homo sapiens</i>	ELVKSRDQVH	ED-----RSIQ	IQCCLDKMF	IYKQFKKSRM	RPGLGVNEEQ	IHKLDKVNFS	HLAKRLQVQF	
<i>Mus musculus</i>	ELLNDRDQIH	EDN-----KSIQ	IQCCLDKMF	IYKQFKKSRM	RPGLSYNEEQ	IHKLDKVNFS	HLAKRLQVQF	
	650	660	670	680	690	700	710	720
<i>Pinctada martensii</i>	EKARDISNEL	NIFYIAWNK	HRISYMEVCD	TYEELDCIR	SSIAEIVQNM	KGIHDPPL--	----PSISQR	KLAYDVKKRV
<i>Crassostrea gigas</i>	KKVQHSMAST	FTSFKRWHSA	Y-IKVIEHGE	KVDAATMEVS	RQLQEVVSYV	KVLKDPILS	SVKKSMTQR	QLAEQVKTRV
<i>Litopenaeus vannamei</i>	AS-VTATLHH	TTDNLADWCK	VAKVQRVQTE	IEEADVEKHE	GLLASFDTEL	GNT-----	EDQYHQTLSS	I-----
<i>Drosophila grimshawi</i>	LDNVSPAVAQ	MAECLADWYK	LAQTVLTKTQ	ILEKDVRCDE	RKLHARDEL	YHKSEQKLD	ADTRNINSNN	Q-----
<i>Oreochromis niloticus</i>	REDCVQRYKE	VLVSAKTWNS	LMLEMQTRLQ	DFSSFSAGLM	ADLEMSECCQ	NKVMDDILYT	LQSK-----	-----RPE
<i>Homo sapiens</i>	QEECVQYQYA	SLVTHGKRM	VVHETRNHLR	LVGCSVAACN	TEAQQVQESL	SKLLEELSHQ	LQDRAKGAQ	ASPPVIAPIY
<i>Mus musculus</i>	QEECVQYQVQ	SLVTHGKRM	VQVRAQNHLL	LIGHSVATCN	SEARGAQESL	NKIFDQLLLD	RASE--QGAE	VSPQPMAPHP
	730	740	750	760	770			
<i>Pinctada martensii</i>	NSILETEISE	SKSLLQESRL	QIESLSSLMA	DLPTLNDISIT	EDLTLKPAD	SNHS		
<i>Crassostrea gigas</i>	N-VISQDMS	SKQIAQESRI	HMESLSSML	D-----	-DLEDCLSD	----		
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-LAAIKDK-K	LQDDPRLQTE	VA-----					
<i>Drosophila grimshawi</i>	-LAKIEERNR	LRIMKQQQLE	VMAVMKKNSD	LIALLNFAV				
<i>Oreochromis niloticus</i>	-KNDNDQVSR	MHLKKEEMEI	LVRELQCNNG	IIESLGAVNS				
<i>Homo sapiens</i>	SPTRKDLLLH	MQELCEGMKL	LASDLLNDR	IIERLNRVPA	PPDV-----			
<i>Mus musculus</i>	GPDPKDLVPH	MQELCNDMKL	LAFDLQDNR	LIERLHRVPS	APDV-----			

图2 IKKε 蛋白质序列多序列比对

Figure 2 Multi-alignment of IKKε

图3 *IKK ϵ* 蛋白质序列聚类分析Figure 3 Cluster analysis of *IKK ϵ* protein sequence图4 *PmIKK ϵ* 基因 mRNA 在马氏珠母贝不同组织中的表达分布

注: A: 闭壳肌; B: 性腺; C: 肝胰腺; D: 外套膜; E: 珍珠囊; F: 鳃; 柱上的不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$); 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$)

Figure 4 Expression patterns of *PmIKK ϵ* in different tissues from *P. martensii*

Note: A: Adductor muscle; B: Gonad; C: Hepatopancreas; D: Mantle; E: Hemocytes; F: Gill; Different letters above the bars represent significant differences at the $p < 0.05$ level; The same letters above the bars represent no significant differences at the $p > 0.05$ level

IKK β 有较高的相似性, 在 N 端都有一个激酶结构域, 该结构域可以磷酸化 *I κ B*, 从而激活 NF- κ B 信号通路(Peters et al., 2000)。本研究所获得的马氏珠母贝 *PmIKK ϵ* 的 N 端也有一个激酶结构域, 多序列比对显示该结构域在物种间具有很高的保守性, 由此可见该结构域的重要性。另外, 同 *IKKs* 家族成员结构一样, *PmIKK ϵ* 的蛋白序列的 C 端也含有一个 LZ 和一个 HLH 结构。LZ 是介导 DNA 结合蛋白质和其它蛋白质结合的一种结构基元。HLH 结构是由一个短的 α -螺旋通过一个环与另一个长的 α -螺旋组成的结构。HLH 和 LZ 结构是 *IKK* 家族间形成同源或者异源二聚体的基础(Kwak et al., 2000)。这些信息表明 *PmIKK ϵ* 的序列及结构特征与 *IKKs* 家族成员有很高的同源性。

基因在不同组织中的表达模式为研究基因功能提供参考。为进一步探讨 *PmIKK ϵ* 在马氏珠母贝中的功能, 我们分析了 *PmIKK ϵ* 基因 mRNA 在马氏珠母贝六个不同组织中的表达模式。结果显示, *PmIKK ϵ* 在马氏珠母贝的六个组织中均有表达, 以肝胰腺中

的表达量最高。该研究结果说明 *PmIKK ϵ* 在马氏珠母贝体内参与的功能比较广泛。肝胰腺是贝类免疫器官, 可以分泌各种免疫酶来对抗外来物的干扰。对于没有特异性免疫的贝类来说, 肝胰腺的功能显得尤为重要(Tiscar and Mosca, 2004)。研究报道, *IKK ϵ* 所介导的 NF- κ B 信号通路可以诱导紫色磷酸酶和超氧化物歧化酶的表达(Darville et al., 2000; Matsumoto et al., 2001)。我们推测, 在贝体受到外界刺激后, *IKK ϵ* 可以激活 NF- κ B 信号通路, 促进肝胰腺分泌免疫酶来对抗外界刺激。这些结果表明, 相对于的其它组织, 马氏珠母贝肝胰腺可能具有较为活跃的 NF- κ B 信号通路, 进一步证明肝胰腺在贝类先天性免疫中的重要作用。

综上所述, 本研究根据马氏珠母贝转录组数据为基础, 应用 RACE 技术获得的 *IKK ϵ* 家族新成员 *PmIKK ϵ* 的 cDNA 全长序列并对其功能进行初步的探讨。我们的研究结果证明 *PmIKK ϵ* 在分子水平及功能上与高等生物 *IKK* 家族成员具有很高的相似性, 本研究可为进一步探讨 *PmIKK ϵ* 及其所在的 NF- κ B 信号通路在马氏珠母贝先天性免疫中的作用奠定基础。

3 材料与方法

3.1 实验材料

马氏珠母贝外套膜为 RACE 的材料。提取成体马氏珠母贝的闭壳肌、外套膜、鳃、肝胰腺、血淋巴、性腺 6 个组织的总 RNA 为荧光定量 PCR 的实验材料, 每个组织至少取 5 个平行个体。

3.2 菌种与质粒

克隆载体 pMD18-T Vector 和感受态 JM109 购买于 TaKaRa 公司。

3.3 主要试剂

LA *Taq* 酶和 RACE 试剂盒 (clontech) 购买于 TaKaRa 公司, M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 和 Trizol 购买于 Invitrogen 公司, *DyNAmo*TM Color Flash SYBR Green qPCR Kit 购买于 Thermo 公司, 其它试剂为国产分析纯试剂。

3.4 RACE 获得目的基因全长序列

根据马氏珠母贝转录组数据库中注释为 *IKK ϵ* 的 unigene 序列设计 *IKK ϵ* 基因特异性引物, 5' RACE 和 3' RACE 的操作按照 clontech 的 SMARTTM RACE

cDNA Amplification Kit 说明书进行, 将获得的片段分离纯化并连接到 pMD18-T 载体上, 然后再转化到 JM109 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 挑选阳性克隆并进行测序, 将测序后的序列与已知的片段进行拼接获得目的基因的 cDNA 全长(Jiao et al., 2012)。所用的特异性引物见表 1。

表 1 马氏珠母贝 *PmIKKε* 基因克隆及荧光定量所用的引物

Table 1 Primers for gene clone and characterization of *PmIKKε*

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
A	GGCAATTTGTGCTGTGTATCTGGGGTCA
B	CTGTTGCCCTCTTCCAAGACAATCTTC
C	CGACAGCAAGGTTTTTCTCATCGTGACA
D	GCCTGGTGTACAAGCTCTCAGACTTTGG
E	AGAGATAGAATGGTGTAGGGAGC
F	CAATGTGGTGTGGTGTAGACTGA

注: A: 5' RACE 外侧引物; B: 5' RACE 内侧引物; C: 3' RACE 外侧引物; D: 3' RACE 内侧引物; E: qPCR 正向引物; F: qPCR 反向引物

Note: A: 5' RACE outer primer; B: 5' RACE inner primer; C: 3' RACE outer primer; D: 3' RACE inner primer; E: qPCR forward primer; F: qPCR reverse primer

3.5 目的基因的生物信息学分析

用 bl2seq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wbl-ast2.cgi>)对测序结果及已知的 unigene 序列进行比对拼接, 得到各基因的全长 cDNA 序列, ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)来预测编码框及非编码区, 分子量和等电点在 ExPasy 网站进行分析(http://web.expasy.org/compute_pi/)。

3.6 实时定量 PCR 法检测目的基因的表达

荧光定量 PCR 法检测马氏珠母贝六个组织中 *IKKε* 基因 mRNA 的表达, *beta-actin* 作为内参基因, 采用 ABI step one Software 系统对荧光定量 PCR 结果进行分析, 标本重复性及组间差异比较采用 SPSS16.0 进行统计。

作者贡献

杜晓东是该项目的负责人, 负责指导实验的设计以及论文写作与修改; 焦钰完成了本项目的实验设计、数据分析以及论文的写作与修改。王庆恒负责基因的克隆和荧光定量 PCR 的实验, 黄荣莲和邓岳文参与了论文的修改; 全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31272635, 412061-41, 31372526)、广东省自然科学基金(S2012040008-042)、广东省教育厅育苗工程(2012LYM_0074)和广东海洋大学博士启动项目(1212318)共同资助。

参考文献

- Bergmann A., 2006, IKK epsilon signaling: Not just NF-kappaB, *Curr. Biol.*, 16(15): R588-R590
- Darville M.L., Ho Y.S., and Eizirik D.L., 2000, NF-kappaB is required for cytokine-induced manganese superoxide dismutase expression in insulin-producing cells, *Endocrinology*, 141(1): 153-62
- Huang X.D., Liu W.G., Guan Y.Y., Shi Y., Wang Q., Zhao M., Wu S.Z., and He M.X., 2012, Molecular cloning and characterization of class NF-kappaB transcription factor from pearl oyster (*Pinctada fucata*), *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 659-66
- Jiao Y., Wang H., Du X., Zhao X., Wang Q., Huang R., and Deng Y., 2012, Dermatopontin, a shell matrix protein gene from pearl oyster *Pinctada martensii*, participates in nacre formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425(3): 679-683
- Kwak Y.T., Guo J., Shen J., and Gaynor R.B., 2000, Analysis of domains in the IKKalpha and IKKbeta proteins that regulate their kinase activity, *J. Biol. Chem.*, 275(19): 14752-14759
- Li H.B., 2012, *IKKε* expression in human gliomas and its molecular mechanisms in promoting glioma cell proliferation and invasion, Thesis for M.S., Tianjin Medical University, Supervisor: Huang Q., pp.95-103 (李会兵, 2012, *IKKε* 在人脑胶质瘤中的表达与其促胶质瘤细胞增殖及侵袭的分子机制研究, 硕士研究论文, 天津医科大学, 导师: 黄强, pp. 95-103)
- Matsumoto M., Hisatake K., Nogi Y., and Tsujimoto M., 2001, Regulation of receptor activator of NF-kappaB ligand-induced tartrate-resistant acid phosphatase gene expression by PU.1-interacting protein/interferon regulatory factor-4, Synergism with microphthalmia transcription factor, *J. Biol. Chem.*, 276(35): 33086-33092
- Peters R.T., Liao S.M., and Maniatis T., 2000, IKK epsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex, *Mol. Cell*, 5(3): 513-522
- Tiscar P.G., and Mosca F., 2004, Defense mechanisms in farmed marine molluscs, *Vet. Res. Commun.*, 28(Suppl 1): 57-62
- Wu X., Xiong X., Xie L., and Zhang R., 2007, Pf-Rel, a Rel/nuclear factor-kappaB homolog identified from the pearl oyster, *Pinctada fucata*, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 39: 533-539
- Xiong X., Feng Q., Chen L., Xie L. and Zhang R., 2008, Cloning and characterization of an IKK homologue from pearl oyster, *Pinctada fucata*, *Dev. Comp. Immunol.*, 32(1): 15-25
- Yang J.Y., Xu X.F., and Xiang Z.Y., 2011, Progress in research

- on NF- κ B, *Huaihai Yiyao* (Journal of Huaihai Medicine), 29(1): 93-96 (杨建营, 徐翔峰, 向珍蛹, 2011, NF- κ B 的研究进展, *淮海医药*, 29(1): 93-96)
- Zeng P., Deng H., and Liu L.M., 2007, New member of the I κ B kinases: IKK ϵ , *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* (World Chinese Journal of Digestology), 15(33): 3524-3526 (曾朋, 邓欢, 刘亮明, 2007, I κ B 激酶家族新成员: IKK ϵ , *世界华人消化杂志*, 15(33): 3524-3526)
- Zhang D., Jiang S., Qiu L., Su T., Wu K., Li Y., Zhu C., and Xu X., 2009, Molecular characterization and expression analysis of the I κ B gene from pearl oyster *Pinctada fucata*, *Fish Shellfish Immunol.*, 26(1): 84-90