

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00747

人天然免疫基因 *BCL10* 的猪同源物的识别、克隆与初步表达分析

何建锋, 张彦明, 段会娟, 曹金锁, 张德礼

西北农林科技大学动物医学院预防兽医学系病毒免疫与生物信息研究室, 杨凌 712100

摘要: 采用电子克隆方法克隆到大小为 925 bp 的人天然免疫蛋白 *BCL10* 的猪同源基因完整 cDNA 序列 (GenBank 登录号: EU088132), 并利用 RT-PCR 方法从猪的全血中扩增出包含 702 bp 的完整开放读码框架(ORF)的 cDNA 片段。经核酸测序, 证明与电子克隆结果相符。利用 NCBI BLAST 分析该 cDNA 包含 3 个大小为 57 bp、289 bp 和 356 bp 的外显子, 并且定位于猪的 4 号染色体上。采用半定量 PCR 技术检测基础水平猪各组织 *BCL10* 基因 mRNA 表达丰度, 并将该基因构建到带有绿色标签的真核表达载体 pEGFP-C1 中, 采用脂质体转染法将该基因转入 PK-15 细胞, 通过绿色荧光标记和 RT-PCR 方法检测实验组的 *BCL10* 蛋白表达。研究结果表明, *BCL10* 基因 mRNA 在脾脏中表达最高; 胸腺、大脑和淋巴结表达次之, 而肝脏只有微量表达, 肾脏没有检测到表达; 同时 *BCL10* 基因在 PK-15 细胞中得到了有效表达。

关键词: *BCL10* 基因; 克隆; 表达分析; 真核表达

In silico identification, molecular cloning and verification of a novel pig gene homologous to human *BCL10* of innate immunity and its preliminary expression profiles in pigs

HE Jian-Feng, ZHANG Yan-Ming, DUAN Hui-Juan, CAO Jin-Suo, ZHANG De-Li

Division of Virology, Immunology & Bioinformatics, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: We identified and characterized a novel swine gene *Bcl10* with GenBank (Accession No. EU088132) which was homologous to human *BCL10* (B-cell CLL/lymphoma 10) gene. The full-length cDNA of 925 bp for swine *BCL10* was *in silico* cloned, and then its ORF of 702 bp coding 233 amino acid residues was verified by RT-PCR and DNA sequencing. NCBI BLAST assay indicated that this cDNA contained three exons with a length of 57, 289 and 356 bp respectively, and it was located on the chromosome 4 of pig genome. Using semi-quantitative PCR, preliminary expression profiles of swine

收稿日期: 2007-12-25; 修回日期: 2008-02-25

基金项目: 西北农林科技大学引进人才基金资助项目(编号: 01140406)和国家自然科学基金项目(编号: 30270342)资助[Supported by the Northwest A & F University Foundation for Attracting Foreign Personnel (No. 01140406) from the "985" Project for Higher Education and the National Natural Science Foundation of China(No.30270342)]

作者简介: 何建锋(1979-), 男, 河北邢台人, 在读硕士, 专业方向: 分子病原学与免疫学。Tel: 13572505864;

E-mail: jianfenghe2007@yahoo.com.cn

通讯作者: 张德礼(1962-), 男, 陕西山阳县人, 博士学历, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子病毒学、免疫学与肿瘤学; 生物信息学与系统生物医学。Tel: 13679108785; E-mail: delizhang@hsc.pku.edu.cn, zhangdeli@tsinghua.org.cn

BCL10 were verified in different swine tissues. The expression of swine *BCL10* was verified by GFP marker and RT-PCR assay. We found that, *BCL10* expressed in high level in swine spleen, and with a modest level in thymus, brain and lymph node; low level mRNA was expressed in liver and not detectable level in kidney. The swine *BCL10* gene was cloned to the GFP-containing eukaryotic expression vector pEGFP-C1 and transfected to PK-15 cell line by lipofectin. *BCL10* was expressed effectively in PK-15 cells. In summary, we cloned a novel swine *BCL10* gene, and investigated its expression characters. This will be the fundament of the future research on its function.

Keywords: *BCL10* gene; cloning; expression analysis; eukaryotic expression

先天性免疫是机体防御病原体感染的第一道防线。*BCL10* (B cell lymphoma-10)是先天性免疫系统的一个重要功能基因, 是从人MALT淋巴瘤相关的t(1;14)(p22;q32)染色体易位断裂点(Chromosome translocation breakpoint)克隆得到的一个细胞凋亡调节基因^[1-3]。正常基因可编码一种由 233 个氨基酸组成的蛋白, 其N端具有一个与多种细胞凋亡调节因子, 如RAIDD, RICK/ RIP2/CARDIAK, ARC等高度同源的CARD结构域^[2]。体外细胞转染实验证实该蛋白具有激活NF- κ B和诱导细胞凋亡的活性^[4-6]。*BCL10* 蛋白的正常生理水平表达可促进免疫因子的产生, 增强机体的先天免疫和抵御细菌类病原体感染的能力; 相反, *BCL10* 蛋白的过量产生会促生一系列免疫抑制因子, 可能导致淋巴瘤等多种疾病的发生^[7]。

为探讨*BCL10* 基因在猪体内的功能, 本研究结合基因存在论(Gene ontology)和生物信息学方法, 依照人*BCL10* 基因序列在NCBI数据库中电子克隆到该基因的猪体同源性基因序列^[8-10], 并对其编码蛋白的功能进行了生物信息学分析。通过实验验证了该基因的存在, 并检测到基础水平猪的各组织*BCL10* 基因mRNA表达丰度, 最后采用脂质体转染法将该基因成功转入哺乳动物细胞并得到了瞬时表达, 为深入研究*BCL10* 基因功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源

1 日龄健康大白猪。屠宰后取其肝脏、脾脏、肾脏、心脏、胸腺和下颌淋巴结立即放入液氮中保存备用。

1.1.2 细胞株

PK-15 细胞株由西北农林科技大学动物医学院

预防兽医学综合实验室保存。

1.1.3 菌株及载体

大肠杆菌 DH5 α 和表达载体 pEGFP-C1 由西北农林科技大学动物科技学院预防兽医学综合实验室保存; pMD18-T Vector 购自 TaKaRa(大连)公司。

1.1.4 主要试剂及工具酶

淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司; TRLZOL @ LS Reagent 试剂盒购自 GIBCOBRL 公司; RevertAidTM H First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司; *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I /*Hind* 均购自 TaKaRa (大连)公司; 质粒提取试剂盒购自 BioDev 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; Lipofectamine2000 Regent 购自 Invitrogen 公司; 新霉素(G418)和 DMEM 细胞培养基为 Gibco 公司产品; 6 孔、24 孔细胞培养板为 Costar 公司产品。

1.1.5 软件及网络资源应用

美国国家生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)的 EST 数据库及蛋白质序列数据库; 蛋白质一级结构预测工具 ProtParam : www.expasy.ch/tools/protparam.html; 二级结构预测工具 Nnpredict : www.cmpchem.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html; 蛋白质功能区分析软件 Subloc: http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm 等。同时, 利用 GENSCAN, DNASTAR, Mega (2.0), BioXM(2.0)和 DNASIS-Pro software 对 DNA 序列进行辅助分析。

1.2 方法

1.2.1 候选基因 *BCL10* 的电子克隆与引物设计

以人*BCL10* 基因序列为种子 (GenBank登录号: NM_003921), 利用 NCBI 中的 BLAST 工具在 GenBank的猪表达序列标签(expressed sequence tag,

EST)数据库中进行同源序列筛选。筛选所得的与人 *BCL10* 基因同源的猪的EST存在重叠区^[11]。下载与人 *BCL10* 基因同源性的猪的几个EST序列,利用NCBI中的BLAST工具在线进行电子拼接,获得相应猪基因的一致序列^[12,13],并以此为模板用DNAStar软件设计一对用于扩增*BCL10* 同源基因cDNA片段的RT-PCR引物:P1:5'-TTCCCCCGCCTCCGCCATG-3';P2:5'-CCGCGCTAAAGGGACGTGTATCAAAAG-3'。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 *BCL10* 基因的分子克隆

常规采集 10 mL 新鲜猪血,采用淋巴细胞液分离液分离出白细胞用来提取总 RNA。用 RevertAid™ H First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第 1 链的合成。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为:反转录产物 2 μL、10 × buffer 2.5 μL、dNTP Mixture 2 μL、浓度为 25 μmol/L 的上下游引物各 1 μL、*Taq* 酶 0.25 μL,加灭菌蒸馏水至 25 μL,进行扩增。反应条件为:95 °C 热变性 5 min;94 °C 1 min;56 °C 55 s;72 °C 1 min,34 个循环,72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR

产物回收后与pMD18-T载体连接,转化大肠杆菌DH5α,挑取白斑摇菌,采用碱裂解法小量提取质粒进行PCR和酶切鉴定^[14]。阳性重组质粒送至上海捷瑞生物工程公司测序。

1.2.3 *BCL10* 基因组织表达差异研究

分别取猪各组织 30 mg,根据试剂盒说明一步法提取总 RNA。通过凝胶电泳检测其完整性,并测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值,以检测 RNA 样品的纯度。然后进行 RT-PCR 反应。*BCL10* 基因扩增引物根据本课题组克隆到的新基因序列(GenBank 登录号:EU088132);β-actin 引物根据基因序列(GenBank 登录号:SSU07786)设计,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。各引物序列见表 1。PCR 反应体系和条件同本文 1.2.2。PCR 产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳后对各电泳条带光密度进行扫描,然后计算 *BCL10* 基因在各组织中的相对表达量。上述每个独立实验重复 3 次,采用 SPSS11.5 软件进行单因素试验统计分析与显著性检验。*BCL10* 基因相对表达量=该基因 RT-PCR 产物电泳条带密度/β-actin RT-PCR 产物电泳条带密度。

表 1 *BCL10* 和β-actin 基因引物序列
Table 1 The primer sequences of *BCL10* and β-actin gene

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增片段大小 Size of amplified fragments(bp)
<i>BCL10</i>	B1: TTAAGCTTCCCCCGCCTCCGCCATG B2: TAGGATCCAGCTGTCAATGCGCGAAAAGA	737
β-actin	C1: ACTCTGGGGATGGGGTCA C2: CTCGTTGCCGATGGTGAT	299

AAGCTT: *Bam*H 酶切位点;GGATCC: *Hind* 酶切位点。
AAGCTT: Restriction enzyme cutting site of *Bam*H ;GGATCC: Restriction enzyme cutting site of *Hind* .

1.2.4 *BCL10* 基因真核表达质粒的构建

以本课题组构建的pMD-*BCL10* 重组质粒为模板,PCR扩增*BCL10* 基因。上游引物B1的5'端加上*Bam*H 酶切位点;下游引物B2的5'端加上*Hind* 酶切位点。将上述PCR产物重新连接入pMD-18T载体构建重组质粒pMD-*BCL10*。然后将此重组质粒和pEGFP-C1表达载体分别经*Bam*H 和*Hind* 双酶切后回收并纯化含*BCL10* 基因片段,在T4连接酶的作用下4 °C 连接过夜,构建真核表达质粒pEGFP-*BCL10*。用此质粒转化大肠杆菌DH5α工程菌,筛选阳性克隆,扩增,用酶切法鉴定重组质粒^[15],并送到上海捷瑞生物工程公司进行序列测定。

1.2.5 重组真核质粒转染 PK-15 细胞及筛选

将处于指数生长期 (50%~60%) 的 PK-15 细胞接种于盛有无血清的 DMEM 培养液的六孔细胞培养板中,在单层细胞上加入脂质体-质粒混合物(2:5,质粒 DNA 的终浓度为 4 mg/L),置 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 6 h 后,弃细胞上清液,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 48 h,加入 G418 筛选液,连续培养。每 2 天更换相同浓度的 G418 筛选液 1 次,并观察细胞生长及死亡情况。同时设转染载体 PEGFP-C1 和未转染的 PK-15 细胞的阴性对照。待对照孔的细胞全部死亡后将 G418 的

浓度换成维持浓度(即筛选浓度减半)。继续培养细胞, 每 2 天换液 1 次, 直到出现阳性克隆细胞。荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况, 扩大培养细胞^[16]。

2 结果与分析

2.1 目的基因的电子克隆与序列分析

电子克隆结果经反复证实获得了一条全长 925 bp 的 cDNA 序列, 其 ORF 由 81~782 bp, 编码 233 个氨基酸。序列 5'端富含 GC 序列, 最大 ORF 第一个起始密码子 ATG, 具有典型的 Kozak 序列, 符合真核细胞 RNA 有效转录的需要。将 BCL10 的氨基酸

序列输入清华大学生物信息研究所网站(<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/Subloc/>)上的在线蛋白质特点及功能区分析软件进行预测, 结果表明可能为核内蛋白 (Predicted location: nuclear)。其可信度 Reliability index(RI) = 5; Expected accuracy=94%。

2.2 猪 BCL10 蛋白一级结构特征分析与二级结构预测

该蛋白分子式为 $C_{1141}H_{1851}N_{325}O_{366}S_7$, 由 3 690 个原子组成, 分子量为 26 202.6, 理论 pI 为 5.69; Leu 含量最高(31 个密码子编码, 占总含量 13.3%), 其次是 Glu 和 Ser(分别由 27 个和 24 个密码子编码, 分别占 11.6%和 10.3%); 其二级结构可能以螺旋为主(图 1)。

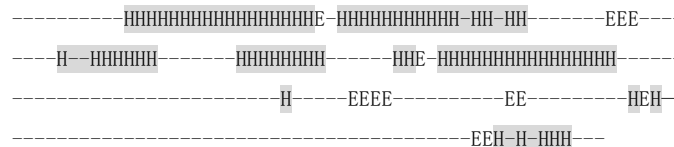


图 1 猪 BCL10 蛋白二级结构预测

H: α -螺旋; E: β -折叠; -: 无预测结果。

Fig. 1 The second structure analysis of pig BCL10 protein

H: α -helix; E: β -strand; -: No prediction.

2.3 外显子分析

利用 NCBI BLAST 将克隆到的 cDNA 序列与 *Sus scrofa*(pig) 进行比对, 发现在染色体 4 (CU179752.3) 上有同源序列, 并将 cDNA 切割为 3 份, 显示可能为 3 个外显子。进一步通过内含子与外显子结合序列 GT-AG 分析, 确为 3 个外显子。利用外显子与内含子的大小进行统计, 并绘制出该基因的染色体图(图 2)。

2.4 猪 *BCL10* 基因的 RT-PCR 扩增和重组质粒 pMD-*BCL10* 的酶切鉴定

RT-PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测片段大小约 846 bp(图 3), 与预期的大小相符。重组质粒 pMD-BCL10 经 *Bam*H I/*Hind* 双酶切出现了约为 850 bp 和明显大约 2 000 bp 的两条带, 与预期结果一致(图 4)。

2.5 测序结果及分析

将重组质粒 pMD-*BCL10* 用全自动测序仪进行序列分析。测序结果经分析与电子克隆相符(图 5)。提交至 GenBank 获得登录号: EU088132。

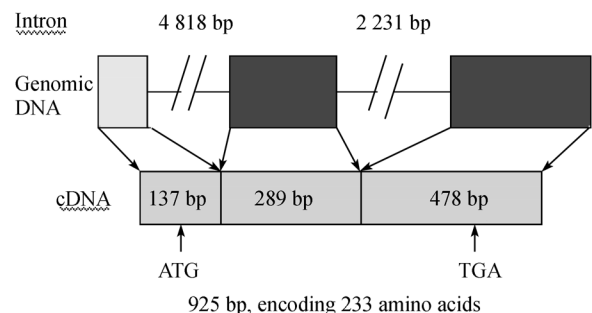


图 2 猪 *BCL10* 基因染色体图

Fig. 2 Chromosome map of pig *BCL10* gene

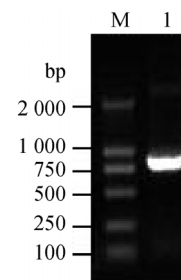


图 3 猪 *BCL10* 基因 RT-PCR 产物

1: RT-PCR 产物; M: DNA marker。

Fig. 3 RT-PCR product of pig *BCL10* gene

1: RT-PCR product; M: DNA marker.

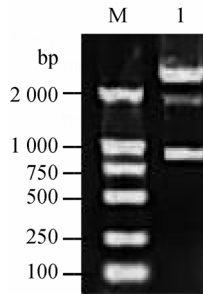


图 4 重组质粒 pMD-*BCL10* 酶切后鉴定

1: 经 *BamH* I / *Hind* III 酶切产物; M: DNA marker。

Fig. 4 Recombinant plasmid pMD-*BCL10* digested with *BamH* I and *Hind* III

1: The products of pMD-*BCL10* by *BamH* I / *Hind* III; M: DNA marker.

2.6 各组织 *BCL10* 和 β -actin 基因的扩增及 *BCL10* 基因 mRNA 表达丰度的差异性检验

猪各组织提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测完整性较好, 且无 DNA 污染, 立即用来做 RT-PCR 反应。*BCL10* 和 β -actin 的 PCR 扩增产物经 1.0 % 的琼脂糖凝胶电泳检测大小与预期相符。所有样品的电泳条带密度经 Dophin DOC 数据转换系统转换后, 进行显著性检验。结果表明, *BCL10* 基因 mRNA 在心脏、脾脏、淋巴结、大脑、肝脏和胸腺中均有表达, 其中脾脏中表达最高; 胸腺、大脑和淋巴结表达次之; 而肝脏只有微量表达; 肾脏没有检测到表达 (图 6)。

```

1      ttccccccgctccgccc[atg]gagcccgccgcccgcgtccctgaccgaggaggacctgaccgaa
      M E P A A P S L T E E D L T E
62     gtgaagaaggacgcttttagaaaatttgcgtgtgtacctgtgtgaaaaaatcatagctgagaga
      V K K D A L E N L R V Y L C E K I I A E R
125    cattttgatcatttacgtgcaaaaaaataactcagtagagaagacaccgaagaaatttccctgc
      H F D H L R A K K I L S R E D T E E I S C
188    cgaacatcaagt agaaaaaggcctggaaaattgttagactacttacaaagaaaaccccaagg
      R T S S R K R A G K L L D Y L Q E N P K G
250    actggat accctgtgcgaatct attcggcgagaaaaaacacagaactttctgatacagaagatt
      L D T L V E S I R R E K T Q N F L I Q K I
314    acagatgaagtactgaaacttagaaatataaaactagaaacacctgaaaggactgaaatgcagc
      T D E V L K L R N I K L E H L K G L K C S
377    agctgtgagcctttccagatggcgccaccagcaacctccccaggtcaaattcagaggagag
      S C E P F P D G A T S N L P R S N S E E S
439    taattttctctgacaaaactgagagcatccactgtcatctaccatccgggaaggagaaatccagcagc
      N F S K L R A S T V I Y H P E G E S S T
503    gcccccttttttgcactgattcctctctgaatttgcocgttctggaagtgggcaggactgaa
      A P F F S T D S S L N L P V L E V G R T E
566    cccccacattctcttcaacgacgctgcccagacctggagaccggggggcgcctcctttgcaa
      H P T F S S T T L P R P G D P G A P P L P
639    ccggagctgcgcttagaagaagaaaggaacctgtggaaactccagcgagatgtttctccccctg
      P E L R L E E E G T C G N S S E M F L P L
692    agatcacgtgctcttttgcggcaa[tga]718  cagctgactacctttttctttattttgatga
      R S R A L L R Q *
751    tgaccagaaaatgtgattgataaaatatagcatcatgtaaagttgctggagtgacttactaact
815    tttagat acacgtcccttttagcgggaatctctagag
  
```

图 5 猪 *BCL10* cDNA 的完整序列及其编码蛋白的氨基酸序列

[atg] 起始密码子; [tga] 终止密码子。

Fig. 5 DNA sequence of pig *BCL10* cDNA and amino acid sequence of the protein

[atg] Initiation codon; [tga] Terminator codons.

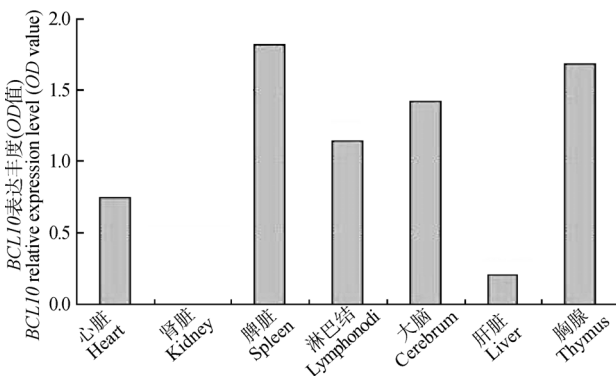


图 6 猪各组织 *BCL10* 基因 mRNA 相对表达丰度的显著性检验

Fig. 6 Significant test of relative abundance of *BCL10* mRNA in different tissues in swine

2.7 真核表达质粒 pEGFP-*BCL10* 的鉴定

将构建好的 pEGFP-*BCL10* 转化至大肠杆菌 DH5 α 工程菌, 筛选阳性克隆, 提取的质粒经 *BamH* I / *Hind* III 酶切鉴定, 产生的片段大小与推测完全相符 (图 7)。证明 *BCL10* 基因已成功插入 pEGFP-C1 表达载体中, 测序表明 *BCL10* 基因位置、大小和读码框均正确。

2.8 转染后阳性细胞的荧光鉴定

利用荧光倒置显微镜对转染质粒的 PK-15 细胞从 24 h 开始进行隔天观察。发现在转染 12 天后 pEGFP-*BCL10* 和 pEGFP-C1 实验组细胞均出现绿色荧光, 未转染的阴性对照组细胞无绿色荧光。第 14

天时实验组阳性细胞已非常典型(图 8)。证明两种质粒均已成功地转入了 PK-15 细胞。

2.9 转染后阳性细胞的获得

PK-15 细胞分别在转染 pEGFP-*BCL10* 和 pEGFP-C1 质粒后传代培养 24 h 至细胞汇合度为 80%时, 加最佳筛选浓度的 G418 培养。72 h 后细胞均开始出现死亡, 第 14 天时, 未转染的 PK-15 细胞全部死亡、脱落, 转染组细胞仅剩下为数不多的阳性细胞(图 9), 此时 G418 浓度减半维持筛选, 保持 G418 维持浓度扩大培养阳性细胞。

2.10 阳性细胞克隆的 PCR 鉴定

收集筛选出的阳性细胞克隆做 PCR 鉴定, 发现转染重组质粒 pEGFP-*BCL10* 的细胞扩增出 750 bp 左右的条带, 而转染空载体质粒 pEGFP-C1 和未转染的细胞均未扩增出目的条带(图 10)。证明外源

BCL10 基因已成功转入 PK-15 细胞并得到了高效的表达。

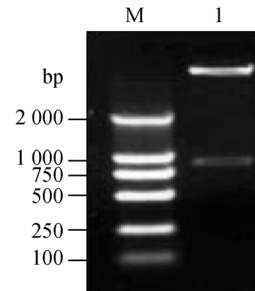


图 7 重组质粒 pEGFP-*BCL10* 的酶切鉴定

1: 经 *Bam*H I / *Hind* III 酶切产物; M: DNA marker。

Fig. 7 Recombinant plasmid pEGFP-*BCL10* digested with *Bam*H I and *Hind*III

1: The products of pEGFP-*BCL10* by *Bam*H I / *Hind*III; M: DNA marker.

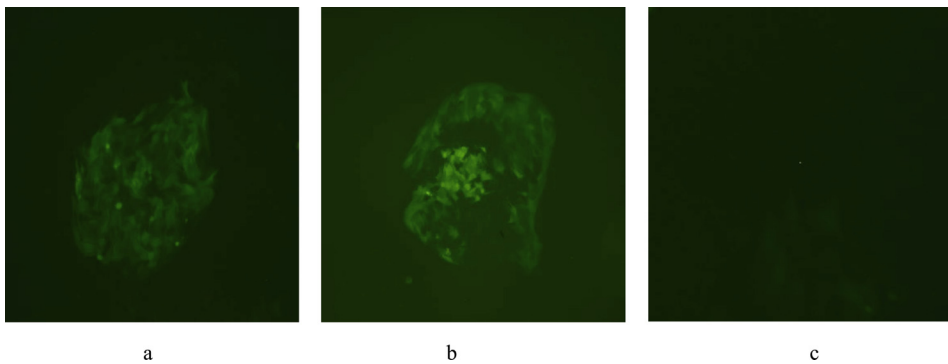


图 8 pEGFP-*BCL10* 和 pEGFP-C1 转染 PK-15 细胞 14 天后荧光显微镜检测(100×)

a: 转染 pEGFP-C1; b: 转染 pEGFP-*BCL10*; c: 未转染。

Fig. 8 The fluorescence of PK-15 transferred pEGFP-*BCL10* and pEGFP-C1 at 14 d(100×)

a: pEGFP-C1; b: pEGFP-*BCL10*; c: Control.

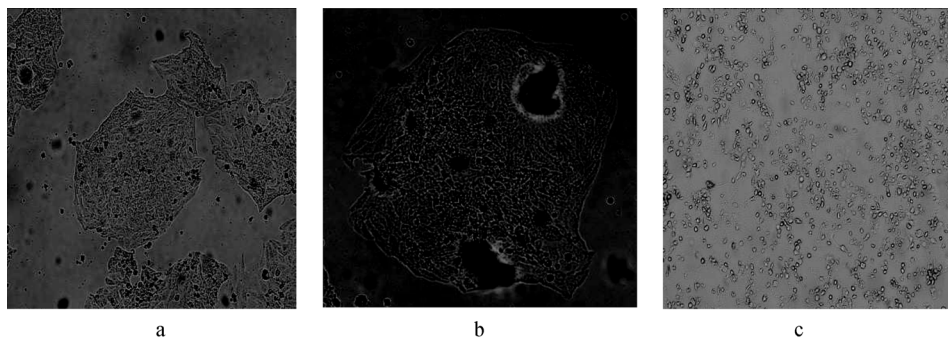


图 9 转染 pEGFP-*BCL10* 和 pEGFP-C1 的阳性克隆细胞 (100×)

a: 转染 pEGFP-C1; b: 转染 pEGFP-*BCL10*; c: 未转染。

Fig. 9 Positive PK-15 clones transfected pEGFP-*BCL10* and pEGFP-C1(100×)

a: pEGFP-C1; b: pEGFP-*BCL10*; c: Control.

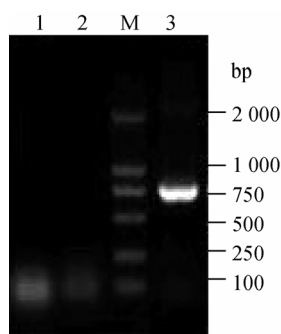


图 10 转染细胞的 PCR 鉴定

1: 未转染; 2: 转染 pEGFP-C1; 3: 转染 pEGFP-BCL10; M: DNA marker。

Fig. 10 Identification of transfer cells by PCR

1: Control; 2: pEGFP-C1; 3: pEGFP-BCL10; M: DNA marker.

3 讨论

BCL10 (B cell lymphoma-10) 基因是人天然免疫一个重要的功能基因。研究人员发现 BCL10 激活了一个驱动产生抗体的 B 细胞发育为该免疫细胞家族的 3 种不同成员之一的分子信号通路, 这 3 个成员就是小囊 B 细胞、边缘区 B 细胞和 B1-B 细胞。缺失 BCL10 的小鼠成熟 B 细胞的数量显著减少, 无法启动有效的抗体应答抵抗血液中的细菌^[17,18]。Dong^[19]与 Jost 等^[20]发现 NF- κ B 蛋白正常情况下是被 BCL10 激活的, 在 B 细胞遭遇细菌等入侵之后, 这些蛋白引发 B 细胞完全成熟, 释放抵御这些特殊生物体的抗体。缺失 BCL10 基因将不能激活属于 NF- κ B 蛋白家族的信号传导分子的通路^[21,22]。

现代生物信息与比较基因组学的发展为基因识别提供了一系列方法, 利用基因存在论 (Gene ontology) 与同源比对算法, 以已获得的人免疫与感染基因为线索, 利用猪 EST 与猪基因组数据库资料, 搜寻猪的同源感染与免疫相关基因, 进行猪免疫与感染基因的精确电子识别、实验克隆与功能分析, 以获得一批重要功能的猪免疫与感染基因并建立数据库, 为猪感染与免疫相关基因产物的分子功能、生物过程和细胞定位提供标准化的注解, 是从宿主背景方面探索重大疫病防控新途径的基础研究。

由于人的基因组和猪的基因组存在着很高的同源性, 作者认为猪体内存在与人的天然免疫基因 *BCL10* 功能相似的基因, 并经电子克隆验证成功。最终通过分子生物学实验成功克隆到人天然免疫蛋白 BCL10 的猪的同源物, 并且对其功能结构域进行了系统的基因组学分析, 推测其可能是核内蛋白。利用 NCBI BLAST 将 cDNA 序列与 *Sus scrofa* (pig)

进行比对, 将其定位于猪的 4 号染色体 (CU179752.3) 上, 通过内含子与外显子结合序列 GT-AG 分析, 确为 3 个外显子。这一结果将会初步揭开 *BCL10* 基因的主要功能结构域所编码的蛋白质的特点, 为进一步阐明该基因在猪免疫系统中扮演的重要角色提供可靠的参考价值。采用半定量 PCR 检测基础水平猪各组织 *BCL10* 基因 mRNA 表达丰度, 采用 SPSS11.5 软件进行单因素试验统计分析 with 显著性检验。结果显示了 *BCL10* 基因主要存在于猪的免疫器官, 推测其在猪的免疫功能中可能扮演着重要的角色, 为进一步功能研究指明了方向。本研究成功的将 *BCL10* 基因构建到带有绿色荧光标记的真核表达载体 pEGFP-C1 中, 实现了 BCL10 蛋白的瞬时表达, 为该蛋白的稳定表达和单克隆抗体的制备与筛选奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger DD, Sanger WG, Nowotny H, Vesely M, Callet-Bauchu E, Salles G, Dixit VM, Rosenthal A, Schlegelberger B, Morris SW. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, 1999, 22: 63–68. [\[DOI\]](#)
- [2] Maes B, Demunter A, Peeters B, De Wolf-Peeters C. BCL10 mutation does not represent an important pathogenic mechanism in gastric MALT-type lymphoma, and the presence of the API2-MLT fusion is associated with aberrant nuclear BCL10 expression. *Blood*, 2002, 99: 1398–1404. [\[DOI\]](#)
- [3] Sagaert X, Laurent M, Baens M, Wlodarska I, De Wolf-Peeters C. MALT1 and BCL10 aberrations in MALT lymphomas and their effect on the expression of BCL10 in the tumour cells. *Mod Pathol*, 2006, 19(2): 225–232. [\[DOI\]](#)
- [4] Bose S, Goldman JM, Melo JV. Mutations of the BCL10 gene are not associated with the blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 1999, 13: 1894–1896. [\[DOI\]](#)
- [5] Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G. BCL10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in MALT lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276(22): 19012–19019. [\[DOI\]](#)
- [6] Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer

- MJ. BCL10 is involved in t (1:14)(p22; q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*, 1999, 96: 35–45. [\[DOI\]](#)
- [7] Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 348–359.
- [8] ZHANG De-Li, DING Pei-Guo, LING Lun-Jiang, CHEN Run-Sheng, MA Da-Long. *In silico* cloning of C17orf32, a novel human gene and verification of its coding region by RT-PCR. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29(4): 543–548.
张德礼, 丁培国, 凌伦奖, 陈润生, 马大龙. 人类新基因 C17orf32 的电子克隆和编码区序列 RT-PCR 验证. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(4): 543–548.
- [9] ZHANG Hua-Li, DENG Hao, ZHANG Rui-Fang, XIA Kun, XIA Jia-Hui. *In silico* cloning of the human TECTB gene. *Acta Genet Sin*, 2003, 30(4): 317–320.
张华莉, 邓昊, 张瑞芳, 夏昆, 夏家辉. 人类 TECTB 基因的电子克隆. *遗传学报*, 2003, 30(4): 317–320.
- [10] ZHANG Cheng-Gang, HE Fu-Chu. *Bioinformatics: Method and Practice*. Beijing: Science Press, 2002, 72–76.
张成岗, 贺福初. *生物信息学: 方法与实践*. 北京: 科学出版社, 2002, 72–76.
- [11] ZHANG De-Li, SUN Xiao-Jing, LING Lun-Jiang, CHEN Run-Sheng, MA Da-Long. Molecular cloning, characterization, chromosomal assignment, genomic organization and verification of SFRS12(SRrp508), a novel member of human SR protein superfamily and a human homolog of rat SRrp86. *Acta Genet Sin*, 2002, 29(5): 377–383.
张德礼, 孙晓静, 凌伦奖, 陈润生, 马大龙. 人类 SR 蛋白超家族新成员—SFRS12(SRrp508) 的基因克隆和特性分析. *遗传学报*, 2002, 29(5): 377–383.
- [12] LI Wei, ed. *Introduction to Bioinformation*. Zhengzhou: Zhengzhou University Press, 2004.
李巍 主编. *生物信息学导论*. 郑州: 郑州大学出版社, 2004.
- [13] JIANG Yan, WANG Xiao-Hang, CAO Yi eds. *Basical and Applied Bioinformatics*. Beijing: Tsinghua University Press, 2003.
蒋彦, 王小行, 曹毅 主编. *基础生物信息学及应用*. 北京: 清华大学出版社, 2003.
- [14] Sambrook J, Russell DW, eds (Translated by HUANG Pei-Tang, WANG Jia-Xi, ZHU Hou-Chu). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW (黄培堂等译). *分子克隆实验指南*. (第 3 版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] SUN Fei, ZHANG Yan-Ming, WEI Zhong-Feng, NI Bin, HONG Hai-Xia, ZHANG Yong-Guo, GUO Kang-Kang, WANG Jing-Yu. Clone and eukaryotic expression plasmid construction of p80 gene of CSFV strain shimen. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(3): 12–14.
孙裴, 张彦明, 魏中锋, 倪斌, 洪海霞, 张永国, 郭抗抗, 王晶钰. 猪瘟病毒 Shimen 株 p80 基因的克隆及其真核表达质粒的构建. *中国农学通报*, 2005, 21(3): 12–14.
- [16] ZHANG Yong-Guo, ZHANG Yan-Ming, SUN Fei, GUO Kang-Kang, WEI Zhong-Feng, WANG Jing-Yu, NI Bin. Expression E2 gene of classical swine fever in mammalian cell. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(3): 5–8.
张永国, 张彦明, 孙裴, 郭抗抗, 魏中锋, 王晶钰, 倪斌. 猪瘟病毒 E2 基因的哺乳动物细胞表达. *中国农学通报*, 2005, 21(3): 5–8.
- [17] Lin X, Wang DM. The roles of CARMA1, BCL10, and MALT1 in antigen receptor signaling. *Seminars In Immunology*, 2004, 16 (6): 429–435. [\[DOI\]](#)
- [18] Liu Y, Dong W, Chen L, Xiang R, Xiao H, De G, Wang Z, Qi Y. BCL10 mediates Lipopolysaccharide/Toll-like receptor-4 signaling through interaction with pellino2. *J Biol Chem*, 2004, 279: 37436–37444. [\[DOI\]](#)
- [19] Dong W, Liu Y, Peng J, Chen L, Zou T, Xiao H, Liu Z, Li W, Bu Y, Qi Y. The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26029–26040. [\[DOI\]](#)
- [20] Jost PJ, Weiss S, Ferch U, Gross O, Mak TW, Peschel C, Ruland J. BCL10/Malt1 signaling is essential for TCR-induced NF-kappaB activation in thymocytes but dispensable for positive or negative selection. *J Immunol*, 2007, 178(2): 953–960.
- [21] Noels H, van Loo G, Hagens S, Broeckx V, Beyaert R, Marynen P, Baens M. A novel TRAF6 binding site in MALT1 defines distinct mechanisms of NF-kB activation by API2-MALT1 fusions. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10180–10189. [\[DOI\]](#)
- [22] Tanner MJ, Hanel W, Gaffen SL, Lin X. CARMA1 coiled-coil domain is involved in the oligomerization and subcellular localization of CARMA1 and is required for T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 17141–17147. [\[DOI\]](#)