

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01377

猪免疫抑制因子 MNSF β 的克隆、表达与组织分布

王静娜^{1,2}, 蒋朋飞^{1,2}, 亢展展^{1,2}, 李登云^{1,2}, 华琳琳^{1,2}, 张洋^{1,2}, 张淑霞^{1,2}, 张德礼^{1,2}

1. 西北农林科技大学兽医免疫学研究所, 动物生物技术农业部重点开放实验室, 杨凌 712100;
2. 西北农林科技大学动物医学院预防兽医学系, 兽医微生物学与病毒学课程组病毒免疫与生物信息研究室, 杨凌 712100

摘要: MNSF β (Monoclonal nonspecific suppressor factor β) 是一种天然免疫抑制因子, 参与机体免疫反应、应激反应、细胞分裂、细胞凋亡和核转运等生物过程, 但其功能在猪中鲜有报道。文章通过电子克隆得到猪 MNSF β 的全长序列, 利用 RT-PCR 首次从猪脾脏中克隆了包含完整开放阅读框的 MNSF β cDNA (GenBank 登录号: KF77642500) 片段, 测序正确后分析猪 MNSF β 的核酸序列和蛋白质序列。将猪 MNSF β 基因编码区序列插入表达载体 pEGFP-C1, 构建真核表达载体 pEGFP-MNSF β ; 用脂质体将重组质粒转染到猪脐静脉内皮细胞 (SUVEC) 中, 利用荧光检测、Western blot 和激光共聚焦分析 SUVEC 中猪 MNSF β 的表达; 并用实时荧光定量 PCR 对猪 MNSF β 在不同组织的表达丰度进行分析。结果表明: 猪 MNSF β 基因全长 402 bp, 编码 133 个氨基酸, 含一个外显子。生物信息学分析表明, 猪 MNSF β 为无信号肽的稳定蛋白, 由泛素样结构域与核糖体蛋白 S30 组成。对猪 MNSF β 与已发现的 18 个物种的 MNSF β 氨基酸序列进行相似性分析和进化树分析, 显示其蛋白相似度均在 91% 以上, 且进化距离都小于 0.05, 说明 MNSF β 在各物种间高度保守。荧光检测和 Western blot 结果显示, 猪 MNSF β 在 SUVEC 中成功表达, 激光共聚焦显示其在细胞质与细胞核内均有分布。组织表达谱分析表明, 猪 MNSF β 在各免疫相关组织广泛表达, 但在肺脏中未检测到表达, 说明其在机体免疫反应中发挥重要作用。

关键词: 猪; MNSF β ; 真核表达; 组织分布

Cloning, eukaryotic expression and spatial expression patterns of porcine MNSF β

WANG Jing-Na^{1,2}, JIANG Peng-Fei^{1,2}, KANG Zhan-Zhan^{1,2}, LI Deng-Yun^{1,2}, HUA Lin-Lin^{1,2}, ZHANG Yang^{1,2}, ZHANG Shu-Xia^{1,2}, ZHANG De-Li^{1,2}

1. Key Laboratory of Animal Biotechnology of National Ministry of Agriculture, Institute of Veterinary Immunology of Northwest A & F University, Yangling 712100, China;
2. Research Laboratory of Virology, Immunology & Bioinformatics, Division of Veterinary Microbiology & Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: MNSF β (Monoclonal nonspecific suppressor factor β) is a natural immunosuppressive factor which has been

收稿日期: 2013-05-11; 修回日期: 2013-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 31072115) 资助

作者简介: 王静娜, 硕士研究生, 专业方向: 分子病原学与免疫学。E-mail: wangjingna1986@163.com

蒋朋飞, 博士研究生, 专业方向: 生物制品与免疫技术。E-mail: peng-feijiang@hotmail.com

王静娜与蒋朋飞共同第一作者。

通讯作者: 张德礼, 博士后, 教授, 研究方向: 分子病毒学与免疫学, 生物信息学与系统生物医学。E-mail: zhangdeli@tsinghua.org.cn

网络出版时间: 2013-8-21 15:20:17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130821.1520.001.html>

reported to be involved in various biological processes, such as immune responses, cell division, stress response, cell apoptosis, and nuclear transport. However, study on porcine MNSF β has been rarely reported. In this study, the full-length sequence of porcine MNSF β (GenBank accession number: KF77642500) was predicted *in silicon* and its cDNA sequence was obtained through RT-PCR from porcine spleen. The nucleic acid and protein sequences were analyzed. Then, the gene was subcloned into pEGFP-C1 to construct a recombinant plasmid pEGFP-MNSF β which was transfected into swine umbilical vein endothelial cells (SUVECs) using Lipofectamine 2000. The expression of GFP was detected by fluorescence microscopy, Western blot, and laser confocal fluorescence microscopy. The spatial expression patterns of porcine MNSF β were detected by real-time qPCR. Results showed that the full length of porcine MNSF β was 402 bp encoding 133 amino acids with only one exon. Bioinformatics analysis showed that porcine MNSF β protein was a stable protein consisting of a ubiquitin-like domain fused to the ribosomal protein S30 with no signal peptide. The analyses of homology and phylogenetic tree of porcine MNSF β and its homologs in other 18 species showed that the identities of MNSF β protein sequence were higher than 91% among different species and the evolutionary distance was less than 0.05. It indicates that MNSF β is highly conserved in the process of evolution. Fluorescence signal showed that the fusion protein GFP-MNSF β was successfully expressed in SUVECs which was then confirmed by Western blot. Laser confocal fluorescence microscopy showed that MNSF β was expressed in both nucleus and cytoplasm. Analysis of spatial expression patterns showed that porcine MNSF β was widely expressed in immune tissues, but not in lung, suggesting that MNSF β may play an important role in immune response.

Keywords: porcine; monoclonal nonspecific suppressor factor β (MNSF β); eukaryotic expression; spatial expression patterns

免疫抑制因子 MNSF(Monoclonal nonspecific suppressor factor)最初在ConA活化的小鼠T细胞杂交瘤中发现,是一种抑制非特异性免疫反应的淋巴因子。它可以抑制T细胞和B细胞的增殖分化,还可以抑制肿瘤细胞的生长^[1]。小鼠MNSF位于第 19 号染色体上,至少由 α 和 β 两个亚基组成^[2]。研究表明,MNSF β 亚基可能是其发挥生物学功能的主要成分,MNSF β 编码一个 14.5 kDa的蛋白,包含 133 个 ubi-L(8 kDa)和核糖体蛋白S30(6.5 kDa)。MNSF β 是泛素样蛋白家族的成员,可以通过修饰靶蛋白并与之共价结合发挥生物学功能,在机体的免疫系统中扮演重要角色。MNSF β 与促凋亡蛋白BCL-G共价结合,通过抑制ERK的活化调节MAPK通路^[3];在肝脏和吞噬细胞中,MNSF β 与endophilinII共价结合,调节Dectin-1介导的炎症反应和细胞的吞噬功能^[4];另外,MNSF β 还参与TLR2 信号通路抑制TNF- α 的分泌,但目前还没发现TLR2 信号通路中与MNSF β 相互作用的靶蛋白^[5-8]。Nakamura等^[9]检测了小鼠胚胎着床部位差异表达的mRNA,发现MNSF β 在胚胎着床前后表达量有显著差异。MNSF β 过表达可以抑制Th2 型细胞因子IL-4 的分泌^[10],而Th2 型细胞参与机体的免疫抑制和免疫耐受,其分泌的细胞因子能减弱着

床部位的免疫反应^[11],胚胎的顺利着床与机体免疫耐受的形成为密切关系。由此推测,MNSF β 可能与胚胎着床有关。

为了探讨 MNSF β 基因在猪体内的生物学功能,本研究利用 RT-PCR 首次从猪脾脏中克隆了包含完整开放阅读框的 MNSF β cDNA(GenBank 登录号: KF77642500),并对其核酸序列与氨基酸序列进行了生物信息学分析;构建真核表达载体 pEGFP-MNSF β ,并在猪脐静脉内皮细胞(SUVEC)中进行表达,确定猪 MNSF β 的亚细胞定位;采用实时荧光定量 PCR 分析 MNSF β mRNA 在猪体各组织的表达分布,为深入研究 MNSF β 基因的生物学功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

30 日龄健康雄性长白猪一只,购自咸阳某猪场;SUVEC 由西北农林科技大学动物医学院张彦明教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 猪 MNSF β 基因的电子克隆

以人 MNSF β 基因序列为种子序列(NM-001997.4),

利用 NCBI 中的 BLAST 工具在 GenBank 猪表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)数据库中进行同源筛选, 比对拼接, 最终得到猪 MNSF β 的全长序列。

1.2.2 猪 MNSF β 基因的分子克隆

以电子克隆得到的猪 MNSF β 全长序列为模板, 用生物学软件 Primer 5.0 设计上游引物 P₁(5'-CTCC-ATCTTCGCGGTAGC-3')和下游引物 P₂(5'-TTAGT-GAAAGCCAGGATTACA-3'), 扩增片段长度约为 500 bp。采用 Trizol 法(TRIZOL 为北京全式金生物技术有限公司产品)从猪的脾脏组织中提取总 RNA, 反转录得到 cDNA(反转录试剂盒为 TaKaRa 公司产品), 以此为模板进行 PCR 扩增。25 μ L 反应体系: PremixTaq(TaKaRa 公司)12.5 μ L, cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 扩增程序: 95 预变性 5 min; 94 30 s, 53 1 min, 72 1 min, 共 32 个循环; 然后 72 延伸 10 min, 扩增得到目的序列。凝胶电泳并回收目的片段, 将回收产物连接到克隆载体 pMD18-T(TaKaRa 公司)得到重组质粒 pMD18-T-MNSF β , 将其转化到 DH5 α 感受态细胞(TaKaRa 公司)。通过蓝白斑筛选, 挑取阳性菌落, 扩大培养后进行菌液 PCR 鉴定, 由南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.3 猪 MNSF β 的生物信息学分析

用 NCBI BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)、ExPASy_ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)、PredictProtein(<http://www.predictprotein.org/>)、SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>)和 NCBI CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>)等在线工具对猪 MNSF β 的核苷酸序列和氨基酸序列进行分析, 分别预测猪 MNSF β 的染色体定位、外显子、蛋白质理化性质、二级结构、信号肽和功能结构域; 用 DNA MAN 软件对猪 MNSF β 与人、小鼠等 18 个物种的 MNSF β 进行蛋白相似性分析和进化树分析。

1.2.4 真核表达载体 pEGFP-MNSF β 的构建

根据重组质粒 pMD18-T-MNSF β 的测序结果, 设计真核表达引物, 上游引物 P₃: 5'-AGAGATCT-ATGCAGCTCTTTGTCCG-3'; 下游引物 P₄: 5'-TAGGGCCCTTAAGAGTTGGCATT-3'。以重组质粒

pMD18-T-MNSF β 为模板, 进行 PCR 扩增, 25 μ L 扩增体系: PremixTaq 12.5 μ L, 模板 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 扩增程序: 95 预变性 5 min; 94 30 s, 50 40 s, 72 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min, 扩增目的序列。对 PCR 产物进行电泳检测和凝胶回收(胶回收试剂盒为威格拉斯生物技术有限公司产品), 将回收的目的片段和 pEGFP-C1 载体(本实验室保存)进行 *Apa* (TaKaRa 公司)和 *Bgl* (TaKaRa 公司)双酶切, 酶切产物进行电泳检测和凝胶回收。将回收的 MNSF β 片段与 pEGFP-C1 按 3:1 的摩尔比混合, 在 T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司)的作用下, 16 连接过夜。10 μ L 连接体系: 目的基因 MNSF β 酶切回收产物 6 μ L, pEGFP-C1 酶切回收产物 2 μ L, T4 连接酶 1 μ L, 10 \times T4 连接酶 buffer 1 μ L。将 10 μ L 连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆, 扩增并提取质粒后(质粒提取试剂盒为威格拉斯生物技术有限公司产品)进行 *Apa* 和 *Bgl* 双酶切鉴定, 由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序, 重组质粒命名为 pEGFP-MNSF β 。

1.2.5 重组质粒 pEGFP-MNSF β 转染 SUVEC

将 SUVEC 接种于装有完全 DMEM 培养基(HyClone 公司)的细胞瓶中, 在 5% CO₂ 培养箱中 37 连续培养, 每 2~3 d 传代一次。将生长良好的 SUVEC 接种于六孔细胞培养板中, 当汇合度达到 70%~80% 时进行转染。实验分为实验组、空载体组和空白对照组, 每组 3 个重复, 实验组转染 pEGFP-MNSF β , 空载体组转染 pEGFP-C1, 空白对照组不加任何干扰, 转染步骤按照 Lipofectamine 2000(INVITROGEN 公司)说明书进行。转染 36 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.6 Western blot 检测猪 MNSF β 蛋白表达

转染 36 h 后, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 800 r/min 离心 5 min。每孔细胞加入 80 μ L 细胞裂解液, 冰上孵育 15 min, 12 000 r/min、4 离心 5 min, 取上清, 按比例加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min 变性, 然后上样进行 SDS-PAGE。转移蛋白至 PVDF 膜(millipore 公司产品), 用 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 分别用鼠抗 GFP 标签抗体(康为世纪生物科技有限公司)和猪源

β -actin 抗体(康为世纪生物科技有限公司)4 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗(康为世纪生物科技有限公司)室温孵育 1 h, ECL (ECL 发光液为 millipore 公司产品)发光显影, 暗室曝光显影、定影。

1.2.7 Hochesst3342 染色后观察转染 36 h 后目的蛋白的细胞定位

转染 36 h 后, 弃去细胞培养液, 用预冷 PBS 洗涤 3 次, 用固定液(甲醇 冰乙酸=3 1)固定细胞, 4 孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次。滴加 Hochesst3342 工作液(武汉博士德生物工程有限公司), 37 孵育 10 min, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 激光共聚焦显微镜下观察细胞内的荧光分布。

1.2.8 猪 *MNSF β* 的组织分布

采用 Trizol 法提取猪不同组织的总 RNA, 反转录得到 cDNA, 根据已克隆的猪 *MNSF β* 全长 cDNA 序列, 设计 RT-qPCR 特异性引物。上游引物 P₅: 5'-CTTGGAGGTAAAGTTCAT-3'; 下游引物 P₆: 5'-TATTGCATACGTCTCTTG-3'。以猪 β -actin 基因序列为模板设计内参引物 β -actin-F(5'-GGATGCA-GAAGGAGATCACG-3')和 β -actin-R(5'-CTCGTCG-TACTCCTGCTTGC-3')。用 RT-qPCR 检测猪 *MNSF β* 在各组织中的相对表达量。20 μ L 反应体系: cDNA 模板 2 μ L, 上下游引物混合液 0.2 μ L(20 pmol/ μ L), SYBR green Real-time PCR master mix 10 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增程序: 95 3 min; 95 10 s, 55 30 s, 40 个循环; 最后为溶解反应, 试验重复 3 次, 使用 Bio-Rad IQ5 软件对 RT-qPCR 试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 猪 *MNSF β* 基因 cDNA 的获得

提取猪脾脏总 RNA, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 凝胶电泳结果显示目的条带约为 500 bp, 与预期大小一致。测序结果显示猪 *MNSF β* 基因全长 402 bp(GenBank 登录号: KF77642500), 与电子克隆序列完全一致。

2.2 猪 *MNSF β* 的生物信息学分析

2.2.1 猪 *MNSF β* 的理化性质分析与二级结构预测

猪 *MNSF β* 蛋白含 133 个氨基酸, 大小约为 14

kDa, 无信号肽, 其分子式为 C₆₂₇H₁₀₅₃N₁₉₅O₁₈₄S₄, 理论 pI 值为 10.24, 推测该蛋白的半衰期为 30 h, 不稳定指数为 30.96, 属稳定蛋白。二级结构中 α 螺旋占 12.78%, β 折叠占 33.08%, 其余为无规则卷曲(附图 1)。二级结构以无规则卷曲为主。

2.2.2 猪 *MNSF β* 染色体定位、外显子、保守结构域预测结果

BLAST 软件预测结果显示, 猪 *MNSF β* 位于第 10 号染色体上, 含有 1 个外显子。NCBI CDD 预测猪 *MNSF β* 蛋白由 ubi-L 结构域和核糖体蛋白 S30 组成, 与已验证的小鼠 *MNSF β* 蛋白结构域相似。

2.2.3 猪 *MNSF β* 与其他物种 *MNSF β* 的同源性分析

利用 NCBI BLAST 在 GenBank 中搜索不同物种 *MNSF β* 的同源序列, 用 DNA MAN 软件对克隆得到的猪 *MNSF β* 与 18 个不同物种的 *MNSF β* 蛋白序列进行相似性比对并绘制 *MNSF β* 蛋白无根进化树。在蛋白水平上, 猪 *MNSF β* 与其他 18 个物种的相似性在 91.73%~97.74%之间, 与小鼠 *MNSF β* 蛋白相似性最高, 达到 97.74%, 与人的 *MNSF β* 蛋白相似性为 93.98%(附表 1)。MNSF β 蛋白的无根进化树分析结果显示猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*)、绵羊(*Ovis aries*)、虎鲸(*Orcinus orca*)和宽吻海豚(*Tursiops truncatus*)可聚成一类, 亲缘关系较近。在所有比较的物种中其进化距离都小于 0.05, 说明 *MNSF β* 在不同物种间高度保守(附图 2)。

2.3 真核表达载体 pEGFP-*MNSF β* 的构建及转染

重组质粒 pEGFP-*MNSF β* 经 *Apa* 和 *Bgl* 酶切鉴定, 所得片段大小与预期结果一致, 表明猪 *MNSF β* 基因已成功插入 pEGFP-C1 表达载体中(图 1)。测序结果表明, *MNSF β* 插入的位置、大小和读码框均正确。

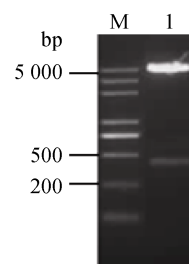


图 1 真核表达载体 pEGFP-*MNSF β* 双酶切结果
M: DNA Maker 2000 plus ; 1: pEGFP-*MNSF β* 酶切结果。

转染 36 h 后, 通过倒置荧光显微镜观察, 实验组和对照组 SUVEC 均出现绿色荧光, 而未转染的空细胞组未见绿色荧光(图 2)。结果表明, 两种质粒已成功转入 SUVEC。

2.4 Western blot 检测 MNSF β 蛋白的表达

MNSF β 蛋白的大小约为 14 kDa, Western blot 结果显示, 在约 41 kDa 出现条带, 与预期大小一致,

表明融合蛋白 EGFP-MNSF β 在 SUVEC 中得到表达(图 3)。

2.5 猪 MNSF β 的亚细胞定位

Hochest33342 染色后用激光共聚焦显微镜观察猪 MNSF β 的细胞定位情况, 转染重组质粒 pEGFP-MNSF β 的 SUVEC 的整个细胞中均能观察到绿色荧光, 说明猪 MNSF β 在细胞核与细胞质内均有表达(图 4)。

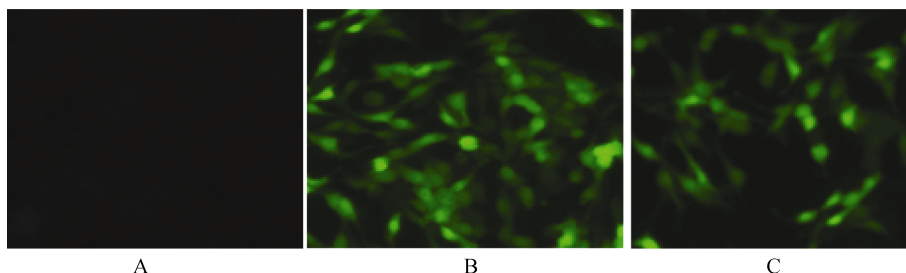


图 2 重组质粒 pEGFP-MNSF β 和空载体 pEGFP-C1 转染 SUVEC 细胞 36 h 后荧光镜检(200 \times)

A: 空 SUVEC; B: 转染空载体 pEGFP-C1 的 SUVEC; C: 转染重组质粒 pEGFP-MNSF β 的 SUVEC。

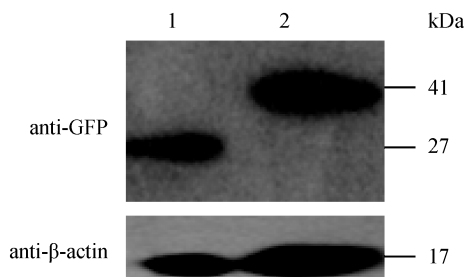


图 3 Western blot 检测猪 MNSF β 的表达

1: 转染空载体 pEGFP-C1 的 SUVEC 细胞; 2: 转染重组质粒 pEGFP-MNSF β 的 SUVEC 细胞。

2.6 猪 MNSF β 的组织表达分布

实时荧光定量 PCR 结果显示, 猪 MNSF β 在肝脏中表达量最高, 其次是扁桃体和肾脏, 在心脏、脾脏、胸腺、肠系膜淋巴结、肺门淋巴结、腹股沟浅淋巴结和下颌淋巴结中低水平表达, 在肺脏中未检测到表达(图 5)。

3 讨论

MNSF β 是一个天然免疫抑制因子, 通过共价结

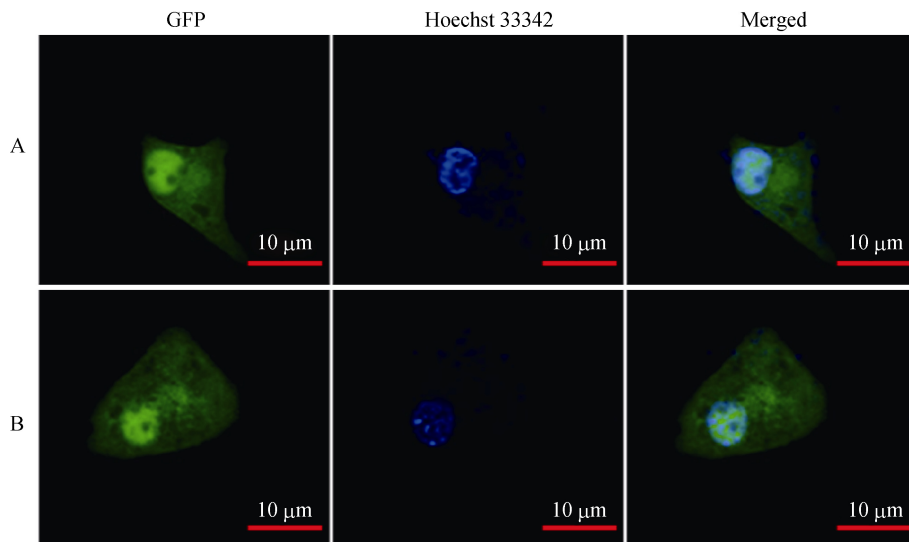


图 4 猪 MNSF β 在 SUVEC 中的亚细胞定位(400 \times)

A: 转染 pEGFP-MNSF β 的 SUVEC 细胞; B: 转染 pEGFP-C1 的 SUVEC 细胞。

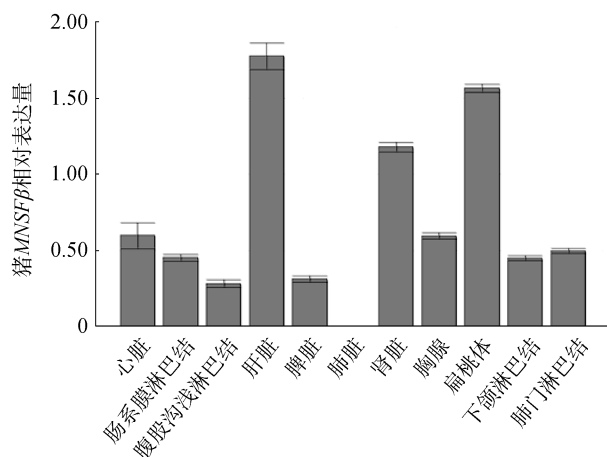


图 5 猪各组织中 *MNSFβ* 基因的相对表达量分析

合到其蛋白受体上发挥生物功能,包括免疫反应、细胞分裂、应激反应、细胞凋亡和核转运^[12]。细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是机体免疫应答与免疫调控的主要形式之一。BCL-G是一个新发现的BCL-2家族的促凋亡蛋白。*MNSFβ*可以通过C-端的Gly-74和Lys-110之间的序列与BCL-G共价结合形成复合物,BCL-G在其中起到稳定*MNSFβ*的作用,并被*MNSFβ*修饰。*MNSFβ*-BCL-G复合物参与介导细胞的凋亡途径,但是其具体作用机制还不清楚^[13-15]。

目前,蒋鹏飞等^[16]已成功克隆了猪*BCL-G*基因,并对其促凋亡作用进行初步验证。为进一步研究*MNSFβ*-BCL-G复合物在凋亡信号通路中的作用机制,本研究利用基因本体论和生物信息学的方法,对猪*MNSFβ*进行了电子克隆,并通过分子生物学实验得到猪*MNSFβ*基因全序列,验证了其在猪体内的存在;将编码区序列与猪基因组序列进行比对,发现猪*MNSFβ*含有1个外显子并定位在第10号染色体,这一结果为进一步研究*MNSFβ*蛋白质的构象和功能结构域提供帮助。NCBI CDD预测结果显示猪*MNSFβ*蛋白与小鼠*MNSFβ*蛋白有相同的结构域,而且两者氨基酸的相似度达97.74%,可能预示着*MNSFβ*蛋白在猪和小鼠体内有着相似的功能。通过构建真核表达载体,并在SUVET中实现了有效的瞬时表达,为该蛋白稳定表达细胞系的筛选奠定了基础。猪*MNSFβ*细胞定位结果显示其在细胞质与细胞核内均有表达。研究发现,*MNSFβ*不仅可以与细胞质中的BCL-G和endophilinII结合发挥生物功能,而且在小鼠Th2细胞系D10中还存在大量游离的*MNSFβ*,

在受到1%TritonX-100刺激时,*MNSFβ*可以与核内组蛋白2A结合参与组蛋白的修饰过程。可见,*MNSFβ*在细胞质与细胞核中均发挥重要作用。实时荧光定量PCR显示:*MNSFβ*在猪免疫器官和组织中广泛表达,在肝脏中的表达量最高。Nakamura等^[17]在小鼠肝脏吞噬细胞中也发现大量的*MNSFβ*蛋白,而肝脏是机体新陈代谢的主要场所。猪*MNSFβ*在肝脏内的高表达,说明其在体内参与众多的生物学功能。前期有研究表明小鼠的脾脏中发现了大量的*MNSFβ*-BCL-G复合物^[18],说明其在机体免疫功能的维持与调节中扮演重要角色。

作为泛素样蛋白家族的成员,*MNSFβ*在物种间有高度的保守性。因此推测,*MNSFβ*在人和猪体内有类似的功能。猪*MNSFβ*-BCL-G复合物功能研究的不断深入,将会为人类对细胞凋亡相关疾病的研究提供理论支持。

附录:附图1、附表1及附图2见文章电子版(WWW.Chinagene.cn)。

参考文献(References):

- [1] Nakamura M, Ogawa H, Tsunematsu T. Mode of action of monoclonal-nonspecific suppressor factor (MNSF) produced by murine hybridoma. *Cell Immunol*, 1988, 116(1): 230-239. [\[DOI\]](#)
- [2] Nakamura M, Xavier RM, Tsunematsu T, Tanigawa Y. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding monoclonal nonspecific suppressor factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8): 3463-3467. [\[DOI\]](#)
- [3] Nakamura M, Tanigawa Y. Ubiquitin-like polypeptide inhibits cAMP-induced p38 MAPK activation in Th2 cells. *Immunobiology*, 2004, 208(5): 439-444. [\[DOI\]](#)
- [4] Naramura M, Watanabe N. Ubiquitin-like protein *MNSFβ*/endophilin complex regulates Decin-1-mediated phagocytosis and in inflammatory responses in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401(2): 257-261. [\[DOI\]](#)
- [5] Suzuki K, Nakamura M, Nariai Y, Dekio S, Tanigawa Y. Monoclonal nonspecific suppressor factor β (*MNSFβ*) inhibits the production of TNF- α by lipopolysaccharide-activated macrophages. *Immunobiology*, 1996, 195(2): 187-198. [\[DOI\]](#)
- [6] Nakamura M, Omura S. Quercetin regulates the inhibitory effect of monoclonal non-specific suppressor factor β on tumor necrosis factor- α production in LPS-stimulated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(7):

- [1901–1920. [DOI](#)
- [7] Nakamura M, Watanabe J, Watanabe N. Ubiquitin-like protein MNSF β regulates TLR-2-mediated signal transduction. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1–2): 39–43. [DOI](#)
- [8] Nie GY, Li Y, Hampton AL, Salamonsen LA, Clements JA, Findlay JK. Identification of monoclonal nonspecific suppressor factor beta (MNSF β) as one of the genes differentially expressed at implantation sites compared to interimplantation sites in the mouse uterus. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55(4): 351–363. [DOI](#)
- [9] Nakamura M, Xavier RM, Tanigawa Y. Monoclonal non-specific suppressor factor β inhibits interleukin-4 secretion by a type-2 helper T cell clone. *Eur J Immunol*, 1995, 25(8): 2417–2419. [DOI](#)
- [10] Nakamura M, Xavier RM, Tanigawa Y. Monoclonal non-specific suppressor factor (MNSF) inhibits the IL-4 secretion by bone marrow-derived mast cell (BMMC). *FEBS Lett*, 1994, 339(3): 239–242. [DOI](#)
- [11] 何球藻, 吴厚生, 曹雪涛. 细胞与分子免疫学. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1997. 146–148. [DOI](#)
- [12] Nakamura M, Tanigawa Y. Noncovalent interaction of MNSF β , a ubiquitin-like protein, with histone 2A. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol*, 2005, 140(2): 207–210. [DOI](#)
- [13] Watanabe J, Nakagawa M, Watanabe N, Nakamura M. Ubiquitin-like protein MNSF β covalently binds to Bcl-2 and enhances lipopolysaccharide/interferon γ -induced apoptosis in macrophages. *FEBS J*, 2013, 280(5): 1281–1293. [DOI](#)
- [14] Naramura M, Yamaguchi S. The ubiquitin-like protein MNSF β regulates ERK-MAPK cascade. *J Biol Chem*, 2006, 281(25): 16861–16869. [DOI](#)
- [15] Cagnol S, Chambard J C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*, 2010, 277(1): 2–21. [DOI](#)
- [16] Jiang P, Li DY, Bi LJ, Zhang DL. BCL-G as a new candidate gene for immune responses in pigs: Bioinformatic analysis and functional characterization. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 150(1–2): 112–117. [DOI](#)
- [17] Nakamura M, Shimosaki S. The ubiquitin-like protein monoclonal nonspecific suppressor factor β conjugates to endophilin II and regulates phagocytosis. *FEBS J*, 2009, 276(21): 6355–6363. [DOI](#)
- [18] Nakamura M, Tanigawa Y. Characterization of ubiquitin-like polypeptide acceptor protein, a novel pro-apoptotic member of the Bcl2 family. *Eur J Biochem*, 2003, 270(20): 4052–4058. [DOI](#)

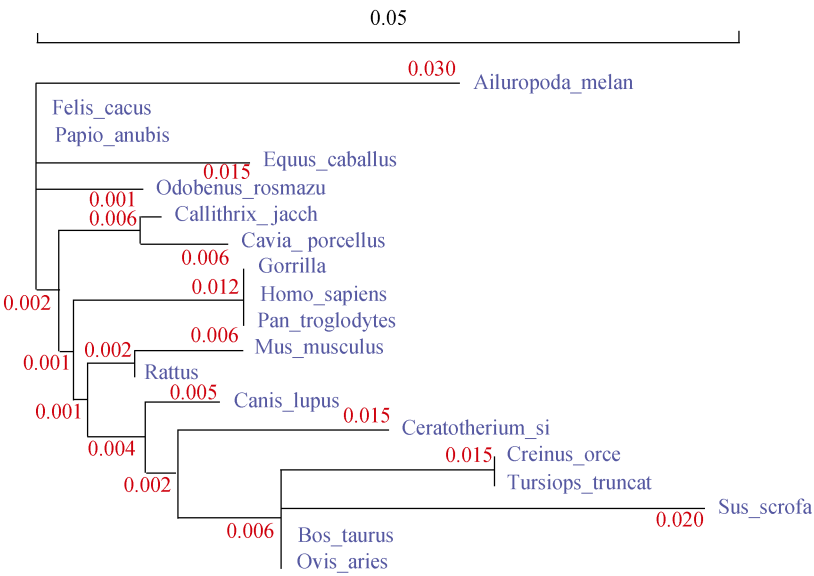
[illegible]

附图 1 猪 MNSF β 蛋白二级结构预测

H: α -螺旋; e: β -折叠; c: 无规则卷曲。

附表 1 猪 MNSFβ 与其他物种 MNSFβ 蛋白序列的相似性分析

物种	拉丁学名	蛋白登录号	蛋白相似度(%)
人	<i>Homo sapiens</i>	NP_001988.1	93.98
小鼠	<i>Mus musculus</i>	NP_001153711.1	97.74
大鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001153704.1	93.98
天竺鼠	<i>Cavia porcellus</i>	XP_003468267.1	93.98
家马	<i>Equus caballus</i>	NP_001157337.1	93.98
家猫	<i>Felis catus</i>	XP_003993635.1	95.49
宽吻海豚	<i>Tursiops truncatus</i>	XP_004324529.1	95.49
虎鲸	<i>Orcinus orca</i>	XP_004264390.1	95.49
海象	<i>Odobenus rosmarus</i>	XP_004394014.1	94.74
牛	<i>Bos taurus</i>	NP_777156.1	96.24
白犀牛	<i>Ceratotherium simum</i>	XP_004440555.1	94.74
绵羊	<i>Ovis aries</i>	XP_004019714.1	96.99
大熊猫	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002916697.1	91.73
大猩猩	<i>Gorilla</i>	XP_004051534.1	93.98
黑猩猩	<i>Pan troglodytes</i>	XP_001168464.1	93.98
普通狢	<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002755569.1	94.74
东非狢狢	<i>Papio anubis</i>	XP_003909640.1	95.49
灰狼	<i>Canis lupus</i>	XP_866667.1	95.49



附图 2 MNSFβ 蛋白无根进化树