

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00482

## 金鱼 PP2A 调节亚基 PR55 $\gamma$ 基因的克隆及表达分析

赵珺琼<sup>1</sup> 谢斯思<sup>1</sup> 陈培超<sup>1</sup> 邹立军<sup>1</sup> 刘文彬<sup>1</sup> 肖亚梅<sup>1</sup>  
刘少军<sup>1</sup> 刘筠<sup>1</sup> 李万程<sup>1,2,3</sup>

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 长沙 410081; 2. Departments of Biochemistry and Molecular Biology University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 681982-5870, USA; 3. Ophthalmology and Visual Sciences, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 681982-5870, USA)

**摘要:** 蛋白磷酸酶 2A 是一种重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶, 对于调控多细胞的生命活动起重要作用。以金鱼大脑为材料, 运用 RT-PCR 技术克隆得到 PP2A 调节亚基 B55 家族中 PR55 $\gamma$  基因编码区部分序列。结果显示 PR55 $\gamma$  基因 cDNA 长 1218 bp, 编码的多肽共含 405 个氨基酸。序列分析表明, 该基因编码的蛋白与已知其他物种对应的 PR55 $\gamma$  蛋白质均有着很高的同源性。用 RT-PCR 的方法检测了 PR55 $\gamma$  基因在金鱼不同组织和胚胎发育不同时期的 mRNA 表达水平。结果表明, PR55 $\gamma$  基因表达呈现明显的组织和胚胎发育阶段差异性。在成体组织中, 仅在大脑和鳍中有表达。在胚胎发育过程中, PR55 $\gamma$  从神经胚开始出现, 整体呈现上升趋势, 在出膜期达到最高水平。据此推测, PR55 $\gamma$  基因可能在金鱼胚胎发育中具有多种重要作用。

**关键词:** 信号转导; 蛋白磷酸酶; PP2A; PR55 $\gamma$ ; 发育; 形态形成

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)03-0482-07

由蛋白激酶和蛋白磷酸酶参与完成的蛋白质磷酸化与去磷酸化过程, 即蛋白质的可逆磷酸化, 是普遍发生于真核生物中的重要调控机制, 蛋白激酶和蛋白磷酸酶活性的平衡对于正常的细胞新陈代谢至关重要<sup>[1-5]</sup>。已完成的人类基因组计划研究成果表明人类共有 518 个潜在的蛋白激酶, 然而仅有 107 种酪氨酸蛋白磷酸酶以及 30—40 种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶与之相对应。如此之少的蛋白磷酸酶之所以可以匹配如此之多的蛋白激酶, 其中最重要的原因之一就是很多蛋白磷酸酶并不是一个单一的蛋白质, 而是由不同亚基组成的复合体, 蛋白磷酸酶 2A (Protein phosphatase 2A, PP2A)就是这种组合的典型代表。

PP2A 是细胞生长、分化和凋亡过程的重要调节者, 通过调节众多蛋白质的磷酸化状态<sup>[6,7]</sup>而参与到

细胞周期、信号转导、DNA 复制、细胞分化和细胞恶性转化等多种生命代谢过程当中<sup>[8,9]</sup>, 我们的最新研究成果表明 PP2A 还参与癌症的控制<sup>[10]</sup>, 在眼睛中也起着十分重要的作用<sup>[11,12]</sup>。

PP2A 一般以二聚体或三聚体形式存在, 三聚体较为常见。其核心酶部分是一个二聚体, 由 36 kD 的催化亚基(PP2Ac)和 65 kD 的结构亚基(PR65/A)组成; 另有分子量为 50—130 kD 不等的调节亚基(B 亚基)和核心酶结合形成三聚体。至今已发现有 26 个 B 族亚基分属 B、B'、B"和 B", 四个亚族, 其中 PR55/B 家族是其调节亚基中重要的成员。

目前已知的 PR55/B 族四种亚基分别是: PR55 $\alpha$ 、PR55 $\beta$ 、PR55 $\gamma$  和 PR55 $\delta$ 。PR55 家族成员表现出时空表达的差异。PR55 $\alpha$  和 PR55 $\delta$  被广泛表达; 而 PR55 $\beta$  和 PR55 $\gamma$  主要表达于脑组织, 其表达

收稿日期: 2010-03-17; 修订日期: 2010-10-29

基金项目: 美国 NIH GRANTS 1R01 EY015765 基金和 1R01 EY01830 基金; 教育部长江学者及创新团队计划 (批准号: IRT0445); 湖南省芙蓉学者特聘教授基金(批准号: 24030604); 国家自然科学基金面上项目(批准号: 30971658); 教育厅优秀青年项目(批准号: 08B048)资助

作者简介: 赵珺琼(1985—), 女, 湖南长沙人; 硕士; 研究方向为鱼类发育生物学及细胞凋亡机制的研究。E-mail: zhaojunqiong111@163.com

通讯作者: 李万程, 男, 湖南衡山人; 博士, 博士生导师; 研究方向为发育生物学和分子细胞生物学。E-mail: dwli1688@hotmail.com

与脑的发育相关。PR55 $\beta$  和 PR55 $\gamma$  都受到不同发育时期的调控, 在出生后 PR55 $\beta$  表达降低, 而 PR55 $\gamma$  的表达水平会迅速升高<sup>[13]</sup>。PR55 家族的不同成员在细胞中的空间分布也不同。但空间定位的不同是由这些亚基的调节功能所致, 还是由于其作用的对象的位置所决定, 还不清楚<sup>[14]</sup>。PP2Ac 和 A 亚基表达无组织特异性, B 亚基决定了 PP2A 全酶的细胞内定位、组织特异性以及发育阶段的存在形式。

目前对于 PP2A 调节亚基 B55 的研究还很有限。据报道, PR55 家族成员与多种蛋白质相互作用参与调节生长发育过程。比如参与构成全酶去磷酸化 AKT 的 Thr308 位点, 抑制下游作用位点; 通过直接去磷酸化被抑制的磷酸化位点 Raf-1(Ser259) 而参与到 MAPK 途径的调控中<sup>[14,15]</sup>。此外, PR55 可参与对细胞周期的控制, 被认为是有丝分裂中的一个重要调节者<sup>[16]</sup>。为了更深入地了解这些亚基的结构特性及其构成的 PP2A 全酶在发育中的功能, 作者克隆了金鱼 PP2A 调节亚基 B55 家族 PR55 $\gamma$  基因的 cDNA 序列, 对它们的氨基酸序列进行了分析, 并进一步对 PR55 $\gamma$  基因在金鱼不同组织和胚胎发育不同时期中 mRNA 的表达进行了研究。

金鱼(*Carassius auratus*)是著名的观赏鱼类, 有极高的经济价值。具有体外产卵、体外受精、胚胎透明的特点, 且繁殖能力强、性成熟早、体型小、饲养成本低。同时人工诱导的单倍体金鱼不同于一般的单倍体鱼类, 可以发育到出膜期, 因此一些非显性基因所控制的表型可以被直接观察, 极大地方便了以单个基因的功能为对象的研究。本实验室以金鱼为实验材料已开展了一系列有关发育调控的研究<sup>[17-22]</sup>, 本实验在已有的研究基础上也以金鱼为实验材料完成。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**实验鱼** 实验用金鱼源自本实验室养殖, 解剖后取出肝脏、精巢、卵巢、大脑、肾脏、肌肉、心脏、鳃、鳍等 9 种组织, 用液氮快速冷冻后储存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。在金鱼繁殖季节, 采用人工受精的方法使鱼卵在水中受精, 然后迅速用胰酶处理使受精卵脱膜。在金鱼受精卵发育过程中, 分别收集不同发育阶段的胚胎, 包括两细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、视原基期、脑泡分化期、肌肉效应期、心跳期、眼色素期、体色素期、出膜

等 12 个发育时期。同样用液氮快速冷冻后储存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

**实验试剂及仪器** Total RNA 提取试剂盒购自 Omega 生物公司, 反转录试剂盒购自 Fermentas 生物公司, PCR TaqMix 和 DNA Marker 购自东盛生物公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物公司, pMD18-T 载体及 RACE 试剂盒购自 TaKaRa 生物公司, 引物合成及 DNA 测序服务均由上海生工生物公司提供。用于质粒扩增的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞(本实验室自备)。BioRad 核酸蛋白分析仪 Biophotometer、MyCycler™ Thermal Cycler PCR 仪; Eppendorf Ctrifuge 5804R 型离心机; Thermo  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱、电子恒温摇床; UVP GDS7500 凝胶成相系统; SW-CJ-2FD 型生物安全柜; AE-240 型电子天平; 北京德天佑科技发展有限公司 DTY-5A 型超级智能恒温循环器; 北京六一仪器厂三恒多用电泳仪、水平平板电泳槽; 上海医用仪器厂 WZK-02 型恒温培养箱; 河南杜甫医用有限公司真空泵; 上海精宏实验设备有限公司 DHG-914A 型电热恒温鼓风干燥箱; 六泉 LQP-B-4 型颗粒制冰机。

### 1.2 实验方法

**总 RNA 的提取** 用 Omega 公司总 RNA 提取试剂盒从金鱼不同组织和不同胚胎时期中提取总 RNA。

**cDNA 第一条链的获得** 分别提取上述金鱼各个组织以及胚胎各个时期的总 RNA。提取时按照 OMEGA 公司的 Total RNA Kit II 推荐方法进行。然后按照 Fermentas 生物公司反转录试剂盒推荐方法进行反转录得到 cDNA 模版。

**PP2A-B55 家族 PR55 $\gamma$  基因的 cDNA 克隆** 从 NCBI 数据库中搜索已知其他物种 PP2A-B55 家族 PR55 $\gamma$  基因 cDNA 序列, 其中包括斑马鱼(NM\_001037394)、褐鼠(NM\_057116)、人(NM\_181876)。参照这些基因的序列比对同源性, 用 Primer Premier 5 软件和 Jellyfish 软件设计引物。以往的研究表明, PR55 $\gamma$  基因在大脑中有丰富的表达, 所以用金鱼大脑组织的 cDNA 为模板, PCR 克隆获得了金鱼 PR55 $\gamma$  基因 cDNA 部分序列。运用 Jellyfish 软件将测序结果与原斑马鱼及其他物种的相应基因序列比对分析, 并将该所得序列于 NCBI 数据库中应用 BLAST 程序进行搜索, 结果均显示该所得序列与 PR55 $\gamma$  基因有着最高的相似性, 确认其为金鱼 PR55 $\gamma$  基因中的片段。

蛋白质结构预测和同源性比较 使用在线工具 SMART 预测蛋白质的简单结构。借助 NCBI 提供的关于 *PR55 $\gamma$*  基因的信息,用序列比对软件 Jellyfish 和 BLAST 工具对克隆得到的 cDNA 序列和对应氨基酸序列进行同源性比较分析。

**PP2A-B55 家族 *PR55 $\gamma$*  基因在 mRNA 水平上的表达分析** 用  $\beta$ -actin 作为实验对照,通过 RT-PCR 的方法检测了 *PR55 $\gamma$*  基因在 mRNA 水平上的表达情况。PCR 模板是从金鱼多种组织和不同发育时期胚胎中提取的 mRNA 经反转录得到的 cDNA。反转录实验时,需根据测定 RNA 样品的浓度,调整反转录中加入的 RNA 量,保证每个反转录体系中的 RNA 量相等。该反转录产物即可作为表达实验中 RT-PCR 的模板。在 RT-PCR 反应体系中, $\beta$ -actin 基因引物和 *PR55 $\gamma$*  基因表达引物加入同一反应体系进行反应。实验用表达引物(表 1)。

## 2 结果

### 2.1 PP2A-B55 家族 *PR55 $\gamma$* 基因的 cDNA 克隆

通过使用上述实验方法,我们得到了金鱼 PP2A-B55 家族 *PR55 $\gamma$*  基因部分 cDNA 序列。它包含 1218 个碱基,编码含 405 个氨基酸的非全长蛋白质序列。作者已将克隆得到的 cDNA 序列提交 GenBank 数据

库。登录号为 GU353173。

氨基酸序列同源性比较表明,该蛋白质序列与斑马鱼(NM\_00103739)的同源序列的相似度为 87.3%,与褐鼠(NM\_057116)的为 75.7%,与人(NM\_181876)的为 75.5%。

### 2.2 *PR55 $\gamma$* 在金鱼不同组织和胚胎发育不同时期中的 mRNA 表达

本实验使用 RT-PCR 的方法检测 *PR55 $\gamma$*  基因在 mRNA 水平上的表达情况。结果表明,*PR55 $\gamma$*  基因表达呈现明显的组织和胚胎发育阶段差异性。在成体组织中,仅在大脑和鳍组织中有表达。胚胎发育过程中,*PR55 $\gamma$*  从神经胚开始出现,在脑泡期和肌肉效应期显著增加后,心跳期、眼色素期和体色素期的表达差异不是很明显,随后在出膜期达到最高水平。

根据基因的表达电泳图并利用灰度分析软件 Gelpro32,通过计算可以得到泳道中特定基因与对应  $\beta$ -actin 的灰度值比值,并据此绘出基因表达的柱型图(图 1、图 2)。

## 3 讨论

### 3.1 PP2A-B55 家族 *PR55 $\gamma$* 基因的结构特点

本文克隆了金鱼 PP2A-B55 家族 *PR55 $\gamma$*  调节基因的 cDNA 序列。序列分析发现,*PR55 $\gamma$*  基因的氨基

表 1 用于 *PR55 $\gamma$*  基因表达检测的引物信息  
Tab. 1 Oligo primers used for *PR55 $\gamma$*  RT-PCR analysis

	Forward primer (+)	Reverse primer (-)
<i>PR55<math>\gamma</math></i>	AAGGATGAAGAAGGGCGAAT	TGTCACAGAGGCGTAGTGTC
$\beta$ -actin	CCGTGACCTGACTGACTACCTC	ATACCGCAAGATTCCATACCC

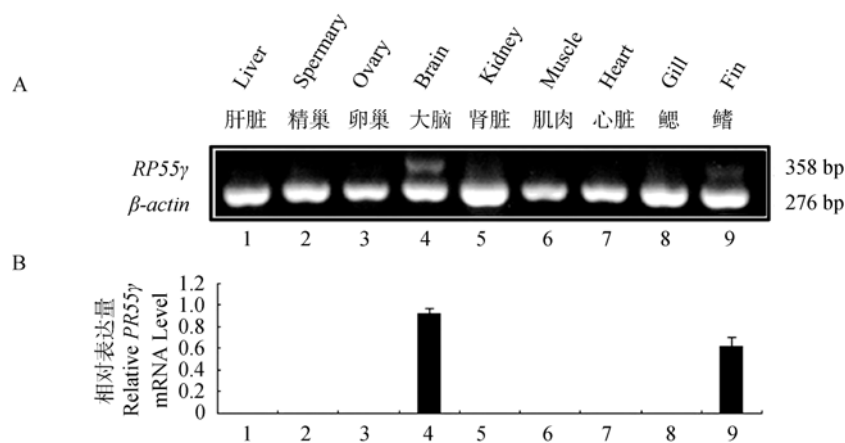


图 1 *PR55 $\gamma$*  在金鱼 9 个组织中的 mRNA 表达(A)及定量分析图(B)

Fig. 1 RT-PCR to detect the mRNA level (A) and quantitative results (B) for *PR55 $\gamma$*  of PP2A in 9 tissues of adult goldfish as indicated

*PR55 $\gamma$*  基因特异表达引物和  $\beta$ -actin 引物在 PCR 反应开始时同时加入; 以上实验数据来自三次以上平行实验; 下同  
The primers for both *PR55 $\gamma$*  and  $\beta$ -actin were added to the same reaction at the beginning of PCR; Quantitative results of the *PR55 $\gamma$*  mRNA expression from three independent experiments; the same below

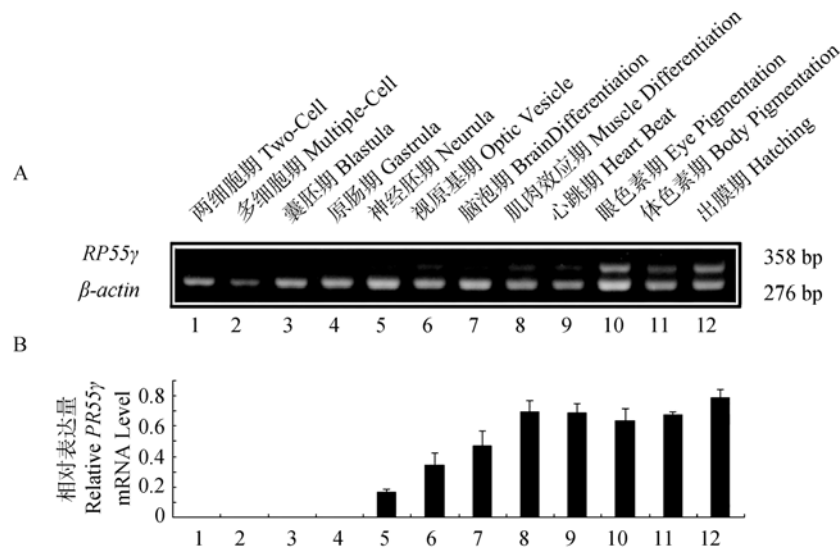


图 2 PR55 $\gamma$  在金鱼胚胎发育 12 个时期中的 mRNA 表达(A)及定量分析图(B)

Fig. 2 RT-PCR to detect the mRNA level and quantitative results of PR55 $\gamma$  at 12 different developmental stages

酸序列在不同物种间具有较高的同源性, 暗示该基因在进化上和功能上的保守性。

已有的研究表明, B 亚基是 PP2AC 的靶蛋白, 具有结构多样性和缺乏序列同源性的特点。B 亚基家族之间的同源性非常低, 但 B 亚基家族中不同的成员具有高度的组织特异性和不同的亚细胞结构定位, 这决定了 PP2A 全酶的底物特异性以及特定发育阶段的不同存在形式, 进而介导 PP2A 在不同信号转导中的特定作用<sup>[23]</sup>。据统计, 在人类的基因组中鉴定出 15 个基因编码 PP2A 的 B 亚基, 能够产生至少 26 个不同的转录及剪切产物。除了几个保守的氨基酸外它们缺乏序列的同源性, 它们与 PR65 的 HEAT 结构域相互作用而结合。我们对 PR55 $\gamma$  的结构预测发现它含有 4 个 WD40 重复结构。这一结构被认为能间接的调节蛋白质的相互作用<sup>[24]</sup>。另外推测, 这种 WD40 重复结构作为与 PP2A 结构亚基 A 相结合的区域, 为 B55 家族调节亚基参与 PP2A 三聚体的装配提供了支点, 参与到全酶装配。据报道, 其他的 B 家族亚基都有特殊的一级结构与结构亚基 A 相互作用, 包括 B'/PR61 家族的 HEAT-like 重复结构和 B''家族的 EF-HAND 结构<sup>[20,25]</sup>。这些由不同亚基组成的 PP2A 全酶具有不同的组织和亚细胞定位、不同底物的特异性以及不同的生物学调节方式<sup>[26]</sup>。

### 3.2 PP2A-B55 家族 PR55 $\gamma$ 基因在金鱼成体组织中表达的探讨

在成体组织中, 金鱼 PR55 $\gamma$  基因在大脑中特异

表达(图 1)。这与之前报道是一致的<sup>[27]</sup>。在金鱼胚胎发育过程中, PR55 $\gamma$  基因的表达是在神经胚形成后才出现的, 并逐渐增强。这一表达模式表明, PR55 $\gamma$  在金鱼大脑的分化过程中起着十分重要的作用。此外, 我们的结果表明 PR55 $\gamma$  基因在鱼鳍中也有明显的表达。鱼鳍的主要功能是调节鱼的运动及平衡并感受周围环境的变化。在分子水平上, 这些功能的完成可能是通过多种不同受体及其调控的信号通路来共同完成的。磷酸化和去磷酸化在这一过程中起着十分重要的作用。由 PR55 $\gamma$  所构成的特异性 PP2A 很可能是重要的参与者。此外, PR55 $\gamma$  参与形成的特异性 PP2A 对鱼鳍的发育也可能有重要作用。我们关于 PR55 $\gamma$  基因在鳍中表达的结果属首次报道。PR55 $\gamma$  基因限定在金鱼大脑和鳍组织中的这一表达模式与 PP2A 催化亚基 C 在各个组织均有表达的模式形成鲜明对比。这表明, PR55 $\gamma$  基因的功能可能以 PP2A 全酶外的其他形式出现。

### 3.3 PP2A-B55 家族 PR55 $\gamma$ 基因在金鱼胚胎发育过程中表达的探讨

在金鱼胚胎发育过程中, PR55 $\gamma$  基因从神经胚开始出现, 在出膜期显著提高达到最高水平(图 2)。从整体上是呈现上升的趋势。这与金鱼 PP2A 催化亚基 C 的发育表达模式较为吻合。后者的表达模式从整体上也是呈现上升的趋势, 从囊胚到体色素出现, PP2Ac 的上升缓慢, 但出膜时 PP2Ac 的表达上升迅速, 是囊胚期的 15 倍<sup>[28,29]</sup>。PR55 $\gamma$  和 PP2Ac 表

达模式的吻合说明在发育过程中, PR55 $\gamma$  调节亚基很可能以 PP2A 全酶的形式行使其调控作用。

本实验关于金鱼 PR55 $\gamma$  基因在组织和胚胎发育各个时期的表达模式和金鱼 PP2A 调节亚基 B' $\delta$ 、B'' $\alpha$  和  $\gamma$  以及 B'''SG2NA 的表达模式有显著差异, 进一步证实了不同形式的 B 亚基是相互独立的发挥其功能的。

在后续实验当中, 本实验室将在蛋白质水平上运用 western blot 结合免疫组化、原位杂交的方法对 PR55 $\gamma$  基因在金鱼组织和胚胎发育中进行定量、定位分析; 并设计构建反义载体、运用 RNA 干扰的方法来抑制或减弱 PR55 $\gamma$  基因的表达, 以期达到更清楚的探究 PR55 $\gamma$  基因在金鱼不同组织和胚胎发育中的重要作用<sup>[30-34]</sup>。本文所研究的这一调节亚基的克隆虽属已知基因, 但该基因所确定的在鱼类中的组织特异性表达和不同发育时期的分化表达在以前的文献中尚未报道, 本研究结果为深入研究 PR55 $\gamma$  基因打下了重要的基础。

#### 参考文献:

- [1] Alain J C. Protein phosphorylation in prokaryotes [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1988, **42**: 97—125
- [2] Jeffrey B S, Alexander J N and Ann M S. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria [J]. *Microbiology Reviews*, 1989, **53**(4): 450—490
- [3] Caren C, Richard C S. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. [J]. *Plant Physiology*, 1998, **117**: 723—731
- [4] David B, Amit K D, Marie P E. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation [J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1998, **27**: 133—164
- [5] Stefaan W, Brain A H. Serine/threonine protein phosphatases [J]. *Biochemical Journal*, 1995, **311**(1): 17—29
- [6] David M V. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, **12**(2): 180—185
- [7] Veerle J, Jozef G. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling [J]. *Biochemical Journal*, 2001, **353**(3): 417—439
- [8] Axel H S. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in Cancer [J]. *Cancer Letters*, 2001, **170**(1): 1—13
- [9] Steven S W, Edward D E, Li J L, et al. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer [J]. *Science*, 1998, **282**(5387): 284—287
- [10] Qin J C, Chen H G, Yan Q, et al. Protein phosphatase-2A is a target of EGCG and modulates the p53-Bak apoptotic pathway [J]. *Cancer Research*, 2008, **68**(11): 4150—4162
- [11] David WC L, Hus X, Uwe F, et al. Analysis of expression patterns of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A in rat and bovine lenses [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001, **42**(11): 2603—2609
- [12] Liu W B, Li Y, Zhang L, et al. Differential expression of the catalytic subunits for PP-1 and PP-2A and the regulatory subunits for PP-2A in mouse eye [J]. *Molecular Vision*, 2008, **14**: 762—773
- [13] Strack S, Zaucha J A, Ebner F F, et al. Brain protein phosphatase 2A: Developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 1998, **392**(4): 515—527
- [14] Pieter E JA, Menno P C, Rene B. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, **1795**(1): 1—15
- [15] Adams D G, Jr C R L, Zhang H, et al. Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes [J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, **280**: 42644—42654
- [16] Satoru M, Satoshi I, Julian G, et al. Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts [J]. *The EMBO Journal*, 2009, **28**: 2777—2785
- [17] Tong Y, Li B X, Chen J H, et al. Analysis on genomic structure and intron polymorphism of goldfish Vsx1 [J]. *Acta Lasser Biology Sinica*, 2007, **16**(4): 418—423 [童英, 李冰露, 陈金辉, 等. 金鱼 Vsx1 基因结构及其内含子多态性分析. 激光生物学报, 2007, **16**(4): 418—423]
- [18] Peng F L, Luo C. Cloning and Tissue Expression of Insulin-like Growth Factor 2 Gene in *Carassius auratus* [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2007, **30**(2): 103—107 [彭凤兰, 罗琛. 金鱼胰岛素样生长因子 2 基因克隆与组织表达. 湖南师范大学自然科学学报, 2007, **30**(2): 103—107]
- [19] Huang L Y, Li B X, Luo C, et al. Proteome comparative analysis of gynogenetic haploid and diploid embryos of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Proteomics*, 2004, **4**(1): 235—243
- [20] Zheng C B, Ma H L, Fu H, et al. cDNA cloning and mRNA expression of the genes encoding regulatory subunits  $\alpha$  and  $\gamma$  of the B'' family for PP-2A [J]. *Progress in Natural Sciences*, 2009, **19**: 36—42 [郑春兵, 马海立, 付虎, 等. 金鱼 PP2A-B'' 家族 Alpha 和 Gamma 调节基因的 cDNA 克隆及 mRNA 表达. 自然科学进展. 2009, **19**: 36—42]
- [21] Fu H, Zheng C B, Ma H L, et al. Molecular cloning and

- differential expression of the gene encoding the B $\delta$  regulatory subunit of PP-2A SP from goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Science China Life Sciences.*, 2009, **39**: 460—468
- [22] Ma H L, Peng Y L, Gong L L, *et al.* The goldfish SG2NA gene encodes two  $\alpha$ -type regulatory subunits for PP-2A and displays distinct developmental expression pattern [J]. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2009, **3**: 115—129
- [23] Li T Z, Xiang B Q. The structure of protein phosphatase 2A and its inhibition of tumorigenesis [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, **36**(2): 133—142 [李天祝, 向本琼. 蛋白磷酸酶 PP2A 的结构及其肿瘤抑制因子功能. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 133—142]
- [24] Eva J N, Carl J S, Raman N, *et al.* The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [J]. *Nature*, 1994, **371**: 297—300
- [25] Li X H, Virshup D M. Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, **269**(2): 546—552
- [26] Veerle J, Sari L, Jozef G. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail) [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, **33**(3): 113—121
- [27] Naoko A, Hiroshi S, Yoshiaki H. *et al.* cDNA cloning of BR gamma, a novel brain-specific isoform of the B regulatory subunit of type-2A protein phosphatase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, **230**: 766—772
- [28] Liu W B, Wang D, Zhou J, *et al.* Differential expression patterns of the protein phosphatase-2Ac in six tissues of different ploidy fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 1095—1104 [刘文彬, 王道, 周洁, 等. 蛋白磷酸酶-2Ac 在不同倍性鱼 6 种组织中的分化表达模式. *水生生物学报*, 2009, **33**(6): 1095—1104]
- [29] Liu W B. Analysis Differential Expression Patterns of the Protein Phosphatase-1 and -2A in the Vertebrates [D]. Thesis for PHD of Science. Hunan Normal University, Changsha. 2007 [刘文彬. 蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 在脊椎动物体内分化表达模式的研究. 博士学位论文, 湖南师范大学, 长沙. 2007]
- [30] Steven S W, Edward E, Jia L L, *et al.* Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer [J]. *Science*, 1998, **282**: 284—287
- [31] George A C, Maria G I, Elisabetta Ci, *et al.* Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms [J]. *Oncogene*, 2000, **19**: 1191—1195
- [32] Chen H G, Han W J, Deng M, *et al.* Transcriptional regulation of PP2A-A alpha is mediated by multiple factors including AP-2alpha, CREB, ETS-1, and SP-1. *PLoS One* **4**, 2009, 7019
- [33] Yan Q, Mao Y W, D.W. Li. Protein serine/threonine phosphatases in the nerve system. In: Binder, Hirokawa, Windhorst (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer, Heidelberg. 2009, 3325—3329
- [34] Liu W B, Hu X H, Hui S S, *et al.* Differential expression patterns of the catalytic subunits for PP-1 and PP-2A in the ocular tissues of goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, **12**: 021

## MOLECULAR CLONING AND DIFFERENTIAL EXPRESSION PATTERNS OF THE GENE ENCODING THE PR55/B $\gamma$ OF PP-2A IN GOLDFISH, *CARASSIUS AURATUS*

ZHAO Jun-Qiong<sup>1</sup>, XIE Si-Si<sup>1</sup>, CHEN Pei-Chao<sup>1</sup>, ZOU Li-Jun<sup>1</sup>, LIU Wen-Bin<sup>1</sup>, XIAO Ya-Mei<sup>1</sup>,  
LIU Shao-Jun<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>1</sup> and LI Wan-Cheng<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Protein Chemistry & Developmental Biology of Education Ministry of China, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Departments of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 681982-5870, USA; 3. Ophthalmology and Visual Sciences, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 681982-5870, USA)

**Abstract:** The reversible phosphorylation of proteins is an important posttranslational modification in eukaryotes that modulates the functional status of more than thirty percent of total cellular proteins. In the present study, we reported the molecular cloning of a partial cDNA coding for the PR55/B $\gamma$  of PP-2A from the brain of goldfish through 5' RACE PCR strategy. The partial *PR55 $\gamma$*  cDNA contained 1218 nucleotides which encoded a deduced partial protein of 405 amino acids. Sequence homology analysis showed that the PR55/B $\gamma$  of PP-2A displayed a high level of amino acid identity with the counterpart from other species including human and rat, indicating the conservation of PR55/B $\gamma$ . RT-PCR analysis revealed that *PR55/B $\gamma$*  mRNA was specifically expressed in the brain and fin of goldfish. Our demonstration that *PR55/B $\gamma$*  was expressed in the fish fin was a novel finding for the first time. This result suggested that the PP-2A with PR55/B $\gamma$  as the regulatory subunit in fish likely played an important role in swimming, balancing and sensitivity to the water environment. Moreover, during the development of goldfish, *PR55/B $\gamma$*  mRNA was initially detected at neurula stage, suggesting that the PP-2A with PR55/B $\gamma$  as the regulatory subunit was likely implicated in control of the brain development differentiation in fish. Furthermore, we found that *PR55/B $\gamma$*  became gradually increased from the optic vesicle stage and reached a peak level at the muscle movement stage, and thereafter, *PR55/B $\gamma$*  mRNA maintained at this level with slight fluctuation from heart beat to hatching larvae. These results indicated that PP-2A with PR55/B $\gamma$  as the regulatory subunit was actively regulating the development processes of these different stages. The consistent developmental expression patterns of PR55/B $\gamma$  (Fig. 2) and the catalytic subunits (PP-2Ac)<sup>[28]</sup> also supported that PR55/B $\gamma$  may regulate fish development in holoenzyme, which was different from that of certain regulatory subunits of PP-2A<sup>[20–22]</sup>. Thus, our present study demonstrated that the specific PP-2A with PR55/B $\gamma$  as regulatory subunit may play an important role in regulating fish development. In addition, PP-2A containing PR55/B $\gamma$  as the regulatory subunit may play important roles of homeostasis in brain and fin.

**Key words:** Signal Transduction; Protein Dephosphorylation; PP-2A; PR55 $\gamma$ ; Development; Morphogenesis