

猪 GRP78 基因克隆、生物信息学分析及组织表达谱研究

赵诗瑜, 张帆, 周晓龙, 汪涵, 赵阿勇, 杨松柏*

(浙江农林大学动物科技学院, 临安 311300)

摘要: 本研究旨在克隆猪葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 基因, 并进行生物信息学分析, 探讨其在猪不同组织中的表达情况。根据 GenBank 上公布的猪 GRP78 基因序列 (登录号: XM_001927795.6) 设计引物, PCR 扩增及测序获得猪 GRP78 基因 CDS 序列, 使用在线软件分析 GRP78 的理化性质、跨膜结构、信号肽、疏水性、保守结构域、二级结构和三级结构, 并进行同源性比对及系统进化树构建, 利用实时荧光定量 PCR 方法检测猪 GRP78 基因在各组织中的表达情况。结果显示, 猪 GRP78 基因 CDS 区长 1 965 bp, 可编码 654 个氨基酸。生物信息学分析表明, GRP78 理论分子质量为 72.3 ku, 等电点 (pI) 为 5.06, 半衰期为 30 h, 其水溶液在 280 nm 处的消光系数为 30 495, 肽链 N 端为蛋氨酸 (Met), 不稳定系数为 32.39, 属于稳定蛋白。脂肪系数为 85.40, 总平均疏水指数为 -0.496, 无跨膜结构, 存在信号肽序列, 说明该蛋白属于分泌型蛋白; GRP78 蛋白只包含 1 个超家族保守结构域: HSP70 结构域。蛋白二级结构分析显示, GRP78 蛋白中 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲分别为 40.06%、20.49%、8.10% 和 31.35%。同源性比对结果显示, 猪 GRP78 基因与人 (登录号: NM_005347.4)、小鼠 (登录号: NM_001163434.1)、大鼠 (登录号: NM_013083.2)、山羊 (登录号: XM_005687138.3)、牛 (登录号: NM_001075148.1) 核苷酸序列的同源性分别为 93%、91%、90%、95%、95%, 氨基酸序列的同源性分别为 99%、98%、98%、99%、99%, 各个物种之间 GRP78 基因保守性较高。实时荧光定量 PCR 结果显示, GRP78 基因在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、胃、卵巢、输卵管、乳腺、小脑、大脑、垂体等组织中均有表达, 在心脏、脾脏、肺脏中相对高表达。本研究结果为今后深入研究 GRP78 基因的生物学功能提供了基础材料。

关键词: 猪; GRP78 基因; 克隆; 生物信息学分析; 组织表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2018)12-3317-10

Cloning, Bioinformatics and Tissue Expression Analysis of Porcine GRP78 Gene

ZHAO Shiyu, ZHANG Fan, ZHOU Xiaolong, WANG Han, ZHAO Ayong, YANG Songbai*
(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Linan 311300, China)

Abstract: This study was aimed to clone and analyze the CDS region of porcine glucose-regulated protein 78 (GRP78) gene using bioinformatics, and investigate the mRNA expression profile of GRP78 gene. Primers were designed according the predicted sequence of porcine GRP78 gene (accession No.: XM_001927795.6) in GenBank. The CDS region of porcine GRP78 gene was cloned by PCR amplification and sequencing. The physical and chemical property, transmembrane region, signal peptide, hydrophobicity, conserved domains, the secondary and tertiary structures were analyzed, and the phylogenetic tree of GRP78 gene was constructed by online prediction softwares. Finally, Real-time PCR was used to detect the tissue expression of porcine GRP78 gene. The results showed that the CDS of GRP78 gene was 1 965 bp, encoding 654 amino acids. Bioinformatics

收稿日期: 2018-04-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31501921); 浙江农林大学学生科研训练项目 (2013200005)

作者简介: 赵诗瑜 (1997-), 女, 山西长治人, 本科, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: zsy2463586863@163.com

* 通信作者: 杨松柏 (1985-), 男, 安徽阜阳人, 博士, 讲师, 研究方向: 猪功能基因组学与抗病育种, E-mail: sbyang@zafu.edu.cn

analysis showed that the molecular weight, theoretical electrical point (pI), half-life and the extinction coefficient of water solution at 280 nm of GRP78 were 72.3 ku, 5.06, 30 h, and 30 495, respectively. The peptide chain N-terminal of GRP78 was M (Met). The unstable coefficient of GRP78 was 32.39, indicating that it belonged to the stable protein. The fat coefficient of GRP78 protein was 85.40, and the total average hydrophobic index was -0.496. GRP78 did not have transmembrane domain but it had one signal peptide, therefore, this protein belonged to the secreted protein. The secondary structure analysis of GRP78 showed that the percent of amino acids of α -helix, extended chain, β -turn and random coil were 40.06%, 20.49%, 8.10% and 31.35%, respectively. Homology analysis results showed that the nucleotide homology of *GRP78* gene with human (NM_005347.4), mouse (NM_001163434.1), rat (NM_013083.2), goat (XM_005687138.3) and cattle (NM_001075148.1) were 93%, 91%, 90%, 95% and 95%, whereas the amino acid homology were 99%, 98%, 98%, 99% and 99%, respectively. These results indicated that *GRP78* gene was highly conserved. Real-time PCR results showed that *GRP78* gene was expressed in heart, liver, spleen, lung, kidney, small intestine, stomach, ovary, fallopian tube, breast, cerebellum, cerebrum and pituitary gland, and highly expressed in heart, spleen and lung. This study provided basic materials for further study of the biological function of *GRP78* gene.

Key words: porcine; *GRP78* gene; clone; bioinformatics analysis; tissue expression

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 又名热休克蛋白 A5 (heat shock protein 5, HSPA5) 和免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin-binding protein, BIP), 是热休克蛋白 70 (HSP70) 家族中的一员, 定位于细胞内质网上, 在内质网应激反应、蛋白质的折叠、转运过程中起重要作用^[1]。研究表明, GRP78 可以通过 PERK、IRE1 和 ATF-6 信号通路来参与内质网应激反应^[2], 其具体作用机理为通过和信号分子的相互作用来调节在受到应激反应时的细胞的生存或凋亡^[3]。在非应激状态下, 2 型穿膜蛋白 ATF-6 与 GRP78 形成稳定的复合物, 并通过 GRP78 对 ATF-6 上高尔基体定位信号 (golgi localization signal, GLS) 的抑制作用而停留在 ER 膜上。内质网发生应激反应时, ER 腔内未折叠蛋白堆积信息能使 ATF-6 与 GRP78 分离, GRP78 会优先结合错误折叠的蛋白质, 同时解除 GRP78 对 GLS 的抑制, ATF-6 与外被蛋白 2 (COP II) 相互作用并形成蛋白复合体, 随后生成囊泡被运输到高尔基体中^[4], ATF-6 活化后, N 端切割段可转移到核内, 促进转录因子 (如 XBP1) 和 UPR 靶分子 (如 GRP78) 等基因转录, 进而促进蛋白在 ER 腔内的正确折叠^[2]。相关研究表明, 猪肾细胞 (PK15) 感染猪圆环病毒 2 (PCV2) 后, 通过激活 PERK/eIF2 α 路径触发非折叠蛋白反应 (UPR)^[5], 内质网应激的发生使 GRP78 和与之结合的 PERK 分离, 转而去应付未折叠蛋白, 从而使 PERK 暴露并活

化, 进而催化 eIF2 α 蛋白发生磷酸化, 抑制了蛋白质合成的起始过程^[6], 介导病毒细胞的自噬和凋亡。鸭感染鸭肠炎病毒 (DEV) 会触发内质网应激反应, 可证实其标志蛋白 GRP78 的表达增强及内质网的形态扩张, 在被 DEV 感染的鸭胚胎成纤维细胞 (DEF) 中, 与 UPR 相关的通路, 包括 PERK 和 IRE1 通路被激活, 但没有激活 ATF6 通路^[7]。Wei 等^[8] 在富含氢的盐水保护视网膜不受谷氨酸的兴奋毒性损伤的试验中发现, 在豚鼠中很可能是通过抑制胶质细胞的活化降低了诱生型一氧化氮合酶 (iNDS) 和 GRP78 的产生, 从而促进谷氨酸的清除。研究表明, 在断奶后的仔猪日粮中补充大肠杆菌会增加 *GRP78* 基因在空肠和回肠 (尤其是空肠上皮细胞和回肠胚心) 中的表达, 并会提高 CHOP 和 caspase-11 在空肠和回肠中的表达水平, 从而激活猪小肠中 CHOP-caspase11 依赖的细胞凋亡^[9]。目前, 关于猪 *GRP78* 基因结构和功能的研究尚不清楚。鉴于此, 本研究通过对猪 *GRP78* 基因 CDS 区进行克隆, 并对其进行生物信息学分析及组织表达谱研究, 为进一步研究 *GRP78* 基因提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

长白猪选自杭州大观山种猪育种有限公司, 取健康猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、胃、卵

巢、输卵管、乳腺、小脑、大脑、垂体等组织,用锡箔纸包好迅速冷冻于液氮中,−80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

pMD19-T 载体、DNA Marker 和荧光定量试剂 SYBR Premix DimerEraser 均购自宝生物工程(大连)有限公司;2×*Taq* PCR MasterMix、HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司;凝胶回收试剂盒和 RNA 提取试剂(Trizol)均购自 Ambion 公司。实时荧光定量 PCR

仪(CFX96 Touch)购自 Bio-Rad 公司。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 上已公布的猪 GRP78 基因预测序列(登录号:XM_001927795.6),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 GRP78 基因普通 PCR 及实时荧光定量 PCR 引物,以猪 RPL32 基因(登录号:NM_001001636.1)作为内参设计扩增引物,引物序列见表 1。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences information

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段长度 Products length/bp	退火温度 Annealing temperature/°C	用途 Purpose
GRP78	F:ATGAAGCTGTCCCTGGTGG R:CTACAACCTCATCTTTGTCTGCTG	1 965	60	普通 PCR
GRP78	F:CTCGCATCCCAAAGATTCAACA R:TCCCACGGTTTCAATACCAAGT	194	62	实时荧光定量 PCR
RPL32	F:CGGAAGTTTCTGGTACACAATGTAA R:TGGAAGAGACGTTGTGAGCAA	96	60	实时荧光定量 PCR

1.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成

经 Trizol 法提取猪各组织总 RNA 后,采用 ND-1000 分光光度计检测总 RNA 的浓度及纯度。利用 HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 的合成,反应体系 20 μL:dNTP Mix 4 μL, Primer Mix 2 μL, RNA 1 μg, 5×RT Buffer 4 μL, DTT 2 μL, HiFiScript 1 μL, RNase-free Water 补足体系。涡旋震荡混匀,短暂离心,使管壁上的液体收集到管底,42 °C 孵育 50 min,85 °C 孵育 5 min,反应结束后,短暂离心,置于冰上冷却,−20 °C 保存备用。

1.5 PCR 扩增及克隆

以猪肾脏组织样 cDNA 为模板扩增猪 GRP78 基因 CDS 序列。PCR 反应体系 20 μL:2×*Taq* PCR MasterMix 10 μL,cDNA 2 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL,灭菌水补足体系。PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 55 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min。通过 TA 克隆方法将该序列在 16 °C 连接至 pMD19-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂板于 LB 固体培养基中,37 °C 恒温培养箱中培养 12 h,挑取单菌落扩大培养,菌液经 PCR 方法鉴定阳性克隆后送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.6 生物信息学分析

通过在线软件 ProtParam([http:// web. expasy. org/protparam/](http://web.expasy.org/protparam/))和 ORFfinder([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/gorf/gorf. html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html))分析蛋白质基本理化性质;通过在线软件 TMHMM([http:// www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/))预测蛋白跨膜结构;通过在线软件 SignalP([http:// www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/))预测蛋白信号肽;通过在线软件 ProtScale([http:// web. expasy. org/ protscale/](http://web.expasy.org/protscale/))分析蛋白质的亲疏水性;通过 Conserved Domains([https:// www. ncbi. nlm. nih. gov/Struc- ture/cdd/wrpsb. cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi))在线软件分析蛋白质的保守结构域;通过在线软件 SOPMA([https:// nhjy. hzau. edu. cn/kech/swxxx/jakj/dianzi/Bioinf7/Expasy/Expasy8. htm](https://nhjy.hzau.edu.cn/kech/swxxx/jakj/dianzi/Bioinf7/Expasy/Expasy8.htm))预测蛋白质二级结构;通过在线软件 Phyre 2([http:// www. sbg. bio. ic. ac. uk/ phyre2/htmlpage. cgi? id=index](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/htmlpage.cgi?id=index))预测蛋白质三级结构。选取人(登录号:NM_005347.4)、小鼠(登录号:NM_001163434.1)、大鼠(登录号:NM_013083.2)、山羊(登录号:XM_005687138.3)、牛(登录号:NM_001075148.1)等物种的相关序列进行序列分析,并利用 DNAMAN 5.0 和 Mega 5.0 进行同源性比对

和系统进化树构建。

1.7 实时荧光定量 PCR 扩增

以猪不同组织 cDNA 作为模板,利用 CFX96 Touch 荧光定量 PCR 检测系统进行实时荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系 10 μ L: SYBR Premix DimerEraser 5 μ L, 上、下游引物各 0.3 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 3.4 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s; 39 个循环。熔解曲线分析: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 然后以 0.5 $^{\circ}$ C/5 s 的速度从 65 $^{\circ}$ C 升到 95 $^{\circ}$ C。最终依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[10], 计算 GRP78 基因在猪不同组织中的表达情况。

2 结果

2.1 猪 GRP78 基因 CDS 的扩增及克隆

以猪肾脏组织 cDNA 为模板对 GRP78 基因 CDS 进行 PCR 扩增, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 发现一条长约 1 965 bp 的条带(图 1), 与预期片段大小一致。克隆测序结果显示, 片段大小为 1 965 bp, 与预期目的条带大小相一致。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 猪 GRP78 蛋白理化性质和疏水性分析

经 ORFfinder 软件预测显示, 猪 GRP78 基因编码 654 个氨基酸。利用 ProtParam 软件分析 GRP78 蛋白的理化性质, 结果显示, GRP78 蛋白分子式为 C₃₁₈₆H₅₁₄₅N₈₆₅O₁₀₁₉S₁₂, 分子质量为 72.3 ku, 理论等电

点(pI)为 5.06, 半衰期为 30 h。其水溶液在 280 nm 处的消光系数为 30 495, 肽链 N 端为蛋氨酸(Met), 不稳定系数为 32.39, 属于稳定蛋白, 脂肪系数为 85.40。猪 GRP78 蛋白的氨基酸残基组成见表 2。由表 2 可知, 含量最高的是谷氨酸(9.6%), 不含吡咯赖氨酸和硒半胱氨酸。

利用 ProtScale 在线软件对猪 GRP78 蛋白做进一步的疏水性分析, 纵坐标 0 值以上为疏水区, 分值越高疏水性越强, 0 值以下为亲水区, 分值越低亲水性越强, 结果见图 2。由图 2 可知, 多肽链的第 9 位氨基酸分值最高为 3.444, 第 21 位氨基酸分值最低为 -3.489。该氨基酸序列亲水性残基多于疏水性残基, 因此整体表现为亲水性, 平均疏水指数为 -0.496。

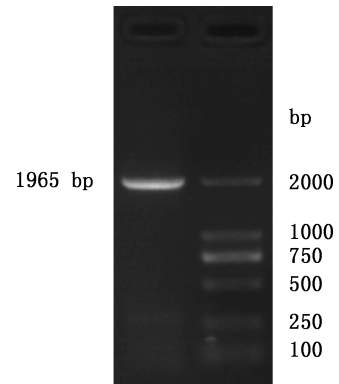


图 1 猪 GRP78 基因 CDS 扩增产物

Fig. 1 CDS amplification product of porcine GRP78 gene

表 2 猪 GRP78 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acids composition of porcine GRP78 protein

氨基酸 Amino acids	数量 Number/个	频率 Frequency/%	氨基酸 Amino acids	数量 Number/个	频率 Frequency/%
Ala(A)	45	6.9	Lys(K)	61	9.3
Arg(R)	28	4.3	Met(M)	10	1.5
Asn(N)	28	4.3	Phe(F)	23	3.5
Asp(D)	48	7.3	Pro(P)	28	4.3
Cys(C)	2	0.3	Ser(S)	28	4.3
Gln(Q)	24	3.7	Thr(T)	49	7.5
Glu(E)	63	9.6	Trp(W)	2	0.3
Gly(G)	51	7.8	Tyr(Y)	13	2.0
His(H)	6	0.9	Val(V)	52	8.0
Ile(I)	41	6.3	Pyl(O)	0	0
Leu(L)	52	8.0	Sec(U)	0	0

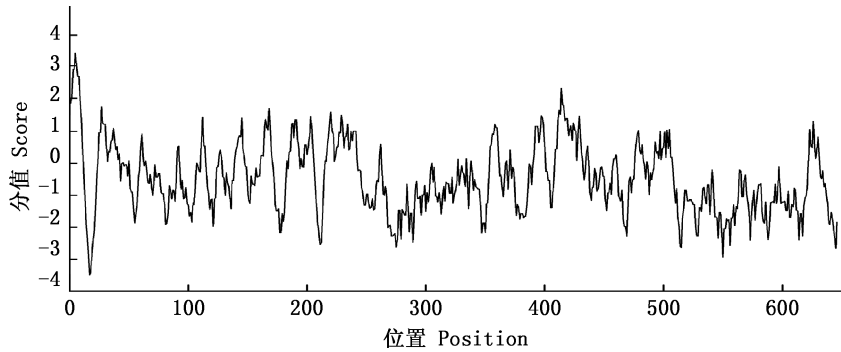


图 2 猪 GRP78 蛋白疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobicity analysis of porcine GRP78 protein

2.2.2 猪 GRP78 蛋白跨膜区预测及信号肽分析

利用 TMHMM 在线软件对猪 GRP78 蛋白的跨膜结构进行预测,结果见图 3。由图 3 可知,猪 GRP78 蛋白不存在跨膜结构。通过在线软件 Sig-

nalP 对猪 GRP78 蛋白信号肽进行预测,结果见图 4。由图 4 可知,该蛋白存在信号肽序列,其中信号肽位于第 1—18 位氨基酸残基之间,说明该蛋白是分泌型蛋白。

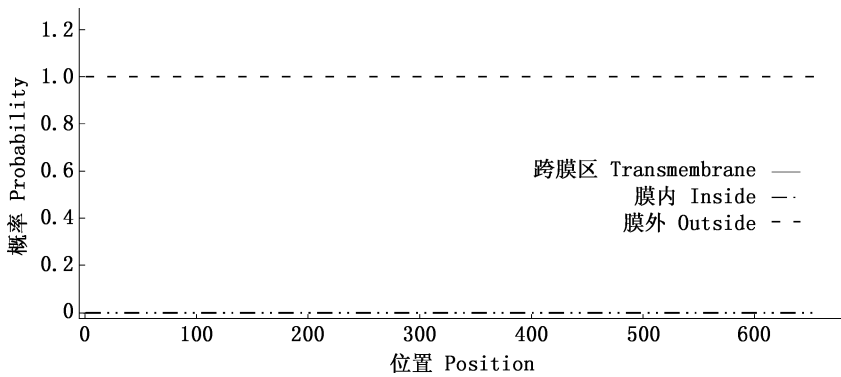


图 3 猪 GRP78 蛋白跨膜结构预测

Fig. 3 Transmembrane domain prediction of porcine GRP78 protein

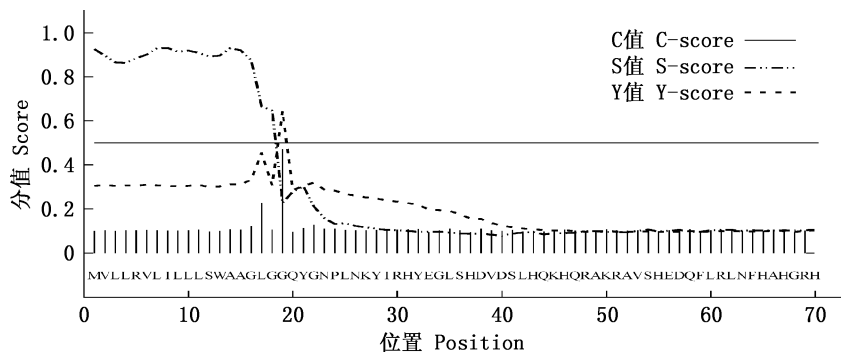


图 4 猪 GRP78 蛋白信号肽预测

Fig. 4 Signal peptide prediction of porcine GRP78 protein

2.2.3 猪 GRP78 蛋白的二级结构和三级结构预测

猪 GRP78 蛋白二级结构预测表明,α-螺旋、延伸链、β-转角和无规则卷曲分别占 40.06%、20.49%、8.10%和 31.35%(图 5)。通过 Phyre 2

在线软件预测猪 GRP78 的三级结构,结果发现,其与 78 ku 的葡萄糖调节蛋白具有 93%的相似性,具有 100%的可信度(图 6)。

性低,中间部分同源性高(图 8)。

用 Mega 5.0 构建系统进化树,结果表明,猪与牛、山

根据 GRP78 基因不同物种间的序列差异,利

羊的亲缘性较近,与大鼠、小鼠的亲缘性较远(图 9)。

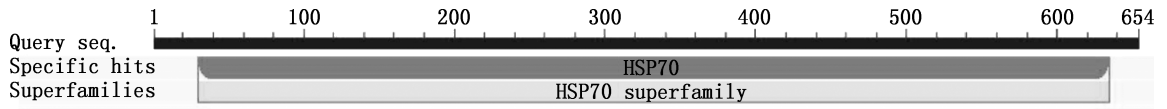


图 7 猪 GRP78 蛋白的保守结构域分析

Fig. 7 Conserved domain analysis of porcine GRP78 protein

猪 <i>Sus scrofa</i>	MKLSIVAAVLLLLG.AAR.EEEDKEDVGTVVGIDLGTYSYCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSPENTVFDKRL	98
人 <i>Homo sapiens</i>	MKLSIVAAVLLLLS.AAR.EEEDKEDVGTVVGIDLGTYSYCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSPENTVFDKRL	98
小鼠 <i>Mus musculus</i>	MKRTVWAALLLLG.AVR.EEEDKEDVGTVVGIDLGTYSYCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSPENTVFDKRL	99
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	MKRTVWAALLLLC.AVR.EEEDKEDVGTVVGIDLGTYSYCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSPENTVFDKRL	98
牛 <i>Bos taurus</i>	MKLSIVAAVLLLLGTPAR.EEEDKEDVGTVVGIDLGTYSYCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSPENTVFDKRL	99
山羊 <i>Capra hircus</i>	MKLSIVAAVLLLLG.AAR.EEEDKEDVGTVVGIDLGTYSYCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSPENTVFDKRL	99
Consensus	mk vaa llll r eedkdedvgtvvgidlgttyscvgvfkngrveiiandqgnritpsyvaftpegerlignaaknqltsnpentvfdakrl	
猪 <i>Sus scrofa</i>	IGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDLGGGQTKTFAPEEISAMVLTMKMKTAEAYLGKVKTHAVVTPAYFNDACRQATKDAGTIAGLNVMRI	198
人 <i>Homo sapiens</i>	IGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDLGGGQTKTFAPEEISAMVLTMKMKTAEAYLGKVKTHAVVTPAYFNDACRQATKDAGTIAGLNVMRI	198
小鼠 <i>Mus musculus</i>	IGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDLGGGQTKTFAPEEISAMVLTMKMKTAEAYLGKVKTHAVVTPAYFNDACRQATKDAGTIAGLNVMRI	199
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	IGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDLGGGQTKTFAPEEISAMVLTMKMKTAEAYLGKVKTHAVVTPAYFNDACRQATKDAGTIAGLNVMRI	198
牛 <i>Bos taurus</i>	IGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDLGGGQTKTFAPEEISAMVLTMKMKTAEAYLGKVKTHAVVTPAYFNDACRQATKDAGTIAGLNVMRI	199
山羊 <i>Capra hircus</i>	IGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDLGGGQTKTFAPEEISAMVLTMKMKTAEAYLGKVKTHAVVTPAYFNDACRQATKDAGTIAGLNVMRI	199
Consensus	igrtwndpsvqqdikflpfkvvkktkpyiqvd lgggqtktfapeeisamvltmkmktaeaylgkvtkhavvtpayfndacrqatkdgatiglnvmri	
猪 <i>Sus scrofa</i>	INEPTAAAIAYGLDKREGEKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIKLYKKTGKDVKDRNRAVQKLRREVEKAKRA	298
人 <i>Homo sapiens</i>	INEPTAAAIAYGLDKREGEKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIKLYKKTGKDVKDRNRAVQKLRREVEKAKRA	298
小鼠 <i>Mus musculus</i>	INEPTAAAIAYGLDKREGEKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIKLYKKTGKDVKDRNRAVQKLRREVEKAKRA	299
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	INEPTAAAIAYGLDKREGEKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIKLYKKTGKDVKDRNRAVQKLRREVEKAKRA	298
牛 <i>Bos taurus</i>	INEPTAAAIAYGLDKREGEKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIKLYKKTGKDVKDRNRAVQKLRREVEKAKRA	299
山羊 <i>Capra hircus</i>	INEPTAAAIAYGLDKREGEKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIKLYKKTGKDVKDRNRAVQKLRREVEKAKRA	299
Consensus	ineptaaaiayglkdkregeknilvfdlgggtfdvslltidngvfevatngdthlgggedfdqrvmehfiklykktgkdvkdrnraavqklrrevekakra	
猪 <i>Sus scrofa</i>	LSSQHARIEIESFEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA	399
人 <i>Homo sapiens</i>	LSSQHARIEIESFEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA	398
小鼠 <i>Mus musculus</i>	LSSQHARIEIESFEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA	399
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	LSSQHARIEIESFEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA	398
牛 <i>Bos taurus</i>	LSSQHARIEIESFEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA	399
山羊 <i>Capra hircus</i>	LSSQHARIEIESFEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA	399
Consensus	lssqhariaiesf egedfsetltrakfeelnmdlfrstmkpvqkvlstdlkkssd ideivlvggstripkiqqlvkeffngkepsrginpdeavayga	
猪 <i>Sus scrofa</i>	AVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVPTRKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPARGVQPIE	498
人 <i>Homo sapiens</i>	AVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVPTRKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPARGVQPIE	498
小鼠 <i>Mus musculus</i>	AVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVPTRKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPARGVQPIE	499
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVPTRKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPARGVQPIE	498
牛 <i>Bos taurus</i>	AVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVPTRKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPARGVQPIE	499
山羊 <i>Capra hircus</i>	AVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVPTRKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPARGVQPIE	499
Consensus	avqagvlsgdqdtgdlvlldvcpltlgi etvggvmtkcli prntvvp trksqifstasdnqptvtikvyegerpltkdnhllgtfdltgippargvpqie	
猪 <i>Sus scrofa</i>	VTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITINDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYS LKNQIGDKEKLGKLS EDKETMEKAV	598
人 <i>Homo sapiens</i>	VTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITINDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYS LKNQIGDKEKLGKLS EDKETMEKAV	598
小鼠 <i>Mus musculus</i>	VTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITINDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYS LKNQIGDKEKLGKLS EDKETMEKAV	599
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	VTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITINDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYS LKNQIGDKEKLGKLS EDKETMEKAV	598
牛 <i>Bos taurus</i>	VTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITINDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYS LKNQIGDKEKLGKLS EDKETMEKAV	599
山羊 <i>Capra hircus</i>	VTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITINDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKLLKERIDTRNELESYAYS LKNQIGDKEKLGKLS EDKETMEKAV	599
Consensus	vtfeidvngilrvtaedkgtgnknkitindqnr ltp eeiermvndaekfaeedkllkeridtrnelesyays lknqigdk eklgkls edk etmekav	
猪 <i>Sus scrofa</i>	EKIEWLESHQDADIEDFRAKKKELEEIVQPIISKLYGSGPPPTGEBEADKDEL	654
人 <i>Homo sapiens</i>	EKIEWLESHQDADIEDFRAKKKELEEIVQPIISKLYGSGPPPTGEBEADKDEL	654
小鼠 <i>Mus musculus</i>	EKIEWLESHQDADIEDFRAKKKELEEIVQPIISKLYGSGGPPPTGEBEADKDEL	655
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	EKIEWLESHQDADIEDFRAKKKELEEIVQPIISKLYGSGGPPPTGEBEADKDEL	654
牛 <i>Bos taurus</i>	EKIEWLESHQDADIEDFRAKKKELEEIVQPIISKLYGSGPPPTGEBEADKDEL	655
山羊 <i>Capra hircus</i>	EKIEWLESHQDADIEDFRAKKKELEEIVQPIISKLYGSGPPPTGEBEADKDEL	655
Consensus	eekiewleshqdadiedf rakkeleeivqpiisklygs gpppt e kdel	

图 8 GRP78 氨基酸序列的同源性比对分析

Fig. 8 Homology analysis base on amino acids sequence of GRP78

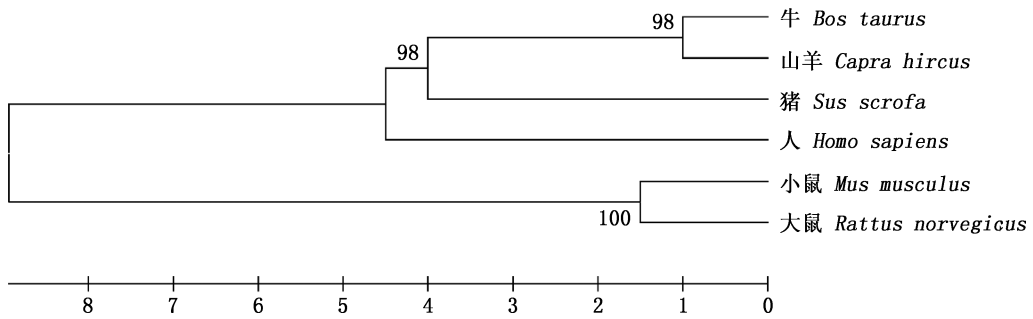


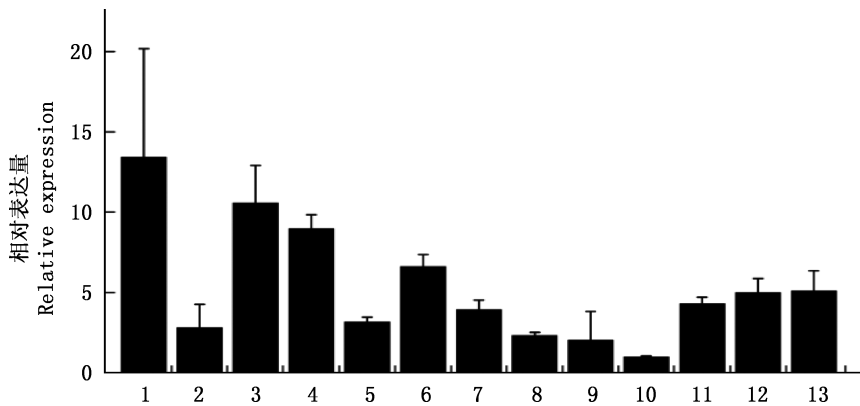
图9 GRP78 氨基酸序列的系统进化树

Fig.9 Phylogenetic tree base on amino acids sequence of GRP78

2.3 猪 GRP78 基因在不同组织中的表达分析

采取实时荧光定量 PCR 方法检测猪 GRP78 基因在不同组织中的表达情况,结果显示,GRP78 基

因在各个组织中均有表达,但在心脏、脾脏、肺脏中表达量相对较高,在卵巢、输卵管、乳腺中表达量相对较低(图 10)。



1,心脏;2,肝脏;3,脾脏;4,肺脏;5,肾脏;6,小肠;7,胃;8,卵巢;9,输卵管;10,乳腺;11,小脑;12,大脑;13,垂体
1, Heart;2, Liver;3, Spleen;4, Lung;5, Kidney;6, Small intestine;7, Stomach;8, Ovary;9, Fallopian tube;10, Breast;
11, Cerebellum;12, Cerebrum;13, Pituitary gland

图 10 猪 GRP78 基因在不同组织中的表达情况

Fig.10 The expression of porcine GRP78 gene in different tissues

3 讨论

内质网应激反应通过 3 种信号通路激活非折叠蛋白反应信号,这 3 种信号通路分别是由 3 种跨膜蛋白受体介导:PERK、ATF6 和 IRE1^[4],而 GRP78 作为分子伴侣在这些过程中发挥重要的作用。在正常活动的细胞中,这 3 种跨膜受体通过和 GRP78 结合抑制其本身活性。当细胞受到应激时,内质网腔中的未折叠或错误折叠的蛋白质不断积累时,GRP78 就会发挥分子伴侣作用来帮助未折叠蛋白成熟,一旦 GRP78 蛋白和 3 种跨膜蛋白受体解离,通过下游信号的传递从而激活非折叠蛋白反应^[4,11],其结果就是试图恢复内质网稳态。

研究证明,多种病毒会通过 GRP78 蛋白的作用从而激活宿主细胞的内质网应激反应^[12]。如登革

热病毒感染上调 GRP78 表达激活内质网应激,然后通过 PERK 和 IRE1 α 信号通路激活 UPR,同时病毒诱导的内质网应激反应又有利于病毒的增殖^[7,13]。猪瘟病毒和猪圆环病毒都可以通过 GRP78 蛋白激活内质网应激通路来增强病毒复制^[5,14]。研究发现,利用猪伪狂犬病毒感染 PK15 细胞,内质网应激相关蛋白上调表达,包括 GRP78^[15]。因此,GRP78 蛋白作为内质网应激的标志性蛋白其作用至关重要。本研究通过克隆猪 GRP78 基因的 CDS 序列并对其进行生物学信息分析,结果显示,猪 GRP78 基因 CDS 全长 1 965 bp,编码 654 个氨基酸。通过将猪 GRP78 基因核苷酸序列同其他物种进行同源性比对,发现此基因在不同物种中具有高度的同源性,说明 GRP78 作为一个具有重要功能的基因在不同物种中存在结构和功能

的一致性。更为有趣的是,相对于 GRP78 蛋白中间氨基酸序列来说,其两端的序列保守性较差,进一步分析发现,其中间的氨基酸序列主要包含 1 个重要的结构域:HSP70,说明 GRP78 蛋白属于 HSP70 家族。推测两端的序列是可变区域,随物种变化而不同,而中间的高度保守的 HSP70 结构域可能对它作为分子伴侣功能来说有重要的意义。

本试验结果发现,GRP78 蛋白不存在跨膜结构,说明其不是跨膜蛋白,但存在信号肽序列,表明该蛋白是分泌型蛋白。扎西英派等^[16]研究发现,在内质网应激状态下,GRP78 可以移动到核周膜、胞浆、胞核、细胞表面甚至细胞外,调解细胞生长和信号转导,但其具体易位机制还不是很清楚,可能与其具有信号肽序列相关。具体来说,在肿瘤细胞中,移动到细胞表面的 GRP78 可作为一种重要的调节因子,与细胞表面相关蛋白组成复合物,从而调节肿瘤细胞的增殖和生存力^[17],这其中的机制可能是 GRP78 在癌细胞表面担任多功能受体,可支持肿瘤生长并放大肿瘤细胞的促炎反应,从而使得 GRP78 可以增强癌细胞的适应力和耐药性^[18]。细胞表面的 GRP78 也能促进肿瘤干细胞的分化和自我更新能力^[19-20]。GRP78 通过与细胞表面的 MHC I 类分子相结合,成为病毒内化的共同受体,说明 GRP78 是病毒进入宿主细胞的关键受体^[17],这也为抗病毒研究提供了新的靶点。GRP78 也可与其他因子共同定位在线粒体外膜上,维持线粒体的通透性,使细胞避免在内质网应激下调亡^[20],这些研究都表明 GRP78 蛋白的分泌性和易位性。

为了研究 GRP78 基因在猪各组织中的表达情况,试验利用实时荧光定量 PCR 方法分析其在猪各组织中的表达差异。结果显示,猪 GRP78 基因在各个组织中均有表达,因为猪 GRP78 基因作为一种重要的分子伴侣蛋白在各个组织和细胞中都发挥非常重要的作用,所以其表达呈现相对的广泛性,而其在心脏、脾脏和肺脏中表达相对较高,在卵巢、输卵管和乳腺等繁殖器官中表达量相对较低,其具体机制仍需要进一步深入研究。

4 结 论

本研究成功克隆了猪 GRP78 基因 CDS 序列,并对其进行了生物信息学和组织表达谱分析,结果显示,猪 GRP78 是一个由 654 个氨基酸组成的可溶性蛋白质,属于分泌型蛋白,在生物进化过程中具有较强的保守性。通过实时荧光定量 PCR 发现,

GRP78 基因在各个组织中均有表达,其中在心脏、脾脏和肺脏中表达相对较高,在卵巢、输卵管和乳腺中表达量相对较低。

参考文献(References):

- [1] LEE A S. Glucose-regulated proteins in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(4): 263-276.
- [2] WALTER P, RON D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation[J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [3] ZHANG C. Roles of GRP78 in Female Mammalian Reproduction[M]. New York: Springer International Publishing, 2017.
- [4] HETZ C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(2): 89-102.
- [5] ZHOU Y, QI B, GU Y, et al. Porcine circovirus 2 deploys PERK pathway and GRP78 for its enhanced replication in PK-15 cells[J]. *Viruses*, 2016, 8(2): 56.
- [6] 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(3): 283-288.
LI Z Q, ZHOU A R, TANG C S. Molecular mechanism on endoplasmic reticulum stress responses[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 20(3): 283-288. (in Chinese)
- [7] YIN H, ZHAO L, JIANG X, et al. DEV induce autophagy via the endoplasmic reticulum stress related unfolded protein response[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189704.
- [8] WEI L, GE L, QIN S, et al. Hydrogen-rich saline protects retina against glutamate-induced excitotoxic injury in Guinea pig[J]. *Experimental Eye Research*, 2012, 94(1): 117-127.
- [9] JIANG Q, CHEN S, REN W, et al. *Escherichia coli* aggravates endoplasmic reticulum stress and triggers CHOP-dependent apoptosis in weaned pigs[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(12): 2073-2082.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] GARDNER B M, PINCUS D, GOTTHARDT K, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(3): a013169.

- [12] HE B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2006, 13(3):393.
- [13] LEE Y R, KUO S H, LIN C Y, et al. Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):489.
- [14] HE W, XU H, GOU H, et al. CSFV infection up-regulates the unfolded protein response to promote its replication [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:2129.
- [15] YANG S, PEI Y, ZHAO A. iTRAQ-based proteomic analysis of porcine kidney epithelial PK15 cells infected with pseudorabies virus [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:45922.
- [16] 扎西英派, 张涛杰, 霍生东, 等. 葡萄糖调节蛋白 GRP78 研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2015, 36(1):48-52.
ZHAXIYINGPAI, ZHANG T J, HUO S D, et al. Research progress of glucose regulatory protein GRP78[J]. *Journal of Northwest University for Nationalities(Natural Science)*, 2015, 36(1):48-52. (in Chinese)
- [17] NI M, ZHANG Y, LEE A S. Beyond the endoplasmic reticulum: Atypical GRP78 in cell viability, signaling and therapeutic targeting[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 434(2):181-188.
- [18] 郑以孜, 邵志敏. 葡萄糖调节蛋白 78 与肿瘤耐药和靶向治疗进展[J]. 中国癌症杂志, 2018, 28(2):156-160.
ZHENG Y M, SHAO Z M. Research progress on glucose-regulated protein 78 in drug resistance and targeted therapy for cancer [J]. *China Oncology*, 2018, 28(2):156-160. (in Chinese)
- [19] CHEN H Y, CHANG T C, CHIEN K Y, et al. The endogenous GRP78 interactome in human head and neck cancers: A deterministic role of cell surface GRP78 in cancer stemness [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):536.
- [20] 贾鹏宇, 何 苗, 魏敏杰. GRP78 在肿瘤发生发展及干性形成中的研究进展[J]. 生命的化学, 2015, 35(4):559-564.
JIA P Y, HE M, WEI M J. Research progress of GRP78 on the development and stemness maintenance of cancers[J]. *Chemistry of Life*, 2015, 35(4):559-564. (in Chinese)

(责任编辑 晋大鹏)