

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201803013](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201803013)

版纳微型猪近交系 *CPN10* 克隆、亚细胞定位、组织表达和生物信息学分析*

宋 雪^{1,2#}, 秦彩艳^{1,2#}, 霍金龙^{1,2**}, 王 配^{1,2}, 李罗刚^{1,2},
张 霞^{1,2}, 王淑燕^{1,2}, 王雪飞^{1,2}

(1. 云南农业大学, 云南省版纳微型猪近交系重点实验室, 云南 昆明 650201;
2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】以版纳微型猪近交系(BMI)为材料克隆 *CPN10* 基因, 从亚细胞、mRNA 水平及生物信息学方面初步探索其结构及功能特性, 为该基因在猪—人异种器官移植免疫排斥中的作用研究奠定基础。【方法】采用 RT-PCR 方法获得 *CPN10* 基因 cDNA 序列, 应用分子克隆技术构建目的基因和报告基因 *EGFP* 的重组真核表达载体 pEGFP-C1-*CPN10*, 将其转染猪肾细胞 PK15 进行瞬时表达, 通过 EGFP 示踪 *CPN10* 在 PK15 细胞中的表达和定位。进一步应用荧光定量技术明确其 mRNA 的多组织表达特征。最后利用生物信息学分析 *CPN10* 蛋白质的结构特征。【结果】得到 BMI *CPN10* CDS 309 bp 序列(GenBank 登录号: KM098149), 成功构建了 BMI *CPN10* 基因的绿色荧光蛋白融合表达载体 pEGFP-C1-*CPN10*, 转染 PK15 细胞且主要在细胞质中检测到绿色荧光蛋白表达。多组织荧光定量表达分析表明: BMI *CPN10* mRNA 在皮肤中具有最高表达量, 在肝和肾上腺中的表达量较高, 在其余各组织中呈中低度表达或几乎不表达。生物信息学分析表明: *CPN10* 编码 102 个氨基酸, 其蛋白分子量为 10.93 ku, 等电点为 8.89, 含 1 个 *CPN10* 保守结构域和 5 个磷酸化位点, 二级结构以延伸链结构为主, 无跨膜螺旋结构和信号肽。【结论】*CPN10* 基因定位在细胞质中, 在皮肤中高表达, 该研究结果为进一步研究该基因在免疫排斥方面的功能奠定了理论基础。

关键词: 伴侣蛋白 10 (*CPN10*); 异种移植; 亚细胞定位; 组织表达; 生物信息学

中图分类号: S 828.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2019) 02-0255-08

Cloning, Subcellular Localization, Tissue Expression and Bioinformatics Analysis of *CPN10* Gene in Banna Mini-pig Inbred Line

SONG Xue^{1,2}, QIN Caiyan^{1,2}, HUO Jinlong^{1,2}, WANG Pei^{1,2}, LI Luogang^{1,2},
ZHANG Xia^{1,2}, WANG Shuyan^{1,2}, WANG Xuefei^{1,2}

(1. Key Laboratory of Banna Mini-pig Inbred Line of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] In this study, the *CPN10* gene was cloned from Banana mini-pig inbred line

收稿日期: 2018-03-06 修回日期: 2018-07-24 网络出版时间: 2019-01-25

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660650, 31160439, 31460580, 31660637)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。宋雪 (1995—), 女, 山西长治人, 在读硕士研究生, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: 604855210@qq.com; 秦彩艳 (1988—), 女, 山西临县人, 硕士, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: 907788347@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 霍金龙 (1975—), 男, 山西五寨人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: jinlonghuo973@163.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201803013](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201803013)

(BMI) and its structural and functional properties were preliminary explored from the subcellular, mRNA levels and bioinformatics, which laid the foundation for the research on the role of this gene in immune rejection of pig-human xenotransplantation. [**Methods**] The cDNA sequence of BMI *CPN10* was obtained by RT-PCR, and the recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-C1-*CPN10* of target gene and reporter gene *EGFP* was constructed by molecular cloning technology. Then, the recombinant vector was transfected transiently into porcine kidney cells (PK15) to confirm *CPN10* localization in cells by tracing EGFP. Further, mRNA expression characteristics of multi-tissue were examined by qPCR techniques. Finally, structural characteristics of *CPN10* protein were analyzed by bioinformatics. [**Result**] The CDS sequence of BMI *CPN10* was 309 bp with GenBank accession number KM098149. The fusion expression vector pEGFP-C1-*CPN10* of green fluorescence protein and *CPN10* gene was successfully constructed and transfected into PK15 cells. The target proteins were mainly detected in the cytoplasm by tracing the green fluorescent protein. BMI *CPN10* mRNA had the highest expression in the skin, higher expression in the liver and adrenal glands, and was moderate, low or hardly expressed in the remaining tissues. Bioinformatics analysis indicated the *CPN10* encoded 102 amino acids with molecular weight of 10.93 ku and isoelectric point of 8.89, containing a conserved *CPN10* domain and 5 phosphorylation sites. The secondary structure of the *CPN10* protein is mainly extended chain structure without transmembrane helical structure and signal peptide. [**Conclusion**] The *CPN10* gene was located in the cytoplasm and highly expressed in the skin, which provided a theoretical basis for further study on the function of *CPN10* gene in rejection of xenotransplantation.

Keywords: chaperonin 10 (*CPN10*); xenotransplantation; subcellular localization; tissue expression; bioinformatics

近年来,细胞介导的异种移植免疫排斥反应研究已成为继 HAR (超急性排斥反应, hyperacute rejection) 之后的前沿研究方向之一^[1]。分子伴侣是一类在进化上相对保守的蛋白,它主要协助蛋白质正确折叠与组装,还兼具参与蛋白质定位、转位、降解及活化其他细胞基因等重要功能。其中很重要的一类分子伴侣 HSP (heat shock protein), 也叫热休克蛋白,可分为 chaperonin10、chaperonin60、HSP70 族和 HSP90 族^[2]。为了获得与猪—人异种器官移植细胞免疫排斥反应相关的新基因, HU 等^[3]构建了猪内皮细胞与人血清作用后差异表达的 cDNA 消减文库,将从 cDNA 消减文库中获得的表达上调基因片段进行克隆、测序,然后与 GenBank 的 NR 数据库 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) 进行同源性比对,结果发现克隆的基因片段 SS9 与大鼠、小鼠、牛和人的伴侣蛋白 10 (chaperonin 10, *CPN10*) 基因高度同源,因此推断该基因是猪—人异种器

官移植免疫排斥反应相关基因^[4-5]。

版纳微型猪近交系 (Banna mini-pig inbred line, BMI) 在 2005 年被鉴定为世界首个大型哺乳类实验动物近交系,其个体差异小、均一性高,可为实验的准确性、一致性、敏感性和重复性提供保证,在器官人源化改造等基础研究和临床试验中具有较大优势,未来可作为猪—人异种器官移植合适的器官供体^[6-8]。*CPN10* 作为猪—人异种器官移植免疫排斥反应新的候选基因,尚未在猪器官人源化具有显著优势的 BMI 中进行研究,其在 BMI 中的基因结构、功能情况尚不清楚。为此,本研究通过对 BMI *CPN10* CDS 区序列的克隆,初步揭示 BMI *CPN10* 的基因结构;通过构建 *CPN10* 与 pEGFP-C1 的真核融合表达载体进行亚细胞定位表达分析;采用荧光定量 PCR 技术分析其在 BMI 27 个不同组织中的表达;通过生物信息学分析其蛋白质的结构,以期在 *CPN10* 基因在异种器官移植排斥反应的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

版纳微型猪近交系耳号为413和0847猪只(昆明原种猪场),屠宰后采集心、肝、脾、肺、肾、脊髓、淋巴结、肌肉、精囊腺、直肠、舌头、颌下腺、下丘脑、回肠、空肠、大脑、小脑、盲肠、皮肤、结肠、舌下腺、甲状腺、肾上腺、附睾、睾丸、扁桃体和胃等27个组织样品,液氮速冻后置于-80℃超低温冰箱保存。

1.2 总RNA提取和第1链cDNA合成

从BMI 27个重要组织中提取总RNA,用BioPhotometer核酸蛋白测定仪进行浓度和纯度的测定并电泳鉴定,将合格样品的总RNA反转录为cDNA第1链。

1.3 设计并合成PCR引物

参照GenBank猪*CPN10* mRNA序列(AY-271355),利用Premier 6.0和Oligo 7软件设计4对特异引物,引物序列、产物大小及用途等信息见表1。

1.4 PCR扩增及产物检测

PCR扩增体系25 μL: ddH₂O 17.04 μL、10× Ex Taq buffer 2.5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL、引物F₁/R₁ (10 μmol/L) 各0.6 μL、cDNA模板(50 ng/μL) 2 μL、Ex Taq聚合酶(5 U/μL) 0.26 μL。PCR运行条件设置:预变性(94℃, 5 min);变性(94℃, 30 s),退火(55℃, 30 s),延伸(72℃, 2 min), 35次循环;后延伸(72℃, 10 min)。PCR产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 BMI *CPN10* 基因克隆

目的片段回收纯化后与克隆载体pMD18-T连接进行克隆测序,连接仪16℃过夜连接。将连接产物转化、复苏、培养使其形成单菌落。挑

取阳性单菌落,37℃ 200 r/min振荡培养,16 h后以0.2 μL菌液为模板,进行菌液PCR鉴定,2%琼脂糖凝胶电泳检测结果。将鉴定为阳性的菌液进行序列测定。选取测序结果无突变的菌液提取重组质粒。

1.6 真核重组表达载体构建

利用F₃/R₃扩增*CPN10*,用EcoR I和BamH I同时双酶切*CPN10*与载体pEGFP-C1,电泳后胶回收并于16℃过夜连接,构建pEGFP-C1-*CPN10*真核表达载体,步骤同1.5节。经菌液PCR鉴定为阳性的菌液送测序。

1.7 PK15细胞培养及*CPN10*亚细胞定位

1.7.1 细胞复苏

取出冻存的PK15细胞,37℃迅速解冻后与5%培养液混匀,离心5 min,弃上清。加入15%细胞培养液,吹打使其悬浮,转移至25 mL的培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,24 h后换液。每隔12 h观察细胞生长情况,当其生长至对数增长期(即汇合率达80%~90%)时进行传代培养。

1.7.2 传代培养

将待传代细胞用PBS冲洗,胰酶消化1~3 min,当细胞呈圆形、游离状态时终止消化,离心5 min,弃上清,加入10%培养液,吹打悬浮后转移至2个25 mL的培养瓶,完成1次传代,以同样的方法再次传代于6孔板中培养。

1.7.3 转染、染色及成像

细胞达到30%~40%汇合率时进行转染,将BMI pEGFP-C1-*CPN10*真核表达重组质粒以及pEGFP-C1空质粒分别转染PK15细胞,同时以未转染的PK15空细胞和转染了EGFP-C1空载体的PK15细胞作为空白对照,每孔细胞中加入500 μL配制好的转染液,轻轻摇匀后置于培养箱中培

表1 PCR引物

Tab. 1 List of PCR primers

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequences	产物大小/bp product size	用途 usage
<i>CPN10</i> -F ₁	CATGGCAGGACAAGCATTTA	343	序列克隆 sequence cloning
<i>CPN10</i> -R ₁	GCTTCATGTGATGCCATTAGAC		
<i>CPN10</i> -F ₂	CGTAGTAGCTGTTGGATCAGG	167	荧光定量 qPCR
<i>CPN10</i> -R ₂	CGTATTTTCCAAGAATGTCACC		
<i>CPN10</i> -F ₃	CCGGAATTCATGGCAGGACAAGCATTTAG	326	真核表达 eukaryotic expression
<i>CPN10</i> -R ₃	CGGGATCCTCAGTCTACGTATTTTCCAAG		
<i>GAPDH</i> -F	CCTTCATTGACCTCCACTACATGGT	183	内参 internal reference
<i>GAPDH</i> -R	CCACAACATACGTAGCACCAGCATC		

养, 6 h 后更换为 10% 无抗生素的细胞培养液, 继续培养 18~48 h 后在倒置荧光显微镜下检测绿色荧光, 确定转染成功及正常表达后, 先后用 Mito Tracker 和 Hoechst 33342 分别对细胞的线粒体和细胞核进行染色, 用蔡司倒置荧光显微镜观察并采集图像, 确定目的蛋白在细胞内的定位情况。

1.8 多组织表达分析

根据获得的 BMI *CPN10* 基因序列, 设计 qPCR 特异引物 F₂/R₂, 选取 *GAPDH* 为内参基因, 设计特异引物 *GAPDH*-F/*GAPDH*-R, 用 qPCR 方法分析 BMI 27 个重要组织中 *CPN10* 基因的 mRNA 水平。扩增体系 20 μ L: 无 RNAase ddH₂O 6.4 μ L、2 \times SYBR Green 10 μ L、引物 F₂/R₂ (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L、cDNA 模板 2 μ L。运行程序: 预变性 (95 $^{\circ}$ C, 2 min); 变性 (95 $^{\circ}$ C, 15 s), 退火 (60 $^{\circ}$ C, 15 s); 延伸 (72 $^{\circ}$ C, 20 s), 35 次循环。每个样本重复 3 次, 同时设置阴性对照 NTC。数据结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析。

1.9 生物信息学分析

利用 DNASTar 软件进行序列组装、CDS 预测、蛋白序列推导及预测蛋白的分子量 (Mw) 和等电点 (pI); *CPN10* 蛋白质的保守结构域、跨膜螺旋、信号肽、二级结构和三级结构分别使用 CDART、TMHMM、SignalP4.1、SOPMA 和 SWISS-MODEL 进行预测。从 NCBI BLASTP 得到大鼠 (*Rattus norvegicus*, AAB27570)、野牦牛 (wild yak, ELR57183)、小鼠 (mouse, NP_032329) 和大猩猩 (gorilla, XP_004058028) 的 *CPN10* 蛋白序列, 利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 程序和 Clustal X 软件与 BMI *CPN10* 蛋白序列 (AIS36195.1) 进行同源比对。

2 结果与分析

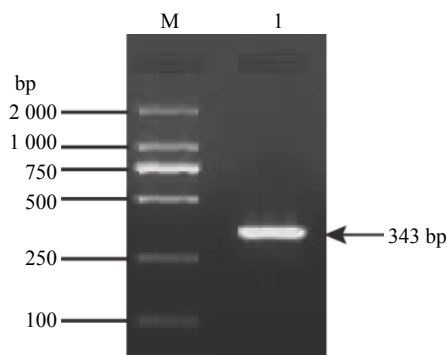
2.1 *CPN10* 基因 PCR 扩增结果

以 BMI 淋巴结总 RNA 反转录获得的第 1 链 cDNA 为模板, 利用特异引物 F₁/R₁ 进行 RT-PCR, 电泳结果见图 1。对 PCR 产物原液和克隆后提取的阳性质粒进行测序, 获得 BMI *CPN10* 的 mRNA 序列长 343 bp, 已提交 GenBank, 登录号为: KM 098149。

2.2 真核表达及亚细胞定位

以引物 F₃/R₃ 从 BMI 肝脏 cDNA 模板中扩

增 *CPN10* 真核表达序列, 得到片段大小为 326 bp (图 2)。*CPN10* 扩增序列包括完全编码区 309 bp 和两端添加的 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点以及保护碱基。细胞中检测到明显的绿色荧光, 证明转染成功。线粒体和细胞核染色后继续观察, 依据绿色荧光的位置确定目的蛋白 *CPN10* 主要在细胞质中表达 (图 3)。通过 PSORT II server 对 *CPN10* 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示: 47.8% 定位在细胞质, 26.1% 定位在线粒体, 网站预测结果与试验结果一致。

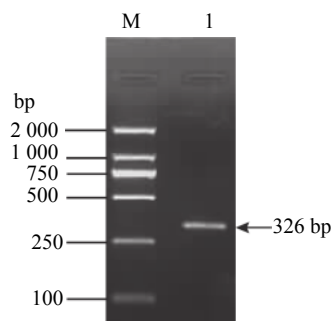


注: M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. 引物 F₁/R₁ 扩增的 PCR 产物。

Note: M. Marker-DL2000; 1. PCR product amplified by primers F₁/R₁.

图 1 *CPN10* 基因 PCR 结果

Fig. 1 The PCR result of *CPN10*



注: M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. 引物 F₃/R₃ 扩增的 PCR 产物。

Note: M. Marker-DL2000; 1. PCR product amplified by primers F₃/R₃.

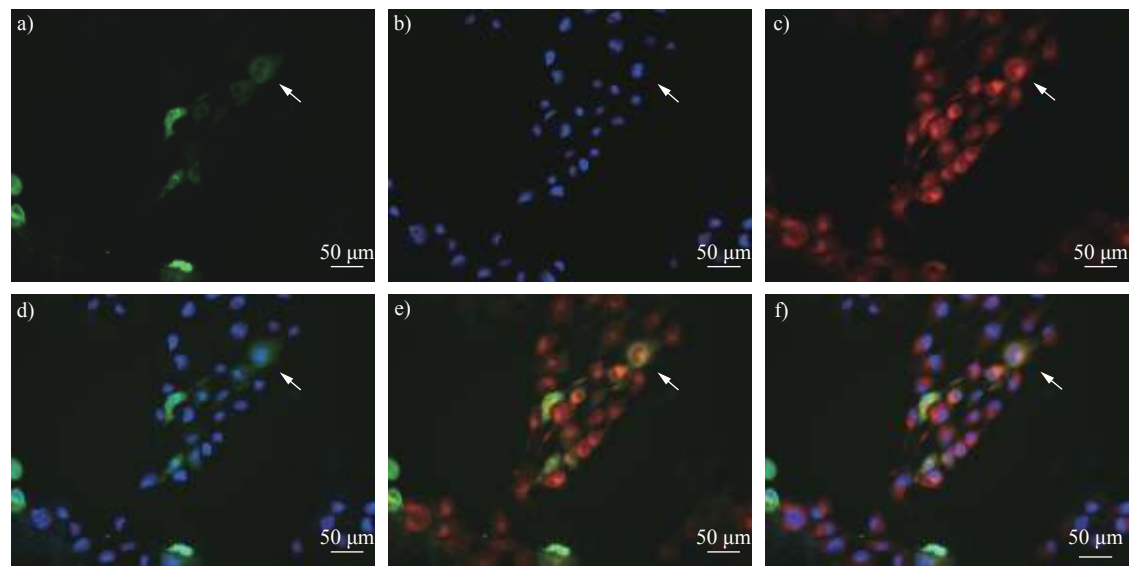
图 2 BMI *CPN10* 真核表达 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis result of eukaryocyte expression PCR products of BMI *CPN10*

2.3 多组织荧光表达分析

CPN10 基因在皮肤中表达最高, 且极显著高于其他组织 ($P < 0.01$) (图 4)。在肝和肾上腺组织中表达较高; 在睾丸、脾、颌下腺、肾、胃、回肠、甲状腺、小脑、淋巴结、下丘脑、精囊腺、

空肠、附睾、扁桃体和脊髓等组织中中度表达 (由高到低), 在大脑、肺、舌下腺、直肠、盲肠和结肠中低度表达 (由高到低); 在心、舌头和肌肉等组织中表达极弱 (由高到低)。



注: a) 绿色荧光蛋白; b) Hoechst33342 对细胞核的染色; c) Mito Tracker 对线粒体的染色; d) 绿色荧光蛋白与细胞核的叠加; e) 绿色荧光蛋白与线粒体的叠加; f) 绿色荧光蛋白、细胞核和线粒体的叠加。
Note: a) green fluorescent protein; b) nucleus staining by Hoechst33342; c) mitochondria staining by Mito Tracker; d) superposition of green fluorescent protein with nucleus; e) superposition of green fluorescent protein with mitochondria; f) superposition of green fluorescent protein, nucleus and mitochondria.

图 3 pEGFP-C1-CPN10 重组质粒在 PK15 细胞中亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of pEGFP-C1-CPN10 recombinant plasmids in PK15 cell

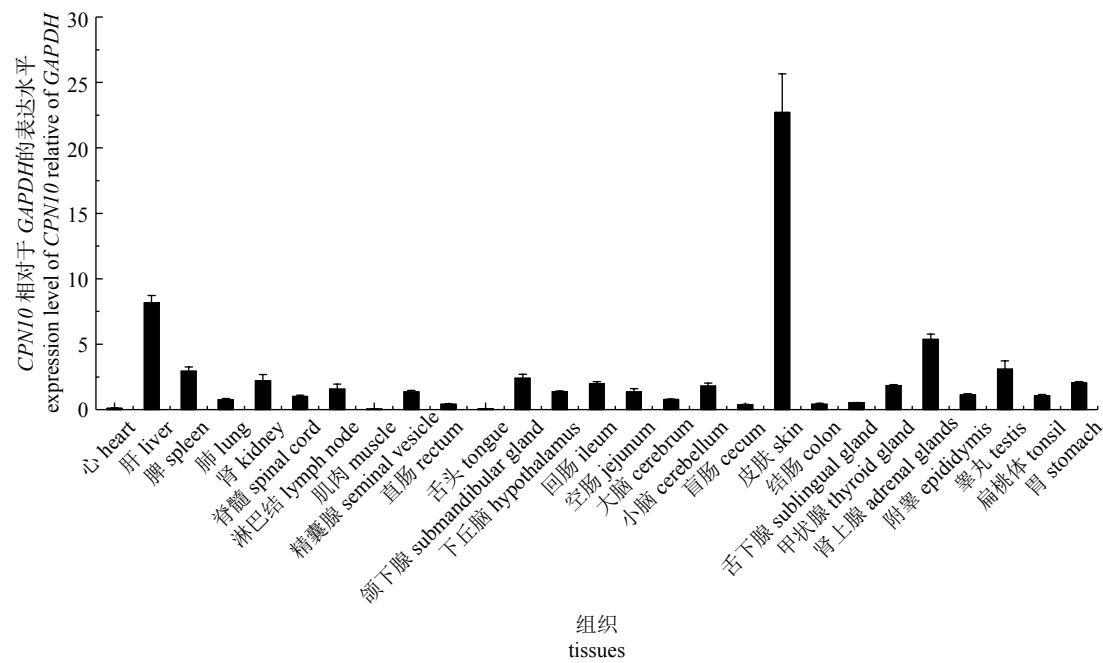


图 4 BMI *CPN10* 基因 27 个组织的 mRNA 表达谱

Fig. 4 The mRNA expression profile 27 tissues of BMI *CPN10* gene

2.4 生物信息学分析

2.4.1 *CPN10* 基因序列及其编码氨基酸

获得的 BMI *CPN10* 基因序列长 343 bp, 包含

309 bp 的开放阅读框和 34 bp 的 5'UTR 和 3'UTR 序列, 编码 102 个氨基酸 (图 5)。蛋白质分子量为 10.93 ku, 等电点为 8.89, 无信号肽, 无跨膜结构。

1	ATGGCAGGACAAGCATTTAGAAAGTTTCTTCCTCTCTTTGATCGAGTATTAGTTGAAAGAAGTGCAGCTGAAACGGTA	78
1	M A G Q A F R K F L P L F D R V L V E R S A A E T V	26
79	ACCAAAGGAGGCATTATGCTTCCAGAAAAATCTCAAGGAAAAGTATTGCAAGCAACCGTAGTAGCTGTTGGATCAGGC	156
27	T K G G I M L P E K S Q G K V L Q A T V V A V G S G	52
157	TCCAAAGGAAAGGGTGGAGAGATTCAACCAGTTAGTGTCAAAGTTGGAGATAAAGTTCTTCTGCCAGAATATGGAGGC	234
53	S K G K G G E I Q P V S V K V G D K V L L P E Y G G	78
235	ACCAAAGTAGTTCTGGATGACAAGGATTATTTCTTATTTAGAGATGGTGACATTCTTGGAAAATACGTAGACTGA	306
79	T K V V L D D K D Y F L F R D G D I L G K Y V D *	102

注：ATG 为起始密码子；*为终止密码子；方框为保守结构域：8~100 AA (CPN10)。
Note: ATG. start codon; *. stop codon; the conserved domain is boxed: 8~100 AA (CPN10).

图 5 BMI CPN10 基因编码序列及其对应的氨基酸序列

Fig. 5 The coding sequence of BMI CPN10 gene and its corresponding amino acid sequence

2.4.2 CPN10 蛋白质二级结构

利用 SOPMA 程序预测的 BMI CPN10 蛋白质二级结构，其中含 α 螺旋 33 AA (29.41%)，延伸链结构 34 AA (33.33%)， β 转角 9 AA (8.82%)，无规则卷曲 29 AA (28.43%)。

2.4.3 CPN10 蛋白保守结构域

通过 NCBI 服务器上的 CDART-BLAST 预测 BMI CPN10 蛋白的保守结构域 (图 6)，其中 8~100 AA 属于 CPN10 超家族保守结构域。

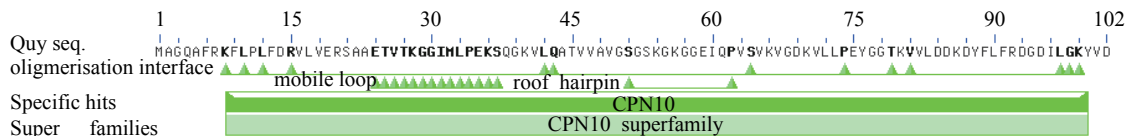


图 6 预测的 BMI CPN10 蛋白质保守结构域

Fig. 6 Predicted conserved domain of BMI CPN10 protein

2.4.4 CPN10 蛋白质疏水性

利用 ProtScale 程序分析 BMI CPN10 氨基酸疏水性，BMI CPN10 蛋白最大疏水值为 2.222，最小疏水值为-1.611，分别处于第 45 位氨基酸和第 55 位氨基酸处。

2.4.5 CPN10 氨基酸磷酸化位点

利用 NetPhos 2.0 程序预测得到的 BMI CPN10 氨基酸磷酸化位点有 5 个 (表 2)。

表 2 预测的 BMI CPN10 氨基酸磷酸化位点

Tab. 2 The prediction results of BMI CPN10 phosphorylated sites

基因 gene	磷酸化氨基酸 phosphorylated amino acids	位置 position	分值 score
CPN10	丝氨酸 serine	21	0.723
		64	0.988
		53	0.507
	苏氨酸 threonine	79	0.563
	酪氨酸 tyrosine	100	0.565

2.4.6 CPN10 蛋白质三级结构

经过计算筛选，SWISS-MODEL 选择了 1 个模板，覆盖 BMI CPN10 蛋白的 3 位到 102 位氨基酸，与人 4pj1.1 的蛋白相似度为 100% (图 7)。

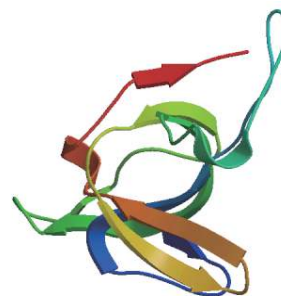


图 7 BMI CPN10 蛋白三级结构分析

Fig. 7 The tertiary structure of BMI CPN10 protein

2.4.7 CPN10 蛋白质同源性分析

推导的 BMI CPN10 氨基酸与下列物种：大鼠 (AAB27570)、野牦牛 (ELR57183)、小鼠 (NP_032329) 和大猩猩 (XP_004058028) 氨基酸序列相似度分别为 100.0%、99.0%、96.1% 和 94.1%。

2.4.8 CPN10 功能预测分析

由表 3 可知：CPN10 蛋白在能量代谢过程中发挥功能的概率最大，大于或等于 0.334。其次，在翻译、复制和转录以及细胞过程中发挥功能的概率均突破 0.1，显著高于其他功能。可见，此蛋白可能主要在能量代谢、复制和转录、翻译等过程中发挥重要功能。

表3 BMI *CPN10* 功能预测Tab. 3 Prediction of *CPN10* function in BMI

功能分类 functional category	概率 probability	基因本体分类 gene ontology category	概率 probability
氨基酸合成 amino acid biosynthesis	0.011	信号转导 signal transducer	0.093
辅因子生物合成 biosynthesis of cofactors	0.061	结构蛋白 structural protein	0.018
细胞被膜 cell envelope	0.034	转运 transporter	0.025
细胞过程 cellular processes	0.110	离子通道 ion channel	0.009
中间代谢中枢 central intermediary	0.060	阳离子通过 cation channel	0.010
能量代谢 energy metabolism	≥0.334	电压门控离子通道 voltage gated ion channel	0.004
脂肪酸代谢 fatty acid metabolism	0.032	应激反应 stress response	0.024
嘌呤和嘧啶 purines and pyrimidines	0.090	免疫反应 immune response	0.052
调节功能 regulatory functions	0.019	生长因子 growth factor	0.007
复制和转录 replication and transcription	0.113	转录调节 transcription regulation	0.029
翻译 translation	0.116	转录 transcription	0.029
转运和结合 transport and binding	0.021		

3 讨论

伴侣蛋白 (chaperonin, CPN) 是细胞在热休克、葡萄糖供应不足或受到病原菌感染应激条件下能够高效表达的一族蛋白。它们通过控制结合与释放,帮助一些相对不稳定的蛋白质稳定而正确的折叠、装配并转运至特定亚细胞器^[9]。CPN10是在所有细菌和真核生物中发现的高度保守的七聚体蛋白,由采用不规则 β -桶结构的7个相同的10 ku 亚基组成,形成1个圆顶状的七聚体环结构,在线粒体蛋白质折叠过程中作为伴侣蛋白起重要作用,并且其合成由细胞应激高度诱导^[10-13]。CPN10是一种分泌分子,可以抑制先天免疫和适应性免疫,在女性妊娠早期的血清中发现了CPN10,并且具有明显的免疫调节功能^[11]。

基因转染是将外源基因导入至靶细胞中,本研究采用非病毒感染中的脂质体介导法^[14]。增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 是经过人工优化产生的突变型绿色荧光蛋白,是目前活体分子标志物应用中效果相对理想的一种^[15]。EGFP的运用可实现在荧光显微镜下直接观察目的基因在活细胞的表达和定位,这不仅源于其高度敏感的示踪性,而且其具有的低毒性可有效避免对目的蛋白功能的影响。真核融合表达载体可把报告基因的蛋白和目的基因的蛋白嵌合在一起,以1个整体的形式表达出来^[16-17]。本研究利用 pEGFP-C1 为骨架,构建 pEGFP-C1-*CPN10* 重组质粒载体,EGFP 示踪 *CPN10* 在 PK15 细胞中的表达和定位情况显示:CPN10 主要定位

于细胞质,说明该蛋白质主要在细胞质中发挥功能作用。绿色荧光蛋白真核表达载体的成功构建将为 BMI *CPN10* 基因功能等的进一步研究奠定基础,也为其他基因的真核表达研究积累了经验。

该研究以 *GAPDH* 看家基因为内参,采用荧光定量 PCR 分析 *CPN10* 基因在 BMI 27 个不同组织中的表达差异。结果显示: BMI *CPN10* mRNA 在皮肤中表达最高,在肝和肾上腺组织中表达较高。*CPN10* 基因 mRNA 在各组织器官间的表达差异性极可能由于组织器官的功能差异所导致。以往的报道中并没有关于 *CPN10* 多组织表达差异的研究,本研究为猪 *CPN10* 基因在各组织器官中的研究提供了依据。

氨基酸侧链的亲、疏水性是蛋白质的重要特性之一,对蛋白质亲、疏水性模式的分析可以揭示某些蛋白质的结构以及折叠信息^[18]。对 BMI CPN10 氨基酸序列的亲、疏水性特征预测结果显示: CPN10 氨基酸 N 端表现出较强的疏水性, C 端表现出较强的亲水性,说明 CPN10 的氨基酸 C 端溶剂可及性 (即溶剂暴露性) 较强。BMI CPN10 蛋白的保守结构域预测结果表明,其 8~100 AA 属于 CPN10 超家族保守结构。磷酸化是蛋白质翻译后的一种主要化学修饰方式,5 个磷酸化位点的发现为今后 CPN10 蛋白的功能研究提供了研究方向。对 BMI CPN10 蛋白质二级结构的预测分析结果显示: CPN10 主要为 β 折叠、 α 螺旋和无规则卷曲,分别占 33.33%、29.41% 和 28.43%。蛋白质的空间结构很大程度上决定其

功能, 其中 β 折叠在蛋白质折叠过程和维持蛋白质三级结构的稳定性方面发挥重要作用, α 螺旋主要对蛋白质骨架起到稳定作用, 无规则卷曲则构成酶活性部位和其他蛋白质特异的功能部位, 决定蛋白质的功能。我们能够通过对蛋白质的三级结构的描述揭示其二级结构的拓扑关系^[19], 对 BMI CPN10 进行三级结构建模表明其与 4pj1.1 的蛋白相似性度为 100%。对 CPN10 进行功能预测结果发现: CPN10 在能量代谢、复制和转录、翻译等过程中概率较大, 与上述推测一致。BMI CPN10 蛋白质序列经与大鼠、野牦牛、小鼠、大猩猩等 4 个物种的 CPN10 蛋白质序列比对分析显示相似性均大于 94%, 此结果表明 CPN10 基因在进化中是高度保守的。

[参考文献]

- [1] 胡为民, 李幼平, 卢晓风, 等. 猪-人移植细胞性排斥反应相关候选基因 *pOSR1* 的克隆和鉴定[J]. 现代免疫学, 2004, 24(4): 268. DOI: [10.3969/j.issn.1001-2478.2004.04.002](#).
- [2] 马学军, 侯云德. 分子伴侣基因的克隆及表达[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(2): 107.
- [3] HU W M, CHENG J Q, LI Y P, et al. Identification of the candidate genes associated with cellular rejection in pig-to-human xenotransplantation[J]. Progress in Natural Science, 2002, 12: 710.
- [4] 胡为民. 猪到人异种移植排斥反应相关候选基因的克隆和鉴定[D]. 成都: 四川大学, 2003.
- [5] 胡为民, 程惊秋, 曾令宇, 等. 猪内皮细胞与血清作用后表达上调基因的初步鉴定[J]. 川北医学院学报, 2004, 19(1): 7. DOI: [10.3969/j.issn.1005-3697.2004.01.004](#).
- [6] YU P, ZHANG L, LI S, et al. Screening and analysis of porcine endogenous retrovirus in Chinese Banna mini-pig inbred line[J]. Transplant Proceedings, 2004, 36(8): 2485. DOI: [10.1016/j.transproceed.2004.07.055](#).
- [7] ZENG R, ZENG Y Z. Molecular cloning and characterization of *SLA-DR* genes in the 133-family of the Banna mini-pig inbred line[J]. Animal Genetics, 2005, 36(3): 267. DOI: [10.1111/j.1365-2052.2005.01277.x](#).
- [8] HUO J L, WANG P, ZHAO Y, et al. Molecular cloning, mRNA expression and characterization of a novel *FAIMI* gene from Chinese Banna mini-pig inbred line (BMI)[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 11(8): 1080.
- [9] 胡为民, 程惊秋, 曾令宇, 等. 猪伴侣蛋白 10 基因克隆和鉴定[J]. 川北医学院学报, 2004, 19(2): 7. DOI: [10.3969/j.issn.1005-3697.2004.02.004](#).
- [10] CHEN D H, LUKE K, ZHANG J J, et al. Location and flexibility of the unique C-terminal tail of *Aquifex aeolicus* co-chaperonin protein 10 as derived by cryo-electron microcopy and biophysical techniques[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 381(3): 707. DOI: [10.1016/j.jmb.2008.06.021](#).
- [11] KULKARNI O P, RYU M, KANTNER C, et al. Recombinant chaperonin 10 suppresses cutaneous lupus and lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27: 1358. DOI: [10.1093/ndt/gfr544](#).
- [12] CAVANAGH A C, MORTON H. The purification of early-pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 222: 551. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1994.tb18897.x](#).
- [13] CORRAO S, CAMPANELLA C, ANZALONE R, et al. Human Hsp10 and early pregnancy factor (EPF) and their relationship and involvement in cancer and immunity: current knowledge and perspectives[J]. Life Sciences, 2010, 86: 145. DOI: [10.1016/j.lfs.2009.11.004](#).
- [14] 陈一曲. pIRES2-AcGFP1-CD 真核表达载体的构建及其在 MSCs 中的表达[D]. 大连: 大连理工大学, 2007.
- [15] NING Z Y, PENG Y Z, HAO W B, et al. Generation of recombinant *Orf* virus using an enhanced green fluorescent protein reporter gene as a selectable marker[J]. BMC Veterinary Research, 2011, 7: 80. DOI: [10.1186/1746-6148-7-80](#).
- [16] ZHANG G H, GURTU V, KAIN S R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 227(3): 707. DOI: [10.1006/bbrc.1996.1573](#).
- [17] 李凤娥, 郝峰, 藏雨轩, 等. 重组 EGFP-aquaporin-4 融合蛋白真核表达载体的构建及其在 FRT 细胞中的表达和定位[J]. 吉林大学学报 (医学版), 2013, 39(2): 273. DOI: [10.7694/jidxyxb20130218](#).
- [18] 刘稳, 李杨, 段新源. 豆壳过氧化物酶的序列联配、二级结构预测及疏水性分析[J]. 纤维素科学与技术, 2001, 9(1): 8. DOI: [10.16561/j.cnki.xws.2001.01.002](#).
- [19] 鞠红. 蛋白质二级结构特征分析与相互作用预测[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009.

责任编辑: 何馨成