

版纳微型猪近交系 *ARRDC5* 基因亚细胞定位研究*

王 配^{1,2#}, 王淑燕^{1,2#}, 霍金龙^{1,2**}, 张 霞^{1,2}, 高林青³, 赵慧敏³,
霍海龙⁴, 曾日彬^{1,2}, 李罗刚^{1,2}, 滕晓红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; 3. 长治职业技术学院, 山西 长治 046000; 4. 云南农业职业技术学院 教务处, 云南 昆明 650031)

摘要:【目的】抑制蛋白 5 (*ARRDC5*) 的功能尚不清楚, 前期发现其可能与公猪繁殖力有关, 本研究旨在克隆猪 *ARRDC5* 基因以及确定猪 *ARRDC5* 蛋白的亚细胞定位。【方法】通过 NCBI 下载猪近缘物种 *ARRDC5* 基因序列, 在线 BLAST 比对获得猪 EST 序列, 电子克隆猪 *ARRDC5* 基因编码区及部分侧翼序列。构建真核融合表达载体并瞬时转染猪睾丸细胞系 ST, 利用倒置荧光显微镜检测蛋白表达。【结果】获得版纳微型猪近交系 (BMI) *ARRDC5* 基因的 cDNA 序列 1 045 bp, 包含 1 014 bp 的 CDS 区, 编码 337 个氨基酸, 与牛及人的同源性高。成功构建了表达载体 pEGFP-C1-*ARRDC5*, *ARRDC5* 蛋白主要定位于细胞质中, 部分细胞核中也有分布。【结论】研究结果为进一步研究该蛋白功能奠定基础。

关键词: 抑制蛋白 5; 基因克隆; 版纳微型猪近交系; 载体构建; 亚细胞定位

中图分类号: S 828.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 01-0033-07

Subcellular Location of *ARRDC5* Gene in Banna Mini-pig Inbred Line

WANG Pei^{1,2}, WANG Shuyan^{1,2}, HUO Jinlong^{1,2}, ZHANG Xia^{1,2}, GAO Linqing³,
ZHAO Huimin³, HUO Hailong⁴, ZENG Ribin^{1,2}, LI Luogang^{1,2}, TENG Xiaohong²

(1. Key Laboratory of Banna Mini-pig Inbred Line of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Changzhi Vocational and Technical College, Changzhi 046000, China; 4. Teaching Affairs Department, Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming 650031, China)

Abstract: [Purpose] The function of the arrestin domain-containing protein 5 (*ARRDC5*) was unclear up to now. Our previous research indicated that *ARRDC5* might be associated with the fecundity of boars. The aim of this study was to clone the porcine *ARRDC5* gene and analyze its subcellular location. [Methods] The *ARRDC5* sequences of allied species of pig were obtained from NCBI and compared by online BLAST to obtain the expressed sequence tag (EST). Subsequently we used silicon cloning strategy to gain the coding sequence and a few flanking sequences of *ARRDC5*. Then, the eukaryotic expression vector pEGFP-C1-*ARRDC5* was constructed by Digestion-Ligation and trans-

收稿日期: 2018-05-20

修回日期: 2018-06-21

网络首发时间: 2020-01-06 16:33:18

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

作者简介: #对本文文献等同, 为并列第一作者。王配 (1987—), 女, 河南上蔡人, 博士, 实验师, 主要从事动物分子遗传学方面的研究。E-mail: pei99999@126.com; 王淑燕 (1987—), 女, 山东济南人, 实验师, 硕士, 主要从事动物分子遗传学方面的研究。E-mail: shuyanwang2014@126.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方面的研究。E-mail: jinlonghuo973@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200106.1028.001.html>



fectured into the swine testicle (ST) cells with liposome, detection of protein expression by inverted fluorescence microscopy. [**Result**] The cDNA length of Banna mini-pig inbred line (BMI) *ARRDC5* was 1 045 bp that included an open reading frame of 1 014 bp coding a protein of 337 amino acids. The BMI *ARRDC5* protein sequence shared high homology with that of cattle and human. We successfully constructed the expression vector pEGFP-C1-*ARRDC5*, and the green fluorescent was mostly limited in the cytoplasm of ST cells, which showed that the gene products of *ARRDC5* in eukaryocytes were mainly located in the cytoplasm. The cell nuclei are also expressed in some cells. [**Conclusion**] These results will provide a basis for the study of *ARRDC5* function in swine.

Keywords: *ARRDC5*; gene cloning; Banna mini-pig inbred line; vector construction; subcellular location

抑制蛋白是多功能适配蛋白, 具有调节 G 蛋白偶联受体信号转导的功能。G 蛋白偶联受体是一个大家族信号分子, 能对各种细胞外刺激做出反应。抑制蛋白最开始是作为调节 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 活性两步机制的一部分被发现^[1-3]。为了阻止 GPCR 激活异源三聚体 G 蛋白的反应, 通过一类丝氨酸/苏氨酸激酶使 G 蛋白偶联受体激酶 (GRKs) 磷酸化。然后磷酸化的 GRK 激活受体结合到抑制蛋白上, 阻碍 G 蛋白介导的信号途径和目标受体的内化。除了 G 蛋白偶联受体, 抑制蛋白还能与其他类细胞表面受体和多种其他信号转导蛋白结合^[4]。

抑制蛋白可分为 α -抑制蛋白 (aArrs)、 β 抑制蛋白 (bArrs) 和视觉抑制蛋白 (vArrs)。哺乳动物有 6 个 α -抑制蛋白, 分别命名为抑制蛋白结构域蛋白 1 至 5 (*ARRDC1~5*) 和硫氧还蛋白互作蛋白或维生素 D 上调蛋白 1 (*TXNIP* 或 *VDUP1*)。不同的抑制蛋白, 如视觉抑制蛋白 (或抑制蛋白 1)、 β -抑制蛋白 1 (或抑制蛋白 2) 和 β -抑制蛋白 2 (或抑制蛋白 3) 可以通过多种方式降低他们的靶蛋白 GPCR 的活性。一个哺乳动物的 α -抑制蛋白可以介导一个激活的质膜受体的泛素化和溶酶体运输^[5]。 α -抑制蛋白也参与胞吞运输且能与 β 抑制蛋白结合, 从而依据细胞的生理环境和外部信号维持细胞表面蛋白的互补和功能优势^[6]。

ARRDC1 是微泡出芽的重要介质, 其 C 端结构域的 2 个高度保守的 PPxY 基序是依赖 PPxY 的逆转录病毒出芽过程所必需的^[7]。*ARRDC1* 泛素化修饰也是 ARMM 释放的必要条件^[8]。但是 *ARRDC5* 的功能尚不清楚。通过哺乳动物 G 蛋

白偶联受体进行的内吞膜运输调控特异性和可塑性高。这些结果对 G 蛋白偶联受体的药理学研究奠定了重要基础, 并为以 G 蛋白偶联受体为导向的药物治疗新机制的开发提供研究思路^[9]。作为 G 蛋白偶联受体的重要调节因子, 对抑制蛋白功能机制的研究具有相当大的理论意义。

版纳微型猪近交系 (Banna mini-pig inbred line, BMI) 是利用云南地方品种滇南小耳猪培育成功的大型哺乳动物近交系, 是云南省宝贵的遗传资源, 可为功能基因研究、人类异种器官移植等众多领域提供实验材料和器官供体, 具有重要的研究应用价值^[10-12], 前期研究发现 BMI 公猪部分不育^[13-14]。因此, 其雄性不育方面的基础研究是亟待开展的重要研究方向。前期我们通过荧光定量 PCR 方法发现 *ARRDC5* 基因 mRNA 在版纳微型猪近交系睾丸、甲状腺和胸腺中特异表达, 且在睾丸中的表达量显著高于甲状腺和胸腺, 提示该基因可能在 BMI 公猪繁殖力方面发挥功能^[15]。本研究的目的是从版纳微型猪近交系中克隆出 *ARRDC5* 基因全长编码序列, 并对其克隆、测序和连接; 利用 DNA 重组技术得到真核表达载体, 并将其转染 ST 细胞, 得到表达荧光的细胞, 证明了该真核表达载体的可应用性; 最后再对表达荧光的细胞进行细胞核和线粒体荧光染色, 确定其在真核细胞内的表达位置, 为猪 *ARRDC5* 基因在 BMI 公猪繁殖力方面的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验动物版纳微型猪近交系来自云南省昆明

市版纳微型猪近交系原种场, 于10月龄活体去势取睾丸, 液氮速冻带回实验室, 转移至 -80°C 冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取和反转录

液氮速冻研钵后, 取100 mg冻存的组织样品放在研钵中, 期间不断加液氮, 使样品一直处于冷冻状态并迅速研磨成粉, 用RNAiso Plus (TaKaRa, 中国大连) 法提取组织的总 RNA。检测睾丸总 RNA 完整性后, 采用第1链 cDNA 合成试剂盒 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis (TaKaRa, 中国大连) 将睾丸组织的总 RNA 反转录为第1链 cDNA, 放置于 -20°C 冰箱备用。

1.3 PCR 引物

根据NCBI已公布的黄牛 (NM_001128508.2) 和人 (NM_001080523.1) 等物种的 *ARRDC5* mRNA 序列, 结合猪 EST 序列 (CX061584 和 BI343733), 利用 Lasergene 软件电子克隆猪 *ARRDC5* 基因序列, 再结合真核表达载体 pEGFP-C1 的多克隆位点信息, 利用 Primer Premier 6.0 和 Oligo 7 软件设计特异性引物, 由昆明硕擎生物科技有限公司合成, 预计扩增出1 045 bp的片段, 引物序列如下: 上游引物 F 为 5'-CTCGAGCCATGTCTGTG-GTGAAGTCGAT-3', 含 *Xho* I 酶切位点和 *ARRDC5* 基因编码区 5'端部分序列; 下游引物 R 为 5'-GAATTCAGAGTCTGATAAAGCTTTTAATA-3', 含 *Eco*R I 酶切位点和 *ARRDC5* 基因编码区 3'端部分序列。

1.4 猪 *ARRDC5* 基因 cDNA 的克隆

从 -20°C 冰箱中取出睾丸组织 cDNA 母液, 稀释成 50 ng/ μL , 作为模板, 利用 Ex Taq 酶 (TaKaRa, 中国大连) 扩增猪 *ARRDC5* 编码区全序列, PCR 反应程序参照 Ex Taq 聚合酶 50 μL 标准体系进行。单一扩增条带的 PCR 扩增产物经胶回收后用 TA 法克隆到 pEASY-T5-ZERO (全式金) 中, 构建 pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* 质粒, 并进行质粒 PCR、双酶切和测序鉴定。

1.5 序列确定和数据分析

使用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序组装测序结果。利用 DNASTar 软件中的 EditSeq 程序对拼接的 cDNA 序列进行 CDS 预测, 并推导出氨基酸序列。分别使用 ProtParam、PSortII、TM-HMM 2.0 和 SignalP 4.1 预测蛋白的一级结构信

息、亚细胞定位、跨膜螺旋和信号肽。NCBI 上搜索得到牛和人等 *ARRDC5* 氨基酸序列, 利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 程序将 BMI、牛和人的 *ARRDC5* 的氨基酸序列进行多物种完全比对, 参数取默认值, 计算序列相似度并输出以 BMI 序列为参考标准的氨基酸序列比对结果, 最后利用 GeneDoc 软件打开和输出氨基酸比对结果。

1.6 真核表达重组载体的构建

pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* 和 pEGFP-C1 均使用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切。酶切体系为 50 μL : pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* 或 pEGFP-C1 5 μg , 内切酶各 5 μL , 10 $\times$ Q. Cut buffer 5 μL , 加去离子水补足 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h。将酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶回收纯化后, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 18 h 后转化大肠杆菌感受态 DH5 α (TaKaRa, 大连, 中国)。复苏、培养和鉴定按常规方法进行。经质粒 PCR、双酶切和测序鉴定, 均正确的命名为: pEGFP-C1-*ARRDC5*。

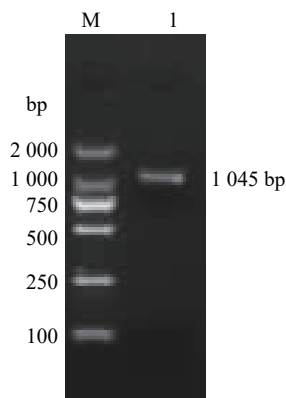
1.7 猪 *ARRDC5* 的亚细胞定位

按无内毒素质粒大提试剂盒 (DP117, 北京天根生化科技有限公司) 说明书提取无内毒素质粒 pEGFP-C1-*ARRDC5* 和 pEGFP-C1。ST 细胞用含 10% 胎牛血清 (Gibco, USA) 的 DMEM 培养液培养, 传代, 细胞汇合率达 50% 时, 用脂质体 2000 (Invitrogen, USA) 转染 ST 细胞, 转染 24 h 后于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。观察到绿色荧光后, 用 PBS 溶液清洗细胞 3 次, 每孔加入 1 mL Mito Tracker 染色液 (250 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中染色 30 min, 弃染色液; PBS 溶液再清洗细胞 3 次, 每孔加入 1 mL Hoechst33342 染色液 (250 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中染色 30 min, 弃染色液; PBS 溶液再清洗细胞 3 次, 加入 2 mL 细胞培养基于倒置荧光显微镜下观察拍照, 线粒体被染成红色, 细胞核被染成蓝色, 目的蛋白为绿色。

2 结果与分析

2.1 猪 *ARRDC5* 基因 RT-PCR 结果

以提取的 BMI 睾丸总 RNA 反转录后得到的 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增得到大小为 1 045 bp 长的片段 (已包括 1 014 bp 的 CDS 区), 结果与预期相符 (图 1)。



注: M. DL 2 000 分子量标准; 1. *ARRDC5* PCR 产物。

Note: M. DL 2 000 Marker; 1. *ARRDC5* PCR product.

图 1 *ARRDC5* 基因扩增结果

Fig. 1 The result of *ARRDC5* gene amplification

2.2 猪 *ARRDC5* 基因序列及对应的氨基酸序列分析

BMI *ARRDC5* 完整编码区长 1 014 bp, 包括起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA, 编码 337 个氨基酸, 序列已提交 NCBI GenBank 数据库, 获得核酸登录号为 KF589203, 其对应的蛋白质登录号为 AHB08949。生物信息学分析表明: *ARRDC5* 蛋白质分子量 (Mw) 为 37.5 ku, 等电点 (pI) 为 7.08, 存在 Arrestin-N 和 Arrestin-C 两个保守结构域 (图 2), 无信号肽和跨膜螺旋, 与牛 (NP_001121980) 和人 (NP_001073992.1) *ARRDC5* 蛋白的同源性高达 85.7% 和 82% (图 2)。



注: 单下划线表示 Arrestin-N 保守结构域, 双下划线表示 Arrestin-C 结构域。

Note: Single underline represents the Arrestin-N conserved domain, the double underline indicates the Arrestin-C conserved domain.

图 2 版纳微型猪近交系 *ARRDC5* 与牛、人 *ARRDC5* 氨基酸序列同源性分析

Fig. 2 Alignment of the amino acids sequences of BMI *ARRDC5* and those of cattle and human

2.3 BMI *ARRDC5* 蛋白亚细胞定位预测

将 BMI *ARRDC5* 蛋白序列提交到 PSORT II 程序, 亚细胞定位预测表明: *ARRDC5* 蛋白在细胞质、线粒体、细胞核、内质网和细胞骨架中的可能性分别为 52.2%、21.7%、8.7%、4.3% 和 4.3%, 说明其主要在细胞核外表达。

2.4 重组质粒的鉴定

以质粒为模板利用特异性引物 F/R 扩增的片段经电泳检测, 结果与预期相符, 为 1 045 bp; 用 *Xho* I 和 *Eco* R I 内切酶对提取的 pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* 和 pEGFP-C1-*ARRDC5* 质粒进行双酶切, 也与预期结果相吻合, 电泳条带分别为 3 961/1 039 bp 和 4 700/1 039 bp; 表明克隆质粒

pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* 和真核表达质粒 pEGFP-C1-*ARRDC5* 构建成功 (图 3)。

2.5 猪 *ARRDC5* 绿色荧光蛋白真核融合表达载体在 ST 细胞中的表达

分别用 pEGFP-C1-*ARRDC5* 和 pEGFP-C1 对照质粒转染猪睾丸 ST 细胞, 瞬时表达。在表达 24 h 后, 可见到绿色荧光。之后, 将细胞进行 Mito Tracker Red CMXRos (染线粒体) 和 Hoechst33342 (染细胞核) 染色, 在倒置荧光显微镜下观察。如图 4 所示: ST 细胞中, 转染有 pEGFP-C1 对照质粒的, 绿色荧光在细胞中均匀分布, 因为绿色荧光蛋白在 ST 细胞中的表达没有定向性, 其广泛分布于整个细胞核和细胞质中。而转染了 pEG-

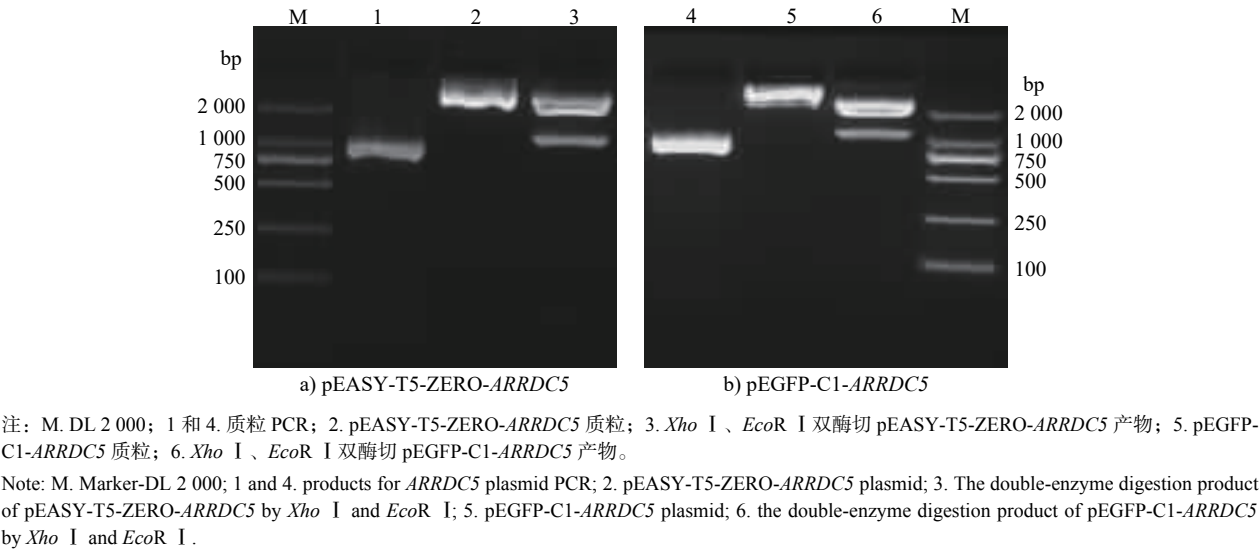


图 3 pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* (a) 和 pEGFP-C1-*ARRDC5* (b) 重组质粒的鉴定

Fig. 3 Identification of the pEASY-T5-ZERO-*ARRDC5* (a) and pEGFP-C1-*ARRDC5* (b) recombinant plasmids

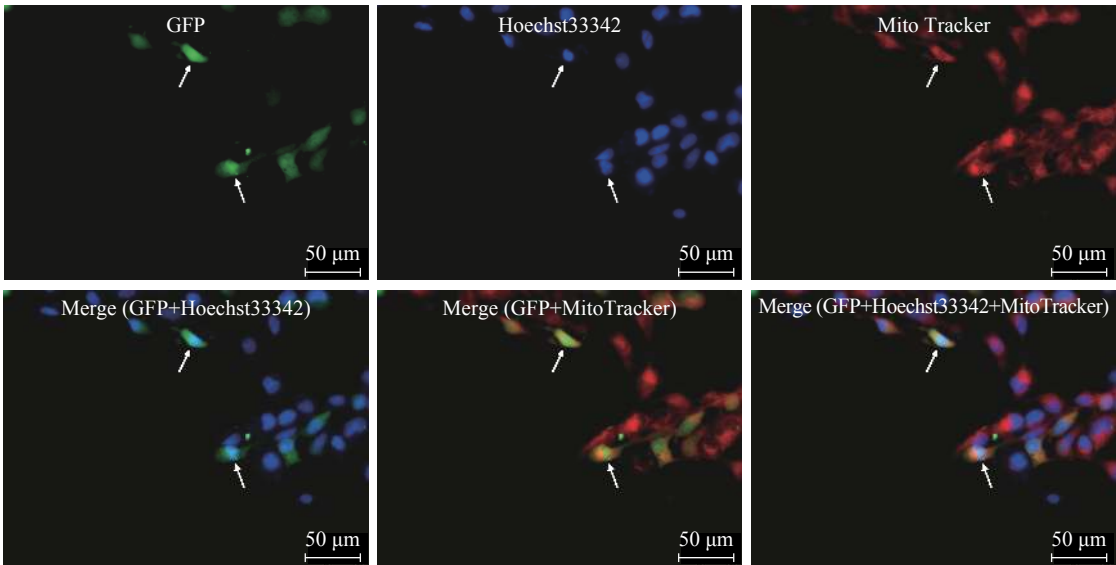


图 4 EGFP 蛋白在 ST 细胞中的亚细胞定位

Fig. 4 The subcellular location of EGFP protein in ST cells

FP-C1-*ARRDC5* 质粒的 ST 细胞中, 绿色荧光主要集中在细胞质中, 部分细胞核中也有荧光(图 5)。为进一步分析 *ARRDC5* 蛋白在细胞中的定位, 我们利用软件将同一视野下的绿色荧光和红色荧光进行叠加、绿色荧光和蓝色荧光进行叠加(图 5), 可以看出绿色荧光与红色荧光重合, 说明 *ARRDC5* 基因在真核生物中的表达产物主要定位于细胞质的线粒体中; 部分细胞中的绿色荧光和蓝色荧光重合, 表明 *ARRDC5* 蛋白也在细胞核中表达(图 5)。

3 讨论

ARRDC5 属于抑制蛋白基因家族, 人 *ARRDC5* 基因定位于 19 号染色体, 但是对其功能的研究较少。本研究首次根据牛和人的 *ARRDC5* mRNA 序列以及猪 EST 序列, 利用同源比对技术成功拼接了猪的 *ARRDC5* cDNA 序列; 然后以版纳微型猪近交系为材料通过 RT-PCR 技术进一步扩增出该基因进行验证。获得的猪 *ARRDC5* 基因 CDS 区长 1 014 bp, 编码 377 个氨基酸, 与 GenBank 中牛和人 *ARRDC5* 氨基酸序列的同源

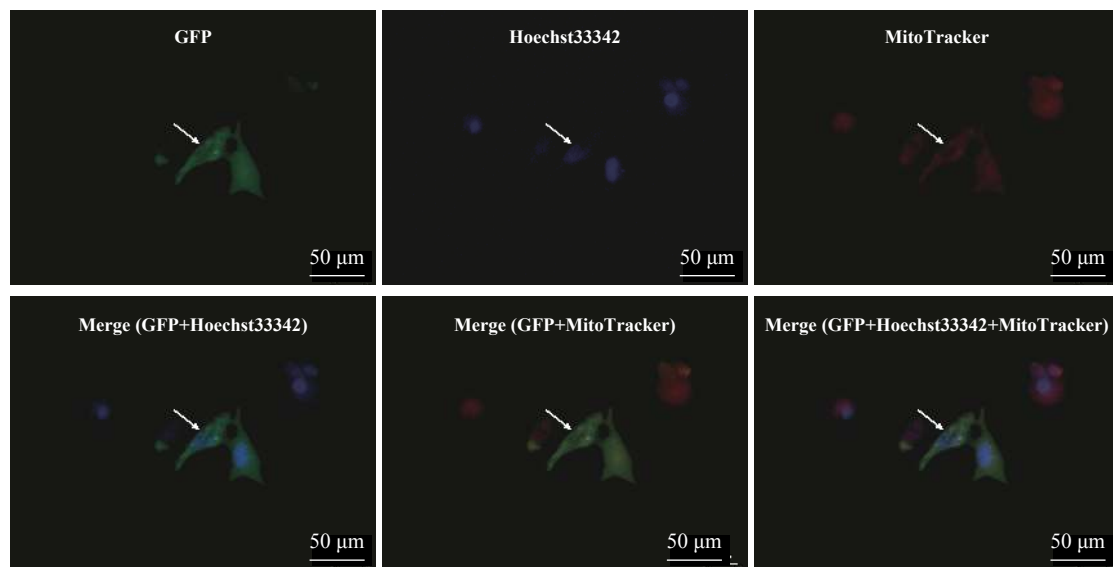


图 5 ARRDC5 蛋白在 ST 细胞中的亚细胞定位

Fig. 5 The subcellular location of ARRDC5 protein in ST cells

性为 85.7% 和 82%，相似性较高，说明该基因在物种间有较高的保守性。此外，试验克隆的猪 *ARRDC5* 基因编码区序列和拼接的猪 *ARRDC5* 基因编码区序列长度一致。猪 *ARRDC5* 蛋白包含两个保守结构域 (Arrestin N 和 Arrestin C)。所有抑制蛋白家族成员都具有 Arrestin C 结构域，它是 Arrestin N 结构域的一个拷贝，是一种类免疫球蛋白的 beta 三明治折叠结构，在激活抑制蛋白家族成员过程中起重要作用^[16-17]。

目前针对猪 *ARRDC5* 基因的生物学功能尚未见报道，但猪 *ARRDC5* 基因是一个具有明显组织表达特异的基因，仅在睾丸、甲状腺和胸腺中表达，且在睾丸中的表达量显著高于其他两种组织^[15]。表达有限性说明对该基因开展深入细致的研究是有必要的。细胞是动物个体的结构和功能单位，具有复杂的亚细胞结构，目前已发现动物细胞中的细胞器主要包括：线粒体、内质网、中心体，高尔基体和核糖体等，它们组成了细胞的基本结构，使细胞能正常地工作、运转。每种细胞器含有一组特定的蛋白，具有特定的功能，如内质网是细胞内除核酸以外的一系列重要生物大分子，是蛋白质、脂类和糖类合成的基地；线粒体是有氧呼吸的主要场所；核糖体是蛋白质合成的分子机器；溶酶体含有多种水解酶，可以消化细胞内的异物及衰老无用的细胞器碎片。由于蛋白质的亚细胞定位与其功能密切相关，所以可以从蛋白

质的定位角度探索猪 *ARRDC5* 的生物学功能。

本研究使用的真核表达载体为 pEGFP-C1，该载体带有 CMV 启动子和增强型绿色荧光蛋白 EGFP，是细胞荧光蛋白报告载体。多克隆位点位于 EGFP 之后，目的基因借助于酶切位点插入多克隆位点，故目的基因 *ARRDC5* 在 *EGFP* 下游；当基因进行转录和翻译时，表达产物为 EGFP 和目的基因表达蛋白的融合体^[18]。EGFP 是 GFP 的突变体，最大激发峰在 490 nm，具有分子量小、荧光强度大、检测灵敏、无细胞毒性和可活体跟踪观察等特征，利用其荧光表达情况可进行活细胞内蛋白质的分布与变化研究^[19]。本研究构建含有 EGFP 标签的重组质粒 pEGFP-C1-*ARRDC5*，通过脂质体 2000 介导转染宿主细胞猪睾丸细胞系 ST，实现瞬时表达，初步研究 *ARRDC5* 在细胞中的定位情况。荧光倒置显微镜下发现转染空载体 pEGFP-C1 的整个细胞可见绿色荧光，核内外荧光强度差别不明显；转染 *ARRDC5* 融合表达质粒的细胞中绿色荧光主要分布于细胞质，少部分在细胞核，核内外荧光强度有差别。猪 *ARRDC5* 蛋白在 ST 细胞中定位结果与 PSORT 软件的预测结果基本一致，这揭示 *ARRDC5* 主要在细胞质中发挥功能。

4 结论

本研究首先电子克隆猪 *ARRDC5* 基因，接着

采用 RT-PCR 分离了其 CDS 区, 采用基因重组法构建了猪 *ARRDC5* 与绿色荧光蛋白的融合表达载体, 并进行了体外表达, 初步确定猪 *ARRDC5* 基因表达产物主要定位于猪睾丸细胞 ST 的细胞质中, 少部分定位于细胞核中, 为进一步研究其在细胞内的作用机制和生物学功能提供了重要依据。

[参考文献]

- [1] WILDEN U, HALL S W, KÜHN H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(5): 1174. DOI: [10.1073/pnas.83.5.1174](#).
- [2] LOHSE M J, BENOVIĆ J L, CODINA J, et al. Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function[J]. Science, 1990, 248(4962): 1547. DOI: [10.1126/science.2163110](#).
- [3] GUREVICH V V, GUREVICH E V. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2006, 110(3): 465. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2005.09.008](#).
- [4] GUREVICH V V, GUREVICH E V. The molecular acrobatics of arrestin activation[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2004, 25(2): 105. DOI: [10.1016/j.tips.2003.12.008](#).
- [5] LÉON S, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins[J]. Experimental Cell Research, 2009, 315(9): 1574. DOI: [10.1016/j.yexcr.2008.11.014](#).
- [6] SHEA F F, ROWELL J L, LI Y, et al. Mammalian alpha arrestins Link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family E3 ubiquitin ligases and interact with β arrestins[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50557. DOI: [10.1371/journal.pone.0050557](#).
- [7] RAUCH S, MARTIN-SERRANO J. Multiple interactions between the ESCRT machinery and Arrestin-Related proteins: implications for PPXY-Dependent budding[J]. Journal of Virology, 2011, 85(7): 3546. DOI: [10.1128/JVI.02045-10](#).
- [8] NABHAN J F, HU R, RS O H, et al. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(11): 4146. DOI: [10.1073/pnas.1200448109](#).
- [9] HANYALOGU A C, VON ZASTROW M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2008, 48: 537. DOI: [10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094830](#).
- [10] YU P, ZHANG L, LI S, et al. Screening and analysis of porcine endogenous retrovirus in Chinese banna minipig inbred line[J]. Transplantation Proceedings, 2004, 36(8): 2485. DOI: [10.1016/j.transproceed.2004.07.055](#).
- [11] 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](#).
- [12] 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. DOI: [10.3923/javaa.2012.1080.1086](#).
- [13] WANG P, WANG S Y, QIN C Y, et al. Characterization and expression of *PGK2* and *PHKG2* in testis tissues from fertile and sterile Banna mini-pig inbred line (BMI)[J]. Research Journal of Biotechnology, 2015, 10(2): 28.
- [14] 张霞, 曾日彬, 霍金龙, 等. 版纳微型猪近交系 *RNF4* 基因克隆、多组织 qPCR 表达及功能生物信息学分析[J]. 东北农业大学学报, 2017, 48(3): 1005. DOI: [10.3969/j.issn.1005-9369.2017.03.004](#).
- [15] HUO H L, WANG P, WANG S Y, et al. cDNA cloning, molecular characterization, and expression analyses of two novel porcine *ARRDC* genes-*ARRDC1* and *ARRDC5*[J]. Turkish Journal of Biology, 2015, 39(4): 523. DOI: [10.3906/biy-1404-101](#).
- [16] PALCZEWSKI K. Structure and functions of arrestins [J]. Protein Science, 1994, 3(9): 1355. DOI: [10.1002/pro.5560030901](#).
- [17] GRANZIN J, WILDEN U, CHOE H W, et al. X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments[J]. Nature, 1998, 391(6670): 918. DOI: [10.1038/36147](#).
- [18] 陈琬玲, 李臣, 范立, 等. 重组表达载体 IDO/pEGFP-C1 的构建[J]. 武警后勤学院学报 (医学版), 2015(2): 2095. DOI: [10.16548/j.2095-3720.2015.02.005](#).
- [19] 徐洁杰. 增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因真核表达载体的构建与表达[D]. 成都: 四川大学, 2005.

责任编辑: 何承刚