

鸡内质网分子伴侣 Calnexin 基因的生物信息学与组织表达谱分析

李楠^{1△}, 王丽丽^{1△}, 曹嫦妤¹, 龚都强^{1,2}, 王伟¹, 李金龙^{1*} (1. 东北农业大学 动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 吉林大学 动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要:为探明鸡内质网分子伴侣钙联结蛋白(Calnexin, CNX)基因特性及蛋白结构和功能,以鸡 CNX 基因序列为对象,利用生物信息学方法分析了 12 个物种该分子核苷酸和氨基酸序列的同源性,并应用 qRT-PCR 法分析了 35 日龄海兰白鸡 30 个组织中 CNX mRNA 组织表达谱。结果表明, CNX 核苷酸序列及氨基酸序列在不同物种中具有一定保守性,该蛋白属于跨膜蛋白,不存在信号肽,酶分类可能属于 EC 1. 11. 1. 9,并与糖类特异性结合发挥活性。鸡 CNX mRNA 在鸡组织中广泛表达,其中在回肠、动脉和腺胃组织中表达量很高,表明 CNX 是鸡体内必需蛋白分子,可能在消化系统和心血管系统中发挥更为重要作用。

关键词:鸡 Calnexin; 生物信息学分析; 组织表达谱; 荧光定量 PCR

中图分类号: S852. 2; Q78

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2014)08-1304-05

Analysis of bioinformatics and tissue specific expression profile of endoplasmic reticulum chaperone Calnexin gene in chicken

LI Nan^{1△}, WANG Li-li^{1△}, CAO Chang-yu¹, GONG Du-qiang^{1,2}, WANG Wei¹, LI Jin-long^{1*} (1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: The aim of this study is to prove the genetic characteristics, the protein structure and function of Calnexin(CNX) of chicken, it is one kind of endoplasmic reticulum chaperone members. Based on the chicken CNX sequence, the homology of the molecule nucleotide and amino acid sequence from 12 species was analyzed by bioinformatics, the tissue specific expression profile about 30 tissues of 35-day-old Hailan white chicken CNX mRNA was analyzed by qRT-PCR in this study. The results showed that the nucleotide sequence and the amino acid sequence of CNX were conserved in some degree among different species. CNX is a transmembrane protein and has no signal peptide. This protein may belong to the enzyme classification EC 1. 11. 1. 9. CNX plays viability by binding specifically with carbohydrate. Chicken CNX mRNA is widely expressed in chicken tissues, high level existed in the ileum, artery and glandular stomach. These results indicated that CNX was one of necessary protein molecules in chicken body and might play a significantly important role in the digestive system and cardiovascular system.

Key words: chicken Calnexin; analysis of bioinformatics; tissue specific expression profile; qRT-PCR

△ Joint first authors; * Corresponding author, E-mail: jinlongli@neau.edu.cn

收稿日期: 2013-07-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(30901088); 教育部新世纪优秀人才培养计划资助项目(NECT-1207-02); 黑龙江省普通高等学校新世纪优秀人才培养计划资助项目(1252-NCET-009); 中国博士后科学基金资助项目(2012T50301; 20110491021); 黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12511031)

作者简介: 李楠(1989-), 女, 硕士研究生。

△共同第 1 作者; * 通讯作者, E-mail: jinlongli@neau.edu.cn

细胞内分子伴侣、化学分子伴侣和药理学分子伴侣可以有效阻止蛋白质错误折叠,从而减轻一些神经变性病和许多其他蛋白质错误折叠病的严重程度^[1-4]。钙联结蛋白(Calnexin,CNX)作为内质网内一类帮助糖蛋白折叠修饰的分子伴侣,对保持糖蛋白的正确折叠进而减少错误折叠的糖蛋白在细胞中的堆积可能会起到十分重要的作用^[5-6]。另外,CNX经常与 Calreticulin(CRT)和内质网依赖性激酶抑制蛋白(ERp57)形成 CNX/CRT 循环,通过此循环新生多肽链完成折叠和装配过程^[7-8]。

目前,灵长类、啮齿类、禽类及鱼类等的 CNX 基因序列均已知,但关于蛋白结构与功能的研究未见报道,特别是禽类的 CNX 基因特性及蛋白质结构与功能仍然未知。本研究对鸡 CNX 基因特性及蛋白结构和功能进行了预测,并检测其在鸡体内组织表达谱,为研究 CNX 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 RNAase 固相清除剂、RNA locker 购自北京天恩泽基因科技有限公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;M-MLV 反转录试剂购自 TransGen Biotech 公司;GoTaq qPCR Master Mix 购自 Promega 公司。

1 日龄海兰白雏鸡购自哈尔滨市先锋种鸡场,常规饲养,自由采食和饮水。35 日龄时颈静脉放血处死,采集大脑、丘脑、小脑、脑干、脊髓、垂体、坐骨神经、食道、嗉囊、腺胃、肌胃、十二指肠、回肠、盲肠、直肠、胰腺、肝脏、胸肌、翅肌、腿肌、心肌、胸腺、法氏囊、脾脏、睾丸、卵巢、动脉、静脉、肾脏、肺脏,经过 RNA locker 处理,然后保存于 -80°C ,用于组织表

达谱检测。

1.2 不同物种间 CNX 核苷酸及氨基酸序列的多重序列比对方法 应用 Laser Gene 软件对 12 个物种 CNX 基因核苷酸及氨基酸序列进行同源性比对,构建 CNX 基因序列的进化关系树,分析不同物种之间的序列差异。12 个物种 CNX 基因及氨基酸序列信息来源于 GenBank,具体信息为鸡(NM001030620)、人(BC042843)、小鼠(BC040244.1)、猩猩(NM_001133567.1)、牛(BC153264.1)、猪(NM_001243210.1)、犬(NM_001003232.1)、非洲蟾蜍(BC044970.1)、蛙(D78589.1)、斑马鱼(NM_213448.1)、斑点叉尾鮰(AY288070.1)、蛇(JU174055.1)。

1.3 生物信息学分析 用 ExPASy-ProtParam Tool 工具对鸡 CNX 蛋白基本理化性质进行包括氨基酸组成、元素组成、等电点、相对分子质量等预测;应用 ProtScale 的网络版本对鸡 CNX 蛋白进行疏水区域预测;应用 TMPRED 在线软件分析鸡 CNX 蛋白的跨膜区;应用 SignalP 在线软件进行鸡 CNX 的信号肽分析;应用 PHD 在线软件进行鸡 CNX 的二级结构预测;应用 InterProScan 在线软件对鸡 CNX 蛋白结构域进行预测;应用 RASMOL 软件对鸡 CNX 蛋白的空间结构进行预测;应用 I-TASSER 在线软件预测该蛋白高级结构与功能。

1.4 鸡 CNX 基因组织表达谱分析

1.4.1 引物设计与合成 以 GADPH 作为内参照进行荧光定量 PCR 分析,利用 Oligo 7.22 软件,按照引物设计的基本要求设计 GADPH 与 CNX 荧光定量引物,由北京六合华大基因科技公司合成,引物序列及特征见表 1。

表 1 鸡 CNX 基因荧光定量 PCR 分析用引物序列及产物大小

基因	序列号	引物序列(5'→3')	长度/bp
CNX	NM001030620	F-GATTGCAAATCCGAAATGTGA	112
		R-GACATTATCAATCATAGGTGGT	
GADPH	K01458	F-AGAACATCATCCAGCGT	182
		R-AGCCTTCACTACCCTCTTG	

1.4.2 总 RNA 的提取及反转录反应 取 50 mg 组织样本,Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量,取等量各组织总 RNA 进行反转录反应,逆转录具体过程参照 TransGen 说明书。反转录体系为 40 μL ,其中总 RNA 10 μg 。组织总 RNA 提取样品的 D_{260}/D_{280} 比值均在 1.9~2.1,即

RNA 纯度较高,符合要求。

1.4.3 荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应 以合成的 cDNA 为模板,qRT-PCR 反应采用 BRYT Green dye 荧光染料法,按照试剂盒使用手册进行。采用 20 μL 反应体系,qPCR 反应体系:GoTaq[®] qPCR Master Mix,2X 10 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各

0.4 μL , cDNA 模板 2.0 μL , Nuclease-Free Water 7.2 μL 。反应在 ABI 7500 Real Time PCR System 上进行。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。反应结束后进行融解曲线分析。

为了保证样品的可靠性,对反转录好的 cDNA 先进行预试验,再进行正式试验。为减少干扰,用 Nuclease-Free Water 代替 cDNA 模板做阴性对照,以检测是否有外源 DNA 污染,而且所有样品做 3 个重复孔,并在同一块平板上进行 cDNA 样品 5 倍 (2 μL cDNA + 8 μL Nuclease-Free Water) 逐级稀释制作相对标准曲线,进行线性回归分析,同时获得扩增曲线、融解曲线和 Slope 值进行下一步分析。在测定组织中 CNX mRNA 表达水平变化时,以肾脏的 C_t 值为参照进行计算。以 GADPH 为参照进行 CNX mRNA 表达水平相对定量分析。计算采用 Pfaffl 法,计算公式如下:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t_{\text{target}}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{GADPH}})^{\Delta C_{t_{\text{GADPH}}}(\text{control-sample})}}, \text{其中 } E$$

$$= 10^{-1/\text{slope}}$$

2 结果

2.1 不同物种间 CNX 核苷酸及氨基酸序列的多重比较 将 12 个物种的 CNX 基因核苷酸序列进行比对,由图 1 可知,CNX 基因核苷酸序列中:鸡与蛇、人、猩猩、小鼠、非洲蟾蜍、犬、猪、牛、斑点叉尾鮰、斑马鱼和蛙的序列相似性分别为 70.1%, 65.3%, 64.9%, 64.7%, 64.7%, 64.7%, 64.4%, 63.3%, 61.0%, 54.2%, 46.7%。即,鸡与蛇 CNX 基因核苷酸序列相似性最高,为 70.1%,与蛙相似性最低,为 46.7%。鸡与人、猩猩和小鼠的 CNX 基因核苷酸序列相似性分别为 65.3%, 64.9% 和 64.7%,也相对较高,反映了 CNX 基因一定的进化性。

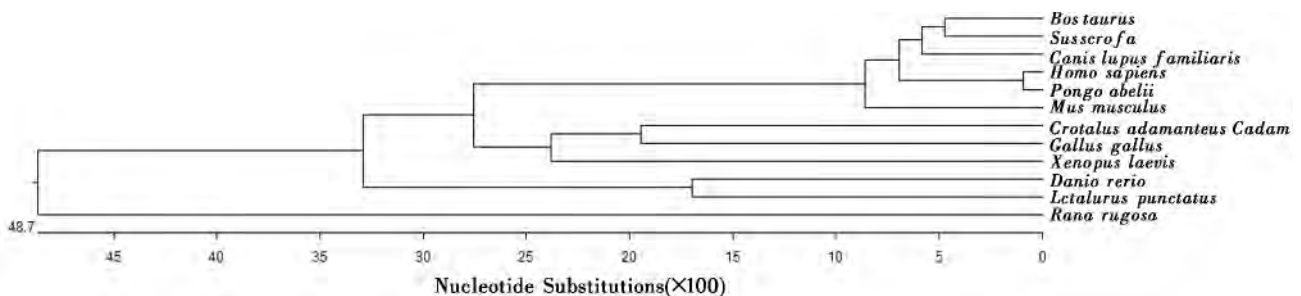


图 1 不同物种 CNX 基因核苷酸进化树

将 12 个物种的 CNX 基因氨基酸序列的同源指数进行综合分析,结果(图 2)表明,鸡 CNX 的氨基酸序列中:鸡与猪、猩猩、犬、牛、人、小鼠、蛇、非洲蟾蜍、斑点叉尾鮰、斑马鱼和蛙同源指数分别为 85.1%, 84.1%, 84.0%, 83.9%, 83.7%, 83.7%,

83.2%, 78.1%, 71.4%, 69.7%, 41.0%。即,鸡与猪的同源性最高,为 85.1%;与蛙的同源性最低,为 41.0%。鸡与猩猩、人和小鼠的 CNX 基因氨基酸序列相似性分别为 84.1%, 83.7%, 83.7%,也相对较高。

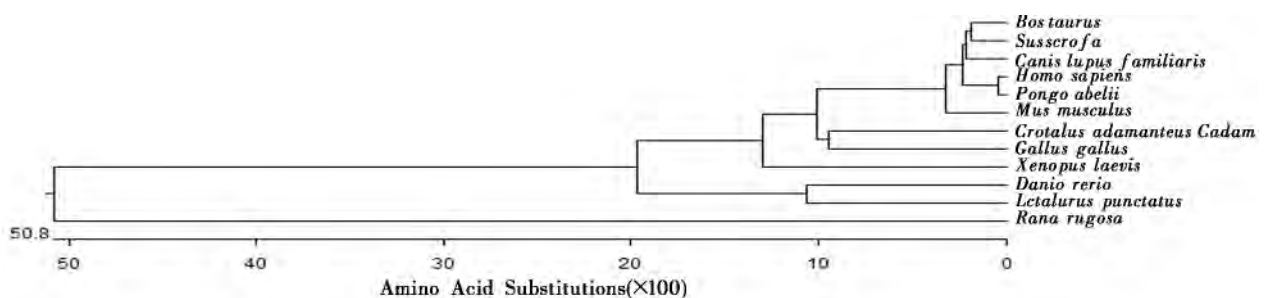


图 2 CNX 基因氨基酸进化树

2.2 生物信息学分析 对 CNX 蛋白进行氨基酸组成及理化性质的分析预测,可知鸡 CNX 蛋白由 601 个氨基酸组成,相对分子质量 68 368.9,理论等电点为 4.41,负电荷氨基酸残基数为 138,正电荷氨基酸残基数为 72,分子式为 $C_{3036}H_{4619}N_{779}O_{981}S_{20}$,原子总数为 9 435,消光系数为 111 840,不稳定系数为 42.05,脂肪系数为 64.59,总平均亲水系数为 -0.877。

蛋白质疏水区域预测显示,鸡 CNX 的 C 端与 N 端具有很高的疏水性,而 C 端的亲水性要强于 N 端,此蛋白具有 22 个疏水区域。跨膜螺旋预测结果显示鸡 CNX 中有 6 个跨膜区域,属于跨膜蛋白。用神经网络算法分析可知鸡 CNX 不存在信号肽。经

二级结构进行预测,鸡 CNX 形成 $\alpha_1(4-21)-\beta_1(71-77)-\beta_2(84-89)-\beta_3(106-109)-\beta_4(123-126)-\alpha_2(129-137)-\beta_5(148-155)-\alpha_3(164-170)-\beta_6(187-191)-\beta_7(201-208)-\beta_8(239-245)-\beta_9(250-254)-\beta_{10}(424-430)-\beta_{11}(436-437)-\beta_{12}(440-441)-\alpha_4(446-464)-\alpha_5(470-480)-\beta_{13}(484-505)-\alpha_6(512-517)-\alpha_7(527-536)-\alpha_8(541-554)-\alpha_9(567-576)-\alpha_{10}(581-587)$ 二级结构。如图 3A,B,鸡 CNX 高级结构预测中,呈现一船扭转式结构,其 601 个氨基酸中,97 个氨基酸可能形成 α 螺旋,85 个氨基酸可能形成 β 折叠,419 个可能形成无规则卷曲。鸡 CNX 蛋白有 510 个 H-键,5 个螺旋,60 个转角。

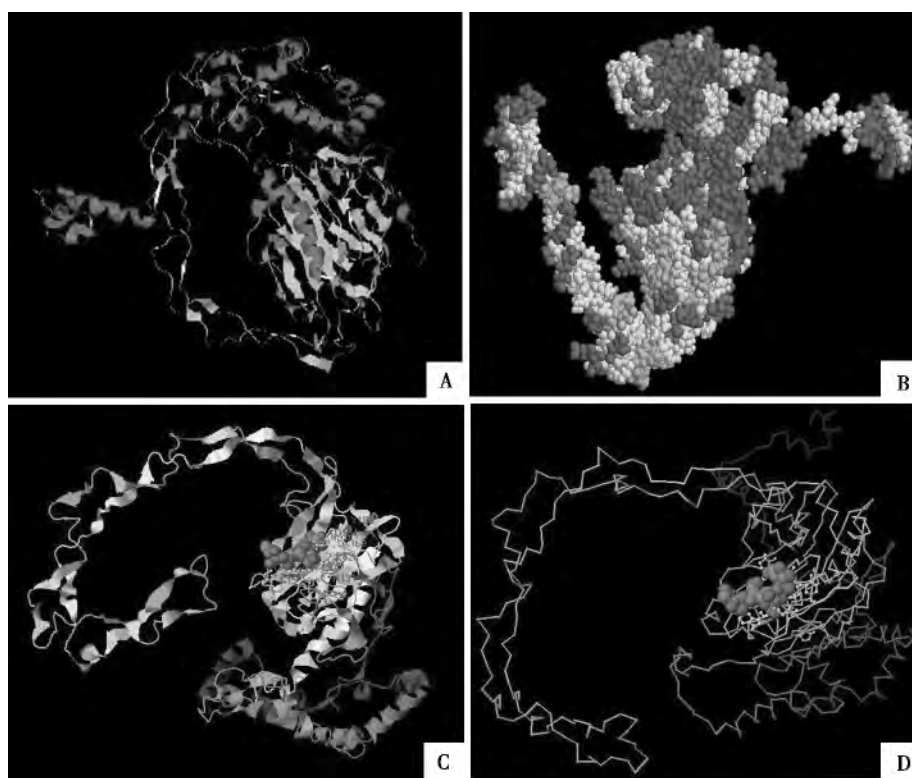


图 3 A. 鸡 CNX 高级结构预测(带状);B. 鸡 CNX 高级结构预测(球状);C. CNX 各结合位点预测(带状);D. CNX 各结合位点预测(棒状)

鸡 CNX 蛋白的功能预测结果表明,该蛋白属于 EC 3.2.1.55,其作用于 α -L-阿拉伯糖苷酶,催化非还原性的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷残基的 α -L-阿拉伯糖苷的终端水解反应,有些 EC 3.2.1.23 和 EC 3.2.1.38 酶也水解 α -L-阿拉伯糖苷,表明 CNX 可能与 EC 3.2.1.23 和 EC 3.2.1.38 酶具有结构功能的相似性。

鸡 CNX 蛋白的空间结合分子预测结果表明

(图 3C,D),CNX 与糖类特异性结合,结合位点残基位置在 131,163,164,165,167,169,184,188,191,195,197,204,428,429,430,CNX 与 CRT 组成 CNX/CRT 循环发挥活性,新生多肽链通过此循环完成折叠和装配过程。

2.3 鸡 CNX 基因的组织表达谱分析 qRT-PCR 结果表明,CNX 基因在鸡 30 个组织中均有表达,但不同组织表达量存在明显的差异(图 4):在回肠、动

脉和腺胃中表达量明显高于其他组织($P < 0.05$), 静脉、脑干、胸肌、卵巢组织中的表达量最低, 十二指肠、坐骨神经、垂体、大脑和卵巢组织中也有较高表达。总体表达顺序为: 回肠 > 动脉 > 腺胃 > 十二指

肠 > 坐骨神经 > 垂体 > 大脑 > 法氏囊 > 翅肌 > 肺脏 > 睾丸 > 肾脏 > 静脉 > 胸肌 > 脑干 > 卵巢 > 嗉囊 > 腿肌 > 直肠 > 脊髓 > 盲肠 > 食道 > 肌胃 > 丘脑 > 胰脏 > 肝脏 > 胸腺 > 脾脏 > 心肌 > 小脑。

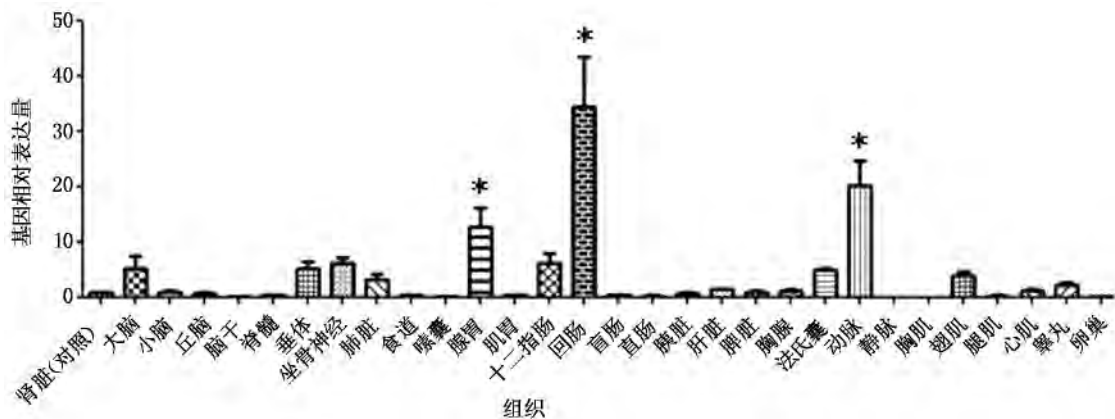


图 4 CNX 基因在鸡各组织中的相对表达量 柱状图中上标 * 表示组织 CNX 表达量之间存在显著差异($P < 0.05$)

3 讨论

CNX 是一种内质网膜结合蛋白, 驻留于内质网^[9]。CNX 具有 Ca^{2+} 依赖性和 ATP 依赖性, 辅助糖蛋白的折叠和装配, 参与内质网的蛋白质质量控制系统、内质网相关的蛋白质降解途径, 缓解内质网应激、细胞的凋亡过程^[10-13]。CNX 调节基质蛋白和识别之间的相互作用的内质网驻留蛋白质折叠工厂的其他组件, 从而引发折叠, 延缓低聚反应^[1,7,14], 阻止降解方面起着重要作用。

CNX 最先是在犬体内发现的, 它参与 MHCI 的折叠和装配^[13], 后来发现, 人类也具有这种蛋白, 根据它的相对分子质量将其命名为 p88 或 IP90。进一步研究发现原核生物、酵母、拟南芥、豌豆、大豆、玉米等物种中也存在, 这说明 CNX 广泛分布于动物、植物和微生物中, 并且在不同物种之间具有结构和序列上的进化保守性^[15]。本研究结果显示, 12 个物种 CNX 基因核苷酸序列中, 鸡与蛇 CNX 基因核苷酸序列相似性最高, 与蛙相似性最低; 鸡与人、猩猩和小鼠等灵长类或哺乳动物的 CNX 基因核苷酸序列相似性也相对较高; 氨基酸序列中, 鸡与猪的同源性最高, 与蛙的同源性最低, 鸡与猩猩、人和小鼠的 CNX 基因氨基酸序列相似性仍相对较高。可见, 核苷酸序列与氨基酸序列相似性分析的结果不同, 造成这些差异的原因有待进一步深入研究。

鸡 CNX 蛋白具有 22 个疏水区域, 属于跨膜蛋

白, 不存在信号肽, CNX 具有 6 个跨膜区域, 酶活性分类为 EC 1.11.1.9, 与 CRT 组成 CNX/CRT 循环发挥活性, 新生多肽链通过此循环完成折叠和装配过程。鸡 CNX 基因结构上的保守性, 与其分子功能有关, CNX/CRT 循环在生物体中发挥着重要作用, 分子结构的保守性和稳定性有利于分子功能的正常发挥^[7-8]。本研究从组织分布和结构功能预测上为进一步研究 CNX 意义重大。

采用 qRT-PCR 研究鸡 CNX 基因的组织表达谱, 结果显示在所检测的鸡组织中均有表达, 由此证明在鸡体内 CNX 基因是一个广泛表达的基因, 这与以往的研究结果一致^[12]。但在鸡体内 CNX mRNA 在回肠、动脉和腺胃组织中表达量很高。

参考文献:

- [1] Schrag J D, Bergeron J J, Li Y, et al. The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding[J]. Mol Cell, 2001, 8(3): 633-644.
- [2] Molinari M, Calanca V, Galli C, et al. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle[J]. Science, 2003, 299(5611): 1397-1400.
- [3] Zhang K, Kaufman R J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 25935-25938.
- [4] Chaudhuri T K, Paul S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches[J]. FEBS J, 2006, 273(7): 1331-1349.

(下转 1313 页)

- [7] Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264. 7 macrophage cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360(2): 346-351.
- [8] Hofbauer L C, Neubauer A, Heufelder A E. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases [J]. Cancer, 2001, 92(3): 460-470.
- [9] Lamothe B, Webster W K, Gopinathan A, et al. TRAF6 ubiquitin ligase is essential for RANKL signaling and osteoclast differentiation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(4): 1044-1049.
- [10] Vincent C, Kogawa M, Findlay D M, et al. The generation of osteoclasts from RAW 264. 7 precursors in defined, serum-free conditions [J]. J Bone Mineral Metabolism, 2009, 27(1): 114-119.
- [11] 李 萍, 蒋 琳, 黄思扬, 等. 中华仓鼠卵巢(CHO) 工程细胞无血清培养的研究 [J]. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(4): 46-50.
- [12] 孙元明, 杨福军, 李雨民. 源于脾干细胞的破骨细胞诱导生成及培养 [J]. 中国地方病学杂志, 2003, 22(2): 101-103.
- [13] 高建军, 周 轶, 顾淑珠, 等. 依降钙素对破骨细胞的作用观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3): 248-252.
- [14] Lee J W, Kobayashi Y, Nakamichi Y, et al. Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(3): 352-361.
- [15] 孟增东, 裴福兴, 沈 彬, 等. 17β -雌二醇对破骨细胞骨架和骨吸收功能影响的实验研究 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2005, 4(2): 94-98.
- [16] 吕 莹, 张德禄, 张 宏, 等. 细胞凋亡检测方法研究进展 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2007, 43(2): 82-87.
- [17] 周 怡, 刘 丽, 张庆鸿. 鼠破骨细胞培养过程中凋亡现象的观察研究 [J]. 口腔医学, 2010, 30(2): 90-92.
- [18] Saltel F, Chabadel A, Bonnelye E, et al. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation [J]. European J Cell Biol, 2008, 87(8): 459-468.

(上接 1308 页)

- [5] Ma Y, Hendershot L M. ER chaperone functions during normal and stress conditions [J]. J Chem Neuroanat, 2004, 28(1/2): 51-65.
- [6] Ou W J, Cameron P H, Thomas D Y, et al. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation [J]. Nature, 1993, 364(6440): 771-776.
- [7] Vassilakos A, Michalak M, Lehrman M A, et al. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin [J]. Biochemistry, 1998, 37(10): 3480-3490.
- [8] Leach M R, Cohen-Doyle M F, Thomas D Y, et al. Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin [J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 29686-29697.
- [9] Corbett E F, Michalak K M, Oikawa K, et al. The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment [J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 27177-27185.
- [10] Wada I, Rindress D, Cameron P H, et al. SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane [J]. J Biol Chem, 1991, 266(29): 19599-19610.
- [11] Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum [J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 1019-1049.
- [12] Takizawa T, Tatematsu C, Watanabe K, et al. Cleavage of calnexin caused by apoptotic stimuli; implication for the regulation of apoptosis [J]. J Biochem, 2004, 136(3): 399-405.
- [13] 马 征. 与 MHC I 类相关的抗原加工和抗原提呈的分子基础 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1996, 12(2): 60-64.
- [14] Thammavongsa V, Mancino L, Raghavan M. Polypeptide substrate recognition by calnexin requires specific conformations of the calnexin protein [J]. J Biol Chem, 2005, 280(39): 33497-33505.
- [15] 张 峰. 内质网分子伴侣 Calnexin 的研究进展 [J]. 生物学通报, 2008, 43(8): 343-347.