

## 拟穴青蟹 GRP78 基因的克隆与应激表达

巩 杰, 叶海辉\*, 于 坤, 黄辉洋, 李少菁

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78 ku, GRP78) 是热休克蛋白 70 家族成员之一, 在调节蛋白质折叠和维持内质网稳态过程中起着分子伴侣作用。采用 RT-PCR、RACE 等技术, 首次从拟穴青蟹获得了 GRP78 的 cDNA 全长序列。该序列全长 2 284 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 962 bp, 编码 653 个氨基酸残基。同源分析显示, 该基因编码的蛋白含有 HSP70 家族的签名序列, C 末端为内质网蛋白滞留信号 KDEL, 与其他物种具有很高相似性。实时荧光定量 PCR 结果表明, GRP78 基因在拟穴青蟹多个组织中均有表达。第一期仔蟹在不同的温度和盐度下暴露 12 h 后, GRP78 基因表达量随环境温度升高而增加; 在高盐 (30) 条件下 GRP78 表达量较高, 进而推测拟穴青蟹 GRP78 参与蛋白质折叠和环境胁迫的应答。

**关键词:** 拟穴青蟹; 葡萄糖调节蛋白 78; 基因克隆; 应激; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs), 又称热应激蛋白, 是广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物的整个生物界, 进化上高度保守、功能上至关重要的一族蛋白<sup>[1-2]</sup>。热休克蛋白 70 (HSP70) 是目前热休克蛋白家族中研究最为深入的一种, 在进化过程中核酸与蛋白序列均高度保守, 并且不同来源的 HSP70 有相似的结构和功能。HSP70 家族作为“分子伴侣”具有重要生物学功能, 能够帮助蛋白进行重新正确折叠、装配和转运; 清除错误折叠、受损或变性蛋白<sup>[3]</sup>。真核生物 HSP70 家族成员主要分为 4 类: 组成型 HSC70 (heat shock cognate70), 为非诱导状况下有着组成性表达; 诱导型 HSP70, 受应激后基因表达量会明显增加; 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein, GRP78), 定位于内质网; 定位于细胞线粒体基质的 HSP70<sup>[4-5]</sup>。

GRP78 又名免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip), 是 HSP70 家族重要的一员, 具有 HSP70 家

族典型的结构<sup>[6]</sup>, 即 N 端 ATP 酶功能域、蛋白酶敏感域、C 端属于可变区的活性调节区域以及 N、C 端之间为相对保守的多肽结合部位<sup>[7]</sup>。已有的研究表明, GRP78 是一种非常典型的应激蛋白, 并可能具有较为广泛的生物学功能<sup>[8]</sup>。在应激反应调节时其基因的转录活性可提高 10~25 倍, 表达量显著增高, 从而维持内质网钙稳态及内环境的稳态<sup>[9]</sup>。另有研究表明, GRP78 能够对细胞外环境因子, 如温度、氧含量的变化和病害感染等的胁迫产生强烈应答<sup>[10-11]</sup>。

到目前为止, GRP78 在甲壳动物中研究甚少, 仅见中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) GRP78 在热休克和免疫应答过程中作用的报道<sup>[12]</sup>。拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 梭子蟹科 (Portunidae), 青蟹属 (*Scylla*), 其肉质细嫩鲜美, 营养丰富, 商品价值高, 且个体大、生长快、适应性较强, 是我国东南沿海重要的海洋经济蟹类之一<sup>[13]</sup>。本研究采用

收稿日期: 2013-06-29 修回日期: 2013-08-28

资助项目: 国家自然科学基金项目 (41076081; No. 31272632); 厦门大学基础创新科研基金 (2011121011)

通信作者: 叶海辉, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

RACE 技术首次得到拟穴青蟹 GRP78 基因全长 cDNA 序列,实时荧光定量 PCR 方法检测其在各个组织和不同环境胁迫下的表达情况。可为拟穴青蟹抗逆生理研究提供科学资料,对其健康养殖具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

拟穴青蟹成体购自厦门市大学路农贸市场,挑选活性好、附肢健全的个体,甲壳长度为 7.2 ~ 8.8 cm,体质量为 250 ~ 420 g,实验室暂养 1 d。

拟穴青蟹仔蟹从天然海区捕捞拟穴青蟹的大眼幼体,在实验室内培养至第一期仔蟹,用于不同胁迫实验处理。

实验主要试剂为 TRIzol<sup>®</sup> Reagent Total RNA Isolation Reagent (Invitrogen 公司); RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司); SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Application Kit (Clontech 公司); DNase I、RNase、LA Taq<sup>®</sup>、dNTPs、pMD19-T、DNA Marker (TaKaRa 公司); E. Z. N. A 胶回收试剂盒 (Omega 公司)。

### 1.2 实验方法

**引物设计** 根据实验室已获得的拟穴青蟹 GRP78 的基因序列片段,设计片段验证引物对该片段进行验证,根据验证片段设计 RACE 特异性引物(表 1),得到该基因全长 cDNA 序列。然后根据得到的全长 cDNA 序列,设计全长验证引物 F2、R2 和荧光定量引物 F3、R3(表 1)。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences

引物 primer	引物序列(5'→3') primer sequence	引物作用 usage
F1	TGTTGTCACGTCCCTGCCTACT	片段引物
R1	GATGTCCTTGCCCTCTTTTCT	fragment primer
H3F	CACCTTTGATGTCTCCTTGCT	3'RACE 特异引物 3'RACE primer
H5R	GTAGGCAGGGACAGTGACAACA	5'RACE 特异引物 5'RACE primer
3'RACE Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	RACE 试剂盒提供外引物
5'RACE Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	3' and 5'RACE outer primer
F2	GTGTCACACAGAACCAACTACA	全长验证引物
R2	ACTTCCATCACAAAACCAATAA	validation primer of full length cDNA
F3	TGTTGTCACGTCCCTGCCTAC	荧光定量引物
R3	GATGTTCTTCTCGCCTTCCTC	real-time RT-PCR primer
<i>β-actin</i> F	GAGCGAGAAATCGTTCGTGAC	<i>β-actin</i> 定量引物
<i>β-actin</i> R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG	<i>β-actin</i> primer

**总 RNA 的抽提和 cDNA 第一链的合成**  
取拟穴青蟹卵巢组织,参照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂使用说明提取总 RNA。以紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及纯度。取 1 μg 总 RNA,参照 Fermentas 公司的 RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明,反转录成 cDNA 模板, -20 °C 保存备用。

**GRP78 基因全长 cDNA 的克隆** 使用片段验证引物 F1、R1,以上述 cDNA 为模板,扩增验证 GRP78 基因片段。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T (TaKaRa 公司) 载体连接,转化到 DH5α 感受态细胞,于含有 AMP 的 LB 平板上培养 14 h,挑取单克隆菌落,接种于含 AMP 的

LB 液体培养基中,37 °C 过夜培养,菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序。该序列经 Blast 后,确定是拟穴青蟹 GRP78 基因。根据设计的 RACE 引物(表 1),用 Clontech 公司的 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Application Kit,以拟穴青蟹卵巢总 RNA 为模板分别扩增该基因 cDNA 的 3' 与 5' 端,扩增产物经克隆、测序后,获得 cDNA 3' 端序列与 5' 端序列,具体步骤参照试剂盒的说明书。拼接获得全长后,通过全长验证引物克隆测序对全长进行验证。

**GRP78 基因 cDNA 全序列分析** 应用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 确定正确的开放阅读框并推

<http://www.sexuebao.cn>

导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的物理参数; SignalP 3.0 server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽; 采用 Clustal X 与 MEGA 软件对序列进行同源性的分析, 并采用邻位相接法 (Neighbor-joining, N-J) 构建系统进化树。

**温度与盐度胁迫** 从天然海区捕获大眼幼体 1 000 只。实验室驯化培养: 高锰酸钾消毒 50 L 养殖桶, 于桶内放养 1 000 只大眼幼体, 桶内添加网片作为遮蔽物, 桶盖半遮。温度为 26 ~ 28 °C, 盐度为 23, 投放足量活的丰年虫, 每天 00:00 和 09:00 两个时间点观察大眼幼体变为仔蟹的情况, 17:00 全量换水一次。

挑选同一时间段变态的第一期仔蟹, 在不同的温度 (14、20、26、32 和 38 °C) 和盐度 (5、10、20、30 和 40) 条件下实验室培养。不同处理的仔蟹养殖于 5 L 的盆内, 盆内放置遮蔽物, 每个盆内培养 20 只仔蟹, 投喂足量的丰年虫配合剪碎的花蛤肉。实验室培养 12 h 后, 每个不同的处理组下取 6 只仔蟹放入冻存管于液氮中冻存, 然后分别提取 3 只仔蟹总 RNA, 另 3 只仔蟹转存于 -80 °C 以防 RNA 提取失败。

**GRP78 基因的表达量分析** 参照 Trizol (Invitrogen 公司) 说明书提取拟穴青蟹各组织 (眼柄神经节、脑神经节、胸神经团、肌肉、心脏、血细胞、肝胰腺、胃、鳃和表皮) 以及不同处理仔蟹的总 RNA, 用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 试剂盒合成一链 cDNA 用于荧光定量表达分析。qRT-PCR 反应体系为 20 μL: 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, cDNA 模板 2 μL, 荧光定量引物各 0.8 μL (10 μmol/L), 6.4 μL 双蒸水。每个样品设置 3 个重复, 用  $\beta$ -actin 基因作内参, 均一化各样品 cDNA 用量的差异, 引物为  $\beta$ -actin F 和  $\beta$ -actin R (表 1)。反应程序为 94 °C 热变性 10 min, 94 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 42 个循环。

**数据处理与分析** 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[14]</sup> 对目的基因的相对表达量进行分析, 以内参基因  $\beta$ -actin 均一化样品。采用 *T*-检验法分析各组数据的差异显著。显著性检验水平  $P < 0.05$  为显著,  $P < 0.01$  为极显著。

## 2 结果

### 2.1 GRP78 全长 cDNA 的克隆和序列分析

通过设计的片段验证引物, 以拟穴青蟹卵巢 cDNA 为模板扩增验证得到 GRP78 片段。基于该片段设计 RACE 引物进行 5' 和 3' 末端扩增, 得到 5' 末端序列和 3' 末端序列, 最后拼接得到一条完整的 cDNA 序列。Blast 比对发现该序列与其他物种的 GRP78 序列同样显示了较高的同源性, 从而确定为拟穴青蟹 GRP78 cDNA 序列。其全长为 2 284 bp, 开放阅读框长度为 1 962 bp, 编码 653 个氨基酸。5' UTR 长度为 121 bp, 3' UTR 长度为 201 bp 并且含有典型的加尾信号 AATAAA 和 poly A 尾 (图 1)。

ProtParam 预测拟穴青蟹 GRP78 由 653 个氨基酸残基组成, 其中带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 113 个, 带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 88 个, 推测分子量约为 72 434.0, 理论等电点 *pI* 为 5.03, 预测其在体外的不稳定性指数 (instability index) 为 28.08, 为较稳定蛋白质。SignalP 3.0 分析拟穴青蟹 GRP78 没有发现信号肽。C 末端 (第 650 ~ 653 位氨基酸) 为内质网蛋白滞留信号 KDEL。

通过 NCBI 的 BlastP 比对分析, 发现 GRP78 存在一个高度保守的区域, 属于 HSP70 超家族, 与其他物种的 GRP78 结构域分析相一致。

### 2.2 GRP78 序列同源性分析

将拟穴青蟹 GRP78 cDNA 序列推导的氨基酸与其他物种的同源蛋白在 Clustal X 中进行多序列比对分析, 结果显示: 拟穴青蟹 GRP78 序列与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾、家蚕 (*Bombyx mori*) 和小白鼠 (*Mus musculus*) 的相似率分别为 93%、91%、86% 和 85%。图 2 是用 Clustal X 对实验所得拟穴青蟹的氨基酸序列与已有的其他一些物种进行对比后, 以 MEGA 软件的邻位相接法 (Neighbor-Joining, NJ) 绘制的系统进化树。系统进化树分为两簇: 一簇为 HSC70 聚集, 一簇为 GRP78 聚集。同时 GRP78 又分为两簇: 无脊椎动物一簇, 脊椎动物为另一簇 (图 2)。

### 2.3 GRP78 基因的表达分析

**GRP78 在各组织中的表达** 依据实验所得拟穴青蟹 GRP78 cDNA 序列设计特异引物

F3、R3,利用 qRT-PCR 技术检测 GRP78 基因在拟穴青蟹不同组织中的表达情况。结果显示,GRP78 在所检测组织(眼柄神经节、脑神经节、胸神经团、肌肉、心脏、血细胞、肝胰腺、胃、鳃和表皮)中均有表达,且在胃中表达量较高(图 3)。

```

GTGTCACACAGAACCAACTACAAGAACAGTG 31
TGAGACAGTCTCCATCCAGTATTGTGTACAGAAATACATATTTATAACCATTACTGAGTCCAGTCAACGCTCCTGAAGTGTATTATAAA 121
ATGAGGTGTGGGTAGCCTTAGGCCTAATGGCCACTGTGGCCTTGTGGTACCAGCAAGGAGTCAAAGAAGGAAGACGTAGGGACTGTC 211
1 M R C W V A L G L M A T V A L L V T A K E S K K E D V G T V
ATCGGCATTGACCTTGGCACCATTATTCATGTGTGGGTGTTCAGAATGGCAGAGTTGAGATCATTGCAAACGACCAGGTAACAGG 301
31 I G I D L G T T Y S C V G V F K N G R V E I I A N D Q G N R
ATCACTCCCTCCTACGTGGCATTACCCGCGATGGAGAGCGACTCATTGGTGACTCTGCCAAGAACCAGCTCACCACCAACCTGAGAAC 391
61 I T P S Y V A F T A D G E R L I G D S A K N Q L T T N P E N
ACCATCTTGTATGCCAAGCGCTCATCGGTAGGGAATGGACTGATAAGTCTGTCCAACATGACATTCAGTTCTTCCCTTCAAGGTATC 481
91 T I F D A K R L I G R E W T D K S V Q H D I Q F F P F K V I
AAGAAGAATGAAAAGCCCATATCCAGGTCTCCACTTACAGGGAGAGAAGGTGTTGCTGCAGAAGAGATCTCTGCCATGGTGTGGA 571
121 K K N E K P H I Q V S T S Q G E K V F A A E E I S A M V L G
AAGATGAAGGAAGTGGCTGAGGCATATCTGGAAAGACTGTCACTCATGTGTGCTACTGTCCTGCTACTCAACGACGCCAGCCAGGA 661
151 K M K E V A E A Y L G K T V T H A V V T V P A Y F N D A Q R
CAGGCAACAAAGGATGCTGGCACAATCGCTGGATTGACAGTCATGAGGATCATCAATGAACCTACAGCTGCTGCCATTGCCTATGGTATT 751
181 Q A T K D A G T I A G L T V M R I I N E P T A A A I A Y G I
GACAAGAAGGAAGGCGAGAAGAATCCTTGTGTTGATCTTGGTGGTGGCACCTTGTATGTCCTTGTCTACTATTGACTCTGGTGTG 841
211 D K K E G E K N I L V F D L G G G T F D V S L L T I D S G V
TTTGAAGTGGTGGCCACAAATGGTGACACTCATCTTGGTGGTGGAGACTTTGACCAGCGTGTATGGACCCTCATCAAGCTGTACAAG 931
241 F E V V A T N G D T H L G G E D F D Q R V M D H F I K L Y K
AAAAAGAAGGGCAAGGACATCAGAAAGACAACCGTCTTTCAGAAAGTCCGCTGGAAGTTGAGAAGCAAGAGGTCCTGTCTGCC 1021
271 K K K G K D I R K D N R A V Q K L R R E V E K A K R S L S A
AGCCACCAGGTGAGGATTGAAATGAAATCCTTCTTTGAGGGAGAGGACTTCTCAGAGACTGACCCGAGCCAAAGTTGAGGAGTTGAAT 1111
301 S H Q V R I E I E S F F E G E D F S E T L T R A K F E E L N
ATGGATCTTTCAGGTCTACAATGAAGCCAGTGCAGAAGGTGCTTGGAGACTCTGACCTGCAGAAGAAGAAATTGATGAGATCGTGTG 1201
331 M D L F R S T M K P V Q K V L E D S D L Q K K E I D E I V L
GTGGTGGTCTACTCGTATTCCCAAGATCCAGCAGCTGGTAAAGGAATCTTCAATGGCAAGGACCATCCCGAGGTATCAACCCAGAT 1291
361 V G G S T R I P K I Q Q L V K E F F N G K E P S R G I N P D
GAGGCTGTGCTTATGGTGTCTGCTCCAGGCTGGTGTGCTGTCTGGTGAAGTACACCAATGACCTTGTGCTGTGGATGTCAACCT 1381
391 E A V A Y G A A V Q A G V L S G E D D T N D L V L L D V N P
CTAACTCTGGTATCGAGACTGTGGTGGAGTCATGACCAAGCTCATTGCCGTAACACTGTCATCCCCACGAAGAAGTCCCAGATCTTC 1471
421 L T L G I E T V G G V M T K L I A R N T V I P T K K S Q I F
TCCACTGCCTCTGACAACCAGCACACTGTACCAATCCAGGTGTTGAGGGTGAACGACCTATGACCAAGGACAACCACATCCTCGGAAAG 1561
451 S T A S D N Q H T V T I Q V F E G E R P M T K D N H I L G K
TTTGACCTAACTGGCATTCCCTGCTCCTCGTGGTGTGCCAGATGAAGTACCTTTGAAATGATGCGAATGGTATCCTCCAGGTT 1651
481 F D L T G I P P A P R G V P Q I E V T F E I D A N G I L Q V
TCTGCTGAAGACAAGGGCACTGGCAACAAGGAAAAGATTGTGATCACAACGACAGAACCCGCTTACCCAGAGGACATTGAGCGCATG 1741
511 S A E D K G T G N K E K I V I T N D Q N R L T P E D I E R M
ATCAAGGATGCTGAAGTGTGCTGATGAGGACAAGAAGCTAAAGAGCGTGTAGAGTCCAGGAATGAGCTTGATGCTATGCCTACAGT 1831
541 I K D A E V F A D E D K K L K E R V E S R N E L E S Y A Y S
CTTAAGAACCAGGTGAACGATAAGGAAAAGCTCGGGGCAAGCTTACTGACGAGGATAAGGAAAAGATCGAGGAGGCCATTGATGAGAAG 1921
571 L K N Q V N D K E K L G A K L T D E D K E K I E E A I D E K
ATCAAGTGGCTGGAGGACAACCCTGATTCTGAGGAGAAGATTACAAGCTCAGAAGAAGAACTGGAGGACATTGTGCAGCAATAATT 2011
601 I K W L E D N P D S E A E D Y K A Q K K E L E D I V Q P I I
GCCAAGCTCTACCAGGTGCTGGTGGTACTCCTCAACTGGTGAAGAGGATTGTAAAGGATGAGTGTAAAGTTATTGTTATGAGT 2101
631 A K L Y Q G A G G T P P T G E E E F D K D E L *
AACTTATGGTTTTGTGATGGAAGTACATTTTCTCATGCTCATCTTTAGGACATATTCAGCAGCTGCTCATCTCATGGTTGAATGAAAG 2191
ATGTTACACTTTTAAAGTATGTATGCACAAGTCCATCCAGGTGTGTGAACGGATGATCTGTTTATAATAAATGATGCTAGAAAAA 2281
AAA 2284

```

图 1 拟穴青蟹 GRP78 cDNA 及其推导的氨基酸序列

\* 代表终止密码子;方框所示为 3'UTR 中的加尾信号;灰色背景的序列为 HSP70 特征序列;下划线部分内质网滞留信号

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of GRP78 from *S. paramamosain*

The stop codon is marked by an asterisk; the polyadenylation signal(AATAAA) is enclosed by a black rectangle; shadow denotes signature sequences of HSP70; underline indicates the endoplasmic reticulum retention sequence

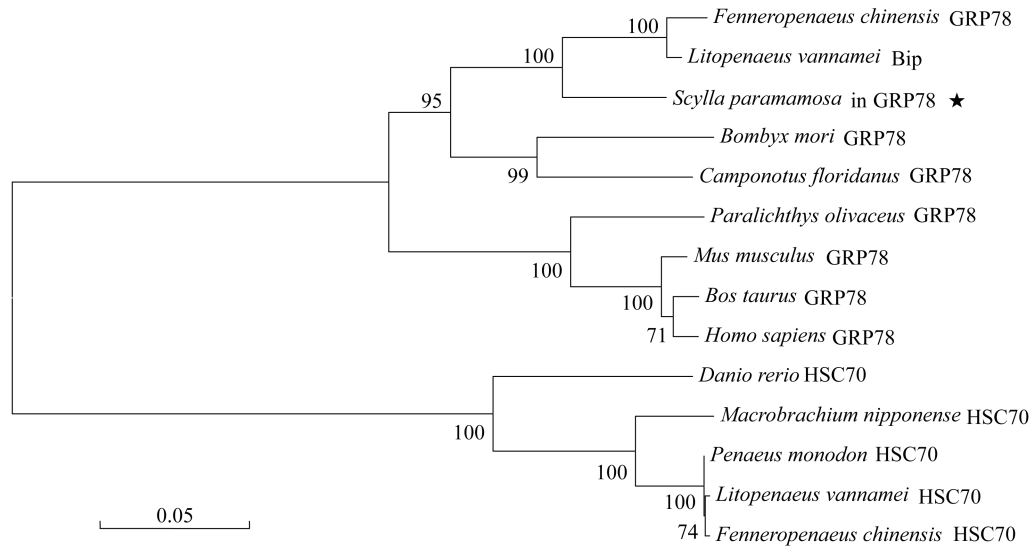


图 2 基于邻接法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on Neighbor-joining method

中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis* GRP78; ABM92447. 1; 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* Bip; AFQ62791. 1; 家蚕 *Bombyx mori* GRP78; AGA84579. 1; 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* GRP78; ABG56392. 1; 黄牛 *Bos taurus* GRP78; NP\_001068616. 1; 小白鼠 *Mus musculus* GRP78; NP\_071705. 3; 人 *Homo sapiens* GRP78; AAA52614. 1; 佛罗里达弓背蚊 *Camponotus floridanus* GRP78; EFN61604. 1; 拟穴青蟹 *Scylla paramamosain* GRP78; 斑马鱼 *Danio rerio* HSC70; AAB03704. 1; 斑节对虾 *Penaeus monodon* HSC70; ABR67686. 1; 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* HSC70; ABP01681. 1; 中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis* HSC70; AAW71958. 1; 日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* HSC70; ABG45886. 1

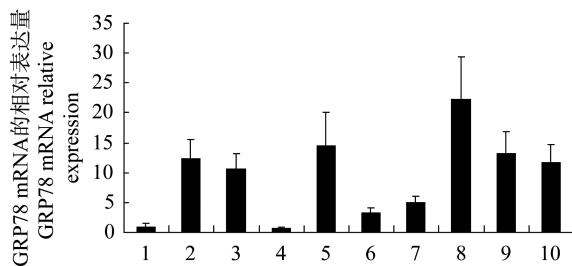


图 3 拟穴青蟹 GRP78 基因在成体组织中的表达

1. 眼柄神经节; 2. 脑神经节; 3. 胸神经团; 4. 肌肉; 5. 心脏; 6. 血细胞; 7. 肝胰腺; 8. 胃; 9. 鳃; 10. 表皮

Fig. 3 Expression of GRP78 mRNA in adult tissues of *S. paramamosain*

1. eyestalk ganglion; 2. brain; 3. thoracic ganglion; 4. muscle; 5. heart; 6. hemocyte; 7. hepatopancreas; 8. stomach; 9. gill; 10. epidermis

GRP78 在温度和盐度胁迫后的表达 为了探究温度和盐度对拟穴青蟹 GRP78 基因表达的影响,对拟穴青蟹仔蟹在不同温度和盐度处理 12 h 后的 mRNA 表达水平进行了测定,实时荧光 PCR 结果表明:相对于 26 °C 条件下,在 32 °C 温度处理下仔蟹体内 GRP78 基因表达量明显被诱导

( $P < 0.05$ ),在 38 °C 温度处理下仔蟹体内 GRP78 基因表达量继续增加并且差异极其显著 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。

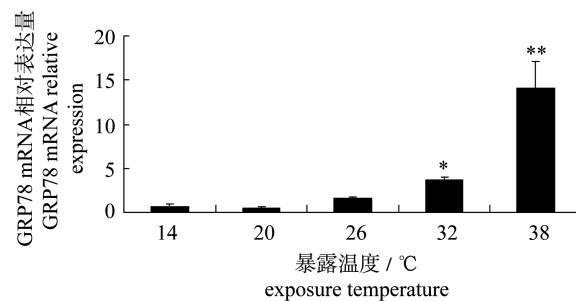


图 4 不同温度下拟穴青蟹仔蟹 GRP78 基因相对表达量

Fig. 4 Changes of GRP78 mRNA transcripts in *S. paramamosain* juveniles subjected to different temperature

\* :  $P < 0.05$ ; \*\* :  $P < 0.01$

在不同盐度条件处理下,当仔蟹暴露于盐度 30 的海水中,GRP78 基因显著高表达 ( $P < 0.05$ ),但是在盐度 40 时表达量有所下降(图 5)。

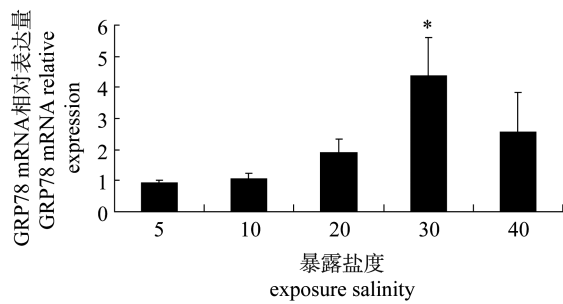


图5 不同盐度下拟穴青蟹仔蟹 GRP78 基因的相对表达量

Fig 5 Changes of GRP78 mRNA transcripts in *S. paramamosain* juveniles subjected to different salinities

\* :  $P < 0.05$ ; \*\* :  $P < 0.01$

### 3 讨论

迄今甲壳动物 GRP78 基因克隆的研究尚少。本研究通过 RACE 技术获得了拟穴青蟹 GRP78 cDNA 序列,全长为 2 284 bp,包括 1 962 bp 的 ORF,编码 653 个氨基酸。首次在蟹类中获得 GRP78 cDNA 序列。序列分析发现,GRP78 基因的氨基酸序列在不同物种间具有较高的同源性,存在 IDLGTTYS、VFDLGGGTFDVSLL 和 IVLVGGSTRIPKIQQ 3 个典型的 HSP70 家族的信号序列。在氨基酸序列的 C 末端存在 KDEL 这一内质网蛋白滞留信号<sup>[12]</sup>。内质网能够通过 KDEL 受体将带有 KDEL 信号可溶性分子伴侣蛋白不断地聚集到内质网内部<sup>[15]</sup>。GRP78 在结构和功能上的高度保守性反映它可能具有非常重要的生物学功能。从系统进化树上可以看出虽然 HSC70 和 GRP78 同属于 HSP70 家族,但是功能上它们却存在明显的不同。

本研究利用 qRT-PCR 技术对拟穴青蟹不同器官中的 GRP78 基因表达进行了定量分析,发现 GRP78 在所检测的组织中均有表达。内质网腔内有大量可溶性分子伴侣和折叠酶,GRP78 通过其多肽结合域和 ATP 酶功能域之间协同作用,辅助内质网中新生肽形成正确构象,在内质网腔内蛋白合成质控过程中发挥重要作用<sup>[7,16]</sup>。在大部分组织都有检测到 GRP78 基因的表达,表明各组织中有较多的 GRP78 蛋白参与了新合成蛋白的折叠过程<sup>[17]</sup>。在胃中表达相对较高可能说明胃作为一个消化器官需要合成大量消化酶,这些酶类的合成需要较多的伴侣蛋白辅助,因此 GRP78 基因具有较高的表达。

GRP78 蛋白质的 C 端具有 KDEL 回收信号序列,是非常典型的内质网滞留蛋白,并可能对内质网的胁迫产生强烈的应答。热休克是内质网的主要胁迫之一,能引起新生肽的错误折叠<sup>[18]</sup>。在 35 °C 条件下时,中国明对虾体内 GRP78 基因能够被迅速诱导表达<sup>[12]</sup>。本研究中当拟穴青蟹仔蟹在 32 °C 和 38 °C 温度条件下,体内的 GRP78 基因也被诱导高表达,表明内质网中的 GRP78 在应对高温环境胁迫中发挥着作用。研究发现热休克诱导 GRP78 基因的表达上调可能是由于热休克调节因子(HSF)能够以磷酸化形式结合 5'UTR 中 nGAAn 热休克元件(HSE),促使 HSPs 的高水平表达<sup>[19]</sup>。酵母 GRP78 基因中有 2 个 HSE,将酵母进行高温培养,其 GRP78 基因表达量明显增高<sup>[20]</sup>。与酵母不同,人的 GRP78 基因缺乏 HSE,所以对热休克无反应<sup>[1]</sup>。本研究中拟穴青蟹 GRP78 也存在多个 HSE,因此高温胁迫时能够上调 GRP78 表达。

在水生生物中,渗透压胁迫是诱导 HSP70 家族合成的一个重要因素<sup>[21]</sup>。高渗透压能够引起生物体内离子条件的改变,由核糖体合成的线性蛋白质对离子浓度的变化非常敏感,这种改变能够导致蛋白质变性或者是影响新生蛋白质的正确折叠<sup>[22]</sup>。我们已发现拟穴青蟹成体在高盐(30)处理后体内的 HSP70 基因表达量明显升高<sup>[23]</sup>。本研究发现拟穴青蟹仔蟹在盐度 30 时 GRP78 基因表达量显著高于其他低盐组。这种差异可能是由于在高渗透压下仔蟹体内初生蛋白的折叠受到影响,因此体内需要产生 GRP78 这类分子伴侣来应对这一变化,从而保证新生肽能够正确折叠。

当环境因子变化超过生物本身正常生理承受范围时,生物会通过相关基因的上调或下调来保护自身避免有害影响。Chen 等<sup>[24]</sup>发现一定的温度压力能够诱导鲍 HSP70 基因的表达,但是当温度过高时 HSP70 的表达反而被抑制。本研究中拟穴青蟹仔蟹在盐度 40 条件下 GRP78 表达量被抑制,说明这一盐度已经不再是拟穴青蟹正常生长的适合盐度,GRP78 基因的低表达可能参与这一自我保护过程。

### 参考文献:

- [1] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology [J]. Pharmacol and Therapeutics, 1998, 80 (2):

- 183 – 201.
- [ 2 ] Sørensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [ J ]. *Ecology Letters*, 2003, 6 ( 11 ): 1025 – 1037.
- [ 3 ] Hendrick J P, Hartl F. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins [ J ]. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, 62; 349 – 384.
- [ 4 ] Hartl F U, Neupert W. Protein sorting to mitochondria; Evolutionary conservation of folding and assembly [ J ]. *Science*, 1990, 247: 930 – 938.
- [ 5 ] Kregel K C. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance [ J ]. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 92: 2177 – 2186.
- [ 6 ] 吴初新, 刘毅, 马梅生, 等. 热休克、Poly I:C 上调草鱼 GRP78 基因表达 [ J ]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(6): 814 – 818.
- [ 7 ] 吴逸园, 杨业鹏, 李载权. 葡萄糖调节蛋白 78 研究进展 [ J ]. *生理科学进展*, 2009, 40(2): 135 – 141.
- [ 8 ] 张莹, 孙黎光. GRP78 的研究进展 [ J ]. *国际病理科学与临床杂志*, 2005, 25(3): 251 – 253.
- [ 9 ] Yang G H, Li S, Pestka J J. Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/Bip by vomitoxin ( Deoxynivalenol ) [ J ]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 162(3): 207 – 217.
- [ 10 ] Melnick J, Dul J L, Argon Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum [ J ]. *Nature*, 1994, 370: 373 – 375.
- [ 11 ] Qian Y C, Zheng Y, Ramos K S, Tiffany-Castiglioni E. GRP78 compartmentalized redistribution in Pb-treated Glia; Role of GRP78 in lead-induced oxidative stress [ J ]. *Neurotoxicology*, 2005, 26 ( 2 ): 267 – 275.
- [ 12 ] Luan W, Li F H, Zhang J Q, *et al.* Cloning and expression of glucose regulated protein 78 ( GRP78 ) in *Fenneropenaeus chinensis* [ J ]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36: 289 – 298.
- [ 13 ] 林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成 [ J ]. *水产学报*, 2007, 31 ( 2 ): 211 – 219
- [ 14 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 ( T ) ( -Delta Delta C ) method [ J ]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [ 15 ] Majoul I, Sohn K, Wieland F T, *et al.* KDEL receptor ( Erd2p ) -mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p [ J ]. *Journal of Cell Biology*, 1998, 143: 601 – 612.
- [ 16 ] Little E, Ramakrishnan M, Roy B, *et al.* The glucose regulated proteins ( GRP78 and GRP94 ): Functions, gene regulation, and applications [ J ]. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*, 1994, 4: 1 – 18.
- [ 17 ] Dhabhi J M, Mote P L, Tillman J B, *et al.* Dietary energy tissue-specifically regulates endoplasmic reticulum chaperone gene expression in the liver of mice [ J ]. *Journal of Nutrition*, 1997, 127 ( 9 ): 1758 – 1764.
- [ 18 ] Kaufman R J, Scheuner D, Schröder M, *et al.* The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation [ J ]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(6): 411 – 421.
- [ 19 ] Sun S W, Chung M C, Lin T Y. The structure and expression of an hsc70 gene from *Lycopersicon esculentum* [ J ]. *Gene*, 1996, 170(2): 237 – 241.
- [ 20 ] Nicholson R C, Williams D B, Moran L A. An essential member of the HSP70 gene family of *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to immunoglobulin heavy chain binding protein [ J ]. *Proceeding of National Academy Sciences of USA*, 1990, 87(3): 1159 – 1163.
- [ 21 ] Yokoyama S, Koshio S, Takakura N, *et al.* Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides* [ J ]. *Aquaculture*, 2006, 255: 507 – 513.
- [ 22 ] Spees J L, Chang S A, Snyder M J, *et al.* Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus* [ J ]. *Biological Bulletin*, 2002, 203: 331 – 337.
- [ 23 ] Yang Y N, Ye H H, Huang H Y, *et al.* Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress [ J ]. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18: 475 – 482.
- [ 24 ] Cheng P Z, Liu X, Zhang G F, *et al.* Heat-shock protein70 gene expression in four hatchery Pacific Abalone *Haliotis discus hannai* Ino populations using for marker-assisted selection [ J ]. *Aquaculture Research*, 2006, 37: 1290 – 1296.

## Cloning and stress expression analysis of glucose regulated protein 78 ku (GRP78) in mud crab (*Scylla paramamosain*)

GONG Jie, YE Haihui\*, YU Kun, HUANG Huiyang, LI Shaojing  
(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Glucose regulated protein 78 ku (GRP78) was one member of heat shock protein 70 (HSP70) family. As a molecular chaperone, GRP78 plays important roles in regulating the protein folding and maintaining the stability of endoplasmic reticulum. In this study, we first cloned the full-length cDNA sequence of GRP78 from mud crab, *Scylla paramamosain* using RT-PCR and RACE. The full-length of GRP78 cDNA is 2 284 bp with 1 962 bp open reading frame encoding 653 amino acids. The homologous analysis indicated that the deduced amino acids contained the signature sequences of HSP70 and the endoplasmic reticulum retention sequence in the C-terminal domain. The deduced amino acid sequence shared high identity with previously reported GRP78s. RT-PCR indicated that GRP78 was expressed in various tissues. When *S. paramamosain* juveniles exposed to different temperatures and salinities after 12 hours, the expression of GRP78 gene increased with the rise of environmental temperature and a high expression of GRP78 was detected in high salinity (30). So we infer that GRP78 in *S. paramamosain* might participate in protein folding and the response to environmental stress.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; glucose regulated protein 78 ku (GRP78); gene cloning; stress; real-time PCR

**Corresponding author:** YE Haihui. E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn