

鲫葡萄糖调节蛋白78基因部分序列的克隆、鉴定及功能预测*

刘小花, 赵元茗, 鄢彦杰, 张金叶

(重庆师范大学 生命科学学院 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】分析和预测鲫(*Carassius auratus*)葡萄糖调节蛋白78(Glucose regulated protein 78, GRP78)的功能,为研究GRP78在鱼类受细胞外刺激过程中的作用机制奠定基础。【方法】通过分子克隆技术获得鲫GRP78基因的部分序列,并利用生物信息学方法分析了该基因片段编码的蛋白质序列的二级结构、亲水性、可塑性、表面可及性和抗原表位。【结果】获得了长度为617 bp的鲫GRP78基因片段序列,共编码113个氨基酸。这些氨基酸所构成序列的相对分子质量约为1.3 kDa,等电点为5.82,无信号肽;可塑性区域位于第7~10位、第18~21位、第28~42位、第51~62位、第68~78位和第94~109位氨基酸残基;表面可及性区域位于第29~30位、第38~43位、第50~65位、第68~79位、第82~86位、第97~99位、第102~104位和第106~111位氨基酸残基;有1个B细胞抗原表位区域,位于第28~45位氨基酸残基。【结论】所获的鲫GRP78序列中含有ATPase保守结构域区段,该区段定位于内质网,具有较强亲水性。

关键词: 鲫;GRP78基因;生物信息学分析

中图分类号: Q958.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)02-0018-06

葡萄糖调节蛋白78(Glucose regulated protein 78, GRP78)又称免疫球蛋白重链结合蛋白(Immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),隶属HSP70家族,于20世纪70年代后期与GRP94和GRP58作为葡萄糖饥饿诱导的细胞蛋白质被同时发现^[1]。GRP78含有位于肽链N端的ATP酶结构域(ATP binding domain)和C端的肽结合结构域(Peptide substrate binding domain)。由于GRP78在蛋白质折叠、装配和运输中的多种功能,因此,它是内质网(Endoplasmic reticulum, ER)的重要分子伴侣,并被认为是内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS)的标志性蛋白质^[2]。GRP78对于降解不稳定和错误折叠的蛋白质以及调节内质网跨膜信号传感器的活性也必不可少^[3]。GRP78基因不仅在内质网中表达,而且偶尔在细胞表面表达^[4-6]。研究表明:GRP78在细胞毒性、细胞凋亡、衰老过程和年龄相关疾病中也具有自身独特的功能^[7-8];同时该蛋白还参与肿瘤的发生形成并起着重要的作用^[9-10];另外该蛋白还可以与重金属形成复合物,表明它在防止重金属毒性方面也有潜在的作用^[11]。

作为一类变温动物,鱼类对细胞外刺激如水温、重金属、氧、渗透压、疾病等更为敏感。这些刺激会影响鱼的分布和身体状况,因此,对于鱼类应激蛋白的研究非常重要^[12]。目前已有一些鱼类如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, GenBank 登录号: AB196459)、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*, GenBank 登录号: DQ662232)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*, GenBank 登录号: FJ436356)的GRP78基因被人们研究^[13-14],结果发现这些鱼类在热休克、冷胁迫或重金属离子(如Pb²⁺, Hg²⁺和Cd²⁺)胁迫下,GRP78含量和GRP78基因的mRNA表达增加。此外,有研究者基于嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染南亚野鲮(*Labeo rohita*)过程对热休克蛋白基因(7种HSP基因)表达进行分析,发现该鱼肝脏中GRP78基因的表达高于其他组织^[15]。以上结果表明,GRP78不仅有助于保护细胞免受热或冷极端的影响,而且在一定程度上保护细胞免受重金属刺激,并表明它在免疫调节过程中有重要的作用^[16-18]。相比之下,作为中国重要经济鱼类的鲫(*Carassius auratus*)GRP78基因相关研究还未见报道。为此,本研究对鲫GRP78基因的部分序列进行了克隆、鉴定及功能预测,旨在为进一步研

* 收稿日期:2018-07-09 修回日期:2019-02-12 网络出版时间:2019-03-15 07:00

资助项目:国家自然科学基金(No. 31672280; No. 31471980; No. 31601845);重庆市基础与前沿研究项目(No. cstc2014jcyjA00006);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ1400515)

第一作者简介:刘小花,女,研究方向为鱼类寄生虫学, E-mail: 1367889115@qq.com;通信作者:张金叶,女,副教授,博士, E-mail: yjz0916@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190315.0057.022.html>

究该基因在鲫遭遇粘孢子虫(*Myxosporea*)感染后所发挥的功能提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

用于实验的成年鲫采自重庆市沙坪坝区虎溪镇养殖场。DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit、胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 和质粒提取试剂盒 E. Z. N. A Plasmid Mini Kit I 购自 QIAGEN 公司;pMD 19-T、rTaq 聚合酶、dNTPs 和 DL5000 Marker 购自 Takara 公司。

1.2 基因组 DNA 的提取

鲫基因组 DNA 的提取采用 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒,严格遵守试剂盒操作手册,并进行电泳检测和浓度测定;提取到的 DNA 于-20 ℃保存备用。

1.3 GRP78 基因片段的克隆和测序

以提取到的鲫 DNA 做为模板来扩增 GRP78 基因片段。用于扩增的引物有:Myxohsp1f(5'-ACTGCT-GCCGCCATTGCT-3')和 Myxohsp1r(5'-ATACGAGTGGATCCACC-3'),Kth70A1f(5'-GGTTTTGACAAGAAAGAT-GG-3')和 Kth70A1r(5'-CAATTTGCTATCGTCGAG-3')^[19]。PCR 反应体系包括:10×PCR Buffer 5 μL,3 mmol·L⁻¹的 MgCl₂ 4 μL,0.2 mmol·L⁻¹的 dNTPs 4 μL,上述引物各 1.5 μL,模板 DNA 3 μL,2.5 U 的 rTaq 酶 0.2 μL,最后灭菌双蒸水补足至 50 μL。反应程序为:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,54 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s 过程循环 30 次;72 ℃延伸 10 min。将 3 μL PCR 产物进行电泳检测,纯化采用 Gel Extraction Kit 试剂盒,纯化后的 PCR 产物插入 pMD19-T 载体,菌液送上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

利用 BioEdit 软件将获得的鲫 GRP78 基因片段序列进行拼接并翻译成氨基酸序列。利用在线软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)预测该片段的内含子。利用 GenBank 选取黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*, GenBank 登录号:KM114873)、斑马鱼(*Danio rerio*, GenBank 登录号:Q6P3L3)和人(*Homo sapiens*, GenBank 登录号:M19645)的 GRP78 氨基酸序列,随后利用 Clustalx 1.83 对上述物种的氨基酸序列进行多重比对。参照从 GenBank 选取的 3 个物种的 ATP 酶结构域^[17],从而得到鲫 GRP78 氨基酸序列的 ATP 酶结构域。利用 DNA-Star 软件中的 Protean 程序对 GRP78 的二级结构和抗原表位进行分析和预测。GRP78 的理化性质预测、蛋白亲/疏水性和信号肽分析所用软件和方法参照文献^[20];该蛋白的亚细胞定位分析所用软件和方法参照文献^[21]。

2 结果

2.1 GRP78 基因片段的特征分析

本研究获得的鲫 GRP78 基因片段长 617 bp,目前该序列已提交到 GenBank,登录号为 MH559338。BioEdit 分析表明该序列中 AT 碱基比为 48.95%,GC 碱基比为 51.05%。通过在线软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)对其中的内含子和外显子进行分析,发现该序列含有 1 个外显子和 2 个内含子,符合 GT-AG 规则;外显子长 341 bp,编码 113 个氨基酸(图 1)。

NCBI 比对显示,该氨基酸序列与布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*, GenBank 登录号:XP006789210)、南亚野鲮(GenBank 登录号:AIH80324)和安水金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis*, GenBank 登录号:XP016338832)的 GRP78 最为相似,相似度分别为 98%,99%和 99%,证实本研究克隆所得的 DNA 片段确为鲫 GRP78 基因片段。与黄颡鱼、斑马鱼和人的 GRP78 氨基酸序列进行多重对比后可知,鲫 GRP78 序列具有 ATPase 结构域,但缺少 C 端的肽结合结构域(图 2)。

鲫 GRP78 的相对分子质量约为 1.3 kDa,等电点为 5.82;该蛋白由 17 种氨基酸组成,其中 Glu 比例最高占 10.6%,Tyr 比例最低均占 0.9%(表 1),带负电荷的残基(Asp 和 Glu)总个数为 21,带正电的残基(Arg 和 Lys)总个数

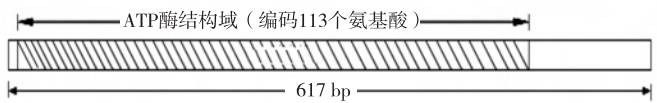


图 1 鲫 GRP78 蛋白片段序列结构示意图

Fig. 1 The schematic diagram of GRP78 fragment in *C. auratus*

为 18;GRP78 的不稳定指数(II)为 34.02。

ExPaSy 和 Bioedit 分析结果显示,鲫 GRP78 具有典型的亲水区,总平均亲水性为-0.521,表明该蛋白为亲水性蛋白(图 3)。SignalP 分析结果显示,GRP78 的 C、Y 和 S 值分别为 0.146,0.137 和 0.170,三者平均值为 0.134,表明该蛋白不存在信号肽(封二彩图 4)。ProtComp 亚细胞定位预测结果显示,鲫 GRP78 定位在内质网。

2.2 GRP78 二级结构预测结果

通过 DNASTar 软件中 Protean 模块的 Chou-Fasman 法和 Gamier-Robson 法^[22-23]对鲫 GRP78 二级结构进行分析。结果显示,鲫 GRP78 的 α -螺旋结构较多,主要位于第 42~55 位和第 60~113 位氨基酸残基; β -折叠位于第 1~5 位和第 12~15 位氨基酸残基;转角位于第 7~8 位、第 18~21 位、第 29~41 位和第 56~59 位氨基酸残基;无规则卷曲位于第 9~11 位、第 20~21 位和第 31~36 位氨基酸残基(封二彩图 5)。

表 1 鲫 GRP78 的氨基酸组成

Tab. 1 Composition of amina acids of GRP78 in *C. auratus*

氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例
Ala(A)	7	6.2%	Gly(G)	9	8.0%	Phe(F)	9	8.0%
Arg(R)	8	7.1%	His(H)	4	3.5%	Ser(S)	4	3.5%
Asn(N)	3	2.7%	Ile(I)	5	4.4%	Thr(T)	7	6.2%
Asp(D)	9	8.0%	Leu(L)	10	8.8%	Tyr(Y)	1	0.9%
Gln(Q)	4	3.5%	Lys(K)	10	8.8%	Val(V)	9	8.0%
Glu(E)	12	10.6%	Met(M)	2	1.8%			

2.3 GRP78 亲水性、可塑性、表面可及性及抗原性预测结果

利用 Kyte-Doolittle 方法^[24]分析鲫 GRP78 的亲水性,结果显示鲫 GRP78 存在亲水性区域,这些区域主要位于第 28~45 位、第 48~89 位和第 93~113 位氨基酸残基(图 6)。利用 Karplus-Schulz 方法^[25]分析鲫 GRP78 的可塑性,结果显示其中含有较多的柔韧性区域,主要位于第 7~10 位、第 18~21 位、第 28~42 位、第 51~62 位、第 68~78 位和 94~109 位氨基酸残基。采用 Jameson-wolf 方法^[26]对鲫 GRP78 进行分析,结果显示其中含有的抗原性区域主要位于第 6~10 位、第 18~22 位、第 29~44 位、第 50~81 位、第 84~90 位和第 94~113 位氨基酸残基(封二彩图 5)。采用 Plot Emini 方法^[27]对鲫 GRP78 进行分析,发现其中呈现在表面可能性较大的区域主要是第 29~30 位、第 38~43 位、第 50~65 位、第 68~79 位、第 82~86 位、第 97~99 位、第 102~104 位和 106~111 位氨基酸残基。

2.4 GRP78B 细胞抗原表位的预测分析

综合鲫 GRP78 的二级结构的转角区和无规则卷曲区、蛋白质亲水性、可塑性、抗原性及表面可及性的分析结果(封二彩图 5,图 6),可以得出鲫 GRP78 的抗原表位主要位于 28~45 氨基酸残基,此部分氨基酸序列为

<i>C. auratus</i>	1	ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQVMHEHFIKLYKKKTGK	57
<i>P. fulvidraco</i>	218	ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQVMHDFIKLYKKKTGK	274
<i>D. rerio</i>	218	ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQVMHEHFIKLYKKKTGK	274
<i>H. sapiens</i>	220	ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQVMHEHFIKLYKKKTGK	276
<i>C. auratus</i>	58	DVRKDHRAVQKLRREVEKAKRAISAQHOARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM	113
<i>P. fulvidraco</i>	275	DVRKDSRAVQKLRREVEKAKRAISSQHOARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM	330
<i>D. rerio</i>	275	DVRKDNRAVQKLRREVEKAKRAISAQHOARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM	330
<i>H. sapiens</i>	277	DVRKDNRAVQKLRREVEKAK-ALSSQHOARIEIESFYEGEDFSETLTRAKFEELNM	331

注:深灰色代表相同的氨基酸残基

图 2 鲫和其他物种的 GRP78 同源蛋白的 ATP 酶结构域

Fig. 2 ATPase domain of GRP78 from *C. auratus* and other species

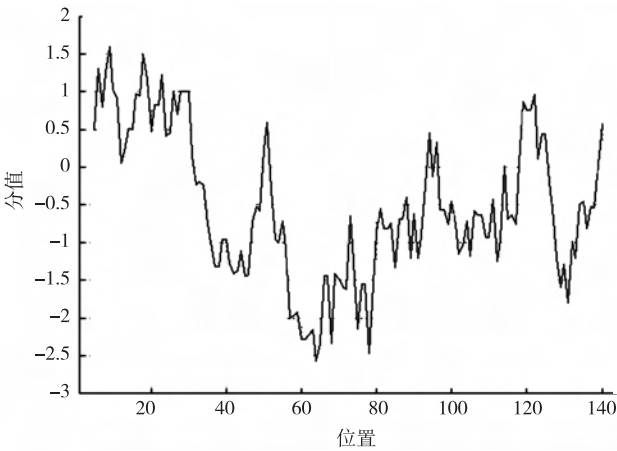


图 3 鲫 GRP78 序列的疏水性分析

Fig. 3 Hydrophobicity profile of GRP78 in *C. auratus*

“TNGDTHLGGEDFDQVRME”,抗原指数为 16.2,共有 1 个共同抗原表位。

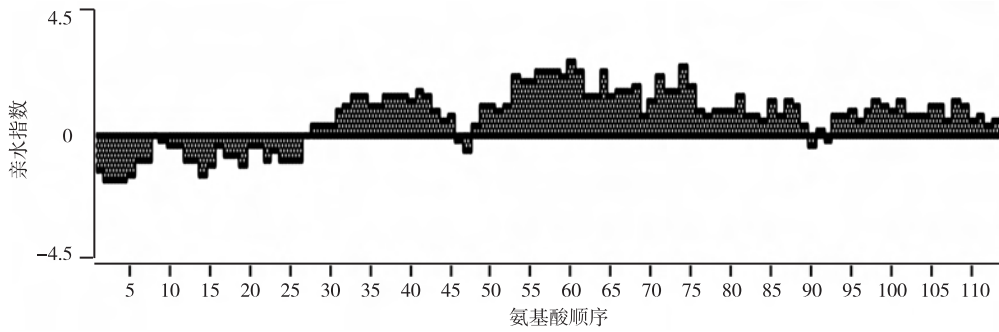


图 6 鲫 GRP78 的亲水性预测结果

Fig. 6 The prediction of the hydrophilicity of GRP78 in *C. auratus*

3 讨论

目前有关 GRP78 定位的研究较多,如胚胎期 GRP78 在 小鼠(*Mus musculus*)脑组织的表达呈现从端脑到后脑逐渐降低的趋势^[28-29]。本研究结果显示鲫 GRP78 定位在内质网,但该蛋白在内质网的确切部位还需要进一步的深入研究。HSP70 蛋白是热休克蛋白家族中最保守的一类蛋白,可特异性地结合 ATP 并具有 ATP 酶活性。有研究表明,HSC71 ATP 酶参与蛋白质的体外释放^[30]。GRP78 作为 HSP70 家族成员之一,它具有的 ATP 酶结构域可以通过与 Bip 结合进而将蛋白质释放到体外^[17,30]。因此,可以推测鲫 GRP78 的 ATP 酶结构域在蛋白质的释放过程中发挥着重要的作用。

最近有研究表明,GRP78 参与分泌型组织和细胞的免疫反应。如石斑鱼(*Epinephelus spp.*)的肾细胞被病毒感染后,GRP78 在与病毒衣壳蛋白相互作用的过程中,GRP78 基因表达上调^[31];在副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)感染牙鲆期间,GRP78 基因表达上调,表明该蛋白是关键 HSP^[32];GRP78 还参与细菌对家蚕(*Bombyx mori*)感染的免疫反应^[33];GRP78 可被日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)感染的小鼠的血清所识别,提示日本血吸虫 GRP78 具有高度的抗原特异性^[34]。在本研究中,获得的鲫 GRP78 基因的部分序列所编码的氨基酸序列中虽然含有较少的转角区和无规则卷曲区,形成的 B 细胞抗原表位较少,但可为后期研究鲫遭遇寄生虫感染的免疫反应奠定基础。

参考文献:

- [1] LEE A S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001,26(8):504-510.
- [2] JI C, KAPLOWITZ N, LAU M Y, et al. Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice[J]. Hepatology, 2011,54(1):229-239.
- [3] HENDERSHOT L M. The ER function BiP is a master regulator of ER function[J]. Mount Sinai Journal of Medicine, 2004,71(5):289-297.
- [4] QUINONES Q J, de RIDDER G G, PIZZO S V. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum[J]. Histology & Histopathology, 2008,23(11):1409-1416.
- [5] DAISUKE M, KAZUHIRO N. ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases[EB/OL]. (2012-03-15) [2018-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342303/>.
- [6] ZHANG Y, LIU R, NI M, et al. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010,285(20):15065-15075.
- [7] YU Z, LUO H, FU W, et al. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis[J]. Experimental Neurology, 1999,155(2):302-314.
- [8] PFAFFENBACH K T, LEE A S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2011,23(2):150-156.
- [9] DEY A, KESSOVA I G, CEDERBAUM A I. Decreased protein and mRNA expression of ER stress proteins GRP78 and GRP94 in HepG2 cells over-expressing CYP2E1[J]. Archives of Biochemistry Biophysics, 2006,447(2):155-166.
- [10] WU C T, WANG W C, CHEN M F, et al. Glucose-regula-

- ted protein 78 mediates hormone-independent prostate cancer progression and metastasis through maspin and COX-2 expression[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(1): 195-204.
- [11] GONICK H C. Lead-binding proteins: a review[J]. *Journal of Toxicology*, 2011, 2011(2011): 686050.
- [12] ZHU Y, FAN Q, MAO H, et al. GRP78 from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) provides cytoplasm protection against thermal and Pb^{2+} stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 617-622.
- [13] OJIMA N, YAMASHITA M, WATABE S. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2005, 329(1): 51-57.
- [14] 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.
- WU C X, LIU Y, MA M S, et al. Up-regulation of grass carp GRP78 gene expression under heat shock and poly I:C stress[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2009, 15(6): 814-818.
- [15] DAS S, MOHAPATRA A, SAHOO P K. Expression analysis of heat shock protein genes during *Aeromonas hydrophila* infection in rohu, *Labeo rohita*, with special reference to molecular characterization of Grp78[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2015, 20(1): 73-84.
- [16] ZHONG B, WANG X, MAO H, et al. A mechanism underlies fish GRP78 protection against Pb^{2+} toxicity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 185-188.
- [17] ZHONG B, MAO H, FAN Q, et al. SiRNA-mediated knockdown of *CiGRP78* gene expression leads cell susceptibility to heavy metal cytotoxicity[J]. *Gene*, 2014, 552(2): 219-224.
- [18] SONG Y F, LUO Z, HUANG C, et al. Endoplasmic reticulum stress-related genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*: molecular characterization, tissue expression, and expression responses to dietary copper deficiency and excess[J]. *G3 Genesgenetics*, 2015, 5(10): 2091-2104.
- [19] WHIPPS C M, KENT M L. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, 53(5): 364-373.
- [20] 刘晓聪, 赵元君, 张金叶. 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因的克隆、鉴定及功能预测[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 33(2): 37-42.
- LIU X C, ZHAO Y J, ZHANG J Y. Cloning, identification and functional prediction of heat shock protein 70 gene in *Myxobolus am pullicapsulatus* [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2016, 33(2): 37-42.
- [21] 陈四妙, 陈晓峰, 杨成东等. 稻瘟病菌分泌复合物的生物信息学分析及 MoSec15 定位研究[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2014, 43(3): 282-288.
- CHEN S M, CHEN X F, YANG C D, et al. Bioinformatics analysis of exocyst complex and the subcellular localization of MoSec15 in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2014, 43(3): 282-288.
- [22] GARNIER J, OSGUTHORPE D J, ROBSON B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1978, 120(1): 97-120.
- [23] CHOU P Y, FASMAN G D. Prediction of the secondary structure of protein conformation[M]. New York: Plenum Press, 1990: 549-586.
- [24] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105-132.
- [25] KARPLUS P A, SCHULZ G E. Prediction of chain flexibility in proteins [J]. *Naturwissenschaften*, 1985, 72(4): 212-213.
- [26] JAMESON B A, WOLF H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J]. *Computer Applications in the Biosciences Cabios*, 1988, 4(1): 181.
- [27] EMINI E A, HUGHES J V, PERLOW D S, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide[J]. *Journal of Virology*, 1985, 55(3): 836-839.
- [28] Reddy R K, Mao C, Baumeister P, et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(23): 20915-20924.
- [29] 李波, 陈誉华. 内质网分子伴侣 GRP78 在小鼠脑发育过程中的时空表达[J]. *实验生物学报*, 2003, 36(2): 137-144.
- LI B, CHEN Y H. The expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) in mouse brain during early development [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2003, 36(2): 137-144.
- [30] GAUT J R, HENDERSHOT L M. Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(10): 7248-7255.
- [31] LU M W, NGOU F H, CHAO Y M, et al. Transcriptome characterization and gene expression of *Epinephelus* spp in endoplasmic reticulum stress-related pathway during

betanodavirus infection *in vitro*[J]. Bmc Genomics,2012, 13(1):651-651.

[32] CHA I S,KWON J,PARK S B,et al. Heat shock protein profiles on the protein and gene expression levels in olive flounder kidney infected with *Streptococcus parauberis* [J].Fish & Shellfish Immunology,2013,34(6):1455-1462.

[33] XI X Z,MA K S. Molecular cloning and expression analysis of glucose-regulated protein 78 (GRP78) gene in silk-worm *Bombyx mori*[J]. Biologia,2013,68(3):559-564.

[34] 高珏,余传信,宋丽君,等. 日本血吸虫热休克蛋白 70 (Sj HSP70) 的抗体反应特征及免疫诊断价值[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(8):699-705.

GAO W,YU C X,SONG L J,et al. Characterization of the antibody response to heat shock protein 70 (Sj HSP70) of *Schistosoma japonicum* and the immunological diagnostic value of that protein [J]. Journal of Pathogen Biology, 2014,9(8):699-705.

Animal Sciences

Cloning, Identification, and Functional Prediction of
Partial Gene Sequence of Glucose Regulated Protein 78 in *Carassius auratus*

LIU Xiaohua, ZHAO Yuanjun, YAN Yanjie, ZHANG JinYE

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes]To analyze and predict the function of glucose regulated protein 78 (GRP78) in *Carassius auratus* and provide a foundation for studying the mechanism of GRP78 during the process of extracellular stress in fish. [Methods]A partial sequence of *GRP78* gene in *C. auratus* was cloned, whose physicochemical property including secondary structures, hydrophilicity, flexibility, surface probability, antigen epitope, was analyzed by bioinformatics methods. [Findings]The *GRP78* gene fragment sequence with long 617 bp was obtained. The sequence encodes a total of 113 amino acids with molecular weight about 1.3 kDa and pI 5.82. None signal peptide was existed. The flexibility was located at 7th~10th, 18th~21st, 28th~42nd, 51st~62nd, 68th~78th, and 94th~109th amino acid residues; the surface probability was placed at 29th~30th, 38th~43rd, 50th~65th, 68th~79th, 82nd~86th, 97th~99th, 102nd~104th, and 106th~111th amino acid residues. Additionally, one B cell epitope was predicted as 28th~45th amino acids residues. [Conclusions]ATPase domain was obtained in the *C. auratus GRP78* gene fragment with higher hydrophilicity, which is located in ER.

Keywords: *Carassius auratus* ; *GRP78* ; bioinformatic analysis

(责任编辑 方 兴)

(接正文20页)

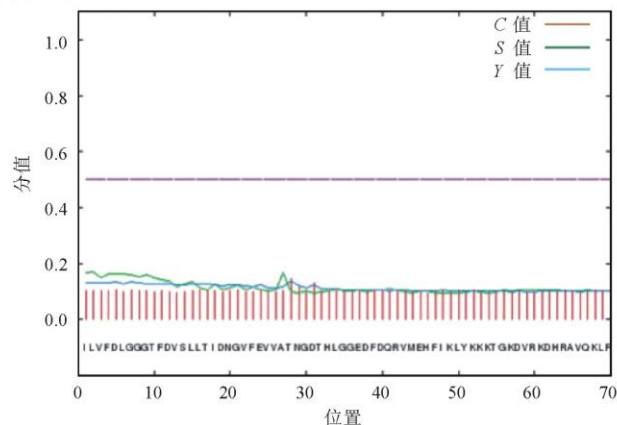
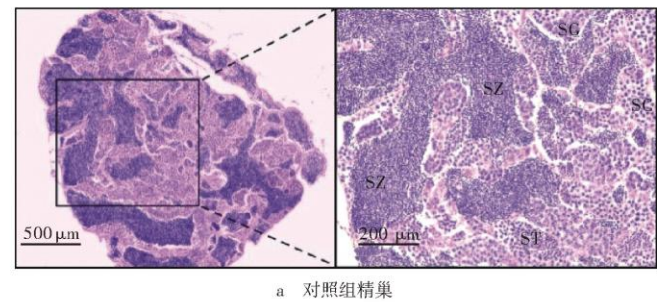


图4 鲫GRP78信号肽分析

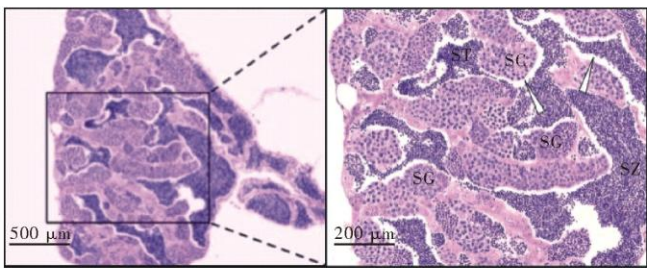
Fig. 4 The signal peptide prediction of GRP78 in *C. auratus*

(接正文26页)



a 对照组精巢

注: SG为精原细胞; SC为精母细胞; ST为精子细胞; SZ为精子; 白色三角符为空隙



b 镉暴露组精巢

图1 镉暴露对斑马鱼精巢组织学的影响

Fig. 1 Effects of cadmium exposure on the histology of zebrafish testis

(接正文45页)

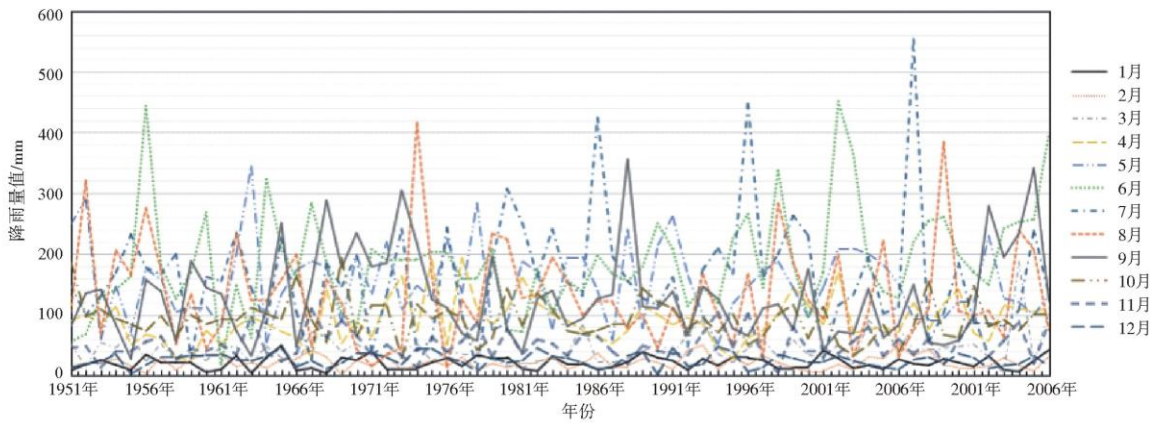


图2 1951—2016年重庆月均降雨量曲线

Fig. 2 Monthly rainfall curves of Chongqing from 1951 to 2016

(接正文135~136页)

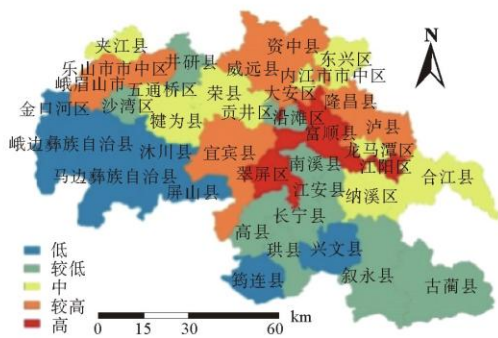


图1 川南城市群县域产业增长分享份额

Fig. 1 The share of industrial growth in the county area of southern Sichuan city

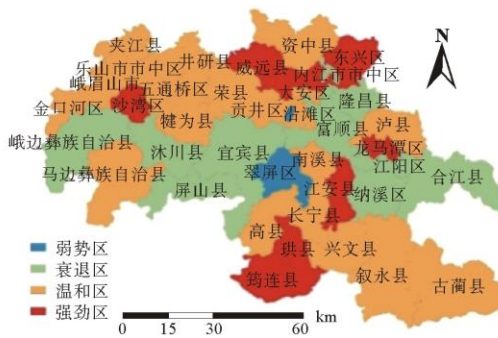


图3 川南城市群县域产业竞争力偏离份额

Fig. 3 The deviation of the industrial competitiveness of the county area in the southern Sichuan city group