

猪 *PILRA* 基因克隆及变异剪接体鉴定

李利族^{1,2}, 韩丽鑫^{1,2}, 王金奎^{1,2}, 汪亮³, 刘娣³, 杨秀芹^{1,2}

1. 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;
2. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030;
3. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086

摘要: II 型成对免疫球蛋白样受体(Paired immunoglobulin-like type 2 receptors, PILRs)是免疫球蛋白超家族成员之一, 包括 α 和 β 两个亚型。PILR α 在机体抵抗病原体入侵的免疫反应中发挥着重要作用, 但目前尚未见关于猪 PILR α 的报道。为了分析其在猪抗病育种中的作用, 本文克隆了猪 PILR α 编码基因(*PILRA*)并鉴定变异剪接体, 利用实时荧光定量 PCR 方法构建其组织表达谱和诱导表达谱。结果表明, 成功克隆了猪 *PILRA* 基因的 3 个变异剪接体 V1~V3(GenBank 登录号: KJ143679~81), 预测的蛋白质多肽链分别长 271 aa、254 aa 和 283 aa, 且都具有免疫球蛋白结构域。各变异剪接体均在脾脏中表达量最高, 肝脏、肺脏次之, 在心脏、肾脏、胃、肌肉、淋巴、大肠、小肠和膀胱等组织中表达量较低或检测不到。Poly(I:C)能显著诱导变异剪接体 V1 的表达, 但几乎不影响 V2、V3 的表达。研究结果为进一步揭示 *PILRA* 在猪抗病育种中的作用提供了基础。

关键词: 猪; *PILRA*; 克隆; 表达

Cloning and identification of splice variants of the porcine *PILRA* gene

Lizu Li^{1,2}, Lixin Han^{1,2}, Jinkui Wang^{1,2}, Liang Wang³, Di Liu³, Xiuqin Yang^{1,2}

1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
3. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

Abstract: Paired immunoglobulin-like type 2 receptors (PILRs) are members of the immunoglobulin superfamily and composed of two subtypes, α and β . PILR α plays an important role in the immune response against invading pathogens, but so far there is no report on porcine PILR α . In order to analyze the potential role of PILR α in porcine disease-resistant breeding, we first cloned the *PILRA* gene (V1-V3, GenBank accession Nos. KJ143679-81) into pigs, and identified its three splice variants. Each variant conceptually translates into proteins of 271 amino acids (aa), 254aa and 283aa, respectively. Furthermore, quantitative real-time PCR was used to construct expression profiles of each variant in tissues and that induced by Poly(I:C). All three variants had the highest expression levels in the spleen, followed by liver and lung tissues. While levels were low or undetectable in the heart, kidney, stomach, muscle,

收稿日期: 2015-04-01; 修回日期: 2015-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31072007)资助

作者简介: 李利族, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传与猪育种。E-mail: 1181349916@qq.com

通讯作者: 杨秀芹, 教授, 研究方向: 分子遗传与猪育种。E-mail: xiuqin163@163.com

刘娣, 教授, 研究方向: 分子遗传与猪育种。E-mail: liudi1963@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-136

网络出版时间: 2015-8-12 16:05:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150812.1605.011.html>

lymph, large intestine, small intestine and bladder. Poly(I:C) significantly induced the expression of splice variant 1 (V1) of porcine *PILRA*, but hardly affected the expression of V2 and V3. The results lay a foundation for further study on the role of *PILRA* in porcine breeding and disease resistance.

Keywords: porcine; *PILRA*; cloning; expression

型成对免疫球蛋白样受体(Paired immunoglobulin-like type 2 receptors, PILRs)是近年发现的免疫球蛋白超家族成员之一,包括 α 和 β 两个亚型,分别由 *PILRA* 和 *PILRB* 基因编码。*PILR α* 是免疫抑制性受体, *PILR β* 是免疫激活性受体,二者都属于型跨膜糖蛋白,多数情况下成对存在。PILRs 主要在髓系来源的单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等抗原递呈细胞中表达^[1];几乎所有的哺乳动物都具有 *PILRs* 基因,保守性较高,所以推测其具有重要的免疫调节作用^[2]。

PILR α 在胞外区含有一个免疫球蛋白样 V 型结构域,胞质区含有两个免疫酪氨酸受体抑制性基序(Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)。ITIM 的保守结构为 L/I/V/SXYXXL/V,存在于绝大多数免疫抑制性受体的胞质区,负责释放抑制性信号,进行免疫负向调节^[3]。人 *PILR α* 由 303 个氨基酸残基组成,分子量为 44 kDa,编码基因位于 7q22,含有 7 个外显子和 6 个内含子,全长 26.7 kb。小鼠 *PILRA* 基因位于 5 号染色体上,编码 302 个氨基酸残基的多肽链。*PILRA* 基因存在着复杂的变异剪接(可变剪接、选择性剪接)现象,通过查询 NCBI protein 数据库发现,人、鼠各存在着至少 3 个变异剪接体。

研究表明, *PILR α* 在机体抵抗病原体入侵的免疫反应中发挥着重要作用。病毒糖蛋白 B 是 *PILR α* 的配体,二者结合能够促进单纯疱疹病毒型入侵机体^[4,5];在金黄色葡萄球菌引起的急性肺炎中,激活 *PILR α* 能够导致小鼠肺部细菌数量显著减少、死亡率降低、干扰素 γ 等细胞因子的含量发生明显变化,表明激活 *PILR α* 有助于控制急性金黄色葡萄球菌感染、减弱炎症反应^[6];因此, *PILRA* 是重要的抗病候选基因。目前尚未见有关猪 *PILRA* 的报道。双链 RNA(Double stranded RNA, dsRNA)是大多数病毒的病原相关分子模式。Poly(I:C)是一种人工合成的 dsRNA,能有效地诱导机体的抗病毒天然免疫反应,而且安全、无毒^[7]。因此,本研究以民猪为实验材料,克隆猪 *PILRA* 基因的全长编码区序列并

鉴定变异剪接体,利用实时荧光定量 PCR 技术构建其组织表达谱和 Poly(I:C)诱导表达谱,研究结果为进一步揭示猪 *PILRA* 基因在天然免疫反应中的作用提供基础,为猪分子抗病育种提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为 1 月龄雌性民猪,来自黑龙江省农科院畜牧研究所科研基地。屠宰后立即取各种组织样,于液氮中速冻后, -80℃ 冰箱长期保存。

1.2 引物设计与合成

通过分析 GenBank 中猪 EST 序列及人、鼠等动物的相应序列,选择高度保守区,设计 2 对引物(C1、C2)扩增猪 *PILRA* 基因的全长编码区。根据克隆、测序结果,设计特异性扩增各变异剪接体的引物 R1、R2 和 R3,用于荧光定量 PCR 分析。引物信息见表 1,所有引物均利用 Primer Premier 5.0 软件自行设计,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 Trizol(Invitrogen 公司)提取总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 的质量和浓度,稀释成 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 备用。采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒(PrimerScript RT reagent Kit)合成 cDNA。

1.4 克隆及变异剪接体鉴定

以脾脏组织 cDNA 为模板,利用 C1 和 C2 引物通过常规 PCR 方法扩增猪 *PILRA* 基因。PCR 扩增条件详见参考文献^[8]。扩增产物胶回收、纯化后,连入 pMD18-T 载体,转化感受态细胞 DH5 α 。利用菌落 PCR 方法对平板上的单克隆进行初筛,并选取扩增片段长度存在差异的菌落,摇菌培养,提取质粒,双酶切鉴定后,由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接、分析。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列(5' 3')	复性温度()	扩增长度(bp)
C1	F: ATGGGGGTGGGCAAGTTT R: ACCTGACCACTGCTTCCTTATTC	57	772
C2	F: GGAGGGGAAAAGGAGTTCAGGG R: TTAGGTCTTCAGGGCAGAGAACAGG	63.7	416
R1	F: GCAACAGACAGACCCCAAGG R: CTTCTCCAGACTTCCCGTAATAT	60	80
R2	F: GCAGACTAAAGCCAGAACCCC R: ATGCCATCATCTTTGTTCCC	60	88
R3	F: CGGCCACCACTGCAGCTGAC R: TGGGAAGGATCCTCTTTGCTTCTCT	60	174
β -actin	F: CATCACCATCGGCAACGA R: GCGTAGAGGTCCTTCCTGATGT	60	144

1.5 组织表达和诱导表达

利用实时荧光定量 PCR 方法分析猪 *PILRA* 基因各变异剪接体在胃、肾脏、脾脏、肺脏、心脏、肝脏、大肠、小肠、肌肉、淋巴、膀胱等组织中的表达情况；并在体外培养的 PK-15 细胞内，分析病毒类似物 Poly(I:C)对各变异剪接体的诱导表达情况。实时荧光定量 PCR 反应、细胞培养、Poly(I:C)诱导等实验方法详见参考文献[8]。

2 结果与分析

2.1 猪 *PILRA* 基因克隆

通过优化 PCR 扩增条件，C1 和 C2 两对引物都得到了预期长度的扩增产物，分别为 772 bp 和 416 bp(图 1A)，二者含有 56 bp 的重叠区，经拼接后序列长为 1132 bp，其中 5'非翻译区(Untranslated region, UTR)长 168 bp、编码区长 816 bp、3'UTR 长 148 bp。编码区核苷酸与人(NM_013439)、牛(NM_001206350)和小鼠(NM_153510)相应序列的相似性分别为 58.28%、55.48%、42.47%，证明本文成功获

得了猪 *PILRA* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号：KJ143679)，命名为 V1。利用 UCSC 基因组数据库(<http://genome.ucsc.edu/>)的 BLAT 程序分析发现，猪 *PILRA* 基因位于 3 号染色体，全长约 10 kb，由 7 个外显子组成，起始密码子和终止密码子分别位于外显子 1 和 6。猪 *PILRA* 基因预期编码 271 aa 残基的多肽链，分子量为 30.62 kDa，等电点为 9.60。利用 SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行的蛋白结构域分析表明，在多肽链的 1~25aa、44~156aa 和 198~220aa 处分别存在着信号肽、免疫球蛋白结构域(Immunoglobulin, Ig)和跨膜结构域。

2.2 猪 *PILRA* 变异剪接体鉴定

琼脂糖凝胶电泳检测发现，C2 引物除了扩增得到一条明亮的主带之外，还有微弱的小带出现(图 1A)。考虑到人、鼠 *PILRA* 基因都存在着变异剪接现象，本文采用菌落 PCR 方法对平板上的单克隆进行筛选，鉴定含有不同插入片段的重组子(图 1B)，并测序验证。结果表明，获得了猪 *PILRA* 基因 2 个新变异剪接体：V2(GenBank 登录号：KJ143680)和 V3(GenBank 登

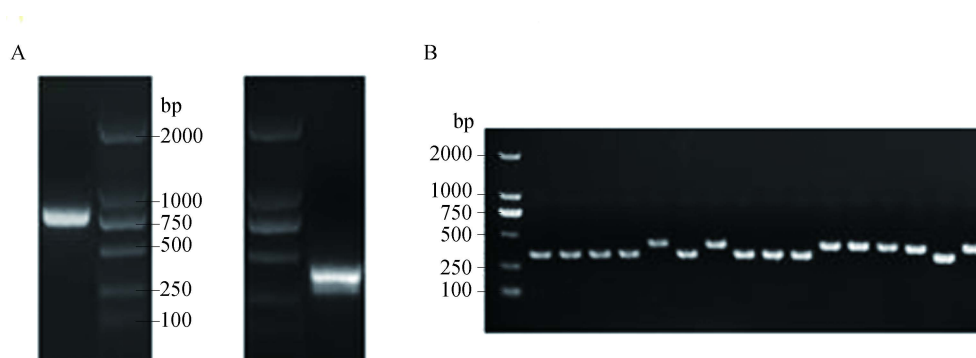


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果

A：C1(左)和 C2(右)引物的扩增结果；B：菌落 PCR 鉴定含有不同插入片段的重组子。

录号：KJ143681)。序列比对分析表明，V2 和 V3 都存在着外显子跳跃(Exon skipping)现象：V2 缺少外显子 6，V3 缺少外显子 4 和 6。V1、V2 和 V3 这 3 个变异剪接体具有相同的起始密码子和 5'UTR，但由于外显子跳跃，V2 和 V3 的终止密码子都发生了后移：V2 终止密码子位于外显子 7 的 5'末端，而 V3 终止密码子位于外显子 7 的 3'末端(图 2A)。预测的 V2 和 V3 多肽链分别长 254aa 和 283aa 残基，3 个变异剪接体共享氨基端的 226aa 残基，即具有相

同的信号肽、Ig 结构域和跨膜结构域(图 2B)。

2.3 组织表达谱

实时荧光定量 PCR 分析发现，*PILRA* V1 在检测的各种组织中都表达；V2 和 V3 具有相似的组织表达谱：在肾脏、胃、肌肉、膀胱、大肠和小肠组织中的表达量较低或检测不到；3 个变异剪接体均在脾脏中表达量最高，在肝脏和肺脏中也都有较高水平的表达(图 3)。

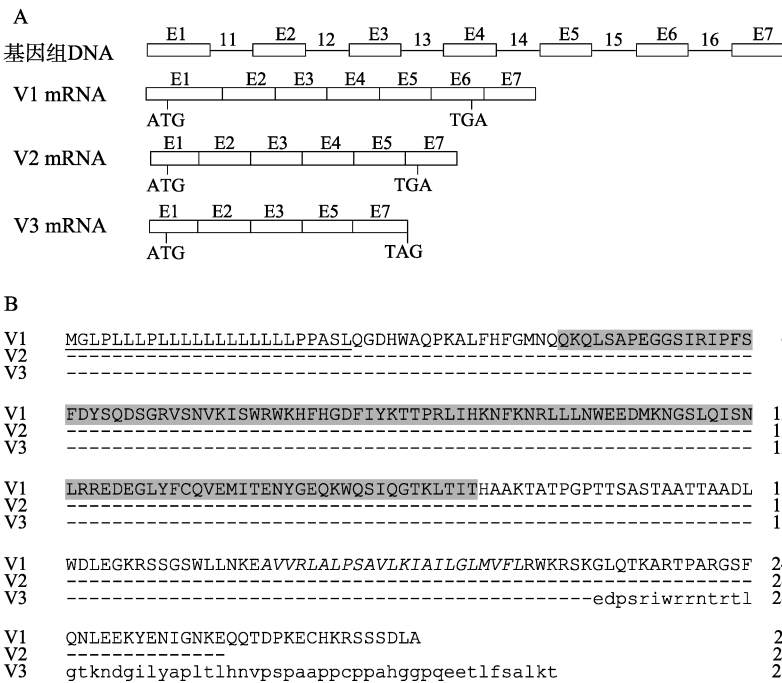


图 2 猪 *PILRA* 变异剪接体的结构及氨基酸序列
A：变异剪接体的结构；B：变异剪接体的氨基酸序列。E：外显子；I：内含子；“-”表示变异剪接体间的序列一致；小写字母表示 V3 特有的序列；下划线表示信号肽序列；阴影表示 Ig 结构域；斜体表示跨膜结构域。

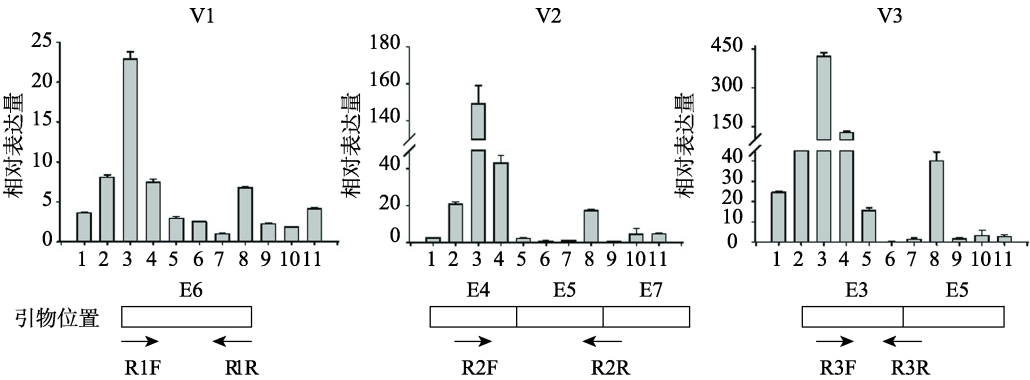


图 3 猪 *PILRA* 基因组织表达谱
1：心脏；2：肝脏；3：脾脏；4：肺脏；5：肾脏；6：胃；7：肌肉；8：淋巴；9：膀胱；10：大肠；11：小肠。肌肉组织中的相对表达量作为 1。每个反应重复 3 次，数据为平均数 ± 标准误。

2.4 诱导表达谱

为了确定 Poly(I:C)对 *PILRA* 基因表达的影响,本研究以不同浓度的 Poly(I:C)刺激体外培养的 PK-15 细胞,12 h 后提取细胞总 RNA,实时荧光定量 PCR 分析 *PILRA* 基因表达量的变化。结果发现 1 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C)能有效地促进 V1 的表达,当浓度继续升高时,其表达量反而下降;变异剪接体 V2 和 V3 的表达与 Poly(I:C)诱导的关系不大(图 4)。

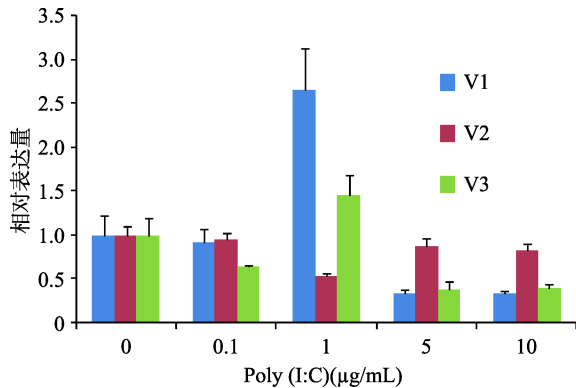


图 4 猪 *PILRA* 基因诱导表达谱
每个反应重复 3 次,数据为平均数 \pm 标准误。

3 讨论

抑制性受体 *PILR α* 参与细胞的特异性和非特异性免疫应答,可以作为病毒糖蛋白 B 的共受体,促进病毒入侵宿主细胞^[4, 9];其介导的信号通路在金黄色葡萄球菌引起的肺炎中发挥重要作用^[6, 10]。因此,本研究选择猪 *PILRA* 作为抗病候选基因,对其进行克隆、组织表达和诱导表达分析,以期猪抗病育种提供新的基因资源。本研究成功克隆了猪 *PILRA* cDNA 序列并获得了 3 个变异剪接体。通过与基因组序列比对分析,发现变异剪接体 V2 和 V3 的形成均由外显子跳跃所致。在氨基酸组成上,三者的差异主要表现在 C-末端的几十个氨基酸残基上,并不存在着蛋白质结构功能域的变化,预示着这 3 个变异剪接体在功能上具有一定的相似性。猪 *PILR α* 的 3 个变异剪接体都含有 Ig 结构域,印证了其是 Ig 超家族成员,也说明其与免疫反应有关。

变异剪接是指细胞选择性地对一个 mRNA 前体的剪接位点进行识别、加工,形成不同成熟 mRNA,从而产生若干具有独特结构和功能的蛋白异构体。

变异剪接广泛地存在于真核生物中,是在转录后水平调控基因表达的重要手段,几乎所有含多个外显子的人类基因(95%~100%)都存在着变异剪接现象^[11, 12]。通过变异剪接,能够显著增加基因组的蛋白编码能力,从而满足不同发育阶段、生理环境的需要。通过查询 NCBI 数据库,发现 *PILRA* 基因在多个物种中都存在着变异剪接现象,并且各变异剪接体都能产生完整的编码产物(多肽链),说明变异剪接是 *PILRA* 基因表达的重要调控手段,由此产生的多种多肽链也应具有各自独特的功能。猪 *PILR α* 3 个变异剪接体在胞内区的差异,可能与其向下游传递信号有关。

组织表达分析表明,3 个变异剪接体在所检测的组织中都表达,其中脾脏的表达量最高。小鼠中的研究也表明 *PILRA* 基因在脾脏中的表达量最高^[13]。脾脏是哺乳动物体内最主要的免疫器官之一,说明该基因在机体免疫中具有重要作用。结果发现,1 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C)能显著诱导变异剪接体 V1 的表达,但当 Poly(I:C)的浓度继续升高,V1 的表达量下降,这可能是由于高浓度的 Poly(I:C)同时激活了细胞内其他因子和信号通路,从而导致 V1 的表达受到抑制;V2、V3 的表达几乎和 Poly(I:C)诱导无关,表明变异剪接体 V1 可能是猪 *PILR α* 的主要活性形式。

本研究成功克隆了猪 *PILRA* 基因的 3 个变异剪接体,并利用组织表达谱和诱导表达谱比较分析了各变异剪接体的功能,研究结果为进一步揭示 *PILRA* 基因在猪抗病育种中的作用提供了基础。

参考文献

- [1] Takai T. Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition. *Immunology*, 2005, 115(4): 433–440. [DOI]
- [2] Wilson MD, Cheung J, Martindale DW, Scherer SW, Koop BF. Comparative analysis of the paired immunoglobulin-like receptor (*PILR*) locus in six mammalian genomes: duplication, conversion, and the birth of new genes. *Physiol Genomics*, 2006, 27(3): 201–218. [DOI]
- [3] Lun YZ, Chi Q, Wang XL, Wang F, Sui W. Identification of paired immunoglobulin-like type 2 receptor α as hepatitis B virus DNA polymerase transactivated protein 1 interacting proteins. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2): 720–724. [DOI]
- [4] Satoh T, Arase H. HSV-1 infection through inhibitory re-

- ceptor, PILRalpha. *Uirusu*, 2008, 58(1): 27–36. [DOI]
- [5] Wang J, Fan Q, Satoh T, Arai J, Lanier LL, Spear PG, Kawaguchi Y, Arase H. Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to paired immunoglobulin-like type 2 receptor α depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. *J Virol*, 2009, 83(24): 13042–13045. [DOI]
- [6] Banerjee A, Stevenaert F, Pande K, Haghighi E, Antonenko S, Gorman DM, Sathe M, McClanahan TK, Pierce R, Turner SP, Bigler ME, Phillips JH, Heyworth PG. Modulation of paired immunoglobulin-like type 2 receptor signaling alters the host response to *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Infect Immun*, 2010, 78(3): 1353–1363. [DOI]
- [7] Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 2006, 80(10): 5059–5064. [DOI]
- [8] 王秋实, 武春艳, 李朋, 邵思宇, 张姣, 朱蒙, 杨秀芹. 猪 *GPR84* 和 *MPEG1* 基因的分子克隆和表达分析. 畜牧兽医学报, 2014, 45(5): 699–705. [DOI]
- [9] Tato CM, Joyce-Shaikh B, Banerjee A, Chen Y, Sathe M, Ewald SE, Liu MR, Gorman D, McClanahan TK, Phillips JH, Heyworth PG, Cua DJ. The myeloid receptor PILR β mediates the balance of inflammatory responses through regulation of IL-27 production. *PLoS One*, 2012, 7(3): e31680. [DOI]
- [10] Sun YL, Senger K, Baginski TK, Mazloom A, Chinn Y, Pantua H, Hamidzadeh K, Ramani SR, Luis E, Tom I, Seibrell A, Quinones G, Ma Y, Mukhyala K, Sai T, Ding JB, Haley B, Shadnia H, Kapadia SB, Gonzalez LC, Hass PE, Zarrin AA. Evolutionarily conserved paired immunoglobulin-like receptor α (PILR α) domain mediates its interaction with diverse sialylated ligands. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15837–15850. [DOI]
- [11] Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1413–1415. [DOI]
- [12] Wang ET, Sandberg R, Luo SJ, Khrebukova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008, 456(7221): 470–476. [DOI]
- [13] Shiratori I, Ogasawara K, Saito T, Lanier LL, Arase H. Activation of natural killer cells and dendritic cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J Exp Med*, 2004, 199(4): 525–533. [DOI]

(责任编辑: 赵要风)