

高翠翠, 喻娇, 唐青海, 等. 猪源和犬源 ELF4 蛋白的亚细胞定位比较研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 45-53.

GAO C C, YU J, TANG Q H, et al. Comparative study on subcellular localization of swine- and canine-derived ELF4 protein [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 45-53.

猪源和犬源 ELF4 蛋白的亚细胞定位比较研究

高翠翠¹, 喻娇¹, 唐青海^{1*}, 侯鑫军¹, 刘婷¹, 全飞杨¹, 刘建行²,
赵婷芳¹, 赵铖¹, 朱钰英¹, 危艳武^{2*}

(1. 衡阳师范学院生命科学学院/南岳山区生物资源保护与利用湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421008;

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所/兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要: 本研究旨在对比分析猪 E74 样因子 4 (sELF4) 和犬 E74 样因子 4 (cELF4) 的亚细胞定位, 为深入开展二者功能研究提供依据。利用 PCR 截短扩增 sELF4 和 cELF4, 分别克隆至真核表达载体 pEGFP-C1 中, 构建 17 个 sELF4 重组真核表达载体和 13 个 cELF4 重组真核表达质粒, 转染 HeLa 细胞、Hoechst33342 染色, 荧光倒置显微镜观察亚细胞定位, 运用生物信息学软件分析其编码氨基酸序列特征。结果表明, sELF4 和 cELF4 蛋白全长均定位在细胞核中, sELF4 196~291 aa (586~873 bp) 之间有可能存在两个细胞质核定位信号肽, cELF4 的核定位信号肽分布在 203~291 aa (607~873 bp), cELF4 292~663 aa (874~1 992 bp)、sELF4 292~662 aa (874~1 989 bp) 在细胞中发生聚集现象。cELF4 与 sELF4 氨基酸序列在第 169~303 位氨基酸之间均高度保守, 其他区段均存在不同程度的差异。综上, sELF4 蛋白全长和 cELF4 蛋白全长均定位在细胞核中, 截短表达的羧基端功能区有聚集现象, 二者的核定位信号肽分布有一定差异。

关键词: 猪 ELF4 蛋白; 犬 ELF4 蛋白; 真核表达; 亚细胞定位

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)03-0045-09

Comparative study on subcellular localization of swine- and canine-derived ELF4 protein

GAO Cuicui¹, YU Jiao¹, TANG Qinghai^{1*}, HOU Xinjun¹, LIU Ting¹, QUAN Feiyang¹, LIU Jianxing²,
ZHAO Tingfang¹, ZHAO Cheng¹, ZHU Yuying¹, WEI Yanwu^{2*}

(1. Hunan Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biological Resources in the Nanyue Mountainous Region/Hengyang Key Laboratory of New Detection Technology and Biological Agents of Animal Microorganism, College of Life Sciences, Hengyang Normal University, Hengyang 421008, China;

2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract: This study was to compare and analyze the subcellular localization of swine E74-like factor 4 (sELF4) and canine E74-like factor 4 (cELF4), so as to provide a basis for further functional research on the two proteins. PCR was used here to truncate sELF4 and cELF4, which were cloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-C1, separately. 17 sELF4 recombinant eukaryotic expression vectors and 13 cELF4 recombinant eukaryotic expression plasmids were constructed, transfected into HeLa cells and stained with Hoechst33342. Subcellular localization was observed by fluorescence inverted microscope, and bioinformatics software was used to analyze the sequence characteristics of encoded amino acids. The results showed that the full length of porcine and canine ELF4 proteins was localized in the nucleus. There might be two cytoplasmic nuclear localization signal peptides between sELF4 196-291aa (586-873 bp), and the nuclear localization signal peptide of cELF4 was distributed between 203-291 aa (607-873 bp). CELF4 292-663aa (874-1 992 bp) and sELF4 292-662aa (874-1 989 bp) were aggregated in the cells. The amino acid sequences of cELF4 and sELF4 were highly conserved between amino acids 169-303aa, and

收稿日期: 2023-03-31; 修回日期: 2024-01-04

基金项目: 国家级大学创新创业训练项目 (cxey2022001); 湖南省自然科学基金面上项目 (2021JJ30060); 湖南省教育厅科学研究项目重点项目 (21A0442); 湖南省重点研发计划项目 (2021NK2026); 2022 年中央引导地方科技发展资金项目 (2022ZYCO91)

第一作者: 高翠翠, 女, 本科生

* 通信作者: 唐青海, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 动物病毒学与免疫学, E-mail: qinghaitang109@126.com; 危艳武, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 动物疫病防控技术, E-mail: weiyanywu@caas.cn。

they were of different degrees in other parts. Taken together, canine ELF4 protein and porcine ELF4 protein were both localized in the nucleus, and they seemed to aggregate in the truncated expression of the carboxyl terminal functional region. The distribution of nuclear localization signal peptides between them varied.

Keywords: swine ELF4 protein; canine ELF4 protein; eukaryotic expression; subcellular localization

E26 转录因子 (E26 transformation specific, ETS) 家族分子是多细胞生物的一类转录因子, 参与发育和分化等多个关键生物学过程^[1]。E74 样因子 4 (E74-like factor 4, ELF4) 是 ETS 家族的重要一员, 该蛋白由 N 端激活区域、与 DNA 共识序列结合的 ETS 区域和富含丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸的区域组成。人 ELF4 (hELF4) 参与细胞多种生理或病理的过程, 如肿瘤发生^[2]、DNA 损伤修复^[3]、天然免疫^[4]、细胞周期调控^[5] 和成骨分化^[6] 等。研究表明, hELF4 高表达可促进人胰岛素瘤细胞增殖^[7], 然而在急性髓性白血病中, hELF4 则是作为一个抑癌基因起作用^[8]。hELF4 对胃癌细胞的增殖和侵袭有正向调节作用^[9], 肿瘤来源的外泌体通过传递 LINC01091 调控 microRNA-128-3p/ELF4/CDX2 轴促进胃癌的生长和转移^[10]。此外, hELF4 在免疫调节中起着重要作用。You 等^[11] 首次发现 hELF4 是一种 I 型干扰素 (IFNs) 转录因子, 并通过直接调节 I 型 IFNs 反应来抑制病毒的复制。hELF4 功能突变缺失导致人类自身炎症和免疫缺陷疾病^[12]。肠道 hELF4 是维持肠道内稳态、减轻酒精诱导的肝脏脂肪变性和损伤的重要宿主保护因子^[13]。hELF4 蛋白功能区研究比较透彻, 定位在细胞核中, 与其作为转录因子的功能关联密切^[14]。

目前尚无猪 E74 样因子 4 (sELF4) 和犬 E74 样因子 4 (cELF4) 的亚细胞定位比较研究的报道。本课题组成员前期成功克隆了 sELF4 基因, 并制备了免疫活性和特异性良好的鸡抗 sELF4 多克隆抗体^[15], 克隆 cELF4 基因, 体外表达重组 cELF4 蛋白并制备

了相应的抗体^[16]。为揭示 sELF4 和 cELF4 蛋白的亚细胞定位特征, 阐明二者亚细胞定位的异同, 本研究采用 PCR 截短扩增基因片段、以绿色荧光蛋白 (GFP) 为报告基因, 构建真核表达载体, 转染细胞, 观察细胞定位, 研究结果将为进一步探究 sELF4 和 cELF4 功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

感受态细胞 Top 10 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; KOD FX Neo 高保真酶购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; Ligation Mix、内切酶以及 Xfect™ 转染试剂均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; Hoechst 33342 购于 Abbkine Scientific 公司; DMEM 和胎牛血清培养基购自 Gibico 公司; 含 sELF4 基因全长质粒 pMD19T-sELF4、含 cELF4 基因全长质粒 pMD19T-cELF4 以及宫颈癌细胞 HeLa 由南岳山区生物资源保护与利用湖南省重点实验室构建或保存。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计

根据本课题组前期已经测定的 cELF4 基因序列 (GenBank No. MZ198105)、sELF4 基因序列 (GenBank No. KU097322), 用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 cELF4 和 sELF4 基因全长 PCR 扩增引物和截短扩增引物, 各片段相对位置如图 1 所示, 引物由深圳华大基因股份有限公司合成, 引物序列信息见表 1 和表 2。

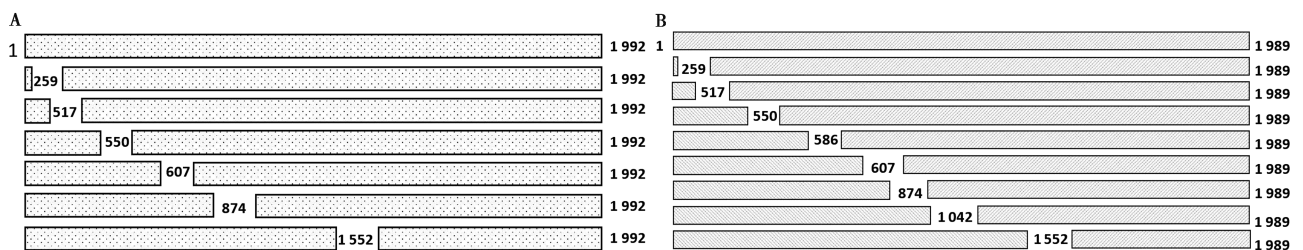


图 1 cELF4 基因截短示意图; B. sELF4 基因截短示意图。图中数字表示片段长度, 单位为 bp。

图 1 sELF4 和 cELF4 重组真核表达载体引物设计模式

1.2.2 sELF4 和 cELF4 基因的 PCR 扩增与重组真核表达载体的构建

以 pMD19T-cELF4 或 pMD19T-sELF4 载体为模板, 利用 KOD FX Neo 高保真酶进行 cELF4 和 sELF4

截短序列的 PCR 扩增。PCR 反应体系为: DNA 模板 2 μ L、KOD FX Neo 1 μ L、2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo 25 μ L, 2 mmol/L dNTPs 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 灭菌去离子水 10 μ L。PCR 反应程序为:

95 ℃ 5 min; 98 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 68 ℃ 2 min, 35 个循环; 69 ℃ 7 min; 4 ℃ 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行双酶切, 与荧光

蛋白报告载体 pEGFP-C1 连接、转化 Top 10 感受态细胞, 阳性克隆采用双酶切和序列测定进行鉴定。

表 1 cELF4 引物信息

引物名称	序列 (5'→3')
cELF4-F1-Sal I	ACT <u>GTCGAC</u> ATGGCTATTACCTTCAGCCAG
cELF4-R1992-BamH I	ACTGGATCCTTACAGGTCATGGGGCTCCATC
cELF4-F1-Sal I	ACT <u>GTCGAC</u> ACCTCACAACCATGTCAACCACTG
cELF4-R1992-BamH I	ACTGGATCCGGAAAATCAAAGAAGAGAATCCGG
cELF4-F259-Sal I	ACTGTCGACGGCAACCGCAGTACCTCACCAG
cELF4-F517-Sal I	ACT <u>GTCGACA</u> AAGGATGGCAAAGGCAGCACC
cELF4-F550-Sal I	ACTGTCGACAAGGAGATGCCCAAGGACCTG
cELF4-F607-Sal I	ACTGTCGACGGGACTGTCATCGCTGCCCTTC
cELF4-F874-Sal I	ACT <u>GTCGACTT</u> AAGGAGGCTGAGAGCTGGGCC
cELF4-F1552-Sal I	ACTGTCGACTTAAAACCTGGTACACCAGCCTCTGCC
cELF4-R1551-BamH I	ACTGGATCCTTAAGACTTCTTCCGTATGGGGATGCT
cELF4-R873-BamH I	ACTGGATCCTTAAGTCTTCTTGGCACCTTCTCTCTG
cELF4-R606-BamH I	ACTGGATCCTTACTTGGTCTTCCGGATTCTTCTTTT
cELF4-R516-BamH I	ACTGGATCCTTATGCTTCATTGTCATCTGCCAGC
cELF4-R549-BamH I	ACTGGATCCATGGCTATTACCTTCAGCCAG
cELF4-R 549-BamH I	ACTGGATCCTTACAGGTCATGGGGCTCCATC

注: 下划线序列分别为 Sal I 和 BamH I 酶切位点。

表 2 sELF4 引物信息

引物名称	序列 (5'→3')
C1-sELF4-F1-Hind III	TCAAAGCTTCGATGGCTATTACCCTGCAGCCC
C1-sELF4-R1989-Sal I	TCAGTCGACTCATATGTCATGGGGCTCCATC
C1-sELF4-F259-Hind III	TCAAAGCTTCGACCTCACAACCATGTCAACCAAC
C1-sELF4-F517-Hind III	TCAAAGCTTCGTCGAAGAAGAGGATCCGGAAGAC
C1-sELF4-F550-Hind III	TCAAAGCTTCGCGCAGTACCTCACCCGTCACC
C1-sELF4-F607-Hind III	TCAAAGCTTCGGGCAAAGGCAGCACCATCTAC
C1-sELF4-F874-Hind III	TCAAAGCTTCGATGCCCAAGGACCTGGTGGT
C1-sELF4-F1552-Hind III	TCAAAGCTTCGACTGTCATTCAGCCTTCATCAG
C1-sELF4-R258-Sal I	TCAGTCGACTCATGCTTCATTGTCATCTGTCAGCA
C1-sELF4-R516-Sal I	TCAGTCGACTCATTTTCCAGTCTTCTTGGCACTGTCT
C1-sELF4-R549-Sal I	TCAGTCGACTCAGTTGCCCTTGGTCTTCCGGATC
C1-sELF4-R606-Sal I	TCAGTCGACTCAGTCTTGGACTTCTTCCGTATGG
C1-sELF4-R873-Sal I	TCAGTCGACTCACTCCTTAAAACCTGGTACACCAGCCTC
C1-sELF4-R1551-Sal I	TCAGTCGACTCACCCGGGGGGCTGAGAGCTGGG
C1-sELF4-F586-Hind III	TCAAAGCTTCGATACGGAAGAAGTCCAAGGACG
C1-sELF4-F1042-Hind III	TCAAAGCTTCGAAAAAGCCAAAGGTGCAGCAG
C1-sELF4-R585-Sal I	TCAGTCGACTCAGGGGATGCTGGGGTCCGGTGA
C1-sELF4-R1041-Sal I	TCAGTCGACTCACCCAGGCTGCCGCCCTTAC

注: 下划线序列分别为 Sal I 和 Hind III 酶切位点。

1.2.3 重组质粒的转染、染色与亚细胞定位的观察

将长满单层的 HeLa 细胞经胰蛋白酶消化、以适当密度接种 96 孔板内，采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h；采用 Xfect™ 转染试剂将重组真核表达质粒转染 HeLa 细胞。转染后 48 h，弃培养基，0.85% 的生理盐水洗涤 1 次，加入 Hoechst 33342 染液、室温孵育 15 min，弃染液、用 0.85% 的生理盐水洗涤 3 次，荧光倒置显微镜下观察荧光蛋白细胞定位，绿色荧光显示为目的蛋白，蓝色荧光为细胞核。

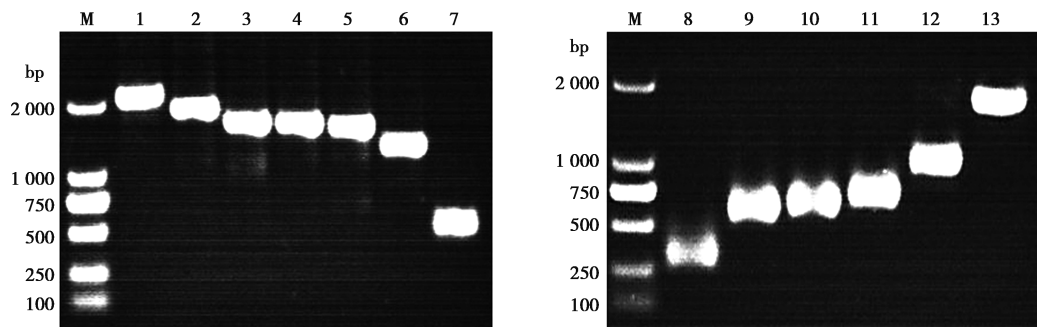
1.2.4 sELF4 和 cELF4 基因的序列比较分析

利用 DNASTar 7.0 对 cELF4 和 sELF4 蛋白的氨基酸序列进行对比分析。

2 结果

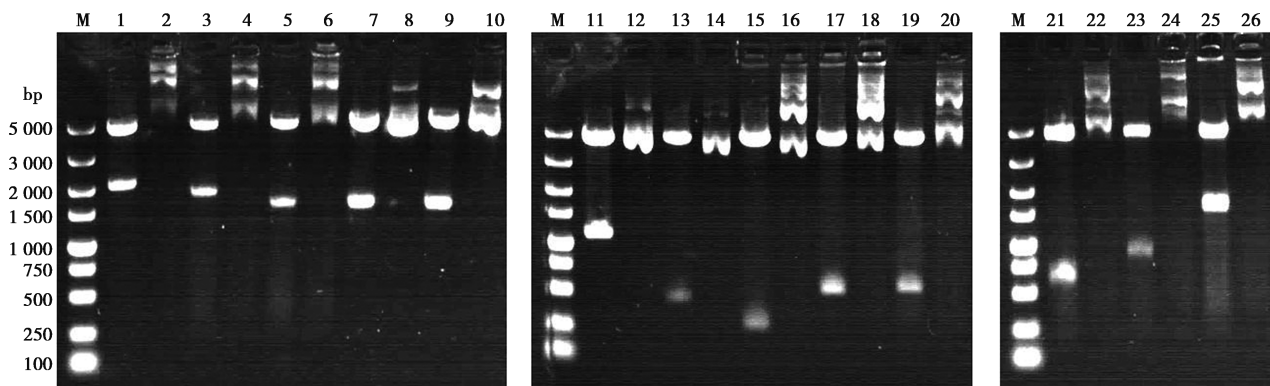
2.1 sELF4 和 cELF4 基因截短片段的真核表达载体的构建

经 PCR 扩增，得到 cELF4 基因的 13 个分子量分别为 1 992、1 734、1 476、1 443、1 386、1 119、441、258、516、549、606、873 和 1 551 bp 的核酸片段（图 2）；克隆至 pEGFP-C1 载体中构建 13 个重组真核表达质粒，双酶切鉴定结果显示，13 个真核质粒均为阳性（图 3）。经 PCR 扩增得到 sELF4 基因的 17 个片段，分子量分别为 1 989、1 731、1 473、1 440、1 404、1 383、1 116、948、438、258、516、549、585、606、873、1 041 和 1 551 bp（图 4）；克隆至 pEGFP-C1 载体中构建 17 个重组真核表达质粒，经双酶切鉴定均为阳性（图 5）。



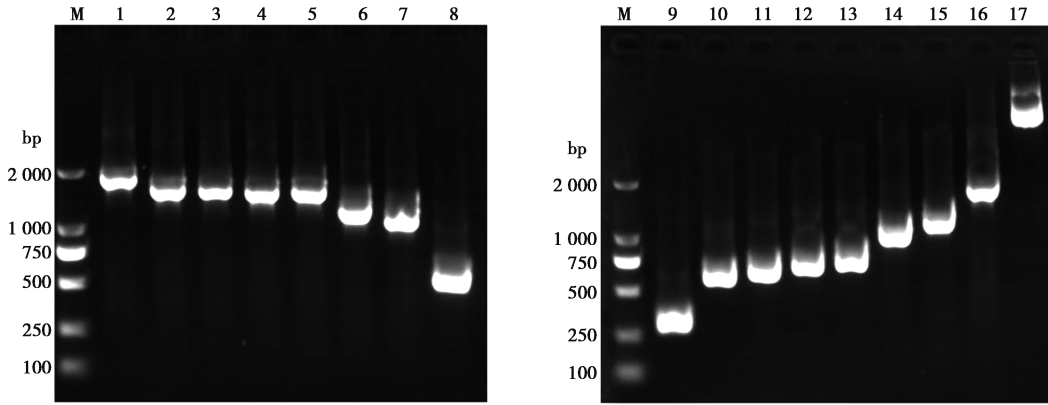
M. DL2000 Marker; 1~13. 分别为 cELF4-1-1992、cELF4-259-1992、cELF4-517-1992、cELF4-550-1992、cELF4-607-1992、cELF4-874-1992、cELF4-1552-1992、cELF4-1-258、cELF4-1-516、cELF4-1-549、cELF4-1-606、cELF4-1-873 和 cELF4-1-1551 的 PCR 产物。

图 2 cELF4 基因片段的 PCR 扩增



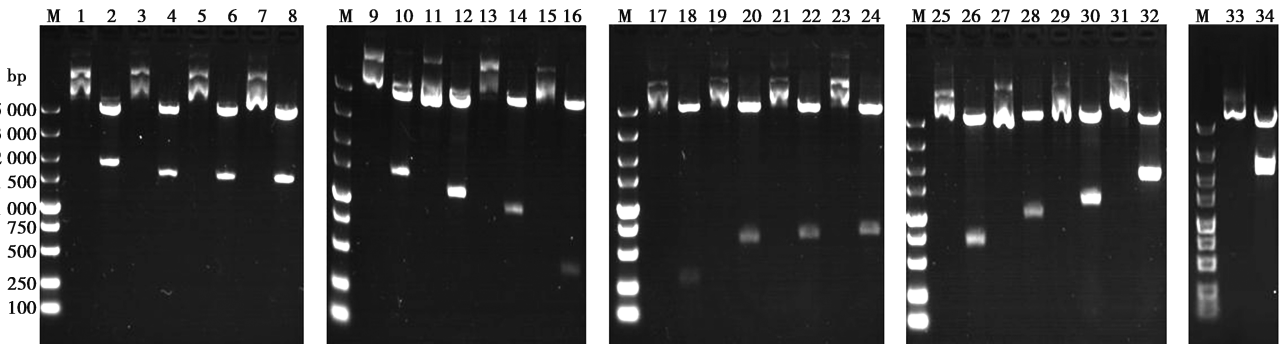
M. DL5000 Marker; 1. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-1992 的双酶切产物; 2. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-1992; 3. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-259-1992 的双酶切产物; 4. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-259-1992; 5. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-517-1992 的双酶切产物; 6. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-517-1992; 7. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-550-1992 的双酶切产物; 8. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-550-1992; 9. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-607-1992 的双酶切产物; 10. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-607-1992; 11. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-874-1992 的双酶切产物; 12. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-874-1992; 13. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1552-1992 的双酶切产物; 14. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1552-1992; 15. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-258 的双酶切产物; 16. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-258; 17. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-516 的双酶切产物; 18. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-516; 19. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-549 的双酶切产物; 20. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-549; 21. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-606 的双酶切产物; 22. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-606; 23. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-873 的双酶切产物; 24. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-873; 25. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-1551 的双酶切产物; 26. 重组质粒 pEGFP-C1-cELF4-1-1551。

图 3 重组真核表达质粒的酶切鉴定



M. DL2000 Marker; 1~16. 分别为 sELF4-259-1989、sELF4-517-1989、sELF4-550-1989、sELF4-586-1989、sELF4-607-1989、sELF4-874-1989、sELF4-1042-1989、sELF4-1552-1989、sELF4-1-258、sELF4-1-516、sELF4-1-549、sELF4-1-585、sELF4-1-606、sELF4-1-873、sELF4-1-1041 和 sELF4-1-1551 的 PCR 产物; 17. pEGFP-C1-sELE4-1-1989 质粒。

图4 sELF4 基因片段的 PCR 扩增



M. DL5000 Marker; 1. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-259-1989; 2. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-259-1989 的双酶切产物; 3. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-517-1989; 4. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-517-1989 的双酶切产物; 5. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-550-1989; 6. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-550-1989 的双酶切产物; 7. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-586-1989; 8. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-586-1989 的双酶切产物; 9. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-607-1989; 10. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-607-1989 的双酶切产物; 11. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-874-1989; 12. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-874-1989 的双酶切产物; 13. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1042-1989; 14. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1042-1989 的双酶切产物; 15. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1552-1989; 16. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1552-1989 的双酶切产物; 17. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-258; 18. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-258 的双酶切产物; 19. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-516; 20. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-516 的双酶切产物; 21. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-549; 22. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-549 的双酶切产物; 23. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-585; 24. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-585 的双酶切产物; 25. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-606; 26. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-606 的双酶切产物; 27. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-873; 28. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-873 的双酶切产物; 29. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-1041; 30. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-1041 的双酶切产物; 31. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-1551; 32. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-1551 的双酶切产物; 33. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-1989; 34. 重组质粒 pEGFP-C1-sELF4-1-1989 的双酶切产物。

图5 重组真核表达质粒的酶切鉴定

2.2 sELF4 和 cELF4 的亚细胞定位

亚细胞定位结果显示, cELF4 的 1~86 aa (1~258 bp)、292~663 aa (874~1 992 bp)、518~663 aa (1 552~1 992 bp) 荧光分布在整个细胞; 1~172 aa (1~516 bp)、1~183 aa (1~549 bp)、1~202 aa (1~606 bp) 荧光分布在细胞质中; 1~291 aa (1~873 bp)、1~517 aa (1~1 551 bp)、1~663 aa (1~1 992 bp)、87~663 aa (259~1 992 bp)、173~663 aa

(517~1 992 bp)、184~663 aa (550~1 992 bp)、203~663 aa (607~1 992 bp) 荧光分布在细胞核中, 1~291 aa (1~873 bp)、203~663 aa (607~1 992 bp) 均定位在细胞核, cELF4 的核定位信号肽分布在 203~291 aa, 292~663 aa (874~1 992 bp) 定位在细胞质和细胞核中均有分布, 且荧光蛋白发生凝聚现象 (如图 6)。

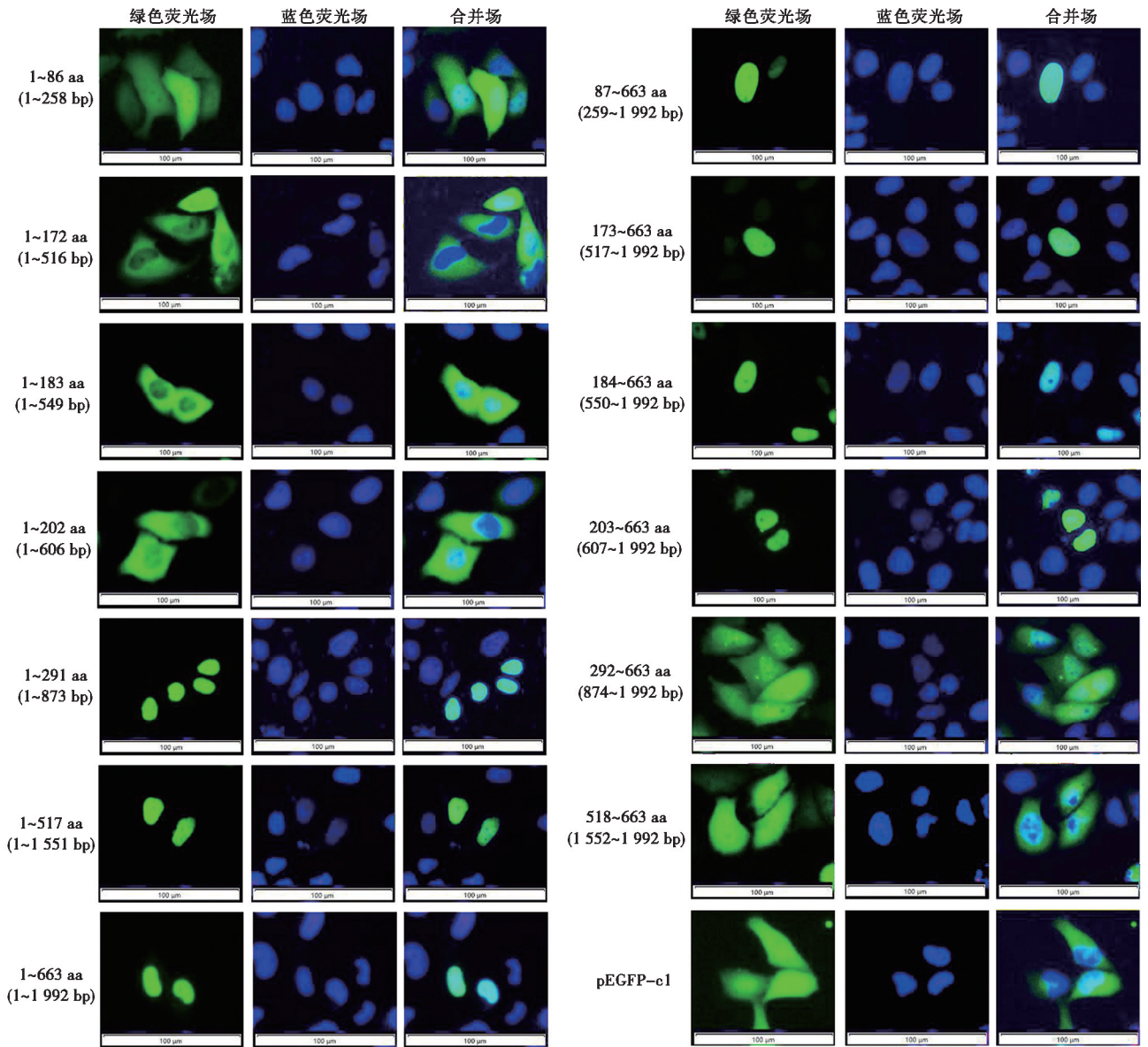


图6 cELF4不同截短片段与EGFP融合表达的亚细胞定位观察(标尺=100 μm)

sELF4的1~86 aa (1~258 bp)、1~202 aa (1~606 bp)、292~662 aa (874~1989 bp)、348~662 aa (1042~1989 bp)、518~662 aa (1552~1989 bp) 荧光分布在整個细胞, 1~172 aa (1~516 bp)、1~183 aa (1~549 bp)、1~195 aa (1~585 bp) 荧光分布在细胞质中, 1~291 aa (1~873 bp)、1~347 aa (1~1041 bp)、1~517 aa (1~1551 bp)、1~662 aa (1~1989 bp)、87~662 aa (259~1989 bp)、173~662 aa (517~1989 bp)、184~662 aa (550~1989 bp)、196~662 aa (586~1989 bp)、203~662 aa (607~1989 bp) 荧光分布在细胞核中, 1~291 aa (1~873 bp)、203~662 aa (607~1989 bp) 均定位在细胞核, sELF4的核定位信号肽分布也在203~291 aa (607~873 bp) (如图7)。

通过对比发现, sELF4的1~202 aa (1~606 bp)

分布在整個细胞中, 在sELF4-585-606之间还存在一段不完全的定位信号肽, 在sELF4 196~291 aa (586~873 bp) 之间有可能存在两个核定位信号肽。cELF4 1~202 aa (1~606 bp) 仅仅分布在细胞质中, 在cELF4 516~606 aa之间还存在一段细胞质信号肽。sELF4 292~662 aa和cELF4 292~663 aa在细胞质和细胞核中均有分布, 且部分荧光蛋白发生凝聚现象。

2.3 sELF4和cELF4基因序列比较分析

氨基酸序列对比分析结果显示(图8), cELF4蛋白和sELF4蛋白的氨基酸序列中第169~303 aa序列完全一致, 说明该区段十分保守。第320~400 aa序列中差异位点相对较多, 共有20个变异位点; cELF4在第357 aa缺失H, 在第70~160 aa共有13个差异位点, sELF4在第116、117位缺失S和A。

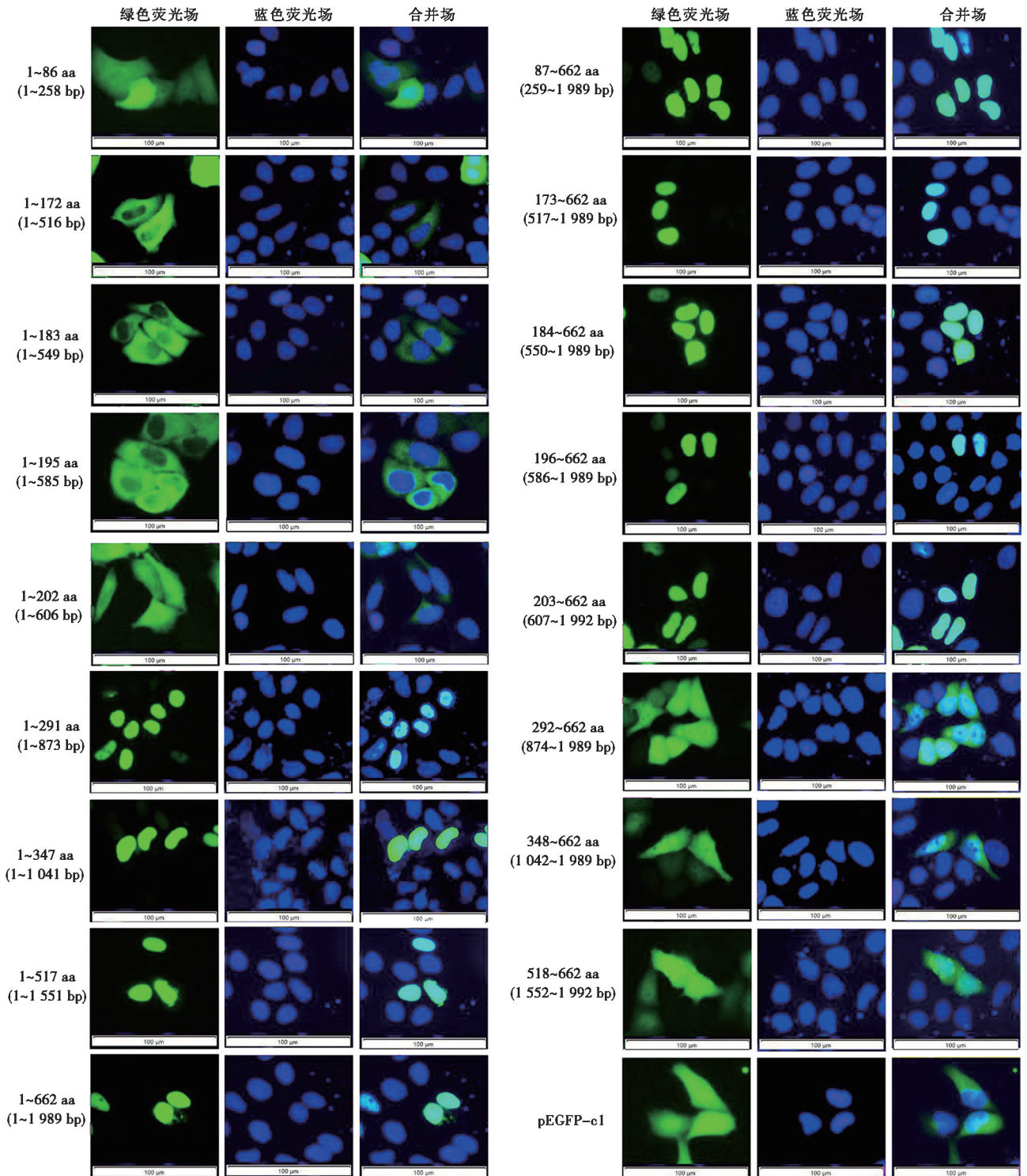


图7 sELF4不同截短片段与EGFP融合表达的亚细胞定位观察(标尺=100 μm)

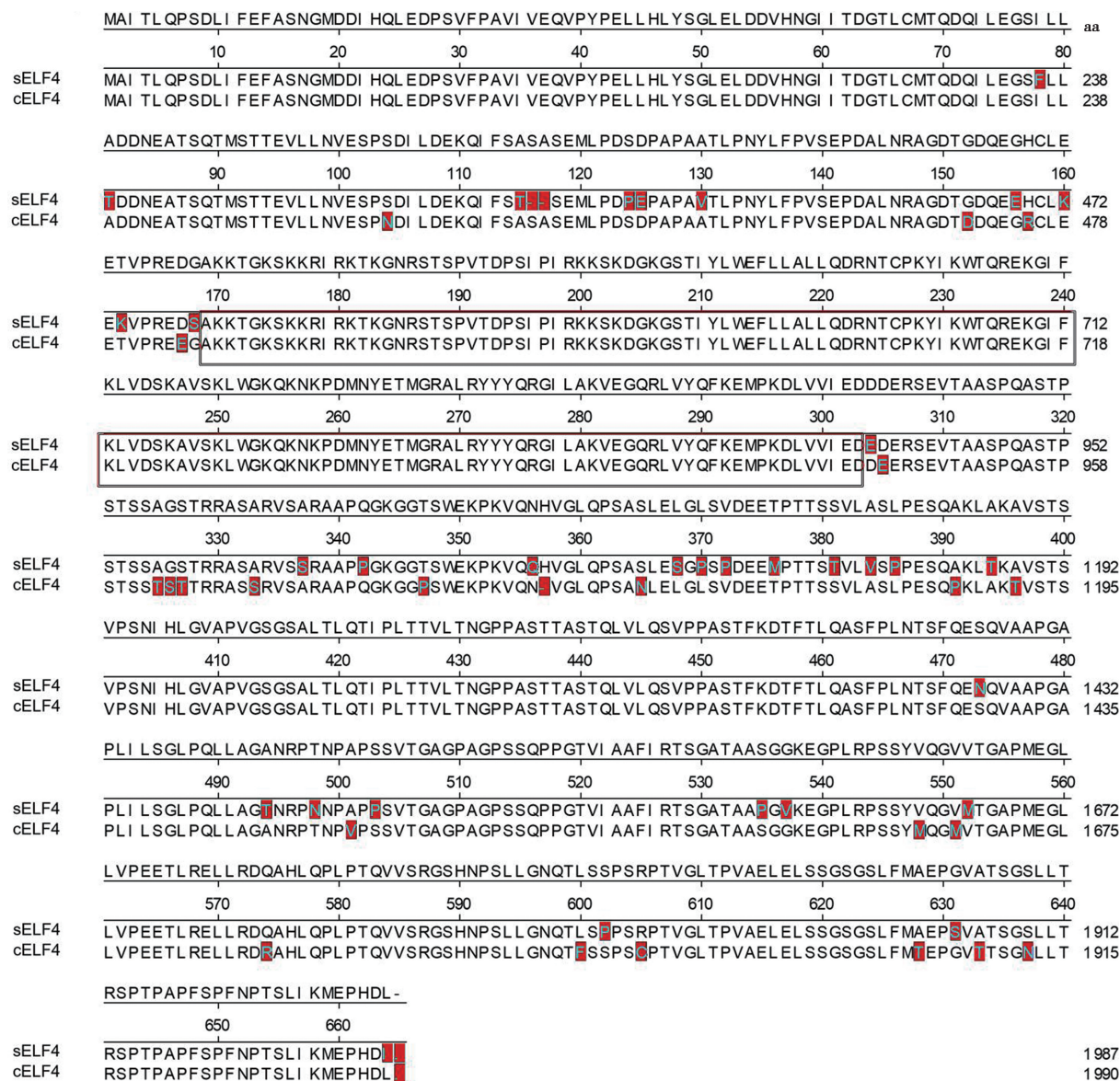
3 讨论

hELF4是近年来新发现的一个在肿瘤发生、发展及肿瘤免疫中至关重要的癌基因^[2]。研究表明,hELF4参与细胞周期的调节^[5],介导成脂成骨细胞的分化^[6],参与DNA损伤修复^[3]。DNA损伤会破坏代谢稳态并引发炎症反应,Shi等^[17]研究发现,hELF4

的敲低增加了4细胞胚胎的DNA损伤,这表明hELF4通过控制基因组完整性进而影响猪的早期胚胎发育。Kosti等^[18]的研究结果表明hELF4是miRNA-转录因子网络的关键组成部分,是胶质母细胞瘤受体信号通路和脂质动态的桥梁调节因子。卫国红等^[19]研究发现,hELF4能促进胰岛素瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡,将其与其他类型肿瘤相比,发现ELF4的功

能具有一定的多样性，在不同类型肿瘤中，由于 hELF4 定位在细胞质或细胞核中而发挥功能的差异性，可能激活不同的信号转导通路，而其原因可能是在细胞内相互结合的关键蛋白因子不同。HeLa 细胞是一种宫颈癌细胞，具有无限增殖潜能，且繁殖速度

快、可连续传代，被广泛应用于肿瘤研究、细胞培养以及生物学试验等。由于其稳定且增殖活性好、外源基因的蛋白表达量高、便于蛋白质的亚细胞定位观察，常用于各类蛋白质定位研究的模式细胞^[19]。



红色背景区代表氨基酸差异区域；无背景色区表示氨基酸保守区域。

图 8 sELF4 氨基酸序列与 cELF4 氨基酸序列对比结果

本研究以 GFP 为报告基因，将重组质粒转染 HeLa 细胞，观察目的蛋白的亚细胞定位，确定了 sELF4 全长蛋白和 cELF4 全长蛋白均定位在细胞核中，这与人 ELF4 蛋白定位一致。cELF4 和 sELF4 的核定位信号分布在 203~291 aa (607~873 bp)，而人 ELF4 包含两个核定位信号分别位于 173~183 aa 和 196~202 aa^[14]，这说明不同种属来源的 ELF4 蛋白的核定位信号肽分布有差异。一般来说，信号肽大概为

16~26 个氨基酸，而本研究发现信号肽分布在 203~291 aa，推测 cELF4 和 sELF4 可能存在多个核定位信号；cELF4 和 sELF4 的亚细胞定位存在差异，在 cELF4-516-606 之间还存在 1 段细胞质信号肽，而 sELF4-516-585 之间存在 1 段细胞质信号肽。此外，发现去除了 N 端核定位信号肽的 sELF4 292~662 aa 和 cELF4 292~663 aa 在细胞质和细胞核中均有分布，且部分荧光蛋白发生凝聚现象，而这一现象在全长蛋

白的表达中并未观察到,推测这种现象可能与蛋白质翻译后折叠、修饰或亲水性发生改变有关。Hamdan等^[20]研究发现,内质网应激会导致胞质蛋白稳态缺陷和蛋白质聚集体的形成。蛋白质构象异常或折叠错误可导致其结合成更大的、不可溶的结构,蛋白质发生聚集^[21],这与应激或衰老条件下的翻译错误、突变或缺乏寡聚组装伴侣有关^[22]。Jamar等^[23]研究发现,在缺乏无义介导的 mRNA 降解、翻译停滞降解和无终止降解的突变体中, mRNA 监测途径的缺失会导致蛋白质聚集增加。喻娇等^[16]研究发现 cELF4 基因 (GenBank No. MZ198105) 与 sELF4 基因 (GenBank No. KU097322) 的氨基酸相似性为 91.8%。本研究利用 DNASTar 7.0 软件对 cELF4 基因编码的氨基酸序列与 sELF4 基因编码的氨基酸序列进行对比分析,发现二者在某特定区域 (169~303 aa) 保守性极高,亚细胞定位试验显示 cELF4 和 sELF4 的核定位信号均分布在 203~291 aa,表明来源于猪和犬的 ELF4 蛋白核定位信号肽高度保守。

综上所述,本研究明确了 cELF4 和 sELF4 基因的信号肽定位序列分布特征,为后续开展基因功能研究提供了依据。

参考文献:

- [1] SZABO A, RAJNAVOLGYI E. Finding a fairy in the forest: ELF4, a novel and critical element of type I interferon responses [J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11 (3): 218-220.
- [2] SZE K M F, HO D W, CHIU Y T, et al. Hepatitis B virus-telomerase reverse transcriptase promoter integration harnesses host ELF4, resulting in telomerase reverse transcriptase gene transcription in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021, 73 (1): 23-40.
- [3] DU H, XIA H, LIU T, et al. Suppression of ELF4 in ulcerative colitis predisposes host to colorectal cancer [J]. *iScience*, 2021, 24 (3): 102169.
- [4] WANG D, ZHANG Z, CUI S, et al. ELF4 facilitates innate host defenses against *Plasmodium* by activating transcription of Pf4 and Ppbp [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294 (19): 7787-7796.
- [5] KOSTI A, DU L, SHIVRAM H, et al. ELF4 is a target of mir-124 and promotes neuroblastoma proliferation and undifferentiated state [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18 (1): 68-78.
- [6] BAEK K, BAEK J H. The transcription factors myeloid elf-1-like factor (MEF) and distal-less homeobox 5 (Dlx5) inversely regulate the differentiation of osteoblasts and adipocytes in bone marrow [J]. *Adipocyte*, 2013, 2 (1): 50-54.
- [7] 卫国红, 王利, 万学思, 等. ELF4 通过激活 Akt 通路促进胰岛素瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41 (9): 1329-1333.
- [8] OKABAYASHI T, SHIMA Y, SUMIYOSHI T, et al. Diagnosis and management of insulinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19 (6): 829-837.
- [9] 刘伟, 朱季军, 王艳, 等. ELF4 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响胃癌细胞的增殖和侵袭 [J]. *华中科技大学学报*, 2021, 50 (1): 33-37.
- [10] WANG Q, ZHANG C, CAO S, et al. Tumor-derived exosomes orchestrate the microRNA-128-3p/ELF4/CDX2 axis to facilitate the growth and metastasis of gastric cancer via delivery of LINC01091 [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39 (2): 519-536.
- [11] YOU F, WANG P, YANG L, et al. ELF4 is critical for induction of type I interferon and the host antiviral response [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14 (12): 1237-1246.
- [12] SUN G, QIU L, YU L, et al. Loss of function mutation in ELF4 causes autoinflammatory and immunodeficiency disease in human [J]. *J Clin Immunol*, 2022, 42 (4): 798-810.
- [13] LIU T, YU H, ZHANG Z, et al. Intestinal ELF4 deletion exacerbates alcoholic liver disease by disrupting gut homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 4825.
- [14] SUICO M A, YOSHIDA H, SEKI Y, et al. Myeloid Elf-1-like factor, an ETS transcription factor, up-regulates lysozyme transcription in epithelial cells through interaction with promyelocytic leukemia protein [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (18): 19091-19098.
- [15] 王瑾, 唐青海, 谷雅静, 等. 猪 ELF4 基因的克隆、蛋白表达及其多克隆抗体制备 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48 (3): 425-435.
- [16] 喻娇, 曹馨, 唐青海, 等. 犬 ELF4 基因原核表达及其卵黄抗体的制备 [J]. *南方农业学报*, 2022, 53 (8): 2359-2372.
- [17] SHI L, ZHAI Y, ZHAO Y, et al. ELF4 is critical to zygotic gene activation and epigenetic reprogramming during early embryonic development in pigs [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 954601.
- [18] KOSTI A, CHIOU J, GUARDIA G D A, et al. ELF4 is a critical component of a miRNA-transcription factor network and is a bridge regulator of glioblastoma receptor signaling and lipid dynamics [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25 (3): 459-470.
- [19] 庞峰, 龙琴琴, 梁绍波. 羊口疮病毒 ORFV113 蛋白的转录动力学、真核表达及亚细胞定位 [J]. *华北农学报*, 2023, 38 (1): 226-231.
- [20] HAMDAN N, KRITSILIGKOU P, GRANT C M. ER stress causes widespread protein aggregation and prion formation [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216 (8): 2295-2304.
- [21] HIPPE M S, PARK S H, HARTL F U. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24 (9): 506-514.
- [22] VENDRUSCOLO M. Proteome folding and aggregation [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2012, 22 (2): 138-143.
- [23] JAMAR N H, KRITSILIGKOU P, GRANT C M. Loss of mRNA surveillance pathways results in widespread protein aggregation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 3894.