

刺参 GPR54-like 受体基因克隆及特征分析

于秋寒¹, 平洪领^{1,2}, 闫允君¹, 史会来², 吕振明¹, 杨静文¹

(1. 浙江海洋大学 海洋科学与技术学院, 国家海洋设施养殖工程与技术研究中心, 浙江 舟山 316022; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316022)

摘要: 采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆了刺参 GPR54-like (*Apostichopus japonicus*, AjGPR54-like, 简称 AjGPR54L)基因 cDNA 全长, 对 AjGPR54L 全长 cDNA 序列进行了生物信息学分析; 通过绿色荧光蛋白(GFP)融合表达, 对其在 HEK293 细胞中进行了亚细胞定位分析; 采用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 AjGPR54L 在组织中的表达。结果表明: 该基因全长 1454 bp, 包含 993 bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码 330 个氨基酸, 191 bp 的 5'非翻译区(UTR)和 270 bp 的 3'-UTR。预测蛋白质的相对分子质量为 37.83 ku、等电点(pI)为 9.81; 预测蛋白序列分析显示 AjGPR54L 具有 GPCR 家族蛋白典型的七次跨膜结构, 包含 1 个预测的 N-连接糖基化位点、5 个 Asn-Xaa-Ser/Thr 序列子和 34 个磷酸化位点, 无信号肽酶切位点; 与已鉴定的 GPR54s 氨基酸序列同源性分析表明, AjGPR54L 与斑马鱼 GPR54 序列相似性最高, 为 30.0%; 共聚焦显微镜检测显示 AjGPR54L-EGFP 可定位于细胞膜表面; 基因表达定量分析结果显示, AjGPR54L 在刺参呼吸树、消化道、体壁、肌肉、神经环中均有表达分布, 且神经环中表达量显著高于其他组织。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); GPR54; 基因克隆; 亚细胞定位; 组织表达

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2018)03-0092-09

DOI: 10.11759/hyhx20171220001

GPR54(G-protein Coupled Receptor 54)是神经肽 Kisspeptin 的专一受体, 通过配体 Kisspeptin 激活后介导细胞信号转导进而行使一系列生理功能。Kisspeptin 属于 RF-酰胺肽家族, 其前体肽由 145 个氨基酸编码组成, 通过不同位点水解酶切, 可形成片段长度不同的酰胺化短肽, 常见活性肽为: Kisspeptin-54 (Kp54)、Kisspeptin-14(Kp14)、Kisspeptin-13 (Kp13)和 Kisspeptin-10(Kp10)等。Lee 等^[1]1996 年首次克隆鉴定了 Kisspeptin 编码基因 KISS-1, 并认为 Kisspeptin 具有明显抑制肿瘤转移的生理功能; 为进一步研究其功能的调控机理, Lee 等^[2]开始关注其受体, 并从鼠脑中克隆得到受体 GPR54; 此后, 人们又鉴定了具有酰胺化末端的 Kisspeptin 神经肽是受体 GPR54 的内源性配体^[3-5]。在后续的 Kisspeptin/GPR54 系统生理功能及临床医学研究中, 该系统在生殖发育调控及青春期启动发育等生理过程中的关键作用得到了进一步揭示^[6]。

近年来, Kisspeptin/GPR54 信号通路的生殖调控研究亦受到了人们的广泛关注并已经建立了完整的理论体系, 目前认为在哺乳动物中其主要作用过程主要有两条: (1)配体 Kisspeptin 通过激活下丘脑

GnRH 神经元表面 GPR54 受体, 介导一系列细胞信号转导, 刺激分泌释放 GnRH, 进而通过 HPG 轴的调控生殖发育启动^[7-9]; (2)刺激垂体 GTH 神经元, 介导细胞信号转导, 调控黄体生成素(LH)和促卵泡素(FSH)分泌, 进而影响生殖行为^[10-11]。同时, 研究表明, 不同动物中 GPR54 所介导的信号转导通路相对保守, 主要通过与 $G_{\alpha q/11}$ 及 $G_{\alpha s}$ 蛋白偶联两条信号途径^[12-13]。然而, 由于进化距离等原因, 有关 Kisspeptin/GPR54 系统的研究主要集中在脊椎动物中, 低等动物中仅有文昌鱼的 Kisspeptin/GPR54 系统有报道^[14], 其他无脊椎动物中尚未证明该系统的存在, 更无相关生理调控功能的报道。

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 属棘皮动物门

收稿日期: 2017-12-02; 修回日期: 2018-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(41606150); 浙江省公益技术基金项目(2017C32074)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41606150; Public Welfare Technical Applied Research Project of Zhejiang Province, No. 2017C32074]

作者简介: 于秋寒(1992-), 女, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学, 电话: 18858384909, Email: 2652047719@qq.com; 通信作者: 杨静文, 博士, E-mail: yangjingwen@zjou.edu.cn

(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirota)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*),属于后口动物,在无脊椎动物中进化地位高^[15]。因此相比其他更为低等的无脊椎动物,刺参中鉴定研究 Kisspeptin/GPR54 系统较为可行。中国的刺参主要分布于辽宁、山东、河北等北方沿海,是中国重要的海水养殖经济动物^[16]。由于刺参具有再生、夏眠、排脏、自溶等较为独特的生理现象,其相关基础研究得到了人们的关注,刺参全基因组测序的完成^[17],为进一步深入探究刺参生物学提供了理论基础。本文利用分子克隆、生物信息学分析、表达载体构建、体外表达等技术,获得了刺参 GPR54-like (*AjGPR54L*)编码基因序列全长,分析了 GFP 荧光蛋白融合表达 *AjGPR54L* 的亚细胞定位以及 *AjGPR54L* 在不同组织的转录表达差异,初步探讨了 GPR54 受体结构与功能特征,以期深入揭示 GPR54 受体在刺参中的功能活性及调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本文所用刺参于 2016 年 4 月取自山东青岛胶南刺参养殖场,采捕刺参时池内水温为 12.35℃,体质量为 79.7 g±4.7 g;低温运至实验室,暂养驯化一周,池内水温控制在 16℃±0.5℃,盐度为 31.0±0.5,24 h 不

间断充气,每天按时定量投喂人工配合饲料;活体解剖获取刺参组织(呼吸树、消化道、体壁、肌肉、神经环、雌性性腺),液氮冷冻保存。

1.2 总 RNA 提取

将上述组织样品从液氮中取出,液氮研磨后取 30 mg 样品,参照 Invitrogen TRIzol Reagent 说明提取获得的总 RNA 样品用琼脂糖电泳检查 RNA 完整性, NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度, RNA 置于-80℃冰箱保存备用。

1.3 刺参 GPR54L 全长 cDNA 扩增

以提取的 RNA 为模版, Oligo-dT 为逆转录引物,使用 Clontech 公司 SMARTScribe Reverse Transcriptase 42℃ 1h 合成 cDNA 第一链,根据转录组基因库中获取的 GPR54 核心序列信息,通过序列分析,使用 primer 5.0 引物设计软件设计 5'RACE 引物和 3'RACE 引物,与试剂盒中的引物结合通过巢式 PCR 扩增 GPR54 基因全长序列的 5'端和 3'端。扩增后的 PCR 产物经琼脂糖电泳后,用 DNA 回收试剂盒 (Axygen)纯化回收后连接到 pMD18-T(TaKaRa)载体上,转化至 *E.coli* DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑选阳性克隆,于 LB 培养基 37℃摇床培养 8~12 h 后提取质粒,送生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序。所用引物序列见表 1。

表 1 用于 *AjGPR54L* 扩增和表达的引物

Tab. 1 Primers used in the amplification and expression of *AjGPR54L*

引物	序列 (5'-3')	功能
5'-outer	TGATAGTGGCCAAGTATCGTTC	<i>AjGPR54L</i> -5' RACE
5'-inner	GTCAGGTCCGAACACGCCAA	
3'-outer	TACCGTCGTTCCACTAGTATTT	<i>AjGPR54L</i> -3' RACE
3'-inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	
<i>AjGPR54L</i> -vec-F	CCCAAGCTTATGGCTGACAACCTG	<i>AjGPR54L</i> -EGFP 载体构建
<i>AjGPR54L</i> -vec-R	CGGGATCCTACAACCTGAGAGCTAAGT	
<i>AjGPR54L</i> -q-F	TACAGAGGTATTTAGCGGATTGACG	<i>AjGPR54L</i> -qRT-PCR
<i>AjGPR54L</i> -q-R	GGTCTTCATCTTCTACTGCCATT	
ACTB-F	AAGGTTATGCTCTTCTCACGC	内参基因
ACTB-R	GATGTCACGGACGATTTACAG	
TUBB-F	CACCACGTGGACTCAAATG	内参基因
TUBB-R	GAAAGCCTTACGACGGAACA	

1.4 *AjGPR54L* 生物信息学分析

为了更准确地了解刺参相关受体的序列特征和系统进化关系,笔者对基因序列以及氨基酸序列进

行了分析(表 2),并将获得的数据进行整理比对。

1.5 哺乳动物表达载体构建

基于 *AjGPR54L* 基因序列特征和表达载体特征,

表 2 生物信息学分析内容及其工具

Tab. 2 Software and websites

分析内容功能与作用	网络平台或软件名称
预测等电点和相对分子量	Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/)
查找糖基化位点(N-X-S/T)	NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)
查找磷酸化位点	NetPhos 2.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)
预测二硫键位置	ScanProsite tool (http://prosite.expasy.org/scanprosite/)
寻找信号肽	SignalP 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)
序列同源性比对分析	NCBI 进行 Blast(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
预测蛋白跨膜结构域	TMHMM Server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)
预测蛋白功能结构域	InterPro (http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html)
预测蛋白三级结构	SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/)
序列多重比较	BioEdit 软件
构建系统进化树	MEGA5.0 软件
预测氨基酸序列	DNAMAN8.0

使用 primer5.0 在线软件设计正向引物(*AjGPR54L-vec-F*)和反向引物(*AjGPR54L-vec-R*)扩增 *AjGPR54L* CDS。使用限制性内切酶 HindIII 和 BamHI 双酶切扩增产物及空白质粒后,将 PCR 扩增产物连接到 pEGFP-N1 表达载体上,经转化扩增提取质粒、双酶切电泳检测为阳性后,测序验证载体准确性,并将构建的载体命名为 *AjGPR54L-EGFP*。

1.6 转染及共聚焦显微镜观察

HEK293 细胞采用 DMEM 高糖完全培养基培养(DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清+1%双抗)。细胞培养在 37℃、5% CO₂、湿度衡定的恒温培养箱中。使用 X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent (Roche)按其说明将 *AjGPR54L-EGFP* 转染至 HEK293 细胞,12~16 h 后,将瞬时转染 *AjGPR54L-EGFP* 的 HEK293 细胞经胰蛋白酶处理后接种于载玻片上。24 h 后,膜荧光探针 DiI 染膜,细胞核染料 DAPI 染核,多聚甲醛固定后封片,置于激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP5II)下检测荧光信号分布情况。

1.7 实时荧光定量 PCR

基于 *AjGPR54L* ORF 序列设计特异性引物(表 1)。以 1.3 中制备的 cDNA 为模板,选择刺参 *β-actin* (ACTB)和 *β-tubulin*(TUBB)作为内参基因^[18],使用 SYBR PrimeScript™逆转录试剂盒在 ABI 7500 Real Time PCR 仪上进行定量扩增,实验重复 3 次。标准曲线和 Ct 值等由 ABI7500 Real Time PCR 仪自带的 ABI7500 Real time PCR System Detection 软件自动完成。使用 2^{-ΔΔCt} 方法测定不同组织 GPR54 基因

的表达量水平^[19-20]。用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one way ANOVA),Duncan 法多重比较检验组间差异的显著性, $P<0.05$ 为差异显著。使用软件 Origin 8.1 绘制柱形图。

2 结果

2.1 *AjGPR54L* cDNA 全长及预测氨基酸序列

克隆获得的 *AjGPR54L* 序列全长为 1454 bp,包含 993 bp 的 ORF(编码 330 个氨基酸)、191 bp 的 5'UTR 和 270 bp 的 3'UTR。预测蛋白质的相对分子质量为 37.83 ku、等电点(pI)为 9.81。通过预测发现 *AjGPR54L* 的氨基酸序列包含:1 个 N-连接糖基化位点,5 个 ASN-XAA-Ser/Thr 序列,1 个细胞外的 N 端结构域(N9),34 个磷酸化位点,包括 13 个丝氨酸(S27、S29、S98、S123、S227、S230、S263、S268、S272、S294、S307、S322、S328)、16 个苏氨酸(T4、T18、T33、T58、T65、T89、T94、T126、T137、T176、T182、T211、T222、T234、T271、T304)和 5 个酪氨酸(Y7、Y125、Y167、Y301、Y303)位点,典型的 7 次跨膜结构,3 个胞外环(EC)和 3 个胞内环(IC)见图 1 和图 2。另外, *AjGPR54L* 具有 GPCR 视紫红质蛋白家族的典型特征,在 IC3 区有 1 个保守的半胱氨酸,1 个典型的 7tm_1 结构域,因此可判断 *AjGPR54L* 属于 GPCR 视紫红质蛋白家族成员。

通过 *AjGPR54L* 氨基酸序列与文昌鱼、斑马鱼、小鼠、人等已鉴定活性功能的 GPR54 氨基酸序列的多序列比对分析发现, *AjGPR54L* 与斑马鱼 GPR54a

```

1      ttattgatttccgaataactgaagcgatcgactgggagtatagttcacttattgttc
61     gcaatcgaaagtctaccatattgttgatatacggggtataaactccatctcaatttcag
121    cggtttgtgcttatttaaattgtttgtttctatattgagtgatactgacgactctgatc
181    aaggttataaaATGGCTGACACACCTGCCTATTTCAATGATACAGAGGTATTAGCGGAT
1      M A D T P A Y F N D T E V F S G
      ▲
241    TGACGTATTTTCGTA CTGTTTCGATTATCTGGAAGTATCCTCTTCACCCTTATTGCGA
17     L T Y F S Y C F D L S G S I L F T L I A
      TM1 (30-51)

301    TTGTTGGTATTGTGGCCAATGGATTGGTTATTATATGGTTGCGAAACACGCACAACCTC
37     I V G I V A N G L V I Y M V A K H A Q L

361    GGACTCCTATGAATTACTTCATCACTCATCTAGCGGCAGCCGATCTGATTCTGCTATTGC
57     R T P M N Y F I T H L A A A D L I L L F
      TM2 (62-87)

421    TACTGGTAGTACCACGGGATGTCAACTTTTTTACGACTTGGAAAGATATTACATACCGTG
77     V L V V P R D V N F F T T W K I F T Y R

481    CATCTCTTATTGTAATACAGTATATCCAACATATTTGCATACAGGCCACTGCCCTGATCT
97     A S L I V I Q Y I Q H I C I Q A T A L I
      TM3 (108-129)

541    TAGCCATCATGTCTATATCGCGGTACACCATGGTAGTCCTCCCCCTCAAAGCCAAGGCAG
117    L A I M S I S R Y T M V V L P L K A K A

601    AGTGGACCGTACGTAGAGTATGGATGTGCTGTGGTGCAGCTTGGATATTGTCTGTGCTGC
137    E W T V R R V W M C C G A A W I L S V L
      TM4 (143-166)

661    TGTATATCCAGTGGCCTGTGGCATACTTTACATGAAAAATGCCGACAACCAGCCTACCC
157    L Y I P V A C G I L Y M K N A D N Q P T

721    CCATACGAGTCGAAACCAAGATATTTGCCGCCCTCAAGCTGGTCTTCATCTTCCTACTGC
177    P I R V E T K I F A A L K L V F I F L L
      TM5 (190-212)

781    CATCTCTGTGATTGTATTTTGCTACAGCAAATCATTCTAACCTTTAGGAGGGGAAGAT
197    P F S V I V F C Y S K I I L T F R R G R

841    ACAAACTGAAGCGCACCGCCAACATTGACTCTGATCGCAGTGATGATCAAACGCGCAAAC
217    Y K L K R T A N I D S D R S D D Q T R K

901    TCGCGGCATGGTCCCTTGTGATTATCTGATCTTTTCTTCAGTTGGGCGCCAATCCAGG
237    L A R M V L V I I L I F F F S W A P I Q
      TM6 (240-258)

961    GTTACCAGACGCGGTTATCCTGCAGAGGCACTCCCTTCCACATCGCCGGCTAATTGGA
257    G Y Q T R L S C R E H S L P T S P A N W

1021   AGACGATAGTCATTCTCGGATCTTTTTCGCTGTTCGCCTACTTGGGTAGTGCTATTA
277    K T I V I L G F F F R L F A Y L G S A I
      TM7 (278-303)

1081   ACCCATTCATTTACGCTTACACAAATCCGAGTTTCAAACGACTTAACATGTTGAGAATCA
297    N P F I Y A Y T N P S F K R L N M F R I

1141   GGAAAATGCCTGATCTGTAGCGCACTTAGCTCTCAGTTGTAGaaagtctgtaccaagt
317    R K M P D S V A T L S S Q L *

1201   ttgggtaccaagcgttattgctcttgcctatgtgaattacgtgtgagttatagactcaaaa
1261   gccagcagatattgtaaacacagttgagcattgtgactaggtattgataacctataga
1321   ttgcctggtagccttagttogatgtgacacttgaatgtataacactgtatataattgg
1381   gtatgtgtatattgatactgacattaaatcaaatgtcttacaataatgtgacagtatcgaa
1441   aaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 刺参 *AjGPR54L* 编码基因 cDNA 全长及预测氨基酸序列

Fig. 1 *AjGPR54L* cDNA sequence and deduced amino acid sequence

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG), 终止密码子用*标出; 表示糖基化位点; 表示磷酸化位点; 灰色表示 Asn-Xaa-Ser/Thr 序列子; 下划线表示跨膜区; 左边的数字表示核苷酸和氨基酸的位置

The initiation codon (ATG) and the termination codon (TGA) are marked with *; the N-glycosylation sites are highlighted in , the phosphorylation sites are labeled in ; Asn-Xaa-Ser/Thr-sequences are highlighted in grey; the seven transmembrane domains (TM1-TM7) are indicated by the black underline; the numbers on the left refer to the position of the nucleotides and the amino acids

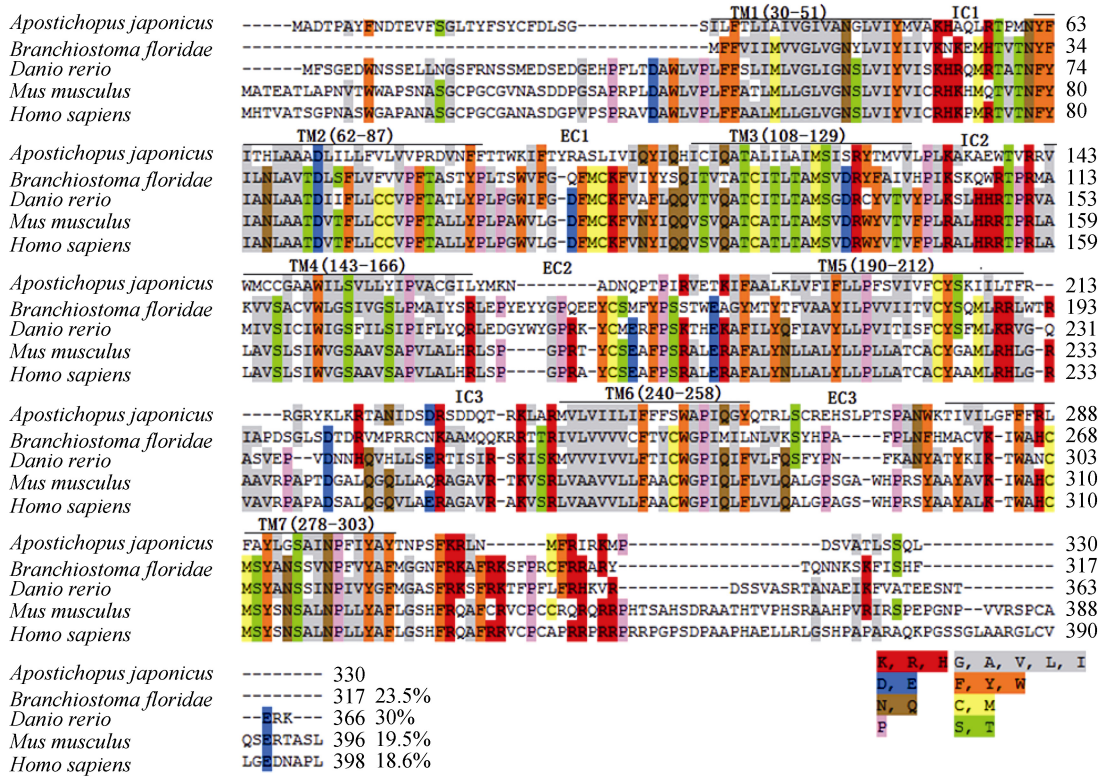


图 2 *AjGPR54L* 与多物种 GPR54 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of the deduced *AjGPR54L* amino acid sequence with other species

左侧物种名称及相应的登录号分别为: *Branchiostoma floridae*-文昌鱼(XP002611682.1)、*Danio rerio*-斑马鱼(NP001099149.2)、*Mus musculus*-小鼠(NP444474.1)、*Homo sapiens*-人(NP115940.2)。TM1-7 分别表示 7 个跨膜结构区, IC1-3 及 EC1~3 分别表示 3 个胞内环和 3 个胞外环。图中右侧 23.5%, 30.0%, 19.5%, 18.6% 分别代表 *AjGPR54L* 与文昌鱼、斑马鱼、小鼠、人 GPR54 的序列相似性

Species are listed on the left side of the figure and mentioned here with their Genbank accession numbers as follows: *Branchiostoma floridae* (XP002611682.1), *Danio rerio* (NP-001099149.2), *Mus musculus* (NP444474.1), and *Homo sapiens* (NP115940.2). The seven transmembrane domains (TM1-TM7) are marked with a black horizontal line above the sequence alignment. The three extracellular (EC) and the three intracellular (IC) rings are shown above the sequence alignment. The values 23.5%, 30%, 19.5%, and 18.6% listed on the right side of the figure represent the sequence similarity of *AjGPR54L* with *B. floridae*, *D. rerio*, *M. musculus*, and *H. sapiens*, respectively

同源性最高, 为 30.0%, 而且与胞外 N 端和 C 端相比, 7 次跨膜结构域相对比较保守(图 2)。利用 Predict-Protein 网络平台预测了 *AjGPR54L* 的二级结构及其蛋白结合位点, 同时用 SWISS-MODEL 结构预测软件, 以 Protein Data Bank 中的 5gli.1.A 片段为模板, 加入人工矫正, 预测获得 *AjGPR54L* 的三维结构图(图 3)。

2.2 *AjGPR54L* 序列系统进化树

为了探究 *AjGPR54L* 和其他物种 GPR54 之间的进化关系, 本研究从 Genbank 数据库中选取 21 条不同物种的 GPR54 氨基酸序列(包括预测信息), 用 MEGA 5.0 软件以最大似然法构建系统进化树(图 4)。通过 BLAST 同源搜索, 发现根据 cDNA 序列预测的刺参 *AjGPR54L* 首先与预测的紫球海胆 GPR54 聚为

一支, 再与文昌鱼 GPR54L-1 聚为一支, 并与脊椎动物 GPR54s 相距较远。

2.3 *AjGPR54L*-EGFP 在 HEK293 细胞中的亚细胞定位

为分析 *AjGPR54L* 亚细胞定位, 本文将构建的 *AjGPR54L*-EGFP 的融合表达质粒瞬时转染至 HEK293 细胞, 24 h 后, DiI 染膜, DAPI 染核, 多聚甲醛固定后封片, 置于激光共聚焦扫描显微镜观察。观察结果显示: 细胞成功转染 *AjGPR54L*-EGFP, 可见明显的绿色荧光信号, 且分布在细胞膜上, 与 DiI 红色荧光重叠(图 5)。这一结果表明 HEK293 细胞中表达的 *AjGPR54L* 受体蛋白定位于细胞膜, *AjGPR54L*-EGFP 蛋白中 C-末端 EGFP 标记不影响 *AjGPR54L* 表达。

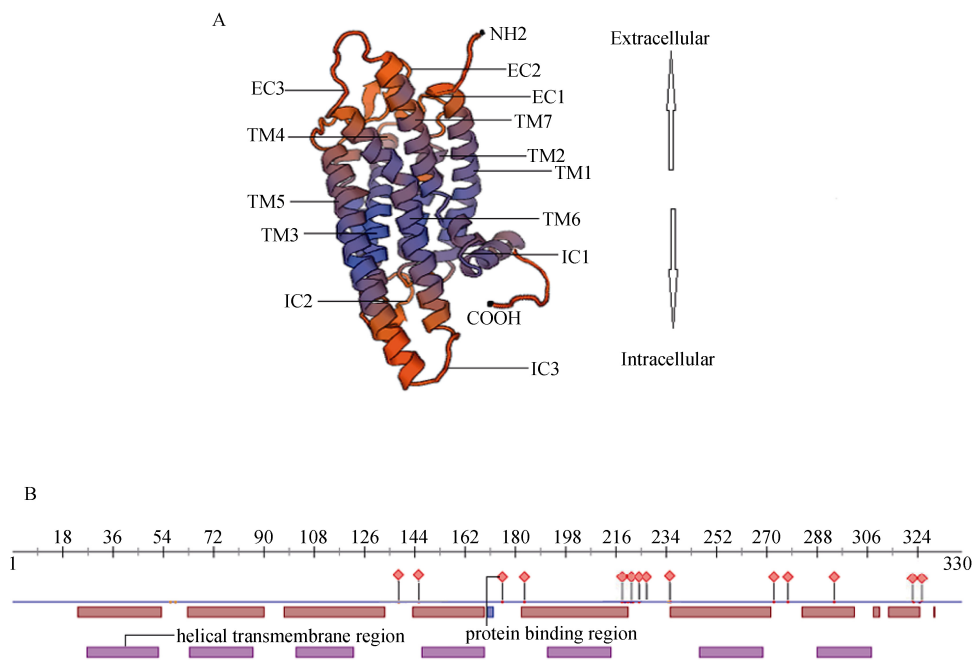


图 3 预测的 *AjGPR54L* 的结构和各结构域

Fig. 3 Predicted *AjGPR54L* protein structure and the respective domains

A. 预测的 *AjGPR54L* 蛋白 3D 结构和 7 次跨膜区, 3 个胞外环, 3 个胞内环; B. *AjGPR54L* 蛋白结合位点和跨膜区

A. Predicted 3D structure of the *AjGPR54L* protein. Seven transmembrane domains (TM1–TM7), three extracellular (EC) rings, and three intracellular (IC) rings are marked. B. *AjGPR54L* protein binding domain and transmembrane region

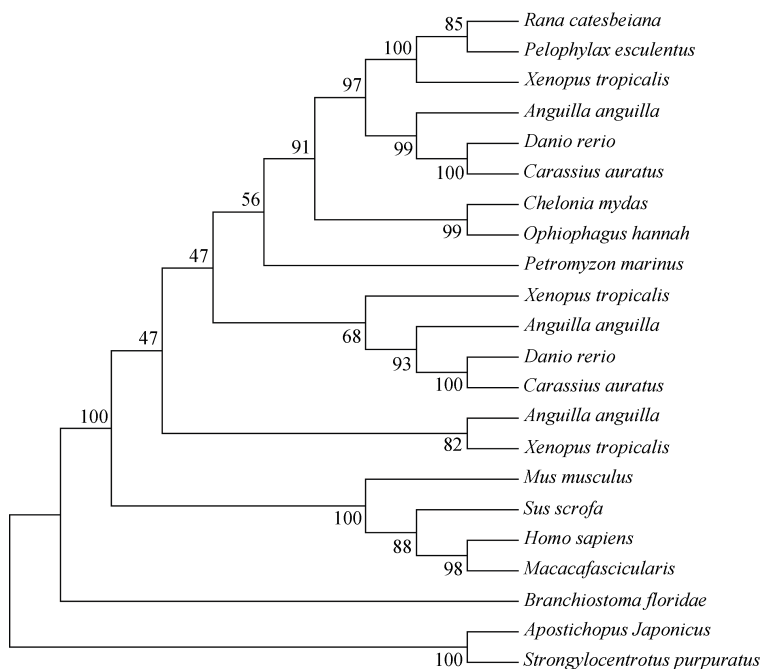


图 4 刺参 GPR54 和其他物种 GPR54 氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the GPR54 amino acid sequences between *Apostichopus japonicus* and other species

GPR54s 氨基酸序列登录号为: *Apostichopus japonicus* GPR54-like: MG199220; *Strongylocentrotus purpuratus* GPR54: XP_784787.2; *Homo sapiens* Kiss1r: NP_115940.2; *Branchiostoma floridae* GPR54L-1: XP_002611682.1; *Danio rerio* GPR54a: NP_001099149.2; *Danio rerio* GPR54b: NP_001104001.1; *Sus scrofa* Kiss1r: NP_001038089.1; *Petromyzon marinus* Kissr: ALF99945.1; *Mus musculus* Kiss1r: NP_444474.1; *Macaca fascicularis* Kiss1r: AEM36046.1; *Carassius auratus* GPR54a: ACK77792.1; *Carassius auratus* GPR54b: ACK77793.1; *Anguilla anguilla* Kiss1r: CCH26286.1; *Anguilla anguilla* Kissr2: CBV36798.1; *Anguilla anguilla* Kissr3: CCH26287.1; *Chelonia mydas* GPR54: EMP23809.1; *Xenopus tropicalis* Kiss1r: NP_001163985.1; *Xenopus tropicalis* GPR54-1b: NP_001165295.1; *Xenopus tropicalis* GPR54-1a: NP_001165296.1; *Pelophylax esculentus* GPR54: AGE31953.1; *Rana catesbeiana* GPR54: ACD44939.1; *Ophiophagus hannah* GPR54: ETE67150

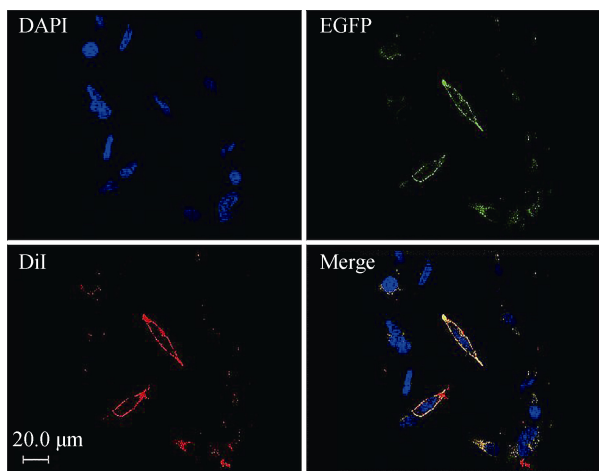


图 5 融合表达蛋白 *AjGPR54L-EGFP* 在 HEK293 细胞中的亚细胞定位

Fig. 5 Confocal microscopy of HEK293 cells expressing the *AjGPR54L-EGFP*

细胞膜和细胞核分别用 DiI(红色)和 DAPI(蓝色)染色
Cells were stained with a membrane plasma probe (DiI) and a nuclei probe (DAPI)

2.4 *AjGPR54L* 的组织表达

用实时荧光定量 PCR 方法,以刺参 *ACTB* 和 *TUBB* 为内参基因,对基因表达量进行校正,检测成体刺参 *GPR54* 基因在刺参呼吸树、消化道、体壁、肌肉、神经环、雌性性腺中的定量表达,结果(图 6)表明:*AjGPR54L* 在刺参不同组织中均有表达但表达量存在差异,在神经环中表达量显著高于其他组织;在呼吸树、消化道、体壁、肌肉及雌性性腺中表达量差异不显著。

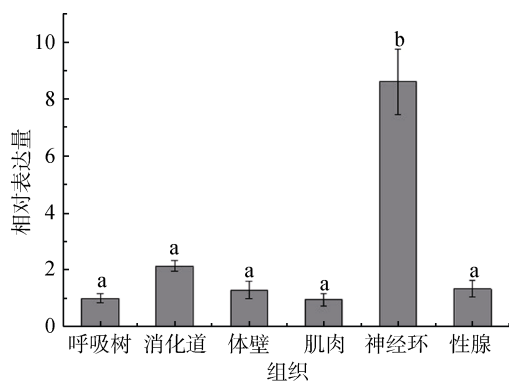


图 6 *GPR54* 在刺参不同组织中的相对表达量

Fig. 6 The relative expression of *GPR54* in different tissues in *Apostichopus japonicus*

采用实时定量 PCR 定量检测,表达量经多内参基因 *ACTB* 及 *TUBB* 几何平均值进行均一化处理。肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 数值为均值 \pm 标准误, 样品量为 6

The mRNA expression levels relative to geometric averaging of *ACTB* and *TUBB* mRNA levels were measured using real-time PCR. Values with different superscript letters indicate significant difference ($P < 0.5$). Values indicate the mean \pm SD ($n = 6$)

3 讨论

本文克隆得到的刺参 *GPR54* cDNA 序列编码一个 330 个氨基酸的成熟蛋白。对所编码的氨基酸结构域进行分析表明, *AjGPR54L* 具有 7 个典型的 GPCR 家族跨膜结构, 属于视紫红质蛋白家族成员。另外, 预测其含有 1 个潜在的 N-连接糖基化位点、5 个 Asn-Xaa-Ser/Thr 序列子和 34 个磷酸化位点, 这些位点可能参与调节蛋白质运输、定位、功能及信号转导等^[21]。进一步的多序列比对分析表明: 与其他物种的 *GPR54* 蛋白序列相比, *AjGPR54L* 蛋白序列具有一定保守性, 尤其是在跨膜区。但与不同物种 *GPR54* 的 N 端和 C 端区域相似性较低, 可能与不同物种中对不同内源配体的结合特性不同及胞内信号转导相关因子结构差异相关。

GPCRs 是众多生物调控及基础医学研究的重要研究对象, 目前研究已建立了许多 GPCR 超家族受体蛋白的三维结构、配体结合过程以及胞内信号转导的介导过程等研究模型^[22-23]。 *GPR54* 属于 GPCR 超家族受体蛋白, 通过结合激动剂 kisspeptin, 进一步激活胞内偶联的 G 蛋白并介导信号转导^[12]。本研究利用生物信息学方法建立了 *AjGPR54L* 三维结构模型并分析了它的二级结构, 预测了其蛋白结合位点, 这些结合位点可能对 *GPR54* 与 Kisspeptin 配体结合及胞内信号因子相互作用相关。

G 蛋白偶联受体位于细胞膜上, 具有 7 次跨膜结构, 通过感受细胞外的分子以激活胞内的信号转导通路。 *AjGPR54L* 的细胞膜定位对其功能活动至关重要, 本文发现其主要在细胞膜表达, 这表明所表达的 *AjGPR54L-EGFP* 细胞膜定位特性与 7 次跨膜的蛋白质三维结构特征一致, 且证明其 C-末端融合表达的 EGFP 不影响 *AjGPR54L* 的表达及亚细胞定位。从而为进一步查明该受体与其配体之间的相互作用、以及阐明信号转导与调控机制提供了基础。

在脊椎动物中, Kisspeptin/*GPR54* 系统主要行使生殖调控等生理功能^[6, 24-25]。人体的青春发育启动直接受到 Kisspeptin/*GPR54* 系统的 HPG 轴的调控影响^[26], 而 *GPR54* 受体基因表达主要分布于多个神经组织, 以接受 Kisspeptin 神经元分泌调控。但研究亦发现 *GPR54* 受体基因在胰脏等外周组织中亦有较高的表达分布^[3], 说明 Kisspeptin/*GPR54* 系统亦可能参与了其他生理功能的调控, 这种 *GPR54* 受体基因的表达分布模式在鼠等其他哺乳动物中亦有类似发现^[27-28]。

本文通过 qRT-PCR 分析, 表明 *AjGPR54L* 在刺参多组织中广泛表达并存在明显差异, 神经环中表达显著高于其他组织。神经环是刺参的重要神经器官, *AjGPR54L* 在神经环中的高水平表达, 与已报道的脊椎动物中 GPR54 的表达有相似之处, 但该基因是否参与某些神经元调控并通过神经内分泌系统调节某些生理过程, 尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lee J H, Miele M E, Hicks D J, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [2] Lee D K, Nguyen T, O'Neill G P, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors[J]. *FEBS Lett*, 1999, 446: 103-107.
- [3] Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, et al. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34631-34636.
- [4] Muir A I, Chamberlain L, Elshourbagy N A, et al. AXOR12, a Novel Human G Protein-coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(31): 28969-28975.
- [5] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. *Nature*, 2001, 411(6837): 613.
- [6] De R N, Genin E, Carel J C, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(19): 10972-10976.
- [7] Thompson E L, Murphy K G. Modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by selective ligands of the KISS1R[J]. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2010, 11(4): 432-439.
- [8] Javed Z, Qamar U, Sathyapalan T. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis-current perspective[J]. *Endokrynologia Polska*, 2015, 66(6): 534.
- [9] Gottsch M L, Cunningham M J, Smith J T, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(9): 4073-4077.
- [10] Saito H, Sawada T, Yaegashi T, et al. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats[J]. *Animal Science Journal*, 2012, 83(6): 487-492.
- [11] Gopurappilly R, Ogawa S, Parhar I S. Functional Significance of GnRH and Kisspeptin, and Their Cognate Receptors in Teleost Reproduction[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2013, 4(24): 24.
- [12] Castaño J P, Martínez-Fuentes A J, Gutiérrez-Pascual E, et al. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity[J]. *Peptides*, 2009, 30(1): 10-15.
- [13] Pampillo M, Camuso N, Taylor J E, et al. Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and beta-arrestin[J]. *Molecular Endocrinology*, 2009, 23(12): 2060.
- [14] Wang P, Wang M, Ji G, et al. Demonstration of a Functional Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in Amphioxus With Implications for Origin of Neuroendocrine Regulation[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(5): 1461-1473.
- [15] 廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
Liao Yulin. *Zoology, Echinoderma, Holothuroidea* [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [16] 常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增养殖业现状、存在问题与展望[J]. *水产科学*, 2006, 25(4): 198-201.
Chang Yaqing, Sui Xilin, Li Jun. Current situation, existing problems and prospects of *Apostichopus japonicus* breeding[J]. *Aquatic Science*, 2006, 25(4): 198-201.
- [17] Zhang X, Sun L, Yuan J, et al. The sea cucumber genome provides insights into morphological evolution and visceral regeneration[J]. *Plos Biology*, 2017, 15(10): e2003790.
- [18] Wang T, Yang Z, Zhou N, et al. Identification and functional characterisation of 5-HT4 receptor in sea cucumber *Apostichopus japonicus*(Selenka)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40247.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D, 2001. 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.
- [20] Breukelen F V, Krumschnabel G, Podrabsky J E. Vertebrate cell death in energy-limited conditions and how to avoid it: what we might learn from mammalian hibernators and other stress-tolerant vertebrates[J]. *Apoptosis An International Journal on Programmed Cell Death*, 2010, 15(3): 386.
- [21] Arnold J N, Wormald M R, Sim R B, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins[J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25(25): 21.
- [22] Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 103(1): 21-80.
- [23] Katritch V, Cherezov V, Stevens R C. Structure-fun-

- ction of the G protein-coupled receptor superfamily[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2013, 53: 531-536.
- [24] Saito H, Sawada T, Yaegashi T, et al. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats[J]. Animal Science Journal, 2012, 83(6): 487-492.
- [25] Funes S, Hedrick J A, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2003, 312(4): 1357-1363.
- [26] Roux N D, Genin E, Carel J, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(19): 10972-10976.
- [27] Hauge-Evans A C, Richardson C C, Milne H M, et al. A role for kisspeptin in islet function[J]. Diabetologia, 2006, 49(9): 2131-2135.
- [28] Dudek M, Kołodziejcki P A, Pruszyńska-Oszmałek E, et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats[J]. Neuropeptides, 2016, 56: 41-49.

Molecular cloning and characterization of GPR54-like receptor in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*

YU Qiu-han¹, PING Hong-ling^{1, 2}, YAN Yun-jun¹, SHI Hui-lai², LÜ Zhen-ming¹, YANG Jing-wen¹

(1. National Engineering Research Center for Facilitated Marine Aquaculture, Marine Science College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316022, China)

Received: Dec. 2, 2017

Key words: *Apostichopus japonicus*; GPR54; gene cloning; subcellular localization; transcriptional expression

Abstract: In this study, a novel GPR54-like gene from *Apostichopus japonicus* was cloned using RACE technology, and then bioinformatics analysis was performed. The *AjGPR54L* gene was fused with the green fluorescent protein (GFP), and its subcellular localization in HEK293 cells was evaluated. The mRNA expression level in multiple tissues of the sea cucumber was also quantified. Results showed that the full-length cDNA of *AjGPR54L* was 1, 454 bp, which contained an open reading frame (ORF) of 993 bp, encoding 330 amino acid (aa) residues, a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 191 bp, and a 3'-UTR of 270 bp. The molecular weight of the protein was predicted to be 37.83 ku, and the isoelectric point (pI) was 9.81. Sequence analysis of the predicted protein showed that *AjGPR54L* had seven transmembrane domains, containing one predicted N-linked glycosylation site, five Asn-Xaa-Ser/Thr sequences, and 34 phosphorylation sites, but no signal peptide cleavage site. The homology analysis of multiple sequence alignment revealed that *AjGPR54L* had the highest similarity to zebrafish GPR54 (30.0%). Confocal microscopy demonstrated the cell membrane localization characteristic of *AjGPR54L*-EGFP. *AjGPR54L* exhibited a ubiquitous expression in *A. japonicus*, and a significantly higher level of *AjGPR54L* transcription was detected in the nerve ring than in other tissues such as the respiratory tree, intestine, body wall, muscle, and ovary.

(本文编辑: 梁德海)