

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)促性腺激素释放激素(GnRH)基因的鉴定、特征及成熟期的表达研究*

吴俊虹 曹子豪 郑利兵 迟长凤

(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技术研究中心 海洋生物种质发掘与利用国家地方联合实验室
舟山 316022)

摘要 促性腺激素释放激素(GnRH)在脊椎动物的繁殖过程中起着至关重要的作用,同时也存在于许多无脊椎动物中。利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆出曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)促性腺激素释放激素(命名为 *SjGnRH*, KP 982885.1)。*SjGnRH* 基因的 cDNA 全长 710 bp, 开放阅读框(ORF)为 273 bp, 编码 90 个氨基酸, 包括一条含有 31 个氨基酸的信号肽、12 个氨基酸的 GnRH 多肽和 44 个氨基酸的 GnRH 相关肽(GAP); *SjGnRH* 与剑尖枪乌贼(*Uroteuthis edulis*)和真蛸(*Octopus vulgaris*)的同源性分别为 86.7%和 73.3%; *SjGnRH* 高度保守的十二肽与剑尖枪乌贼和真蛸的 *octGnRH* 相似度达 100%, 其信号肽的相似性分别为 66.7%和 54.8%, GAP 区的相似性分别为 95.5%和 77.3%; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)结果显示, *SjGnRH* 基因在成熟期的表达具有特异性, 在脑中表达量最高, 且与其他组织差异显著($P < 0.05$); 采用原位杂交技术检测 *SjGnRH* mRNA 在脑内的表达模式, 结果表明: *SjGnRH* 在食道神经团、食道下神经团和视叶的不同部位均有表达, 暗示 *SjGnRH* 可能参与曼氏无针乌贼的生殖调控作用。

关键词 曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*); 神经肽; 促性腺激素释放激素(GnRH); 生殖调控

中图分类号 Q789; S931; S968 doi: 10.11693/hyh20210400083

促性腺激素释放激素(GnRH)主要由下丘脑神经元合成和分泌, 调节下丘脑-垂体-性腺轴, 参与控制许多脊椎动物和无脊椎动物的生殖过程(Gottsch *et al.*, 2004; Chaiyamoorn *et al.*, 2020)。无脊椎动物的 GnRH 与脊椎动物的 GnRH 在结构和功能上同源, 参与调节生殖相关功能, 包括卵巢成熟和产卵(Tinikul *et al.*, 2014; Chaiyamoorn *et al.*, 2020)。脊椎动物的 GnRH 可刺激促性腺激素的产生和分泌(Ma *et al.*, 2020), 且对性别分化的开始和整个生殖过程都至关重要(Counis *et al.*, 2005)。脊椎动物中的 GnRH 主要分为三种类型: GnRH-I、GnRH-II 和 GnRH-III, 且在同一个物种中 GnRH 可有多种形式(Chang *et al.*, 2018)。GnRH-I 存在于鸟类、两栖动物和鱼类中, 包括哺乳动物形式

(mGnRH)和各种鱼类特有的形式, 如 *cfGnRH*、*hrGnRH*、*mdGnRH*、*sbGnRH* 和 *wfGnRH*。GnRH-I 存在于视前区(POA)和下丘脑的神经元中(Selvaraj *et al.*, 2012); GnRH-II 存在于所有脊椎动物中, 主要表达部位集中在中脑区域(Schneider *et al.*, 2008); GnRH-III 仅存在于硬骨鱼中, 集中表达在嗅球、末梢神经节和 POA 的神经元中(Kah *et al.*, 2007)。在七鳃鳗中的 *lGnRH-I* 和 *lGnRH-III* 一开始被分为 GnRH-IV 型(Nozaki *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2004), 但后来分析证明, 其与 GnRH-II 和 GnRH-III 有共同的祖先, 因此不再被归类为 GnRH-IV 型(Decatur *et al.*, 2013); GnRH-V 目前仅包含软体动物的两种类型, 分别为真蛸(*Octopus vulgaris*)分离出的 *octGnRH*, 以及海蜗牛

* 国家自然科学基金项目, 31872547 号; 浙江省自然科学基金项目, LY20C190007 号。吴俊虹, 硕士研究生, E-mail: wu2964061429@hotmail.com

通信作者: 迟长凤, 博士, 教授, E-mail: chcf@zjou.edu.cn

收稿日期: 2021-04-07, 收修改稿日期: 2021-05-14

(*Aplysia californica*)分离出的 *ap*GnRH (Zhang *et al*, 2008), 其主要表达在中枢神经系统与外周神经系统中(陈蕾等, 2003), *oct*GnRH 还可刺激真蛸的卵巢和精巢产生睾酮、孕酮和雌二醇(Kanda *et al*, 2006)。有趣的是, 所有脊椎动物的 GnRH 亚型都是十肽(Zhou *et al*, 2012), 而 *oct*GnRH 是十二肽, *ap*GnRH 是十一肽(Tsai *et al*, 2010)。GnRH 除参与软体动物生殖外, 还影响其基本生理活动, 如心率、脂肪代谢和行为等(Tsai, 2018)。

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)曾是东海具有较高经济价值的四大海产之一。自 20 世纪 70 年代以来, 由于过度捕捞和环境变化, 资源逐渐衰减, 因此, 发展人工养殖具有重要意义。然而, 在人工养殖过程中, 人们发现该物种出现性早熟现象(Cao *et al*, 2016)。因此, 本研究首次克隆曼氏无针乌贼 *GnRH* 基因的全长, 并分析该基因在不同组织中表达的特异性和在脑中的表达位置, 旨在为曼氏无针乌贼的人工繁育提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验样品

成熟时期曼氏无针乌贼采自浙江舟山东极岛曼

氏无针乌贼养殖基地, 体重为 80—120 g。乌贼饲养温度 23—25 °C, 盐度 28—30, 光照周期为光照 14 h, 黑暗 10 h, 定时投喂虾, 2 次/d。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

用 0.1%乙醇将乌贼麻醉 5—10 min, 解剖取脑、鳃、心脏、肌肉、肝脏、卵巢、缠卵腺、副缠卵腺和精巢组织, 放至液氮速冻, -80 °C 保存备用。采用 Trizol 法提取组织总 RNA (TaKaRa), 采用 PowerScript 逆转录酶 (TaKaRa)合成第一链 cDNA, 42 °C 反应 90 min 后使用 NucleoSpin 柱(TaKaRa)进行纯化。

1.3 *SjGnRH* 基因全长克隆

根据真蛸 (BAB 86782.1) 和剑尖枪乌贼 (*Uroteuthis edulis*, BAH 09303.1)序列设计兼并引物 *GnRH-F/GnRH-R* (表 1), 扩增反应按照本实验室的前期工作进行, 并稍做改动(Cao *et al*, 2016)。根据引物 *GnRH-F/GnRH-R* 扩增出来的核心序列设计用于 cDNA 末端快速扩增(RACE)的特异性引物, 5'-RACE 和 3'-RACE 操作均根据 Firstchoice RLM-RACE 试剂盒(Ambion)的说明书进行, 然后将 PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体(Bio Basic), 并送至生工生物工程(上海)公司进行测序。

表 1 *GnRH* 基因克隆引物信息
Tab.1 The primers used in *GnRH* gene clone

引物	序列(5'—3')
<i>GnRH-F</i>	CAGACNCAAGCACARAAYTA
<i>GnRH-R</i>	TYTCTATCAAAGCYTTTGT
5'- <i>GnRH</i> -outter	TTACCACCAGGGTGCCATCC
5'- <i>GnRH</i> -inner	TTGCTAAATGGTAATTCTG
3'- <i>GnRH</i> -outter	AGGAAATCACTCGTATAATT
3'- <i>GnRH</i> -inner	AATTACTACATGTACCAATA
M13-F	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC
5'RACE Adapter	GGCCAGGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGG
5'RACE Outer Primer	ACUACUACUAGGGGCGTCGACGTA
5'RACE Inner Primer	ACUACUACUAGGGGCGTCGA
3'RACE Adapter	GCGAGCACAGAATTAATATTTTTTTTTTTT
3'RACE Outer Primer	GCGGATCCGAATTAATACGACT
3'RACE Inner Primer	GCGAGCACAGAATTAATACGACT

1.4 *SjGnRH* 基因生物信息学分析

以 Premier 5.0 设计核心片段扩增引物和 RACE 引物; NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找序列的开放阅读框(ORF); 运用软件 DNAMAN 8.0 将 *SjGnRH* 基因的 cDNA 序列翻译

成氨基酸序列, 并用 Laser gene 软件(DNAStar, Inc., Madison, Wisconsin, USA)分析 cDNA 序列。使用生物序列分析中心 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)的 SignalP 4.1 鉴定潜在的信号肽及信号肽切割位点; 通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

预测其蛋白结构域；多序列比对分析通过 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>)完成；ExPASy ProtParam Server (<http://web.expasy.org/protparam/>)用来预测蛋白的理化性质如蛋白分子量(MW)及等电点(pI)；Phylogeny.fr Gblocks 0.91b Server (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks)提取待建树氨基酸序列的保守区间。利用软件 MEGA-X 根据推导的氨基酸序列进行最大似然法进化树的构建。

1.5 qRT-PCR 检测 *SjGnRH* 基因表达

qRT-PCR 使用 SYBR PreMix Ex TaqTM II 试剂盒 (TaKaRa), 按照 7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 的说明书进行, 反应体系和反应条件参考本实验室先前的工作积累进行 (Cao *et al.*, 2016), 选用曼氏无针乌贼 *β-actin* (JN564496.1) 作为内参基因。

1.6 原位杂交检测 *SjGnRH* 基因 mRNA 在脑中的表达

原位杂交插入片段为 *SjGnRH* 基因 cDNA 中位于第 49—305 位的核苷酸, 将其克隆至 pSPT 18 质粒, 再以 *EcoR* I 和 *Hind* III 将质粒线性化, 用 SP6/T7 Dig RNA 标记试剂盒 (Roche Diagnostics) 引入地高辛标记正、反义 RNA 探针, 样品处理和操作流程按照我们

实验室先前的工作稍有改动 (Cao *et al.*, 2016)。

1.7 数据分析

用 2^{-ΔΔCt} 法分析 *SjGnRH* 在 mRNA 水平的表达, 所有数据均与心脏的 mRNA 表达水平进行对比, 结果以平均值±标准差 (S.D.) ($n=3$), 数据分析采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 然后进行 *t* 检验, 显著性由 $P<0.05$ 表示。

2 实验结果

2.1 *SjGnRH* 基因的鉴定及特性分析

SjGnRH 基因 (KP 982885.1) 的 cDNA 全长为 710 bp, 包含 273 bp 的 ORF、86 bp 的 5'-非编码区 (UTR) 以及 352 bp 的 3'-UTR (图 1); *SjGnRH* MW 为 10.1 kDa, 预测 pI 为 7.71; BLASTn 分析结果表明, *SjGnRH* 与剑尖枪乌贼和真蛸的序列具有较高的相似性; 预测的 *SjGnRH* 蛋白序列包括 31 个氨基酸的信号肽、高度保守的十二肽和 44 个氨基酸的 GnRH 相关肽 (GAP); 在十二肽的 C 末端之后存在一个切割位点 (GKR, Gly-Lys-Arg), 这表明酰胺化发生在翻译后的加工过程中。

1	ACTTACTTTCTCTCATCCCTCGAAGAAGACAAAGACAGTTGAAATCTCCATCATCAGGTAAACATCTACCAGC
76	CAGTATAATCATGTCACCACTGCACCTCTGTCACACTTGAGAAAAATGGCCTTTCTCACCTGTGCCATTCTCTCT
1	M S T A L S S N L R K M A F L T C A I L L
151	CCTGTCCTTCTGCATGCAAAATACAAGCAGAGAATTACCATTTTAGCAATGGATGGCACCCCTGGTGGTAAACGAAG
23	L S F C M Q I Q A Q N Y H F S N G W H P G G K R S
226	TGGACTTCCAGACATGCAGTGTCAATTCAGACCCCAACAAAAGCTTTGATCGAGAACTCTTAGACGAGGAAAT
48	G L P D M Q C H F R P Q T K A L I E K L L D E E I
301	CACTCGTATAATTACTACATGTACCAATACAGTCAATGACATTCAGACTTGCAGTACTTACACAGGTCAAGC
74	T R I I T T C T N T V N D I A D L Q *
376	AAATTCACCTGGATATGCAACCACCAATAAACTGACCAAGCTGGAAGGCTAACATTCACAGAAAAAGATCAA
451	CTTTATGATTTTAAATTTGATAAAACCAAGACAAATTTCTTATATATATATATATATATATATATATATATA
526	TATATATAACACACCTGCTGAACAGAACTGTCAAAACACTGTAATATACAGAGCTATATATGTAGATCATA
601	GGACTTTTATATGATATTACTTATATATTCATTATAATATCATGAATAAAAGTTAAACCTAAAAAATGGT
676	GATTTCTGTACAAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1 *SjGnRH* 基因的序列分析

Fig.1 Sequence analysis of the *GnRH* gene in *S. japonica*

注: 预测的 N-末端信号肽用黑色下划线表示。预测的跨膜区域用灰色阴影表示, 预测的磷酸化位点用红色线框标记。预测的起始密码子 (ATG)、终止密码子 (TGA) 和多聚腺苷酸信号 (AATAAA) 用黑色线框标记。序列中所含的 GnRH 的十二肽以红色字体标出, 碱性切割位点以绿色字体标出, C 末端酰胺化甘氨酸以蓝色字体标出。GnRH 相关肽 (GAP) 以虚线标出

2.2 *SjGnRH* 基因的同源性和系统发育分析

将预测的 *SjGnRH* 氨基酸序列与不同物种的 GnRH 氨基酸序列在 ClustalW2 网站上进行了比对 (图 2), 所用序列的 GenBank 登录号分别如下: 曼氏无针乌贼 (KP 982885.1)、真蛸 (BAB 86782.1)、剑尖枪乌贼 (BAH 09303.1)、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*, ARE

30281)、澳大利亚绿边鲍 (*Haliotis laevigata*, AKR 13997.1)、美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*, XP 022319572.1)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*, ADZ 17180.1)、虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*, XP 021347551.1) 和法螺 (*Charonia tritonis*, AQS 80512.1)。对比结果表明, 预测的 *SjGnRH* 与剑尖枪

▼ <i>Sepiella japonica</i>	MSTTALSSNLRKMAFLTCAILLLSFCMQIQAQNMHFSNGWHFPGKRSGL.....PDMQCHFRPQTKALIEKLLD	69
<i>Octopus vulgaris</i>	MSATASTSSRKMAFFIFSMILLSLCLQTQAQNMHFSNGWHFPGKRSAL.....SDIQCHFRPQTKALIEKILD	69
<i>Uroteuthis edulis</i>	MSTSPVTSTLRRMVFLTCAIFLLSLCMQTAQNMHFSNGWHFPGKRSGL.....PDMQCHFRPQTKALIEKLLD	69
<i>Haliotis discus hannai</i>	MSVLSRQGVTVSVLLLLLVHAGVGGQNMHFSNGWHFAGKRRGG.....DSTSCVFRKDI LMLVNLKIM	62
<i>Haliotis laevis</i>	MSVLSRQGVTVSVLLLLLVHAGVGGQNMHFSNGWHFAGKRRGG.....DSTSCVFRKDI LMLVNLKIM	62
<i>Crassostrea virginica</i>	MKVSPCTQVIVMVLTLG..LLCEVHAQNMHFSNGWHFPGKRS.....YKACTVRPEIRSI LFKIIE	58
<i>Crassostrea gigas</i>	MKVSPCTQVIVMVLTLG..LLCEVHAQNMHFSNGWHFPGKRS.....YKACTVRPEIRSI LFKIIE	58
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MSSYTQILVAQLLLAGLLVAVVSGQNMHFSNGWHFPGKRRAPMM.....TSGTQLCSFRPHIKALLWIE	64
<i>Charonia tritonis</i>	.MSTSRITVPSTMVALLAAVILLALGLTVQGNMHSNGWHFPGKRRGNALNKATFYRSITTENLCRYKPRVLSVINKLIQ	79
<i>Sepiella japonica</i>	EEIIRITITCTN..TVNDIADLQ.....	90
<i>Octopus vulgaris</i>	EEINRIITCTG..PVNEIADL.....	89
<i>Uroteuthis edulis</i>	EEIIRITITCTN..TVNDIADLQ.....	90
<i>Haliotis discus hannai</i>	DESSRVAHRCQN..GVPHMDFTEPDTVEADSANQLTDKRWK.....	101
<i>Haliotis laevis</i>	DESSRVAHRCQN..AVPHMDFTEPDTVEADSDGQLTDKRWK.....	101
<i>Crassostrea virginica</i>	DEVBRIQKCSNS..NMEDVFSLIQEK.SAVDGRM.....	90
<i>Crassostrea gigas</i>	DEVBRIQKCSHS..NIEDVFSLIQEK.TGVDAREV.....	90
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	DEVKRIKSCGS..GYDDIINLLQSKQGLPLSSGMPSDSQ.....	103
<i>Charonia tritonis</i>	EEIARMERSCSSEEPINHLKLMEGSPFHSAAETRQKLEEVAEDEDAMNK	131

图2 曼氏无针乌贼与其他物种的 GnRH 氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple alignments of the deduced amino acid sequences of GnRH from *S. japonica* and other species

注: 序列中相同的氨基酸用黑色表示, 保守序列标记为灰色

乌贼和真蛸中的相似度分别为 86.7%和 73.3%; *SjGnRH* 高度保守的十二肽与剑尖枪乌贼和真蛸的 *octGnRH* 有 100%的相似性, 其中, 信号肽区的相似性分别为 66.7%和 54.8%, GAP 区的相似性分别为 95.5%和 77.3%。

软体动物 GnRH 的氨基酸序列如图 3 所示。头足类物种之间有高度保守的序列和结构上的相似性。到目前为止, 已在三种双壳纲海洋贝类长牡蛎(Bigot *et al*, 2012)、虾夷扇贝(Nagasawa *et al*, 2015b)和菲律宾

蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) (Song *et al*, 2015)中发现了 *invGnRH*, 这些研究表明, 神经节内存在以下两种形式的 *invGnRH* 肽: *invGnRH* 12 aa-OH 和 *invGnRH* 11 aa-NH₂。

为确定 *SjGnRH* 的进化位置, 利用脊椎动物和无脊椎动物的 GnRH 前体蛋白序列, 以最大似然法构建了系统发育树(图 4)。分析结果表明, *SjGnRH* 与无脊椎动物 GnRH 聚在一起, 且与拟目乌贼(*Sepia lycidas*)、虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*) GnRH 的亲缘关系较近。

	Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Chordata	<i>Homo sapiens</i>	pQ	—	—	H	W	S	Y	G	L	R	P	G	amide
	<i>Gallus gallus-I</i>	pQ	—	—	H	W	S	Y	G	L	Q	P	G	amide
	<i>Rana dybowskii</i>	pQ	—	—	H	W	S	Y	G	L	W	P	G	amide
	<i>Clarias macrocephalus</i>	pQ	—	—	H	W	S	H	G	L	N	P	G	amide
	<i>Oncorhynchus keta</i>	pQ	—	—	H	W	S	Y	G	W	L	P	G	amide
	<i>Gallus gallus-II</i>	pQ	—	—	H	W	S	H	G	W	Y	P	G	amide
	<i>Petromyzon marinus-II</i>	pQ	—	—	H	W	S	H	G	W	F	P	G	amide
	<i>Sepiella japonica</i> ▼	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	H	P	G	amide
Mollusca	<i>Sepia lycidas</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	H	P	G	amide
	<i>Sepia pharaonis</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	H	P	G	amide
	<i>Octopus vulgaris</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	H	P	G	amide
	<i>Uroteuthis edulis</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	H	P	G	amide
	<i>Sepia officinalis</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	K	S	G	amide
	<i>Lottia gigantea</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	Q	P	G	amide
	<i>Crassostrea gigas</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	Q	P	G	amide
	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	Q	P	G	amide
	<i>Patinopecten yessoensis</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	Y	A	—	amide
	<i>Aplysia californica</i>	pQ	N	Y	H	F	S	N	G	W	N	P	G	amide
Annelida	<i>Ruditapes philippinarum</i>	pQ	S	Y	H	F	S	N	G	W	N	P	G	amide
	<i>Capitella teleta</i>	pQ	A	Y	H	F	S	H	G	W	F	P	G	amide
Arthropoda	<i>Helobdella robusta</i>	pQ	S	I	H	F	S	R	S	W	Q	P	G	amide
	<i>Procambarus clarkii</i>	pQ	N	H	H	F	S	L	G	W	K	P	—	amide
Echinodermata	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	pQ	V	H	H	R	F	S	G	W	R	P	G	amide

图3 不同种类 GnRH 与氨基酸序列对比图(验证或推导)

Fig.3 Amino acid sequences of representative notochord GnRH and non-chord GnRH molecules (validation or derivation)

注: 黄色表示在大多数动物中高度保守的氨基酸, 灰色表示更为保守的氨基酸

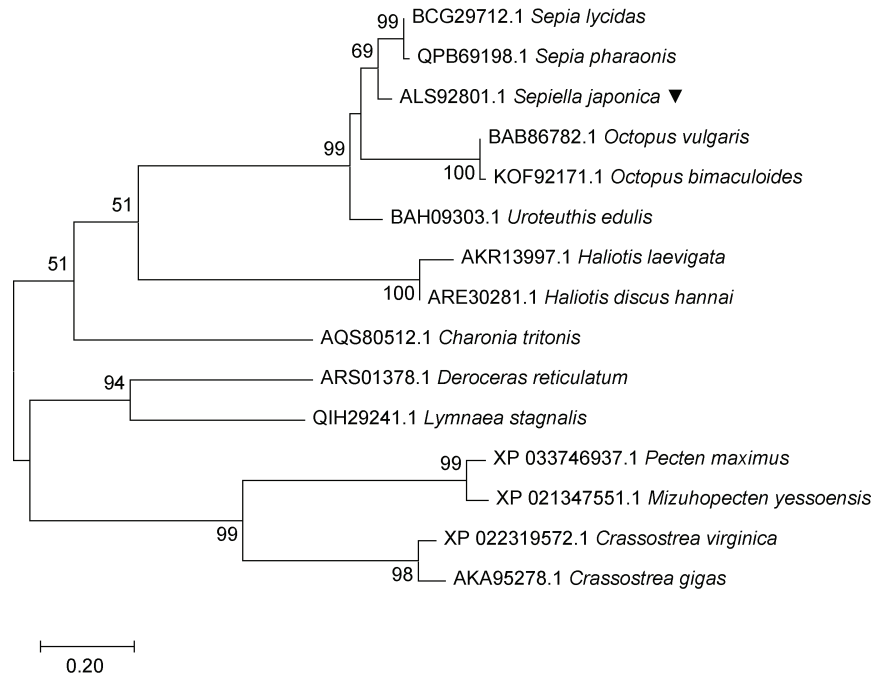


图4 *SjGnRH* 的氨基酸序列与其他物种的 GnRH 氨基酸序列通过最大似然法构建系统进化树

Fig.4 The phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood method between the amino acid sequence of *SjGnRH* and the amino acid sequence of GnRH of other species

2.3 *SjGnRH* 在不同性别曼氏无针乌贼组织中的表达分布

SjGnRH 在曼氏无针乌贼不同性别组织中的表达模式如图 5 所示。实验结果表明, *SjGnRH* 在不同性别的组织中均有表达, 但表达水平不同; 其中, 在雌性和雄性的脑中表达量较高, 与其他组织表达水平呈显著性差异($P < 0.05$)。

2.4 *SjGnRH* 基因 mRNA 在脑组织中的定位

如图 6 所示, *SjGnRH* mRNA 阳性信号广泛存在于大脑中, 当与正义探针(阴性对照)杂交时, 没有检

测到明显的信号(图 6a); 乌贼的大脑由三个主要部分组成: 食道上神经团、食道下神经团和视叶(于新秀等, 2011); *SjGnRH* 特异性表达存在于食道上神经团的多个区域, 且主要在胞体表达, 表达最强的是脑亚脚叶和亚垂直叶(图 6b), 其次是下额叶(图 6c)和后基底叶(图 6d), 而最弱的表达出现在前基底叶; 在食道下神经团(图 6e), 三个形态不同的区域(前、中、后区)均有阳性表达。其中, 在食道下神经团前部, 腕叶呈阳性染色; 在食道下神经团中部, 足叶呈阳性染色; 在食道下神经团后部, *SjGnRH* 主要表达在巨细胞叶和

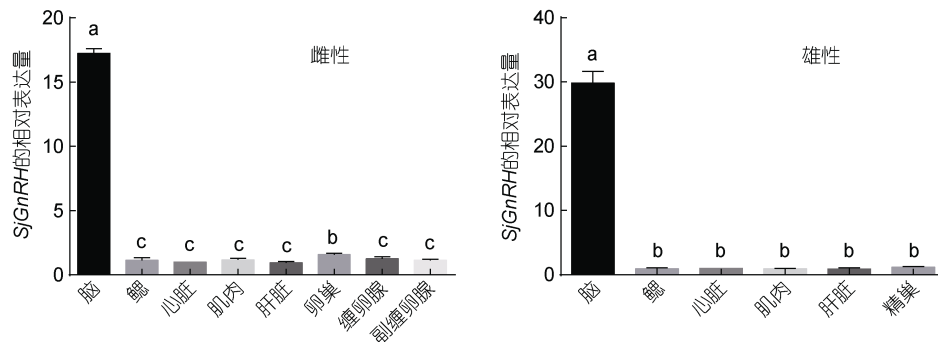


图5 *SjGnRH* 基因 mRNA 在不同曼氏无针乌贼组织中的分布

Fig.5 Distribution of *SjGnRH* mRNA in various *S. japonica* tissues

注: 以心脏表达水平作为参考值。结果以平均 $\pm$ 标准差(S.D.)($n=3$)表示, 分别分析在雌性与雄性不同组织中的表达含量, 包括脑、鳃、心脏、肌肉、肝脏、卵巢、输卵管和精巢。以 β -actin 作为内参基因, 对组织表达量进行 LSD(Least significant Difference)多重比较, 图中的 a、b 和 c 代表组织表达量之间存在显著性差异($P < 0.05$)

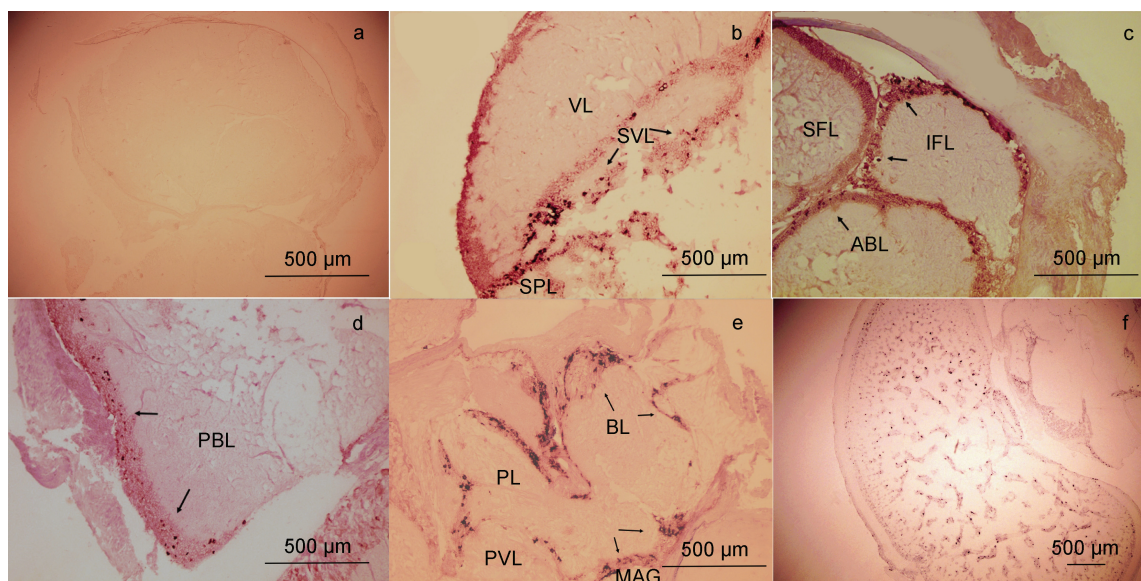


图 6 *SjGnRH* 基因 mRNA 在脑组织的原位杂交

Fig.6 The expression of *SjGnRH* mRNA in the brain

注: a. *SjGnRH* 正义探针对照图; 反义探针组: b. 亚垂直叶; c. 下额叶; d. 后基底叶; e. 食道下神经团; f. 视叶。阳性信号以黑色箭头标出。

VL. 垂直叶; SVL. 亚垂直叶; SPL. 脑亚脚叶; SFL. 上额叶; IFL. 下额叶; ABL. 前基底叶; PBL. 后基底叶; BL. 腕叶; PL. 足叶; PVL. 外套内脏叶; MAG. 巨细胞叶

外套内脏叶; *SjGnRH* 探针在视叶的髓质中(图 6f)也出现阳性信号, 而在视腺或嗅叶中未见阳性表达。

3 讨论

3.1 *SjGnRH* 基因的鉴定及分析

SjGnRH 的 cDNA 全长为 710 bp, 包含 273 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 90 个氨基酸, 其信号肽由 31 个氨基酸组成, 具有高度保守的十二肽, GAP 序列为 44 个氨基酸; 在十二肽的 C 末端之后存在一个切割位点(GKR, Gly-Lys-Arg), 这与脊椎动物相似, 表明酰胺化发生在翻译后的加工过程中, 无脊椎动物促性腺激素释放激素活性的 C 末端结构可能是保守的(Onitsuka *et al*, 2009)。

根据预测的 *SjGnRH* 氨基酸序列与其他物种多序列比对的结果, 我们认为 *SjGnRH* 在成熟肽区高度保守, 但在 N 端信号肽和 C 端 GAP 区表现出变异; ClustalW 分析表明, *SjGnRH* 的氨基酸序列与剑尖枪乌贼和真蛸中的 GnRH 分别有 86.7%和 73.3%的相似性, 信号肽区的相似性分别为 66.7%和 54.8%, GAP 区的相似性分别为 95.5%和 77.3%; 且 *SjGnRH* 高度保守的十二肽与剑尖枪乌贼和真蛸的 *octGnRH* 有 100%的相似性; 进化树结果显示: *SjGnRH* 与真蛸和剑尖枪乌贼的 GnRH 聚于一类, 与海兔(*Ovula ovum*)、

网纹野蛞蝓(*Deroceras reticulatum*)等腹足纲的亲缘关系较远, 其中与真蛸 GnRH 的亲缘关系比剑尖枪乌贼 GnRH 的更近。这表明在曼氏无针乌贼中克隆的 *SjGnRH* 属于仅存在于软体动物中的 GnRH-V 类型, 且属于其中的 *octGnRH*。对枪乌贼(*Loligo bleekeri*)脑内的 GnRH 神经元进行免疫组织化学分析, 观察到两种类型的 GnRH 神经元, 表明在枪乌贼脑中至少存在两种类型的 GnRH 神经系统(Amano *et al*, 2008); 在双壳动物中发现了两种 GnRH 多肽, 即十一肽和十二肽, 如长牡蛎(Bigot *et al*, 2012; In *et al*, 2016)、虾夷扇贝(Nagasawa *et al*, 2015a, b), 这些数据进一步表明, 在无脊椎动物同一物种中可能存在不同形式的 GnRH, 在曼氏无针乌贼中是否存在多种形式的 GnRH 还需进一步证明。

3.2 *SjGnRH* 在不同性别组织中的表达分布与组织定位

qRT-PCR 结果表明, *SjGnRH* 在曼氏无针乌贼的雌性脑、卵巢和雄性脑中均表达显著, 这一结果与其他头足类动物相似。对商乌贼(*Sepia officinalis*)的 RT-PCR 分析结果表明 GnRH 在脑、卵巢和卵中都有表达(Di Cristo *et al*, 2009); 在剑尖枪乌贼中, RT-PCR 和 Southern blot 分析结果表明, *GnRH* 基因的前体主要在中枢神经系统表达(Onitsuka *et al*, 2009); 在海蛞

牛中, *apGnRH-like* 肽(Tsai *et al*, 2010)存在于中枢神经和外周组织;长蛸(*Octopus minor*)的 qRT-PCR 研究结果中显示, *octGnRH* 主要表达于神经系统及神经纤维所控制的部分组织, 在雌雄个体的食道、下神经团中表达量都较高, 在雄性的精巢中表达次之, 而在雌性的卵巢中表达则较低(朱之发等, 2020), 本文实验结果显示在雌、雄脑中的表达量最高, 在卵巢中的表达较高, 精巢的表达则较低, 推测 *SjGnRH* 的表达量可能与性腺发育时期相关。

有研究显示: GnRH-I 与 GnRH-II 的类似物能够促进大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)的排卵(Hildahl *et al*, 2011); *sbGnRH* 和 *sGnRH* 在大菱鲆中的表达量具有周期性变化(赵春彦, 2017), 这两种类型的 GnRH 在进化上趋同(Imanaga *et al*, 2014; Andrea *et al*, 2016), *sGnRH* 可辅助 *sbGnRH* 表达; *sbGnRH* 在性腺与脑中的表达模式相似, 可能具有一定的关联性(赵春彦, 2017), 另外, *sbGnRH* 在性腺中的高表达表明了 GnRH 系统同时具有刺激性腺成熟和调控性腺发育作用(赵春彦, 2017), 同时说明 GnRH 与繁殖作用联系紧密, 还能促进生殖腺的生长发育和精卵细胞的产生(Gray *et al*, 2002); 且 *sbGnRH* 在条斑星鲈的卵巢发育与排出过程中也具有重要作用(Masafumi *et al*, 2008); GnRH 类似物对 LH 的释放以及产卵作用也具有促进作用(Nyuji *et al*, 2013); 有研究发现 GnRH 多肽在金头鲷(*Sparus aurata*)和鲭鱼(Gothilf *et al*, 1997; Selvaraj *et al*, 2012)中, 也有参与生殖调控的功能。GnRH 在性腺的高表达表明了 GnRH 系统在刺激性腺成熟、调控性腺发育(Powell *et al*, 1996)和调节雌雄性腺激素含量的作用(Soverchia *et al*, 2007)。在软体动物中的研究显示, 如真蛸 *octGnRH* 肽的转录本在食道神经团、食道下神经团、视腺以及脑脚叶中均有表达(Iwakoshi *et al*, 2002); 先前的一项研究提供了有关表达 *octGnRH* 基因 mRNA 的神经元胞体在中枢神经系统的定位, 以及在真蛸中枢和外周器官中的 *octGnRH* 免疫反应胞体和纤维分布的详细信息(Iwakoshi-Ukena *et al*, 2004), 在该研究中, *octGnRH* 的 mRNA 表达定位在食道神经团的前后侧基底叶、下额叶以及后颊叶, 与食道下神经团的外套内脏叶、足叶、后腕叶、前臂叶、血管舒缩叶以及视叶中; 在本研究中, *SjGnRH* 基因 mRNA 在食道神经团的脑亚脚叶、亚垂直叶、前基底叶、后基底叶和下额叶均出现不同程度的阳性表达, 在食道下神经团的巨细胞叶、外套内脏叶、足叶和腕叶以及视叶也有阳性

表达, 这与先前的结果研究结果基本一致。在真蛸的中枢和外周器官中 *octGnRH* 样免疫反应胞体和纤维的分布表明, *octGnRH* 参与了脑亚脚叶-视腺轴, 这与脊椎动物的下丘脑-垂体轴相似, 都有参与生殖的功能(Di Cosmo *et al*, 1998; Iwakoshi *et al*, 2002; Iwakoshi-Ukena *et al*, 2004)。 *octGnRH* 除了促进生殖作用之外, 还参与很多其他重要的生理作用, 包括进食(Newth, 1972)、触觉和记忆(Balaban, 1996)、运动和自主行为(Iwakoshi-Ukena *et al*, 2004)等。此外, 在枪乌贼脑组织中分别进行了 *cGnRH-II* 和 GnRH 类似物抗体的免疫组织化学, 显示 *cGnRH-II* 免疫阳性的胞体主要存在于巨细胞叶和视叶(Amano *et al*, 2008), 阳性神经纤维广泛分布于脑组织(Osada *et al*, 2013)。GnRH 类似物免疫阳性的细胞体广泛分布于巨细胞叶中, 但在嗅叶和垂直叶中分布较少。束状轴突从腹部巨细胞叶延伸到脑内部, 免疫阳性神经纤维主要分布在食道神经团与食道下神经团中, 但视叶中只有神经纤维有免疫阳性反应(Amano *et al*, 2008); 在真蛸的脑亚脚叶、嗅叶和视叶中均发现 *octGnRH* 神经肽, 在视腺细胞上也发现含有 GnRH 神经肽的神经末梢, 而视腺分泌活动受神经肽的调控, 因此, 推测嗅叶可能是 GnRH 神经肽的来源(Di Cosmo *et al*, 1998; Iwakoshi-Ukena *et al*, 2004); 而本研究结果表明, *SjGnRH* 探针在视叶的髓质中出现阳性信号, 但在视腺或嗅叶却未见阳性表达。对 GnRH 的免疫反应也出现在其他物种的大脑中, 如淡水硬骨鱼高身丽脂鲤(*Atila altiparae*)的嗅球、末梢神经节、视前区、中脑被盖核, 也存在于纵环核、肾小球核以及丘脑背侧中央和背侧后核(Gomes *et al*, 2013)。我们推测, 这几项研究结果之间的差异可能是由于物种差异性所致, 也可能是由于不同物种的在生殖周期内受到周围环境刺激的影响所致, 如光周期、温度等(Andrea *et al*, 2016)。在本研究中, 针对我国重要的经济乌贼——曼氏无针乌贼, 进行了 *SjGnRH* 基因的克隆鉴定以及系统发育特征分析, 这将有助于我们理解 GnRH 在无脊椎动物中的适应和进化过程, 关于 *SjGnRH* 在曼氏无针乌贼中的生理调控机制还有待进一步研究。

4 结论

(1) 在曼氏无针乌贼中克隆的 *SjGnRH* 基因属于仅存在于软体动物中的 GnRH-V 类型, 且属于其中的 *octGnRH*。

(2) *SjGnRH* 具有高度保守的十二肽, 与真蛸

GnRH的亲缘关系比剑尖枪乌贼 GnRH 的更近。

(3) *SjGnRH* 在雌、雄无针乌贼脑中的表达量显著高于其他组织。

(4) *SjGnRH* 在食道上神经团的脑亚脚叶和亚垂直叶表达最强,其次是下额叶、后基底叶以及前基底叶;在食道下神经团的腕叶、足叶、巨细胞叶和外套内脏叶中均有阳性表达;在视叶的髓质中也出现阳性信号,而在视腺或嗅叶未见阳性表达。

参 考 文 献

- 于新秀,吴常文,迟长凤,2011.曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)脑显微结构及视腺超微结构观察.海洋与湖沼,42(2):300—304
- 朱之发,边力,王亚美等,2020.长蛸 oct-GnRH 基因的 cDNA 克隆及组织表达分析.海洋渔业,42(5):585—594
- 陈蕾,冯俏丽,纪惠玲等,2003.合浦珠母贝生殖腺及消化道 GnRH 及其受体的免疫组织化学研究.第四军医大学学报,24(22):2081—2083
- 赵春彦,2017.大菱鲆性腺分化以及 Mtnrs, kiss/kissr 和 GnRH 在性腺成熟过程中的表达特征.青岛:中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士学位论文
- Amano M, Oka Y, Nagai Y *et al*, 2008. Immunohistochemical localization of a GnRH-like peptide in the brain of the cephalopod spear-squid, *Loligo bleekeri*. General and Comparative Endocrinology, 156(2): 277—284
- Andrea M, Ike O, Andrea D F *et al*, 2016. Characterization and transcriptional profiles of *Engraulis encrasicolus* GnRH forms. Reproduction (Cambridge, England), 152(6): 727—739
- Balaban P, 1996. Cephalopod neurobiology. Trends in Neurosciences, 19(3): 115
- Bigot L, Zatylny-Gaudin C, Rodet F *et al*, 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Peptides, 34(2): 303—310
- Cao Z H, Sun L L, Chi C F *et al*, 2016. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of an LFRFamide gene in the cuttlefish *Sepiella japonica*. Peptides, 80: 40—47
- Chaiyamon A, Tinikul R, Nontunha N *et al*, 2020. Characterization of TRH/GnRH-like peptides in the sea cucumber, *Holothuria scabra*, and their effects on oocyte maturation. Aquaculture, 518: 734814
- Chang J P, Pemberton J G, 2018. Comparative aspects of GnRH-Stimulated signal transduction in the vertebrate pituitary-contributions from teleost model systems. Molecular and Cellular Endocrinology, 463: 142—167
- Counis R, Laverriere J N, Garrel G *et al*, 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. Reproduction Nutrition Development, 45(3): 243—254
- Decatur W A, Hall J A, Smith J J *et al*, 2013. Insight from the lamprey genome: glimpsing early vertebrate development via neuroendocrine-associated genes and shared synteny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). General and Comparative Endocrinology, 192: 237—245
- Di Cosmo A, Di Cristo C, 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. The Journal of Comparative Neurology, 398(1): 1—12
- Di Cristo C, De Lisa E, Di Cosmo A, 2009. GnRH in the brain and ovary of *Sepia officinalis*. Peptides, 30(3): 531—537
- Gomes C C, Costa F G, Borella M I, 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). Micron, 52—53: 33—38
- Gothilf Y, Meiri I, Elizur A *et al*, 1997. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids (mRNAs), gonadotropin beta-subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. Biology of Reproduction, 57(5): 1145—1154
- Gottsch M L, Cunningham M J, Smith J T *et al*, 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology, 145(9): 4073—4077
- Gray Sarah L, Adams Bruce A, Warby Carol M *et al*, 2002. Transcription and translation of the salmon gonadotropin-releasing hormone genes in brain and gonads of sexually maturing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction, 67(5): 1621—1627
- Hildahl J, Sandvik G K, Edvardsen R B *et al*, 2011. Identification and gene expression analysis of three GnRH genes in female Atlantic cod during puberty provides insight into GnRH variant gene loss in fish. General and Comparative Endocrinology, 172(3): 458—467
- Imanaga Y, Nyuji M, Amano M *et al*, 2014. Characterization of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in jack mackerel (*Trachurus japonicus*): comparative gene expression analysis with respect to reproductive dysfunction in captive and wild fish. Aquaculture, 428—429: 226—235
- In V V, Ntalamagka N, O'Connor W *et al*, 2016. Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*). Peptides, 82: 109—119
- Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y *et al*, 2002. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 291(5): 1187—1193
- Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa-Kuroda K *et al*, 2004. Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. The Journal of Comparative Neurology, 477(3): 310—323
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G *et al*, 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. General and Comparative Endocrinology, 153(1/3): 346—364
- Kanda A, Takahashi T, Satake H *et al*, 2006. Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common

- octopus (*Octopus vulgaris*). The Biochemical Journal, 395(1): 125—135
- Ma Y, Ladisa C, Chang J P *et al*, 2020. Multifactorial control of reproductive and growth axis in male goldfish: Influences of GnRH, GnIH and thyroid hormone. Molecular and Cellular Endocrinology, 500: 110629
- Masafumi Amano, Ky Xuan Pham, Noriko Amiya *et al*, 2008. Changes in brain seabream GnRH mRNA and pituitary seabream GnRH peptide levels during ovarian maturation in female barfin flounder. General and Comparative Endocrinology, 158(2): 168—172
- Nagasawa K, Oouchi H, Itoh N *et al*, 2015a. In vivo administration of scallop GnRH-like peptide influences on gonad development in the Yesso Scallop, *Patinopecten yessoensis*. PLoS One, 10(6): e0129571
- Nagasawa K, Osugi T, Suzuki I *et al*, 2015b. Characterization of GnRH-like peptides from the nerve ganglia of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. Peptides, 71: 202—210
- Newth D R, 1972. The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 35(3): 421
- Nozaki M, Ominato K, Gorbman A *et al*, 2000. The distribution of lamprey GnRH-III in brains of adult sea lampreys (*Petromyzon marinus*). General and Comparative Endocrinology, 118(1): 57—67
- Nyuji M, Fujisawa K, Imanaga Y *et al*, 2013. GnRH α -induced spawning of wild-caught jack mackerel *Trachurus japonicus*. Fisheries Science, 79(2): 251—258
- Onitsuka C, Yamaguchi A, Kanamaru H *et al*, 2009. Molecular cloning and expression analysis of a GnRH-like dodecapeptide in the swordtip squid, *Loligo edulis*. Zoological Science, 26(3): 203—208
- Osada M, Treen N, 2013. Molluscan GnRH associated with reproduction. General and Comparative Endocrinology, 181: 254—258
- Powell J F, Prakash M O, Fischer W H *et al*, 1996. Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(9): 10461—10464
- Schneider J S, Rissman E F, 2008. Gonadotropin-releasing hormone II: a multi-purpose neuropeptide. Integrative and Comparative Biology, 48(5): 588—595
- Selvaraj S, Kitano H, Amano M *et al*, 2012. Molecular characterization and expression profiles of three GnRH forms in the brain and pituitary of adult chub mackerel (*Scomber japonicus*) maintained in captivity. Aquaculture, 356—357: 200—210
- Silver M R, Kawauchi H, Nozaki M *et al*, 2004. Cloning and analysis of the lamprey GnRH-III cDNA from eight species of lamprey representing the three families of Petromyzoniformes. General and Comparative Endocrinology, 139(1): 85—94
- Song Y, Miao J J, Cai Y F *et al*, 2015. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a gonadotropin-releasing hormone-like cDNA in the clam, *Ruditapes philippinarum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 189: 47—54
- Soverchia L, Carotti M, Andreu-Vieyra C *et al*, 2007. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the regulation of gonadal differentiation in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Molecular Reproduction and Development, 74(1): 57—67
- Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R *et al*, 2014. Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development. Aquaculture, 420—421: 79—88
- Tsai P S, 2018. Gonadotropin-releasing hormone by any other name would smell as sweet. General and Comparative Endocrinology, 264: 58—63
- Tsai P S, Sun B, Rochester J R *et al*, 2010. Gonadotropin-releasing hormone-like molecule is not an acute reproductive activator in the gastropod, *Aplysia californica*. General and Comparative Endocrinology, 166(2): 280—288
- Zhang L H, Tello J A, Zhang W M *et al*, 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. General and Comparative Endocrinology, 156(2): 201—209
- Zhou X S, Yi Q L, Zhong Q W *et al*, 2012. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of gonadotropin-releasing hormone III gene (GnRH-III) in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 163(1): 59—64

IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION, AND EXPRESSION ANALYSIS OF A GNRH-LIKE GENE AT MATURE STAGE IN THE CEPHALOPOD *SEPIELLA JAPONICA* (SEPIIDAE)

WU Jun-Hong, CAO Zi-Hao, ZHENG Li-Bing, CHI Chang-Feng

(National and Provincial Joint Laboratory of Exploration and Utilization of Marine Aquatic Genetic Resources, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, School of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is known for playing a crucial role in vertebrate reproduction and has been characterized in many invertebrate species. In this study, a *GnRH*-like gene (designated *SjGnRH*, KP 982885.1) was firstly identified in the common Chinese cuttlefish *Sepiella japonica* using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The full-length sequence of *SjGnRH* cDNA is 710 bp and the open reading frame (ORF) contains 273 bp, encoding 90 amino acids, a putative signal peptide containing 31 amino acids, a 12 amino acid GnRH peptide and a 44 amino acid GnRH related peptide (GAP) sequence. It has 86.7% and 73.3% identity with *Uroteuthis edulis* and *Octopus vulgaris*, respectively. The highly conserved dodecapeptide of *S. japonica* shares 100% similarity with *octGnRH* of *U. edulis* and *O. vulgaris*, exhibits 66.7% and 54.8% similarity in the signal peptide region, and 95.5% and 77.3% in the GAP region, respectively. According to the results of qRT-PCR, the *SjGnRH* gene is tissue-specific at the mature stage, with the highest expression in brain, which is significantly different from other tissues ($P < 0.05$). The expression pattern of *SjGnRH* mRNA was detected in the brain using *in situ* hybridization method. Therefore, *SjGnRH* is expressed in different regions of the supraesophageal mass, subesophageal mass, and optic lobes, which suggests that *SjGnRH* might be involved in the reproduction of the cuttlefish *S. japonica*.

Key words *Sepiella japonica*; neuropeptide; GnRH; reproduction