

大菱鲆促黄体激素受体基因的克隆及其生物信息学分析

贾玉东, 孟 振, 牛化欣, 刘新富, 高淳仁, 雷霖霖*

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 通过兼并引物扩增及 RACE 技术, 克隆大菱鲆促黄体激素受体 (luteinizing hormone receptor, LHR) 基因, 分析其相应生物信息学特征和组织表达。结果显示: *LHR* 基因序列全长 3 184 bp, 编码 685 个氨基酸, 同大西洋庸鲽同源性最高。氨基酸序列分析发现, 该基因编码蛋白为疏水性蛋白, 相对分子量 76.54 ku, 理论等电点 7.22, 存在信号肽序列和跨膜区; 亚细胞定位主要在内质网和细胞膜; 预测该蛋白含有 33 个磷酸化位点、5 个糖基化位点、6 个富含亮氨酸重复序列、7 个跨膜保守结构域, 二级结构以无规则卷曲为主, 三级结构其结构域呈 α 螺旋状构象; 蛋白功能预测表明, *LHR* 主要在辅助、运载、翻译和代谢调节过程中发挥关键作用。组织表达分析表明, *LHR* 基因除在卵巢大量表达外, 在其他非性腺组织也有表达, 尤其是在肝脏表达较高。上述结果为深入探讨 *LHR* 基因在大菱鲆性腺发育过程中的生物学功能奠定了遗传信息基础, 也为研究其他海水养殖鱼类生殖调控提供重要参考。

关键词: 大菱鲆; 促黄体激素受体; 克隆; 生物信息; mRNA 表达

中图分类号: Q 785; S 965.3

文献标志码: A

鱼类的生殖周期受下丘脑-垂体-性腺轴精确调控^[1]。下丘脑通过接受内外源性刺激, 激发垂体分泌促性腺激素, 而后作用于性腺, 参与诱导配子发生、发育和性类固醇激素分泌, 因而促性腺激素在硬骨鱼类乃至脊椎动物生殖调控中起着非常重要的作用。促黄体激素 (luteinizing hormone, LH) 是促性腺激素的一种, 其主要功能是促进生殖细胞生长、发育、成熟、排精和排卵, 而 LH 必须与靶细胞表面特异性受体 (luteinizing hormone receptor, LHR) 结合后, 通过 LHR 介导, 才能行使其相应的生物学功能^[2-3]。LHR 属于 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 超家族成员, 具有一个典型的 N-端胞外区域 (extracellular domain, ECD)、7 个跨膜螺旋区 (transmembrane helix domain, TMD) 和一段细胞内 C-端胞内控制区, 当 ECD 对 LH 进行特异性识别和结合后, 诱导 LHR 构象活化, 引起 TMD 重

新排列, 在 C-端胞内控制区通过与 G 蛋白的偶联, 在细胞内产生第二信使环化腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP), 经过一系列的酶促级联反应, 将细胞外信号传递到细胞内, 调控细胞的分化、增殖和凋亡, 在内外因素的影响下, 它在靶细胞上分布表达变化影响到细胞功能的发挥^[4-8]。LHR 主要分布于性腺组织, 对哺乳动物研究表明, LHR 在卵泡发育早期就已存在, 随着有腔卵泡的发育, LHR 表达逐渐增高, 在成熟卵泡颗粒细胞和膜细胞中均有高度表达, 而在未成熟卵泡中仅在膜细胞中少许表达, LHR 表达的提高, 增强了卵泡对 LH 的反应性, 最终诱导卵泡成熟和排卵^[9-12]。对硬骨鱼类研究也初步证实, LHR 主要分布于排卵前发育成熟的卵母细胞滤泡的膜细胞和颗粒细胞, 与卵母细胞的最后成熟和排卵密切相关^[1-2, 13-15]。

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 为原产于欧

收稿日期: 2013-09-16 修回日期: 2013-12-18

资助项目: 国家鲆鲽类产业技术体系 (CRAS-50); 国家自然科学基金项目 (31302205); 山东省自然科学基金项目 (ZR2012CQ024); 山东省优秀中青年科学家奖励基金 (BS2013SW004)

通信作者: 雷霖霖, E-mail: lejilin@ysfri.ac.cn

洲沿海的冷水性鲚科鱼类,其较高的经济价值使之成为重要海水养殖良种之一,自1992年引进中国以来,在海水鱼类工厂化养殖领域取得了重大成效,从而成为我国水产养殖业一个新的经济增长点^[16]。在大菱鲆等海水鱼类繁殖过程中,促性腺激素广泛应用于亲鱼的繁(选)育,在雌性亲鱼的繁殖产卵期,注射促性腺激素促进卵母细胞的成熟和释放,从而达到对卵子催熟和同步产卵的效果。本实验以大菱鲆为研究对象,应用分子生物学方法,克隆LHR基因全长cDNA序列,从分子水平研究大菱鲆LHR基因的序列结构及相关生物信息学特征,为进一步阐明LHR的遗传特性及相关生理功能提供理论依据,同时也为深入了解促性腺激素在鱼类生殖周期调控中的生物学功能提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用鱼选自烟台天源水产有限公司自行繁育的大菱鲆亲鱼,体质量3 500~4 000 g。取样前禁食12 h,MS-222(100 mg/L)麻醉后,迅速解剖

取出卵巢、肝、眼、肠、脑、心脏、胃、脾、肾和肌肉组织于液氮中保存备用。

总RNA提取试剂TRIZOL Reagent、Ex Taq酶、pMDI9-T Simple载体、SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, USA), SYBR® Premix Ex Taq™, DL2000 Marker均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒和大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞DH5 α ,购自天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒购自Thermo Science;引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 LHR基因全长cDNA序列克隆

根据TRIZOL试剂盒说明提取卵巢组织总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。根据已知鱼类LHR保守序列,利用CodeHop原理^[17]设计简并引物LHRF1和LHRR1(表1),进行PCR扩增反应,克隆大菱鲆LHR基因部分CDS序列。根据获取的片段,利用Primer Premier 5.0设计特异性引物LHRF2(3'-RACE)和LHRR2(5'-RACE),进行全长扩增(表1)。

表1 大菱鲆LHR基因克隆引物
Tab.1 Primers used for *S. maximus* LHR cloning

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	扩增序列长度/bp length of sequence
LHRF1	TGGCTGTAATGGTTATTCTGCT	342
LHRR1	GTTGGTGATGGTGTGGCAGCGT	
LHRF2(3'-RACE)	TACTACAACCACGCCACGGACT	1 882
LHRR2(5'-RACE)	CACATGAGAAACCTGGAGATGG	1 372
LHRF(qRT)	GCTCCTCCTCAACATCCTGG	189
LHRR(qRT)	TGCGGACAGTCAGATAGATGCT	
β -actin F(qRT)	TGAACCCCAAAGCCAACAGG	108
β -actin R(qRT)	CAGAGGCATACAGGGACAGCAC	

1.3 LHR的组织表达分析

采用real-time PCR方法检测LHR基因在雌性大菱鲆各组织中表达量。取出液氮中保存组织,提取总RNA,反转录成第一链cDNA,利用该基因特异性引物LHRF/R,以第一链cDNA为模板,以 β -actin为内参基因检测LHR在大菱鲆不同组织中的表达变化(表1)。实验流程参照SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒操作说

明,在ABI StepOnePlus型实时荧光定量PCR仪上进行,每个样品设置3个重复。

1.4 大菱鲆LHR的生物信息学分析及数据处理

扩增全长序列在NCBI数据库中进行BLAST比对和同源性分析,利用ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>),SMS(<http://www.91bio.com/SMS2/>)

orf_find.html)推断其开放阅读框和编码氨基酸序列。利用 DNAMAN 6.0 软件进行物种同源性分析。采用 Neighbour-Joining 法(1 000 runs)结合 Clustal X、MEGA 4.0 软件,构建系统进化树。

利用 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 LHR 蛋白质的基本理化性质;NetPhos 2.0 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测 LHR 编码氨基酸存在的磷酸化位点;SignalP 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 NetNGlyc 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分别分析其潜在信号肽剪切位点和糖基化位点;Smart(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析预测氨基酸序列的保守结构域;TMPred(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)和 TMHMM Server 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行蛋白质序列的跨膜区分析。PSORT II Prediction(<http://psort.hgc.jp/form2.html>)预测蛋白质的亚细胞定位;利用 Hopfield 神经网络(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)和 swiss-model(<http://swissmodel.expasy.org>)分别预测蛋白质的二、三级结构;Protfun(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)软件在线对 LHR 编码产物进行功能预测分析。

根据实时荧光定量 PCR 测得的 C_t 值,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 LHR 基因在大菱鲆各组织表达水平。所得数据采用 SPSS 16.0 软件中的 Duncan 氏法进行数据处理和统计分析, $P < 0.05$ 时认为差异显著,结果以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示。

2 结果

2.1 大菱鲆 LHR 基因全长 cDNA 克隆和序列分析

通过简并引物 LHRF1 和 LHRR1 扩增出 434 bp 长度的片段(图 1-a)。在此序列的基础上,采用 RACE 方法扩增 3' 端和 5' 端序列,其中 3'-RACE 产物长 1 882 bp(图 1-b),5'-RACE 产物长 1 372 bp(图 1-c)。将中间片段、3'-RACE 和 5'-RACE 序列拼接后,得到大菱鲆 LHR 基因 3 184 bp 的全长 cDNA 序列,此序列编码 685 个氨基

酸,包含 5' 非编码区 124 bp 和 3' 非编码区 1 002 bp,开放性阅读框 2 058 bp(图 2)。

2.2 大菱鲆 LHR 基因同源性分析和系统进化树构建

登录 NCBI 经 BLAST 比对,大菱鲆 LHR 序列与其他鱼类 LHR 基因有较高同源性(表 2),这表明这一序列属于 LHR 家族;同时大菱鲆与 GenBank 上其他 8 种动物的 LHR 编码序列比较发现,近 C-末端区域内的序列高度保守,表明该区域可能对 LHR 发挥有效生理功能有着重要作用(图 3)。根据大菱鲆和其他物种 LHR 基因编码的氨基酸序列构建系统进化树,结果显示,系统进化树可分为两大支:哺乳类、两栖类和鸟类聚为一支;所有鱼类聚为一支,其中大菱鲆处于鱼类这一分支中,且与大西洋庸鲽合为一个小的分支,亲缘性最近(图 4)。

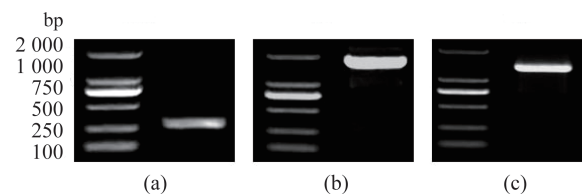


图 1 大菱鲆 LHR 基因部分 CDS(a)、3'-RACE(b)和 5'-RACE(c)电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of *S. maximus* LHR CDS(a), 3'-RACE(b) and 5'-RACE(c)

表 2 大菱鲆 LHR 核苷酸序列在 GenBank 上同源性比较结果

Tab. 2 Homologous comparison of the fragment of *S. maximus* LHR nucleotide

GenBank 登录号 accession number	物种 species	分值 score(bits)	同源性/% identities
BK005585	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	1 496	80
KC207944	日本鲈 <i>Pneumatophorus japonicus</i>	2 117	81
EU502845	大西洋庸鲽 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	2 309	83
EU339125	黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	1 999	81
NM_001279595	吉富罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	1 941	81
HM768316	大西洋鲑鱼 <i>Gadus morhua</i>	1 034	78

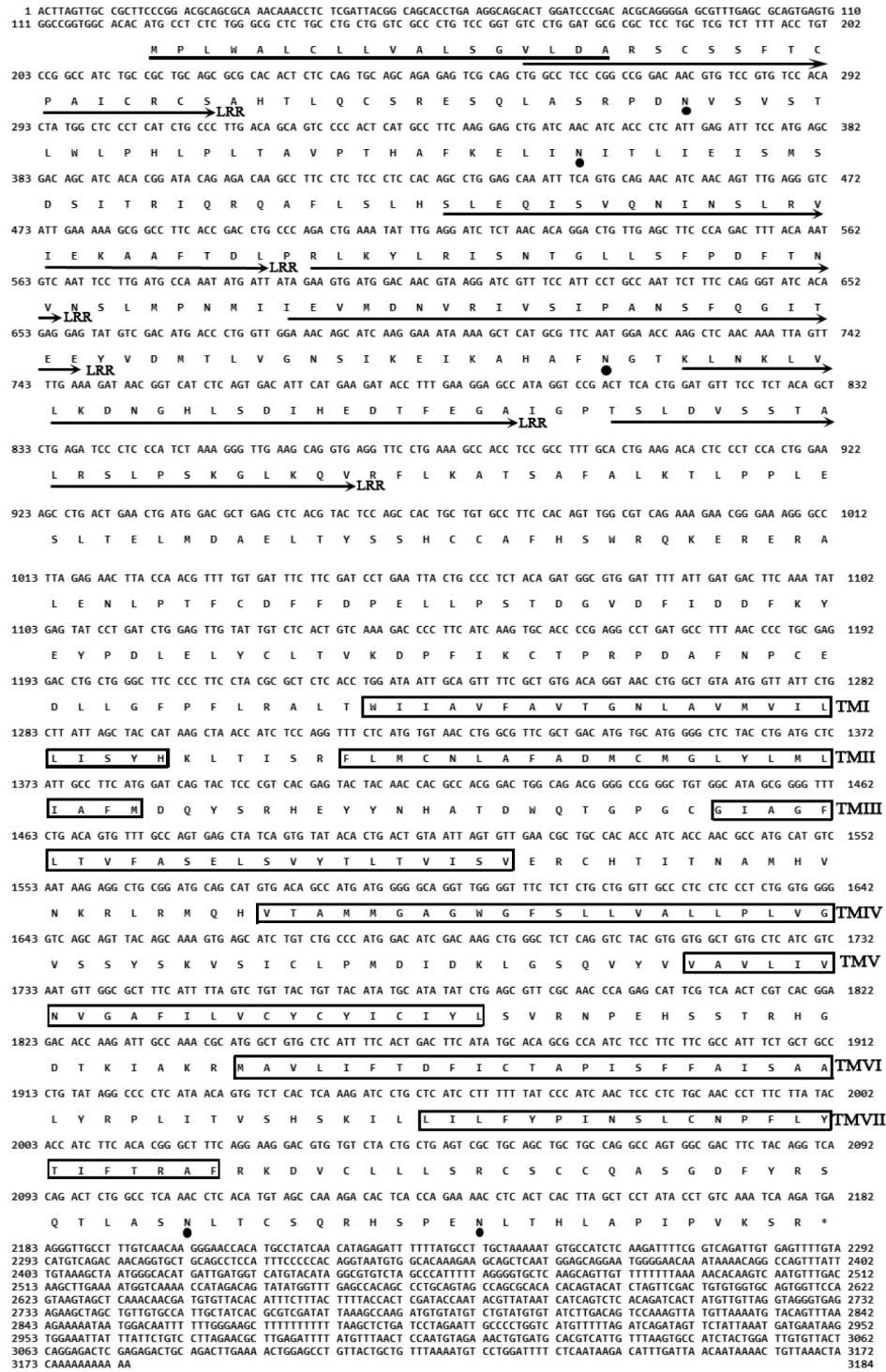


图2 大菱鲆 *LHR* 基因 cDNA 及其编码氨基酸序列

起始密码子. ATG; 终止密码子. TGA; 信号肽序列. MPLWALCLLVALSGLVDA; 亮氨酸重复序列 (LRR). →; 跨膜螺旋区 (TM I-TM VII). □; 潜在的 N 糖基化位点. •

Fig. 2 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *LHR* gene in *S. maximus*

The start codon (ATG) was boxed and the stop codon (TGA). The signal peptide sequence is underlined. The position of leucine-rich repeat is showed as arrow. The position of the seven predicted transmembrane domain is showed as black box. Potential N-glycosylation sites indicated by closed black circle

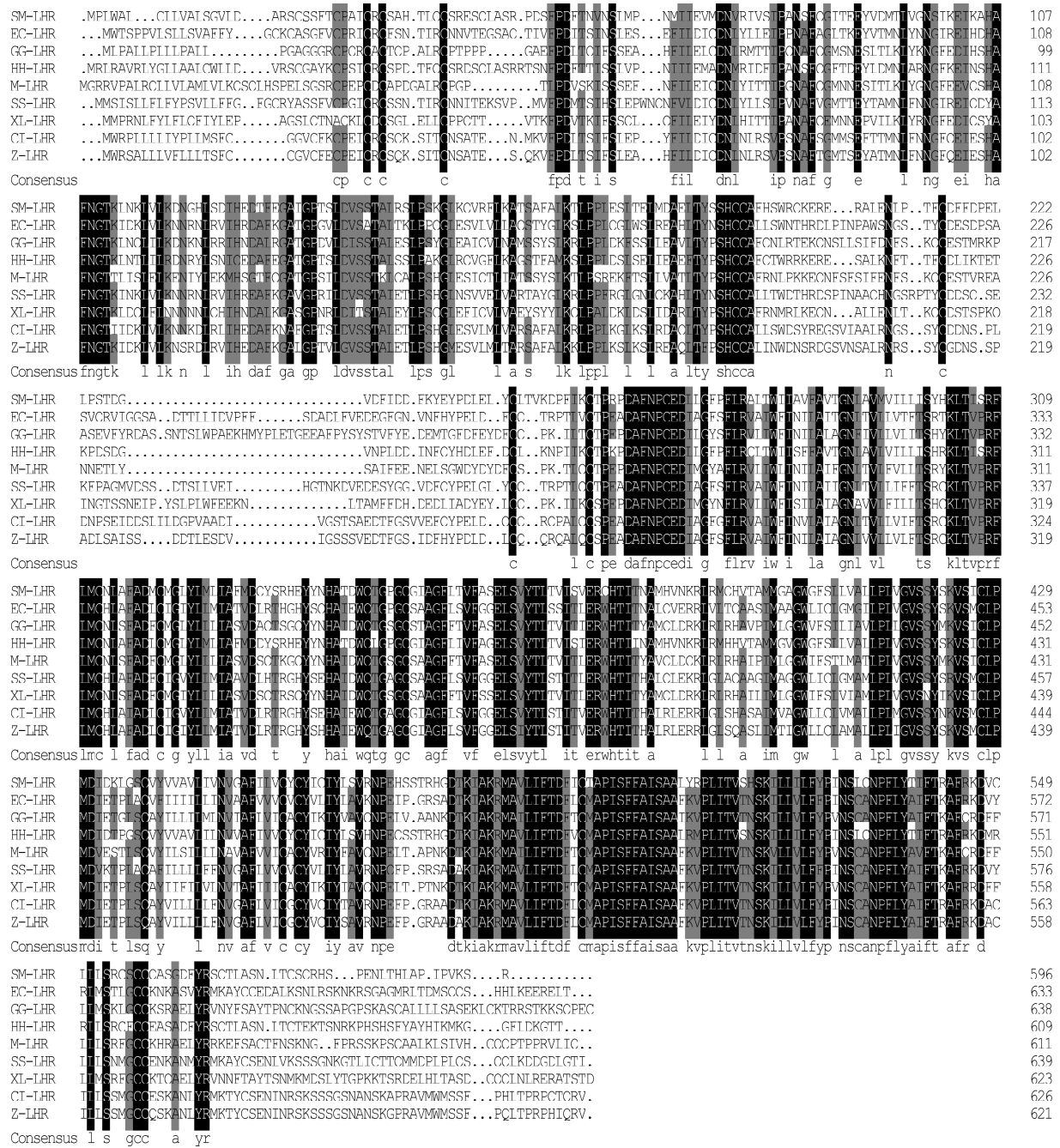


图 3 大菱鲂 LHR 与其他物种氨基酸序列比对图

序列中相同氨基酸残基用黑色背景表示,同源性超过 80% 用灰色背景表示。序列号:石斑鱼 HQ650770,鸡 AB009283,大西洋庸鲽 EU502845,鼠 M81310,鲑鱼 AJ579790,爪蟾 AB602929,草鱼 EF194761,斑马鱼 AY714133

Fig. 3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *S. maximus* LHR with the corresponding sequences from other species

Position with >80% similarity are shaded in light grey, while completely conserved positions are shaded in black

Accession numbers: *Epinephelus coioides* (EC) HQ650770, *Gallus gallus* (GG) AB009283, *Hippoglossus hippoglossus* (HH) EU502845, *Mouse* (M) M81310, *Salmo salar* (SS) AJ579790, *Xenopus laevis* (XL) AB602929, *Ctenopharyngodon idella* (CI) EF194761, *Danio rerio* (Z) AY714133

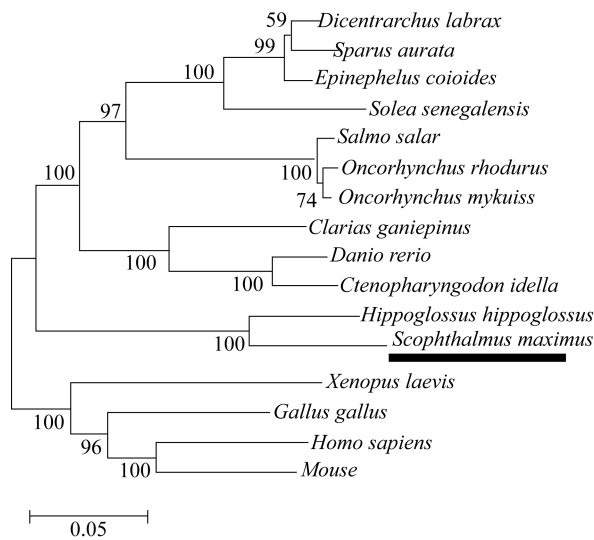


图4 不同物种 LHR 氨基酸序列构建系统进化树

欧洲狼鲈 AY642114, 金头鲷 AY587261, 石斑鱼 HQ650770, 塞内加尔鲷 GQ472140, 大西洋鲑 AJ579790, 玫瑰马苏大麻哈鱼 AB030005, 虹鳟 AF439404, 鲈鱼 AF324540, 斑马鱼 AY714133, 草鱼 EF194761, 大西洋庸鲷 EU502845, 爪蟾 AB602929, 鸡 AB009283, 人 S57793, 鼠 M81310

Fig. 4 Phylogenetic tree based on different kinds of species' LHR amino acid sequence

Dicentrarchus labrax (AY642114), *Sparus aurata* (AY587261), *Epinephelus coioides* (HQ650770), *Solea senegalensis* (GQ472140), *Salmo salar* (AJ579790), *Oncorhynchus rhodurus* (AB030005), *Oncorhynchus mykiss* (AF439404), *Clarias gariepinus* (AF324540), *Danio rerio* (AY714133), *Ctenopharyngodon idella* (EF194761), *Hippoglossus hippoglossus* (EU502845), *Xenopus laevis* (AB602929), *Gallus gallus* (AB009283), *Homo sapiens* (S57793), *Mouse* (M81310)

2.3 大菱鲆 LHR 蛋白结构与功能分析

蛋白理化性质分析 ProtParam 分析 LHR 蛋白理化性质, 其蛋白理论分子量 76.54 ku, 等电点 7.22。蛋白分子式 $C_{3455}H_{5441}N_{895}O_{972}S_{46}$, 总原子数 10 890, 不稳定参数 37.72, 属于稳定蛋白, GRAVY (grand average of hydropathicity) 为 0.296, 由于 GRAVY 值的范围为 $2 \sim -2$, 正值表明此蛋白为疏水性蛋白、负值表明为亲水性蛋白, 因此该蛋白为疏水性蛋白, 摩尔消光系数为 65 915, 在哺乳动物体内半衰期为 30 h, 酵母体内大于 20 h, 菌里大于 10 h。成熟蛋白所含有的负电荷残基 (Asp + Glu) 和正电荷残基 (Arg + Lys) 分别为 57 和 57 个。

亚细胞定位 亚细胞定位与蛋白质功能存在非常重要的联系, 蛋白质位置为阐释其功能提

供了非常有价值的信息。PSORT II 分析预测结果显示, LHR 蛋白定位于内质网、细胞膜、空泡和线粒体的概率为 44.4%、33.3%、11.1% 和 11.1%, 由此推测 LHR 最可能定位于内质网和细胞膜, 属于分泌性蛋白。

蛋白潜在的信号剪切位点、磷酸化位点和糖基化位点 通过 SignalP 4.0 软件分析 LHR 编码的蛋白质序列信号肽, 结果表明, 该 cDNA 编码的蛋白含前端含有长 18 氨基酸 (1aa-18aa) 的信号肽结构, 其剪切位点位于第 18 和 19 位氨基酸处 (图 5-a)。NetPhos 2.0 和 NetOGlyc 3.1 预测结果表明, 21 个 Ser、5 个 Thr 和 7 个 Tyr 可能成为蛋白激酶磷酸化位点 (图 5-b), 同时存在 5 个潜在糖基化位点 (图 5-c)。

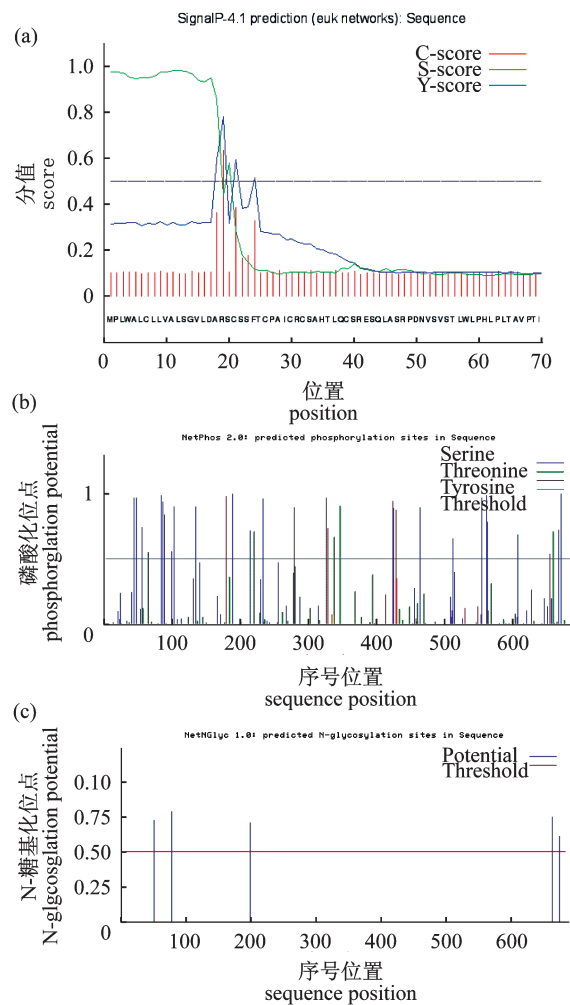


图5 LHR 信号肽剪切位点 (a)、磷酸化位点 (b) 和糖基化位点 (c)

Fig. 5 LHR signal peptide splice site (a), phosphorylation site (b) and glycosyl site (c)

保守结构域和跨膜结构分析 根据 Smart 和 ProtScale 软件分析结果表明, LHR 在 56 ~ 278、29 ~ 274 和 378 ~ 626 氨基酸残基分别有 SCOP、PDB 和 7 个跨膜受体保守结构域(图 6-a), 15 ~ 33、102 ~ 125、127 ~ 147、156 ~ 175、201 ~ 224、228 ~ 248 氨基酸残基是富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)。TMPRED 预测表明, 该蛋白含有 7 个跨膜结构域(图 6-b), TMHMM Server 2.0 对跨膜区分析表明, 该蛋白在 369 ~ 391、398 ~ 420、442 ~ 464、485 ~ 507、531 ~ 553、574 ~ 596 和 611 ~ 663 氨基酸处含有 7 个跨膜结构域(图 6-c)。

蛋白二级结构、三级结构及编码产物功能预测与分析 Hopfield 神经网络和 swiss-model 预测蛋白质二级和三级结构, 结果显示, LHR 蛋白二级结构中, α -螺旋(h)占 25.84%, β -折叠(e)占 21.31%, 无规则卷曲(c)占 52.85%(图 7-a); 蛋白三级结构中, LHR 存在 7 个 α 螺旋组成的跨膜结构域(图 7-b)。对蛋白功能预测分析结果表明, 该蛋白具有生物合成辅因子(biosynthesis of cofactors)、脂肪酸代谢(fatty acid metabolism)、翻译(translation)和运载结合(transport and binding)功能的概率分别为 2.917、1.308、1.614 和 1.885(表 3)。

2.4 大菱鲆各组织中 LHR mRNA 水平

利用 real-time PCR 技术检测 LHR mRNA 在大菱鲆不同组织中表达情况。结果发现, LHR mRNA 在卵巢组织中表达量最高, 显著高于其他组织($P < 0.05$), 其次是肝脏组织, 而眼、肠、脑、肌肉、脾、胃、心、肾中有少量表达且无显著差异

($P > 0.05$), 鳃和肾的表达无显著差异($P > 0.05$), 但二者表达均显著低于眼($P < 0.05$)(图 8)。

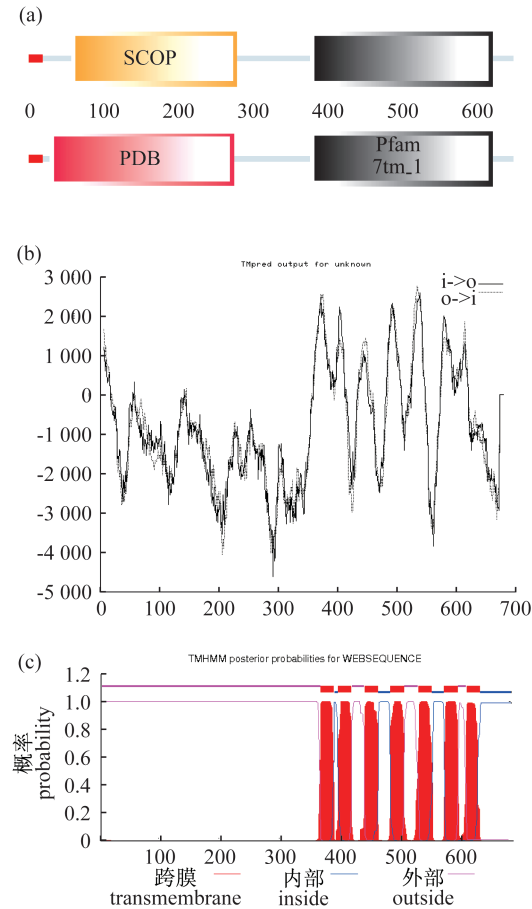


图 6 LHR 蛋白保守结构区域 (a)、跨膜结构 (b) 和跨膜区域 (c)

Fig. 6 LHR protein conserved domain (a), transmembrane structure (b) and region (c)

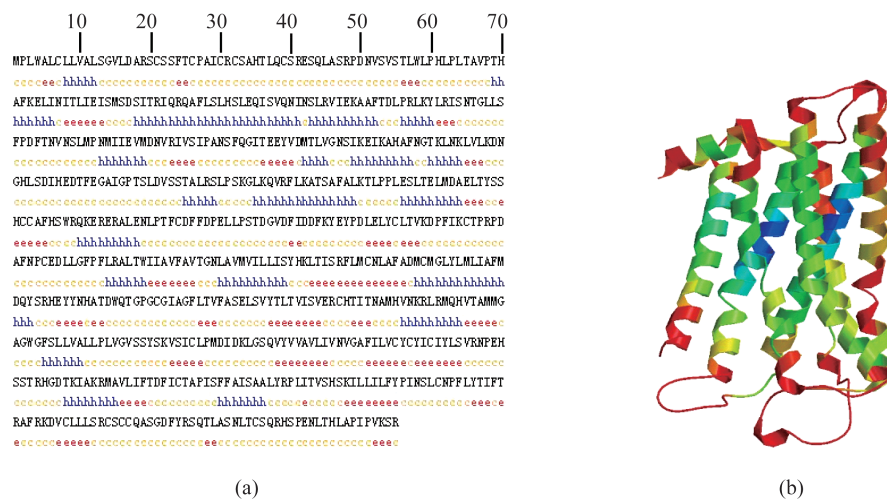


图 7 LHR 蛋白二级结构 (a) 和三级结构 (b)

Fig. 7 LHR protein secondary structure (a) and tertiary structure (b)

表3 LHR 编码产物功能预测
Tab.3 The prediction of LHR function

功能分类 functional category	概率 probability
氨基酸生物合成 amino acid biosynthesis	0.500
生物合成辅因子 biosynthesis of cofactors	2.917
细胞被膜 cell envelope	0.541
细胞过程 cellular processes	0.411
中央中介代谢 central intermediary metabolism	0.762
能量代谢 energy metabolism	0.389
脂肪酸代谢 fatty acid metabolism	1.308
调节功能 regulatory functions	0.211
复制和转录 replication and transcription	0.075
翻译 translation	1.614
运载结合 transport and binding	1.885

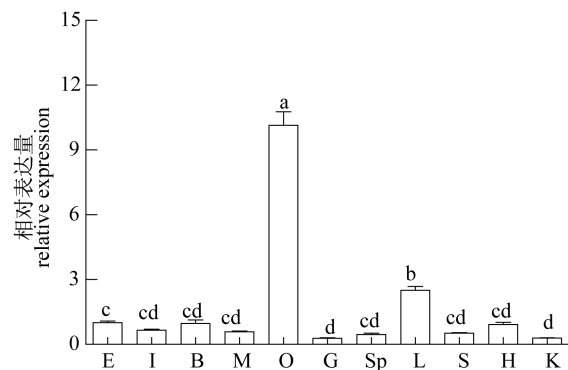


图8 大菱鲆 LHR mRNA 的组织表达

E. 眼; I. 肠; B. 脑; M. 肌肉; O. 卵巢; G. 鳃; Sp. 脾; L. 肝; S. 胃; H. 心; K. 肾

Fig. 8 Expression of LHR mRNA in various tissues of *S. maximus*

E. eye; I. intestine; B. brain; M. muscle; O. ovary; G. gill; Sp. spleen; L. liver; S. stomach; H. heart; K. kidney

3 讨论

LHR 作为 GPCR 家族成员,具有一个典型的 N-端胞外区域 (extracellular domain, ECD), 7 个跨膜螺旋区 (transmembrane helix, TM helix) 和一段细胞内 C-端胞内控制区。本实验获得的大菱鲆 LHR 基因 cDNA 全长 3 184 bp, 编码 685 个氨基酸, 蛋白理论分子量 76.54 ku, 等电点 7.22, 该基因核苷酸序列同大西洋庸鲽 LHR 的同源性最高 (83%), 且编码氨基酸序列具有 GPCR 家族典型的 7 次跨膜螺旋结构, N-端胞外区域和 C-端胞内区; 系统进化树分析结果显示, 此序列位于鱼类 LHR 分支中, 同大西洋庸鲽亲缘性最接近。以上

结果表明所得序列为目的基因, 且该基因属于 GPCR 家族。

信号肽是位于分泌性蛋白 N 端, 由 15 ~ 30 个氨基酸组成的一段连续的氨基酸序列。信号假说认为, 编码分泌性蛋白的 mRNA 首先翻译合成的是 N 末端带有疏水性氨基酸残基的信号肽, 信号肽引导核糖体并将其定位于内质网膜通道上, 并将不断合成蛋白质肽链通过内质网膜进入网腔内, 随后信号肽被切除, 而新合成的蛋白质则由内质网腔转运到相应靶位^[18]。因此, 信号肽的功能, 不仅决定了一个蛋白质是否为分泌性蛋白, 而且和蛋白质或新生肽链在细胞内的定位密切相关。通过对信号肽剪切位点预测分析, 发现大菱鲆 LHR 蛋白存在明显的信号肽切割位点, 这在其他硬骨鱼类 LHR 蛋白上也发现了与其相类似的信号肽序列^[19-22]。亚细胞定位的结果显示, LHR 蛋白大部分定位于内质网和细胞膜上, 这表明 LHR 主要在内质网合成, 合成后由内质网转运到细胞膜上, 随后与相应的配体识别结合后, 通过与 G 蛋白偶联, 产生酶促级联反应, 激活细胞内信号转导通路, 进而发挥调控细胞增殖、分化和凋亡的生物学功能。

蛋白质翻译结束后, 从核糖体上释放的多肽链要经过不同方式的加工修饰才能成为具有特定结构和功能的成熟蛋白质。翻译后肽链中残基修饰是一类广泛的后加工, 其中糖基化和磷酸化是非常重要的侧链修饰方式, 对蛋白功能正常发挥有非常重要的调控作用。对硬骨鱼类 LHR 研究发现, 大西洋庸鲽 LHR 蛋白氨基酸序列中, 存在蛋白激酶 C、酪蛋白激酶 II、环化腺苷酸依赖的蛋白激酶等磷酸化位点和 O-糖基化位点^[23], 在黑鲈 LHR 蛋白序列上也存在类似的磷酸化和糖基化位点^[24]。大菱鲆 LHR 编码蛋白序列中存在多处磷酸化蛋白激酶和糖基化位点, 这表明大菱鲆 LHR 蛋白具有和其他硬骨鱼类相类似的翻译后加工方式, 都需要经过相应的磷酸化和糖基化侧链修饰, 才能发挥其正常的生理功能。

对大菱鲆 LHR 氨基酸序列结构和跨膜区域进一步分析发现, 该基因除了具有 GPCR 典型的 7 个跨膜受体保守结构外, 还存在 6 个富含亮氨酸重复序列 (leucine rich repeat, LRR)。LRR 具有广泛的生物学作用, 其作为一个蛋白质的识别基序介导蛋白与蛋白之间的相互作用, LRR 广泛

分布于真核生物和原核生物中,并且在多种组织和细胞中表达,其定位的特异性以及同蛋白相互作用的复杂性,决定了富含 LRR 蛋白功能的多样性,而富含 LRR 的蛋白,大部分都参与了信号通路的转导,如激素-受体的相互作用、细胞黏附和细胞内物质转运等^[25-27]。大量研究证实,在哺乳动物和硬骨鱼类 LHR 氨基酸序列中都普遍存在数量不等的 LRR,这些 LRR 序列对 LHR 蛋白功能发挥起到重要辅助调节作用^[2,28-31]。氨基酸二级结构是高级结构的基础,同时也会对高级结构形成产生影响,对蛋白质二级和三级结构分析发现,大菱鲆 LHR 蛋白二级结构主要以 α 螺旋和无规则卷曲为主,三级结构中存在 7 个 α 螺旋构象结构域,这显著符合 GPCR 基本特征。蛋白质结构与其相应的生物学功能密切相关,通过对蛋白功能预测发现,大菱鲆 LHR 蛋白主要具有生物合成辅因子、脂肪酸代谢、翻译和运载结合等功能,其中在运载结合和作为辅助因子方面起着关键性作用,这进一步表明了大菱鲆 LHR 作为 GPCR 超家族成员,通过与特异性配体识别结合后,启动不同的信号转导通路,将外源性信息传递到细胞内,引起细胞状态的改变,并最终发挥其调控性腺发育的生物学功能。

LHR 是促性腺激素受体家族重要成员,在脊椎动物卵子发育过程中扮演着重要角色。对硬骨鱼类研究表明,LHR 受体主要分布于卵巢组织中,通过介导卵母细胞和周围滤泡细胞之间物质、能量和信息交流,调控卵母细胞的最后成熟和排卵^[2-3]。荧光定量 PCR 结果显示,LHR 基因在大菱鲆卵巢组织中表达水平最高,同时在其他组织中也有表达,但都显著低于卵巢组织,这表明 LHR 基因在卵巢组织的高度表达,促进了大菱鲆雌性亲鱼卵巢的发育和排卵行为发生。鱼类物种多样性,决定了其繁殖策略多样性,LHR 基因在非性腺组织中也有表达,特别是肝脏组织,这预示 LHR 除了参与卵巢的发育外,也可能对其他组织的发育有调控作用,但其作用机理需要进一步研究。

综上所述,本实验首次克隆了大菱鲆 LHR 基因全长 cDNA 序列,并采用生物信息学方法预测分析了该基因的序列结构、编码蛋白特性及相关生物信息学特征,同时分析了该基因在各组织中 mRNA 表达水平,为进一步揭示 LHR 在卵巢发育

过程中的生物学功能奠定了遗传信息基础,同时也为研究其他海水养殖鱼类生殖周期调控提供重要参考。

参考文献:

- [1] Lin H R. Fish Physiology[M]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2011: 237 - 324. [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社, 2011: 237 - 324.]
- [2] Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós E L, *et al.* Perspectives on fish gonadotropins and their receptors [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 412 - 437.
- [3] Swanson P, Dickey J T, Campbell B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28 (1 - 4): 53 - 59.
- [4] Bockaert J, Pin J P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors; an evolutionary success [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(7): 1723 - 1729.
- [5] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, *et al.* Fish gonadotropin and thyrotropin receptors; evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129 (2 - 3): 441 - 448.
- [6] Ulloa-Aguirre A, Crépieux P, Poupon A, *et al.* Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism [J]. *Review in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2011, 12(4): 259 - 274.
- [7] Ji T H, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (28): 17299 - 17302.
- [8] Gether U, Kobilka B K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (29): 17979 - 17982.
- [9] Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2012, 1822 (12): 1896 - 1912.
- [10] Sokka T A, Hämäläinen T M, Kaipia A, *et al.* Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 55(3): 663 - 670.
- [11] Lovell T M, Al-Musawi S L, Gladwell R T, *et al.*

- Gonadotrophins modulate hormone secretion and steady-state mRNA levels for activin receptors (type I, IIA, IIB) and inhibin co-receptor (betaglycan) in granulosa and theca cells from chicken prehierarchical and preovulatory follicles [J]. *Reproduction*, 2007, 133(6):1159 – 1168.
- [12] Palma G A, Argañaraz M E, Barrera A D, *et al.* Biology and biotechnology of follicle development [J]. *The Scientific World Journal*, 2012, 2012:938138.
- [13] Kwok H F, So W K, Wang Y J, *et al.* Zebrafish gonadotropins and their Receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72 (6): 1370 – 1381.
- [14] Andersson E, Schulz R W, Male R, *et al.* Pituitary gonadotropin and ovarian gonadotropin receptor transcript levels: Seasonal and photoperiod-induced changes in the reproductive physiology of female Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 191:247 – 258.
- [15] Kumar R S, Ijiri S, Trant J M. Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(3):1010 – 1018.
- [16] Lei J L. *Marine Fish Culture Theory and Techniques* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 43 – 86. [雷霖. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2005:43 – 86.]
- [17] Rose T M, Henikoff J G, Henikoff S. CODEHOP (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13):3763 – 3766.
- [18] von Heijne G. The signal peptide [J]. *The Journal of Membrane Biology*, 1990, 115(3):195 – 201.
- [19] Hu X S, Liu X C, Zhang H F, *et al.* Expression profiles of gonadotropins and their receptors during 17 α -methyltestosterone implantation-induced sex change in the Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2011, 78(6):376 – 390.
- [20] Wong A C, Van Eenennaam A L. Gonadotropin hormone and receptor sequences from model teleost species [J]. *Zebrafish*, 2004, 1(3):203 – 221.
- [21] Mittelholzer C, Andersson E, Taranger G L, *et al.* Molecular characterization and quantification of the gonadotropin receptors FSH-R and LH-R from Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(1):47 – 58.
- [22] Ohkubo M, Yabu T, Yamashita M, *et al.* Molecular cloning of two gonadotropin receptors in mummichog *Fundulus heteroclitus* and their gene expression during follicular development and maturation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 184: 75 – 86.
- [23] Kobayashi T, Andersen Ø. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), 1: Isolation of multiple transcripts encoding full-length and truncated variants of FSH-R [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(3):584 – 594.
- [24] Rocha A, Gómez A, Zanuy S, *et al.* Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 272(1–2):63 – 76.
- [25] Takahashi Y, Takahashi N, Putnam F W. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alpha 2-glycoprotein of human serum [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(7):1906 – 1910.
- [26] Enkhbayar P, Kamiya M, Osaki M, *et al.* Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins [J]. *Proteins*, 2004, 54(3):394 – 403.
- [27] Ng A C, Eisenberg J M, Heath R J, *et al.* Human leucine-rich repeat proteins: a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(suppl. 1):4631 – 4638.
- [28] Groves M R, Barford D. Topological characteristics of helical repeat proteins [J]. *Current Opinion in Structure Biology*, 1999, 9(3):383 – 389.
- [29] Kobe B, Kajava A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. *Current Opinion in Structure Biology*, 2011, 11(6):725 – 732.
- [30] Vischer H F, Bogerd J. Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(1):262 – 271.
- [31] Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular

dissection of the glycoprotein hormone receptors[J]. 119 - 126.
Trends in Biochemical Sciences, 2004, 29 (3):

Cloning and bioinformatics analysis of *LHR* gene in *Scophthalmus maximus*

JIA Yudong, MENG Zhen, NIU Huaxin, LIU Xinfu, GAO Chunren, LEI Jilin*

(Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The complete cDNA sequence of luteinizing hormone receptor (LHR) gene in turbot (*Scophthalmus maximus* L) was cloned by degenerate primer PCR amplification and RACE technology, and provided a bioinformatics foundation and tissue expression for the study of *LHR* genetic characters. The full length of *LHR* gene is 3 814 bp, encodes 685 amino acids and shares a higher degree of homology with the *Hippoglossus hippoglossus*. The amino acid sequence analysis revealed that the LHR gene encoded hydrophobic protein and its relative molecular weight was 76. 54 ku, isoelectric point was 7. 22, and contained signal peptides and transmembrane domains. Subcellular localization of LHR was in endoplasmic reticulum and cell membrane. Meanwhile, the amino acids sequence contains thirty-three phosphorylation sites, five glycosylation sites, 6 leucine-rich repeats, SCOP, PDB and seven conserved transmembrane helix domains. Furthermore, the secondary structure of LHR was mainly composed of random coil. The tertiary structure of domain area of LHR protein showed α -helix structure. In addition, we found LHR protein probably plays a key role in transport, translation and metabolism process. Tissue expression analysis showed LHR mRNA was preferentially expressed in ovary, whereas strong amplification signal was also detected in liver. Therefore, the above results laid a genetic information foundation for further study of the *LHR* gene function in the turbot gonads development, providing the theoretical basis for fish breeding in marine aquaculture.

Key words: *Scophthalmus maximus*; luteinizing hormone receptor; clone; bioinformatics; mRNA expression

Corresponding author: LEI Jilin. E-mail: leijilin@ ysfri. ac. cn