

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201709042](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709042)

槟榔江水牛 *FSHR* 基因分离鉴定及其功能初步分析*

周芳廷^{1#}, 杨云^{2#}, 刘丽仙², 张永云³, 苗永旺^{1**}

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业职业技术学院 畜牧兽医学院, 云南 昆明 650212;

3. 云南农业大学农科专业基础实验教学示范中心, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】揭示槟榔江水牛 *FSHR* 基因的结构与功能。【方法】采用 RT-PCR 法克隆了槟榔江水牛 *FSHR* 基因的编码区全序列, 并利用生物信息学方法对其基因编码产物的理化特性、结构及功能进行了初步分析。【结果】槟榔江水牛 *FSHR* 基因编码区全长为 2 088 bp, 编码 695 个氨基酸。氨基酸序列比对显示: 槟榔江水牛 *FSHR* 与其他哺乳动物的同源性在 89.4% 以上。槟榔江水牛 *FSHR* 蛋白 N-端含信号肽和 7 个跨膜结构, 属细胞膜疏水蛋白。该蛋白含有 7tmA_FSH-R、LRRNT、LRR 重复单元和 GnHR_trans 等 4 个保守结构域。槟榔江水牛 *FSHR* 二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲所构成, 分别占 41.73% 和 38.71%。*FSHR* 最有可能在细胞的转运和结合过程中发挥功能作用(概率 ≥ 0.827)。【结论】槟榔江水牛 *FSHR* 属于 G 蛋白偶联受体家族, 在细胞质中合成后转运到达细胞膜, 推测通过与 FSH 激素结合后激活 G 蛋白偶联作用, 进而促进其精子和卵泡的发育与成熟。

关键词: 槟榔江水牛; *FSHR*; 生物信息学分析; 结构与功能

中图分类号: S 823.832 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2018) 06-1060-08

Isolation and Identification of Binglangjiang Buffalo *FSHR* Gene and Preliminary Analysis on Its Function

ZHOU Fangting¹, YANG Yun², LIU Lixian², ZHANG Yongyun³, MIAO Yongwang¹

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural College of Vocational Education, Kunming 650212, China; 3. Teaching Demonstration Center of the Basic Experiments of Agricultural Majors, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purposes] In order to reveal the structure and function of Binglangjiang buffalo *FSHR* gene. [Methods] The whole coding sequence (CDS) of the *FSHR* gene was cloned using RT-PCR method, and the physicochemical properties, structure and function of its coding product were analysed preliminarily based on the method of bioinformatics. [Results] The completed CDS of

收稿日期: 2017-09-26 修回日期: 2017-10-24 网络出版时间: 2018-11-19

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31460582, 31760659); 云南省应用基础研究重点项目(2014FA032, 2007C0003Z)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。周芳廷(1994—), 女, 云南宣威人, 在读博士研究生, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: 850379193@qq.com; 杨云(1963—), 男, 云南通海人, 学士, 副教授, 主要从事动物医学教学和科研工作。E-mail: 939854460@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 苗永旺(1964—), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: yongwangmiaol@126.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201709042](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709042)

Binglangjiang buffalo *FSHR* gene is 2 088 bp in length, encoding a peptide composed of 695 amino acid residues. The amino acid sequence alignments showed that identity is more than 89.4% between Binglangjiang buffalo and other mammals. Binglangjiang buffalo *FSHR* protein is a hydrophobic protein with one N-terminal signal peptide and seven transmembrane regions, located in cell membrane. This protein contains 7tmA_FSH-R, LRRNT, LRR and GnHR_trans conservative domains. The secondary structures of buffalo *FSHR* are mainly consist of alpha helix and random curl, occupied 41.73% and 38.71%, respectively. The buffalo *FSHR* probably function in the process of cell transport and binding (probability $\geq$ 0.827). [Conclusions] Binglangjiang buffalo *FSHR* belongs to the G protein coupled receptor family, which is synthesized in the cytoplasm and transfered to cell membrane. It is speculated that the buffalo *FSHR* activates G protein coupling mechanism by binding to FSH hormone, which in turn promotes the development and maturation of buffalo sperm and follicles.

Keywords: Binglangjiang buffalo; *FSHR*; bioinformatic analysis; structure and function

促卵泡素 (follicle stimulating hormone, FSH) 是由垂体前叶分泌的调控动物繁殖活动的糖蛋白质激素, 它能促进性腺的发育和成熟, 并在哺乳动物整个繁殖周期中诱导和维持配子产生。FSH 对雄性动物精子质量和数量的维持以及雌性动物卵泡的生长发育、分化和成熟起重要作用^[1-2]。FSH 通过促卵泡素受体 (follicle stimulating hormone receptor, *FSHR*) 的介导来实现其生物学功能。雌性动物中, *FSHR* 位于卵泡颗粒细胞膜上, *FSHR* 与卵泡刺激素 FSH 结合, 通过 G 蛋白偶联机制激活腺苷酸环化酶, 使细胞内 cAMP 增加或 Ca^{2+} 内流增加, 从而对细胞代谢或功能活动产生影响。在雄性动物中, *FSHR* 位于睾丸间质细胞膜上, 能刺激曲细精管上皮和次级精母细胞的发育, 并在雄性激素协同下使精子发育成熟^[3-5]。

FSHR 基因是一个影响繁殖性状的重要基因。迄今, 在小鼠^[6]、普通牛^[7]、绵羊^[8]、瘤牛^[9]和猪^[10]等物种上已有研究报道。在人上, PRERZ 等^[11]研究发现 *FSHR* 基因第 10 外显子 p.Asn680Ser 的氨基酸替换与卵巢对 FSH 敏感性以及妇女的排卵数有关。在普通牛上, SANG 等^[12]发现 *FSHR* 基因 A-234500T (rs43676359) 与中国荷斯坦奶牛公牛每次射精量和精液浓度显著相关。CORY 等^[13]对荷斯坦奶牛进行超数排卵应答研究, 发现 *FSHR* 基因 c.871A>G 和 c.1973C>G 与胚胎数量和未受精卵母细胞的数量相关。在猪上, ZHANG 等^[10]发现 *FSHR* 基因外显子 10 上 c.1491C>T、c.1885G>A 和 c.1977C>T 与皖南黑猪和巴克夏猪产仔数显著相关。

水牛具有世代间隔长、发情不明显等特征, 其遗传机理尚不清楚。槟榔江水牛是中国近年发现的唯一的本土型河流型水牛, 具有良好的乳用性能, 有望成为发展中国水牛乳业的重要种源。迄今, 对槟榔江水牛 *FSHR* 基因的研究还未见报道。本研究对槟榔江水牛 *FSHR* 基因完整编码区序列进行了克隆和鉴定, 在此基础上对其编码产物的理化特性、结构及功能进行了分析, 可为解析槟榔江水牛繁殖性状的遗传基础提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验样品及试剂

本研究样品采自云南省腾冲市槟榔江水牛良种繁育场, 1 头成年健康槟榔江水牛母牛的卵巢组织和 1 头成年健康槟榔江水牛公牛的睾丸组织。样品低温带回实验室后, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。试验所需的 RNA 提取、PCR 等试剂及反转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒提取槟榔江水牛卵巢和睾丸组织的总 RNA, 用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 选择完整性较好的 RNA 样品参照反转录试剂盒说明书进行 cDNA 的合成, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 引物设计与目的片段扩增

根据 NCBI 数据库中已发表的普通牛 *FSHR* 基因序列 (登录号为 NM_174061) 采用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对引物用于扩增槟榔江水

牛 *FSHR* 基因的完整编码区。上游引物: 5'AAGAAAGCAGGTGGATGG3', 下游引物: 5'ATTTACCTTATGGATGTGCC3'。

PCR 反应体系体积为 20 μL , 包含 10 $\times$ buffer 2 μL (Mg^{2+} 15 mmol/L), 上、下游引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), dNTP 1.6 μL (2.5 mmol/L), *Taq* 酶 (TaKaRa) 0.2 μL (5 U/ μL), 模板 2 μL (50 ng/ μL), ddH₂O 13.4 μL 。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 然后, 35 个循环的 3 步程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

1.4 序列测定

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选择扩增效果好的产物, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行正、反链双向测序。

1.5 数据分析

利用 DNASTar 软件包 (DNASTar Inc.) 对所得序列进行核对并识别序列的开放阅读框, 进行编码区核酸序列组成分析, 推导其对应的氨基酸序列, 并进行物种间氨基酸序列同源比较分析。采用 Mega 5.0 软件基于两参数模型构建 N-J 系统树。采用 ProtParam tool、NCBI 数据库中 BLAST 程序、ProtScale、ProtComp 9.0、PignaIP 4.1、TMHMM Server 2.0、SOPMA、SWISS-MODEL、Prosite Scan 和 ProtFun 2.2 等软件分别预测 *FSHR* 编码氨基酸的分子量和等电点、FSHR 蛋白的保守结构域、疏水性、亚细胞定位、信号肽、跨膜结构、二级结构、三级结构和 FSHR 的功能。

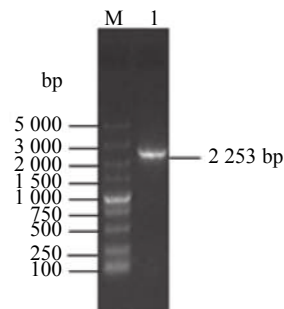
2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

对 *FSHR* 基因 cDNA 进行扩增, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。扩增片段长度与预期结果相符, 片段长度为 2 253 bp。

2.2 *FSHR* 基因分离鉴定

对测序所得序列进行开放阅读框查找, 然后使用 NCBI 数据库进行同源搜索, 确定其为水牛 *FSHR* 基因序列。最终确定槟榔江水牛 *FSHR* 基因 CDS 与其他牛科物种的长度相同, 为 2 088 bp, 编码 695 个氨基酸。槟榔江水牛 *FSHR* 基因完整 CDS 序列及其编码的氨基酸序列见图 2。水牛 *FSHR* 基因 CDS 碱基组成为 A=25.05%、G=21.22%、T=26.10%、C=27.63%、A+T=51.15%、C+G=48.85%。



注: M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. 样品编号。

Note: M. Marker-DL2000; 1. sample No.

图 1 槟榔江水牛 *FSHR* 基因 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product of the *FSHR* gene of Binglangjiang buffalo

将其序列与普通牛序列 (AC_000168) 进行比对, 总长度完全一致, 一致性为 98%, 初步确定槟榔江水牛 *FSHR* 基因编码区也由 10 个外显子组成, 1~9 外显子较小, 长度分别为 152、72、75、75、72、78、69、75 和 186 bp, 分别编码 FSHR 第 1~50、51~75、76~100、101~124、125~148、148~171、172~196、197~221、222~284 位氨基酸, 第 10 外显子最大, 长 1 234 bp, 占 CDS 的 59.09%, 编码 FSHR 第 285~695 位氨基酸。

2.3 FSHR 蛋白质序列基本理化特性

对槟榔江水牛 FSHR 蛋白基本理化特性分析结果见表 1。

2.4 FSHR 亚细胞定位及跨膜结构

预测槟榔江水牛 FSHR 蛋白定位于细胞膜上, 概率为 100%。FSHR 含有 4 个胞外域、4 个胞内域和 7 个跨膜结构, 是典型的 7 次跨膜蛋白。胞外域分别位于氨基酸序列的 1~366、425~443、513~531 和 598~606 等位点; 跨膜结构域分别位于氨基酸序列的 367~389、402~424、444~466、490~512、532~554、575~597 和 607~629 等位点; 胞内域分别位于氨基酸序列的 390~401、467~489、555~574 和 630~695 等位点 (图 3)。

2.5 FSHR 蛋白保守结构域

预测显示: 槟榔江水牛 FSHR 含有 7tmA_FSH-R 结构域, 是 FSHR 最大的结构域, 位于第 363~637 位氨基酸处。此外, FSHR 也包含 LRR-NT、LRR 重复单位和 GnHR 超家族等 3 个保守结构域。LRRNT 位于第 17~50 位氨基酸处, LRR 重复单位位于第 67~245 位氨基酸之间, 包含 LRR_5、LRR_8 和 GnHR_trans 结构域位于第 282~349 位氨基酸处。

1	ATGGCCCTTGTCCTGGTGCCCTTGCTGCATTCTCTGAGCTGGGCTCAGGATGCCATCTCGACTTGTCAGTCTGCTTAACGGAGTTTTCCTCTGCCAGGAGACAAGGTGACAGAGATT	1200
1	M A L S L V A L L A F L S L G S G C H H R L L C H C S N G V F L C Q E S K V T E I	240
121	CCCTCCGACCTCCCAAGGATGCGGTGAAGTACGAGTTTGTCTCACCAGCTTCGAGTCACTCCCAAAAGGAGCCTTTTCAGGATTTGGAGACCTGGAGAAAATAGAGATCTCACGGAAT	400
41	P S D L P R D A V E L R F V L T K L R V I P K G A F S G F G D L E K I E I S R N	80
241	GATGTCTTGGAGTGATAGAGGCAAGCTGTTCTCCAACTGCCCAACTACATGAATTAAGATTGAAAAGGCCAACNCTGCTATACATCGACCTGTATGCCTTCAGCAAGCTTCCT	360
81	D V L E V I E I A N V F S N L P K L H E I R I E K A A A N N L L Y I D P D A F Q N L P	120
361	AACCTCCGACATCTGTTAATATCCAACACAGGTATTAGGCACTTGGCAGCTGTTTACAAGATTAGTCCCTCCAAAAGGTTTACTAGATATTCAAGGTAATATAAACATCCACACAGTT	480
121	N L R H L L I A S N T G I R H L P A V H K I Q S L Q K V L L D I Q G N N I N I H T V	160
481	GAAAGAAATCTTTCATGGGGCTAGNTTGAAGATGATTGTATGGCTGAGTAGAAGTGGGATTCAAGAAATACACAACCTTGCAATCAATGAGCAACCACTCGATGAGCAATGACTTA	600
161	E R N S F M G L S F E S M I V W L S K N G I Q E I H N C A F N G C T Q L D E L N L	200
601	AGTGTAACAGTAATTTGGAAGAACGCTCAATGATGTTTCCAGGAGGCTCTGGACGACTCATCTAGATATTTCAAGAACCCAGGATCCGTTCCCTGCCTAGCTATGGCTTAGAAAAAT	720
201	S D N S N L E E L P N D V F C Q G A S G P V I L D I S R T R I R S L P S Y G L E N	240
721	CTTAAGAGCTCGGGCCGAAGTCAACTACCGCTTAAAAAGACTTCCCAAGTTTGCAAAAATTTGTACACTCTGTGGGGCGAGCCTCACTACCCAGCACTGTGCGGCTTGTGCAAC	280
241	L K K L R A A K S T Y R L K K L P S L E K F V T L V G A S L T Y P S H C C A F A N	840
841	TGGAGCGGGCAAACTCTGACCTTCATCCAATTTGCAACAAATCTATGTTAAGGCAAGAAGTTGATGACATGACTCAGGCTAGGGGTGAGAGAGTCTCTTTGGCAGAAGATGATGAGCCC	960
281	W R R Q T S D L H P I C N K S M L R Q E V D D M T Q A R G Q R V C S L A E D E A T P	320
961	AGCTATGCCAAAGGATTTGACGTGATGACAGTGAATTGACTATGACTATGCAATGAAGTGGTTGATGTGACTGTCTCCCTGAGCGAGAGCATTATCACTCATGTGAGAAATDCCG	1080
321	S Y A K G F D V M Y S E F D Y D L C N E V V D V T C S P E P D A F N P C E D I M	360
1081	GGGGATGATATTTCTCAGATCTTGATATGGTTTATTAGCATCTGGCCACTCTGGGAACATCTAGTGCTGGTGATCTTGATCACCAGTCAAGTATAAACTACAGTCCCCCGTTCTCT	1200
361	G D D I L R V L I W F I S I L A I T G N I L V L V I L I T S Q Y K L T V P R F L	400
1201	ATGTGCAATCTGCGCTTGGCGATCTCTGCAATGGAATCTACCTGCTGCTCATGAGCTCAGTTGATGTCCACACCAAAGCCATACCAACAATGATGCCATCTGCGCAAACTGGAGCA	1320
401	M C N L A F A D L C I G I Y L L L I A S V D V H T K S Q Y H N Y A I D W Q T G A	1440
1321	GGCTGTAGTGTGCGCGCTTTTCTACGTCTTTGGCAGTGGAGTCTCAGTCTACACTTGACCGGCATCAGCTGGAAGGTGGCATACCATCACCATGCCATGCAGCTCGAATGCAAA	1480
441	G C D A A G F F T V F A S E L S V Y T L T A I T L E R W H T I T H A M Q L E C K	480
1441	GTGACGCTCCGCACTGCTGCCAGCGTCACTGTGGTGGCGTGAATCTTGCTTTGCAAGTGGCCCTTTCCCATCTTTGGCATCAGCAGTACATGAAGGTGAGACTTGCCTGCCCAT	1560
481	V Q L R H R A S V S V M L V G W I F A F A V A L F P I F G I S S Y M K V S I C L P M	520
1561	GACATTGACAGCCCTTGTACAGCTCTATGTTATGTCCCCCTTGTGCTCAATGTCTGGCTTGTGGTGCTGTGGCTGCTACAGTACACATCACTCAGGTGAGGAGACCCCAAC	1680
520	D I D S P L S Q L Y V M S S P L V N L L L A F V V I C G C Y A A H I Y L T V R N P N	1800
1681	ATCACATCCTCTTCTAGTGACACCAAGATAGCCAAGCGCATGGCCATGCTCATCTTCAAGCACTTCTCTGCTGATGCCACCATCTCTCTTCTTGCCATCTCTGCTCCCTCAAGTGCCCT	1800
561	I T S S S S D T K I A K R M A M L I F T D F L C M A P I S F F A I S A S L K V P	1920
1801	CTCATCTGTGTCGAAGTCAAGAGCTCTCTGGCTCTGTTTACCCCATCAACTCTGTGCCAACCCCTTCTCTATGTCATCTTACCAAGAAGCTCCGAGAGGATTTTCTCATTTCTG	2000
601	L I T V T S G S K I L L L L F Y P I N S C A N P F L Y A I F T K N F R R D D F F I L	2040
1921	CTGAGCAAGTTTGGCTGCTATGAAGTCAAGCCAGCACTATAGTTCAGAAACCTATCCACTGCCCAACAATTCATCCAAGGAATGGTCACTGCCCCCCAGCTCCCAGGGTTACCAGT	2400
641	L S K F G C Y E V Q A Q T Y R S E T S S T A H A N F H P R N G H C P P A P R V T S	680
2041	GGTCCAATTACACATATTCCCCCTAAGACATTAGCCAAAGAACTAA	2088
681	G S N Y T I L I P I R H I A K N *	2100

注:下划线为信号肽序列;阴影部分为蛋白结构域:第 17~50 位氨基酸处为 LRRNT,第 67~245 位氨基酸处为 LRR 重复单元,第 282~349 位氨基酸为 GnHR trans,第 363~637 位氨基酸为 7tmA FSH-R 结构域。

Note: Underline: signal peptide; shade area conserved domain: 17-50AA. LRRNT; 67-245AA. LRR repeats; 282-349AA. GnHR_trans; 363-637AA. 7tmA FSH-R.

图2 榔江水生 *FSHR* 基因 CDS 序列与其对应的编码的氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence and amino acids sequence of Binglangjiang buffalo *FSHR* gene

表 1 槟榔江水生 FSHR 蛋白的理化特性分析

Tab. 1 Physicochemical properties of Binglangjiang buffalo FSHR protein

特性 characteristics	预测结果 prediction results
等电点 isoelectric point (IP)	6.86
分子量/ku molecular weight	77.8
负电荷残基数 negatively charged residues (Asp+Glu)	62
正电荷残基数 positively charged residues (Arg+Lys)	60
分子式 formula	C ₃₅₂₂ H ₅₅₃₆ N ₉₂₂ O ₉₉₂ S ₃₈
不稳定系数 instability index (II)	43.57
平均疏水性 grand average of hydropathicity (GRAVY)	0.214
脂肪系数 aliphatic index (AI)	105.64
信号肽 signal peptide	氨基酸第 1~17 位: MALSLVALLAFLSLGSG

2.6 FSHR 二级结构和三级结构分析

预测显示：槟榔江水牛 FSHR 中 α -螺旋占 41.73% (含有 290 个氨基酸), 延伸链占 16.98% (含 118 个氨基酸), β 转角占 2.59% 的 (含 18 个氨基酸), 无规则卷曲占 38.71% (含 269 个氨基酸) (图 4)。当 α -螺旋 $<5\%$ 、延伸链 $>45\%$ 时为 all-

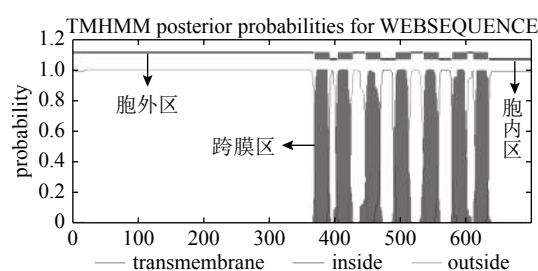


图3 槟榔江水牛 FSHR 跨膜结构图

Fig. 3 Predicted transmembrane domains of Binglangjiang buffalo FSHR

beta 型；当 α -螺旋>30%、延伸链>20% 时为 α - β 型；当 α -螺旋>45%、延伸链<5% 时为 all- α 型；而其他情况为 mixed 型^[14]。本研究水牛 FSHR 蛋白的二级结构比例最大的 3 种形式 α -螺旋、延伸链及无规则卷曲所占的比例分别为 41.73%、16.98%、38.71%，因此，确定槟榔江水牛该蛋白的构型为 mix 型。采用 SWISS-MODEL 程序同源建模预测的三级结构显示 (图 5)：槟榔江水牛成熟 FSHR 蛋白的三级结构与人的 FSHR 蛋白有 86.82% 的相似度，覆盖率为 57%。



注: h、e、t 和 c 分别代表 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲。

Note: h, e, t and c represent alpha helix, extended strand, beta turn and random coil, respectively.

图 4 预测的槟榔江水牛 FSHR 蛋白二级结构

Fig. 4 The inferred secondary structure of Binglangjiang buffalo FSHR



图 5 槟榔江水牛 FSHR 蛋白三级结构

Fig. 5 The deduced tertiary structure of Binglangjiang buffalo FSHR

2.7 FSHR 蛋白功能位点分析

预测 FSHR 蛋白质含有 5 类功能活性位点, 包括 5 个 N-酰基化位点、7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、5 个 N-糖基化位点、4 个蛋白激酶 c 磷酸化位点和 2 个 cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(表 2)。

2.8 FSHR 序列同源性比较

从 NCBI 数据库下载普通牛 (NP_776486)、

牦牛 (XP_0143369)、绵羊 (NM_001009289)、山羊 (NP_001272565)、野牛 (XP_010854200)、瘤牛 (XP_019825216)、人 (AEI86722)、小鼠 (NP_038551) 和猫 (NP_001041479) 的 FSHR 氨基酸序列与本研究的槟榔江水牛序列进行比对, 结果见表 3。各物种间 FSHR 基因编码的氨基酸序列较保守, 槟榔江水牛与普通牛、牦牛、瘤牛和野牛的同源性较高, 分别为 98%、98.1%、98.2% 和 98.0%, 与绵羊、山羊、人、小鼠和猫的同源性分别为 96.5%、96.3%、89.4%、89.5% 和 92.5%。基于 FSHR 氨基酸序列, 采用 MEGA5 构建系统发育树(图 6)。结果显示: 槟榔江水牛与牛属的普通牛、野牛、瘤牛、牦牛聚为一类(支持率 68%), 其与山羊、绵羊遗传关系较远。

2.9 FSHR 功能分析

对 FSHR 功能预测显示(表 4): 该蛋白最有可能在细胞的转运和结合过程中发挥功能作用(概率 ≥ 0.827)。其在信号转导、转录调控和转录的过程中发挥功能的可能性均 > 0.10 。

表 2 槟榔江水牛 *FSHR* 蛋白功能活性位点分析

Tab. 2 Functional active sites of Binglangjiang buffalo *FSHR* protein

功能位点 putative functional sites	位置及氨基酸组成 position and amino composition
N-酰基化位点	28~33:GVfICQ; 64~69:GAfsGF; 309~314:GQrvSL;
N-myristoylation sites	441~446:GCdaAG; 681~686:GSnyTL
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	78~81:SqnD; 193~196:TqID; 204~207:SnIE; 263~266:TlvE;
casein kinase II phosphorylation sites	313~316:SlaE; 331~334:SefD; 564~567:SssD
N-糖基化位点	191~194:NGTQ; 199~202:NLSD;293~296:NKSM;
N-glycosylation sites	560~563:NITS; 683~686:NYTL
蛋白激酶 c 磷酸化位点	249~251:TyR; 555~557:TvR;
protein kinase c phosphorylation sites	596~598:SIK; 653~655:TyR
cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点	282~285:RRqT;
cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites	324~330:Kgf.Dvm.Y

表 3 槟榔江水牛与其他物种 *FSHR* 氨基酸序列一致性

Tab. 3 Homologous of *FSHR* amino acids sequences of Binglangjiang buffalo and other species

物种 species	水牛 buffalo	普通牛 cattle	牦牛 yak	山羊 goat	绵羊 sheep	野牛 bison	瘤牛 zebu	人 human	鼠 mouse	猫 cat
水牛 buffalo	—	98.0	98.1	96.3	96.5	98	98.2	89.4	85.5	92.5
普通牛 cattle	2.0	—	98.7	97.3	97.6	99.4	99.4	90.1	86.7	93.4
牦牛 yak	1.9	1.3	—	97.5	97.7	98.9	99.0	89.4	86.3	93.6
山羊 goat	3.8	2.8	2.5	—	98.3	97.3	97.5	89.2	85.7	92.2
绵羊 sheep	3.5	2.5	2.3	1.7	—	97.6	97.6	89.4	86.3	93.6
野牛 bison	2.0	0.6	1.1	2.8	2.5	—	99.4	90.5	86.8	93.7
瘤牛 zebu	1.8	0.6	1.0	2.6	2.4	0.6	—	90.4	87.1	93.4
人 human	11.5	10.7	11.4	11.7	11.5	10.2	10.3	—	88.0	90.8
鼠 mouse	16.1	14.7	15.1	15.9	15.4	14.5	14.2	13.1	—	86.0
猫 cat	7.9	6.9	6.7	8.2	7.9	6.6	6.9	9.8	15.6	—

注: 对角线以上数值表示一致性百分比, 对角线以下数值表示代表分歧度。
Note: The values above diagonal line represent the identity percentage, and the values below the diagonal represent divergence.

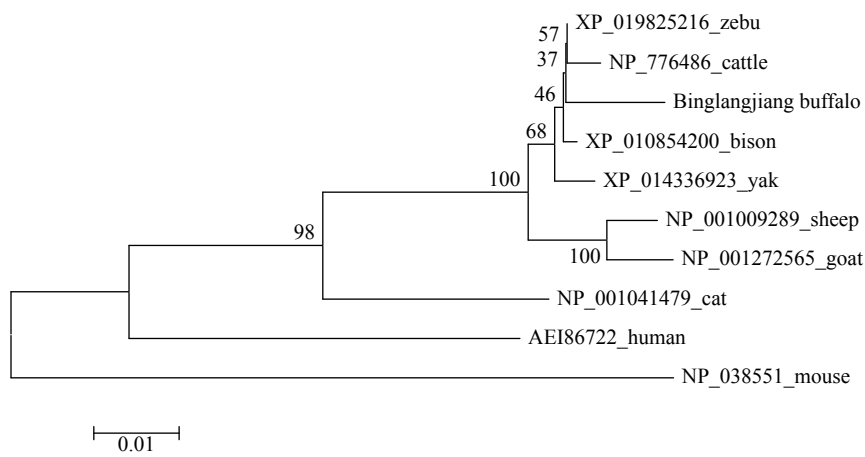


图 6 槟榔江水牛与其他物种 *FSHR* 氨基酸序列系统树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on *FSHR* amino acid sequences of Binglangjiang buffalo and other species

3 讨论

大多数哺乳动物 *FSHR* 基因编码区长 2 088 bp, 共有 10 个外显子和 9 个内含子, 1~9 号外显子较小, 长度在 69~251 bp 之间, 只编码 *FSHR* 蛋白胞外区的 N 端部分, 第 10 号外显子

最大, 长 1 234 bp, 编码 *FSHR* 第 285~695 位氨基酸, 构成 *FSHR* 的跨膜区、胞内区和小部分的胞外区^[15-16]。普通牛与人 *FSHR* 蛋白相似, 由 695 个氨基酸组成, 其中 N 端 1~17 位氨基酸为疏水性信号肽, 第 18~366 位氨基酸构成 *FSHR* 的胞外域, 具亲水性, 其第 367~630 位氨基酸构成的

表 4 槟榔江水牛 FSHR 功能预测
Tab. 4 Prediction of FSHR function in Binglangjiang buffalo

功能分类 functional category	概率 probability	基因本体分类 gene ontology category	概率 probability
辅因子生物合成 biosynthesis of cofactors	0.030	转运 transporter	0.027
细胞被膜 cell envelope	0.038	离子通道 ion channel	0.037
细胞过程 cellular processes	0.027	阳离子通过 cation channel	0.010
中间代谢中枢 central intermediary metabolism	0.041	电压门控离子通道 voltage gated ion channel	0.006
能量代谢 energy metabolism	0.068	应激反应 stress response	0.009
脂肪酸代谢 fatty acid metabolism	0.016	免疫反应 immune response	0.016
嘌呤和嘧啶 purines and pyrimidines	0.070	生长因子 growth factor	0.078
转运和结合 transport and binding	≥0.827	转录调控 transcription regulation	0.103
信号转导 signal transducer	0.110	转录 transcription	0.221
结构蛋白 structural protein	≥0.172		

跨膜区，由 7 个跨膜的 α 螺旋组成，具疏水性。位于其羧基末端的最后 65 个氨基酸构成该蛋白的胞内区^[7]。本研究成功克隆了槟榔江水牛 *FSHR* 基因的 CDS 区，该基因 CDS 区长为 2 088 bp，编码 695 个氨基酸，分子量为 77.8 ku。各物种同源性比较揭示 *FSHR* 蛋白序列一致性在 89.4% 以上，其中槟榔江水牛与普通牛、牦牛、瘤牛和野牛的一致性较高，分别为 98%、98.1%、98.2% 和 98.0%，揭示槟榔江水牛 *FSHR* 的功能与其他牛科物种相似。基于 *FSHR* 氨基酸序列构建的系统树结果显示：槟榔江水牛与普通牛、野牛、瘤牛、牦牛聚为一类，其与山羊、绵羊遗传关系较远，表明亲缘关系较近的物种 *FSHR* 生物学功能较相似。槟榔江水牛 *FSHR* 基因外显子 10 与其他哺乳动物长度一致，为 1 234 bp，占完整 CDS 的 59.09%，编码 *FSHR* 第 285~695 位氨基酸，且槟榔江水牛 *FSHR* 的 7 个跨膜结构和 7tmA_FSH-R 保守结构域为第 10 外显子所编码，大多数功能活性位点均位于第 10 外显子编码的多肽链上，这表明水牛 *FSHR* 基因外显子 10 可能对其编码产物实现其功能起重要作用。本研究从槟榔江水牛卵巢和睾丸组织均克隆得到了 *FSHR* 基因 CDS 序列，表明其在卵巢组织和睾丸组织中均有表达，揭示该基因在公、母水牛的生殖腺中发挥功能。

通过预测发现：槟榔江水牛 *FSHR* 含有 7tmA_FSH-R 结构域，该结构域为 G 蛋白偶联受体家族成员所拥有，具有糖蛋白激素受体的结构特征。糖蛋白激素受体是 7 次跨膜受体，具有 1 个富含亮氨酸重复序列 (leucine rich repeat, LRR) 的细胞外 N-末端，负责激素的识别与结合。糖蛋白激素

通过与同源的 GPCRs 相互作用来发挥生物学功能，其中 LRR 结构域主要参与激素和跨膜区之间的相互作用，*FSHR* 胞外区含有至少 10 个亮氨酸丰富的重复单位 (LRR)，LRR5~LRR10 之间为 FSH 特异性结合的位点^[17]。本研究预测到水牛 *FSHR* 含有 LRR5 和 LRR8 的重复单位，因此推测其与 FSH 结合的位点可能为 LRR5 或 LRR8。二级结构分析显示：*FSHR* 多肽主要由 α 螺旋和无规则卷曲所构成，分别占 41.73% 和 38.71%。蛋白质的空间结构很大程度上决定其功能，其中 α 螺旋主要对蛋白质骨架起到稳定作用，无规则卷曲则构成酶活性部位和其他蛋白质特异的功能部位，决定蛋白质的功能。G 蛋白耦联受体家族含有 7 个疏水性片段形成跨膜 α 螺旋的特征性基序，由胞外环和胞内环交替连接。本研究预测到水牛 *FSHR* 含有 7 个跨膜域，符合 G 蛋白耦联受体家族的特征，是 G 蛋白偶联受体家族的成员之一。对水牛 *FSHR* 功能位点进行预测发现 *FSHR* 蛋白质含有 5 类功能活性位点，其中胞外区 N 端存在 3 个保守的糖基化位点。过去认为，*FSHR* 的糖基化方式可能影响激素的结合，最近的研究证实受体蛋白的糖基化不是 *FSHR* 与 FSH 结合所必须的，但与蛋白质的折叠和通透性有关^[18]。翻译后修饰是蛋白质成熟的必要步骤，其中磷酸化修饰对蛋白的结构和功能具有至关重要的作用，磷酸化与细胞的信号转导、细胞周期等息息相关^[19]。对水牛 *FSHR* 预测发现该蛋白含有 7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点，4 个蛋白激酶 c 磷酸化位点，2 个 cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点。其中酪蛋白激酶 II 是酶类家族中的重要成员，催化蛋白磷酸化作用的过程，控制细胞生

命活动^[20]。酪蛋白激酶Ⅱ作为参与细胞信号转导的一种重要分子,通过对底物的磷酸化作用而影响细胞增殖和分化、细胞信号的转导和加工以及细胞凋亡^[21]。*FSHR* 功能预测结果表明它在转运和结合方面发挥功能的可能性最大。此外,*FSHR* 的 N 端有 17 个氨基酸组成的信号肽,生物信息学方法预测该蛋白定位于细胞膜上。信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽(长度 5~30 个氨基酸),能指导蛋白质的跨膜转移(定位)。因此,推测 *FSHR* 可能是在细胞质中合成后在信号肽的引导下到达细胞膜上的。基于水牛 *FSHR* 的理化特性和结构特征,推测水牛 *FSHR* 在细胞膜上通过与激素 FSH 的结合,激活 G 蛋白偶联型受体介导的信号路径,使细胞内 cAMP 增加或 Ca^{2+} 内流增加,导致一些蛋白酶和转录因子激活,影响一些基因的表达,进而促进水牛精子和卵泡的发育与成熟。

[参考文献]

- [1] SIMONI M, GROMOLL J, NIESCHLAG E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology[J]. *Endocrine Reviews*, 1997, 18(6): 739. DOI: [10.1210/edrv.18.6.0320](#).
- [2] 牛志宏, 冯云. FSH 受体基因单核苷酸多态性与卵巢功能[J]. *中国妇幼健康研究*, 2008(3): 268. DOI: [10.3969/j.issn.1673-5293](#).
- [3] WEIL S, VENDOLA K, ZHOU J, et al. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1999, 84(8): 2951. DOI: [10.1210/jcem.84.8.5929](#).
- [4] ALBANESE C, CHRISTIN-MAITRE S, SLUSS P M, et al. Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 1994, 101(1/2): 211.
- [5] MAYERHOFER A, DISSEN G A, COSTA M E, et al. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(8): 3320. DOI: [10.1210/endo.138.8.5335](#).
- [6] TENA-SEMPERE M, MANNA P R, HUHTANIEMI I. Molecular cloning of the mouse follicle-stimulating hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: functional expression of alternatively spliced variants and receptor inactivation by a C566T transition exon 7 of the coding sequence[J]. *Biology of Reproduction*, 1999, 60(6): 1515. DOI: [10.1095/biolreprod60.6.1515](#).
- [7] HOUDE A, LAMBERT A, SAUMANDE J, et al. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1994, 39(2): 127. DOI: [10.1002/mrd.1080390202](#).
- [8] JENKINS Z A, HENRY H M, SISE J A, et al. Follistatin (FST), growth hormone receptor (GHR) and prolactin receptor (PRLR) genes map to the same region of sheep chromosome 16[J]. *Animal Genetics*, 2000, 31(4): 280. DOI: [10.1111/j.1365-2052.2000.00482.pp.x](#).
- [9] MARSON E P, FERRAZ J B, MEIRELLES F V, et al. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers[J]. *Genetics & Molecular Research*, 2005, 4(3): 496.
- [10] ZHANG X D, ZHU H Y, ZHOU J, et al. Relationship between polymorphisms in exon 10 of *FSHR* gene and litter size in swine[J]. *Genetics & Molecular Research*, 2015, 14(3): 8252. DOI: [10.4238/2015](#).
- [11] PEREZ M M, GROMOLL J, BEHRE H M, et al. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype[J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000, 85(9): 3365. DOI: [10.1210/jcem.85.9.6789](#).
- [12] SANG L, DU Q, YANG W, et al. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha, inhibin beta A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls[J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 126(3/4): 151. DOI: [10.1016/j.anireprosci](#).
- [13] CORY A T, PRICE C A, LEFEBVRE R, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits[J]. *Animal Genetics*, 2013, 44(2): 197. DOI: [10.1111/j.1365-2052.2012.02380.x](#).
- [14] 曾杰, 龚金秋, 王水莲. 小鼠 *GnIH* 基因克隆及生物信息学分析[J]. *中兽医医药杂志*, 2017(4): 8. DOI: [10.13823/j.cnki.jtcvm.2017.04.002](#).
- [15] RENDINA D, GIANFRANCESCO F, DE FILIPPO G F G, et al. *FSHR* gene polymorphisms influence bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2010, 163(1): 165. DOI: [10.1530/EJE-10-0043](#).
- [16] MINEGISHI T, IGARASHI S, NAKAMURA K, et al. Functional expression of the recombinant human FSH receptor[J]. *Journal of Endocrinology*, 1994, 141(2): 369. DOI: [10.1677/joe.0.1410369](#).
- [17] 丰培金, 牛淑玲, 周虚. 卵泡刺激素受体研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2003(5): 311. DOI: [10.3969/j.issn.1004-3845.2003.05.015](#).
- [18] DAVIS D, LIU X, SEGALOFF D L. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function[J]. *Molecular Endocrinology*, 1994, 9(2): 159. DOI: [10.1210/mend.9.2.7776966](#).
- [19] GARAVELLI J S. The RESID database of protein modifications as a resource and annotation tool[J]. *Proteomics*, 2004, 4(6): 1527. DOI: [10.1002/pmhc.200300777](#).
- [20] LEE J Y. Versatile casein kinase 1: multiple locations and functions[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(7): 652. DOI: [10.1104/pp.108.129346](#).
- [21] BEN-NISSAN G, YANG Y D, LEE J Y. Partitioning of casein kinase 1-like 6 to late endosome-like vesicles[J]. *Protoplasma*, 2010, 240(1/4): 45. DOI: [10.1007/s00709-009-0087-y](#).

责任编辑: 何馨成