

家鸡似 G 蛋白偶联受体 119 基因的克隆与组织表达分析

邓秋洋, 张剑南, 王亚军, 李娟*

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 家鸡 G 蛋白偶联受体 119(GPR119)是 A 型视紫红质 G 蛋白偶联受体家族成员。在哺乳类动物中, 该基因高表达于胰腺 β 细胞和 PP 细胞以及小肠组织的内分泌 L 细胞, 参与胰岛素释放调节。本文以家鸡小肠 cDNA 为模板, 首次克隆到似 *GPR119* 新基因, 本研究将其命名为 *GPR119b* 基因。结果显示: 家鸡 *GPR119b* 基因的 cDNA 全长 954 bp, 编码具 317 个氨基酸的前体蛋白。将家鸡 GPR119b 前体蛋白氨基酸序列与绿头鸭、绿海龟、西部锦龟和火鸡的 *GPR119b* 进行序列比对, 分析显示其分别具有 79.9%、61.0%、62.3%、95.5% 的相似度。利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 家鸡 *GPR119b* 的 5'UTR 亦获分离, 该片段 678 bp。采用 Real-time PCR 方法, 本研究亦探究家鸡 *GPR119b* 基因的组织表达, 发现家鸡 *GPR119b* 基因在大脑、肝脏、肾脏、小肠、卵巢、精巢、垂体、胰腺、皮肤、脂肪、肺、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、直肠等组织中有表达, 其中 *GPR119b* 基因在肝脏、肾脏、盲肠和精巢的表达量较高, 在胰腺、皮肤、脂肪和肺组织中, *GPR119b* 基因仅有微量表达。本研究为进一步探究 *GPR119b* 基因在家鸡中的生理功能奠定基础。

关键词: 家鸡; *GPR119b*; 分子克隆; 组织表达

中图分类号: Q959.7; Q78

文献标志码: A

Molecular Cloning and Tissue Expression of Chicken *GPR119*-like Receptor Gene

DENG Qiuyang, ZHANG Jiannan, WANG Yajun, LI Juan*

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: G protein-coupled receptor 119 (*GPR119*) is a member of class A (rhodopsin-type) G protein-coupled receptor family. In mammals, *GPR119* gene is found to be highly expressed in pancreatic islet β cells, PP cells and intestine endocrine L cells involving in insulin secretion. In this study, we cloned a chicken *GPR119*-like gene (named *cGPR119b*) from intestine and examined its expression in chicken tissues. The results showed that the full-length cDNA of *cGPR119b* was 954 bp in length and encode a precursor protein of 317 amino acids. Sequence analysis revealed that chicken *GPR119b* shares high amino acid sequence identity with that of *Anas platyrhynchos* (79.9%), *Chelonia mydas* (61.0%), *Chrysemys picta bellii* (62.3%), *Meleagris gallopavo* (95.5%). 5'-RACE PCR assay revealed that the 5'UTR of chicken *GPR119b* is 678 bp. Quantitative real-time PCR assay showed that *cGPR119b* was widely expressed in various chicken tissues including the brain, liver, kidney, intestine, ovary, testis, pituitary, pancreas, skin, fat, lung, duodenum, jejunum, ileum, cecum and rectum. *GPR119b* is highly expressed in the liver, kidneys, cecum and testes and weakly expressed in the pancreas, skin, fat and lung. Present study provided a basis to uncover the physiological roles of *GPR119b* in chickens.

Keywords: chicken; *GPR119b*; molecular cloning; tissue expression

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)在真核生物中是最大、种类最多的细胞表面受体家族。人类基因组中参与编码 GPCR 的基因被认为超过 1 000 个, 广泛参与机体稳态, 胚胎发育以及学习、记忆、视觉、嗅觉和味觉调控等过程, 其胞外配体包括离子和小分子等, 例如脂肪酸、氨基酸、多肽和类固醇等(Takeda *et al.*, 2002; Perez, 2003; Vassilatis *et al.*, 2003; Fredriksson & Schiöth, 2005)。有鉴于 GPCRs 在机体内介导的广泛生理效应, 在制药工业中, 50% 的药物靶标设计针对 GPCRs 进行研发(Klabunde & Hessler, 2002; Civelli, 2005; Winzell & Ahrén, 2007)。

GPR119 是一类 A 型视紫红质 G 蛋白偶联受体(rhodopsin-like GPCR), 具典型 7 次跨膜结构, 与胞内 G 蛋白偶联, 介导下游效应(Hansen *et al.*, 2012)。目前, 在大鼠 *Rattus norvegicus*、小鼠 *Mus musculus*、仓鼠 *Mesocricetus auratus*、黑猩猩 *Pan troglodytes*、恒河猴 *Macaca mulatta*、牛 *Bos taurus* 和狗 *Canis lupus familiaris* 等哺乳动物中, *GPR119* 基因已获得鉴定(Overton *et al.*, 2008)。在人, 小鼠中, *GPR119* 基因的 cDNA 全长 1 008 bp, 编码 335 个氨基酸的前体蛋白, 具典型七次跨膜结构并由单一外显子编码(Bonini *et al.*, 2001; Ohishi *et al.*, 2001)。*GPR119* 一直以来被视为孤儿受体(orphan receptor), 后来文献报道 *GPR119* 可以被内源性配体溶血卵磷脂(LPC)和油酰乙醇胺(OEA)激活(Soga *et al.*, 2005; Overton *et al.*, 2006)。*GPR119* 可与 $G_{\alpha s}$ 蛋白偶联, 结合配体后, 可刺激下游 cAMP 水平上升(Holst *et al.*, 2011), 进而刺激 β 细胞胰岛素释放, 以及肠道 K 细胞的葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP)和 L 细胞的胰高血糖素样肽 1(GLP-1)的释放(Chu *et al.*, 2008)。GIP 与 GLP-1 是最重要的促胰岛素释放因子, 由此, *GPR119* 激动剂成为治疗糖尿病药物研发的重要候选对象, 解析 *GPR119* 基因序列以及其编码蛋白结构备受关注(Kang, 2013)。

收稿日期: 2017-05-02

接受日期: 2017-05-22

作者简介: 邓秋洋(1990—), 硕士, 主要从事动物分子遗传学, E-mail:13689043376@163.com

*通信作者 Corresponding author, E-mail:lijuanscuhk@163.com

尽管在哺乳动物中, GPR119 的功能已逐步明确, 但在包括鸟类在内的低等脊椎动物类群中, 关于 GPR119 的研究几属空白。本研究以家鸡为研究对象, 从小肠组织中克隆得到一个似 *GPR119*(*GPR119*-like)新基因, 并确定其氨基酸序列。因该基因与鸡与人 *GPR119* 基因具较高序列同源性, 因此, 本研究将其命名为 *GPR119b*。在此基础上, 本研究采用定量 PCR 技术, 首次探究了 *GPR119b* 在家鸡组织中的表达情况。这些结果为探究家鸡 GPR119b 的内源性配体、胞内信号通路, 以及其在家鸡组织中的生理效应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验中成体家鸡全部购自成都活禽市场。家鸡各组织放入液氮速冻后保存于-80 °C 待用。

1.2 实验试剂

本实验中用于序列克隆的高保真 DNA 聚合酶(KOD-FX)体系购自 TaKaRa 公司; 引物合成及测序由北京华大六和股份有限公司完成; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Easy-Taq DNA 聚合酶、dNTP、反转录酶等购自 TaKaRa 公司; RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; 总 RNA 提取用 RNazol 购自 Molecular Research Center 公司; 宿主菌 *Escherichia coli* DH5 α 由本实验室制备保存; DNA 纯化胶回收试剂盒购自上海生工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取 取家鸡心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、小肠、肌肉、胰腺、精巢、卵巢、垂体, 以及脑部各区域(大脑、下丘脑)和肠道分区(十二指肠、空肠、回肠、盲肠、直肠), 放入液氮中进行速冻, 并于液氮中充分研磨, 将组织粉末与 RNazol 混合均匀, 加入 240 μ L DEPC-H₂O 混匀, 4 °C 12 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 15 min; 取上清, 加入 3 μ L 的阿司咪唑(BAN), 漩涡后于 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清, 加入等体积异丙醇, 4 °C 12 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 15 min; 弃上清, 加入 70% 的乙醇漂洗 2 次, 4 °C 12 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 3 min; 弃上清, 用 DEPC-H₂O 溶解沉淀, -80 °C 保存。

1.2.2 RNA 反转录 以各组织 RNA 为模板, 反转录获得 cDNA。反转录反应体系为: RNA 2 μ g, Oligo-dT 1 μ L, 加 DEPC-H₂O 补足至 5 μ L, 70 °C 加热 10 min, 取出后冰浴 2 min; 再加入 2 μ L 5 \times Buffer, dNTPs 0.5 μ L(终浓度 2 mM), MMLV 逆转录酶 0.5 μ L, 2 μ L DEPC-H₂O, 42 °C 孵育 1.5 h, 70 °C 加热 10 min。反应产物用 DEPC-H₂O 稀释至 50 μ L MiliQ-H₂O 作 cDNA 模板, -20 °C 贮存。

1.2.3 引物设计 根据 NCBI 数据库中的预测序列(LOC101750121)设计引物, 扩增 cDNA 获得 *GPR119b* 基因全长, 根据测序序列, 设计检测 *GPR119b* 组织表达的特异性引物。

表 1 本实验所用引物序列

Table 1 Primers used in the study

基因	引物序列 5'-3'	片段长度/bp
<i>GPR119b</i>	rU1: CGGTGCAGTGGCCAGACATGGCT	1276
	rL1: CCGACAGTTCAGGTGAAGGAGA	
<i>GPR119b</i>	qU1: GACAGGTATCTGGCAGTGAG	209
	qL1: AAGCAGAGGGTGTAGAGGTA	
<i>GPR119b</i>	GSP1: TGCCACTCTCCTACCGCACGCTTC	
	nGSP1: GAAGCGTGCGGTAGGAGAGTGGCA	
β -actin	U1: TGTGCTACGTCGCACTGGAT	401
	L1: GCTGATCCACATCTGCTGGA	

1.2.4 家鸡 *GPR119b* 基因 cDNA 扩增 以小肠 cDNA 为模板, 采用 PCR 方法对 *GPR119b* 基因进行扩增。PCR 反应体系: 5 μ L 2 \times KOD Buffer, 2 μ L cDNA 模板, 2 μ L 2 mM dNTP, 0.1 μ L rU1 引物, 0.1 μ L rL1 引物, 0.2 μ L KOD-Fx, 加水补足 10 μ L。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 10 s, 62 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 60 s, 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 20 min。取 3 μ L 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳跑胶检测反应结果。

1.2.5 利用 5'-RACE 获取 *GPR119b* 基因 5'-UTR 序列 根据 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒制备 cDNA 模板。在此基础上, 利用基因特异性引物 PCR 扩增 GPR119 的 5'-端非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)。PCR 反应体系为: 5 μ L 2 \times KOD Buffer, 2 μ L cDNA 模板, 2 μ L 2 mM dNTP, 0.1 μ L UPM 引物, 0.1 μ L GSP 引物, 0.2 μ L KOD-Fx, 加水补足 10 μ L。反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 10 s, 72 °C 退火 3 min, 共 5 个循环; 94 °C 变性 10 s, 70 °C 退火 3 min, 共 5 个循环; 94 °C 变性 10 s, 68 °C 延伸 3 min, 25 个循环; 最后 68 °C 延伸 10 min。反应结束后, 取 3 μ L PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。取上述 PCR 产物, 稀释 1 000 倍作为模板, 进行第二轮巢氏 PCR 反应。PCR 反应体系及条件同上。

对获得的 PCR 产物进行加 A 反应。反应体系为: PCR 产物 4.5 μ L, 10 \times A-attachment Mix 0.5 μ L, 反应条件为 60 °C

2.3 家鸡 *GPR119b* 的 5'-UTR 的确定

为探究 *GPR119b* 基因的基因结构, 本实验以家鸡小肠为 cDNA 模板, 采用 5'-RACE 方法, 对家鸡 *GPR119b* 的 5'UTR 区域进行扩增, 成功获得 5'-UTR 序列。测序结果显示 *GPR119b* 的 5'-UTR 大小为 678 bp。通过与家鸡基因组序列比对, 发现该区域不含新外显子。由此, 可知家鸡 *GPR119b* 与 *GPR119* 一致, 也由单一外子组成(图 3)。

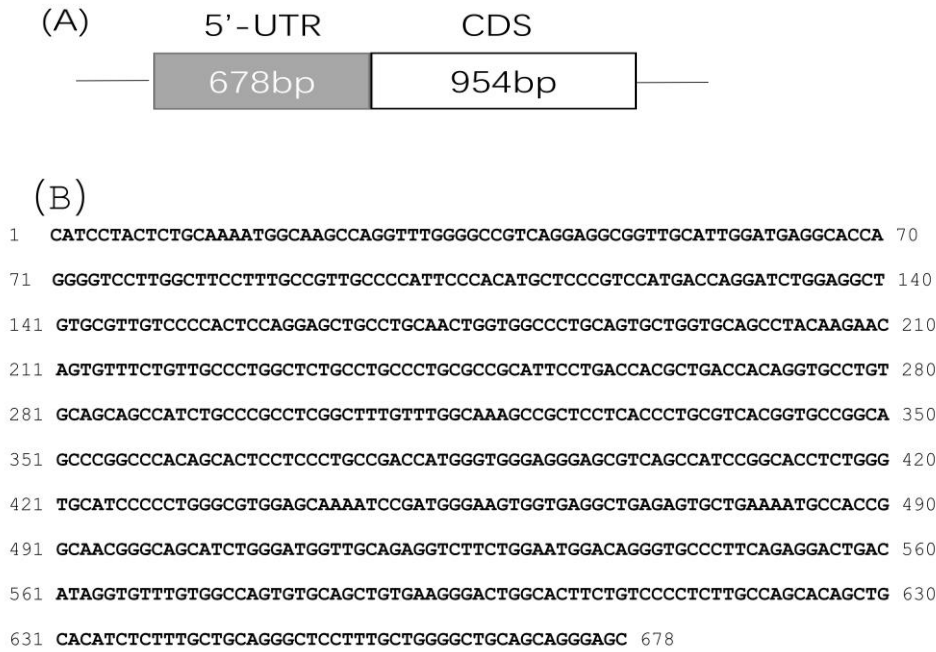


图 3 家鸡 *GPR119b* 的基因结构(5'-UTR+编码区)(A)和家鸡 *GPR119b* 的 5'-UTR 区域核苷酸序列(B)

Fig. 3 Gene structure of chicken *GPR119*-like receptor (*GPR119b*)(A) and 5'-UTR region nucleotide sequence of chicken *GPR119b* (B)

2.4 家鸡 *GPR119b* 基因组织表达分析

采用 Real-Time PCR 方法, 我们检测了 *GPR119b* 基因在家鸡组织中的表达情况。如图 4 所示, 家鸡 *GPR119b* 基因在大脑、肝脏、肾脏、小肠、卵巢、精巢、垂体、胰腺、皮肤、脂肪、肺、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、直肠等组织有表达。其中 *GPR119b* 基因在肝脏、肾脏、盲肠和精巢的表达量较高; 在胰腺、皮肤、脂肪和肺等组织中仅有微量的表达, 而在下丘脑和脾脏检测不到 *GPR119b* 基因的表达(图 4)。

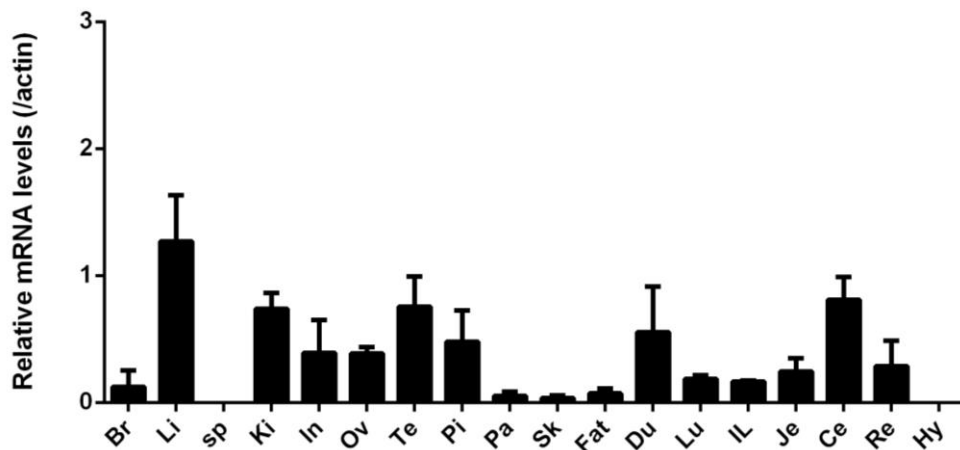


图 4 Real-time PCR 检测 *GPR119b* 在家鸡组织中的表达

Fig. 4 Quantitative real-time PCR assay of *GPR119b* expression in chicken tissues

Br. 大脑, Li. 肝脏, Sp. 脾脏, Ki. 肾脏, In. 小肠, Ov. 卵巢, Te. 精巢, Pi. 垂体, Pa. 胰腺, Hy. 下丘脑, Sk. 皮肤, Fat. 脂肪, Lu. 肺, Du. 十二指肠, Je. 空肠, IL. 回肠, Ce. 盲肠, Re. 直肠。

Br. brain, Li. liver, Sp. spleen, Ki. kidney, In. small intestine, Ov. ovary, Te. testis, Pi. pituitary, Pa. pancreas, Hy. hypothalamus, Sk. skin, Fat. fat, Lu. lung, Du. duodenum, Je. jejunum, IL. ileum, Ce. cecum, Re. rectum.

3 讨论

G 蛋白偶联受体 119(GPR119)是 A 型视紫红质 G 蛋白偶联受体家族成员。在哺乳类动物中, 该基因高表达于胰腺 β 细胞和 PP 细胞以及小肠组织的内分泌 L 细胞, 参与胰岛素的释放调节, 成为制药公司研发糖尿病治疗用药的靶标, 备受关注(Moran *et al.*, 2016)。本文首次报道家鸡 *GPR119b* 基因序列以及其组织表达图谱, 研究结果为探究家鸡 *GPR119b* 基因在家鸡中生理效应奠定基础。

利用 RT-PCR 技术, 我们成功从鸡小肠中克隆得到 *GPR119b* 基因的完整编码区序列。序列分析显示家鸡 *GPR119b* 基因的 cDNA 区域全长 954 bp, 编码具 317 个氨基酸的前体蛋白, 该蛋白由单一外显子编码, 具典型七次跨膜结构域, 其第二胞内区域前端含 D-R-Y 基序(图 3)。氨基酸序列对比发现家鸡 GPR119b 分别与与绿头鸭、绿海龟、西部锦龟和火鸡中预测的 GPR119b 享有 79.9%, 61.0%, 62.3%, 95.5% 的序列相似度, 但家鸡 GPR119b 与人、小鼠和家鸡 GPR119(Accession: JQ768805, 本实验室已克隆)则具较低序列相似度, 因此, 本研究将该似 *GPR119* 基因(GPR119-like receptor gene)命名为 *GPR119b*。有趣的是, *GPR119b* 基因在哺乳动物中已消失。

采用 5'-RACE 技术, 我们亦成功获得家鸡 *GPR119b* 基因的 5'-UTR。测序结果显示该 5'-UTR 长度为 678 bp, 暗示该 5'-UTR 区或含未知调控序列, 或参与控制 *GPR119b* 的翻译效率。利用 Real-Time PCR 方法, 家鸡 *GPR119b* 基因在家鸡组织中的表达图谱获得解析。研究发现家鸡 *GPR119b* 基因在肝脏、精巢、肾脏和盲肠等组织表达丰度较高, 而 *GPR119b* 基因在胰腺和肠分区组织中的表达量较低。该结果与哺乳动物 *GPR119* 基因的组织表达存在较大差异(Chu *et al.*, 2007; Odori *et al.*, 2013)。在大鼠中, *GPR119* 主要在胰腺组织表达(Sakamoto *et al.*, 2006)。在人中, *GPR119* 在胰腺和肠内分泌细胞高表达(Chu *et al.*, 2008)。有鉴于 *GPR119* 基因在家鸡中存在两个拷贝, *GPR119* 与 *GPR119b*。家鸡 *GPR119b* 基因组织表达图谱区别于其在人, 大鼠中的表达图谱。这一结果暗示: *GPR119b* 或与哺乳动物及家鸡 *GPR119* 的功能显著不同, 值得深入探究。

参考文献:

- Bonini JA, Borowsky BE, Adham N, *et al.* 2001. DNA encoding SNORF25 receptor: U.S., Patent 6, 221, 660[P]. 2001-4-24[2017-5-1]. <https://www.google.com/patents/US6221660660>.
- Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, *et al.* 2008. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release[J]. *Endocrinology*, 149(5): 2038-2047.
- Chu ZL, Jones RM, He H, *et al.* 2007. A role for β -cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release[J]. *Endocrinology*, 148(6): 2601-2609.
- Civelli O. 2005. GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(1): 15-19.
- Fredriksson R, Schiöth HB. 2005. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes[J]. *Molecular Pharmacology*, 67(5): 1414-1425.
- Hansen HS, Rosenkilde MM, Holst JJ, *et al.* 2012. GPR119 as a fat sensor[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(7): 374-381.
- Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, *et al.* 2011. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 34(Supplement 2): S251-S257.
- Kang SU. 2013. GPR119 agonists: a promising approach for T2DM treatment? A SWOT analysis of GPR119[J]. *Drug Discovery Today*, 18(23): 1309-1315.
- Klabunde T, Hessler G. 2002. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors[J]. *Chembiochem*, 3(10): 928-944.
- Moran BM, McKillop AM, O'Harte FP. 2016. Development of novel ligands for peptide GPCRs[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 31: 57-62.
- Odori S, Hosoda K, Tomita T, *et al.* 2013. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function[J]. *Metabolism*, 62(1): 70-78.
- Ohishi T, Takasaki J, Matsumoto M, *et al.* 2001. Method of screening remedy for diabetes: U.S. Patent 10/240, 540[P]. 2001-11-30[2017-5-1]. <https://www.google.com/patents/US20030180813>.
- Overton H, Fyfe M, Reynet C. 2008. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity[J]. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1): S76-S81.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, *et al.* 2006. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents[J]. *Cell Metabolism*, 3(3): 167-175.
- Perez DM. 2003. The evolutionarily triumphant G-protein-coupled receptor[J]. *Molecular Pharmacology*, 63(6): 1202-1205.
- Sakamoto Y, Inoue H, Kawakami S, *et al.* 2006. Expression and distribution of Gpr119 in the pancreatic islets of mice and rats: predominant localization in pancreatic polypeptide-secreting PP-cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(2): 474-480.

- Soga T, Ohishi T, Matsui T, *et al.* 2005. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(4): 744-751.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, *et al.* 2002. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence[J]. *FEBS Letters*, 520(1-3): 97-101.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, *et al.* 2003. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8): 4903-4908.
- Winzell MS, Ahrén B. 2007. G-protein-coupled receptors and islet function—implications for treatment of type 2 diabetes[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3): 437-448.