

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)IGF- 基因的克隆 及序列分析*

常抗美 郑孝亮 刘慧慧 张建设 吴常文

(浙江海洋学院海洋科学学院 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室 舟山 316004)

提要 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了大黄鱼胰岛素样生长因子- (IGF-) cDNA 的全序列, 序列全长 2027bp, 由 57bp 的 5'非翻译区、1409bp 的 3'非翻译区和 561bp 的开放阅读框组成。序列分析表明, 大黄鱼 IGF- 编码区包括信号肽、成熟肽(B、C、A、D)和 E 等 6 个区域的 186 个氨基酸, 形成成熟肽时, 信号肽和 E 区被切除, 成熟肽分子量 7.5kDa, 等电点(pI)为 7.76, 成熟肽的 B 区和 A 区有 6 个保守的半胱氨酸残基, 形成 3 对二硫键, 起到了稳定 IGF- 三维结构的作用。与其它物种的 IGF- 比对后发现 A、B 区域比较保守, C、D 区域保守性较差; E 区域的分析结果表明, 大黄鱼 IGF- cDNA 序列为 Ea-4 亚型。核苷酸同源性分析发现, 大黄鱼 IGF- cDNA 与美国红鱼同源性最高, 为 99.47%; 与斜带石斑鱼、金头鲷和褐牙鲆的同源性依次降低, 分别为 97.68%、97.50%和 95.90%。

关键词 大黄鱼, 胰岛素样生长因子- (IGF-), 克隆

中图分类号 S432.1

胰岛素样生长因子- (Insulin-like growth factor-, IGF-)广泛存在于自然界, 作为胰岛素样生长因子家族(IGFs)中的一员, IGF- 是由 70 个氨基酸残基组成的碱性单链多肽, 分子质量为 7.5kDa, 有 B、C、A、D 四个结构域, 在脊椎动物中高度保守(Uchida *et al*, 2003; Froesh, 1985), 主要起刺激生长和分化的作用, 在渗透压调节(Madsen *et al*, 1993)、繁殖(Grado-Ahuir *et al*, 2009)、生命周期(Bonafè *et al*, 2008)、骨质平衡(Giustina *et al*, 2008)、免疫应答(Yada, 2007)和新陈代谢(Aas-Hansen *et al*, 2005)等方面也具有重要的生理功能。IGF- 大部分由肝脏合成, 也可由局部组织细胞产生和分泌, 在体内主要存在于血液中, 浓度和活性受激素和营养状况等多种因素影响。1989 年, Cao 等首次从鲑(*Oncorhynchus tshawytscha*)中克隆到鱼类的 IGF- cDNA (Cao *et al*, 1989), 此后, 虹鳟(*Salmo gairdnei*) (Chen *et al*, 2001)、鲤(*Cyprinus carpio*) (Queenie *et al*, 2003)、罗非鱼(*Oreochromis*

mossambica) (Annette *et al*, 1999)、鲇(*Clarias macrocephalus*) (McRory *et al*, 1994)、鲷(*Sparus aurata*) (Minoru *et al*, 1998)和鲨鱼(*Squalus acanthias*) (Duguay *et al*, 1995)等的 IGF- 基因和氨基酸序列相继得以研究。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 隶属鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄鱼属 (*Pseudosciaena*), 是舟山渔场传统四大渔产之一。由于多年过度捕捞, 其自然资源遭受严重破坏, 形不成渔汛, 甚至濒临衰竭, 基本没有渔获(俞存根等, 2010)。目前大黄鱼的研究主要集中在遗传背景和遗传多样性方面(李凌云等, 2003; 王军等, 2001; 黄振远等, 2011), 而关于功能基因的研究较少, 迄今尚未发现大黄鱼 IGF- 基因的报道。本研究克隆了大黄鱼肝脏组织中 IGF- 基因, 获得其核苷酸及氨基酸序列, 试验结果可为大黄鱼生长调控研究提供基础理论。

* 国家农业公益性行业科研专项“优质安全大黄鱼养殖产业链技术与示范”, 200903029-06 号; 国际科技合作项目“浅海典型渔业生态功能恢复与重建关键技术”, 2009DFB20290 号。常抗美, 教授, E-mail: changkangmei@yahoo.com.cn; 郑孝亮, 同等贡献作者, E-mail: xiaoliangzheng2008@163.com

收稿日期: 2011-02-28, 收修改稿日期: 2011-04-26

1 材料与方 法

1.1 材 料

成体大黄鱼(*Larimichthys crocea*)原种由浙江大海洋科技有限公司东极养殖基地提供。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶等试剂购自宝生物(大连)公司, 其它试剂为国产或进口分析纯。实验用克隆载体 pMD18-T 及克隆菌株 *Escherichia coli* DH5 由本实验室保存。

1.2 肝脏总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

取大黄鱼肝脏组织 0.1g 在液氮中研磨成粉末, 转移 50mg 到 Eppendorf 管中, 加入 1ml Trizol Regent, 按说明书提取总 RNA。用 1%琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量, 紫外分光光度计检测 RNA, 并取少量 RNA 按照试剂盒操作说明合成 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.3 IGF- 基因克隆

根据已报道的不同生物 IGF- 的氨基酸序列保守区(信号肽区域和成熟肽部分)设计大黄鱼 IGF- 基因引物, 序列如下:

P1 5'-CAGTGGCATTATGTGATGT-3'

P2 5'-AACTATGTCCAGGTGAAGG-3'

PCR 反应按照以下条件进行: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 35s, 35 个循环; 接着进行 72℃ 延伸 5min。PCR 产物用 QIAGEN 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后, 与 pMD18-T 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5 感受态细胞, PCR 检测后将阳性克隆送上海英骏公司进行测序。

1.4 IGF- 基因全长 cDNA 的获得

根据前一步获得的 cDNA 序列设计特异性引物, 用于获得大黄鱼 IGF- cDNA 全长。引物序列如下:

P3 5'-AAACCAACAGGCTACGGCCCAAATGCAC-3' 用于 3'RACE 扩增

P4 5'-TTTGGGCCGTAGCCTGTTGGT-3' 用于 5'RACE 扩增

按照 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行: 取 1μg 肝脏总 RNA 按照说明书分别合成 3'RACE-cDNA 和 5'RACE-cDNA。分别以 3'RACE-cDNA 和 5'RACE-cDNA 为模板, 以 P3 和 P4 为引物, 以及试剂盒提供的 UPM 进行 3'RACE 和 5'RACE 的 PCR 反应。3'RACE 和 5'RACE PCR 反应程序: 94℃ 30s, 72℃ 3min, 5 个循环; 94℃ 30s, 70℃ 30s, 72℃ 3min, 5 个循环; 94℃ 30s, 68℃ 30s, 72℃ 3min, 27 个循环; RACE 产物纯化克隆和测

序方法同上。

1.5 核苷酸序列的分析和氨基酸比对

将得到的 3'和 5'cDNA 序列与原 cDNA 片段用 DNAMAN 软件进行分析和序列拼接, 获得大黄鱼 IGF- 基因的全长 cDNA 序列。

使用 Expasy 网站(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)计算编码产物分子量和等电点, 并在网站(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行同源建模。利用 Clustal X 软件将其与已知脊椎动物的 IGF- 基因进行同源性比对, 并以该基因为分子标记分析大黄鱼与其它脊椎动物的亲缘和进化关系, 采用 MEGA3.1 的 Neighbor-joining 法构建分子进化树。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼肝胰脏总 RNA 的质量

总 RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后条带清晰(图 1), 紫外分光光度计测定结果表明, 所提 RNA 的 $A_{260} : A_{280}$ 值均在 1.8—2.0 之间, RNA 的质量能够满足进一步的实验要求。

2.2 大黄鱼 IGF- 基因的 cDNA 全长

以引物 P1、P2 进行 PCR 反应, 获得约 460bp 的单一一条带(图 2A), 测序结果为 461bp。用引物 P3、P4 进行 PCR 反应, 电泳检测 3'RACE 片段在 1600bp 左右(图 2B), 5'RACE 片段在 270bp 左右(图 2C)。

测序后得到的 3'和 5'cDNA 序列与原 cDNA 片段用 DNAMAN 软件进行分析和拼接, 获得大黄鱼 IGF-

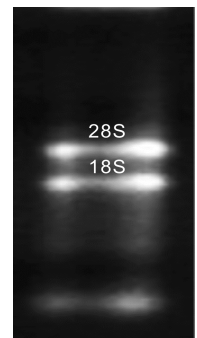


图 1 大黄鱼肝胰脏总 RNA 甲醛变性电泳结果
Fig.1 Result of total RNA isolated from *L. crocea* liver on formaldehyde denatured agarose gel

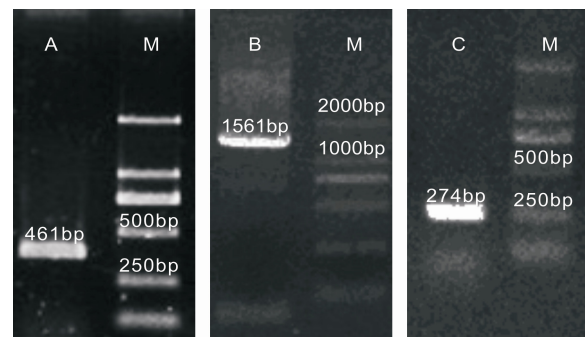


图 2 大黄鱼 IGF- cDNA 的扩增

Fig.2 The amplification of *L. crocea* IGF- cDNA

注: M. DL DNA Marker, A. 中间片段, B. 3'RACE, C. 5'RACE

基因全长 2027bp, 由 57bp 的 5'非翻译区(UTR)、1409bp 的 3'非翻译区和 561bp 的开放阅读框(ORF)组成(图 3)。克隆得到的基因已录入 GenBank, 序号为 JN565945。

2.3 序列分析

序列分析表明, 大黄鱼 IGF- cDNA 的 ORF 编码包括信号肽、成熟肽(B、C、A、D)和 E 区等 6 个区域 186 个氨基酸。信号肽和 E 区域被切除后, 形成 68 个氨基酸残基的成熟肽, 分子量为 7.5kDa, 等电点(pI)为 7.76。在成熟肽的 B 区和 A 区有 6 个保守的半胱氨酸残基(CysB6, CysB18, CysA6, CysA7, CysA11 和 CysA20), 形成 3 对二硫键, 起到了稳定 IGF- 三维结构的作用(图 4), 所建 IGF- 成熟肽的三级结构模型如图 5, 具有 2 个螺旋。

2.4 同源性分析

将大黄鱼 IGF- 成熟肽与 12 种脊椎动物的 IGF- 氨基酸序列进行对比(图 4)。结果表明大黄鱼 IGF- 的氨基酸序列与美国红鱼的完全相同, 与其它鱼类及脊椎动物的差异主要在 C 和 D 区, A 和 B 区同源性较高。进行核苷酸的序列比对后发现与同为石首科的美国红鱼同源性最高, 为 99.47%; 与鲈形目的其它鱼类也具有较高的同源性, 如与斜带石斑鱼、金头鲷和尼罗罗非鱼的同源性分别为 98.92%、97.85%和 88.17%; 与鲽形目的褐牙鲆和虹鳟同源性也很高, 达到了 98.39%和 82.26%; 与鲤形目的鲤鱼、鲟形目的欧洲鳇的同源性稍低为 68.62%、60.75%, 与两栖类、鸟类和哺乳类差异较大, 与非洲爪蟾、鸡、鼠、人的同源性分别为 58.84%、52.15%、50.00%、50.00%(表 1)。从系统进

化树(图 6)可以看出, 鱼类的 IGF- 与去他脊椎动物的分支较明显。在鱼类之间, 分类地位较近鱼类出现在同一分支, 大黄鱼与美国红鱼在一个分支上, 也证明它们的亲缘关系较近。

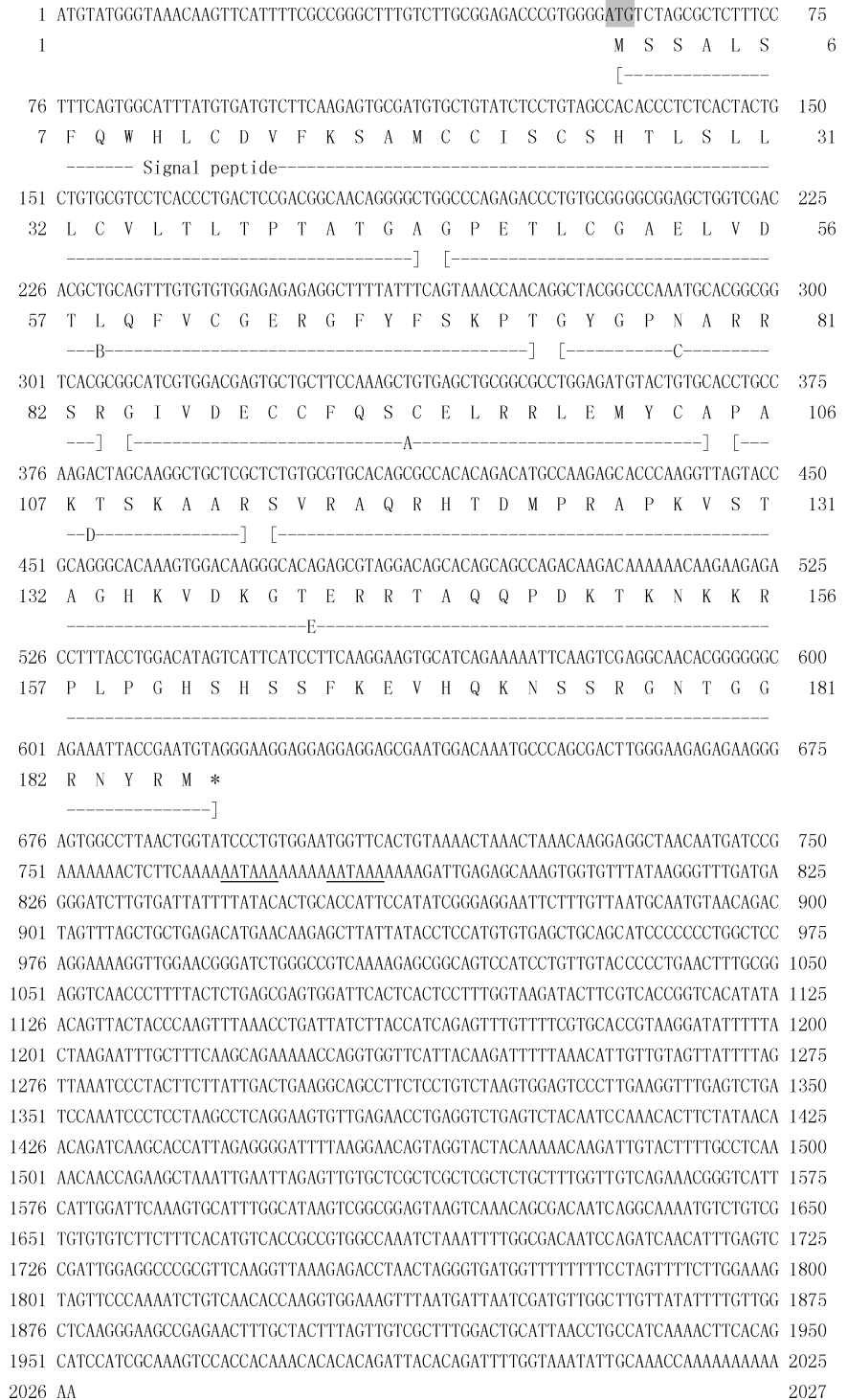


图 3 大黄鱼 IGF- 基因全长 cDNA 和推测的前肽序列

Fig.3 cDNA and deduced propeptide sequence of *L. crocea* IGF-

注: 灰色阴影部分表示起始密码子, *表示终止密码子, 下划线表示多聚腺苷酸加尾信号

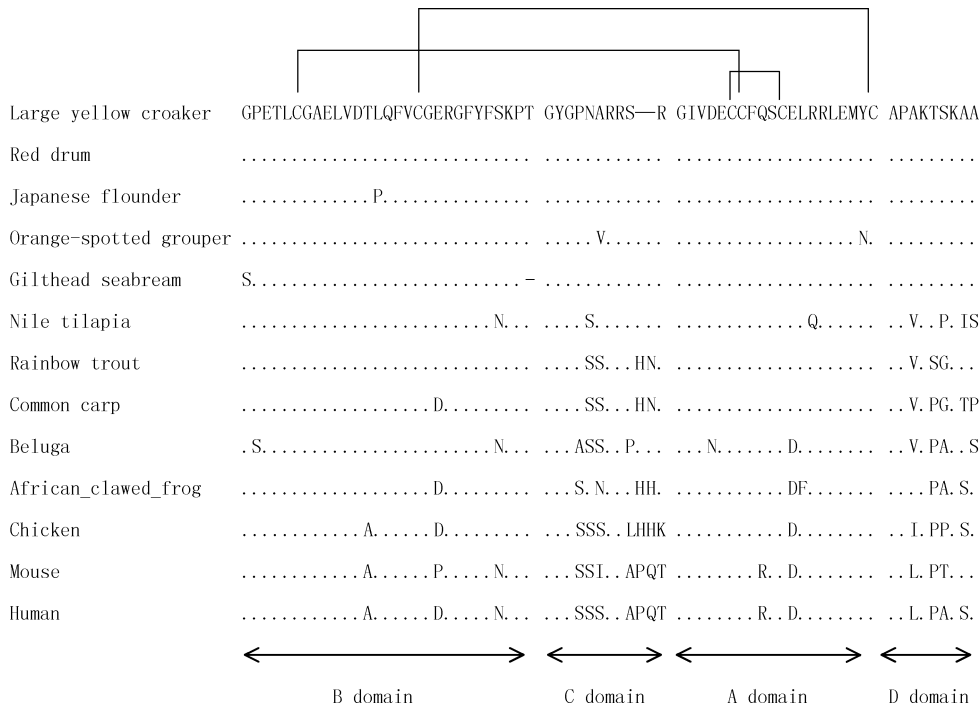


图 4 大黄鱼与 12 种不同脊椎动物的 IGF-1 氨基酸序列比较

Fig.4 Comparison of amino acid sequences of IGF-1 in *L. crocea* and 12 vertebrates

注: Red drum, 美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*) GQ443297.1; Japanese flounder, 褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) AF061278.1; Orange-spotted grouper, 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) AY513719.1; Gilthead seabream, 金头鲷(*Sparus aurata*) AY996779.2; Nile tilapia, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) EU272149.1; Rainbow trout, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) M95183.1; Common carp, 鲤鱼(*Cyprinus carpio*) BAA11879; Beluga, 欧洲鳊(*Huso huso*) AB512770.1; African clawed frog, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) AAA70330; Mouse, 鼠(*Mus musculus*) AAH12409; Chicken, 鸡(*Gallus gallus*) NP001004384; Human, 人(*Homo sapiens*) CAA40342

3 讨论

本实验通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了大黄鱼的胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) cDNA 的全序列 2027bp, 其中开放阅读框为 561bp, 编码长度为 186 个氨基酸的 IGF-1 前肽, 包括信号肽、B、C、A、D 和 E 等 6 个区域, 成熟时切掉信号肽和 E 区, 形成 68 个氨基酸的碱性多肽。通过与其它脊椎动物的 IGF-1 比较后发现 B 区和 A 区比较保守, 有国外学者认为在哺乳动物 IGF-1 B 区和 A 区存在的保守型残基与其结合蛋白和受体有关(Duvall *et al*, 2002), 这些保守残基说明了 IGF-1 在脊椎动物中有着相似的功能;

而与两栖类、鸟类和哺乳类同源性较低。有关鱼类 IGF-1 基因同源性的研究已有很多报道, 也有学者将其作为亲缘关系远近的评定依据(张殿昌等, 2002; 白俊杰等, 2001; 石和荣等, 2005)。大黄鱼与美国红鱼 IGF-1 基因的 561 个核苷酸中仅有 3 个碱基差异, 186 个氨基酸残基完全相同, 也在 IGF-1 基因的水平上说明大黄鱼和美国红鱼亲缘关系较近。

研究发现, 鲑鳟鱼类 IGF-1 存在四种亚型, 这四种亚型的 E 区域氨基酸残基数目不同, 分别含有 35、47、62 与 74 个氨基酸, 依其大小依次命名为 Ea-1、Ea-2、Ea-3 与 Ea-4 (Sakamoto *et al*, 1995; Duan *et al*,

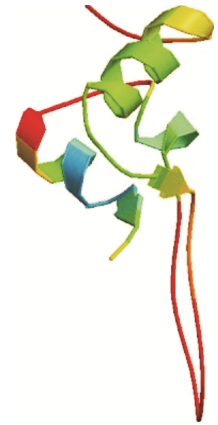


图 5 IGF-1 的三维结构模型

Fig.5 The three dimensional structure model of IGF-1

另外, 结构上的保守性也表明 IGF-1 的生物学功能在脊椎动物进化过程中的重要性(Upton *et al*, 1998)。

通过与其它物种的 IGF-1 核苷酸序列比对, 发现大黄鱼与鲈形目和鲷形目的鱼类同源性很高, 与鲤形目和鲟形目也具有较高的同源性,

表 1 大黄鱼 IGF-1 核苷酸与其它脊椎动物同源性比较(%)

Tab.1 The homology comparison on IGF-1 nucleotide sequences between *L. crocea* and other vertebrates(%)

大黄鱼	美国红鱼	斜带石斑鱼	褐牙鲆	金头鲷	尼罗罗非鱼	虹鳟	鲤鱼	欧洲鳊	非洲爪蟾	鸡	鼠	人
100	99.47	98.92	98.39	97.85	88.17	82.26	68.82	60.75	54.84	52.15	50.00	50.00

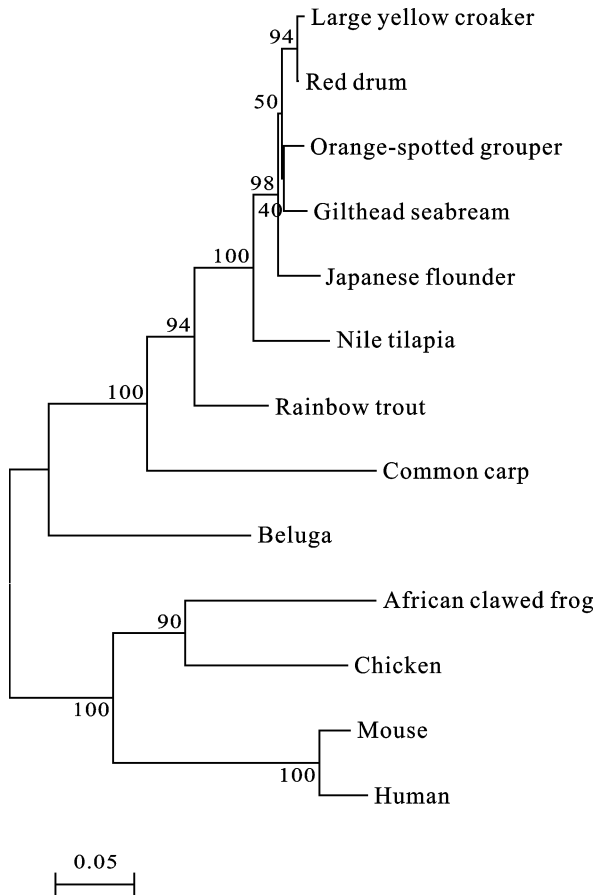


图6 大黄鱼与12种脊椎动物IGF-1氨基酸序列的系统发生树

Fig.6 Phylogenetic tree inferred from *L. crocea* and 12 vertebrates IGF-1 amino acid sequences

1993)。本文将克隆到的大黄鱼 IGF-1 与鲑鳟鱼类的 IGF-1 结构进行比较,认为大黄鱼肝脏表达的 IGF-1 属 Ea-4 亚型。美国红鱼 IGF-1 三种亚型(Ea-2, Ea-3, Ea-4)在成体的肝脏、卵巢、脾脏、胆囊、脑、红肌、胰腺、脊髓中检测到表达,而 Ea-1 亚型只在幼年阶段表达(Cynthia *et al*, 2010),在大黄鱼的系统发育过程和各部分组织是否也存在 IGF-1 的四种亚型,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 王 军, 全成干, 苏永全等, 2001. 官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋学报, 23(3): 87—91
- 石和荣, 张 勇, 张为民, 2005. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷 IGF-1 基因表达和生长的影响. 动物学报, 51(1): 108—116
- 白俊杰, 劳海华, 叶 星等, 2001. 团头鲂胰岛素样生长因子-1 基因克隆与分析. 动物学研究, 22(6): 502—506
- 李星云, 张海琪, 薛良义, 2003. 网箱养殖大黄鱼遗传多样性

- 的同工酶和 RAPD 分析. 中国水产科学, 10(5): 523—526
- 张殿昌, 江世贵, 苏天凤, 2002. 鲑胰岛素样生长因子 (IGF-1)cDNA 的分子克隆和序列分析. 上海水产大学学报, 11(2): 97—101
- 俞存根, 陈全震, 陈小庆等, 2010. 舟山渔场及邻近海域鱼类种类组成和数量分布. 海洋与湖沼, 41(3): 410—417
- 黄振远, 苏永全, 张建设等, 2011. 闽粤群和岱衢群养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)及其杂交子代遗传差异的 SSR 分析. 海洋与湖沼, 42(4): 592—596
- Aas-Hansen O, Jorgensen E H, Vijayan M M, 2005. Fasting modulates metabolic responses to cortisol, GH and IGF-I in Arctic charr hepatocytes. Fish Biol, 67: 1631—1645
- Annette C S, Esther N f, Werner K *et al*, 1999. Insulin-like growth factor-I and -II in the ovary of a bony fish, *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: *in situ* hybridisation, immunohistochemical localisation, Northern blot and cDNA sequences. Mol Cell Endo, 156: 141—149
- Bonafè M, Olivieri F, 2008. Genetic polymorphism in long-lived people: cues for the presence of an insulin/IGF-pathway-dependent network affecting human longevity. Mol Cell Endo, 299(1): 118—123
- Cao Q P, Duguay S T, Plisetskaya E *et al*, 1989. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor-I mRNA. Mol Endo, 3: 2005—2010
- Chen Mark H C, Lin G H, Gong H Y *et al*, 2001. The characterization of prepro-insulin-like growth factor-I Ea-2-expression and insulin-like growth factor-I genes (devoid 81bp) in the zebrafish (*Danio rerio*). Gene, 268: 67—75
- Cynthia K F, Rafael P, Kenneth A *et al*, 2010. The novel finding of four distinct prepro-IGF-I E domains in a perciform fish, *Sciaenops ocellatus*, during ontogeny. Gen Comp Endo, 169: 75—81
- Duan C, Duguay S J, Plisetskaya E M, 1993. Insulin-like growth factor (IGF-1) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family peptides. Fish Physiol Biochem, 11: 371—379
- Duguay S J, Chu S J, Mommsen T P *et al*, 1995. Divergence of insulin-like growth factors I and II in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. FEBS Letters, 371: 69—72
- Duvall H, Rousseau K, Eli è s G *et al*, 2002. Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF-I and IGF-II. Gen Comp Endo, 126: 269—278
- Froesh E R, 1985. Action of insulin-like growth factors. Annu Rev Physiol, 47: 443—467
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E, 2008. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. Endo Rev, 29(5): 535—559
- Grado-Ahuir J A, Aad P Y, Ranzenigo G *et al*, 2009. Microarray analysis of insulin-like growth factor-I-induced changes in

- messenger ribonucleic acid expression in cultured porcine granulosa cells: possible role of insulin-like growth factor-I in angiogenesis. *Anim Sci*, 87(6): 1921—1933
- Madsen S S, Bern H A, 1993. *In vitro* effects of insulin-like growth factor-I on gill Na⁺, K⁺-ATPase in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology*, 138: 23—30
- McRory J E, Sherwood N M, 1994. Catfish express two forms of insulin-like growth factor- (IGF-) in the brain. *Journal of Biology Chemistry*, 269(28): 18588—18592
- Minoru T, Tomomi T, Ichiro Y *et al*, 1998. Gene and cDNA structures of flounder insulin-like growth factor- (IGF-): multiple mRNA species encode a single short mature IGF- . *DNA and Cell Biology*, 17(10): 859—868
- Queenie P V, Chan K M, Kin L *et al*, 2003. Common carp insulin-like growth factor- gene: complete nucleotide sequence and functional characterization of the 5'-flanking region. *Gene*, 322: 145—156
- Sakamoto T, Hirano T, Madsen S S, 1995. Insulin-like growth factor gene expressing during parr-smolt transformation of coho salmon. *Zool Sci*, 12: 249—252
- Uchida K, Kajimura S, Riley L G *et al*, 2003. Effects of fasting hormone/insulin-like growth factor-I axis in the intilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol, Part A*, 134: 429—439
- Upton Z, Yandell C A, Degger B G *et al*, 1998. Evolution of insulin-like growth factor- (IGF-) action: *in vitro* characterization of vertebrate IGF- proteins. *Comp Biochem Physiol, Part B, Biochem Mol Biol*, 121: 35—41
- Yada T, 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen Comp Endo*, 152: 353—358

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR cDNA FROM *LARIMICHTHYS CROCEA*

CHANG Kang-Mei, ZHENG Xiao-Liang, LIU Hui-Hui, ZHANG Jian-She, WU Chang-Wen
(Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Zhejiang Provincial Marine Culturing Equipments and Engineering Technology, Zhoushan, 316004)

Abstract The insulin-like growth factor (IGF-) gene of *Larimichthys crocea* was cloned from liver by RT-PCR and RACE technique. All the length of the nucleotide sequence was 2027bp, including 5'UTR (57bp), 3'UTR (1409bp) and ORF (561bp). Nucleotide sequence analysis showed that ORF encoded 186 amino acids that was composed of signal peptide, mature peptide (B, C, A, D) and E domain. Signal peptide and E domain were cut off when the peptide was processed. The molecular weight of mature peptide was 7500Da and its pI was 7.76. There were three disulfide bonds formed by six cysteines in B and A domains. The disulfide bonds comparing the amino acid sequence of IGF- of *L. crocea* with those of other species, the sequence conservation of A and B domains is high, while low in C and D domains. E domains in IGF- of *L. crocea* was belonged to IGF- Ea-4 subtype. Analysis of nucleotide sequence showed that IGF- cDNA of *L. crocea* is similar to other fishes which shared sequence homology of 99.47% with *Sciaenops ocellatus*, 97.68% with *Epinephelus coioides*, 97.50% with *Sparus aurata* and 95.90% with *Paralichthys olivaceus*.

Key words *Larimichthys crocea*, IGF- , Cloning