

银鲟(*Pampus argenteus*)胰岛素样生长因子-I 基因的克隆和表达分析*

朱晓芳 郭晓鸽 张鼎元 杨佳喆 徐善良^① 王丹丽^①

(宁波大学海洋学院 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

摘要 胰岛素样生长因子-I(Insulin-like growth factor-I, IGF-I)是影响脊椎动物生长、发育及代谢的重要调控因子。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆了银鲟(*Pampus argenteus*)肝脏 IGF-I cDNA 序列,应用半定量 RT-PCR、Real-time qPCR 和原位杂交的方法检测了 IGF-I 的组织表达特性、在肝脏中的生长表达特性和 IGF-I 基因在肝脏中的定位。序列分析表明,IGF-I cDNA 序列全长 836bp,其 5'非编码区 128bp、3'非编码区 92bp,开放阅读框(open reading frame, ORF)605bp,由此推导 IGF-I 前体蛋白由 201 个氨基酸组成;前体肽由信号肽、成熟肽、E 肽三部分组成,其中信号肽 59 个氨基酸,成熟肽 68 个氨基酸,E 肽 74 个氨基酸;成熟肽由 B、C、A、D 四个区域组成,E 肽分析表明,银鲟 IGF-I 属 Ea-4 型。同源性比较结果表明,银鲟与同目鲈形目鱼类的 IGF-I 编码序列同源性较高,为 83.52%—91.40%;与哺乳类、鸟类和爬行类的同源性较低。半定量 RT-PCR 和 Real-time qPCR 组织特异性表达结果显示,IGF-I mRNA 在肝脏组织中的表达量最高,显著高于其它组织,肾脏、心脏、肌肉、脑、鳃、小肠、卵巢次之,嗅球、脾脏和胃中表达较低;半定量 RT-PCR 和 Real-time qPCR 不同生长阶段表达结果显示,IGF-I mRNA 在 30—50g 肝脏组织中表达量最高($P < 0.05$);IGF-I mRNA 在肝脏中的原位杂交定位结果显示,在肝脏细胞中均有表达,阳性信号主要位于细胞质中,靠近细胞边缘处信号较强。

关键词 银鲟;胰岛素样生长因子-I 基因;荧光定量;原位杂交

中图分类号 Q953 doi: 10.11693/hyhz20160600142

胰岛素样生长因子(IGFs, insulin-like growth factors)因其结构与胰岛素原相类似而得名,它是一种单链多肽,包括 IGF-I、IGF-II (Perks *et al*, 1995)和 IGF- (Wang *et al*, 2008; Li *et al*, 2011)。IGF-I 由 70 个氨基酸组成,分子量约为 7.5kDa (Vong *et al*, 2003),能通过选择性地促进有丝分裂发生分化以及抑制细胞凋亡,在生长、分化和繁殖调控中起着相当大的作用(Reinecke *et al*, 2005)。自 Rinderknecht & Humber 于 1978 年首次阐述了 IGF-I 的一级结构,很多脊椎动物的 IGF-I 基因序列已经被克隆得到,同时对它们的表达模式也进行了相应的研究(Rinderknecht *et al*,

1978)。在鱼类中, Cao 等于 1989 年首次从鲑 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 中克隆到鱼类 IGF-I cDNA (Cao *et al*, 1989), 随后, 鲤形目的鲤 (*Cyprinus carpio*) (华益民等, 2001)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) (白俊杰等, 2001)、胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) (郑凯迪等, 2007)、鲈形目的鲈 (*Sparus aurata*) (Tanaka *et al*, 1998)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) (常抗美等, 2012)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) (钱焜等, 2014) 等几十种鱼类的 IGF-I 基因序列相继得到研究。

银鲟(*Pampus argenteus*)隶属鲈形目(Perciformes),

* 国家星火计划项目, 2015GA701007 号; 浙江省自然科学基金项目, LY15C190003 号; 宁波市重大科技专项, 2015C110003 号。朱晓芳, E-mail: 2366405841@qq.com

通讯作者: 徐善良, 教授, E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn; 王丹丽, 教授, E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-30, 收修改稿日期: 2016-08-15

鲟科(Stromateidae), 鲟属(*Pampus*), 分布范围广泛。迄今, 对银鲟的研究涉及分类、资源评估、生态和繁殖特性、人工繁殖、营养成分分析、体成分分析等诸多方面(施兆鸿等, 2009, 2011; 彭士明等, 2010, 2013; 徐善良等, 2012, 2013; 周健恺等, 2014; 王腾飞等, 2015; 闫雪梅等, 2015), 目前对银鲟分子生物学方面的研究较少, 对银鲟胰岛素样生长因子(IGF)基因的克隆, 国内外尚无文献报道。作者在本文中采用同源克隆和 RACE-PCR 方法, 对养殖银鲟 IGF-I 的 cDNA 全长进行克隆, 采用实时荧光定量(Real-Time PCR)技术检测其 mRNA 的组织表达特性和在肝脏中的表达特性和定位, 以期研究 IGF-I 在银鲟生长发育中的调控机理提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用银鲟取自浙江省宁波市象山鱼得水水产养殖有限公司的银鲟养殖池。选择摄食正常、无病无伤、健康的个体。在养殖的不同阶段, 分别捞取体重为 1—5g、5—15g、15—30g、30—50g、50—100g、100—150g、>150g 的 7 种规格鱼体各 15 尾。立即在冰盘上用无菌解剖工具活体摘取肝脏、肌肉、肾脏、肠、垂体、心、嗅球、胃、鳃、卵巢共 10 种组织样品, 置于盛有 RNA 保护酶的冻存管中, 置于-80℃冰箱中保存备用。

实验期间养殖池水温 25—27℃, pH 值为 8.21±0.3, 盐度为 20.3±0.8。饲料为日本林谦株式会社产“鱼宝”5#饲料和新鲜马鲛鱼肉按 1:1 反复绞碎制成的湿团状料。

1.2 引物设计

从 GenBank 中获得已注册的花鲈(*Lateolabrax japonicus*, JN596878.2)、鳊(*Siniperca chuatsi*, HM164110.1)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, AY513719.1)、河鲈(*Perca fluviatilis*, AJ586907.1)和金头鲷(*Sparus aurata*, AY996779.2) IGF-I 基因的 cDNA 全长, 运用 ClustalX1.83 软件找到 IGF-I 基因的保守区, 并用 Primer Premier 5 软件设计兼并引物 IGF-I-F 和 IGF-I-R, 进行 PCR 扩增, 得到一条长度约为 762bp 核心片段, 根据这部分序列设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物 IGF-I-5'R1, IGF-I-5'R2, IGF-I-3'F1, IGF-I-3'F2, 扩增出 IGF-I 全长 cDNA 序列, 进一步设计出实时荧光定量 PCR 引物 IGF-I-RT-F, IGF-I-RT-R。基于银鲟 18S(AJ564775.1)的 cDNA 序列,

设计内参基因序列引物 18S F 和 18S R。检验后, 用一对内参基因引物 18S-F/R 以及一对特异性引物 qIGF-I-F/R 来检测银鲟不同组织和肝脏不同生长发育时期 IGF-I mRNA 的表达情况, 测序引物用菌体自带引物 M13-R、M13-47-F(表 1)。

1.3 总 RNA 提取以及 cDNA 第一链的合成

采用 RNA 提取试剂盒(Axygen, RNA extraction kit)对同一时期不同组织和不同生长阶段肝脏总 RNA 分别进行提取。采用 TaKaRa 反转录试剂盒对上述 RNA 进行反转录, 获得 cDNA。经 37℃ 反转录 15min, 于 85℃ 灭活反转录酶 5s。将合成得到的 cDNA 产物保存于-20℃ 或直接用于 PCR。

1.4 对 IGF-I 基因 cDNA 核心片段进行克隆

以银鲟的肝脏 cDNA 作为模板, 采用 IGF-I-F/R 简并引物, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50μL, 优化后的扩增条件如下: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s; 55℃ 退火 30s, 于 72℃ 延伸 1min, 30 个循环; 再于 72℃ 延伸 10min; 在 4℃ 保存。

将 PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 并切胶回收目的片段。进行连接转化培养, 再根据电泳检测菌液 PCR 结果, 取阳性克隆菌液, 送上海 Sunny 生物科技有限公司测序。

1.5 银鲟 IGF-IcDNA 全长获取

将测序结果在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中, 进行 BlastX 对比分析, 如果测序所得的 IGF-I 部分序列与其它物种的 IGF-I 同源, 即根据测得序列再设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性引物 IGF-I-5'R1, IGF-I-5'R2, IGF-I-3'F1 和 IGF-I-3'F2, 用于 RACE 扩增。采用 SMART™ RACE cDNA 试剂盒(Clontech)进行 5'RACE 和 3'RACE, 以获得全长 cDNA。

1.6 对 IGF-I 基因的信息学分析

采用 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白的理化特性进行预测; 并利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上的 BlastX 工具核酸和蛋白序列相似性进行比较分析; 采用 NCBI 的 ORF Finder 分析开放阅读框, 预测氨基酸的序列; 用 ExPASy-PROSITE 网站(<http://prosite.expasy.org/>)预测氨基酸功能域; 采用 Signal P4.1 Server 对信号肽进行分析; 功能域的预测则采用 Smart 软件; 多序列比对分析则采用 ClustalW 软件。构建进化树采用 MEGA5.05 软件中的 M-L(Maximum-Likelihood)法。并采用自展法(Bootstrap)进行 1000 次重复检验。

表 1 本实验所用引物及序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used in the experiments

引物名称	序列(5'—3')
兼并引物	
IGF-I-F1	ATTGCCCGCATCTCATCYTC
IGF-I-R1	GCTGGGCATTGTCCATTCC
IGF-I-F2	CAAGAGTGCGATGTGCTGTA
IGF-I-R2	CTATGTCCAGGTRAAGGTCT
基因特异性引物	
IGF-I-5'R1	GTAGGAGTCAGGGTGAGGACGCAC
IGF-I-5'R2	CGCAACGCAGCTTGAAGACATCAC
IGF-I-3'F1	CCTGGACATAGTCATTTCGACCTTC
IGF-I-3'F2	ACAGAATGTAGGGAAGGAGCGAATGG
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
IGF-I-S	ATTGCCCGCATCTCATCTTCTT
IGF-I-V	ACAGTGAACCATTCCACAGGGGT
测序引物	
M13-47-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
基因特异性引物	
qIGF-I-F	TTGTGGATGAGTGCTGCTTC
qIGF-I-R	GCTGTACTAACCTTGGGTGCT
内参引物	
18S-F	GGTTTTCTCTCTGAACTGGGG
18S-R	CCTCCGACTTTCGTTCTTGAT
原位杂交探针引物	
IGF-I-S	ACCCAAGGTTAGTACAGCAGG
IGF-I-A	TGAACCATTCCACAGGGGTA

注: Y = C or T; R = A or G

1.7 实时荧光定量 PCR 分析

对体重大于 100g 的成鱼肝脏、肌肉、肾脏、小肠、垂体、嗅球、胃、心脏、鳃、卵巢 10 种组织以及体重为 1—5g、5—15g、15—30g、30—50g、50—100g、100—150g 六个阶段的肝脏组织进行实时荧光定量 PCR 分析, 每个分析样 3 个重复。荧光定量 PCR 时, 先优化模板浓度, 将各类模板按 10 倍稀释 5 个浓度梯度, 并用引物分别扩增以确定最佳的模板浓度。并优化引物退火温度, 优化后反应条件为: 95 预变性 30s; 95 变性 5s, 59 退火 30s, 40 个循环; 95 15s, 60 1min, 95 15s。待反应结束, 确定 Real-time PCR 扩增曲线及溶解曲线, 在 ABI StepOnePlus™ Instrument 上进行数据采集和处理。所得数据以平均值 ± 标准差 (M±SD) 表示, 采用 SPSS17.0 软件对所测数据进行统计分析, 用 One-Way ANOVA 法进行显著性检验, 多重比较采用

Duncan 检验法。本文根据 Livak 等(2001)方法进行引物效率的检测, 结果发现 PCR 产物溶解曲线未出现杂峰, 表明产物的特异性较好。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 qRT-PCR 结果加以分析处理, 将 ΔCt 定义为: 内标目的基因 IGF-I Ct 值与 18S Ct 值之间的差值。

1.8 原位杂交

根据已克隆的 IGF-I cDNA 序列设计探针模板引物 IGF-I-S 和 IGF-I-A, PCR 扩增得到 248bp 目的序列, 经电泳验证后连接至 pGEM-T 载体, 转化后取阳性克隆测序鉴定。测序结果比对正确后, 扩培菌液用 Omega 质粒抽提试剂盒抽提质粒。对重组 pGEM-T 质粒用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Spe* I 分别进行单酶切, 使得质粒线性化。用琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物正确后, 用 PCR 纯化试剂盒(AxyGen, 美国)回收线性化的模板质粒, 采用 0.1% 的 DEPC 处理水溶解。将纯化质粒作为体外转录的 DNA 模板, 以 DIG RNA

Labeling Mix 为底物, 参照 Riboprobe® System (Promega)的实验程序, 用 T7 聚合酶和 SP6 聚合酶 (Promega)进行体外转录合成 DIG 标记的正反义 RNA 探针。采用没有 RNA 酶活性 DNA 酶处理去除 DNA 模板, 再加入 2.5 μ L 预冷的 5mol/L 氯化锂(经 DEPC 处理)及 75 μ L 冰预冷的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 下放置过夜。用 DEPC 水配制的 70%酒精洗沉淀, 吹干后向 RNA 沉淀中加入 30 μ L 的 DEPC 水, 待其自然溶解后, 取 5 μ L 进行电泳检测, 置于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

原位杂交步骤主要参照谢碧文(2008)和陈丽丽(2012)。具体调整方法如下: 为保证细胞的完整性采用组织切片技术, 为增加细胞膜通透性采用蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 消化 30min, 为探针与模板最佳结合且降低非特异性染色采用 60 $^{\circ}$ C 预杂交 2h, 洗掉预杂交液无酶条件干燥后滴加杂交液 60 $^{\circ}$ C 过夜孵育(探针: 预杂交液=1: 100)。

2 结果与分析

2.1 银鲟 IGF-I 基因 cDNA 全长的克隆

以银鲟 cDNA 全长为模板, 用兼并引物 IGF-I-F、IGF-I-R 扩增, 获得一条 762bp 的单一一条带, 经 BlastX 分析, 显示与已登录的大黄鱼(*Larimichthys crocea*, KKF31429.1)、石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*, ABZ10841.1)、鳊(*Siniperca chuatsi*, ADO14142.1)、花鲈(*Dicentrarchus labrax*, AAV67967.1)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*, ABG57072.1) IGF-I 氨基酸同源性都达到了 98%以上, 表明该片段是 IGF-I 基因的一部分。再用特异性引物 IGF-I-3'F2 扩增出 190bp 的 cDNA 片段, 测序后所得序列通过比对拼接得到了一条 836bp 的银鲟 IGF-I cDNA 序列(GenBank 登录号: KT210886), 见图 1。再重新设计 IGF-I_CDS-F 和 IGF-I_CDS-R 克隆 IGF-I 全长序列, 以验证序列的可靠性, 结果发现与拼接结果一致, 证明了 cDNA 克隆是成功的。将银鲟 IGF-I 基因的 cDNA 命名为 *Pampus argenteus* insulin-like growth factor-I。

2.2 银鲟胰岛素样生长因子 IGF-I 序列特征分析

银鲟 IGF-I 基因 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列见图 1。该 cDNA 全长 836bp, 含有 128bp 的 5'非编码区(UTR)、605bp 的开放阅读框(ORF)和 92bp 的 3'-非编码区(UTR), 编码了 201 个氨基酸。IGF-I 前体肽预测的理论等电点(pI)为 9.72, 分子质量经计算约为 22.00kDa。据 SignalP 4.1Server 分析, 该多肽含有

一段 59 个氨基酸残基的信号肽序列, 成熟肽 B 区 31 个氨基酸, A 区 19 个, C 区 10 个, D 区 7 个, E 区 75 个。成熟肽存在 CysB6, CysB18, CysA6, CysA7, CysA11 及 CysA20 等 6 个半胱氨酸残基。

银鲟 IGF-I 基因 ORF 中功能位点分析发现, 含有 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site); 1 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site); 1 个酪蛋白激酶磷酸化位点(casein kinase phosphorylation site); 以及 1 个豆蔻酰化位点(N-myristoylation site)(图 2)。

2.3 不同物种 IGF-I 氨基酸序列同源性分析

利用 ClustalW 对银鲟 IGF-I 和其它 20 种脊椎动物 IGF-I 的编码氨基酸序列对比发现(图 3)。在不同物种中均存在 6 个保守的半胱氨酸(Cys)残基。由氨基酸序列同源性分析可见, 与 11 种鱼类 IGF-I 氨基酸同源性均在 70.19%以上, 其中银鲟与河鲈(*P. fluviatilis*)的同源最高为 91.40%; 与鲈形目鱼类的同源性为 83.52%—91.40%; 与鲷形目牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的同源性分别为 90.86%、83.96%; 与鲷形目鲷鱼(*Mugil cephalus*)的同源性为 86.02%; 鲑形目大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)的同源性为 81.82%; 与鳗形目日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的同源性为 73.75%; 与鲤形目的同源性为 70.19%—71.43%; 各个功能区域间对比发现, B 区和 A 区保守性较高, C 区次之, 而 D 区和 E 区保守性较差(图 3)。

通过 MEGA5.05 软件, 对 21 个物种的 IGF-I 氨基酸进行了分子系统进化分析, 并在构建系统发生树基础上, 研究银鲟 IGF-I 和其它物种的进化关系, 见图 4。由图 4 可知, 所有物种聚为两大亚群, 银鲟与硬骨鱼类聚为一大亚群, 即银鲟先与河鲈(*P. fluviatilis*)、牙鲆(*P. lethostigma*)、金头鲷(*S. aurata*)、点带石斑鱼(*E. coioides*)、鳊(*S. chuatsi*)、加州鲈(*M. salmoides*)、花鲈(*L. japonicus*)、鲷鱼(*M. cephalus*)聚为一支, 然后与红鳍笛鲷(*L. erythropterus*)、半滑舌鲷(*C. semilaevis*)、尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)、大西洋鲑(*S. salar*)聚类, 最后与鲤鱼(*C. carpio*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)和日本鳗鲡(*A. japonica*)聚为一个大的亚群; 另一个亚群中, 人(*Homo sapiens*)、野猪(*Sus scrofa*)、金仓鼠(*Mesocricetus auratus*)三种哺乳类先聚为一支, 再与鸟类原鸡(*Gallus gallus*)和爬行类中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)聚为一大亚群。

```

1  ATTGCCCGCATCTCATCTTCTTCTCCGTTTTTTAATGACTTCAAACAAGTTCATTTTC
61  GCOGGTTTTTGTCTTGCAGACCCGTGGGGATGTCTACCGCTCTTCTCTTCAGTGCCA
121 TTTATGTG 128
129 ATGTCTTCAAGCTGCGTTGCGCACAGCGCTCCGGAGCGTCACAGCTGTCTGCCTCCTG
1  M S S S C V A H R R S G A S Q L V C L L
189 TTTGACTCTTTGACTCTGGCACCAACGTGGAAGAGTCCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGC
21  F D S L T L A P T W K S A M C C I S C S
      Signal peptide
249 CACACCTCTCACTACTGTGTGCGTCCCTCACCTGACTCCTACGGCAACAGGGCGGGG
41  H T L S L L L C V L T L T P T A T G A G
309 CCAGAGACCTGTGCGGGCGGAGCTGGTGGACACGCTGCAGTTTGTGTGTGGAGAGAGA
61  P E T L C G A E L V D T L Q F V C G E R
      B-domain
369 GGCTTTTATTTCACTAAACCAACGGGCTATGGACCTAACGCTCGCGGTCACGTGGCATT
81  G F Y F S K P T G Y G P N A R R S R G I
      C-domain
429 GTGGATGAGTGTGCTTCCAAAAGCTGTGAGCTGCGGGCGCTGGAGATGTAAGTGTGCACCT
101 V D E C C F Q S C E L R R L E M Y C A P
      A-domain
489 GCCAAGACTAGCAAGGCAGCTCGTTCTGTGCGCGCACAGCGGCACACAGACATGCCGAGA
121 A K T S K A A R S V R A Q R H T D M P R
      D-domain
549 GCACCCAAGGTTAGTACAGCAGGGCACAAGTGGACAAGGGCACAGCGTAGGACAGCA
141 A P K V S T A G H K V D K G T E R R T A
609 CAGCAGCCAGACAAGACAAAAACAAGAAGAGACCTTTACCTGGACATAGTCATTCCGACC
161 Q Q P D K T K N K K R P L P G H S H S T
      E-domain
669 TTCAAGGAAGTGCATCAGAAAACTCAAGTTCGAGGCAACGCGGGGGCAGAAATTACAGA
181 F K E V H Q K N S S R G N A G G R N Y R
714 ATGTAG 734
201 M * 201
735 GGAAGGAGCGAATGGACAAAATGCCACCGACATGGGAAGAGAGAAGGGAGTGCCTTACC
795 TGGTACCCCTGTGGAATGGTTCCTGTAAAAA 836

```

图 1 银鲟 IGF-I 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequence of *P. argenteus* IGF-I and deduced amino acids sequence

注: 信号肽和成熟肽的区域分别以英文名称标注; 浅灰色代表 CysB6, CysB18, CysA4, CysA5, CysA9 和 CysA18 六个半胱氨酸残基; 星号为终止密码子

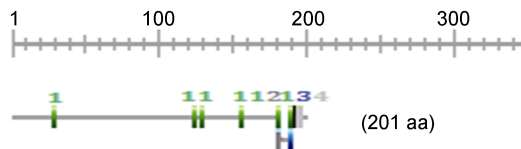


图 2 银鲟 IGF-I 基因 ORF 中功能位点示意图

Fig.2 The functional sites in ORF of IGF-I from *P. argenteus*
 注: 1. 蛋白激酶 C 磷酸化位点(绿色 29—31, 123—125, 129—131, 155—157, 180—182, 189—191); 2. 酪蛋白激酶 磷酸化位点(深灰 180—183); 3. N 端糖基化位点(蓝色 188—191); 4. 豆蔻酰化位点(浅灰 192—197)

通过进化关系图可见, 银鲟与同一鲈形目的河鲈(*P. fluviatilis*)、金头鲷(*S. aurata*)、点带石斑鱼(*E. coioides*)等亲缘关系最近; 与鲈形目和鲷形目亲缘关系较近; 与鲤形目和鳊鲃目等淡水鱼类较远, 与哺乳类、鸟类和爬行类的进化距离最远。

2.4 银鲟不同组织的 IGF-I mRNA 的表达

采用半定量 RT-PCR 和 Quantitative Real-time PCR 方法检测了 IGF-I 基因在银鲟肝脏、肌肉、肾脏等 10 个不同组织中的表达情况(图 5)。IGF-I 基因在

银鲟 10 个不同组织中均有表达, 尤其是在肝脏中表达量最高, 显著高于其它组织($P < 0.05, n = 3$), 其次为肾脏、心脏、肌肉、脑等, 在嗅球和胃中表达较低。

2.5 银鲟不同生长阶段肝脏 IGF-I mRNA 的表达

通过半定量 RT-PCR 和 Quantitative Real-time PCR 方法检测银鲟 IGF-I 基因在不同生长阶段的表达

情况(图 6)。银鲟幼鱼在体重小于 30g 时, IGF-I 表达略有下降, 在体重 30—50g 时显著性增高($P < 0.05$), 且达最高峰值, 约为体重 1—30g 阶段表达量的 2.5—5 倍; 到体重 50—100g 时表达量显著下降($P < 0.05$), 仅为体重 30—50g 时表达量的 1/2; 此后表达量趋于平稳, 维持在中等水平。

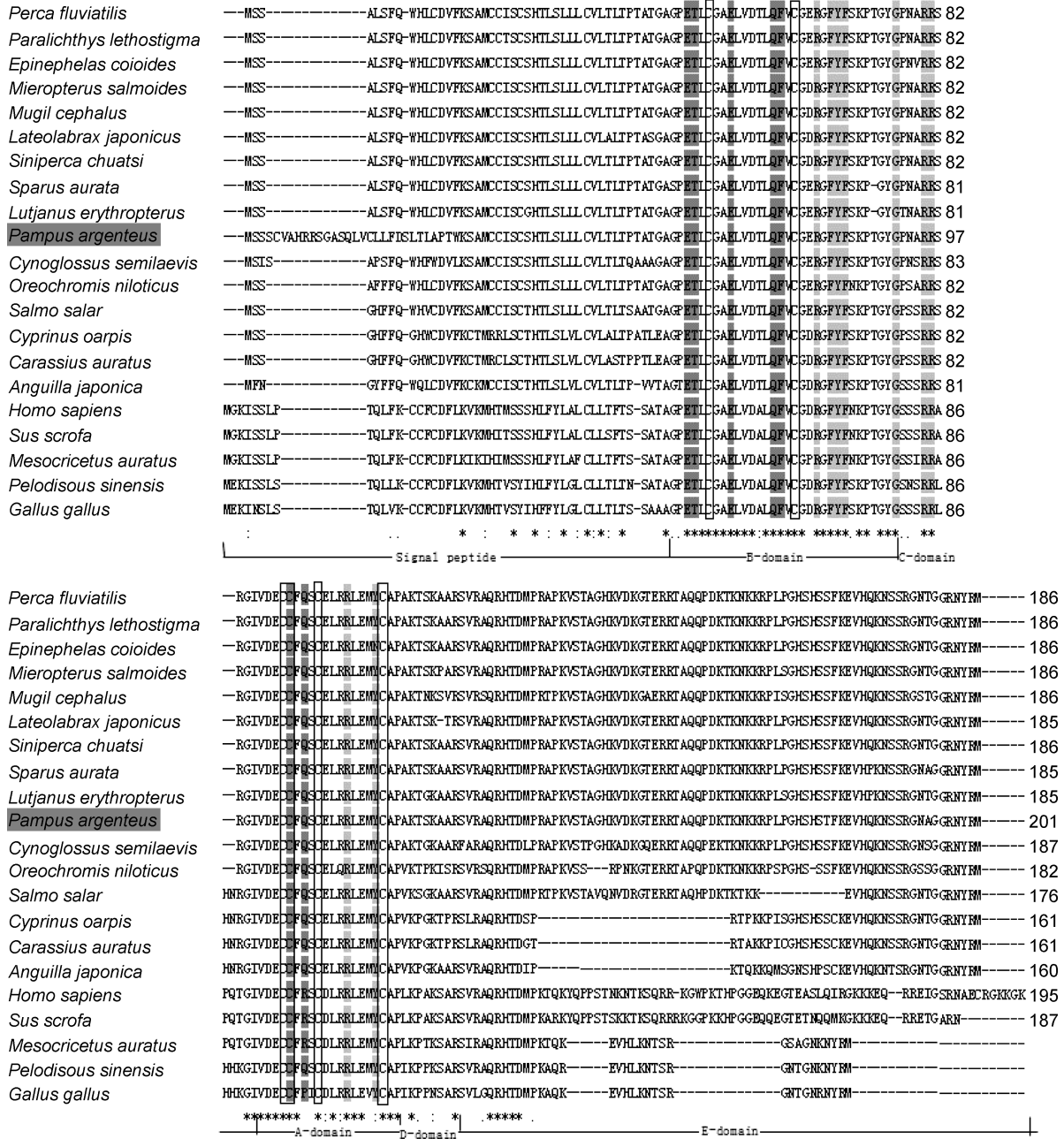


图 3 脊椎动物 IGF-I 的氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple-sequence alignment of vertebrate IGF-I amino acids sequence

注: 星号表示所有的比对物种 IGF-I 氨基酸完全一致; 点表示只有少部分物种的氨基酸一致; 比号表示大部分的物种氨基酸一致。浅灰色表示与 IGF-BP5 结合相关的氨基酸; 深灰色表示与 IGF-1R 结合相关的氨基酸; 方框表示 6 个保守的半胱氨酸残基

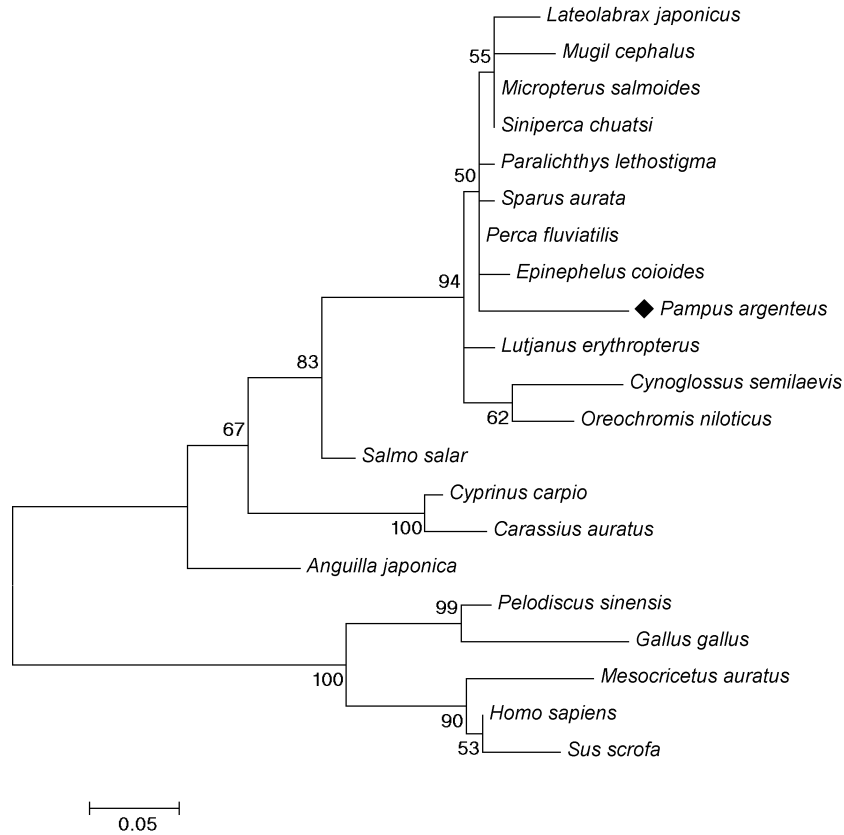


图 4 利用不同物种推导的 IGF-I 氨基酸序列构建的 M-L 进化树

Fig.4 The maximum-likelihood tree reconstructed based on putative IGF-I amino acids residues
注: 由 MEGA 5.05 软件 Maximum-Likelihood 方法构建进化树, 重复抽样次数为 1000 次; 标注“◆”为银鲟

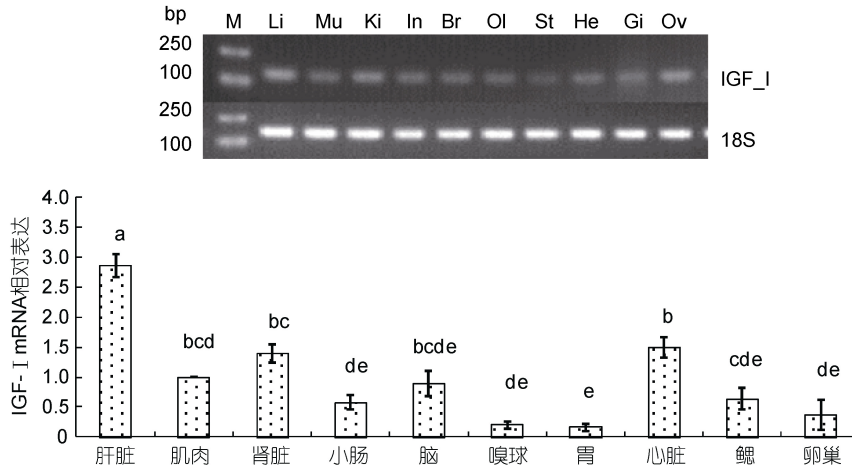


图 5 银鲟 IGF-I mRNA 在不同组织中的表达水平

Fig.5 Levels of IGF-I mRNA transcription of different tissues with 18S acted housekeeping gene
注: M. Mark 2000, Li. 肝脏, Mu. 肌肉, Ki. 肾脏, In. 小肠, Br. 脑, Ol. 嗅球, St. 胃, He. 心脏, Gi. 鳃, Ov. 卵巢

2.6 银鲟 IGF-I 原位杂交结果

实验组为 DIG 标记的反义 RNA 探针, 对照组为 DIG 标记的正义 RNA 探针, 同时用 H.E 染色作为对照组。从图 7 可见, 肝细胞呈板状排列, 血窦在肝细

胞索(肝板)之间, 肝细胞索的形状呈现弯曲、分支及吻合(图 7, A1, A2, C1, C2)。肝脏原位杂交结果显示, 地高辛标记的 IGF-I 反义 RNA 阳性杂交反应信号遍布于肝细胞中, 且杂交信号主要存在于细胞质中, 靠

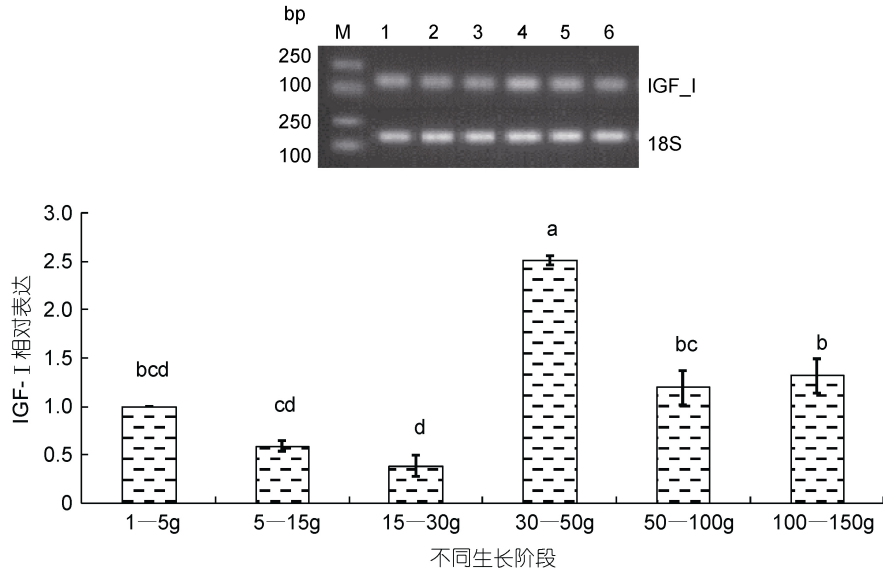


图 6 银鲟 IGF-I mRNA 在不同生长阶段表达水平

Fig.6 Levels of IGF-I mRNA transcription in different growth stages with 18S acted housekeeping gene
注: M: Mark 2000, 1: 1—5g, 2: 5—15g, 3: 15—30g, 4: 30—50g, 5: 50—100g, 6: 100—150g

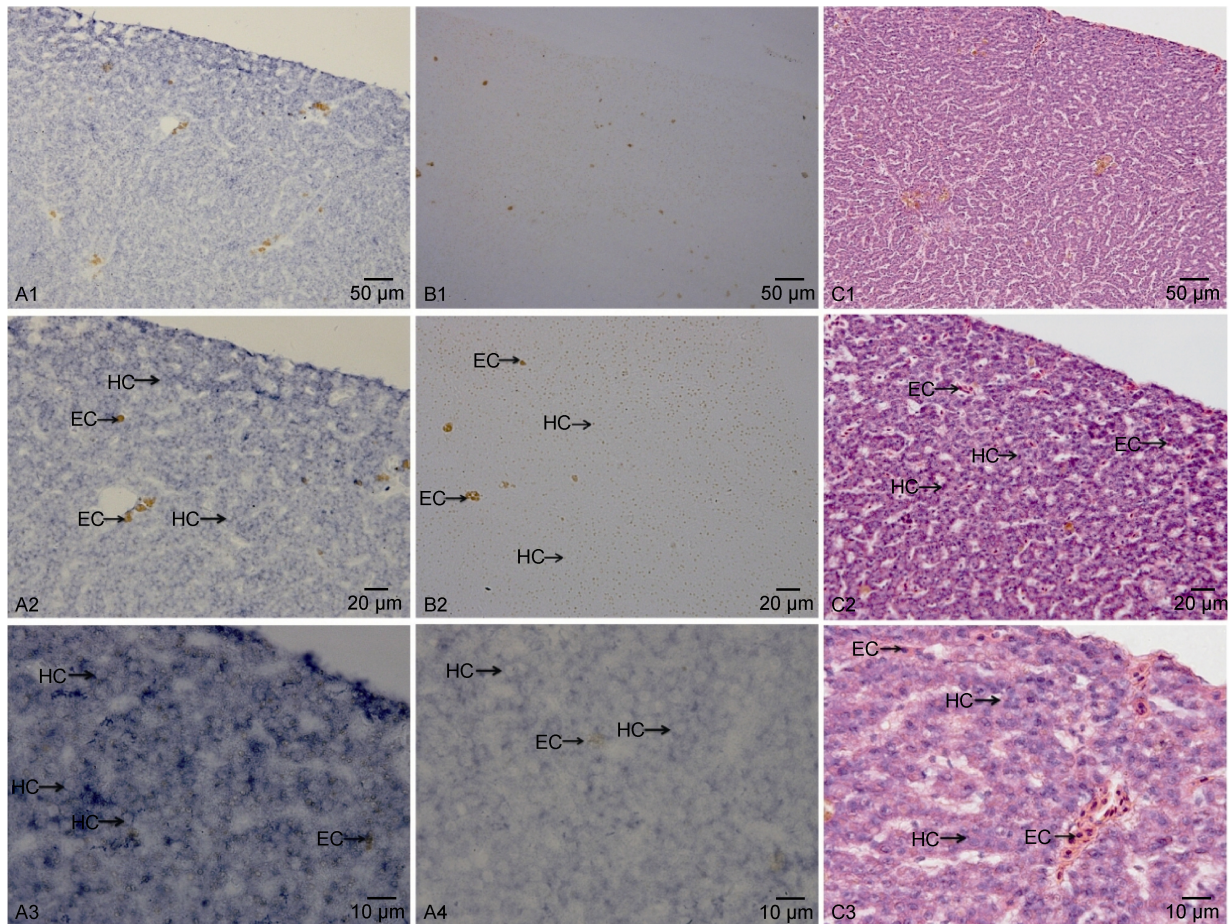


图 7 胰岛素样生长因子-I 原位杂交及 H.E 染色结果

Fig.7 *In situ* hybridization of *P. argenteus*, showing the location of insulin-like growth factor-I mRNA in liver
注: A1—A4: IGF-I 反义探针杂交结果; B1—B2: IGF-I 正义探针杂交结果(对照组); C1—C3: H.E 染色结果(对照组); HC: 肝脏细胞, EC: 红细胞

近细胞边缘处信号较强(图 7, A3, A4); 正义探针对照(图 7, B1, B2)没有检测到 IGF-I mRNA 的杂交阳性信号。

3 讨论

3.1 IGF-I mRNA 序列分析

本文首次克隆得到了银鲟 IGF-I cDNA 全长序列, 与斜带石斑鱼(Pedroso *et al.*, 2006)、鳊(刘俊等, 2011)、花鲈(钱焜等, 2014)的 IGF-I 前体蛋白结构相同, 银鲟的 IGF-I 前体蛋白也由信号肽、成熟肽和 E 肽三部分组成, 而成熟肽则由 B, C, A, D 四个结构域组成。与人和其它脊椎动物的 IGF-I 一样, 银鲟 IGF-I 的成熟肽含 6 个极端保守的半胱氨酸(Cys)残基, 其中 2 个位于 B 结构域, 另外 4 个位于 A 结构域, 其参与形成的二硫键对蛋白质的正常折叠、空间结构的维持及生理作用的发挥具有重要意义(Hober *et al.*, 1992; Magee *et al.*, 1999)。

由氨基酸序列同源性分析可见, 银鲟 IGF-I 与其它鱼类氨基酸同源性在 70.19%以上, 与哺乳动物的同源性在 44.62%以上, 可见 IGF-I 在进化过程中是一个演变过程较慢的蛋白分子, 可以成为鱼类分类中的一个重要参考标记; B 区和 A 区同源性分别为 89.66%—100%和 90.48%—100%, 结构域保守性很高, 它们包含与 IGF-IR 和 IGFBPs 结合的序列(Zhang *et al.*, 1994; Magee *et al.*, 1999), 可能与 IGF-I 的功能维持相关; 而 C 区(50.00%—100%)、D 区(37.50%—100%)和 E 区(25.68%—97.3%)在不同物种中存在一定差异。目前已发现的 IGF-I 存在着 4 种不同的剪接体(Cao *et al.*, 1989; Shambloott *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1997), 根据 E 肽氨基酸大概长度分别命名为含 35 个氨基酸的 Ea-1 型, 含 47 个氨基酸的 Ea-2 型, 含 62 个氨基酸的 Ea-3 型, 以及含 74 个氨基酸的 Ea-4 型。银鲟 IGF-I E 肽序列长为 75 个氨基酸, 属于 Ea-4 型。Duguay 等(1992)报道大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的心、脑、肾、脾及卵巢等组织中主要表达 Ea-4 型的 IGF-I。同样, Chen 等(1998)报道黑鲟(*Acathopagrus schlegelii*)的肝等组织也主要表达 Ea-4 型的 IGF-I, 而 Hashimoto 等(1997)的研究表明鲤鱼(*C. carpio*)各组织主要表达 Ea-2 型的 IGF-I。本研究得出的系统进化树基本反映了脊椎动物的系统分类关系, 与传统的形态学和生化特征分类基本一致。

3.2 IGF-I mRNA 在不同组织中的表达分析

本章采用半定量 RT-PCR 和 quantitative real-time

PCR 方法检测了 IGF-I 基因在银鲟肝脏、肌肉、肾脏等 10 种组织中的表达情况, 结果与日本白鲫(*Carassius cuvieri*)(陶敏等, 2012)完全相同, 均在肝脏组织中的表达量最高, 这是因为 IGF-I 绝大部分由肝合成(Sjögren *et al.*, 1999)。大量研究表明, IGF-I 在鱼体各组织的表达呈多样性。郁建锋等(2012)采用半定量 RT-PCR 方法以鳊(*Elopichthys bambusa*) β -actin 基因为内参照, 检测了 IGF-I 基因 mRNA 在鳊的 6 个不同组织的表达情况, 发现 IGF-I 基因 mRNA 在肝脏中表达量最高, 心脏中未见其明显表达, 肾脏、肠、心脏和肌肉中的表达量较肝脏明显偏低; 钱焜等(2014)和胡健(2012)分别检测花鲈(*L. japonicus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) IGF-I mRNA 在不同组织的表达水平, 发现肝脏 IGF-I 的表达水平最高, 肌肉中表达量相对较高, 在肾脏中表达量偏低; Otteson 等则报道了在金鱼(*Carassius auratus*)视网膜中发现了 IGF-I 的表达(Hitchcock *et al.*, 2001)。大量研究表明, 肝脏 IGF-I mRNA 表达水平不但与物种、体重、年龄、营养条件, 环境温度还有盐度有关, 也与个体所处的生长阶段有关(Duan *et al.*, 1998; Metón *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2001; Gabillard *et al.*, 2003)。研究表明 IGF-I 在肝外组织可以分别以自分泌和旁分泌方式作用于相应器官, 发挥特定的生理功能(Reinecke *et al.*, 1998; Roith *et al.*, 2001)。

3.3 IGF-I mRNA 在不同生长阶段的表达分析

通过半定量 RT-PCR 和 quantitative real-time PCR 检测银鲟 IGF-I 基因在不同生长阶段的表达情况, 银鲟幼鱼在体重小于 30g 前, IGF-I 表达虽稍有降低, 但变化幅度不大。至体重 30—50g 时表达量显著性增高($P < 0.05$), 这与此时银鲟进入快速生长阶段完全相吻合, 夏末初秋水温在 23—28 范围, 正是银鲟最佳的生长期。随后因银鲟进入越冬期(体重 50—100g)生长减缓, IGF-I 基因表达随之下跌过半, 翌年春天银鲟体重达到 100—150g, 由于性腺发育迅速, 生长反而受到影响, 故此时呈现 IGF-I 基因的表达量增幅不大的现象(Wen *et al.*, 2002)。有关 IGF-I 调节鱼类生长发育的研究不多, Shambloott 等(1993)检测虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)成鱼和幼鱼组织 IGF-I mRNA 的表达水平, 发现成鱼肝组织 IGF-I mRNA 水平约为幼鱼表达量的两倍; 而 Duan 等(1998)发现银大马哈鱼肝组织 IGF-I mRNA 水平随着年龄的增长而显著下降。

3.4 IGF-I 基因在肝脏中的定位分析

IGF-I 介导生长激素(GH)的功能, 对机体组织和

个体发育有非常重要的作用,关于 IGF-I 的原位杂交研究主要集中在脊椎动物的整体原位杂交和组织原位杂交(李艳梅, 2008; 郭斌, 2008; Patruno *et al*, 2008)。本研究用 DIG 标记的 RNA 探针检测到 IGF-I mRNA 在肝脏细胞的细胞质中有大量表达,与 Patruno 等(2008)在肝脏中的表达结果相似。Patruno 等(2008)采用经 DIG 标记的 RNA 探针和荧光原位杂交技术,检测到花鲈孵化后第一周有较强的 IGF-I mRNA 表达,在幼鱼和成鱼的肝脏中也有 IGF-I mRNA 大量表达;但也有学者在肝脏中并未发现 IGF-I 基因的表达,如郭斌(2008)运用 DIG 标记的 RNA 探针检测 IGF-I mRNA 在成体文昌鱼不同组织中的表达,发现 IGF-I mRNA 只在肝盲囊和后肠中表达。

参 考 文 献

- 王腾飞, 郭晓鸽, 谷江稳等, 2015. 饥饿及过量投喂下银鲟幼鱼形态学指标及体成分变化. 海洋学研究, 33(4): 83—89
- 白俊杰, 叶 星, 李英华等, 2001. 草鱼胰岛素样生长因子-1 基因克隆及序列分析. 水产学报, 25(1): 1—4
- 华益民, 林浩然, 2001. 营养状况对幼年鲤鱼肝脏 IGF-I mRNA 表达的影响. 动物学报, 47(1): 94—100
- 刘 俊, 赵金良, 张 敏等, 2011. 鳊胰岛素样生长因子-1 cDNA 全长克隆及组织表达分析. 动物学杂志, 46(3): 28—36
- 闫雪梅, 谷江稳, 郭晓鸽等, 2015. 饥饿银鲟幼鱼的能量利用规律及其生存策略. 动物营养学报, 27(12): 3975—3983
- 李艳梅, 2008. GHR、IGF-1、IGF-1R 基因在鹿茸顶端组织定位及鹿 GHR 基因 cDNA 克隆. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文
- 陈丽丽, 2012. 鲟鱼皮中胶原蛋白的提取、性质及其应用研究. 南昌: 江西科技师范大学硕士学位论文
- 郁建锋, 李建林, 徐建荣等, 2012. 鳊胰岛素样生长因子 1 基因的克隆及其组织特异性表达分析. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 33(3): 32—39
- 周健恺, 徐善良, 邱成功等, 2014. 银鲟不同消化器官中消化酶活性的分布及其比较. 宁波大学学报(理工版), 27(4): 1—6
- 郑凯迪, 陈小川, 李英文, 2007. 胭脂鱼胰岛素样生长因子-1(IGF-I)cDNA 的分子克隆、序列分析及组织表达. 动物学杂志, 42(2): 39—45
- 胡 健, 2012. 大菱鲆类胰岛素样生长因子和结合蛋白基因克隆及表达的研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- 施兆鸿, 赵 峰, 王建钢等, 2009. 舟山渔场银鲟人工授精及孵化. 渔业现代化, 36(1): 18—21, 34
- 施兆鸿, 彭士明, 王建钢等, 2011. 人工养殖银鲟子代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察. 中国水产科学, 18(2): 267—274
- 钱 焜, 温海深, 迟美丽等, 2014. 花鲈类胰岛素生长因子-1 基因的全长 cDNA 分离与表达分析. 中国海洋大学学报, 44(2): 27—34
- 徐善良, 王丹丽, 徐继林等, 2012. 东海银鲟(*Pampus argenteus*), 灰鲟(*P. cinereus*)和中国鲟(*P. sinensis*)肌肉主要营养成分分析与评价. 海洋与湖沼, 43(4): 775—782
- 徐善良, 王丹丽, 徐继林等, 2013. 3 种鲟属鱼不同组织脂肪组成的比较研究. 生物学杂志, 29(6): 53—58
- 郭 斌, 2008. 文昌鱼 GH/IGF 轴的证明: 文昌鱼 IGF 的克隆、表达、功能及其受 GH 作用上调表达. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- 陶 敏, 钟 欢, 刘少军等, 2012. 日本白鲫 IGF-I 基因全长 cDNA 克隆及组织表达分析. 生命科学研究, 16(4): 295—300
- 常抗美, 郑孝亮, 刘慧慧等, 2012. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*) IGF-1 基因的克隆及序列分析. 海洋与湖沼, 43(1): 35—40
- 彭士明, 林少珍, 施兆鸿等, 2013. 饲养密度对银鲟幼鱼增重率及消化酶活性的影响. 海洋渔业, 35(1): 72—76
- 彭士明, 施兆鸿, 孙 鹏等, 2010. 养殖密度对银鲟幼鱼生长及组织生化指标的影响. 生态学杂志, 29(7): 1371—1376
- 谢碧文, 2008. 南方鲇 POMC、TSH β 亚基和 SL cDNA 克隆及垂体激素基因的时空表达. 重庆: 西南大学博士学位论文
- 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. Molecular Endocrinology, 3(12): 2005—2010
- Chen M H C, Lin G H, Gong H Y *et al*, 1998. Cloning and characterization of insulin-like growth factor I cDNA from black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). Zoological Studies, 37(3): 213—221
- Duan C M, 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. The Journal of Nutrition, 128(2): 306S—314S
- Duguay S J, Park L K, Samadpour M *et al*, 1992. Nucleotide sequence and tissue distribution of three insulin-like growth factor I prohormones in salmon. Molecular Endocrinology, 6(8): 1202—1210
- Gabillard J C, Weil C, Rescan P Y *et al*, 2003. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology, 133(2): 233—242
- Hashimoto H, Mikawa S, Takayama E *et al*, 1997. Molecular cloning and growth hormone-regulated gene expression of carp insulin-like growth factor-I. Biochemistry and Molecular Biology International, 41(5): 877—886
- Hitchcock P F, Otteson D C, Cirenza P F, 2001. Expression of the insulin receptor in the retina of the goldfish. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42(9): 2125—2129
- Hober S, Forsberg G, Palm G *et al*, 1992. Disulfide exchange folding of insulin-like growth factor I. Biochemistry, 31(6): 1749—1756
- Larsen D A, Beckman B R, Dickhoff W W, 2001. The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology (insulin, insulin-like growth factor-I, and thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. General and Comparative Endocrinology, 123(3): 308—323
- Li J Z, Liu Z H, Wang D S *et al*, 2011. Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish. Biology of Reproduction, 84(3): 476—486

- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Magee B A, Shooter G K, Wallace J C *et al*, 1999. Insulin-like growth factor I and its binding proteins: a study of the binding interface using B-domain analogues. *Biochemistry*, 38(48): 15863—15870
- Metón I, Caseras A, Cantó E *et al*, 2000. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Journal of Nutrition*, 130(4): 757—760
- Patruno M, Sivieri S, Poltronieri C *et al*, 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell and Tissue Research*, 331(3): 643—658
- Pedroso F L, De Jesus-Ayson E G T, Cortado H H *et al*, 2006. Changes in mRNA expression of grouper (*Epinephelus coioides*) growth hormone and insulin-like growth factor I in response to nutritional status. *General and Comparative Endocrinology*, 145(3): 237—246
- Perks C M, Denning-Kendall P A, Gilmour R S *et al*, 1995. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type I IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, 136(12): 5266—5273
- Reinecke M, Björnsson B T, Dickhoff W W *et al*, 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1—2): 20—24
- Reinecke M, Collet C, 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *International Review of Cytology*, 183: 1—94
- Rinderknecht E, Humbel R E, 1978. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *Febs Letters*, 89(2): 283—286
- Roith D L, Scavo L, Butler A, 2001. What is the role of circulating IGF-I?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(2): 48—52
- Shamblott M J, Chen T T, 1993. Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 2(6): 351—361
- Sjögren K, Liu J L, Blad K *et al*, 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12): 7088—7092
- Tanaka M, Taniguchi T, Yamamoto I *et al*, 1998. Gene and cDNA structures of flounder insulin-like growth factor-I (IGF-I): multiple mRNA species encode a single short mature IGF-I. *DNA and Cell Biology*, 17(10): 859—868
- Vong Q P, Chan K M, Leung K *et al*, 2003. Common carp insulin-like growth factor-I gene: complete nucleotide sequence and functional characterization of the 5'-flanking region. *Gene*, 322: 145—156
- Wang D S, Jiao B W, Hu C J *et al*, 2008. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2): 336—341
- Wen H S, Lin H R, Dong X *et al*, 2002. Seasonal changes and neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in feral Catfish (*Silurus asotus*). *Acta Zoologica Sinica*, 48(2): 213—220
- Zhang W, Gustafson T A, Rutter W J *et al*, 1994. Positively charged side chains in the insulin-like growth factor-I C- and D-regions determine receptor binding specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(14): 10609—10613

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I GENE IN *PAMPUS ARGENTEUS*

ZHU Xiao-Fang, GUO Xiao-Ge, ZHANG Ding-Yuan, YANG Jia-Zhe, XU Shan-Liang, WANG Dan-Li
(School of Marine Science, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University,
Ningbo 315211, China)

Abstract Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is an important regulator to growth, development, and metabolism of a vertebrate. To clone the IGF-I cDNA sequences in liver of *Pampus argenteus*, we used RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), RACE (rapid amplification of cDNA ends). In addition, to detect the IGF-I expression in the tissues and IGF-I expression levels in the liver in six different growth stages and the positioning of the IGF-I gene in the liver, we used semi-quantitative RT-PCR, quantitative RT-PCR, and in-situ hybridization. Results show that the IGF-I cDNA precursor consists of 836bp with a 605bp open reading frame, ORF, and 5' and 3' UTR (untranslated regions, 128bp and 92bp, respectively). Therefore, we deduce that the precursor protein of IGF-I consisted of 201 amino acids; the precursor peptide is composed of signal peptide, mature peptide and E peptide, signal peptide of 59 amino acids, mature peptide of 68 amino acids, and E peptide of 74 amino acids. The mature peptide was composed of four regions B, C, A, and D. Analysis on E peptide showed that IGF-I of pomfret was in Ea-4 type. The IGF-I coding sequence of pomfret had higher identity with the same mesh Perciformes fish, from 83.52% to 91.40%; and lower identity with mammals, birds and reptiles. Semi-quantitative RT-PCR and RT qPCR results show that IGF-I mRNA was expressed in all 10 tissues, high in liver, and low in other tissues. Semi-quantitative RT-PCR and quantitative RT PCR in six different growth stages showed that IGF-I mRNA expression level was the highest when fish weighed between 30—50g, and then decreased significantly between 50—100g ($P < 0.05$). The in-situ hybridization to see IGF-I mRNA expression in the liver indicated that GF-I positive cells were found throughout the liver; the signal intensity was significantly higher at cell edge, and positive signals were found mainly in cytoplasm.

Key words *Pampus argenteus*; insulin-like growth factor-I gene; quantitative real-time PCR; *in situ* hybridization