

# 鳊胰岛素样生长因子- I cDNA 全长克隆 及组织表达分析

刘俊 赵金良\* 张敏 代威

上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室 上海 201306

**摘要:**采用 RT-PCR、cDNA 末端快速扩增法(RACE)等技术克隆了鳊(*Siniperca chuatsi*)肝组织胰岛素样生长因子- I (IGF- I) cDNA 全长序列。结果表明,鳊 IGF- I cDNA 全长 1 784 bp,包括 5'端非翻译区 233 bp,3'端非翻译区 990 bp 和开放阅读框 561 bp,共编码 186 个氨基酸;前肽由信号肽、成熟肽、E 肽三部分组成,其中,信号肽 44 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 4 个区域组成,E 肽分析表明,鳊 IGF- I 属 Ea-4 型。鳊 IGF- I 氨基酸序列与其他脊椎动物 IGF- I 氨基酸序列相似度达 81% ~ 99%,表明 IGF- I 在脊椎动物进化中较为保守。运用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测了鳊 IGF- I 在成鱼不同组织中的表达水平,其中,肝中表达量最高,肾、脑、后肠、皮肤、性腺表达量次之,胃、脾、前肠、鳃、心、肌肉表达量较低。本研究结果为该基因的时序表达、生长调控等研究奠定了分子基础。

**关键词:**鳊;胰岛素样生长因子- I ;cDNA 末端快速扩增;实时荧光定量 RT-PCR;组织表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)03-28-09

## Full-length cDNA Cloning and Tissue Expression of Insulin-like Growth Factor- I in the Mandarin Fish, *Siniperca chuatsi*

LIU Jun ZHAO Jin-Liang\* ZHANG Min DAI Wei

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** The complete cDNA sequence of *Siniperca chuatsi* insulin-like growth factor- I (IGF- I) was isolated from liver and cloned by means of RT-PCR, rapid amplification of cDNA ends (RACE). A 1 784 bp IGF- I cDNA sequence contained a 233 bp 5'-untranslated region, 990 bp 3'-untranslated region and 561 bp open reading frame (ORF), which encoded 186 amino acids with a signal peptide of 44 amino acids, a mature peptide of 68 amino acids, and an E peptide of 74 amino acids. The mature peptide included B, C, A and D domains. The E peptide analysis showed that *S. chuatsi* IGF- I belonged to Ea-4 type. The amino acid sequence similarity of *S. chuatsi* IGF- I was 81% - 99% with that of other vertebrate IGF- I s, indicating that IGF- I was relatively conserved in vertebrate evolution. The IGF- I mRNA expression in different adult tissues were analyzed by real-time quantitative RT-PCR technique, and its highest expression in the liver, and high expression in kidney, brain, hindgut, skin, gonad, but low expression in stomach, spleen, foregut, gill, heart, muscle were revealed. These results may provide molecular base for further study on its developmental

**基金项目** 上海市科委重点基础项目(No. 09jc1406900),上海市重点学科建设项目(No. Y1101);

\* 通讯作者, E-mail: jljzhao@shou.edu.cn;

**第一作者介绍** 刘俊,男,硕士研究生;研究方向:水产动物遗传育种;E-mail: junliu1983@163.com。

收稿日期:2010-11-04,修回日期:2011-01-05

expression and growth regulation.

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; Insulin-like growth factor- I ; Rapid amplification of cDNA ends; Real-time quantitative RT-PCR; Tissue expression

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 是一类在结构上与胰岛素原具有高度同源性的多肽, IGF 系统包括 2 个配体 (IGF- I, - II)、2 个受体 (IGF- I receptor, - II receptor) 和 6 个结合蛋白 (IGFBPs)<sup>[1]</sup>。胰岛素样生长因子- I (IGF- I) 是一种由 68 ~ 70 个氨基酸组成的单链多肽, 分子量约 7 500 u。IGF- I 主要在肝产生, 其前体由信号肽、B、C、A、D 和 E 区域 6 个部分组成, 去除信号肽和 E 区域后产生成熟肽<sup>[2]</sup>, 具有调节细胞代谢、促进细胞生长分化和分裂、调节渗透压等多种生理功能<sup>[3]</sup>。

脊椎动物中, 鱼类具有特殊的生长模式, 不仅生长具有阶段性, 且性成熟后仍保持继续生长<sup>[4]</sup>。鱼类生长是一个复杂、高度综合的过程, 受遗传、营养、环境以及激素调节等诸多因素影响, 其中, GH-IGF- I 轴是鱼类生长的调控关键<sup>[5]</sup>。鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国特有的名贵淡水经济鱼类, 有关其生长激素基因的结构特征已有报道<sup>[6]</sup>, 为深入了解生长因子对鳊生长发育的调控作用, 本实验通过 RACE 技术克隆了鳊 IGF- I 全长 cDNA, 对其结构特征进行了初步分析, 并用实时定量 RT-PCR 技术对不同组织 IGF- I mRNA 的表达水平进行分析, 为

后期研究该基因在个体发育阶段的时空表达特征及其生长调控作用奠定分子基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 鳊购于上海市浦东新区芦潮港镇果园农贸市场。总 RNA 抽提试剂 RNAiso<sup>TM</sup> Plus、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit、DNA Fragment Purification Kit、SYBR<sup>R</sup> PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit、pMD19-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA Ladder、Loading Buffer、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自天根生化科技 (北京) 有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成** 活体解剖鳊, 取肝组织, 用液氮迅速冷冻并研磨后, 按 RNAiso<sup>TM</sup> Plus 说明书抽提总 RNA。用 DNase I (RNase Free) 去除基因组 DNA 的污染。利用 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 合成 3' 和 5' RACE-Ready-cDNA, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

**1.2.2 引物设计与合成** 所用引物见表 1, 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 引物序列及退火温度

Table 1 Nucleotide sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物 Primer	序列 Nucleotide sequence	退火温度 Annealing temperature ( $^{\circ}$ C)
IGF1F	5'-TGACTCCGACGGCAACAG-3'	58
IGF1R	5'-GCAGCACTCGTCCACAAT-3'	56
GSP1	5'-CCAACAGGCTATGGCCCCAATGCAC-3'	68
GSP2	5'-ACCAGCTCCGCCCGCACAGGGTCT-3'	70
IGF1F1	5'-GCCCGCATCTCATCTCTTT-3'	59
IGF1R1	5'-ATCCGTTCACCTTTCCTG-3'	59
IGF1F2	5'-ACAGCAGCCAGACAAGACAAAA-3'	60
IGF1R2	5'-GTCCATTCGCTCCTTCCTAC-3'	60
P1	5'-ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC-3'	60
P2	5'-CCTGTTGGCTTTGGGGTTC-3'	60

**1.2.3 RT-PCR 和 RACE 扩增** IGF- I cDNA 小片段 RT-PCR 以 IGF1F 和 IGF1R 为引物,按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 说明书进行, RACE 扩增按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明书进行。主要步骤如下:以 3'-RACE-Ready cDNA 为模板,以通用引物 UPM 和 GSP1 进行 3'-RACE 扩增。PCR 反应条件为:94℃, 30 s, 68℃, 30 s, 72℃, 3 min, 27 个循环;最后 4℃ 保存。以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板,以通用引物 UPM 和 GSP2 进行 5'-RACE 扩增。PCR 反应条件为:94℃, 30 s, 72℃, 3 min, 5 个循环;94℃, 30 s, 70℃, 30 s, 72℃, 3 min, 5 个循环;94℃, 30 s, 68℃, 30 s, 72℃, 3 min, 27 个循环,最后 4℃ 保存。

以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板,以 IGF1F1 和 IGF1R1 为引物,按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 说明书进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃, 3 min, 1 个循环;94℃, 30 s, 59℃, 30 s, 72℃, 1 min, 30 个循环;72℃, 5 min, 1 个循环,最后 4℃ 保存。

**1.2.4 PCR 产物克隆、测序** RT-PCR 和 RACE 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收纯化,纯化后的 RT-PCR 和 RACE 产物分别与 pMD19-T 载体连接构建重组质粒,转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经 LB 平板(含 Amp<sup>+</sup>、IPTG 和 X-gal)培养后,筛选重组子进行插入片段检测,序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。

**1.2.5 生物信息学分析** 对克隆得到的 IGF- I cDNA 序列分别应用 BioEdit 和 Edit Seq 程序进行 IGF- I 开放阅读框(ORF)分析并推导相应的氨基酸序列;Signal P 3.0 server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>)进行信号肽分析和 Scratch 程序(<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>)预测二硫键;BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行序列同源性分析;Clustal W(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)进行多

序列比对;EMBOSS(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>)进行序列相似度分析;MEGA4.1 构建 NJ 系统进化树。

**1.2.6 不同组织 IGF- I mRNA 表达水平的实时定量分析** 以肝组织总 RNA(浓度为 500 ng/ $\mu$ l)为模板按 SYBR<sup>R</sup> PrimeScript™ RT-PCR Kit 的说明书进行反转录,反转录产物用 EASY Dilution 做 10 倍梯度稀释,共设 5 个梯度,每个梯度设 3 个重复,分别以引物 IGF1F2 和 IGF1R2、引物 P1 和 P2 配制实时定量 PCR 反应液,BioRad IQ5 系列实时定量 PCR 仪上进行 Real Time PCR 反应。其中,IGF1F2 和 IGF1R2 引物的反应程序为:95℃, 30 s;95℃, 5 s, 60℃, 30 s, 40 个循环;熔解步骤:P1 和 P2 引物的反应程序为:95℃, 30 s;95℃, 10 s, 60℃, 30 s, 72℃, 30 s, 40 个循环;熔解步骤。根据各扩增曲线的 Ct 值及对应各稀释梯度的对数值,制作标准曲线。分别提取 3 尾成鱼胃、肾、脾、脑、前肠、后肠、皮肤、鳃、心、性腺、肌肉、肝 12 个组织的总 RNA,测定各组织的 OD 值,并将起始浓度调到合适浓度,按 SYBR<sup>R</sup> PrimeScript™ RT-PCR Kit 的说明书进行反转录,以反转录产物为模板,按照上述相同步骤分别进行目的基因 IGF- I 和内参基因  $\beta$ -actin 各组织 Real Time PCR 反应。

## 2 结果

### 2.1 鳊胰岛素样生长因子- I cDNA 全长序列

IGF- I 小片段扩增产物经克隆、测序获得了 161 bp 片段,经 Blastn 检索 NCBI 核酸数据库和 Blastx 检索 NCBI 蛋白质库发现该序列与其他鱼类 IGF- I 有较高的序列同源性,故初步确定此片段为鳊 IGF- I cDNA 部分序列。3' RACE 产物测序得到长 1 338 bp 的序列(图 1 A),5' RACE 产物测序得到长 449 bp 的序列(图 1 B),将 IGF- I 3' RACE、5' RACE 和小片段序列比对、拼接后得到长度为 1 784 bp cDNA 全长序列。并以 IGF1F1 和 IGF1R1 为引物扩增包括 IGF- I 基因编码区的 cDNA 序列,进行验证(图 1 C)。

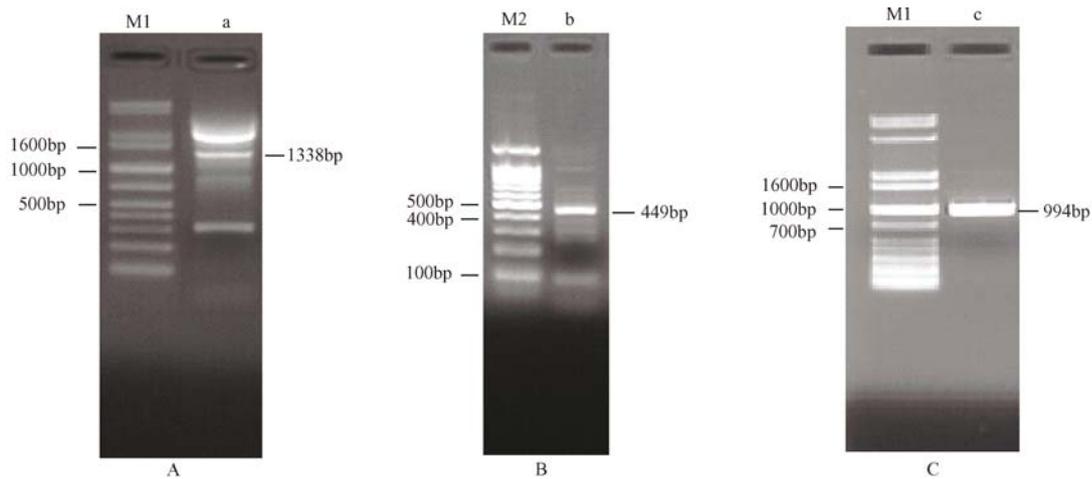


图 1 鳊 IGF- I 3' RACE、5' RACE 和编码区扩增结果

Fig. 1 3' RACE, 5' RACE and coding region products of *Siniperca chuatsi* IGF- I

A: 3' RACE 产物电泳图; B: 5' RACE 产物电泳图; C: 编码区产物电泳图。

M1: 1 kb plus 分子量标记; M2: 100 bp 分子量标记; a: 3' RACE 扩增产物; b: 5' RACE 扩增产物; c: 编码区扩增产物。

A: Electrophoresis figure of 3' RACE product; B: Electrophoresis figure of 5' RACE product; C: Electrophoresis figure of coding region product. M1: 1 kb plus molecular marker; M2: 100 bp molecular marker; a: 3' RACE product; b: 5' RACE product; c: Coding region product.

IGF- I 基因 cDNA 包括 233 bp 的 5' 端非翻译区, 561 bp 的开放阅读框 (ORF), 990 bp 的 3' 端非翻译区, 在 1 737 ~ 1 742 位点有一个多聚腺苷酸 (attaaa) 信号序列 (图 2)。编码的 186 个氨基酸序列中, 前 44 个氨基酸为信号肽, 中间 68 个氨基酸为成熟肽, 后 74 个氨基酸序列为 E 肽。氨基酸序列中, 第 49、61、88、89、93、102 位的 6 个半胱氨酸可形成 3 个二硫键。

鳊 IGF- I 成熟肽由 B、C、A、D 4 个区域组成, 其中, B 区域 29 个氨基酸, C 区域 10 个氨基酸, A 区域 21 个氨基酸, D 区域 8 个氨基酸 (图 3)。与黄金鲈 (*Perca flavescens*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) IGF- I 氨基酸序列相似度最高, 为 99%, 与斑马鱼 (*Danio rerio*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫 (*Carassius auratus*) IGF- I 氨基酸序列相似度为 87%, 与人 (*Homo sapiens*)、小家鼠 (*Mus musculus*)、马 (*Equus caballus*) IGF- I 氨基酸序列相似度最低, 为 81%。其中, B 和 A 区域较为保守, C 和 D 区域变异较大。

根据鳊与其他 16 种脊椎动物 IGF- I 氨基

酸序列构建了脊椎动物 NJ 系统关系树 (图 4), 鳊和其他鱼类聚为一支, 哺乳类、鸟类和两栖类构成另一支, 物种间亲缘关系与其传统分类地位一致。

**2.2 鳊 IGF- I 在各组织中的表达特征** 实验检测到鳊肝组织总 RNA 10 pg ~ 100 ng 相当量 10 倍梯度 cDNA 稀释液。由标准曲线 (图 5A、B) 可知 IGF- I 基因的扩增效率 E 值为 97.7%, 相关系数  $R^2$  为 0.995; 内参基因  $\beta$ -actin 的扩增效率 E 值为 99.9%, 相关系数  $R^2$  为 0.998, 结果表明 IGF- I 基因和内参基因标准曲线的线性关系都良好, 在实验浓度范围内能够进行准确的定量。

利用实时定量 RT-PCR 分析 IGF- I mRNA 在不同组织的表达情况, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因对各组织起始 RNA 量进行校正, 以肾作为对照因子, 因目的基因 IGF- I 和内参基因  $\beta$ -actin 扩增效率兼容<sup>[7]</sup>, 故采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对不同组织 IGF- I mRNA 的表达量进行比较 (图 6)。由图可知, 各组织中均有 IGF- I mRNA 的表达, 其中, IGF- I mRNA 在肝中表达量最高, 约为肾的

```

1
3 gctgtttcctgttgaaaatgtctgtgtaatgtagataaatgtgaggattttctctctaaatccgctctcctgttc
78 gctaaatctcacttctccaaaacgagcctgcgcaatggaacaaagtcggaatattgagatgtgacattgcccgc
153 tctcatcctctttctccccgttttaaatgacttcaacaagttcattttcgccgggctttgtcttgcggagacc
228 gtggggATGTCTAGCGCTCTCCTTTTCAGTGGCATTATGTGATGTCTTCAAGAGTGCATGTGCTGTATCTCC
1 M S S A L S F Q W H L C D V F K S A M C C I S
303 TGTAGCCACACCTCTCACTACTGCTGTGCGTCCCTCACCCTGACTCCGACGGCAACAGGGGGGGACCAGAGACC
24 C S H T L S L L L C V L T L T P T A T G A G P E T
378 CTGTGCGGGGGAGCTGGTGCACACGCTGCAGTTTGTGTGGAGATAGAGGCTTTTATTTCAGTAAACCAACA
49 L C G A E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S K P T
453 GGCTATGCCCAATGCACGGCGATCACGTGGCATTGTGGACGAGTGTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTGCGGCGC
74 G Y G P N A R R S R G I V D E C C F Q S C E L R R
528 CTGGAGATGTACTGTGCACCTGCCAAAAGTACGAAAGCTGCTCGTCTGTGCGTGCACAGCGCCACAGACATG
99 L E M Y C A P A K T S K A A R S V R A Q R H T D M
603 CCGAGACACCTAAGTGTAGTACCGCAGGCACAAAAGTGGACAAGGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCAGCCA
124 P R A P K V S T A G H K V D K G T E R R T A Q Q P
678 GACAAGCAAAAAACAAGAAGAGACCTTACCTGGACATAGTCATTCATCCTTCAAGGAAGTCATCAGAAAAAC
149 D K T K N K K R P L P G H S H S S F K E V H Q K N
753 TCAAGTCGAGGCAACACAGGGGGCAGAAATTACAGAATGTAGgaaggagcgaatggacaaatgccagcgactt
174 S S R G N T G G R N Y R M *
828 gggaaagagaagggagtgccttacctgtgaccctgtggaatggttcaactgtaaaacaaaacacagaggaggc
903 taacaatggtccgaaaagctcttcaaaatgattgaaacttgagagctaagtgtgttaagggtttgatgaggga
978 tcttgtgattattttatacactgcaccattccatattggggaggaattcttgttaatgcaatgtaacagactagt
1053 ttagctgctgagacacgaacaagagcttattatacctccatgtgtgagctgcagcatccctggctccaggaaag
1128 gtggaaacggatctgggcttcagccaatcagagagcggcaggctgtgtttgagaatgagtgttccatcctgttcc
1203 ttgaactttgcgaggtaaatcctttactctgagagagtgattaattcactccttcggttaagacgggatactt
1278 tgtcattgatcgcatataacagttaactaccagttaaaaatctgattatctcacttcagagtttgttttatgc
1353 accatgcattatgaggatatttttaaaatcaaggttcgcttgaaaggacaaagaccacatggttcggttatcag
1428 actttaagcattgttagttattttaccttgagcccaagtcaaatccctacttctcactgactgaagcagtggtt
1503 cttctgtctaagtggagtccttttaaggtttgagtccaatccaatcccttctaagcctcaggaagtgttgagaa
1578 cctgaggactgagctcaaatccaacacttttatacaacagatccgatcattagaggggattttaaggaagga
1653 gggaaagttagtaccctcaaaaacaagattgttcttttcttattttcaaaaacagagaatcaaatcaaccagaag
1728 ctaaatggaattaaagttttttcccgattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 鳊 IGF- I cDNA 全长和氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Siniperca chuatsi* IGF- I

小写字母代表 3', 5'端非翻译区;大写字母部分为编码区,且上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列,信号肽用浅灰底色黑字标示,成熟肽用深灰底色黑字标示,E 肽用黑底色白字标示; \* 表示终止密码子;多聚腺苷酸加尾信号( attaaa) 和形成 3 个二硫键的 6 个半胱氨酸残基(C<sup>49</sup>, C<sup>61</sup>, C<sup>88</sup>, C<sup>89</sup>, C<sup>93</sup>, C<sup>102</sup>) 用方框标出。

3'-, 5'-untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotide and the lower shows the amino acids, light gray background and black letters indicate the signal peptide, dark gray background and black letters indicate the mature peptide, black background and white letters indicate the E peptide; Asterisk indicates stop codon; Putative polyadenylation signals( attaaa) and the forming of three disulfide bonds of the six cysteine residues ( C<sup>49</sup>, C<sup>61</sup>, C<sup>88</sup>, C<sup>89</sup>, C<sup>93</sup>, C<sup>102</sup>) are boxed.

125 倍;脑、后肠、皮肤、性腺表达次之;胃、脾、前肠、鳃、心、肌肉表达量较低。

### 3 讨论

本研究运用 RACE 等克隆技术首次获得了

	B DOMAIN	C DOMAIN	A DOMAIN	D DOMAIN
Sch	GPETLCGAELVDTLQFVCGDRGFYFSKPT	GYGPNARRS--R	GIVDECCEQSCELRRLEMYCA	PAKTSKAA
Ssa	.....E.....	.....SS..HN.	.....	..V..SG...
Omy	.....E.....	.....SS..HN.	.....	..V..SG...
Pfl	.....E.....	.....	.....	.....
Sau	S.....E.....	.....	.....	.....
Eco	.....E.....	.....V.....	.....	.....N.....
Pol	.....E.....	.....	.....	.....
Omo	.....E.....N..	.....S.....	.....Q.....	..V..P..IS
Cca	.....	.....SS..HN.	.....	..V..PG..TP
Dre	.....	.....SS..HN.	.....	..V..G..SP
Cau	.....	.....SS..HN.	.....	..V..PG..TP
Mmu	.....A.....P.....N..	.....SSI..APQT	.....R..D.....	..L..PT...
Mga	.....A.....	.....SSS..LHHK	.....D.....	..I..PP..S.
Hsa	.....A.....N.....	.....SSS..APQT	.....R..D.....	..L..PA..S.
Xla	.....	.....S..N.....HH.	.....DF.....	..PA..S.
Eca	.....A.....N.....	.....SSS..APQT	.....R..D.....	..L..PA..S.
Apl	.....A.....	.....SSS..LHHK	.....D.....	..I..PP..S.

图3 脊椎动物 IGF- I 氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequences of vertebrate IGF- I

为了最大限度的比对,引入间隙,并用波折号(-)表示,具有相同的氨基酸位点用(.)标出。IGF- I 参考序列如下, Sch: 鳊; Ssa: 大西洋鲑, NP\_001117095. 1; Omy: 虹鳟, NP\_001118168. 1; Pfl: 黄金鲈, AAC62228. 1; Sau: 金鲷, ABQ52656. 1; Eco: 石斑鱼, AAS01183. 1; Pol: 牙鲆, AAC62228. 1; Omo: 莫桑比克罗非鱼, CAA71789. 1; Cca: 鲤, ABQ08938. 1; Dre: 斑马鱼, NP\_571900. 1; Cau: 鲫, AAC83444. 1; Mmu: 小家鼠, NP\_034642. 2; Mga: 火鸡, AAC26006. 1; Hsa: 人, NM\_000618. 2; Xla: 非洲爪蟾, NP\_001156865. 1; Eca: 马, NP\_001075967. 2; Apl: 绿头鸭, ABS76279. 1。

To maximize the alignment, gaps are introduced and indicated as dashes, dots indicate identity. References for IGF- I sequences are as follows, Sch: *Siniperca chuatsi*; Ssa: *Salmon salar*, NP\_001117095. 1; Omy: *Oncorhynchus mykiss*, NP\_001118168. 1; Pfl: *Perca flavescens*, AAC62228. 1; Sau: *Sparus aurata*, ABQ52656. 1; Ec: *Epinephelus coioides*, AAS01183. 1; Pol: *Paralichthys olivaceus*, AAC62228. 1; Omo: *Oreochromis mossambicus*, CAA71789. 1; Cca: *Cyprinus carpio*, ABQ08938. 1; Dre: *Danio rerio*, NP\_571900. 1; Cau: *Carassius auratus*, AAC83444. 1; Mmu: *Mus musculus*, NP\_034642. 2; Mga: *Meleagris gallopavo*, AAC26006. 1; Hsa: *Homo sapiens*, NM\_000618. 2; Xla: *Xenopus laevis*, NP\_001156865. 1; Eca: *Equus caballus*, NP\_001075967. 2; Apl: *Anas platyrhynchos*, ABS76279. 1.

鳊 IGF- I 基因的 cDNA 全长序列, 推导的 IGF- I 前体蛋白序列含 186 个氨基酸, 分子量为 20.5 ku, 等电点为 9.5。与斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[8]</sup> IGF- I 前体蛋白结构一样, 鳊 IGF- I 前体蛋白由信号肽、成熟肽、E 肽三部分组成, 成熟肽由 B、C、A、D 4 个区域组成, 其中, B 区域 29 个氨基酸, C 区域 10 个氨基酸, A 区域 21 个氨基酸, D 区域 8 个氨基酸。成熟肽含有 6 个半胱氨酸残基, 2 个位于 B 区域, 4 个位于 A 区域, 可形成 3 个链内二硫键, 对维持 IGF- I 的空间结构有重要作用。

脊椎动物 IGF- I 在长期进化过程中较为保守。鳊 IGF- I 与其他脊椎动物 IGF- I 的氨基酸序列相似度达到 81% ~ 99%, 其中, B 和 A 区的同源性较高, 在硬骨鱼类中仅有极个别氨

基酸差异; C 和 D 区差异较大。系统进化树基本显示出了脊椎动物的系统分类关系, 即鳊与硬骨鱼类同源性较高, 与两栖类、鸟类和哺乳类的同源性较低。

研究发现, IGF- I 基因可转录产生多种类型 IGF- I mRNA。Shablott 等<sup>[9]</sup>在研究鲑鳟鱼类 IGF- I 时发现存在 4 种不同的 mRNA, 这 4 种 IGF- I mRNA 是通过原始转录本选择性剪接产生的长度不同的拼接体, 这些拼接体翻译产物都含有相同的信号肽、B、C、A 和 D 区域, 仅仅 E 区域长短不同, 依其 E 区域长短分别命名为 Ea-1、Ea-2、Ea-3 和 Ea-4。Ea-1 的 E 区域含有 35 个氨基酸、Ea-2 含 47 个氨基酸、Ea-3 含 62 个氨基酸、Ea-4 含 74 个氨基酸。鳊 IGF- I 前肽序列与鲑鳟鱼 IGF- I Ea-4 亚型结构相同,

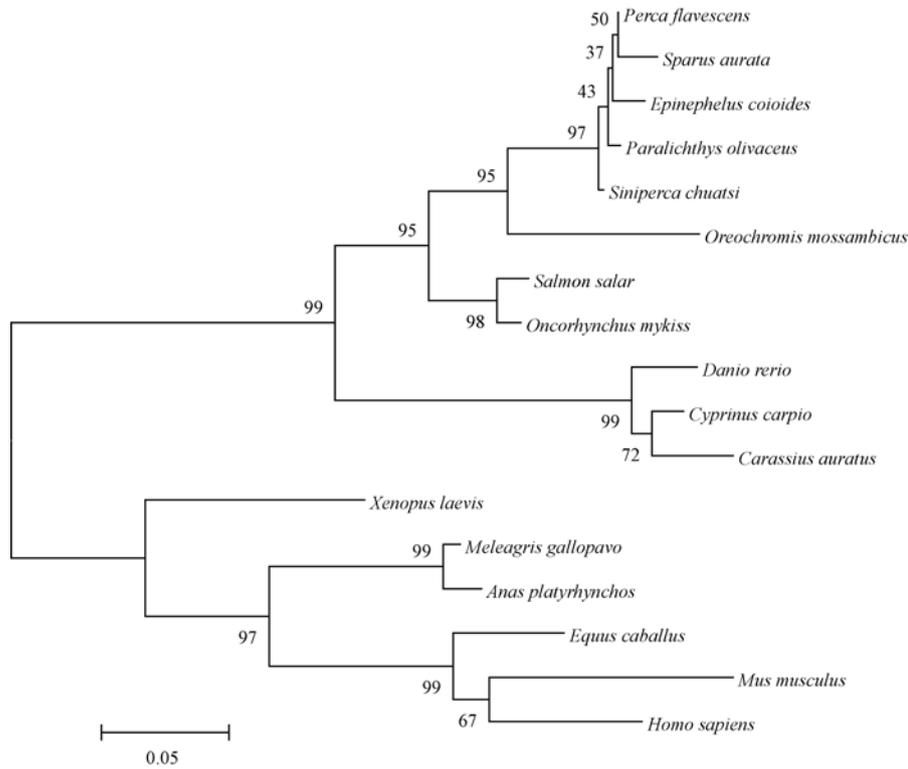


图 4 脊椎动物 IGF- I 的 NJ 系统进化树

Fig.4 NJ phylogenetic tree of vertebrate IGF- I

*Perca flavescens*; 黄金鲈, AY332492. 2; *Sparus aurata*; 金鲷, ABQ52656. 1; *Epinephelus coioides*; 石斑鱼, AAS01183. 1; *Paralichthys olivaceus*; 牙鲆, AAC62228. 1; *Oreochromis mossambicus*; 莫桑比克罗非鱼, CAA71789. 1; *Oncorhynchus mykiss*; 虹鳟, NP\_001118168. 1; *Salmon salar*; 大西洋鲑, NP\_001117095. 1; *Danio rerio*; 斑马鱼, NP\_571900. 1; *Carassius auratus*; 鲫, AAC83444. 1; *Cyprinus carpio*; 鲤, ABQ08938. 1; *Xenopus laevis*; 非洲爪蟾, NP\_001156865. 1; *Meleagris gallopavo*; 火鸡 AAC26006. 1; *Anas platyrhynchos*; 绿头鸭, ABS76279. 1; *Equus caballus*; 马, NP\_001075967. 2; *Mus musculus*; 小家鼠, NP\_034642. 2; *Homo sapiens*; 人, NM\_000618. 2。

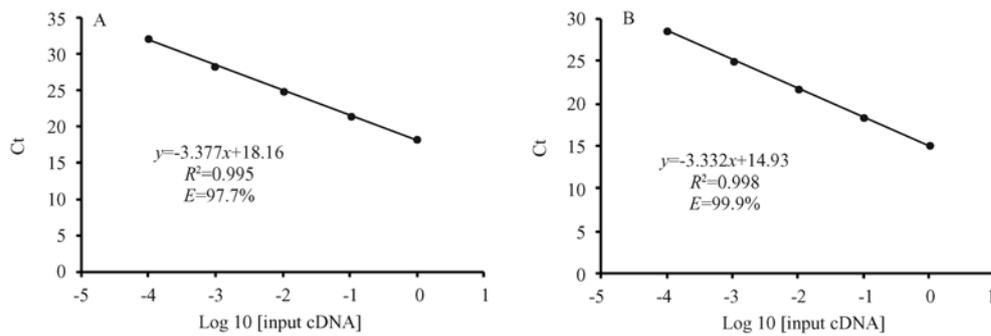


图 5 IGF- I 和内参基因 β-actin 的标准曲线图

Fig.5 The standard curve of IGF- I gene and internal reference gene β-actin

A: IGF- I ; B: β-actin.

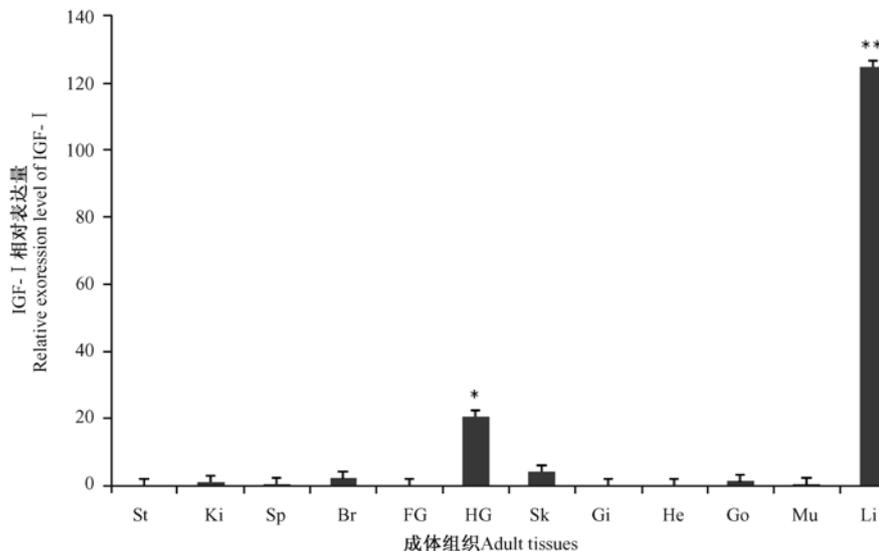


图 6 鳊各组织 IGF- I mRNA 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of IGF-I mRNA in tissues of *S. chuatsi*

St:胃; Ki:肾; Sp:脾; Br:脑; FG:前肠; HG:后肠; Sk:皮肤; Gi:鳃; He:心; Go:性腺; Mu:肌肉; Li:肝。表达值以内参基因  $\beta$ -actin 加以校正,数值表示为相对于对照因子(肾)的倍数变化(平均值  $\pm$  标准差)。\* 表示该组织与肾有显著差异 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示该组织与肾有极显著差异 ( $P < 0.01$ )。

St:Stomach; Ki:Kidney; Sp:Spleen; Br:Brain; FG:Foregut; HG:Hindgut; Sk:Skin; Gi:Gill; He:Heart; Go:Gonad; Mu:Muscle; Li:Liver. Expression values were normalized to those of internal reference gene  $\beta$ -actin. Data were expressed as the mean fold change (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) from the calibrator group (kidney). Expression values of tissues with (\*) or (\*\*) are significantly or more significantly different from kidney, respectively ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

故将本文克隆 cDNA 命名为鳊 IGF- I Ea-4 型。Duguay 等<sup>[10]</sup>报道大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的心、脑、肾、脾和卵巢等组织中主要表达 Ea-4 型 IGF- I mRNA, Chen 等<sup>[11]</sup>报道黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)肝等组织也主要表达 Ea-4 型 IGF- I mRNA, 而 Hashimoto 等<sup>[12]</sup>报道鲤各组织主要表达 Ea-2 型 IGF- I mRNA, 这说明在不同种类鱼中可能表达不同类型的 IGF- I mRNA。

IGF- I 基因不仅转录产物类型多样,而且具有组织表达特异性。本研究运用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测了鳊 IGF- I mRNA 在不同组织的相对表达水平,与鲤<sup>[13]</sup>和河鲈(*Perca fluviatilis*)<sup>[14]</sup>一样,鳊 IGF- I mRNA 在肝组织中的表达水平最高,是肝外其他组织表达量总和的 4 倍多,表明肝是 IGF- I 合成和分泌的主

要器官。然而,不同物种肝组织 IGF- I mRNA 的表达水平存在较大的差异,这一差异可能由物种间差异引起的,营养状况、环境温度或盐度和个体发育阶段等也可能产生影响<sup>[15]</sup>。肝外组织产生的 IGF- I 可以自分泌或旁分泌的形式参与组织特定作用<sup>[16]</sup>,本文检测到在肝外各组织都有 IGF- I mRNA 的表达,其中,后肠中表达量为肾的 20 多倍,可能与后肠作为鱼类主要的渗透调节器官参与渗透调节有关<sup>[17]</sup>;性腺中表达量为肾的 2 倍多,表明性腺中 IGF- I 可能参与生殖调节<sup>[18]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Jones J R, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews*, 1995, 16(1): 3-34.
- [2] Reinecke M, Bjornsson B T, Dickho V W W, et al.

- Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 20–24.
- [ 3 ] Duan C. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist*, 1997, 37(6): 491–503.
- [ 4 ] Thomas P M. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2001, 129(2/3): 207–219.
- [ 5 ] Moriyama S, Aysen F G, Kawauchi H. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(8): 1553–1562.
- [ 6 ] 鲁双庆, 刘峰, 刘臻, 等. 三种鳊鱼生长激素基因的克隆及序列比较. *海洋与湖沼*, 2008, 39(4): 354–361.
- [ 7 ] Johnson M R, Wang K, Smith J B, et al. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 2000, 278(2): 175–184.
- [ 8 ] Fiona L P, Evelyn G T, Hanna H C, et al. 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*, 2006, 145(3): 237–246.
- [ 9 ] Shablott M J, Chen T T. Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1993, 2(6): 351–361.
- [ 10 ] Duguay S J. Nucleotide sequence and tissue distribution of three insulin-like growth factor I prohormones in salmon. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1992, 12(3): 25–37.
- [ 11 ] Chen M H C, Lin G H, Gong H Y, et al. Cloning and characterization of insulin-like growth factor I cDNA from black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Zoological Studies*, 1998, 37(3): 213–221.
- [ 12 ] Hashimoto H, Mikawa S, Takayama E, et al. Molecular cloning and growth hormone-regulated gene expression of carp insulin-like growth factor I. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1997, 41(5): 877–886.
- [ 13 ] Vong Q P, Chan K M, Cheng C H. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. *Journal of Endocrinology*, 2003, 178(3): 513–521.
- [ 14 ] Jentoft S, Aastveit A H, Andersen Q. Molecular cloning and expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): lack of responsiveness to growth hormone treatment. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2004, 30(1): 67–76.
- [ 15 ] Larsen D A, Beckman B R, Dickhoff W W. 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*, 2001, 123(3): 308–323.
- [ 16 ] Reinecke M, Collet C. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *International Review of Cytology*, 1998, 183(1): 1–94.
- [ 17 ] Bern H A, McCormick S D, Kelley K M, et al. Insulin-like growth factors “under water”: role in growth and function of fish and other poikilothermic vertebrates // Spencer E M. *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. New York: Elsevier, 1991: 85–96.
- [ 18 ] Giorgi B, Helena D C, Jean F B, et al. Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(3): 204–210.