

## 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代胰岛素样生长因子(IGF-I b)基因3'cDNA末端克隆及序列分析

范武江, 李思发\*, 王兵, 孟庆辉

(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:**为探讨尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代(*Oreochromis niloticus* ♀ × *Sarotherodon melanotheron* ♂) IGF-I 基因结构差异, 研究 IGF-I 基因与此 3 种基因型罗非鱼耐盐性能差异之间的关系, 通过 3'-RACE 的方法, 从鳃的总 RNA 分别获得其 IGF-I b 基因的部分 cDNA 序列, 长度分别为 1 076 bp、1 075 bp 和 1 079 bp, 包含完整的开放阅读框(ORF)546 bp、一个终止密码及含 polyA 信号的 3'UTR; ORF 编码 182 个氨基酸, 包括信号肽(44aa), 成熟肽 B 区(29aa)、C 区(10aa)、A 区(21aa)、D 区(8aa)及编码 70aa 的 E 区, 二级结构为混合类型; 与其他脊椎动物 IGF-I b 序列的序列相似度达 75.8%~100%; 成熟肽 A、B 区高度保守, C 区第 82 位后缺失 2aa, E 区第 131 位和 159 位分别缺失 3aa 和 1aa; 萨罗罗非鱼在 E133 位发生 Ala/Pro 氨基酸残基替换, 与耐盐性强的莫桑比克罗非鱼和画眉罗非鱼一致, 推测 IGF-I b 基因 E 区选择性剪切与 3 种罗非鱼耐盐性能差异有关。

**关键词:**尼罗罗非鱼; 萨罗罗非鱼; 杂交子代; 胰岛素样生长因子-I b; cDNA; 克隆

**中图分类号:**Q 785; S 917

**文献标识码:**A

罗非鱼(*Tilapia*)隶属于鲈形总目, 鲈亚目, 丽鱼科(*Cichlidae*), 按 *Trewavas*<sup>[1]</sup> 分类方法包括 3 个属约 70 多种, 大多数属于广盐性种类, 既可以在淡水中养殖, 也可以经过驯化后在咸水中生长。其中尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)原主产北非, 已成为国内外养殖最普遍的罗非鱼, 它生长快, 个体大, 但耐盐性差; 萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)生长慢, 个体小, 但是耐盐性强, 可耐受 100 以上的盐度, 在盐度 35 的咸水中可正常繁殖<sup>[2]</sup>。本实验室通过尼罗罗非鱼(♀) × 萨罗罗非鱼(♂)杂交和选育, 获得了耐盐性能和生长性能兼优的杂交子代<sup>[3-4]</sup>。但导致 3 种基因型罗非鱼的耐盐性能差异的遗传机制尚不清楚。罗非鱼类的耐盐机理相当复杂, 涉及到生态、生理、遗传和环境等各个方面。在生态、生理方面, 当罗非鱼在咸淡水之间迁移时, 细胞内外渗透压发生改变, 可以通过改变肾脏<sup>[5]</sup>、食道上

皮<sup>[6]</sup>的形态结构及鳃丝和鳃盖膜上氯细胞的数量和形态<sup>[7]</sup>来调节水盐代谢, 维持细胞内外的渗透平衡以适应水体盐度的变化; 而在遗传方面, 耐盐能力固然与遗传因素有关, 也受遗传-非遗传因子互作的影响。如早期耐盐处理、光照周期<sup>[8]</sup>及营养状况<sup>[9-10]</sup>等都会影响到罗非鱼盐度耐受性试验结果。胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)是一类具有胰岛素样代谢和促有丝分裂功能的多肽, 由两种同源多肽组成, 即 IGF-I 和 IGF-II, 它们通过自分泌或旁分泌方式作用于不同的靶细胞<sup>[11]</sup>。IGF-I 在鱼类进化过程中相当保守, 其主要功能有: (1) 促进软骨组织对硫的吸收<sup>[12]</sup>; (2) 加速蛋白质合成<sup>[13]</sup>; (3) 激发精子发生及诱导卵母细胞成熟<sup>[14]</sup>; (4) 增强鱼类适应咸水环境的能力<sup>[15]</sup>。

IGF-Is 系统在哺乳动物中的研究已较为深入, 主要在出生后及成年期发挥作用介导生长激

收稿日期:2009-09-27 修回日期:2009-12-22

资助项目:罗非鱼产业技术体系(新 D-8002-09-0055); 公益性行业(农业)科研专项:罗非鱼大规模鱼种规模化培育与生态养殖技术研究(nyhyzx07-044-01); 国家科技支撑计划专题:耐盐罗非鱼新品种选育(2006BAD01A1203)

通讯作者:李思发, E-mail: sfli@shou.edu.cn

素(GH)的促生长效应<sup>[16]</sup>;但在鱼类,IGFs系统的研究尚处于起步阶段,且仅限于鲑鳟<sup>[17]</sup>鱼类、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)<sup>[18]</sup>、鲤科<sup>[19]</sup>和鲈形目<sup>[20]</sup>等少数几个种类。越来越多的研究结果表明,IGF-I的渗透调节作用与鱼类的耐盐适应有关,水体盐度直接影响IGF-I黑鲟肝脏IGF-I mRNA表达,在等渗溶液中mRNA含量最高<sup>[21]</sup>;通过注射IGF-I,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)转入到咸水环境后,血浆渗透压和Na<sup>+</sup>浓度显著提高<sup>[13]</sup>;经IGF-I处理过的大西洋鲑(*Oncorhynchus kisutch*)的鳃Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性得到增强<sup>[22]</sup>;Sakamoto等<sup>[23]</sup>发现,在2龄鲑降河下海的适应过程中,肝脏IGF-I mRNA水平上升,1个月后观察到鳃IGF-I mRNA水平也上升。在哺乳动物,IGF-I s包括a、b和c型3种亚型,它们的前体蛋白原具有完全相同的成熟肽区,主要差别在于转录产物的E肽长度不同,在鱼类如斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[24]</sup>、河鲈(*Perca fluviatilis*)<sup>[25]</sup>等也存在a和b两种亚型,其中IGF-I a比IGF-I b在E肽区缺失27aa,但是目前还很少有关罗非鱼IGF-I b基因方面的报道。

本试验以尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及它们的杂交后代为材料,研究它们IGF-I b基因cDNA序列结构,从分子水平对IGF-I b基因与3种基因型罗非鱼耐盐机制的关系作一初步探索,为耐盐罗非鱼新品种的选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

尼罗罗非鱼新吉富品系(以下简称尼罗,代号ON)、萨罗罗非鱼(以下简称萨罗,代号SM)由河北中捷国家级罗非鱼良种场提供,尼罗♀×萨罗♂的杂交后代(代号HB)在该场通过人工繁殖获得。取鳃组织,用灭菌DEPC水清洗后,迅速保存到10倍体积(质量体积百分比M/V)RNAstore液中,带回实验室-80℃保存备用。

### 1.2 试剂药品

RNAstore保存液购自北京天根生化科技有限公司,Trizol试剂购自Invitrogen公司,PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit、pMD19<sup>TM</sup>-T Vector及3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0试剂盒由Takara公司提供,凝胶回收使用博日公司的Bio Spin Gel Extraction Kit试剂盒,X-gal、IPTG、氨苄青霉素为

上海生物工程公司产品;引物合成与DNA测序由上海生工生物工程公司完成。

### 1.3 IGF-I的cds序列克隆

总RNA的提取按照总RNA提取试剂盒Trizol说明书的方法进行,检测后-80℃保存备用。根据GenBank中的尼罗罗非鱼(EU272149)IGF-I cds序列,应用Primer Premier 5.0软件在开放阅读框(open reading frame, ORF)区域设计一对引物(表1);使用PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit试剂盒逆转录合成cDNA第一链,反应体系参照试剂盒说明书。PCR反应条件:94℃ 3 min;30个循环94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 35 s;再72℃ 10 min。反应产物经1.2%琼脂糖电泳,Biospin Gel Extraction Kit回收目的片段;连接pMD19-T载体,4℃过夜,转化DH5a感受态细胞,菌液涂布在含有X-gal底物、IPTG诱导物和氨苄青霉素(1% Amp<sup>+</sup>)的固体培养基平板,利用蓝白斑进行筛选,挑选白色单一菌落,LB(1% Amp<sup>+</sup>)液体培养基中37℃ 250 r/min过夜;菌液PCR鉴定;阳性克隆送菌液委托上海生工测序。应用Vector NTI 8.0、BioEdit 7.0、MEGA 4.0、DNAMAN等生物软件进行分析。

### 1.4 IGF-I基因3'RACE-PCR

使用3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0试剂盒进行快速扩增cDNA3'末端(3'RACE),技术流程和操作方法按照说明书。根据已经获得的IGF-I基因cds序列,应用Primer Premier 5.0软件设计两条基因特异性引物(GSP1, GSP2),分别与试剂盒提供的外侧引物和内侧引物进行巢式PCR,扩增3'RACE cDNA第一链获得3'RACE结果;试剂盒引物序列及GSP引物序列见表1。回收纯化扩增产物,A/T克隆后测序,将测序结果与已经获得的IGF-I基因cds序列拼接获得IGF-I基因3'cDNA全长。

### 1.5 蛋白质结构预测

将推导出来的开放阅读框氨基酸序列,利用网上资源SignalP 3.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>在线预测可能的信号肽及信号肽切割位点的位置。对氨基酸的一级和二级结构在PredictProtein: <http://www.predictprotein.org/>网站上做在线分析,预测可能的α螺旋、β折叠、环区发生部位及各种功能模体的分布。在<http://swissmodel.expasy.org/>网上进行同源建模,初步预测蛋白质三级结构。

表 1 尼罗、萨罗及杂交后代 IGF- I 基因 PCR 引物序列、退火条件及产物大小  
Tab.1 Primer sequences, PCR size and annealing temperatures of IGF- I gene in *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid

引物名称 primer	引物序列 sequence	退火温度 $T_m$ ( $^{\circ}$ C)	产物 product
cds 引物	IGF- I F	5'-ATGCTAGCGCTTTTCTT-3'	549 bp
	IGF- I R	5'-CTACATTCTGTAATTCCTGCC-3'	
	ON- GSP1*	5'-CTCACCTGACTCCGACGGCAAC-3'	
	ON- GSP2*	5'-ATGCCAAGAGCACCCAAGTTAGTAG-3'	
3'RACE 引物	SM-GSP1	5'-CCTCACCTGACTCCGACAGCAAC-3'	549 bp
	SM-GSP2	5'-CCAAGAGCACCCAAGTTAGTAGCAGAG-3'	
	Outer Primer	5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATT-3'	
	Inner Primer	5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTCACTATAGG-3'	

注: \* 尼罗和杂交后代共用的 3'RACE GSP 引物。

Notes: \* Indicates the GSP primers for 3'RACE belonging to ON and HB.

### 1.6 氨基酸序列分析与系统发育树的构建

将测序所得到的 cDNA 序列用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 的 Blastn 软件进行同源基因的搜索; 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 氨基酸序列的推断通过软件 DNAMAN 6.0 完成; 氨基酸同源性使用 Clustal X 2.0 软件进行分析, 将研究所得尼罗、萨罗及杂交后代 IGF- I 推导的氨基酸序列与其他同源的 IGF- I b 基因的氨基酸序列进行多重比较, 用 MEGA 4 软件包中的系统发育分析程序, 以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ 法) 构建系统进化树, 用 Bootstrap 法进行 1 000 次评估。

## 2 结果

### 2.1 IGF- I 基因 cDNA 序列结构

分别将获得的 3 种基因型罗非鱼的鳃的总 RNA 反转录后, 进行 PCR 扩增, 得到长度约为 550 bp 的单一片段 (图 1), 与预期片段大小一致, 未发现有何非特异性区带。分别回收目的片段, 克隆测序后, 经 BLAST 分析确定是 IGF- I 基因 cds 完整序列。3 种基因型罗非鱼的 IGF- I 基因 cds 序列长度均为 549 bp (图 2-a)。尼罗和杂交后代的核苷酸序列 100% 一致; 同尼罗和杂鱼相比, 萨罗核苷酸序列相差两个碱基。

使用快速扩增 3'cDNA 末端方法获得新吉富尼罗、萨罗及杂交后代 IGF- I 基因的 3'端非翻译区 (UTR), 序列的长度分别为 527 bp、526 bp 及 530 bp。在 3 种基因型罗非鱼 3'UTR 区相似位置存在一个保守的 mRNA 加尾信号序列 AATAAA 及 9~12 个碱基的 polyA 尾巴 (图 2-

b); 同尼罗和萨罗相比, 杂交后代在 IGF- I b cDNA 序列上分别相差 5 个和 7 个碱基, 变异率分别为 0.46% 和 0.65%。

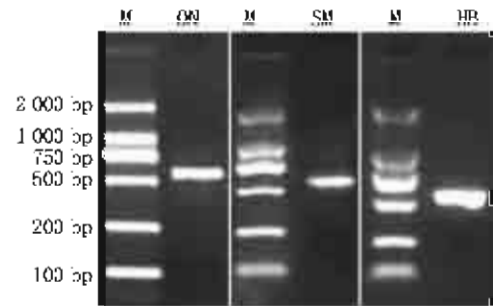


图 1 尼罗、萨罗及杂交后代 IGF- I cDNA 扩增产物  
M: DL-2 000DNA 分子量标记; ON: 尼罗; SM: 萨罗; HB: 杂交后代。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of IGF- I cDNA in *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid

M: DL-2 000 DNA Marker; N: *O. niloticus*; S: *S. melanotheron*; HB: *O. niloticus* × *S. melanotheron*.

### 2.2 氨基酸序列结构

由 DNAMAN 6.0 软件推导的氨基酸序列表明, IGF- I b 基因 cds 区由 182 个氨基酸编码, 与黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii* 4104007)、黄金鲈 (*Perca flavescens* 33089962)、龙胆石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus* 167077135) 和褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus* 3483058) IGF- I b 基因比较 (图 3), 新吉富尼罗、萨罗及其杂交后代 IGF- I 推导的氨基酸序列包含完整的信号肽成熟肽和 E 肽区, 信号肽包含 44 个氨基酸残基 (amino acid residues, aa), 成熟肽由 68 个 aa 组成 (B 区 29aa,

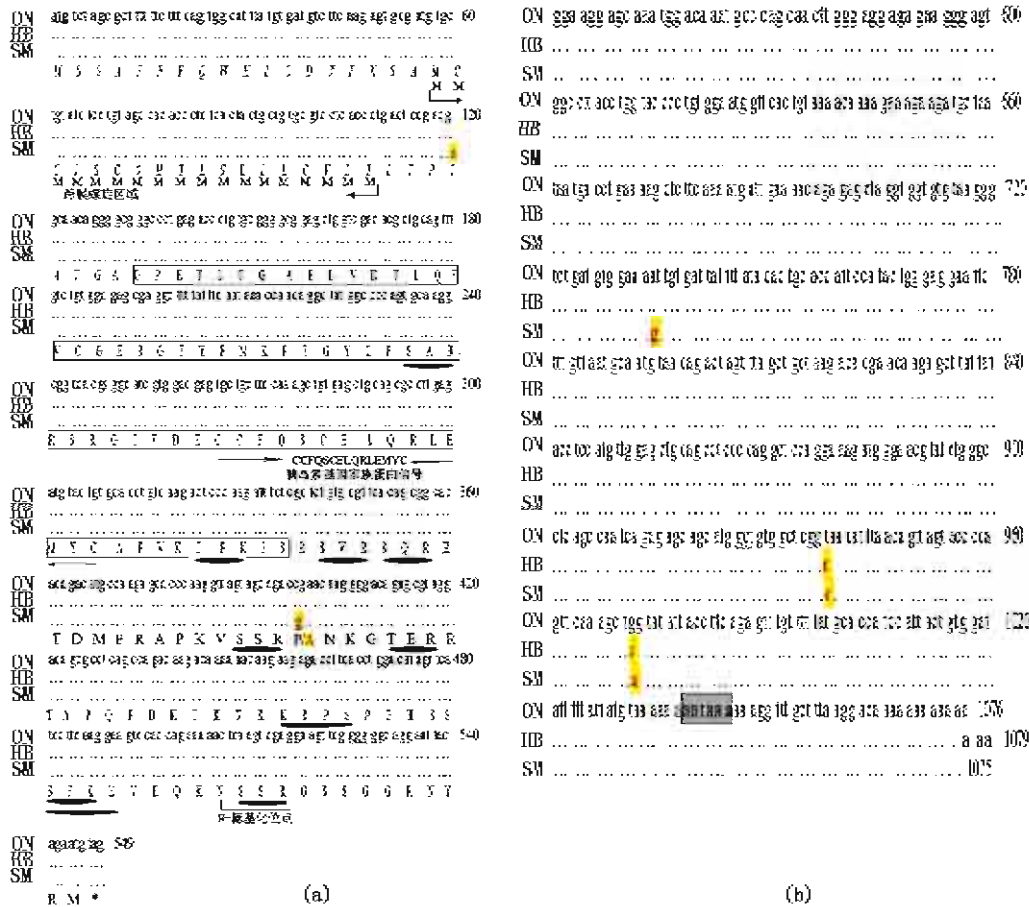


图2 尼罗、萨罗、杂交后代 IGF- I 基因 cDNA 序列比对结果

(a)IGF- I b 开放阅读框及推导的氨基酸序列；(b)IGF- I b 3'非编码区序列。

(atg)指示起始密码子；(\*)表示终止密码子；(M M)表示跨膜螺旋区域；(□)表示成熟肽序列；红色粗体+彩色阴影字母表示杂交后代与萨罗、尼罗棍导的碱基和氨基酸；(→)表示 10 个不同磷酸化位点；(→←)表示胰岛素基因家族蛋白信号；(□)表示 N-糖基化位点；(□)表示 poly A 加尾信号。

Fig. 2 cDNA sequences encoding the IGF- I gene in Oreochromis niloticus, Sarotherodon melanotheron and their hybrid

(a) The open reading frame and deduced amino acid sequences of IGF- I ;(b) The 3'-untranslated regions of IGF- I .

(atg)indicated initial codon ; (\*) mark stop condon ; (M M) indicates transmenbrane segments coding from 19 to 36 ; mature peptides are boxed with (□) ; the variety base and amino acid between SM and HB and ON are bolded and shaded with colors ; (→) indicates 10 phosphorylation sites ; (→←) position and sequence of insulin family signature is indicated between the arrows ; (□) indicates a N-glycosylation site ; a polyadenylation signal are boxed with (□) .

C 区 10aa, A 区 21aa, D 区 8aa), 在 B 区和 A 区含有构成 IGF- I 基因必需的 6 个半胱氨酸残基, E 肽全长 70aa。

2.3 IGF- I b 基因二级结构预测

IGF- I 基因二级结构的在线分析结果表明, 3 种基因型罗非鱼的氨基酸序列均包含 1 个长 15 个 aa 的胰岛素家族基因蛋白信号, 在成熟肽区域均包含一个 N-糖基化位点和多个磷酸化位点 [ST]。

[RK](图 3-a)。由 PHDhtm 预测结果可知, IGF- I 基因包含 18 个 aa 组成的跨膜拓扑结构 (19Met-Thr36); 新吉富尼罗、萨罗及其杂交子代的二级结构类型和组成高度一致, α 螺旋占 17.03%, β 折叠占 13.74%, γ 环占 69.23%, 本研究使用的 3 种基因型罗非鱼 IGF- I b 蛋白质二级结构为混合类型。

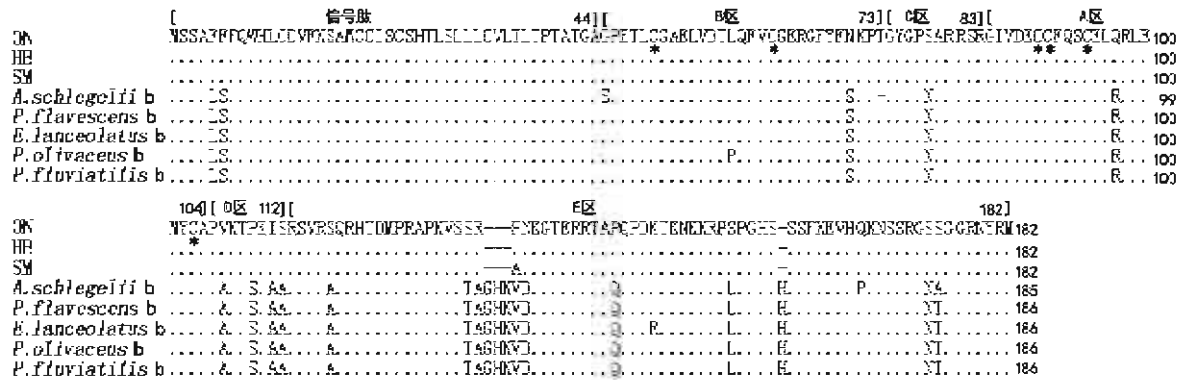


图3 尼罗、萨罗和杂交后代 IGF- I b 预测氨基酸序列与黑棘鲷、黄金鲈、龙胆石斑鱼、褐牙鲷和欧洲鲈 IGF- I b 基因同源比较

3 种基因型罗非鱼的 IGF- I b 基因包含信号肽(1~44),成熟肽 B 区(45~73)、C 区(74~83)、A 区(84~104)和 D 区(105~112), E 肽(113~182), \* 指示成熟肽中的半胱氨酸。

Fig. 3 The structure of the IGF- I b precursor with the predicted amino acid residues (aa) encoded by the cDNA of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid

The signal peptide(1-44), mature peptide which including B domain(45-73), C domain(74-83), A domain(84-104) and D domain(105-112) and E domain(113-182) were identified in sequence alignments of *A. schlegelii* (4104007), *P. flavescens* (33089962), *E. lanceolatus* (167077135) and *P. olivaceus* (3483058), *Perca fluviatilis* (37936473).

表2 实验罗非鱼 IGF- I b 基因成熟肽一级序列与牙鲷、欧洲鲈、人和鸡同源性比较  
Tab.2 Homology comparison of mature peptide of tilapia IGF- I b with *P. olivaceus*, *P. fluviatilis*, *H. sapiens*, and *Gallus gallus*

	B 区(29aa) B dom.	C 区(10aa) C dom.	A 区(21aa) A dom.	D 区(8aa) D dom.	合计(68aa) total
褐牙鲷 <i>P. olivaceus</i>	28* (96.6**)	9(90)	20(95.3)	4(50)	61(89.8)
欧洲鲈 <i>P. fluviatilis</i>	27(93.2)	9(90)	20(95.3)	4(50)	60(89)
人 <i>H. sapiens</i>	27(93.2)	3(40)	18(85.8)	3(37.5)	52(77.2)
鸡 <i>G. gallus</i>	26(89.7)	3(40)	19(90.6)	3(37.5)	51(75.8)

注: \* 表示氨基酸残基数; \*\* 括号内数值表示同源氨基酸残基在各保守区的百分比。  
Notes: \* Indicates the amino acid residues number; \*\* indicates the homologous ratio in each conserved region.

2.4 IGF- I b 氨基酸多重比对及系统发育树

应用 Clustal 2.0 软件对 3 种基因型罗非鱼的 IGF- I b 基因与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus niloticus* ABY88872)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus* AAC17494)、画眉罗非鱼(*Oreochromis urolepis hornorum* ABN13422)、黄金鲈(*Perca flavescens* 33089962)、龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* 167077135)、河鲈(*Perca fluviatilis* 37936473)、褐牙鲷(*Paralichthys olivaceus* 3483058)、鸡(*Gallus gallus* 211951)、家兔(*Oryctolagus cuniculus* 126722801)、人(*Homo*

*sapiens* 183109)、犬(*Canis familiaris* 73977757)、褐家鼠(*Rattus norvegicus* 92423)及小家鼠(*Mus musculus* 163659892) IGF- I 基因进行多重比对(图 4),本实验中的 3 种罗非鱼 IGF- I b 成熟肽与尼罗、莫桑比克及画眉罗非鱼完全相同,但相对于哺乳动物和鸡 IGF- I 基因,罗非鱼类 IGF- I b 基因在 C 区第 82 位与 83 位之间缺失两个残基;成熟肽 B、C、A 和 D 区与其它物种总的相似度为 75.8%~100%(表 2);系统发育树(图 5, NJ tree)结果显示,所有陆生动物共聚为一支,鱼类共聚为一支,罗非鱼则进一步聚在一起。

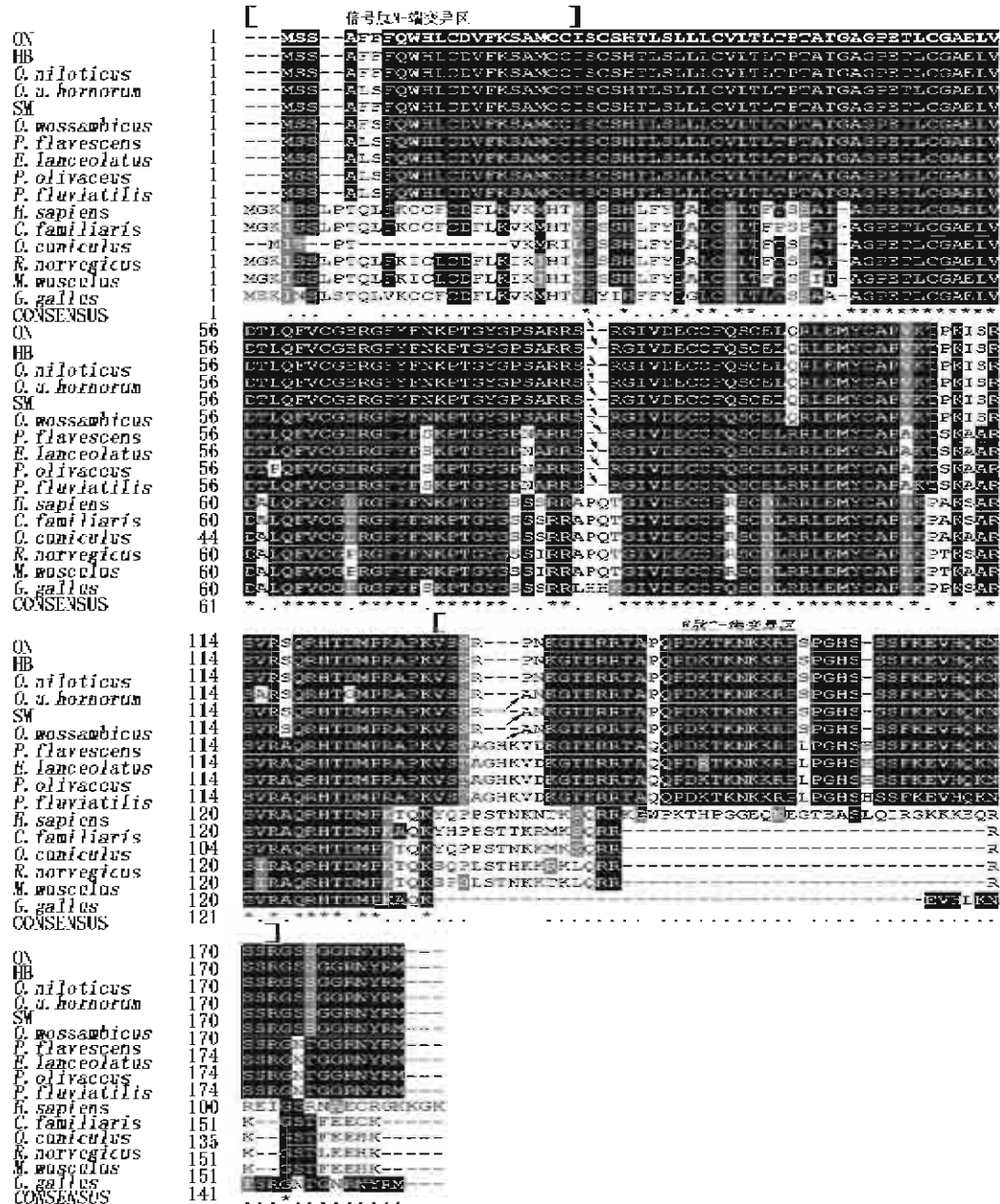


图 4 由尼罗、萨罗、杂交后代的 IGF-I cDNA 推导的氨基酸序列与其它物种的多重比较结果  
 Fig. 4 Comparison of amino acid sequence deduced from IGF-I cDNA of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid with some similar protein sequences

相同氨基酸用“\*”指示,相似的氨基酸用“:”或“.”指示;(\)指示几种鱼类缺失 2 个 aa 位置;(/)指示萨罗罗非鱼变异的 aa,与莫桑比克和画眉罗非鱼一致;[]指示 IGF-I E 肽碳端(C-端)变异区;用于比较的物种及相关 GenBank 序列号为 ON. 新吉富尼罗(本文),HB. 杂交后代(本文),尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* ABY88872; SM. 萨罗罗非鱼 *Sarotherodon melanotheron* ACRI8999(本文);莫桑比克罗非鱼 *Oreochromis mossambicus* CAA71789;画眉罗非鱼 *Oreochromis urolepis hornorum* ABN13422;黄金鲈 *Perca flavescens* 33089962;龙胆石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* 167077135;褐牙鲈 *Paralichthys olivaceus* 3483058;河鲈 *Perca fluviatilis* 37936473;鸡 *Gallus gallus* 211951;家兔 *Oryctolagus cuniculus* 126722801;人 *Homo sapiens* 183109;犬 *Canis familiaris* 73977757;褐家鼠 *Rattus norvegicus* 92423;小家鼠 *Mus musculus* 163659892

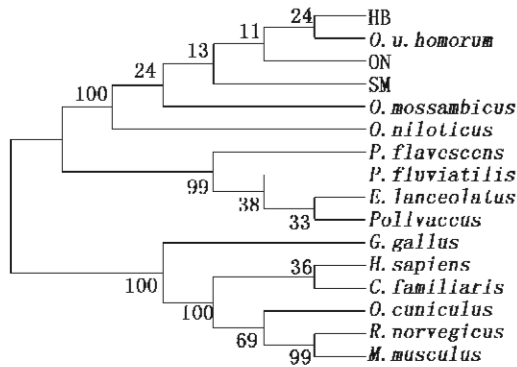


图5 尼罗、萨罗、杂交后代与其它物种 IGF- I 系统发育树

Fig. 5 Construction of Phylogenetic tree based on IGF- I amino acids in *Oreochromis niloticus* (ON), *Sarotherodon melanotheron* (SM) and their hybrid (HB) and other species

### 3 讨论

本研究采用同源克隆加 3'RACE 方法首次分别从生长快、耐盐性弱的尼罗罗非鱼新吉富品系,生长慢、耐盐性强的萨罗罗非鱼,以及它们的杂交后代的鳃中分离得到了 IGF- I b 基因完整的开放阅读框(ORF)和 3'UTR,与其他脊椎动物 IGF- I b 基因核苷酸的相似性 60%~99%,由 ORF 推导的 3 种试验罗非鱼 IGF- I b 氨基酸序列一级结构与黑棘鲷、龙胆石斑鱼、黄金鲈、褐牙鲷及欧洲鲈 IGF- I b 高度一致,仅有 7~8 个氨基酸残基的差异;同源比对结果表明,IGF- I b 基因成熟肽与人、兔、鼠、鸡、牙鲷、鲈等在 B、A 区高度保守,但在 C 区和 D 区分别只有 40% 和 37.5% 的相似(表 2,图 4),3 种罗非鱼 IGF- I b 在 C 区缺失 2aa,导致成熟肽全长只有 68aa,不同于哺乳类动物及鸟类的 70aa,C 区联系着 B 区和 A 区,因此 C 区的任何插入或缺失都可能影响 B 区和 A 区半胱氨酸之间二硫键的形成,从而影响 IGF- I s 前体成熟过程中的正确折叠。通过与其它物种 IGF- I s 氨基酸序列比对(图 6),发现不仅仅是本实验的 3 种基因型罗非鱼,鲈形目其他种类、鲹形目、鲷形目、银汉鱼目及鲑形目鱼类 IGF- I s 都在 C 区缺失 2aa,这些鱼类大多数是海水鱼类[半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)],或广盐性鱼[鲈(*Lates calcarifer*)],或次级淡水鱼类(尼罗罗非鱼)。罗

非鱼的远祖生活于咸水环境,在长期的演变过程中,它们的后代逐渐适应了淡水环境并在其中定居,但是通过驯化也能在一定盐度的水体中生存,其中的一些种类如萨罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼还是著名的耐盐性强的鱼类;鲈形目中有些种类如大口黑鲈、河鲈、黄金鲈等虽然人们习惯上将它们划入淡水鱼类,但 3 种鱼 IGF- I s 基因 C 区与其他鲈形目鱼类一致,可能是由于 IGF- I s 在物种的进化过程中非常保守的缘故;而淡水鱼类中鲤形目鱼类、两栖类中的爪蟾及其他陆生脊椎动物 C 区同源位点没有发生缺失现象;采用同源建模的计算方法预测萨罗、尼罗、杂交鱼、鲈、斑马鱼、爪蟾和人 IGF- I 蛋白质三级结构,萨罗、尼罗、杂交鱼、鲈 IGF- I s 由于在 C 区缺失 2aa,导致 IGF- I s 蛋白质结构独特(图 7-1,2,3 红色区域所示),从而能够适应在溯河或降海过程中水体渗透压的变化。

IGF- I s 基因信号肽和 E 肽随着 IGF- I 蛋白质前体成熟被蛋白酶水解,但是 E 区由于选择性剪接会产生不同长度的转录产物。如虹鳟<sup>[26]</sup> IGF- I 基因产生 Ea-1、Ea-2、Ea-3 和 Ea-4 等 4 种类型,E 肽长度分别为 35aa、47aa、62aa 和 74aa;Kuo 等<sup>[27]</sup>证明来自虹鳟 IGF- I Ea-4 的 E 肽与人 IGF- I Eb 的 C 肽在调节细胞生长和分化过程中具有非常类似的功能。鱼类 IGF- I s 前体的转录产物的多样性或许将影响 E 肽的生物学活性。IGF- I a 和 IGF- I b 在 E 区相差 27aa,从而形成不同的转录产物,如在斑马鱼,就只检测到两种转录产物 Ea-1 和 Ea-2,Schmid 等<sup>[28]</sup>从罗非鱼的卵巢和肝脏中也检测到 4 种 IGF- I s 转录产物。正是这些转录产物的多样性,导致不同物种 IGF- I s 功能的差异,但是对于罗非鱼 4 种转录产物的剪接模式并不清楚。本实验结果表明新吉富尼罗、萨罗罗非鱼及其杂交后代与另外 3 种罗非鱼(莫桑比克、画眉罗非鱼、尼罗罗非鱼)非常一致地在 E 区 131 位后连续缺失了 3aa 及在 E 区 159 位后缺失了 1aa(图 5),那么 E 区氨基酸残基的缺失是否就是选择性剪接的结果?对罗非鱼类 IGF- I s 的生物学功能有何影响?这些猜想到目前还无法弄清楚,有待进一步研究。

有研究表明,萨罗致死盐度(123.7±3.5) g/L,而新吉富尼罗只有(46.3±3.4) g/L,两种罗



非鱼的耐盐能力迥然不同<sup>[29]</sup>;莫桑比克和画眉罗非鱼也是比较著名的耐盐罗非鱼品种,二者与萨罗罗非鱼在 E 区 133 位一致都为丙氨酸(Ala, A),而新吉富尼罗及杂交后代 IGF- I E133 位(Pro, P)与不耐盐的尼罗罗非鱼一致,似乎表明 E133Pro/Ala 的差异与几种罗非鱼生活习性的差异密切相关。杂交后代除部分地继承了母本生长快的优点之外,也部分地继承了父本耐盐性强的

优点,耐盐能力显著提高,100% 死亡盐度达到(112.8 ± 2.4) g/L,耐盐性能类似于父本萨罗,其中的原因到目前还不清楚,由于鱼类的耐盐机理相当复杂,而且 IGF- Is 活性除了与其自身的分子结构及 E 区选择性剪切方式有关之外,还受 GH 及其他内分泌激素的调节,另外,IGF- Is 结合蛋白(IGFBPs)的种类也是影响 IGF- Is 半衰期的关键。

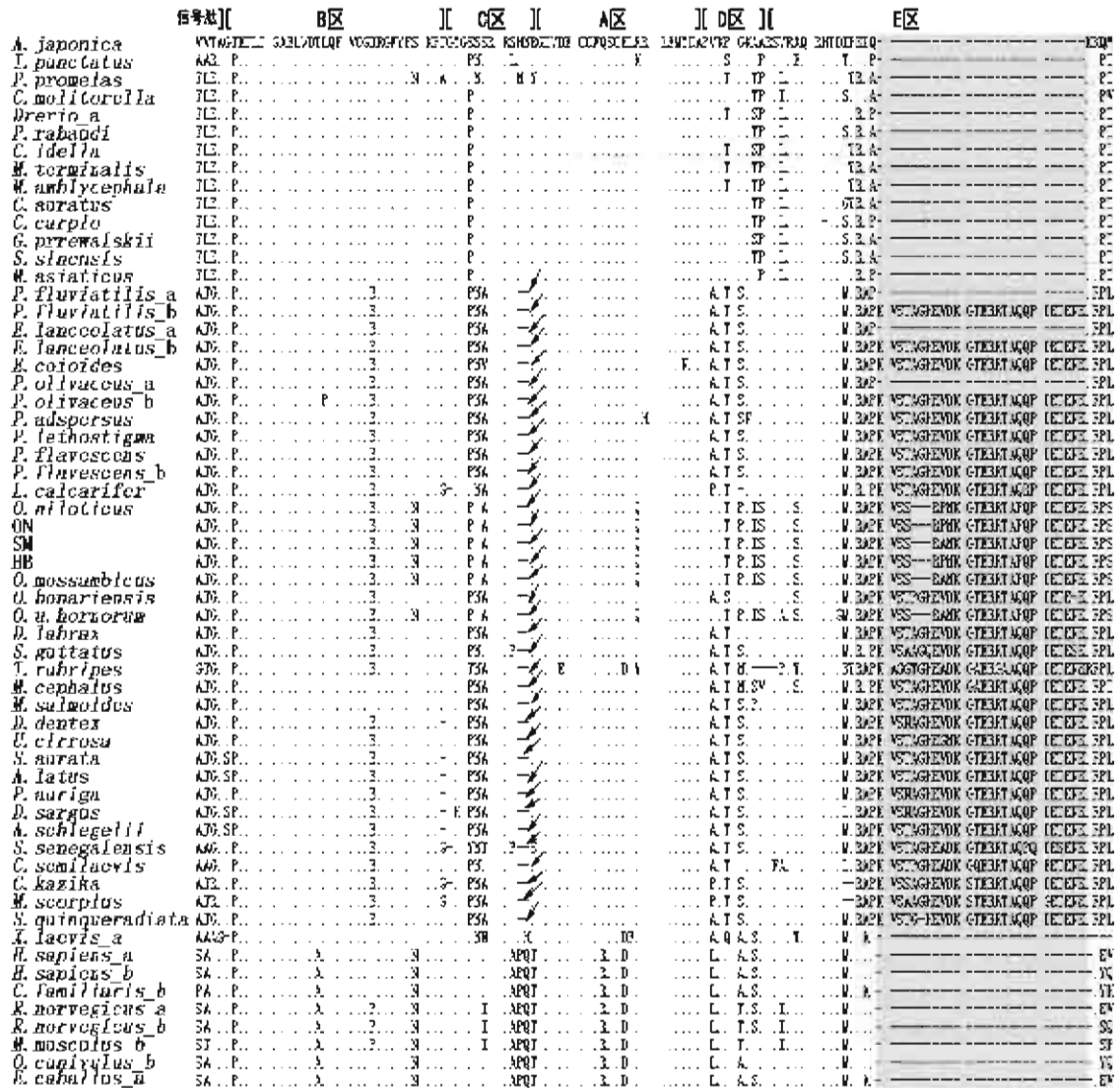


图 6 由尼罗、萨罗、杂交后代的 IGF- 1b cDNA 推导的氨基酸序列与其它同源序列多重比较结果  
箭头指示罗非鱼类等 C 区缺失 2aa,阴影区表示 IGF- 1a 和 IGF- 1b 的差异区。

Fig. 6 Comparison of amino acid sequence deduced from IGF- 1b cDNA of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid with other homolog species

The arrow indicates 2aa-deletion, the shadow indicates the differences of IGF- 1a and IGF- 1b.



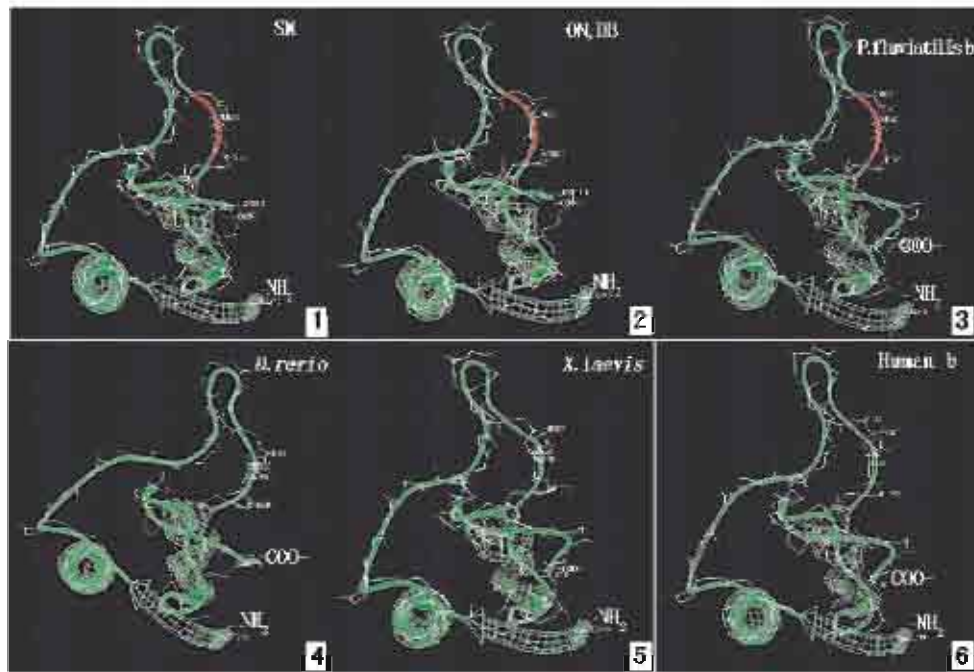


图 7 IGF- I 基因蛋白质三级结构预测结果

红色区域显示尼罗、萨罗、杂交鱼及鲈缺失 2 个氨基酸残基的结构。

Tab.7 The predicted tertiary structure of IGF- I by homology modeling method

The red bonds in picture 1,2,3 indicate the special segments missing 2 aa of ON,SM,HB and perca.

#### 参考文献:

- [1] Trewavas E. Tilapia and Sarotherodon[J]. Buntbarsche Bulletin, 1980, 81(1): 1-6.
- [2] Jennings D P, Williams J D. Factors influencing the distribution of blackchin tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Osteichthyes: Cichlidae) in the Indian River system, Florida[J]. Northeast Gulf Science, 1992, 12(2): 111-117.
- [3] 李思发,颜标,蔡完其. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交鱼自繁后代  $F_2$  耐盐性、生长性能及亲本对杂种优势贡献力的评估[J]. 水产学报, 2008, 32(3): 335-340.
- [4] 李思发,颜标,蔡完其. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反杂交后代耐盐性能的杂种优势及其与遗传的相关性的 SSR 分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 189-198.
- [5] Hwang P P, Wu S M. Salinity effects on cytometrical parameters of the kidney in the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*[J]. Fish Biol, 1988, 33(1): 89-95.
- [6] Cataldi E, Crosetti D, Conte G. Morphological changes in the oesophageal epithelium during adaptation to salinities in *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* and their hybrid[J]. Fish Biol, 1988, 32(2): 191-196.
- [7] 姜明,汝少国,刘晓云. 不同盐度下蓝非鲫泌氯细胞的结构变化[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(4): 603-608.
- [8] Watanabe W O. Production of Florida red tilapia in flowthrough seawater pools at three stocking densities[M]//Pullin R S V, Lazard J, Legendre M, et al. The third international symposium on tilapia in aquaculture. Manila: ICLARM Conference Proceedings 41, 1993: 40-51.
- [9] Jurs K. Biochemical investigations into the influence of environmental salinity on starvation of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. Aquaculture, 1984, 40(2): 171-182.
- [10] Peterson B C, Waldbieser G C. Effects of fasting on IGF- I, IGF- II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Domest Anim Endocrinol, 2009, 37(2): 74-83.
- [11] Jones J I, Clemmons D R. Insulin-like growth factors

- and their binding proteins: biological actions [J]. *Endocr Rev*, 1995, 16(1): 3-34.
- [12] Gelsleichter J, Musick J A. Effects of insulin-like growth factor- I , corticosterone, and 3, 3', 5-tri-iodo-L-thyronine on glycosaminoglycan synthesis in vertebral cartilage of the clearnose skate, *Raja eglanteria*[J]. *J Exp Zool*, 1999, 284(5): 549-556.
- [13] Negatu Z, Meier A H. *In vitro* incorporation of [<sup>14</sup>C] glycine into muscle protein of gulf killifish (*Fundulus grandis*) in response to insulin-like growth factor- I [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, 98(2): 193-201.
- [14] Berishvili G, d' Cotta H, Baroiller J F, *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* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 146(3): 204-210.
- [15] McCormick S D, Sakamoto T, Hasegawa S, *et al.* Osmoregulatory actions of insulin-like growth factor- I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Endocrinol*, 1991, 130(1): 87-92.
- [16] Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, *et al.* Possible interactions between gonadotrophs and somatotrophs in the pituitary of tilapia: Apparent roles for insulin-like growth factor- I and estradiol [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(3): 1183-1191.
- [17] Shambloft M J, Chen T T. Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(19): 8913-8917.
- [18] Moriyama S, Yamaguchi K, Takasawa T, *et al.* Insulin-like growth factor- I of Japanese eel, *Anguilla japonica*: cDNA cloning, tissue distribution, and expression after treatment with growth hormone and seawater acclimation[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2006, 32(3): 189-201.
- [19] Hashimoto H, Mikawa S, Takayama E, *et al.* Molecular cloning and growth hormone-regulated gene expression of carp insulin-like growth factor- I [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1997, 41(5): 877-886.
- [20] Stahlbom A K, Sara V R, Hoeben P. Insulin-like growth factor mRNA in barramundi (*Lates calcarifer*): Alternative splicing and nonresponsiveness to growth hormone [J]. *Biochemical Genetics*, 1999, 37(3-4): 69-93.
- [21] Deane B E, Kelly S P, Luk J C, *et al.* Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor- I expression in black sea bream [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2002, 4(2): 193-205.
- [22] Madsen S S, Bern H A. *In vitro* effects of insulin-like growth factor- I on gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. *J Endocrinol*, 1993, 138(1): 23-30.
- [23] Sakamoto T, Hirano T, Madsen S S, *et al.* Insulin-like growth factor I gene expression during parr-smolt transformation in cohosalmon [J]. *Zool Sci*, 1995, 12(2): 249-252.
- [24] Chen M H, Lin G, Gong H, *et al.* The characterization of prepro-insulin-like growth factor- I Ea-2 expression and insulin-like growth factor- I genes ( devoid 81 bp) in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Gene*, 2001, 268(1-2): 67-75.
- [25] Jentoft S, Aastveit A H, Andersen O. Molecular cloning and expression of insulin-like growth factor- I (IGF- I) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): lack of responsiveness to growth hormone treatment [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2004, 30(1): 67-76.
- [26] Shambloft M J, Chen T T. Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1993, 2(6): 351-361.
- [27] Kuo Y H, Chen T T. Novel activities of pro-IGF- I E peptides: regulation of morphological differentiation and anchorage-independent growth in human neuroblastoma cells [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 280(1): 75-89.
- [28] Schmid A C, Naf E, Kloas W, *et al.* 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 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 156(1-2): 141-149.
- [29] Lemarié G, Baroiller J F, Clota F, *et al.* A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron* [J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1-4): 575-587.

## Cloning and sequencing of IGF- I b 3'cDNA in *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid

FAN Wu-jiang, LI Si-fa\*, WANG Bing, MENG Qing-hui

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of  
Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Aiming at exploring the sequence differences of IGF- I gene of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* NewGifts, ON), black-chin tilapia (*Sarotherodon melanotheron*, SM) and their First Generation of Hybrid (HB), investigating the relationships between the great differences of salt-resistant property among the three genotypes, we cloned partial cDNA fragments of insulin-like growth factor I (IGF- I) from gill extracts through rapid amplification of 3' cDNA ends(3'RACE) methods. The results demonstrated to be the IGF- I b gene cDNAs with length of 1 076 bp, 1 075 bp and 1 079 bp respectively and comprising of a stop codon, a 546 bp open reading frame (ORF) encoding a 182 amino acid peptides(aa), and 3'-untranslated regions (3'-UTR). The deduced amino acid sequence of IGF- I b precursor is composed of signal peptide, mature peptide (including conserved B, C, A and D domains consisting of 29-aa, 10-aa, 21-aa and 8-aa respectively) and E domain of 70aa. Results of the predicted secondary structures were typed as "mixed patterns". The results of multiple alignments showed highly homologous with 75.8% to 100% amino acid identity. The B and A domains are highly conserved in all of the allied species. There are 2aa-deletion between No. 82 and 83 sites in C domain, 3aa and 1aa-deletion next to NO. 131 and No. 159 site, respectively. Ala / Pro substitution occurred at No. 133 of E domain of black-chin tilapia compared with ON and HB, which is identical to *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis urolepis hornorum*. We presumed that the differences of salt-resistant property of ON, SM and HB may be due to the alternative splicing of the IGF- I E domain.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; *Sarotherodon melanotheron*; hybrid; insulin-like growth factor I b; cDNA; clone

**Corresponding author:** LI Si-fa. E-mail: sfli@shou.edu.cn