

牙鲆胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 cDNA 全长的克隆及表达分析

翟万营¹, 张俊玲¹, 施志仪^{1*}, 李巍²

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 全国水产技术推广总站, 北京 100026)

摘要: 利用 RACE-PCR 技术, 从牙鲆肝脏组织总 RNA 中克隆得到胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (insulin-like growth factor binding protein 1, *IGFBP-1*) 基因的全长 cDNA 序列, 该 cDNA 全长为 1 070 bp, 开放阅读框为 729 bp, 编码 242 个氨基酸。通过系统进化树分析, 牙鲆 *IGFBP-1* 与鱼类 *IGFBP-1* 基因紧密聚为一支; 通过同源性比对, 牙鲆 *IGFBP-1* 基因的核苷酸序列与大菱鲆同源性最高, 为 95%, 而其推导的氨基酸序列与其它鱼类如大菱鲆、五条鲈、黄金鲈、红点鲑、鲤和斑马鱼的同源性分别为 89%、89%、84%、79%、67% 和 67%。半定量 RT-PCR 显示, 牙鲆 *IGFBP-1* mRNA 在未受精卵、受精卵、胚胎、仔鱼发育各阶段及成体各组织均被检测。荧光定量 RT-PCR 结果表明, 牙鲆 *IGFBP-1* 基因在成鱼肝脏中表达量最高, 且在胚胎和仔鱼发育期间具有明显的时期特异性。

关键词: 牙鲆; 胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (*IGFBP-1*); cDNA 全长; 基因; 表达

中图分类号: Q 786; S 917

文献标志码: A

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 信号系统主要由配体 IGF-1、IGF-2 及其受体和 1~6 个 IGF 结合蛋白 (IGF-binding proteins, IGFBPs) 组成, *IGFBP-1* 是 IGFs 信号通路中的重要成员, 它是一个多功能蛋白, 参与脊椎动物的生长、发育、生殖及血糖调节等生理过程^[1]。*IGFBP-1* 是重要的内分泌激素之一, 主要由肝脏、肾脏等组织器官分泌, 对分泌细胞本身、邻近组织细胞或通过血循环对远处靶器官产生作用^[2], 其主要生物学意义是运输和调节 IGF-1 与受体结合, 延长 IGF-1 的半衰期, 并进行组织和细胞识别定位, 对 IGFs 通路的生物学功能起重要的调节作用。其次, *IGFBP-1* 自身还有独立于 IGF-1 之外的生物学作用^[3]。另外, 在低氧胁迫下 *IGFBP-1* 蛋白可通过降低胚胎和成体生长, 而使机体细胞适应低氧环境^[4]。迄今为止, 对鱼类 *IGFBP-1* 基因序列和功能研究较少, 国内外仅在

斑马鱼 (*Danio rerio*)^[5]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、五条鲈 (*Seriola quinqueradiata*)^[7]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[8]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[9] 等鱼类中分离出 *IGFBP-1* 基因的全长 cDNA, 但对其生物学功能研究却鲜有报道。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是一种重要的海水增殖养殖鱼类, 也是鲽形目鱼类中有关变态研究相对比较多的种类。在仔鱼向稚鱼的变态阶段, 发生眼睛移位, 体色及生活方式等一系列变化^[10-12]。本课题组已构建了 IGF-1 及其受体在牙鲆发育变态中的表达谱, 分析了 IGFs 系统在牙鲆变态中的潜在作用^[11-12]。但 *IGFBP-1* 作为鱼类生长和发育的重要调控因子, 其在牙鲆生长发育中的作用至今未见报道。因此, 本研究克隆了牙鲆 *IGFBP-1* 基因的 cDNA 全长, 进行序列分析比较, 并用半定量 PCR 和定量 PCR 方法检测了 *IGFBP-1* 基因在牙鲆早期发育阶段和成体组织中

收稿日期: 2011-07-16 修回日期: 2011-11-07

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31172392); 上海市重点学科水生生物学建设项目 (S30701)

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

的表达,期望能为进一步阐明胰岛素样生长因子系统在牙鲆生长发育中的作用积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼 实验用牙鲆胚胎和仔鱼采集于中国水产科学研究院北戴河中心实验站,养殖水温控制在 $(16 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$;实验用牙鲆成鱼购自上海市铜川路水产品市场。

试剂 总 RNA 提取试剂(Trizol Reagent)购自 Invitrogen 公司;IQTM SYBR Green Supermix 购自 BIO-RAD 公司;M-MLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、DNase I(RNase free)、dNTP、pMD19-T 载体、3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司;DNA Marker、琼脂糖、普通 DNA 纯化回收试剂盒购于天根生化科技有限公司;大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;DNA 测序在上海生工生物工程有限公司进行。

1.2 方法

总 RNA 的提取与鉴定 根据刘海金等^[13]对牙鲆胚胎发育和 Miwa 等^[14]对牙鲆变态时期的划分,对牙鲆胚胎和仔鱼进行取样,分别采集未受精卵(0 h)、受精卵(0.5 h)、囊胚期(9 h)、原肠胚期(26 h)、神经胚期(42.5 h)、胚孔封闭期(48 h)、心跳期(71 h)、出膜前(75 h)及刚出膜(78.5 h)、孵化后 3、7、10、14、17、20、23、29、36 和 41 d(DPH)仔鱼,各期样品平行取样 3 组,每组 15~30 个体,仔鱼变态始于 20 DPH,在 41 DPH 结束;同时解剖成鱼(3 尾),取其脑、鳃、肌肉、心脏、肝脏、脾、胃、肾、肠、性腺组织。各样品立即进行总 RNA 的提取,然后置于 $-80 ^\circ\text{C}$ 保存备用。

检测所提总 RNA 的质量,分别测定所提取的 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度,并计算其纯度(P 值)与浓度(C 值),P 值均在 1.8~2.0,总 RNA 经过 2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后条带清晰,28S 条带的亮度约是 18S 条带亮度的两倍,说明 RNA 的质量较好,能够满足后续实验的要求。

cDNA 链的合成及牙鲆 IGFBP-1 全长 cDNA 的克隆 反转录采用 Prime Script 1st strand cDNA synthesis kit(TaKaRa)试剂盒完成,具体方案如下:在无 RNase 的离心管中加入 2 μg 总 RNA,1 μL Oligo dT Primer(50 $\mu\text{mol/L}$),1 μL dNTP Mixture(10 mmol/L each),补充 RNase free dH₂O 至 10 μL ;然后在 PCR 仪上进行变性、退火反应,条件为 $65 ^\circ\text{C}$ 5 min,冰上急冷;加入以下试剂:5 \times PrimeScript Buffer 4 μL , RNase Inhibitor(40 U/ μL) 0.5 μL , PrimeScript RTase(200 U/ μL) 1 μL ,补充 RNase free dH₂O 至 20 μL ;然后在 PCR 仪上进行反转录,反应条件为 $42 ^\circ\text{C}$ 60 min, $70 ^\circ\text{C}$ 15 min,然后冰上放置 2 min, $-20 ^\circ\text{C}$ 保存。

根据已知物种同源基因,设计 IGFBP-1-F 和 IGFBP-1-R 引物(表 1),取牙鲆肝脏组织 cDNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为 $94 ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $57 ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 12 s,35 个循环; $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用天根胶回收试剂盒纯化回收,并将其连接到 pMD19-T 载体上, $16 ^\circ\text{C}$ 连接过夜后,转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中,经蓝白斑筛选,挑选白色单菌落,培养后做菌落 PCR 鉴定,挑选正确的阳性克隆抽提质粒后送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 PCR 使用的引物

Tab. 1 Primer sequences for PCR in the present study

引物 primer	引物序列(5'→3') primer sequence	片段长度/bp fragment length
IGFBP-1-F	AACAGGGACCCTGTCATG	202
IGFBP-1-R	ATCTTCTCCAGTCCAGG	
3'-IGFBP-1-F	ACCACCTTCTACCTCCCCAACT	438
3'-IGFBP-1-nest-F	GCCAAGCAGTGCGATTGTCT	
5'-IGFBP-1-R	GCGAGCAGGAGGTCCAACCAGAG	675
5'-IGFBP-1-nest-R	CAGTTGGGGAGGTAGAAGGTGGTGAA	
qIGFBP-1-F	GGGACCCTGTCATGTTGAACTCC	145
qIGFBP-1-R	CAGAGACGAATCGCACTGCTTGG	
β -actin-F	GGAAATCGTGCGTGACATTAAG	155
β -actin-R	CCTCTGGACAACGGAACTCT	

根据所得牙鲈 *IGFBP-1* 片段,设计 3'-RACE 引物(3'-*IGFBP-1-F*)和 3'-RACE 巢式引物(3'-*IGFBP-1-nest-F*)(表 1),进行 3'-RACE PCR 扩增,PCR 反应条件均为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。同样根据所得牙鲈 *IGFBP-1* 序列设计 5'-RACE 引物(5'-*IGFBP-1-R*)和 5'-RACE 巢式引物(5'-*IGFBP-1-nest-R*)(表 1),首先依照 5'-Full RACE Kit(TaKaRa)进行反转录合成 5'-RACE cDNA 链,然后进行 5'-RACE PCR 扩增,PCR 反应条件均为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 65 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。3'-RACE 和 5'-RACE PCR 产物经分别经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,割胶回收纯化目的片段,进行连接、转化、克隆和测序。

序列分析 用 BioEdit 软件^[15]将测序所得的 5'-RACE 和 3'-RACE 序列的中间重叠部分去掉,并且去掉试剂盒提供的两端添加的引物部分,拼接得到全长 cDNA 序列,然后应用 PROSITE 软件(<http://prosite.expasy.org/>)、PFAM 软件(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)和 RasMol 软件预测其氨基酸合成蛋白质的二级结构和三级结构并进行进一步生物信息学分析。

用 MEGA4.0^[16]软件的 NJ(Neighbor-Joining)法进行序列比对并构建系统进化树,分析结果用 MEGA4.0 软件的 tree view 表示。其他脊椎动物的 *IGFBP-1* 氨基酸序列均从 NCBI 中 GenBank 下载,登录号如下:大菱鲂(*Scophthalmus maximus*, turbot) AEB96249.1;五条鲈(*Seriola quinqueradiata*, yellowtail) ACD10797.1;黄金鲈(*Perca flavescens*, golden perch) ACO82021.1;大西洋鲑(*Salmo salar*, Atlantic salmon) ABO36530.1;大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*, chinook salmon) AAV83995.1;虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, rainbow trout) ABA55020.1;斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*, channel catfish) ACN41861.1;鲤(*Cyprinus carpio*, common carp) ACV72066.1;斑马鱼(*Danio rerio*, zebrafish) CAC44453.1;牛(*Bos taurus*, cattle) DAA30471.1;羊(*Ovis aries*, sheep) ACM17465.1;松鼠(*Spermophilus tridecemlineatus*, thirteen-lined ground squirrel) AAS67029.1;小鼠(*Mus musculus*, house mouse) AAH13345.1;大鼠(*Rattus norvegicus*, rats) AAA82581.1;人(*Homo*

sapiens, human) AAH57806.1。

半定量 RT-PCR 采用 Primer 5.0 设计,同时应用 Oligo6 软件分析,选择扩增特异性强、效率高的引物应用于半定量和定量 PCR,引物分别为 q*IGFBP-1-F* 和 q*IGFBP-1-R*(表 1),内参基因为 β -*actin*,引物分别为 β -*actin-F* 和 β -*actin-R*(表 1)。

用 DNase I (RNase free)除去各组织总 RNA 中的基因组 DNA 污染,然后合成 cDNA 的第一条链。通过循环次数递增的方法确定牙鲈 *IGFBP-1* 和 β -*actin* 扩增的最适扩增循环数,然后进行 PCR 扩增,PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,分析 *IGFBP-1* 基因在牙鲈胚胎、仔鱼发育各时期及成鱼各组织中的相对表达。

荧光定量 qRT-PCR 所用引物与上述半定量 PCR 的相同。首先制作目的基因和内参基因标准曲线,real-time PCR 在 iCycler PCR 仪(BIO-RAD)上进行。PCR 反应体系 25 μ L,包括 10 倍梯度稀释的仔鱼 cDNA,400 nmol/L 基因特异性的正反向引物(表 1),12.5 μ L IQTM SYBR Green Supermix。反应条件为 95 °C,1 min;95 °C,10 s;60 °C,30 s,并随之采集荧光,40 个循环;随后进行融解曲线的扩增。结果显示内参基因和目的基因的相应的扩增效率(*E*)均为 95%~100%,*R* 值均大于 0.99,且目的基因和内参基因的 *M* 值相差小于 0.1。随后进行所有样品的定量检测,PCR 反应体系和条件同上,实验设 3 次重复。

统计分析 牙鲈胚胎和仔鱼不同时期以未受精卵中的相对 mRNA 量为对照,成鱼不同组织以肌肉中的相对 mRNA 量为对照。*IGFBP-1* 的相对 mRNA 水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。其数值用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示,*n* = 3。统计分析采用 SPSS 11.5 软件中的单因素方差分析(One-Way ANOVA),使用 Dunnett's T3 multiple comparisons 进行比较,当 *P* < 0.05 时接受差异显著。

2 结果

2.1 牙鲈 *IGFBP-1* 全长 cDNA 的克隆及结构分析

以牙鲈肝脏总 RNA 为模板,首先进行 *IGFBP-1* 中间部分 cDNA 片段的 PCR 扩增,得到一段 202 bp 序列;然后通过 3'-RACE 和 5'-RACE PCR 分别获得一条 438 和 675 bp 序列(图 1)。经 BioEdit 软件拼接,得到牙鲈 *IGFBP-1* 基因的 cDNA 全长序列(图 2),该 cDNA 全长为 1 070 bp,包括一段编

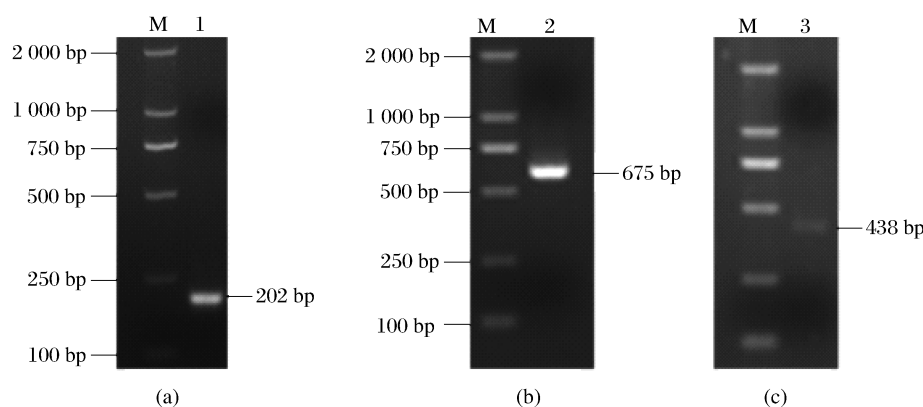


图1 RACE 法克隆牙鲈 *IGFBP-1* 基因全长 cDNA

M:Marker; (a) 部分 cDNA 片段; (b) 5'-RACE 结果; (c) 3'-RACE 结果。

Fig. 1 The full-length cDNA cloning of *P. olivaceus IGFBP-1* gene by the technology of RACE

M:Marker; (a) part cDNA fragment; (b) the result of 5'-RACE; (c) the result of 3'-RACE.

```

-69 GAAAAGAAGGAAAACACTACAGTCACACAGAGCAGCTGAGAAGAAAAGAAGATAGTAATCCTG
TGACCAAAG
1 ATGCCTGGATTATATGAGAAGCTGACGTTTGTGTCAGGAGTGTCCCTGGTGGTCTTGGCC
1 M P G L Y E K L T F V A G V S L V V L A
61 GTGGCAAGGTCTTCCCCATTAGTGGTCCAGGAGCCAATCCGCTGTGCCCCCTGCACCCAG
21 V A R S S P L V V Q E P I R C A P C T Q
121 GAGAGTTGAACAGCTGTCCCGCCATCCCGCAGGCTGCAGGCAGGTGCTGAGGGAGCCT
41 E R L N S C P A I P A G C R Q V L R E P
181 GGCTGTGGCTGCTGCATGGCCTGCGCTCTGGAGAAAGGGGCGTCTGTGGGGTTCACACG
61 G C G C C M A C A L E K G A S C G V H T
241 GCCCACTGTGGCGAGGGCCTGCGCTGCACTCCAGGCCTGGTGAGGCCAGACCCCTCCAC
81 A H C G E G L R C T P R P G E A R P L H
301 GCTCTGACCAGGGGACATGGAGTCTGCACTGAGGACGTGGCCAAGAGGACACTGAAGGT
101 A L T R G H G V C T E D V G Q E D T E G
361 GACCATGACTCCCTGCACTACATGTTGGGTCTCAACCTCCCTTCGACCAGCAAGACCTT
121 D H D S L H Y M L G L N L P F D Q Q D L
421 GCTGAGGGCCACGAGAGCATCAAGGCCAAGGTCAGACTGATGCAACAGCAACAGGGACCC
141 A E G H E S I K A K V R L M Q Q Q Q G P
481 TGTCATGTTGAACTCCACACAGCGCTGGACACAATCAACAGCTCTCAGCAGAAACTGGGA
161 C H V E L H T A L D T I N S S Q Q K L G
541 GAGAAGTTCACCACCTTCTACCTCCCCAACTGTAACAAGCGCGCTTCTACAAGGCCAAG
181 E K F T T F Y L P N C N K R G F Y K A K
601 CAGTGGGATTTCGTCTCTGGTTGGACCTCCTGCTCGCTGCTGGTGGCTCTCCCCCTGGACT
201 Q C D S S L V G P P A R C W C V S P W T
661 GGGAAGAAGATCCCAGGGTCGAGTGACCTGCTCGGTGACGCAGAGTGTTCATCAGGAAATC
221 G K K I P G S S D L L G D A E C H Q E I
721 A C A C T C T G A
241 T L *
730 AGGGATCAACGTCTCCACACGCACCCAGATGCATACAGATAGAAGTCATTTAATATCTGC
ATGCCTGGAGAAGTCACTTCACTTTTATTTACCAGATGCATCAAAAACCTTATTTATTC
ACTACTTGATATTTCTTTGTCGTAACATTTTTTTTTTAATATGTTTTCTTTTTTTTTT
CCACTTGTAATAAAGGCAACACTGTATACATTTGAGTTTCTGACTAAACAACCTCCATTGC
TCAAAACCCACAGGTCACAGCTAAAAAAAAA

```

图2 牙鲈 *IGFBP-1* 基因 cDNA 全长及其推导的氨基酸序列

* 表示终止密码子; ___表示 mRNA 快速降解信号;表示加尾信号; _____表示 HAS 序列。

Fig. 2 The full-length cDNA and deduced amino acid sequences of *Paralichthys olivaceus IGFBP-1* gene

* indicated stop codon; ___ indicated rapid degradation signal of mRNA; indicated the polyadenylation signal sequence; _____ indicated HAS sequence region.

码 242 个氨基酸残基的 729 bp 开放阅读框 (ORF), 一段 69 bp 的 5'非翻译区 (UTR) 和一段 272 bp 的 3'非翻译区。在其 3'-UTR 区域包含 3 个与 mRNA 瞬时表达有关的快速降解信号 ATTTA 和 1 个低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 辅助顺式元件 HAS (CAGGT)。此外, 其 N 端残基富含半胱氨酸 (Cys), 数目多达

12 个, 在 C 端残基中也有 6 个 Cys 存在 (图 3)。对其预测氨基酸合成蛋白质的二级结构和三级结构研究, 发现该蛋白包含两个结构域, 分别是胰岛素样生长因子结合蛋白 N 端结构域和甲状腺球蛋白-1 结构域, 并且显示该蛋白含有 48 个 H-键, 1 个 α -螺旋, 9 个 β -转角 (图 4)。

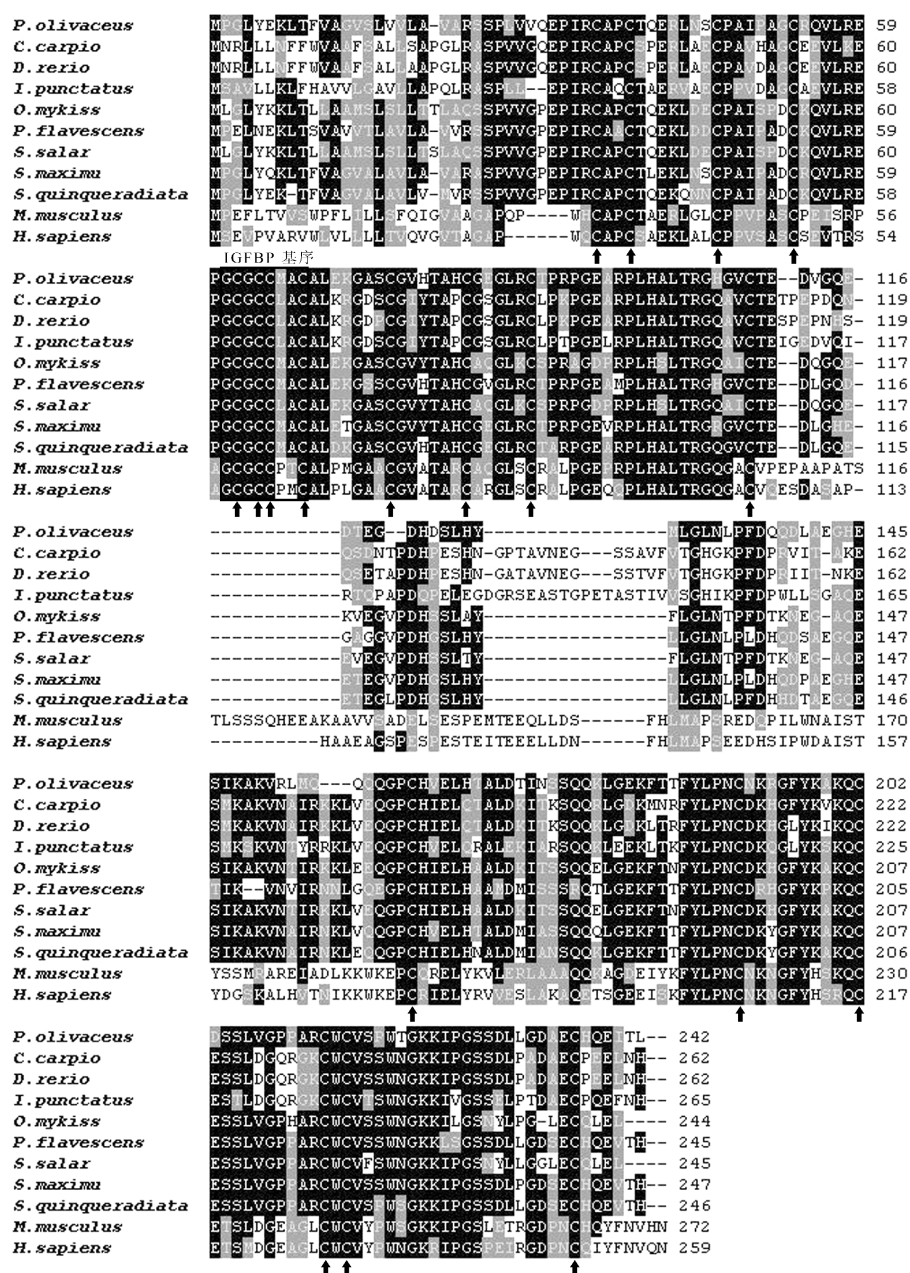


图 3 IGFBP-1 氨基酸序列比对分析

箭头所指氨基酸残基为保守的半胱氨酸; 黑框包含的氨基酸序列为 IGFBP 基序; 黑色区域代表氨基酸残基完全保守。

Fig. 3 Amino acid sequences alignment of IGFBP-1 between *Paralichthys olivaceus* and other species

The conserved cysteine residues are indicated by arrow; black box contains the IGFBP motif; black blocks represent identical amino acid residues.

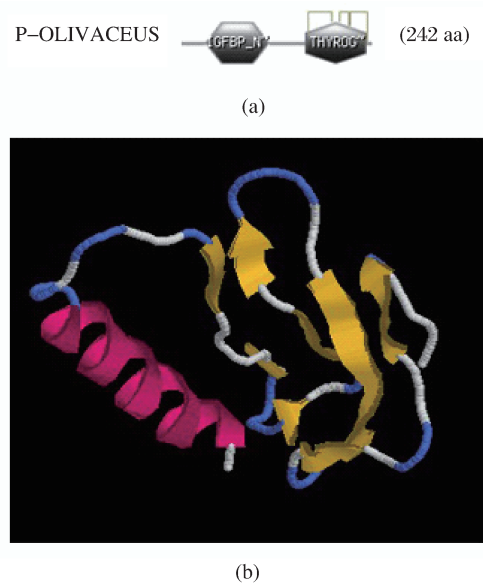


图4 牙鲈 IGFBP-1 预测蛋白质的二级、三级结构
Fig. 4 The deduced secondary structure and tertiary structure of *P. olivaceus* IGFBP-1

2.2 牙鲈 IGFBP-1 序列比对及进化树构建

经 NJ 系统进化树分析(图 5),牙鲈 IGFBP-1 与脊椎动物 IGFBP-1 聚为一支,而与鱼类 IGFBP-1 更为紧密地聚为一支。通过核苷酸序列比对发现,牙鲈 IGFBP-1 与大菱鲈、黄金鲈、大鳞大麻哈鱼、五条鲈的同源性分别为 95%、85%、73%、69%;同时将推导的牙鲈 IGFBP-1 氨基酸序

列与其它物种相应序列进行比较(图 3),发现其与大菱鲈、五条鲈的同源性都为 89%,与黄金鲈、红点鲈、鲤鱼、斑马鱼的同源性分别为 84%、79%、67%、67%,而与小鼠和人的同源性仅为 40% 和 38%。

2.3 牙鲈 IGFBP-1 基因在胚胎、仔鱼不同发育阶段及成体组织中的表达

半定量 RT-PCR 结果显示,牙鲈 IGFBP-1 mRNA 在未受精卵、受精卵、胚胎、仔鱼发育各阶段及成体各组织中均被检测到(图 6)。荧光定量结果(图 7)显示,除 IGFBP-1 在至原肠期(26 h)的早期阶段具有相对较高的 mRNA 水平外,牙鲈 IGFBP-1 基因在胚胎发育的各阶段仅有较低水平的表达,在出膜后第 3 天(3 DPH)达到一个高峰,接下来从第 7 天(7 DPH)一直到第 20 天(20 DPH),IGFBP-1 mRNA 都保持在一个较低的水平,从第 23 天(23 DPH)开始,IGFBP-1 基因的表达逐渐增多,到变态高峰期(29 DPH)达到最高峰,随后至变态结束(41 DPH)牙鲈 IGFBP-1 基因的表达又有所降低。

同时,在牙鲈各个组织中,荧光定量结果显示,IGFBP-1 基因在肝脏中表达量最高,是肌肉中的 468.7 倍($P < 0.05$);其次在胃、脾、肠、性腺、肾、鳃、脑、心脏和肌肉中也有不同程度的表达,彼此间无显著差异。

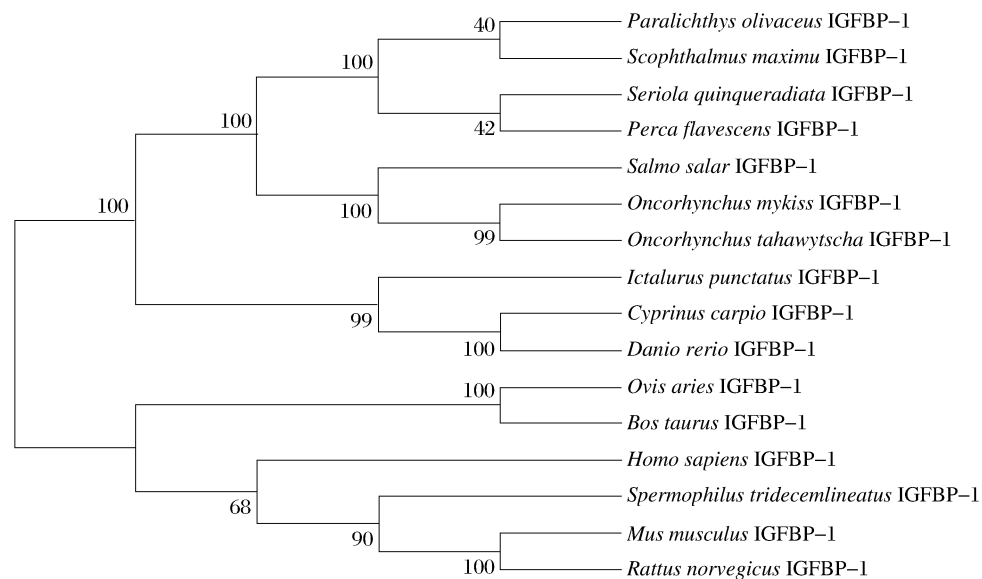


图5 IGFBP-1 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 5 A phylogenetic tree constructed by the Neighbour-Joining method for amino acid sequences of IGFBP-1. Bootstrap values are shown at the branch points.

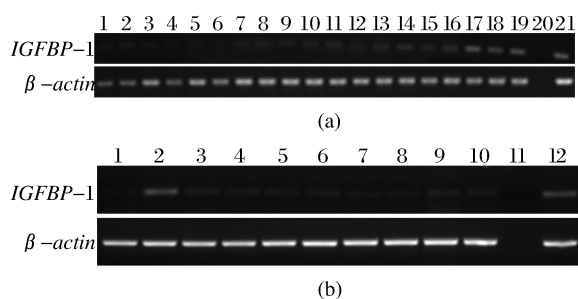


图6 牙鲈 *IGFBP-1* 基因在胚胎、仔鱼不同发育阶段 (a) 和成体组织 (b) 中的表达

(a) 1. 0 h, 2. 0.5 h, 3. 6 h, 4. 26 h, 5. 42.5 h, 6. 48 h, 7. 71 h, 8. 75 h, 9. 78.5 h, 10. 3 DPH, 11. 7 DPH, 12. 10 DPH, 13. 14 DPH, 14. 17 DPH, 15. 20 DPH, 16. 23 DPH, 17. 29 DPH, 18. 36 DPH, 19. 41 DPH, 20. 阴性, 21. 阳性。(b) 1. 心脏, 2. 肝脏, 3. 脾脏, 4. 胃, 5. 肾脏, 6. 大脑, 7. 鳃, 8. 肌肉, 9. 性腺, 10. 肠, 11. 阴性, 12. 阳性。

Fig. 6 Expression of *IGFBP-1* gene during embryonic and larval development and in adult tissues in *P. olivaceus*

(a) 1. 0 h, 2. 0.5 h, 3. 6 h, 4. 26 h, 5. 42.5 h, 6. 48 h, 7. 71 h, 8. 75 h, 9. 78.5 h, 10. 3 DPH, 11. 7 DPH, 12. 10 DPH, 13. 14 DPH, 14. 17 DPH, 15. 20 DPH, 16. 23 DPH, 17. 29 DPH, 18. 36 DPH, 19. 41 DPH, 20. 阴性, 21. 阳性。(b) 1. heart, 2. liver, 3. spleen, 4. stomach, 5. kidney, 6. brain, 7. gill, 8. muscle, 9. gonad, 10. intestine, 11. negative, 12. positive.

3 讨论

3.1 牙鲈 *IGFBP-1* 的同源性与氨基酸结构特征

本研究采用 RACE 法成功地克隆得到牙鲈 *IGFBP-1* 基因的全长 cDNA 序列, 该 cDNA 编码由 242 个氨基酸组成的 *IGFBP-1* 蛋白, 与同属鲈形目的鱼类具有高度的同源性, 如与大菱鲈的同源性为 95%; 其氨基酸序列与鲈形目的五条鲈、黄金鲈, 鲑形目的红点鲑也有很高的同源性, 分别为 89%、84% 和 79%; 而与亲缘关系较远的鲤形目鱼类如鲤和斑马鱼也都具有 67% 的同源性, 这些结果表明, 不同鱼类的 *IGFBP-1* 间具有较高的同源性。此外, 系统进化树分析也证实了这一点, 牙鲈与鱼类 *IGFBP-1* 基因紧密聚为一支。

在编码氨基酸序列结构上, 牙鲈 *IGFBP-1* 与其它脊椎动物 *IGFBP-1* 以及 *IGFBPs* 家族其它成员类似, 其 N 端和 C 端均富含半胱氨酸, 这些保守的半胱氨酸和它们空间位置在 *IGFBP-1* 中是恒定的。它们是 *IGFBP-1* 功能的基础, 18 个半胱氨酸形成 9 对链内二硫键, 这些二硫键的意义尚

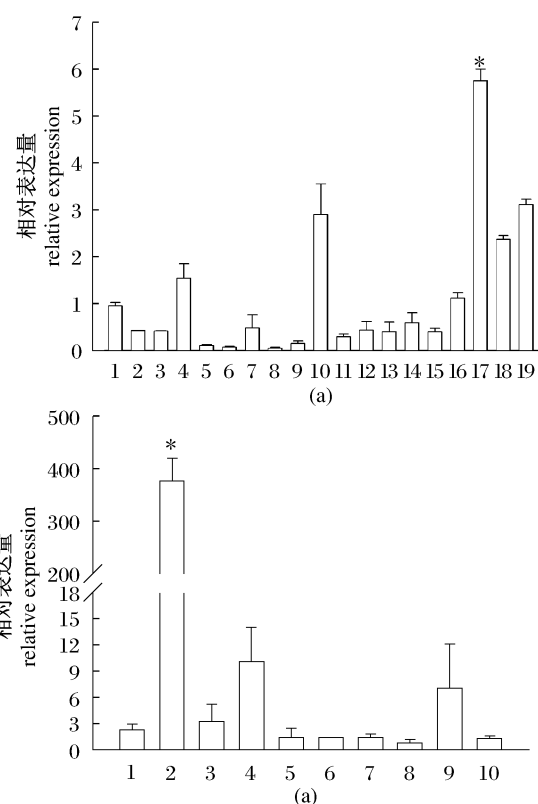


图7 牙鲈 *IGFBP-1* 基因在胚胎、仔鱼不同发育阶段 (a) 和成体组织 (b) 中的定量检测

(a) 1. 0 h, 2. 0.5 h, 3. 6 h, 4. 26 h, 5. 42.5 h, 6. 48 h, 7. 71 h, 8. 75 h, 9. 78.5 h, 10. 3 DPH, 11. 7 DPH, 12. 10 DPH, 13. 14 DPH, 14. 17 DPH, 15. 20 DPH, 16. 23 DPH, 17. 29 DPH, 18. 36 DPH, 19. 41 DPH。(b) 1. 心脏, 2. 肝脏, 3. 脾, 4. 胃, 5. 肾, 6. 大脑, 7. 鳃, 8. 肌肉, 9. 性腺, 10. 肠。

Fig. 7 Quantitative expression profile of *IGFBP-1* gene during embryonic and larval development and in adult tissues in *P. olivaceus*

(a) 1. 0 h, 2. 0.5 h, 3. 6 h, 4. 26 h, 5. 42.5 h, 6. 48 h, 7. 71 h, 8. 75 h, 9. 78.5 h, 10. 3 DPH, 11. 7 DPH, 12. 10 DPH, 13. 14 DPH, 14. 17 DPH, 15. 20 DPH, 16. 23 DPH, 17. 29 DPH, 18. 36 DPH, 19. 41 DPH。(b) 1. heart, 2. liver, 3. spleen, 4. stomach, 5. kidney, 6. brain, 7. gill, 8. muscle, 9. gonad, 10. intestine.

β -actin mRNA worked as an endogenous control. The asterisk represented the statistical significant differences at a significance level ($P < 0.05$). Error bars represented standard deviation of three independent biological replicates.

不明了, 可能与 *IGFBP-1* 空间结构形成有关^[2]。而且, *IGFBP-1* 与 IGF 特异性结合等功能也与蛋白表面的半胱氨酸有关, 它们起着识别和结合 IGFs 的作用^[2,17-18]。与其它脊椎动物一样, 在牙鲈 *IGFBP-1* 的 3'-UTR 区域中潜在 3 个与 mRNA 瞬时表达有关的快速降解信号和 1 个低氧诱导因

子辅助顺式元件 (HAS), 说明牙鲈 IGFBP-1 mRNA 易受低氧等因素的瞬时调控^[5]。

3.2 牙鲈 IGFBP-1 基因在不同发育阶段的表达

在鱼类中, 目前有关 IGFBP-1 在胚胎和仔鱼发育不同阶段的表达研究很少。在斑马鱼中发现, 有 IGFBP-1a 和 IGFBP-1b 两个同源基因^[5,19], 其中 IGFBP-1a 在整个胚胎阶段都有转录本存在, 而 IGFBP-1b 直到胚胎发育后期才开始转录^[5]; 如果同时敲除 IGFBP-1a 和-1b, 胚胎发育 30 h 就会死亡^[20]。研究表明, 虹鳟 IGFBP-1 基因在未受精卵中无母源 mRNA^[6], 草鱼 IGFBP-1 基因的转录本在受精后 4 和 8 h 也未被检测到^[9]; 然而, 本实验发现牙鲈 IGFBP-1 基因在未受精卵、受精后 0.5、9 和 26 h 时有相对较高水平的 mRNA, 可能是由于存在母源转录本的原因。本实验还发现, 牙鲈 IGFBP-1 基因在整个胚胎及仔鱼发育阶段均有不同程度的表达, 在第 3 天 (3 DPH) 达到一个高峰, 与实验室先前研究的 IGF-1R-2 基因在第 3 天 (3 DPH) 也有较高的转录^[12] 相似, 这暗示 IGF 系统可能参与了鱼类内源营养向外源营养方式的转变。在后期仔鱼中, IGFBP-1 基因的表达量相对较高, 尤其是在变态高峰期的 29 DPH, IGFBP-1 mRNA 达到最高值, 与其它时期相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。先前的研究表明, 牙鲈 IGF-1 mRNA 水平较变态前和变态起始阶段有所降低, 同时与早期仔鱼阶段相比, 变态期间及变态刚结束阶段仔鱼体长和体质量生长率也降低^[11]。鉴于 IGF 系统在鱼类生长、代谢和发育等过程中的重要作用^[21], 牙鲈 IGFBP-1 基因的表达变化可能与调节 IGF 信号在变态阶段的生物学作用发挥有关, 但这需要进一步的实验验证。总之, 牙鲈 IGFBP-1 基因在胚胎和仔鱼发育不同阶段的广泛表达, 说明 IGFBP-1 基因在鱼类发育和生长中具有重要的意义。

3.3 牙鲈 IGFBP-1 基因在不同组织的表达

对牙鲈 IGFBP-1 基因在成鱼各组织中的半定量及荧光定量分析发现, IGFBP-1 在牙鲈肝脏中表达量最高, 这与在哺乳动物和其它鱼类中相似^[22-23]。同时发现, 牙鲈 IGFBP-1 基因在胃、脾、肠、性腺、肾、鳃、脑、心脏和肌肉中也均有表达。但有研究表明, 在成体草鱼的脾、肌、眼、鳃、胰脏、肠、脑和性腺中均未检测到 IGFBP-1 mRNA 的表达^[9]。在五条鲈中, IGFBP-1 基因除在肝脏

中有较高的表达外, 在其它各组织中仅有很微弱的表达^[7]。在大鳞大麻哈鱼中, IGFBP-1 基因在肌肉中也有相对较高的表达^[24]。这些结果说明, 不同鱼类 IGFBP-1 的合成均以肝脏为主, 但在鱼类其它肝外组织中的表达分布差异较大, 导致 IGFBP-1 mRNA 组织分布上的差异原因目前还不清楚, 这可能与不同的物种或物种的生理状态有关, 或许生活环境和生活习性的改变也可能使得 IGFBP-1 基因表达发生差异。

综上所述, 牙鲈 IGFBP-1 是 IGF 系统中的重要成员, 其 cDNA 全长序列的克隆及表达分析对于进一步研究其在牙鲈生长、发育中的生理功能和理解 IGF 信号通路在牙鲈胚胎发育、仔鱼变态以及生长和繁殖过程中的作用机制, 都将具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] Katz L E, Diva D D, Zhao H, et al. Free and total insulin-like growth factor (IGF)-I levels decline during fasting: relationships with insulin and IGF-binding protein-1 [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002, 87 (6): 2978 - 2983.
- [2] 魏平, 王嘉玺. 胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (IGFBP-1) 研究进展 [J]. 国外医学 (分子生物学分册), 2002, 24(5): 269 - 272.
- [3] 李有朝, 来茂德. 胰岛素样生长因子结合蛋白的结构与功能研究概况 [J]. 国外医学 (分子生物学分册), 2010, 26(5): 347 - 357.
- [4] Mclellan K C, Hooper S B, Bocking A D, et al. Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-2 gene expression in the ovine fetus [J]. Endocrinology, 1992, 131(4): 1619 - 1628.
- [5] Kamei H, Lu L, Jiao S, et al. Duplication and diversification of the Hypoxia-Inducible IGFBP-1 gene in zebrafish [J]. Plos One, 2008, 3(8): 1 - 13.
- [6] Kamangar B B, Gabillard J C, Bobe J. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) - 1, - 2, - 3, - 4, - 5, and - 6 and IGFBP-related protein 1 during rainbow trout postvitellogenesis and oocyte maturation: molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation [J]. Endocrinology, 2006, 147(5): 2399 - 2410.
- [7] Pedrosa L F, Fukada H, Masumoto T. Molecular

- characterization, tissue distribution patterns and nutritional regulation of IGFBP-1, -2, -3 and -5 in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161 (3): 344-353.
- [8] 陈文波. 鲤鱼类胰岛素生长因子结合蛋白(IGFBP)-1、-2和-3基因的克隆及其表达调控机制研究[D]. 广州:中山大学,2009:17-27.
- [9] 陶洋,邹曙明. 草鱼胰岛素样生长因子结合蛋白IGFBP-1基因的全长cDNA克隆及表达[J]. *上海海洋大学学报*,2011,20(1):15-21.
- [10] 张俊玲,施志仪. 牙鲆早期阶段的变态发育及其机制[J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(4): 348-352.
- [11] 张俊玲,施志仪,付元帅,等. 牙鲆变态中IGF-I基因表达及甲状腺激素对其的调节作用[J]. *水生生物学报*,2011,35(2):355-359.
- [12] Zhang J L, Shi Z Y, Cheng Q, *et al.* Expression of insulin-like growth factor 1 receptors at mRNA and protein levels during metamorphosis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*,2011,173(1):78-85.
- [13] 刘海金,王常安,朱晓琛,等. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. *大连水产学院学报*,2008,23(3):161-167.
- [14] Miwa S, Yasuo L. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Cell and Tissue Research*,1987(249):117-123.
- [15] Hall A T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999(41):95-98.
- [16] Tamura K, Dudley J, Masatoshi N, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*,2007,24(8):1596-1599.
- [17] Rechler M M, Clemmons D R. Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1998, 9(5):176-183.
- [18] Kim H S, Nagalla S R, Oh Y, *et al.* Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (igfbps): characterization of connective tissue growth factor as a member of the igfbp superfamily [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,1997,94(24):11298-12981.
- [19] Maures T J, Duan C. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF-binding protein-1 [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(7):2722-2731.
- [20] 焦爽,卢玲,李筠,等. 斑马鱼类胰岛素生长因子信号途径及作用机制研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*,2009,29(3):235-239.
- [21] Reinecke M, Björnsson T B, Dickhoff W W, *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142 (1-2): 20-24.
- [22] Lee P D, Giudice L C, Conover C A. Insulin-like growth factor binding protein-1 recent findings and new directions [J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*,1997,216(3):319-357.
- [23] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. The insulin-like growth factor-binding protein (igfbp) superfamily [J]. *Endocrine Reviews*,1999,20(6):761-787.
- [24] Shimizu M, Dickey J T, Fukada H, *et al.* Salmon serum 22 KDA insulin-like growth factor-binding protein (igfbp) is IGFBP-1 [J]. *Journal of Endocrinology*,2005,184(2):267-276.

The full-length cDNA cloning and gene expression analysis of insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHAI Wan-ying¹, ZHANG Jun-ling¹, SHI Zhi-yi^{1*}, LI Wei²

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University,

Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China;

2. National Fisheries Technology Extension Station, Beijing 100026, China)

Abstract: The full-length cDNA of insulin-like growth factor binding protein 1 gene (IGFBP-1) was obtained from the liver of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using RACE method. The complete cDNA of *P. olivaceus* IGFBP-1 is 1 070 bp and its ORF includes 729 bp encoding 242 amino acid residues. The IGFBP-1 was highly homologous with IGFBP-1 gene in fish through phylogeny analysis. The nucleotide sequence of IGFBP-1 from *P. olivaceus* shared 95% homology with that of *Scophthalmus maximu*, and the deduced amino acid analysis showed that the sequence similarities between *P. olivaceus* and *S. maximu*, *Seriola quinqueradiata*, *Perca flavescens*, *Salvelinus alpines*, *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*, are 89%, 89%, 84%, 79%, 67% and 67%, respectively. Semi-quantitative RT-PCR results demonstrated that IGFBP-1 mRNA was detected in unfertilized egg, fertilized egg, embryonic and larval development, and various adult tissues. Moreover, real-time quantitative RT-PCR results showed that IGFBP-1 gene had the highest expression in adult liver and was expressed in a stage-specific manner during embryonic and larval development.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1); the full-length cDNA; gene; expression

Corresponding author: SHI Zhi-yi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn