

泥蚶胰岛素生长因子1受体基因的 cDNA全长克隆及表达分析

任付真^{1,2}, 姚韩韩¹, 钱雪骏², 林志华¹, 董迎辉^{1*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江宁波 315100;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了研究 *IGF1R* 基因在泥蚶生长、发育过程中的调控作用, 本研究基于泥蚶转录组文库的 EST, 利用 SMART RACE 技术首次克隆获得泥蚶 *IGF1R* 基因 (*Tg-IGF1R*) cDNA 全长序列, 该序列全长为 5793 bp, 开放阅读框为 4638 bp, 编码 1546 个氨基酸。经生物信息学分析发现, 该基因 5' 端非编码区为 810 bp, 3' 端非编码区为 345 bp, *Tg-IGF1R* 蛋白分子量为 176.01 ku, 等电点为 6.04, 包含 4 个 III 型纤粘连蛋白结构域, 1 个半胱氨酸富集区和 1 个酪氨酸激酶结构域, 属于亲水性跨膜蛋白质。氨基酸多重比对显示 *Tg-IGF1R* 蛋白序列与人、非洲爪蟾、斑马鱼的相似性分别为 45.2%、45.6% 和 45.4%。利用 qRT-PCR 技术检测了 *Tg-IGF1R* 基因在泥蚶成体不同组织及幼体不同发育时期的表达情况, 发现该基因具有广泛的组织表达性, 在所检测的 6 个组织(血液、闭壳肌、斧足、鳃、内脏团和外套膜)中均有不同程度的表达, 其中血液中的相对表达量最高, 并与其余 5 个组织间存在显著性差异, 推测 *Tg-IGF1R* 以信号分子的形式参与多种组织细胞的生命过程。*Tg-IGF1R* 基因在泥蚶个体发育过程中的 9 个时期均有表达, 且高表达主要集中在原肠胚期, 其次是担轮幼虫期和稚贝期, 说明 *Tg-IGF1R* 基因可能在早期发育阶段参与了某些器官的形成。

关键词: 泥蚶; *Tg-IGF1R* 基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)由 2 个生长因子(IGF-1、IGF-2)、2 个生长因子受体(IGF1R、IGF2R)和 6 种高亲和力结合蛋白(IGFBP1~IGFBP6)组成^[1], 各组分相互作用共同调节至关重要的生物学过程, 包括细胞生长、细胞增殖、细胞分化、抗细胞凋亡和细胞迁移^[2-5]。而在大多数细胞和组织中, IGFs 对生长的促进作用是通过 *IGF1R* 基因进行调控的^[6], 比如它可通过与 IGF-1 结合启动不同的信号通路, 也可与细胞周期中的多种生长因子协同对生长发育进行调控^[7]。对于 *IGF1R* 基因结构、功能以及在信号通路中作用的研究, 在人类医学方面已十分透

彻^[8-10]。在其他高等动物, 如绵羊(*Ovis aries*)^[11-12]、小鼠(*Mus musculus*)^[13-14]、鸡(*Gallus domestica*)^[15-16]等中也展开过许多研究, 而软体动物葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)中仅有该基因组的克隆分析^[17]。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国传统四大养殖贝类之一, 具有良好的养殖产业基础和前景。开展泥蚶生长调控机制的分子生物学研究, 对挖掘利用基因资源和分子标记辅助育种具有重要意义。近年来关于泥蚶分子遗传与功能基因方面的研究已取得重要进展: 免疫相关基因方面有小热休克蛋白基因^[18]、血红蛋白基因^[19]和基

收稿日期: 2015-12-13 修回日期: 2016-05-26

资助项目: 国家现代贝类产业技术体系专项(CARS-48); 国家水产种质资源平台项目(2015DKA30470); 浙江省自然科学基金重点项目(LZ12C19001); 浙江省重中之重学科自设课题(ZS2015012)

通信作者: 董迎辉, E-mail: dongyinghui118@126.com

质金属蛋白酶组织抑制因子3基因^[20]等; 生长、繁殖等经济性状相关基因有骨形态发生蛋白7基因^[21]、生长因子受体结合蛋白2基因^[21-22]、组蛋白去乙酰化酶1基因^[23]与*Smad1/5*基因^[24]等的报道; 但*IGF1R*基因却未见报道。本研究首次克隆获得泥蚶*Tg-IGF1R*基因的cDNA全长序列, 并结合实时荧光定量PCR (qRT-PCR)分析了该基因在成体不同组织表达及幼体不同发育时期表达特征, 以期研究该基因在贝类生长、发育过程中的调控作用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用泥蚶取自宁波鄞州丹艳水产养殖基地。通过诱导产卵、人工授精和早期培育技术获得4细胞胚胎期、囊胚期、原肠胚期、担轮幼虫期、D形幼虫期、壳顶幼虫期、眼点幼虫期和稚贝期样品。液氮速冻, -80 °C保存备用。取泥蚶成贝3颗, 活体解剖后迅速取血液、闭壳肌、斧足、鳃、内脏团和外套膜6个组织, 用液氮速冻于-80 °C冰箱, 用于RNA提取。

1.2 *Tg-IGF1R*基因的cDNA全长克隆

利用Trizol法提取泥蚶闭壳肌总RNA, Nanovue微量分光光度计检测浓度和OD₂₆₀/OD₂₈₀值, 同时用1%琼脂糖电泳检测其完整性。SMART™ RACE cDNA Amplification试剂盒(Clontech)反转录获得

cDNA, 作为3'和5'端序列快速扩增(RACE)模板。据454转录组文库注释信息, 拼接获得contig序列, 以此分别设计特异性引物IGF1R-F、IGF1R-R与RACE引物IGF1R-F1、IGF1R-R1和IGF1R-F2、IGF1R-R2(表1), 按Advantage 2 Ploymerase试剂盒(Clontech)说明书扩增获得*Tg-IGF1R*基因cDNA全长。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测并割胶纯化, 纯化产物连接到pEASY-T1(全式金)载体, 重组质粒转化到大肠杆菌DH5α(全式金)中进行克隆, 阳性克隆送往华大基因科技公司测序。

1.3 *Tg-IGF1R*基因序列生物信息学分析

将测得的序列对比拼接, 用NCBI的Blast工具验证*Tg-IGF1R*基因cDNA全长的正确性, 并进行同源搜索和功能域推导。ORF Finder程序搜索其开放阅读框; DNAMAN软件推测其编码的氨基酸序列和蛋白质的理化性质。用Expasy ProtScale在线工具对其编码的蛋白进行疏水性分析; 蛋白质跨膜区域用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)进行分析; 蛋白的信号肽用SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测; NetNGlyc 4.0 sever和NetOGlyc 1.0 server程序分析获得N-连接和O-连接的糖基化位点。NetPhos 2.0工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对其进行氨基酸磷酸化位点分析; SMART 4.0预测该蛋白的结构域; Phyre²(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)在线预测

表 1 实验用引物及序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers and their sequences used in the experiments

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence from 5' to 3'	引物应用 use of primer
IGF1R-F	AATGCCAACGACCCAGCCAACCT	IGF1R 片段扩增
IGF1R-R	TCTATGCTATCTGCTTCCTTCTTTGGC	IGF1R 片段扩增
IGF1R-R1	CATAACACAGATCCGATTTTCTCCAA	IGF1R 5' 内侧引物
IGF1R-R2	ACGATTCCTTTCTTTATCCAATTCATCC	IGF1R 5' 外侧引物
IGF1R-F1	ATCATGTGGTTCAGTTGTTAGGGGTTGT	IGF1R 3' 内侧引物
IGF1R-F2	TGGACACATACCTTTACACATGCGAATG	IGF1R 3' 外侧引物
Real-IGF1R-F	ACTCCTCATTGACCATGCGA	qRT-PCR 基因引物
Real-IGF1R-R	ATGACCACGGATAACAGCCAA	qRT-PCR 基因引物
18SrRNA-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	qRT-PCR 内参引物
18SrRNA-R	AGTGACGAAAAATAACAATACGGGA	qRT-PCR 内参引物

该蛋白质的高级结构。氨基酸多重序列对比用ClustalX和DNAMAN软件完成。用MEGA 6.0软件的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。

1.4 *Tg-IGF1R*基因的时空表达分析

利用Trizol法提取泥蚶9个发育阶段样品(成熟卵子、4细胞胚胎、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、D形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫及稚贝, $n>500$)和6个组织($n=3$)总RNA, 反转录获得cDNA。依据获得cDNA全长序列, 设计特异性引物Real-IGF1R-F和Real-IGF1R-R(表1), 以18S rRNA基因的表达量作为内参。用ABI 7500 FAST荧光定量PCR仪进行泥蚶*IGF1R*基因在幼体不同发育时期及成体不同组织中的定量表达分析, 每个样品设3个平行。其PCR反应体系: SYBRGREEN MIX (Biorad) 10 μ L, cDNA模板0.8 μ L, 上、下游特异性引物(10 mmol) 1 μ L, 用DEPC-H₂O补足至20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 20 s, 95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸10 s, 共40个循环。1%琼脂糖凝胶检测和熔解曲线峰单一性确定没有引物二聚体的影响。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因的相对表达水平进行分析, 采用SPSS 16.0进行数据统计分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 *Tg-IGF1R*基因全长cDNA序列分析

*Tg-IGF1R*基因的cDNA全长5793 bp (GenBank登录号: KU245648), 开放阅读框4638 bp, 编码1546个氨基酸, 5'非编码区(5'UTR)810 bp, 3'非编码区(3'UTR)345 bp, 3'UTR包含1个终止密码子TGA, 加尾信号AATAAA及29 bp多聚A尾巴(图1)。推导出*Tg-IGF1R*蛋白的理论分子量为176.01 ku, 等电点为6.04。

ExPASy ProtScale程序预测显示, *Tg-IGF1R*蛋白在氨基酸组成上, 极性氨基酸所占比例较高, 表现为亲水性; SingleP 4.1预测表明该基因编码的蛋白质没有明显的信号肽; TMHMM在线预测该蛋白存在跨膜区; 通过NetPhos 2.0程序分析, 该蛋白包含37个丝氨酸磷酸化位点、25个苏氨酸磷酸化位点和20个酪氨酸磷酸化位点; 用NetNGlyc 1.0 sever和NetOGlyc 4.0 server软件预测得到12个N-糖基化位点和9个O-糖基化位点。

*Tg-IGF1R*蛋白含有9个功能域即4个FN3 (50~129、610~713、728~918和947~1032 aa), 1个FU (348~397 aa), 1个跨膜区(1055~1077 aa), 1个TyrKc (1117~1383 aa)和2个Low complexity (1409~1424和1506~1521 aa)(图2)。Phyre²程序预测显示, 该蛋白的二级结构由411个氢键、10个 α -螺旋、76个 β -折叠片和105个转角组成(图3)。

2.2 *Tg-IGF1R*同源比对与系统进化树分析

通过与GenBank中13个物种的*IGF1R*氨基酸序列比对发现, 泥蚶*IGF1R*蛋白序列与人(*Homo sapiens*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)*IGF1R*蛋白相似性分别为45.2%、45.6%、45.4%和45.6%。系统进化树分析显示, 泥蚶首先与葡萄牙牡蛎聚为一支, 形成贝类的一个分支, 其次与家蚕(*Bombyx mori*)、然后与文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)聚为一支, 这两小支都同为无脊椎动物。而大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)、尼罗罗非鱼和地雀(*Geospiza fortis*)等脊椎动物聚为一大支, 反映了脊椎动物门的亲缘关系较近, 与泥蚶的关系较远(表2, 图4)。

2.3 *Tg-IGF1R*基因在成体不同组织及幼体不同发育时期的表达差异分析

qRT-PCR检测结果显示, *Tg-IGF1R*基因在成贝6个组织中均有表达, 表达量由高到低依次为血液>闭壳肌>外套膜>鳃>内脏团>斧足。其中血液中的相对表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$), 其余5个组织中闭壳肌与斧足表达量也存在显著差异($P<0.05$)(图5)。

在泥蚶个体发育过程中, 发现*Tg-IGF1R*基因在9个发育时期均有不同程度的表达, 表达量并不呈线性变化, 而是呈先上升后下降再上升的波动趋势。其中原肠胚期表达量最高, 显著高于其他发育阶段($P<0.05$), 同时在担轮幼虫期表达量开始下降, 壳顶幼虫期表达量达到最低之后又开始上升, 在变态至稚贝时表达量排列第二位(图6)。

3 讨论

*IGF1R*是胰岛素样生长因子系统重要的组成

部分^[25], 是一种跨膜酪氨酸受体^[1]。有研究表明, 它是在核糖体中合成的一条多肽链, 经过

蛋白水解酶的裂解去掉由 30 个氨基酸残端组成的信号肽形成受体前体, 再进一步糖基化后裂解

```

1 ACATGGGGATTTCGCGAGGTTGTTTACATGTACGCTTGTGTTTGTGATGTAGTCTGGGGT
61 ATCGTTGTGACCCCTTTTAAATGGTATTTCCGCTGGATTCTTTACCCCTTATCAACGATAC
121 AAACCTTTTATGGAGTATAATATGATTCCCTGAACTTATCATGGATGAATTGGATAAAGAA
181 AGGAATCGTTACGGATTTTTCTCGGATATACTACGCACTCTGTGGACCAACAATTGTGA
241 GAGTTC AAGGCCTCTTGGATATTTTTATACAATCGTGAAACAAACAACCTTTGGTTCTTG
301 ATTAGTATTGATTCTGCCTTCATTTTGTGTATTTATATAATGTGTAACATATGAAAGGG
361 AAAGAAAAGCATTCTTATCATTAAACTATTGACATCATGTGATGAAATATACAAGACA
421 ATACTTGTGTTCTTGTATGATAAATAATGGCCGATCATGCACATACGTTTCATTGATAAA
481 CAGAAAACAAGACATAATTGATGTATCCCTCGTGGACAATTTACTTACCACAGGGTTAAC
541 ATCTCTTTGTTATTTAGATATATAACGCAAAAATAAAATAAACCTCAACGTTCTAATATGG
601 TCAAAAATAATACCAAGAAAGACGGTACTATGTTTGTGATGGATTCACCTTTTTGCGAGTG
661 AATTTGTGAATGAAGTTGCGTCTTAGTATAAAAAAGGCGACAGCAGATCGAGAGATCCTT
721 GTTCTGTTGATACATGTA AAAATGGTGGTACCTGTGAGCAGTTAGACTACGTTTGTAGCT
781 GAAAATGTTTACCATATTATAATGGGGATATGTTGCAATTTGAACCTGGAACCTTACTAG
1 M C Q F E P G N L L
841 GATACTGCACAAATAGACAAGAATGTCCAAATATAGAAAATGTAGAATGTATAGACAATA
11 G Y C T N R Q E C P N I E N V E C I D N
901 TGTGTAATTGCACAGCAGGGTTTTATCAAGAATGGCCTGTGTAATGATATTC AAGCTT
31 M C N C T A G F Y I K N G L C N D I Q A
961 TAAAGGTTTCTGGAGTAAATGCCACATTGATAACAGGACAAATGTCAGTGAATGTTACCT
51 L K V S G V N A T L I T G Q M S V N V T
1021 GGAATCTGCCCAGATCCTGATGGAGTTTATCAGTATGAGGTCAGGTGGTCATACAGTG
71 W N L P A D P D G V Y Q Y E V R W S Y S
1081 GTGGGGAAAACAGAAAGCTAAGCGATCTACAGGTCCTCAGTATGCTATCATATCAGGACTGT
91 G G E T E A K R S T T G P Q Y A I I S G L
1141 TAGCAGGGACTACATATACAATATATGTTTTTCAATAGAATATAATGGTATGACTCCAC
111 L A G T T Y T I Y V F S I E Y N G M T P
1201 AGAGTGTGGCATCAGGACCAGTTGTCATAACAACAAAACTATTTGTACCCTAGGGATG
131 Q S V A S G P V V I T T K T I C T T R D
1261 TAAGAAATGGTATTCACAGTTTTAAGGACCTTATCAACTGTACTGTAATTGAAGGGAATT
151 V R N G I H S F K D L I N C T V I E G N
1321 TAAAATACTCCTCATTGACCATGCGACATCTAAAGATTTGAAGACATTCTGTTTTCCTG
171 L K I L L I D H A T S K D F E D I R F P
1381 ATTTAGTAGAAATAACAGATTACATGTTATTATATAGAGTTTATTCTTTGAAAACCTTAC
191 D L V E I T D Y M L L Y R V Y S L K T L
1441 GAAAATGTTTCCAAATTTGGCTGTTATCCGTGGTCATGATTTATTTTCAACTTTGCTC
211 R K M F P N L A V I R G H D L F F N F A
1501 TGGTTGCATTTGAAATGGTAGACCTTGAAGAATTAGGATTAGTTAGCTTAAGTGTAAATTG
231 L V A F E M V D L E E L G L V S L T V I
1561 AACGAGGTGCTGTACGATTGGAGAAAAATCGGAATCTGTGTTATGTGACTACTATTGATT
251 E R G A V R L E K N R N L C Y V T T I D
1621 GGTCATTGATTGCCACTGGAGTAAAACCTGAAGATAATTTTCATCCAAGATAATAAAAAATC
271 W S L I A T G V K P E D N F I Q D N K N
1681 CTGAAGAATGTGTTAATATTTGTCCTGATCATTGTCCTTTAAAGGATCAAAATGGA AAAAT
291 P E E C V N I C P D H C P L K D Q N G K
1741 CACCTGCTGTTAGAACATGTTGGACATCAGAGGATTGTCAAAAAAGACTTGTACCAA AAT
311 S P A V R T C W T S E D C Q K R L V P N
1801 GCCCAGCATGCGCTGGAAGATCAGGACGTTACTGCTACAACCATGCTGGAAGAGATCTGT
331 C P A C A G R S G R Y C Y N H A G R D L
1861 GTTGTATCAGAGTTGCTTAGGAGGTTGCTATGGTGAACAAGAAGCGATTGCATAGCTT
351 C C H Q S C L G G C C Y G E T R S D C I A
1921 GAAAAA ACTTGATTGTAACAGGAAATATGGTGATAGTAGATCAATGTGCAGACTGATT
371 C K N L I V T G N Y G D S R S M C R P D
1981 GTGACCCAGGAACCTTTATGTATAAGAAAAGAAGATGTTAATGAGACAGGACTGTTTAA
391 C D P G T F M Y K K R R C L M R Q D C L
2041 AAATGAAAATGAAGGTTATAGAAGCTGGACATGGTCCAATGGCAGGAAGATGTGTTAAAA
411 K M K M K V I E A G H G P M A G R C V K
2101 CTTGCTCATTGACTACATGGAAGACACAGCTGATCCTCGTAGGTGTATCCTGTGTGAAA
431 T C P I D Y M E D T A D P R R C I L C E
2161 AAGAATGTCCAAAAGAATGTCAAGCTGTTAGGATAGATAGTATCAATGAAGCACAGAAAC
451 K E C P K E C Q A V R I D S I N E A Q K
2221 TGAAAAGGTTGTACCATTGTAACAGGGCCATTAGAAAATTAGAATTCTTAAAGGAAGCAATG

```

(图1 Fig.1)

471 L K G C T I V T G P L E I R I L K G S N
 2281 TTGGCAAAGAATTGGAAGAAAATTTGGGTCAGATAAAAAGAAGTTTTAGGTCACATTTGGA
 491 V G K E L E E N L G Q I K E V L G H I W
 2341 TTCATTCTCATGCTCTACTCTCTCTTAATTTTTTCAAAAAGTTTAGAAAAAATCCATG
 511 I H S S S H A L L S L N F F K S L E K I H
 2401 GAGAAAATTTATATAATGGATTTTCACTCCTTGTAATGATAATTTGAACCTCCAGAAAC
 531 G E N L Y N G F S L L V N D N L N L Q K
 2461 TCTTCCCAGAAGAAGTAGAAAATCGACTTAAGATTTTGAATGGAAACATGTTCTTTCCT
 551 L F P E E V E N R L K I L N G N M F F H
 2521 TTAACCGAAAAGCTCTGCTTGAGTAAAATTAGAGAGCTAGAAAAAAAAGTTGAGATGAATC
 571 F N R K L C L S K I R E L E K K V E M N
 2581 TCTCCAAGGCTAACAATGACATATCAGATTCAACAAATGGGGATCAAATGCCATGTTATG
 591 L S K A N N D I S D S T N G D Q M P C Y
 2641 TTACTCAACTCAACCTGACTATACTCAGCGTATCATCAACAGTCGCTTTTCTGAAATGGG
 611 V T Q L N L T I L S V S S T V A F L K W
 2701 AAAACTTCAAAAATCCCGATAACAGAAAACCTCTAAGTTATGTTATATACTATAAGGAAG
 631 E N F K I P D N R K L L S Y V I Y Y K E
 2761 CTCCAACCAAGGATGTGTCCATTTATGATGGTAGAGATGCCTGCAGTGAATAATGTTGGC
 651 A P T K D V S I Y D G R D A C S E N V W
 2821 AAACAAAAGATGTTTTGAACAACAGTGAAGGCAAAAATTTTTCATCACAATTATAGTTA
 671 Q T K D V L N N S E K P K F F I T I I V
 2881 ATCTAAATCCGTGGACACAATATGCTGTATATGTACAGACATATAACCACAGCGTCAGCAA
 691 N L N P W T Q Y A V Y V Q T Y T T A S A G
 2941 CATATGGGGCAATGAGCAAACTTTATACTTCAGAACAGCTCCGGCAATGCCAACCCGCC
 711 T Y G A M S K L L Y F R T A P A M P T S
 3001 CAGCCAACCTGGTGGTAAGATCTGTGAGACAGAATGAACCTTCTGGTCACCTGGGACCCAC
 731 P A N L V V R S V R Q N E L L V T W D P
 3061 CAACTTCTCCACATGGAAATGTTACTCATTATGAGGTGTACTGGCGTAAAAAGAGAAGTTG
 751 P T S P H G N V T H Y E V Y W R K R E L
 3121 TACCATTGAAATACTCCAGAAGAAATTTGTACTGATCCCTTGAGAAGACTTGATTTGG
 771 V P L K Y S R R N Y C T D P L R R L D L
 3181 ACACAGAAAAATGAAATTTAAAATAAAGAAAAGAACAGAAAAAGAGAAACGAAACAGAAGATG
 791 D T E N E I K I K K E Q K K R N E T E D
 3241 GTCAGCAATGCTGTGCTTGTCCCGCAGTAAAGAAGAAGAAGCTAGTGAGCAACTTGAAA
 811 G Q Q C C A C P R S K E E E A S E Q L E
 3301 GGGAAATTCAAATCAAATTTGAAAATTCCTGCAAAAATATAATATATACAAAAAGAAGCTG
 831 R E I Q I K F E N Y L Q N I I Y T K R T
 3361 ATAGAAAAGGAGGTGAAGCCAGGGATAACACGTCTGTAAAATTAAGAACCACCAACAATG
 851 D R K E V K P G I T R P V K L R T T N N
 3421 AAAGTGGGTGAACCGCACTAGAAAAGCTGAAGCTCCTTACTCCAAAGCAGTTGTAACCA
 871 E T E V N R T R K A E A P Y S K A V V T
 3481 CTAGAGAAATAGTTCTGCCAAATCTTGGTCATTTTGAAGATTACAATGTGGAGGTAATTG
 891 T R E L V L P N L G H F E D Y N V E V I
 3541 CATGTCTAGAAAAGAGATCCACGTGACCCAAGGAAGGTCAAACCTTTGTAGCAACAGAGCTA
 911 A C L E R D P R D P R K V K L C S N R A
 3601 TTACAATGGGAAGATCATTGCCAAAGAAGGAAGCAGATAGCATAGATGTTGCTTCCATAA
 931 I T M G R S L P K K E A D S I D V A S I
 3661 AAATACTGCAGAATACCTCCAAGTCTAGTGATGTATTAATTACATGGGAGGAACCACCTA
 951 K I L Q N T S K S S D V L I T W E E P P
 3721 ATCCTAATGGACTTATTATAACCTACCCTTAGAATACAGCAATGTTAATACGCCAGATC
 971 N P N G L I I T Y H L E Y S N V N T P D
 3781 ACCAGAAACCTCTGGTATGCATTCCTCATACCAATTATACCAGGTTAAAGGTCACAAAT
 991 H Q K P L V C I P H T N Y T R F K G H K
 3841 TAACCAATCTATCACCTGCCAATTACACATTTTCGTATAATGGCAACATCACTAGCAGGAA
 1011 L T N L S P A N Y T F R I M A T S L A G
 3901 AGGGAGAATGGACACCATATAAGCATTTCGATATTGAGCCACAAAAAGATGAGCCATGGG
 1031 K G E W T P Y K H F D I E P Q K D E P W
 3961 AAAAAGAGACCATCATAGCTGTAAGTGTATCCATTGTACTTCTGGTTTTACTGCTAACAG
 1051 E K E T I I A V T V S I V L L V L L L T
 4021 TCATTGTTGTTTGGTTCTGTGCCAGACACAGATTCAGCAAGATACCGGATATTGTCCTTA
 1071 V I V V W F C A R H R F S K I P D I V L
 4081 ACACATCTGCTAACCTGAGTATTGGTCCTATCAGGATGCTTATGAAGCAGATGAATGGG
 1091 N T S A N P E Y W S Y Q D A Y E A D E W
 4141 AAGTTGACCGTGACAAAGTAAGGTTACTAAAAGAAGTGGGACAAGGTTCAATTTGGAATGG
 1111 E V D R D K V R L L K E L G Q G S F G M
 4201 TATATAAAGGATTACTGTTTATAGATGAGAAGAAAAGAAGAAATTCCTGTGGCTGTCAAGA

(图1 Fig.1)



图2 Smart软件预测的Tg-IGF1R蛋白功能域

Fig. 2 The prediction of protein functional domains of Tg-IGF1R protein using Smart software

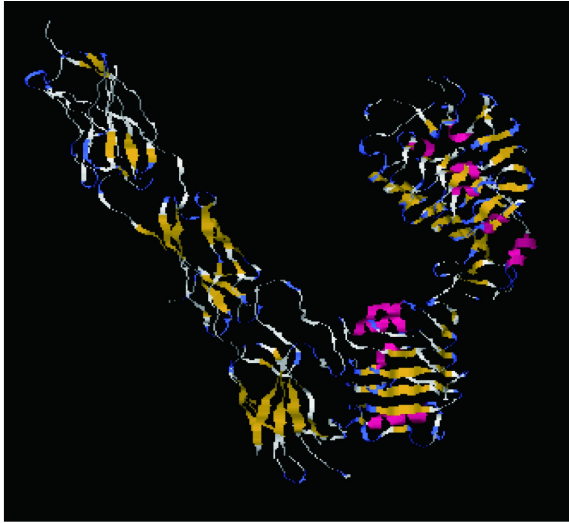


图3 Tg-IGF1R蛋白的二级结构预测图

深红色.α-螺旋; 黄色.β-折叠; 淡蓝色.转角; 白色.其他残基

Fig. 3 The prediction of Tg-IGF1R protein secondary structure from *T. granosa*

Red. alpha-helix; yellow. the beta sheet; blue. turn; white. other residues

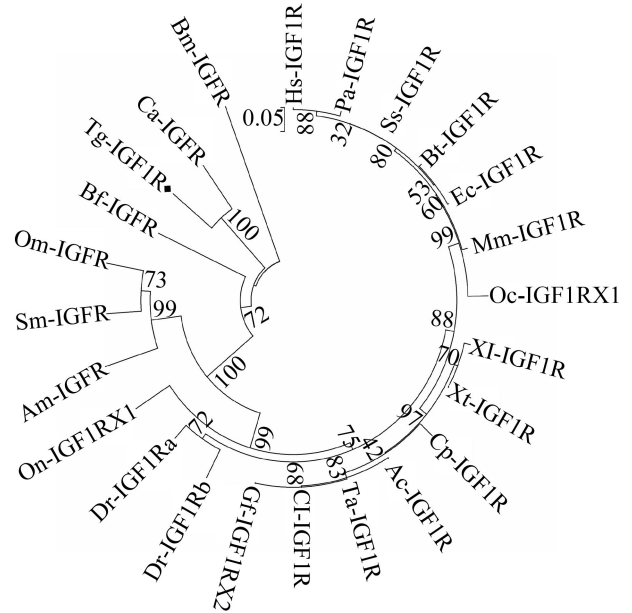


图4 利用MEGA 6.0软件NJ法构建的Tg-IGF1R系统进化树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of Tg-IGF1R amino acid sequences by MEGA 6.0 software

表2 泥蚶与其他物种IGF1R氨基酸序列

Tab. 2 IGF1R amino acid sequences from *T. granosa* and other species

IGF1R物种 IGF1R species	登录号 accession no.	缩写 abbreviation	IGF1R物种 IGF1R species	登录号 accession no.	缩写 abbreviation
泥蚶 <i>Tegillarca granosa</i>	KU245648	Tg-IGF1R	安乐蜥 <i>Anolis carolinensis</i>	XP_003226539.2	Ac-IGF1R
葡萄牙牡蛎 <i>Crassostrea angulata</i>	ACU33961.1	Ca-IGFR	斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	XP_002199843.1	Ta-IGF1R
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NP_001081734.1	XI-IGF1R	地雀 <i>Geospiza fortis</i>	XP_005424279.1	Gf-IGF1R
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_694501.1	Dr-IGF1Rb	原鸽 <i>Columba livia</i>	EMC77329.1	Cl-IGF1R
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAI63723.1	Dr-IGF1Ra	家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_008247008.1	Oc-IGF1RX1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005447747.1	On-IGF1RX1	马 <i>Equus caballus</i>	XP_001489815.1	Ec-IGF1R
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AAC16492.1	Om-IGFR	牛 <i>Bos taurus</i>	NP_001231541.1	Bt-IGF1R
红腹蝾螈 <i>Cynops pyrrhogaster</i>	BAB44154.1	Cp-IGF1R	野猪 <i>Sus scrofa</i>	NP_999337.1	Ss-IGF1R
大菱鲂 <i>Scophthalmus maximus</i>	CAA12279.1	Sm-IGFR	小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAI38870.1	Mm-IGF1R
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037011.1	Bm-IGFR	大熊猫 <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002921975.2	Am-IGFRX1
文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>	XP_002585764.1	Bf-IGFR	苏门答腊猩猩 <i>Pongo abelii</i>	NP_001125259.1	Pa-IGF1R
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	XP_002933351.1	Xt-IGF1R	人类 <i>Homo sapiens</i>	AAI43722.1	Hs-IGF1R

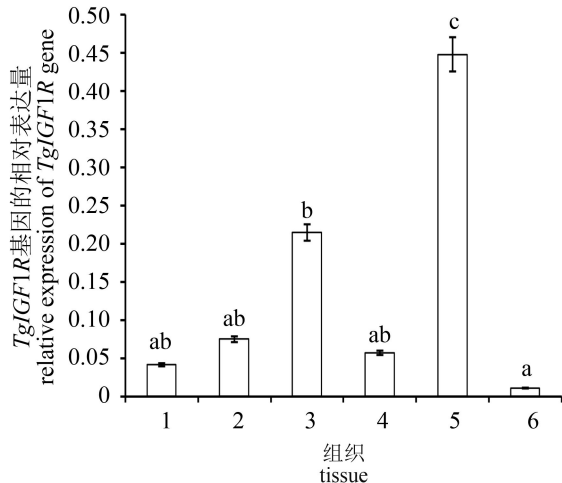


图5 *Tg-IGF1R*基因在6个组织中的表达差异分析($n=3$)

1. 内脏团; 2. 外套膜; 3. 闭壳肌; 4. 鳃; 5. 血液; 6. 斧足; 不同字母代表差异显著, $P<0.05$, 下同

Fig. 5 Analysis of expression of *Tg-IGF1R* gene in six tissues of *T. granosa*

1. visceral mass; 2. mantle; 3. adductor muscle; 4. gill; 5. blood; 6. foot; different letters represent significant differences, $P<0.05$, the same below

furin-like结构域(furin like cysteine-rich domain), 富含半胱氨酸, 与配体结合引起酪氨酸残基自身磷酸化, 激活细胞内信号传导通路(MAPK和P13K-KT通路), 从而对生长发育进行调控, 控制细胞凋亡、增殖、分化^[7], 因此, IGF1R是生长发育中非常重要的因子之一; 1个跨膜区(transmembran region): 1055~1077 aa, 这与IGF1R是一种跨膜蛋白受体相适应^[1]; 1个酪氨酸激酶(TyrKc)结构域, 该区域为类PKc超家族蛋白激酶催化结构域, 具有活性位点、ATP结合位点和底物结合位点, 能催化ATP的 γ 磷酸基团转移至专一性底物^[29]。

本研究通过qRT-PCR技术对*Tg-IGF1R*基因在各组织中的表达情况进行了检测, 结果显示该基因在各组织中均有不同程度的表达, 其中血液中的表达量最高。有研究发现, IGFs广泛存在于多种体液中, 如脑脊液、尿液和羊水等, 对人体组织细胞的生长发育具有广泛而重要的调节作用^[30]; IGF1作为一种多功能的细胞增殖调控因子, 经血液运输到全身, 几乎存在于机体的所有组织中^[31], 而IGF1R是其功能的主要介导者^[1]; Gricourt等^[32]利用人类重组蛋白IGFR对长牡蛎(*C. gigas*)进行了IGF通路的研究, 认为在长牡蛎体内同样具有一条IGF-IGFR通路, 该通路中, IGF发挥了和在哺乳动物中同样促进生长的功能。此

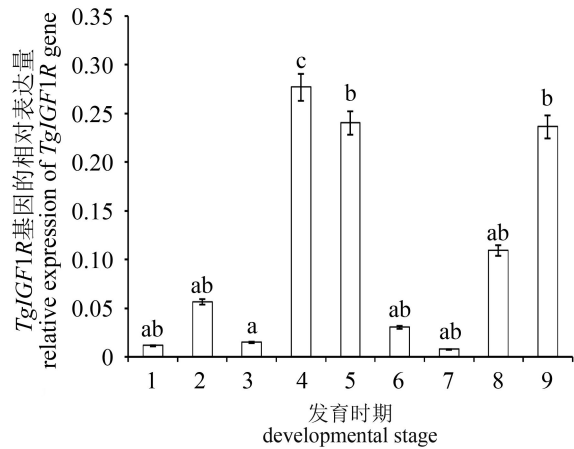


图6 *Tg-IGF1R*基因在9个发育时期的表达差异分析($n>500$)

1. 成熟卵子; 2. 4细胞胚胎; 3. 囊胚期; 4. 原肠胚; 5. 担轮幼虫; 6. D形幼虫; 7. 壳顶幼虫; 8. 眼点幼虫; 9. 稚贝(12日龄)

Fig. 6 Analysis of expression of *Tg-IGF1R* gene in nine developmental stages

1. mature eggs; 2. 4 cells; 3. blastula; 4. gastrulae; 5. trochophore; 6. D-shaped larvae; 7. umbo larvae; 8. eyebot larvae; 9. juvenile clams

外, IGF1R在北极狐(*Alopex lagopus*)^[30]、斑马鱼^[33]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[34]等其他动物组织中广泛表达。因此, 推断*Tg-IGF1R*基因在泥蚶多种组织细胞中具有广泛的生物学活性。血液作为一条重要的物质运输途径, 只有在其中高表达才能满足细胞快速生长和调节的功能。

IGF1R作为一种广泛分布的多功能受体, 在多种生物过程中起关键作用, 如调节体细胞有丝分裂、调节增殖和抗凋亡等^[1]。但与IGFs类似, IGF1R基因的表达也受到如生理因子、营养状况、发育阶段和不同种类激素等的调控^[35]。Ayaso等^[36]发现IGF1R基因在斑马鱼的各个发育阶段均有表达; 周春雪^[25]在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)早期胚胎中没有检测到IGF1R基因, 受精后16h左右才开始出现, 且表达量逐渐升高, 24h达到最高, 32h时下降, 36h时又升高, 其表达量的变化并不是线性增加的; 张俊玲等^[34]对牙鲆体内检测发现胰岛素样生长因子1受体在受精卵、卵裂和囊胚阶段表达量相对较低, 从原肠胚期开始大量表达, 至出膜前各阶段均保持较高的表达水平。*Tg-IGF1R*基因mRNA在泥蚶发育的各个阶段均有表达, 且表达量的变化也不是线性增加的, 在原肠胚期的表达量最高, 随后降低, 原因可能是随着胚胎发育过程的进行,

细胞分裂速率加快, 生命活动旺盛, 信号传导需要较多的受体蛋白; 稚贝期该基因的表达量再次升高, 推测可能是细胞分化加速, 需要更多的受体蛋白所导致。

参考文献:

- [1] 宋姗姗, 王雷, 荣敏, 等. 胰岛素样生长因子I受体与生长发育的相关性研究[J]. 特产研究, 2015(2): 61-64.
Song S S, Wang L, Rong M, *et al.* Study of the correlation between Insulin-like growth factor-I receptor and growth[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2015(2): 61-64(in Chinese).
- [2] Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, *et al.* Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout[J]. The FASEB Journal, 2006, 20(6): 773-775.
- [3] Pollak M N, Schernhammer E S, Hankinson S E. Insulin-like growth factors and neoplasia[J]. Nature Reviews Cancer, 2004, 4(7): 505-518.
- [4] Khandwala H M, McCutcheon I E, Flyvbjerg A, *et al.* The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth[J]. Endocrine Reviews, 2000, 21(3): 215-244.
- [5] Duan C M, Ding J, Schlueter P, *et al.* A zebrafish view of the insulin-like growth factor (IGF) signaling pathway[J]. Acta Zoologica Sinica, 2003, 49(4): 421-431.
- [6] Litwack G. Biochemical Actions of Hormones[M]. New York: Elsevier Inc, 2012.
- [7] 杨凡. 胰岛素样生长因子受体与生长发育[J]. 国外医学: 妇幼保健分册, 2000, 11(3): 117-120.
Yang F. Study of the relationship between insulin-like growth factor receptors and growth[J]. Foreign Medical Sciences: Section of Maternal and Child Health, 2000, 11(3): 117-120(in Chinese).
- [8] Siebler T, Lopaczynski W, Terry C L, *et al.* Insulin-like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of the distal long arm of chromosome 15[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995, 80(12): 3447-3457.
- [9] Li H, Adachi Y, Yamamoto H, *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces tumor angiogenesis and enhances the effects of bevacizumab for a human gastric cancer cell line, MKN45[J]. Cancer, 2011, 117(14): 3135-3147.
- [10] Haisa M. The type 1 insulin-like growth factor receptor signalling system and targeted tyrosine kinase inhibition in cancer[J]. The Journal of International Medical Research, 2013, 41(2): 253-264.
- [11] 仓明, 周宁聪, 周平, 等. 胰岛素样生长因子及其受体在绵羊早期胚胎的表达[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2006, 37(1): 76-80.
Cang M, Zhou N C, Zhou P, *et al.* Expression of IGFs and their receptors in ovine preimplantation embryos[J]. Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Edition), 2006, 37(1): 76-80(in Chinese).
- [12] 同海妮, 白淑, 王树迎, 等. GHR和IGF-1R在济宁青山羊子宫内分布和表达的发育性变化[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(9): 1392-1399.
Tong H N, Bai S, Wang S Y, *et al.* Developmental changes of the distribution of GHR and IGF-1R and the expression of its mRNA in the uterus of Jining Grey Goats[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2013, 44(9): 1392-1399(in Chinese).
- [13] Domené H M, Hwa V, Jasper H G, *et al.* Acid-labile subunit(ALS) deficiency[J]. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011, 25(1): 101-113.
- [14] Kalista S, Schakman O, Gilson H, *et al.* The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy[J]. Endocrinology, 2012, 153(1): 241-253.
- [15] Lei M M, Peng X, Zhou M, *et al.* Polymorphisms of the IGF1R gene and their genetic effects on chicken early growth and carcass traits[J]. BMC Genetics, 2008, 9: 70.
- [16] 金崇福, 王金玉, 赵秀华, 等. 京海黄鸡IGF1R基因Alu I、Hin1 I多态位点的发现及其与生产性状的相关性[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(3): 10-13.
Jin C F, Wang J Y, Zhao X H, *et al.* Alu I and Hin1 I polymorphic sites of IGF1R gene and their association with growth and reproductive performance in Jinghai Yellow Chickens[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2012, 48(3): 10-13(in Chinese).
- [17] 秦骥. 福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)生长相关基因和群体选育研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2013.
Qin J. Studies on growth related gene and population selective breeding for the Fujian oyster (*Crassostrea angulata*)[D]. Xiamen: Xiamen University, 2013(in

- Chinese).
- [18] Bao Y B, Wang Q, Liu H M, *et al.* A small HSP gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 729-733
- [19] 汪青, 林志华, 包永波, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)血红蛋白基因(Tg-HbIIA)克隆、分析及免疫表达研究[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 88-94.
- Wang Q, Lin Z H, Bao Y B, *et al.* Clone and analysis of hemoglobin gene (Tg-HbIIA) and immune expression research in *Tegillarca granosa*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 88-94(in Chinese).
- [20] 李佩芬, 林志华, 包永波. 泥蚶基质金属蛋白酶组织抑制因子3基因的克隆及镉免疫表达研究[J]. *水产学报*, 2015, 39(3): 336-343.
- Li P F, Lin Z H, Bao Y B. A novel tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning and immune-related research of Cd[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 336-343(in Chinese).
- [21] 董迎辉. 泥蚶高通量转录组分析及生长相关基因的克隆与表达研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- Dong Y H. Transcriptome analysis using 454 pyrosequencing and cloning and expression of growth-related genes for the blood clam *Tegillarca granosa* (Linnaeus, 1758)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012(in Chinese).
- [22] 董迎辉, 项翔, 姚韩韩, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)生长因子受体结合蛋白2(GRB2)基因的克隆与表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(4): 937-943.
- Dong Y H, Xiang X, Yao H H, *et al.* Cloning and expression of GRB2 gene from the blood clam *Tegillarca granosa*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 937-943(in Chinese).
- [23] 周小龙. 泥蚶微卫星分子标记的开发与应用及生长相关基因HDAC1的克隆[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Zhou X L. Development and application of SSR and cloning of growth-related gene HDAC1 in *Tegillarca granosa*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013(in Chinese).
- [24] 钱雪骏, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 泥蚶*Smad1/5*基因cDNA全长克隆及时空表达特征分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(9): 1302-1312.
- Qian X J, Dong Y H, Yao H H, *et al.* Cloning and spatiotemporal expression analysis of *Smad1/5* gene in the blood clam *Tegillarca granosa*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1302-1312(in Chinese).
- [25] 周春雪. 草鱼胰岛素样生长因子1受体和结合蛋白5的克隆与功能研究及不同草鱼群体肌肉生长调控基因SNP分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Zhou C X. Molecular cloning and functional characterization of IGF-1R and duplicated IGFBP-5 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and SNP analysis of different grass carp's muscle-growth control genes[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014(in Chinese).
- [26] 曹川, 戴霞. 受体酪氨酸蛋白激酶的研究[J]. *医学综述*, 2008, 14(12): 1780-1781.
- Cao C, Dai X. Research progress of receptor tyrosine protein kinase[J]. *Medical Recapitulate*, 2008, 14(12): 1780-1781(in Chinese).
- [27] Skorstengaard K, Jensen M S, Sahl P, *et al.* Complete primary structure of bovine plasma fibronectin[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1986, 161(2): 441-453.
- [28] 黄海涛, 宋伟, 缪时英, 等. 人源Fank1蛋白质FN3结构域多肽的原核表达、纯化及晶体筛选[J]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(3): 193-196.
- Huang H T, Song W, Miao S Y, *et al.* Prokaryotic expression, purification and crystallization of human fank1 protein FN3 domain[J]. *Journal Medical Molecular Biology*, 2009, 6(3): 193-196(in Chinese).
- [29] 彭景琨, 曹广力, 钱莹, 等. 家蚕JAK/STAT信号通路相关基因克隆与分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(17): 3592-3601.
- Peng J K, Cao G L, Qian Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of JAK/STAT pathway related major genes of silkworm (*Bombyx mori*)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(17): 3592-3601(in Chinese).
- [30] 高敏. 生长因子与激素对胎儿发育的影响[J]. *国外医学: 妇幼保健分册*, 1996, 7(4): 162-164.
- Gao M. Effects of growth factors and hormones on the development of fetus[J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Maternal and Child Health*, 1996, 7(4): 162-164(in Chinese).
- [31] 杜智恒. 北极狐GH、GHR、IGF1和IGF1R基因的cDNA克隆、表达及相关性状的研究[D]. 哈尔滨: 东

- 北农业大学, 2008.
- Du Z H. cDNA cloning, expression of arctic fox GH, GHR, IGF1 and IGF1R genes and study of correlative traits[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008(in Chinese).
- [32] Gricourt L, Bonnec G, Boujard D, *et al.* Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrlGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 134(1): 44-56.
- [33] Maures T, Chan S J, Xu B, *et al.* Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(5): 1858-1871.
- [34] 张俊玲, 施志仪, 程琦, 等. IGF-I及其受体基因在牙鲆胚胎发育过程中的表达图式[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1219-1225.
- Zhang J L, Shi Z Y, Cheng Q, *et al.* Expression patterns of IGF-I and its receptor genes during embryonic development of Japanese flounder[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1219-1225(in Chinese).
- [35] Werner H, Woloschak M, Adamo M, *et al.* Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(19): 7451-7455.
- [36] Ayaso E, Nolan C M, Byrnes L. Zebrafish insulin-like growth factor-I receptor: Molecular cloning and developmental expression[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 191(2): 137-148.

Cloning and expression analysis of *IGF1R* gene in *Tegillarca granosa*

REN Fuzhen^{1,2}, YAO Hanhan¹, QIAN Xuejun², LIN Zhihua¹, DONG Yinghui^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to explore the function of *IGF1R* during the process of the growth and development in *Tegillarca granosa*, *Tg-IGF1R* cDNA was cloned by SMART RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) techniques on the basis of cDNA library of *T. granosa*. The full length cDNA of *Tg-IGF1R* was 5793 bp, and its complete ORF (Open Reading Frame) was 4638 bp encoding 1546 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the sequence of *Tg-IGF1R* contains a 5'-untranslated region (UTR) of 810 bp, and a 3'-UTR of 345 bp. The predicted molecular mass of the deduced amino acid of *Tg-IGF1R* was 176.01 ku, and the theoretical isoelectric point was 6.04. *Tg-IGF1R* protein consists of four fibronectin type (FN3) domains, one furin like cysteine-rich (FU) domain and Tyrosine kinase (TyrKc) domain, belonging to transmembrane and hydrophilic protein. Homologous analysis on the amino acids showed that *IGF1R* of *T. granosa* shared more than 40% similarity with the most species of *IGF1R*, including *Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, and *Danio rerio*. qRT-PCR (Real-time quantitative PCR) results indicated that *Tg-IGF1R* gene was expressed in 6 tissues (blood, adductor muscle, foot, gill, visceral mass and mantle.), and the expression of blood was significantly higher than other tissues, which implied that *Tg-IGF1R* plays various biological roles. The results of relative expression in 9 development stages revealed that the expression of *Tg-IGF1R* gene showed the highest expression in the gastrulae stage, and followed by trochophore and juvenile clams stages. Therefore, *Tg-IGF1R* may be involved in the formation of certain organs in early developmental stages.

Key words: *Tegillarca granosa*; *IGF1R* gene; cloning; expression analysis

Corresponding author: DONG Yinghui. E-mail: dongyinghui118@126.com

Funding projects: Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-48); National Infrastructure of Fishery Germplasm Resource Programme (2015DKA30470); Key Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ12C19001); Zhejiang Provincial Top key Discipline (ZS2015012)