



## 马氏珠母贝 *IGF2BP1* 基因的鉴定及对矿化相关基因表达的影响

熊盼盼<sup>1,2,3</sup>, 张华<sup>1,2,3\*</sup>, 何毛贤<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301;  
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 广州 511458;  
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 为了研究胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 (IGF2BPs) 基因是否参与珍珠贝的生物矿化, 本实验鉴定了一个马氏珠母贝 *IGF2BP1* 基因, 命名为 *PfIGF2BP1-1*, 该基因 cDNA 全长为 7 348 bp, ORF 长 1 818 bp, 编码 605 个氨基酸。多序列比对和系统进化分析表明, *PfIGF2BP1-1* 有 2 个 RRM 结构域和 4 个 KH 结构域, 与其他物种来源的 IGF2BPs 同源。实时荧光定量 PCR 结果显示, *PfIGF2BP1-1* 在马氏珠母贝的 8 个组织中均有表达, 在闭壳肌组织中表达量最高, 其次为足和外套膜组织。利用 pET-32a 原核表达载体构建了含有 *PfIGF2BP1-1* 成熟多肽区的重组质粒并成功表达蛋白。在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C 培养 8 h 的条件下诱导表达 *PfIGF2BP1-1* 蛋白最佳。*PfIGF2BP1-1* 蛋白刺激马氏珠母贝外套膜原代细胞, 引起壳基质蛋白基因 *Accbp*、*MSI7*、*Nacrein* 的表达水平显著上升, 表明 *PfIGF2BP1-1* 蛋白可诱导壳矿化相关基因的表达, 参与马氏珠母贝的生物矿化过程。

**关键词:** 马氏珠母贝; 胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 1; 蛋白表达; 壳矿化相关基因

中图分类号: Q 786; S 968.31\*6.1

文献标志码: A

马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 又名合浦珠母贝, 是生产海水珍珠的主要母贝, 其贝壳/珍珠(质)的形成是一个典型的生物矿化过程。贝壳的生物矿化已被证实是受基因精确调控的复杂过程, 由外套膜表皮细胞分泌的基质蛋白被认为起着关键的作用<sup>[1-2]</sup>。尽管大量与贝壳/珍珠质形成机理相关的一些蛋白质也已经被鉴定和分析, 但是目前仍然未知这些蛋白是如何被调控而影响其晶体成核和生长功能。

胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein, IGF2BPs) 是

一种重要的、多功能的 RNA 代谢调控因子, 涉及多个不同的生物学过程。与传统调控不同的是, IGF2BPs 可与目标 mRNA 的 5'端、编码区或 3'端任意区域结合, 形成颗粒性核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP), 从而调控目标 mRNA 的定位、稳定, 防止其降解, 促进其翻译, 进而引起不同的生物学效应<sup>[3]</sup>。脊椎动物有 3 个高度相似的 IGF2BPs 旁系同源基因 (*IGF2BP1*、*IGF2BP2*、*IGF2BP3*)<sup>[4]</sup>。其中 *IGF2BPs1* 在调节机体生长发育、器官形成、神经系统发育过程中具有重要的生物学功能。如 *IGF2BP1* 通过在受精卵和胚胎阶段的

收稿日期: 2021-04-17 修回日期: 2021-10-09

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-49); 国家自然科学基金 (42006106); 广东省自然科学基金 (2020A1515011434); 广东省科技计划项目 (2020B1212060058)

第一作者: 熊盼盼 (照片), 从事马氏珠母贝分子遗传育种研究, E-mail: xiongpanpan19@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 张华, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: hua2020@scsio.ac.cn;

何毛贤, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: hmx@scsio.ac.cn



高表达来调节胚胎的发生<sup>[5-7]</sup>。敲除 *IGF2BP1* 导致小鼠 (*Mus musculus*) 60% 的致死率或者身体明显变小, 造成几乎所有器官组织发育不良<sup>[5]</sup>。在神经元发育中, *IGF2BP1* 通过结合 ACTB mRNA's 3'UTR 影响其时空活性来控制 ACTB 蛋白质的合成, 从而调节神经突向外生长、神经元细胞迁移和轴突导向<sup>[8-9]</sup>。目前, 对 *IGF2BP1* 基因的功能研究主要集中在人 (*Homo sapiens*)、小鼠等高等脊椎动物, 尤其是涉及与临床相关的疾病, 然而近年来的研究表明, 其可能与骨形成相关。全基因组关联分析发现, *IGF2BP1* 上的 SNP 位点 rs9674544 与婴儿期初生牙齿发育显著相关<sup>[10]</sup>。张奕奋<sup>[11]</sup> 运用基因过表达及抑制表达实验, 证明 *IGF2BP1* 在老年人骨髓间充质干细胞成骨分化过程中起促进作用。*IGF2BP1* 基因在贝类中的相关研究甚少, 范嗣刚等<sup>[12]</sup> 克隆获得了马氏珠母贝 *IGF2BP1* 基因, 原位杂交显示该基因在外套膜边缘的外褶中表达, 并推测其可能参与棱柱层的形成, 但未对其功能和调控机制进行相关研究。

在马氏珠母贝的转录组数据库中, 发现存在一个与 *IGF2BP1* 同源的基因 (*PfIGF2BP1-1*), 为了研究该基因是否在生物矿化中起作用, 本研究对马氏珠母贝 *PfIGF2BP1-1* 的序列和结构进行了分析, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测了 *IGF2BP1-1* 基因的组织分布, 原核表达了 *PfIGF2BP1-1* 蛋白, 并分析了 *PfIGF2BP1-1* 蛋白对壳矿化形成相关基因表达的影响。研究结果将为诠释 *IGF2BP1* 基因的功能及珍珠贝壳形成的分子机制提供新的参考资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验用马氏珠母贝来源于深圳大鹏澳养殖群体, 贝龄为 1 龄。

### 1.2 *IGF2BP1-1* cDNA 序列验证

取马氏珠母贝闭壳肌、足、心脏、鳃、消化腺、肠道、性腺和外套膜 (组织用量小于 100 mg), 混合后用于提取总 RNA, 提取方法按照 Magen 通用 RNA 提取试剂盒的说明书步骤操作。cDNA 合成根据 TOYOBO 的 FSK-101 反转录试剂盒操作说明进行, 合成的第一链 cDNA 于 -20 °C 保存备用。在马氏珠母贝转录组数据库中, 经过序列搜索和拼接获得 *IGF2BP1-1* cDNA 全长序列, 根据序列设计引物 (表 1) 进行其全长验证。

表 1 *IGF2BP1-1* 基因序列验证、RT-qPCR 及蛋白表达所用的引物

Tab. 1 List of primers for *IGF2BP1-1* gene verification, RT-qPCR and protein expression

引物名称及序列 primers name and sequence (5'-3')	引物用途 function
IGF2BP1-1F: TGAGGTTCCGTATCACCCCA	全长验证 verification sequence
IGF2BP1-1R: CCAAGATAAGGGTGGGCGAA	
F: TAGTCCGGTACCCACCCAT	RT-qPCR
R: TCCTCAAAAAGCCCACGAAGA	
bmp (65.2Hind III)	双酶切引物 primers for enzyme digestion
F:AAAAAGCTTATGGCCGAAGCTGCAGCG	
bmp (66.1Not I)	
R:AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTTGCCATT TGTTGAGGTTGGT	
<b>矿化功能验证 verification mineralization function</b>	
F: GAAGGGGATAGCCATTCTTATGTG	Aspein
R: GCATCACTGGGCTCCGATACTA	
F: GACATGGAACAAAGATGGTGG	Accep
R: CTGTGGCTGGAATGGTTGG	
F: GAGGCTACTGGACACGAGAT	BMP
R: TTTACAGAATGTGAGGACG	
F: GATCGTCTTAATTGCCTCTGTTTCT	MSI7
R: CTCCAAGCCCCGATAACACCT	
F: TGCGGACGTTACTCATACTGCT	N16
R: CCACATCTAAGCCACTCATACTCT	
F: GGCTTTGGCGACGAACCGGA	Nacrein
R: ACACGGGGGAGTGGTCAGGG	
F: TGCTGCCATCACGTGAGTATG	Pif
R: GACTTCCCTTTCTCACACTTCCA	

注: AAGCTT. *Hind* III 双酶切位点, GCGGCCG. *Not* I 双酶切位点  
Notes: AAGCTT. *Hind* III double restriction site, GCGGCCG. *Not* I double restriction site

### 1.3 生物信息学分析

使用 DNAMAN 软件翻译序列; 使用 ORF Finder 在线网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找开放阅读框; 使用 ExPasy (<http://au.expasy.org/tool/Ls/>) 分析蛋白质氨基酸的理化性质; 使用 Port-Param (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测编码蛋白的理化性质; 使用 SMART 软件 ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode)) 分析蛋白的功能结构域; 使用 NCBI 的 Blast 进行序列比对; 使用 MEGA 6.0 软件构建系统 NJ 进化树。

### 1.4 *PfIGF2BP1-1* 的组织分布

用于组织分布实验的组织包括肌肉、足、心脏、鳃、消化腺、肠道、性腺和外套膜。以 18S *rRNA* 为内参进行 RT-qPCR (表 1), 反应体系:

SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix 5.0  $\mu$ L, 双蒸馏水 3.4  $\mu$ L, cDNA 模板(稀释 5 倍) 1.0  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 0.3  $\mu$ L, 共 10.0  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 45 个循环。每个组织 3 个生物学重复,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对 mRNA 表达量。GraphPad 8.0 软件作图。

### 1.5 PfiGF2BP1-1 蛋白原核表达和检测

根据 *PfiGF2BP1-1* 基因序列, 设计含 PfiGF2BP1-1 蛋白成熟区序列的酶切引物(表 1), PCR 扩增后产物测序验证。将测序正确的 PCR 产物与 pET-32a 载体用 *Hind* III 和 *Not* I 分别进行双酶切、胶回收并纯化双酶切产物。将酶切纯化后的 PCR 产物和 pET-32a 载体用 T<sub>4</sub> DNA Ligase 在 4  $^{\circ}$ C 下连接过夜, 构建重组表达质粒 pET-32a-*PfiGF2BP1-1*。将重组表达质粒转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态 DH-5 $\alpha$ , 挑取单菌落摇菌并测序。将测序正确的单克隆菌提取质粒, 并将质粒转化至 *Transetta* (DE3) 表达菌株, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜后挑取单菌落摇菌, 按 1:100 (体积比) 接种至 LB 培养基中摇菌, 待 OD<sub>600</sub> 为 0.7 时, 检测不同的 IPTG 诱导浓度 (0、0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.0 mmol/L) 和诱导时间 (0、2、4、6、8 和 10 h) 对表达 PfiGF2BP1-1 蛋白的影响。PfiGF2BP1-1 蛋白经镍柱纯化后, 采用 His 标签抗体进行 Western blot 验证。

### 1.6 PfiGF2BP1-1 蛋白对矿化相关基因表达的影响

外套膜原代细胞培养参考 Zhang 等<sup>[13]</sup>。原代细胞过 40  $\mu$ m 细胞筛后, 密度调整为  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔接种量为 1 mL。然后加入重组蛋白 PfiGF2BP1-1 (设 0.1、1.0 和 5.0  $\mu$ g/mL 3 个浓度梯度), 26  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后收集细胞, 用于 RNA 提取, 每组 3 次重复, 对照组加入等量的磷酸盐缓冲溶液 (PBS)。RT-qPCR 检测 7 个矿化相关基因 *BMP*、*MSI7*、*N16*、*Aspein*、*Acbbp*、*Nacrein* 和 *Pij80* 的表达水平(表 1), 分析方法同前。

### 1.7 数据分析

用 SPSS 19.0 软件的单因素方差分析法 (ANOVA) 进行表达量显著性分析 ( $P < 0.05$ ), GraphPad 8.0 软件作图。

## 2 结果

### 2.1 PfiGF2BP1-1 序列和结构分析

获得的 *PfiGF2BP1-1* 全长 cDNA 为 7 348 bp (GenBank: MW767156), 含 1 818 bp 的 ORF, 编码 605 个氨基酸。ProtParam 分析得出该蛋白质分子式为 C<sub>2891</sub>H<sub>4647</sub>N<sub>853</sub>O<sub>900</sub>S<sub>37</sub>, 分子质量为 66.941 ku, 理论等电点 (pI) 为 8.22; 含 68 个带负电的氨基酸 (Asp+Glu)、71 个带正电的氨基酸 (Arg+Lys); 脂肪系数为 72.31, 亲水性总平均数为 -0.581, 为负数, 故该蛋白是一类亲水性蛋白, 不稳定性指数为 52.94, 是一类不稳定的蛋白。SMART 结构域预测 PfiGF2BP1-1 蛋白有 2 个 RRM 结构域 (32~102 和 106~174 aa) 和 4 个 KH 结构域 (279~344、200~263、510~576 和 418~491 aa) (图 1), 与脊椎动物的 IGF2BP1 类似。

```

ATGCCGACCTGAGCGGAGGGGAGGACACTAGTCCGGTATCCACCCAGGGGACTCTGAGGAAAGAAATCAAGGCTCATGACCGTGTAT 96
MAEAAAEGGDTSPVPTQGHSEEDSSVMYRVY
GTCGAACTAGACCCCGCCCTGACGAGAACTCTCTGGTGGCTTTTGAGGATACCGGCTCTGTTAGGAATATTTAAGAAAGAAAC 192
VGNLDPAVDEGLRLRGLFEDHGI VVGNILKRRN
TACTCTTTAGATGTCAGACAGACACCTAGACAGGGCCATGAAAATLGAATGATAGCATCTCTAGGCTCAATGACGAAAGGAA 288
YAFVDCPDQNNVDKAIKELNDYDLGSTMQVE
CCTGATGATGAGAAAGAAATGCAATGCAATCCGATCCGATCTCCGCGAGGATATTAACAGGACATGTTGGAGACTCTGTCATGG 384
PSTSRKRKSNKIQIRNLRPQHINRDDVETLVMG
CTTGATCTACAGATGTGAACAGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 480
LGTLQRCEQGGSEGLVYVTFETPEEAQMAVNTL
PfiGF2BP1-1: CAGCGGGCAGTCTCGAGGTTGACTTTCGCTGGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 576
NGYDYQQQILKVDFAAGQMKRRRPRPNHNSG
CTGATGACAGAGTTGCCACTGAGGATCCTGTCAGAGTGAAGTTGTAGTGTCTATCTTGTGTCAGACAGACATACATAATATACC 672
MNRQELP LRLVLSSEFVGAIIQRGGQT IHNIT
TACAGACCCGAGCTAGTGGTATACACAGAAAGGACAACTTCTGCTGACACTTGTAAAGTAAGGAGCCGAGAGTGTACAGAG 768
SQSRARVDIHRDRDNISADTLVTKGSPESCTE
GGATGAGGAAATGAAAGTACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 864
ACK EIMK VVEAE AKSLNKGEFFL KILCPNSLC
GGTCTGATGTTGATAAATGGAGGCTTATAAAAAGTTTATGGAGACAGCAACACAGATGTTGTATCAAGTCTGTCGATGATGAAAT 960
GRIIGKN CNVIK SFMEQTNTHTV VSSVSDMNN
TATTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1056
YYVDRVITVSGSPDNCAKGEALVTEKMRKCFE
CAGGACCCGAGATATAATACAGATGGGTATGTTGGAGGATGCCCCCAATGCCAGGATGATGCCCTGCTATGTCGATACCCCTGGT 1152
QDAQNYNQQMGMFFGGMPFPGMPPA M S G Y P G
ATGAGAACCTACCCCTCCCTCACTCTGGTGAAGTGTGTTTACCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1248
MRQPYHP P S L L G E G S F Y Q G M Y G S P P Q E L E V T
TACCTATATACGAAACACTGTTGGTCTGATTTGGCAGAAAGCAACATATCAAAATCATGAGGATGTTCTGCTGATGATGATGATGAT 1344
YLYIPENTV G A C I G S K G T N I K E I M R M S G A R I K
ATACTGCCCCGAGGATGGAGGATGAATGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1440
ILPQKNGE M N G E R K G P S P Q L D E R K V I I T G S A E
GCCCATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1536
AQWKAQFYIFDKIKMEGNFQRLEEVHLRSEVM
GTACCAAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1632
VPRSMIGRIIGKGGQNVREMQRVSGAIVKLPD
CCAAACCAAAACCCGACAGATAGCAGCAAGTCTGCTGATCCATATAGGAGATTTTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1728
PNQNPPTDNDVEAVSIIIGHFYAIIQPAQRIRIS
CTGTTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1818
LVQQRGAPQCGMGGFPQRRPFCPPRPQQNKG

```

图 1 *PfiGF2BP1-1* 开放阅读框及编码的氨基酸序列  
实线表示 RRM 结构域, 长方形框表示 KH 结构域

### Fig. 1 *PfiGF2BP1-1* open reading frame sequences and corresponding amino acid sequences

Solid line represents the RRM domain, and the rectangular box represents the KH domain

### 2.2 PfiGF2BP1-1 的进化分析

系统进化树分析显示, PfiGF2BP1-1 先与马氏珠母贝 IGF2BP1 聚类为一支, 再与美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 和虾夷扇贝 (*Patinopecten*

*yessoensis*) IGF2BP2 组成软体动物分支, 与黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 等的 IGF2BPs 聚类为无脊椎动物分支, 最后与脊椎动物分支构成整

个进化树 (图 2)。说明 PfiGF2BP1-1 在进化距离上保守性比较高, 属于 IGF2BPs 家族, 暗示着功能上的保守性。

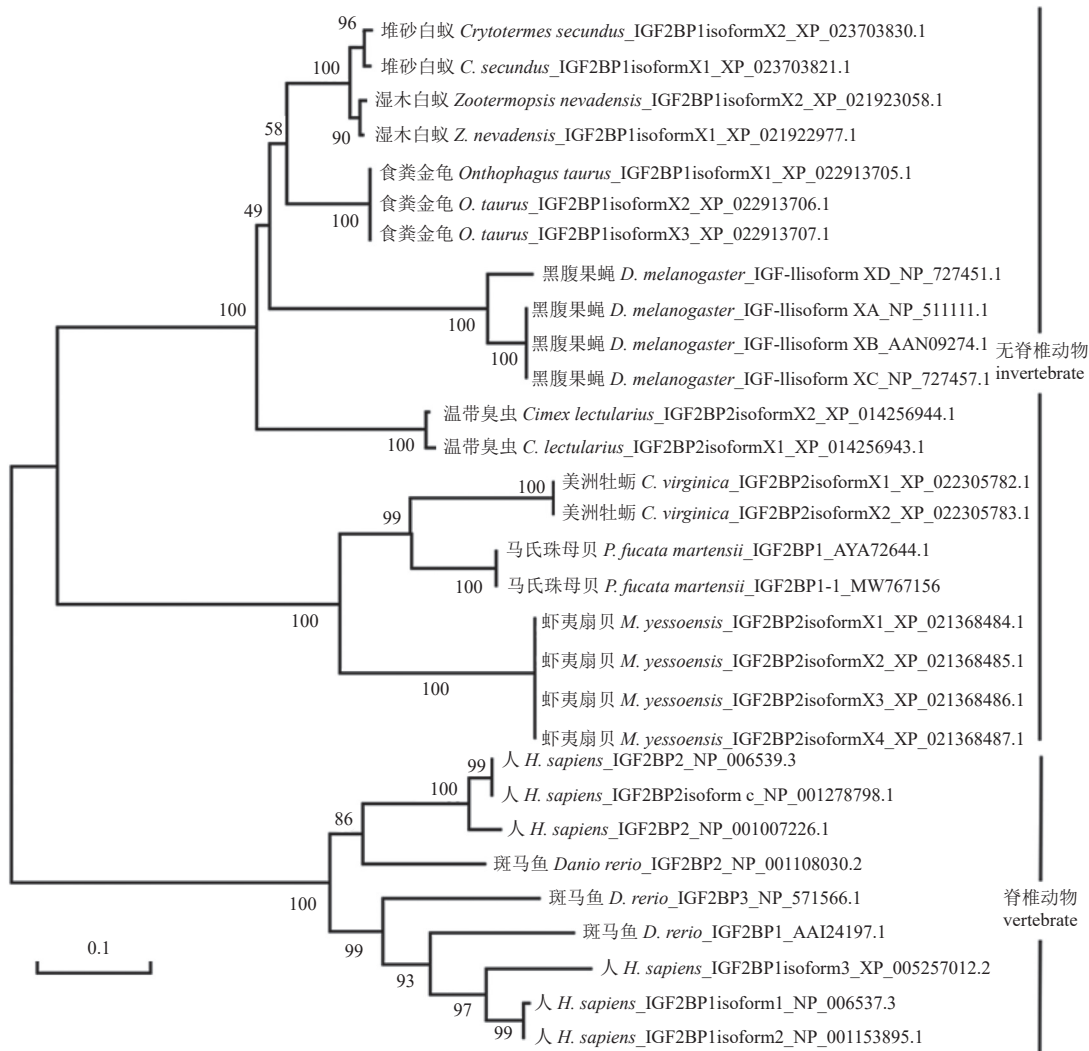


图 2 基于 IGF2BP 蛋白序列构建 NJ 系统进化树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on IGF2BP protein sequence

### 2.3 PfiGF2BP1-1 组织表达分布

在所检测的 8 个组织中, *PfiGF2BP1-1* 基因都有表达, 在闭壳肌中的表达量最高, 其次为足和外套膜, 在心脏、鳃、消化腺、肠道和性腺中表达量较低 (图 3)。

### 2.4 原核表达 PfiGF2BP1-1 蛋白

重组菌 *Transetta* (DE3)/pET-32a-*PfiGF2BP1-1* 经 IPTG 诱导后, 用 SDS-PAGE 电泳检测表达, 结果显示, 与对照相比, 在约 95 ku 附近出现了明显的蛋白表达增强条带 (图 4-a), 除去标签蛋白 (约 25 ku) 的大小, 表达的蛋白分子大小与理论预

测值 67 ku 基本相符。用重组菌菌液的上清液和沉淀分别进行电泳, 结果显示 *PfiGF2BP1-1* 在上清液中表达量更高 (图 4-b)。以上结果表明, *PfiGF2BP1-1* 蛋白在大肠杆菌中成功表达, 且以可溶性蛋白表达为主。

为优化 *PfiGF2BP1-1* 蛋白的表达条件, 实验进行了不同 IPTG 浓度诱导和不同时间诱导对 *PfiGF2BP1-1* 蛋白表达的摸索。结果显示, 在 37 °C、0.5 mmol/L IPTG、诱导时间为 8 h 时, *PfiGF2BP1-1* 融合蛋白的表达量最高 (图 5)。

重组蛋白经纯化后, 获得了较为单一的目的条带 (图 6-a), 大小约 95 ku, 除去 25 ku 的标签蛋

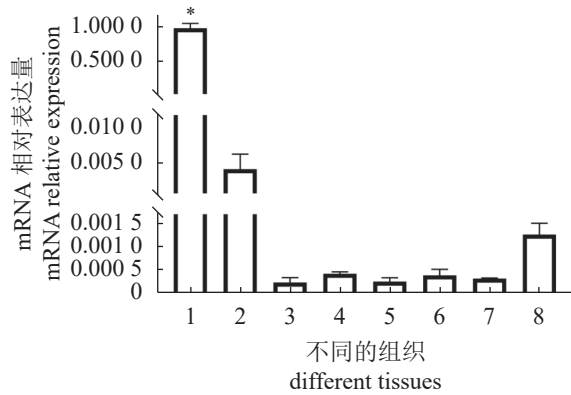


图 3 PflIGF2BP1-1 基因在不同组织中的表达量

1. 闭壳肌, 2. 足, 3. 心脏, 4. 鳃, 5. 消化腺, 6. 肠道, 7. 性腺, 8. 外套膜; “\*”代表不同组织间基因的表达有显著差异,  $P < 0.05$

Fig. 3 mRNA expression level of PflIGF2BP1-1 in different tissues

1. adductor muscle, 2. foot, 3. heart, 4. gill, 5. digestive gland, 6. intestinal tract, 7. gonad, 8. mantle; “\*” represents significant differences in the expression of genes in different tissues,  $P < 0.05$

白后约 70 ku, 与前期预测的蛋白分子量 66.941 ku 大小相近。将纯化后的蛋白质进行 Western-blot 鉴定, 结果显示, 在 95 ku 检测到特异性条带(图 6-b)。

### 2.5 重组蛋白 IGF2BP1-1 对矿化相关基因表达的影响

外套膜原代细胞在 IGF2BP1-1 的刺激下, *MSI7* 基因的表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 随着 IGF2BP1-1

刺激浓度的升高, *MSI7* 基因的表达也随之增强, 表达量分别为对照组的 1.83 倍 (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 2.23 倍 (5  $\mu\text{g/mL}$ )。 *Nacrein* 基因表达量也有一定幅度的升高, 最高表达量为对照组的 1.43 倍 (5.0  $\mu\text{g/mL}$ )。而 *Accbp* 基因表达量在浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  时, 与对照组表达有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 为对照组的 2.08 倍; *Aspein*、*BMP*、*N16* 和 *Pif* 这 4 个基因的表达水平在不同 IGF2BP1-1 浓度刺激下均没有发生显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。

### 3 讨论

本研究获得的 PflIGF2BP1-1 cDNA 全长为 7 348 bp, 含 1 818 bp 的 ORF, 编码 605 个氨基酸, 而范刚刚等<sup>[12]</sup>克隆的马氏珠母贝 *IGF2BP1* 基因的 cDNA 全长序列开放阅读框长 1 737 bp, 编码 579 个氨基酸, 二者的开放阅读框序列长度存在 81 个碱基 (23 个氨基酸) 的差距, 为了区分, 本研究将获得的马氏珠母贝 *IGF2BP1* 同源基因命名为 PflIGF2BP1-1。 IGF2BP1-1 蛋白含有 2 个 RRM 结构域和 4 个 KH 结构域, 这与已经发现的马氏珠母贝 IGF2BP1 及与其他脊椎动物如齿蝶鱼 (*Pantodon buchholzi*, GenBank: AIM47936.1)、无脊椎动物如厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*, GenBank: CAC5397443.1) 的 IGF2BP1 结构域相同。已有研究表明, IGF2BP1 家族由 6 个规范的 RNA 结合结

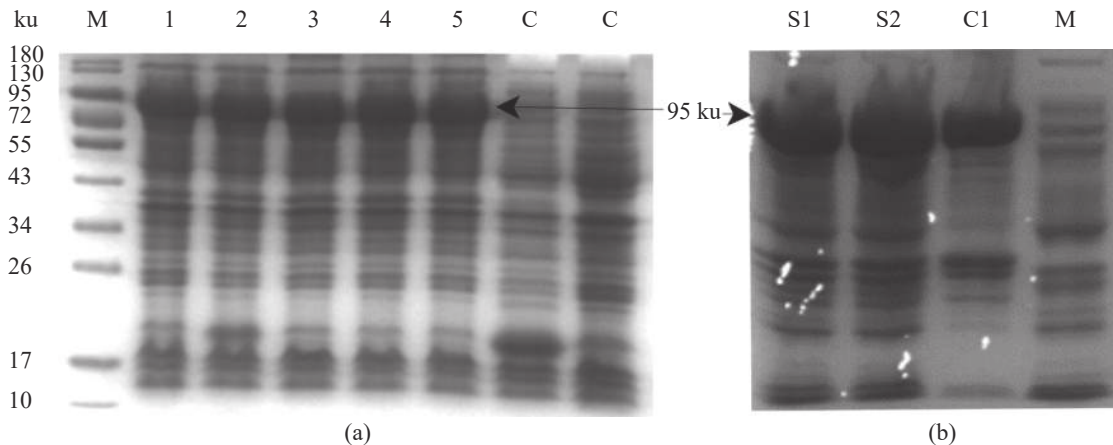


图 4 PflIGF2BP1-1 重组蛋白可溶性检测

M. 蛋白分子量标准, 下同; (a) 重组菌诱导 PflIGF2BP1-1 表达结果, 1~5. 平行样, 为最佳诱导条件下诱导的全菌蛋白, C. 对照; (b) 重组菌上清液和沉淀中的 PflIGF2BP1-1, S1 和 S2 为平行样, 代表诱导菌破碎的上清液; C1 为诱导菌破碎的沉淀

Fig. 4 PflIGF2BP1-1 recombinant protein solubility test

M. protein molecular weight marker, the same below; (a) results of induced PflIGF2BP1-1 protein expression in recombinant bacteria, 1-5. parallel samples: whole bacteria protein induced under optimal induction conditions C. control; (b) induced PflIGF2BP1-1 in recombinant bacteria supernatant (S1 and S2) and precipitation (C1)

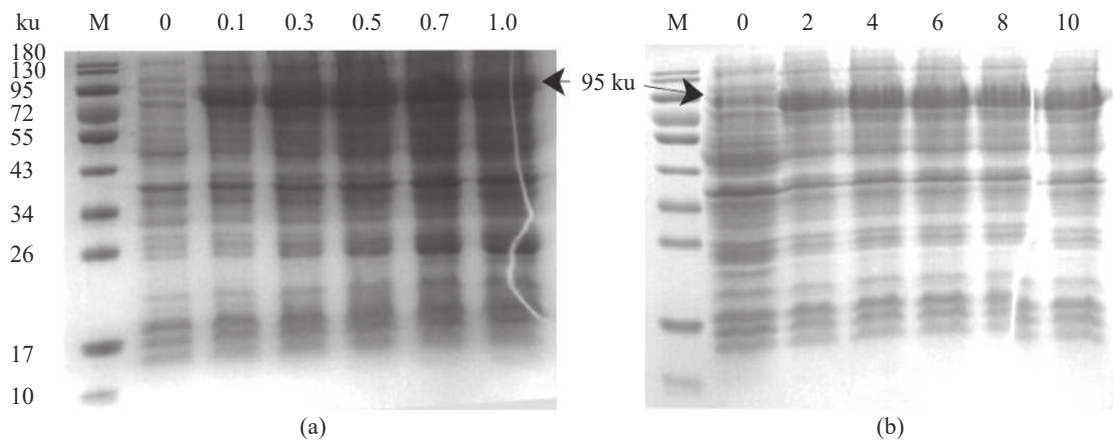


图5 PflGF2BP1-1 重组蛋白最佳诱导条件的检测

(a) 不同 IPTG 浓度 8 h 诱导下 pET-32a-*PflGF2BP1-1* 的表达, 诱导浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.0 mmol/L; (b) 不同诱导时间下 pET-32a-*PflGF2BP1-1* 的表达, 诱导时间分别为 0、2、4、6、8 和 10 h

Fig. 5 Detection of optimal induction conditions for PflGF2BP1-1 recombinant protein

(a) expression level of pET-32a-*PflGF2BP1-1* induced by different IPTG concentrations 8 h (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 mmol/L); (b) expression level of pET-32a-PflGF2BP1-1 at different induction time (0, 2, 4, 6, 8 and 10 h)



图6 重组蛋白 PflGF2BP1-1 的纯化及 Western blot

(a) 重组蛋白 PflGF2BP1-1 的纯化结果图; (b) 纯化的重组蛋白 PflGF2BP1-1 Western blot 结果分析, 1 和 2 为平行样

Fig. 6 Purification and Western blot of recombinant protein PflGF2BP1-1

(a) purification result of the recombinant protein PflGF2BP1-1; (b) Western blot analysis of the purified recombinant protein PflGF2BP1-1, 1 and 2 are parallel samples

构域构成, 包括 4 个 K 同源结构域 (KH1~4) 和 2 个 RNA 识别区域 (RRM1~2)<sup>[14]</sup>。RRM 结构域可能会以靶标依赖的方式来帮助稳定 IGF2BP1-RNA 复合物, 但是体外研究证实, KH 结构域在促进 IGF2BP 与 RNA 结合的过程中发挥更重要的作用, 其中 KH1/2 结构域通过控制调节 IGF2BP1 与 ACGF 3'-UTR 的顺式结合, 来稳定 IGF2BP1-RNA 复合物; KH3/4 结构域可能通过 N6-甲基腺苷 (m6A) 的方式来促进 IGF2BP1 与靶向 mRNA 的结合<sup>[15]</sup>。PflGF2BP1-1 在进化距离上保守性比较高,

这也暗示着其功能具有保守性。

为了区分已报道的 *PflGF2BP1* 基因, 实验在变异区设计了 *PflGF2BP1-1* 的定量引物, 利用 RT-qPCR 技术检测 *PflGF2BP1-1* mRNA 在马氏珠母贝成体的 8 个组织中的表达量, 结果显示, *PflGF2BP1-1* 在闭壳肌中表达量最高, 其次是足和外套膜。范嗣刚等<sup>[12]</sup> 针对其克隆的 *PflGF2BP1* 序列的 RT-qPCR 结果显示, 该基因在鳃和珍珠囊中的 mRNA 表达量较高, 组织分布表达模式的不同暗示这 2 个基因在功能上可能存在差异。

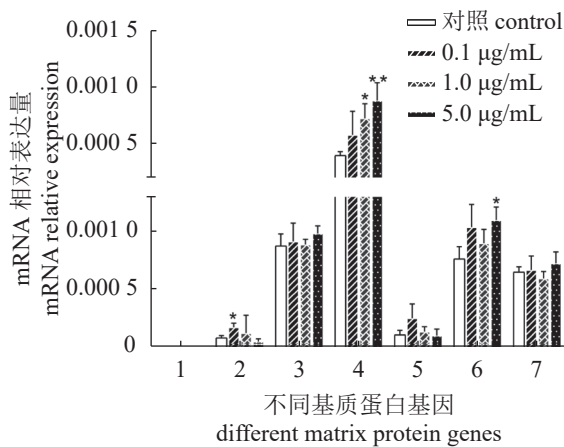


图 7 IGF2BP1-1 对矿化相关基因 mRNA 表达的影响  
“\*”代表基因的表达与对照相比有显著差异,  $P < 0.05$ , “\*\*”代表基因的表达与对照相比有极显著差异,  $P < 0.01$

Fig. 7 Effect of IGF2BP1-1 on mRNA expression of mineralization-related genes

1. *Aspein*, 2. *Accbp*, 3. *BMP*, 4. *SMI17*, 5. *N16*, 6. *Nacrein*, 7. *Pif*. “\*” means a significant difference in gene expression compared with the control group,  $P < 0.05$ . “\*\*” means an extremely significant difference in gene expression compared with the control group,  $P < 0.01$

*PfIGF2BP1-1* 在多种组织中表达, 推测其具有较广泛的生物学功能。已有的研究表明, *IGF2BP1* 在成骨中起重要作用<sup>[10-11]</sup>, 而 *PfIGF2BP1-1* 在马氏珠母贝的外套膜中有较高的表达, 预测其可能参与贝壳的生物矿化。

为了探究 *PfIGF2BP1-1* 基因生物矿化功能, 实验构建了 *PfIGF2BP1-1* 基因的原核表达载体, 并成功获得了 *PfIGF2BP1-1* 重组蛋白。*PfIGF2BP1-1* 在一定浓度范围内能引起马氏珠母贝外套膜原代细胞的 *Accbp*、*MSI7* 和 *Nacrein* 矿化基因的 mRNA 显著变化, 说明 *PfIGF2BP1-1* 可调节这 3 个基因的表达。对于 *MSI7* 和 *Nacrein*, *PfIGF2BP1-1* 在高浓度 (5 µg/mL) 时显著促进基因表达, 而对于 *Accbp*, 低浓度 (0.1 µg/mL) *PfIGF2BP1-1* 就能促进其表达量升高, 推测相应的壳基质蛋白基因对于 *PfIGF2BP1-1* 蛋白浓度的敏感度不同。同时, *PfIGF2BP1-1* 对于 *MSI7* 基因的调控具有浓度依赖性。

而 *PfIGF2BP1-1* 蛋白对于 *Aspein*、*BMP*、*N16* 和 *Pif* 这些矿化相关基因的表达无显著影响。以往的研究表明, *IGF2BPs* 是一种重要的、多功能的 RNA 代谢调控因子, 它可与目标 mRNA 结合, 从而调控目标 mRNA 的稳定, 防止其降解, 促进其翻译, 进而引起不同的生物学效应<sup>[16]</sup>。在本研究

中, *PfIGF2BP1-1* 可调节 *Accbp*、*MSI7* 和 *Nacrein* 的表达, 却对其他 4 个基因的表达无显著影响, 可能是不同的矿化基因对 *PfIGF2BP1-1* 蛋白的敏感性不同, 或者是 *PfIGF2BP1-1* 与不同的基因结合特性存在差异, 具体调控机制还有待进一步研究。有研究证明, *PfIGF2BP1-1* 调控的 *Accbp*、*MSI7* 和 *Nacrein* 同时参与珍珠层和棱柱层的调节<sup>[17-19]</sup>, 由此推测, *PfIGF2BP1-1* 在珍珠层和棱柱层两种矿化结晶层中都是重要的参与者, 在马氏珠母贝壳生物矿化中起调控作用。这些结果为研究马氏珠母贝生物矿化机制提供了新的研究资料。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Zhang C, Zhang R Q. Matrix proteins in the outer shells of molluscs[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 572-586.
- [2] Marie B, Joubert C, Tayalé A, et al. Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(51): 20986-20991.
- [3] Yuan P, Meng L, Wang N. *SOX12* upregulation is associated with metastasis of hepatocellular carcinoma and increases *CDK4* and *IGF2BP1* expression[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(17): 3821-3826.
- [4] Nielsen J, Kristensen M A, Willemoes M, et al. Sequential dimerization of human zipcode-binding protein IMP1 on RNA: a cooperative mechanism providing RNP stability[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(14): 4368-4376.
- [5] Hansen T V O, Hammer N A, Nielsen J, et al. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(10): 4448-4464.
- [6] Ioannidis P, Kottaridi C, Dimitriadis E, et al. Expression of the RNA-binding protein CRD-BP in brain and non-small cell lung tumors[J]. *Cancer Letters*, 2004, 209(2): 245-250.
- [7] Bell J L, Wächter K, Mühleck B, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (*IGF2BPs*):

- post-transcriptional drivers of cancer progression?[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(15): 2657-2675.
- [ 8 ] Perycz M, Urbanska A S, Krawczyk P S, *et al.* Zipcode binding protein 1 regulates the development of dendritic arbors in hippocampal neurons[J]. *Journal of Neuroscience*, 2011, 31(14): 5271-5285.
- [ 9 ] Fabrizio J, Hickey C A, Stabrawa C, *et al.* Imp (IGF-II mRNA-binding protein) is expressed during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*[J]. *Fly*, 2008, 2(1): 47-52.
- [10] Pillas D, Hoggart C J, Evans D M, *et al.* Genome-wide association study reveals multiple loci associated with primary tooth development during infancy[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(2): e1000856.
- [11] 张奕奋. miR-150-5p 调控 BMSCs 成骨分化在老年性骨质疏松发生中的作用研究 [D]. 深圳: 深圳大学, 2020.
- Zhang Y F. Study on the role of miR-150-5p in the osteogenic differentiation of BMSCs in the occurrence of senile osteoporosis[D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2020 (in Chinese).
- [12] 范嗣刚, 郭奕惠, 王珍珍, 等. 合浦珠母贝 *IGF2BP1* 基因的克隆与表达分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(6): 2470-2478.
- Fan S G, Guo Y H, Wang Z Z, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *IGF2BP1* from *Pinctada fucata*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(6): 2470-2478 (in Chinese).
- [13] Zhang H, He M X, *et al.* The role of a new insulin-like peptide in the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Scientific reports*, 2020, 10(1): 1-12.
- [14] Wächter K, Köhn M, Stöhr S, *et al.* Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains[J]. *Biological Chemistry*, 2013, 394(8): 1077-1090.
- [15] Huang X W, Zhang H, Guo X R, *et al.* Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) in cancer[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018, 11(1): 88.
- [16] 张莉莉, 李玉坤. 生长因子对骨代谢影响的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2012, 39(2): 121-126.
- Zhang L L, Li Y K. Influence of growth factors to bone metabolism: research advances[J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2012, 39(2): 121-126 (in Chinese).
- [17] Song J S, Hwang D H, Kim S O, *et al.* Comparative gene expression analysis of the human periodontal ligament in deciduous and permanent teeth[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61231.
- [18] Zhou J B, Bi C L, Ching Y Q, *et al.* Inhibition of LIN28B impairs leukemia cell growth and metabolism in acute myeloid leukemia[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2017, 10(1): 138.
- [19] Ma Z J, Huang J, Sun J, *et al.* A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(32): 23253-23263.



## Identification of *IGF2BP1* and its effect on the expression of mineralization-related genes in *Pinctada fucata martensii*

XIONG Panpan<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Hua<sup>1,2,3\*</sup>, HE Maoxian<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Insulin-like growth factor 2 binding proteins (IGF2BPs) are the important RNA metabolism regulators involved in many different biological processes. In order to study whether *IGF2BP1* plays a role in biomineralization of pearl oysters, this study identified a *Pinctada fucata martensii* *IGF2BP1* gene, named *PfIGF2BP1-1*. The cDNA length of the gene is 7 348 bp, with an ORF of 1 818 bp and encoding 605 amino acids. Multiple sequence alignments and phylogenetic analysis showed that *PfIGF2BP1-1* has two RRM domains and four KH domains, which are homologous to IGF2BPs from other species. Real-time fluorescent quantitative PCR results showed that *PfIGF2BP1-1* was expressed in eight tissues of *P. fucata martensii*, with the highest expression level in adductor muscle tissue, followed by foot and mantle tissue. The pET-32a prokaryotic expression vector was used to construct a recombinant plasmid containing the mature polypeptide region of *PfIGF2BP1-1* and the protein was successfully expressed. The optimal conditions for inducing protein expression were that the bacteria were cultured at 37 °C for 8 hours with 0.5 mmol/L IPTG. The *PfIGF2BP1-1* protein can stimulate the coat membrane primary cells of *P. fucata martensii* and significantly increase the expression level of cell matrix protein genes *Accbp*, *MSI7*, and *Nacrein* in primary mantle cells. The results indicated that the *PfIGF2BP1-1* protein is involved in the biomineralization process of *P. fucata martensii* through inducing the expression of shell mineralization-related genes.

**Key words:** *Pinctada fucata martensii*; insulin-like growth factor 2 binding protein 1; protein expression; shell mineralization-related genes

**Corresponding authors:** ZHANG Hua. E-mail: hua2020@scsio.ac.cn;

HE Maoxian. E-mail: hmx@scsio.ac.cn

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-49); National Natural Science Foundation of China (42006106); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515011434); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2020B1212060058)