

文章编号: 1674 - 5566(2011)05 - 0669 - 08

大口黑鲈胰岛素基因 cDNA 全序列的克隆及其编码蛋白的结构分析

靳利娜, 陈乃松, 肖温温, 梁勤朗

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 胰岛素在鱼体内是一种重要的内分泌激素, 其主要的生理功能是调控鱼体的代谢和血糖稳定。用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 技术克隆了大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 胰岛素基因 cDNA 全序列, 并对其编码的氨基酸序列和蛋白结构进行了分析。结果显示, 该基因 cDNA 序列全长 665 bp, 其中包括 5' 端非翻译区 101 bp、3' 端非翻译区 213 bp 和开放阅读框 351 bp。该开放阅读框编码包括信号肽、B 链、C 肽和 A 链的 116 个氨基酸, 其分子量约为 12.7 ku, 理论等电点为 5.44。在线分析表明: 推测的大口黑鲈前胰岛素原氨基酸序列存在一段跨膜区; 并存在信号肽序列, 信号肽分裂位点在 Ala24-Phe25 处。大口黑鲈与其他硬骨鱼类及脊椎动物的前胰岛素原氨基酸序列的比对结果显示, 大口黑鲈前胰岛素原 A 链和 B 链氨基酸序列均高度保守, 与其他硬骨鱼类的前胰岛素原氨基酸序列相似度较高, 为 75% ~ 94%, 但与其他脊椎动物的相似度较低, 为 59% ~ 62%。用邻接法构建的系统进化树显示, 大口黑鲈前胰岛素原与同为鲈形目的岩鲈、红甘鲈和尼罗罗非鱼的亲缘关系较近。

胰岛素是由胰岛 β 细胞受内源性或外源性物质如葡萄糖、乳糖、核糖、精氨酸和胰高血糖素等的刺激而分泌的一种蛋白激素^[1], 是糖代谢调节的重要参与者, 具有降低血糖的生理功效, 其分泌不足或者功能障碍会引起糖尿病。对人和部分哺乳类动物胰岛素的研究已有很大进展。鱼类的胰岛素也受到越来越多的关注^[2-3], 经研究发现, 它除了在葡萄糖代谢调节中发挥重要作用外^[4], 还能促进葡萄糖和氨基酸的吸收, 增加蛋白合成^[5], 促进鱼体生长^[6]。关于鱼类胰岛素基因和氨基酸序列的研究已有不少报道, 种类包括: 条斑星鲈 (*Verasper moseri*)^[7]、齿鲈 (*Pantodon buchholzi*)^[8]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[9]、大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)^[10] 和鲤 (*Cyprinus carpio*)^[11] 等。

研究亮点: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术首次克隆了大口黑鲈胰岛素基因的 cDNA 全序列, 并对其基因结构特征以及相应的蛋白质序列进行了分析, 为进一步研究大口黑鲈营养与内分泌的关系, 鱼类系统进化和胰岛素在基因工程中的应用等奠定了基础。

关键词: 大口黑鲈; 胰岛素; 克隆; cDNA 序列; 编码蛋白; 同源性分析

中图分类号: S 917

文献标志码: A

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 又名加州鲈鱼, 属硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鲈形目 (Perciformes), 棘臀鱼科 (Centrarchidae), 黑鲈属 (*Micropterus*), 原产于美洲的密西西比河水系, 是典型的肉食性鱼类。因其肉质鲜美、抗病力强、生长迅速和适温范围广等优点, 在 20 世纪 80 年代被引种到国内开展养殖生产。目前大口黑鲈在我国的养殖产量高达 10 多万吨, 已成为重要的水产养殖品种。有研究指出, 大口黑鲈如同其它肉食性鱼类, 对饲料中的碳水化合物耐受性低^[12-13]。本研究拟通过 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 技术克隆大口黑鲈胰岛素 cDNA 的全序列, 并对其基因结构特征以及相应的蛋白质序列进行了初步分析, 拟为进一步研究大口黑鲈内分泌系统的调控机制奠定基础。

收稿日期: 2011-03-29 修回日期: 2011-05-18

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农攻字 2006 第 6-4 号)

作者简介: 靳利娜 (1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物分子营养学。E-mail: siben2008@hotmail.com

通讯作者: 陈乃松, E-mail: nschen@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

实验用鱼取自本实验室自养的大口黑鲈,体重为(50±1)g。

1.1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本), 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa, 日本), RACE 试剂盒 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国), PCR 扩增试剂盒 Advantage® 2 PCR Kit (Clontech, 美国), 以及 pMD19-T 载体购自上海皓嘉生物科技发展有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 TIANgel Midi Purification Kit, 感受态细胞 *E. coli* DH5α 购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.3 仪器

本实验所用仪器有 PCR 仪 (TP600, TaKaRa, 日本)、紫外分光光度计 (T6, 北京普析通用有限公司)、高速冷冻离心机 (TGL-16, 湖南湘仪集团) 和电泳仪 (DYY-6C, 北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 大口黑鲈肝脏总 RNA 提取

将大口黑鲈活体解剖, 取出肝脏组织, 迅速用液氮研磨。取约 50 mg 置于 1.5 mL 离心管中, 按照 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒推荐的方法提取总 RNA。使用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, 观察是否有 28S, 18S 和 5S 3 条清晰的条带。用紫外分光光度计测定其 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值, 检测其纯度。

1.2.2 cDNA 的扩增、克隆和序列测定

根据 GenBank 已经公布的尼罗罗非鱼、红甘鲈、大麻哈鱼和大西洋鲑鱼的前胰岛素原 cDNA 序列设计相应的简并引物 (表 1)。用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 将部分总 RNA 反转录成 cDNA, 经 PCR 扩增得到前胰岛素原 cDNA 的一段序列。根据已知的序列分别设计了 3' RACE 扩增的特异性引物和巢式引物, 以及 5' RACE 扩增的特异性引物 (表 1)。再使用 SMART-RACE 方法扩增得到前胰岛素原基因 cDNA 的全长序列。3' RACE 和 5' RACE 均使用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage® 2 PCR Kit 试剂盒进行扩增。上述引

物采用 Primer 5.0 软件并结合 BLAST 程序设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测, 用 TIANgel Midi Purification Kit 回收目的片段的 PCR 产物, 进行纯化。将回收产物插入 pMD19-T 载体中, 再转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 经含有 Amp⁺、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基平板培养后, 挑选白斑。最后经扩大培养, 菌液被送至上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

表 1 前胰岛素原 cDNA 扩增的引物

Tab. 1 Primers for preproinsulin cDNA amplification

引物名称	引物序列
上游简并引物	5'-CTGTGGCTCCAGDCCKTCTCCSTGCT-3'
下游简并引物	5'-GCCTCGGCTTCACCATCATYTCATCTGGT-3'
3'-GSP	5'-ACCGTCTCCGTGCTGGTCTACTG-3'
3'-NGSP	5'-TGCTGGTCTTACTGATCGTATCGTGGC-3'
5'-GSP	5'-CTGGCTTCACCATCATTTCCATCTG-3'

1.2.3 序列分析

登录 NCBI 用 BLAST 分析核苷酸和氨基酸序列的相似性; 通过 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定其开放阅读框 (ORF); 用 ProtParam 程序预测氨基酸序列的物理参数; 用 Sigal P 3.0 server 预测信号肽; 用 TMpred server 分析氨基酸跨膜结构^[14]; 用 Mega 4.1 软件构建大口黑鲈与其他脊椎动物的前胰岛素原氨基酸序列的 NJ (Neighbor-joining) 系统进化树, 并用重复 1 000 次的自展法 (Bootstrap Method) 检验计算各分支的置信值; 用 Jpred 3 预测蛋白质二级结构; 通过 ESyPred3D 提交后分析蛋白质三级结构^[15]。

2 结果

2.1 大口黑鲈肝脏总 RNA 和 PCR 扩增电泳图

大口黑鲈肝脏总 RNA 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果显示, RNA 28S, 18S 和 5S 3 条清晰的条带, 见图 1(a)。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 2.0, 表明提取的总 RNA 纯度较高, 可用于 RT-PCR 及 RACE 扩增。用 3'-GSP, 3'-NGSP 分别与试剂盒中的通用引物 UPM, NUM 进行 3'RACE 扩增, 获得 1 条约 533 bp 的特异带, 见图 1(b); 同样用 5'-GSP 和通用引物 UPM 进行 5'RACE 扩增, 获得 1 条约 432 bp 的特异带, 见图 1(c)。

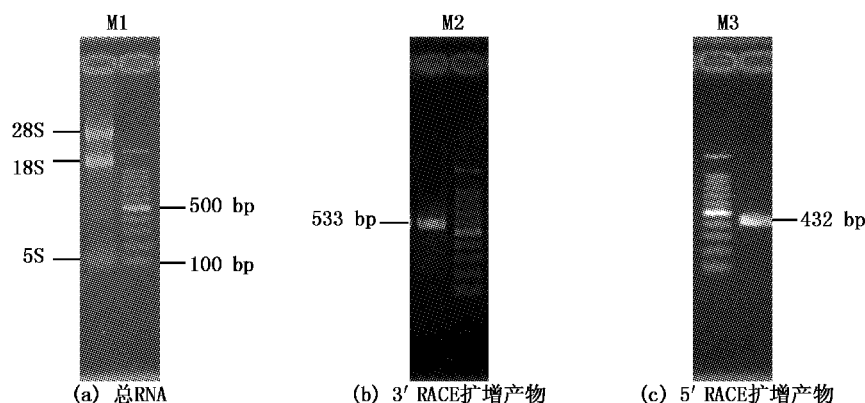


图1 大口黑鲈肝脏总 RNA 和 3',5'RACE PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of total RNA and 3', 5'RACE PCR products made from largemouth bass liver
M1、M2、M3 为 DNA 分子量标准(100 bp 梯度)。

2.2 大口黑鲈前胰岛素原 cDNA 序列的特征分析

将 3'RACE 和 5'RACE 扩增产物的测序结果进行拼接,获得了大口黑鲈前胰岛素原的全长 cDNA 序列。此序列已在 GenBank 登录,登录号为 HQ418228。该 cDNA 全长 665 bp。其中包括开放阅读框长度为 351 bp,可编码 116 个氨基酸残基;5'端非翻译区 101 bp 和 3'端非翻译区 213 bp。3'末端含有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAAA 和 Poly A 尾。

2.3 大口黑鲈前胰岛素原氨基酸序列分析及与其他鱼类前胰岛素原氨基酸序列的比对

根据获得的大口黑鲈前胰岛素原的 cDNA 全序列推导出相应的 116 个氨基酸残基,其原子总数量为 1 769,分子式为 C₅₇₁H₈₇₉N₁₄₉O₁₅₉S₁₁,分子量约为 12.7 ku,理论等电点为 5.44。并检测出其不稳定指数为 39.26,显示此蛋白质性质稳定。亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和脯氨酸含量比较高,分别占总氨基酸的 11.2%、8.6%、8.6%、8.6% 和 7.8%;苏氨酸和色氨酸含量较少,分别为 0.9% 和 1.7%。其中,带正电荷氨基酸(精氨酸和赖氨酸)残基有 8 个,带负电荷氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)残基有 11 个。

将大口黑鲈与红甘鲈 (*Seriola dumerili*, BAE96120.1), 条斑星鲈 (*Verasper moseri*, Q9W7R2.1), 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, AAD22742.1), 美洲鲈 (*Lophius americanus*, P69045.1), 大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*, P04667.2), 齿蝶鱼 (*Pantodon buchholzi*, Q98TA8.1), 大西洋鲑 (*Salmo salar*,

ACI69187.1), 鲤 (*Cyprinus carpio*, P01335.1), 斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_571131.1) 的前胰岛素原氨基酸的序列进行比对。结果显示,前胰岛素原 A 链和 B 链氨基酸序列均高度保守(图 2)。与其他物种类似,大口黑鲈前胰岛素原的 A 链内存在二硫键(C101-C106,图 2),A 链与 B 链间也有 2 处存在二硫键(C32-C102,C44-C115,图 2)。

2.4 前胰岛素原的结构预测分析

经 TMpred 分析表明前胰岛素原存在一段跨膜区,位于 Val17-Gly33 氨基酸区。用 Sigal P 程序中 NN 和 HMM 模型对信号肽的分析表明,大口黑鲈前胰岛素原存在信号肽序列;信号肽断裂位点在 Ala24-Phe25 处,HMM 模型显示其可信度为 0.982。经参考其他物种胰岛素成熟肽断裂位点,推测大口黑鲈胰岛素成熟肽 A 链的切割位点在 Arg95-Gly96,B 链的切割位点分别在 Ala24-Phe25 和 Pro53-Lys54。这样大口黑鲈胰岛素 A 链包含 21 个氨基酸,B 链包含 29 个氨基酸。

大口黑鲈前胰岛素原经 Jpred3 软件对其二级结构预测,发现以不规则卷曲为主。在第 3~19、34~44、100 以及第 108~113 氨基酸残基处存在 α 螺旋,在第 29~31 以及 97~99 氨基酸残基处存在 β 折叠。

根据 YANG 等 (<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2KQP>) 报道的人胰岛素原 (PDB id: 2kqp) A 链为模板,通过 ESyPred3D 预测了大口黑鲈前胰岛素原的三级结构,发现其与模板的同源性为 35.9%。其三级结构见图 3。

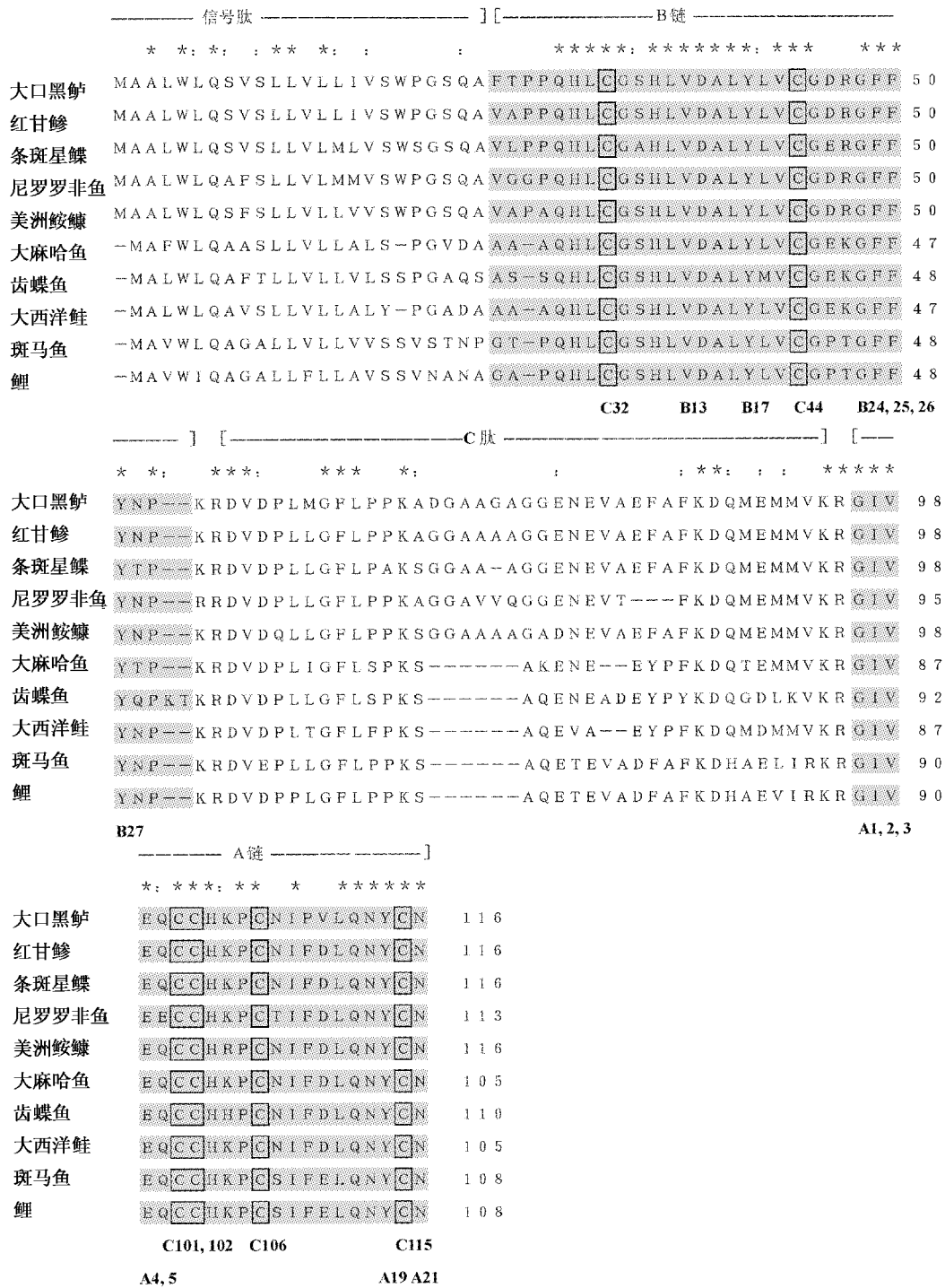


图 2 大口黑鲈与其他鱼类前胰岛素原氨基酸序列的比对

Fig. 2 Alignment comparison of preproinsulin amino acid sequences between largemouth bass and other fishes

-表示比较时的氨基酸缺口; *表示保守的氨基酸残基; :表示次保守的氨基酸残基; 灰色阴影部分代表前胰岛素原 A 链及 B 链; 方框代表 A 链内及 A 链与 B 链间二硫键位点。

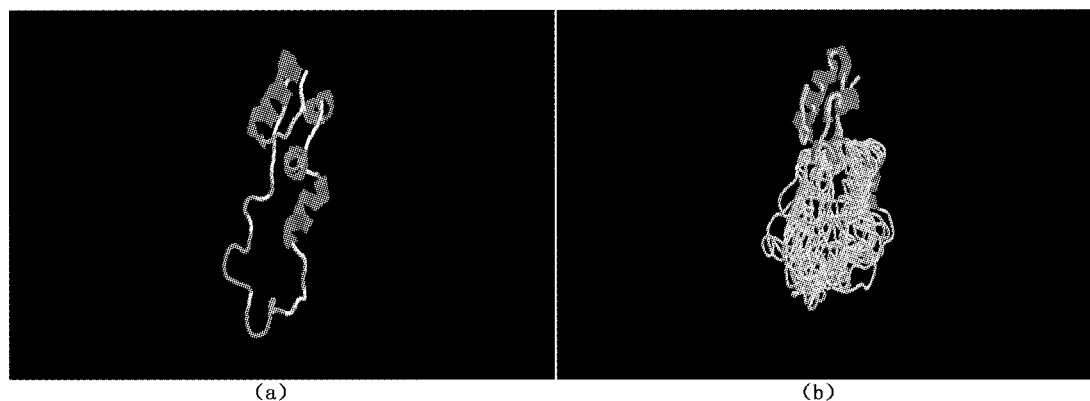


图3 ESyPred 3D 预测的大口黑鲈前胰岛素原三级结构(a)及人胰岛素原三级结构(b)

Fig. 3 Tertiary structure of largemouth bass preproinsulin (a) deduced by ESyPred 3D and tertiary structure of human proinsulin (b)

2.5 大口黑鲈前胰岛素原氨基酸序列同源性及分子进化分析

大口黑鲈前胰岛素原氨基酸序列经 Blast 比对发现,其与硬骨鱼类序列相似度较高,介于

94% ~ 75% 之间。其中,与同为棘臀鱼科的红甘鲈序列相似度最高,为 94%。与其他脊椎动物类序列相似度较低,介于 62% ~ 59% 之间(表 2)。

表 2 大口黑鲈与其他物种前胰岛素原序列的相似性比较

Tab. 2 Similarity comparison for preproinsulin gene sequences between largemouth bass and other species

物 种	GenBank 登录号	相似度
红甘鲈(<i>Seriola dumerili</i>)	BAE96120.1	110/116(94%)
岩钝鲈(<i>Ambloplites rupestris</i>)	AAK28708.1	83/91(91%)
美洲鳊鲈(<i>Lophius americanus</i>)	P69045.1	106/116(91%)
条斑星鲈(<i>Verasper moseri</i>)	BAA82315.1	106/116(91%)
黑青斑河豚(<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	CAF97344.1	104/116(89%)
尼罗罗非鱼(<i>Oreochromis niloticus</i>)	P81025.2	101/116(87%)
青鲈(<i>Oryzias latipes</i>)	BAF34949.1	93/110(84%)
虹鲈(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	NP_001118142.1	80/98(81%)
大西洋鲑(<i>Salmo salar</i>)	ACI69187.1	91/114(79%)
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	NP_571131.1	90/114(78%)
齿鲈(<i>Pantodon buchholzi</i>)	AAK28712.1	91/116(78%)
白亚口鱼(<i>Catostomus commersonii</i>)	AAK28709.1	88/114(77%)
似鲈月眼鱼(<i>Hiodon alosoides</i>)	AAK54684.1	90/116(77%)
卡特拉鱼(<i>Catla catla</i>)	AAK51558.1	87/114(76%)
鲤(<i>Cyprinus carpio</i>)	P01335.1	87/114(76%)
铠甲弓背鱼(<i>Chitala chitala</i>)	AAK28710.1	90/117(76%)
银龙鱼(<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>)	AAK28713.1	87/116(75%)
象鼻鱼(<i>Gnathonemus petersii</i>)	AAK28711.1	70/93(75%)
斑胸草雀(<i>Taeniopygia guttata</i>)	XP_002198969.1	73/116(62%)
非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	NP_001079350.1	73/116(62%)
红原鸡(<i>Gallus gallus</i>)	NP_990553.1	70/114(61%)
智人(<i>Homo sapiens</i>)	AAA59179.1	70/114(61%)
黄毛鼠(<i>Rattus losea</i>)	ABB89743.1	68/115(59%)

用 Clustal W 软件将大口黑鲈与其他已报道的硬骨鱼类的前胰岛素原氨基酸序列一起进行比对,再用 Mega 4.1 软件以 NJ 法构建系统树(图 4)。结果表明,大口黑鲈前胰岛素原氨基酸序列与同为鲈形目的岩钝鲈、红甘鲈和尼罗罗非鱼的

序列同源性较高,与其他硬骨鱼类的同源性较低。

3 讨论

经对比大口黑鲈与其他脊椎动物前胰岛素

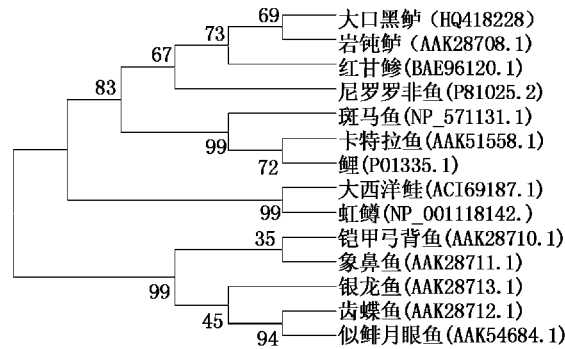


图4 大口黑鲈与其他硬骨鱼类前胰岛素原氨基酸序列的NJ系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree of preproinsulin amino acid sequences of largemouth bass and other bony fishes

括号内的编号代表 GeneBank 序列号;节点上的数字为重复 1 000 次的自展法 (Bootstrap Method) 检验置信值。

原的氨基酸序列发现,其功能性二硫键位点高度保守,这对维持胰岛素蛋白的构象有重要作用。前胰岛素原 B 链 N 端的残基可能对维持胰岛素六聚体结构稳定性也有重要意义,但其保守性较弱^[16]。通常认为的胰岛素受体结合区域: B13 (V), B17 (Y), B24-27 (GFFY), A1-5 (GIVEQ), A19 (Y), A21 (N) (图 2) 是高度保守的。其中,位于 B24 的甘氨酸, B25 的苯丙氨酸, A2 的异亮氨酸, A3 的缬氨酸和 A19 的酪氨酸可能与受体以及其它残基发生作用,参与维持受体结合构型的稳定。研究发现,罗非鱼中的位点 A5 发生替换,会导致胰岛素与受体结合特异性降低^[8]。胰岛素成熟肽 A 链和 B 链序列保守度较高,但信号肽和 C 肽序列差异较大,这种差异可能是在物种进化过程中引起的变异。C 肽曾被认为是胰岛素成熟肽合成的中间产物,无实际生物学意义。但近年来在人类的相关研究中发现, C 肽可以与胰岛素共同抑制葡萄糖新生,具有防止糖尿病并发症发生的生物学功能^[17]。C 肽在鱼类中是否发挥类似的生物学功能还有待进一步的研究。

胰岛素多肽结构已被用于硬骨鱼类和其他脊椎动物系统进化的相关分析研究。既可以分析淡水和海水硬骨鱼类间的进化距离^[11],又可以用于确认鱼类的系统进化地位^[18]。本文中也对前胰岛素原序列进行进化树分析,发现大口黑鲈胰岛素与同为鲈形目的岩钝鲈、红甘鲈和尼罗罗非鱼的同源性最高。这与大口黑鲈的生物学分类

地位相吻合,也为进一步分析大口黑鲈与其他物种的进化关系提供了依据。但有研究认为,低分子量或者高度保守的多肽激素不能用于构建系统进化树,使用含有变化较大的 C 肽区域的序列则可以避免这一问题,达到成功构建系统进化树的目的^[19]。

硬骨鱼类,尤其是肉食性鱼类(如:大口黑鲈),不能有效利用饲料中的碳水化合物为其自身提供能量^[12-13,20]。关于鱼类不耐受葡萄糖的原因目前尚不完全清楚,主要有以下 3 种假说:(1)胰岛素缺乏说,认为鱼类对葡萄糖的不耐受性是由鱼体内胰岛素的缺乏造成的,至少是在胰岛素分泌水平上的不足^[21];(2)胰岛素受体缺乏说,认为鱼体内胰岛素受体数量较少,而胰岛素在结合胰岛素受体激活受体酪氨酸激酶活性后才能发挥作用,这使得血浆中的葡萄糖清除率较低,导致鱼类对葡萄糖不能有效利用^[22];(3)胰岛素受体后事件说,可能是胰岛素受体 β 亚基受胰岛素刺激的酪氨酸激酶活性出现削弱或者胰岛素受体内化和固定机制出现故障^[23],致使胰岛素不能正常发挥功能。但已开展的研究显示,鱼体内的胰岛素水平受到饥饿^[24]、再投喂^[5,25]以及饲料中碳水化合物水平^[26]和氨基酸等营养状况的影响。这说明胰岛素的分泌受到营养状况和饲料成分的影响。本研究的实施为进一步开展大口黑鲈营养与内分泌关系的研究奠定基础。在本研究的基础上,我们已开展了饲料中不同碳水化合物与脂肪比对大口黑鲈肝脏胰岛素 mRNA 表达影响的研究,揭示出大口黑鲈肝脏胰岛素 mRNA 表达丰度与饲料中碳水化合物含量有关联性。本研究也为开展大口黑鲈胰岛素 mRNA 表达调控的研究^[27]以及建立胰岛素的酶联免疫检测技术^[28]奠定了基础。

本研究的开展也为研究大口黑鲈胰岛素与类胰岛素生长因子的结构和功能的关系以及它们的相互作用提供了帮助。类胰岛素生长因子-I (IGF-I)与胰岛素有很高的序列同源性、相似的三维结构、共同的祖先分子,具有调节鱼类代谢,生长和分化等生理功能^[22]。有研究表明,IGF-I 可以与胰岛素的受体结合而产生类胰岛素的作用,但 IGF-I 与胰岛素受体结合的特异性较低^[29]。这种交叉作用的生理意义尚不清楚。

参考文献:

- [1] PESSIN J E, SALTIEL A R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 106 (2): 165-170.
- [2] MOMMSEN T, PLISETSKAYA E. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation [J]. *Reviews in Aquatic Sciences*, 1991, 4 (2/3): 225-259.
- [3] NAVARRO I, ROJAS P, GUTIÉRREZ J, et al. Insights into insulin and glucagon responses in fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 27 (3): 205-216.
- [4] ENES P, SANCHEZ-GURMACHES J, NAVARRO I, et al. Role of insulin and IGF-I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 2010, 157(4): 346-353.
- [5] MONTSERRAT N, NAVARRO M I, GUTIÉRREZ J, et al. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *General Comparative Endocrinology*, 2007, 150 (3): 462-472.
- [6] DUAN C, HIRANO T. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the in-vitro uptake of sulphate by eel branchial cartilage: evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulphation factors [J]. *Journal of Endocrinology*, 1992, 133 (2): 211-219.
- [7] ANDOH T, NAGASAWA H. Two molecular forms of insulin from barfin flounder, *Verasper moseri*, are derived from a single gene [J]. *Zoological Science*, 1998, 15 (6): 931-937.
- [8] AL-MAHROUKI A A, IRWIN D M, YOUSON J H, et al. Molecular cloning of preproinsulin cDNAs from several osteoglossomorphs and a cyprinid [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 174 (1/2): 51-58.
- [9] MANSOUR M, WRIGHT J R JR, POHAJDAK B. Cloning, sequencing and characterization of the tilapia insulin gene [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 1998, 121 (3): 291-297.
- [10] SOROKIN A V, PETRENKO O I, KAVSAN V M, et al. Nucleotide sequence analysis of the cloned salmon preproinsulin cDNA [J]. *Gene*, 1982, 20 (3): 367-376.
- [11] HAHN V, WINKLER J, RAPOPORT T A, et al. Carp preproinsulin cDNA sequence and evolution of insulin genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11 (13): 4541-4552.
- [12] COWEY C B, WALTON M J. Intermediary metabolism [M]// HALVER J E. *Fish nutrition*. 2nd ed. London: Academic Press, 1989: 259-329.
- [13] GOODWIN A E, LOCHMANN R T, MITCHELL A J, et al. Massive hepatic necrosis and nodular regeneration in largemouth bass fed diets high in available carbohydrate [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2002, 33 (4): 466-477.
- [14] 王玉梅, 夏建红, 喻达辉, 等. 大珠母贝珍珠质相关基因 N36 和 N45 的克隆与序列特征分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20 (1): 8-14.
- [15] 董姝君, 汪桂玲, 李家乐, 等. 三角帆蚌 AMP 基因 cDNA 全序列的克隆及分子特征研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20 (3): 342-349.
- [16] CONLON J M, ANDREWS P C, THIM L, et al. The primary structure of glucagon-like peptide but not insulin has been conserved between the American eel, *Anguilla rostrata* and the European eel, *Anguilla anguilla* [J]. *General Comparative Endocrinology*, 1991, 82 (1): 23-32.
- [17] 周士新, 谢建明, 孙啸, 等. 不同物种间胰岛素及其编码 mRNA, DNA 序列比较与分析 [J]. *东南大学学报*, 2003, 33 (3): 292-295.
- [18] CONLON J M, FAN H, FRITZSCH B. Purification and structural characterization of insulin and glucagon from the bicir polypterus senegalensis (Actinopterygii: Polypteriformes) [J]. *General Comparative Endocrinology*, 1998, 109 (1): 86-93.
- [19] DORES R M, RUBIN D A, QUINN T W. Is it possible to construct phylogenetic trees using polypeptide hormone sequences? [J]. *General Comparative Endocrinology*, 1996, 103 (1): 1-12.
- [20] WILSON R P. Utilization of dietary carbohydrate by fish [J]. *Aquaculture*, 1994, 124 (1/4): 67-80.
- [21] MOON T W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 129 (2/3): 243-249.
- [22] PLANAS J V, NAVARRO I, GUTIÉRREZ J, et al. Fish insulin, IGF-I and IGF-II receptors: a phylogenetic approach [J]. *American Zoologist*, 2000, 40 (2): 223-233.
- [23] KAHN C R, GOLDSTEIN B J. Molecular defects in insulin action [J]. *Science*, 1989, 245 (4913): 13.
- [24] NAVARRO I, GUTIÉRREZ J. Fasting and starvation [J]. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 1995, 4: 393-434.
- [25] NAVARRO I, CARNEIRO M N, GUTIÉRREZ J, et al. Post-feeding levels of insulin and glucagon in trout (*Salmo trutta fario*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1993, 104 (2): 389-393.
- [26] CAPILLA E, NAVARRO I, GUTIÉRREZ J, et al. Response of hexokinase enzymes and the insulin system to dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Reproduction Nutrition Development*, 2004, 44 (3): 233-242.
- [27] HRYTSENKO O, WRIGHT J R, POHAJDAK B. Regulation of insulin gene expression and insulin production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *General Comparative Endocrinology*, 2008, 155 (2): 328-340.
- [28] SINK D T, LOCHMANN R T. An enzyme-linked immunosorbent assay for sampling blood plasma insulin concentrations in

largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2006, 5 (11): 1008 - 1013.

[29] LEIBUSH B, PLISETSKAYA E M, GUTIÉRREZ J, et al. Insulin and insulin-like growth factor-I receptors in fish brain [J]. Regulatory Peptides, 1996, 61 (2): 155 - 161.

Full-length cDNA cloning of insulin gene and its encoding protein structure analysis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

JIN Li-na, CHEN Nai-song, XIAO Wen-wen, LIANG Qin-lang

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

Abstract: Insulin is one of the most important endocrine hormones, playing a critical physiological role in regulating metabolism and glucostasis in fish. In this paper, the complete cDNA of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) insulin gene was cloned by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods, and its encoding amino acid sequence as well as the protein structure was analyzed. The insulin full-length cDNA sequence consists of 655 bp, comprising a 101 bp 5'-untranslated region, a 213 bp 3'-untranslated region and an open reading frame (ORF) of 351 bp in length. The ORF encodes a preproinsulin of 116 amino acids with a molecular weight of about 12.7 ku and a theoretical isoelectric point of 5.44, from which a signal peptide, a B-chain, a C-peptide and an A-chain could be derived. Online analysis suggests that the deduced preproinsulin contains a transmembrane region, and that it has a signal peptide whose cleavage site occurs between Alanine²⁴ and Phenylalanine²⁵. Comparative analysis of preproinsulin amino acid sequences related indicates that A-chain and B-chain sequences of preproinsulins are highly conserved between teleost and other vertebrate species, and that the preproinsulin amino acid sequence of largemouth bass shares high similarity of 75% - 94% to those of other teleosts, but low similarity of 59% - 62% to those of other vertebrates. The phylogenetic tree by the Neighbor-joining method shows that the preproinsulin of largemouth bass has high homology with that of some of the other Perciformes fishes, such as rock bass, greater amberjack and tilapia.

Key words: largemouth bass; insulin; cloning; cDNA sequence; encoding protein; homology analysis