

文章编号:1004-7271(2002)02-0097-05

鲮胰岛素样生长因子 I(IGF-I) cDNA 的分子克隆和序列分析

张殿昌^{1,2}, 江世贵¹, 苏天凤¹, 蔡云川¹, 许新萍²

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法,从鲮肝脏总 RNA 中扩增出胰岛素样生长因子-I(IGF-I)基因,克隆至质粒 pUCm-T。测定该基因序列,推导其编码的蛋白质序列。克隆的鲮 IGF-I cDNA 编码序列包括信号肽、B、C、A、D 和 E 6 个区域,共 161 个氨基酸残基。与鲤 IGF-I 比较,信号肽由 44 个氨基酸残基组成比鲤少 17 个,成熟肽核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分别为 95.2% 和 100%。E 区域分析结果表明,克隆的鲮 IGF-I 序列属于 IGF-I Ea-2 亚型。

关键词 鲮;胰岛素样生长因子 I(IGF-I);分子克隆

中图分类号 S917 文献标识码:A

Molecular cloning and sequence analysis of insulin-like growth factor I(IGF-I) cDNA from *Cirrhinus molitorella*

ZHANG Dian-chang^{1,2}, JIANG Shi-gui¹, SU Tian-feng¹, CAI Yun-chuan¹, XU Xin-ping²

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China

2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Total RNA was isolated from *Cirrhinus molitorella* liver tissue. The cDNA encoding insulin-like growth factor I(IGF-I) was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) strategy using isolated total RNA as template. The amplified cDNA fragment was inserted to vector pUCm-T. The cloned cDNA was sequenced and the amino acid sequence of *Cirrhinus molitorella* IGF-I was predicted. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence shared 95.2% and 100% homology with that of *Cyprinus carpio* mature IGF-I peptide. Analysis of E domain indicated that cloned *Cirrhinus molitorella* belonged to IGF-I Ea-2 subtype.

Key words :*Cirrhinus molitorella*; insulin-like growth factor I(IGF-I); molecular cloning

胰岛素样生长因子(IGF-I)是一种由 70 个氨基酸残基组成的单链多肽激素,在结构上与前胰岛素相似。在脊椎动物中,IGF-I 的结构高度保守,这与其生理功能上的重要性有关。IGF-I 前肽由信号肽、B、C、A、D 和 E 区 6 部分组成,成熟肽由 B、C、A 和 D 区 4 个区域构成。近年来,IGF-I 在人和部分哺乳动物中的研究已相当深入,而对鱼类 IGF-I 的研究尚处于起步阶段,已报道的鱼类 IGF-I 基因和氨基酸序列主要集中在鲑鳟鱼类,且发现有 4 种亚型的 IGF-I mRNA,依据其 E 区的大小不同分别命名为 Ea-1,

收稿日期 2002-03-19

作者简介 张殿昌(1977-)男,山东嘉祥人,硕士研究生,主要从事基因工程和分子遗传学研究。E-mail:zhdchang@263.net

通讯作者 江世贵(1964-)男,研究员,主要从事海洋生物技术研究。E-mail:jiangsg@21cn.com

Ea-2, Ea-3 和 Ea-4。此外,鲤(*Cyprinus carpio*)、金鱼(*Carassius auratus*)、罗非鱼(*Tilapia mossambica*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)、鳊(*Clarias macrocephalus*)和大杜父鱼(*Cottus scorpius*)等少数几种鱼类的 IGF-I 基因和氨基酸序列也得到了研究。最近,华益民和林浩然^[1]和白俊杰等^[2]各自克隆和分析了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) IGF-I 序列。

为了进一步研究 IGF-I 的生理功能和作用机制以及研究 IGF-I 在水产养殖中潜在的应用价值,开发高效生物饲料添加剂,本研究以我国重要的养殖品种之一的鲢(*Cirrhinus molitorella*)为材料,利用 RT-PCR 技术克隆并分析了鲢 IGF-I 基因序列。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品

鲢由广州市白云区水产研究所陈国权老师提供。

1.1.2 宿主菌和质粒

pUCm-T 载体购自威佳生物工程公司,大肠杆菌 DH5a 由本室保存。

1.1.3 试剂和酶

限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、碱性磷酸酶购自宝生物工程公司。RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 和逆转录试剂盒 THERMOSCRIPT™ RT-PCR System 购自 invitrogen 公司。其它产品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鲢肝组织的处理

将活的鲢断头处死,分离出肝脏,在液氮中充分研磨,待液氮挥发完全后,加入适量的 Trizol Reagent,置于 -80℃ 冰箱中保存以备提取总 RNA。

1.2.2 鲢肝脏总 RNA 提取

将含鲢肝脏组织的 Trizol 变性液离心后取上清,参考 invitrogen 公司 Trizol Reagent 介绍的方法稍做修改后进行总 RNA 的提取,电泳分析 RNA 质量。

1.2.3 引物设计与 RT-PCR

由于 IGF- I 基因具有较高的保守性,据与鲢亲缘关系最近的鲤和草鱼的 IGF- I cDNA 序列设计合成 1 对引物。P_I-IGF 5'-ATGACTTCAAACAAGTTCAT-3', P_{II}-IGF 5'-CTAATGCGATAGTTGCTTC-3'。按逆转录试剂盒 THERMOSCRIPT™ RT-PCR System 介绍的方法进行 cDNA 第一链的合成和 PCR 扩增,将总 RNA 和 oligo(dT)₂₀ 于 65℃ 温育 5min 使其变性后立即放于冰上,加入适量的 cDNA 合成混合物于 60℃ 60min 合成 cDNA 第一链,然后用 invitrogen 公司的高保真聚合酶(PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity)进行 PCR 扩增 30 个循环。PCR 反应条件为变性 94℃、120s,退火 55℃、60s,延伸 68℃、45s。循环结束后 72℃ 延伸 10min。反应结束后取出 PCR 管立即放于冰上,加入 0.2μL 普通 Taq DNA 聚合酶,重新将 PCR 管放入 PCR 仪中 72℃ 反应 10min。取 5μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,预计会产生 1 条约 540bp 的扩增带。

1.2.4 鲢 IGF- I cDNA

克隆 PCR 产物经纯化后,按 1:1 的比例与 pUCm-T 载体混合,在 T₄DNA 连接酶作用下,将纯化的 DNA 片段插入到 pUCm-T 载体中,构建 pUCm-IGF 重组质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5a,用蓝白斑和酶切电泳法筛选重组子^[3]。

1.2.5 DNA 序列测定

在上海博亚生物工程有限公司用通用引物进行测序,用 DNA 分析软件分析测序结果。

2 结果

2.1 总 RNA 的分离与 RT-PCR 扩增鲮肝脏 IGF-I cDNA

从 50mg 肝组织中提取总 RNA, 经 1% 甲醛变性凝胶电泳检测可见清晰的 28s、18s 和 5.8s 3 条 rRNA 条带, 且 28s 条带的亮度大约是 18s 条带的两倍, 表明总 RNA 完整性良好(图 1)。以总 RNA 作模板, 以 Oligo(dT)₂₀ 为引物进行逆转录合成单链 cDNA, 省去了分离纯化 mRNA 的过程。PCR 产物电泳结果显示, 在约 540bp 处有一扩增带。

2.2 鲮肝脏 IGF-I 的 cDNA 克隆

用高保真 DNA Taq 酶进行 PCR 扩增, 大大降低了突变产生的可能性; 高保真 DNA Taq 酶不会在 PCR 产物末端加 A, 为了用 T 载体进行便捷的克隆, 在 PCR 反应完成后, 加入普通 DNA Taq 酶在 72℃ 再反应 10min, 可在 PCR 产物末端加 A, PCR 产物经纯化后可直接用于与 T 载体的连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5a, 筛选得到 5 个重组子 (pUCmIGF-I2、pUCmIGF-I3、pUCmIGF-I4、pUCmIGF-I7、pUCmIGF-I8), 用 *Pst* I 酶切鉴定, 均含有约 540bp 的插入片段 (如图 2)。

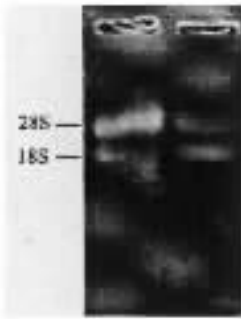


图 1 肝脏总 RNA
Fig.1 Total RNA of liver

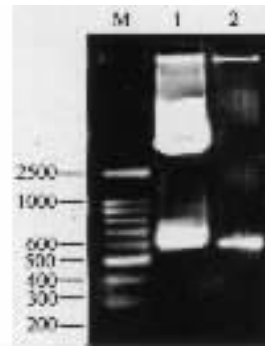


图 2 PCR 产物及 pUCm-GH 酶切电泳图
Fig.2 Electrophoresis of RT-PCR products and restriction pattern of pUCm-IGF
M :100bp DNA ladder , 1. pUCm-IGF/Ban HI + EcoRI ,
2. PCR Products

2.3 序列测定

取质粒 pUCmIGF-I2、pUCmIGF-I3 和 pUCmIGF-I4 各自进行双相测序, 这 3 个质粒插入片段的测序结果一致, 说明在扩增过程中没有发生突变。利用软件 BLAST 与 GenBank-EMBL 中的 IGF-I 序列进行同源性比较分析, 结果证实其为鲮 IGF-IcDNA。测序结果和推测的氨基酸序列见图 3。鲮 IGF-IcDNA 开放阅读框 (ORF) 全长为 483bp, 编码由 161 个氨基酸残基组成的前蛋白原。从 IGF-I 信号肽氨基酸的第一个密码子 ATG 到终止密码子 TAG。本文所克隆的基因序列已登录入 GenBank、EMBL、和 DDBJ 基因库, 序列号为 AY069945。

3 讨论

本文采用 RT-PCR 技术首次成功地克隆到鲮 IGF-I cDNA 基因, 从该基因的核酸序列推断出 IGF-I 蛋白质的一级结构。参照人和其它脊椎动物的 IGF-I 结构, 推测所克隆鲮 IGF-I 基因的氨基酸序列分为信号肽、B、C、A、D 和 E 6 个区域, 其中信号肽 44 个氨基酸、B 区 29 个、C 区 10 个、A 区 23 个、D 区和 E 区分别为 8 个和 47 个氨基酸残基。成熟肽 B、C、A、D 4 个区域共有 Cys^{B6}、Cys^{B18}、Cys^{A8}、Cys^{A9}、Cys^{A13}、Cys^{A22} 6 个半胱氨酸残基, 可形成 3 对二硫键, 对维持 IGF-I 的空间结构起重要作用。用软件 DNAsis 和 DNA Tool 对鲮 IGF-I 和 IGF-I 蛋白的分析表明, 鲮 IGF-I 前蛋白原的分子量为 17.8kD, 等电点 pI 为 8.67 ;

```

|.....
1 ATG TCT AGC GGT CAT TTC TTC CAG GGG CAT TGG TGT GAT GTC TTT AAG TGT ACC ATG CGC
1 M S S G H F F Q G H W C D V F K C T M R
..... signal peptide.....
61 TGT CTC CCG TGC ACC CAC ACC CTC TCA CTG GTG CTG TGC GTC CTC GCG TTG ACT CCC GCG
21 C L P C T H T L S L V L C V L A L T P A
..... |.....
121 ACA CTG GAG GCG GGG CCG GAG ACG CTG TGC GGG GCG GAG CTT GTA GAC ACG CTG CAG TTT
41 T L E A G P E T L C G A E L V D T L Q F
..... B-domain..... |.....
181 GTG TGT GGA GAC AGG GGC TTT TAT TTC AGC AAA CCA ACA GGA TAT GGG CCT AGT TCG AGA
61 V C G D R G F Y F S K P T G Y G P S S R
..... C-domain..... |..... A-domain.....
241 CGG TCG CAC AAC CGC GGC ATC GTG GAC GAG TGC TGC TTT CAG AGC TGT GAG CTG AGG GCG
81 R S H N R G I V D E C C F Q S C E L R R
..... |..... D-domain..... |.....
301 CTT GAG ATG TAC TGT GCG CCT GTA AAG CCC GGC AAA ACT CCA CGA TCC ATA CGA GCG CAA
101 L E M Y C A P V K P G K T P R S I R A Q
..... E-domain.....
361 CGG CAC ACA GAC AGC CCC AAG ACA GCA AAG AAA CCT GTA TCC GGA CAT AGC CAC TCT TCC
121 R H T D S P K T A K K P V S G H S H S S
.....
421 TGT AAG GAA GTT CAT CAG AAG AAC TCG AGC CGA GGA AAC ACA GGG GGA AGC AAC TAT CGC
141 C K E V H Q K N S S R G N T G G S N Y R
... |
481 ATT TAG
161 I *

```

图3 鲮 IGF-I cDNA的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of *C. molitorella* IGF-I cDNA and predicted amino acid sequence

鲮 IGF-I 蛋白的分子量为 7.763kD, 等电点 pI 为 7.59。

将鲮 IGF-I 的基因序列与鲤 IGF-I 进行比较发现, 虽然鲮和鲤属于亲缘关系较近的鲤科鱼类, 但鲮 IGF-I 信号肽与鲤 IGF-I 信号肽不同, 而与其它鱼类相似由 44 个氨基酸残基组成, 而鲤的 IGF-I 信号肽有 61 个氨基酸残基组成。在 B、C、A、D 和 E 5 个区域中, 鲮与鲤核酸序列的同源性达 93%, 差异主要分布在 A 区同源性为 89.9%, 其次是 C 区、D 区和 E 区的同源性分别为 93.3%、95.8% 和 91.5%, 而 B 区具有高度的保守性, 同源性高达 100%。鲮 IGF-I 核苷酸序列与人^[4]IGF-I 的同源性为 54.8%。鲮成熟 IGF-I 的氨基酸序列与鲤完全相同。IGF-I 蛋白原 C 末端的 E 区域也具有相当高的保守性, 鲮与鲤 IGF-I E 区域的 47 个氨基酸残基中仅有 7 个氨基酸差异。近来在哺乳类发现 IGF-I b 的 E 区域编码一个酰胺肽, 鱼类 E 区域的氨基酸序列也含有肽基 C 端酰胺化的信号机元, Shambloott 和 Cher^[5]推断在鲮 IGF-I Ea-4, IGF-I Ea-3 和 IGF-I Ea-2 序列 N 端有 1 个或更多的内肽酶酶切位点, 可产生 E 区域内部的酰胺肽。由此可见 E 区域可能具有重要的生物功能, 其具体的功能和作用机制还有待于进一步的研究。

Sakamoto 等^[6]和 Duan 和 Duguay^[7]在对鲑鳟鱼类 IGF-I 的研究中发现存在四种亚型的 IGF-I mRNA 分子, 由于它们都和哺乳动物的 IGF-Ia 相似, 因此依据其 E 区的大小分别命名为 Ea-1、Ea-2、Ea-3 和 Ea-4, Ea-1 的 E 区域含有 35 个氨基酸残基、Ea-2 含有 47 个、Ea-3 含有 62 个、Ea-4 含有 74 个。通过序列比较已知鲑鱼 IGF-I E 区域含有 47 个氨基酸残基, 因此本文所报道的鲑 IGF-I 序列应属于 IGF-I Ea-2 亚型。Liang 等^[8]对鲤成鱼肝组织 cDNA 进行了研究, 认为鲤成鱼肝脏组织主要表达 IGF-I Ea-2 这种形式, 但鲑肝脏组织是否也是这样还需要进一步研究。目前, 我们正着手准备将鲑 IGF-I 基因在原核细胞中表达, 以期大量制备基因重组鲑 IGF-I 蛋白, 以供 IGF-I 生理功能和作用机制研究使用。

参考文献:

- [1] 华益民, 林浩然. 草鱼 IGF-I cDNA 的克隆和在原核生物中的表达[J]. 动物学报, 2001, 47(3): 274-281.
- [2] 白俊杰, 叶星, 李英华, 等. 草鱼胰岛素样生长因子-I 基因克隆及序列分析[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 1-4.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Rinderknecht E, Humble R E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structure homology with proinsulin [J]. J Biol Chem, 1987, 262(8): 2769-2776.
- [5] Shambloot M J, Chen T T. Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1993, 4(6): 351-361.
- [6] Sakamoto T, Hirano T, Madsen S S, et al. Insulin-like growth factor I gene expressing during parr-smolt transformation of coho salmon [J]. Zool Sci, 1995, 12: 249-252.
- [7] Duan C, Duguay S J, Plisetskaya E M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family peptides [J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 11: 371-379.
- [8] Liang Y H, Cheng C H, Chan K M. Insulin-like growth factor I Ea-2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1996, 5(2): 145-152.

下期文章摘要

杭州湾漕泾沿岸水化学状况

臧维玲¹, 蔡云龙¹, 戴习林¹, 姚庆祯¹

江敏¹, 罗春芳¹, 徐桂荣², 丁福江²

(1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 2. 上海申漕特种水产开发公司, 上海 201507)

摘要 本文报道了 2001 年 1 月 - 12 月杭州湾畔金山漕泾地区用于水产养殖的河口沿岸水化学状况: 总含盐量 (12.24 ± 1.92) g/L, 碱度 (2.12 ± 0.27) mmol/L, pH 值为 7.99 ± 0.11 , 阴阳离子中含量最高者分别为 Cl^- (6.64 ± 1.04) g/L 与 $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ (3.76 ± 0.60) g/L, 属典型河口区水质特点, 系海水水质类型 (Cl^-)。常规水质指标如下: $\text{NH}_3 - \text{N}$ 为 (1.32 ± 0.44) mg/L, 其中 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 占 19.7%, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 占 78.8%, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 占 1.6%, 活性磷 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 含量为 (2.04 ± 1.57) $\mu\text{g/L}$, 氮磷比 (N/P) 为 64 (原子比), 化学需氧量 (COD_{Mn}) 为 (6.89 ± 1.76) mg/L, 五日生化需氧量 (BOD_5) 为 (2.56 ± 0.52) mg/L, 溶解氧 (DO) 为 (7.95 ± 0.56) mg/L。

关键词 沿岸 水化学 水质指标