

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0679 - 05

Western 印迹法检测 IGF- I 及其受体蛋白在牙鲆仔鱼变态中的表达

张俊玲¹, 施志仪¹, 翟万营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 Western 印迹法对胰岛素样生长因子- I (insulin-like growth factor-1, IGF- I) 及其受体 (IGF- I receptor, IGF- I R) 蛋白在牙鲆仔鱼发育变态阶段的表达进行分析。结果显示 IGF- I 蛋白在仔鱼变态前(17 d)和变态起始阶段(21 d)免疫活性较强,而在变态期间降低;IGF- I R 蛋白在变态起始阶段的表达与 IGF- I 类似,但在变态期间与 IGF- I 相反,具有相对丰富的表达。这些结果为进一步研究 IGF- I 及其受体在牙鲆变态中的生理意义奠定了基础。

胰岛素样生长因子- I (insulin-like growth factor-1, IGF- I) 在结构上与胰岛素原高度同源,是脊椎动物中促进细胞生长和分化的重要的肽类激素。与哺乳类一样,IGF- I 主要由鱼类肝脏合成,其他大部分肝外组织也都有表达^[1]。同样,其特异的膜受体即 IGF- I 受体 (IGF- I receptor, IGF- I R) 在鱼类各种组织中也是广泛表达的^[2],进一步表明 IGF- I 不仅具有内分泌的功能,还可以通过旁分泌、自分泌的方式作用于临近组织或自身组织。研究表明 IGF- I 及其受体在鱼类生长、发育、生殖及渗透压调节、免疫等多种生理过程中发挥重要的生理功能^[3-4]。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 隶属鲽形目,在仔鱼阶段经历了一个典型的变态过程,一只眼睛绕过头背部迁移到另一侧,生活方式也从浮游型转变为底栖型。这种变态发育被认为是组织器官结构在胚胎期间确立后,通过细胞增殖、分化与凋亡等多种细胞学行为进行重新塑造的“二次发育”过程。除甲状腺激素、皮质醇、催乳素以及

研究亮点: 牙鲆变态是鱼类早期发育中非常奇特的现象,本文首次利用 Western 印迹法检测了 IGF- I 及其受体蛋白在牙鲆仔鱼发育变态阶段的表达,并分析了二者潜在的生物学功能,为进一步研究鱼类变态发育奠定了基础。

关键词: 牙鲆;变态发育;胰岛素样生长因子- I;胰岛素样生长因子- I 受体; Western blot

中图分类号: S 917

文献标志码: A

性类固醇激素等对牙鲆变态有重要的影响^[5-7]外,我们先前的研究表明 IGF- I 及其受体在牙鲆变态中也可能发挥重要的作用^[1],但二者在仔鱼变态阶段的蛋白表达情况尚不清楚,因而,本研究采用 Western 印迹法检测了 IGF- I 及其受体蛋白在仔鱼变态前后的表达,以期为进一步探讨 IGF 系统在鲽形目鱼类变态中的生理意义提供更多的资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用牙鲆仔鱼采集于中国水产科学研究院北戴河中心实验站,采用常规的轮虫-卤虫喂养,整个养殖期间水温控制在 14 ~ 16 °C;分别在孵化后 3、13、17、21、24、29、33 和 36 d 取材,仔鱼变态在孵化后 21 d 开始,36 d 结束^[8]。各时期样品立即置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2 抗体及主要试剂

目的蛋白兔抗 IGF- I、IGF- I R 抗体购自

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(31172392);上海市重点学科水生生物学建设项目(S30701);上海海洋大学博士启动基金(B-8812-11-0194)

作者简介: 张俊玲(1975—),女,副教授,博士,研究方向为鱼类发育生物学及遗传育种。E-mail: jlzhang@shou.edu.cn

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

Santa Cruz 公司;鼠抗 β -actin 抗体购自 Sigma 公司;相应二抗 HRP-conjugated goat anti rabbit IgG、HRP-conjugated goat anti mouse IgG 购自 KPL 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;SuperECL Plus 超敏发光液购自 PIRECE 公司;预染标准分子量蛋白购自 Fermentas 公司;本实验所用其他化学试剂均为分析纯。

1.3 各时期样品总蛋白的提取

取上述各时期样品,精确称量后记录重量,入预冷 $1 \times$ PBS 洗涤一次;按每 100 mg 样品加 1 mL 预冷的 RIPA 裂解液,放入预冷的玻璃匀浆器中,置冰上制成匀浆液,冰上继续裂解 10 min;将匀浆液转移至 1 mL 离心管,14 000 r/min 4°C 离心 30 min;小心吸取蛋白上清,即为总蛋白,置 -80°C 冰箱备用。

1.4 BCA 法测定蛋白质的浓度

首先配制牛血清白蛋白(BSA)标准品(0.5 mg/mL)和反应液(每反应需 200 μL Solution A 和 4 μL Solution B 混匀),按表 1 所示依次在 96 孔板中加入 BSA 标准品或样品(样品用双蒸水稀释 10 倍)及 Solution A + B 混合物,每个测定要做 3 个平行反应。混匀, 37°C 保温 30 min。冷却到室温,测定 562 nm 的光吸收(OD 值)。然后绘制标准曲线,计算出未知样品的浓度。

表 1 BCA 法测定样品蛋白质的浓度
Tab.1 Detection of protein concentration by BCA method

	BCA method							μL 样品
	1	2	3	4	5	6	7	
BSA	0	2.5	5	10	15	20	25	25
H ₂ O	25	22.5	20	15	10	5	0	0
Mix(A + B)	200	200	200	200	200	200	200	200

1.5 Western 印迹法检测 IGF- I 及其受体蛋白在牙鲆仔鱼中的表达

首先配制 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 浓缩胶,取上述各时期蛋白样品,按蛋白总量相等(25 μg)的原则折算出不同的上样体积,依次加至电泳孔槽中,起始孔槽加预染蛋白质 Marker,采用 Mini Trans-Blot 电泳仪室温电泳,先 50 V 恒压,至溴酚蓝条带到达分离胶和浓缩胶的分界,再改用 100 V 恒压分离蛋白样品,待溴酚蓝至凝胶底部时结束电泳。

电泳结束后,先切除积层胶,比照 PVDF 膜和滤纸大小,再参考预染蛋白质 Marker 切下目的蛋白所处凝胶区域,将其放入转移缓冲液中漂洗片

刻。组装好转膜装置,将转膜装置放入已加入预冷转移缓冲液的转移槽中,避免转移过程中温度过高,350 mA 恒流转膜 90 ~ 120 min。转膜结束后,将 PVDF 膜剪角以辩识膜的蛋白面,室温下 PVDF 膜用丽春红 S 染色 5 min,然后用 TBST 漂洗,以观察蛋白转移效果;同时用考马斯亮蓝 R250 对凝胶进行染色约 4 h,脱色,观察蛋白质转膜效率。

将 PVDF 膜放入装有 5% 脱脂奶粉/TBST 封闭液的培养小皿中,置于水平摇床上轻轻摇动,室温封闭 1 h,然后用 TBST 晃动洗涤 3 次,每次 5 min。用 5% 脱脂奶粉/TBST 配制目的蛋白 IGF- I (或 IGF- I R)一抗工作液 2 mL,将 PVDF 膜放置于湿盒与一抗工作液充分接触, 4°C 冰箱孵育过夜(约 12 h)。次日取出 PVDF 膜,放入 TBST 中晃动洗涤 3 次,每次 5 min;用 TBST 配制 HRP 标记羊抗兔二抗工作液 2 mL,工作浓度为 1:2 000,置湿盒中室温下反应 1 h;二抗孵育结束后,将膜放入 TBST 中晃动洗涤 3 次,每次 5 min。 β -actin 抗体作为内参,工作浓度为 1:5 000,HRP 标记羊抗小鼠二抗工作浓度为 1:3 000。

取 ECL 化学发光试剂 A 液和 B 液各 1 mL,混匀后室温下与膜作用 1 ~ 3 min,吸去多余液体,迅速将膜平整放入多功能成像系统暗盒中的塑料薄膜上,合理调节各类参数后成像。用成像系统中图像分析软件对图象进行灰度分析,将第一条带灰度比值设定为 1,计算其它条带灰度值和第一条带灰度值的比值。利用 β -actin 作为内参。

2 结果

2.1 BSA 标准曲线与各样品的蛋白质浓度

图 1 是根据牛血清白蛋白(BSA)标准品绘制的标准曲线,据此计算得出的各时期样品的蛋白质浓度如表 2。

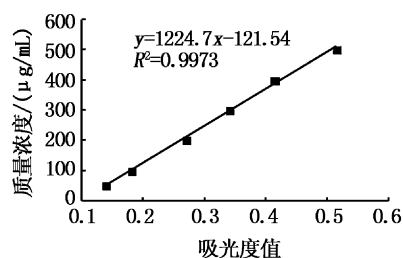


图 1 BSA 标准品的标准曲线

Fig. 1 Standard curve based on BSA standard sample

表 2 各样品蛋白质的浓度

Tab. 2 Concentration of sample proteins

时间	3 d	13 d	17 d	21 d	24 d	29 d	33 d	36 d
浓度/($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.94	0.99	1.17	1.12	1.35	1.26	1.41	1.50

2.2 IGF- I 及其受体蛋白在牙鲆仔鱼发育变态阶段的表达

图 2 显示免疫活性的 IGF- I 及其受体 IGF- I R 蛋白在牙鲆仔鱼发育中各个时期是广泛存在的。IGF- I 蛋白在早期仔鱼中比在后期仔鱼中具有相对较高的水平,在变态前(17 d)和变态起始阶段(21 d)其表达水平有一个上调的趋势,而在进入仔鱼变态期间后,其蛋白水平逐渐降低,在变态结束时的仔鱼中仅有较低水平的表达。IGF- I R 蛋白在变态起始阶段与 IGF- I 相似,其表达水平增加,但进入变态期以后和 IGF- I 相反,具有相对丰富的表达。

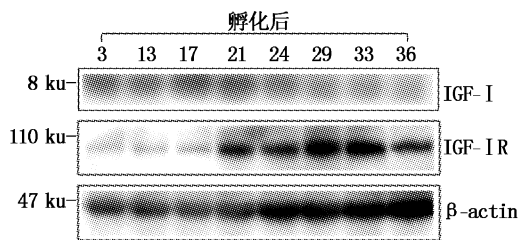


图 2 Western blot 结果

Fig. 2 Results from Western blot

3 讨论

鳎形目鱼类的变态涉及到大量基因表达和内分泌系统的调控,我们先前的研究表明 IGF- I mRNA 在变态即将到来的 17 d 牙鲆仔鱼和变态起始的 21 d 仔鱼中表达量最高,而在变态高峰期显著降低^[1],但其蛋白水平的表达并未检测。本研究采用 Western 印迹法检测了 IGF- I 及其受体蛋白在牙鲆仔鱼阶段的表达,结果显示 IGF- I 在蛋白水平的表达图式与其 mRNA 大体上是相一致的; IGF- I R 蛋白在变态起始阶段的表达与 IGF- I 相似,但在变态期间与 IGF- I 不同。

有趣的是,IGF- I 蛋白在牙鲆仔鱼变态前(17 d)及变态起始阶段(21 d)为何大量增加。最近发现在变态的大西洋庸鳎(*Hippoglossus hippoglossus*)中 IGF- I 蛋白也有类似的表达^[9]。与哺乳动物类似,IGF- I 在鱼类中的主要功能是

介导生长激素的促生长效应^[10]。在多种鱼类中的研究表明,血液或组织中的 IGF- I 水平是与膳食比、蛋白含量和增长率正相关的^[11-13]。CASTILLO 等^[14]研究表明在虹鳟中,IGF- I 还与代谢紧密相关。在牙鲆中,仔鱼右眼迁移在孵化后 20~24 d 开始,至 36~42 d 结束,其持续的时间主要取决于仔鱼的营养状况,而且仔鱼大小(standard length, SL)要达到 7.0~7.5 mm,即本文的 21 d 仔鱼才开始变态,否则变态将延迟或失败。另外,仔鱼变态期间会减少摄食,需要在变态前积累较多的能量帮助其顺利完成变态。因而,考虑到 IGF- I 在鱼类促生长和调控营养代谢中的重要作用,我们认为 IGF- I mRNA 和蛋白在牙鲆变态前和变态起始阶段的大量表达对于其变态的起始和成功完成变态有着非常重要的意义。

同时,本研究还发现 IGF- I 蛋白在牙鲆变态期间表达水平降低。首先,IGF- I 水平的降低可能与牙鲆仔鱼在变态期间的增长率降低^[15]有关;其次,牙鲆变态期间以眼睛迁移为主的过程还涉及到剧烈的组织器官的重建,而这种形态结构的重塑主要由细胞凋亡引起^[16]。在鱼类中,IGF- I 除了能促进细胞分化和增殖,还具有抑制细胞凋亡的作用^[17],因而我们推测 IGF- I 蛋白水平在变态期间的降低还可能与牙鲆仔鱼变态期间的细胞凋亡有关。

其次,本研究显示 IGF- I 受体在变态起始阶段的表达与 IGF- I 相似,其蛋白水平明显比变态前增加。一般认为,IGF- I 生理作用的发挥主要通过与其靶组织上特异的膜受体即 IGF- I R 结合,从而激活细胞内的信号转导通路而实现。因此,IGF- I R 是 IGF 信号的关键调节子,其表达水平的高低直接反映了 IGF- I 的组织敏感性。因而,IGF- I R 蛋白在变态起始阶段的高表达很可能增强了 IGF- I 的组织敏感性,从而提高了 IGF- I 的促生长活性。这是因为在变态前,鳎形目仔鱼经历了一个快速生长的过程^[15, 18-19],尽管仔鱼完成整个变态所跨越的时间是相似的,但一般快速生长的仔鱼变态也开始得早一些^[18]。从这种意义而言,此时 IGF- I 组织敏感性的提高可能是仔鱼起始变态所必需的。此外,与 IGF- I 相反,IGF- I R 蛋白在牙鲆仔鱼整个变态期间均保持较高的水平。先前在大菱鲆中的研究表明,

IGF- I R mRNA 在仔鱼变态后表达降低,但它的蛋白水平并没有被检测^[20]。也有研究表明在变态畸形或发育不良的大西洋庸鲽仔鱼中,IGF- I R mRNA 的水平降低^[9]。因而,我们推测在变态期间保持较高的 IGF- I R 水平很可能是对此时仔鱼体内较低的 IGF- I 水平的一种补偿,这对于提高变态期间 IGF- I 的组织敏感性,帮助牙鲆仔鱼成功完成变态具有重要的意义。

综上所述,本研究初步阐明了牙鲆仔鱼发育变态阶段 IGF- I 及 IGF- I R 在蛋白水平的表达图式,但是仍需进一步的抑制或过表达研究才能更好地揭示二者在牙鲆变态中的生理意义及其作用机制。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] NAKAO N, TANAKA M, HIGASHIMOTO Y, et al. Molecular cloning, identification and characterization of four distinct receptor subtypes for insulin and IGF- I in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Endocrinology, 2002, 173: 365 - 375.
- [3] REINECKE M, BJÖRNSSON B T, 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: 20 - 24.
- [4] WOOD A W, DUAN C, BERN G A. Insulin-like growth factor signaling in fish [J]. International Review of Cytology, 2005, 243: 215 - 285.
- [5] DE JESUS E G, HIRANO T, INUI Y. Flounder metamorphosis: Its regulation by various hormone [J]. Fish Physiology Biochemistry, 1993, 11: 323 - 328.
- [6] YAMANO K, MIWA S. Differential gene expression of thyroid hormone receptor α and β in fish development [J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 109: 75 - 85.
- [7] 鲍宝龙,张臻宇,龚小玲,等. 外源甲状腺激素及可的松对牙鲆早期发育阶段生长、发育和变态的影响[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(3): 242 - 245.
- [8] MINAMI T. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus* (in Japanese) [J]. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 1982, 48(11): 1581 - 1588.
- [9] HILDAHL J, SWEENEY G, GALAY-BURGOS M, et al. Cloning of Atlantic halibut growth hormone receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis [J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 151: 143 - 152.
- [10] BUTLER A A, LE ROITH D. Control of growth by the somatotrophic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles [J]. Annual Review of Physiology, 2001, 63: 141 - 164.
- [11] DUAN C. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish [J]. Journal of Nutrition, 1998, 128: 306 - 314.
- [12] PÉREZ-SÁNCHEZ J, MARTI-PALANCA H, KAUSHIK S J. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor- I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. Journal of Nutrition, 1995, 125: 546 - 552.
- [13] BECKMAN B R, SHIMIZU M, GADBERRY B A, et al. Response of the somatotrophic axis of juvenile coho salmon to alterations in plane of nutrition with an analysis of the relationships among growth rate and circulating IGF- I and 41 kDa IGFBP [J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 135: 334 - 344.
- [14] CASTILLO J, CODINA M, MARTÍNEZ M L, et al. Metabolic and mitogenic effects of IGF- I and insulin on muscle cells of rainbow trout [J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Compative Physiology, 2004, 283: R647 - R652.
- [15] 刘立明. 不同温度条件下牙鲆变态期生长发育变化的研究[J]. 海洋科学, 1996(4): 58 - 63.
- [16] 鲍宝龙,杨桂梅,任大明. 牙鲆变态过程中的细胞凋亡[J]. 动物学报, 2006, 52(2): 355 - 361.
- [17] JONES J I, CLEMMONS D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions [J]. Endocrine Reviews, 1995, 16: 3 - 34.
- [18] FERNÁNDEZ-DÍAZ C, YÓFERA M, CAÑAVATE J P, et al. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory [J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58: 1 - 13.
- [19] SOLBAKKEN J S, NORBERG B, WATANABE K, et al. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* [J]. Environmental Biology of Fishes, 1999, 56: 53 - 65.
- [20] ELIES G, DUVAL H, BONNEC G, et al. Insulin and insulin-like growth factor- I receptors in an evolved fish, the turbot: cDNA cloning and mRNA expression [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1999, 158: 173 - 185.

Expression of IGF- I and its receptor proteins detected by Western blot during metamorphosis of *Paralichthys olivaceus*

ZHANG Jun-ling¹, SHI Zhi-yi¹, ZHAI Wan-ying¹, LI Wei²

(1. Key laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Fisheries Technology Extension Station, Beijing 100026, China)

Abstract: In this study, Western blot was used to analyze the expression of insulin-like growth factor-1 (IGF- I) and its receptor (IGF- I R) proteins during larval development and metamorphosis of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. The results showed that IGF- I protein has a higher immunoreactivity at premetamorphosis (17 d) and the onset of metamorphosis (21 d), while lower during metamorphosis. The expression pattern of IGF- I R protein at the onset of metamorphosis was similar to that of IGF- I, and but an opposite pattern was observed throughout metamorphosis. These results provide a basis for further study on the physiological significance of the IGF- I and its receptor in the Japanese flounder metamorphosis.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; IGF- I; IGF- I R; Western blot

欢迎订阅 2013 年《上海海洋大学学报》

《上海海洋大学学报》为上海海洋大学主办,面向全国的以海洋、水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要刊登研究论文,少量刊登综述、评述、简讯,并酌登学术动态和主要书刊评介等。目前学报是《中国科学引文数据库》来源期刊,《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,万方数据—数字化期刊群全文收录期刊,中国科技论文统计源核心期刊,水产渔业类中文核心期刊。

本刊为双月刊,大 16 开,国内外公开发行。每期单价:10.00 元。国际标准刊号:ISSN 1674 - 5566,国内统一刊号:CN31 - 2024/S。国内邮发代号:4 - 604,国际发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部联系地址:上海市临港新城沪城环路 999 号,上海海洋大学 201 信箱

邮政编码:201306

联系人:郭丰红

联系电话:021 - 61900229

传 真:021 - 61900227

E-mail: xuebao@shou.edu.cn

网 址: <http://www.shhydxxb.com>