

网络出版时间:2013-05-02 10:22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130502.1022.006.html>

鲢 *IGFBP-1* 基因全长 cDNA 的克隆及表达分析

丁为群¹, 梁宏伟², 邹桂伟², 王晓阳², 曹磊², 刘迪秋¹, 李忠²

(1 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500;

2 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

【摘要】 【目的】克隆鲢胰岛素样生长因子结合蛋白 1(*IGFBP-1*) 基因, 分析其编码蛋白的结构与功能, 并分析低氧胁迫下该基因在鲢肝脏中的表达情况。【方法】采用 cDNA 末端快速扩增技术(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)扩增鲢 *IGFBP-1* 基因的全长 cDNA, 通过半定量 RT-PCR 法对鲢肌肉、心脏、脑、肾脏、肝脏、腮和脾等组织器官 *IGFBP-1* mRNA 的表达水平进行检测, 利用 Real-time PCR 法检测急性低氧胁迫 0, 2, 4, 6, 8, 10 和 12 h 后鲢肝脏组织中 *IGFBP-1* 表达量的变化。【结果】鲢 *IGFBP-1* 全长 cDNA 为 1 081 bp, 具有 73 bp 的 5' 非编码区(Untranslated Regions, UTR), 789 bp 的开放读码框(Open reading frame, ORF), 以及 219 bp 的 3' UTR, 编码含 262 个氨基酸的蛋白质。RT-PCR 结果表明, *IGFBP-1* 在肌肉、心脏、脑、肾脏、肝脏、腮和脾等 7 种组织中均有表达, 其中在肝脏中的表达量最高, 心脏和肌肉次之, 在脑中的表达量最低; Real-time PCR 结果表明, 在低氧胁迫 6 h 时, *IGFBP-1* cDNA 在肝脏中的表达量显著增高, 随后略有降低但仍显著高于未进行低氧胁迫处理组。【结论】克隆得到鲢 *IGFBP-1* 全长 cDNA, 该基因在肝脏组织中大量表达; 随着低氧胁迫时间的延长, 鲢肝脏中 *IGFBP-1* mRNA 表达量升高, 达最大值后继续低氧胁迫其表达量略有降低。

【关键词】 白鲢; 低氧; *IGFBP-1*; RACE; Real-time PCR

【中图分类号】 S965.113.6; Q786

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)05-0001-08

Molecular cloning and expression analysis of the full length cDNA of *IGFBP-1* gene in *Hypophthalmichthys molitrix*

DING Wei-qun¹, LIANG Hong-wei², ZOU Gui-wei²,

WANG Xiao-yang², CAO Lei², LIU Di-qiu¹, LI Zhong²

(1 College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China;

2 Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Wuhan, Hubei 430223, China)

Abstract: 【Objective】The study aimed to clone the cDNA of *IGFBP-1* and analyze the encoded amino acids and the expression level under hypoxia in liver. 【Method】The method of Rapid amplification of cDNA ends(RACE) was used to obtain the complete *IGFBP-1* cDNA sequence. Semi-quantitative RT-PCR was performed using the tissues of muscle, heart, brain, kidney, liver, gill and spleen of silver carp. The expression patterns of *IGFBP-1* under the condition of acute hypoxia for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h was analyzed by real-time PCR. 【Result】The full-length cDNA of *IGFBP-1* was 1 081 bp and the open reading frame was 789 nucleotides flanked by a 73 nucleotides of 5'-UTR and a 219 nucleotides of 3'-UTR. The ORF encoded a predicted polypeptide of 262 amino acids. RT-PCR showed that *IGFBP-1* mRNA was expressed in mus-

【收稿日期】 2012-09-03

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31101894); 公益性行业(农业)科研专项(200903045)

【作者简介】 丁为群(1987—), 女, 江苏镇江人, 在读硕士, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: dweiqun@126.com

【通信作者】 刘迪秋(1979—), 女, 湖北恩施人, 副研究员, 博士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: diqiuliu@hotmail.com

李忠(1976—), 男, 山东济南人, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: lizhong@yfi.ac.cn

cle, heart, brain, kidney, liver, gill and spleen and showed high expression in liver, heart and muscle and low expression in brain. Real-time PCR revealed that in liver, the expression level increased significantly at 6 hours under hypoxia, and decreased a little after then but kept at a high level compared to the control group. 【Conclusion】 A full-length cDNA of *IGFBP-1* was cloned. *IGFBP-1* mRNA was abundantly expressed in liver and the expression level increased after acute hypoxia. The peak was at 6 h after hypoxia and it slightly decreased after the peak.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; hypoxic; *IGFBP-1*; RACE; Real-time PCR

胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (Insulin-like growth factors binding protein-1, *IGFBP-1*) 是胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBPs) 家庭的重要成员之一, IGFBPs 通过与血液循环系统和细胞外基质中的胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factors, IGFs) 的高亲和力结合, 从而调控 IGFs 的生物学活性。IGFBP-1 蛋白是最早发现的 IGFBPs 家族成员, 其主要功能是结合和运载胰岛素样生长因子 1 (IGF-1), 延长其半衰期, 并进行组织和细胞识别定位, 对 IGFs 通路的生物学功能起着重要的调节作用^[1], 在低氧环境中对 IGFs 信号系统的调控也起着重要作用^[2]。

在哺乳动物中, IGFBPs 由 6 个 IGF 结合蛋白组成, 分别命名为 IGFBP-1~IGFBP-6, 它们各自为一个独立的基因产物^[3]。在一级结构上, 成熟的 IGFBPs 含有 200~300 个氨基酸, 分子质量为 24~45 ku, 其 N 端结构域含有 12 个保守的半胱氨酸残基, C 端结构域含有 6 个半胱氨酸残基, 且 IGFBP-4 还有 2 个额外的二硫键, 这些半胱氨酸能形成链内二硫键, 帮助 IGFBPs 形成二级结构。IGFBPs 中间可变结构域充当连接 N 端和 C 端结构域的角色, 该区域还存在一些转录后修饰位点^[4]。IGFBP-1 大量存在于人的羊膜水中, 其基因是第 1 个被纯化和测序的 IGFBPs 基因^[5]。在斑马鱼胚胎发育早期的低氧诱导试验中, 人们发现, 低氧可以强烈诱导 IGFBP-1 的表达, 并对胚胎的生长和发育起着显著的抑制作用^[6]。Junichi 等^[7]对 HepG2 细胞的研究发现, 低氧可以在转录和翻译水平上调控 *IGFBP-1* 基因的表达; Zhai 等^[8]对大鳞大马哈鱼和牙鲈的研究表明, *IGFBP-1* 基因的表达还受营养和温度的调控。Kajimura 等^[9]对斑马鱼的研究发现, 在 *IGFBP-1* 启动子中存在一个低氧应答元件 (Hypoxia response element, HRE) 和一个低氧诱导因子 (HIF-1) 辅助元件 (HIF-1 ancillary sequence, HAS), 低氧胁迫通过对低氧诱导因子的激活而对 IGFBP-1 进行调控。目前, 对鱼类 *IGFBP-1* 基因

序列和功能的研究较少, 仅在斑马鱼^[10-11]、五條鰭^[12]、虹鱖^[13]、鲤^[14]、草鱼^[15]和牙鲈^[16]等鱼类中克隆到 *IGFBP-1* 全长 cDNA, 但对其功能研究得较少。

鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 属鲤科鲢亚科, 是我国淡水养殖的主要种类之一。鲢在各种应激刺激后即跳跃出水, 耐低氧能力差, 易泛塘。低氧胁迫对鲢的生存造成严重影响, 因此研究鲢在低氧条件下的反应机制对理解其生理特性及鲢新品种选育具有重要指导价值。本研究克隆了鲢 *IGFBP-1* cDNA 序列, 对该序列进行生物信息学分析, 并探讨了该基因在低氧刺激后的表达变化, 旨在阐明鲢对低氧环境的反应机制, 为进一步研究鲢 IGFBP-1 蛋白的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 供试鲢来自中国水产科学院长江水产研究所窑湾试验场, 体质量 (12.2±0.3) g/尾。

1.1.2 试剂及菌株 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0、pMD-18T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; SMART RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购于 AxyPrep 公司; 2×SYBR Premix ExTaq 购于百泰克公司; Rotor-Gene Q cycler (QIAGEN, 德国)。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 由中国水产科学院长江水产研究所遗传育种实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 鲢总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 将鲢在充分曝气的自来水中驯养 1 周后, 取其肌肉、心脏、脑、肾脏、肝脏、腮和脾等组织, 保存于 -80℃ 冰箱中备用。对鲢进行低氧处理, 每个水箱投放 5 尾健康鲢, 用尼龙薄膜将水箱上口封住, 分别

低氧处理 0 h(CK,溶氧量 6.77 mg/L),2 h(溶氧量 5.3 mg/L),4 h(溶氧量 4.29 mg/L),6 h(溶氧量 2.98 mg/L),8 h(溶氧量 1.9 mg/L),10 h(溶氧量 1.09 mg/L)和 12 h(溶氧量 0.89 mg/L),低氧处理期间每隔 2 h 取样 1 次,采集每个处理 5 尾鲢的肝脏,液氮速冻后置于−80 ℃保存。

按照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒操作指南提取鲢样品总 RNA,用适量的无 RNase 的 ddH₂O 溶解。以提取的总 RNA 为模板,根据 RNA PCR Kit (AMV)Ver3.0 操作说明合成 cDNA 第一链。反转录体系如下:25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,10×RT Buffer 1 μL,10 mmol/L dNTP Mixture 1 μL,40 U/μL RNase Inhibitor 0.25 μL,5 U/μL AMV Reverse Transcriptase 0.5 μL,50 pmol/μL Random 9 mers 0.5 μL,RNA 样品 1 μL,用无 RNase 的 ddH₂O 补足 10 μL。合成的 cDNA 第一链按需要加入 TE Buffer,−20 ℃储存备用。

1.2.2 鲢 *IGFBP-1* 基因全长 cDNA 的克隆 根据 GenBank 中斑马鱼的 *IGFBP-1* cDNA 序列(GenBank 登录号:AF434664.1),设计 2 对保守区引物(IGFBP-1 1、IGFBP-1 2);根据鲢 *IGFBP-1* cDNA 第 1 链序列设计 3′ 和 5′ RACE 引物(3′-IGFBP-1 和 5′-IGFBP-1)及其巢式引物(3′-IGFBP-1 nest 和 5′-IGFBP-1 nest)。引物序列见表 1,引物由武汉擎科生物技术有限公司合成。以合成的 cDNA 第一链为模板,参照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 的实验步骤进行 RACE,获得的 3′ 和 5′ RACE PCR 产物经 TA 克隆后,连接到载体 pMD18-T 上,并将连接产物导入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,进行筛选,挑取阳性克隆进行测序。采用 ContigExpress 软件对 3′ 和 5′ 端序列进行拼接,获得鲢 *IGFBP-1* 基因全长 cDNA 序列。

1.2.3 鲢 *IGFBP-1* 基因全长 cDNA 的生物信息学分析 通过在线工具 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定最大开放阅读框和编码区。采用 NCBI 在线软件 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)寻找 GenBank 中的同源序列,进行同源性分析。采用 clustalx 1.8 软件对本研究克隆的鲢 *IGFBP-1* ORF 的氨基酸与其他物种的相应序列进行比较,用 MEGA 5 软件中的 Neighbor-Joining 进行聚类分析,并对其进行自展检验(bootstrap,1 000-replicates)。采用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白质的信号肽序列;采用 ExPASy

Proteomics Server(<http://expasy.org/>)蛋白质在线分析工具预测蛋白质的分子质量和等电点。

1.2.4 鲢不同组织中 *IGFBP-1* 基因表达的半定量 RT-PCR 检测 根据鲢 *IGFBP-1* cDNA 序列设计半定量引物 *IGFBP-1* Fordward 和 *IGFBP-1* Reverse (序列见表 1),预期扩增目的片段为 212 bp。以合成的鲢 *IGFBP-1* cDNA 序列为模板,采用 RT-PCR 半定量法对鲢 *IGFBP-1* mRNA 在肌肉、心脏、脑、肾脏、肝脏、腮和脾等组织的表达差异进行分析。PCR 反应体系为 15 μL: 10×反应缓冲液 1.5 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.3 μL,*Taq* 酶 1 U,cDNA 1 μL,用 ddH₂O 补足。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,48 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,32 个循环;72 ℃延伸 10 min。

表 1 本试验中用到的引物序列

Table 1 The sequences of the primers used in the experiment

引物 Primer	序列(5′→3′) Sequence(5′→3′)
IGFBP-1 1	Forward:CCTAACCACAGCCAAAGCG Reverse:CCAGGATGACACACCAACA
IGFBP-1 2	Forward:TGAAGAGAGGTGACCCGTG Reverse:CCAGTTTCTGCTGTGATTTAGTG
3′-IGFBP-1	GAGCCTAACCACAGCCAAAGCGA
3′-IGFBP-1nest	ATGTTTCAGAGGGGGAAGTGTGTGG
5′-IGFBP-1	CTTCTAACGCACAGGCGAGGCA
5′-IGFBP-1 nest	CGCACGGGTCACTCTCTTCAAC
IGFBP-1	Forward:CAACGCAATACGCAAGAAA Reverse:AGGATGACACACCAACA
β-actin	Forward:TGAGAGGTTTCAGGTGCCCAG Reverse:TGTCAGCAATGCCAGGGTAC

1.2.5 低氧胁迫不同时间后鲢肝脏中 *IGFBP-1* 基因表达的实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 以鲢 β-actin 基因为参照基因,采用实时荧光定量 PCR 法检测急性低氧胁迫下鲢肝脏组织中 *IGFBP-1* 表达量的变化,*IGFBP-1* 实时荧光定量 PCR 引物(*IGFBP-1* Fordward 和 *IGFBP-1* Reverse)及鲢 β-actin 基因引物(β-actin Forward 和 β-actin Reverse)见表 1。实时荧光定量 PCR 反应体系为:10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL,模板 1 μL,2×SYBR Premmix Ex *Taq* 酶 7.5 μL,加 ddH₂O 补足 15 μL。PCR 条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 15 s,52 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 18 s,40 个循环;72 ℃延伸 5 min。实时荧光定量 PCR 采用 Rotor-Gene Q cycler 进行。目的基因相对表达量的计算采用文献[17]的方法,首先根据扩增曲线得到荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数(Ct),计算目标基因(*IGFBP-1*)和内参基因(β-actin)Ct 值

的差异;然后根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出低氧处理样本相对于对照样本的倍数,进而得出基因相对表达量。

1.3 数据分析

数据采用“平均数±标准差(mean±SD)”表示,采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(one-way,ANOVA),利用 Duncan’s 多重比较进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 鲢 IGFBP-1 基因全长 cDNA 的获得

图 1 显示,克隆得到的鲢 IGFBP-1 cDNA (GenBank 登录号:JX163932)全长为 1 081 bp,其

开放阅读框长 789 bp,编码 262 个氨基酸残基,5'端非编码区长度为 73 bp,3'端非编码区长度为 219 bp。将克隆的鲢 IGFBP-1 的核苷酸序列与 GenBank 中其他鱼类 IGFBP-1 核苷酸进行同源性分析,结果显示,鲢与鲤的 IGFBP-1 序列相似性最高,达到了 89%;其次为斑马鱼(86%)、大鳞大麻哈鱼(80%)、大菱鲆(75%)、细须石首鱼(73%)、黄颡鱼(73%)、鲈鱼(73%)。在鲢 IGFBP-1 的 3'非编码区中有 2 个胰岛素应答靶基序 IRE T(G/A)TTT(T/G)(T/G)和 1 个低氧诱导因子 1(HIF-1)辅助顺式元件 HAS(CAGGT)。

```
1  ACATGGGGAACTCCTCATTTCACTTCAGCCGATATTTATTTATTTATCTATTTA
55  TTCTGAGCCTTACTTTGGGATGAACAGACTGCTTCTGAACCTTTTCTGGGTGGC
1  M N R L L L N F F W V A
109 AGCATTTCAGCGCACTCCTTTACGCGCCGGGCTCCGGGCTTCCCGATGGTTGG
13  A F S A L L S A P G L R A S P V V V G
163 GCAGGAACCTATCCGCTGCGCCCCGTGCTCCCGGAGCGGGCTGGCCGAGTGTCC
31  Q E P I R C A P C S P E R L A E C P
217 CGCGGTGGATGCCGGCTGTGAGGAGGTGCTTCGAGAGCCGGGCTGCGGCTGTCTG
49  A V D A G C E E V L R E P G C G C C
271 CCTCGCCTGTGCGTTGAAGAGAGGTGACCCGTGCGGGATCTACACTGCGCCCTG
67  L A C C A L K R G D P C G I Y T A P C
325 CGGCTCGGGGCTCCGCTGCTTGCCGAAACCTGGAGAAGCCCGACCCTGCACGC
85  G S G L R C L P K P G E A R P L H A
379 TCTACCCGAGGACAGGCGGTGTGCACTGAGACCCCGAGCCCTGACAGGCCA
103 L T R G Q A V C T E T P E P D Q S Q
433 AAGCGACACAACGCCAGATCATCTGTAGTCTAACAACGGGGCAATGTCCGTGAA
121 S D T T P D H P E S N N G A S V N
487 TGAAGGCAGCTCAGCGGTCTTCGTGCCCGGGCACGGCAAGCCCTTCGACCCGCG
139 E G S S A V F V P G H G K P F D P R
541 GGTCATCACTGCTAAAGAGAGCATGAAGGCCAAAGTCAACGCAATACGCAAGAA
157 V I T A K E S M K A K V N A I R K K
595 ACTGGTGGAGCAGGGCCCTTGTCATATTGAACTGCAGACAGCCCTTGACAAGAT
175 L V E Q G P C H I E L Q T A L D K I
649 CACTAAATCACAGCAGAAACTGGGAGACAAAATGACCAGATTCTACCTTCCCAA
193 T K S Q Q K L G D K M T R F Y L P N
703 TTGTGACAAACACGGTCTATACAAAGTCAAACAGTGTGAATCGTCTCTGGATGG
211 C D K H G L Y K V K Q C E S S L D G
757 TCAGAGGGGGAAGTGTGGTGTGTGTCATCCTGGAATGGGAAGAAGATTCCTGG
229 Q R G K C W C V S S W N G K K I P G
811 ATCAAGTGACCTGCCAGCAGATGCCGAGTGTCCTCCGAGGAAGTCAACCACTGATC
247 S S D L P A D A E C P E L N H *
865 TGTACACACACACACACACACACACACACATGCACACACACACACACAT
919 GCACACACGTAATACCACTGAATTTTATCATTATATTTTTTAAAAATATCTTAG
973 TATTTATTTATTGTTAGTGGTGATATTTAATTCAGGTACACTGTTTTTATTGG
1027TAAATTCCTGAACTCTCCAAAAA
```

图 1 鲢 IGFBP-1 的全长 cDNA 序列以及编码的氨基酸序列

下划横线区域为 HAS 序列;下划波浪线为 HRE 序列;* 表示终止密码子

Fig.1 cDNA sequence and amino acid sequence of silver carp IGFBP-1

The underlined are HAS sequences;the wavy underlined are IRE sequences;the stop codon is denoted by asterisk

2.2 氨基酸序列比对及系统进化树分析

由图 2 可知,鲢 IGFBP-1 N 端和 C 端的保守性较高并且富含半胱氨酸(C),其 N 端残基含有 12 个 C,C 端残基含有 6 个 C;此外,鲢 IGFBP-1 的 N 端含有 1 个典型的 IGFBP 基序 GCGCCXXC,C 端含有 1 个甲状腺球蛋白-1 基序 CWCV。

表 2 显示,鲢 IGFBP-1 与同为鲤科的鲤鱼和斑马鱼的同源性最高,分别为 95%和 94%;与细须石

首鱼、大菱鲆、大鳞大马哈鱼、鲈鱼、黄颡鱼的同源性分别为 73%,61%,61%,60%和 59%;与哺乳动物人和小鼠的同源性较低,均为 43%。由图 3 可知,鲢 IGFBP-1 位于脊椎动物 IGFBP-1 分枝上,表明不同脊椎动物的 IGFBP-1 具有较高的同源性,鲢 IGFBP-1 与鲤鱼的亲缘关系最近,首先聚为一枝,然后再与鲤科鱼类斑马鱼聚为一支。

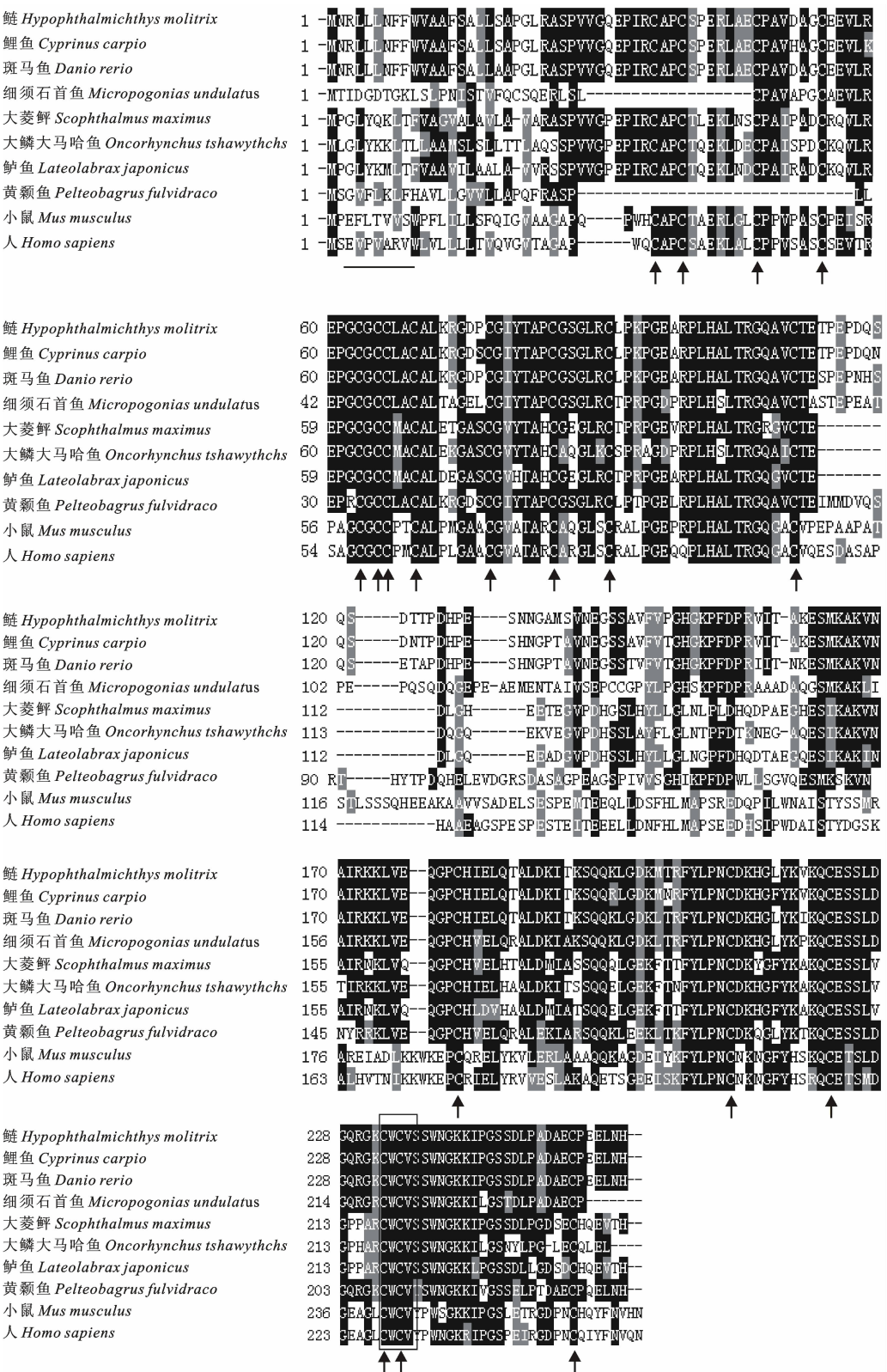


图 2 鲢与其他物种 IGFBP-1 蛋白的多重序列比较结果

箭头所指为半胱氨酸(C)残基;下划线为 IGFBP 基序;方框为甲状腺球蛋白-1 基序;黑色区域代表氨基酸完全保守

Fig. 2 Multiple alignments of *H. molitrix* IGFBP-1 and that of other species

The conserved cysteine residues are indicated by arrow; the IGFBP motif is underlined; thyroglobulin-1 motif is in box; and black blocks represent identical amino acid residues

表 2 鲢与其他物种 IGFBP-1 的氨基酸序列同源性

Table 2 The homology of *IGFBP-1* amino acids between *H. molitrix* and other species

物种名 Species	IGFBP-1 氨基酸 序列登录号 Accession number	氨基酸序列 同源性/% Identity of amino acids	物种名 Species	IGFBP-1 氨基酸 序列登录号 Accession number	氨基酸序列 同源性/% Identity of amino acids
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	ACV72066	95	鲈鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i>	AER12723	60
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAM83038	94	黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	ADK88907	59
黑点青鳉 <i>Oryzias melastigma</i>	AEA51082	74	黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	ACO82021	56
细须石首鱼 <i>Micropogonias undulatus</i>	AEI25510	73	牙鲆 <i>Paralichthys adspersus</i>	AEP95283	55
长须虾虎鱼 <i>Gillichthys mirabilis</i>	AAG13329	61	山羊 <i>Capra hircus</i>	ADM86709	45
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	AEB96249	61	小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAH13345	43
大鳞大马哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	AAV83995	61	人 <i>Homo sapiens</i>	AAH57806	43

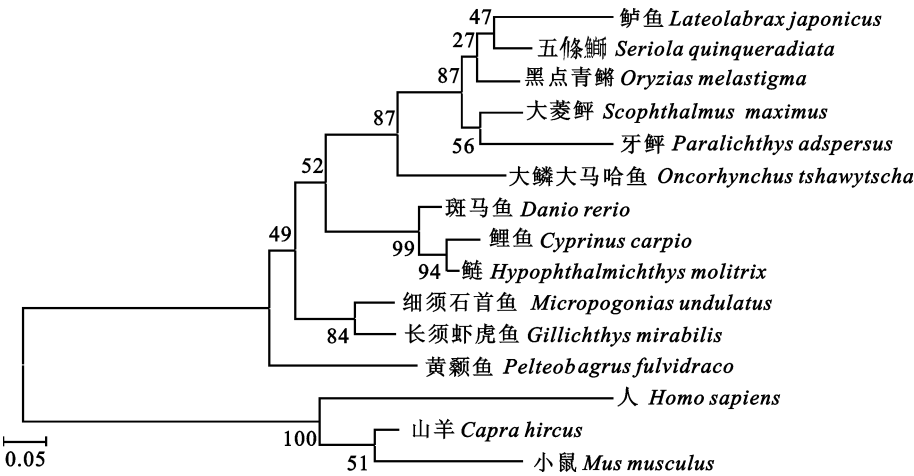


图 3 基于 IGFBP-1 氨基酸序列的鲢与其他物种进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of IGFBP-1 amino acid sequences in *H. molitrix* and other species

2.3 鲢 IGFBP-1 蛋白质的理化性质及信号肽分析

ExPASy Proteomics Server 蛋白质在线软件预测的鲢 IGFBP-1 蛋白质理论等电点 pI 为 7.42, 分子质量为 28.2 ku。SignalP 4.0 Server 在线软件推测结果显示, 鲢 IGFBP-1 蛋白质包含 1 个由 25 个氨基酸组成的信号肽。

2.4 鲢 IGFBP-1 mRNA 表达的组织特异性及低氧胁迫下表达的变化

本试验鲢脾脏、腮、肝脏、肾脏、脑、心脏和肌肉等组织 IGFBP-1 基因表达量的 RT-PCR 检测结果见图 4。急性低氧胁迫 2, 4, 6, 8, 10 和 12 h 后, 鲢肝脏中 IGFBP-1 表达量的变化如图 5 所示。

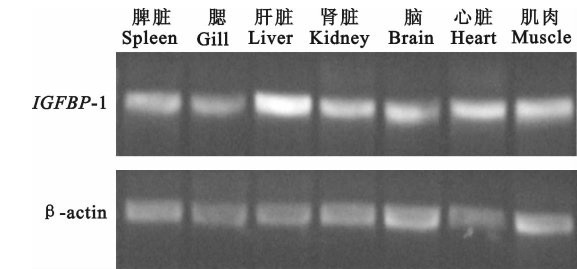


图 4 鲢不同组织 IGFBP-1 基因表达量
的 RT-PCR 检测结果

Fig. 4 RT-PCR analysis result of *IGFBP-1* gene from different tissues in silver carp

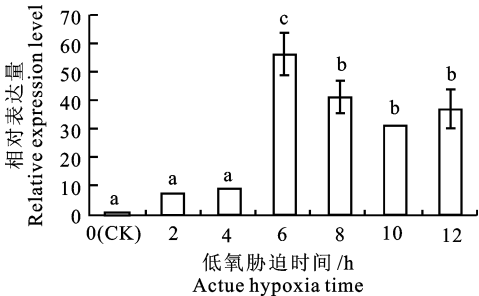


图 5 急性低氧胁迫不同时间后鲢肝脏中
IGFBP-1 表达量的变化

图柱上标不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)
Fig. 5 Liver specific expression patterns of
IGFBP-1 during acute hypoxia
Different letters mean significant difference ($P < 0.05$)

由图4可知,*IGFBP-1* 基因在所取的7种组织中均有表达,其中肝脏的表达量最高,心脏和肌肉次之,脑中的表达量最低。由图5可知,在急性低氧胁迫2和4 h,鲢肝脏中 *IGFBP-1* 表达量与对照差异不显著;在急性低氧胁迫6 h时,鲢肝脏组织中 *IGFBP-1* 表达量与对照组差异显著($P < 0.05$),为对照组的60倍;之后随着低氧胁迫时间的延长,*IGFBP-1* 在肝脏组织中表达量略有降低但仍显著高于对照组。

3 讨论

本研究通过 RACE 技术克隆了鲢 *IGFBP-1* 基因,该基因全长 1 081 bp,编码 262 个氨基酸,编码的氨基酸与同为鲤科的鲤鱼和斑马鱼有高度的同源性,分别达到 95% 和 94%。在编码氨基酸序列结构上,鲢 *IGFBP-1* 与其他脊椎动物 *IGFBPs* 相似,其 N 末端和 C 末端均富含半胱氨酸,具有识别和结合 IGFs 的作用,序列比对结果显示,不同物种中 *IGFBP* 家族的 N 末端和 C 末端具有高度的保守性。*IGFBP* 的中间可变结构域主要是充当连接 N 端和 C 端的角色,保守性较低,但是中间区域也存在一些转录后修饰的位点,如糖基化位点^[18]。此外,基于 *IGFBP-1* 的系统进化分析表明,鲢与鱼类紧密聚为一支。

RT-PCR 结果表明,鲢 *IGFBP-1* 在肌肉、心脏、脑、肾脏、肝脏、腮和脾中均有表达,其中以肝脏中的表达量最高,心脏和肌肉次之,脑中的表达量最低。从已有的研究结果来看,尽管 *IGFBP-1* mRNA 在肝脏外的其他组织中的表达量存在种属差异,但在脊椎动物肝脏细胞中均存在该基因的转录本,说明肝脏是 *IGFBP-1* 的重要表达场所^[19-21]。Fiona 等^[12]克隆了五條鰮 *IGFBP-1* 的全长 cDNA,并检测了其组织分布情况,结果显示,五條鰮 *IGFBP-1* mRNA 在各个组织中均有分布,且在肝脏中高度表达。翟万营等^[16]对牙鲈进行研究后发现,*IGFBP-1* 基因在肝脏中表达量最高,是肌肉中的 468.7 倍;其次在胃、脾、肠、性腺、肾、腮、脑、心脏中也有不同程度的表达,且这些组织间的表达量无显著性差异。Mc Lellan 等^[1]发现,*IGFBP-1* mRNA 在草鱼肝脏、肾脏、肠和心脏组织中均有表达,在肝脏和心脏中的表达水平较高;在肾脏和肠中表达次之;而在脾、肌、腮和脑中均未检测到 mRNA 的转录本。由上述结果可知,*IGFBP-1* mRNA 在肝脏中高表达,说明肝脏是 *IGFBP-1* mRNA 主要的合成部位。此

外,*IGFBP-1* mRNA 同样也可以在肝脏之外的其他组织合成,调控 IGFs 的功能。

本试验对 *IGFBP-1* 基因在低氧胁迫下鲢肝脏中的表达情况进行了研究,结果表明,在低氧胁迫 6 h 时 *IGFBP-1* 表达量急剧增加,之后略有降低但仍然显著高于对照组,说明低氧可以强烈诱导肝脏中 *IGFBP-1* 基因的表达。Maures 等^[10]对斑马鱼胚胎的研究发现,*IGFBP-1* 在整个胚胎发育阶段都有表达,出膜后则主要在肝脏中表达;当成鱼或胚胎处于缺氧状态时,*IGFBP-1* 的表达量会急剧增加。Kajimura 等^[6]通过失去-获得功能的方法研究了 *IGFBP-1* 对低氧胁迫的斑马鱼胚胎生长发育的影响,结果表明,*IGFBP-1* 通过与 IGFs 结合抑制了 IGFs 的活性,从而抑制了胚胎的生长和发育,*IGFBP-1* 的诱导表达可能是一种保守的生理机制,可抑制低氧状态下 IGF 刺激的生长发育过程。Salli 等^[22]对 *IGFBP-1* 基因结构的研究表明,在该基因第 1 个内含子上存在 3 个 HRE 的潜在一致性序列;进一步对 HRE 进行突变处理,结果使得 *IGFBP-1* 应对低氧的活性丧失,表明 HRE 在 *IGFBP-1* 的低氧应答反应中具有功能活性。

本试验对鲢 *IGFBP-1* 全长 cDNA 进行了克隆与表达分析,结果为进一步研究鲢 *IGFBP-1* 在低氧胁迫和 IGF 信号通路中的作用机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Mc Lellan K C, Hooper S B, Bocking A D, et al. Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1 (*IGFBP-1*) and *IGFBP-2* gene expression in the ovine fetus [J]. *Endocrinology*, 1992, 131(4): 1619-1625.
- [2] 陶 洋. 草鱼低氧调控 *IGFBP-1* cDNA 的克隆与功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
Tao Y. Structural and functional study of the hypoxia-inducible *IGFBP-1* cDNA in grass carp [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010. (in Chinese)
- [3] Sue M F, Robert C B. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23: 825-835.
- [4] 章 力, 黄希贵, 王德寿. 鱼类胰岛素样生长因子(IGF)系统的研究进展 [J]. *动物学杂志*, 2005, 40(2): 99-105.
Zhang L, Huang X G, Wang D S. Progress in the studies on the IGF system in fishes [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(2): 99-105. (in Chinese)
- [5] Drop S L, Kortleve D J, Guyda H J. Isolation of a somatomedin-binding protein from preterm amniotic fluid; Development of a radioimmunoassay [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59