

文章编号: 1000-0615(2001)01-0001-04

草鱼胰岛素样生长因子-Ⅰ基因克隆及序列分析

白俊杰, 叶星, 李英华, 李新辉, 简清, 罗建仁
(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要: 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法, 从草鱼肝脏的总 RNA 中扩增出胰岛素样生长因子-I(IGF-I) 基因序列, 定向克隆至质粒 pUC18。测定了该基因序列, 推导其编码的蛋白质序列。克隆的 cDNA 序列编码包括 B、C、A、D 和 E 五个区域的 117 个氨基酸。与鲤 IGF-I 成熟肽比较, 核酸序列和氨基酸序列的同源性分别为 93.8% 和 97.1%。E 区域分析结果表明, 所克隆的草鱼 IGF-I 序列属于 IGF-IE α -2 亚型。

关键词: 草鱼; 胰岛素样生长因子-I; 基因克隆

中图分类号: Q343.1; S917 文献标识码: A

Molecular cloning and sequence analysis of insulin-like growth factor I cDNA from *Ctenopharyngodon idellus*

BAI Jun-jie, YE Xing, LI Ying-hua, LI Xin-hui, JIAN Qing, LUO Jian-ren
(Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Total RNA was isolated from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) liver tissue. The cDNA encoding insulin-like growth factor I (IGF-I) peptide 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 pUC18. The cloned cDNA was sequenced and the amino acid sequence of grass carp IGF-I was predicted. The nucleotide sequencing showed the cDNA encoded 117 amino acids including B, C, A, D and E five domains. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence shared 93.8% and 97.1% homology with that of common carp mature IGF-I. Analysis of E domain indicated that cloned grass carp IGF-I belonged to IGF-IE α -2 subtype.

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

胰岛素样生长因子-I(IGF-I)是一种由 70 个氨基酸组成的单链多肽, 因其结构与胰岛素原相类似而得名。在脊椎动物中 IGF-I 通过介导生长激素达到促进生长的作用。IGF-I 前肽由 S、B、C、A、D 和 E 六个区域构成, 形成成熟肽时, S 和 E 区域被切除。近十几年来, 在人和部分哺乳类动物中 IGF-I 的研究已经取得很大的成绩, 而对鱼类 IGF-I 的研究还尚处在起步阶段, 至今仅有鲑(*Oncorhynchus tshawytscha*)、虹鳟(*Salmo gairdnei*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼(*Tilapia mossambica*)和鲇(*Clarias macrocephalus*)等少数几种鱼类的 IGF-I 基因和氨基酸序列得到研究。这些研究证明, 鱼类 IGF-I 同源性很强, 在整个进化过程中 IGF-I 比较保守。这也与 IGF-I 的生理功能上的重要性有关。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国重要的养殖品种之一, 为了探明其 IGF-I 的结构与功能以及研究 IGF-I 在水产养殖业上的潜在应用前景, 本研究克隆了草鱼 IGF-I 基因, 进行序列分析和比较。

收稿日期: 2000-5-12

资助项目: 农业部“九五”重点渔业科技资助项目(渔 95-B-96-02-08-02)

第一作者: 白俊杰(1957), 男, 福建福州人, 研究员, 主要从事鱼类基因工程研究。Tel: 020-81510127, E-mail: jjbai@163.net

1 材料和方法

1.1 材料

体重约 1 500g 草鱼来自本所水产良种基地。重组鲤生长激素由本所生产^[1], 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶及有关试剂购自 Promega 公司或华美生物工程公司。RNA 提取试剂盒 High Pure RNA Isolation Kit 和逆转录试剂盒 Access RT-PCR system 分别为 ROCH 和 Promega 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 和质粒 pUC18 由本室保存。

1.2 草鱼肝脏总 RNA 提取

为了得到高产量的 IGF-I RNA, 核酸提取前给实验鱼注射两次重组鲤生长激素, 间隔为 8h, 剂量为 2 μ g \cdot g⁻¹体重。取 10 μ g 肝脏组织, 用 ROCH 公司 High Pure Tissue RNA Isolation Kit 介绍的方法提取总 RNA, 电泳分析 RNA 质量。

1.3 引物设计与 RT-PCR

分析已报道的鲑、鲤及哺乳动物 IGF-I 基因的保守区域设计并合成 5' 和 3' 端引物: 5' 端引物, 5' CCGAATTCATGGGCGGAGACGCTGT 3'。3' 端引物, 5' CGCGGATCCTTACTAAATGCGATAGTTT 3'。5' 端引物拟从鱼 IGF-I 成熟肽的第一个氨基酸的密码子开始扩增, 3' 端引物拟从 IGF-I 基因的终止密码子 TGA 开始反向扩增。为了方便克隆, 在 5' 端引物和 3' 端引物中分别加入一个 EcoR I 和一个 BamH I 酶切位点。按逆转录试剂盒 Access RT-PCR system 介绍的方法进行 cDNA 合成和 PCR 扩增。用逆转录酶 48 $^{\circ}$ C 45 min 合成 cDNA 第一条链, 然后进行 PCR 扩增; 头 10 个循环 PCR 反应条件为变性 94 $^{\circ}$ C、30s; 退火 50 $^{\circ}$ C、30s; 延伸 68 $^{\circ}$ C、45s。后 25 个循环 PCR 条件为变性 94 $^{\circ}$ C、30s; 退火 55 $^{\circ}$ C、45s; 延伸 68 $^{\circ}$ C、1min, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。取 5 μ L PCR 产物作 1% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物在约 380 bp 处应有一条扩增带。

1.4 克隆与测序

PCR 产物纯化后, 用 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 回收长度约 400 bp DNA 片段。同时用 EcoR I 和 BamH I 将 pUC18 双酶切, 在 T₄DNA 连接酶作用下, 将回收的 DNA 片段定向插入 pUC18, 构建 pUCgIGF-I 重组质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 用蓝白斑和电泳酶切法筛选重组子^[2]。DNA 测序在 ABI PRISM TM377 全自动荧光测序仪上进行, 用 DNA 分析软件分析测定结果。

2 结果

2.1 草鱼 IGF-I 基因的克隆与测序

用 5' 端引物和 3' 端引物扩增的 PCR 产物纯化后经 EcoR I 和 BamH I 酶切, 定向插入同样双酶切的质粒 pUC18, 筛选得到 3 个重组子 (pUCgIGF2、pUCgIGF3、pUCgIGF7), 经 EcoR I 和 BamH I 酶切鉴定, 均有约 380bp 的插入片段。图 1 是 PCR 产物和质粒的酶切图。取质粒 pUCgIGF2 和 pUCgIGF7 进行序列测定, 测序结果和推测的氨基酸序列见图 2, 图 3 是测序的部分扫描结果。克隆到的目的基因片段共 354bp, 编码 117 个氨基酸。从 IGF-I 成熟肽氨基酸的第一个密码子到终

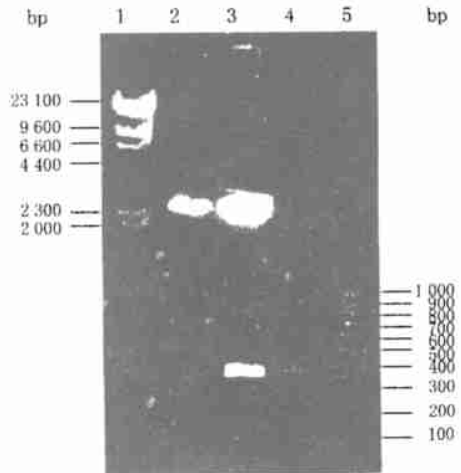


图 1 PCR 产物及 pUCgIGF7 酶切的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR products and restriction pattern of pUCgIGF7

1. ADNA/Hind III 2. PUC18/EcoR I + BamH I, 3. pUCgIGF7/EcoR I + BamH I, 4. RT-PCR products, 5. 100bp DNA ladder

止密码子 TAG。去掉了该基因的信号肽序列。本文所克隆的基因序列和推测的蛋白质序列已登录入 GenBank、EMBL 和 DDBJ 基因库, 序号分别为 AF247658 和 AAF56819. 1。

```

GGG CCG GAG ACG CTG TGC GGG GCG GAG CTT GTA GAC ACG CTG CAG TTT GTG TGT GGA GAC    60
G   P   E   T   L   C   G   A   E   L   V   D   T   L   Q   F   V   C   G   D           20
AGG GGC TTT TAT TTC AGC AAA CCA ACA GGA TAT GGG CCT TGT TCG AGG CGG TCG CAC AAC    120
R   G   F   Y   F   S   K   P   T   G   Y   G   P   S   S   R   R   S   H   N           40
CGC GGC ATT GTG GAC GAA TGC TGC TTT CAG AGC TGC CAA CTG CGG GGC CTC GAG ATG TAC    180
R   G   I   V   D   E   C   C   F   Q   S   C   E   L   R   R   L   E   M   Y           60
TGT GCA CCC GTG AAA ACC GGC AAA TCT CCA CGA TCC CTA CGA GCG CAA CGG CAC ACA GAT    240
C   A   P   V   K   T   G   K   S   P   R   S   L   R   A   Q   R   H   T   D           80
ATC ACC AGG ACA GCA AAG AAA CCT TAT TCT GGA CAT AGC CAC TCT TCC TGT AAG GAG GTT    300
I   T   R   T   A   K   K   P   I   S   G   H   S   H   S   S   C   K   E   V           100
CAT CAG AAG AAC TCT AGC CGA GGA AAC ACA GGG GGC AGA AAC TAT CGC ATT TAG          354
H   Q   K   N   S   S   R   G   N   T   G   G   R   N   Y   R   I                       177

```

图 2 草鱼胰岛素样生长因子-I cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of IGF-I cDNA from grass carp and predicted amino acid sequence

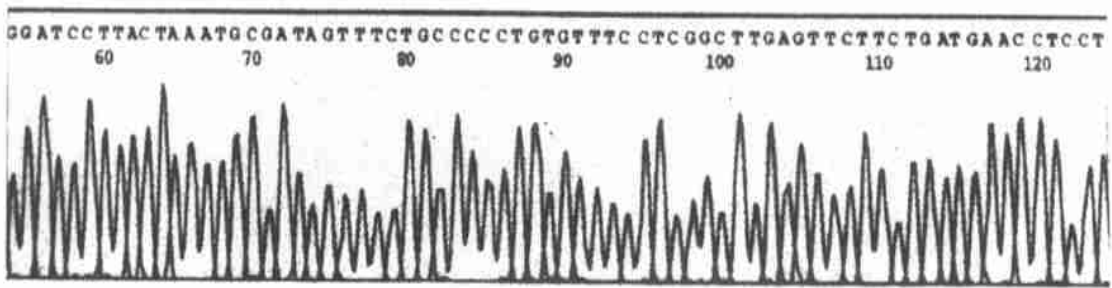


图 3 草鱼胰岛素样生长因子-I cDNA 序列部分激光扫描结果

Fig. 3 Part sequencing analysis of IGF-I cDNA from grass carp by automatic laser scanning

2.2 序列分析

参照人和其它脊椎动物的 IGF-I 结构, 推测所克隆的草鱼 IGF-I 基因的氨基酸序列分为 B、C、A、D 和 E 五个区域, 其中 B 区 29 个氨基酸、C 区 12 个、A 区 21 个、D 区和 E 区分别为 8 个和 47 个氨基酸。成熟肽 B、C、A、D 四个区域共有 6 个半胱氨酸残基。

3 讨论

本文采用 RT-PCR 技术首次成功地克隆到草鱼 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。将草鱼 IGF-I 的基因序列与鲤 IGF-I^[3] 进行比较, 发现在 B、C、A、D 和 E 五个区域中两种鱼核酸的同源性达 92.6%。差异主要分布在 C 和 D 区, 同源性分别为 88.9% 和 87.5%。而 B 区和 A 区的同源性分别是 100% 和 92.1%。图 4 是草鱼 IGF-I 与鲤^[3]、金鱼 (GenBank 序号 AF001006)、鲑^[4]、鳟^[5]、罗非鱼^[6]、黑鲷 (GenBank 序号 AF030573)、大杜父鱼 (*Cottus scorpilus*)^[7] 等几种鱼类和蛙^[8]、鸡^[9]、大鼠^[10] 等脊椎动物及人^[11] 的 IGF-I 氨基酸序列比较。草鱼 IGF-I 与鲤和金鱼仅在 D 区有两个氨基酸残基的差别。与人和鼠类等的同源性在 78% 以上。而且差异主要集中在 C 和 D 区上, B 和 A 区的同源性较高, 在 90% 以上。在比较的 12 种动物中都含有定位相同的 6 个半胱氨酸残基, 这对于蛋白质构象的确定是必要的。图 4 同源性的比较基本显示了动物的系统分类地位, 即草鱼 IGF-I 与同属鲤科的鲤和金鱼的同源性最高, 与鲑科的鲑、丽鱼科的罗非鱼等次之, 与哺乳类的人和鼠类的同源性较低。

	B 区	C 区	A 区	D 区
草鱼	GPETLCGAEVLVDTLQFVCGDRGFYFSKPT	GYGPSRRSRNR	GIVDECCFQSCELRRLEMYCA	PVKTKGKSP
鲤鱼	-----	-----	-----	---P--T-
金鱼	-----	-----	-----	---P--T-
蛙	-----E-----	-----	-----	---S--AA
鳅	-----E-RVH-----	-----	-----	---S--AA
罗非鱼	-----E--N--	---A--	-----Q-----	---P-IS
黑鲷	S-----E-----	---NA--	-----	-A-S-AA
大杜父鱼	-----E-----G	---NA--	-----	-P-S-AA
蛙	-----	---SNN--H-	-----DF-	-A-PA-AA
鸡	-----A-----	---S---L-HK	-----D-----	-I-PP-AA
鼠	-----A-----P--N--	---S-I--APQT	-----R--D-----	V RC-PT-AA
人	-----A-----D--N--	---S-S--APQT	-----R--D-----	V -L-PA-AA

图 4 草鱼胰岛素样生长因子-I 与几种不同脊椎动物的氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of amino acid sequences of IGF-I in grass carp and several vertebrates

注: - 表示该氨基酸与草鱼 IGF-I 氨基酸一致; * 表示该处氨基酸缺失

Shambloott 和 Chen^[12] 在研究鲑鳟鱼类 IGF-I 时发现存在四种 IGF-I mRNA, 依其分子大小分别命名为 E α -1、E α -2、E α -3 和 E α -4。这些转录产物都含有相同的 B、C、A 和 D 区域, 仅仅是 E 区域转录后不同剪接造成的。E α -1 的 E 区域含有 35 个氨基酸、E α -2 含 47 个、E α -3 含 62 个、E α -4 含 74 个氨基酸。通过与鲑这四种 IGF-I 序列比较, 本文所报道的草鱼 IGF-I 序列应属于 IGF-IE α -2 亚型。根据 Liang 等^[3] 对鲤成鱼肝 cDNA 进行的检测, 认为 IGF-IE α -2 是鲤成鱼肝脏表达的主要形式。草鱼是否也是这样还有待进一步研究。目前, 草鱼 IGF-I 基因已在原核细胞中获得表达, 有关基因表达和重组草鱼 IGF-I 对鱼类的生理作用有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 白俊杰, 马进, 简清, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 生长激素基因克隆及原核表达 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(3): 409-412.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual(2nded) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [3] Liang Y H, Cheng C H, Chan K M. Insulin-like growth factor-IE α -2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Mol Marine Biol Biotechnol, 1996, 5(2): 145-152.
- [4] Wallis A E, Devlin R H. Duplicate insulin-like growth factor-I genes in salmon display alternative splicing pathways [J]. Mol Endocrinol, 1993, 7(3): 409-422.
- [5] McRory J E, Sherwood N M. Catfish express two forms of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the brain, Ubiquitous IGF-I and brain-specific IGF-I [J]. J Biol Chem, 1994, 269(28): 18588-18592.
- [6] Schmid A C, Nef E, Kloas W, et al. Insulin-like growth factor I+II in the ovary of the bony fish *Oreochromis mossambicus*: localization, expression, cDNA Sequence [J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 156: 141-149.
- [7] Loffing-Cueni D, Schmid A C, Graf H, et al. IGF-I in the bony fish *Cottus scopiopus*: cDNA, expression and differential localization in brain and islets [J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 141(1-2): 187-194.
- [8] Kajimoto Y, Rotwein P. Evolution of insulin-like growth factor I (IGF-I): structure and expression of an IGF- precursor from *Xenopus laevis* [J]. Mol Endocrinol, 1990, 4: 217-226.
- [9] Kajimoto Y, Rotwein P. Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter element [J]. J Biol Chem, 1991, 266, 9724-9731.
- [10] Roberts C T Jr, Lasky S R, Lowe W L, et al. Rat IGF-I cDNAs contain multiple 5'-untranslated regions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 146, 1154-1159.
- [11] Rinderknecht E, Humbel R E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structure homology with proinsulin [J]. J Biol Chem, 1987, (8): 2769-2776.
- [12] Shambloott 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 Biotechnol, 1993, 2: 351-361.