

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0015 - 07

草鱼胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 基因的全长 cDNA 克隆及表达

陶 洋, 邹曙明

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

摘 要: 克隆了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP-1)基因的全长 cDNA, 并对草鱼不同时期的胚胎和成鱼不同组织进行了 RT-PCR 分析, 以探索草鱼 IGFBP-1 基因的生物学功能。结果显示: (1) 草鱼 IGFBP-1 基因 cDNA 全长为 1 135 bp, 包含一个 789 bp 阅读框, 编码 262 个氨基酸残基; 草鱼与鲤、斑马鱼、沟鲈、大鳞大麻哈鱼、虹鳟、五条鲈、小鼠和人的 IGFBP-1 氨基酸序列相似度分别为 94%、93%、69%、60%、58%、56%、40% 和 38%; 草鱼 IGFBP-1 蛋白的 N 端和 C 端序列负责与胰岛素样生长因子(IGF)结合, 其保守性较高。(2) RT-PCR 分析结果表明, 草鱼胚胎期 IGFBP-1 mRNA 的表达水平很低, 在受精后 4 hrs 和 8 hrs 胚胎未能检测到转录本, 受精 12 hrs 后, 仅能检测到微量表达; 草鱼 IGFBP-1 mRNA 在肝脏、肾脏、肠和心脏组织中具有表达活性。鉴于 IGFBP-1 基因在 IGF 信号通路中的重要作用, 又是一个低氧诱导基因, 上述结果可为进一步探索 IGFBP-1 基因的功能奠定基础。

研究亮点: IGFBP-1 是胰岛素样生长因子结合蛋白家族的重要成员, 是典型的低氧诱导基因, 有关该基因的研究在经济鱼类中少见。草鱼作为我国养殖产量最大的淡水鱼类之一, 其生长发育与耐低氧机制倍受关注。因此, 进行草鱼 IGFBP-1 基因的克隆和表达研究具有一定的创新性。

关键词: 草鱼; 胰岛素样生长因子结合蛋白 1; 全长 cDNA; RT-PCR

中图分类号: S 917

文献标识码: A

包括鱼类在内的脊椎动物的生长主要受胰岛素样生长因子(IGFs)信号通路的调控^[1], IGFBP-1 作为 IGFs 通路中的一个重要组成蛋白, 其主要功能是结合和运载 IGF-1, 延长 IGF-1 的半衰期, 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^[2]。另外, IGFBP-1 受低氧诱导因子和胰岛素等蛋白的调控, 在低氧胁迫下 IGFBP-1 蛋白表达增强, 可通过结合 IGFs 蛋白, 抑制 IGFs 信号通路, 降低胚胎和成体生长, 从而使机体细胞适应低氧环境, 以维持生存^[2]。目前, 对养殖鱼类 IGFBP-1 的基因序列和功能研究开展的较少, 迄今为止, 国内外仅在斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、沟鲈(*Ictalurus punctatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus*

mykiss)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、五条鲈(*Seriola quinqueradiata*) 6 种鱼类中分离出 IGFBP-1 基因的全长 cDNA^[3-5], 其生物学功能研究开展的很少。

草鱼(*C. idellus*)属骨鲮总目(Ostariophysi)、鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、草鱼属(*Cetpharyngodon*), 为典型的草食性鱼类。草鱼生长迅速, 饲料来源广, 是我国淡水养殖的四大家鱼之一。2008 年, 我国草鱼总产量已达 400 万吨^[6]。本研究采用末端快速扩增法(RACE)克隆了草鱼 IGFBP-1 基因的全长 cDNA, 并对草鱼不同时期的胚胎和成鱼不同组织进行了 RT-PCR 分析, 为进一步深入探索草鱼 IGFBP-1 的生物学功能积累资料。

收稿日期: 2010-04-23 修回日期: 2010-06-24

基金项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划项目(2009AA10Z105); 公益性行业(农业)科研专项(200903045); 上海市教委曙光计划(08SG50)

作者简介: 陶 洋(1985-), 男, 硕士研究生, 专业方向为鱼类遗传育种研究。E-mail: ytao0818@126.com

通讯作者: 邹曙明, Tel: 021-61900435, smzou@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

草鱼成鱼和受精卵均取自上海海洋大学青浦鱼类育种试验站。成鱼为3龄,体重约为3 500 g,活体快速解剖后,取脾、肌肉、肾脏、眼、心脏、鳃、肝脏、胰脏、肠、脑、性腺置于液氮中冻存,运回实验室进行总 RNA 的提取;受精卵从草鱼产卵池中获得,充氧打包后运送至实验室,在胚胎培养液 (embryo rearing solution, ERS) 中继续培养,培养温度为 18 ~ 22 ℃。在 Nikon SMZ1500 体视显微镜下,每 4 小时观察胚胎发育时相和拍照,同时取相应时相胚胎 20 个,进行胚胎总 RNA

的提取。不同组织和胚胎的总 RNA 提取后,置于 -80 ℃ 冰箱保存、备用。

1.1.2 试剂

总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 invitrogen 公司;3'-RACE 试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0)、DNA 酶、PMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司;Taq 酶、dNTP 混合物、DNA Marker、胶回收试剂盒购自天根生物有限公司;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存;引物委托上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1);DNA 测序在北京华大基因研究中心进行。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers in the present study

引物名	序列(5'-3')	用途	片段大小(bp)
IGFBP-1-F	GCTGCCTCGCCTGTGCGTTGAAG	小片段扩增	525
IGFBP-1-R	TCCAGGATGACACACACCAACAC		
3'-IGFBP-1	GCATGAAATCCAAAGTCAACGCAATACG	3'-RACE	381
3'-IGFBP-1-nest	AAAGTCAAACAGTGTGAATCGTCTC		
5'-IGFBP-1	GATTCACACTGTTTGACTTTGTAT	5'-RACE	689
5'-IGFBP-1-nest	GTGATTTAGTGATCTTGTCAAGGGC		
RT-F	GAGGATCCTGAGCCTTGCTTTGGGATG	RT-PCR 分析	819
RT-R	GATAGCTACGTGGTTGAGTTCTCCGGGAC		
β -actin-F	CCGCTGCCTCTTCTTCCTC	RT-PCR 对照	592
β -actin-R	CTACCTCCCTTTGCCAGTTTCCGC		

1.2 方法

1.2.1 IGFBP-1 全长 cDNA 的克隆

取草鱼肝脏组织总 RNA,以 3'-RACE 试剂盒中的逆转录酶进行单链 cDNA 扩增,采用 IGFBP-1-F 和 IGFBP-1-R 引物(表 1)先扩增一段 IGFBP-1 序列,并进行克隆和测序。根据测序结果,设计 3'-RACE 引物(3'-IGFBP-1,表 1)和 3'-RACE 巢式引物(3'-IGFBP-1-nest,表 1),并进行第一次 PCR 扩增;再以 PCR 产物为模板,用 M13 Primer M4 和 3'-RACE 巢式引物进行巢式 PCR 扩增。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,割胶回收目的片段,进行连接、转化、克隆,甘油保存菌液进行双向测序。上述 2 轮 PCR 反应程序均为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环;72 ℃ 延长 5 min。

根据 3'-RACE 测序结果,按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 实验流程,设计

5'-RACE 引物(5'-IGFBP-1,表 1)和 5'-RACE 巢式引物(5'-IGFBP-1-nest,表 1)。首先反转录获得 5'端第一链 cDNA,再用试剂盒中 10 \times Universal Primer A (UPM) 和 5'-RACE 引物进行第一轮 PCR 扩增,PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,65 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。然后,以第一轮 PCR 产物为模板,用 Nested Universal Primer A NUP 和 5'-RACE 巢式引物进行第二轮 PCR,PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 所得产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,进行回收、连接、转化、克隆和测序。

1.2.2 序列分析

用 BioEdit 7.0 软件中的 CLUSTAL W^[7] 程序比较 5'-RACE、3'-RACE 和中间序列重叠部分,去掉序列两端添加的引物部分,拼接得到全长

cDNA 序列。

采用 Blast n/p 软件,在 GenBank 中进行同源搜索,对同源 IGFBP-1 核苷酸和氨基酸序列进行比对分析。以 MEGA 4.0 软件包中的 Neighbor-Joining 重建系统树,并对其进行自展(bootstrap, 1000-replicates)检验,所用的其它脊椎动物的 IGFBP-1 的 GenBank 序列号如下:人(NM000596)、牛(NM174554)、大鼠(NM013144)、小鼠(NM008341)、松鼠(AY560836)、鸡(NM001001294)、爪蟾(BC060008)、虹鳟(DQ190460)、大鳞大麻哈鱼(AY662657)、斑马鱼(IGFBP-1a, NMI73283; IGFBP-1b, NM001098257)、沟鲈(FJ668941. 1)、五条鲷(EU650626)和鲤(FJ797306)。

1.2.3 RT-PCR 分析

以草鱼 β -actin 为参照,进行草鱼 IGFBP-1 转录产物的 RT-PCR 分析。草鱼不同组织和各时期胚胎总 RNA 用 DNA 酶处理后,取 5 μ g 总 RNA 合成第一条链 cDNA,方法同 1.2.1 节。根据草鱼 IGFBP-1 基因全长 cDNA 序列和斑马鱼基因序列信息,设计一对跨内含子的向正反引物(RT-F 和 RT-R,表 1),同时设计一对跨内含子的 β -actin 正反向引物(β -actin-F 和 β -actin-R,表 1),通过循环次数递增的方法确定 IGFBP-1 和 β -actin 扩增的线性增长期,获得最适扩增循环数。RT-PCR 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测和拍照。

2 结果

2.1 草鱼 IGFBP-1 全长 cDNA 的克隆及序列分析

以草鱼肝脏总 RNA 为模板,进行 3'-RACE 扩增和测序,获得一条 406 bp 序列,经序列比对,该序列与其它脊椎动物 IGFBP-1 的 cDNA 同源,为草鱼 3'端 IGFBP-1 基因的 cDNA 片段;根据 5'-RACE 操作流程,获得一条 604 bp 序列,经比对分析,该序列为草鱼 5'端 IGFBP-1 基因 cDNA 片段。对 3'-、5'-RACE 的序列和中间小片段序列信息,进行比对、拼接得到草鱼 IGFBP-1 全长 cDNA 序列(图 1)。草鱼 IGFBP-1 基因 cDNA 全长为

1 135 bp,包括一段 103 bp 的 5'非翻译区(UTR),一段编码 262 个氨基酸残基的 789 bp 阅读框和一段 243 bp 的 3'非翻译区(图 1)。

在草鱼 IGFBP-1 基因 cDNA 的 5'-和 3'-UTR 中,各包含 3 个与 mRNA 瞬时表达有关的快速降解信号 ATTTA(图 1);此外,在 3'-UTR 中,还包含了 2 个胰岛素应答靶基序 IRE (T(G/A)TTT (T/G)(T/G))、1 个低氧诱导因子 1(HIF-1)辅助顺式元件 HAS(CAGGT)和 PolyA 加尾信号 AATAA(图 1)。与其它 IGF 结合蛋白类似,草鱼 IGFBP-1 蛋白的功能结构区域也富含半胱氨酸(Cys),其 N 端 1-82 个氨基酸残基中的 Cys 数目达 12 个,在 C 端 156-244 残基中也存在 6 个 Cys(图 2);另外,草鱼 IGFBP-1 的 N 端包含一个典型的 IGFBP 基序(GCGCCXXC),C 端包含一个甲状腺球蛋白-1 基序(CWCV)(图 2)。

将草鱼 IGFBP-1 的 ORF 氨基酸序列与其它物种相应序列进行相似性比较,结果表明:草鱼 IGFBP-1 与同为鲤科的鲤和斑马鱼间具有较高的同源性,相似度为 94% 和 93%;而与五条鲷、大鳞大麻哈鱼、虹鳟和沟鲈的同源性分别为 69%、60%、58% 和 56%;与哺乳类动物的进化关系较远,与鼠和人的同源性分别低至 40% 和 38%。草鱼 IGFBP-1 蛋白的 N 端和 C 端的结构域,主要负责与 IGF 结合,这些区域的保守性较高(图 2),而 N 端和 C 端间的序列保守性较差,主要起连接 N 端和 C 端结构域的作用。NJ 聚类结果显示,草鱼 IGFBP-1 可与其它脊椎动物 IGFBP-1 聚类(图 3)。

2.2 草鱼胚胎不同时期和成鱼各组织 IGFBP-1 的表达

RT-PCR 分析结果表明,草鱼胚胎期 IGFBP-1 mRNA 的转录水平很低,受精后 4 h 和 8 h 的胚胎未能检测到转录产物,受精 12 h 后,也仅能检测到极微弱转录(图 4)。草鱼成鱼各组织 RT-PCR 分析结果显示,草鱼 IGFBP-1 mRNA 在肝脏、肾脏、肠和心脏组织中具有表达活性,在肝脏和心脏中的表达水平较高,在肾脏和肠中的表达次之,在脾、肌、眼、鳃、胰脏、肠、脑和性腺中均未能检测到 mRNA 转录本(图 5)。

```

-103  ACGCGGGAGTCATTTTGAAGAGCGCAAAGACAGCGAGGAACCTCCTATTTCACTTCAGCCGATATTAT
      TTTATTATCTATTATTCTGAGCCCTGCTTTGGG
1     ATGAACAGACTGCTTCTGAACTTTTTCTGGGTGGCAGCATTTCAGC
1     M N R L L L N F F W V A A F S
46    GCACTCCTTTCAGCGCCGGGGCTCCGGGCTTCCCCAGTGGTTGGG
16    A L L S A P G L R A S P V V G
91    CGGGAACCTATCCGCTGCGCCCCGTGCTCCCCGGAGCGGCTGGCT
31    R E P I R C A P C S P E R L A
136   GAGTGTCTGCGGTGGATGCCGGCTGTGAGGAGGTGCTTCGAGAG
46    E C P A V D A G C E E V L R E
181   CCGGGCTGCGGCTGCTGCCTGCGCTGCGCGTTGAAGAGAGGTGAC
61    P G C G C C L A C A L K R G D
226   CCGTGCGGGATCTACACTGCGCCCTGCGGCTCAGGGCTCCGCTGC
76    P C G I Y T A P C G S G L R C
27    TTGCCGAAACCCGGTGAAGCCCGACCCCTGCACGCACTCACCCGA
91    L P K P G E A R P L H A L T R
316   GGACAGGCGGTGTGCACTGAGACCCCCGAGCCTGATCAGAGCCAA
106   G Q A V C T E T P E P D Q S Q
361   AGCGACACAACGCCAGATCATCCTGAGTCTAACAACGGGGCAATG
121   S D T T P D H P E S N N G A M
406   TCGGTGAATGAAGGCAGCTCAGCGGTCTTCGTGCCCGGGCACGGC
136   S V N E G S S A V F V P G H G
451   AAGCCCTTCGACCCGCGGGTCATCACTGCTAAAGAGAGCATGAAA
151   K P F D P R V I T A K E S M K
496   TCCAAAGTCAACGCAATACGCAAGAACTGGTGGAGCAGGGTCTCT
166   S K V N A I R K K L V E Q G P
541   TGTCATATTGAACTGCAGACGGCCCTTGACAAGATCACTAAATCA
181   C H I E L Q T A L D K I T K S
586   CAACAGAACTGGGAGACAAAATGACCAGATTCTACCTTCCAAAT
196   Q Q K L G D K M T R F Y L P N
631   TGCGACAAACACGGTCTATACAAAGTCAAACAGTGTGAATCGTCT
211   C D K H G L Y K V K Q C E S S
676   CTGGATGGTCAGAGGGGAAGTGTGGTGTGTGCATCCTGGAAT
226   L D G Q R G K C W C V S S W N
721   GGAAGAAGATTCTGGATCAAGTGACCTGCCAGCAGATGCCGAG
241   G K K I P G S S D L P A D A E
766   TGTCCCGAGGAACTCAACCACTGA
256   C P E E L N H *
790   TCTGTCTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
      CAGGGGACCTAAAGAGCCACACACACAGTAATACCACTGAATTTATCATTATATTTTTAAAAATATCT
      TAGTATTATTATTGTTAGTGGTGGTATTTAATTCAAGGTACACTGTTTTTGATTGGTAAATTCCTCGA
      AAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 草鱼 IGFBP-1 基因 cDNA 及其编码氨基酸序列

Fig. 1 The sequences of cDNA and deduced amino acid of gene IGFBP-1 in *C. idellus*

mRNA 快速降解信号以方框表示；下划横线区域为 HAS 序列；下划波浪线为 IRE 序列；双下划线区域为多聚腺苷酸加尾信号；* 表示终止密码子。

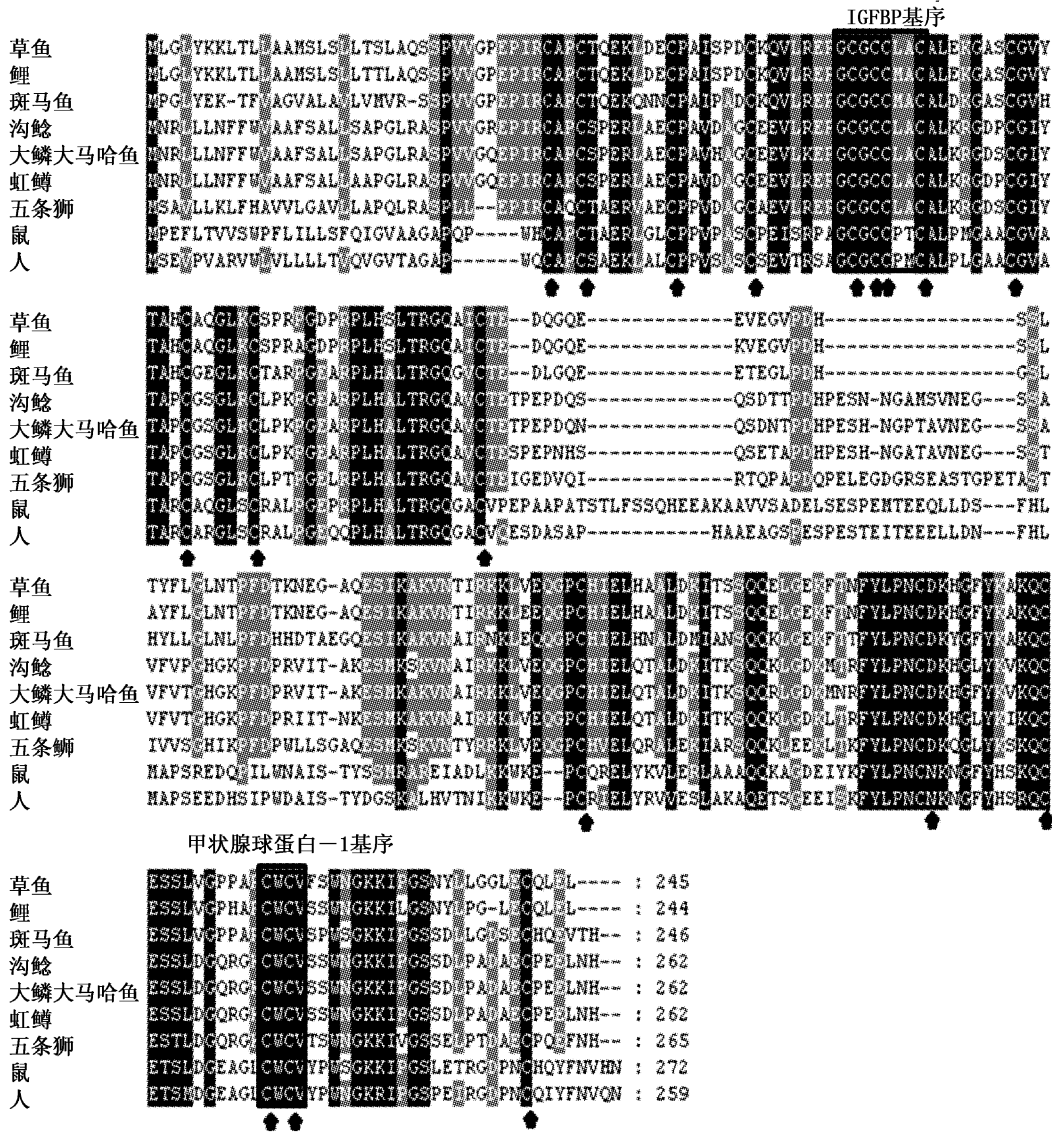


图 2 IGFBP-1 氨基酸序列对比分析

Fig. 2 Alignment analysis of IGFBP-1 amino acid sequences

箭头所指氨基酸残基为保守的半胱氨酸;黑框包含的氨基酸序列为 IGFBP 基序和甲状腺球蛋白-1 基序;黑色区域代表氨基酸残基完全保守;灰色区域代表氨基酸残基 80% 保守。

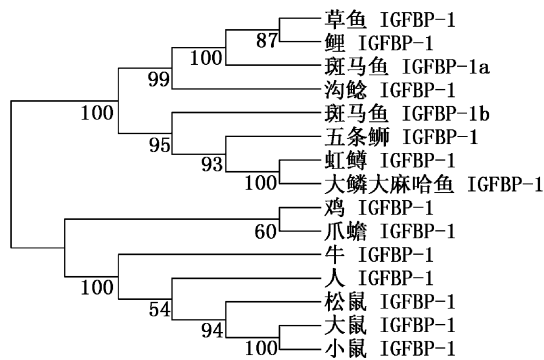


图 3 草鱼与其它脊椎动物 IGFBP-1 基因的 NJ 聚类树

Fig. 3 Phylogenetic tree of IGFBP-1 constructed by the Neighbor-Joining (NJ) method

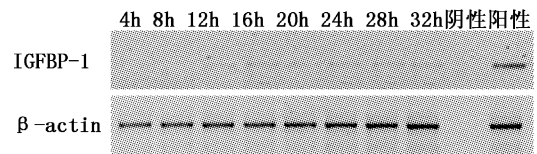


图 4 草鱼不同胚胎时期的 IGFBP-1 mRNA 的表达
Fig. 4 IGFBP-1 transcripts in embryos at different stages in *C. idellus*

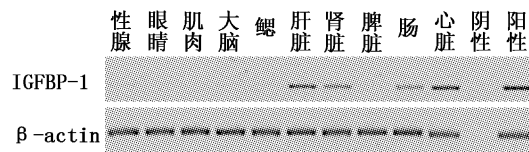


图 5 草鱼成鱼不同组织 IGFBP-1 mRNA 的表达
Fig. 5 IGFBP-1 transcripts in different tissues of adult fish in *C. idellus*

3 讨论

本研究获得了草鱼 IGFBP-1 基因的全长 cDNA 序列,草鱼 IGFBP-1 与鲤、斑马鱼、沟鲈、大鳞大麻哈鱼、虹鳟、五条鲈、小鼠和人的相似性分别为 94%、93%、69%、60%、58%、56%、40% 和 38%,系统聚类树结果表明草鱼 IGFBP-1 位于脊椎动物 IGFBP-1 分支上,这些结果表明不同脊椎动物的 IGFBP-1 间具有较高的同源性。在编码氨基酸序列结构上,草鱼 IGFBP-1 也与其它脊椎动物 IGFBP 类似,其 N 端和 C 端均富含半胱氨酸,起着识别和结合 IGFs 的作用,其中间区域只是充当连接 N 端和 C 端的角色,不含半胱氨酸,连接氨基酸序列的同源性较差^[8-9]。在草鱼 IGFBP-1 的 5' 和 3' UTR 中,存在 6 个参与调控 mRNA 快速降解的顺式元件、2 个胰岛素应答元件 (IRE) 和 1 个低氧诱导因子辅助元件 (HAS),说明草鱼 IGFBP-1 mRNA 的稳定性较差,与其它脊椎动物一样,其 mRNA 水平易受胰岛素、饥饿、低氧环境等因素的瞬时调控^[3,10-13]。

与 IGFBP-2、-3、-4、-5 和 -6 等其它 IGF 结合蛋白不同,IGFBP-1 主要在哺乳动物肝脏中转录^[8,14]。在非鲤科鱼类中的大鳞大麻哈鱼的肝脏和肌肉存在 IGFBP-1 mRNA 的转录^[15],在五条鲈中,其成鱼所有组织中发现有少量转录;鲤科鱼类中,IGFBP-1 仅在斑马鱼肝脏和肾脏中存在转录^[3],而鲤中则是在所有组织中都存在该基因的转录。本研究发现,在草鱼肝脏、肾脏、肠、心脏组织中存在 IGFBP-1 mRNA 的转录,其中肝脏和心脏转录水平最高,肾脏和肠次之,在脾、肌、眼、鳃、胰脏、肠、脑和性腺中均未能检测到 mRNA 的转录。从已有的研究结果来看,尽管 IGFBP-1 mRNA 在肝脏外其它组织中的转录存在种属差异,但在包括鱼类在内的脊椎动物中,它们的肝脏细胞中均存在该基因的转录本,表明肝脏是 IGFBP-1 的重要表达场所。根据已有的研究结果,IGF 信号通路中的配体 (IGF-1 和 IGF-2) 也主要在肝脏中合成^[1],然后经循环系统运送到各个靶器官或组织细胞,肝脏作为 IGFBP-1 的重要合成场所,也可能通过同样方式行使其生物学功能。

在鱼类中,有关 IGFBP-1 在胚胎发育的不同阶段的表达模式的研究不多,迄今为止,仅在模

式生物斑马鱼中进行过相关研究,如在斑马鱼中发现存在 2 个 IGFBP-1 同源基因 (IGFBP-1a 和 -1b),其 IGFBP-1a 在整个胚胎发育阶段都有转录,而 IGFBP-1b 直到胚胎发育后期才能检测到转录^[3]。本实验 RT-PCR 结果表明,草鱼胚胎在受精后 4 h 和 8 h 未能检测到 IGFBP-1 mRNA 的表达,受精 12 h 后,即使进行 35 个 PCR 循环,也仅能检测到微量表达。因此,我们推测草鱼 IGFBP-1 在胚胎期的转录并不是组成型的,其水平可能受到其它基因或外界因子的诱导或降解,该推测是否成立还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ZOU S, KAMEI H, MODI Z, *et al.* Zebrafish insulin-like growth factor genes: Gene duplication, structural and expression conservation and divergence [J]. *Plos One*, 2009, 4(9): e7026.
- [2] MCLELLAN 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 - 1628.
- [3] KAMEI H, LU L, JIAO S, *et al.* Duplication and diversification of the hypoxia-inducible IGFBP-1 gene in zebrafish [J]. *Plos One*, 2008, 3(8): 3091.
- [4] KAMANGAR B B, GABILLARD J C, BOBE J. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) -1, -2, -3, -4, -5, and -6 and IGF-related protein 1 during rainbow trout postvitellogenesis and oocyte maturation: molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(5): 2399 - 2410.
- [5] PEDROSO F L, FUKADA H, MASUMOTO T. Molecular characterization, tissue distribution patterns and nutritional regulation of IGFBP -1, -2, -3 and -5 in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 161(3): 344 - 353.
- [6] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 8 - 10.
- [7] THORMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(22): 4673 - 4680.
- [8] HWA V, OH Y, ROSENDEL R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20(6): 761 - 787.
- [9] RECHLER M M, CLEMMONS D R. Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins [J]. *Trends*

- Endocrinol Metab, 1998, 9(5): 176-183.
- [10] BUSBY W H, SNYDER D K, CLEMMONS D R. Radioimmunoassay of a 26,000 dalton plasma insulin-like growth factor-binding protein: control by nutritional variables[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 67(6): 1225-1230.
- [11] SUWANICKUL A, MORRIS S L, POWELL D R. Identification of an insulin-responsive element in the promoter of the human gene for insulin-like growth factor binding protein-1 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(23): 17063-17068.
- [12] POPOVICI R M, LU M, BHATIA S, *et al.* Hypoxia regulates insulin-like growth factor-binding protein 1 in human fetal hepatocytes in primary culture: suggestive molecular mechanisms for in utero fetal growth restriction caused by uteroplacental insufficiency [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001, 86(6): 2653-2659.
- [13] 何珠子, 邹曙明, 袁襄南, 等. 团头鲂 *HoxB3a* 基因全长 cDNA 克隆及表达[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(6): 655-661.
- [14] LEE P D, GIUDICE L C, CONOVER C A, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-1 recent findings and new directions[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 216(3): 319-357.
- [15] SHIMIZU M, DICKEY J T, FUKADA H, *et al.* Salmon serum 22 kDa insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) is IGFBP-1[J]. J Endocrinol, 2005, 184(1): 267-276.

cDNA cloning and expression of insulin-like growth factor binding protein gene IGFBP-1 in *Ctenopharyngodon idellus*

TAO Yang, ZOU Shu-ming

(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the complete cDNA of a insulin-like growth factor binding gene IGFBP-1 was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. And mRNA transcripts during embryogenesis and in adult tissues were studied by RT-PCR. The results showed that: (1) The complete cDNA of *C. idellus* IGFBP-1 is 1 135 bp and its ORF includes 789 bp which coding 262 amino-acid residue. The deduced amino acid analysis showed that the sequence similarities between *C. idellus* and *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Ictalurus punctatus*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Seriola quinqueradiata*, *Mus musculus* and *Homo sapiens* are 94%, 93%, 69%, 60%, 58%, 56%, 40% and 38%, respectively. Its functional N-terminal and C-terminal domains, which are involved in binding with IGF ligand, are very conservative. (2) RT-PCR results demonstrated that IGFBP-1 gene had a low expression in embryos at different stages in *C. idellus*. Weak mRNA transcripts can be detected after 12 hpf. Tissue distribution results showed that IGFBP-1 mRNA was expressed in liver, kidney, intestines and heart. In terms of its crucial function of IGFBP-1 in IGF signal pathway and as a hypoxia-inducible gene, our results provide data for further functional investigations of IGFBP-1 gene in grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; IGFBP-1; full-length cDNA; RT-PCR