

# 川金丝猴胰岛素样生长因子 (IGF<sup>-</sup>) 基因的克隆及序列分析

宋利<sup>1\*</sup> 胡细连<sup>2\*</sup> 张志和<sup>3</sup> 岳碧松<sup>1</sup> 沈富军<sup>3</sup> 孟延安<sup>1\*\*</sup> 赵斌<sup>4</sup>

(1 四川大学生命科学学院, 成都, 610064) (2 杭州大学生命科学学院, 杭州, 310029)

(3 成都大熊猫繁育研究基地, 濒危动物繁殖与保护遗传四川省重点实验室, 成都, 610081) (4 西安动物园, 西安, 710032)

**摘要:** 本实验从金丝猴肝脏细胞 RNA 中反转录得到 cDNA, 利用设计的引物 M1 和 M2 扩增 IGF<sup>-</sup> 基因, 并将其克隆到 pGEM-T 载体上。经筛选、酶切、PCR 鉴定、序列分析, 证明该片段为金丝猴 IGF<sup>-</sup> 基因的 cDNA 克隆。该片段由 521 个核苷酸组成, 其中包括一个完整的开读框 (ORF), 编码一个由 153 个氨基酸组成的多肽。与 GenBank 中人、猪、鼠、马、牛、兔、山羊等哺乳动物的 IGF<sup>-</sup> 序列比较, 其编码成熟肽序列的同源性从 93.8% (马) 到 88.6% (鼠), 开放框序列的同源性从 94.4% (人) 到 88.5% (鼠)。

**关键词:** 金丝猴; IGF<sup>-</sup> 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 03 - 0282 - 05

## Cloning and Sequence Analysis of Golden Monkey (*Rhinopithecus roxellana*) Insulin-like Growth Factor Gene

SONGLi<sup>1\*</sup> HUXilian<sup>2\*</sup> ZHANG Zhihe<sup>3</sup> YUE Bisong<sup>1</sup> SHEN Fujun<sup>3</sup> MENG Yanfa<sup>1\*\*</sup> ZHAO Bin<sup>4</sup>

(1 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, 610064, China)

(2 College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China)

(3 Key Laboratory for Reproduction and Conservation Genetics of Endangered Wildlife of Sichuan Province, Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu, 610081, China) (4 Xi'an Zoo, Xi'an, 710032, China)

**Abstract:** The insulin-like growth factor (IGF<sup>-</sup>) cDNA of the golden monkey (*Rhinopithecus roxellana*) was cloned for the first time from liver tissue by reverse transcription and amplified by PCR using a set of primers that we designed in this study. The amplified cDNA fragment was inserted into the vector pGEMT. Through transferring, screening, enzymolysis and sequencing, it was demonstrated that this fragment was IGF<sup>-</sup> gene cDNA. It is 521nts in length and contains one open reading frame (ORF), which encodes for a polypeptide containing 153 amino acids. The golden monkey IGF<sup>-</sup> gene has a high homology with other mammal IGF<sup>-</sup> genes.

**Key words:** Cloning; Golden monkey; IGF<sup>-</sup> gene; Sequence analysis

胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF<sup>-</sup>) 成熟肽由 70 个氨基酸残基组成, 分子量约为 7.5 kDa (Paget-Holthuized *et al.*, 1986), 是一种多功能细胞调控因子, 其生物学功能主要是调节细胞代谢, 促进细胞生长、分化和分裂, 抑制细胞死亡, 促进骨骼生长, 参与创伤愈合过程 (Cohik and Clemmons, 1993; Jones and Clemmons, 1995), 在动物出生后的生长发育中起重要作用 (Upton *et al.*, 1998)。此外, IGF<sup>-</sup> 在动物生殖过

程中也起着重要的调节作用, 能够提高胚胎的发育率, 促进胚胎着床; 调节卵泡发育及卵母细胞的成熟, 提高排卵率; 调节黄体的发育与退化及生殖激素的生成与分泌; 提高精子活力及繁育效率 (张巍等, 2002)。IGF<sup>-</sup> 可通过内分泌、自分泌、旁分泌等多种方式发挥作用, 对糖尿病、生长迟滞、骨质疏松等多种疾病均有治疗作用 (Laron, 2001)。目前国外已有转 IGF<sup>-</sup> 基因治疗神经损伤、软骨缺损等疾病的报导 (Rabinovsky *et al.*, 2003)。

作者简介: 宋利 (1977 - ), 男, 硕士生, 生物化学与分子生物学专业; 胡细连, 女, 博士生, 遗传学专业, \*并列第一作者。

收稿日期: 2004 - 10 - 08; 修回日期: 2005 - 01 - 24

\*\* 通讯作者, correspondence author, E-mail: yfmeng@tom.com

IGF<sup>-</sup> 的氨基酸序列在不同的脊椎动物中相当保守, 这表明它是一种由共同原型基因进化而来, 且具有重要功能的多肽 (奚刚等, 2000)。在动物体各个组织器官中都有该基因的表达产物, 其中肝脏是最主要的表达和合成的场所 (Lund *et al.*, 1986)。

近几年来, 有关 IGF<sup>-</sup> 基因的研究较多, 猪、鼠、马、牛、兔、山羊等物种的 IGF<sup>-</sup> 基因序列都已逐渐被测定, 其蛋白产物的生物学作用也越来越被人们所重视。本实验从金丝猴肝脏细胞 RNA 中反转录了 cDNA, 以设计的特异性引物扩增了 IGF<sup>-</sup> 基因的 cDNA, 并将其克隆到 pGEM-T 载体上, 进行了序列分析。通过序列分析, 与其它哺乳动物序列对比得出与其同源性最高的物种。为金丝猴的繁育和保护提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

实验材料为金丝猴肝脏, 采自陕西省西安动物园一正常死亡个体。

#### 1.1.2 菌株与质粒

JM109 菌株购自 Stratagene; pGEM-T Easy Vector 购自 Promega。

#### 1.1.3 工具酶与试剂

总 RNA 抽提试剂盒 (TRIzol<sup>R</sup> Total RNA Isolation Reagent) 为 GIBCOBRL 公司产品; 逆转录试剂盒为 MBI 公司产品 (RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit); QIAquick 胶回收纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 限制性内切酶 (*Nhe* I、*Bam*HI) 为上海华美生物公司产品; IPTG、X-gal 为美国 Sigma 公司产品; DEPC 为 Sigma 公司产品; T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品; Tris 碱为上海华美生物有限公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.4 引物设计与合成

根据 IGF<sup>-</sup> 基因在不同哺乳动物中的高度保守性, 利用引物设计软件 Primer 5.0 进行设计。扩增的上游引物为: 5' TTGCCTCATTATTT (C) CTGCTA 3', 下游引物为: 5' CTCCTACATT (C) CTGTAGTTC 3', 分别命名为 M1 和 M2。由上海博亚生物有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 肝组织处理

将采到的新鲜肝组织在液氮中充分研磨, 待液

氮挥发完全后, 加入适量 TRIzol Reagent, 置于 -80 °C 冰箱中保存以备提取总 RNA。

#### 1.2.2 总 RNA 的提取

用总 RNA 抽提试剂盒, 按照 GIBCOBRL 公司总 RNA 抽提试剂盒操作手册进行总 RNA 的提取。用紫外分光光度计和甲醛凝胶电泳检测 RNA 质量。-70 °C 保存。

#### 1.2.3 反转录

以抽提的总 RNA 为模板, 以 Oligo dT 为反转录引物, 按照 Promega 公司逆转录试剂盒操作手册进行 cDNA 第一链的合成。产物 -20 °C 保存。

#### 1.2.4 IGF<sup>-</sup> 基因 cDNA 的克隆与序列测定

##### 1.2.4.1 PCR 扩增

反应条件如下: 10 ×PCR 缓冲液 10 μl, 1mM 的各种 dNTP 混合液 5 μl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 10 μl, 上下游引物各 50 pmol, 上述逆转录产物 5 μl, Taq 酶 2.5 μl, 加水至 100 μl, 铺盖 20 μl 矿物油。94 °C 预变性 4 min, 扩增参数: 94 °C 变性 1 min、52 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 50 s, 30 个循环, 最后延伸 5 min。PCR 反应结束后, 取 10 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以检查扩增结果。

##### 1.2.4.2 PCR 产物的克隆

采用 QIAquick 胶回收纯化试剂盒回收 PCR 扩增出的目的产物 (520 bp 左右), 将回收纯化的目的产物直接与 pGEM-T Easy 载体连接后, 转化 JM109 感受态细菌, 经含有氨苄青霉素和 X-gal 的平板筛选培养, 挑取白斑, 培养于 4 ml LB 培养基中, 培养 2~4 h 后, 取 1 μl 培养的重组克隆的菌液为模板、M1 与 M2 为引物做 PCR 鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳。选取 3 个阳性重组克隆。

##### 1.2.4.3 重组克隆插入片段的序列测定与分析

将所选的 3 个重组克隆, 小规模扩大培养后, 经博亚公司测序, 所得序列用 Genetool Lite 软件进行开读框 (Open reading frame ORF) 分析及翻译, 并与 GenBank 中的其它哺乳动物作同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的提取

所分离金丝猴肝脏总 RNA 经紫外分光光度计测定, A260/A280 为 2.0, 甲醛凝胶电泳后可清晰见到 18S 和 28S 两条核糖体 RNA 条带 (图 1), 说明本试验的肝脏组织在保存和提取过程中无明显 RNA 降解发生, 总 RNA 是完整的。

### 2.2 IGF<sup>-</sup> 开读框 (ORF) 的克隆与序列分析

2.2.1 含 IGF<sup>r</sup> 开读框 (ORF) 重组克隆的筛选及鉴定

电泳结果表明, 目的条带分子量与预期的大体一致 (图 2)。取 3 个经鉴定含有 500 bp 左右插入片段的重组克隆, 命名为 MIGF<sup>r</sup>。

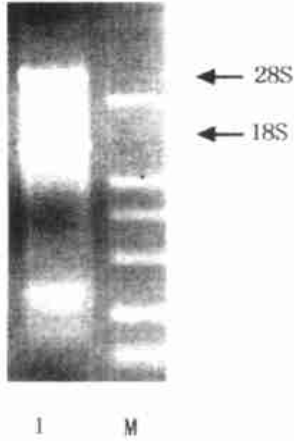


图 1 金丝猴肝脏总 RNA 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳分析  
M: Marker; 1: 总 RNA

Fig. 1 1% formaldehyde agarose gelelectrophoresis analysis of liver RNA from golden monkey  
M: Marker; 1: Total RNA

2.2.2 重组克隆插入片段的序列测定及分析

将鉴定后的 MIGF<sup>r</sup> 重组克隆培养后由博亚公司进行序列测定。测定的结果表明, MIGF<sup>r</sup> 插入片段的序列完全相同且与预期大小相同。经 NCBI 数据库 Blast 搜索, 表明测得的序列与 GeneBank 中哺乳动物的 IGF<sup>r</sup> 最为相似, 与人、猪、马等哺乳

动物的同源性都在 90% 以上, 表明本试验所克隆的序列代表金丝猴胰岛素样生长因子 基因序列。将该序列登录于 GenBank, 登录号为 AY677085。IGF<sup>r</sup> 核苷酸及其编码的氨基酸序列如图 3 所示, IGF<sup>r</sup> 基因编码 153 个氨基酸的前体蛋白, 包括 48 个氨基酸的信号肽和 70 个氨基酸的成熟肽。预测前体蛋白的分子量为 16.9 kDa, 成熟肽为 7.6 kDa。

该序列及其推导编码的氨基酸序列与 GenBank 中猪、兔子、小鼠、人的碱基序列比较, 表明 IGF<sup>r</sup> 的编码成熟肽序列和开读框同源性都很高。氨基酸序列的同源性也很高, 尤其是成熟肽序列, 该区域内金丝猴与人只差两个氨基酸 (表 1)。进一步证实了 IGF<sup>r</sup> 基因的高度保守性。

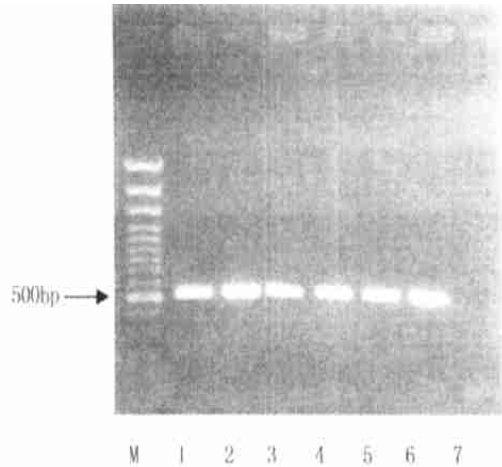


图 2 金丝猴 IGF<sup>r</sup> PCR 鉴定  
M: DL3000 Marker; 1~6: PCR 产物; 7: 阴性对照  
Fig. 2 PCR identification of IGF<sup>r</sup> recombinant  
M:DL3000 Marker;1 - 6:PCR products;7:nagetive control

表 1 金丝猴与其它物种 IGF<sup>r</sup> 编码区核苷酸及其氨基酸序列的同源性比较  
Table 1 Homlogy comparison of AmIGF<sup>r</sup> with that of other species in nucleotide and amino acids levels

比较水平 The levels of comparison	人 Human	猪 Pig	鼠 Rat	马 Horse	牛 Cattle	兔 Rabbit	山羊 Goat
编码成熟肽序列 (%) The mature peptide coding sequence	93.3	92.9	88.6	93.8	91.4	92.9	91.0
开读框序列 (%) The sequence of open reading frame	94.4	92.4	88.5	94.0	92.1	91.3	92.4
氨基酸 (%) Amino Acids	98.2	95.8	94.4	98.9	97.2	92.9	95.4
前体蛋白氨基酸数 (个) The munber of amino acids of IGF <sup>r</sup> precursor	153	130	127	127	131	137	154

```

1      TTGCCTCATTATTCCTGCTAACCAATTCATTTCCAGACTTTGCACTTCAGAAGCAATGGG
1      C L I I P A N Q F I S R L C T S E A M G
61     AAAAATCAGCAGTCTTCCAACCAATTATTTAAGTGCTGCTTTTGTGATTTCTTGAAGGT
21     K I S S L P T Q L F K C C F C D F L K V
121    AAAGATGCACATCATGTCTCCTCTCATCTCCTCTACCTGGCGCTGTGCTTGCTCACCTT
41     K M H I M S S S H L L Y L A L C L L T F
181    CACCAGCTCCGCCACAGCTGGACCAGAGCGCTCTGTGGGGCTGAGTTGGTGGATGCTCT
61     T S S A T A G P E T L C G A E L V D A L
241    TCAGTTCTGTGTGGAGACAGGGGTTTTTATTTCACAAGCCCACGGGGTATGGCTCCAG
81     Q F V C G D R G F Y F N K P T G Y G S S
301    CAGTCGGAGGGCACCTCAGACAGGCATTGTGGACGAGTGCTGCTTCCGGAGCTGTGATCT
101    S R R A P Q T G I V D E C C F R S C D L
361    GAGGAGGCTAGAGATGTACTGTGCACCCCTCAAGCCTGCCAAGTCTGCCGCTCAGTCCG
121    R R L E M Y C A P L K P A K S A R S V R
421    TGCCAGCGCCACACCGACATGCCAAGGCTCAAAGGAAGTACATTTGAAGAACGCAAG
141    A Q R H T D M P K A Q K E V H L K N A S
481    TAGAGGGAGTGCAGGAAACAAGAACTACAGAATGTAGGAAG
161    R G S A G N K N Y R M *

```

图3 金丝猴 IGF<sup>-</sup> 开读框的核苷酸序列（521 bp）及其推知的氨基酸序列

下划线表示开读框（ORF）序列（56~514）；加粗的黑体部分表示编码信号肽的序列（56~199）；双下画线部分表示编码成熟肽的序列（200~409）

Fig. 3 The sequence of open reading frame (521 bp) and the deduced amino acid residues. The sequence of open reading frame (56 - 514) is underlined. The signal peptide coding sequence is highlighted in bold. The mature peptide coding sequence is doubly underlined

### 3 讨论

本实验首次成功得到了金丝猴 IGF<sup>-</sup> 基因编码区的全长 cDNA 克隆。经分子量大小分析、酶切、PCR 和基因序列分析，进一步确证为 IGF<sup>-</sup> 基因的 cDNA。IGF<sup>-</sup> 开读框由 459 bp 碱基组成，编码由 153 个氨基酸组成的多肽。其 cDNA 序列的取得，既进一步证实了 IGF<sup>-</sup> 在哺乳动物中的高度保守性，又为其以后的表达和生物活性研究打下了基础。从表 1 可以看到，在比较的几种哺乳动物中，金丝猴与马的 IGF<sup>-</sup> 编码成熟肽序列的同源性（93.8%）最高，比和人的同源性（93.3%）还高。而在开读框序列的比较中，金丝猴和人的同源性（94.4%）最高，金丝猴和马的同源性为 94.0%，从它们间的序列的长度来看，金丝猴与人的序列长度同为 459 bp，而马的长度是 381 bp。在前体蛋白的氨基酸水平上，金丝猴 IGF<sup>-</sup> 与人的同源性为 98.2%，仅有两个氨基酸的差异，即金丝猴 IGF<sup>-</sup> 的第 26 和第 33 个氨基酸分别为异亮氨酸和亮氨酸，在人 IGF<sup>-</sup> 中分别为苏氨酸和苯丙氨酸，由此

可以看出，金丝猴和人的亲缘关系比金丝猴和马的亲缘关系更近。而且金丝猴和人 IGF<sup>-</sup> 的成熟肽序列是相同的，因此在以后的实验中，我们可以用人 IGF<sup>-</sup> 代替金丝猴 IGF<sup>-</sup>。

胰岛素样生长因子（IGF<sup>-</sup>）是一个可对多种组织细胞发挥多种作用的多肽因子，近年来倍受重视。将胰岛素样生长因子 I 促生长和促繁育等作用应用于与濒临灭绝的国家一级保护动物金丝猴，具有重要意义。

此前，国际上用于基因工程表达的 IGF<sup>-</sup> 基因大多数是化学合成的双链 DNA（Buell *et al.*, 1985），这种方法不仅价格昂贵，而且随着合成片段的增长，产率会逐渐下降，错误率则会升高，往往突变的手段才能得到完整而正确的基因（梁东春等，2002）。我们采用的方法则具有方便、快捷、成本低等优点。

#### 参考文献：

Buell G, Schulz M F, Selzer G, Chollet A, Mova N R, Semon D, Escanez S, Kawashima E. 1985. Optimizing the expression in *E. coli* of a synthetic gene encoding somatomedin-c. *Nucleic Acids Res*, 13 (6):

- 1923.
- Cohik W S, Clemmons D R. 1993. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, **55**: 131.
- Jones J I, Clemmons D R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, **16**, 3 - 34.
- Laron Z. 2001. Insulin-like growth factor (IGF<sup>+</sup>): a growth hormone. *Mol Pathol*, **54** (5): 311 - 316.
- Lund P K, Mbats-staats B M, Hynes M A, Simmons J G, Jansen M, D'Ercole A J, Van Wyk J J. 1986. Somatomedin C/insulin-like growth factor and insulin-like growth factor mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J Biol Chem*, **261**: 14539 - 14544.
- Paget-Holthuijzen P, van Schaik F M, Verduijn G M, van Ommen G J, Bouma B N, Jansen M, Sussenbach J S. 1986. Organization of the human genes for insulin-like growth factors and. *FEBS*, **195** (1 - 2): 179 - 184.
- Rabinovsky E D, Gelir E, Gelir S, Lui H, Kattash M, Demayo F J, Shenaq S M, Schwartz R J. 2003. Targeted expression of IGF<sup>+</sup> transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J*, **17** (1): 53.
- Upton Z, Yandell C A, Degger B G, Chan S J, Moriama S, Francis G L, Ballard F J. 1998. Evolution of insulin-like growth factor (IGF<sup>+</sup>) action: in vitro characterization of vertebrate IGF<sup>+</sup> proteins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **121**: 35 - 41.
- 张巍, 李峰, 张果平, 黄永宏. 2002. 胰岛素样生长因子家族对动物生殖功能的影响. *上海畜牧兽医通讯*, **1**: 17 - 19.
- 奚刚, 许梓荣, 戚益军. 2000. 杜大长猪 IGF<sup>+</sup> 基因的克隆及其序列分析. *中国兽医学报*, **20** (1): 74 - 76.
- 梁东春, 郭刚, 左爱军, 张镜宇. 2002. 大鼠胰岛素样生长因子基因的克隆及表达. *遗传学报*, **29** (12): 1063 - 1067.