

鲤 *IGF2b* 基因内含子的克隆、 基因组序列分析及慢病毒载体构建*

苏胜彦^{1,2}, 董在杰^{1,2,3}, 袁新华^{1,2}, 梁政远², 曲疆奇²,
张建桥², 刘伟², 马良骁², 徐跑^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心//农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,
江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了了解鲤 *IGF2b* 基因与鲤生长性状之间的关系, 以建鲤为试验材料, 克隆了 *IGF2b* 基因内含子, 分析其基因组序列的特点, 构建了 *IGF2* 基因的慢病毒载体, 同时观察其在 293T 细胞中的表达活性。结果获得鲤 *IGF2b* 5 173 bp 长度的基因组 DNA 序列 (HM755899), 共有 3 个内含子, 4 个外显子; 在 3' 非翻译区存在 2 个 CpG 岛, 在 5' 端非翻译区存在 (T) n 重复序列; 除此之外, 成功构建了慢病毒载体质粒 Lenti-*IGF2b*-IRES-EGFP, 转染 293T 细胞后, 产生的重组慢病毒颗粒出现高表达绿色荧光, 荧光定量 PCR 检测发现 *IGF2b* 基因在 293T 细胞中高表达。这些结果将为研究 *IGF2b* 基因在多态性、表达方面与鲤生长性状之间的关联奠定基础。

关键词: 鲤; *IGF2b*; 内含子; 慢病毒载体

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2012) 02-0077-09

Clone of *IGF2b* Introns, Analysis of Its Genomic Sequence and Construction of Lentiviral Vector (Lenti-*IGF2*-IRES-EGF) in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.)

SU Shengyan^{1,2}, DONG Zaijie^{1,2,3}, YUAN Xinhua^{1,2}, LIANG Zhengyuan², QU Jiangqi²,
ZHANG Jianqiao², LIU Wei², MA Liangxiao², XU Pao^{1,2}

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences//Key Laboratory of
Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Wuxi 214081, China;

3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To explore the relationship between the *IGF2b* gene and growth traits, we cloned the introns of *IGF2b* in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle and analysis its characters. Further more, the lentiviral vector (Lenti-*IGF2*-IRES-EGF) was constructed and its activity was also researched. The results showed that: the length of 5 173 bp DNA sequence of *IGF2b* (HM755899) was get, including 3 introns and 4 exons. Two CpG islands in the 3' untranslated region and (T) n repeat sequence in the 5' untranslated region were found. Besides these, the lentiviral vector (Lenti-*IGF2b*-IRES-EGF) was constructed

* 收稿日期: 2011-05-03

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (CARS-46); 国家“十二五”科技支撑计划专题资助项目 (2012BAD26B02); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目 (2009JBF01); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2010164)

作者简介: 苏胜彦 (1982 年生), 男, 助理研究员, 博士; **通讯作者:** 徐跑; E-mail: xup@ffrc.cn

successfully, which was cotransfected into 293T cells with the GFP expression. The higher expression of IGF2 was found in 293T cells by Real time PCR. These illustrated that these study may be lay on solid foundation for relationship between *IGF2b* genetic diversity, expression and common carp growth traits.

Key words: common carp; *IGF2b*; introns; lentiviral vector

建鲤作为经国家审定的我国第一个人工育成的水产养殖品种,其生长速度快,抗病力强。然而经过十几年的推广,迫切需要进一步的遗传改良,进行水产养殖品种的更新。而杂交育种是目前成效比较显著的鲤育种方法之一^[1-2],建鲤、丰鲤、荷元鲤等就是杂种优势利用的成功典范^[3]。国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目和国家“十一五”科技支撑计划项目等都将建鲤的遗传改良列入其中,并在 2010 年获得福瑞鲤水产良种。而建鲤生长速度的分子标记,尤其是改良过程中超显性优势相关分子标记,已成为提高建鲤选育效率的重要途径。

IGF2 (类胰岛素生长因子 2, Insulin-like growth factor II, IGF II) 是一种促细胞分裂多肽,其结构与胰岛素相类似^[4],在所有胰岛素的靶细胞中发挥类胰岛素的功能。除此之外,更为重要的是其可作为生长激素的中间信使,传递生长激素,对机体的生长和发育起作用^[5]。在动物上,IGF2 的表达水平与动物骨骼肌的发育调控有关^[6],是影响猪产肉性能的主要功能基因之一。

在鱼上,虹鳟的 IGF2 cDNA 被首次克隆出来的^[7],此后,鲟^[8],澳洲肺鱼^[9],罗非鱼^[10],杜父鱼^[11],斑马鱼^[12],河豚^[13],大菱鲆^[14],大麻哈鱼^[15]等多种硬骨鱼类和软骨鱼类的 IGF-2 被全部或部分克隆。2002, Tse 等^[16]克隆了鲤鱼 IGF2 序列,并对其组织表达做了分析。对于鱼类的 IGF2 基因结构,大麻哈鱼^[15],澳洲肺鱼^[9]和河豚(基因库新 No. AL021880)已经确定。大麻哈鱼,澳洲肺鱼和河豚的 *IGF-2* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子构成,分别跨越约 7.9、5.5、4.2 kb 染色体 DNA。

IGF-2 基因在未成熟的和成熟的硬骨鱼的肝组织和非肝组织中充分表达,包括鲤鱼^[16],虹鳟鱼^[17],斑马鱼^[12],杜父鱼^[11],罗非鱼^[18],鲟^[19]及河豚^[13]。在虹鳟鱼的肝,肠道组织(体内)和培养的肝细胞(体外)^[20]以及在鲤鱼的脑,鳃,肠,肾,肝,肌肉^[16]中用 GH 处理,可增加 *IGF2* mRNA 含量。Chen 等^[21]用重组 *IGF2* 腹腔注射罗非鱼 5 周后,体质量和体长分别较对照组增加了

72% 和 34%。这些说明, *IGF2* 基因表达量与鱼类生长速度密切相关,这就为建鲤高生长速度的特性提供研究途径。

慢病毒载体 (lentiviral vector) 源于 HIV1^[22-23],是以慢病毒基因组为基础,除去其复制所需的基因,以治疗性基因和选择性标记物构建而成,转移基因片段容量大,无毒性且不易诱发宿主免疫反应,安全性较好,不仅能感染分裂细胞,且能转染终末分化细胞和非分裂细胞(如神经细胞、干细胞、肌纤维细胞、视网膜和肝细胞等),整合于靶细胞基因组的目的基因能够长期、稳定表达^[24]。慢病毒载体常常用于研究基因表达的调控^[25]、转基因动物的制作^[26]、疾病机理与治疗^[27]等。其中,慢病毒载体用于基因功能的研究^[28-30],功能基因用于疾病治疗、转基因动物的生产^[31]、农业上提高生产性能^[32-33]等方面成为其应用的热点。因此,通过注射 *IGF2* 基因慢病毒载体将是研究 *IGF2* 基因体内、体外过表达的重要手段。

本研究利用 PCR 扩增的方法,根据斑马鱼 *IGF2* 基因序列的剪切方式,在鲤 *IGF2b* 基因 mRNA 序列上设计 4 对引物,首次克隆测序了鲤该基因的全部内含子,并推断出鲤 *IGF2b* 基因的结构;分析了该基因序列的 CpG 岛和重复序列,并构建了 *IGF2* 基因的慢病毒载体,为研究 *IGF2b* 基因在鲤生长发育、产肉性能等方面奠定基础。

1 材料及方法

1.1 实验材料

建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴试验基地。试验所用细胞株为 293T 细胞,为贴壁依赖型成上皮样细胞,细胞生长所需培养基为 DMEM + 10% FBS (*w*),使用的质粒载体为 pLenti6.3-IRES-EGFP 质粒。

1.2 总 DNA 提取和 PCR 扩增, 测序

鲤基因组总 DNA 提取采用 Takara 全血基因组试剂盒,后进行凝胶电泳检测提取 DNA 的质量,用分光光度计测算 DNA 浓度。根据鲤 *IGF2* 基因的 cDNA 序列 (AF402958) 设计引物 (见表 1)。

表 1 鲤 *IGF2b* cDNA 和 DNA 扩增所需引物Table 1 Primers for *IGF2b* cDNA and DNA amplified

基因	引物序列	扩增长度 /bp	退火温度 /°C
<i>IGF2b</i>	GGGGAAACTAAACCGACATT	200	56
	GGCATTCTGTATGGACCACTA		
<i>IGF2b</i>	TACTGGTCCATACGAATGCC	623	53
	GGGAAGGAAGAAGGGTTGT		
<i>IGF2b</i>	TTTAACCCGTCTGCTTCG	1 000	55
	ACTTGGACGTAATCCGTGGC		

表 2 扩增 *IGF2b* 基因编码区全长的引物序列Table 2 Primers for *IGF2b* encoding

引物名称	引物序列	产物 大小/ bp
<i>IGF2b</i> -BamHI-F	GATCATACGGATCCGCCACCAT	658
(bp1)	GGAGGACCAACTAAAACATCA	
<i>IGF2b</i> -NheI-R	CAGTTGACGCTAGCTCAT	
(bp624C)	CGACTCTGTGCAAAAAGG	

注: 灰色字体分别为酶切位点 *Bam*HI 和 *Nhe*I。

PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 10 \times buffer 15 μ L, Mg^{2+} (25 m mol/L) 1 μ L, dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μ L, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L 模板 DNA 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 (Promega) 1 U, 补 dd H₂O 至反应体系, 扩增反应均在 TAKARA 公司梯度 PCR 仪上完成, PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 退火温度 48 ~ 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 将反应后的 PCR 产物用 $w = 8\%$ 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合 goldview 显色进行检测, 溴酚蓝为上样液 ($w = 0.25\%$ 溴酚蓝, $w = 40\%$ 蔗糖水溶液), UVP 扫描仪扫描成像, 拍照, 送往公司测序。

1.3 慢病毒载体的构建

1.3.1 RNA 提取和反转录 每 50 ~ 100 mg 组织加入 1 mL Trizol, 用匀浆器进行匀浆, 直至匀浆液无颗粒透明状, 将裂解液转移至离心管中, 在室温下放置 5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 然后小心吸取上清, 并转移至新的无 RNase 的离心管中。每管加入 200 μ L 氯仿, 用手上下颠倒 ep 管 15 s, 室温静置 15 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 15 min。吸取上清移至新的 1.5 mL ep 管, 加入等体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 10 min。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min 后, 去上清, 加入至少 1 mL 4 $^{\circ}$ C 预冷的 $\varphi = 75\%$ 乙醇, 洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。吸水纸吸去残液, 室温干燥。加入 20 μ L RNase-free 水, 至完全溶解, 紫外分析测定所抽提 RNA 的浓度。根据 Fermentas 公司的 M-MLV 操作说明书进行反转录。

1.3.2 *IGF2b* 基因 CDS 区扩增 针对鲤 *IGF2b* 基因 (AF402958) 的 CDS (Coding domain sequence) 区序列设计并合成 PCR 引物 (序列见表 2), 并在目的基因的 5' 端添加 *Bam*HI 酶切位点, 3' 端添加 *Nhe*I 酶切位点。

PCR 反应体系为 50 μ L, 包括 10 \times buffer 5 μ L, Mg^{2+} (25 m mol/L) 2 μ L, dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μ L, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L 模板 DNA 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 (Promega) 1 U, 补 dd H₂O 至扩增反应体系, 在 TAKARA 公司梯度 PCR 仪上完成, PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 退火温度 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 将反应后的 PCR 产物用 $w = 8\%$ 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合 goldview 显色进行检测, 溴酚蓝为上样液 ($w = 0.25\%$ 溴酚蓝, $w = 40\%$ 蔗糖水溶液), UVP 扫描仪扫描成像, 拍照, 然后用 T 载体连接, 后将菌落 PCR 呈阳性的质粒进行酶切鉴定, 酶切体系如下: 10 \times Buffer Tango 2 μ L, 重组质粒 1 μ g, 限制性内切酶 *Bam*H 10.25 μ L, 限制性内切酶 *Nhe*I 0.25 μ L, 补 ddH₂O 至 20 μ L。将菌落 PCR 和酶切鉴定均呈阳性的克隆送测序, 并进行序列比对。

1.3.3 慢病毒表达载体 pLenti6.3-*IGF2b*-IRES-EGFP 的构建 与上述方法类似, 以 T-*IGF2b* 载体为模板, PCR 扩增目的片段, 在目的片段两端添加酶切位点 *Bam*HI 和 *Nhe*I。PCR 反应体系和循环体系参照上文所述。回收 PCR 产物, 用 *Bam*HI 和 *Nhe*I 双酶切 PCR 回收产物及载体 pLenti6.3-IRES-EGFP, 将酶切回收的目的基因 *IGF2b* 片段与 pLenti6.3-IRES-EGFP 连接, 室温连接 4 h。取 10 μ L 连接液转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行菌落 PCR, 后将菌落 PCR 鉴定呈阳性的质粒进行酶切鉴定, 将菌落 PCR 和酶切鉴定均呈阳性的克隆送测序, 并进行序列比对, 保留测序验证正确的质粒。

1.3.4 慢病毒包装、转染 193T 细胞 将测序正确的 pLenti-*IGF2b*-IRES-EGFP 及对照质粒 pLenti-EGFP 菌液划线培养, 并测定质粒浓度: 质粒 DNA 最终溶于除菌的 TE 中, 以 Thermo Nanodrop 仪器测定质粒浓度及纯度, 保证抽提质粒的浓度在 1 μ g/ μ L 左右。

转染时 (细胞状态良好, 贴壁牢, 密度在 50 - 70% 时可用于转染), 向无菌的 1.5 mL 离心管中加入 750 μL Opti-MEM, 然后向其中加入所制备的各 DNA 溶液, 慢病毒表达质粒 6 μg , 包装质粒 Packaging Mix 6 μg , 混合均匀, 在室温下温育 5 min。同时, 在另一无菌的 1.5 mL 离心管中加入 750 μL Opti-MEM, 向其中加入 POLOdelivererTM 3000 Transfection Reagent 24 μL , 轻轻混匀, 室温下温育 5 min。把稀释后的 DNA 与稀释后的 POLOdelivererTM 3000 Transfection Reagent 混合, 轻轻地颠倒混匀, 不要振荡。此步必须在 5 min 之内混合, 混匀后, 在室温下温育 20 min, 以便形成 DNA 与 POLOdelivererTM 3000 Transfection Reagent 的复合物。取 1.5 mL DNA 与 POLOdelivererTM 3000 Transfection Reagent 混合液均匀地滴加在 293T 细胞的培养液中, 前后左右摇匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中培养。

转染后 48 h (转染即可为 0 h 计起), 收集 293T 细胞上清液 (第 1 次收液)。细胞更换新鲜的完全培养基, 继续培养至 72 ~ 80 h, 收集病毒上清, 与第 1 次收集的混合, 共 20 mL。于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min 离心 10 min, 除去细胞碎片, 每管装 1 mL 病毒, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.5 慢病毒滴度测定 (荧光显微镜观察法) 感染前 1 d, 用胰蛋白酶消化细胞并计数, 准备 5×10^5 细胞/mL 的 293T 细胞接种 24 孔板, 每孔 0.5 mL。细胞接种后第 2 天, 根据病毒的预期滴度, 准备 3 个无菌的 EP 管, 10 倍倍比稀释慢病毒浓缩液。

13 μL 慢病毒原液 + 117 μL DMEM $\rightarrow 10^{-1}$ 病毒液

13 μL 10^{-1} 病毒液 + 117 μL DMEM $\rightarrow 10^{-2}$ 病毒液

细胞换液, 每孔内加入 500 μL 无抗生素的 DMEM + 10% FBS (w) 培养液, 除 control 组外其余各孔均加入 polybrene 至终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。各感染孔内分别加入相应稀释度的病毒液及病毒原液 100 μL , 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 的培养箱内。感染 24 h 后, 换液, 每孔内加入 500 μL DMEM + 10% FBS (w) + 1% Pen-Strep (w), 继续放回培养箱内进行孵育。感染 72 h 后观察荧光表达情况, 选取合适的稀释度对应的孔, 对 GFP 阳性的细胞进行计数, 并依此计算待测慢病毒的滴度。

计算滴度:

计算感染形成单位 (ifu/mL):

$$\frac{(\text{平均阳性细胞数}/\text{视野}) \times (\text{视野数}/\text{孔})}{\text{病毒体积 (mL)} \times \text{稀释倍数}}$$

1.3.6 病毒液目的基因检测 将处于对数生长期的目的细胞进行胰酶消化, 制成细胞悬液。将细胞悬液 (细胞数约为 5×10^4) 接种于 24 - well 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ $\varphi = 5\%$ CO_2 培养箱培养待细胞融合度达到约 80%。分别加入 50 μL 目的及对照病毒液, 同时加入终质量浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Polybrene 促进感染。感染 24 h 后, 换液, 每孔内加入 500 μL DMEM + 10% FBS (w) + 1% Pen-Strep (w), 继续放回培养箱内进行孵育。感染 48 h 后观察慢病毒上报告基因 GFP 的表达情况, 并拍照记录感染结果。后收集细胞用于 RNA 提取。此时荧光率应该大于 80% 者, 若感染效率低于 80% 的实验组, 重新进行感染实验。弃细胞上清, 每孔加入 1 mL Trizol 裂解细胞, 抽提 RNA, 经 DNaseI 处理后将 RNA 反转录成 cDNA, 实时荧光定量 PCR 检测 *IGF2b* 基因表达。

表 3 荧光定量 PCR 所需引物

Table 3 Primers for real-time PCR analysis

引物名称	引物序列	产物
		大小/ bp
<i>IGF2b</i> -F1 (bp359)	CCACATCCCTACAGGTCATCC	168
<i>IGF2b</i> -R1 (bp526C)	CCTGCCGCTAAACTTCTT	
hACTB-F (bp877)	TCCTTCCTGGGCATGGAGT	208
hACTB-R (bp1084C)	CAGGAGGAGCAATGATCTTGAT	

1.4 数据分析

序列比对通过 NCBI 数据库中 Blast 进行, CpG 岛预测通过在线软件 MethPrimer 进行, 重复序列预测采用 RepeatMasker 进行; 试验数据在 Microsoft Excel 表中初步整理后, 使用 SAS8.0 分析。

2 结果

2.1 *IGF2b* 基因组 DNA 序列

依据鲤 *IGF2* 基因的 cDNA 序列 (AF402958) 设计引物 (表 1), 从鲤基因组 DNA 中获得的扩增片段回收测序, 获得 5 173 bp 长度的基因组 DNA 序列 (图 1)。本序列已提交给 GenBank (Accession No. HM755899)。从图 1 可以看出, 鲤 *IGF2b* 基因的基因有内含子为 3 个, 长度分别为 1 275、1 825、878 bp。

相似性为 88%；都有 3 个内含子，其长度不同。通过在线软件 MethPrimer 软件进行该序列的 CpG 岛预测发现，在区域 4 497 - 4 504 和 4 878 - 4 979 上有 2 个 CpG 岛，全部位于 3' 非翻译区。通过在线软件 RepeatMasker 预测其重复序列，发现在区域 46 - 86 上存在 (T)_n 重复。

2.3 慢病毒载体的构建

2.3.1 鲤 *IGF2b* 基因的 ORF (open reading frame)

克隆和重组克隆的菌落 PCR 鉴定 根据基因库鲤 *IGF2b* 基因序列，设计引物，扩增其 CDS 区，用连接 PCR 产物后的 T 载体做模板，扩增 *IGF2b* 基因电泳图见图 1，而进行慢病毒载体包装后的质粒载体做模板获得的电泳图见图 2。从图 1 和图 2 中可以看出，2 次获取的基因片段长度是一致的，而且重复性也好。经过测序与已知序列一致。

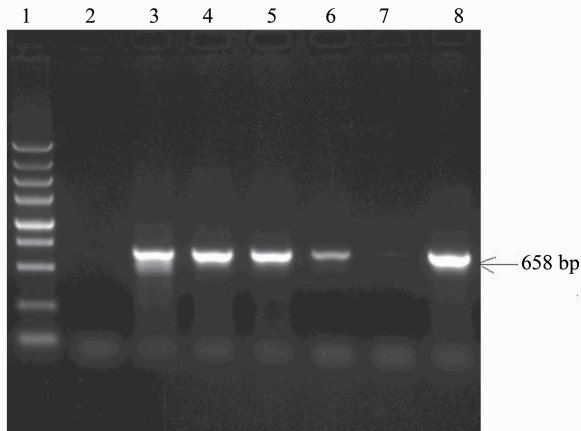


图 2 T-*IGF2b* 重组载体菌落 PCR 产物鉴定

Fig. 2 PCR identification of T-*IGF2b* recombinant vector clones

1: Marker DL5000 (从上至下依次: 5 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); 泳道 2: 阴性对照 (水); 泳道 3: 阳性对照 (PCR 产物为模板) 泳道 4 - 8: *IGF2b* 全长引物对重组子 PCR 扩增

2.3.2 慢病毒表达质粒及包装质粒共转染 293T 细胞 构建的 *IGF2b* 基因慢病毒载体感染 193T 细胞后在荧光显微镜下观察图如下: 从图中可以看出, 对照和含有 *IGF2b* 基因的质粒均有 GFP 表达, 说明包装没有问题, 但 *IGF2b* 的表达还需进行收毒、实时荧光定量 PCR 检测。

2.3.3 慢病毒滴度测定 为了确定构建的慢病毒载体的浓度, 并能下步慢病毒感染细胞、活鱼做基础, 我们用荧光显微镜进行了滴度测定。本文从 20 倍物镜 × 10 倍目镜下, 从 10^{-2} 孔内各随机选取

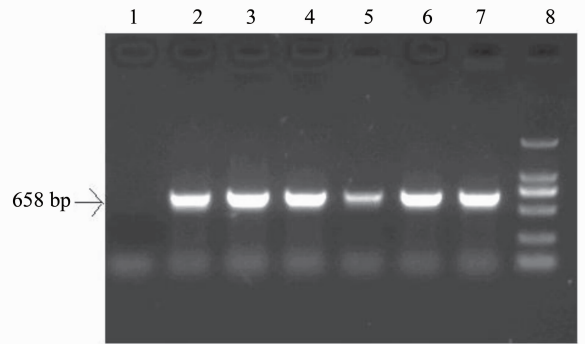


图 3 pLenti6.3-*IGF2b*-IRES-EGFP 重组载体菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of pLenti6.3-*IGF2b*-IRES-EGFP recombinant vector clones

1: 阴性对照 (水); 2: 阳性对照 (*IGF2* T 载体质粒); 3 - 7: *IGF2b* 全长引物对重组子 PCR 扩增; 8: Marker DL2000 (从上至下分别为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp)

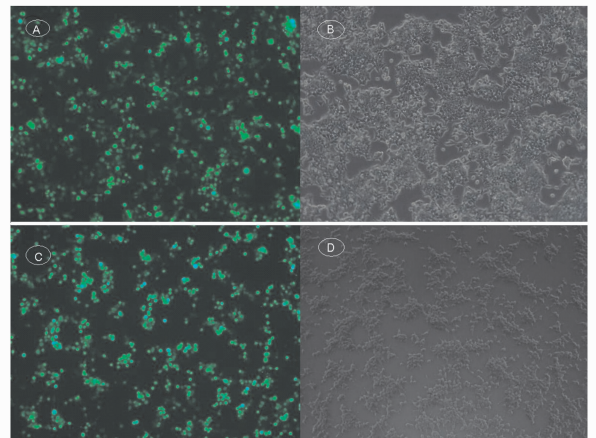


图 4 慢病毒表达质粒及包装质粒共转染 293T 细胞

Fig. 4 Lentiviral expression plasmid and packaging plasmids co-transfected 293T cells

A, B: pLenti-*IGF2b*-IRES-EGFP; C, D: pLenti-EGFP Nomal Control; A, C: 荧光检测; B, D: 对照组

3 个视野, 加入病毒液的体积 = 100 μ L, 获得了 pLenti-*IGF2b* 的滴度为: ifu/mL = 5.54×10^6 , 而阴性对照 Lenti-EGFP NC 滴度为: 3.04×10^6 。

2.3.4 *IGF2* 基因在 293T 细胞中表达的检测 为了检测构建的慢病毒载体对细胞的感染能力, 本文通过 RealtimePCR 技术检测了 *IGF2b* 基因在 293T 细胞中的表达情况 (图 4 - 6), 图 5 为 *IGF2b* 基因以及内参基因 *hACTB* 的扩增曲线, 图 6 为这 2 基因的溶解曲线, 从图中可以看出扩增曲线为光滑的 S 形曲线, 溶解曲线为单一峰值, 故特异性和扩增

量都满足要求。从图 7 可以看到，用构建的 *IGF2b* 基因慢病毒载体感染 293T 细胞后，检测到了 *IGF2b* 基因的表达，从而证明了构建的 *IGF2b* 基因慢病毒载体是成功的。

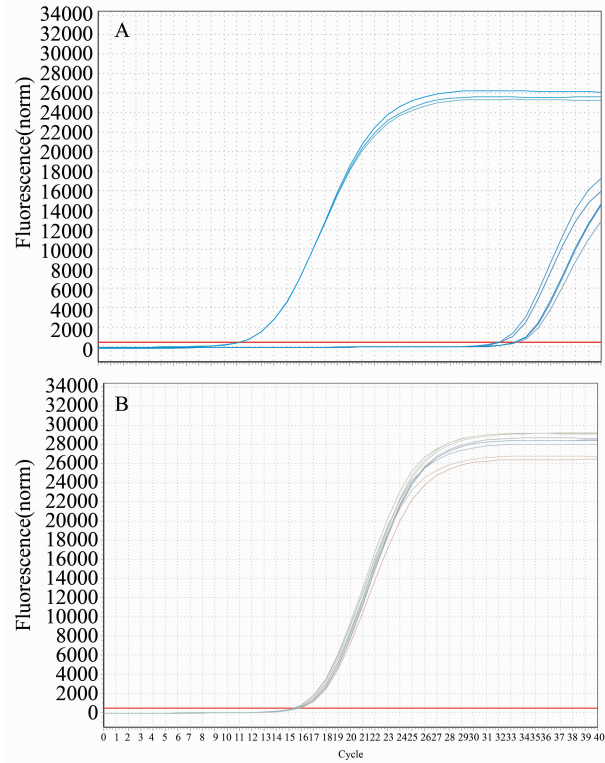


图 5 *IGF2b* 基因及内参基因 *hACTB* 的扩增曲线

Fig. 5 *IGF2b* and internal reference *hACTB* amplification

A: *IGF2b* 基因在 293T 细胞 cDNA 中的扩增曲线；B: 内参基因 *hACTB* 在 293T 细胞 cDNA 中的扩增曲线

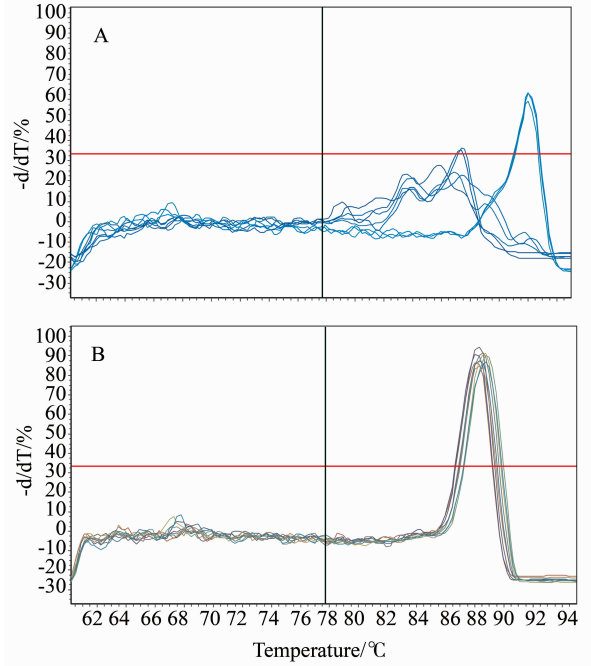


图 6 *IGF2b* 目的基因及 *hACTB* 内参基因的熔解曲线

Fig. 6 *IGF2b* and internal reference *hACTB* melting curve

A: 目的基因在 293T 细胞 cDNA 中的溶解曲线；B: 内参基因 *hACTB* 在 293T 细胞 cDNA 中的溶解曲线

pLenti-*IGF2b* 感染 293T 的表达检测

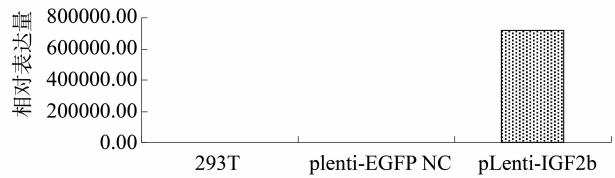


图 7 Lenti-*IGF2b* 感染 293T 的表达检测

Fig. 7 Expression observa of *IGF2b* after Lenti-*IGF2b* infecting the 293T cells

3 讨论

3.1 鲤 *IGF2* 基因的结构

本文通过基因库中 Blast 检测鲤 *IGF2* 基因的序列的同源性，发现其更接近于斑马鱼 *IGF2b* 基因。因此，本文选用建鲤作为试验材料，以该基因在斑马鱼上的剪切方式设计引物，扩增鲤鱼 *IGF2b* 基因的内含子。同时本课题组以斑马鱼 *IGF2a* 基因设计引物，扩增出了 *IGF2a* 序列。因此，本文扩增出的内含子是鲤 *IGF2b* 基因的内含子。

鲤 *IGF2b* 基因的基因有内含子为 3 个，长度分别为 1 275、1 825、878 bp。这个结果与大麻哈鱼^[15]，澳洲肺鱼^[9] 和河豚（基因库新 No. AL021880）已经确定的 *IGF2* 基因结构一致。另外，在鲤 *IGF2b* 3' 非翻译区域存在 2 个 CpG 岛，内含子中没有检测到 CpG 岛。通过在线软件 Re-

peatMasker 预测其重复序列，发现在区域 46 - 86 上存在 (T) n 重复，位于 5' 非翻译区。

3.2 鲤 Lenti-*IGF2b*-IRES-EGFP 载体

目前，普遍使用的载体系统包括病毒载体和非病毒载体两类，其中非病毒载体安全性较高，但是转染效率低^[34]，而病毒载体应用较为普遍^[25-26,32,35]。与其它病毒载体相比，慢病毒载体最大的特点就是强大的穿透性^[36]，并能感染非分裂期细胞从而实现目的基因稳定表达，因此越来越受到神经科学、基因功能研究、基因表达、转基因动物、农业生产的重视^[25-26,28,32,37]。因此本文采用分子克隆的方法成功构建了一种新型的慢病毒载体质粒 Lenti-*IGF2b*-IRES-EGFP，并利用质粒共转染

的方法产生了完整的慢病毒载体。Lenti-IGF2b-IRES-EGFP 载体含有 GFP 报告基因, 具有很强的实用性, 同时 GFP 报告基因以 CMV 启动子启动, 其表达效率高, 能达到 95% 以上, 观察结果方便快捷, 为后续研究, 尤其是研究 IGF2 基因过表达对鲤生产性能的作用奠定基础。

参考文献:

- [1] BAKES J, GORDA S. Genetic improvement of common carp strains using intraspecific hybridization[J]. Aquaculture, 1995, 129:183 - 186.
- [2] LINHART O, GELA D, RODINA M, et al. Top-crossing with paternal inheritance testing of common carp (*Cyprinus carpio* L.) progeny under two altitude conditions[J]. Aquaculture, 2002, 204: 481 - 491.
- [3] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999:40 - 107.
- [4] RINDERNECHT E, HUMBEL R E. The amino acid sequence of human insulin like growth factor I and its structural homology with proinsulin[J]. J Biol Chem, 1978, 253(8):2769 - 2776.
- [5] VASILATOS Y R, SCANES CG. Growth hormone and insulin-like growth factor in poultry growth: required, optimal or ineffective[J]. Poultry Sci, 1991, 70: 1764 - 1780.
- [6] FLORINI J R, EWTON D Z, MCWADE F J. IGFs, muscle growth, and myogenesis[J]. Diabetes Rev, 1995, 3:73 - 92.
- [7] SHAMBLOTT M J, CHEN T T. Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:8913 - 8917.
- [8] DUGUAY S J, LAI-ZHANG J, STEINER D F, et al. Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNAs in Sparus aurata[J]. J Mol Endocrinol, 1996, 16: 123 - 132.
- [9] COLLET C, CANDY J, RICHARDSON N, et al. Organization, sequence, and expression of the gene encoding IGFII from Barramundi (Teleostei; Lates calcarifer)[J]. Biochem Genet, 1997, 35: 211 - 224.
- [10] CHEN J Y, CHANG C Y, CHEN J C, et al. Production of biologically active recombinant tilapia insulin-like growth factor-II polypeptides in Escherichia coli cells and characterization of the genomic structure of the coding region[J]. DNA Cell Biol, 1997, 16: 883 - 892.
- [11] LOYNG-CUENI D, SCHMID A C, REINECHE M. Molecular cloning and tissue expression of the insulin-like growth factor II prohormone in the bony fish Cottus scorpius[J]. Gen Comp Endocrinol, 1999, 113: 32 - 37.
- [12] MAURES T, CHAN S J, XU B, et al. Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish[J]. Endocrinology, 2002, 143: 1858 - 1871.
- [13] AYSON F G, DE-JESUS E G, MORIYAMA S, et al. Differential expression of insulin-like growth factor I and II mRNAs during embryogenesis and early larval development in rabbitfish, *Siganus guttatus*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 126: 165 - 174.
- [14] DUVAL H, ROUSSEAU K, ELIES G, et al. Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF-I and IGF-II[J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 126: 269 - 278.
- [15] PALAMARCHUK A, GRITSENKO O, HOLTHUIZEN E, et al. Complete nucleotide sequence of the chum salmon insulin-like growth factor II gene[J]. Gene, 2002, 295: 223 - 230.
- [16] TSE M C, VONG Q P, CHENG C H, et al. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II[J]. Biochim. Biophys. Acta, 2002, 1575: 63 - 74.
- [17] AEGERTER S, JALABERT B, BOBE J. Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulinlike growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence[J]. Mol Reprod Dev, 2004, 67: 127 - 135.
- [18] CAELERS A, SCHMID A C, HRUSOVSKY A, et al. Insulin-like growth factor II mRNA is expressed in neurons of the brain of the bony fish *Oreochromis mossambicus*, the tilapia[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18: 355 - 363.
- [19] PERROT V, MOISEEVA E B, GOZES Y, et al. Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): Expression and cellular localization[J]. Biol Reprod, 2000, 63: 229 - 241.
- [20] SHAMBLOTT M J, CHENG C M, BOLT D, et al. Appearance of insulin-like growth factor mRNA in the liver and pyloric ceca of a teleost in response to exogenous growth hormone[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 6943 - 6946.
- [21] CHEN J Y, CHEN J C, CHANG C Y, et al. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides[J]. Aquaculture, 2000, 181: 347 - 360.
- [22] WONG L F, GOODHEA L, PRAT C, et al. Lentivirus-mediated gene transfer to the centralnervous system: therapeutic and research applications[J]. Hum

- GeneTher, 2006, 17(1): 1-9.
- [23] JAKOBSSON J, LUNDBERG C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system[J]. Mol Ther, 2006, 13(3): 484
- [24] COCKRELL A S, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3): 184-204.
- [25] CHUMAKOV S P, KRAVCHENKO J E, PRASSOLOV V S, et al. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector [J]. Plasmid, 2010, 63: 143-149.
- [26] RAMOS O S, CARRATALA Y P, PUERTA S G, et al. Dual promoter lentiviral vector generates transgenic mice expressing E2-CSFV glycoprotein in their milk, but impairs early identification of transgenic embryos [J]. Theriogenology, 2011.
- [27] WITCHER M, EMERSON B M. Epigenetic Silencing of the p16INK4a Tumor Suppressor Is Associated with Loss of CTCF Binding and a Chromatin Boundary[J]. Molecular Cell, 2009, 34, 271-284.
- [28] ZHANG L, PROCUIK M, FANG T, et al. Functional analysis of the quantitative expression of a costimulatory molecule on dendritic cells using lentiviral vector-mediated RNA interference [J]. Journal of Immunological Methods, 2009, 344: 87-97.
- [29] 刘真, 甄艳, 于晓黎, 等. 人 NESG1 基因慢病毒载体的构建及其在 293FT 细胞中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31: 65-68
- [30] 汤展毅, 严云勤, 高学军, 等. 牛 myf6 基因真核表达载体的构建及在成肌细胞中的表达[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2793-2799.
- [31] MOTONO M, YAMADA Y, HATTORI Y, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109: 315-321.
- [32] KEEN J E, HUNGERFORD L L, LITLEDIKE E T, et al. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity[J]. Preventive Veterinary Medicine, 1997, 30: 155-169.
- [33] BLASCO A. The role of genetic engineering in livestock production[J]. Livestock Science, 2008, 113: 191-201.
- [34] 沈媛, 彭辉, 冯敏, 等. 构建 HMGB1/PEI 非病毒载体介导高效基因传递的研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(5): 91-96.
- [35] 钟建辉, 银巍, 藏林泉, 等. 腺病毒载体介导的大鼠 DNA 多聚酶 α 重组体的构建及其在 PC12 细胞中的表达[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 6(26): 622-625.
- [36] AZZOUC M, KINGSMAN S M, MAZARAKIS N D. Lentiviral vectors for treating and modeling human CNS disorders[J]. J GeneMed, 2004, 6(9): 951-962.
- [37] VERCAMMEN L, VAN DERPERREN A, VAUDANO E, et al. Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease [J]. MolTher, 2006, 14(5): 716-723.

(上接第 76 页)

- [8] RICHARD D J, SAVAGE K, BOLDESON E, et al. hSSB1 rapidly binds at the sites of DNA double-strand breaks and is required for the efficient recruitment of the MRN complex [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(5): 1692-1702.
- [9] RICHARD D J, CUBEDDU L, URQUHART A J, et al. hSSB1 interacts directly with the MRN complex stimulating its recruitment to DNA double-strand breaks and its endo-nuclease activity [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(9): 3643-3651.
- [10] HUANG J, GONG Z, GHOSAL G, et al. SOSS complexes participate in the maintenance of genomic stability [J]. Mol Cell, 2009, 35(3): 384-393.
- [11] LI Y, BOLDESON E, KUMAR R, et al. HSSB1 and hSSB2 form similar multiprotein complexes that participate in DNA damage response [J]. J Biol Chem, 2009, 284(35): 23525-23531.
- [12] SKAAR J R, RICHARD D J, SARAF A, et al. INTS3 controls the hSSB1-mediated DNA damage response [J]. J Cell Biol, 2009, 187(1): 25-32.
- [13] ZHANG F, WU J, YU X. Integrator3, a partner of single-stranded DNA-binding protein 1, participates in the DNA damage response [J]. J Biol Chem, 2009, 284(44): 30408-30415.