

崔淼, 李钰杰, 杨永春, 等. 黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因克隆及 *IGF-1/2* 在胚胎发育过程中的表达特性分析[J]. 海洋学报, 2022, 44(10): 152–162, doi:10.12284/hyxb2022158

Cui Miao, Li Yujie, Yang Yongchun, et al. Gene cloning of *IGF-2* gene and differential expression of *IGF-1/2* during embryonic development in *Acanthopagrus latus*[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(10): 152–162, doi:10.12284/hyxb2022158

黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因克隆及 *IGF-1/2* 在胚胎发育过程中的表达特性分析

崔淼^{1*}, 李钰杰¹, 杨永春¹, 张佳颖¹, 许鲜姬¹, 林李泉²,
林国荣³, 张其中¹, 许德麟^{1*}

(1. 暨南大学 生命科学技术学院, 广东 广州 510632; 2. 阳西县恒生水产养殖专业合作社, 广东 阳江 529825; 3. 阳江市国荣水产科技有限公司, 广东 阳江 529825)

摘要: 类胰岛素样生长因子 (Insulin-like Growth Factors, IGFs) 是生物生长轴下游的关键调控因子, 其对促进细胞分化与机体生长具有重要的作用。为深入研究 *IGF-1* 和 *IGF-2* 基因在黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 胚胎发育过程中表达机制及可能发挥的作用, 本文利用分子克隆技术分离鉴定了黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因 cDNA 序列, 并对其进行了生物信息学分析。同时, 在对其胚胎发育过程连续观察的基础上, 利用实时荧光定量 PCR 的方法, 测定并分析了黄鳍棘鲷胚胎发育不同时期 *IGF-1* 和 *IGF-2* 基因 mRNA 的表达情况。实验结果表明, *IGF-2* 基因 cDNA 序列全长为 1 736 bp, 其中开放阅读框 648 bp, 共编码 215 个氨基酸。多重序列比对分析发现, 黄鳍棘鲷 *IGF-2* 氨基酸序列与同属鲷科鱼类的大西洋鲷 (*Sparus aurata*) 相似性为 99.95%, 与三长棘赤鲷 (*Pagrus auriga*) 相似性为 98.14%, 与其他硬骨鱼类的 *IGF-2* 也有较高的相似性, 显示出 *IGF-2* 在硬骨鱼类进化关系上的保守性。在水温为 (26.5±0.5) °C, pH 为 8.0 和盐度为 28 的条件下, 黄鳍棘鲷由受精卵至孵化出膜历时 25.5 h。实时荧光定量 PCR 结果显示: *IGF-1* 和 *IGF-2* 基因 mRNA 在黄鳍棘鲷胚胎发育不同时期均有表达。*IGF-1* 基因表达量呈现先升高后降低的趋势, 在肌肉效应期达到最高表达量; *IGF-2* 基因表达量呈现先升高后降低再升高的趋势, 在原肠期、肌肉效应期与出膜后 3 d 表现高表达量, 这表明 *IGF-1* 和 *IGF-2* 基因在胚胎发育时期可能发挥重要作用。

关键词: IGFs; 基因克隆; 黄鳍棘鲷; 胚胎发育; 表达模式

中图分类号: Q959.483; Q523

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)10-0152-11

1 引言

类胰岛素样生长因子 (Insulin-like Growth Factors, IGFs) 是一类参与脊椎动物生长、生殖和免疫等过程的调控因子, 相较于胰岛素, IGFs 多一个功能域 D。

IGFs 主要由肝脏细胞表达生成, 然后通过内分泌及旁分泌的方式运输到机体各个部位, 介导生长激素 (Growth Hormone, GH) 发挥生理功能, 从而促进肌肉组织的生长和肌纤维细胞的增殖, 对于鱼类的生长发育具有重要作用^[1]。硬骨鱼 IGFs 基因序列相继在虹

收稿日期: 2022-02-15; 修订日期: 2022-04-04。

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2019A1515012112, 2019A1515011791); 广东省科技计划 ([2019]170, KTP20210324); 广东省自然科学基金 (2018A030313578); 广州市科技项目 (GZKTP202032)。

* 通信作者: 崔淼 (1979—), 男, 安徽省阜阳市人, 副研究员, 研究方向为水生动物遗传育种。E-mail: cuisanshui@163.com; 许德麟 (1980—), 女, 副研究员, 研究方向为分子微生物学。E-mail: xudelin@live.com

鳊 (*Oncorhynchus mykiss*)^[2]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[3]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[4] 等成鱼中被克隆报道,但一直未见其在胚胎发育中的作用研究。直到 Fukenstein 等^[5]首次在大西洋鲷 (*Sparus aurata*) 卵子和受精卵发育不同时期检测到了 IGF-1 基因,才明确 IGF-1 基因参与了调控胚胎的发育过程;此后,White 等^[6]发现敲除斑马鱼的 IGF-2 基因会导致胚胎死亡。由此可见,IGFs 基因在硬骨鱼类胚胎发育的调控过程中发挥着至关重要的作用。

黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 属鲈形目、鲷科、棘鲷属,为浅海暖水性底层鱼类,生活在近岸海域及河口湾,常见于我国东南沿海^[7-8]。其肉质鲜美,营养价值高,深受广大消费者的喜爱,是沿海地区最有推广潜力的海水鱼类养殖品种之一。黄鳍棘鲷繁殖期为每年的 9-12 月,雌鱼繁殖期多次产卵^[9-10]。郑运通等^[11-12]、Leu 和 Chou^[13] 完成了黄鳍棘鲷的人工繁殖以及种苗培育,Li 等^[14] 和 Zhou 等^[15] 对黄鳍棘鲷性腺发育进行了研究,为黄鳍棘鲷规模化人工养殖提供了理论基础。目前,关于黄鳍棘鲷的生长相关基因研究绝大多数限于成鱼之中^[16-20],在胚胎发育中的作用和机制研究相对较少。本文拟通过对黄鳍棘鲷早期胚胎发育全过程的跟踪观察,掌握其胚胎发育阶段不同组织器官的特征变化规律,在克隆获得黄鳍棘鲷 IGF-2 基因的基础上,了解 IGF-1 和 IGF-2 基因在黄鳍棘鲷胚胎中的表达特征,为研究 IGF-1 和 IGF-2 基因在黄鳍棘鲷早期发育中的生理功能提供基础资料。

2 材料与方法

2.1 实验材料

选择体长为 (14±3) cm, 体重为 (135±30) g 的成鱼,每 5 条作为一个混样,每个样本设 3 个平行,采样前先进行 MS-222 (40 mg/L) 麻醉,然后取新鲜肝脏组织,放入经过 DEPC 水处理过的冻存管中,置于液氮中,于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。黄鳍棘鲷海捕亲鱼来源于南海不同海域,选择体质健壮、体表光滑无伤痕、颜色鲜艳、活力大的个体,雄性个体体重大于 250 g,雌性个体体重大于 400 g,共 286 条,在广东省阳江市恒生水产养殖合作社海上网箱中进行强化培育。

采用绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和促黄体素释放激素 (LRH-A) 混合注射入背部肌肉,雌鱼 HCG 注射量为 600 IU/kg, LRH-A 注射量为 10 μg/kg; 雄鱼注射量为雌鱼的一半,分两次注射,间隔 24 h。将 5 条雌性亲鱼与 10 条雄性亲鱼一同放入产卵池中,在水温为

(27±1)℃, 盐度为 28, pH 为 8.0 的情况下,采用避光、流水刺激的方法使亲鱼正常产卵受精。在孵化池的出水口收集受精卵,随机取样放入显微镜下观察,确保受精卵发育同步性,然后将受精卵转移至 500 L 的孵化桶中,在水温为 (26.5±0.5)℃, 盐度为 28, pH 为 8.0 的情况下,微充气孵化。用烧杯于孵化桶中捞取适量受精卵,用吸管吸取胚胎 (不少于 30 粒),在 Nikon E100 生物显微镜下连续观察并拍照记录。参考刘鉴毅等^[21] 的方法,当视野中 50% 以上个体发育至某阶段时,所用时间即为发育到该阶段的时间。当胚胎到达一个发育阶段后,对该阶段胚胎进行取样,每次取样分为 3 个平行,每个平行不少于 50 粒,用 DEPC 水冲洗干净,放入液氮中冷冻保存。

2.2 实验方法

2.2.1 引物设计与合成

从 NCBI 数据库中获取到斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, AY552787.1)、金钱鱼 (*Scatophagus argus*, XM_046394064.1)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, XM_025908435.1)、大西洋鲷 (*S. aurata*, EF563836.1) 的 IGF-2 基因 mRNA 序列,利用 BioEdit 软件进行序列比对,获得 IGF-2 基因的保守区域,运用 Primer Premier 5 设计保守区域引物,对黄鳍棘鲷 IGF-2 基因保守区域进行扩增测序,扩增反应体系总体积为 25 μL: 10×KOD Buffer 2.5 μL, dNTPs Mixture (2 mmol/L) 2.5 μL, MgSO₄ (25 mmol/L) 1.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 0.5 μL, ddH₂O 16.75 μL, KOD-Plus Neo 0.25 μL。PCR 反应条件为 94℃ 4 min; 98℃ 10 s, 52~64℃ 30 s, 68℃ 40 s, 35 个循环; 68℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。以 IGF-2 基因保守区域序列作为基础,设计并合成用于 5' RACE 与 3' RACE 扩增所需的特异性引物,引物合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。引物序列详见表 1。

2.2.2 总 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

参照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 说明书,提取黄鳍棘鲷肝与各胚胎发育阶段的总 RNA,按照 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒 (Promega, 美国) 说明书,以 Oligo(dT) 作为引物,反转录合成第一链 cDNA。同时根据 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书,以黄鳍棘鲷肝的 RNA 作为模板合成 5' 和 3' RACE-ready cDNA。

2.2.3 黄鳍棘鲷 IGF-2 基因克隆

以反转录获得的第一链 cDNA 作为模板,用引物 IGF-2-F 与 IGF-2-R 进行梯度 PCR。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶检测后,按照 DNA 凝胶回收试剂盒

表 1 本实验所用引物

Table 1 The primers used in the experiments

引物名称	序列(5'-3')	用途
<i>IGF-2-F</i>	TCATCTCAGCCGCACCAACT	CDS序列克隆
<i>IGF-2-R</i>	AAAAGGTGCTGGAACAGGAATC	CDS序列克隆
<i>5'-GSP1</i>	GGCATCACGGGTAAGACCTGTA	5'末端序列克隆
<i>5'-GSP2</i>	GTGGCAAAGTGAGTGGCGTC	5'末端序列克隆
<i>3'-GSP1</i>	TCTGAACTCTTTCGCTCCCTCT	3'末端序列克隆
<i>3'-GSP2</i>	ATTAGATTCTGTTCAGCACCTT	3'末端序列克隆
M13F-47	CGCCACCCTTTTCCAGTCACGAC	菌液检测
M13R-48	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	菌液检测
<i>IGF-1-F1</i>	TAGCCACACCTCTCACTACTG	荧光定量
<i>IGF-1-R1</i>	AAGCTCTCTCTCCACACAAA	荧光定量
<i>IGF-2-F1</i>	CCGTAGCTGTGACCTCAACC	荧光定量
<i>IGF-2-R1</i>	TCCTCTGCCACACCTCGTAT	荧光定量
<i>β-actin-F</i>	ACCCAGATCATGTTCGAGACC	内参基因
<i>β-actin-R</i>	ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCG	内参基因

(Omega, 美国)说明书, 将 PCR 产物进行纯化, 连接到 pMD™18-T (TaKaRa, 日本) 质粒上, 转化进 DH5 α 中, 挑取单克隆菌落, 经菌液 PCR 检测后, 筛选出阳性菌, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 扩增反应体系总体积为 25 μ L: 10 \times Buffer(含 2.5 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L, dNTPs Mixture(2.5 mmol/L) 2 μ L, M13F-47(10 μ mol/L) 0.5 μ L, M13R-48(10 μ mol/L) 0.5 μ L, 菌液 1 μ L, ddH₂O 18.375 μ L, rTaq 0.125 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。以 5'RACE-ready cDNA 和 3'RACE-ready cDNA 作为模板, 采用特异性引物与通用引物进行巢式 PCR 扩增, 扩增反应体系总体积为 25 μ L: 10 \times KOD Buffer 2.5 μ L, dNTPs Mixture(2 mmol/L) 2.5 μ L, MgSO₄(25 mmol/L) 1.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 5'/3' RACE-ready cDNA 0.5 μ L, ddH₂O 16.75 μ L, KOD-Plus Neo 0.25 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 4 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 50~64 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物操作同上。运用 DNAMAN 软件将测序结果拼接, 得到黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因 cDNA 序列。

2.2.4 生物信息学分析

运用 NCBI 数据库在线分析黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 并将其翻译成相应的氨基酸序列, 利用 NCBI 的 Blast 功能对

IGF-2 基因核苷酸与氨基酸进行序列相似性比对和分析, 利用 ExPasy(<http://web.expasy.org/>)在线分析 *IGF-2* 基因的分子量、分子式、等电点等生物信息, 利用 MEGA X 软件进行氨基酸序列比对, 并基于邻接(Neighbour-joining, NJ)法构建 *IGF-2* 进化树。用于 *IGF-2* 氨基酸序列分析、同源性比对和构建系统进化树的基因序列均从 NCBI 数据库下载。

2.2.5 黄鳍棘鲷胚胎发育阶段 *IGF-1* 和 *IGF-2* 基因表达

根据已克隆得到的 *IGF-2* 基因以及前期报道的 *IGF-1* 基因序列^[18], 设计用于 qPCR 的特异性引物。使用 Bio-Rad CFX96™ Real Time System 平台, 参照 SYBR® Green Real Time PCR MIX 试剂盒(TOYOBO, 日本)说明书, 采用 20 μ L 体系(SYBR® Green Real Time PCR MIX 10 μ L, cDNA 1 μ L, 上游引物 0.4 μ L, 下游引物 0.4 μ L, DEPC 水 8.2 μ L), 以实时 qPCR 法对 *IGF-1* 和 *IGF-2* 基因在黄鳍棘鲷胚胎发育各阶段的表达量进行测定。反应程序为预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。以 *β -actin* 作为内参基因^[20], 校正各基因的反转录效率, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 *IGF-1* 和 *IGF-2* 在各胚胎发育时期中的相对表达量。

2.2.6 数据处理

采用 SPSS19.0 通过单因素方差分析和 Duncan 多重比较进行均值计算和显著性分析, $p < 0.05$ 表示差异显著, 结果采用平均值 \pm 标准误表示, 设置 3 个平行实验。

3 结果分析

3.1 黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因克隆及序列分析

利用保守区域特异性引物扩增获得的产物经纯化、连接、转化等处理后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果在 NCBI 数据库中比对, 确定为黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因保守区片段。根据此序列, 进行 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增反应, 得到 *IGF-2* 基因部分 cDNA 片段, 经过拼接, 得到黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因 cDNA 全长序列(图 1)。黄鳍棘鲷 *IGF-2* 基因 cDNA 包括 148 bp 的 5' 端非编码区(5' UTR), 940 bp 的 3' 端非编码区(3' UTR), 以及 648 bp 的 ORF, 共编码 215 个氨基酸残基。对 *IGF-2* 基因编码的蛋白质进行生物信息学分析, 结果显示该蛋白质中精氨酸(Arg)含量最高, 为 10.7%, 其次为亮氨酸(Leu), 含量为 10.2%, 色氨酸(Trp)含量最少, 仅为 0.5%。预测蛋白分子量为 24.67 kDa, 理论等电点为 10, 不稳定指数为 68.58, 脂肪指数为 79.81, 蛋白质前 52 个氨基酸为信号肽, *IGF-2* 功能区具有 58 个氨基酸, 后 105 个氨基酸为结构域 E。

```

1 CTGTCCGCTGGTCTTTGGGACAGCCTCTCACATCATCTCAGCCGACCAACTGGGAACTAACTCACCTGCAATCTCTCCGAAACCAATAACCCACCCCTCCCAACCAACCCCTC 120
121 CCGACGTTTTTACTACTGCATCTGACatggagaccagcaaaagacacggagccactcactttgccacacctgccggaggagagagagcagagaatgaaggcaagaagatgtctc 240
1 M E T Q Q R H G R H S L C H T C R R T E S S R M K V K K M S S 31
241 gtccagtcgctgctcttttgcactggccctgacgctctacgtggagggtggccctcggcgagacgctgtgtggggagagctggtagatcgctgacgttgtctgcaagaacag 360
32 S S R A L L F A L A L T L Y V V E V A S A E T L C G G E L V D A L Q F V C E D R 71
361 aggccttctattcagtaggccaaccagcaggggaaacaaccggcgccccagaccgcgggatcgtagaggagtgtgtttccgtagctgtgacctcaacctgctggagcagtagctgtgc 480
72 G F Y F S R P T S R G N N R R P Q N R G I V E E C C F R S C D L N L L E Q Y C A 111
481 caaacccgccaagtccgaaaggagctgtcggccacctctctacaggtcttaccgtgatgccccactaaaacaggaagtctcaaggaagcagcatgtgacctgaagtattccaaata 600
112 K P A K S E R D V S A T S L Q V L P V M P P L K Q E V S R K Q H V T V K Y S K Y 151
601 cgagggtgtggcagaggaagcggccagcggctccggagggtgtccggccatcctgaggccaaaaagtatcggaggcagcggagaagatcaagcccaggagcagcagcatctcca 720
152 E V W Q R K A A Q R L R R G V P A I L R A K K Y R R Q A E K I K A Q E Q A I F H 191
721 caggcctctgatcagcctgcccaaacctgctcccgtctgtctgcaccagacaactatgcaaccacaaatgaGCCCGTCCAGCCCTTTGCACAGACAAGATTTGGAGGGAGAA 840
192 R P L I S L P S K L P P V L L A T D N Y V N H K * 215
841 AAAAAAGACTAGGGATATAGCTTTGTCTGACGTCATTCTGTGGCAGTCTCTTTGACCTCCCTGCCTGTCCGAGCCACCAATCCCTCCCTCCCTGCTCTCATCCACTACTTCTT 960
961 GACCTCTGGCCCTTTTTCTAATGCCCTTCAGCCCGACCCACCCATCTCTCCGCGACACAACATGCCTTCACATTTCTCTGTCTGAACTCTTTGGCTCCCTCTCTTTTCAGT 1 080
1 081 CACTGACACAAAAGACACAAAACACAATGATGAACAAAAAGTTAAACAATTCGGCTGAATGCAATTCAGGTGGATCCTTAAAGCAAAAAGAGAAAACGGGAAAGAGAAAAGAGATGA 1 200
1 201 AAGAGATCTGTGGTTTGAAGTGCAAGAGGACACCCAGCGGAATGTTTTTTGTCTTGTGGAAGACAACCTGAAAGTGAAGAGCAGCTTGCATGAAAAGATCCATCCACATCATT 1 320
1 321 TCCTGAGGCAAAAAGAAATCTCTTAGTTCTTTTTTGTATTAGTTTGCACCTCTACCTATAAAGGGACTCTCCTACTGTAAGGAATATTTTTGTAATAATAGATTCCTGTCCAGCACC 1 440
1 441 TTTTGATCACAACAAAAGCAGAAAAGAGCTGCAAAAATGCACATGCCACGGATTACGTCAAAAGTAAAGAAAAAATGGCACTATTTTTTATGAACAATGAACGTGTAGCTTAAAA 1 560
1 561 AAATGTCATGGTGTAGCTTTGGGAATGGACTCAAGAAGAGTTGAAAAAGCAGCTTTTTTTTTTTTTTTTCTTGAATGAATATAAACTTTCCGTTTTAAAGAAAGGTGACTTTT 1 680
1 681 TTAATAAAAAAAAAAAGGAAATAAAGGATCTGGGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1 736

```

图1 黄鳍棘鲷 IGF-2 基因全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Complete sequence of IGF-2 gene cDNA and deduced amino acid sequence from *Acanthopagrus latus*

*代表氨基酸终止密码子;左右两列数字分别代表最左边与最右边碱基或者氨基酸在整个基因或者氨基酸序列中的位置, ATAA代表 poly(A) 加尾信号

* Represents stop codon TGA; the left and right columns represent the positions of the leftmost and rightmost bases or amino acids in the entire gene or amino acid sequence; ATAA represents poly(A) signal

3.2 黄鳍棘鲷 IGF-2 基因氨基酸序列的同源性和系统发育分析

黄鳍棘鲷 IGF-2 基因氨基酸序列经过 Blast 检索发现, IGF-2 基因在鱼类中高度保守(图 2), 与同为鲈形目的大西洋鲷、三长棘赤鲷 (*Pagrus auriga*) 高度相似, 一致性高达 95% 以上, 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 一致性在 80% 以上, 与斑马鱼的一致性为 78.2%, 但与其他脊椎动物一致性较低, 与野猪 (*Sus scrofa*) 的一致性为 42.2%, 与人 (*Homo sapiens*) 和猕猴 (*Macaca mulatta*) 的一致性仅为 36.7% 和 35.8%。将黄鳍棘鲷与 Gene-Bank 中已发表的其他物种的 IGF-2 基因氨基酸序列进行比对, 构建系统进化树(图 3), 基于系统进化树可知, 黄鳍棘鲷与其他硬骨鱼类聚为一簇, 两栖类则和哺乳类聚为一簇。其中, 黄鳍棘鲷先与大西洋鲷、沙重牙鲷 (*Diplodus sargus*) 聚为一支, 三者遗传距离最近, 其次与三长棘赤鲷、牙鲆和大菱鲆等聚为一簇, 与哺乳类动物和两栖动物遗传距离较远, 这与氨基酸序列同源性比较结果一致。

3.3 黄鳍棘鲷胚胎发育观察

黄鳍棘鲷受精卵在水温为 (26.5±0.5) °C, 盐度为 28, pH 为 8.0 的条件下, 完成整个胚胎发育过程共用

时 25.5 h。在水体不充气的状态下, 黄鳍棘鲷受精卵在不同盐度的海水中分布不同, 当盐度大于 32 时, 受精卵漂浮于水面; 当盐度小于 24 时, 受精卵沉在水底; 当盐度为 26~30 时, 受精卵悬浮于水中。黄鳍棘鲷受精卵卵裂方式为盘状卵裂, 卵裂仅在胚盘上进行, 卵黄不参与分裂。黄鳍棘鲷卵受精后, 卵周隙变小, 受精卵卵径为 (0.900±0.050) mm, 内有一个直径为 (0.250±0.020) mm 的油球。受精后, 在动物极可观察到一扁平帽状结构, 称为胚盘, 卵黄向植物极集中, 原生质逐渐向动物极转移, 胚盘开始隆起, 大约 40 min 后在胚盘顶部中央产生一分裂沟, 即第一次细胞分裂, 最终形成两个均等的细胞(图 4a)。55 min 后开始第二次细胞分裂, 在细胞顶部中央出现与第一次细胞分裂相垂直的分裂沟, 形成 4 个大小相似的细胞(图 4b), 1 h 10 min 后, 在第一次分裂沟两边, 各出现一条与之相平行的分裂沟, 形成 8 个细胞(图 4c)。然后继续分裂, 依次进入 16 细胞期(图 4d)、32 细胞期(图 4e)、64 细胞期(图 4f) 和多细胞期(图 4g)。随着细胞分裂次数不断增多, 细胞多而呈不规则排列, 3 h 20 min 后进入桑葚胚期(图 4h)。细胞继续分裂, 细胞间更细密, 细胞界限模糊不清, 4 h 后在胚盘处细胞堆积, 在突出于卵黄之上形成囊胚层, 进入高囊胚期(图 4i)。

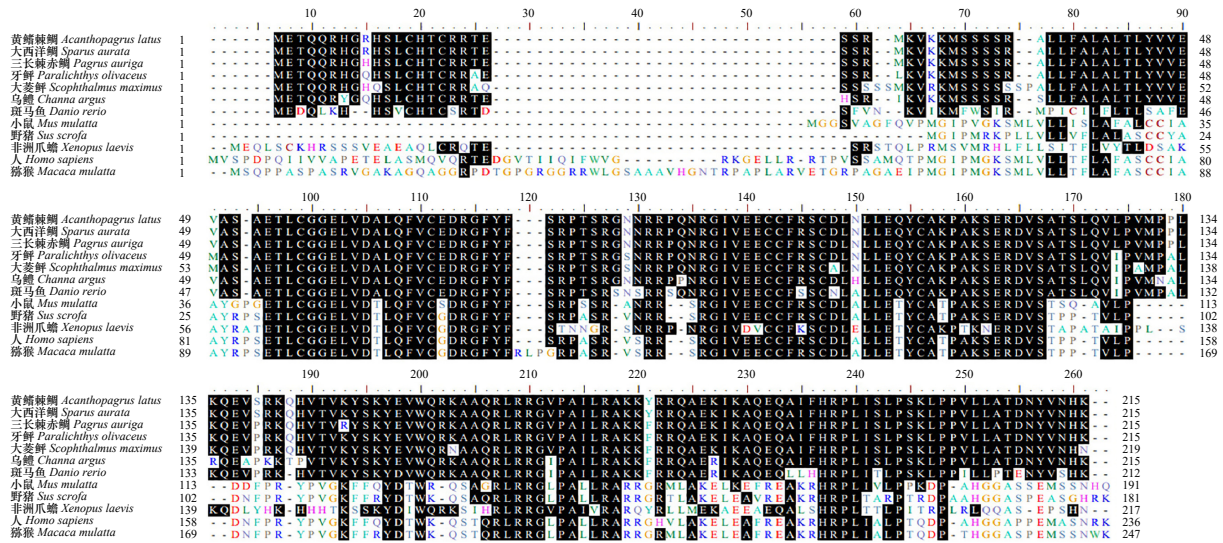


图 2 黄鳍棘鲷 IGF-2 基因氨基酸序列多重序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence multiple alignment of IGF-2 gene from *Acanthopagrus latus*

不同颜色的字母代表不同的氨基酸;左右两边数字分别代表最左边与最右边的氨基酸在整个氨基酸序列中的位置

Different colored letters represent different amino acids; the left and right numbers represent the positions of the leftmost and rightmost amino acids in the amino acid sequence

细胞向四周扩散, 5 h 25 min 后, 囊胚层变低, 称之为低囊胚期(图 4j)。囊胚层继续向下包, 7 h 10 min 进入原肠前期(图 4k); 胚盘下包至卵黄 1/2 处, 形成胚盾, 8 h 45 min 后进入原肠中期(图 4l); 10 h 5 min 后囊胚层下包至卵黄 3/4 处, 胚层包裹植物极形成胚孔, 胚盾继续延伸, 胚体逐步形成, 进入原肠晚期(图 4m)。11 h 10 min 后, 胚层继续下包, 最终完全将胚孔封闭(图 4n); 11 h 40 min 后, 胚体头部开始形成视囊(图 4o); 受精 12 h 20 min 后, 脑开始出现分化, 身体中部出现肌节(图 4p); 受精后 13 h 40 min 后, 在眼囊中间处出现一对凹陷, 开始形成视杯, 肌节数目增多(图 4q); 受精后 15 h, 肌节进一步增多, 胚体末端黑色素开始累积, 在腹面开始突出形成尾芽, 并开始从卵黄囊上分离(图 4r); 16 h 50 min 后, 尾从卵黄囊上分离出来, 胚体头部变大, 视囊中出现圆形晶体, 心脏原基开始出现(图 4s); 受精 19 h 40 min 后, 心脏原基进一步发育, 头部结构变得复杂, 胚体开始间歇性颤动, 进入肌肉效应期(图 4t); 受精 21 h 后, 胚体颤动频率增加, 心脏开始搏动, 起初频率微弱, 以后逐渐加快(图 4u); 23 h 10 min 后, 胚体长度几乎可以包裹卵黄囊一周, 胚体扭动有力, 在显微镜下可见连续扭动(图 4v); 胚体发育 25 h 30 min 后, 胚体头部破膜而出, 尾部摆动频繁, 仔鱼开始褪去卵膜孵出(图 4w)。

3.4 IGF-1 和 IGF-2 基因在黄鳍棘鲷胚胎发育过程中的表达情况

通过荧光定量 PCR 检测黄鳍棘鲷 IGF-1 和 IGF-2

基因在胚胎发育不同阶段(卵裂期、囊胚期、原肠期、胚孔封闭期、晶体期、肌肉效应期、心跳期、出膜前、出膜后 3 d)的表达情况。结果显示, 黄鳍棘鲷 IGF-1 和 IGF-2 基因 mRNA 在各发育时期中均有表达(图 5), 黄鳍棘鲷 IGF-1 基因呈现先上升后下降的表达趋势, 在肌肉效应期表达量最高, 在囊胚期、原肠期、胚孔封闭期、晶体期以及出膜后 3 d 表达量次之, 卵裂期、心跳期、出膜前表达量较低; IGF-2 基因呈现先上升后下降再上升的表达趋势, 在原肠期、肌肉效应期以及出膜后 3 d 的表达量较高, 在胚孔封闭期和晶体期表达量次之, 而在卵裂期、囊胚期、心跳期以及出膜前表达量较低。

4 讨论

类胰岛素样生长因子是位于生物 GH-IGFs 生长轴下游的关键因子, 介导生长激素发挥生物学功能^[22], 类胰岛素样生长因子主要由 IGF-1 和 IGF-2 组成。IGF-2 也被称为生长调节素 A, 是胰岛素家族的成员之一, 具有促进细胞有丝分裂和分化的作用, 同时也与个体脂肪沉淀、生长速度等生产性能关系密切^[23]。本研究采用 RACE 技术, 首次克隆获得黄鳍棘鲷 IGF-2 基因的全长序列, 其全长为 1 736 bp, 共编码 215 个氨基酸, 推导的氨基酸序列与其他硬骨鱼类相似性较高, 而与两栖类、哺乳类相似性较低, 系统进化关系与物种传统分类学相一致, 这说明 IGF-2 在硬骨鱼类中进化保守。IGF-2 蛋白与 IGF-1 蛋白^[18]一级结构基

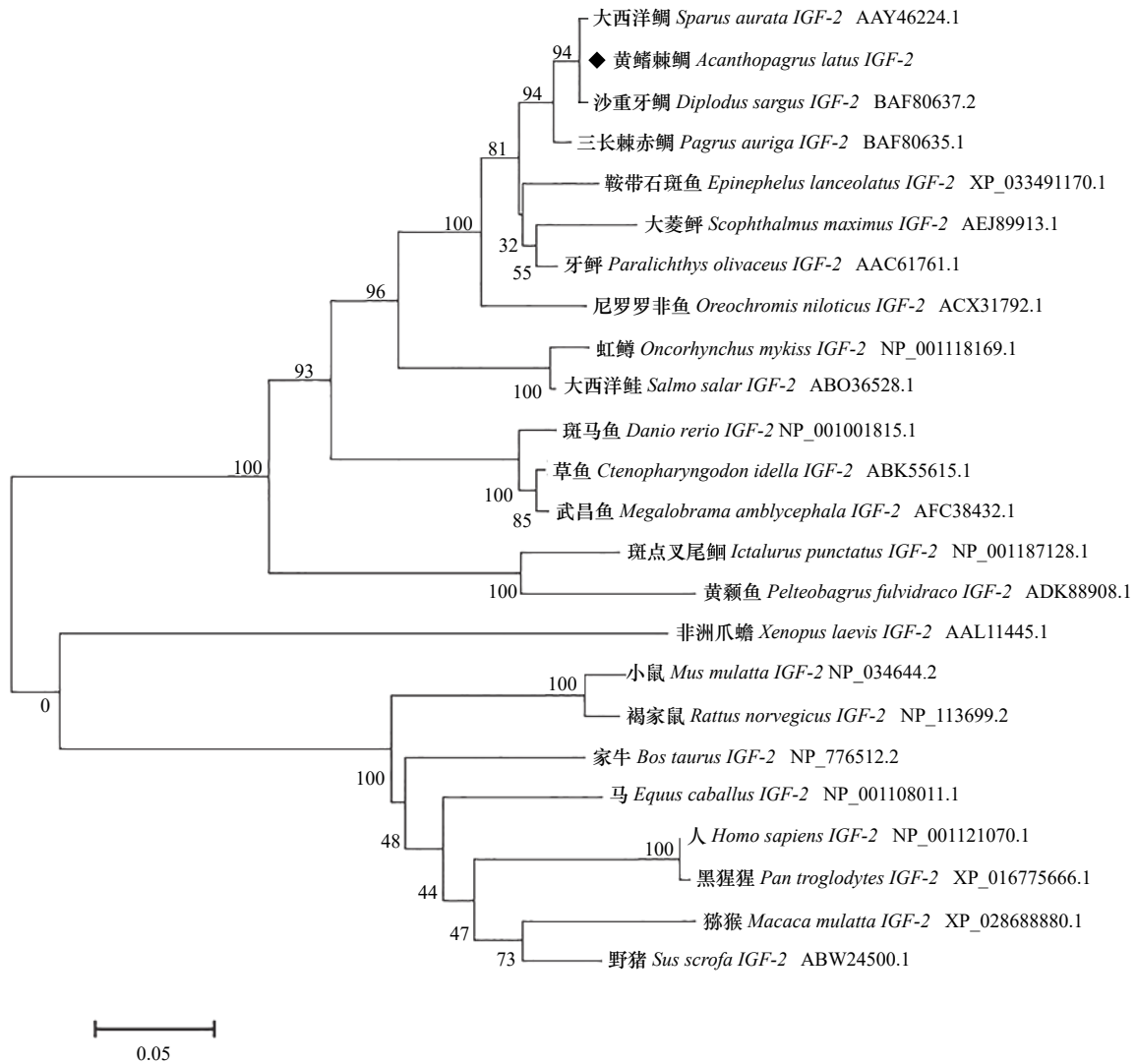


图3 黄鳍棘鲷和其他物种 IGF-2 基因氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of IGF-2 gene amino acid sequence from *Acanthopagrus latus* and other species

本相同,均由信号肽、功能域和结构域 E 组成。IGF-2 功能域具有 53 个氨基酸,由 B、C、A、D 4 个结构域组成^[24],B、A 结构域分别与胰岛素 B 链和 A 链同源^[25],C 区与胰岛素连接肽类似,这说明 IGF-1、IGF-2 和胰岛素是由同一个祖蛋白进化来的^[26]。IGF-2 含有 3 个由半胱氨酸形成的二硫键,使得 IGF-2 蛋白质的三级结构得以维持。但是,目前相比于人、鼠等哺乳动物,国内外对硬骨鱼类 IGF-2 基因的研究较少,后续仍需对鱼类 IGF-2 基因功能及调节机制进行进一步研究。

本研究中观察并记录了黄鳍棘鲷胚胎发育 23 个时期的形态特征变化。黄鳍棘鲷受精卵具有典型硬骨鱼类端黄卵的特性,呈圆球形,具有一个油球,其内含中性脂肪,使受精卵不仅能储藏养料,也能使卵子漂浮于水中。受精卵在盐度 28 的海水中为悬浮性卵,卵裂方式为盘状卵裂。胚胎发育主要经历 5 个时期,分别为卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期和

器官形成期^[27]。鱼卵的直径因物种不同而存在差异,鱼卵直径显著影响其发育速度,一般鱼卵直径越大,发育速度越慢。将黄鳍棘鲷与几种鲈形目暖水性海水鱼类胚胎发育特征进行比较^[21,28-33](表 2),发现黄鳍棘鲷受精卵卵径比军曹鱼(*Rachycentron canadum*)卵径小,与 3 种鲷科鱼类差距不大,比其余 3 种鱼卵径大,这与物种的种间差异具有一定的关系。相较于 3 种鲷科鱼类,黄鳍棘鲷孵化时间短,我们猜想这与孵化温度有一定关系^[34]。本研究中黄鳍棘鲷在水温(26.5±0.5)℃的情况下,经 25.5 h 孵化为仔鱼,这与郑运通等^[12]观察到黄鳍棘鲷受精卵在(21.6±0.5)℃下,30 h 35 min 后孵化为仔鱼情况有所差异,该结果也验证了我们所猜想的胚胎孵化与温度具有一定的关系。

胚胎发育涉及到各种信号通路的调节,是个体发育中的重要环节,本研究利用 RT-PCR 检测了 IGF-1 和 IGF-2 基因在胚胎发育各个时期的表达。结果显

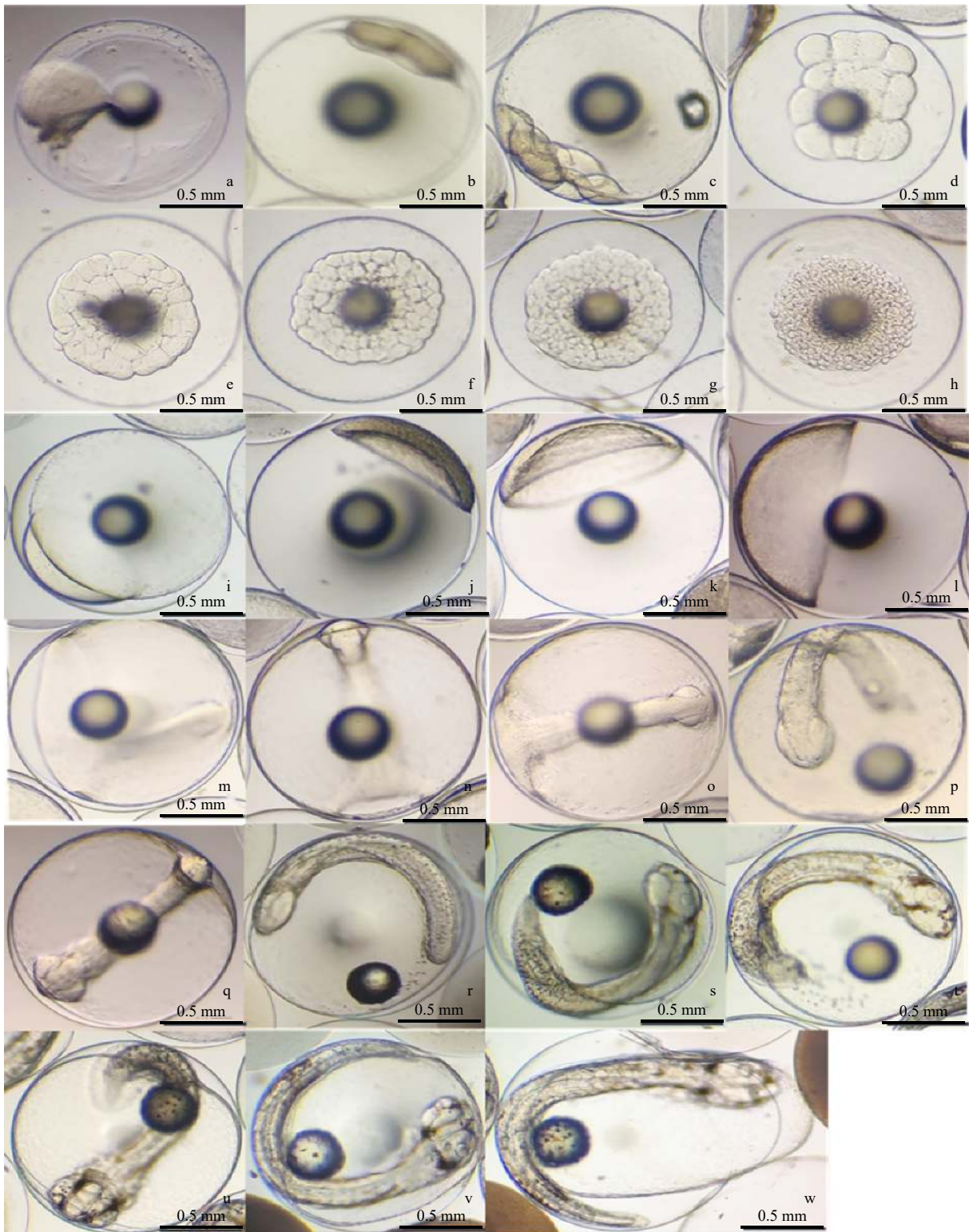


图 4 黄鳍棘鲷的胚胎发育

Fig. 4 Embryonic development of *Acanthopagrus latus*

a. 2 细胞期; b. 4 细胞期; c. 8 细胞期; d. 16 细胞期; e. 32 细胞期; f. 64 细胞期; g. 多细胞期; h. 桑葚胚期; i. 高囊胚期; j. 低囊胚期;

k. 原肠前期; l. 原肠中期; m. 原肠晚期; n. 胚孔封闭期; o. 视囊形成期; p. 肌节出现期; q. 晶体形成期; r. 尾芽期; s. 尾芽游离期;

t. 肌肉效应期; u. 心跳期; v. 将孵期; w. 破膜期

a. 2-cell stage; b. 4-cell stage; c. 8-cell stage; d. 16-cell stage; e. 32-cell stage; f. 64-cell stage; g. multicellular stage; h. morula stage; i. high blastula stage;

j. low blastula stage; k. early-gastrula stage; l. mid-gastrula stage; m. late-gastrula stage; n. closure of blastopore stage; o. eye vesicle formation stage;

p. muscle burl stage; q. crystal formation stage; r. tail-bud stage; s. tail-bud free stage; t. muscular effect stage; u. heart-beating stage;

v. pre-hatching stage; w. hatching stage

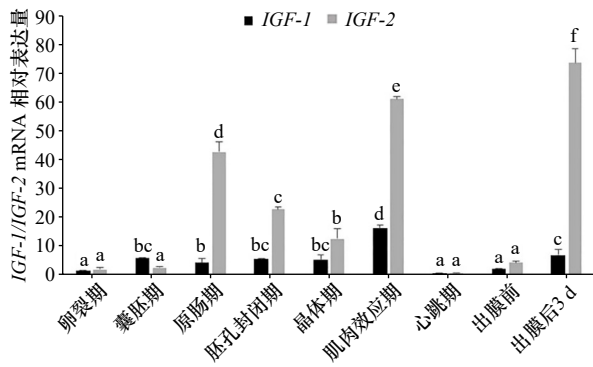


图5 黄鳍棘鲷胚胎发育过程中 IGF-1/IGF-2 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 5 The relative expression of IGF-1/IGF-2 genes mRNA in different embryo development stages of *Acanthopagrus latus*

标有不同字母的组间平均值差异显著 ($p < 0.05$)

The mean values marked with different letters between groups are significantly striking ($p < 0.05$)

示: IGF-1 和 IGF-2 基因在黄鳍棘鲷的胚胎发育各个时期均有表达, IGF-1 基因在肌肉效应期高表达; 相较于 IGF-1 基因, IGF-2 基因在原肠期、肌肉效应期以及出膜后 3 d 均有高表达。金钱鱼 IGF-1 基因在卵裂期到出膜期的各个时期中均有表达^[35], 大西洋鲷^[5, 36]也有着类似现象。通过向斑马鱼胚胎显微注射 IGF-1 基因 mRNA, 相较于对照组, 实验组斑马鱼躯干生长发育速度加快^[1]。我们推测 IGF-1 基因可能在鱼类胚胎发育过程中广泛表达, 促进肌纤维细胞的增殖。黄鳍棘鲷 IGF-2 基因直到原肠期才开始高表达, 虹鳟卵裂期不表达^[37], 斜带石斑鱼在桑葚期开始表达, 随后表达量持续升高^[22], 这说明 IGF-2 基因在不同鱼类早期胚胎发育过程中的表达方式不同。White 等^[6]利用吗啉反义寡核苷酸抑制斑马鱼胚胎发育期间 IGF-2b 基因的表达, 发现 IGF-2b 基因缺失导

表2 海水鱼类胚胎发育特征的比较

Table 2 Comparison of embryonic developmental characteristics of marine fish

物种	受精卵直径/ mm	油球直径/ mm	孵化水温/ °C	胚胎发育 时间
黄鳍棘鲷 (<i>Acanthopagrus latus</i>)	0.900±0.050	0.250±0.020	26.5±0.5	25 h 30 min
条石鲷 (<i>Oplegnathus fasciatus</i>) ^[28]	0.910±0.038	0.210±0.028	23.9±0.4	30 h 32 min
黑棘鲷 (<i>Acanthopagrus schlegelii</i>) ^[29]	0.895±0.055	-	21.0±0.5	32 h
大西洋鲷 (<i>Sparus aurata</i>) ^[30]	0.870±0.050	0.205±0.025	19±0.5	44 h 48 min
军曹鱼 (<i>Rachycentron canadum</i>) ^[31]	1.245±0.065	0.325±0.027	27.0±0.5	26 h 30 min
鞍带石斑鱼 (<i>Epinephelus lanceolatus</i>) ^[32]	0.820±0.030	0.230±0.030	29.0±0.5	18 h 30 min
多纹钱蝶鱼 (<i>Selenotoca multifasciata</i>) ^[21]	0.605±0.005	0.237±0.013	27.0±1.0	18 h 30 min
黄姑鱼 (<i>Nibea albiflora</i>) ^[33]	0.830±0.018	0.240±0.012	23.2±0.15	22 h 59 min

致斑马鱼背侧中线发育缺陷, 同时也导致了腹侧前脑发育缺陷, 最终胚胎死亡, 这说明 IGF-2 基因可能参与了脑部发育与肌细胞的增殖。IGF-2 基因在原肠期高表达, 这与金钱鱼 IGF-2 基因表达相似^[35], 我们认为 IGF-2 基因可能在中胚层的形成中发挥作用。IGF-1 和 IGF-2 基因在肌肉效应期都出现高表达的现象, 表示二者在胚胎发育过程中对肌细胞的增殖均发挥作用。IGF-1 和 IGF-2 基因在胚胎发育过程中发挥着重要作用, 但其在胚胎发育过程中是否具有协同作用及其调控的下游信号通路还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Wood A W, Duan Cunming, Bern H A. Insulin-like growth factor signaling in fish[J]. International Review of Cytology, 2005, 243: 215-285.
- [2] Loir M, Le Gac F. Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes[J]. *Biology of Reproduction*, 1994, 51(6): 1154-1163.
- [3] Zou Shuming, Kamei H, Modi Z, et al. Zebrafish IGF genes: gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7026.
- [4] Tse M C L, Vong Q P, Cheng C H K, et al. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2002, 1575(1/3): 63-74.
- [5] Fukenstein B, Shemer R, Amuly R, et al. Nucleotide sequence of the promoter region of *Sparus aurata* insulin-like growth factor I gene and expression of IGF-I in eggs and embryos[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(1): 43-51.
- [6] White Y A R, Kyle J T, Wood A W. Targeted gene knockdown in zebrafish reveals distinct intraembryonic functions for insulin-like growth factor II signaling[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(9): 4366-4375.
- [7] 苏锦祥. 鱼类学与海水鱼类养殖[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 160-220.

- Su Jinxiang. Ichthyology and Marine Fish Culture[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 160–220.
- [8] 麦贤杰, 黄伟健, 叶富良, 等. 海水鱼类繁殖生物学和人工繁育[M]. 北京: 海洋出版社, 2005: 199–225.
Mai Xianjie, Huang Weijian, Ye Fuliang, et al. Reproductive Biology and Artificial Breeding of Marine Fish[M]. Beijing: China Ocean Press, 2005: 199–225.
- [9] Wang S B, Lau K Y, Liu K M, et al. Reproductive characteristics of the hermaphroditic yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* in the waters off western Taiwan[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(12): 5015–5028.
- [10] 洪万树, 张其永, 郑建峰, 等. 港养黄鳍鲷性腺发育和性转变研究[J]. 台湾海峡, 1991, 10(3): 221–228.
Hong Wanshu, Zhang Qiyong, Zheng Jianfeng, et al. Studies on gonadal development and sex inversion of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1991, 10(3): 221–228.
- [11] 郑运通, 马荣和, 许波涛, 等. 黄鳍鲷人工繁殖与育苗技术的研究[J]. 海洋渔业, 1986(5): 205–208.
Zheng Yuntong, Ma Ronghe, Xu Botao, et al. Study on artificial propagation and seedling technology of yellowfin bream (*Acanthopagrus latus*)[J]. *Marine Fisheries*, 1986(5): 205–208.
- [12] 郑运通, 马荣和, 许波涛, 等. 黄鳍鲷的胚胎和仔稚幼鱼的形态发育观察[J]. 水产科技情报, 1986(4): 1–3.
Zheng Yuntong, Ma Ronghe, Xu Botao, et al. Morphological development of embryos and larvae of yellowfin bream (*Acanthopagrus latus*)[J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 1986(4): 1–3.
- [13] Leu M Y, Chou Y H. Induced spawning and larval rearing of captive yellowfin porgy, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn)[J]. *Aquaculture*, 1996, 143(2): 155–166.
- [14] Li Shizhu, Lin Genmei, Fang Wenyu, et al. Gonadal transcriptome analysis of sex-related genes in the protandrous yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 709.
- [15] Zhou Ying, Liu Haiyang, Wang Xinhua, et al. QTL fine mapping for sex determination region in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and comparison with silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(1): 41–53.
- [16] Zhu Kecheng, Zhang Nan, Liu Baosuo, et al. A chromosome-level genome assembly of the yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*; Houttuyn, 1782) provides insights into its osmoregulation and sex reversal[J]. *Genomics*, 2021, 113(4): 1617–1627.
- [17] 石和荣, 张为民, 刘晓春, 等. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷生长激素分泌的影响[J]. 海洋学报, 2005, 27(3): 147–153.
Shi Herong, Zhang Weimin, Liu Xiaochun, et al. Effects of cysteamine hydrochloride and luteinizing hormone-releasing hormone analog on growth hormone secretion in yellowfin porgy[J]. *Haiyang Xuebao*, 2005, 27(3): 147–153.
- [18] 石和荣, 张勇, 张为民, 等. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷 *IGF-I* 基因表达和生长的影响[J]. 动物学报, 2005, 51(1): 108–116.
Shi Herong, Zhang Yong, Zhang Weimin, et al. Effect of cysteamine hydrochloride and luteinizing hormone-releasing hormone analog on the growth and the expression of *IGF-I* mRNA in the yellowfin porgy *Sparus latus*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(1): 108–116.
- [19] 张殿昌, 江世贵. 黄鳍鲷生长激素 cDNA 的分子克隆和序列分析[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(4): 62–65.
Zhan Dianchang, Jiang Shigui. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA from *Sparus latus*[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2002, 22(4): 62–65.
- [20] 马细兰, 冷婷婷, 刘启智, 等. 黄鳍鲷 (*Sparus latus*) 两种生长激素受体的 cDNA 克隆及组织表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(6): 830–838.
Ma Xilan, Leng Tingting, Liu Qizhi, et al. cDNAs cloning and tissues expression of two growth hormone receptors in yellowfin bream *Sparus latus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(6): 830–838.
- [21] 刘鉴毅, 李琪, 孙艳秋, 等. 多纹钱蝶鱼胚胎发育及胚后发育观察[J]. 中国水产科学, 2021, 28(8): 978–987.
Liu Jianyi, Li Qi, Sun Yanqiu, et al. Embryonic and post-embryonic development of *Selenotoca multifasciata*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 978–987.
- [22] 杨慧荣, 王庆, 李水生, 等. 类胰岛素生长因子 (IGFs) 在斜带石斑鱼胚胎及卵巢的表达[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2019, 58(5): 94–103.
Yang Huirong, Wang Qing, Li Shuisheng, et al. Expression analysis of insulin-like growth factors' (IGFs) in embryo and oocyte of *Epinephelus coioides*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2019, 58(5): 94–103.
- [23] Aslan O, Hamill R M, Davey G, et al. Variation in the *IGF2* gene promoter region is associated with intramuscular fat content in porcine skeletal muscle[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4101–4110.
- [24] Yuan Yongming, Hong Yunhan. Medaka insulin-like growth factor-2 supports self-renewal of the embryonic stem cell line and blastomeres *in vitro*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 78.
- [25] 林权卓, 沈卓坤, 杨宪宽, 等. 双棘黄姑鱼 *IGF2* 基因克隆及其在卵巢发育中的作用研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(3): 119–124, 130.
Lin Quanzhuo, Shen Zhuokun, Yang Xiankuan, et al. *IGF2* gene cloning and its function during the development of ovarian cycle in *Protonibea diacantus*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(3): 119–124, 130.
- [26] 王丁科, 阎萍, 梁春年, 等. 胰岛素样生长因子 2 研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(7): 67–70.
Wang Dingke, Yan Ping, Liang Chunian, et al. Progress on insulin-like growth factor 2[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(7): 67–70.
- [27] 陈军平, 沈方方, 武慧慧, 等. 我国鱼类胚胎发育研究进展[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(17): 45–52.
Chen Junping, Shen Fangfang, Wu Huihui, et al. Research progress of China's fish embryonic development[J]. *Jiangsu Agricultural Sci-*

- ences, 2021, 49(17): 45–52.
- [28] 辛俭, 薛利建, 毛国民, 等. 条石鲷的胚胎发育观察[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2005, 24(1): 31–36.
Xin Jian, Xue Lijian, Mao Guomin, et al. Study on the embryonic development of *Oplegnathidae fasciatus*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2005, 24(1): 31–36.
- [29] 官曙光, 刘洪军, 李祥东, 等. 黑棘鲷胚胎发育过程及特殊结构观察[J]. 海洋科学, 2011, 35(9): 68–72.
Guan Shuguang, Liu Hongjun, Li Xiangdong, et al. Observation of embryonic development of *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Marine Sciences, 2011, 35(9): 68–72.
- [30] 王彦怀, 陶秉春, 梁伟光, 等. 金头鲷胚胎发育的初步观察[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 14–18.
Wang Yanhuai, Tao Bingchun, Liang Weiguang, et al. Preliminary studies on embryo development of *Sparus aurata*[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(6): 14–18.
- [31] 邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼的胚胎发育及仔稚鱼形态观察[J]. 水产学报, 2021, 45(11): 1814–1824.
Kuang Jiehua, Chen Gang, Ma Qian, et al. Embryonic development and morphological characteristics of larvae and juveniles of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(11): 1814–1824.
- [32] 周玲, 翁文明, 李金亮, 等. 鞍带石斑鱼胚胎发育及仔鱼形态发育、饵料转变的观察研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 293–302.
Zhou Ling, Weng Wenming, Li Jinliang, et al. Studies on embryonic development, morphological development and feed changeover of *Epinephelus lanceolatus* larva[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(1): 293–302.
- [33] 黄贤克, 单乐州, 闫茂仓, 等. 黄姑鱼胚胎发育及其与温度和盐度的关系[J]. 海洋科学, 2017, 41(7): 44–50.
Huang Xianke, Shan Lezhou, Yan Maocang, et al. Embryonic development of *Nibea albiflora* and the effects of temperature and salinity on embryogenesis[J]. Marine Sciences, 2017, 41(7): 44–50.
- [34] Yang S G, Ji S C, Lim S G, et al. Management of sexual maturation and natural spawning of captive-reared yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*, in an indoor rearing tank[J]. Development & Reproduction, 2016, 20(2): 141–147.
- [35] 张克伟, 陈华谱, 江东能, 等. 金钱鱼 IGF-1 和 IGF-2 的克隆及其在胚胎发育过程的表达[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(2): 7–14.
Zhang Kewei, Chen Huapu, Jiang Dongneng, et al. Insulin-like growth factors 1 and 2 in spotted scat (*Scatophagus argus*): molecular cloning and differential expression during embryonic development[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(2): 7–14.
- [36] Perrot V, Moiseeva E B, Gozes Y, et al. Ontogeny of the insulin-like growth factor system (IGF-I, IGF-II, and IGF-1R) in gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization[J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 116(3): 445–460.
- [37] Greene M W, Chen T T. Quantitation of IGF-I, IGF-II, and multiple insulin receptor family member messenger RNAs during embryonic development in rainbow trout[J]. Molecular Reproduction and Development, 1999, 54(4): 348–361.

Gene cloning of IGF-2 gene and differential expression of IGF-1/2 during embryonic development in *Acanthopagrus latus*

Cui Miao¹, Li Yujie¹, Yang Yongchun¹, Zhang Jiaying¹, Xu Xianji¹, Lin Liquan², Lin Guorong³,
Zhang Qizhong¹, Xu Delin¹

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Yangxi Hengsheng Aquaculture Co., Ltd., Yangjiang 529825, China; 3. Yangjiang Guorong Aquatic Science and Technology Co., Ltd., Yangjiang 529825, China)

Abstract: Insulin-like growth factors (IGFs) are key regulators downstream of the growth axis and play an important role in promoting cell differentiation and growth. In order to further study the expression mechanism and possible roles of IGF-1 and IGF-2 genes in the embryonic development of *Acanthopagrus latus*. Our research cloned and identified the cDNA sequence of IGF-2 gene from *A. latus* and proceeded a biological information analysis. At the same time, based on the foundation of continual observation of the embryonic development of *A. latus*. RT-qPCR was carried out to explore the expression levels of IGF-1 and IGF-2 genes. The results suggested that the full length and open reading frame of IGF-2 gene are 1 736 bp and 648 bp respectively, encoding a predicted peptide of 215 amino acids. Multiple alignment showed that *A. latus* IGF-2 was 99.95% similar to *Sparus aurata* and 98.14% similarity with *Pagrus auriga*, as well as relatively high homology with other teleosts, indicating that conservation of IGF-2 in teleost evolutionary relationships. Through continuous observation of the embryonic development of *A. latus*, it was found that under the conditions of water temperature of (26.5±0.5)°C, pH of 8.0 and salinity of 28, the

time from fertilization of egg to hatching of membrane of *A. latus* was 25.5 h. Expression analysis showed that *IGF-1* and *IGF-2* genes constitutively expresses in various tested stages of embryo of *A. latus*. The expression of *IGF-1* gene showed a trend of first increasing and then decreasing, reaching a relatively high expression in the muscle effect period, and the expression of *IGF-2* gene showed a trend of first increasing and then decreasing and then increasing, *IGF-2* gene was expressed in the gastrula stage, the muscle effect stage and 3 days after membrane emergence. Summarizing, all the data of our study above showed that *IGF-1* and *IGF-2* genes may play a crucial role in embryonic development in *A. latus*.

Key words: insulin-like growth factors; gene clone; *Acanthopagrus latus*; embryonic development; expression pattern