

大菱鲂胰岛素样生长因子-I成熟肽的克隆、重组表达及活性分析

赵晓杰^{1,2}, 陈松林^{2,3*}, 王娜², 王贤丽², 邢士超²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

3. 上海海洋大学, 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

摘要:通过 RT-PCR 方法从大菱鲂肝组织克隆了胰岛素样生长因子-I(IGF-I)成熟肽片段, 分析表明, 此成熟肽由 70 个氨基酸残基组成, 含有 3 个链内二硫键。将扩增片段克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 上, 实现了 IGF-I 成熟肽和 GST 蛋白在 *Escherichia coli* BL21(DE3)plysS 中的融合表达。融合蛋白分子量约为 34 ku, 诱导 4 h 时占菌体总蛋白的 59%, 主要以包涵体形式存在。Western-blotting 免疫印迹表明, 融合蛋白可以特异性地被 anti-GST 抗体识别。包涵体经 6 mol/L 盐酸胍变性溶解及脉冲法稀释复性后, 通过 GSTrap FF 亲和预装柱纯化, 获得了电泳分析纯的融合蛋白。以细胞增殖实验检测蛋白生物活性, 结果显示, 纯化蛋白能促进大菱鲂肾脏细胞的增殖。

关键词:胰岛素样生长因子-I; cDNA 克隆; 重组表达; 包涵体; 融合蛋白

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

胰岛素样生长因子-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 是与胰岛素同源的单链多肽, 分子量约为 7.5 ku。除信号肽外, IGF-I 开放阅读框还可编码 B-C-A-D-E 5 个区域。其中成熟肽由 70 个氨基酸组成, 包括 B-C-A-D 4 区, 在进化上相当保守。

IGF-I 广泛存在于动物界, 目前已从多个物种中克隆了 IGF-I 基因, 包括哺乳类、鸟类^[1]、爬行类、两栖类和鱼类等。1989 年 Cao 等^[2]从银鲑 (*Oncorhynchus kisutch*) 首次检测出 4 种 IGF-I mRNA 转录产物 (Ea-4, Ea-3, Ea-2, Ea-1)。此后, 有关鱼类 IGF-I 基因及其表达产物生物学功能的研究广泛开展。现已从大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、罗非鱼、澳洲肺鱼 (*Neoceratodus forsteri*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*) 等不同的鱼中得到 IGF-I cDNA 序列。研究发现不同类群之间 IGF-I 氨基酸序列同源性很高, 在进化上相当

保守。鱼 IGF-I 与鸡、鼠、人有很高的相似性, 如大麻哈鱼和人 IGF-I 的 70 个氨基酸只有 14 个不同^[2], 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 区和 D 区, B 和 A 区的同源性较高, 在 90% 以上^[3]。

IGF-I 具有促进有丝分裂、抑制细胞凋亡、影响蛋白质的合成、保护神经系统等生物学功能。在哺乳动物中, IGF-I 是介导 GH 促生长效应的主要因子。例如, 给大鼠注射外源 IGF-I 能使鼠生长增快^[4], 且 IGF-I 与 GH 在长期促生长效应上具有协同作用^[5]。IGF-I 在哺乳动物生殖活动的调节中也具有重要作用, IGF-I 能提高睾丸间质细胞类固醇激素的合成^[6]; 促进卵巢颗粒细胞的复制并加速其分化, 协同促卵泡激素 (FSH) 诱导鼠卵泡颗粒细胞的芳香酶活性, 并能诱导黄体生成素受体和孕酮的合成^[7]。另外, IGF-I 是骨骼细胞分泌的重要生长因子, 它以自分泌、旁分泌的形式调节成骨细胞功能、参与骨重建^[8-9]。在鱼

收稿日期:2008-09-30 修回日期:2009-01-17

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A402);山东省泰山学者工程专项经费资助;上海市教育委员会 E-研究院建设项目(E03009)

通讯作者:陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

类,现已报道草鱼 IGF-I 重组蛋白具有促进草鱼吻端成纤维细胞 PSF 和草鱼卵巢细胞 CO 增殖的作用^[10]。另外,IGF-I 参与性类固醇激素的生成,能诱导罗非鱼卵母细胞的成熟和颗粒细胞的增殖与分化^[2]。此外,Kagawa 等^[11]还发现 IGF-I 能增强黑鲷卵巢芳香化酶活性和细胞色素 P450 芳香化酶基因表达,从而刺激卵泡 17 β -雌二醇的生成。IGF-I 也是鱼类适应海水环境,调节渗透功能的内分泌介质。

IGF-I 对调节机体生长繁殖作用重大,尤其对于鱼类等成熟之后仍然持续生长的物种来说,对其 IGF 的研究很有价值。但这类因子在动物体内只有微量表达,不便于对其生物活性进行研究,因此构建原核表达载体获取大量重组蛋白是研究其生理功能进而加以应用的有效途径。本研究通过克隆 IGF-I 成熟肽片段并构建重组载体实现了 IGF-I 的高效重组表达,并对其活性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) (体重约 750 g) 购自海阳养殖实验基地。实验用克隆载体 pMD18-T 购自宝生物(大连)公司;表达载体 pGEX-4T-1、克隆菌株 *E. coli* DH5 α 和表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)plysS 由本实验室保存。

RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶等试剂购自宝生物(大连)公司, anti-GST antibody 和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自天为时代公司,其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 大菱鲆肝脏总 RNA 提取

取 0.1 g 肝脏组织在液氮中充分研磨提取 RNA。方法参照 Trizol Regent (Invitrogen) 一步法说明书。电泳分析 RNA 质量,核酸蛋白测定仪测量 RNA 浓度。

1.3 逆转录 cDNA 第一链的合成

cDNA 合成采用 M-MLV 反转录酶 (Promega),按照 Chen 等^[12]所述方法进行。取 1~2 μ g 总 RNA,加 DEPC 处理的 ddH₂O 至 9.5 μ L,将此样品在 75 $^{\circ}$ C 变性 5 min,立即在冰浴中冷却 5 min,然后 9 000 r/min 离心 30 s。将反应液混合,室温放 10 min 后 42 $^{\circ}$ C 温育 60 min。再

在 85 $^{\circ}$ C 水浴中放置 10 min 以灭活逆转录酶。加入 180 μ L DEPC 处理的 ddH₂O,稀释至 200 μ L,混匀,9 000 r/min 离心 30 s,保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.4 IGF-I 成熟肽片段的同源克隆

根据已经报道的其他物种的 IGF-I 基因保守序列设计简并引物 dIGF-F (5'-GCGGGMCCDGA GAC S C T G T G -3') 和 dIGF-R (5'-TTCKGAYS GTTC CGNMGRGC B A G R C -3') 在肝脏 cDNA 中扩增 IGF-I 基因。PCR 反应条件按照以下进行:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 35 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用 DNA 凝胶回收试剂盒 (QIAGEN) 回收与预测大小相近的 PCR 产物,TA 克隆至 pMD-18T 载体并转化 *E. coli* DH5 α ,涂布含 100 μ g/mL Amp 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。菌落 PCR 筛选阳性克隆,送上海联合基因公司测序。

1.5 pGEX-IGF-I 重组载体的构建

根据同源扩增所得的大菱鲆 IGF-I 成熟肽序列设计一对特异性引物 GEX_I5 (5'-ATAGAATTCGGACCGGAGACCCTGTGC-3') 和 GEX_I3 (5'-ATACTCGAGAGAGCGAGCTGCCTTGCT-3'),扩增 IGF-I 成熟肽片段。分别在上下游引入 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点,便于重组载体构建。

将纯化的 IGF-I 成熟肽片段和表达质粒 pGEX-4T-1 用 *Eco* RI/*Xho* I 双酶切,16 $^{\circ}$ C 连接后转化 *E. coli* DH5 α ,用载体特异引物进行菌落 PCR 初步筛选阳性克隆,送上海联合基因公司测序。

1.6 融合蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

用测序正确的重组质粒 pGEX-IGF-I 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)plysS,挑取阳性单克隆接种于含 Amp (100 μ g/mL) 的 5 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日按 1:100 扩大培养,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 进行诱导。每隔 1 h 取样 1 mL 存于 -20 $^{\circ}$ C。收集的菌液 4 $^{\circ}$ C,8 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 200 μ L 无菌水重悬,加入等体积 2 \times SDS 上样 Buffer 煮沸 5 min,按照分子克隆常规方法进行 SDS-PAGE 不连续垂直电泳,检测时间对蛋白表达的影响。用 BandScan 分析融合蛋白含量。

1.7 Western-blotting 检测融合蛋白

SDS-PAGE 不连续电泳结束后,利用电转法

将蛋白转移至 PVDF 膜上并用 1% BSA 封闭。以 anti-GST 为一抗、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,依次与 PVDF 膜结合,最后用北京中杉金桥公司的 DAB 显色试剂盒进行显色。

1.8 融合蛋白的纯化

37 °C 大量培养阳性重组菌至 OD₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.6,用 IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导 4 h。8 000 r/min,4 °C 离心 10 min 收集菌体,用 1/10 体积 PBS(含有 1% Triton-X100,1 mmol/L PMSF)重悬,-80 °C/37 °C 反复冻融 3 次,冰浴超声破碎。4 °C,12 000 r/min 离心 30 min 收集包涵体,用包涵体洗涤液(1% Triton-X100,1% DOC,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,10 mmol/L EDTA)洗涤 3 次,得到初步纯化的包涵体。

上述洗涤的包涵体溶于包涵体裂解液(6 mol/L 盐酸胍,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.2 mmol/L EDTA,50 mmol/L DTT)4 °C 搅动过夜,离心取上清,采用脉冲法(pulse renaturation)^[13-14]进行稀释复性。每隔半小时将包涵体裂解液逐滴加入到复性缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、0.5 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl、10% 甘油、0.5 mol/L L-精氨酸、1 mol/L 还原型谷胱甘肽、0.2 mol/L 氧化型谷胱甘肽、1 mol/L 盐酸胍,pH 8.0)中,每次不超过 5 mL,4 °C 搅动混匀。复性 24 h 后 4 °C 高速离心收集上

清,用 GSTrap FF 亲和预装柱纯化目的蛋白。纯化方法按照产品说明书进行。洗脱后的蛋白装入透析袋于 4 °C 对超纯水充分透析。透析结束后冷冻干燥,蛋白样品保存于 -80 °C。

1.9 重组蛋白的生物活性分析

将分离纯化后的重组蛋白进行复溶,Bradford 法测浓度,过滤除菌并用 PBS 稀释。采用本实验室建立的大菱鲆肾脏细胞系进行重组蛋白的生物活性测定实验。采用常规方法在 50 mL 细胞培养瓶中培养和传代大菱鲆肾脏细胞,当细胞生长至 90% 长满时,用胰酶消化,收集细胞,用含 2.5% FBS 的 DMEM 培养液制成细胞悬液,然后接种于 48 孔细胞培养板,每孔接种约 1×10^4 个细胞,每组设 3 个平行,24 °C 培养 24 h 后更换培养基,然后添加不同浓度的纯化蛋白,使重组蛋白的终浓度分别为 0.25 和 2.5 μg/mL,继续培养 48 h 后进行细胞计数。设立空白对照和阴性对照。

2 结果

2.1 IGF-I 成熟肽片段的序列分析

以大菱鲆肝脏提取的总 RNA 作反转录模板,经 RT-PCR 获得 IGF-I 基因成熟肽片段。测序结果表明此片段大小为 210 bp,与设计相符(图 1)。

```

1      GGACCGGAGACCCTGTGCGGGGCGGAGCTGGTCGACACCGCTGCAGTTTGTGTGTGGAGAG
1      G P E T L C G A E L V D T L Q F V C G E
61     AGAGGCTTTTATTTTCAGTAAACCAACCGGCTATGGGCCCAACGCACGGCGGTCACCTGGC
21     R G F Y F S K P T G Y G P N A R R S R G
121    ATCGTGGACCGAGTGTCTTCCAGAGCTGCGAGCTGTGGCGCCTGGAGATGTACTGTGCCG
41     I V D E C C F Q S C E L W R L E M Y C A
181    CCTGCCAAGACTACCAAGCCAGCTCGCTCT
61     P A K T S K A A R S

```

图 1 大菱鲆胰岛素样生长因子-I cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and predicted amino acid sequence of mature IGF-I cDNA from turbot

此成熟肽序列经 Genbank BLAST,显示大菱鲆 IGF-I 成熟肽的氨基酸序列与牙鲆、金鲈、草鱼、鸡、人的相似性分别为 100%、98%、86%、79%、76%,说明 IGF-I 是高度保守的蛋白,这可能与 IGF 蛋白家族在生物体内不可替代的重要功能有关。如图 2 所示几个物种在 B、A 二区分别有 2、4 个半胱氨酸残基,预测它们分别由 1-4、2-6、3-5 配对,组成 3 个链内二硫键。

2.2 诱导时间对融合蛋白表达的影响

用 IPTG 诱导携带重组质粒的重组菌和携带空白载体的对照菌,每隔 1 h 收集 1 mL 样品进行 SDS-PAGE(图 3,图 4)。对照菌在大约 26 ku 处有一条特异蛋白带,这是 pGEX-4T-1 载体自身表达的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)蛋白;重组菌在大约 34 ku 处有增强表达的特异蛋白条带,这是 GST 和 IGF-I 形成的融合蛋白。

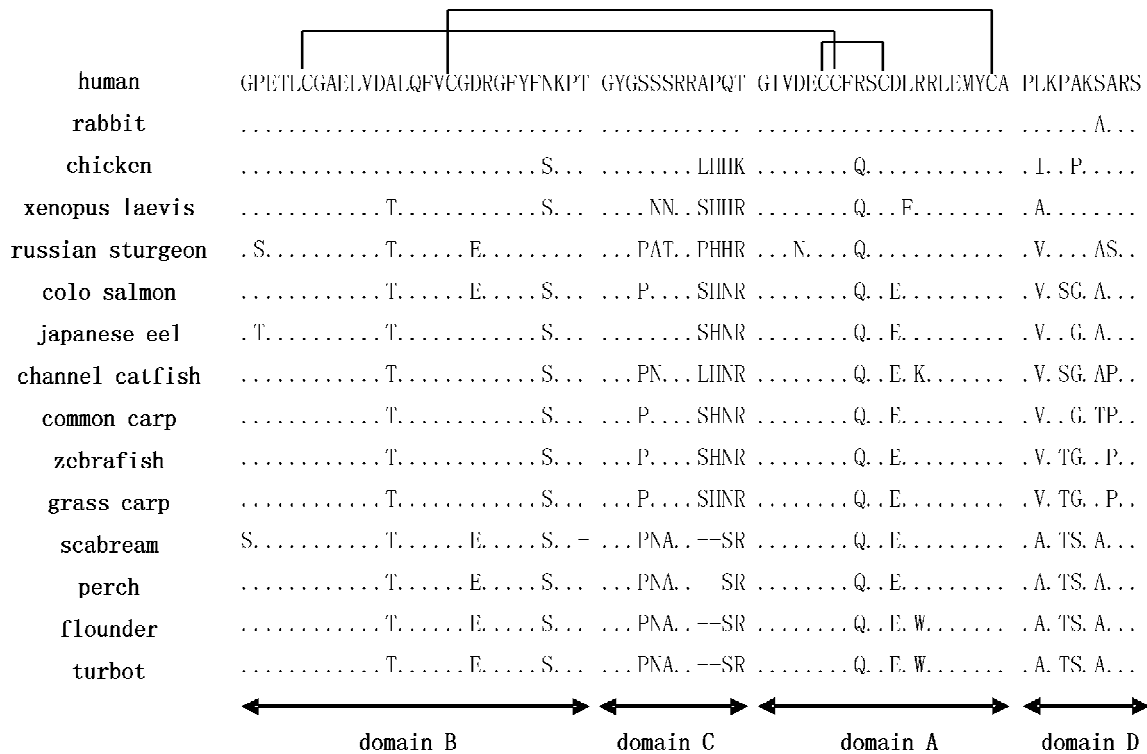


图2 大菱鲆与其他几个物种胰岛素样生长因子-I成熟肽的氨基酸序列比较

.表示该氨基酸与人IGF-I氨基酸一致;-表示该处氨基酸缺失;折线表示由6个半胱氨酸残基形成的3个二硫键

Fig.2 Amino acid alignment of turbot mature IGF-I with that of other species

residues conserved in all species are indicated with a dot; missing residues are indicated with -; The three disulfide bounds formed by the six cysteine residues are shown

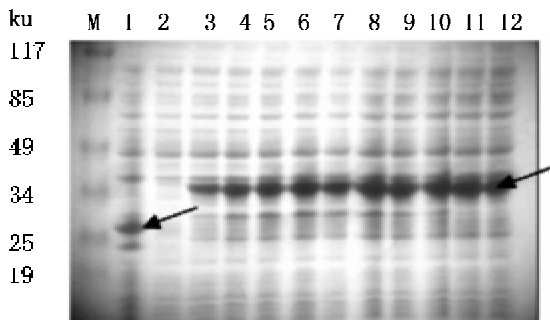


图3 SDS-PAGE 分析诱导时间对融合蛋白表达量的影响

M:预染蛋白分子量标准;1:诱导4h的对照菌(箭头所指为26ku的GST蛋白);2-12:分别诱导0、1、2、3、4、5、6、7、8、18、24h的重组菌(箭头所指为34ku的融合蛋白)

Fig.3 SDS-PAGE analysis of protein expression

M: prestained protein molecular weight markers; 1: 4 h post induction of control (the arrow indicates the location of GST); 2-12: expression of recombinant pGEX-IGF-1 at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 24 h post induction respectively (the arrow indicates the location of fusion protein GST-IGF-1)

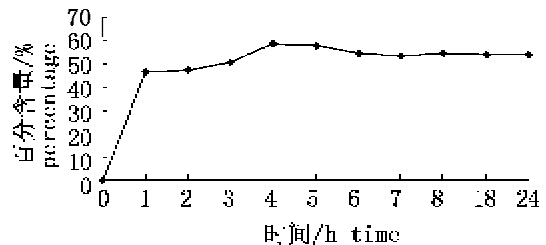


图4 不同诱导时间融合蛋白的含量

Fig.4 Percentage of fusion protein post induction

用 BandScan 分析各个时间点蛋白的表达情况,结果显示当诱导4h时融合蛋白表达量最大,占菌体总蛋白的59%。延长时间并不能增加目的蛋白的表达量,这可能与胞体内不断积累的外源蛋白包涵体对宿主菌产生毒性效应有关。

2.3 融合蛋白的 Western-blotting 验证

Western-blotting 免疫印迹表明,重组菌所表达的融合蛋白可以特异性地被 anti-GST 抗体识别,此蛋白具有 GST 抗原性(图5);此外,融合蛋

白特异条带比对照 GST 蛋白略大,与预染蛋白 Marker 相比大约为 34 ku,验证了此条带携带有 IGF-I 成熟肽片段。这证明 GST-IGF-I 融合蛋白在大肠杆菌中表达成功。

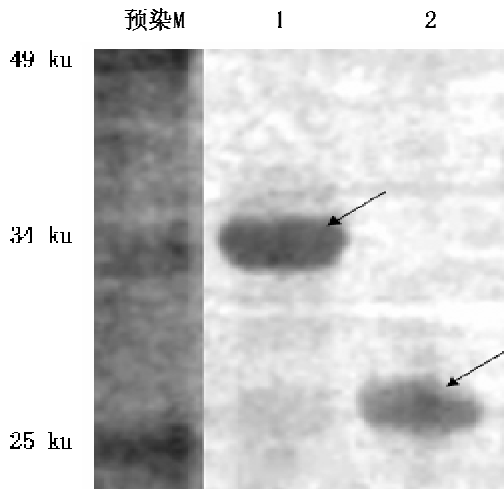


图5 重组蛋白 GST-IGF-I 的 Western-blotting 验证

1. 重组蛋白 GST-IGF-I; 2. 对照(GST)

Fig. 5 Western-blotting analysis of recombinant GST-IGF-I

M: prestained protein molecular weight markers; 1. recombinant GST-IGF-I; 2. control(GST)

2.4 融合蛋白的纯化

诱导 4 h 的重组菌经超声破碎,4 ℃、12 000 r/min 离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE,发现融合蛋白主要以包涵体形式存在;上清中有少量可溶性目的蛋白,但不足以分离纯化。包涵体经洗涤、溶解后,用脉冲法进行稀释复性。复性后的上清经 GSTrap FF 亲和和预装柱纯化,得到电泳分析纯的融合蛋白(图 6)。

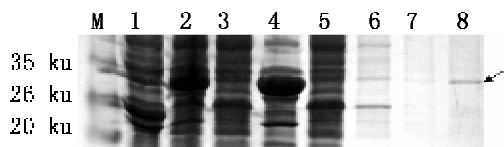


图6 SDS-PAGE 分析重组蛋白的溶解性及分离蛋白的纯度

M. 蛋白分子量标准; 1. 阴性对照; 2. 表达菌总蛋白; 3. 超声破碎离心后的上清; 4. 超声破碎离心后的沉淀; 5. 过亲和柱时的流穿液; 6. 过亲和柱时的洗涤液; 7. 第 1 管洗脱收集液; 8. 第 5 管洗脱收集液箭头所指为纯化的 GST-IGF-I

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the purified GST-IGF-I
M. protein molecular weight markers; 1. control; 2. total protein from recombinant bacteria; 3. supernatant after centrifugation step; 4. precipitation after centrifugation step; 5. flow-through from GSTrap column; 6. effluent after wash step; 7. the first pipe of eluant; 8. the fifth pipe of eluant. The arrow in lane 8 indicates the location of purified GST-IGF-I

2.5 重组蛋白 GST-IGF-I 的活性分析

大菱鲆肾脏细胞预培养 24 h 后换成含低浓度 FBS 的培养基,加入纯化的重组 IGF-I 蛋白,使其终浓度为 0.25 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分别测定其对细胞的促增殖作用。结果如图 7 所示,重组蛋白对大菱鲆肾脏细胞具有促增殖的作用,与不加蛋白的对照组比较差异显著($P < 0.01$),且 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化蛋白促增殖作用更明显。

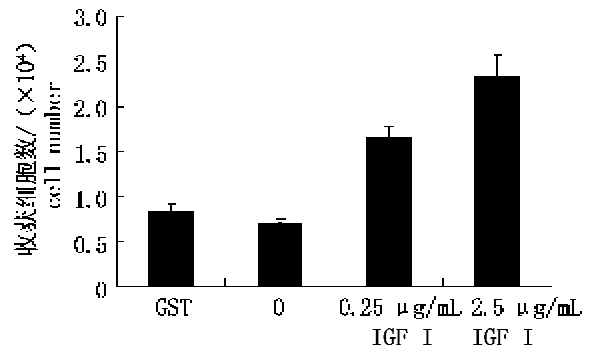


图7 重组 IGF 蛋白的生物活性分析

Fig. 7 Activity of recombinant IGF-I protein

3 讨论

考虑到 IGF-I 的信号肽(48 个氨基酸)可能会影响到重组 IGF-I 的生物学活性,本实验剔除信号肽序列,根据已经报道的草鱼、鲤、鸡、人等物种的 IGF-I 成熟肽序列设计简并引物,成功地克隆到大菱鲆 IGF-I 成熟肽片段。

实验选用带有 GST 标签的 pGEX-4T-1 原核表达载体,实现 IGF-I 成熟肽的高效重组表达。目的蛋白主要以包涵体形式存在于胞质内,可以避免宿主菌蛋白酶的降解作用。在菌体破碎过程中,酶解法和超声破碎法都能有效获得包涵体,但是酶解法所得包涵体含有较多杂蛋白,不利于包涵体的变性溶解和目的蛋白的纯化;超声破碎相比酶解法能获得较纯的目的蛋白,而且超声过程能释放少量目的蛋白到裂解上清中。在大量发酵时,可以考虑收集并纯化这部分释放的可溶性蛋白,以免去包涵体纯化中变性与复性的复杂工序。

IGF-I 成熟肽片段含有 6 个半胱氨酸,可以形成 3 个链内二硫键。但对于缺乏真核蛋白修饰体系的原核表达系统,二硫键的错配加大了蛋白发生错误折叠的可能性,容易形成包涵体。配对正确的二硫键是形成正确蛋白构象的前提,要想获

得具有生物活性的蛋白必须经过包涵体的变性和复性,打断错配的二硫键并重新配对。在包涵体洗涤过程中,笔者曾比较不同去污剂的效果,发现在洗涤液中添加1% Triton-X100和1% DOC时洗涤效果最好,且易于透析除去。鉴于尿素溶解能力较弱且在作用时间较长或温度较高时容易对重组蛋白的氨基进行共价修饰,本实验采用6 mol/L 盐酸胍溶解包涵体。在采用脉冲稀释法进行蛋白复性时,操作的关键是控制变性蛋白加入复性液的速率并迅速混合均匀以维持低的蛋白浓度而阻止其聚集^[14-15]。逐滴将变性液加入复性液可以减小变性蛋白的初始浓度;间隔1 h可以使蛋白分散均匀且能充分重折叠,阻止无规则蛋白聚集。此外,在复性液中加入L-精氨酸和1 mol/L 盐酸胍有助于增加复性中间产物的溶解度,有效抑制蛋白的聚集,使蛋白缓慢折叠形成正确构象。

IGF-I在促生长、代谢和骨发生与骨重建方面的功能较显著^[16],这种蛋白的高保守性预示它还可能具有其他重要的生物功能。大菱鲆作为一种重要海水经济鱼类,生长速度和产量是重要指标,所以对与此性状相关的促生长因子的研究很有必要。本研究首次实现了大菱鲆IGF-I成熟肽的重组表达和纯化,并通过细胞增殖试验证明重组IGF蛋白具有刺激大菱鲆肾脏细胞分裂和增值的活性,为深入研究鱼类IGF的功能及其在鱼类养殖业中的应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张建峰,侯加法,张皎,等. 鸡类胰岛素生长因子I的克隆、表达及其表达产物的生物学活性研究[J]. 中国农业科学,2005,38(10):2129-2133.
- [2] Cao Q P, Duguay S J, Plisetskaya E, et al. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA[J]. Molecular Endocrinology, 1989, 3(12): 2005-2010.
- [3] 白俊杰,叶星,李英华,等. 草鱼胰岛素样生长因子-I基因克隆及序列分析[J]. 水产学报,2001,25(1):1-4.
- [4] Russell S M, Spencer E M. Local injections of human or rat growth hormone of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats [J]. J Endocrinol,1985,116(6):2563-2567.
- [5] Skottner A, Clark R G, Robinson I C, et al. Recombinant human IGF-I: testing the somatomedin hypothesis in hypophysectomized rats [J]. J Endocrinol,1987,112(1):123-132.
- [6] Lin T, Haskell J, Vinson N, et al. Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture; a comparative study[J]. Endocrinology,1986,119(4):1641-1647.
- [7] Adashi E Y, Resnick C E, D'Ercole A J, et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function [J]. Endocrinol Rev,1985,6(3):400-420.
- [8] 程志安,萧劲夫. 胰岛素样生长因子与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志,2001,7(1):85-87.
- [9] Delany A M, Pash J M, Canalis E. Cellular and clinical perspectives on skeletal insulin-like growth factor- I [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1994,55(3):328-333.
- [10] 叶星,白俊杰,简清,等. 草鱼胰岛素样生长因子-I基因在大肠杆菌中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2001,17(6):725-728.
- [11] Kagawa H, Gen K, Okuzawa K, et al. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major* [J]. Biol Reprod,2003,68(5):1562-1568.
- [12] Chen S, Hong Y, Scherer S J, et al. Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. Gene,2001,264(2):197-203.
- [13] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology,1998,9(5):497-501.
- [14] 靳挺,关怡新,费峥峥,等. 重组人 γ -干扰素包涵体稀释复性[J]. 化工学报,2004,55(5):770-774.
- [15] Clark E D. Protein refolding for industrial process [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001,12(2):202-207.
- [16] Rosen C J, Donahue L R. Insulin-like growth factors and bone; the osteoporosis connection revisited[J]. Proc Soc Exp Biol Med,1998,219(1):1-7.

Cloning, recombinant expression and purification of turbot (*Scophthalmus maximus*) mature IGF-I

ZHAO Xiao-jie^{1,2}, CHEN Song-lin^{2,3*}, WANG Na², WANG Xian-li², XING Shi-chao²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. The E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is a conserved peptide expressed ubiquitously, which shows highly homologous diverse effects on development, growth, and metabolism. With RT-PCR, the fragment encoding the turbot (*Scophthalmus maximus*) mature IGF-I peptide was amplified. It was predicted that the mature peptide was composed of 70 amino acids including 6 cysteines which may form 3 disulfide bonds. The target fragment was then successfully subcloned into the express vector pGEX-4T-1 and was highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) plysS. The result of SDS-PAGE showed that the fusion protein expressed in the form of inclusion bodies with molecular weight of 34 ku and maximally amounted to 59 % of the whole protein in the *E. coli* cell 4 hours after being induced with IPTG. The western blotting indicated that recombinant protein had the antigenicity to anti-GST antibody. The inclusion bodies were dissolved in 6 mol/L guanidine chloride followed by pulse renaturation in refolding buffer containing 0.5 mol/L L-Arginine, 1.0 mol/L GSH and 0.2 mol/L GSSG. Then the renatured recombinant protein was purified by GSTrap FF affinity chromatography. The effect of purified GST-IGF-I on turbot kidney cells was analysed, and it indicated that the recombinant GST-IGF-I can stimulate the proliferation of the cells.

Key words: insulin-like growth factor-I; cDNA cloning; recombinant expression; inclusion body; recombinant protein

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn