

七带石斑鱼类胰岛素生长因子-I 成熟肽的 克隆及原核表达与活性分析

陈圣毅^{1,2}, 刘新富^{1,3}, 徐永江^{1,3}, 刘芝亮^{1,2},
柳学周^{1,3*}, 史宝^{1,3}, 王妍妍^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室,山东 青岛 266071)

摘要:应用 RT-PCR 方法扩增七带石斑鱼类胰岛素生长因子-I(esIGF-I)成熟肽序列。该成熟肽序列由 210 个碱基组成,编码 70 个氨基酸,包括 B-C-A-D 4 个结构域。将此成熟肽片段导入原核表达载体 pET-28a 上,在 IPTG 诱导下成功在 *E. coli* BL21(DE3) 中融合表达。SDS-PAGE 分析表明,融合蛋白大小为 11 ku,在 IPTG 诱导后 3 h 表达量最高,占菌体总蛋白的 51.8%,重组蛋白主要以包涵体形式存在。对重组蛋白进行变性、纯化和复性,获得了纯化的重组蛋白。Western-blotting 免疫印迹分析表明,融合蛋白可特异性地被 6×His 抗体识别。细胞增殖实验表明,纯化的 IGF-I 融合蛋白能促使人乳腺癌细胞 MDA231 细胞增殖,表明具有生物活性。

关键词:七带石斑鱼;类胰岛素生长因子-I;成熟肽克隆;原核表达;生物活性分析

中图分类号:Q 785; S 965

文献标志码:A

类胰岛素生长因子I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)是胰岛素生长因子家族中的一员,广泛存在于脊椎动物体内。生长激素/类胰岛素生长因子轴(GH/IGFs)是鱼类生长和生殖的重要内分泌调控系统^[1-2],而 IGF-I 是 GH/IGFs 轴的关键因子^[3-4]。鱼类的 IGF-I 是由 70 个氨基酸残基组成的碱性单链多肽,其中肝脏是其主要合成和表达的场^[5]。IGF-I 的前肽是由信号肽和 B、C、A、D、E 5 个结构域组成。成熟肽蛋白只保留 B、C、A、D 4 个结构域,切除了信号肽和 E 区。IGF-I 在鱼类生长和生殖生理调控中起着重要的作用,其不仅具有调节细胞代谢、促进细胞生长、分化和分裂、抑制细胞死亡和调节渗透压等多种生理功能^[6-7],还是生长激素功能的主要介导因子,能促进蛋白质的合成和抑制蛋白质的降解^[8]。目前,已从多种鱼类中成功克隆了 IGF-I 基因,如 鲑 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、虹 鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲤

(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、金鱼 (*Carassius auratus*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 和 斑马鱼 (*Danio rerio*) 等,研究发现 IGF-I 在鱼类中具有高度的同源性,在进化上是高度保守的^[9-10]。

七带石斑鱼 (*Epinephelus septemfasciatus*) 属 鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属 (*Epinephelus*),主要分布于韩国、日本沿海和中国的黄海、东海沿岸,为石斑鱼属中唯一在黄海分布的品种^[11],因其能够耐受 7~8℃ 的水温,有“冷水石斑”之称。七带石斑鱼低温耐受性强、肉质鲜嫩、营养和经济价值高,是一种理想的人工增养殖开发品种。近年来,我国七带石斑鱼的人工繁育技术研究刚刚开始,目前已能小批量生产苗种^[12-13],但相关研究尚不深入。为了进一步探究七带石斑鱼生殖和生长的分子机制并为将来的养殖生长调控提供参考,有必要开展对七带石斑鱼 GH/IGFs 生长

收稿日期:2013-04-20 修回日期:2013-05-24

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A413);鲜鲷类现代产业技术体系(CARS-50);中央级公益性事业单位基本科研业务费项目(20603022012022 号);山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ025);青岛市科技计划项目(11-1-1-11-hy)

通信作者:柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

因子轴调控机制的研究。本研究克隆了七带石斑鱼 IGF-I 成熟肽序列,并对其进行了体外重组表达和活性分析,旨在为七带石斑鱼 IGF-I 生物学功能和生长因子轴的调控机制研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

七带石斑鱼于 2012 年 8 月取自莱州明波水产有限公司。取 1 龄人工养殖的实验鱼 5 尾,平均体质量为 150.3 g (132.8 ~ 168.5 g),平均体长为 18.32 cm (17.82 ~ 20.30 cm)。实验鱼活体打包充氧运回实验室后,以 MS222 (200 mg/L) 麻醉后解剖,取其肝脏组织快速投入液氮 (-196 °C) 中,后转入 -80 °C 冰箱保存。

1.2 RNA 提取和 cDNA 的合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa) 从肝脏中提取总 RNA。利用超微量紫外检测仪 (Nanodrop 2000D) 检测总 RNA 的纯度和浓度,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。

以肝脏中总的 RNA 为模板,根据 PrimeScript[®] RT-PCR Kit 反转录试剂盒 (TaKaRa) 中的操作说明合成 cDNA。然后保存在 -20 °C 冰箱中。

1.3 成熟肽片段扩增

根据 NCBI 上已报道的其它鲈形目鱼类的 IGF-I 序列,设计了七带石斑鱼 IGF-I 特异性引物:上游引物序列为 5'-ATAGGATCCATGGGC-CCAGAGACCCTGTG-3';下游引物序列为:5'-ATAAAGCTTT TAA GAGCGAGCAGCCTTGC-3',并分别在上下游引物中插入了 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(以下划线标识),另外在下游引物中加入强终止密码子 TAA(方框标识)。

以肝脏 cDNA 为模板,用 IGF-I 特异性引物扩增 esIGF-I 成熟肽序列,PCR 条件:94 °C 5 min,94 °C 50 s,57.5 °C 30 s,72 °C 50 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳检测、切胶回收、纯化后连接到 pEASY-T1 载体(北京全式金生物技术有限公司)上并转移至 Trans1-T1 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)中,37 °C 条件下振荡培养 12 ~ 14 h,筛选阳性克隆菌株送至华大基因公司测序。将测序结果在 NCBI 上分析比对。

1.4 pET-28a-IGF-I 重组质粒的构建

取阳性克隆菌株于 LB 液体培养基中扩大培

养,利用 AxyPrep 质粒 DNA 小量提取试剂盒 (ZYMO RESEARCH 公司) 提取 pEASY-T1-IGF-I 和 pET-28a 质粒。

将原核表达载体 pET-28a 和 pEASY-T1-IGF-I 质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,用 1% 的琼脂糖电泳检测,切胶回收产物。将回收的 IGF-I 片段与原核表达载体 pET-28a (TaKaRa) 用 T₄ DNA 连接酶在 25 °C 下连接 3 h,然后转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa) 中,过夜培养后挑选阳性克隆菌株进行测序,以确定目的片段是否正确插入。

1.5 esIGF-I 成熟肽蛋白的诱导表达

将获得的 pET-28a-IGF-I 重组质粒转化到表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) (TaKaRa) 中,挑选阳性克隆菌株接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中振荡过夜培养,待 OD 值至 0.4 ~ 0.6 时,取 1 mL 菌液样品保存于 -30 °C 冰箱中。在剩余的培养基中加入 IPTG (异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷) 至终浓度为 1 mmol/L,在 37 °C 下振荡培养,分别在诱导后 0、1、2、3、4 h 时各取 1 mL 的菌液样品。将取得的菌液样品在 4 °C,10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,再加入 200 μ L 的 PBS 缓冲液重悬,然后分别取 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染液染色 2 h 后进行脱色、拍照,用 BandScan 软件分析融合蛋白的表达率。

收集诱导表达后的菌液,离心,收集菌体沉淀,用 PBS 缓冲液重悬,进行超声波破碎。分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。确定目的蛋白是否以包涵体的形式表达。

1.6 诱导温度对 esIGF-I 成熟肽蛋白的影响

分别在 20、28 和 37 °C 下振荡培养经 IPTG 诱导的阳性重组菌株 3 h。然后按“1.5”的操作方法进行 SDS-PAGE 电泳,比较不同温度下 IGF-I 成熟肽重组蛋白的表达率。

1.7 esIGF-I 成熟肽蛋白表达产物的纯化与复性

将“1.6”部分收集的蛋白用包涵体洗涤缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.5 mol/L NaCl,2 mol/L Urea,2% Triton) 洗涤 3 次。然后用包涵体裂解液 (6 mol/L guanidine HCl pH 7.0,0.4 mol/L NaH₂PO₄,0.4 mol/L Na₂HPO₄,0.5 mol/L NaCl) 重悬包涵体,4 °C 条件下振荡过夜、变性。将变性后的包涵体 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清。用 Ni²⁺ 亲和层析柱和 UVD-680-1 紫外检测仪分离纯化的蛋白。将纯化好的蛋白分别经 8 mol/L 尿素梯度

复性液I(50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10% Glycerol, 1% Glycine, 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mol/L NaH₂PO₄ pH 7.4, 0.2 mol/L Na₂HPO₄ pH 7.4)、4 mol/L 尿素梯度复性液II(50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10% Glycerol, 4 mol/L Urea, 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mol/L NaH₂PO₄ pH 7.4, 0.2 mol/L Na₂HPO₄ pH 7.4)和 2 mol/L 尿素梯度复性液III(50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L Urea, 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mol/L NaH₂PO₄ pH 7.4, 0.2 mol/L Na₂HPO₄ pH 7.4)中透析 6~8 h, 再在 PBS 中透析过夜。最后用 3 ku 超滤管(Millipore)进行超滤浓缩, 获得纯化蛋白。

1.8 esIGF- I 融合蛋白的 Western-blotting 分析

纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 利用半干电转印法将凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭。将 PVDF 膜在含有一抗为 anti-6 × His (TaKaRa) (1:500) 的封闭液中温育 1 h, 洗涤后在含二抗经 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:500) 封闭液中温育 1 h, 然后用 HRP-DAB 显色 (Tiangen 公司)。分析实验组和对照组的条带, 以确定目的蛋白是否具有抗原活性。

1.9 esIGF- I 融合蛋白的生物活性分析

用 MTT 法检测 IGF-I 重组蛋白的生物活性。用 Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒 (Thermo Scientific) 测定获得的重组蛋白浓度, 然后用 0.22

μm 滤膜过滤除菌待用。将生长良好的人乳腺癌细胞 MDA231 以 1 × 10⁵/mL 密度接种于 96 孔板 (每孔 200 μL), 培养 24 h 后, 加入含不同浓度重组蛋白的无血清培养基, 使重组蛋白的终浓度分别为 0.27、0.53 和 2.65 μg/mL, 每组设置 3 个重复, 并设空白对照, 继续培养 48 h 后, 弃上清, 每孔加入 90 μL 新鲜培养液, 再加入 20 μL MTT (Sigma) 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔再加入 100 μL DMSO, 低速振荡。酶标检测仪 570 nm 波长处读取各样品的光密度值。每个浓度组设置 3 个重复。细胞增殖率 (GSR) 计算方法为: $GSR (\% \text{ control}) = A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100$, A_{sample} 为加入重组蛋白组, A_{control} 为未加重重组蛋白组。

结果表示为 mean ± SD (平均值 ± 标准差), 利用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 设定差异显著水平 P 为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著, 当 $P < 0.01$ 时为差异极显著。

2 结果

2.1 esIGF- I 成熟肽 cDNA 的序列分析

七带石斑鱼 IGF- I 成熟肽片段大小为 210 bp, 编码 70 个氨基酸。其中 A 区编码 21 个氨基酸, B 区编码 29 个氨基酸, C 区编码 10 个氨基酸, D 区编码 10 个氨基酸 (图 1)。Blast 分析表明

```

1  CATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATG
   6×His tag

61  ACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGGCCAGAGACCCCTGTGCGGGCGGAG
   BamHI           G P E T L C G A E
   [-----]

121 CTGGTCGACACGCTGCGAGTTTGTGTGGAGAGAGAGGCTTTTATTTCAGTAAACCAACA
   L V D T L Q F V C G E R G F Y F S K P T
   [-----B domain-----]

181 GGCTATGGCCCAATGCACGGCGGTACCGTGGCAITGTGGACGAATGCTGCTTCCAAAGC
   G Y G P N A R R S R G I V D E C C F Q S
   [-----C domain-----]

241 TGTGAGCTGCGGCGCCTGGAGATGTAAGTGTGACCTGTCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGC
   C E L R R L E M Y C A P V K T S K A A R
   [-----A domain-----] [-----D domain-----]

301 TCTTAAAAGCTT
   S * Hind III
   --]

```

图 1 七带石斑鱼 IGF- I 成熟肽 cDNA 序列与推测的氨基酸序列

方框注部分为启动密码子(ATG); *表示终止密码子(TAA)。

Fig. 1 The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of matured peptide of IGF- I from *E. septemfasciatus*

The initiation codon(ATG)is box labeled part and asterisk indicates the stop codon(TAA).

七带石斑鱼 IGF-I 成熟肽的氨基酸序列与斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*)、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 和鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的相似性分别为 99%、98%、97%、99% 和 85%, 表明 esIGF-1 成熟肽高度保守。

2.2 esIGF- I 基因原核表达载体的构建

将获得的 pET-28a- IGF- I 重组质粒转到 *E. coli* DH5 α 中培养后, 挑选阳性克隆菌株再次测序。结果表明在载体中插入的目的基因片段完全正确(图 1), 该重组质粒将表达约 11 ku 的融合蛋白, 由 104 个氨基酸组成, 其中包括 IGF- I 成熟肽和 N 端的 6 \times His 标签, 其等电点为 8.31。

2.3 诱导时间对重组蛋白的影响

将重组质粒 pET-28a- IGF- I 转化入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 用 IPTG (1 mmol/L) 进行诱导表达。SDS-PAGE 检测表明, 重组质粒在 11 ku 处有增强表达的特异条带, 即融合的目的蛋白(图 2)。质粒 pET-28a 的分子量约为 40 ku。BandScan 分析表明, 在 IPTG 诱导后 3 h 时重组蛋白表达量最大, 占菌体总蛋白的 51.8%, 而在诱导后的 1、2 和 4 h 的表达量分别为 23.6%、30.5% 和 41.5%。

2.4 IGF- I 重组蛋白的存在形式

将诱导后的菌液用超声波破碎后收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明 esIGF- I 成熟肽的重组蛋白主要是以包涵体的形式存在(图 2 中的 8 和 9)。

2.5 诱导温度对重组蛋白的影响

不同温度对 esIGF- I 重组蛋白的影响分析表明: 在 37 $^{\circ}$ C 条件下 esIGF- I 重组蛋白的表达量最大, 占菌体蛋白总量的 51.8% (图 3)。

2.6 重组蛋白的纯化

将诱导 3 h 的重组 pET-28a- IGF- I 菌株用超声波破碎后取上清, 然后用变性液变性处理, 用 Ni²⁺ 亲和层析柱分离纯化的蛋白, 再经过尿素梯度复性液复性后, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果有一单一条带, 相对分子质量约为 11 ku (图 2 中的 7), 与预期大小相符合。

2.7 重组蛋白的 Western-blotting 分析

将未诱导表达的重组蛋白和诱导表达 3 h 的重组蛋白进行 Western-blotting 反应, 结果如图 4 所示: 诱导表达 3 h 的重组蛋白组在 PVDF 膜上

可见单一印迹, 而作为阴性对照组则无此条带, 表明重组菌株表达了具有抗原活性的目的蛋白, 且能被 6 \times His 抗体识别。

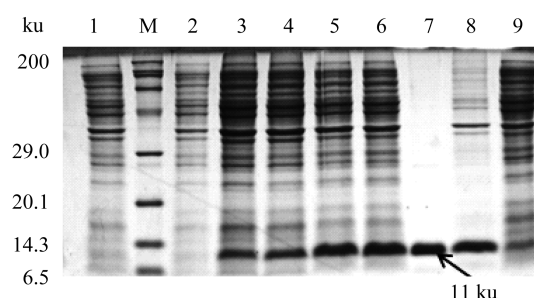


图 2 SDS-PAGE 分析诱导时间对蛋白表达量的影响

M. 蛋白分子量标准; 1. 质粒 pET-28a; 2~6. 诱导 0、1、2、3、4 h 的菌液; 7. 纯化后的蛋白; 8. 超声波破碎离心后的沉淀; 9. 超声波破碎离心后的上清。

Fig. 2 Effects of induction duration on production of recombinant IGF-I protein based on SDS-PAGE analysis

M. marker; 1. pET-28aplasmid; 2-6. expression of recombinant IGF- I protein post 0, 1, 2, 3, 4 h of IPTG induction; 7. purified recombinant IGF- I protein; 8. SDS-PAGE of precipitation after ultrasonic treatment; 9. SDS-PAGE of supernatant after ultrasonic treatment.

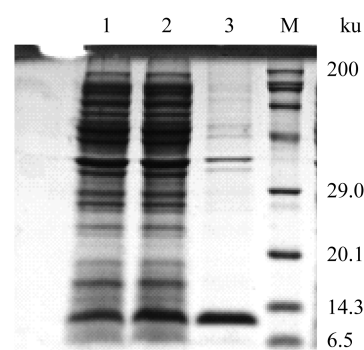


图 3 SDS-PAGE 分析诱导温度对蛋白表达量的影响

M. 蛋白分子量标准; 1. 20 $^{\circ}$ C 下诱导的重组菌; 2. 28 $^{\circ}$ C 下诱导的重组菌; 3. 37 $^{\circ}$ C 下诱导的重组菌。

Fig. 3 Effects of temperature on production of recombinant IGF-I protein based on SDS-PAGE analysis

M. marker; 1-3. expression of recombinant IGF- I protein at 20, 28 and 37 $^{\circ}$ C respectively.

2.8 重组蛋白的生物活性分析

用 MTT 法来检测不同浓度的重组蛋白对人乳腺癌细胞增殖率的影响表明, 与对照组相比, 0.27、0.53 μ g/mL 浓度的 esIGF-I 重组蛋白均能显著的促进人乳腺癌细胞 MDA231 增殖 ($P < 0.01$) (图 5), 证明复性后的重组蛋白具有生物活性。

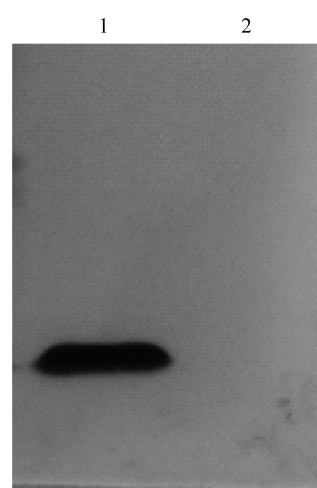


图4 诱导表达3 h的重组IGF-I蛋白的Western-blotting分析

1. 诱导表达3 h的重组蛋白; 2. 未诱导表达的重组蛋白组(阴性对照组)。

Fig. 4 Western-blotting analysis of recombinant IGF-I protein post 3 h induction of IPTG

1. recombinant IGF-I protein post 3 h induction; 2. negative control.

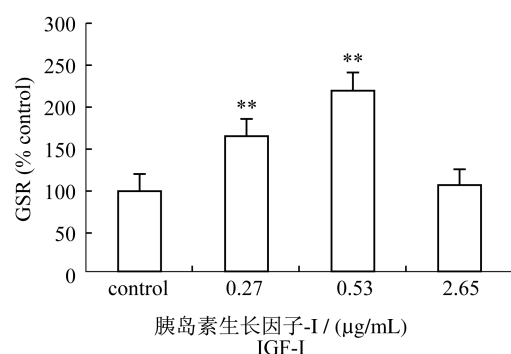


图5 不同浓度的重组IGF-I蛋白对人乳腺癌细胞增殖的影响

Fig. 5 Effects of recombinant IGF-I protein on human breast cancer proliferation

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 方法克隆获得了七带石斑鱼的 IGF-I 成熟肽序列,揭示了其序列具有高度的保守性,为开展 IGF-I 基因体外重组表达提供了基础。同时,利用原核表达系统,本研究成功表达了七带石斑鱼 IGF-I 成熟肽,并获得了具有细胞增殖生物活性的体外重组 IGF-I 蛋白。

鱼类的 IGF-I 信号肽不能被大肠杆菌很好地识别,严重影响了融合蛋白的表达量。因此,本研究在密码子设计时去掉了 IGF-I 信号肽序列,并加入强终

止密码子 TAA,避免通读和产生超长蛋白,而且所表达的蛋白分子量较小,无需糖基化等修饰^[12],较适合在大肠杆菌中表达。载体 PET-28a 两端带有 His-tag 标签,当与 IGF-I 融合表达后,不仅有利于检测和纯化表达情况,而且可避免重组蛋白被菌体所产生的蛋白酶降解。本研究构建的 pET28a-IGF-I 重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达的重组蛋白占细菌总蛋白的 51.8%,高于已报道的其他鱼类 IGF-I 重组蛋白的表达量^[14-15],表明了 PET-28a 是七带石斑鱼 IGF-I 原核表达的理想载体。

实验中获得的重组蛋白以包涵体的形式存在。为了最大程度地提取包涵体中的目的蛋白并纯化,需要对菌体进行破碎。超声波破碎法和酶解法都能有效地获得目的蛋白,但是酶解法所获取的蛋白杂质较多,不利于目的蛋白的变性溶解和纯化。本研究采用细胞裂解液洗涤法和超声波破碎法相结合,不仅能使细胞裂解得更充分,获得更多的重组蛋白,而且利于蛋白的纯化。原核表达系统由于缺乏真核蛋白修饰体系,二硫键容易发生错配,使得产生的蛋白形成错误的包涵体而丧失生物活性。因此,获得的重组蛋白需经过溶解、变性、复性才能恢复其生物学活性。尿素和盐酸胍都能使蛋白质变性,但尿素使包涵体在溶解后含的杂质较多^[16],且所需时间较长。因此本研究采用 6 mol/L 的盐酸胍使蛋白变性,然后再通过尿素梯度复性液进行复性,通过 MTT 法检测表明重组 IGF-I 蛋白具有促进细胞增殖的生物活性,表明本研究采用的蛋白复性方法是可靠的。

IGF-I 作为一种体内代谢过程中极为重要的细胞因子,在鱼类生长和生殖调控中具有重要的生理作用。如张为民等^[17]成功地在大肠杆菌中表达了虹鳟 IGF-I 和 IGF-II 的融合蛋白,并通过细胞增殖实验表明虹鳟 IGF-I 融合多肽对 BALB/NIH3T3 的促进作用要比 IGF-I 融合多肽高;Duva 等^[18]表达了大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) IGF-I 和 IGF-II,并将重组蛋白注入鱼体后,能特异地抑制 GH 的释放;叶星等^[19]在大肠杆菌中表达了草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) IGF-I,表达量占菌体总蛋白的 20.03%,用 MTT 法测定重组 IGF-I 对草鱼吻端成纤维细胞 PSF 和草鱼卵巢细胞具有明显的促增殖作用。Degger 等^[20]报道,尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 注射外源 IGF-I 后,其侧腹肌肉组织对葡萄糖的吸收以及肝脏对亮氨酸的吸收明显加快。

Cestillo 等^[21]研究发现,IGF-I能刺激体外虹鳟肌细胞的分化,表明其可促进鱼类肌肉生长和代谢;Cao 等^[10]研究表明,IGF-I能够诱导罗非鱼卵母细胞的成熟和颗粒细胞的增殖与分化。七带石斑鱼为我国近年来新开发的重要海水养殖经济品种,对其生殖和生长调控机制的认识可为实现其苗种规模化繁育及养殖业的发展提供重要理论支撑。本研究首次运用基因工程技术实现了七带石斑鱼 IGF-I成熟肽蛋白在体外的重组表达和纯化,并通过细胞增殖实验证明了纯化后的 IGF-I蛋白具有生物活性,为深入研究七带石斑鱼 IGF-I的生物学功能以及新型促生长剂的研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gray E S, Kelley K M. Growth regulation in the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*; roles of growth hormone, hepatic growth hormone receptors and insulin-like growth factor- I [J]. *Journal of Endocrinol*, 1991, 131(1) : 57 - 66.
- [2] Uchida K, Kajimura S, Riley L G, *et al.* Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2003, 134(2) : 429 - 439.
- [3] Duan C. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish [J]. *American Zoologist*, 1997, 37(6) : 491 - 503.
- [4] Moriyama S, Ayson F G, Kawauchi H. Growth regulation by insulin-like growth factor- I in fish [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2000, 64(8) : 1553 - 1562.
- [5] Reinecke M, Schmid A, Ermatinger R, *et al.* Insulin-like growth factor- I gene in the teleost *Oreochromis mossambicus* tilapia; gene sequence, tissue expression and cellular localization [J]. *Endocrinology*, 1997, 138, 3613 - 3619.
- [6] Jones J I, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins; biological actions [J]. *Endocrine Reviews*, 1995, 16(1) : 3 - 34.
- [7] Upton Z, Yandell C A, Degger B G, *et al.* Evolution of insulin- like growth factor- I (IGF- I) action; *in vitro* characterization of vertebrate IG-I proteins [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 121(1) : 35 - 41.
- [8] 刘红云,童富淡. 鱼类 IGF- I 生理功能及其表达调控的研究进展 [J]. *水产科学*, 2004, 23(5) : 37 - 40.
- [9] Froesch E R, Schmid C, Schwander J, *et al.* Action of insulin-like growth factors [J]. *Annual Review Physiology*, 1985, 47 : 443 - 467.
- [10] 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.
- [11] 成庆泰,杨文华. 鱼类学论文集(第一辑) [C]. 北京:科学出版社,1981:1 - 8.
- [12] 柳学周,庄志猛,马爱军,等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究 [J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(2) : 17 - 24.
- [13] 陈超,赵明,柳学周,等. 七带石斑鱼胚胎及仔稚鱼形态学观察 [J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(5) : 24 - 31.
- [14] 华益民,林浩然. 草鱼 IGF- I cDNA 的克隆和在原核生物中的表达 [J]. *动物学报*, 2001, 47(3) : 274 - 279.
- [15] 赵晓杰,陈松林,王娜,等. 大菱鲆类胰岛素样生长因子- I 成熟肽的克隆、重组表达及活性分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34(1) : 1 - 7.
- [16] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(4) : 482 - 485.
- [17] 张为民,张利红. 虹鳟胰岛素样生长因子 I 和 II 在大肠杆菌中的融合表达及促有丝分裂活性 [J]. *动物学报*, 2003, 49(2) : 266 - 271.
- [18] Duval H, Rousseau K, Le Bail P Y, *et al.* Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF- I and IGF- II [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 126(3) : 2 - 27.
- [19] 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.
- [20] Degger B, Upton Z, Soole K, *et al.* Comparison of recombinant barramundi and human insulin-like growth factor (IGF- I) in juvenile barramundi (*Lates calcarifer*); *in vivo* meta-bolic effects, association with circulating IGF-binding proteins, and tissue localisation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 117(3) : 395 - 403.
- [21] Cesfillo J, Codina M, Matyinez M L, *et al.* Metabolic and mitogenic effects of IGF- I and insulin on muscle cells of rainbow trout [J]. *American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2004, 286(5) : 935 - 941.

Prokaryotic expression and activity analysis of insulin-like growth factor- I from *Epinephelus septemfasciatus*

CHEN Shengyi^{1,2}, LIU Xinfu^{1,3}, XU Yongjiang^{1,3}, LIU Zhiliang^{1,2},
LIU Xuezhou^{1,3*}, SHI Bao^{1,3}, WANG Yanyan^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to study the underlying molecular mechanisms for growth of *Epinephelus septemfasciatus*, the insulin-like growth factor I (IGF- I) mature peptide sequence was amplified from *E. septemfasciatus* liver with RT-PCR method. It was predicted that the mature peptide was composed of 210 base pairs, which encodes 70 amino acid residues and consists of B-C-A-D four functional domains. The matured peptide fragment was subcloned into the expression vector pET-28a and was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cell. The result of SDS-PAGE analysis indicated that the fusion protein expressed in the form of inclusion bodies with molecular weight of 11 ku and maximally amounted to 51.8% of the whole protein in the *E. coli* cell 3 hours after being induced with IPTG. The purified recombinant protein was obtained through denaturation, purification and refolding. The Western-blotting indicated that the recombinant protein had specifically been recognized by 6 × His antibody. The proliferation experiment showed that the purified IGF- I fusion protein could significantly promote the proliferation of breast cancer cells MDA231, and this indicated that it has biological activity.

Key words: *Epinephelus septemfasciatus*; insulin-like growth factor- I; mature peptide cloning; prokaryotic expression; biological activity analysis

Corresponding author: LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn