

哲罗鲑胰岛素样生长因子-I的原核表达及活性鉴定

王晓玉^{1,2}, 徐黎明¹, 刘 淼¹, 赵景壮¹,
卢彤岩¹, 曹永生¹, 尹家胜^{1*}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为进一步了解哲罗鲑IGF-I, 实验采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法, 从哲罗鲑肝脏的总RNA中扩增出胰岛素样生长因子-I(IGF-I)的cDNA开放阅读框(open reading frame, ORF)序列。利用原核表达载体pS构建重组表达质粒(IGF-I/pS), 并将其转化到宿主大肠杆菌Rosetta后经IPTG诱导获得重组哲罗鲑IGF-I蛋白。经SDS-PAGE电泳检测, 在35~50 ku有条带与预期相符, 且重组蛋白以包涵体的形式存在。包涵体经变性/复性实验后, 获得纯化的IGF-I融合蛋白。ELISA鉴定结果显示, 目的蛋白能特异性识别抗鱼类IGF-I抗体, 表明获得了具有免疫活性的哲罗鲑IGF-I蛋白。细胞增殖实验(MTT法)结果显示, 重组IGF-I蛋白对大麻哈鱼胚胎细胞(CHSE-214)、鲤上皮细胞(EPC)及虹鳟性腺细胞(RTG-2)均有显著促增殖作用, 表明获得的重组IGF-I蛋白具有细胞水平的生物活性。本研究为深入了解IGF-I在哲罗鲑生长发育中的调控机制及绿色高效促生长制剂的研发奠定基础。

关键词: 哲罗鲑; 胰岛素样生长因子-I; 原核表达; 生物活性

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

鱼类胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)是一类具有胰岛素样代谢和促进有丝分裂功能的多肽, IGF-I选择性地与IGF-I R(IGF-I receptor)结合, 通过促进细胞分裂、分化和已知凋亡来调节生长、分化和繁殖等生理过程^[1]。胰岛素样生长因子包括IGF-I、IGF-II以及近年来Wang等^[2]研究罗非鱼发现的新成员IGF-III, 其中IGF-I是生长激素(GH)发挥生物学功能的重要传导因子^[3-4], 鲑鳟鱼类的肝脏IGF-I mRNA和血液中的IGF-I的含量明显与幼鱼的生长速率有关。对鱼类的IGF-I进行深入研究, 在鱼类的育种及养殖管理等方面都具有重要的指导作用。但从鱼类的血浆或组织中直接提取天然的IGF-I具有一定的困难, 从而限制了对鱼类IGF-I功能和作用的深入研究, 因此获得足够的

重组IGF-I对鱼类生理生殖作用的研究具有重要意义。

哲罗鲑(*Hucho taimen*)又称哲罗鱼, 属鲑形目(Samoniiformes)、鲑科(Salmonidae)、哲罗鱼属(*Hucho*), 是我国名贵的冷水性鱼类, 具有较高的经济价值^[5], 其属肉食性凶猛鱼类, 具有明显的季节性洄游, 主要分布于俄罗斯、蒙古、哈萨克斯坦和中国的额尔齐斯河、乌苏里江、喀纳斯湖等。近些年由于受到过度捕捞、环境污染等因素的影响, 哲罗鲑资源逐渐下降, 并已被列入中国濒危保护动物^[6-7], 但近年来, 我国关于哲罗鲑人工繁殖技术的研究也逐渐有了进展^[8-9]。本实验克隆了哲罗鲑IGF-I基因片段, 利用原核表达载体pS构建IGF-I重组表达质粒(IGF-I/pS), 实现了哲罗鲑IGF-I重组蛋白的体外高效

收稿日期: 2015-10-12 修回日期: 2016-05-09

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B10); 公益性行业(农业)科研专项(201003055-14)

通信作者: 尹家胜, E-mail: xwsc20@tom.com

表达,并对重组IGF-I-pS蛋白进行了生物学活性分析,以期深入解析IGF-I在哲罗鲑生长发育中的调控机制及绿色高效促生长制剂的研发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用哲罗鲑(每尾平均体质量10 g)采自中国水产科学院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站。一步法RT-PCR试剂盒、*rTaq*酶、pMD18-T simple Vector及限制性内切酶均为宝生物公司产品;DNA纯化试剂盒及RNA提取试剂盒购自Promega公司;质粒提试剂盒购自Axygen公司;表达载体pS由东北农业大学制药教研室李德山教授惠赠;克隆用菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 和表达用菌株*E. coli* Rosetta在本实验室保存;鱼胰岛素样生长因子-I(IGF-I)ELISA试剂盒购自上海常斤生物科技有限公司;MEM(minimum essential medium)细胞培养基、胰蛋白酶、胎牛血清均购自Hyclone公司;噻唑蓝(MTT)购自Sigma;鲤上皮细胞(EPC)、大麻哈鱼胚胎细胞(CHSE-214)和虹鳟性腺细胞(RTG-2)由中国水产科学研究院长江水产研究所鱼类病害研究室曾令兵教授惠赠。

1.2 引物设计与合成

对GenBank收录的多条鲑鳟类IGF-I基因开放阅读框序列进行比对,然后选择北极红点鲑的IGF-I基因开放阅读框序列(NCBI登录号为GU933431.1)为模板,利用Primer 5.0设计用于扩增哲罗鲑ORF序列的引物P-F和P-R,根据pS载体上多克隆位点的排列特点,分别在上、下游引物的5'端添加了*Bsa*I和*Bam*H I酶切位点(酶切位点见下划线标识)。P-F:5'GGTCTCATGGAAACCCAGAAAAGACACGAAT3',P-R:5'GGATCCTCAATTGTGGCTGACGTAGTTGTCC 3',退火温度为55℃。

1.3 IGF-I基因的克隆

根据RNA提取试剂盒(Promega公司)的方法提取哲罗鲑肝脏总RNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度。依据RT-PCR试剂盒(TaKaRa)的方法对获得的RNA进行RT-PCR一步反应扩增IGF-I基因。将PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电

泳进行检测,并切胶回收,连接pMD18-T simple Vector构建重组质粒。将重组质粒转化至*E. coli* DH5 α 感受态细胞中,经LB平板倒置培养后,挑取单菌落培养并进行PCR鉴定。选择阳性克隆送哈尔滨博仕生物技术有限公司测序。

1.4 IGF-I/pS重组表达质粒的构建

使用限制性内切酶*Bsa*I和*Bam*H I对表达载体pS及鉴定正确的重组质粒IGF-I/pMD18-T进行双酶切,再用T4 DNA连接酶将具有相同粘性末端的两基因片段连接,获得重组表达质粒IGF-I/pS,转化至*E. coli* DH5 α 中,提质粒进行PCR和酶切鉴定,鉴定正确的送哈尔滨博仕生物技术有限公司测序。

1.5 重组IGF-I蛋白的表达

将测序结果正确的重组质粒IGF-I/pS转化至表达菌株*E. coli* Rosetta中,挑取单菌落进行菌液PCR鉴定,将鉴定结果正确的接种于含Amp的10 mL LB液体培养基中,37℃摇床培养过夜。次日按1:100比例接种于含Amp的500 mL LB液体培养基中扩大培养至OD₆₀₀值为0.6左右,加入125 μ L浓度为1 mmol/L的IPTG进行IGF-I蛋白的诱导表达,分别在0、1、2、3、4、5 h时取样,4℃、11 000 r/min离心10 min收菌,PBS洗涤重悬沉淀、加入溶菌酶(至终浓度为1 mg/mL)后4℃作用1 h、-80℃放置过夜。次日将菌体冻融后在冰浴中超声破碎,破碎后产物4℃、11 000 r/min离心10 min,分别取上清和沉淀,进行SDS-PAGE电泳检测,以确定蛋白形式及最佳诱导时间。

1.6 重组IGF-I蛋白的纯化

蛋白表达为包涵体形式,则需进行包涵体纯化。菌体超声破碎后的沉淀即为包涵体,用复性液(尿素、Tris-buffer、丙酮、巯基乙醇、甘氨酸、氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽)洗涤2~3次,洗涤后的包涵体溶于变性液(尿素、Tris-HCl磷酸二氢钠)中,4℃过夜。向变性产物中逐滴加入10倍体积的复性液,置于4℃冰箱12 h后,用PBS溶液(pH 8.0)于4℃冰箱中透析12 h。透析后的溶液于4℃、11 000 r/min离心10 min,取上清,并进行SDS-PAGE电泳检测。

1.7 IGF-I蛋白免疫学检测

利用鱼胰岛素样生长因子-I ELISA试剂盒

(上海常升生物科技有限公司)对IGF-I蛋白进行免疫学检测。分别按48、24、12、6、3 $\mu\text{g/L}$ 的浓度梯度,对IGF-I蛋白进行稀释后,按照ELISA试剂盒的说明书进行操作:设置空白对照组,在酶标包被板待测样品孔中加入50 μL 稀释后的IGF-I蛋白,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤液洗涤5次。每孔加入酶标试剂50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min后,洗涤5次。然后每孔加入显色剂A 50 μL ,再加显色剂B 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色15 min,最后每孔加入终止液50 μL 终止反应。在15 min以内用酶标仪检测结果。

1.8 IGF-I蛋白生物活性检测

使用MTT法检测IGF-I蛋白的生物活性。实验前测量IGF-I蛋白浓度并进行无菌过滤,按IGF-I蛋白浓度为0(对照组)、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$ 分为8组,每组6个重复。取生长状态良好的EPC、CHSE-214和RTG-2细胞,以 4×10^4 个/mL每孔接种100 μL 于96孔板中,CO₂培养箱中培养过夜使细胞贴壁,次日加入不同浓度梯度的IGF-I蛋白,对照组加入等体积的无菌PBS。继续培养24~48 h后,每孔加入20 μL MTT (5 mg/mL),孵育4 h,小心吸去上清,每孔加入

100 μL 二甲基亚砜(DMSO),37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床低速震荡10 min,酶标仪检测490 nm处的吸光值。实验数据运用SPSS 13.0软件进行分析。

2 结果

2.1 IGF-I基因的克隆

哲罗鲑肝脏总RNA经过RT-PCR扩增,产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测分析,发现在500~750 bp之间有一明显条带,与预期的目的条带大小相符(573 bp)(图1-a)。将PCR产物纯化回收后与pMD18-T simple载体连接,并利用Bsa I/BamH I对重组质粒pMD18-T-IGF-I进行酶切鉴定(图1-b)。将鉴定正确的pMD18-T-IGF-I送测序,得到开放阅读框(ORF)长度为573 bp的IGF-I基因片段,在NCBI上BLAST分析后发现此基因片段与北极红点鲑的IGF-I基因ORF长度相同,且同源性高达99%,判断出此序列是哲罗鲑IGF-I基因。该基因序列已提交至GenBank数据库,登录号:KR106990。

2.2 IGF-I/pS重组质粒的构建

将鉴定正确的pMD18-T-IGF-I质粒进行双酶切(Bsa I/BamH I),并连接至pS表达载体中。将重

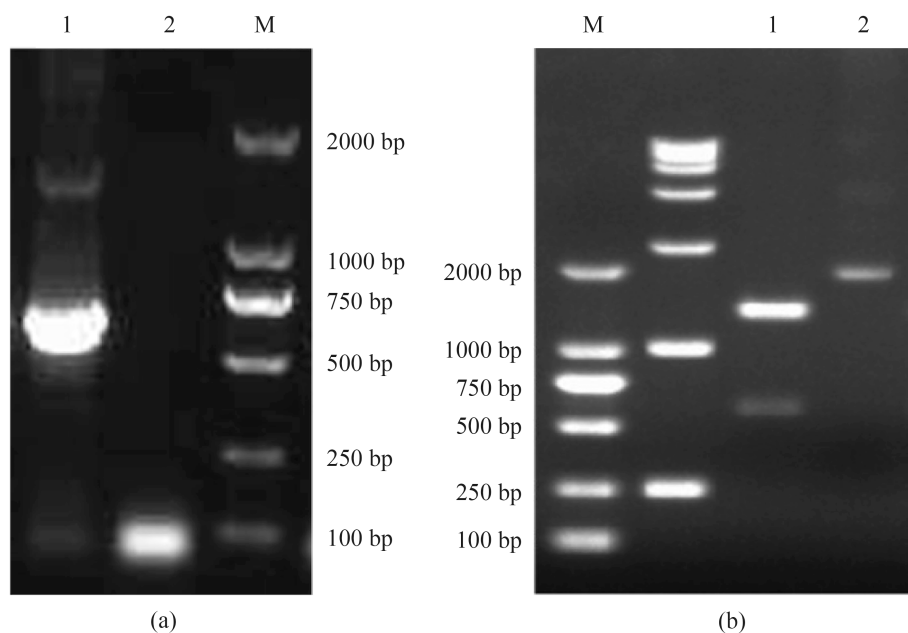


图1 IGF-I基因扩增产物及重组质粒pMD18-T-IGF-I酶切鉴定

(a) 1. IGF-I基因片段; 2. 阴性对照; M. DL2000 DNA (b) 1. 双酶切后的重组质粒pMD18-T-IGF-I; 2. 重组质粒pMD18-T-IGF-I; M. DL2000分子量标准

Fig. 1 Agrose gel analysis of IGF-I PCR products and identification of IGF-I by dual-digestion

(a) 1. PCR products of IGF-I; 2. Negative control; M. DL2000DNA marker. (b) 1. Dual-digestion of recombinant plasmid pMD18-T-IGF-I; 2. Recombinant plasmid pMD18-T-IGF-I; M. DL2000 DNA marker.

组质粒IGF-I/pS转化至表达菌株*E.coli* Rosetta中,挑单菌落培养,菌液PCR鉴定得到与预期相符合的条带(图2)。进一步对重组质粒IGF-I/pS进行双酶切鉴定(*Bsa* I/*Bam*H I),结果显示与预期相符,且测序结果也显示正确,说明目的片段已成功载入表达载体。

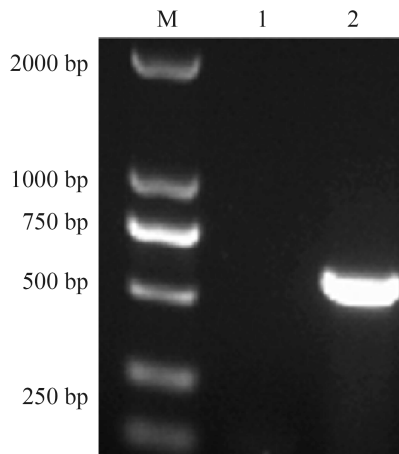


图2 重组质粒IGF-I/pS PCR鉴定

M. DL 2000分子量标准; 1. 阴性对照; 2. IGF-I基因片段

Fig. 2 Agrose gel analysis of IGF-I/p PCR products

M. DL2000 DNA marker; 1. Negative control; 2. PCR product of IGF-I

2.3 重组IGF-I蛋白在*E.coli* Rosetta中的表达

将重组质粒IGF-I/pS转入*E.coli* Rosetta中,利用IPTG进行诱导表达,分别对诱导时间及诱导温度进行对比实验,得出最佳诱导条件。诱导

后的菌液超声破碎,分别收集上清和沉淀。进行SDS-PAGE电泳检测,结果显示,37℃、IPTG(0.25 mmol/L)诱导3 h表达效果最佳,且重组IGF-I蛋白以包涵体的形式存在(图3-a)。

2.4 重组IGF-I蛋白的纯化

经上述对重组IGF-I蛋白的SDS-PAGE电泳检测,可知重组IGF-I蛋白以包涵体的形式存在。因此,取破碎后的沉淀,用复性液洗涤3次后,加入变性液,4℃过夜,再将10倍体积复性液缓慢加入并不断搅拌,最后经PBS透析得重组IGF-I融合蛋白。将纯化后的重组IGF-I融合蛋白进行SDS-PAGE电泳分析,发现有与预期相符的特异性条带(图3-b)。

2.5 IGF-I蛋白的免疫学鉴定

将IGF-I融合蛋白用包被液稀释到不同浓度梯度,依据ELISA试剂盒操作方法,加入酶标包被板与IGF-I蛋白的抗体结合,最后加入酶标试剂,用酶标仪检测,结果显示, A_{490} 值随IGF-I蛋白浓度的升高逐渐增大,且对照组与实验组之间呈极显著性差异($P < 0.01$)(图4),表明本实验通过原核表达获得了完整的具有免疫活性的哲罗鲑IGF-I融合蛋白。

2.6 IGF-I蛋白的生物活性鉴定

运用MTT法检测不同浓度的哲罗鲑IGF-I融

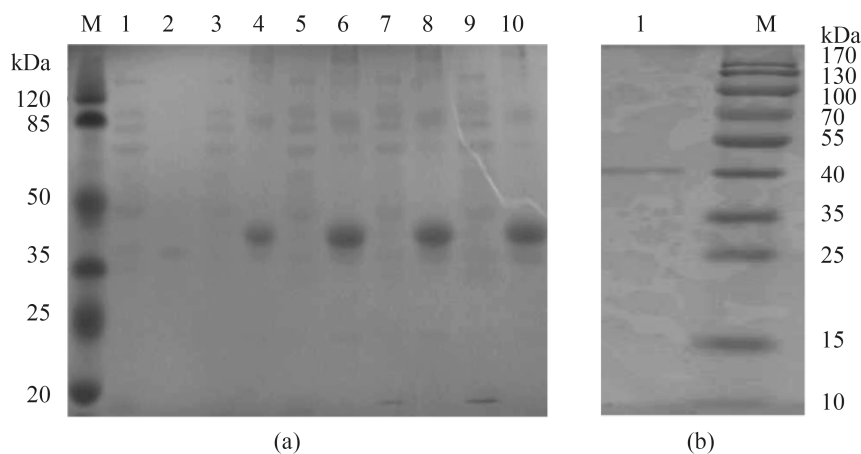


图3 IGF-I蛋白的可溶性、最佳诱导时间分析以及纯化后的蛋白分析

(a)M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导菌体破碎后上清; 2: 未诱导菌体破碎后沉淀; 3、5、7、9: 诱导2 h、3 h、4 h、5 h后菌体破碎上清; 2、4、6、8、10: 诱导2 h、3 h、4 h、5 h后菌体破碎沉淀 (b)1: 纯化后的重组IGF-I蛋白; M: 蛋白分子量标准

Fig. 3 Analysis of the solubility and optimal induction time of IGF-I protein and the analysis of the purified protein

(a)M: Protein marker; 1: Supernatant of uninduced bacteria; 2: Sediment of uninduced bacteria; 3、5、7、9: Supernatant of induced bacteria of 2 h、4 h and 5 h; 2、4、6、8、10: Sediment of induced bacteria of 2 h、3 h、4 h and 5 h. (b) 1: Purified IGF-I protein; M: Standard protein marker

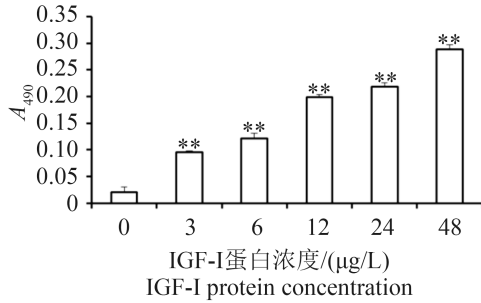


图 4 IGF-I蛋白的ELISA检测结果

**表示与对照组差异极显著(P<0.01)

Fig. 4 ELISA detection results of IGF-I protein

** indicated extremely significant difference with the control group

合蛋白对EPC、CHSE-214和RTG-2细胞的增殖效应。随着IGF-I蛋白浓度的增高, EPC、CHSE-214和RTG-2细胞均呈现出有增殖效应, 且与对照组相比有显著性差异(P<0.01)(图5)。

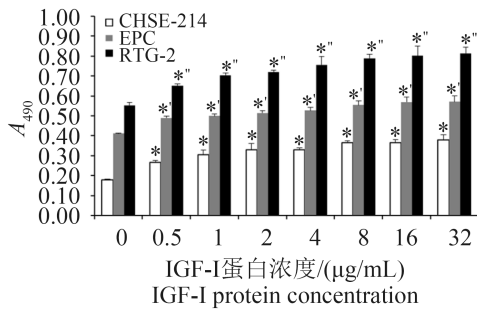


图 5 IGF-I蛋白的MTT检测结果

*, **和***分别表示与各自对照组呈显著性差异(P<0.05)

Fig. 5 MTT detection results of IGF-I protein

*, ** and *** indicated significant difference with the control group (P<0.05)

3 讨论

3.1 蛋白的诱导表达分析

原核表达系统因其周期快、表达量高以及成本低等众多优势, 被广泛应用于很多生物制剂的表达, 而大肠杆菌表达系统又是原核表达系统中最受欢迎的外源蛋白表达系统^[10]。目的蛋白在大肠杆菌中的表达量受多种因素的影响, 如诱导剂的浓度、诱导的时间以及诱导温度等^[11]。本研究选用Bsa I和BamH I酶切位点, 将IGF-I基因片段连接至pS表达载体中, 转入表达菌株E.coli Rosetta中, 利用IPTG进行诱导表达。经实验发现, 37 °C、IPTG(0.25 mmol/L)诱导3 h, 目

的蛋白在大肠杆菌中的表达效果最佳。

3.2 蛋白的定性及生物活性分析

IGF-I在促细胞生长、分裂分化及骨发生与重建^[12]等方面具有显著作用, 但关于鱼类IGF-I蛋白的诸多生物功能还有待深入研究。由于目前商业化的鱼类IGF-I抗体较少, 对鱼类IGF-I生物功能的研究有所制约。本研究原核表达获得的哲罗鲑IGF-I融合蛋白, 经免疫活性实验检测显示其具有识别特异性抗体的能力, 说明获得具有免疫活性的完整结构的哲罗鲑IGF-I蛋白。

IGF-I能特异性识别组织细胞膜上的受体, 并与之结合以激活细胞核内核糖体DNA的启动子, 从而促进细胞分裂与增殖^[13]。有研究显示, 重组虹鳟IGF-I对小鼠成纤维细胞有促增殖作用^[14], 赵晓杰等^[15]也发现, 重组大菱鲆IGF-I能促进大菱鲆肾脏细胞增殖。本实验利用CHSE-214、EPC以及RTG-2鉴定重组哲罗鲑IGF-I融合的生物活性。MTT法结果显示, 目的蛋白对3种细胞均有显著促增殖效应, 表明本研究利用原核表达系统成功获得了具有良好生物学活性的哲罗鲑IGF-I融合蛋白。

IGF-I作为GH的中介体, 在调节鱼类生长代谢中起核心作用。目前关于哲罗鲑IGF-I基因的研究非常少, 本研究通过对哲罗鲑IGF-I基因的克隆、原核表达以及蛋白产物的纯化研究, 获得了具有免疫活性和生物学活性的IGF-蛋白, 为深入解析IGF-I在哲罗鲑生长发育中的调控机制及绿色高效促生长制剂的研发奠定基础。

参考文献:

[1] Reinecke M. Insulin-like growth factors and fish reproduction[J]. Biology of Reproduction, 2010, 82(4): 656-661.

[2] Wang D S, Jiao B W, Hu C J, et al. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 367(2): 336-341.

[3] 张春香, 罗海玲, 陈喻, 等. IGF-I基因内含子4多态性与南江黄羊生长性状的关系[J]. 中国草食动物, 2008, 28(5): 14-16.

Zhang C X, Luo H L, Chen Y, et al. Relationship between the polymorphism of IGF-I gene intron 4 & the growth performance of Nanjiang Yellow goat[J]. China

- Herbivores, 2008, 28(5): 14-16 (in Chinese).
- [4] Peter R E, Marchant T A. The endocrinology of growth in carp and related species[J]. *Aquaculture*, 1995, 129(1-4): 299-321.
- [5] 王清印, 徐来宁, 杨宁生. 中国水产生物物种资源与利用[M]. 北京: 海洋出版社, 2005: 64-70.
Wang Q Y, Xu L N, Yang N S. Genetic Resources & Utilization of Aquatic Organisms in China[M]. Beijing: Ocean Press, 2005: 64-70 (in Chinese).
- [6] 董崇智, 李怀名, 赵春刚, 等. 濒危名贵哲罗鱼保护生物学的研究 II. 哲罗鱼性状及生态学资料[J]. *水产学杂志*, 1998, 11(2): 34-39.
Dong C Z, Li H M, Zhao C G, *et al.* Study on the protective biology of precious Hucho trout being in critically ill II properties of Hucho trout and its ecology data[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 1998, 11(2): 34-39 (in Chinese).
- [7] 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书: 鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 29-31.
Le P Q, Chen Y Y. China Red Data Book of Endangered Animals: Pisces[M]. Beijing: Science Press, 1998: 29-31 (in Chinese).
- [8] 徐伟, 尹家胜, 姜作发, 等. 哲罗鱼人工繁育技术的初步研究[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(1): 26-30.
Xu W, Yin J S, Jiang Z F, *et al.* A technique of artificial reproduction of *Hucho taimen*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(1): 26-30 (in Chinese).
- [9] 姜作发, 尹家胜, 徐伟, 等. 人工养殖条件下哲罗鱼生长的初步研究[J]. *水产学报*, 2003, 27(6): 590-594.
Jiang Z F, Yin J S, Xu W, *et al.* A preliminary study on the growth of *Hucho taimen* under artificial rearing conditions[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(6): 590-594 (in Chinese).
- [10] Fischer B, Summer L, Goodenough P. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 41(1): 3-13.
- [11] Amersham Pharmacia Biotech. GST Gene Fusion System[M]. 3rd ed. San Francisco: Pharmacia Biotech, Inc., 2001: 2-4.
- [12] Rosen C J, Donahue L R. Insulin-like growth factors and bone: The osteoporosis connection revisited[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1998, 219(1): 1-7.
- [13] Ong J, Yamashita S, Melmed S. Insulin-like growth factor I induces c-fos messenger ribonucleic acid in L6 rat skeletal muscle cells[J]. *Endocrinology*, 1987, 120(1): 353-357.
- [14] Van Reeth T, Drèze P L, Szpirer J, *et al.* Positive selection vectors to generate fused genes for the expression of His-tagged proteins[J]. *Biotechniques*, 1998, 25(5): 898-904.
- [15] 赵晓杰, 陈松林, 王娜, 等. 大菱鲆胰岛素样生长因子-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.
Zhao X J, Chen S L, Wang N, *et al.* Cloning, recombinant expression and purification of Turbot (*Scophthalmus maximus*) mature IGF-I[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(1): 1-7 (in Chinese).

Prokaryotic expression and bioactivity analysis of insulin-like growth factor-I from *Hucho taimen*

WANG Xiaoyu^{1,2}, XU Liming¹, LIU Miao¹, ZHAO Jingzhuang¹,
LU Tongyan¹, CAO Yongsheng¹, YIN Jiasheng^{1*}

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) plays a major role in the control of growth and development in fish. Total RNA was isolated from *H. taimen* liver tissue. The cDNA encoding insulin-like growth factor I (IGF-I) peptide was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) strategy using isolated total RNA as template. Recombinant expression plasmid (IGF-I/pS) was constructed by prokaryotic expression vector pS and transformed into *E. coli* Rosetta. The expression of recombinant IGF-I protein of *H. taimen* was induced by IPTG. There was a clear target band with expected size between 35~50 kD in SDS-PAGE electrophoresis, and the recombinant protein existed in the form of inclusion body. Purified IGF-I protein was obtained after the inclusion body was denatured/renatured. ELISA results showed that target protein can identify commercial fish IGF-I antibody, indicating that *H. salmon* IGF-I protein with immune activity was obtained. Cell proliferation assay (MTT) results showed that recombinant IGF-I protein can significantly promote the propagation of CHSE-214, EPC and RTG-2, indicating that the recombinant IGF-I protein had biological activity. The study has laid a foundation for the research of IGF-I function in the growth and development of *H. taimen*.

Key words: *Hucho taimen*; insulin-like growth factors-I; prokaryotic expression; bioactivity

Corresponding author: YIN Jiasheng. E-mail: xwsc20@tom.com

Funding projects: National Science and Technology Support Program (2012BAD25B10); Public Welfare Industry (Agriculture) Research (201003055-14)