

青海湖裸鲤类胰岛素生长因子 IGF-II 的原核表达

曹诣斌^{1,2} 吴兰亲¹ 邵邻相¹ 张均平¹ 叶晓微¹ 朱肖颖¹ 陈学群² 杜继曾²

(1. 浙江师范大学生化学院, 金华 321004; 2. 浙江大学医学院, 杭州 310058)

EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-II OF NAKED CARP (*GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII*) IN LAKE QINGHAI

CAO Yi-Bin^{1,2}, WU Lan-Qin¹, SHAO Lin-Xiang¹, ZHANG Jun-Ping¹, YE Xiao-Wei¹,
ZHU Xiao-Ying¹, CHEN Xue-Qun² and DU Ji-Zeng²

(1. College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004; 2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

关键词: 青海湖裸鲤; 类胰岛素生长因子-2(IGF-II); 原核表达

Key words: Naked carp; Lake Qinghai; IGF-II; Expression in *E. coli*

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0459-04

青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 俗称湟鱼, 属鲤科裂腹鱼亚科裸鲤属, 是我国最大内陆咸水湖青海湖中唯一的经济鱼类, 其生长极其缓慢, 平均每生长到 500 g 需要近 10 年^[1]。青海湖裸鲤具有明显的生殖洄游, 每年 3 月下旬至 8 月进入青海湖附属淡水河流中产卵^[2]。近几十年来, 过度捕捞、气候和人为因素造成的青海湖裸鲤天然产卵场的破坏, 导致青海湖裸鲤资源急剧下降, 已基本丧失渔业价值, 同时也使青海湖原本脆弱的生态系统遭到破坏, 引起了国内外学者的高度关注^[3, 4]。

与哺乳动物相似, 生长激素-类胰岛素生长因子轴 (GH-IGFs) 是鱼类主要的内分泌生长调节系统。类胰岛素生长因子-2 (IGF-II) 是一种在结构上和胰岛素与 IGF-I 具有很高同源性的促有丝分裂蛋白, 在哺乳动物中一般认为 IGF-II 主要与胚胎发育有关。近期研究表明, 鱼类 IGF-II 在表达调控和作用机理等方面与哺乳动物有明显的不同, 如: 啮齿类哺乳动物在出生后血液 IGF-II 水平明显下降, 而鱼类在成体中 IGF-II 依然有较高的表达水平^[5]; 在哺乳动物中, 和 IGF-I 受体的结合能力 IGF-II 一般要比 IGF-I 低 15—20 倍, 但在鱼类中两者的结合能力相似^[6], 这些差异提示 IGF-II 在鱼类中可能具有特有的生理功能。

我们采用放免等方法研究了青海湖裸鲤在不同水环境中 GH 和 IGF-I 水平的变化^[7]。目前, 对于鲤科 IGF-II 尚缺乏有效的研究手段。本文通过裸鲤 IGF-II 的原核表达, 试图首次获得具有生物活性的鲤形目鱼类 IGF-II 重组成熟肽, 以进一步研究高原盐湖环境中青海湖裸鲤 IGF-II 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青海湖裸鲤采样自黑马河, 为青海湖入湖河流之一。在青海湖渔场, 裸鲤用 MS-222 (Sigma, 美国) 麻醉, 采集组织样本并立即用液氮冻存。

1.2 原核表达载体的构建

提取裸鲤肝脏总 RNA 并逆转录合成 cDNA 第一链。根据我们已经克隆的青海湖裸鲤 IGF-II 编码区序列 (Genbank Accession No. AY919609), 设计引物并分别添加 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点, 以扩增 IGF-II 前体中的 BCAD 功能域 (成熟肽): PIF1: 5'-CCATGGAAGTGGCTTCAG-3'; PIR1: 5'-AAGCTTTACTCTGACTTGGCAG-3'。PCR 扩增条件为: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃ 延伸 6min。Agarose gel DNA purification kit (Takara) 回收 PCR 目的片段, 并连接到 PMD 18-T easy 载体 (Takara)。转化并提取重组质粒, 用 *Nco* I 和 *Hind* III (MBI) 双酶切, 回收酶切目的片段并连接到 pET 32a 原核表达载体 (Novagen)。

1.3 Trx-IGF-II 融合蛋白的表达

重组表达载体转化到 BL21(DE3) 感受态细胞, LB 液体培养基 37℃ 培养至 A₆₀₀ 达到 1.2, 加入 IPTG (BBI) 至终浓度为 1 mmol/L, 25℃ 和 37℃ 诱导 3h, 或 15℃ 诱导 5h, 离心收集细胞并超声波破碎, SDS-PAGE 分析上清中可溶性 Trx-IGF-II 融合蛋白的含量。

收稿日期: 2008-10-16; 修订日期: 2009-07-29

基金项目: 浙江省教育厅科研项目 (理工科类) Y200702196; 国家基金 30770807 资助

通讯作者: 曹诣斌 (1974—), 男, 浙江慈溪人; 博士; 主要从事鱼类生理学与分子生物学研究。E-mail: sky109@zjnu.cn

1.4 ncIGF-II 目的蛋白的酶切与纯化

在确认有部分融合蛋白可溶性表达之后, 收集超声波破碎上清液进行 Ni-resin (Genscript) 纯化, 依次用含 50 mmol/L 和 250 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱(50 mmol/L NaH_2PO_4 、300 mmol/L NaCl、50 mmol/L 或 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 获得融合蛋白, Trx-IGF-II 融合蛋白经透析后冷冻干燥浓缩, Thrombin (Sigma) 4℃ 酶切过夜, 然后加入 Ni-resin 4℃ 摇床结合 30min, 离心除去与 Ni-resin 结合的带有 6×his 标签的 Trx, Tricine-SDS-PAGE 鉴定 ncIGF-II 重组目的蛋白。

1.5 ncIGF-II 的生物活性检测

采用 MTT 法检测 IGF-II 生物活性。将人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 接种于 96 孔板中, 每孔加入细胞悬液 100 μL (1×10^5 个/mL), 培养 24h 后, 弃去培养基, 加入含不同浓度 ncIGF-II 的无血清培养基, 培养 48h, 每孔加入 10 μL [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (MTT) (Sigma, 1 mg/mL) 溶液, 再培养 4h, 去除培养液, 加入 150 μL dimethyl sulfoxide (DMSO), 振荡 15min, 用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度。促生长效率 (Growth stimulation ratio, GSR) (%) = $A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100$, A_{control} 未加入 ncIGF-II。

1.6 统计分析

数据以平均值 $\pm$ SD 表示。采用单因素方差分析检验组间的差异, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 原核表达载体 pET 32a-ncIGF-II 的构建

编码青海湖裸鲤成熟 IGF-II 的 DNA 片段被连接到 pET 32a 载体, DNA 测序表明阅读框正确(图 1)。随后质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞, 进行 IPTG 诱导培养。

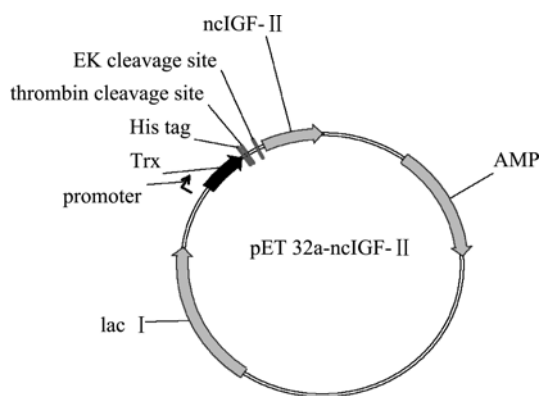


图 1 pET 32a-ncIGF-II 原核表达载体的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant expression plasmid pET 32a-ncIGF-II
编码成熟 ncIGF-II 的 PCR 产物经 *Nco*I 和 *Hind*III 酶切后连接到 pET 32a 载体; Amp, 氨苄青霉素抗性; lac I, lac 阻遏物; Trx, 硫氧还蛋白; EK, 肠激酶

The PCR fragment which encodes mature ncIGF-II was digested with *Nco*I and *Hind*III and then cloned into pET 32a at the same restriction sites. Amp, ampicillin resistance; lac I, lac repressor; Trx, thioredoxin; EK, Enterokinase

2.2 Trx-ncIGF-II 融合蛋白的表达

含重组质粒的 BL21(DE3) 分别经 IPTG 25℃ 和 37℃ 诱导 3h, 或 15℃ 诱导 5h, 超声波破碎后离心取上清, SDS-PAGE 检测表明 Trx-IGF-II 融合蛋白(约 32 kD)部分可溶性表达, 其中 25℃ 诱导培养 3h 可溶性表达比例最高(图 2)。

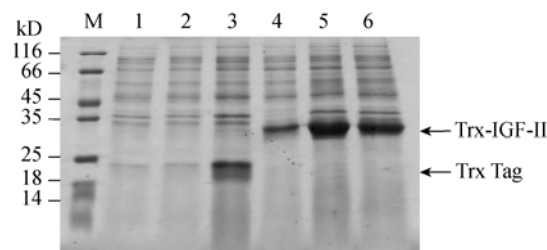


图 2 Trx-IGF-II 融合蛋白在 BL21(DE3) 中的可溶性表达

Fig. 2 Expression of soluble Trx-ncIGF-II fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3)

1. BL21(DE3); 2. 含 pET 32a 质粒的 BL21(DE3), 未经 IPTG 诱导; 3. 含 pET 32a 质粒的 BL21(DE3), IPTG 诱导; 4. 含 pET 32a-ncIGF-II 质粒的 BL21(DE3), IPTG 15℃ 诱导培养; 5. 含 pET 32a-ncIGF-II 质粒的 BL21(DE3), IPTG 25℃ 诱导培养; 6. 含 pET 32a-ncIGF-II 质粒的 BL21(DE3), IPTG 37℃ 诱导培养
1. BL21(DE3); 2. BL21(DE3) harboring pET-32a without IPTG induction; 3. BL21(DE3) harboring pET-32a with IPTG induction at 37℃; 4. BL21(DE3) harboring pET-32a-ncIGF-II with IPTG induction at 15℃; 5. BL21(DE3) harboring pET-32a-ncIGF-II with IPTG induction at 25℃; 6. BL21(DE3) harboring pET-32a-ncIGF-II with IPTG induction at 37℃

2.3 Trx-ncIGF-II 融合蛋白的镍柱纯化

超声波破碎细胞后离心取上清液过柱, 采用含不同浓度咪唑的洗脱液进行洗脱, SDS-PAGE 分析表明, 50 mol/L 和 250 mol/L 咪唑依次洗脱后, 目的蛋白损失较少, 但有部分非特异性结合的杂蛋白; 150 mol/L 和 250 mol/L 咪唑依次洗脱后, 能获得单一电泳条带的目的蛋白, 但目的蛋白损失较多(图 3)。

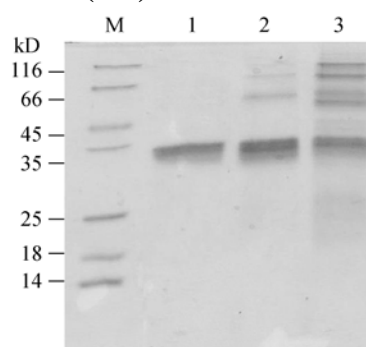


图 3 Trx-IGF-II 融合蛋白的镍柱纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Trx-IGF-II fusion proteins from Ni-resin beads incubated with lysate from BL21 (DE3) containing the expression plasmid

1. 150 mol/L 和 250 mol/L 咪唑洗脱; 2. 50 mol/L 和 250 mol/L 咪唑洗脱; 3. 超声波破碎上清

Whole proteins (Lane 3) were passed through Ni-resin. After wash with 50 mol/L and 250 mol/L imidazole (Lane 2) or 150 mol/L and 250 mol/L imidazole (Lane 1) Elution buffer, fusion protein was eluted

2.4 Trx-ncIGF-II 融合蛋白的酶切

Trx-IGF-II 融合蛋白分别采用肠激酶 EK 和凝血酶 Thrombin 进行酶切。EK 酶切得到两条分子量为约 16 kD 和 20 kD 的片段, 分子量大小与预期不符。Thrombin 酶切得到两条分子量分别为约 10 kD 和 15 kD, 分子量大小与预期相符合(图 4)。

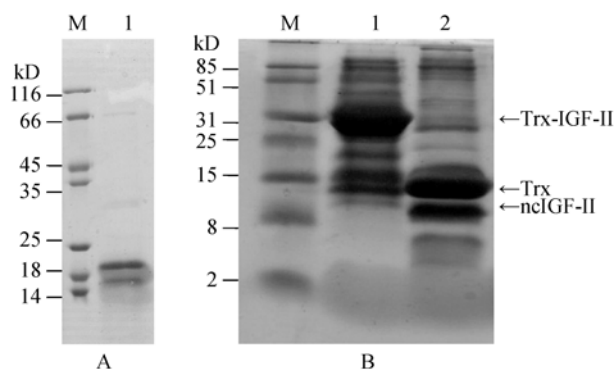


图 4 Trx-IGF-II 融合蛋白的酶切

Fig. 4 Polyacrylamide gel analysis of the cleavage reaction fractions after digestion with EK and thrombin

A. Trx-IGF-II 融合蛋白的 EK 酶切, SDS-PAGE; B. Trx-IGF-II 融合蛋白的 Thrombin 酶切, Tricine-SDS-PAGE: 1. Trx-IGF-II 融合蛋白; 2. 融合蛋白的 Thrombin 酶切

A. SDS- PAGE analysis of EK cleavage of Trx-ncIGF-II fusion protein; B. Tricine-SDS- PAGE analysis of thrombin cleavage of Trx-ncIGF-II fusion protein before (Lane 1) and after thrombin cleavage (Lane 2)

2.5 ncIGF-II 目的蛋白的纯化

Thrombin 酶切产物进行第二次镍柱纯化。Trx 由于携带 6×his 标签, 与非特异性结合蛋白一起被 Ni-resin 吸附, 而目的蛋白 ncIGF-II 则不与 Ni-resin 结合(图 5)。

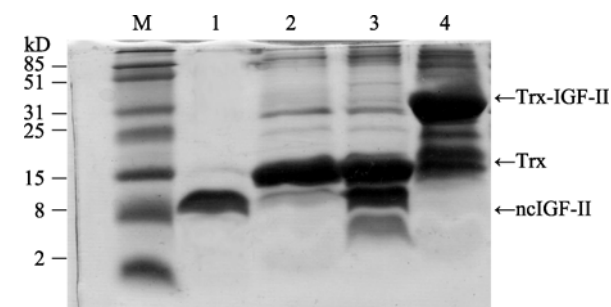


图 5 Thrombin 酶切产物的纯化

Fig. 5 Tricine-SDS- PAGE analysis of purified thrombin cleaved fusion protein

1. Thrombin 酶切产物中不与镍柱结合的 ncIGF-II 目的蛋白; 2. thrombin 酶切产物中与镍柱结合的 Trx 以及非特异性结合蛋白; 3. 融合蛋白的 Thrombin 酶切; 4. Trx-IGF-II 融合蛋白
Tricine-SDS- PAGE analysis of thrombin cleavage of Trx-ncIGF-II fusion protein before (Lane 4) and after thrombin cleavage (Lane 3). After thrombin treatment, the His6-tag-containing Trx and any remaining uncleaved fusion proteins were removed by adding Ni-resin for 30 min at 4°C followed by centrifugation (Lane 2). The supernatant contained the purified untagged ncIGF-II peptide (lane 1)

2.6 MTT 法检测表明 ncIGF-II 重组蛋白具有生物活性

MTT 法检测表明, 30 nmol/L 和 60 nmol/L ncIGF-II 对 MDA-MB-435 细胞具有显著的促生长作用($P < 0.01$), 但当浓度上升到 90 nmol/L 时, 促生长效果反而不明显(图 6)。

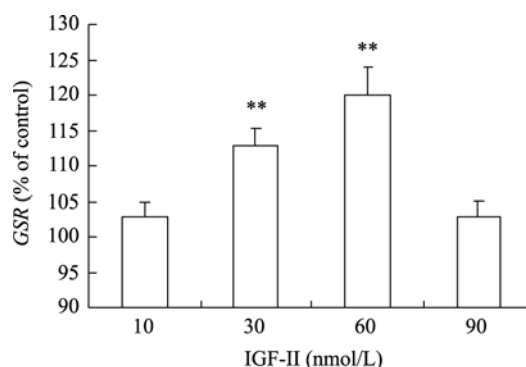


图 6 不同浓度 IGF-II 处理对 MDA-MB-435 细胞生长的影响

Fig. 6 The bioassay of recombinant ncIGF-II

MTT 法检测 ncIGF-II 生物活性, 以 48h 培养后与空白对照的比值(GSR)检测促生长效应, GSR 用平均值 $\pm$ SD 表示 ($n = 4$, $**P < 0.01$)

The bioactivity of ncIGF-II was measured with MTT method. The growth stimulation ratios (GSR) were evaluated after 48h cultivation and the results were compared with cells in the absence of IGF-II treatment. GSR are shown as means $\pm$ SD ($n = 4$, $**P < 0.01$)

3 讨论

由于缺乏鱼类 IGF-II 蛋白和相应抗体, 相当长一段时间里人们主要在 mRNA 水平来研究鱼类 IGF-II 表达调控机制, 很大程度上限制了鱼类 IGF-II 研究的进一步深入。现在人们已经获得了 5 种具有生物活性的鱼类 IGF-II 重组表达蛋白, 包括比目鱼^[8]、虹鳟鱼^[9]、澳洲肺鱼^[10]、罗非鱼^[11]和大西洋鲑鱼^[12], 并建立了虹鳟鱼 IGF-II 的放免法^[13]和大西洋鲑鱼 IGF-II 的酶免疫法^[14]检测手段。在鲤科鱼类中, 目前仅有普通鲤鱼 IGF-II 融合蛋白的重组表达和抗体制备的报道^[15]。

pET 32a 载体以 Trx 融合蛋白的方式表达目的蛋白, 我们的实验结果表明 Trx-ncIGF-II 部分可溶性表达, 其中以 25°C IPTG 诱导 3h 可溶性表达比例较高。镍柱纯化过程中, 我们采用 50 mol/L 咪唑和 250 mol/L 咪唑洗脱液依次洗脱的方式, 得到的粗产物中仍有少量非特异性结合蛋白。由于我们在酶切后还需要再进行一次镍柱纯化以除去 Trx 融合蛋白, 而非特异性结合蛋白会同时与镍柱结合而与目的蛋白分离, 所以我们在第一次镍柱纯化中采用了较为温和的洗脱条件。

融合蛋白酶切我们分别尝试了 pET 32a 所提供的 EK 和 thrombin 这两个酶切位点。EK 酶切产物在 N 端基本上没有额外的氨基酸, 是理论上比较理想的酶切位点。但本实验中, EK 酶切产物的片段大小与预期不符, 这一现象在鲑鱼 IGF-II 的原核表达中也同样遇到^[12], 可能与非特

异性酶切有关,说明 EK 不适合 IGF-II 的重组表达。Thrombin 酶切结果与预期相符,但会导致酶切产物在 ncIGF-II N 端有三十个左右的额外氨基酸,我们采用 MTT 法检测这是否会抑制 ncIGF-II 的生物学活性。

目前我们尚没有条件进行裸鲤原代细胞的培养,由于罗非鱼 IGF-II 可以明显促进小鼠胚胎细胞和人类肺组织细胞生长^[11],我们采用人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 来检验 ncIGF-II 的生物学活性,MDA-MB-435 细胞自身没有 IGF-II mRNA 的表达^[16],因此不会通过自分泌的途径干扰外源 IGF-II 的作用效果。MTT 法检测表明,30 mol/L 和 60 mol/L ncIGF-II 对 MDA-MB-435 分别有约 15% 和 20% 的促生长作用,与罗非鱼 IGF-II 对斑马鱼肝脏细胞的促生长效果相近^[11]。当 IGF-II 处理浓度上升到 90 nmol/L 时,促生长效果反而降低,这可能与 IGF-II 对某些癌细胞同时具有促进生长和诱导凋亡的双重作用有关^[17]。

参考文献:

- [1] Chen D Q, Zhang X, Xiong F, *et al.* Studies on growth characteristics of *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(2): 173—179 [陈大庆, 张信, 熊飞, 等. 青海湖裸鲤生长特征的研究. 水生生物学报, 2006, **30**(2): 173—179]
- [2] Wang Y S, Gonzalez R J, Patrick M L, *et al.* Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2003, **134**: 409—421
- [3] Matey V, Richards J G, Wang Y, *et al.* The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2008, **211**: 1063—1074
- [4] Wood C M, Du J, Rogers J, *et al.* Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): an endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2007, **80**: 59—77
- [5] 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]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1575**: 63—74
- [6] Fruchtmann S, McVey D C, Borski R J. Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone [J]. *American Journal of Physiology*, 2002, **283**: 468—476
- [7] Cao Y B, Chen X Q, WANG S, *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factor of naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) in Lake Qinghai: Expression in different water environments [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, **161**: 400—406
- [8] Duval H, Rousseau K, Elies G, *et al.* Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF-I and IGF-II [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, **126**: 269—278
- [9] Zhang W M, Zhang L H. Fusion expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) insulin-like growth factors I and II and their mitogenic activities in *E. coli* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, **49**(2): 266—271 [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. 动物学报, 2003, **49**(2): 266—271]
- [10] Degger B, Richardson N, Collet C, *et al.* Production, in vitro characterisation, in vivo clearance, and tissue localisation of recombinant barramundi (*Lates calcarifer*) insulin-like growth factor II [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, **123**: 38—50
- [11] Hu S Y, Wu J L, Huang J H. Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, **107**: 161—171
- [12] Wilkinson R J, Elliott P, Carragher J F, *et al.* Expression, purification, and in vitro characterization of recombinant salmon insulin-like growth factor-II [J]. *Protein Expression and Purification*, 2004, **35**: 334—343
- [13] Gentil V, Martin P, Smal J, *et al.* Production of recombinant insulin-like growth factor-II in the development of a radioimmunoassay in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1996, **104**: 156—167
- [14] Wilkinson R J, Elliott P, Hohmann A, *et al.* Development and characterization of a competitive polyclonal antibody enzyme-immunoassay for salmon insulin-like growth factor-II [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, **139**: 193—201
- [15] Shang H Q, Luo X S, Zou S P, *et al.* Gene cloning and fusion expression of common carp insulin-like growth factor II and preparation of its polyclonal antibody [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, **37**(6): 65—68 [商汉桥, 罗晓松, 邹世平, 等. 鲤胰岛素样生长因子 II 的克隆表达与抗体制备. 淡水渔业, 2007, **37**(6): 65—68]
- [16] Chatzistamou I, Schally A V, Varga J L, *et al.* Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen-independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2001, **12**: 761—768
- [17] Fu P, Thompson J A, Leeding K S, *et al.* Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, **100**: 58—68