

文章编号: 1000 - 0615(2002)02 - 0122 - 05

草鱼胰岛素样生长因子 - I 的 融合表达、纯化和抗血清制备

叶 星, 白俊杰, 劳海华, 简 清, 李英华, 罗建仁

(中国水产科学研究院珠江水产研究所农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

摘要:采用 PCR 方法改造已克隆到的草鱼胰岛素样生长因子- I (IGF- I) cDNA, 使其成为成熟肽 cDNA 并亚克隆到 pGEX-4T-1 载体中, 构建草鱼 IGF-I 融合蛋白表达质粒 pGEX-IGF。质粒转化大肠杆菌 BL21 菌株。该菌株经 IPTG 诱导可表达分子量约 34 kD 的特异蛋白。在不同的温度条件下分别产生以可溶性的和包涵体形式为主的特异蛋白。经 30 ℃ 诱导的菌体经溶菌酶消化、超声破碎及高速离心后, 裂解液上清经 glutathione sepharose 亲和层析纯化获得高纯度的 GST-IGF。以此纯化的融合蛋白为抗原制备兔抗草鱼 IGF-I 的抗血清。凝胶双扩散试验显示抗血清效价为 1:64, 说明表达产物具免疫原性。

关键词:草鱼; 胰岛素样生长因子-I; 融合表达; 纯化; 抗血清

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A

Fusion expression and purification of *Ctenopharyngodon idellus* IGF- I and preparation of the antiserum against GST-IGF

YE Xing, BAI Jun-jie, LAO Hai-hua, JIAN Qing, LI Ying-hua, LUO Jian-ren

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Employing PCR method, the cloned grass carp IGF- I gene was modified to be a mature IGF-I peptide gene and then subcloned into fusion expression vector pGEX-4T-1 to construct expression vector pGEX-IGF. Restriction endonuclease analysis and sequencing confirmed the corrected construction. The vector was transformed into *Escherichia coli* BL21 cell which can be induced by IPTG to produce a special protein of 34kD in molecular weight. The special protein can be mainly in form of soluble protein or inclusion body when induced at 30 and 37 ℃ respectively. The cells induced at 30 ℃ were digested by lysozyme and disrupted by sonication. After being centrifuged the supernatant was purified by glutathione sepharose column. GST-IGF fusion protein could be absorbed specifically on this column. The high purified protein was used as antigen to immune rabbits directly and high quality antiserum was obtained, which showed that the fusion protein possesses good immunogenicity.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; insulin-like growth factor-I (IGF-I); fusion expression; purification; antiserum

收稿日期: 2001-08-28

资助项目: 农业部“九五”重点渔业科技资助项目(渔 95 - B - 96 - 02 - 08 - 02)

作者简介: 叶 星(1962 -), 女, 广东陆丰人, 副研究员, 硕士。主要从事鱼类生物技术研究。Tel: 020 - 81616127, E-mail: yexing @

163.net

近年来鱼类胰岛素样生长因子 IGF⁻ 的生理作用受到越来越多的关注。IGF-I 不仅广泛地存在于鱼类的不同组织,而且也存在于各个发育阶段中,包括未受精卵、胚胎、幼体和成鱼^[1-4]。初步的研究表明 IGF-I 在鱼类的生长、繁殖及渗透压等方面有着重要的调节作用^[5-9]。由于鱼类的血浆或组织中 IGF⁻ 的含量低且大多与 IGFs 的结合蛋白结合,因此难于分离。本实验室曾采用 pBV220 表达载体在大肠杆菌中表达了草鱼 IGF-I 成熟肽,并证实表达产物具有促草鱼细胞增殖的活性^[10]。如要进一步开展草鱼 IGF-I 及其受体在组织中的定位、含量变化和生理功能等的研究需要其抗血清,但由于草鱼 IGF-I 的分子量较小(约 7.5kD),制备抗血清的效果不太理想,为此选择蛋白融合表达。融合表达载体 pGEX 含强启动子 tac 可受 IPTG 诱导,在 BL21 菌株中通过温度控制,可产生可溶性的表达产物^[11]。利用 pGEX 的谷胱甘肽硫 - 转移酶基因(GST 基因)与目的蛋白基因融合表达具有许多优点,如表达产物较稳定、可利用 GST 端特异地结合在谷胱甘肽 - 琼脂糖亲和柱上从而便于融合蛋白的纯化、可在温和条件下洗脱产物,使产物保留蛋白抗原性和功能活性、融合蛋白具有较大的分子量,可以增强小分子蛋白抗原的免疫原性等,因此近年来被广泛应用于外源蛋白的表达^[12,13]。鱼类的 IGF 的融合表达也有过报道,Chen 等^[14]利用 PGEX-2T 质粒融合表达罗非鱼 IGF-I,重组产物能促进鱼生长;华益民等利用 pGEX-4T-3 融合表达草鱼 IGF-I,证实表达产物具有免疫活性^[15]。本实验将已克隆到的 IGF-I 序列进行改造后亚克隆到表达质粒 PGEX-4T-I 中,与 GST 基因融合,进行融合蛋白表达,并用谷胱甘肽 - 琼脂糖(glutathione-sepharose)亲和层析纯化表达产物,纯化产物作为抗原免疫新西兰兔,获得高效价的 GST-IGF 抗血清。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒及细胞

草鱼 IGF⁻ cDNA 质粒 pUCgIGF₇ 由本实验室克隆和构建^[16]。质粒 pGEX-4T-1、大肠杆菌 BL21 菌株来自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

1.1.2 工具酶、试剂

限制性内切酶、连接酶及其它主要试剂为 Promega 公司和华美公司产品。还原型谷胱甘肽、盐酸胍购自上海生工公司。DNA Gel Extraction Kit 为 Boehringer Mannheim 公司产品。glutathione sepharose 4 fast flow (GS TrapTM FF)为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。重组草鱼 IGF⁻ 和鲤鱼生长激素分别由本室构建的酵母分泌表达菌株发酵获得。

1.1.3 实验兔

纯种新西兰兔,雄性,每只体重 2kg,由广东省医学实验动物中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 操 作

质粒制备、基因操作、大肠杆菌感受态细胞制作、质粒转化及 SDS-PAGE 等主要参照 Sambrook 等^[17]的方法。

1.2.2 PCR 扩增及扩增产物的克隆和序列分析

设计扩增草鱼 IGF-I 成熟肽的一对引物。引物 1:5'-CGGAATTCATGGGGCCGAGACGCTGT-3';引物 2:5'-CGCGTCGACTTACTATGGAGATTTGCCGGTT-3'。引物 1 含一个翻译起始密码子 ATG 和 *Eco*R I 识别位点。引物 2 含终止密码子 TAG、TAA 及一个 *Sal* I 识别位点。扩增引物由上海生工公司合成,合成产物经 PAGE 纯化。PCR 扩增产物经 *Eco*R 和 *Sal* I 酶切消化后与经同样双酶切的 pGEX-4T-1 混合,T4 DNA 连接酶连接过夜,转化 BL21 菌株。电泳法和酶切筛选重组子。全自动荧光测序仪检测重组子的插入片段阅读框序列,采用的是 1 对 pGEX 的测序引物:5'引物(pGEX 质粒上的第 869~891 个核苷酸)为 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3';3'引物(pGEX 上的第 1041~1019 个核苷酸)为 5'-

CCGGGAGCTGCA GTGTCA GAGG-3'。

1.2.3 IGF^r 的诱导表达和表达量测定

挑取含重组质粒 pEGX-IGF₄ 的 BL21 单菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 摇床过夜。次日按 1:100 扩大培养,30 培养至 A_{600nm} 0.5~2.0,加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol L⁻¹,诱导培养 3h,离心收集菌体。SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 15%),考马斯亮蓝染色,薄层扫描测定表达产物占菌体总蛋白的百分比(波长 570nm)。

同时用 30 和 37 两种温度进行诱导培养,菌体经超声破碎、高速离心,取上清和沉淀进行 SDS-PAGE,观察表达产物的存在形式及表达量。对 37 培养的分别在诱导后 2、4、6 和 19h 后取样,检测诱导时间对表达量的影响。

1.2.4 表达产物的纯化

将在 30 培养、经 IPTG 诱导表达的菌体用预冷的 PBS 洗涤(pH7.3)、新鲜配制的溶菌酶冰浴处理 15~30min 后,加入 DTT 至 5 mmol L⁻¹浓度,冰浴超声破碎细胞、高速(15 000r·min⁻¹)离心收集裂解上清。纯化使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的 AKTA prime 层析仪和 glutathione sepharose 4FF 层析柱。上样前用 5~10 个柱床体积的 PBS(预冷)0.5mL·min⁻¹平衡层析柱,以 0.1mL·min⁻¹的速度上样,再用 10~15 个柱床体积的 PBS 洗涤,然后用还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱,收集洗脱部分即为纯化的 GST-IGF。上样及洗脱过程均在 4 进行。SDS-PAGE 电泳检查纯度,光密度法计算蛋白浓度^[18]。

1.2.5 GST-IGF 抗血清的制备及效价检测

免疫方案:第一次免疫用纯化的 GST-IGF(蛋白浓度为 1.1mg·mL⁻¹)与等体积的弗氏完全佐剂(羊毛脂 液体石蜡按 1:5 的比例配制,加入 10mg·mL⁻¹的卡介苗)乳化后作为抗原,多点皮下注射,注射量为 0.6mL·kg⁻¹。3 周后用 IGF 与等体积的弗氏不完全佐剂(不加卡介苗)乳化后作加强免疫。以后每隔 2 周加强免疫 1 次,一共 4 次。注射抗原前取兔静脉血 1.5mL 作空白血清。最后一次加强免疫后 5d,动脉取血,于室温静置 1h,4 静置 3h,取上清,与沉淀血块经 1000r·min⁻¹离心 10min 后的上清一起,加入 0.1%的叠氮钠,-20 存放备用。

抗血清的效价检测及鉴定:凝胶双扩散试验检测抗血清的效价。倒 1.25%的琼脂平板(含盐 1.0%),稀释抗体,梅花孔型点样。中央孔加纯化的 GST-IGF 作抗原,周围孔加按倍比稀释的抗血清,置湿盒中 37 孵育 18~24h 后观察结果,具体方法见杨廷彬等^[19]。并用同法观察抗血清与本实验室制备保存的酵母中表达的重组草鱼 IGF-I 和重组鲤鱼生长激素 GH 的反应。

2 结果

2.1 pGEX-IGF 融合蛋白表达载体的构建

以草鱼 IGF^r cDNA 质粒 pUC gIGF₇ 为模板,经 PCR 扩增回收大小约 230 bp 的扩增片段。该扩增片段经 EcoR 和 SalI 双酶切,定向插入经同样双酶切的融合蛋白表达质粒 pGEX-4T-1 中,转化大肠杆菌 BL21 菌株,LB-Amp 板培养过夜。挑选 6 个菌落,提取质粒,分别用 EcoR I 和 Sal I 双酶切和电泳,证实有 5 个质粒具有约 230bp 的插入片段(图 1),具有较高的重组率。利用 pGEX 质粒的 1 对测序引物对质粒 pGEX-IGF₄ 进行测序,其结果与预期的完全一致,即插入片段包括编码草鱼 IGF^r 成熟肽的序列、1 个起始密码子 ATG 以及 2 个终止密码子 TAG 和 TAA,且插入片段与 GST 之间读码框架正确。

2.2 重组质粒 pGEX-IGF₄ 在 BL21 中的表达

转化空质粒 pEGX-4T-1 的对照菌株可诱导表达分子量为 26 kD 特异蛋白(GST 片段),转化重组质粒 pGEX-IGF₄ 的 BL21 菌株则诱导表达了分子量约 34 kD 的特异蛋白带,与预期的 GST-IGF 的蛋白分子量大小相吻合,同时在 26 kD 处的蛋白带消失了,说明插入的外源基因与 GST 所形成的融合基因成功地在大肠杆菌中表达(图 2)。

同时进行的 30 和 37 温度的诱导试验显示,两种温度诱导的目的蛋白的表达量没有明显差异

(图 2),但 30 诱导的表达产物主要以可溶性形式存在,而 37 的则主要以包涵体形式存在。37 诱导不同时间的 GST-IGF 表达量,也不存在明显的差异。此外还随机挑选了 5 个阳性菌株进行诱导,未发现不同菌株间表达量的明显差异。

2.3 GST-IGF 融合蛋白的纯化

取 30 诱导的菌体的超声裂解液上清经亲和层析后得到高纯度的 GST-IGF 表达蛋白,面积定量扫描表明纯化的 GST-IGF 已达电泳纯(图 2)。

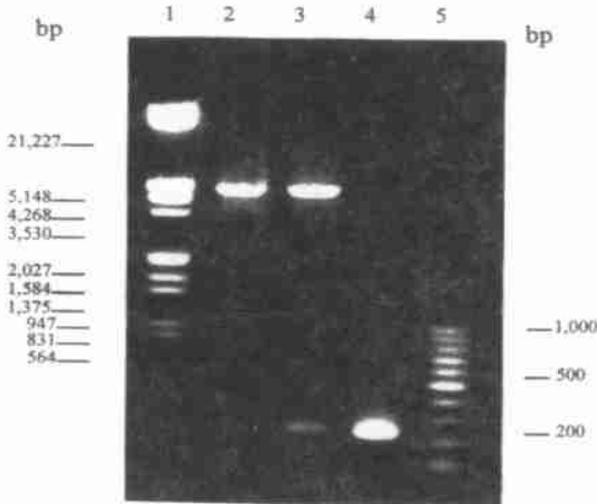


图 1 重组质粒 pGEX-IGF₄ 酶切鉴定的电泳结果

Fig.1 Identification of recombinant expression plasmid pGEX-IGF₄ by restriction digestion

1. DNA/ EcoR + Hind 标记;
 2. 质粒 pGEX-4T-1/ EcoRI + SalI;
 3. 重组质粒 pGEX-IGF₄/ EcoRI + SalI;
 4. PCR 产物;
 5. 100bp 分子梯度标记
1. DNA/ EcoR + Hind marker; 2. pGEX-4T-1/ EcoRI + SalI; 3. pGEX-IGF₄/ EcoRI + SalI; 4. PCR products; 5. 100bp ladder marker

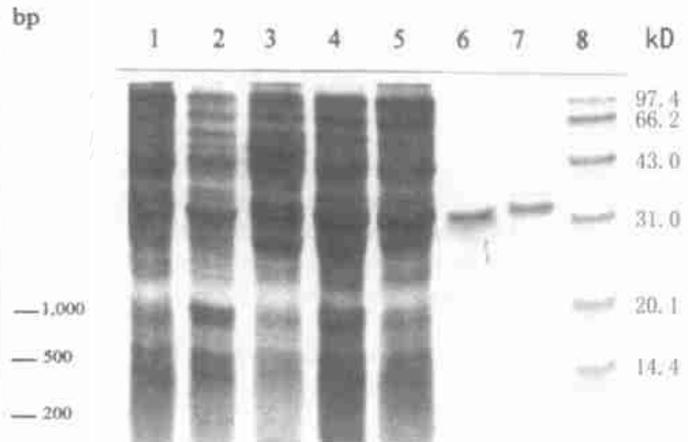


图 2 pGEX-IGF₄ 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression products of pGEX-IGF₄

1. BL21 菌株;
 2. pGEX-IGF₄ 未诱导;
 3. 空载体诱导;
 - 4,5. pGEX-IGF₄ 37 和 30 诱导;
 6. 亲和纯化的 GST-IGF;
 7. 包涵体复性;
 8. 标准蛋白分子;
1. BL21; 2. pGEX-IGF₄ before inducing; 3. pGEX-4T-1 induced; 4,5. pGEX-IGF₄ induced at 37 and 30; 6. GST-IGF purified; 7. renature of the inclusion body; 8. Low molecular weight protein marker

2.4 GST-IGF 抗血清制备及其效价检测

以纯化后的 GST-IGF 为抗原免疫兔子获得 GST-IGF 抗血清。琼脂双向扩散实验显示抗血清与抗原发生作用,18h 后出现单一、清晰的沉淀线,对照血清则没有出现沉淀线,表明得到了高质量的 GST-IGF 抗体,其效价达 1 64。抗血清与在酵母表达的重组草鱼 IGF-I 也出现了沉淀线,而与重组鲤鱼 GH 则没有反应,说明抗血清不但对 GST-IGF 具有抗性,对草鱼 IGF-I 也具有特异的抗性。

3 讨论

本实验构建的表达质粒 pGEX-IGF₄ 转化 BL21 菌株,在 30 和 37 条件下经 IPTG 诱导均可稳定表达融合蛋白;37 诱导 3h 即可达到较好的表达效果,增加诱导时间并没有明显提高表达量,这可能是由于宿主菌蛋白酶量随着诱导时间的延长而增加,对表达蛋白产生降解作用所致。一般认为诱导形成包涵体的融合表达产量较高^[20,21],但本实验以 30 和 37 温度诱导获得的可溶性产物和包涵体形式的产量没有明显差异,其原因可能与不同的融合蛋白分子、宿主菌及诱导培养条件有关^[11]。

草鱼 IGF-I 为单链多肽,含有 3 对二硫键。若表达产物以包涵体的形式为主,则蛋白分子需经历变性和复性处理,此过程极易造成二硫键的错配,而蛋白质的活性与二硫键的正确配对相关,错配会造成

生物活性的严重下降^[21]。因此采用 BL21 菌株进行 GST-IGF 的融合表达时以 30 诱导表达,产物既为可溶性、免去了溶解复性等步骤且产量也不比 37 形成包涵体时的低,对下一步的亲纯化,并利用凝血酶酶切 GST-IGF 产生具有生物活性的 IGF 等极为有利。华益民等用蛋白免疫印迹法显示所表达的 GST-IGF 能分别与兔抗鲑 IGF 和兔抗 GST 多克隆抗体反应,说明其具有免疫活性^[15];本试验则用所表达的 GST-IGF 经过亲和层析获得的高纯度产物作为抗原,获得 GST-IGF 抗血清,证明其具有免疫原性。由于没有天然的草鱼 IGF-I,本实验采用酵母表达的重组草鱼 IGF-I 来检验抗血清的特异性,而不用 pBV220 载体表达的草鱼 IGF-I,因为后者也是由大肠杆菌表达,易产生交叉反应。草鱼 IGF-I 的分子量较小,通常小分子肽的免疫原性较弱,由于与 GST 融合,且免疫时使用了佐剂,故获得了较好的免疫效果。GST-IGF 抗血清的获得,将为下一步的 IGF-I 及其受体在组织中的定位、含量的变化、作用方式及对生长和繁殖等的调节机制的研究提供专一的蛋白探针。

参考文献:

- [1] 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]. Gen Comp Endocrinol, 1999,116(3):445 - 460.
- [2] Schmid A C, Naf E, Kloas W, et al. Insulin-like growth factor-I and -II in the ovary of a bony fish, *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: *in situ* hybridisation, immunohistochemical localisation, Northern blot and cDNA sequences[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999,156(1 - 2):141 - 149.
- [3] 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]. Mol Reprod Dev,1999,54(4):348 - 361.
- [4] Planas J V, Mendez E, Banos N, et al. Insulin and IGF-I receptors in trout adipose tissue are physiologically regulated by circulating hormone levels[J]. J Exp Biol, 2000,203(7):1153 - 1159.
- [5] Li W S, Lin H R. Effects of sex steroid on the pituitary of common carp[J]. Acta Zool Sin,2000,6(2):175 - 182. [李文笙,林浩然. 性类固醇激素对鲤鱼脑垂体生长激素基因表达的影响[J]. 动物学报,2000,6(2):175 - 182.]
- [6] Peter R E, Marchant T A. The endocrinology of growth in carp and related species[J]. Aquac, 1995,129(1 - 4):299 - 321.
- [7] Perrot V, Moiseeva E B, Gozes Y, et al. Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization[J]. Biol Reprod, 2000,63(1):229 - 241.
- [8] 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* metabolic effects, association with circulating IGF binding proteins, and tissue localisation[J]. Gen Comp Endocrinol, 2000,117(3):395 - 403.
- [9] Zhu M J, Wang X C, Chen J, et al. Expression of consentative sections of RD28 in *E. coli* and preparation of the antibody against RD28[J]. J Agric Biotechnol, 1999,7(3):211 - 214. [朱美君,王学臣,陈珈,等. 拟南芥质膜水通道蛋白 RD28 保守区段在大肠杆菌中的表达及其抗体的制备[J]. 农业生物技术学报,1999,7(3):211 - 214.]
- [10] Ye X, Bai J J, Jian Q, et al. Expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) insulin-like growth factor- in *E. coli* [J]. Chinese J Biochemi Molecular Biol, 2001,17(6):725 - 728. [叶星,白俊杰,简清,等. 草鱼胰岛素样生长因子- 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] Amersham Pharmacia Biotech, GST gene fusion system[M], Third Edition, Revision 2, Pharmacia Biotech, Inc. 2001,2 - 4.
- [12] Pan Shu-Mei, Hwang Guan-Bor, Liu Hung-Chi. Over-expression and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase from rice in *Escherichia coli* [J]. Bot Bull Acad Sin, 1999(40):275 - 281.
- [13] Qi M, Yu X P, Bian J F, et al. Cloning and expression of human papillomavirus type 16 L1ORF in *E. coli* [J]. Acta Academiae Medicinae Shandong,2000,38(2):117 - 119. [齐眉,于修平,卞继峰,等. HPV16L1 ORF 的基因克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 山东医科大学学报,2000,38(2):117 - 119.]
- [14] Chen J Y, Chen J C, Chang C Y, et al. Exrsrsion of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides[J]. Aquac, 2000,181:347 - 360.
- [15] Hua Y M, Lin H R. Cloning and expression in prokaryote of grass carp IGF-I cDNA[J]. Acta Zool Sin,2001,47(3):274 - 279. [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.]
- [16] Bai J J, Ye X, Li Y H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of insulin-like growth factor I cDNA from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. J Fish China,2001,25(1):1 - 4. [白俊杰,叶星,李英华,等. 草鱼胰岛素样生长因子- 基因克隆及序列分析[J]. 水产学报,2001,25(1):1 - 4.]
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [18] Robert F S, Pieter C W, Practical methods in molecular biology[M]. New York Heidelberg Berlin, Springer-Verlag, 1981,81.
- [19] Yang T B, Wang Q F. Immunology and laboratory immunology[M]. Beijing: People's Hygiene Press. 2000,105 - 108. [杨廷彬,王钦富. 免疫学及免疫学检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2000,105 - 108.]
- [20] Du M, Zhu M J, Zhang M F, et al. Expression of functional domain of calpastatin in *E. coli* and preparation of antiserum against purified GST-calpastatin. Chinese J Biochem Molecular Biol,2000,16(1):23 - 27. [杜敏,朱美君,张曼夫,等. 钙蛋白酶抑制蛋白功能结构域在大肠杆菌中的表达、纯化及其抗血清的制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2000,16(1):23 - 27.]
- [21] Xia Q C. Protein chemistry research technologies and progresses [M]. Beijing: Science Press. 1999,245 - 246. [夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 北京:科学出版社. 1999,245 - 246.]