

硫氧还蛋白促进人胰岛素样生长因子-1 在大肠杆菌中高效可溶表达

万爱妮¹, 徐栋生², 蔡燕飞², 陈 蕴², 金 坚², 李华钟^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为实现人胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 在大肠杆菌中的高效可溶表达, 获得大量具生物活性的 IGF-1。应用融合 PCR 技术构建 *trx-igf1* 融合基因, 克隆至 pET30a 载体。重组载体 pET30a-Trx-IGF-1 转化大肠杆菌 C43 (DE3), 并进行条件优化大量表达可溶性蛋白 Trx-IGF-1。利用 His 标签纯化表达产物, 对纯化蛋白进行 Western blot 与生物活性分析。构建的 pET30a-Trx-IGF-1 重组载体转化大肠杆菌 C43 (DE3) 后, 在 30 ℃ 培养条件下 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h, 获得大量以可溶形式表达的融合蛋白 Trx-IGF-1; 采用 Ni 离子亲和层析, 获得纯度达 90% 以上的融合蛋白, 经 Western blot 检测具有 IGF-1 抗原活性。生物学活性检测显示, 融合蛋白 Trx-IGF-1 能明显促进 NIH3T3 细胞增殖及细胞周期进展。本研究应用的载体蛋白 Trx, 能实现在大肠杆菌中高效可溶表达具生物活性的 IGF-1, 为包涵体蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达提供借鉴。

关键词: 胰岛素样生长因子-1; 硫氧还蛋白; 大肠杆菌 C43 (DE3); 可溶; 生物活性

中图分类号: Q 78 文章编号: 1673-1689(2019)04-0050-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.008

Thioredoxin Increases the Efficient and Soluble Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 in *E.coli*

WAN Aini¹, XU Dongsheng², CAI Yanfei², CHEN Yun², JIN Jian², LI Huazhong^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutical, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to overexpress soluble human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in *Escherichia coli* and obtain a large number of bioactive proteins. A fusion gene containing *trx* and *igf-1* was constructed via fusion of PCR technique and inserted into pET30a plasmid. Then the recombinant plasmid was transformed to *E.coli* strain C43 (DE3) and a series of conditions optimization was carried out. After purification, target protein was identified by Western blot and determined for bioactivity. Trx-IGF-1 fusion protein was high expressed in soluble form in C43 (DE3) after

收稿日期: 2016-09-19

基金项目: 国家 863 计划项目 (2014AA021003)。

* 通信作者: 李华钟 (1958—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物制药研究。E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 万爱妮, 徐栋生, 蔡燕飞, 等. 硫氧还蛋白促进人胰岛素样生长因子-1 在大肠杆菌中高效可溶表达[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 50-57.

induction with 1mmol/L IPTG at 30 °C for 5 h. The recombinant protein reached a purity above 90% by using Ni²⁺ affinity chromatography and showed a strong antigenic ability by Western blot. The biological activity assay revealed that the fusion protein Trx-IGF-1 could significantly promote the proliferation and cell cycle progression of NIH3T3 cells. The carrier protein Trx can be used to realize the high-level soluble expression of bioactive IGF-1 in *E.coli*, which provide an evidence for the soluble expression of foreign proteins in *E. coli*.

Keywords: Insulin-like growth factor-1, thioredoxin, *E.coli* C43(DE3), soluble, bioactivity

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是含有 70 个氨基酸的碱性多肽, 也被称为生长激素介质/促生长因子 (somatomedins C), 是一种结构与胰岛素类似的活性多肽^[1], 主要由肝脏产生和分泌^[2]。IGF-1 参与多种细胞生物效应, 是细胞的重要增殖调控因子, 对生长和分化有重要作用, 并影响蛋白质、碳水化合物和脂质代谢^[3]。IGF-1 还具有胰岛素代谢效应^[4], 能增加组织对胰岛素敏感性^[5], 可作为胰岛素抵抗糖尿病治疗的有效替代药物。对治疗 1 型、2 型糖尿病有重要作用。研究发现, IGF-1 在生长迟缓、神经损伤、糖尿病等疾病的治疗中有广阔的应用前景^[6]。

血液中 IGF-1 主要以无活性的复合物形式存在 (>95%), 有活性的游离 IGF-1 含量很低, 所以无法从血清中大量提取天然 IGF-1, 从而限制了其研究和治疗的应用^[7]。应用基因工程技术, 可以获得大量的有生物活性的外源蛋白, 为基础研究和临床应用提供新途径。国内外已有很多通过哺乳动物细胞^[8-9]、毕赤酵母^[10]及大肠杆菌^[11-13]等表达系统获得 IGF-1 的研究, 哺乳动物细胞和酵母表达系统, 具有较强的翻译后修饰功能, 适合真核生物基因表达, 但存在发酵成本高、表达量低、分离纯化困难等问题。

IGF-1 相对分子质量较小、不稳定, 在大肠杆菌中表达时, 易被蛋白酶降解, 且表达产物大多以包涵体形式存在, 生物活性严重受损。研究表明, 载体标签蛋白部分对 IGF-1 的原核表达起主要作用^[14-15], 选择合适的载体对表达外源基因并获得有生物活性的目的蛋白具有重要意义。我们探究了多种原核表达载体对 IGF-1 在大肠杆菌中表达的影响, 构建 9 种重组载体, 分别转入 BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 和 C43(DE3) 等 3 种表达菌株中。IPTG 诱导表达结果表明, IGF-1 在携带标签蛋白 Trx 的 pET32a 载体

上高效可溶表达 (C43), 在其他载体中一部分不表达 (如 pET20b-IGF-1), 一部分则以包涵体形式表达 (如 pET30a-IGF-1)。

为探究标签蛋白 Trx 对外源蛋白 IGF-1 在大肠杆菌中表达的影响, 我们应用融合 PCR 技术获得 Trx-IGF-1 融合基因, 构建重组载体 pET30-Trx-IGF-1 并转化大肠杆菌 C43(DE3), 以期实现具有生物活性的 IGF-1 的高效可溶表达, 进而探究标签蛋白 Trx 对 IGF-1 生物活性的影响, 为其他外源蛋白的可溶表达策略提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体及细胞 IGF-1 基因, 购自 Origene; 大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3), 购自天根生化科技有限公司; 载体及大肠杆菌菌株 Rosetta(DE3)、C43(DE3) 以及 NIH3T3 细胞由本实验室保存。

1.1.2 试剂 引物由上海生物工程有限公司合成; PrimeSTAR mix, 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 (*Kpn* I、*Sal* I 等)、T₄ DNA 连接酶、DNA marker、蛋白 marker, 购自 Fermentas 公司; 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒、卡那霉素、IPTG, 购自上海生物工程有限公司; 山羊抗人 IGF-1 多抗, 购自 Abcam 公司; HRP 标记驴抗山羊 IgG, 购自碧云天生物技术研究; Ni 离子金属亲和层析填料, 购自美国 GE 公司; IGF-1 标准品, 购自 R&D 公司; DMEM 和 FBS, 购自 Gibco 公司; CellTiter-Blue Cell Viability Assay, 购自 Promega 公司; Propidium Iodide/碘化丙啶 (PI), 购自碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 以 IGF-1 基因, 设计引物, 引入双酶切位点, 分别与 9 种带不同标签的载体连接, 构建重组载体。

1.2.2 IGF-1 在大肠杆菌中的诱导表达 挑取阳性克隆,接种于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 培养过夜,后以 1%接种体积分数转接到新鲜含 100 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 值为 0.4~0.6 时加入 IGTG (终浓度 1 mmol/L),低温、低转速 (30 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min) 诱导 6 h。SDS-PAGE 检测诱导前后菌液表达情况。

1.2.3 重组表达载体 pET30a-Trx-IGF-1 的构建 以人 *igf-1* 基因为模板,采用 PCR 方法扩增 *igf-1* 基因。以 pET32a 为模板,用 PCR 方法扩增 *trx* 基因。胶回收试剂盒纯化 PCR 产物 *trx-igf-1* 融合基因,用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切,并将酶切产物割胶回收,与同样酶切并回收纯化的 pET30a 载体用 T_4 DNA 酶连接,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中,卡那霉素抗性筛选,提取质粒,进行菌液 PCR、*Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切及测序鉴定,筛选阳性克隆,将其质粒转化至大肠杆菌 C43(DE3) 菌株中。

1.2.4 融合蛋白诱导表达 挑取阳性克隆,接种于含卡那霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 培养过夜,然后以 1%接种量转接到新鲜含卡那霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 值为 0.6 时加入 IGTG,探索不同诱导温度 (20、25、30、37 $^{\circ}\text{C}$)、诱导时间 (2、3、4、5、6、7 h) 及 IPTG 浓度 (0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5 mmol/L) 对表达的影响,确定可溶表达的最优条件。诱导表达结束后,离心收集菌体,按 1/5 加入 PBS 重悬菌体,经超声破碎后离心,收集上清和沉淀,SDS-PAGE 检测可溶性。

1.2.5 融合蛋白纯化 发酵表达 600 mL,离心收集菌体,按 1/5 加入平衡缓冲液 20 mmol/L PB、100 mmol/L NaCl、25 mmol/L 咪唑 (pH 7.2) 重悬,超声破碎,离心取上清备用。Ni 离子亲和层析柱先用平衡缓冲液平衡,上样结束,分别用 20 mmol/L PB、100 mmol/L NaCl、257.5 mmol/L 咪唑 (pH 7.2) 和 20 mmol/L PB、100 mmol/L NaCl、800 mmol/L 咪唑 (pH 7.2) 洗脱杂蛋白质和目的蛋白质,收集洗脱峰,进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.6 纯化产物的 Western blot 检测 纯化蛋白经 SDS-PAGE 分离后,电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上,经 5 g/dL 脱脂奶粉封闭 2 h,以山羊抗人

IGF-1 多抗为一抗,室温孵育 3 h, TBST 洗涤 3 次后,以 HRP 标记的驴抗山羊为二抗,室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 显色分析结果。

1.2.7 融合蛋白 Trx-IGF-1 促 NIH3T3 增殖活性 NIH3T3 细胞用 DMEM 培养基 (含体积分数 10% FBS) 配成 5×10^4 mL 细胞悬液,接种于 96 孔板,100 μL /孔,培养 24 h。0.4% 血清饥饿处理 12 h 后,向 96 孔板中分别添加不同浓度的 IGF-1 标准品和 Trx-IGF-1 (100、75、50、25、12.5、6.5、3.25、0 nmol/L),每组 6 个复孔。作用 24 h 后,每孔加 CellTiter-Blue 试剂 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,酶标仪检测样品在 560 $_{\text{nm}}$ /590 $_{\text{nm}}$ 波长处的荧光值。

1.2.8 流式细胞仪检测对 NIH3T3 细胞周期的影响 取对数生长期的 NIH3T3 细胞, 2×10^6 孔接种于 6 孔板,分为 IGF-1 阳性组、Trx-IGF-1 实验组和对照组,3 孔/组。培养 24 h 后,更换 0.4% FBS/DMEM 饥饿处理 12 h, IGF-1 阳性组加入 IGF-1 (30 nmol/L), Trx-IGF-1 实验组加入 Trx-IGF-1 (30 nmol/L),加药处理 24 h 后,以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,弃培养基,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,离心去 PBS,加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 的乙醇 -30 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,离心弃去固定液,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗细胞 2 次,加入 500 μL RNase (50 $\mu\text{g/mL}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,离心弃上清液,加入 200 μL PI (50 $\mu\text{g/mL}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min。采用流式细胞仪检测细胞周期。

2 结果与讨论

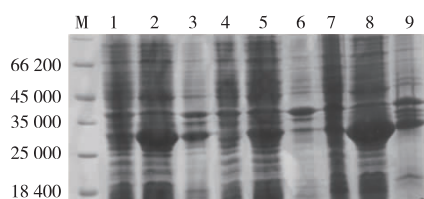
2.1 IGF-1 在大肠杆菌中的诱导表达

将 *igl-1* 基因分别与质粒 pET28a、pET20b、pET356、pET32a、pET30b、pEZZ18a、pGEX4T-1、pCold II、pMAL2X 连接,构建 9 种重组表达载体,分别转入 BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 和 C43(DE3) 等 3 种表达菌株中,诱导结果显示,pET28a-IGF-1、pET35b-IGF-1、pET32a-IGF-1、pET30a-IGF-1、pColdII-IGF-1、pMAL-2X-IGF-1 重组载体在大肠杆菌中有不同程度的表达,但只有 pET32a-IGF-1 可溶表达,且在 C43(DE3) 菌株中表达量最高 (图 1),而 pET30a-IGF-1 虽然大量表达,但表达产物以包涵体形式存在 (图 2)。

2.2 重组表达载体 pET30a-Trx-IGF-1 在 C43 (DE3) 中的表达

将 PCR 获得的 *trx-igf-1* 融合基因插入 pET30a

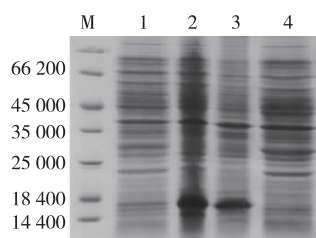
表达载体,并转化至 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆并进行测序鉴定。重组表达载体 pET30a-Trx-IGF-1 转化 C43(DE3)细胞,挑取阳性克隆,过夜活化后,按 1/100 转接至 10 mL LB/Amp⁺培养基中,37 ℃培养至对数生长期 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.6 时,加入 IGTG 诱导表达 4 h。离心收集菌体,经超声破碎,离心分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE(图 3),结果显示在相对分子质量约 25×10³ 处可见目的条带,与理论值一致,而未诱导组未见此带。目的蛋白主要存在于上清中,表明重组融合蛋白主要以可溶形式表达。



M:标准;1、4、7:未诱导全蛋白;2:BL21(DE3)诱导上清蛋白;3:BL21(DE3)诱导沉淀蛋白;5:Rosetta 诱导上清蛋白;6:Rosetta 诱导沉淀蛋白;8:C43(DE3)诱导上清蛋白;9:C43(DE3)诱导沉淀蛋白

图 1 pET32a-MIGF-1 在大肠杆菌中表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of pET32a-IGF-1 expression in *E.coli*



M:标准;1:未诱导全蛋白;2:诱导全蛋白;3:诱导沉淀蛋白;4:诱导上清蛋白

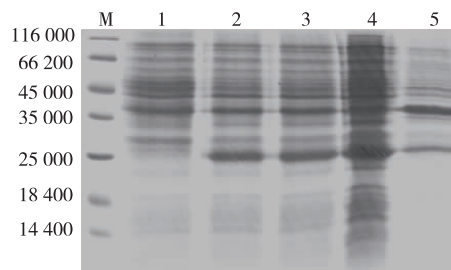
图 2 pET30a-MIGF-1 在 C43(DE3)中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of pET30a-IGF-1 expression in C43(DE3)

2.3 融合蛋白诱导表达条件优化

为确定最优表达条件,提高可溶目的蛋白表达量,我们比较了不同诱导温度(20、25、30、37 ℃)、诱导时间(2、3、4、5、6、7 h)及 IPTG 浓度(0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5 mmol/L)对表达的影响,确定可溶表达的最优条件。结果表明,30 ℃条件下,1 mmol/L IPTG 诱导 5 h,可溶性目的蛋白表达量最

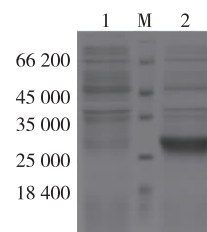
高(图 4),用 Image J 软件分析结果显示,融合蛋白表达量约占菌体总蛋白的 50%。



M:标准;1:C43(DE3)未诱导全蛋白;2、3:C43(DE3)诱导全蛋白;4:C43(DE3)诱导上清蛋白;5:C43(DE3)诱导沉淀蛋白

图 3 pET30a-Trx-IGF1 重组载体在 C43(DE3)中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pET30a-Trx-IGF-1 expression in C43(DE3)



M:标准;1:未诱导全蛋白;2:诱导全蛋白

图 4 pET30a-Trx-IGF-1 在 C43(DE3)中优化表达的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of optimizing pET30a-Trx-IGF-1 expression in C43(DE3)

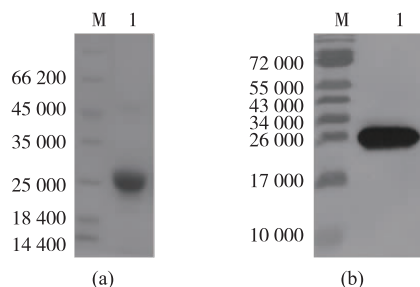
2.4 融合蛋白的纯化及 Western blot 分析

超声破碎上清经过 Ni 柱吸附后,以 20 mmol/L PB、100 mmol/L NaCl、257.5 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白,20 mmol/L PB、100 mmol/L NaCl、800 mmol/L 咪唑洗脱目的融合蛋白(图 5(a)),经 Ni 离子亲和层析柱纯化后,目的蛋白 Trx-IGF-1 的纯度达 90%以上。纯化获得的目的蛋白经 SDS-PAGE 后,用 anti-IGF-1 抗体进行 Western blot 鉴定(图 5(b)),结果显示,在相对分子质量约 25×10³ 处可见蛋白杂交带,说明获得的重组融合蛋白具有 IGF-1 抗原活性。

2.5 融合蛋白 Trx-IGF-1 促 NIH3T3 增殖活性

Cell-Titer Blue 试剂盒检测 Trx-IGF-1 对 NIH3T3 细胞增殖的影响,结果(图 6)显示,在 5、10、20、40、80 nmol/L 的浓度范围内,与对照组(0 nmol/L)相比,Trx-IGF-1 融合蛋白具有明显的促 NIH3T3 细胞增殖活性,且呈剂量依赖关系,IGF-1

标准品最高增殖率达到 $(218.59 \pm 11.22)\%$, Trx-IGF-1 融合蛋白最高增殖率为 $(192.79 \pm 11.39)\%$ 。



M: 标准; 1: Trx-IGF-1 融合蛋白

图 5 Trx-IGF-1 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 与 Western Blot 分析

Fig. 5 SDS-PAGE and Western Blot analysis of purified Trx-IGF-1

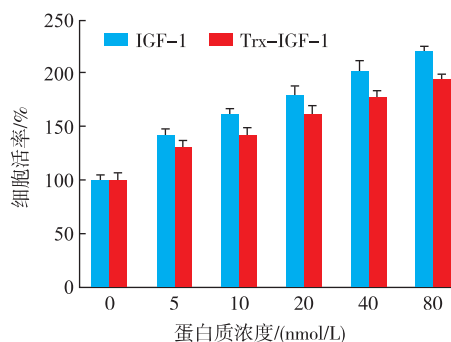


图 6 Trx-IGF-1 融合蛋白对 NIH3T3 细胞增殖的影响

Fig. 6 Effect of Trx-IGF-1 on NIH3T3 cells proliferation

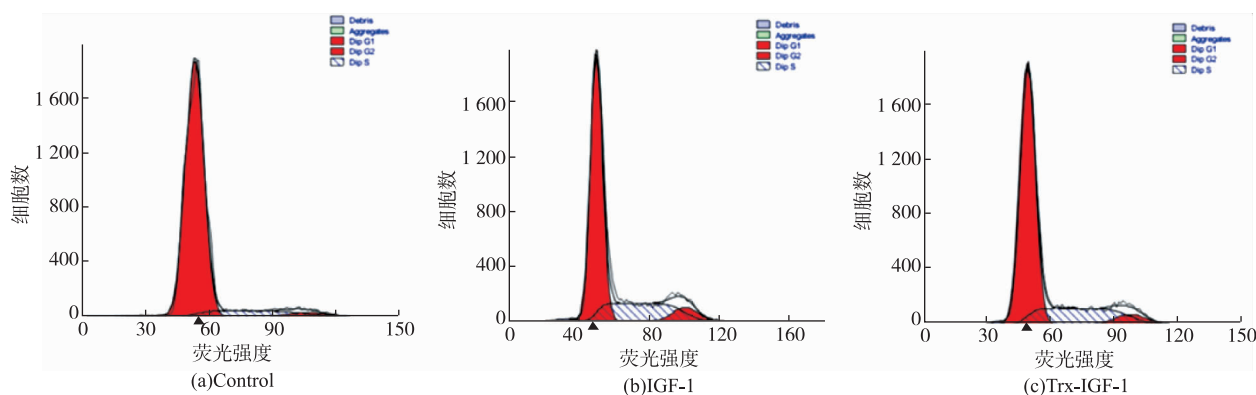


图 7 IGF-1 或 Trx-IGF-1 对 NIH3T3 细胞周期进展的影响

Fig. 7 Effect of IGF-1 or Trx-IGF-1 on NIH3T3 cell cycle progression

表 1 IGF-1 和 Trx-IGF-1 对 NIH3T3 细胞周期的影响

Table 1 Effects of IGF-1 and Trx-IGF-1 on cell cycle progression of NIH3T3 cells

组别	$G_0 \sim G_1$	S	$G_2 \sim M$	PI
对照组	87.12	10	2.88	12.88
IGF-1 阳性组	67.11	25.90	6.99	32.98
Trx-IGF-1 实验组	70.49	24.15	5.36	29.51

2.6 流式细胞仪检测对 NIH3T3 细胞周期的影响

细胞周期分析结果(图 7)表明,对照组 NIH3T3 细胞大多处于 G_0/G_1 期, 细胞增殖指数 PI 为 12.88%。IGF-1 阳性组和 Trx-IGF-1 实验组处理 NIH3T3 细胞后,与对照组相比, G_0/G_1 期的细胞百分率明显降低,S 期和 G_2/M 期细胞百分比明显增高,增殖指数(分别为 32.89%、29.51%,表 1),表明融合蛋白能明显促进 NIH3T3 细胞周期进展。

3 结语

IGF-1 是人体内一种重要的生长因子, 与胰岛素结构相似,通过内分泌、自分泌和旁分泌形式调节细胞分化和增殖,参与合成代谢,在神经细胞生长和分化^[16]、软骨发育^[17]及骨质疏松重建过程中^[18]有重要的作用。然而,从血液中获得 IGF-1 难度大,得率低,限制了早期人们对 IGF-1 纯品深入研究和临床应用推广。随着基因工程技术的发展,国内外学者应用基因重组技术在细菌、酵母和动物细胞中表达 IGF-1。

大肠杆菌表达系统是目前获得重组蛋白最简单经济的方法,现阶段关于大肠杆菌表达 IGF-1 重组蛋白的研究,国内外都有许多报道。但该系统缺乏真核生物蛋白质翻译后修饰系统,不能有效表达过长或过短的外源蛋白,二硫键形成能力有限,易错误折叠形成包涵体^[19],严重影响了外源蛋白的高

表达和高活性。

选择适宜的表达菌株,是外源蛋白高效表达的重要步骤。菌体内含有大量内源蛋白酶,易造成外源表达产物的降解。而大肠杆菌 C43(DE3)是蛋白酶缺陷型菌株,可以有效避免外源蛋白被蛋白酶降解,保持其稳定性^[20]。同时,C43(DE3)基因组含有参与毒性蛋白表达时细胞死亡途径的突变,可以高效表达毒性蛋白或疏水性蛋白^[21]。一些在 BL21(DE3)中低表达的蛋白,甚至对宿主细胞有毒性的蛋白,如球蛋白和膜蛋白,均能在 C43(DE3)中高效且低毒性表达^[22-24]。C43(DE3)是优于 BL21(DE3)的高效表达外源蛋白的理想宿主^[25]。

蛋白正确的空间折叠和二硫键配对,是保证其生物活性的基本要求。表达载体是外源基因在大肠杆菌中可溶表达的一个重要影响因素。IGF-1 相对分子质量较小,且含有二硫键,为获得正确立体结构的活性蛋白,需与可溶高表达的蛋白标签融合,进行可溶表达^[26-29]。原核表达载体主要包括 pET 系列载体、pGEX 载体和 pMAL 载体等,载体上含有各种融合标签,与外源基因形成融合蛋白^[30]。pGEX-4T-1 载体含有 GST 标签,具有对宿主菌无选择性,纯化条件温和简便等优点,但对目的蛋白分子量、电性及氨基酸种类要求严格,蛋白易形成包涵体^[31]。pMAL-2x 载体含有 BMP 标签,由于胞质中蛋白水解酶对融合蛋白的降解作用,表达的融合蛋白通常低于理论分子量,且融合蛋白易错误折叠形成包涵体,不能正常分泌^[32]。

pET 系列载体是目前应用最广泛的原核表达载体,本实验结果表明,各种融合载体蛋白系统中,

pET32a 的硫氧还蛋白标签,能帮助外源基因高效可溶表达。硫氧还蛋白 Trx 是一种常见的氧化还原小分子蛋白(相对分子质量为 12×10^3),其保守的活性位点结构为-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-,具备氧化还原活性,可编码硫氧还蛋白,催化蛋白质二硫键还原,帮助蛋白质正确折叠^[33]。同时,Trx 作为大肠杆菌自身蛋白,在菌体中易折叠,应用 Trx 融合表达,可在大肠杆菌中获得高产量的可溶性融合蛋白^[34-36]。HARTWIGA 等^[37]应用 Trx 融合及真核序列密码子优化,实现广藿香醇合成酶在大肠杆菌中的可溶表达,表达量提高 42%,且融合蛋白仍保持酶活。

pET30a-IGF-1 在大肠杆菌中主要以包涵体形式表达,我们通过构建融合表达载体 pET30a-Trx-IGF1,转化至大肠杆菌 C43(DE3)中,经 30℃ 诱导表达,实现融合蛋白的高效可溶表达,目的蛋白约占菌体总蛋白的 50%。利用融合蛋白 N 端 His-tag 标签,经 Ni 离子亲和色谱柱纯化,获得纯度较高且具有 IGF-1 免疫源性的融合蛋白。在 IGF-1 的 N 端融合 Trx 有助于 IGF-1 的正确折叠,获得大量可溶的 Trx-IGF-1 融合蛋白。生物学活性测定实验证明,融合蛋白具有明显的促 NIH3T3 细胞增殖及细胞周期进展的生物活性。与阳性对照相比,Trx-IGF-1 融合蛋白促 NIH3T3 相比增殖活性有些许降低(约 12%),可能是由于融合蛋白分子量变大,Trx 通过空间位阻影响 IGF-1 与其受体结合,但未影响 IGF-1 信号传导。本实验表明,硫氧还蛋白促进 IGF-1 在大肠杆菌中的高效可溶表达,为 IGF-1 生产工艺及药学研究等奠定基础,同时为包涵体蛋白在大肠杆菌中的可溶表达提供一定的借鉴。

参考文献:

- [1] DAUGHADAY W H, ROTWEIN P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations[J]. *Endocrine Reviews*, 1989, 10(1): 68-91.
- [2] PHILLIPS L S, HARPA J B, GOLDSTEIN S, et al. Regulation and action of insulin-like growth factors at the cellular level [J]. *Proceedings of the Nutrition Society, Proceedings of the Nutrition Society*, 1990, 49(3): 451-458.
- [3] DEREK LeROITH, CHARLES T ROBERTS Jr. Insulin-like Growth Factors [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 692: 1-9.
- [4] CAROLYN A B, LOUIS E U, DAVID R C, et al. Clinical uses of insulin-like growth factor I [J]. *Annals of Internal Medicine*, 1994, 120(7): 593-601.
- [5] MOSES A C, YOUNG S C, MORROW L A, et al. Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes[J]. *Diabetes*, 1996, 45(1): 91-100.
- [6] COHEN P. Overview of the IGF-I system[J]. *Hormone Research*, 2006, 65(Suppl 1): 3-8.
- [7] CHRISTOF S. Insulin-like growth factors[J]. *Cell Biology International*, 1995, 19(5): 445-457.

- [8] MCKINNON P,ROSS M,WELLS J R,et al. Expression,purification and characterization of secreted recombinant human insulin-like growth factor-I(IGF-I) and the potent variant des(1-3)IGF-I in Chinese hamster ovary cells[J]. 1991,6(3):231-239.
- [9] ZHOU H B,ZHENG Z G,DONG Q R,et al. Establishment of CHO cell line stably expressing insulin like growth factor-1[J]. **Jiangsu Medical Journal**,2007,33(1):52-54.(in Chinese)
- [10] LI Y Y,WU S G,OUYANG J L,et al. Expression of insulin-like growth factor-1 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in yeast *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**,2012,84(1):80-85.
- [11] HAMIDREZA I,ESKANDAR O,VENUS V. Expression of recombinant human insulin-like growth factor type 1 (rhIGF-1) in *Escherichia coli*[J]. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**,2015,7(3):101-105.
- [12] MARK G O,MARY A T. Secretion and export of IGF-1 in *Escherichia coli* strain JM101[J]. **Mol Gen Genet**,1988,215(1):19-25.
- [13] EDITH Y W,RAMNATH S,CLAIRE E K,et al. Expression of secreted insulin-like growth factor-1 in *Escherichia coli* [J]. **GENE**,1988,68(2):193-203.
- [14] HU Ming,LI Boliang. Immunogenic structure of highly expressed hIGF- I varied with different carrier proteins [J]. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**,1994(5):469-475.(in Chinese)
- [15] LIU Baoying,ZHAO Ming. Expression of human insulin like growth factor I in *E.coli*[J]. **Chinese journal of Biochemistry and Molecular Biology**,1998,14(1):47-51.(in Chinese)
- [16] WEN Jianfeng,QIAN Suokai. The neuroprotective effect of IGF-1 in brain injury [J]. **Jiangxi Medical Journal**,2006,41(11):926-928.(in Chinese)
- [17] JENISKENS Y M,KOEVOET W,bart A C W D,et al. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1,TGFβ2 and FGF2[J]. **Osteoarthritis and Cartilage**,2006,14(11):1136-1146.
- [18] LUO Yun,CUI Liqun,YANG Hui,et al. Research progress on the relationship between IGF-1 and osteoporosis [J]. **Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine**,2014,26(8):876-878.(in Chinese)
- [19] DONG Xu,XIN Yi. Strategies for soluble expression of recombinant protein in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Dalian Medical University**,2007,48(4):393-395.(in Chinese)
- [20] 李欢. 香蕉凝集素 BanLec1 的原核表达及活性分析[D]. 南京:南京农业大学,2014.
- [21] LAURENCE D S,LAURENCEL V,GUILLAUME C,et al. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*:a comparison of overexpression in BL21 (DE3),C41 (DE3),and C43 (DE3) [J]. **Protein Expression and Purification**,2004,37(1):203-206.
- [22] ARECHAGA I,MIROUX B,RUNSWICK M J,et al. Over-expression of *Escherichia coli* F1Fo-ATPase subunit a is inhibited by instability of the uncB gene transcript[J]. **FEBS Letters**,2003,547(1):97-100.
- [23] SØRENSEN H P,SPERLING-PETERSEN H U,MORTENSEN K K. Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*:completion of protein synthesis is the bottleneck [J]. **Journal of Chromatography. B:Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**,2003,786(1-2):207-214.
- [24] WAGNER S,KLEPSCH M M,SCHLEGEL S,et al. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression [J]. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**,2008,105(38):14371-14376.
- [25] MIROUX B,WALKER J E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*:mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels[J]. **J Mol Biol**,1996,260:289-298.
- [26] BIS R L,STAUFFER T M,SFNGH S M,et al. High yield soluble bacterial expression and streamlined purification of recombinant human interferon a-2a[J]. **Protein Expression and Purification**,2014,99:138-146.
- [27] PECIAK K,TOMMASI R,CHOI J W,et al. Expression of soluble and active interferon consensus in SUMO fusion expression system in *E. Coli*[J]. **Protein Expression and Purification**,2014,99:18-26.
- [28] WANG Jue,WANG Dan,ZHANG Bing,et al. Overexpression of Rh α mucor miehei lipase and activity assay [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(12):1262-1268.(in Chinese)
- [29] ZHAO Shancheng,WANG Zhen,CHENG Yongmei,et al. Soluble expression and purification of the SUMO heparinase I fusion enzyme[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(3):318-323.(in Chinese)
- [30] NING Junkai,YU Changxi. Progress in the preparation of insulin like growth factor -1 (IGF-1) [J]. **Strait Pharmaceutical**

- Journal**, 2012, 24(6): 8-12. (in Chinese)
- [31] ZHOU Yuxun, WEI Dongzhi, WANG Erli. Fusion protein expression vector pGEX and its application [J]. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, 1998, 10(3): 122-124. (in Chinese)
- [32] AMJAD A, STEPHAN P, KAUSAR H S, et al. Comparison of periplasmic and intracellular expression of Arabidopsis thionin proproteins in *E. Coli*[J]. **Biotechnology Letters**, 2013, 35(7): 1085-1091.
- [33] FLORENCE K, GLEASON, ARNE H. Thioredoxin and related proteins in procaryotes [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1988, 54(4): 271-297.
- [34] TENNO, TAKESHI, GODA, et al. High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling[J]. **Protein Engineering Design & Selection**, 2004, 17(4): 305-314.
- [35] CHANG S K, SEUNG Y S, IN S B. Biologically active and C-amidated hinnavinII-38-Asn produced from a Trx fusion construct in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Microbiology**, 2008, 46(6): 656-661.
- [36] LI Min, YANG Qing, BAO Yongming, et al. Fusion expression and purification of glosedobin, a thrombin-like enzyme from *Glycybus shedaoensis* in *E. Coli*[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2003, 22(2): 22-25. (in Chinese)
- [37] HARTWIGA S, FRISTERA T, ALEMDARA S, et al. Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2014, 97: 61-71.

会 议 消 息

会议名称: 2019 年第六届生物与化学研究进展国际学术会议(ICABC 2019)

会议地点: 中国南京理工大学

会议时间: 2019 年 6 月 24-26 日

主要亮点:

1. 著名学者教授做大会报告人:

陈生明教授, 来自国立台北科技大学;

刘孝恒教授, 来自中国南京理工大学;

骆碧秀教授, 来自台湾长庚大学;

华国媛副教授, 来自国立台北科技大学。

2. 考察

将于 2019 年 6 月 26 日在南京组织半日学术访问与市内半日游。

3. 出版及检索

被录用且注册成功的文章将发表在: International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (IJBBB, ISSN: 2010-3638) 期刊, 能被 Electronic Journals Library, Chemical Abstracts Services (CAS), Engineering & Technology Digital Library, Google Scholar, and ProQuest 检索; International Journal of Chemical Engineering and Applications (IJCEA, ISSN: 2010-0221) 期刊, 能被 Chemical Abstracts Services (CAS), Ulrich's Periodicals Directory, CABI, DOAJ, Electronic Journals Library, Google Scholar, Engineering & Technology Digital Library, ProQuest, and Crossref 检索。

会议网站: <http://www.icabc.org/>.

联系人: 刘女士

邮箱: icabc@chees.net

电话: +852-3500-0137 (中国香港)

+1-206-456-6022 (美国)

+86-28-86528465 (中国大陆)