

# 基于蛋白质结构预测的胰岛素样生长因子-1 的制备及活性分析

谢倩<sup>1,2#</sup>, 李冠霖<sup>2#</sup>, 李颖<sup>1</sup>, 李佳楠<sup>1</sup>

1 江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056

2 武汉海特生物制药股份有限公司技术中心, 湖北 武汉 430056

谢倩, 李冠霖, 李颖, 李佳楠. 基于蛋白质结构预测的胰岛素样生长因子-1 的制备及活性分析. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2259-2268.

XIE Q, LI GL, LI Y, LI JN. Preparation and activity evaluation of insulin-like growth factor 1 based on protein structure prediction. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2259-2268.

**摘要:** 为了更经济高效地制备胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1), 本研究采用计算机模拟技术对 3 种 IGF-1 融合蛋白进行蛋白质结构预测与分子对接, 筛选出酶切最适配的 IGF-1 融合蛋白表达形式。利用基因工程技术构建并鉴定了 IGF-1 融合蛋白原核表达载体, 并转化大肠杆菌 Origami B(DE3) 菌株, 获得重组子; 经异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导表达后, 对菌体的破菌上清进行亲和层析、脱盐、凝血酶酶切及酶切产物亲和层析纯化得到目的蛋白; 通过 3T3 细胞增殖法建立活性评价体系并对获得的 IGF-1 进行活性测定。结果显示, 构建的 IGF-1 融合蛋白原核表达载体序列正确, 获得的重组子在 25 °C、0.05 mmol/L IPTG 诱导 16 h 时融合蛋白为可溶性表达, 经初步纯化、凝血酶酶切、再次纯化后可获得纯度大于 90% 的 IGF-1 目的蛋白, 在建立的活性评价体系下测得制备的 IGF-1 比活为  $2.47 \times 10^5$  U/mg, 与市售标准品接近。本研究建立了一条用于制备 IGF-1 的完整工艺路线, 为 IGF-1 药物的研制及工业化生产奠定基础。

**关键词:** 胰岛素样生长因子-1; 虚拟预测; 基因重组; 活性分析

**Received:** September 17, 2021; **Accepted:** December 14, 2021; **Published online:** December 27, 2021

**Supported by:** Graduate Research and Innovation Fund of Jiangnan University, China (20HG005)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**Corresponding author:** LI Jia'nan. E-mail: lijianan@jhun.edu.cn

**基金项目:** 江汉大学研究生科研创新基金项目 (20HG005)

# Preparation and activity evaluation of insulin-like growth factor 1 based on protein structure prediction

XIE Qian<sup>1,2#</sup>, LI Guanlin<sup>2#</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, LI Jia'nan<sup>1</sup>

1 School of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China

2 Technology Center, Wuhan Hiteck Biological Pharma Co., Ltd., Wuhan 430056, Hubei, China

**Abstract:** In order to prepare insulin-like growth factor 1 (IGF-1) more economically and efficiently, the structure prediction and molecular docking of three IGF-1 fusion proteins were performed by computer simulation. The most suitable expression form of IGF-1 fusion protein was screened out. A prokaryotic expression vector of IGF-1 fusion protein was constructed and transformed into *Escherichia coli* Origami B(DE3) strain to obtain the recombinant strain. After induction with IPTG, the target protein was purified from the soluble fractions of the bacteria cell lysate by affinity chromatography, desalination, thrombin digestion and affinity chromatography of the enzyme digested products. An activity evaluation system was established by 3T3 cell proliferation method and the activity of the obtained IGF-1 was measured. The results showed that the sequence of the IGF-1 fusion protein prokaryotic expression vector was correct and the fusion protein was soluble upon 0.05 mmol/L IPTG induction at 25 °C for 16 h. After preliminary purification, thrombin digestion and re-purification, IGF-1 target protein with purity over 90% was obtained. Using the established activity evaluation system, the specific activity of IGF-1 was  $2.47 \times 10^5$  U/mg, which was close to the standard product available at the market. The preparation technology of IGF-1 developed in this study may facilitate the development and industrial production of IGF-1 drugs.

**Keywords:** insulin like growth factor-1 (IGF-1); virtual prediction; genetic recombination; activity evaluation

胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 是人体内一种具有促进细胞生长、发育和增殖作用的多功能调控因子<sup>[1]</sup>, 人体内有十几种细胞均可以旁分泌、自分泌或内分泌的方式产生 IGF-1<sup>[2]</sup>, 其在机体许多重要的合成和代谢反应中都发挥着不可或缺的作用。目前, 重组人生长激素作为治疗儿童生长障碍的临床一线常用药物, 其可以作用于几乎全部的细胞和组织, 包括骨骼系统、脂肪组织、免疫系统和生殖系统<sup>[3-5]</sup>。生长激素最重要的作用就是促进个体的生长发育, 使各组织和器官正常运行, 在人体正常生长发育的过程中起关键性作用。原发性 IGF-1 缺乏综合征是一种由生

长激素受体突变<sup>[6]</sup>或生长激素受体信号级联中缺陷<sup>[7]</sup>导致的儿童生长发育障碍的罕见疾病, 临床表现为儿童成长期身材矮小<sup>[8]</sup>和生长激素抵抗<sup>[9]</sup>。患者通常不能对内源性或外源性的生长激素作出反应, 因此补充外源性生长激素对原发性 IGF-1 缺乏综合征的患者无促生长作用, 使用重组人 IGF-1 替代治疗是现阶段唯一一种有效的治疗手段<sup>[10-11]</sup>, 但人 IGF-1 存在着血液提取成本大、制备难等特点<sup>[12-13]</sup>, 因此在我国尚无成品药上市, 应用十分受限。近年来, 蛋白质结构预测已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术<sup>[14]</sup>, 利用计算机模拟分子间的互作具有经济高效的特点<sup>[15]</sup>, 进而可以大大缩

短药物的研发周期。文中采用蛋白质结构预测技术筛选出蛋白酶最适配的融合蛋白,再通过基因工程的方法得到高纯度、高活性的 IGF-1 目的蛋白,为大规模工业化制备 IGF-1 奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌株、细胞

IGF-1-pET-48b(+)(*Sac* I/*Hind* III) 穿刺菌购自金斯瑞生物科技有限公司, pET-32a(+) 质粒购自武汉森灵生物科技有限公司, 表达菌株 Origami B(DE3)、3T3 细胞由本公司保存。

#### 1.1.2 试剂

DNA markers、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Msc* I、*Eco*R V 购自宝生物工程(中国)有限公司; 5×HF 缓冲液、Phusion DNA 聚合酶购自 Thermo 公司; 凝血酶购自 Solarbio 公司; IGF-1 单克隆抗体购自 Abcam 公司; IGF-1 标准品购自金斯瑞生物科技(中国)股份有限公司; 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 双抗购自 Hyclone 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 融合蛋白与相应蛋白酶的虚拟筛选

根据用酶成本及酶切后是否含有多余氨基酸残留选择凝血酶及肠激酶两种酶切方案,并利用含有以上酶切位点的不同 pET 系列载体构建重组表达载体,最终设计出了 pET32-thrombin-IGF-1、pET32-enterokinase-IGF-1、pET40-enterokinase-IGF-1 三种融合蛋白;使用 PSIPRED 在线预测服务器对不同融合蛋白的

二级结构进行预测,再根据二级结构预测结果使用 I-TASSER 在线预测服务器进行三级结构预测,进入 Cluspro 在线预测服务器根据三级结构及不同的蛋白酶分别进行分子对接,统计正确酶切概率,并以 50%作为成功酶切的阈值。

#### 1.2.2 IGF-1 融合蛋白原核表达载体的构建及重组子筛选

根据大肠杆菌密码子偏好性、简并性、GC 含量及合适的限制性内切酶等因素,设计用于表达 IGF-1 融合蛋白的基因序列,PCR 扩增得到目的基因片段,其中带有 IGF-1 基因序列的质粒 IGF-1-pET-48b(+)(*Sac* I/*Hind* III) 为全基因合成,设计表 1 引物进行 PCR 扩增。

扩增产物经 *Msc* I 与 *Eco*R V 双酶切后,连接到经同样双酶切的 pET-32a(+) 表达载体上,构建 pET32a-thrombin-IGF-1 重组表达载体(图 1),再转化大肠杆菌表达菌株 Origami B(DE3),在含有 50 μg/mL 氨苄青霉素(Amp)、15 μg/mL 卡那霉素(Kan)以及 12.5 μg/mL 四环素(Tet)的 LB 培养基上,37 °C 培养筛选重组子,经 PCR、酶切鉴定正确后送测序,并妥善保存。

#### 1.2.3 IGF-1 融合蛋白的诱导表达

将甘油冻存的重组工程菌接种于 100 mL 的 LB 抗性培养基中,37 °C 振荡过夜培养,活化重组工程菌;再按照 2%的接种量转接至 800 mL 的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养约 3 h,当  $OD_{600}$  值为 0.7–0.8 时,加入 0.05 mmol/L 的 IPTG 于 25 °C 诱导表达 16 h,离心收集菌体,加入破菌缓冲液超声破菌,经 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 检测分析。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer names           | Primer sequences (5'→3')   | Size (bp) |
|------------------------|--|-----------|
| pET32-thrombin-IGF-1-F | TGGCCATATGCACCATCATCATCATCTTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTC<br>CGGAGACC | 61        |
| pET32-thrombin-IGF-1-R | GATATCTCATTACGCGCTTT   | 20        |

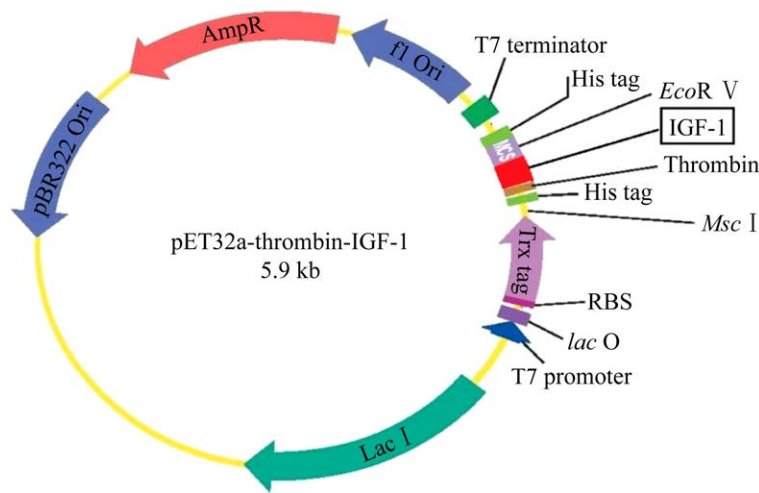


图 1 pET32-thrombin-IGF-1 质粒构建图

Figure 1 Plasmid map of pET32-thrombin-IGF-1.

#### 1.2.4 IGF-1 的分离纯化及酶切

使用 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.8 的缓冲液平衡 HisTrap FF 亲和层析柱, 取用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的破菌上清液上样, 用 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.8 的缓冲液洗脱, 用 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA), pH 7.8 的缓冲液再生, 再用 500 mmol/L NaOH 清洗, 以上流速均为 1 mL/min, 将收集的各峰进行 SDS-PAGE 检测; 将咪唑洗脱样品脱盐后按照凝血酶: 融合蛋白=1 U: 100  $\mu\text{g}$  的比例在 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT), pH 7.8 的酶切缓冲液中 25  $^{\circ}\text{C}$ 、摇床酶切 16 h; 此时酶切产物应含带有 His 标签的 IGF-1 融合蛋白与酶切产生的前半段肽链, 以及不含 His 标签的 IGF-1 目的蛋白, 根据 IGF-1 目的蛋白不挂 Ni 柱这一特点将酶切样品再次进行亲和层析从而达到去除未酶切的融合蛋白和酶切产生的前半段肽链的目的, 酶切产物亲和层析的平衡液为 20 mmol/L

Tris, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 1% Tween 20, pH 7.8, 洗脱液为 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, 1% Tween 20, pH 7.8, 再生液为 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 30 mmol/L EDTA, pH 7.8, 将收集的各峰进行 SDS-GAGE 检测, 流穿样品进行反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 纯度鉴定, 其中色谱柱为 Agilent C8 (4.6 mm $\times$ 250 mm 5  $\mu\text{m}$  粒径 300  $\text{\AA}$  孔径), 流动相 A 相为 0.1%三氟乙酸+100%纯水, B 相为 0.1%三氟乙酸+100%乙腈, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 214 nm, 梯度洗脱如表 2 所示。

表 2 RP-HPLC 梯度洗脱表

Table 2 Gradient elution of RP-HPLC

| Time (min) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0          | 85    | 15    |
| 10.00      | 85    | 15    |
| 12.00      | 70    | 30    |
| 32.00      | 60    | 40    |
| 32.01      | 30    | 70    |
| 38.00      | 30    | 70    |
| 38.01      | 85    | 15    |
| 50.00      | 85    | 15    |

### 1.2.5 利用 3T3 细胞检测 IGF-1 的活性

有研究表明, IGF-1 对 3T3 细胞有较显著的增殖作用, 且 IGF-1 的刺激作用呈现一定的剂量依赖性, IGF-1 的浓度越高对细胞的刺激增殖作用越大, 而当达到一定剂量以后, 其促进作用不再增加<sup>[16-17]</sup>。根据 IGF-1 可促进 3T3 细胞增殖这一特性通过 3T3 细胞增殖法和 MTS 比色法建立 IGF-1 体外细胞活性检测体系, 在检测条件为铺板细胞密度  $1 \times 10^4$  /mL, 初始、铺板及维持培养基血清浓度分别为 4%、2% 和 1%, IGF-1 样品初始浓度为 1 000 ng/mL, 3 倍梯度稀释的条件下培养细胞并绘制 IGF-1 的四参数回归曲线, 根据购得的金斯瑞 IGF-1 标准品的说明书, 其比活大于  $2 \times 10^5$  U/mg, 将市售 IGF-1 标准品比活定为  $2 \times 10^5$  U/mg, 以此为标准, 由以下公式计算样品的生物学活性。

样品的生物学活性(U/mL)=Pr×Ds×Es/Dr/Er/C

式中: Pr 为标准品的生物学活性(U/mL); Ds 为样品的预稀释倍数; Es 为样品的半效稀释倍数; Dr 为标准品的预稀释倍数; Er 为标准品的半效稀释倍数; C 为样品的蛋白浓度(mg/mL)。

## 2 结果与分析

### 2.1 融合蛋白与相应蛋白酶的虚拟筛选结果

三种融合蛋白的二级结构及分子对接预测结果如表 3 所示, 其中使用 pET32-thrombin-IGF-1 载体所表达的融合蛋白被凝血酶特异性

切割的效率最高, 为 62.1% (大于 50%), 因此认为 pET32-thrombin-IGF-1 载体所表达的融合蛋白能被凝血酶特异性切割, 而其他 2 种融合蛋白被相应的蛋白酶特异性的酶切效率均小于 50%, 不能被相应蛋白酶成功酶切。

### 2.2 IGF-1 重组质粒构建及鉴定结果

#### 2.2.1 IGF-1 目的片段 PCR 扩增结果

将全基因合成的 IGF-1-pET-48b(+) (*Sac* I / *Hind* III) 质粒作为模板对目的基因片段进行 PCR 扩增, 结果如图 2 所示, 泳道 1、2、3、4 均为目的基因的扩增产物, 可看到扩增产物大小为 271 bp 左右, 与预测的目的基因片段大小一致, 泳道 5 为空白对照, 无扩增条带, 证实目的基因片段成功扩增。

#### 2.2.2 重组质粒鉴定结果

将扩增的 IGF-1 目的基因片段与 pET-32a(+) 质粒双酶切后连接转化, 挑取单菌落在含有氨苄抗性的 LB 培养基中 37 °C 培养 16 h, 抽提质粒进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 再对重组质粒进行 PCR 扩增, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3A 所示, 泳道 1 扩增片段大小为 271 bp, 与目的基因片段大小一致, 空白对照基因组 DNA 模板无扩增产物, 与预期结果相符。将重组质粒使用 *Msc* I 与 *Eco*R V 进行双酶切, 并使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测显示 (图 3B), 泳道 1 显示有两条带, 证明重组质粒成功被内切酶切开, 其中小片段分子量大小与预期的分子量 271 bp 大小一致, 而阴性对照未被切开。

表 3 不同融合蛋白的虚拟预测结果

Table 3 Virtual prediction of different fusion proteins

| Fusion proteins          | $\alpha$ -helix (%) | $\beta$ -pleated sheet (%) | Proteases    | Enzyme digestion efficiency at the correct site (%) |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|--------------|---|
| pET32-thrombin-IGF-1     | 22.2                | 25.9                       | Thrombin     | 61.1  |
| pET32-enterokinase-IGF-1 | 25.9                | 22.2                       | Enterokinase | 14.7  |
| pET40-enterokinase-IGF-1 | 25.6                | 23.3                       | Enterokinase | 0.0   |

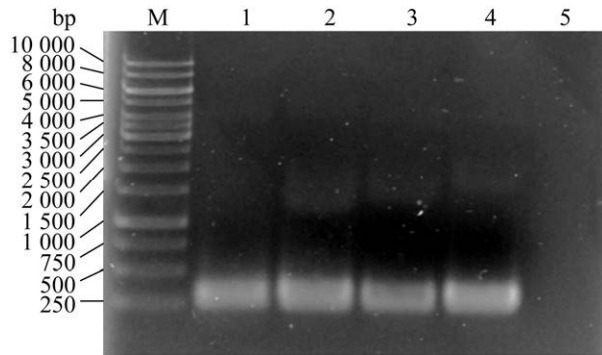


图2 目的片段 PCR 扩增结果

Figure 2 PCR amplification of target fragment. M: DNA marker; 1-4: PCR amplified fragment; 5: negative control.

### 2.3 IGF-1 融合蛋白的诱导表达与鉴定结果

实验结果 (图 4) 表明, 泳道 1 对应的诱导前全菌液中无目的蛋白表达, 泳道 2 中诱导后的全菌液中有少量分子量为 26 kDa 的融合蛋白表达, 泳道 3 对应的诱导后破菌上清中有明显的分子量接近 26 kDa 的融合蛋白条带, 与理论分子量 21.6 kDa 接近。

经 IGF-1 单抗的蛋白质免疫印迹 (Western

blotting) 鉴定, 结果如图 5 所示, 结果表明破菌上清中的融合蛋白具有 IGF-1 的免疫活性, 融合蛋白还会形成少量二聚体结构, 证明 IGF-1 融合蛋白成功正确表达。

### 2.4 IGF-1 分离纯化及酶切结果

#### 2.4.1 IGF-1 融合蛋白亲和层析结果

SDS-PAGE 结果显示 (图 6), 泳道 1 为加入了终浓度为 70 mmol/L 咪唑的破菌上清液, 在 26 kDa 左右处有明显的目的蛋白条带, 泳道 2 为流穿液, 可见目的蛋白挂柱而杂蛋白流穿, 泳道 3 为咪唑洗脱的蛋白洗脱样, 在 26 kDa 左右处可见明显的目的蛋白条带, 且浓度较高, 而杂蛋白较少, 泳道 4 为 0.5 mol/L NaOH 洗脱峰, 可见柱上几乎无残留的蛋白。

#### 2.4.2 IGF-1 融合蛋白酶切结果

SDS-PAGE 结果显示 (图 7), 泳道 1 为阴性对照, 可看出明显的融合蛋白条带且无酶切产物条带, 泳道 2 为不加 DTT 时的酶切样品, 图中可看到融合蛋白减少, 出现酶切产物条带, 证明融合蛋白部分被酶切, 泳道 3 为加入

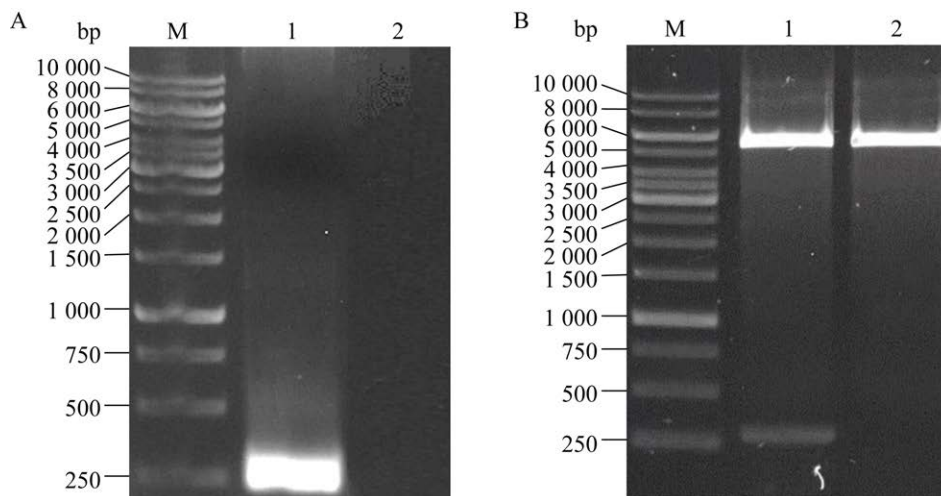


图3 重组质粒鉴定

Figure 3 Identification of recombinant plasmid by PCR (A) M: DNA marker; 1: PCR amplified fragment; 2: negative control; and double enzyme digestion (B). M: DNA marker; 1: recombinant plasmids digested with *Msc* I and *EcoR* V; 2: negative control.

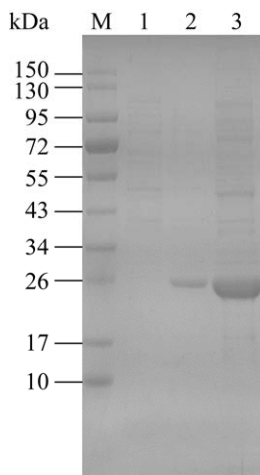


图 4 融合蛋白 SDS-PAGE 检测结果

Figure 4 SDS-PAGE results of fusion protein. M: protein marker; 1: bacteria lysate before induction; 2: bacteria lysate after induction; 3: the supernatant after induction and ultrasonic.

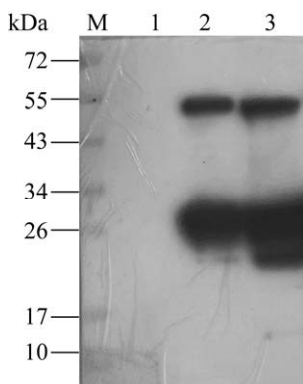


图 5 融合蛋白 Western blotting 检测结果

Figure 5 Western blotting results of fusion protein. M: protein marker; 1: bacteria lysate before induction; 2: bacteria lysate after induction; 3: the supernatant after induction and ultrasonic.

1 mmol/L DTT 后的酶切样品, 对比泳道 2 融合蛋白显著减少且酶切产物显著增多, 由此可见该酶切条件可成功对 IGF-1 融合蛋白进行酶切。

#### 2.4.3 酶切产物亲和层析结果

图 8 中泳道 1 为酶切产物的样品, 泳道 2 为收集的流穿样, 在 10 kDa 处可见单一的

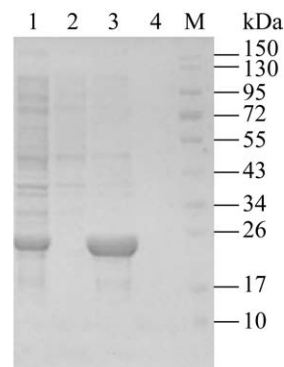


图 6 融合蛋白 Ni 柱亲和层析结果电泳图

Figure 6 SDS-PAGE of fusion protein obtained from Ni affinity chromatography 1: sample loading; 2: flow through; 3: elution of imidazole; 4: elution of NaOH; M: protein marker.

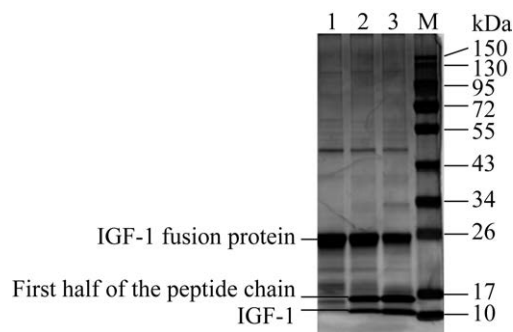


图 7 DTT 对酶切影响的电泳分析

Figure 7 Effect of DTT on enzyme digestion. 1: negative control; 2: no DTT; 3: 1 mmol/L DTT; M: protein marker.

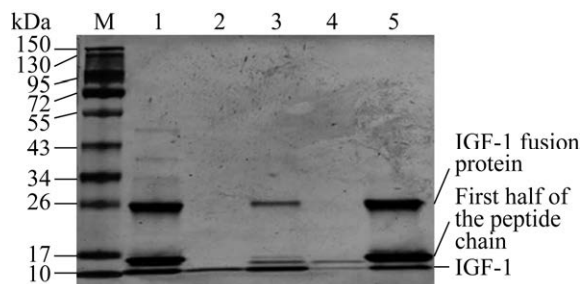


图 8 酶切产物 Ni 柱亲和层析结果电泳图

Figure 8 SDS-PAGE of enzyme digested products obtained from Ni affinity chromatography. M: protein marker; 1: sample loading; 2: flow through; 3: re-equilibration; 4: elution of imidazole; 5: elution of EDTA.

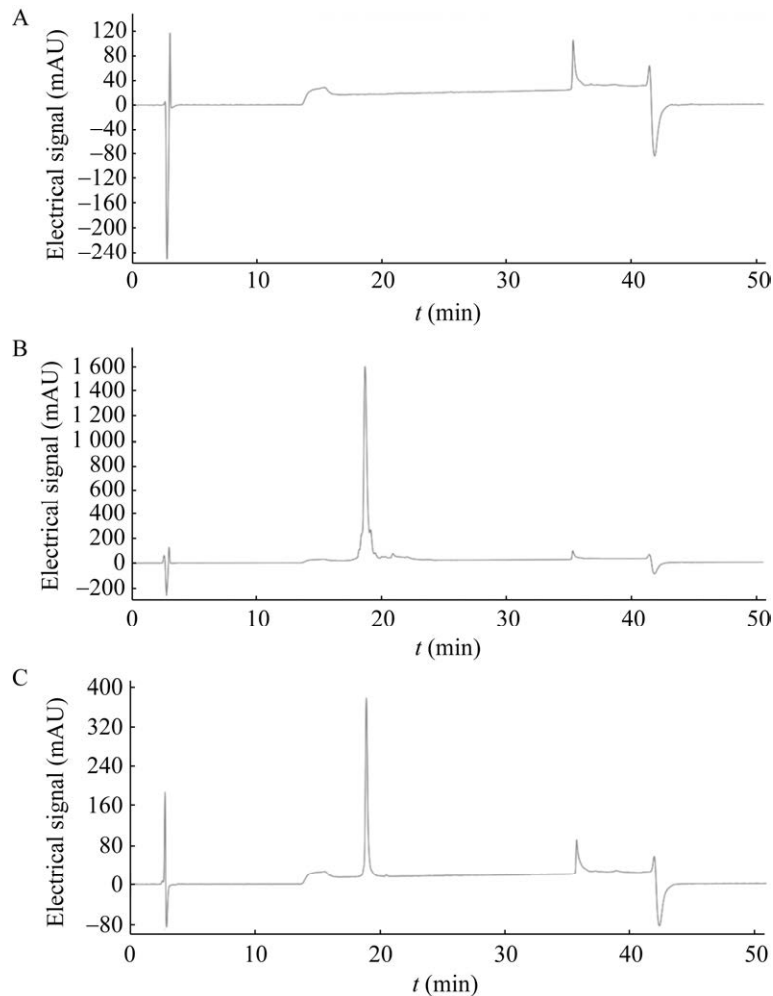


图9 RP-HPLC 检测结果

Figure 9 RP-HPLC test of water (A), standard substance (B) and flow-through sample (C).

IGF-1 目的条带, 泳道 3 为复平衡, 有少量结合不牢固的融合蛋白、前半段肽链及 IGF-1 目的蛋白被洗脱, 泳道 4 及泳道 5 分别为咪唑和 EDTA 洗脱的蛋白, 可见咪唑洗脱效果不佳, EDTA 可将柱上结合的蛋白全部洗脱下来。

#### 2.4.4 IGF-1 目的蛋白 RP-HPLC 纯度鉴定结果

将制备的流穿样品进行高效液相色谱检测, 结果如图 9, IGF-1 的出峰时间为 18 min, 制备的流穿样品纯度 >90%。

#### 2.5 IGF-1 样品及融合蛋白活性鉴定结果

四参数拟合后曲线如图 10 所示, 根据购得

的金斯瑞 IGF-1 标准品的说明书将市售 IGF-1 标准品比活定为  $2 \times 10^5$  U/mg, 根据公式计算的生物学活性结果见表 4, IGF-1 样品比活为  $2.47 \times 10^5$  U/mg, 与市售标准品接近, 均大于  $2 \times 10^5$  U/mg, 而融合蛋白比活为  $1.14 \times 10^5$  U/mg。

### 3 讨论

生长发育是一个复杂的动态过程, 受遗传、生活环境及内分泌等多种因素的影响<sup>[18]</sup>, 垂体分泌的生长激素可以促进机体的生长发育<sup>[19]</sup>, 但其大部分功能必须通过 IGF-1 的介导才能发



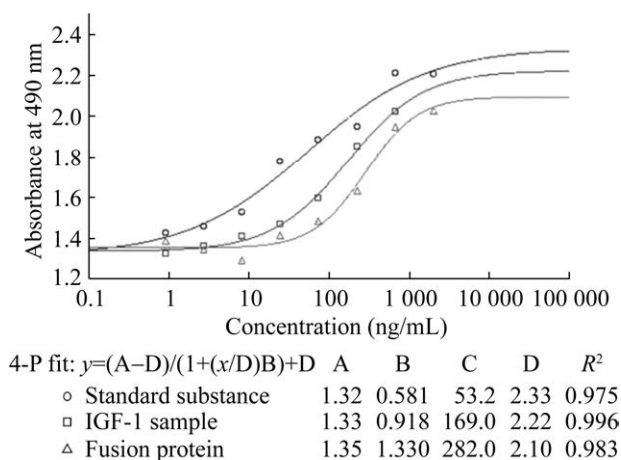


图 10 IGF-1 样品及融合蛋白细胞活性检测结果  
Figure 10 Detection of cell viability of IGF-1 sample and fusion protein.

表 4 IGF-1 样品及融合蛋白细胞活性计算结果  
Table 4 The calculated cell viability of IGF-1 sample and fusion protein

| Samples        | Protein concentration (mg/mL) | Dilution times | Sample titers | Protein activity (U/mg) |
|----------------|-------------------------------|----------------|---------------|-------------------------|
| IGF-1          | 0.04                          | 40             | 9 867         | $2.47 \times 10^5$      |
| Fusion protein | 0.64                          | 640            | 72 716        | $1.14 \times 10^5$      |

挥其生物学作用<sup>[20]</sup>；国外已有 IGF-1 蛋白类药物上市<sup>[21]</sup>，而我国 IGF-1 药物尚处于研究阶段，在市面上没有相关的药物，属空白领域，而进口药物价格昂贵，给患者家庭带来沉重的经济负担和心理负担，因此亟待相关药物的上市；随着 IGF-1 药物在我国的需求逐渐增大，开发进口替代药物具有十分重要的意义。目前现有的研究发现，在大肠杆菌中直接表达 IGF-1 会形成包涵体<sup>[22]</sup>，给后续的分选纯化带来极大不便，且生物活性也难以保证，因此 IGF-1 的可溶性表达策略极为重要，既利于后续的纯化工艺，也可以较好保持蛋白结构，具有高效、经济的特点，对减少生产成本大有裨益。

用层析技术分离纯化 IGF-1，大多采用亲和

层析<sup>[23]</sup>。在对 IGF-1 融合蛋白酶切产物进行分离纯化时，无论是通过优化 Ni 柱亲和层析的条件还是尝试离子交换及疏水层析等精细纯化的方法仍无法达到纯度与回收率兼得的效果，而凝胶过滤层析是根据样品中各种物质分子量的不同，通过多孔凝胶床达到分离的目的<sup>[24]</sup>，具有条件温和<sup>[25]</sup>和分离效果好<sup>[26]</sup>等优点，因此下一步将尝试采用凝胶过滤层析对酶切产物进行分离纯化。通过鉴定 IGF-1 体外刺激 3T3 细胞增殖的作用，发现其具有显著的刺激 3T3 细胞增殖能力，计算得出制备的 IGF-1 活性与市售标准品接近，后续研究中将进一步考察 IGF-1 的体内生物学活性及其在生物体内的代谢情况，为其安全性评价和临床应用打下基础。

本研究在蛋白质结构预测的基础上，开发出了一条用于 IGF-1 制备及活性测定的完整工艺路线，为 IGF-1 的工业化生产提供了实验依据，为未来 IGF-1 药物的研制提供了思路与方法。

## REFERENCES

- [1] Mueller PL, Pritchett CE, Wiechman TN, et al. Antidepressant-like effects of insulin and IGF-1 are mediated by IGF-1 receptors in the brain. *Brain Res Bull*, 2018, 143: 27-35.
- [2] 谢倩, 李佳楠. 胰岛素样生长因子-1 衍生物的研究进展. *江汉大学学报(自然科学版)*, 2019, 47(6): 555-562.  
Xie Q, Li JN. Research progress of insulin-like growth factor-1 derivatives. *J Jiangnan Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, 47(6): 555-562 (in Chinese).
- [3] Pagani S, Bozzola E, Acquafredda G, et al. GH-IGF-1 axis in children with cystic fibrosis. *Clin Med Res*, 2019, 17(3/4): 82-89.
- [4] Palmieri VV, Lonero A, Bocchini S, et al. Uniparental disomy and pretreatment IGF-1 may predict elevated IGF-1 levels in Prader-Willi patients on GH treatment. *Growth Horm IGF Res*, 2019, 48/49: 9-15.
- [5] Bianchi A, Giampietro A, Tartaglione L, et al. Short- and long-term responsiveness to low dose growth hormone (GH) in adult GH deficiency: role of

- GH receptor polymorphism. *J Neuroendocrinol*, 2019, 31(4): e12692.
- [6] Laron Z, Pertzelan A, Mannheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone—a new inborn error of metabolism? *Isr J Med Sci*, 1966, 2(2): 152-155.
- [7] Laron Z, Werner H. Laron syndrome—a historical perspective. *Rev Endocr Metab Disord*, 2021, 22(1): 31-41.
- [8] Castilla-Cortazar I, De Ita JR, Aguirre GA, et al. Fanconi anemia and laron syndrome. *Am J Med Sci*, 2017, 353(5): 425-432.
- [9] Sádaba MC, Martín-Estal I, Puche JE, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: mitochondrial dysfunction and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(7): 1267-1278.
- [10] Bang P, Woelfle J, Perrot V, et al. Effectiveness and safety of rhIGF therapy in patients with or without laron syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2021, 184(2): 267-276.
- [11] Lazea C, Grigorescu P, Legendre M, et al. Novel compound heterozygous mutations of growth hormone receptor gene in two Romanian siblings with laron syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2019, 26: 860-871.
- [12] Obradovic M, Zafirovic S, Soskic S, et al. Effects of IGF-1 on the cardiovascular system. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(35): 3715-3725.
- [13] Iglesias P, Villabona C, Díez JJ. Effects of cabergoline therapy on serum IGF-1 concentrations in prolactinoma patients. *Pituitary*, 2020, 23(2): 200-202.
- [14] Pearce R, Zhang Y. Deep learning techniques have significantly impacted protein structure prediction and protein design. *Curr Opin Struct Biol*, 2021, 68: 194-207.
- [15] Geng H, Chen FF, Ye J, et al. Applications of molecular dynamics simulation in structure prediction of peptides and proteins. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17: 1162-1170.
- [16] Nagano K, Akpan A, Warnasuriya G, et al. Functional proteomic analysis of long-term growth factor stimulation and receptor tyrosine kinase coactivation in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Proteom*, 2012, 11(12): 1690-1708.
- [17] Li Y, Zhang XL, Song SM, et al. Baicalein inhibits proliferation and collagen synthesis of mice fibroblast cell line NIH/3T3 by regulation of miR-9/insulin-like growth factor-1 axis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3202-3211.
- [18] Erol N, Yıldız M, Güven A, et al. Cardiac examination in children with laron syndrome undergoing mecaseimerin therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2018, 31(6): 675-679.
- [19] Liang Y, Guo H, Liu B, et al. Genomic structure and characterization of growth hormone receptors from golden pompano *Trachinotus ovatus* and their expression regulation by feed types. *Fish Physiol Biochem*, 2019, 45(6): 1845-1865.
- [20] Racine HL, Serrat MA. The actions of IGF-1 in the growth plate and its role in postnatal bone elongation. *Curr Osteoporos Rep*, 2020, 18(3): 210-227.
- [21] O'Leary HM, Kaufmann WE, Barnes KV, et al. Placebo-controlled crossover assessment of mecaseimerin for the treatment of Rett syndrome. *Ann Clin Transl Neurol*, 2018, 5(3): 323-332.
- [22] 刘侃. 重组人胰岛素样生长因子-1 在大肠杆菌中的高效表达及体外复性摸索[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- Liu K. Overexpression of recombinant human insulin-like growth factor-1 in *E. coli* and *in vitro* refolding[D]. Guangzhou: Jinan University, 2006 (in Chinese).
- [23] 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. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(4): 50-57.
- Wan AN, Xu DS, Cai YS, et al. Thioredoxin increases the efficient and soluble expression of insulin-like growth factor-1 in *E. coli*. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(4): 50-57 (in Chinese).
- [24] Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, et al. A high performance gel filtration chromatography method for  $\gamma$ -glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem*, 2008, 374(1): 1-7.
- [25] Xin XL, Yang Y, Zhong J, et al. Preparative isolation and purification of isobenzofuranone derivatives and saponins from seeds of *Nigella glandulifera* Freyn by high-speed counter-current chromatography combined with gel filtration. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(19): 4258-4262.
- [26] Yue DR, Yang L, Liu SX, et al. A continuous procedure based on column chromatography to purify anthocyanins from *Schisandra chinensis* by a macroporous resin plus gel filtration chromatography. *Molecules*, 2016, 21(2): 1-14

(本文责编 陈宏宇)