

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) IGF- II 的体外重组表达*

徐永江¹ 柳学周^{1①} 张 凯² 武宁宁³ 刘芝亮¹ 李春广⁴

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛贝宝海洋科技有限公司 青岛 266400; 3. 青岛市海洋与渔业局渔业技术推广站 青岛 266071;
4. 绍兴市鸿港农业开发有限公司 绍兴 312000)

摘要 为在蛋白水平认识半滑舌鳎类胰岛素生长因子 II (IGF- II) 的生理功能, 将 IGF- II 成熟肽序列克隆到原核表达载体 pET-28a 中, 成功构建了重组半滑舌鳎 IGF- II /pET28a 质粒, 导入到 *E. coli* BL21(DE3) 菌株后经 IPTG 诱导, 获得了大小为 11.4 kDa 的重组 IGF- II 蛋白, N 端含 6 个组氨酸, 可特异性地被 6×His 抗体识别。重组 IGF- II 蛋白在最优诱导条件 37℃ 诱导 2 h, 目的蛋白表达量占重组表达菌总蛋白的 43.7%, 重组蛋白主要以包涵体存在。将获得的重组蛋白包涵体经变性、纯化和复性后, 获得了纯化的 IGF- II 重组蛋白, 其可在体外显著促进人乳腺癌 MDA231 细胞的增殖, 表明 IGF- II 重组蛋白具有体外细胞水平的生物活性。本研究结果可为认识鱼类 IGF- II 生理功能及半滑舌鳎生长调控机制提供理论支撑。

关键词 半滑舌鳎; IGF- II; 原核表达; 生物活性

中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0051-06

类胰岛素生长因子- II (IGF- II) 是一种单链小分子多肽, 在动物机体生长和发育过程中具有重要生理调节作用。先前对哺乳动物的研究表明, IGF- II 是一种胎儿生长激素, 主要对早期胚胎的生长发育起重要调节作用(Erhardt *et al*, 2003; Antonazzo *et al*, 2008)。但后续研究表明, IGF- II 与动物的生长速度、背部肌肉厚度和瘦肉率等生产性状密切相关(王丁科等, 2008; Vykoukalová *et al*, 2006; 刘桂兰等, 2003; Sánchez *et al*, 2013), 表明其在胚后生长发育阶段也起着重要的调控作用。近年来对鱼类的研究表明, IGF- II 与 IGF-1R 的结合能力同 IGF-I 相似(Fruchtman *et al*, 2002), 表明其与 IGF-I 在胚胎和胚后期具有同等重要的生长调控作用(Peterson *et al*, 2004、2008)。另外, 还有研究证明, 在鱼类生长发育过程中, IGF- II

在血液中一直保持较高的表达水平, 而啮齿类动物在出生后血液中 IGF- II 水平明显下降(Shamblott, 1998; Tse *et al*, 2002), 这些差异提示, 与哺乳动物相比, IGF- II 在鱼类生长发育过程中可能承担着更重要的角色。但一直以来, 由于缺乏鱼类 IGF- II 蛋白和相应的抗体, 对鱼类 IGF- II 的功能研究主要集中在 mRNA 水平上, 在蛋白层面对其生长调控机能方面的研究少有报道。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 是一种大型底栖比目鱼类, 是我国理想的近海增养殖对象(邓景耀等, 1988), 近年来已成为我国三大鲆鲽类主导养殖品种之一。半滑舌鳎具有生长的性别二态性, 即雌性生长速度远远大于雄性, 养殖雄性的经济效益低, 国内学者(季相山, 2009¹⁾; Ma *et al*, 2011) 已对该现

* 鲆鲽类现代产业技术体系(CARS-50)、山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ025)、中央级公益性事业单位基本科研业务费项目(20603022012022)和绍兴市院校科技合作项目(2012704)共同资助。徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-16, 收修改稿日期: 2014-06-17

1) 季相山. 半滑舌鳎雌核发育诱导、遗传分析及生长相关基因雌雄差异表达研究. 山东农业大学博士研究生学位论文, 2009, 97-106

象的形成机制开展了相关研究,但目前对这种生长差异现象的机制认识尚不足,因此,未能建立起有效的养殖生长调控技术,不利于养殖产业的持续发展。鉴于 IGF- II 在鱼类生长发育中的重要调控作用,为深入认识半滑舌鳎生长调控机制,中国水产科学研究院黄海水产研究所鱼类养殖与设施渔业实验室构建了半滑舌鳎 IGF- II 体外重组表达系统,获得了具有生物活性的重组 IGF- II 蛋白,为从蛋白水平深入认识鱼类 IGF- II 生理功能及半滑舌鳎生长调控机制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用鱼(全长为 25–33 cm, 体重为 490–680 g)于 2012 年 5 月取自山东青岛忠海水产有限公司,以 MS-222 (300 mg/L)麻醉处死,迅速取肝脏置于液氮(–196℃)保存,用于总 RNA 提取。

1.2 成熟肽的克隆

利用 TRIzol 法提取肝脏总 RNA, 反转录合成第一链 cDNA。根据半滑舌鳎 IGF- II (GenBank 获取号: FJ608668) cDNA 序列, 设计特异性引物 P1 和 P2 扩增其成熟肽序列。在 P1 和 P2 的 5'端分别添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(方框标注), 在 P2 中添加了终止密码子 TAA(下划线标注)。

P1: 5'-ATA GGATCC GAAATGGCCTCGGCG-3'

P2: 5'-ATA AAGCTT TTACGTGGACTTGGGCGG -3'

PCR 条件: 94℃ 5 min 变性, 34 个循环(94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 50 s), 72℃ 延伸 10 min。将目的片段切胶回收后连接到 pEASY-T1 Simple 载体上, 挑选阳性克隆测序验证。

1.3 重组质粒的构建

提取重组的 IGF- II 克隆质粒, 与表达载体 pET-28a 混合, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III (TaKaRa) 双酶切, 以 T4 连接酶连接得到表达重组质粒 IGF- II /pET28a, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(Invitrogen)中, 菌液培养后 PCR 验证并测序。

1.4 重组质粒在表达菌株中的表达

测序正确的表达重组质粒转化到表达菌株 BL21 (DE3)中, 在液体 LB 培养基中(含卡那霉素)培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 达 0.6–0.7(37℃), 添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG, 1 mmol/L)继续培养。为分析目的蛋白的表达效率, 在添加 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 时分别吸取 2 ml 表达菌液, 离心收集菌体(8000 r/min 10 min, 4℃),

以 PBS 洗涤并重悬, 以 SDS-PAGE 电泳(15%分离胶)和 SigmaScan pro 5 软件分析目的蛋白的表达效率。

将菌液分别在 18℃、28℃、37℃ 条件下以 IPTG (1 mmol/L)诱导 2 h, 取样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 研究不同温度下重组蛋白表达量的差异。

1.5 重组蛋白的 Western-blotting 验证

收集以 IPTG 诱导 2 h 的表达菌体, 沉淀经 SDS-PAGE 电泳后, 利用半干电转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 并用 5% BSA 封闭, 以 6 \times His 单抗为一抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 室温下分别孵育 1 h, 利用 HRP-DAB 试剂盒(Bio-Rad)显色, 观察拍照。

1.6 重组蛋白的纯化和复性

取 37℃ 条件下 IPTG 诱导表达 2 h 的重组菌, 离心(8000 r/min 10 min, 4℃), PBS 洗涤沉淀, 按照刘芝亮等(2013)的方法纯化和复性, 获得重组 IGF- II 蛋白。获得的纯化融合蛋白经 SDS-PAGE 检测, 置入透析袋, 分别用 8、6、4、2 mol/L 尿素梯度复性液和 PBS 充分透析复性, 用 3 kDa 超滤管(Millipore)进行超滤浓缩, SDS-PAGE 电泳检测后于–80℃ 保存备用。

1.7 融合蛋白的生物活性检测

利用 MTT 法检测获得的纯化复性的 IGF- II 融合蛋白的生物活性。设置半滑舌鳎 IGF- II 融合蛋白浓度分别为 0.35、3.5 和 35 μ g/ml, 3 个试验组, 1 个空白对照组, 每组设 4 个平行, 以人乳腺癌细胞 MDA231(上海若谷生物科技有限公司)为载体, 具体操作方法参考刘芝亮等(2013)。

细胞增殖率(GSR) (% control) = $A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100$

式中, A_{sample} 为加入重组蛋白组, A_{control} 为未加重组蛋白组。 GSR 用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)来表示, 采用 SPSS 16.0 软件对各试验组的细胞增殖率进行单因素方差分析(ANOVA), 设置显著性水平 $P=0.05$, 当 $P<0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 半滑舌鳎 IGF- II 成熟肽的克隆

半滑舌鳎 IGF- II 成熟肽序列长为 210 bp, 由 B、C、A、D 共 4 个结构域组成, 编码 70 个氨基酸(图 1)。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 IGF- II 编码氨基酸序列与塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)和点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)同源性分别为 93%、94%、90%和 93%, 具有较高的序列保守性。

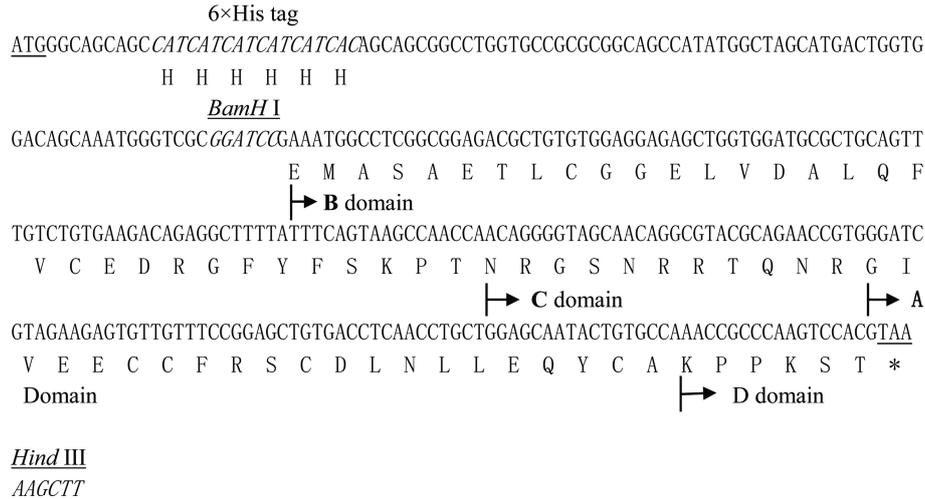


图 1 半滑舌鳎 IGF- II 成熟肽序列

Fig.1 The mature peptide sequence of IGF- II in *C. semilaevis* Günther

起始密码子 ATG 以下划线标注, *示终止密码子 TAA

The start codon (ATG) is underlined and the asterisk indicates the stop codon

2.2 IGF- II/pET28a 重组质粒的构建

将 IGF- II 成熟肽序列插入到原核表达质粒 pET-28a, 获得了重组质粒 IGF- II/pET28a, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中培养, 测序验证目的基因插入正确(图 1), 获得的重组质粒由 104 个氨基酸组成, 包括 IGF- II 成熟肽和 N 端的 6×His 标签, 等电点为 7.69。

2.3 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

将重组质粒 IGF- II/pET28a 转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中构成重组菌, 经 IPTG 诱导后电泳检测, 出现的大小为 11.4 kDa 的特异性条带为重组 IGF- II 蛋白。

温度诱导试验结果显示, 不同诱导温度下, 重组菌的目的蛋白表达量各不相同(图 3), 37℃、IPTG 诱导 2 h 重组蛋白表达量最大, 占表达菌总蛋白含量的 43.7%。

2.4 重组 IGF- II 蛋白的 Western-blotting 验证

Western-blotting 检测显示, 获得的重组表达菌在 PVDF 膜上可见单一印迹, 且大小为 11.4 kDa (图 4), 说明重组表达菌正确表达了目的蛋白, 且能特异性地被 6×His 抗体识别, 具有抗原活性, 验证了半滑舌鳎 IGF- II 蛋白体外重组表达成功。

2.5 IGF- II/pET28a 融合蛋白的纯化

将重组菌进行超声破碎, SDS-PAGE 电泳检测菌液沉淀和上清液, 显示融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中(图 2)。收集包涵体, 变性处理后过

Ni²⁺-NTA 亲和层析柱进行分离纯化, 纯化的融合蛋白再经过尿素梯度复性后以 SDS-PAGE 检测, 可见大小为 11.4 kDa 的单一一条带(图 2)。

2.6 重组蛋白的生物活性检测

MTT 法检测结果显示, 浓度为 0.35 μ g/ml 和 3.5 μ g/ml 的重组半滑舌鳎 IGF- II 蛋白均能显著促进

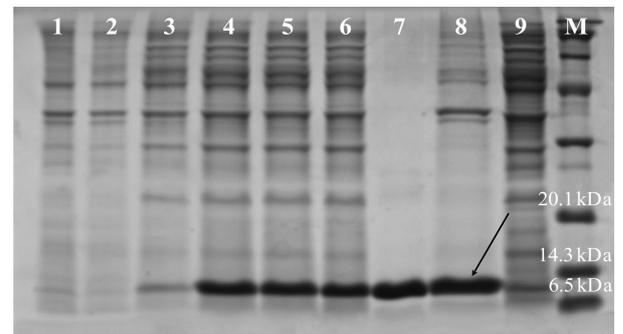


图 2 半滑舌鳎重组 IGF- II 蛋白的表达分析

Fig.2 Expression of the recombinant IGF- II protein in BL21(DE3) cells

M: 蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导 2 h 对照菌;
2-6: IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 的重组菌;
7: 纯化 IGF- II 融合蛋白; 8-9: IPTG 诱导 2 h 后表达菌裂解液沉淀和上清液(箭头示 11.4 kDa 融合蛋白)
M: Protein marker; 1: Control; 2-6: Expression of recombinant IGF- II post 0, 1, 2, 3, and 4 h of induction;
7: Purified recombinant IGF- II protein;
8-9: Precipitation and supernatant of bacterial lysates post 2 h of induction (arrow indicates 11.4 kDa recombinant IGF- II protein)

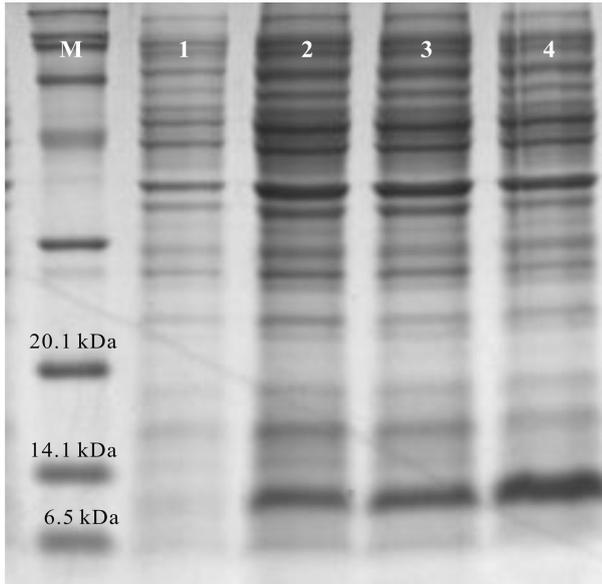


图3 温度对重组半滑舌鲷 IGF- II 蛋白表达效率的影响
Fig.3 Effects of temperature on the recombinant IGF- II protein from *C. semilaevis* Günther

M: 蛋白 Marker; 1: 对照菌 37°C下 IPTG 诱导 2 h; 2-4: 重组表达菌 18°C、28°C、37°C下 IPTG 诱导 2 h

M: Protein marker; 1: Control at 37°C; 2-4: Recombinant IGF- II at 18°C, 28°C and 37°C post 2 h of induction

人乳腺癌细胞 MDA231 增殖, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。但当蛋白浓度增加至 35 $\mu\text{g/ml}$ 时, 细胞增殖率减小(图 5), 表明高浓度的 IGF- II 蛋白反而不利于细胞增殖。上述结果表明本研究获得的半滑舌鲷 IGF- II 融合蛋白具有细胞水平的生物活性。

3 讨论

IGF- II 被认为是迄今为止功能最复杂的生长调控因子, 除了促生长作用外, 还与家畜的脂肪沉积、瘦肉率、腹脂率等多种经济性状密切相关(Lamberson *et al*, 1996), 因而在家畜育种工作中已作为辅助选择育种标记应用, 增加了性状育种的准确性(李志辉等, 2004), 而在鱼类中 IGF- II 的多种功能及其作用机制尚需深入研究。半滑舌鲷为我国重要海水养殖品种, 具有雌雄个体生长差异的特性, 但其机制不明。季相山(2009)¹⁾研究表明, IGF- II 在半滑舌鲷胚胎、脑、眼、鳃、头肾、肠、肝、肌肉、垂体、皮肤、脾等组织中均有表达, 表明其在半滑舌鲷胚胎发育、生长和生殖中均具有重要的生理功能。同时还发现, 8 月龄前,



图4 半滑舌鲷重组 IGF- II 蛋白的 Western-blotting 验证
Fig.4 The detection of recombinant IGF- II protein from *C. semilaevis* Günther by Western-blotting

M: Marker; 1: 诱导 2 h 重组表达菌

M: Protein Marker; 1: Recombinant IGF- II /pET28a post 2 h of induction

雌雄舌鲷间 IGF- II mRNA 表达量无显著差异, 但 9 月龄和 12 月龄的雌性舌鲷 IGF- II mRNA 表达量显著高于雄性, 这说明 IGF- II 在半滑舌鲷雌雄生长差异中可能起着重要的调控作用, 对其具体的机制研究需要从 mRNA、激素和蛋白水平进行深入开展。本研究利用 pET-28a 表达载体成功构建了半滑舌鲷 IGF- II 体外原核重组表达体系, 优化了蛋白表达条件, 获得了高效表达且具有细胞水平生物活性的重组 IGF- II 蛋白, 结果为在蛋白水平研究半滑舌鲷生长调控机制提供了理论依据。

基因体外重组蛋白的表达受多种因素影响,

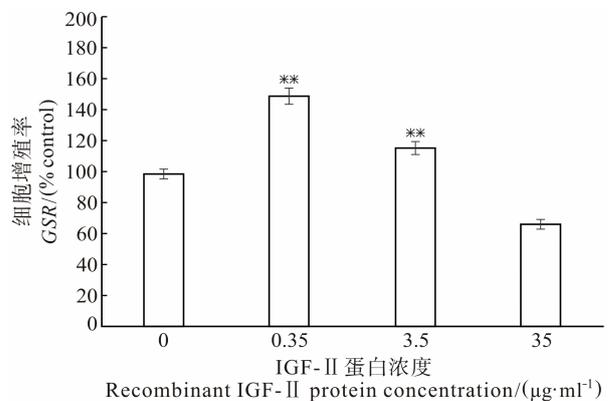


图5 重组半滑舌鲷 IGF- II 蛋白对人乳腺癌细胞 MDA231 增殖率的影响

Fig.5 The effect of recombinant IGF- II protein on the proliferation of human breast cancer cell MDA231

GSR 用平均值 \pm 标准差表示($n=4$);

** : 与对照组差异极显著($P < 0.01$)

GSR are shown as Mean \pm S.D. ($n=4$);

** : Highly significant difference from control ($P < 0.01$)

1) 季相山. 半滑舌鲷雌核发育诱导、遗传分析及生长相关基因雌雄差异表达研究. 山东农业大学博士研究生学位论文, 2009, 97-106

如载体选择、表达菌株选择及诱导条件等(宁俊凯等, 2012)。本研究利用原核表达系统获得了体外重组的 IGF- II 蛋白,但由于原核表达产物主要以包涵体形式存在,需经变性、复性后才具有生物活性,其生产效率较低,且不具备在养殖生产中大量应用的经济性。比较而言,真核表达体系产物具有高效表达、表达后无需变性和复性处理,且更具安全性(Li *et al*, 2012),因而可用于重组蛋白的体外大规模生产。下一步将开展半滑舌鳎 IGF- II 真核表达技术研究,为研制绿色高效的半滑舌鳎专用促生长制剂提供技术支撑。

人乳腺癌细胞由于自身没有 IGF- II mRNA 的表达(Chatzistamou *et al*, 2001),而成为研究外源 IGF- II 功能的良好载体。因此,本研究选用了人乳腺癌细胞 MDA231 来检验获得的半滑舌鳎 IGF- II 重组蛋白的生物活性,无需考虑自身 IGF- II 对外援 IGF- II 蛋白的干扰作用。结果显示,0.35 $\mu\text{g/ml}$ 和 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的重组半滑舌鳎 IGF- II 蛋白均能显著促进 MDA231 的增殖,表明其具有良好的体外生物活性。对青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)重组 IGF- II 蛋白的研究表明,其在一定浓度条件下可显著促进人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 的增殖,但超过一定浓度时可能起抑制作用(曹诣斌等, 2010)。

本课题组先期已利用原核表达系统体外成功表达并制备获得半滑舌鳎 IGF-I (刘芝亮等, 2013)和 GH,以细胞增殖和注射方式验证了 IGF-I 和 GH 对半滑舌鳎生长的促进作用(另文发表)。本研究获得了具有生物活性的半滑舌鳎 IGF- II 融合蛋白,可为在蛋白水平认识其生理作用及研究半滑舌鳎雌雄生长的性别二态性提供新的基础资料。下一步本课题组将深入开展 IGF- II 的生理功能研究,以期揭示其在半滑舌鳎生长调控中的生理作用及其机制。

参 考 文 献

- 王丁科, 阎萍, 梁春年, 等. 胰岛素样生长因子 2 研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(7): 67-70
- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988(9): 10-89
- 宁俊凯, 俞昌喜. 胰岛素样生长因子-I(IGF-I)原核制备工艺进展. 海峡药学, 2012, 24(6): 7-11
- 刘芝亮, 徐永江, 史宝, 等. 半滑舌鳎类胰岛素生长因子-I 的原核表达及活性分析. 中国水产科学, 2013, 20(4): 706-712
- 刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 等. IGF2 基因 PCR-RFLP 多态性与脂肪沉积相关性状的关联分析. 遗传学报, 2003, 30(12): 1107-1112
- 李志辉, 王启贵, 赵建国, 等. 类胰岛素生长因子 2(IGF2)基因多态性与鸡体脂性状的相关研究. 中国农业科学, 2004, 37(4): 600-604
- 曹诣斌, 吴兰亲, 邵邻相, 等. 青海湖裸鲤类胰岛素生长因子 IGF- II 的原核表达. 水生生物学报, 2010, 34(2): 1-5
- Antonazzo P, Alvino G, Cozzi V, *et al*. Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies. Placenta, 2008, 29(1): 99-101
- Chatzistamou I, Schally AV, Varga JL, *et al*. Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. Anti-cancer Drugs, 2001, 12(9): 761-768
- Erhardt S, Lyko F, Ainscough JF, *et al*. Polycomb-group proteins are involved in silencing processes caused by a transgenic element from the marine imprinted H19/Igf2 region in *Drosophila*. Dev Genes Evol, 2003, 213(7): 336-344
- Fruchtman S, McVey DC, Borski RJ. Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 283(2): 468-476
- Lamberson WR, Sterle JA, Matteri RL. Relationships of serum insulin-like growth factor-2 concentrations to growth, compositional, and reproductive traits of swine. J Anim Sci, 1996, 74: 1753-1756
- Li YY, Wu SG, Ouyang J, *et al*. Expression of insulin-like growth factor-1 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in yeast *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2012, 84(1): 80-85
- Ma Q, Liu SF, Zhuang ZM, *et al*. Molecular cloning, expression analysis of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene and IGF-I serum concentration in female and male tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2011, 160(4): 208-214
- Peterson BC, Small BC. Endocrine responses of fast- and slow-growing families of channel catfish. N Am J Aquacult, 2008, 70(2): 240-250
- Peterson BC, Waldbieser GC, Bilodeau AL. IGF-I and IGF- II mRNA expression in slow- and fast-growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2004, 139(3): 317-323
- Sánchez Del Pulgar J, Carrapiso AI, Reina R, *et al*. Effect of IGF- II genotype and pig rearing system on the final characteristics of dry-cured Iberian hams. Meat Sci, 2013, 95(3): 586-592
- Shamblott MJ. Characterization of a teleost IGF- II gene: evidence for promotor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) sites, and the presence of hepatic C/EBP. Mol Mar Biol Biotechnol, 1998, 7(3): 181-190
- Tse MC, Vong QP, Cheng CH, *et al*. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor- II. Biochim Biophys Acta, 2002, 1575(1-3): 63-74

Vykoukalová Z, Knoll A, Dvorák J, *et al.* New SNPs in the IGF2 gene and association between this gene and back fat

thickness and lean meat content in large white pigs. *J Anim Breed Genet*, 2006, 123(3): 204–207

(编辑 冯小花)

***In vitro* Recombinant Expression of Insulin-Like Factor II from *Cynoglossus semilaevis* Günther**

XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou¹①, ZHANG Kai², WU Ningning³, LIU Zhiliang¹, LI Chunguang⁴

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Qingdao Beibao Marine Science and Technology Co., Ltd., Qingdao 266400; 3. Fishery Technology Extension Center of Qingdao, Qingdao 266071; 4. Shaoxing Honggang Agricultural Development Co., Ltd., Shaoxing 312000)

Abstract To explore the role of insulin-like factor II (IGF-II) in growth regulation of *Cynoglossus semilaevis* Günther, the IGF-II gene was expressed *in vitro* and the bioactivity was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT method). The mature peptide domain of IGF-II gene of *C. semilaevis* Günther was cloned by PCR amplification and sequenced for verification. The obtained mature peptide fragment was then subcloned into the prokaryotic expression vector pET-28a (IGF-II/pET28a). The recombinant plasmid was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) cells and the recombinant IGF-II protein containing 6×His tag at N-terminus was induced by IPTG. SDS-PAGE analysis indicated that the obtained IGF-II protein was found in the form of inclusion bodies with molecular weight of 11.4 kDa, which accounted for 43.7% of the whole bacterial protein post 2-hour induction with IPTG. Western blotting analysis indicated that the recombinant IGF-II protein had the antigenicity to 6×His antibody. The inclusion bodies containing recombinant protein were denaturalized, purified and annealed. The recombinant IGF-II protein significantly promoted the proliferation of human breast cancer cells MDA231. Results could provide basic information on the role of IGF-II in fish and be helpful to better understand the endocrine mechanism of sex-based dimorphic growth performance of *C. semilaevis* Günther.

Key words *Cynoglossus semilaevis* Günther; IGF-II; Prokaryotic expression; Bioactivity

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn