

## 三角帆蚌 *IGF2* 基因的亚细胞定位及重组蛋白促体外细胞活性分析

李雪男, 冯上乐, 王贺, 申晓雅, 陈一格, 白志毅, 李文娟

### Subcellular localization of *IGF2* gene and analysis of recombinant protein to promote *in vitro* cellular activity in *Hyriopsis cumingii*

LI Xuenan, FENG Shangle, WANG He, SHEN Xiaoya, CHEN Yige, BAI Zhiyi, LI Wenjuan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20220603891>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

##### 三角帆蚌 *cyclin B* 基因克隆及功能

Expression and function of *cyclin B* gene in *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 496 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190402584>

##### 三角帆蚌中 *WNT4* 基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

##### 添加类胡萝卜素对三角帆蚌总类胡萝卜素含量及贝壳珍珠质颜色的影响

Effect of dietary carotenoid on total carotenoids content and shell color in *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2018, 27(4): 477 <https://doi.org/10.12024/jsou.20171202192>

##### 基于蛋白质组学的三角帆蚌珍珠囊形成相关免疫因子研究

Analysis of proteomic differences and immune factors between *Hyriopsis cumingii* mantle and pearl sac

上海海洋大学学报. 2022, (2): 344 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210603491>

##### 三角帆蚌所育不同颜色珍珠及其相关组织金属元素种类和含量差异分析

Analysis of metallic element types and contents in pearls of different colors and their related tissues in *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2019, 28(6): 882 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190202615>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1335-07

DOI:10.12024/jsou.20220603891

## 三角帆蚌 *IGF2* 基因的亚细胞定位及重组蛋白促体外细胞活性分析

李雪男<sup>1</sup>, 冯上乐<sup>1</sup>, 王 贺<sup>1</sup>, 申晓雅<sup>1</sup>, 陈一格<sup>1</sup>, 白志毅<sup>1,2</sup>, 李文娟<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘 要:** 胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factors 2, IGF2) 在多种细胞生长、分化和合成代谢的调节中发挥重要的调控作用。本研究成功构建了淡水珍珠蚌三角帆蚌 IGF2 的重组质粒 pEGFP-IGF2 和 pET32a-IGF2, 通过 pEGFP-IGF2-细胞转染, 表明该蛋白定位在细胞质与细胞核中。将 pET32a-IGF2 转化到 BL21 (DE3) 中进行蛋白诱导表达, 成功得到其原核表达载体, SDS-PAGE 检测显示, 在约 25ku 处有一条清晰的条带, 符合目的条带大小 (26.27 ku), 且主要表达于上清液中。为研究重组蛋白 IGF2 对三角帆蚌细胞活性的作用, 通过 CCK8 细胞活性测定, 进一步探讨了添加不同质量浓度重组目的蛋白 (0.2.5、5.0、7.5、12.5、17.5、22.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培养的三角帆蚌外套膜细胞增殖活性。结果显示, 三角帆蚌 IGF2 重组蛋白能显著促进三角帆蚌外套膜细胞的增殖活性 ( $P < 0.05$ ), 且在其质量浓度为 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对三角帆蚌外套膜细胞的促生长效果最佳, 这为促进三角帆蚌外套膜细胞传代、细胞系建立奠定了基础, 也为下一步探究 IGF2 在贝类中的功能提供依据。

**关键词:** 三角帆蚌; IGF2; 亚细胞定位; 重组蛋白; 细胞培养; 生物活性

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

胰岛素样生长因子 2 (insuline-like growth factor 2, IGF2) 在细胞增殖、分化、迁移和凋亡等调控过程起着关键性作用<sup>[1]</sup>, 在哺乳动物中, IGF2 主要通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/PKB) 途径和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径将信号传递到细胞核内, 促使 IGF2 分泌, 发挥细胞增殖等广泛的生物学功能<sup>[2]</sup>。过表达 IGF2 后, 牦牛 (*Bos grunniens*) 胎儿成纤维细胞 S 期细胞明显增加, 采用细胞激光全息技术发现细胞的数量增加了 1 倍, 细胞的厚度明显增加<sup>[3]</sup>; WANG 等<sup>[4]</sup> 研究表明加入 IGF2 后, 分离的大鼠 (*Rattus norvegicus*) 脂肪基质细胞 ADSCs 表现出更高的增殖能力和干细胞相关标志物 *Nanog*、*octamer-binding transcription factor 4* 和 *SRY-box transcription factor 2* 的高表达, 并具有向脂肪细胞和成骨细胞分化的巨大潜力。因此, IGF2 具有作为 LL 促生长因子来促进细胞体外增

殖活力的潜力。

三角帆蚌是中国特有的淡水珍珠蚌, 其珍珠产量占所有人工养殖淡水珍珠的 95% 以上<sup>[5]</sup>。外套膜是贝壳和珍珠矿化中最重要的组织<sup>[6]</sup>, 外套膜细胞的培养具有重要意义, 但其在体外培养进程中增殖能力较低, 至今没有建立稳定传代的细胞系<sup>[7]</sup>。鉴于种属差异, 利用蚌同源促生长因子促进其细胞体外增殖是解决这一问题的新思路。本实验在前期实验基础上, 通过构建 pEGFP-IGF2 和 pET32a-IGF2 重组质粒, 进行 IGF2 亚细胞定位、原核表达载体构建, 以及重组蛋白在三角帆蚌外套膜细胞体外培养进程中对细胞增殖活性的作用研究, 旨在促进贝类细胞体外增殖活力, 为下一步建立贝类细胞系提供依据, 同时为探究 IGF2 在贝类生长发育调控过程中的研究奠定基础。

收稿日期: 2022-06-06      修回日期: 2022-06-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901406); 国家自然科学基金 (31872565); 上海市学术研究带头人计划 (19XD1421500)

作者简介: 李雪男 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类细胞分子生物学。E-mail: 2567616071@qq.com

通信作者: 李文娟, E-mail: wjli@shou.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康的一龄三角帆蚌购自浙江省金华市武义养殖场;DNA 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、Trizol、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司(大连);羊抗鼠 IgG(HRP 标记)购自北京源畅致和生物科技有限公司;His 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)、His-tag 抗体(小鼠单抗)、DAPI、*EcoR* I 限制性内切酶、BCA 试剂盒、4% 多聚甲醛购自碧云天生物有限公司(上海);Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购自英潍捷基贸易有限公司(上海);感受态 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)购自天根生化科技有限公司;质粒 pEGFP-N1 和 pET32a(+ )均由本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

按照 Trizol 法提取总 RNA,采用 Q6000 微量分光光度计(Quawell, USA)检测 RNA 含量,1%

琼脂糖凝胶检测 RNA 的质量。按照 Evo M-MLV 反转录预混合试剂盒(Accurate Biology, 中国)说明书将总 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存。

#### 1.2.2 pEGFP-IGF2、pET32a-IGF2 载体构建

根据实验室前期基于 RACE (rapid amplification of c DNA ends)方法所克隆的三角帆蚌 IGF2 基因序列,分别设计带有酶切位点和同源臂的特异性引物(表 1),交由上海生工生物公司合成。以外套膜 cDNA 为模板,进行 PCR,切胶回收。同时利用 *EcoR* I 内切酶对 pEGFP-N1 在 37 °C 条件下酶切 2 h,按照无缝克隆试剂盒说明书将胶回收产物和酶切后的质粒进行连接,连接产物转化到 DH5 $\alpha$  中,热激 90 s,摇床上继续培养 2 h,涂板后 37 °C 培养 10 ~ 12 h,挑取单菌落,条带大小经验证正确后,随机选取 3 个菌液送到上海金唯智公司测序。测序无突变后进行扩大培养,重组质粒的提取参照质粒小量抽提试剂盒说明书,同时使用 *EcoR* I 酶切重组质粒进行验证。构建 pET32a-IGF2 载体的方法同上。

表 1 本实验使用的引物

Tab.1 Primers used in this experiment

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Usage
pEGFP-IGF2-F	TCGAGCTCAAGCTTCGAATTCATGATCTCCACCTCACTTATGATTGC	亚细胞定位
pEGFP-IGF2-R	GTACCCGCTGACTGCAGAATTCGGACCAGACTGGACTTCGGC	
pET32a-IGF2-F	TTGTGCGACGGAGCTCGAATTCATGATCTCCACCTCACTTATGATTGC	原核表达
pET32a-IGF2-R	GCTGATATCGGATCCGAATTCCTCAGACCAGACTGGACTTCGC	

#### 1.2.3 IGF2 亚细胞定位

使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒将重组质粒 pEGFP-IGF2 转染到 293T 中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h;去除培养基,使用缓冲液清洗细胞,重复 3 次后;加入 4% 多聚甲醛,固定 20 min;去除多聚甲醛,缓冲液重复清洗 3 次;每孔加入 100  $\mu$ L 工作浓度的 DAPI 染液;避光条件下左右摇床染色 15 min;吸出 DAPI;缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。在荧光显微镜(OLYMPUS DP80)下拍片观察。

#### 1.2.4 IGF2 的原核表达和蛋白纯化

将测序正确的 pET32a-IGF2 重组质粒转入到 BL21(DE3)中,37 °C 恒温箱中培养 10 ~ 12 h,挑取单菌落后,继续培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4 ~ 0.6 时,一部分加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,分别在 37 °C 条件下诱导 3 h,25 °C 条件下诱导 3 h,16 °C

条件下诱导 5 h,另外一部分未经诱导正常培养。菌液离心,收集下层沉淀;加入适量裂解液进行破碎;离心后,将上清和沉淀收集到 EP 管中;100 °C 条件下变性 5 min 后;SDS-PAGE 电泳分析蛋白的可溶性以及确定蛋白的诱导条件。蛋白纯化的方法参照 His 标签蛋白纯化试剂盒说明书。将洗脱后的蛋白进行电泳分析以检测纯化蛋白的质量,最后测定蛋白浓度,-80 °C 保存备用。

#### 1.2.5 Western blot 检测

将第 4 次洗脱的蛋白经过 SDS-PAGE 电泳后,在半干转膜仪(Bio-Rad, USA)上将蛋白转印到 PVDF 膜上,使用封闭液封闭 2 h,TTBS 洗涤 3 次后,加入 1:1000 的 His-tag 抗体(小鼠单抗)孵育 10 h,洗涤 3 次后,加入 1:1000 稀释的二抗继续孵育 3 h,清洗 3 次,每次 8 min,最后使用 ECL 化学发光超敏显色试剂盒显色,拍照并保存图

片。

### 1.2.6 IGF2 重组蛋白的生物活性

采用 CCK8 法检测 IGF2 的生物学活性, CCK8 中含有 WST-8, 它在电子载体的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为高度水溶性的黄色甲瓚染料, 生成的甲瓚物的数量与活细胞的数量成正比, 因此可以利用这一特性直接进行细胞增殖分析。参照文献[8]中外套膜游离细胞的获取方法, 将三角帆蚌外套膜细胞接种到 96 孔板中, 每孔细胞数量  $1 \times 10^5$  个, 每孔加入 100  $\mu$ L 培养基(10% 蚌自体血清 + RPMI 1640 基础培养基 + 1% 三抗)进行培养, 使其贴壁后, 去除培养基, 使用含有不同质量浓度纯化蛋白(0、2.5、5.0、7.5、12.5、17.5、22.5  $\mu$ g/mL; 每组设有 6 个重复)的培养基继续培养, 分别在 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 时间点每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 溶液, 继续培养 2 h, 测定 450 nm 波长下的 OD 值。

### 1.2.7 统计与分析

所有数据均表示为平均值  $\pm$  标准误, 采用 SPSS 19.0 (SPSS Inc., USA) 进行统计学分析, 多重比较使用 Duncan 氏法进行分析, 显著水平为  $P < 0.05$ , 极显著水平为  $P < 0.01$ , 使用 SigmaPlot 13.0 (SYSTAT, USA) 进行绘图。

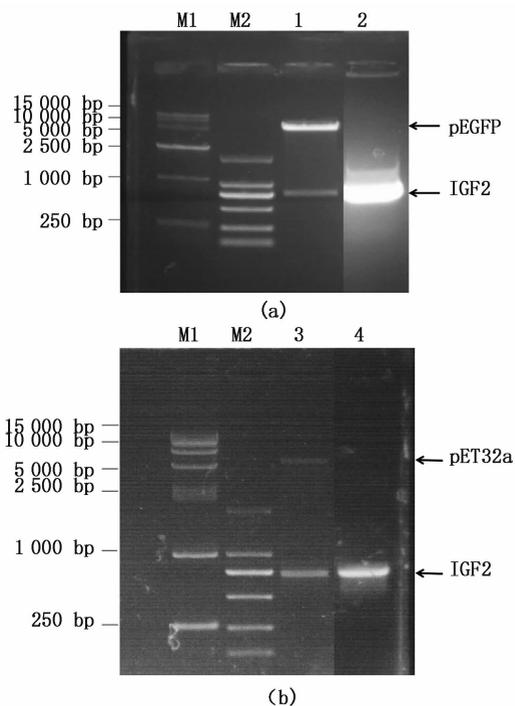
## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的获取和载体构建鉴定

以三角帆蚌外套膜组织的 cDNA 为模板, PCR 扩增后电泳结果显示, 在目的条带大小处 (705 bp) 出现单一的特异性条带。通过 *EcoR* I 将空质粒酶切后, 使用无缝克隆试剂盒将目的片段分别连接到酶切后的质粒上, 获得重组质粒, 两个重组质粒均通过 *EcoR* I 酶切验证和测序是否正确。酶切验证结果见图 1, 目的条带大小和载体片段大小均符合预计大小。

### 2.2 IGF2 蛋白的亚细胞定位结果

为了分析 IGF2 蛋白表达后的亚细胞定位分布, 将质粒 pEGFP-N1 和 pEGFP-IGF2 分别转染到 293T 细胞中, 结果显示, 转染 pEGFP-N1 的细胞中, 细胞质和细胞核中均出现绿色荧光, 符合预期结果。转染 pEGFP-IGF2 的细胞中, 细胞核和细胞质中也均有绿色荧光, 这表明 IGF2 蛋白在 293T 细胞的细胞核和细胞质中均表达(图 2)。



(a) pEGFP-IGF2 质粒; (b) pET32a-IGF2 质粒; M1. 15 000 DNA Marker; M2. 2 000 DNA Marker; 1, 3. 酶切后条带; 2, 4. PCR 扩增条带。

(a) pEGFP-IGF2 plasmid; (b) pET32a-IGF2 plasmid. M1. 15 000 DNA Marker; M2. 2 000 DNA Marker; 1, 3. bands after enzyme digestion; 2, 4. PCR amplified bands.

图 1 重组质粒酶切验证和 PCR 扩增

Fig. 1 Validation of recombinant plasmid enzymatic digestion and PCR amplification

### 2.3 IGF2 的原核表达和蛋白纯化结果

把构建的重组质粒 pET32a-IGF2 转入 BL21 (DE3) 中, 经 IPTG 诱导后, 超声波破碎, 收集上清液和沉淀, 经 SDS-PAGE 检测结果显示, 37  $^{\circ}$ C 诱导 3 h 处理组上清液和沉淀在约 25 ku 处均有 1 条明显的条带, 符合目的条带大小 (26.27 ku)。25  $^{\circ}$ C 诱导 3 h 处理组、16  $^{\circ}$ C 诱导 5 h 处理组以及空白组均未见明显的目的条带(图 3)。

将 37  $^{\circ}$ C 诱导 3 h 后的破碎上清液使用镍柱过滤, 使用 50 mmol/L 浓度的咪唑进行多次洗脱。结果显示, 第 2 次洗脱后, 纯化蛋白的量最多, 但是有明显的杂带, 第 4 次洗脱后, 蛋白条带单一, 但蛋白含量较低(图 4)。

### 2.4 Western blot 结果

pET32a(+) 质粒上带有 His 标签, 使用带有抗 His 的小鼠单抗作为一抗进行 Western blot 检测, 结果显示, 在约 25 ku 处有一条特异性的条带,

条带大小与预期的目的条带大小一致,对照组无 明显条带(图5)。

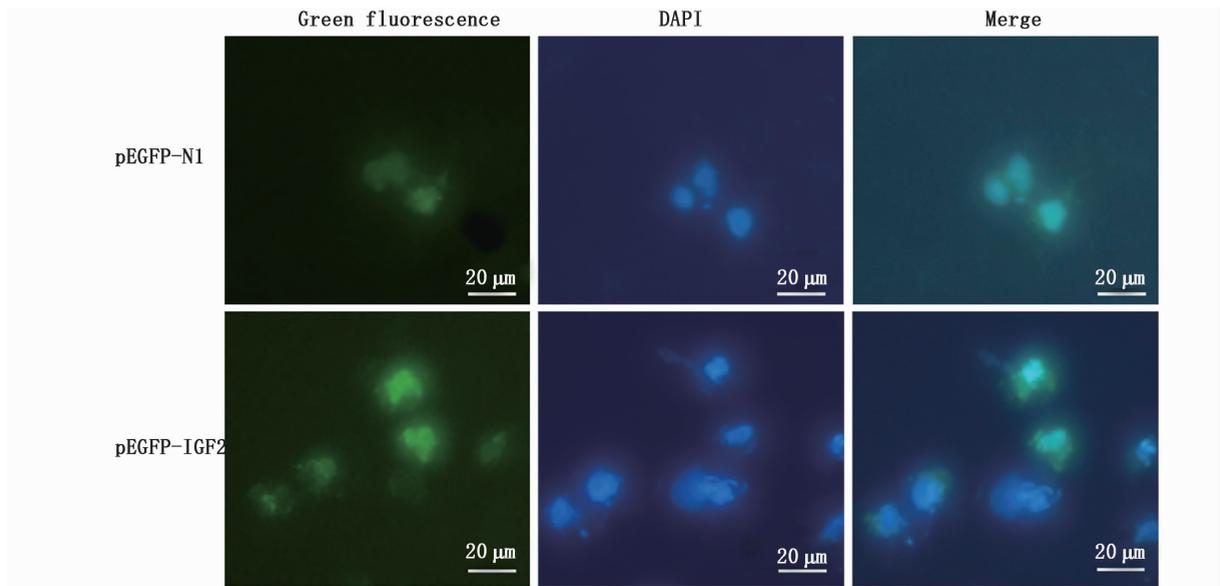
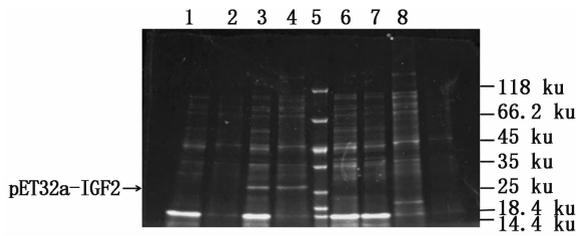


图2 IGF2 在 293T 细胞中的亚细胞定位

Fig. 2 The subcellular localization of IGF2 in 293T cells



1. 未诱导菌的上清; 2. 未诱导菌的沉淀; 3. 37 °C 诱导 3 h 后的上清; 4. 37 °C 诱导 3 h 后的沉淀; 5. 25 °C 诱导 3 h 后的上清; 6. 25 °C 诱导 3 h 后的沉淀; 7. 16 °C 诱导 5 h 后的上清; 8. 16 °C 诱导 5 h 后的沉淀。

1. Supernatant of uninduced bacteria; 2. Precipitation of uninduced bacteria; 3. Supernatant after 3 h induction at 37 °C; 4. Precipitation after 3 h induction at 37 °C; 5. Supernatant after 3 h induction at 25 °C; 6. Precipitation after 3 h induction at 25 °C; 7. Supernatant after 5 h induction at 16 °C; 8. Precipitation after 5 h induction at 16 °C.

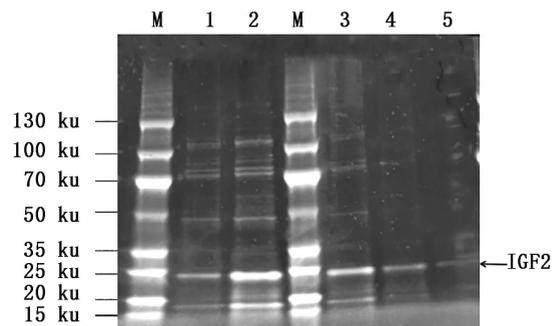
图3 IGF2 蛋白的可溶性分析

Fig. 3 Soluble analysis of IGF2 protein

### 2.5 IGF2 重组蛋白对三角帆蚌外套膜细胞的增殖活性分析

IGF2 重组蛋白对三角帆蚌外套膜细胞的促生长效果研究表明,与对照组(0 μg/mL 添加组)相比,各质量浓度添加组均能有效促进细胞的增殖活性( $P < 0.05$ ),且随着添加质量浓度的增高,增殖活性呈现先上升后缓慢下降的趋势。

具体来说,7.5 ~ 22.5 μg/mL 添加组在 3 ~ 6 d 内,均能显著促进细胞增殖活性( $P < 0.05$ ),其中 12.5 μg/mL 添加组的促增殖活性作用最大,与其他添加组存在显著差异( $P < 0.05$ ),且与对照组相比,能够极显著促进细胞增殖活力( $P < 0.01$ ),质量浓度继续上升,促生长效果下降; 2.5 μg/mL 添加组在 1 ~ 4 d 内均能促进细胞增殖活性( $P < 0.05$ ),但 5 ~ 6 d 促增殖效果不显著( $P > 0.05$ ,图6)。

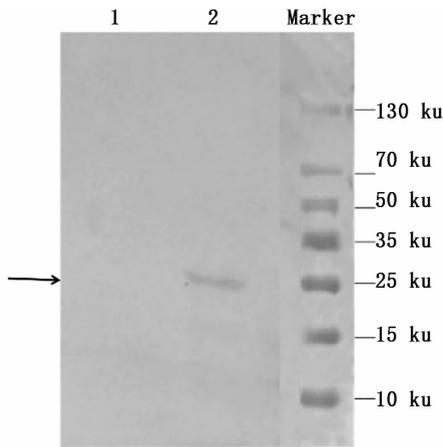


1, 2, 3, 4, 5 分别代表第 1, 2, 3, 4, 5 次洗脱。

1, 2, 3, 4, and 5 represent the 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th elution, respectively.

图4 IGF2 蛋白的 SDS-PAGE 分析

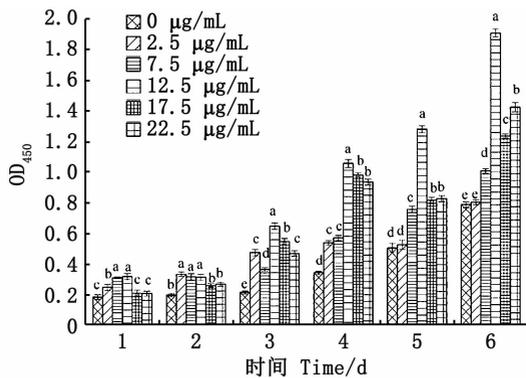
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of IGF2 protein



1. pET-32a (+) 空载体对照; 2. IGF2 蛋白; 箭头标记目的条带。  
 1. pET-32a (+) empty vector control; 2. IGF2 protein; arrows mark the target bands.

图 5 Western blot 鉴定

Fig.5 Western blot identification



同一天数的不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
 Different letters for the same day count indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

图 6 不同质量浓度 IGF2 蛋白对三角帆蚌外套膜细胞生长的影响

Fig.6 Effect of different mass concentrations of IGF2 protein on the growth of mantle cells of the mussel

### 3 讨论

IGFs 是一种活性蛋白多肽物质,通过自分泌、旁分泌或内分泌的形式来发挥生物学作用<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10-11]</sup>表明,IGFs 参与到了酪氨酸蛋白激酶/转录激活因子 (JAK/STAT) 信号通路, JAK2 能够激活 STAT5,激活后的 STAT5 能够形成二聚化,然后进入到细胞核内,与 IGFs 的转录调控位点相结合,从而促进 IGFs 的表达和分泌。亚细胞定位结果显示 IGF2 在细胞核中表达,表明该蛋白可能参与与转录调控过程,尤其是细胞

增殖、凋亡和免疫调节相关的转录过程。IGFs 在促进线粒体自噬和减少内质网应激等方面起着保护作用<sup>[12-13]</sup>。本实验中,IGF2 蛋白也在细胞质中表达,表明该蛋白可能参与细胞内多种生物过程。

原核表达系统具有操作简单、成本低廉、需时较短、表达产量高等优点,成为目前最成熟的蛋白表达系统<sup>[14]</sup>。本文使用 pET32a (+) 作为原核表达载体,在羧基末端有 6 个组氨酸残基 ( $6 \times \text{His}$ ),附着在所表达的蛋白尾部,同时增加重组蛋白的可溶性表达<sup>[15]</sup>。SDS-PAGE 结果显示 pET32a-IGF2 在 DE3 中在上清液和包涵体中均有表达,但主要以可溶性的上清液形式存在,满足后续纯化的要求,这可能主要与蛋白的本身特性以及载体有关。本文同时选择了 3 个温度进行诱导,结果表明 37 °C 诱导 3 h 可溶性比例较高,可能是因为在 37 °C 条件下合成蛋白的速度较快,蛋白来不及折叠形成包涵体<sup>[16]</sup>。蛋白主要以可溶性形式存在,更好地保持了蛋白的活性,为下一步蛋白活性分析奠定基础。

研究<sup>[17]</sup>表明,人 IGF2 重组蛋白显著促进了神经干细胞 NSPs 的增殖和自我更新,并增加了 NSPs 中 *Oct4*、*Sox1* 和 *FABP7* 等几种干细胞基因的 mRNA 表达水平,哲罗鱼 (*Hucho taimen*) IGF2 重组蛋白能够有效地刺激虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 性腺细胞和鲤 (*Cyprinus carpio*) 上皮细胞的增殖<sup>[18]</sup>,说明了动物同源原核表达系统获得的 IGF2 蛋白能有效促进细胞的增殖活力,这与本研究结果一致。曹传平等<sup>[19]</sup>研究表明,在最低质量浓度为 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,人 IGF1 重组蛋白才能有效促进人乳腺癌细胞的增殖,存在浓度作用效应。本实验结果显示 IGF2 蛋白在 3~4 d 时间内,各质量浓度组均起到有效促进细胞增殖的作用,但作用水平存在差异;在 5~6 d 时间内,质量浓度为 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 IGF2 蛋白对三角帆蚌外套膜细胞的促增殖效果不显著,这可能是因为添加到培养基中的 IGF2 重组蛋白被消耗殆尽;质量浓度为 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时促增殖效果最显著,当质量浓度上升到 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、22.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,促增殖效果下降,同样存在质量浓度作用效应,这可能与 IGF2 对细胞同时具有促进生长和诱导凋亡的双重作用有关<sup>[20]</sup>。本研究为制备抗体, Pull-Down 互作验证等后续功能研究奠定了基础。

本研究对 IGF2 蛋白进行了亚细胞定位、原核表达、活性分析等方面的研究,为进一步研究 IGF2 在贝类中的生理功能打下了基础,此外,对于突破细胞体外培养的屏障,促进贝类细胞系的建立具有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] JONES J I, CLEMMONS D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions[J]. *Endocrine Reviews*, 1995, 16(1): 3-34.
- [2] PENNINGER J M, KROEMER G. Mitochondria, AIF and caspases-rivaling for cell death execution[J]. *Nature Cell Biology*, 2003, 5(2): 97-99.
- [3] 贡继尚. IGF2 基因对牦牛和小鼠成纤维细胞的增殖及相关信号的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.  
GONG J S. Study on IGF2 gene proliferation and related signaling in yak and mouse fibroblasts[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [4] WANG C, LI X M, DANG H X, et al. Insulin-like growth factor 2 regulates the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stromal cells via IGF-1R and IR [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(6): 619-630.
- [5] 汪桂玲, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1618-1627.  
WANG G L, BAI Z Y, LIU X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1618-1627.
- [6] 李云娟, 盛军庆, 王军花, 等. 池蝶蚌外套膜的组织学观察[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2009, 33(3): 279-284.  
LI Y J, SHENG J Q, WANG J H, et al. Observation on the mantle of the freshwater pearlshell, *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2009, 33(3): 279-284.
- [7] 靳雨丽, 施志仪, 李文娟, 等. 三角帆蚌外套膜细胞培养的改进与大型有核珍珠的培育研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(5): 705-711.  
JIN Y L, SHI Z Y, LI W J, et al. Improvement on mantle cell culture and technique for large nucleated pearl producing in *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(5): 705-711.
- [8] 李倩, 施志仪, 李文娟, 等. 三角帆蚌外套膜细胞体外培养优化及体内植入培养对细胞生长的影响[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(2): 225-234.  
LI Q, SHI Z Y, LI W J, et al. Impact of in vitro optimization and in vivo implantation culture on the growth of *Hyriopsis cumingii* mantle cells [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 225-234.
- [9] OHLSSON C, MOHAN S, SJÖGREN K, et al. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I [J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30(5): 494-535.
- [10] ROTWEIN P. Mapping the growth hormone-Stat5b-IGF-I transcriptional circuit [J]. *Trends Endocrinology & Metabolism*, 2012, 23(4): 186-193.
- [11] YAMAMOTO M, IGUCHI G, FUKUOKA H, et al. SIRT1 regulates adaptive response of the growth hormone-insulin-like growth factor-I axis under fasting conditions in liver [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(37): 14948-14953.
- [12] 田小珍, 陈仲会, 欧连生, 等. miR-339-5p 调控 IGF2 对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡和内质网应激的影响[J]. *中国药师*, 2021, 24(7): 282-286, 291.  
TIAN X Z, CHEN Z H, OU L S, et al. Effects of miR-339-5p on the apoptosis of alveolar epithelial cells and endoplasmic reticulum stress induced by *Streptococcus pneumoniae* by regulating IGF2 [J]. *China Pharmacist*, 2021, 24(7): 282-286, 291.
- [13] 温迪. IGF-1 对 ALS 小鼠及细胞模型线粒体的保护作用及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.  
WEN D. Protective effect and mechanism of IGF-1 on mitochondria in ALS mice and cell model[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [14] POROWINSKA D, WUJAK M, ROSZEK K, et al. Prokaryotic expression systems [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67: 119-129.
- [15] KAAR W, AHRER K, DÜRAUER A, et al. Refolding of Npro fusion proteins [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(4): 774-784.
- [16] 张志强, 刘鑫潮, 牛金中, 等. 尼罗罗非鱼 *Galectin-4* 基因的原核表达及诱导条件优化 [J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(5): 118-123.  
ZHANG Z Q, LIU X C, NIU J Z, et al. Prokaryotic expression and optimization of *Galectin4* gene from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 118-123.
- [17] ZIEGLER A N, SCHNEIDER J S, QIN M, et al. IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(6): 1265-1276.
- [18] 吴秀梅, 徐黎明, 赵景壮, 等. 哲罗鱼胰岛素样生长因子-II 的原核表达与活性分析 [J]. *中国水产科学*, 2015, 22(2): 243-249.  
WU X M, XU L M, ZHAO J Z, et al. Prokaryotic expression and bioactivity analysis of *Hucho taimen* insulin-like growth factor-II [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 243-249.
- [19] 曹传平, 陈晓虹, 吴建国, 等. 胰岛素样生长因子-1 基因原核表达载体的构建及表达蛋白的生物学活性 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(10): 848-851.  
CAO C P, CHEN X H, WU J G, et al. Construction of prokaryotic expression vector for human insulin-like growth factor-I gene and biological activity of expressed protein [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2008, 21(10): 848-851.

[20] 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(1): 58-68.

## Subcellular localization of *IGF2* gene and analysis of recombinant protein to promote *in vitro* cellular activity in *Hyriopsis cumingii*

LI Xuenan<sup>1</sup>, FENG Shangle<sup>1</sup>, WANG He<sup>1</sup>, SHEN Xiaoya<sup>1</sup>, CHEN Yige<sup>1</sup>, BAI Zhiyi<sup>1,2</sup>, LI Wenjuan<sup>1,2</sup>

(1. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Insulin-like growth factors 2 (*IGF2*) plays an important regulatory role in the regulation of growth, differentiation and anabolism in a variety of cells. In this study, the recombinant plasmids pEGFP-*IGF2* and pET32a-*IGF2* of freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* were successfully constructed, and showed that the protein was localized in the cytoplasm and nucleus by pEGFP-*IGF2*-cell transfection. The pET32a-*IGF2* was transformed into BL21 (DE3) for protein induction expression, and its prokaryotic expression vector was successfully obtained. SDS-PAGE showed a clear band at about 25 ku, which matched the size of the target band (26.27 ku), and was mainly expressed in the supernatant. In order to investigate the effect of recombinant protein *IGF2* on the cellular activity of *Hyriopsis cumingii*, the proliferation activity of *Hyriopsis cumingii* mantle cells cultured with different mass concentrations of recombinant target protein (0, 2.5, 5.0, 7.5, 12.5, 17.5, 22.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was further investigated by CCK8 cell activity assay. The results showed that *IGF2* significantly promoted the proliferation activity of *Hyriopsis cumingii* mantle cells ( $P < 0.05$ ), and the best pro-growth effect was achieved at the mass concentration of 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which laid the foundation for the promotion of *Hyriopsis cumingii* mantle cells and cell line establishment, and also provided the basis for the next investigation of the function of *IGF2* in shellfish.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; *IGF2*; subcellular localization; recombinant protein; cell culture; biological activity