

草鱼 IGF-I cDNA 的克隆和在原核生物中的表达*

华益民 林浩然**

(中山大学生命科学院水生经济动物研究所, 广州 510275)

摘要 根据亲缘关系较近的鲤鱼胰岛素样生长因子-I (IGF-I) cDNA 设计一对引物, 通过 RT-PCR 从草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝组织首次克隆了草鱼 IGF-I cDNA 开放阅读框 (ORF) 片段。经序列分析表明克隆的草鱼 IGF-I cDNA 为 Ea-2 亚型, ORF 与鲤鱼有 95% 的同源性, 与人有 63% 的同源性; 草鱼 IGF-I 蛋白与鲤鱼 IGF-I 仅 2 个氨基酸残基不同, 与人 IGF-I 也仅有 13 个残基不同。将表达成熟草鱼 IGF-I (reIGF-I) 蛋白的 cDNA 片段亚克隆至谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合表达载体 pGEX-4T-3, 再将构建的重组表达载体 pGEX-T-gcIGF-I 转入大肠杆菌 BL21。在 IPTG 的诱导下, GST-gcIGF-I 融合蛋白高效表达。兔抗鲑鱼 IGF-I 抗血清进行的 Western Blot 检测显示重组草鱼 IGF-I 蛋白具有免疫活性。

关键词 草鱼 胰岛素样生长因子-I 克隆 原核生物的表达

IGF-I 通过与其受体相互作用调控细胞的生长。Nagamitsu 等 (1991) 报道了无颌类盲鳗 (*Myxine glutinosa*) IGF-I cDNA 的克隆, 根据对 B 区域和 A 区域序列同源性的分析, 盲鳗 IGF-I 既与人类的 IGF-I 相似又与人类 IGF-II 相似。盲鳗是迄今为止发现具有 IGF 基因的最原始的动物。1989 年 Cao 等首次在鱼类 (银大麻哈鱼) 克隆了 IGF-I cDNA, 对其 IGF-I cDNA 的序列和氨基酸顺序进行了分析, 并证实鱼类 IGF-I 的表达也受到 GH 的调节。在鱼类关于 IGF-I 基因的报道主要在鲑鳟鱼类, 且发现存在 4 种亚型的 IGF-I mRNA (Duan *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 1995)。随后, Duguay 等 (1996) 报道金头鲷 (*Sparus aurata*) IGF-I 和 IGF-II mRNA 表达的调节; Liang 等 (1996) 报道鲤鱼组织主要表达 Ea-2 型的 IGF-I。

近年来随着对 IGF-I 在鱼类生长、繁殖及渗透压调节等多方面研究的进一步深入 (李文笙等, 2000; 华益民等, 2001), 获得足够量供研究的鱼类 IGF-I 蛋白已经相当迫切。无论是鱼类 IGF-I 生物效应的检测和作用机制的研究, 还是建立 IGF-I 放射免疫测定法、放射受体测定法、或者是 ELISA 等都需要足够量鱼类 IGF-I 蛋白。许多学者曾试图从鱼的血浆或组织中提纯天然的 IGF-I

蛋白都无功而返。

鉴于鱼类 IGF-I 在水产养殖中潜在的巨大作用, 本文以重要经济鱼种-草鱼为材料, 克隆并分析了草鱼肝组织 IGF-I cDNA; 通过原核表达系统基因重组草鱼 IGF-I 蛋白, 以期对鱼类 IGF-I 基因有更进一步的了解并为进一步研究草鱼或其他相近鱼种 IGF-I 的功能和作用机理以及在生产中的应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

实验中所用限制内切酶, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶和质粒 pGEM-T 为 Promega 公司产品。质粒 pGEX-4T-3, mRNA 纯化试剂盒, cDNA 第一条链合成试剂盒和大肠杆菌 BL21 购于 Pharmacia 公司。大肠杆菌 Top F、TG1 为本室保存。PCR 引物由中科院上海生化所合成。兔抗 GST 多克隆抗体购自 Sigma 公司, 兔抗鲑鱼 IGF-I 抗血清购自 GroPep 公司, 羊抗兔 IgG-HRP 购自天象人公司。

1.2 方法

1.2.1 草鱼 IGF-I cDNA 的克隆 健康幼年草鱼, 体重约 60 g。迅速切开鱼体, 取肝组织 100mg, 用组织匀浆器高速匀浆 1 分钟, 立即根据试剂盒操作

1999-05-10 收稿, 2000-11-29 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39570099)

** 通讯作者 E-mail: 1.S32@zsu.edu.cn

第一作者简介 华益民, 男, 33 岁, 博士, 讲师。研究方向: 分子遗传学。现工作单位: 复旦大学遗传所, 上海 200433。

步骤提取 mRNA。取适量提取的 mRNA 根据试剂盒操作步骤合成 cDNA 第一链,接着用 PCR 扩增草鱼 IGF-I cDNA。由于 IGF-I 基因保守性较高,我们根据与草鱼有较高亲缘关系的鲤鱼的 IGF-I cDNA 序列合成一对引物。上游引物:5'-AT-GACTTCAAACAAGTTCAT-3';下游引物:5'-CTAAATGCGATAG TTGCTTCCC-3'。反应条件如下:94℃ 变性 3 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 Glass Milk 法回收后,用 T4 连接酶与 pGEM-T 16℃ 连接过夜,取适量转化 CaCl₂ 法制备的感受态 Top F' 菌。筛选阳性克隆后,提取质粒测序。

1.2.2 构建重组表达质粒 设计一对引物扩增表达草鱼成熟 IGF-I 蛋白的 cDNA 片段。分别在引物 5' 端加上 BamH I 和 Sal I 酶切位点(上游引物为 5'-TGGGATCCGGGCC GGAGACGCTG-3';下游引物 5'-CGGTCCGACTCATGGAGATTGCCGGT-3')。将 PCR 片段酶切后接入 pGEX-4T-3 用 BamH I 和 Sal I 切出的窗口,构建 GST 重组融合表达载体 pGEX-4T-3-gcIGF-I。测序鉴定开放读框。

1.2.3 融合蛋白的诱导表达 在 pGEX-4T-3 重组表达系统中融合蛋白的表达受 Tac 启动子的控制,需要 IPTG 进行诱导。挑选转化了 pGEX-4T-3-gcIGF-I 的菌株 BL21 单克隆接种到 LB 液体培养基(Amp⁺)中,37℃ 摇动过夜。次日晨以 1:10 的比例接入新鲜 LB 液体培养基(Amp⁺)中,37℃ 摇动培养到 OD₆₀₀ 值达 0.7~0.8 左右,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,再继续 37℃ 培养 3~5 hr。

1.2.4 SDS-PAGE 和 Western 印迹 取诱导培养的细菌 0.5 mL,离心收集菌体,1×PBS 洗一次,离心弃上清,菌体凉干后加适量超纯水和等体积电泳上样缓冲液,煮沸 5~10 min,离心 10 min,取适量上清上样,稳流电泳。积层胶浓度为 5%,电流强度为 18 mA;分离胶浓度为 12%,电流强度为 34 mA。电泳完毕,考马斯亮蓝染色凝胶并脱色。Western 印迹根据 Sambrook 等(1989)方法进行。200 mA 转印 30~60 min 后,切除载有蛋白分子量标准的 NC 膜条,氨基黑染色观察转印情况。NC 膜其余部分 37℃ 封闭 1 hr(封闭液:10% 脱脂奶粉,0.3% Tween-20,1×PBS, pH 7.3),弃封闭液;将膜移入加有适量一抗的封闭液 37℃ 温育 1 hr,经洗涤缓冲液(1×PBS,0.3% Tween-20)洗膜后,再转入含有适量二抗的封闭液中 37℃ 温育 1 hr。洗膜后用 3,3'-二氨基联苯胺/辣根过氧化物酶底物显色系统显色。

2 结果和分析

2.1 草鱼 IGF-I cDNA 的克隆和序列分析

利用 RT-PCR 方法扩增出一条约 537 bp 的 DNA 条带,大小与预期的草鱼 IGF-I cDNA 一致。将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 质粒载体上后,对重组质粒外源片段部分进行了自动测序,并利用软件 BLAST 与 Genbank-EMBL 中已知的 IGF-I 序列进行同源性比较分析,结果证实其为草鱼 IGF-I cDNA(图 1)。gcIGF-I cDNA 开放阅读框全长为 537 nt,编码由 179 个氨基酸残基组成的前蛋白原,信号肽长为 61 个氨基酸,成熟 IGF-I 由 70

```

|Signal peptide
1  ATG ACT TCA AAC AAG TTC ATT TTT GCT GGG CTT TTG CTG GAG ACC CAA GGG ATG TCT AGC GGT CAT TTC TTC CAG GGG
1  M T S N K F I F A G L L L E T Q G M S S G H F F Q G

79  CAC TGG TGT GAT GTC TTT AAG TGT ACC ATG CGC TGT CTC TCG TGC ACC CAC ACC CTC TCA CTG GTG CTG TGC GTC CTC
27  H W C D V F K C T M R C L S C T H T L S L V L C V L
                                     |B domain
157  GCG TTG ACT CCC GCG ACA CTG GAT GCG GGG CCG GAG ACG CTG TGC GGG GCG GAG CTT GTA GAC ACG CTG CAG TTT GTG 53
A L T P A T L D A G P E T L C G A E L V D T L Q F V
                                     |C domain                                     |A domain
235  TGT GGA GAC AGG GGC TTT TAT TTC AGC AAA CCA ACA GGA TAT GGG CCT AGT TCG AGG CCG TCG CAC AAC CGC GGC ATT
79  C G D R G F Y F S K P T G Y G P S S R R S H N R G I
                                     |D domain
313  GTG GAC GAA TGC TGC TTT CAG AGC TGC GAA CTG CCG CGC CTC GAG ATG TAC TGT GCA CCC GTG AAA ACC GGC AAA TCT
105  V D E C C F Q S C E L R R L E M Y C A P V K T G K S
                                     |E domain
391  CCA CGA TCC CTA CGA GCG CAA CGG CAC ACA GAT ATC ACC AGG ACA GCA AAG AAA CCT ATA TGT GCA CAT AGC CAC TCT
(31  P R S L R A Q R H T D I T R T A K K P I S G H S H S

469  TCC TGT AAG GAG GTT CAT CAG AAG AAC TCA AGC CGA GGA AAC ACA GGG GGA AGC AAC TAT CGC ATT TAG 537
15  S C K E V H Q K N S S R G N T G G S N Y R I * 179

```

图 1 草鱼 IGF-I cDNA 序列和推断的草鱼 IGF-I 前蛋白原氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequences and extrapolated amino acid sequences of the Grass carp IGF-I cDNA clone

个氨基酸残基组成。因此草鱼 IGF-I cDNA 和鲤鱼极其相似, ORF 核苷酸序列一致性达 95%; 与人 ORF 的核苷酸序列也有 63% 的同源性。草鱼和鲤鱼 ORF 的 179 个氨基酸残基中仅 9 个不同, 同源性高达 95%; 其中成熟 gcIGF-I 蛋白氨基酸序列中仅 2 个氨基酸残基与鲤鱼不同, 同源性高达 97%; 与人 IGF-I 蛋白也仅有 13 个氨基酸残基不同。信号肽大小与鲤鱼一致而与其它鱼类不同。利用软件 DNAsis 和 PROsis 对 gcIGF-I 前蛋白原和 gcIGF-I 蛋白的分析表明, gcIGF-I 前蛋白原的分子量为 19742.6 Da, 等电点 pI 为 8.81; gcIGF-I 分子量为 7752.45 Da, 等电点 pI 为 7.6。

2.2 草鱼 IGF-I 融合蛋白的表达

将 210 bp 表达成熟草鱼 IGF-I 蛋白的 cDNA 片段装入表达质粒 pGEX-4T-3 中构建了重组表达质粒 pGEX-4T-3-gcIGF-I。在亚克隆过程中, 连

接反应液直接转化表达菌株 BL21 的效率极低, 可先用 TG1 转化, 经鉴定后再用重组质粒 pGEX-4T-3-gc IGF-I 转化 BL21 菌株。经 IPTG 诱导后, pGEX-4T-3-gcIGF-I 转化菌的蛋白样品中出现了 1 条分子量约为 34 kD 的蛋白带 (图 2)。GST 蛋白的分子量为 26 kD, 而草鱼 IGF-I 为 7.75 kD。因此该蛋白带大小与预计的融合蛋白相符, 初步说明草鱼 IGF-I 基因在大肠杆菌中得到了表达。密度扫描结果显示, 融合蛋白的最高表达量占菌体总蛋白的 21.4% 左右。

为证实 IGF-I 基因得到表达, 采用 Western Blotting 技术对表达产物进行了鉴定。Western Blotting 结果显示约 34 kD 的融合蛋白不仅能特异性地与兔抗 GST 多克隆抗体反应, 也能特异性地与兔抗鲑鱼 IGF-I 抗血清反应, 均出现一条分子量约为 34 kD 的特异性反应带, 而不携带重组表达质粒的菌株蛋白样品结果为阴性 (图 3)。进一步证实该表达产物的正确性并表明其具有免疫活性。

研究还表明当菌液 OD600 值为 0.7~1.5 时诱导融合蛋白表达量都在 20% 以上。在 OD600 值为 7.5 时, IPTG 诱导 3~5 hr 表达效果最好。当

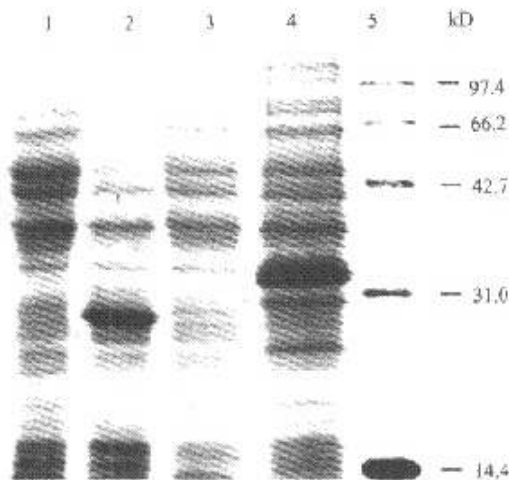


图 2 BL21 细胞裂解液中草鱼重组表达融合蛋白 GST-gcIGF-I 的 SDS-PAGE 图谱 菌液在 OD600 为 7.5 时, 用 0.5mmol/L IPTG 诱导 4 小时

Fig.2 SDS-PAGE analysis of Grass carp recombinant fusion protein GST-gcIGF-I in supernatant of cell lysate of BL21 induced for 4 hr with 0.5 mmol/L

IPTG and OD600 value 7.5

1: 不含质粒的菌株 (Strain containing no plasmid) 2: 含质粒 pGEX-4T-3 的菌株 (Strain containing pGEX-4T-3) 3: 含重组表达质粒但未经诱导的菌株 (Strain containing recombinant plasmid but without induction) 4: 经诱导的含重组表达质粒的菌株 (Induced strain containing recombinant plasmid) 5: 标准分子量蛋白 (Protein molecular weight marker)

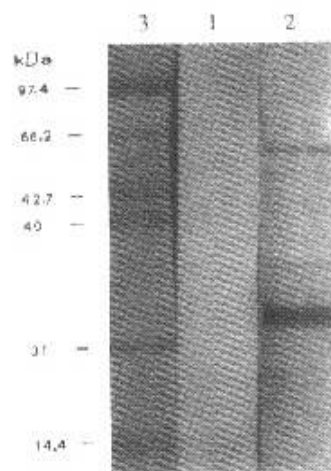


图 3 Western Blotting 检测 BL21 细胞裂解液中草鱼重组表达的融合蛋白 GST-gcIGF-I

Fig.3 Detection of Grass carp recombinant fusion protein GST-gcIGF-I by Western Blotting

抗血清为兔抗鲑鱼 IGF-I (Rabbit anti-salmon IGF-I was used as antiserum)

1: 不含重组表达质粒的菌株 (Strain containing no recombinant plasmid) 2: 含重组表达质粒的菌株 (Strain containing recombinant plasmid) 3: 标准分子量蛋白 (Protein molecular weight marker)

IPTG 浓度大于 0.1 mmol/L 时都能获得大于 20% 的高效表达。

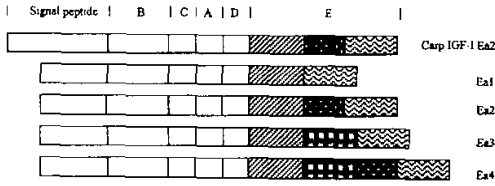


图4 草鱼和鲤鱼 Ea2 亚型 IGF-I cDNA 与四种鲑鳟鱼类 IGF-I cDNA 结构比较

Fig. 4 Comparison of the cloned Grass carp and Common carp Ea2 subtype IGF-I cDNA with the four subtypes of Rainbow trout IGF-I cDNA

E 区域 4 部分以不同的阴影表示, carp IGF-I Ea2 指草鱼和鲤鱼 Ea2 亚型 IGF-I cDNA (Different regions of the E domain are indicated in different shades; carp IGF-I Ea2 indicates Grass carp and Common carp Ea2 subtype IGF-I cDNA)

3 讨论

自从 Cao 等于 1989 年从银大马哈鱼首次克隆出 IGF-I cDNA, 许多学者开始鱼 IGF-I 分子生物学的研究。在鲑鳟鱼类现已发现存在 4 种亚型的 IGF-I cDNA, 由于都和哺乳动物的 IGF-I a 相似, 依其大小分别命名为 Ea-1, Ea-2, Ea-3 和 Ea-4。E 区域由 4 个基本结构单元构成, Ea-1, Ea-2 和 Ea-3 皆因为缺乏其中 1 或 2 个结构单元所致 (图 4)。但所有亚型 IGF-I cDNA 的 E 区域 3' 端均为同一个结构单元, 因此只要草鱼存在足够量各种亚型的 IGF-I mRNA, 本文中设计的引物都能将其扩增出来。本文仅从草鱼肝组织中扩增出一条 DNA 带, 经克隆和序列分析表明其为 Ea-2 亚型。因此我们基本可以推测至少在草鱼肝组织只表达或主要表达这一种形式的 IGF-I mRNA。这与 Duguay 等 (1992), Wallis 等 (1993)、Shamblott 等 (1993) 以及 Duan (1998) 在鲑鳟鱼类的研究结果不同, 而与 Liang 等 (1996) 的研究结果一致。而且草鱼和鲤鱼 IGF-I 的信号肽也一致, 比其它鱼种多出 17 个氨基酸。因此我们推测鲤科鱼和鲑鳟鱼类在 IGF-I mRNA 的表达形式上存在一定差异。由于

我们对草鱼 IGF-I 的研究材料仅仅是其肝组织, 对其它组织是否只表达或主要表达 Ea-2, 需要进一步的研究。

草鱼成熟 IGF-I 蛋白的氨基酸序列与鲑鳟鱼有 4 个不同, 其中 1 个在 B 区域而三个都在 D 区域。草鱼和鲤鱼成熟蛋白仅有的两个氨基酸的差异也存在于 D 区域, 因此我们推测 IGF-I 基因的 D 区域属相对不稳定区。IGF-I 蛋白原中 C 末端的 E 区域也具有相当强的保守性。草鱼、鲤鱼和鳟鱼 IGF-I E 区域 47 个氨基酸相互间都只有 7 个氨基酸的差异。哺乳动物 IGF-I E 区域也具有相当高的保守性, 且哺乳动物和鱼类 IGF-I 的 E 区域具有较高的同源性。Shimatsu 等 (1987) 曾推测 E 肽可能具有某种生物功能。近来在哺乳类发现 IGF-I b 的 E 区域 (IBE1) 编码一个酰胺肽进一步支持了这一假设。鱼类 E 区域的氨基酸序列含有肽基 C 端酰胺化的信号基元 (signal motif)。Shamblott 等 (1993) 推断在鳟鱼 IGF-I Ea-4, 3, 和 2 该序列 N 端有 1 个或更多的内肽酶酶切位点, 可产生 E 区内部的酰胺肽。

本文中采用 GST 融合原核表达系统, 获得了较高的重组草鱼 IGF-I 表达产物, 最佳诱导培养条件是当表达菌液 OD600 值为 0.7~1.5 时, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 hr 左右。鲑鱼与草鱼的 IGF-I 蛋白仅 3 个氨基酸的差异。因此本文利用抗鲑鱼 IGF-I 的抗血清进行 Western Blot 分析, 结果表明表达产物具有免疫活性, 可用于建立检测血清和组织中 IGF-I 蛋白水平的放射免疫测定等技术。在融合蛋白的 GST 和草鱼 IGF-I 之间有一个凝血酶酶切位点, 通过凝血酶可获得氨基酸多出 2 个氨基酸 (甘氨酸和丝氨酸) 的 IGF-I 非融合蛋白。Moriyama 等 (1993) 研究发现大肠杆菌表达的基因重组鲑鱼 IGF-I 蛋白在 3.9~250 ng/mL 范围内能显著刺激鲑鱼软骨的摄硫能力, 且存在剂量依赖效应, 表明原核表达的重组 IGF-I 蛋白具有生物活性。目前正在大量收获基因重组草鱼 IGF-I, 以检测其生物活性并用于鱼类 IGF-I 功能和作用机理的研究。

参 考 文 献 (References)

- Cao, Q. P., S. J. Duguay, E. Plisetskaya, S. F. Steiner and S. J. Chan 1989 Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA. *Molecular Endocrinology* 3: 2 005 ~ 2 010.
- Duan, C., S. J. Duguay and E. M. Plisetskaya 1993 Insulin like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family peptides. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 371 ~ 379.
- Duan, C. 1998 Nutritional and developmental regulation of insulin like growth factors in fish. *J. Nutr.* 128: 306S ~ 314S.
- Duguay, S. J., L. K. Park, M. Samadpour and W. W. Dickhoff 1992 Nucleotide sequence and tissue distribution of three insulin-like growth factor I prohormones in salmon. *Molecular Endocrinology* 6: 1 202 ~ 1 210.
- Duguay, S. J., L. J. Zhang, D. F. Steiner, B. Funkenstein and S. J. Chan 1996 Developmental and tissue regulated expression of insulin-like growth factor I and II mRNA in *Sparus aurata*. *J. Mol. Endocrinol.* 16: 123 ~ 132.
- Hua, Y. M. and H. R. Lin 2001 Effects of different nutritional states on expression IGF-I mRNA in immature Common carp liver. *Acta Zool. Sin.* 47(1):94 ~ 100. [华益民, 林浩然 2001 营养状况对幼年鲤鱼肝脏 IGF-I mRNA 表达的影响. *动物学报* 47(1): 94 ~ 100.]
- Liang, Y. H., C. H. K. Cheng and K. M. Chan 1996 Insulin-like growth factor I Ea-2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5 (2): 145 ~ 152.
- Li, W. S. and H. R. Lin 2000 Effects of sex steroid on the growth hormone (GH) gene expression in the pituitary of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Zool. Sin.* 46(2): 175 ~ 182. [李文笙, 林浩然 2000 性类固醇激素对鲤鱼脑垂体生长激素基因表达的影响. *动物学报* 46(2): 175 ~ 182.]
- Moriyama, S., S. J. Duguay, J. M. Conlon, W. W. Dickhoff and E. M. Plisetskaya 1993 Recombinant coho salmon insulin-like growth factor I expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 218: 205 ~ 211
- Nagamatsu, S., S. J. Chan, S. Falkmer and D. E. Steiner 1991 Evolution of the insulin gene superfamily: sequence of a preproinsulin-like growth factor cDNA from the Atlantic hagfish. *J. Bio. Chem.* 266: 2 397 ~ 2 402.
- Sakamoto, T., T. Hirano, S. S. Madsen, R. S. Nishioka and H. A. Bern 1995 Insulin-like growth factor I gene expression during parr-smolt transformation of coho salmon. *Zool. Sci.* 12: 249 ~ 252.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis 1989 *Molecular Cloning* (second edition). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shamblott, M. J and T. T. Chen 1993 Age-related and tissue-specific levels of five form of insulin-like growth factor mRNA in a teleost. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2 (6): 351 ~ 361.
- Shimatsu, A and P. Rotwein 1987 Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. *J. Biol. Chem.* 262: 7 894 ~ 7 900.
- Wallis, A. E and R. H. Devlin 1993 Duplicated insulin-like growth factor I genes in salmon display alternative splicing pathways. *Molecular Endocrinology* 7: 409 ~ 422.

外 文 摘 要 (Abstract)

CLONING AND EXPRESSION IN PROKARYOTE OF GRASS
CARP IGF-I cDNA *

HUA Yi-Min LIN Hao-Ran**

(Institute of Aquatic Economic Animal, School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Fragment of open reading frame of Grass carp (*Ctenopharyngoden idellus*) cDNA was cloned for the first time from liver by RT-PCR technique using a set of primers designed according to the closely related Common carp IGF-I cDNA. Sequence analysis showed that similar to Common carp IGF-I cDNA, the cloned Grass carp IGF-I cDNA was also Ea-2 subtype, and the homology of nucleotide sequence in open reading frame was up to 95% compared with the counterpart of Common carp, only nine amino acid were different between the two pre-pro-IGF-I s. The homology of nucleotide sequence in ORF of Grass carp was 63% compared with the counterpart of human. Grass carp and Common carp mature protein differed in only two amino acids, while Grass carp and human mature protein differed in 13 amino acids. The fragment of Grass carp IGF-I DNA which expressed mature gcIGF-I protein, was subcloned into a GST fusion expression vector, pGEX-4T-3, to construct a recombinant expression vector, pGEX-4T-3-gcIGF-I. The pGEX-4T-3-gcIGF-I was then transformed into *E. coli*, BL21. When cultured and induced by IPTG, high amount of GST-gcIGF-I fusion protein was expressed in the transformed BL21. The recombinant IGF-I protein had immune activity showed by Western Blotting technique.

Key words Grass carp (*Ctenopharyngoden idellus*), IGF-I, Cloning, Expression, Prokaryote

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39570099)