

文章编号: 1003-8701(2015)04-0068-04

# 原核表达梅花鹿 IGF-1 成熟多肽对 鸡 CEF 和 CEK 细胞增殖的影响

胡 薇, 牛永梅, 司 博, 王蒙蒙, 闫语多

(吉林农业大学, 长春 130118)

**摘 要:** 本实验利用原核表达载体 pET-30a 对梅花鹿胰岛素样生长因子-1 (Insulin Growth Factor, IGF-1) 成熟多肽基因进行诱导表达与纯化, 经羟胺裂解和复性后获得重组梅花鹿 IGF-1 成熟多肽蛋白。再通过 MTT 法检测重组蛋白 IGF-1 对鸡胚成纤维细胞 (Chick Embryo Fibroblast, CEF) 及鸡胚肾细胞 (Chicken Embryo Kidney, CEK) 增殖的影响。MTT 法检测结果发现不同浓度的重组 IGF-1 成熟多肽皆能促进鸡胚成纤维细胞的增殖, 其中, 在 48 h、终浓度为 200 ng/mL 时对鸡胚成纤维细胞增殖的影响最显著。但不同浓度的重组 IGF-1 成熟多肽以及不同处理时间对鸡胚肾细胞增殖均无显著影响。本研究结果说明原核表达的 IGF-1 成熟多肽可显著促进鸡胚成纤维细胞的增殖, 但对鸡胚肾细胞的增殖影响不显著。

**关键词:** 梅花鹿; IGF-1 成熟多肽; 原核表达; 鸡胚成纤维细胞; 鸡胚肾细胞; 增殖

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

## Effect of Prokaryotic Expression of IGF-1 Mature Peptide from Cervus Nippon on Proliferation of Chicken CEF and CEK Cells

HU Wei, NIU Yong-mei, SI Bo, WANG Meng-meng, YAN Yu-duo

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** Sika deer Insulin Growth Factor (IGF-1) mature peptide gene was expressed and purified by prokaryotic expression vector pET-30a in this study. Recombinant IGF-1 mature peptide protein from sika deer was obtained after splitting decomposition of hydroxylamine and protein renaturation. Chicken embryo fibroblast cell and chicken embryo kidney cell proliferation was determined by MTT assay after recombinant IGF-1 mature peptide treatment. The results showed that recombinant IGF-1 mature peptide promoted the proliferation of CEF cell in different concentrations. Among them, the most significant impact on CEF cell proliferation was at 48h, and the final concentration was 200 ng/mL. But the effect of recombinant IGF-1 on CEK cell was not significant in different concentrations and different treatment time. Our findings indicated that IGF-1 mature peptide after renaturation promoted chicken embryo fibroblast proliferation significantly, but its influence on chicken embryo kidney cell proliferation was not significant.

**Key words:** Cervus nippon; Insulin growth factor-1 mature peptide; Prokaryotic expression; Chicken embryo fibroblast cell; Chicken embryo kidney cell

鹿茸是雄性梅花鹿的第二性征, 是目前已知的唯一一个失去后可以完全再生的哺乳动物附属器官, 这种再生是基于角柄骨膜中干细胞聚集的

过程<sup>[1]</sup>。作为特殊的骨组织, 鹿茸在快速生长期能够以每天 1~2 cm 的速度生长而不产生癌变, 有人推测鹿茸中很可能存在着与一般组织不同的活性物质控制并刺激着鹿茸的生长<sup>[2]</sup>。因此, 鹿茸成为了研究创伤修复及哺乳动物器官再生的理想模型。生长因子是调节细胞增殖和分化的一类物质, 其分子量从几百到几万不等, 习惯上称多肽生长因子<sup>[3]</sup>。近年来, 国内外学者相继在鹿茸中发现各种细胞生长因子, 表明鹿茸是一

收稿日期: 2015-03-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30972083); 吉林省科技发展计划项目 (20090574); 吉林农业大学国家 (省) 级大学生创新创业训练计划项目 (201310193032)

作者简介: 胡 薇 (1966-), 女, 副教授, 博士, 主要从事鹿茸再生发育机理的研究。

个天然的细胞生长因子库,其中胰岛素样生长因子在鹿茸快速生长中起主要作用<sup>[4]</sup>。胰岛素样生长因子的化学结构与胰岛素原类似,是一类广谱性的促生长因子,主要包括 IGF-1 (Insulin Growth Factor, IGF-1) 和 IGF-2 (Insulin Growth Factor, IGF-2)<sup>[5]</sup>。IGF-1 存在于鹿茸角顶部再生鹿茸角增殖区,能促进间充质干细胞及软骨细胞的增殖<sup>[6]</sup>。其在鹿茸中含量丰富,可能是促进鹿茸生长的主要生长因子,具有极强的刺激鹿茸生长的作用,其表达的高峰期与鹿茸快速生长期相一致<sup>[7-8]</sup>。体外试验证实,IGF-1 和 IGF-2 均可促进鹿茸细胞的增殖<sup>[9]</sup>。其中 IGF-1 是影响鹿茸生长速度的最主要因素<sup>[10]</sup>。因此,本研究旨在利用原核表达载体 pET-30a 对 IGF-1 成熟多肽进行表达和纯化,获得重组梅花鹿 IGF-1 成熟多肽,再通过 MTT 法检测重组梅花鹿 IGF-1 成熟多肽对鸡胚成纤维细胞(CEF)和鸡胚肾细胞(CEK)增殖的影响,为研究梅花鹿 IGF-1 的功能及在细胞增殖中的调节作用提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

载有梅花鹿茸 IGF-1 成熟肽基因的大肠杆菌菌种(pET-30a-IGF-1)由吉林农业大学生物化学与分子生物学实验室制备。BCA 法蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,Sephadex G-25、Sephadex G-50 葡聚糖凝胶购自 Pharmacia-Biotech 公司,蛋白电泳 Marker 购自 TAKARA, Tris 购自 Solarbio, SDS、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵均为 Sigma 电泳纯,TEMED 为鼎国分装电泳纯,DMEM 高糖培养液及胎牛血清购自天津市灏阳生物制品有限公司、醋酸、醋酸钠、冰乙醇、尿素、羟胺、咪唑等均为国产分析纯。鸡胚成纤维细胞和鸡胚肾细胞购自上海昕毓生物科技有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 重组梅花鹿 IGF-1 成熟肽 pET-30a-IGF-1 的诱导表达

于-80℃冰箱中取出载有梅花鹿茸 IGF-1 成熟肽基因的大肠杆菌菌种 pET-30a-IGF-1,以 1:100 的比例接种于 20 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中,37℃ 190 r/min 摇床活化培养 12 h。再将活化后的菌液按比例接种于 2 L 含有 Amp 的 LB 液体培养基中,37℃ 190 r/min 摇床震荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 时停止扩播。最后向扩播后的菌液中

加 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L,37℃ 摇床 190 r/min 震荡培养 4 h,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定诱导是否成功。

#### 1.2.2 重组蛋白的 Ni 柱纯化

诱导成功的菌液在 10 000 r/min,4℃ 条件下离心 15 min,弃上清,沉淀用适量 PBS 缓冲液吹打均匀使之重悬,并加入适量的 PMSF 保护蛋白不被酶解,用超声波破碎仪在冰上破碎菌体。破碎后的菌液 10 000 r/min,4℃ 离心 15 min,弃上清,所得沉淀即为包涵体蛋白。将沉淀重悬于适量 Binding Buffer 中,10 000 r/min,4℃ 离心 15 min,弃沉淀,上清用滤器过滤,上清液经 Ni 柱进行纯化,收集波长为 280 nm 的 Elution Buffer 洗脱峰流出液。对收集的洗脱液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

#### 1.2.3 重组蛋白的切割与复性

用羟胺裂解液溶解上述获得的融合蛋白调至终浓度为 1.0 mg/mL,45℃ 水浴反应 5 h 以裂解融合蛋白,用 HCl 将溶液 pH 调至 8.0 后反应终止。对切割后的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳验证。取适量 Binding Buffer 溶解冻干后的蛋白,过 Ni 柱纯化,收集波长为 280 nm 的 Binding Buffer 洗脱峰流出液,并对收集的纯化蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。最后在验证正确的蛋白溶液中加入复性液,使其浓度为 0.15 mg/mL,于 4℃ 复性 12 h 后透析 48 h 并冻干,即可获得重组梅花鹿 IGF-1 成熟肽蛋白。

#### 1.2.4 重组 IGF-1 成熟多肽的生物学活性检测

将鸡胚成纤维细胞和鸡胚肾细胞复苏后用含有 10% 体积分数小牛血清的 DMEM 培养基进行培养,观察到细胞融合度达到 80% 后将细胞转入 96 孔板中培养 24 h,分别向两种细胞中加入重组 IGF-1 成熟多肽,使蛋白最终质量浓度梯度分别为 0(空白对照),100、200、300 ng/mL,培养 24、48、72 h 后,用 MTT 法测 OD<sub>490</sub> 的值用以表示重组 IGF-1 成熟多肽对细胞增殖的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET-30a-IGF-1 的诱导表达结果

pET-30a-IGF-1 的诱导表达后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果见图 1。如图所示,终浓度为 0.6 mmol/L IPTG 诱导的表达产物在约 28.0 kD 处有特异性条带出现,与预期结果相符,说明 IPTG 诱导 IGF-1 成熟肽成功。

### 2.2 重组蛋白 IGF-1 的纯化与鉴定

将终浓度为0.6 mmol/L IPTG 诱导的表达产物利用 Ni 柱进行纯化,对所得到的重组 IGF-1 成熟肽进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。如图 2

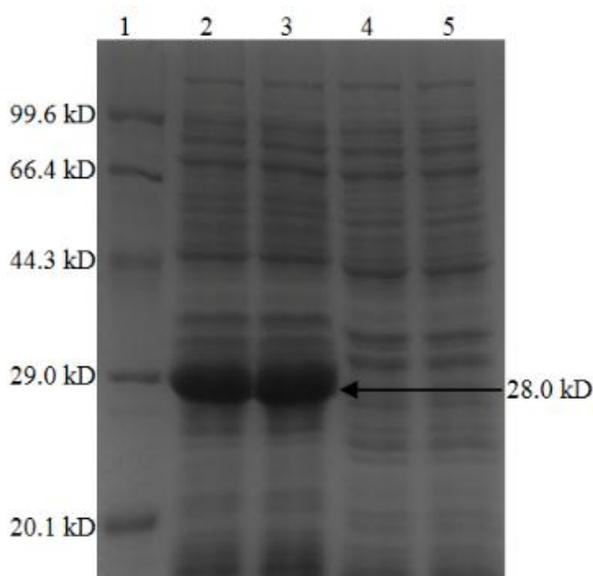


图 1 诱导表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

1. 蛋白 marker; 2~3. 诱导的表达产物;  
4~5. 未诱导的 pET-30a-IGF-1

所示,纯化后的 IGF-1 成熟肽在分子质量约 28.0 kD 处有一条特异性条带出现,与 IGF-1 成熟肽分子量大小一致。

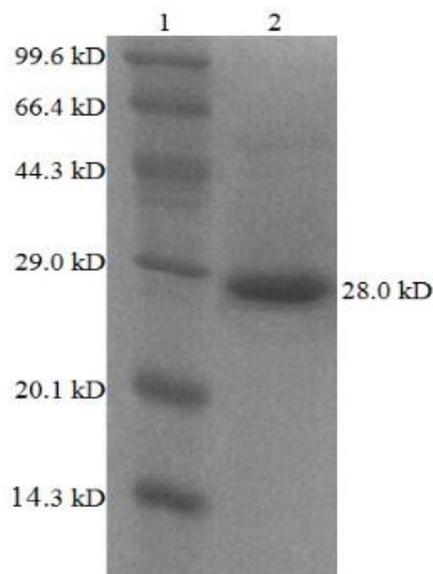


图 2 重组梅花鹿 IGF-1 成熟肽 Ni 柱纯化结果

1. 蛋白 marker; 2. 纯化后的 IGF-1 成熟肽

### 2.3 重组蛋白 IGF-1 的切割与复性

将纯化后收集的重组 IGF-1 成熟多肽加入羟胺裂解液进行蛋白切割,并进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果见图 3。如图所示,羟胺裂解后的蛋白产物在 28.0 kD, 20.5kD, 7.5kD 处分别有一处特异性条带,28.0 kD 为未切割成功的融合蛋白,20.5kD 为切割下的标签蛋白,7.5kD 为梅花鹿 IGF-1 成熟多肽蛋白。最后对切割后的蛋白进行 Ni 柱亲和层析并复性和透析,经 SDS 电泳检测发现,在 7.5 kD 处有一条特异性蛋白条带,即为梅花鹿 IGF-1 成熟多肽蛋白。

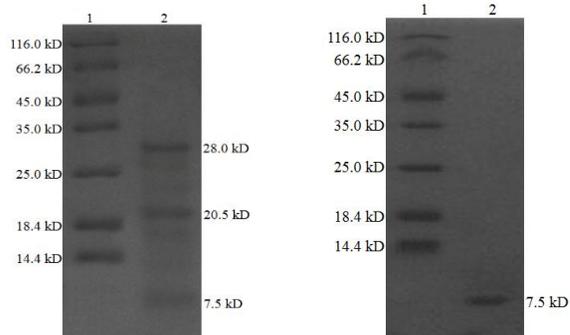


图 3 IGF-1 融合蛋白  
羟胺裂解结果

1. 蛋白 marker;  
2. 羟胺裂解产物

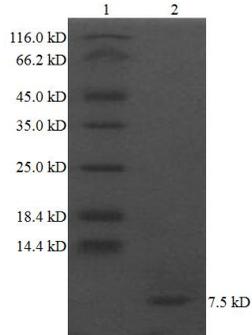


图 4 切割后的蛋白  
纯化结果

1. 蛋白 marker;  
2. 纯化产物

### 2.4 梅花鹿 IGF-1 成熟多肽的生物学活性检测

配制含有不同浓度 IGF-1 成熟多肽的培养基对鸡胚成纤维细胞和鸡胚肾细胞进行培养,24、48、72 h 后收集细胞,用 MTT 法检测细胞的增殖

表 1 不同培养时间下不同浓度 IGF-1 成熟多肽对鸡胚成纤维细胞 (CEF) 增殖的影响

IGF-1 成熟肽添加量 (ng/mL)	OD <sub>490</sub>		
	24 h	48 h	72 h
0 (CK)	0.233±0.012	0.258±0.023	0.271±0.026
100	0.281±0.024*	0.324±0.015*	0.397±0.033*
200	0.302±0.021**	0.445±0.014**	0.491±0.009*
300	0.307±0.019**	0.438±0.017**	0.472±0.025*

注:“\*”代表差异显著,“\*\*”代表差异极显著

表 2 不同培养时间下不同浓度 IGF-1 成熟多肽对鸡胚肾细胞 (CEK) 增殖的影响

IGF-1 成熟多肽添加量 (ng/mL)	OD <sub>490</sub>		
	24 h	48 h	72 h
0 (CK)	0.221±0.013	0.243±0.019	0.258±0.024
100	0.224±0.022	0.256±0.017	0.271±0.021
200	0.230±0.017	0.268±0.015	0.283±0.018
300	0.229±0.021	0.252±0.013	0.287±0.027

情况,结果见表1和表2。如表所示,在加入不同浓度的IGF-1成熟多肽之后,鸡胚成纤维细胞的增殖速度随IGF-1成熟多肽浓度的升高而加快,且最佳的作用时间和浓度分别为48 h和200 ng/mL。而鸡胚肾细胞的增殖随IGF-1成熟多肽浓度的升高变化则不显著。

### 3 讨 论

鹿茸顶端组织是天然的细胞生长因子库,而生长因子是调节细胞增殖和分化的一类重要物质<sup>[11]</sup>。其中胰岛素生长因子-1是单链碱性蛋白,由70个氨基酸组成,在功能和结构上与人的胰岛素原约50%相似<sup>[12]</sup>。相关研究表明,鹿茸组织中IGF-1的高表达可以促进鹿茸细胞的增殖,是鹿茸快速增殖过程中的主效因子之一,具有极强的刺激鹿茸生长的作用<sup>[13]</sup>。鹿茸顶部亦含有大量IGF受体,且IGF-1表达的高峰期与鹿茸快速生长期相一致<sup>[14-15]</sup>。胰岛素样生长因子又是一类重要的生物资源,但天然IGF-1含量较低且极不稳定,市场售价非常昂贵。同时提纯天然IGF-1还存在许多困难,因此人工表达提纯IGF-1已成为深入研究IGF-1的前提。采用基因工程的手段制备重组IGF-1已成为当前的研究方向,生产前景良好,在国际上已逐渐形成一种高效益的技术产业。目前,国内外已成功表达了人及其它多种脊椎动物的IGF-1,这不仅为我们提供了参考资料,更提示我们要紧跟研究前沿,在IGF-1的开发利用领域争得一席之地。

因此,本研究为了探究IGF-1成熟多肽促细胞增殖的活性,选择长度为234bp的梅花鹿IGF-1成熟多肽基因,消除多余的氨基酸序列对蛋白功能部位正确折叠的影响<sup>[16-17]</sup>。在克隆获得的梅花鹿IGF-1成熟多肽基因基础上,利用原核表达载体pET-30a对其进行诱导表达与纯化,旨在获得体外重组的梅花鹿IGF-1蛋白。pET原核表达载体系列是*E.coli*中克隆表达重组蛋白功能强大的系统,其mRNA合成速度约为大肠杆菌的6倍。两种T7启动子以及多种拥有不同抑制本底表达水平的宿主细胞共同构成了一个极为灵活而有效的系统,能使各种目的蛋白得以最优化的表达。因此,笔者选择pET原核表达载体来实现目的蛋白的高效表达。同时pET-30a载体含有组氨酸标签,可以特异性地结合在Ni柱上,实现表达蛋白的高度纯化<sup>[18]</sup>。IGF-1成熟肽的第一个氨基酸为Gly,我们在Gly前添加了一个Asn,因此便形成了

一个Gly-Asn肽键,该肽键可以被羟胺裂解液特异性裂解,切割暴露出独立的成熟多肽,避免了多余氨基酸序列对成熟多肽复性的影响。包涵体蛋白的复性是一个很复杂的过程,除了对复性条件和过程进行控制外,很大程度上与蛋白质自身的氨基酸组成和结构特性相关<sup>[19]</sup>。本实验使用的蛋白复性液通过自身的GSSG/GSH氧化还原系统,使目的蛋白肽链中的二硫键正确连接并折叠形成具有生物学活性的三维构象,恢复蛋白质的活性。

目前,关于梅花鹿IGF-1成熟多肽相关功能的研究很少,特别是对鸡胚细胞增殖的影响方面未见报道。本实验通过MTT法检测结果显示,不同浓度的重组梅花鹿IGF-1成熟多肽在不同时间条件下对鸡胚成纤维细胞和鸡胚肾细胞的影响有所不同。随着培养液中IGF-1成熟肽浓度的升高和时间的适当延长,鸡胚成纤维细胞的增殖速度也随之明显加快,但IGF-1成熟肽浓度的变化对鸡胚肾细胞的影响却并不明显。说明IGF-1成熟肽能够促进鸡胚肌肉的发育而与鸡肾脏发育关联甚微,这可能与鸡胚肾细胞上缺少IGF-1受体而鸡胚成纤维细胞上IGF-1受体丰富有关,这一结果与丁庆峰等<sup>[20]</sup>报道的相一致。总之,本研究通过原核表达及纯化获得了纯度较高的梅花鹿IGF-1成熟多肽蛋白,对获得的包涵体蛋白进行复性后发现其可以特异性提高鸡胚成纤维细胞的增殖速度,说明复性后的IGF-1蛋白可以促进肌肉发育。

随着农业和畜牧业的发展,人类对动物产品的要求不断提高,重组IGF正是受人瞩目的发现新外源性激素的潜在领域。吉林省是鹿业大省,鹿业资源丰富。因此,利用基因工程方法获得大量体外重组梅花鹿IGF-1制品,对降低动物饲料成本,促进动物生长发育和繁育具有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 董 振,褚文辉.鹿茸再生及其蛋白质组学研究进展[J].中国组织工程研究,2014,18(24):3931-3936.
- [2] 何忠梅,王铁成.鹿茸多肽生长因子研究进展[J].经济动物学报,2011,15(3):179-184.
- [3] 王秋玉,王本祥.论鹿茸生长因子[J].中医药学报,2000,(6):10-12.
- [4] 李 婷,李 沐,孟星宇,等. MicroRNA介导的IGF-1基因对鹿茸软骨细胞增殖的影响[J].西北农林科技大学学报,2013,41(11):7-12,18.
- [5] 朱红杰,张彦华.胰岛素样生长因子的研究进展[J].黑龙江医药,2007,20(3):200-203.

(下转第112页)

面积受胚乳类型或(和)品种的影响。因此,关于玉米角质和粉质胚乳淀粉合成相关酶的活性及其与淀粉粒粒度分布的关系,还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Pereira R C, Davide L C, Pedrozo C A, et al. Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grains[J]. *Genetic Molecular Research*, 2008, 7(2): 498-508 .
- [ 2 ] 王 忠, 顾蕴洁, 慧 慧, 等. 关于玉米胚乳细胞发育的研究[EB/OL]. 中国科技论文在线, 2012[2013-7-23]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201209-77> .
- [ 3 ] 夏 涛, 窦美安, 刘纪麟. 若干玉米胚乳突变体基因效应的研究[J]. *作物学报*, 1997, 23(6): 753-758 .
- [ 4 ] 杨引福, 李向拓, 谢恩魁. 不同硬度胚乳奥帕克-2( $\alpha 2$ )玉米子粒超微结构与品质性状的相关研究[J]. *中国农业科学*, 2002, 38(1): 59-63 .
- [ 5 ] Wei C, Zhang J, Chen Y, et al. Physicochemical properties and development of wheat large and small starch granules during endosperm development[J]. *Acta Physiology Plant*, 2010, 32(5): 905-916 .
- [ 6 ] 银永安, 齐军仓, 李卫华, 等. 小麦胚乳 A、B 型淀粉理化特性研究[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(11): 2372-2379 .
- [ 7 ] Ao Z H, Jane J L. Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 67(1): 46-55 .
- [ 8 ] Geera B P, Nelson J E, Souza E, et al. Composition and properties of A- and B-type starch granules of wild-type, partial waxy, and waxy soft wheat[J]. *Cereal Chemistry*, 2006, 83(5): 551-557 .
- [ 9 ] 陆大雷, 郭换粉, 董 策, 等. 生长季节对糯玉米淀粉粒分布和热力学特性的影响[J]. *作物学报*, 2010, 36(11): 1998-2003 .
- [ 10 ] Gagan D S, Amrinder S B, Sukhcham S, et al. Physicochemical, pasting, thermal and morphological characteristics of Indian water chestnut (*Trapa natans*) starch[J]. *Starch*, 2009, 61(1): 35-42 .
- [ 11 ] 伊祖涛, 张海艳. 玉米角质和粉质胚乳淀粉粒粒径、糊化特性及凝胶质构特性的研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(7): 27-32 .
- [ 12 ] Park S, Wilson J D, Seabourn B W. Starch granule size distribution of hard red winter and hard red spring wheat: Its effects on mixing and breadmaking quality[J]. *Journal of Cereal Science*, 2009, 49(1): 98-105 .
- [ 13 ] Stoddard F L. Survey of starch particle-size distribution in wheat and related species[J]. *Cereal Chemistry*, 1999, 76(1): 145-149 .
- [ 14 ] Chojecki A J S, Gale M D, Bayliss M W. The number and sizes of starch granules in the wheat endosperm, and their association with grain weight[J]. *Annals of Botany*, 1986, 58(6): 819-831 .
- [ 15 ] Edith A, Ana P B R, Guadalupe M, et al. Physicochemical and biochemical characterization of starch granules isolated of pigmented maize hybrids[J]. *Starch*, 2008, 60(8): 433-441 .
- [ 16 ] 陆大雷, 郭换粉, 董 策, 等. 普通、甜、糯玉米果穗不同部位子粒淀粉理化特性和颗粒分布差异[J]. *作物学报*, 2011, 37(2): 331-338 .
- [ 17 ] 张 丽, 张吉旺, 刘 鹏, 等. 不同淀粉含量玉米子粒淀粉粒度分布特性[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(8): 1596-1602 .
- [ 18 ] Rubí G U, Edith A, Ana P B R, et al. Physicochemical and enzyme characterization of small and large starch granules isolated from two maize cultivars[J]. *Cereal Chemistry*, 2010, 87(1): 50-56 .
- [ 19 ] 石德杨, 张海艳, 董树亭. 补充灌溉和施氮对玉米子粒淀粉粒粒度分布的影响[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(4): 633-643 .
- [ 20 ] Zhang C H, Jiang D, Liu F L, et al. Starch granules size distribution in superior and inferior grains of wheat is related to enzyme activities and their gene expressions during grain filling [J]. *Journal of Cereal Science*, 2010, 51(2): 226-233 .
- [ 21 ] Peng M, Gao M, Båga M, et al. Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 265-272 .
- [ 22 ] Tyynelä J, Stitt M, Lönneborg A, et al. Metabolism of starch synthesis in developing grains of the shx shrunken mutant of barley (*Hordeum vulgare*)[J]. *Plant Physiology*, 1995, 93(1): 77-84 .
- (责任编辑:范杰英)
- 
- (上接第 71 页)
- [ 6 ] 崔昊震, 尹明浩. 鹿茸生长因子的研究现状[J]. *延边大学医学学报*, 2006, 29(1): 70-72 .
- [ 7 ] 陈凡波, 尹建元. 鹿茸、鹿心和鹿血中胰岛素样生长因子-1 的制备及含量检测[J]. *中药材*, 2014, 37(12): 2155-2158 .
- [ 8 ] 张 伟, 褚文辉. 鹿茸成骨过程及其相关调控机制研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(8): 6-11 .
- [ 9 ] 李 沐, 胡 薇. MicroRNA 介导的 IGF-1 基因沉默与端粒酶对鹿茸细胞增殖抑制的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013 .
- [ 10 ] 苏仲毅, 尹芸生. 胰岛素样生长因子 IGF-1 促骨质疏松骨折愈合的实验研究[J]. *中国药物与临床*, 2007, 7(3): 182-185 .
- [ 11 ] 苏凤艳, 宗 颖, 温铁峰. 鹿茸生长发育及其再生调控机制的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013(2): 32-34 .
- [ 12 ] 江军伟, 夏立建. 胰岛素样生长因子-I 在胃癌组织中的表达及临床意义[D]. 泰安: 泰山医学院, 2014 .
- [ 13 ] 张大成, 李淑芬. 鹿茸中胰岛素样生长因子-1 的提取及纯化研究[D]. 天津: 天津大学, 2008 .
- [ 14 ] 李艳梅, 杨鸣琦. CHR、IGF-1、IGF-1R 基因在鹿茸顶端的组织定位及鹿 CHR 基因 cDNA 克隆[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008 .
- [ 15 ] 刘 振, 赵海平. 鹿茸再生及其分子调节机理研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(2): 50-53 .
- [ 16 ] 郝林琳, 张永亮. 鹿茸多肽研究及 IGF-15' 端调控序列分析[D]. 长春: 吉林大学, 2006 .
- [ 17 ] 孟星宇, 李 婷. 梅花鹿 IGF-1 的原核表达与纯化[J]. *西北农林科技大学学报*, 2012, 40(7): 7-13 .
- [ 18 ] 夏海锋, 张 显. 镍离子亲和层析介质的制备及其用于组氨酸标记蛋白质的纯化[J]. *江南大学学报*, 2010, 9(6): 685-689 .
- [ 19 ] 才 蕾, 娇丽媛. 甲胎蛋白的原核表达及复性优化[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(1): 193-197 .
- [ 20 ] 丁庆峰, 刘贺贺. 鸭胚卵内注射 rhIGF-1 对其出壳后卵泡抑素基因表达及胸肌发育的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(8): 1101-1106 .
- (责任编辑:范杰英)