

重组草鱼干扰素 IFN γ 原核表达及其抗 GCRV 效果

袁雪梅¹ 徐铃威² 黄雷¹ 郝贵杰¹ 蔺凌云¹ 潘晓艺¹ 姚嘉赟¹ 沈锦玉^{1*}

¹ 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室/浙江省鱼类健康与营养重点实验室/浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001; ² 杭州市萧山区农(林)业技术推广中心水产站, 杭州 311225

*通讯作者, sjinyu@126.com.

摘要 近年来,由草鱼呼肠孤病毒(*Grass carp reovirus*, GCRV)引发的草鱼出血病给该产业造成了严重的损失。为探究重组干扰素对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的免疫保护作用及其作用机制,本研究构建草鱼干扰素 γ (interferon γ , IFN γ)的原核表达载体 PET-30a-rCiIFN γ ,并转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) Transetta (DE3)感受态细胞,经 IPTG 诱导表达及镍柱层析法纯化后获得重组蛋白 rCiIFN γ ;通过细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)检测 rCiIFN γ 的体外抗病毒活性;进一步在攻毒实验中评价 rCiIFN γ 免疫对草鱼体内抗 GCRV 感染的影响。结果显示,重组草鱼 IFN γ 融合蛋白(rCiIFN γ)分子量约 23 kD,纯化复性后的 rCiIFN γ 抗病毒效价达 2.8×10^3 U/ μ g; rCiIFN γ 不仅能在体外抑制 GCRV 引起的细胞病变,还可以诱导草鱼肝、脾、肾、肠中 *IFN*、*IRF1*、*IRF7*、*Mx*、*PKR* 和 *STAT3* 等干扰素激活基因的表达,并能显著降低 GCRV 攻毒草鱼的死亡率。上述结果提示重组草鱼 IFN γ 融合蛋白 rCiIFN γ 具有明显的体内和体外抗 GCRV 效果。本研究为草鱼 IFN γ 在抗病毒方面的应用提供了参考依据。

关键词 草鱼;重组干扰素;干扰素 γ (IFN γ);抗病毒活性;草鱼呼肠孤病毒(GCRV)

中图分类号 S917.1 文献标识码 A

Prokaryotic Expression of Recombinant Interferon IFN γ of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Its Anti-GCRV Effects

YUAN Xue-Mei¹ XU Ling-Wei² HUANG Lei¹ HAO Gui-Jie¹ LIN Ling-Yun¹ PAN Xiao-Yi¹
YAO Jia-Yun¹ SHEN Jin-Yu^{1*}

¹ Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province/Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; ² Hangzhou Xiaoshan Aquatic Station of Agricultural and Forestry Technology Extension Center, Hangzhou 311225, China

Abstract In recent years, grass carp hemorrhagic disease caused by *Grass carp reovirus* (GCRV) has caused serious losses to the grass carp industry. In order to explore the immune protective effects of recombinant interferon on grass carp and its mechanism, the prokaryotic expression vector PET-30a-rCiIFN γ of *Ctenopharyngodon idella* interferon γ (IFN γ) was constructed and transferred into Transetta (DE3). The recombinant protein rCiIFN γ induced by IPTG and purified by nickel column chromatography. The antiviral activity of rCiIFN γ *in vitro* was detected by cytopathic effect (CPE) observation. The protective efficacy of rCiIFN γ *in vivo* was evaluated by challenge experiment. The results showed that the molecular weight of rCiIFN γ is about 23kD, and the antiviral titer of purified rCiIFN γ was 2.8×10^3 U/ μ g. rCiIFN γ could not only inhibit cytopathic effect induced by GCRV *in vitro*, but also induced the expression of IFN-stimulated genes

基金项目:浙江省科技计划项目(2012C22046; 2016C32076)

收稿日期:2021-08-26 接受日期:2021-11-02

(IFN, IRF1, IRF7, Mx, PKR, STAT3 and IFN α) in liver, spleen, kidney and intestine, and significantly reduced the mortality of *C. idellus* challenged with GCRV. These results indicated that the recombinant interferon IFN γ fusion protein rCiIFN γ was effective in protecting grass carp against GCRV infection. This study provides a theoretical basis for the antiviral application of grass carp interferon γ .

Keywords Grass carp; Recombinant interferon; Interferon γ (IFN γ); Antiviral activity; *Grass carp reovirus* (GCRV)

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国最大的淡水养殖品种之一。草鱼呼肠孤病毒(*Grass carp reovirus*, GCRV)是一种 dsRNA (double-stranded RNA) 病毒,广泛流行于草鱼养殖区域,可引起草鱼出血性疾病,致死率极高(Wang et al., 2012),对产业危害巨大,尚无有效的防治措施。

干扰素(interferon, IFN)是一类具有抗病毒、调节免疫作用的分泌蛋白(细胞因子),在脊椎动物防御病毒感染中发挥重要作用(Samuel, 2001)。根据氨基酸结构、抗原性和细胞来源的不同,IFN 分为 I 型和 II 型两类(Pestka et al., 2004)。哺乳动物中 II 型 IFN 只有一种,即 IFN γ ,其不仅具备 I 型 IFN 的抗病毒功能,还有多种免疫学和生物学活性(Schroder et al., 2003),如促进 MHC (major histocompatibility complex) II 类抗原表达、增强 T 细胞与 APC 细胞的相互作用等。最近,有关硬骨鱼(*Osteichthyes*)中 II 型 IFN 的研究陆续被报道,且一些硬骨鱼有不止 1 个 IFN γ 基因(Igawa et al., 2006)。一些研究表明鱼类 IFN γ 具有一定的抗病毒功能,Sun 等(2011)证明斑马鱼 II 型 IFN 具有抗传染性胰腺坏死病毒(*Infectious pancreatic necrosis virus*, IPNV)的功能;马普(2015)克隆出红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) IFN γ ,并证明重组 IFN- γ 蛋白具有体外抗病毒活性。目前,有关草鱼的干扰素及相关基因研究较为广泛,但用于抗 GCRV 研究的仅限于草鱼 I 型干扰素。李东明(2013)克隆表达了草鱼干扰素 IFN α ,并进行抗 GCRV 研究,结果表明,重组干扰素 IFN α 蛋白可以抑制 GCRV 在肾细胞系 CIK 中的复制增殖,上调草鱼体内干扰素激活的基因(IFN-stimulated genes, ISGs)的表达水平,降低感染 GCRV 草鱼的死亡率。本课题组在前期研究中发现,携带草鱼 IFN α 基因的真核表达载体在细胞和鱼体上具有抗 GCRV 效果(Yuan et al., 2019)。本研究拟扩增草鱼 II 型干扰素 IFN γ 基因并克隆至原核表达载体,以纯化的 IFN γ 重组蛋白进行体内和体外抗 GCRV 研究,为深入探讨草鱼抗病机制及高

效抗病毒制剂的开发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株及实验动物

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肾细胞系 CIK 和草鱼卵巢细胞系 CO 为本实验室保存。GCRV 流行毒株 HZ13 为本实验室分离保存。标准参考株 GCRV873 由长江水产研究所鱼病研究室惠赠。体重 (20 \pm 5) g 的健康草鱼购自湖州浙北新品种繁育公司。

1.2 菌株和载体

克隆所用大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5 α 及表达用感受态 *Transtetta*(DE3)购自北京全式金生物公司。原核表达载体 pET-30a (Clontech, 美国)由本实验室保存。克隆载体 pMD19-T Simple Vector 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 主要试剂

TRIzol RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、限制性内切酶、DNA Ligation Kit、PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)购自上海索莱宝生物科技有限公司;细胞培养基 M199 和胰酶购自 GIBCO (美国);小牛血清购自四季青公司(杭州)。

1.4 草鱼 IFN γ 基因的 PCR 扩增、克隆和鉴定

1.4.1 PCR 扩增

为刺激草鱼体内干扰素基因的表达,用 Poly I: C (1 mg/mL)经腹腔注射健康草鱼,用量为每克鱼体重 5 μ L。3 d 后取脾脏组织 100 mg,参照 TRIzol 说明书提取脾脏组织的总 RNA,测定 RNA 纯度及浓度;然后利用反转录试剂盒合成 cDNA。根据草鱼 IFN γ 基因序列(GenBank No.FJ695520)设计引物

对 pET-IFN γ -F (5'-CGCGGATCCGATTCTTGGCT-CAACATGAT-3', 含 *Bam*H I 酶切位点) 和 pET-IFN γ -R (5'-CCCAAGCTTTCATTGAACCTTTTGTG-3', 含 *Hind* III 酶切位点), 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 cDNA 1 μ L, 5 \times PrimeSTAR Buffer (内含 Mg²⁺) 10 μ L, pET-IFN γ -F (100 nmol/L) 1 μ L, pET-IFN γ -R (100 nmol/L) 1 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 32.5 μ L; PCR 反应条件: 预变性 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 10 min。取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4.2 PCR 产物的克隆和鉴定

将 IFN γ 基因的 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化, 与载体 pMD20-T 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 平板进行初步筛选; 挑取单个菌落抽提质粒, 进行酶切和 PCR 鉴定, 将阳性重组质粒 pMD20-rCiIFN γ (rCi: recombinant Ctenopharyngodon idella) 送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.5 原核表达质粒 pET-30a-rCiIFN γ 的构建及鉴定

1.5.1 pET-30a-rCiIFN γ 的构建

以 *Bam*H I 和 *Hind* III 对 pMD20-rCiIFN γ 及质粒载体 pET-30a 分别进行双酶切, 酶切产物分别用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化。然后按照 0.03 pmol: 0.03~0.30 pmol (pET-30a: 目的片段) 的比例将两者混合, 加入等体积的 Solution I, 充分混匀, 于 16 $^{\circ}$ C 反应 30 min 以上。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 平板上进行筛选, 挑取单个菌落进行扩增培养, 并少量提取质粒。

1.5.2 重组质粒 pET-30a-rCiIFN γ 的鉴定

利用 1.4.1 中的特异性引物对重组质粒 pET-30a-rCiIFN γ 进行 PCR 扩增, 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 对重组质粒进行双酶切鉴定。

1.6 重组蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

分别取鉴定正确的重组表达质粒 pET-30a-rCi-

IFN γ 及空质粒 pET-30a 转化大肠杆菌感受态细胞 Transetta (DE3), 挑取阳性菌落接种于 3 mL 含 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜; 以 1:100 的比例接种于 200 mL 含 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期 (OD_{600} = 0.6~1.0); 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 于 37 $^{\circ}$ C 诱导表达, 于不同的时间取样用于确定最佳诱导时间。

1.7 包涵体的制备、纯化及 Western blot 分析

参照常恒祯等(2021)的方法对诱导表达的重组蛋白进行分离纯化及复性。于 8 000 \times g 离心 15 min 收集表达菌, 用 lysis buffer (5 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 重悬菌体; 超声破碎后, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 30 min; 分别取上清液和沉淀进行 12% 的 SDS-PAGE 分析。按照 QIAGEN 公司的 Ni-NTA Fast Start Kit 蛋白纯化系统操作指南进行包涵体纯化。纯化产物经 0.1 mol/L PBS 缓冲液透析, 以 Bradford 法定量纯化的 rCi-IFN γ 蛋白浓度并进行 Western blot 检测, 最后分装保存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.8 抗病毒效价的测定

按照实验室常规方法进行细胞培养及病毒滴度测定(徐洋等, 2010)。重组干扰素蛋白效价测定参照 Li 等(2013)的方法进行: 将纯化的 rCiIFN γ 进行连续 10 倍梯度稀释, 对已生长形成致密单层的 CIK 细胞进行处理, 每孔 100 μ L, 每个稀释度设置 8 个重复孔; 于 28 $^{\circ}$ C 继续培养 6 h, 随后每孔加入 100 μ L GCRV ($1.0 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/mL)(其中 TCID₅₀ 为半数组织培养感染剂量 (50% tissue culture infective dose)) 感染 CIK 细胞, 培养至病毒感染对照组细胞(未经 rCiIFN γ 处理)出现明显的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)。在各稀释度中, 以能抑制 50% 细胞病变的最高稀释度的倒数为 rCiIFN γ 的抗病毒效价, 以 U/ μ g 作为其量化衡量单位。

1.9 rCiIFN γ 对 CO 细胞的免疫保护

采用 MTS 法检测 rCiIFN γ 的体外抗病毒活性(Xu et al., 2010)。rCiIFN γ 的处理方式同 1.8。将起始浓度为 100 μ g/mL 的 rCiIFN γ 进行 10 倍梯度稀释, 以各稀释度的 rCiIFN γ 处理 CO 细胞, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 显微镜下观察细胞生长情况; 用 1.0 \times

104.5 TCID₅₀/mL 的 GCRV 接种 CO 细胞, 28 °C 孵育 2 h; 吸掉病毒液, 加入 100 μ L 维持液。设置阴性对照组, 包括未经任何处理的细胞、经 rCiIFN γ 处理的不接种病毒的细胞以及只接种病毒的细胞。于 28 °C 继续培养至未经 rCiIFN γ 处理的病毒感染组细胞出现明显病变, 用 CellTiter 96[®] AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (Promega, 美国) 检测不同处理组的细胞活力, 在 96 孔板的读板仪上记录 490 nm 吸光率。实验结果为 8 次重复测定结果的均值, 并均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。按下列公式计算相对保护率: 相对保护率 (%) = (rCiIFN γ 处理组的 OD₄₉₀ - 病毒对照组的 OD₄₉₀) / (正常细胞对照组的 OD₄₉₀ - 病毒对照组的 OD₄₉₀) \times 100。采用 SPSS 19.0 软件中的 Duncan 方法对数据进行差异显著性分析。

1.10 rCiIFN γ 对草鱼的免疫保护

将适养 2 周的草鱼 (10 g 左右) 随机分为 4 组, 其中 3 组为免疫组、1 组为对照组, 每组 30 尾; 所有草鱼在实验前均将其放在含 0.005% MS-222 的水中进行麻醉处理。3 个免疫组草鱼分别经腹腔注射 100 μ L rCiIFN γ 溶液, 其中 rCiIFN γ 使用量分别为 0.5、2.0、5.0 μ g/g (鱼体重); 阴性对照组注射 100 μ L PBS; 24 h 后按照 Yuan 等 (2019) 的方法进行 GCRV 攻毒, 每天观察各组草鱼的死亡情况, 连续观察 21 d, 通过计算累积死亡率 (cumulative mortality rate, CMR) 来评价 rCiIFN γ 对草鱼的免疫保护作用, 各试验组累积死亡率为 21 d 内死亡率的总和。采用 SPSS 19.0 软件中的 Duncan 方法对数据进行差异显著性分析。

1.11 rCiIFN γ 对干扰素激活基因的诱导表达模式分析

为研究重组干扰素 rCiIFN γ 对草鱼干扰素激活基因 (IFN-stimulated genes, ISGs) 的诱导表达模式, 以 2 μ g/g (鱼体重) 的 rCiIFN γ 经腹腔注射草鱼, 分别诱导 6、12、24、48 和 72 h; 阴性对照组注射 100 μ L PBS。每个诱导时间点取诱导组和对照组草鱼各 3 尾, 分别取其肝、脾、肾及肠道, 提取各组织的总 RNA 并反转录为 cDNA。应用 qPCR 方法分析 IFN α 、IFN γ 、IRF1 (interferon regulatory factor 1)、IRF7、Mx (myxovirus resistance)、PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) 和 STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3)

等 7 种 ISGs 的诱导表达情况, 以 β -actin 为内参基因, 设置 3 个重复; 引物序列及 qPCR 方法参照文献 (Yuan et al., 2019)。利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算各基因相对表达量, 使用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 采用方差分析法 (ANOVA) 进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 重组草鱼 IFN γ (rCiIFN γ) 表达载体的构建

对重组菌进行 PCR 扩增, 得到略大于 500 bp 的片段, 与预期大小一致 (图 1A)。对重组表达质粒进行测序, 序列与目的片段一致。以 BamH I 和 Hind III 对重组表达质粒进行双酶切鉴定, 获得约 5 000 bp 的载体条带及略大于 500 bp 的目的条带 (图 1B), 说明重组表达载体构建成功。

2.2 重组草鱼 IFN γ 的表达与纯化

将重组载体 pET-30a-rCiIFN γ 转化大肠杆菌 Transetta (DE3), 经 1.0 mmol/L IPTG 诱导表达获得重组蛋白 rCiIFN γ 。对表达产物进行 SDS-PAGE 检测, 显示与预期大小 (23 kD) 相吻合的杂交条带 (图 2A 泳道 2); 表达产物经包涵体洗涤、过柱纯化后,

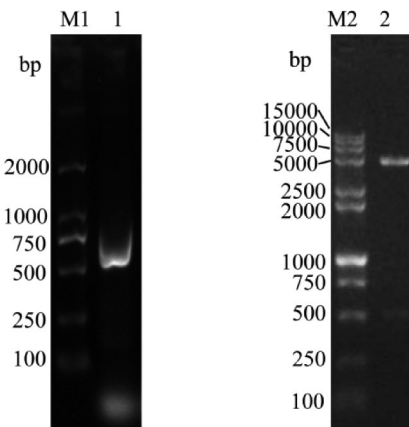


图 1 重组表达质粒 pET-30a-rCiIFN γ 的 PCR (A) 及酶切鉴定 (B)

Figure 1 PCR (A) and enzyme digestion identification (B) of the recombinant plasmid pET-30a-rCiIFN γ

M1: DL2000 DNA Marker; 1: 重组菌的 PCR 扩增产物; M2: DL15000 DNA Marker; 2: pET-30a-rCiIFN γ 的 BamH I 和 Hind III 酶切产物

M1: DL2000 DNA Marker; 1: PCR products from recombinant bacteria; M2: DL2000 DNA Marker; 2: Digestion products from pET-30a-rCiIFN γ by BamH I and Hind III

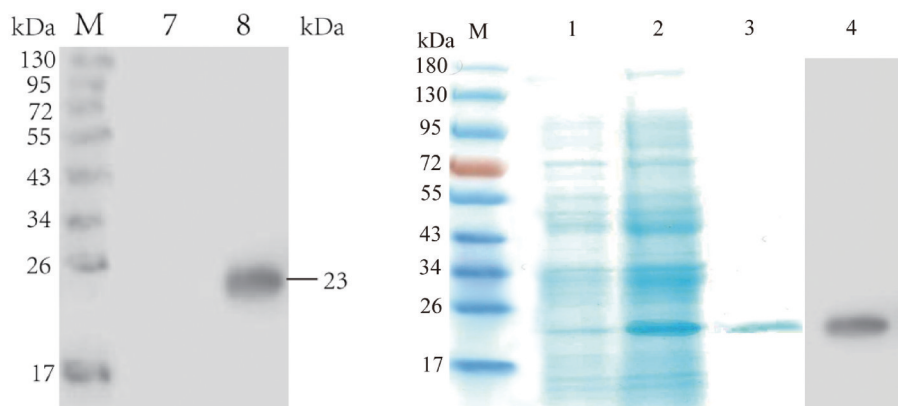


图2 rCiIFN γ 的诱导表达、纯化及鉴定

Figure 2 Induced expression, purification and identification of rCiIFN γ

A. SDS-PAGE. B. Western blot. M: 蛋白质分子量标准; 1和4: pET30a空载体; 2: pET-30a-rCiIFN γ ; 3和5: 纯化的rCiIFN γ
A. SDS-PAGE. B. Western blot. M: Protein marker; 1 and 4: Empty vector pET30a; 2: pET-30a-rCiIFN γ ; 3 and 5: Purified rCiIFN γ

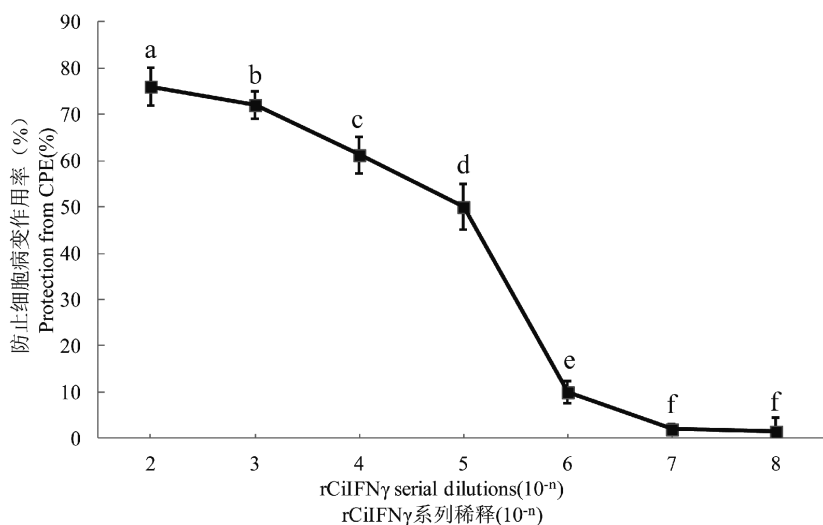


图3 MTS法测定rCiIFN γ 对CO细胞抗病毒活性的影响

Figure 3 Effect of rCiIFN γ on antiviral activity in CO cells determined by MTS method

CPE: 细胞病变效应; rCiIFN γ 在 10^{-2} ($1 \mu\text{g/mL}$, $n=2$)至 10^{-3} ($n=3$)稀释浓度时的抗病毒效果最好(保护率 $>70\%$);不同小写字母表示差异具有统计学意义($P<0.05$),下同

CPE: Cytopathic effect; rCiIFN γ had the best antiviral effect (protection rate $>70\%$) at the dilution concentration of 10^{-2} ($1 \mu\text{g/mL}$, $n=2$) to 10^{-3} ($n=3$); Different lowercase letters indicate that the difference is statistically significant ($P<0.05$), the same below

蛋白纯度达90%以上(图2A泳道3);纯化蛋白进行Western blot分析(图2B),以His抗体为一抗,可得到明显的单一条带。上述结果表明重组蛋白rCiIFN γ 特异性较好,纯度较高。包涵体蛋白经复性浓缩后,应用Bradford法检测终浓度为 1.41 mg/mL 。

2.3 体外抗病毒活性

将纯化的rCiIFN γ 进行连续10倍梯度稀释并处理CIK细胞,以能抑制50%细胞病变的最高稀释度的倒数为抗病毒效价。rCiIFN γ 的抗病毒效价经测算为 $2.8 \times 10^3 \text{ U}/\mu\text{g}$,具有较好的抗病毒效果。采用MTS法测定rCiIFN γ 对CO细胞的抗病毒保护效果,结果显示,rCiIFN γ 在 10^{-2} ($1 \mu\text{g/mL}$)~ 10^{-3} ($0.1 \mu\text{g/mL}$)稀释浓度时的抗病毒效果最好(保护率 $>$

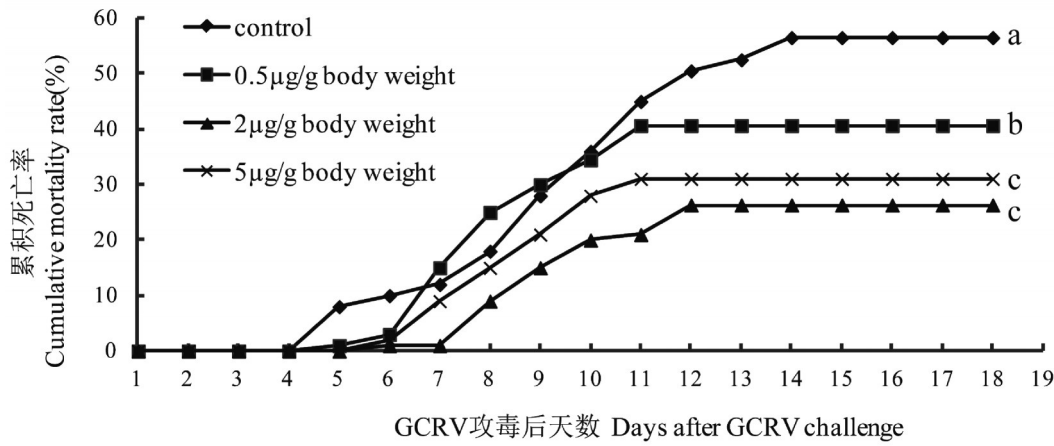


图4 经rCiIFN γ 免疫的草鱼抗GCRV感染的累积死亡率(CMR)

Figure 4 Cumulative mortality rate (CMR) of grass carp immunized with rCiIFN γ against GCRV infection

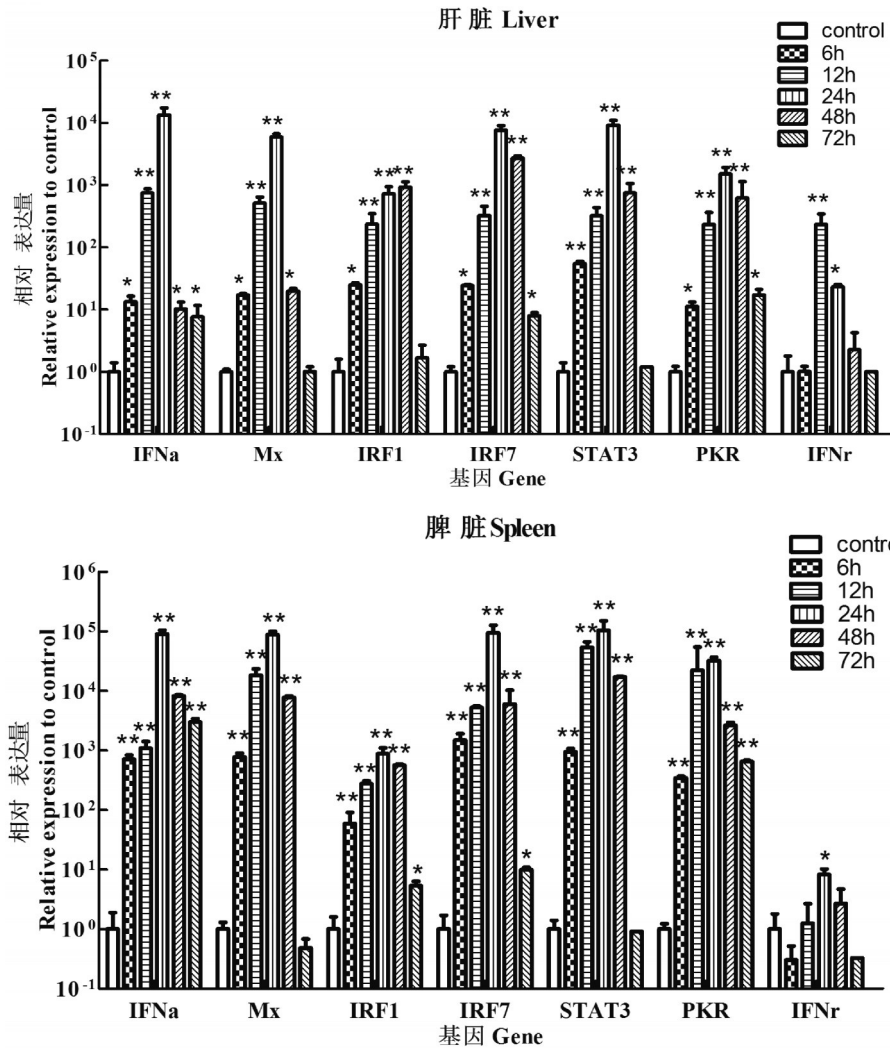


图5 rCiIFN γ 免疫不同时间对草鱼不同组织中7个干扰素激活基因表达的影响

Figure 5 Effects of rCiIFN γ immunization with different time on the expression of 7 interferon (IFN)-stimulated genes in different tissues of grass carp

Reference gene: β -actin; n=3; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

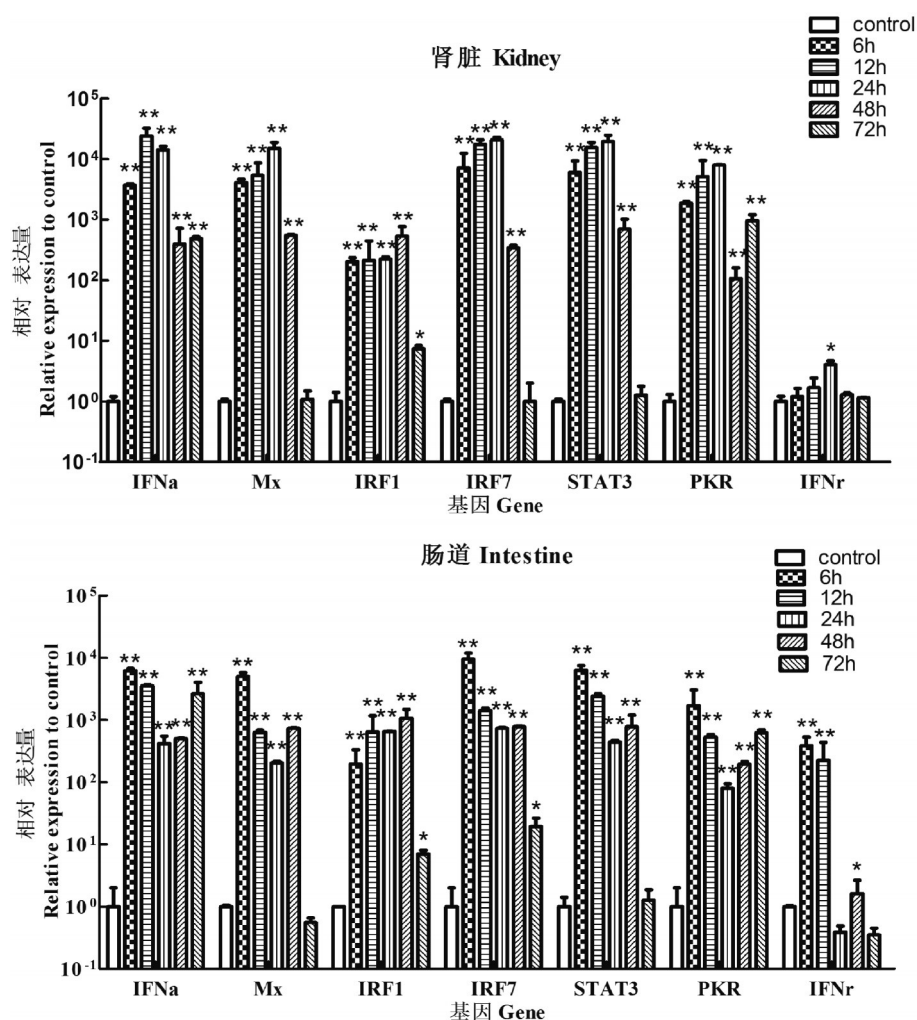


图5 rCiIFN γ 免疫不同时间对草鱼不同组织中7个干扰素激活基因表达的影响

Figure 5 Effects of rCiIFN γ immunization with different time on the expression of 7 interferon (IFN)-stimulated genes in different tissues of grass carp

Reference gene: β -actin; n=3; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

70%), 在 10^{-4} ~ 10^{-5} 的稀释浓度时的保护效果稍有下降(保护率 > 45%), 但在稀释度 10^{-6} ~ 10^{-8} 时几乎未表现出抗病毒活性(图3)。

2.4 体内抗病毒活性

为确定最佳免疫剂量, 以3种不同剂量的 rCiIFN γ 免疫草鱼, 24 h 后进行 GCRV 攻毒, 通过计算累积死亡率来评价重组干扰素对草鱼的免疫保护作用。结果显示, 2.0 $\mu\text{g}/(\text{g}$ 鱼体重) 处理组草鱼的累积死亡率最低(32.43%), 其次是 5.0 $\mu\text{g}/(\text{g}$ 鱼体重) 组(39.74%) 和 0.5 $\mu\text{g}/(\text{g}$ 鱼体重) 组(47.81%), 3 个免疫组的累积死亡率均显著低于对照组(56.52%) ($P < 0.01$) (图4)。上述结果说明 rCiIFN γ 具有体内抗 GCRV 效果, 且 2.0 $\mu\text{g}/(\text{g}$ 鱼体重) 的作用浓度效果最

好。

2.5 rCiIFN γ 对草鱼干扰素激活基因的诱导表达模式分析

为确定 rCiIFN γ 在草鱼体内诱导干扰素激活基因(ISGs) 表达的效果, 采用腹腔注射途径免疫草鱼, 通过 qPCR 方法检测草鱼肝、脾、肾、肠中的 ISGs 表达量, 包括 IFN α 、IFN γ 、IRF1、IRF7、Mx、PKR 和 STAT3 等 7 个基因。与对照组比较, 这些干扰素激活基因在肝、脾、肾、肠中均被强烈诱导表达, 在脾脏中的表达水平最高, 4 种组织中 IFN γ 的表达水平均低于 IFN α ; 大多数 ISGs 基因在 24 h 达到最高水平, 在 72 h 内回落到正常水平(图5)。上述结果提示, rCiIFN γ 可显著提高 ISGs 的表达水平, 从而刺

激机体进入抗病毒状态。

3 讨论

本研究探讨原核表达的草鱼 II 型干扰素 IFN γ 对 GCRV 引起的出血性疾病是否具有保护作用, 首先成功获得了草鱼 IFN γ 重组蛋白, 并证明该蛋白可以在 CO 细胞上抑制 GCRV 的复制; 然后进行免疫保护试验, 分析 IFN γ 重组蛋白处理后草鱼肝、肾、脾和肠道组织中 IFN 激活基因的表达, 发现注射 IFN γ 重组蛋白的草鱼在 GCRV 攻毒后的存活率高于对照, 并且 *Mx*、*IRF1*、*IRF7*、*STAT3* 和 *PKR* 基因在注射 IFN γ 鱼的肝脏、肾脏、脾脏和肠道中的表达被有效上调, 提示由 IFN γ 介导的先天免疫可保护宿主免受 GCRV 感染。

本课题组在前期工作中研究了草鱼 I 型干扰素 IFN α 在细胞和鱼体上的抗 GCRV 效果 (Yuan et al., 2019), 携带草鱼 IFN α 基因的真核表达载体用脂质体包裹后注射草鱼, GCRV 攻毒后草鱼死亡率较病毒阳性对照组下降 33.65%。本研究以 IFN γ 重组蛋白注射草鱼, GCRV 攻毒后草鱼死亡率最多下降 24.09%, 其抗 GCRV 效果低于 IFN α 。Gattoni 等 (2006) 研究发现, 单一的 II 型干扰素 IFN γ 显示出一些抗病毒特性, 但抗病毒活性低于 I 型干扰素 IFN α 。Xiang 等 (2017) 发现, 达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) IFN γ 也具有抗病毒功能。罗凯 (2018) 对比分析 poly I:C 诱导后的细胞内表达, 发现 IFN γ 的开始合成时间较 IFN α 延后, 表达水平较 IFN α 低, 发挥抗病毒功能较 IFN α 弱, 但是 IFN γ 抗病毒功能的持续时间比 IFN α 长。

硬骨鱼 IFN γ 具有一定的抗病毒作用。在病毒感染时, IFN γ 可刺激 JAK-STAT 信号通路, 通过激活下游抗病毒效应器而保护宿主 (Zhang et al., 2012; Plataniias, 2005)。Mx (Verhelst et al., 2013) 和 PKR (余新建等, 2013) 是两种由干扰素诱导产生的抗病毒蛋白, 被证明在硬骨鱼的病毒感染防御中发挥重要作用。干扰素调节因子家族基因 *IRF1*、*IRF7* 及转录激活因子 STAT 家族基因 *STAT3* 均属于干扰素激活基因 (刘洋等, 2018)。本研究应用 IFN γ 重组蛋白注射草鱼, *STAT3*、*PKR*、*Mx*、*IRF1*、*IRF7* 的表达均被快速激活, 因此可能使机体细胞建立抗病毒状态, 从而获得较强的抗病毒性能; 另外, 4 种组织中的 IFN α 在 5 个时间点的表达量均高

于 IFN γ , 推测 IFN γ 可能通过激活 IFN α 诱导细胞进入抗病毒状态。Sun 等 (2011) 研究表明, IFN γ 的抗病毒活性可能部分依赖于 IFN α 的诱导, 与本研究结果相似。

4 结论

本研究成功建立了草鱼 II 型干扰素 IFN γ 的原核表达系统, 纯化的重组蛋白 rCiIFN γ 具有诱导干扰素激活基因在草鱼体内表达的能力; 通过注射 rCiIFN γ 可有效提高 GCRV 感染鱼的存活率。本研究为草鱼传染性疾病的防治提供了新的途径。

参考文献

- 常恒祯, 常江, 战俊澎, 等. 2021. 包涵体重组蛋白不同纯化方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 34(07): 862-867. (Chang H Z, Chang J, Zhan J P, et al. 2021. Comparison of various methods for purification of recombinant inclusion body protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 34(07): 862-867.)
- 刘洋, 刘永亮, 葛胜祥. 2018. 干扰素刺激基因及临床意义研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 34(03): 454-459. (Liu Y, Liu Y L, Ge S X. 2018. Research progress towards interferon stimulated genes and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Immunology, 34(03): 454-459.)
- 罗凯. 2018. 鱼类抗病毒基因 *TRIM* 和 *IFN* 基因克隆及功能研究[D]. 硕士学位论文, 长江大学, 导师: 许巧情, pp. 61-72. (Luo K. 2018. Cloning and functional study of antiviral *TRIM* and *IFN* genes in fish[D]. Thesis for M. S., Changjiang University, Supervisor: Xu Q Q, pp. 61-72.)
- 马普. 2015. 红鳍东方鲀 *IFN- γ* 基因和 *CCL19* 基因的原核表达及重组 IL15 的活性鉴定[D]. 硕士学位论文, 大连海洋大学, 导师: 王秀利, pp. 1-30. (Ma P. 2015. Prokaryotic expression of *IFN γ* gene and *CCL19* gene and the activity identification of recombinaton IL15 of *Takifugu rubripes*[D]. Thesis for M. S., Dalian Ocean University, Supervisor: Wang X L, pp. 1-30.)
- 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 2010. 两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 40(03): 44-49. (Xu Y, Hao G J, Shen J Y, et al. 2010. Isolation and identification of two grass carp reovirus strain in Jiangxi province [J]. Freshwater Fisheries, 40(03): 44-49.)
- 余新建, 李东明, 马梅生, 等. 2013. 重组干扰素上调草鱼干扰素系统基因的表达[J]. 水生生物学报, 37(06): 1184-1188. (Xu X J, Li D M, Ma M S, et al. 2013. Recombi-

- nant IFN up-regulates the expression of interferon system genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idelus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 37(06): 1184-1188.)
- Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, et al. 2006. Interferon-gamma: Biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts)[J]. *Clinical Therapeutics*, 157(5): 377-386.
- Igawa D, Sakai M, Savan R. 2006. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: *IL-22* and *-26* genes have been described for the first time outside mammals [J]. *Molecular Immunology*, 43(7): 999-1009.
- Li D M, Lin G, Yu X j, et al. 2013. Immunoprotection of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with recombinant interferon (α IFN) against GCHV infection[J]. *Aquaculture*, 388: 42-48.
- Pestka S, Krause C D, Walter M R, 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors[J]. *Immunological Reviews*, 202(1): 8-32
- Platanias L C, 2005. Mechanisms of type- I - and type- II -interferon-mediated signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 5 (5): 375-386.
- Pyo S, Gangemi J D, Ghaffar A, et al. 1993. Poly I:C-induced antiviral and cytotoxic activities are mediated by different mechanisms[J]. *International Journal of Immunopharmacology*, 15(4): 477-486
- Samuel C E. 2001. Antiviral actions of interferons[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4): 778-809.
- Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, et al. 2003. Interferon- γ : An overview of signals, mechanisms and functions[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2): 163-189.
- Sun B, Skjaveland I, Svingerud T, et al. 2011. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon[J]. *Journal of Virology*, 85(17): 9188-9198.
- Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. 2013. Mx proteins: Antiviral gatekeepers that restrain the uninvited[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4): 551-566.
- Wang Q, Zeng W W, Liu C, et al. 2012. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. *Journal of Virology*, 86(22): 12466.
- Xu C, Guo T C, Mutoloki S, et al. 2010. Alpha interferon and not gamma interferon inhibits *Salmonid alphavirus* subtype 3 replication in vitro[J]. *Journal of Virology*, 84 (17): 8903-8912.
- Xiang Y X, Liu W, Jia P, et al. 2017. Molecular characterization and expression analysis of interferon-gamma in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 70(1): 140-148.
- Yuan X M, Yao J Y, Liu L Y, et al. 2019. Preparation of liposome-encapsulated interferon alpha (IFN- α) vaccine and anti-grass carp reovirus effect[J]. *Aquaculture Research*, 50(9): 2600-2607.
- Zhang Y B, Gui J F. 2012. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 38(2): 193-202.

(责任编辑 任立刚)