



黑头软口鲮上皮瘤细胞 *ifn-1* 基因的表达及抗病毒活性

孙杰¹, 郭雅娜¹, 戴彩姣¹, 陈孝煊¹, 李莉娟¹, 袁军法^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了体外表达黑头软口鲮上皮瘤细胞 (EPC) I 型干扰素 (IFN-1), 本实验通过 RT-PCR 从 EPC 中扩增 *ifn-1* 基因, 构建重组表达质粒 pET-32a-IFN-1, 并转化到感受态细胞 Transetta(DE3), 体外纯化后检测其抗病毒活性。结果显示, *ifn-1* 编码区大小为 552 bp, 编码 184 个氨基酸, 与草鱼干扰素 1(CiIFN1) 亲缘关系最近。通过 SDS-PAGE 分析, 重组表达质粒 pET-32a-IFN-1 在宿主菌中可明显表达约 35 ku 的融合蛋白条带, 且部分呈可溶性表达, 进而通过亲和纯化可溶性重组 IFN-1(rIFN-1), 免疫新西兰大白兔获得效价较高的抗 IFN-1 多克隆抗体, 可用于检测细胞内源性的 IFN-1。定量 PCR 显示 rIFN-1 与 EPC 细胞孵育可以诱导抗病毒蛋白 Mx1 的表达, 并抑制鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 引起的细胞病变 (CPE) 及 SVCV 的复制, 表明 rIFN-1 具有抗病毒活性。

关键词: 黑头软口鲮; *ifn-1*; 上皮瘤细胞; 鲤春病毒血症病毒; 原核表达

中图分类号: Q 786; S 941.41

文献标志码: A

干扰素 (interferons, IFNs) 是细胞受到病原刺激时产生的一种分泌蛋白 (细胞因子), 在抵抗感染过程中具有重要作用^[1]。干扰素最初是 1957 年由 Isaacs 等^[2] 在鸡胚绒毛尿囊膜细胞的病毒干扰实验中发现。干扰素有 3 种类型, 包括 I 型干扰素 (IFN- α/β)、II 型干扰素 (IFN- γ)、III 型干扰素 (IFN- λ), I 型和 III 型干扰素具有抗病毒作用, II 型干扰素发挥免疫监视作用^[3]。

硬骨鱼类是低等变温脊椎动物, 其干扰素分为 I 型干扰素和 II 型干扰素。鱼类 I 型干扰素没有 α 与 β 之分, 但根据成熟肽中半胱氨酸残基的数量 (2 或 4) 分为第 I 组和第 II 组, 其中第 I 组 I 型干扰素有 IFN-a、-d、-e 和 -h, 存在于所有硬骨鱼类中; 第 II 组 I 型干扰素包括 IFN-b、-c 和 -f, 只存在于少数种类中, 例如斑马鱼 (*Danio rerio*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等^[4-5]。IFN- γ 在红鳍东方鲀 (*Takifugu*

rubripes)、斑马鱼和大西洋鲑中鉴定出, 其包含 3 个内含子, 与高等脊椎动物 IFN- γ 相似^[1]。

黑头软口鲮 (*Pimephales promelas*) 上皮瘤细胞 (epithelioma papulosum cyprini, EPC) 是从黑头软口鲮的上皮中分离, 经原代培养、衍生的连续细胞系。EPC 在 13~33 °C 都可生长, 且对鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV)、传染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 等多种水生动物病毒敏感, 是水生动物病毒诊断和研究水生动物病毒复制与致病机理的重要材料^[6-10]。但目前缺乏针对 EPC 来源的特异性细胞因子, 如干扰素、白细胞介素 10 等, 限制了其在水生动物病毒—宿主互作研究中的应用。为此, 本研究克隆和表达了 EPC 来源的 *ifn-1* 基因, 并评价了其重组蛋白的抗病毒活性。

收稿日期: 2019-06-26 修回日期: 2019-12-01

资助项目: 国家自然科学基金 (31872598)

通信作者: 袁军法, E-mail: jfyuan@mail.hzau.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

黑头软口鲮上皮瘤细胞、鲤春病毒血症病毒为本实验室保存;载体 pET-32a、限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、RNA 提取试剂 (Trizol)、反转录试剂盒购自 TaKaRa; *E. coil* trans5 α 、*E. coil* Transetta(DE3)、Amp 和 IPTG 购自北京全式

金生物有限公司; His 标签蛋白亲和纯化试剂盒购自 Novagen 公司。

1.2 引物合成

根据本实验室 EPC 细胞转录组数据,获得 *ifn-1* 基因的核苷酸序列,利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物,引物上下游分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性酶切位点,引物序列见表 1。

表 1 引物碱基序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers

引物 primers	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	用途 purpose
<i>ifn-1</i> -F	ATTGGATCCTGCGAATGGCTCGGC	扩增 <i>ifn-1</i> 基因
<i>ifn-1</i> -R	GCCAAGCTTAAACTTTTAGAGAGGACGB	扩增 <i>ifn-1</i> 基因
<i>ifn-1</i> -F1	AACGCAGCACAAATGGAAC	qPCR
<i>ifn-1</i> -R1	TGATGGATGGTGGTATCG	qPCR
Mx1-F	ACCCAGCAGCAGTGGAGAAA	qPCR
Mx1-R	TCCCAGGGAGGTCAATGAGAG	qPCR
SVCV-G-F	TGCTGTGTTGCTTGCACTTATYT	qPCR
SVCV-G-R	TCAAACKAARGACCGCATTTTCG	qPCR
TBP-F	TTACCCACCAGCAGTTTAG	qPCR
TBP-R	ACCTTGGCACCTGTGAGTA	qPCR

注: TBP为TATA box binding protein, 用作定量PCR扩展的内参基因

Notes: TBP is TATA box binding protein, used as a quantitative internal reference gene

1.3 EPC *ifn-1* 的扩增

以 0.1 MOI(multiplicity of infection, 感染复数)的 SVCV 感染 EPC 细胞, 24 h 后收集细胞。按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 按照 PrimeScript™ RT 试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA, 以此为模板进行 PCR。PCR 反应体系: 2.5 μ L 10 \times buffer, 2.0 μ L dNTPs, 上下游引物各 1 μ L, Taq 酶 0.1 μ L, ddH₂O 17.4 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 OMEGA 公司 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收。

1.4 序列分析

从 GenBank 中选择草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、金鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼和虹鳟的 I 型和 II 型干扰素基因, 通过 DNAMAN 软件进行同源序列对比, 采用 ClustalX 2.0 和 MEGA 7.0 软件进行聚类分析。用在线分析软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal>) 分析 EPC *ifn-1* 的信号肽, 利用 TMHMM Server v2.0([http://www.cbs.](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)

[dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) 软件进行跨膜区分析。

1.5 定量 PCR(qPCR) 分析基因的表达

以 0.1 MOI SVCV 感染 EPC 和胖头鲤肌肉细胞 (fathead minnow, FHM), 分别在 3、6、12 和 24 h 收集细胞。按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 按照 PrimeScript™ RT 试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA。荧光定量 PCR(qPCR) 根据 SYBR PremisEx Taq (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行, 采用 20 μ L 反应体系: SYBR Premis Ex Taq™ (2 \times) 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。以 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法计算各组相对表达量, 并进行显著性差异分析。

1.6 pET-32a-IFN-1 表达载体的构建

利用 *ifn-1* 引物扩增目的基因片段, 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 限制性内切酶进行酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳后纯化目的片段, 构建重组表达质粒 pET-32a-IFN-1, 转化到 trans5 α 感受态细胞, 挑选单菌落培养, 经菌液 PCR 鉴定, 对 PCR 结果为阳

性的菌液提质粒,进行双酶切鉴定,对双酶切鉴定为阳性的重组质粒送生工生物工程有限公司武汉分公司测序验证。

1.7 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达与纯化

阳性克隆经测序鉴定正确后,提取 pET-32a-IFN-1 质粒转化感受态细胞 *Transtetta*(DE3),接种到含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养过夜;次日以 1:100 比例转接于 5 mL LB 培养基中,培养至对数期,取出 1 mL 菌液作为未诱导对照,其他加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,诱导 3~4 h 离心收集菌体,超声破碎,分别取上清液和沉淀,SDS-PAGE(浓缩胶 5%,分离胶 12%)电泳,分析目的蛋白的表达及其可溶性。

根据目的蛋白的表达结果进行纯化。将 10 mL 转入重组质粒 pET-32a-IFN-1 的 *Transtetta*(DE3) 菌液接种到 1 L 含 AMP(100 µg/mL) 的 LB 液体培养基中。37 °C 180 r/min 振荡培养 3 h 后加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,继续培养 4 h。分批次 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀,PBS 重悬并 5 000 r/min 离心 10 min 洗涤 1 次,再加入 40 mL 的无菌 PBS 吹打均匀,液压破碎菌体后,4 °C 下 12 000 r/min 离心 30 min,分别收集上清液和沉淀。根据 His 标签蛋白亲和纯化试剂盒说明书分别进行上清液可溶性蛋白和沉淀包涵体蛋白的纯化。

1.8 血清抗体的制备与检测

将实验用兔暂养 1 周,采用背部皮下及后脚掌多点注射免疫新西兰雄性大白兔(2.0 kg/只)。首次免疫前取少量耳静脉血做对照。将上述制备的蛋白作为抗原免疫,每只每次免疫 400~600 µg 蛋白,免疫 3 次,间隔 2 周。第 3 次免疫后 10 d 从兔颈动脉放血,分离血清,分装后-20 °C 保存。

将表达的重组蛋白用 PBS 重悬后进行 SDS-PAGE 电泳,血清抗体分别按 1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:30 000、1:40 000、1:50 000、1:100 000 的比例进行稀释作为一抗,AP 标记的羊抗兔抗体 1:10 000 稀释作为二抗,进行 Western-Blot 检测。

1.9 Western-blot 检测细胞内 IFN-1 表达

用 poly I:C 预处理 EPC、FHM 细胞,再以 0.1 MOI 的 SVCV 感染 EPC 细胞,24 h 后收集不同处理的细胞样品,加 5 × loading buffer,于

100 °C 煮 15 min,Western-blot 检测细胞内源性 IFN-1 蛋白的表达。

1.10 抗病毒活性测定

用不同浓度的 rIFN-1 蛋白(1、5、10、50、100、200、400 ng/mL)处理 EPC 细胞 24 h,以定量 PCR 法检测抗病毒蛋白 Mx1 的转录水平。根据 Mx1 转录水平结果,选择用 5 ng/mL 的 rIFN-1 同 EPC 细胞孵育 24 h,再用 0.1 MOI 的 SVCV 感染细胞,并在病毒感染后 3、6、12 和 24 h 分别收集细胞;阴性对照组以 PBS 处理,再用 0.1 MOI 的 SVCV 感染细胞。观察细胞病变情况并检测 SVCV-G 转录水平和病毒滴度。

2 结果

2.1 EPC *ifn-1* 的克隆与序列分析

序列分析结果显示,EPC *ifn-1* 编码区大小为 552 bp,预测编码 184 个氨基酸,分子量为 17 ku,含信号肽(1~22 aa),无跨膜结构域。利用特异性引物扩增 *ifn-1* 编码区(不含信号肽序列),PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见 500 bp 处有特异性条带,并且成功构建重组质粒 pET-32a-IFN-1(图 1)。硬骨鱼类 I 型干扰素根据成熟肽中半胱氨酸残基数分为第 I 组和第 II 组,EPC IFN-1 的成熟肽中含有 2 个半胱氨酸残基,属于第 I 组 I 型干扰素。聚类分析显示 EPC *ifn-1* 基

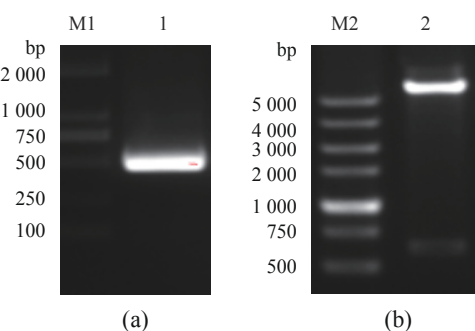


图 1 *ifn-1* 的扩增及重组质粒 pET-32a-IFN-1 双酶切鉴定

(a) M1. 分子质量标准 DL2000; 1. *ifn-1* 基因扩增。(b) M2. 分子质量标准 DL5000; 2. 重组质粒 pET-32a-IFN-1 双酶切鉴定 (*Hind* III 和 *Bam*HI)

Fig. 1 Amplification of *ifn-1* and identification of the recombinant plasmid pET-32a-IFN-1

(a) M1. molecular weight standard DL2000; 1. amplification of *ifn-1* gene. (b) M2. molecular weight standard DL5000; 2. recombinant plasmid pET-32a-IFN-1 digested with *Hind* III and *Bam*HI

因与草鱼 *ifn-1* 和金鱼 *ifn-1* 亲缘关系最近,氨基酸一致率分别为 60.88% 和 59.30%(图 2)。

2.2 *ifn-1* 的表达模式

以 0.1 MOI 的 SVCV 感染 EPC 和 FHM 细胞后,分别在 3、6、12 和 24 h 收集细胞,分析 *ifn-1* 的转录水平,结果显示 SVCV 感染 24 h 后, EPC、FHM 细胞中的 *ifn-1* 水平较未感染组显著上调,但在病毒感染早期(3~12 h), *ifn-1* 的转录受到明显抑制(图 3)。

2.3 *ifn-1* 的原核表达与融合蛋白的纯化

将重组表达质粒 pET32a-IFN-1 转化宿主菌 *Transtetta* 后培养,用终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG 于 37 °C 下诱导表达。实验组中可明显观察到约 35 ku 的重组融合蛋白表达条带,部分呈可溶性

表达(图 4-a)。

收集菌体,经液压破碎后离心分离上清液和沉淀,通过 His 标签亲和纯化试剂盒收集上清液中可溶性形式及沉淀中包涵体形式的融合蛋白 rIFN-1,进行 SDS-PAGE 电泳。纯化后的融合蛋白条带单一,纯化效果较好(图 4-b)。

2.4 Western-blot 检测血清抗体效价

重组表达的可溶性融合蛋白经纯化后免疫新西兰大白兔,制备了抗 EPC IFN-1 的多克隆抗体。以制备的抗 IFN-1 抗体作为一抗,AP 标记的羊抗兔抗体作为二抗,通过 Western-blot 测定其抗体效价。结果显示,制备的抗 IFN-1 抗体在 1 : 1 000~1 : 100 000 的稀释倍数下,免疫印迹均较为清晰,表明制备了效价较高的抗 IFN-1 多克

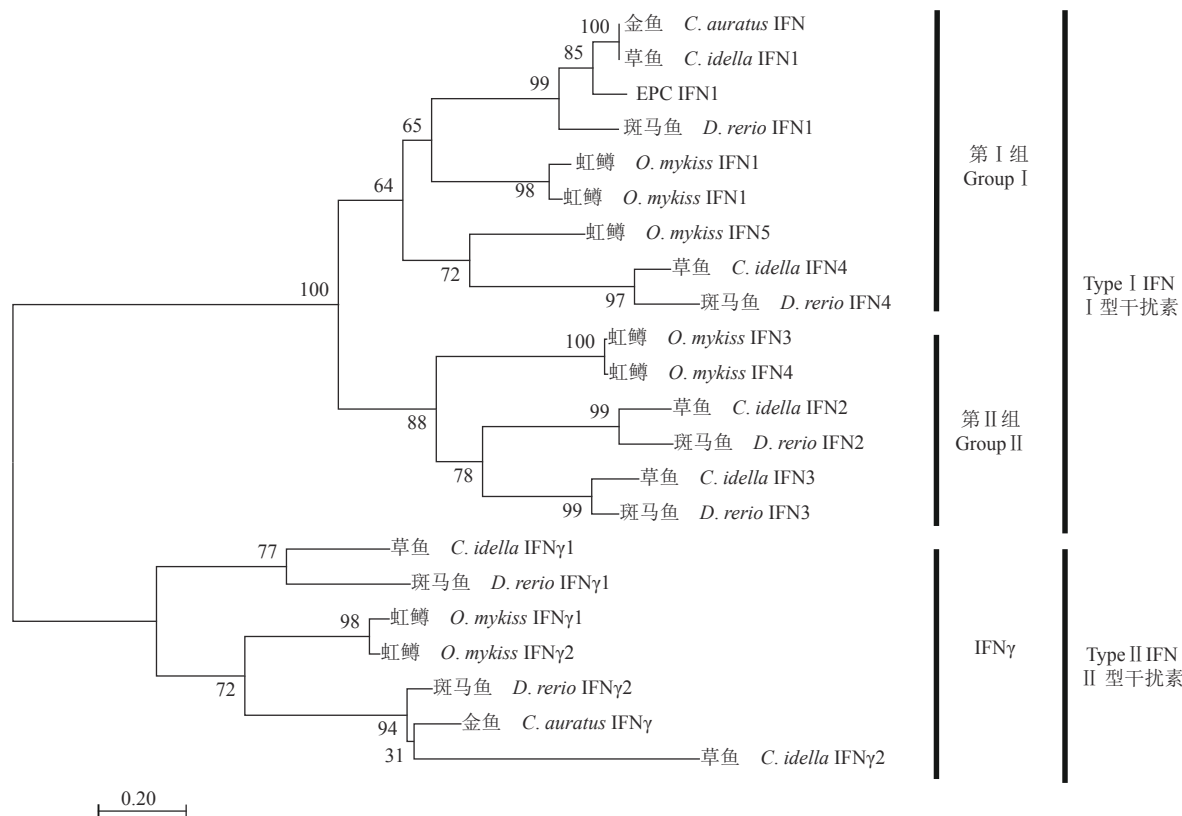


图 2 IFN-1 的系统进化树

GenBank 登录号。草鱼: DQ357216 (IFN1), KU182641 (IFN2), KU182642 (IFN3), KU182643 (IFN4), FJ695520 (IFN γ 1), JX657683 (IFN γ 2); 斑马鱼: NM207640(IFN1), NM001111082(IFN2), NM001111083(IFN3), NM001161740(IFN4), NM001020793(IFN γ 1), NM212864(IFN γ 2); 虹鳟: AM489418(IFN1), NM001160505(IFN2), NM001160502(IFN3), NM001165043(IFN4), NM001159339(IFN4), NM001160503(IFN γ 1), NM001160504(IFN γ 2); 金鱼: AY452069(IFN), EU9093681(IFN γ)

Fig. 2 Phylogenetic tree of IFN-1

GenBank accession number. *C. idella*: DQ357216 (IFN1), KU182641 (IFN2), KU182642 (IFN3), KU182643 (IFN4), FJ695520 (IFN γ 1), JX657683 (IFN γ 2); *D. rerio*: NM207640(IFN1), NM001111082(IFN2), NM001111083(IFN3), NM001161740(IFN4), NM001020793(IFN γ 1), NM212864(IFN γ 2); *O. mykiss*: AM489418(IFN1), NM001160505(IFN2), NM001160502(IFN3), NM001165043(IFN4), NM001159339(IFN4), NM001160503(IFN γ 1), NM001160504(IFN γ 2); *C. auratus*: AY452069(IFN), EU9093681(IFN γ)

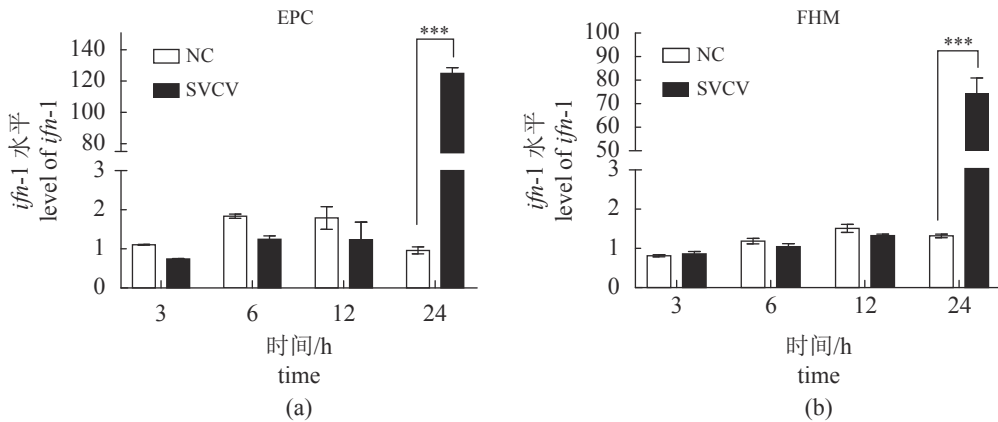


图 3 RT-qPCR 检测 *ifn-1* 的转录水平

***. $P < 0.001$; NC. 正常对照组

Fig. 3 Detection of the transcription level of *ifn-1* by RT-qPCR

***. $P < 0.001$; NC. normal control

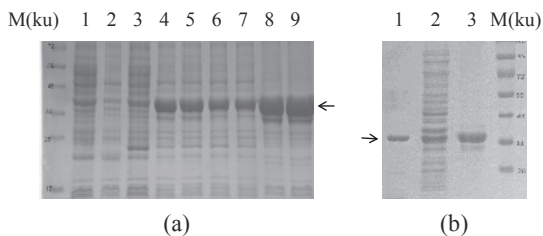


图 4 SDS-PAGE 分析 pET-32a-IFN-1 的表达及其重组融合蛋白的纯化

(a) SDS-PAGE 分析 pET-32a-IFN-1 在 37 °C 下的表达, M. 预染标准分子量蛋白; 1. 不加入 IPTG 的空载对照组; 2. 加入 IPTG 的空载对照组; 3. 不加入 IPTG 的重组对照组; 4-5. 加入 IPTG 全菌蛋白实验组; 6-7. 实验组的上清液; 8-9. 实验组的沉淀. 箭头 (\leftarrow) 标识重组蛋白位置; (b) pET-32a-IFN-1 融合蛋白的纯化, M. 预染标准分子量蛋白; 1. 上清液纯化; 2. 穿流液纯化; 3. 包涵体纯化. 箭头 (\rightarrow) 标识纯化蛋白位置

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of pET-32a-IFN-1

(a) SDS-PAGE analysis of pET-32a-IFN-1 expression at 37 °C. M. pre-stained standard molecular weight protein; 1. no-load control group without IPTG; 2. no-load control group with IPTG added; 3. recombinant control group without IPTG; 4-5. addition of IPTG whole-bacteria protein experimental group; 6-7. supernatant of the experimental group; 8-9. precipitation of the experimental group. " \leftarrow " indicates the position of the fusion protein; (b) purification of pET-32a-IFN-1 fusion protein. M. pre-stained standard molecular weight protein; 1. supernatant purification; 2. flow-through purification; 3. inclusion body purification. " \rightarrow " indicates the position of the purified protein

隆抗体 (图 5)。

2.5 IFN-1 多克隆抗体的特异性检测

为了分析制备的抗 IFN-1 抗体的特异性, 以 poly I:C 转染 EPC 和 FHM 细胞 (图 6), 或以



图 5 Western-blot 检测抗 IFN 融合蛋白血清抗体效价

Fig. 5 Detection of titer of IFN antiserum through Western-blot

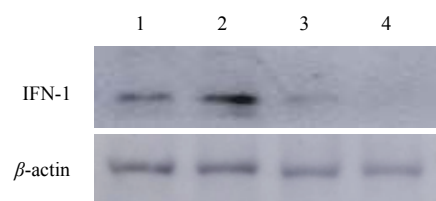


图 6 Western-blot 检测 IFN-1 抗体特异性

1. 用 poly I:C 处理的 FHM 细胞; 2. 用 poly I:C 处理的 EPC 细胞; 3. 用 0.1 MOI SVCV 处理的 EPC 细胞; 4. 阴性对照 (PBS 处理的 EPC 细胞), β -actin 用作 Western-Blot 的内参

Fig. 6 Detection of IFN-1 antibody specificity by Western-blot

1. FHM cells treated with poly I:C; 2. EPC cells treated with poly I:C; 3. EPC cells treated with 0.1 MOI SVCV; 4. negative control (EPC cells treated with PBS buffer), β -actin was used the reference control for total protein loading

0.1 MOI SVCV 感染 EPC 细胞诱导 IFN-1 的表达, 进而以制备的多克隆抗体进行 Western-blot 检测, 其中 β -actin 用作上样量的内参. 实验结果显示, 与对照比较, 转染 poly I:C 和 SVCV 感染组在 17 ku 处存在一条特异性条带, 与预计细胞内源性

IFN-1 大小相似, 说明可以用来检测细胞内源性 IFN-1。

2.6 IFN-1 的抗病毒活性

以不同浓度的 rIFN-1 处理 EPC 细胞, 分析抗病毒蛋白 Mx1 的表达水平, 结果显示 5~200 ng/mL 的 rIFN-1 预处理 24 h 能显著上调 Mx1 的转录水平 (图 7-a)。rIFN-1 预处理 EPC 细胞后再以 SVCV

感染, 感染 3~24 h 均未观察到明显的细胞病变。未以 rIFN-1 处理的感染组在 24 h 细胞病变明显, 部分细胞脱落 (图 7-b)。定量分析 rIFN-1 可以显著降低 SVCV-G 的表达及病毒滴度 (图 7-c, 7-d)。该结果表明, rIFN-1 预处理 EPC 细胞可激活 Mx1 的表达, 显著抑制 SVCV 的复制, 具有较好的抗病毒活性。

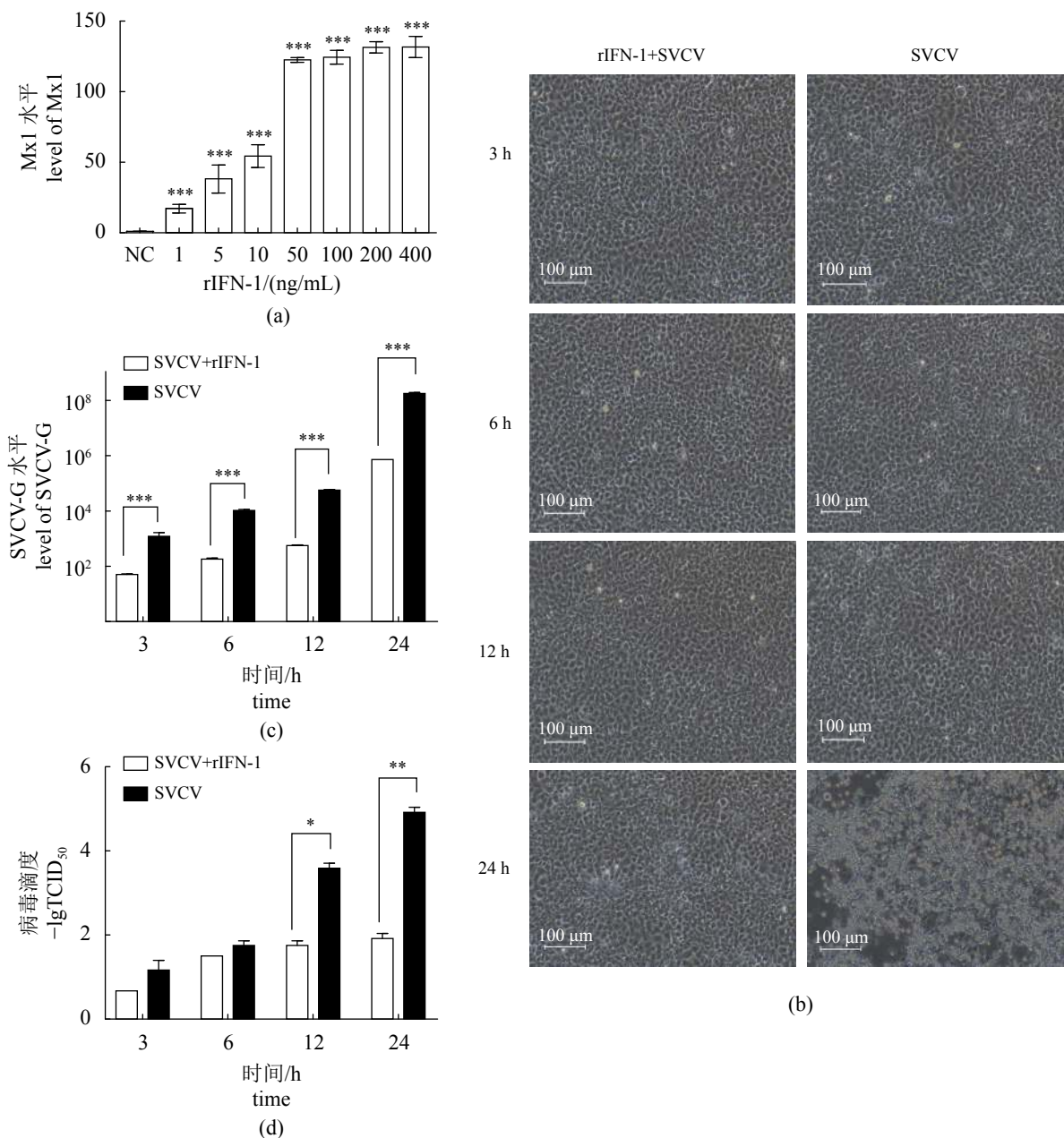


图 7 rIFN-1 的抗病毒活性

(a) RT-qPCR 检测 Mx1 转录水平; (b) 细胞病变分析; (c) RT-qPCR 检测 SVCV-G 的复制水平; (d) rIFN-1 预处理后病毒滴度的测定

Fig. 7 Antiviral activity of rIFN-1

(a) detection of the transcription level of Mx1 by RT-qPCR; (b) cytopathic effect (CPE) analysis; (c) detection of the transcription level of SVCV-G by RT-qPCR; (d) viral titers in the supernatant were determined after rIFN-1 treatment; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

3 讨论

干扰素具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能,在开发新型抗病毒生物制剂、疫苗和免疫增强剂等方面具有良好的应用前景^[11]。目前,人的干扰素已经应用于临床抗肿瘤和病毒治疗。哺乳动物的干扰素还可用作免疫佐剂,如猪源 IFN- λ 1 作为乙型肝炎病毒 DNA 疫苗的分子免疫佐剂,可显著提高宿主免疫应答水平^[12]; peg-IFN 可以降低慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 的复制^[13]。鱼类干扰素的抗病毒功能也有所研究,如虹鳟 I 型干扰素可以显著抑制病毒性出血败血症病毒 (VHSV) 的复制^[14]。斑马鱼干扰素 DreIFN 具有抗 SVCV 和抗 IHNV 的活性^[15]。草鱼干扰素 CiIFN-1 具有抗 GCRV 的活性^[16]。青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 的 I 型干扰素 bcIFNb 以及三倍体金鱼的 I 型干扰素 3nIFNa 和 3nIFNa2 对 GCRV 和 SVCV 具有明显的抗病毒能力^[17-19]。本实验从 EPC 中扩增 *ifn-1* 基因,并构建原核表达质粒 pET-32a-IFN-1,经 IPTG 诱导成功,在宿主菌 *Transtetta* 中表达约 35 ku 的融合蛋白,且部分呈可溶性表达。经过纯化,获得条带单一的 IFN-1 重组蛋白,并制备了效价较高的抗 IFN-1 多克隆抗体,可以检测细胞内干扰素水平。抗病毒实验结果也显示, rIFN-1 可激活下游抗病毒蛋白 Mx1 的表达,并可显著抑制 SVCV 的复制,说明该 rIFN-1 蛋白具有较好的抗病毒活性。

本实验中 SVCV 感染 EPC 后 24 h 诱导 *ifn-1* 表达,而在早期并没有产生,与先前的研究一致,与 SVCV 拮抗宿主 IFN 产生相关^[20-22]。病毒感染细胞后,RLRs 识别病毒 RNA,激活下游衔接分子 MAVS,启动 TANK 结合激酶 1(TBK1),激活 IRF3/7 诱导干扰素的表达^[20]。SVCV 感染 EPC 后, SVCV-N 蛋白通过降解 MAVS 降低 IFN-1 的表达^[21]; SVCV-P 蛋白与 IRF3 竞争磷酸化,使 IRF3 磷酸化减少,导致 IFN-1 产生减少,并促进 SVCV 的复制^[22]。蛋白精氨酸甲基转移酶 PRMT6 也可以抑制 TBK1 介导的 IRF3/7 抗病毒信号通路帮助 SVCV 逃避免疫系统^[23]。

I 型干扰素本身没有抗病毒功能,而是诱导产生如蛋白激酶 PKR、2'5'-寡腺苷酸合成酶、抗病毒蛋白 Mx 及主要组织相容性复合体蛋白 MHC 等效应蛋白与其他信号通路合作,激活抗病毒反应^[3,24]。rCiIFN 诱导 CIK 产生蛋白激酶 PKR,参与抗病毒反应^[25]; 鲤 (*Cyprinus carpio*)IFN-1

可以诱导头肾抗病毒基因 Mx1 的表达^[26]; IRF5/9、ifit36 及 viperin 等因子可调节 EPC 干扰素信号通路,上调 RIG-I、ISG15、IRF3/7 及 PKR、Mx1 等的表达,降低 SVCV 的病毒滴度^[27-31]。本实验通过用 rIFN-1 蛋白预处理,可显著提高抗病毒蛋白 Mx1 的表达,并抑制 SVCV 的复制。这为 EPC IFN-1 融合蛋白走向生产应用、开发干扰素制剂提供了科学依据。

目前鱼类亚单位疫苗、合成肽疫苗以及 DNA 疫苗等新型疫苗的研究逐渐展开,但需要合适的疫苗佐剂来增强疫苗的免疫效果^[32]。如 SVCV-G 蛋白作为病毒最主要的抗原,但制备的 DNA 疫苗免疫效果并不好^[33]。鲤 I-IFN- γ 作为锦鲤疱疹病毒的免疫佐剂取得一定的免疫效果^[34]; 利用斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的 IL-8 构建的海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) DNA 疫苗佐剂诱导鱼体产生了更强的免疫保护力^[32]。EPC rIFN-1 能否用作免疫佐剂值得进一步研究。

EPC 可增殖多种水生动物病毒,如虹彩病毒科 (Iridoviridae) 的流行性造血器官坏死病毒 (epizootic haematopoietic necrosis virus, EHNV)、欧洲鲇病毒 (European catfish virus, ECV)、蛙病毒 3 (frog virus 3, FV3), 弹状病毒科 (Rhabdoviridae) 的 SVCV、病毒性出血性败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)、传染性造血器官坏死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 及双 RNA 病毒科 (Birnaviridae) 的裂唇鱼病毒 (doctor fish virus, DFV) 和 IPNV, 是研究水生动物病毒的重要材料。本实验获得的 rIFN-1 及制备的抗体可用于水生动物病毒复制与致病机理研究。

参考文献 (References):

- [1] Robertsen B. The interferon system of teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 172-191.
- [2] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon[J]. *Proceedings of the Royal Society-B: Biological Sciences*, 1957, 147(927): 258-267.
- [3] Samuel C E. Antiviral actions of interferons[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 778-809.
- [4] Zhou Y Z, Jiang N, Fan Y D, et al. Identification, expression profiles and antiviral activities of a type I IFN from gibel carp *Carassius auratus gibelio*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 78-86.
- [5] Ding Y, Ao J Q, Huang X H, et al. Identification of two

- subgroups of type I IFNs in perciforme fish large yellow croaker *Larimichthys crocea* provides novel insights into function and regulation of fish type I IFNs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 343.
- [6] Fijan N, Sulimanović D, Bearzotti M, *et al.* Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *cyprinus carpio*[J]. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*, 1983, 134(2): 207-220.
- [7] Holopainen R, Tapiovaara H, Honkanen J. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1095-1105.
- [8] Lopez A, Fernandez-Alonso M, Rocha A, *et al.* Transfection of epithelioma papulosum cyprini (EPC) carp cells[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(6): 481-487.
- [9] Liu L Y, Zhu B B, Wu S S, *et al.* Spring viraemia of carp virus induces autophagy for necessary viral replication[J]. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(4): 595-605.
- [10] Kim H J, Cho J K, Hwang H K, *et al.* Establishment and characterization of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line persistently infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), an aquabirnavirus[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(5): 821-826.
- [11] 魏文燕, 朱玲, 汪开毓, 等. 虹鳟 I 型干扰素 $\epsilon 7$ 在胖头鲮肌肉细胞中的表达及其抗传染性造血器官坏死病毒活性检测[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(07): 76-80.
Wei W Y, Zhu L, Wang K Y, *et al.* Expression of rainbow trout type I interferon $\epsilon 7$ in fathead minnow cell line and its anti-virus activity assay[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(07): 76-80(in Chinese).
- [12] 周亚红, 田占成, 于瑞明, 等. IFN- $\lambda 1$ 作为乙型脑炎病毒DNA疫苗佐剂的免疫效应研究[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(7): 841-846.
Zhou Y H, Tian Z C, Yu R M, *et al.* Immune effect of IFN- $\lambda 1$ as adjuvant for Japanese encephalitis virus DNA vaccine[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(7): 841-846(in Chinese).
- [13] Zhou Y, Yan R, Ru G Q, *et al.* Pegylated-interferon consolidation treatment versus nucleos(t)ide analogue consolidation treatment in non-cirrhotic hepatitis B patients with hepatitis B e antigen seroconversion: an open-label pilot trial[J]. *Hepatology International*, 2019, 13(4): 422-430.
- [14] Chaves-Pozo E, Zou J, Secombes C J, *et al.* The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interferon response in the ovary[J]. *Molecular Immunology*, 2010, 47(9): 1757-1764.
- [15] Wang L, Wang L, Zhang H X, *et al.* *In vitro* effects of recombinant zebrafish IFN on spring viremia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2006, 26(4): 256-259.
- [16] Feng X L, Su J G, Yang C R, *et al.* Molecular characterizations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TBK1 gene and its roles in regulating IFN-I pathway[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 45(2): 278-290.
- [17] Wu H, Liu L Q, Wu S Z, *et al.* IFN β of black carp functions importantly in host innate immune response as an antiviral cytokine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 1-9.
- [18] Yan J, Peng L Z, Li Y, *et al.* IFN α of triploid hybrid of gold fish and allotetraploid is an antiviral cytokine against SVCV and GCRV[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 529-536.
- [19] Yan J, Peng L Z, Chi M D, *et al.* IFN $\alpha 2$ of triploid hybrid of gold fish and allotetraploid is an intracellular antiviral cytokine against SVCV and GCRV[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 238-246.
- [20] Feng H, Zhang Y B, Zhang Q M, *et al.* Zebrafish IRF1 regulates IFN antiviral response through binding to IFN $\phi 1$ and IFN $\phi 3$ promoters downstream of MyD88 signaling[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(3): 1225-1238.
- [21] Lu L F, Li S, Lu X B, *et al.* Spring viremia of carp virus N protein suppresses fish IFN $\phi 1$ production by targeting the mitochondrial antiviral signaling protein[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(9): 3744-3753.
- [22] Li S, Lu L F, Wang Z X, *et al.* The P protein of spring viremia of carp virus negatively regulates the fish interferon response by inhibiting the kinase activity of TANK-binding kinase 1[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(23): 10728-10737.
- [23] Jiang Y Y, Liu L Q, Yang S S, *et al.* Black carp PRMT6 inhibits TBK1-IRF3/7 signaling during the antiviral innate immune activation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 108-115.
- [24] Stetson D B, Medzhitov R. Type I interferons in host defense[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 373-381.
- [25] Sun C G, Liu Y, Hu Y S, *et al.* Gig1 and Gig2 homologs (CiGig1 and CiGig2) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) display good antiviral activities in an IFN-inde-

- pendent pathway[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 477-483.
- [26] Kitao Y, Kono T, Korenaga H, *et al.* Characterization and expression analysis of type I interferon in common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(13): 2548-2556.
- [27] Wei X X, Jia P, Tong G X, *et al.* Effect of common carp (*Cyprinus carpio*) TLR9 overexpression on the expression of downstream interferon-associated immune factor mRNAs in epithelioma papulosum cyprini cells[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2016, 170: 47-53.
- [28] Kim M S, Shin M J, Kim K H. Increase of viral hemorrhagic septicemia virus growth by knockout of IRF9 gene in Epithelioma papulosum cyprini cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 443-448.
- [29] Ai K T, Luo K, Xia L H, *et al.* Functional characterization of interferon regulatory factor 5 and its role in the innate antiviral immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 31-36.
- [30] Chen B, Huo S T, Liu W M, *et al.* Fish-specific fin-TRIM FTR36 triggers IFN pathway and mediates inhibition of viral replication[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 876-884.
- [31] Wang F, Jiao H Q, Liu W M, *et al.* The antiviral mechanism of viperin and its splice variant in spring viremia of carp virus infected fathead minnow cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 805-813.
- [32] 龙波. 斑点叉尾鲷*IL-8*基因的克隆、表达及疫苗佐剂效应研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.
- Long B. Cloning, expression and effects of vaccine adjuvant of *Ictalurus punctatus* channel catfish *IL-8*[D]. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2015(in Chinese).
- [33] Kanellos T, Sylvester I D, D'Mello F, *et al.* DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus[J]. *Vaccine*, 2006, 24(23): 4927-4933.
- [34] 于慧, 张瑞雪, 王好, 等. 鲤I-IFN- γ 作为锦鲤疱疹病毒核酸疫苗免疫佐剂的效果研究[J]. *中国兽药杂志*, 2016, 50(8): 9-15.
- Yu H, Zhang R X, Wang H, *et al.* Immune effect of carp I-IFN- γ as koi herpesvirus nucleic acid vaccine adjuvants[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2016, 50(8): 9-15(in Chinese).

Expression and antiviral activity of *ifn-1* gene in epithelioma papulosum cyprini cells of *Pimephales promelas*

SUN Jie¹, GUO Yana¹, DAI Caijiao¹, CHEN Xiaoxuan¹, LI Lijuan¹, YUAN Junfa^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Engineering Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China)

Abstract: To clone Type I interferon (IFN-1) from epithelioma papulosum cyprini cells (EPC) of *Pimephales promelas*, the *ifn-1* gene was amplified from EPC by RT-PCR, and the recombinant plasmid of pET-32a-IFN-1 was constructed and transformed into the host strain Transetta for expression. Sequence analysis showed that the coding region of *ifn-1* gene was 552 bp in length and encoded 184 amino acids, which was closely related to grass carp interferon 1(CiIFN1). Recombinant soluble IFN-1 (rIFN-1) was induced in Transetta by IPTG and obtained by Ni-affinity purification. Then, anti-rIFN-1 polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand white rabbits with rIFN-1 and could be used to detect endogenous IFN-1 in EPC cells. Quantitative PCR showed that the antiviral protein Mx1 was induced and spring viremia of carp virus (SVCV) replication as well as the production of cytopathic effect (CPE) was significantly inhibited when EPC was pre-incubated with rIFN-1, which indicated that rIFN-1 possessed antiviral activity in EPC cells.

Key words: *Pimephales promelas*; *ifn-1*; EPC; SVCV; prokaryotic expression

Corresponding author: YUAN Junfa. E-mail: jfyuan@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872598)