

文章编号: 1000-0615(2003)05-0474-06

# 团头鲂血清抗病毒半乳糖凝集素样蛋白的分离与鉴定

何介华<sup>1,2</sup>, 邹思湘<sup>1</sup>, 陆承平<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

**摘要:** 将草鱼出血病病毒(GCHV)的结构蛋白与 Sepharose-4B 偶联制备亲和柱, 经亲和层析从团头鲂血清中分离到一种蛋白, 能凝集兔红细胞, 其血凝性依赖于 $\beta$  巯基乙醇的存在。红细胞凝集抑制实验证实该蛋白与 D 半乳糖有最高的亲和力, 其次为甘露糖。梯度 PAGE 测得其分子量约为 240 000 SDS 梯度 PAGE 证实该蛋白由分子量为 15 000 的单个亚基组成, 亚基之间没有共价连接。以上特性与半乳糖凝集素相符, 故称其为团头鲂抗病毒半乳糖凝集素样蛋白。抗体阻断试验证实, 此种凝集素样蛋白是团头鲂血清抗病毒及红细胞凝集活性的主要成分。N 末段的氨基酸序列为 Lys-Val-Asn-Leu-Asp-Glu-Lys-Cys-Pro-Phe, 检索 GenBank, 未发现与这一段序列同源的蛋白质。

**关键词:** 团头鲂; 草鱼出血病病毒结构蛋白; 半乳糖凝集素样蛋白; 抗病毒活性; 红细胞凝集活性

**中图分类号:** Q511; S917 **文献标识码:** A

## Isolation and characterization of an anti-viral galectin-like protein from *Megalobrama amblycephala* serum

HE Jie-hua<sup>1,2</sup>, ZOU Si-xiang<sup>1</sup>, LU Cheng-ping<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Jingzhou 434000, China)

**Abstract:** An anti-viral protein was isolated from *Megalobrama amblycephala* serum by affinity chromatography on a column of Sepharose 4B-GCHV structure protein. Depending on exogenous  $\beta$ -mercaptanethanol, the isolated anti-viral protein could agglutinate rabbit erythrocytes treated by trypsin. Galactose was the most active inhibitor to the protein in hemagglutination inhibition test, and mannose had less activity than that of galactose. The molecular weight of the protein was 240 000 in PG-PAGE and SDS-PG-PAGE demonstrated that it had a subunit structure consisting of a single component with a molecular weight of 15 000. The anti-viral protein was designated anti-viral galectin-like protein of *M. amblycephala*. After treatment with rabbit anti-serum, the rest serum of *M. amblycephala* lost its anti-viral and hemagglutination activity completely. The amino acid sequence of N-end of the galectin-like protein was Lys-Val-Asn-Leu-Asp-Glu-Lys-Cys-Pro-Phe, and no protein with the homologous amino acid sequence was found in the GenBank.

收稿日期: 2002-09-12

作者简介: 何介华(1962-), 男, 湖南益阳人, 博士研究生, 主要从事鱼病学研究。E-mail: hejh@sohu.com

通讯作者: 陆承平(1945-), 男, 上海市人, 教授, 博士生导师, 主要从事鱼类免疫及病原的分子生物学研究。Tel: 025-4396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; GCHV structure protein; galectin-like protein; anti-viral activity; hemagglutination activity

草鱼出血病病毒(grass carp hemorrhage virus, GCHV)是危害草鱼养殖的主要病原。实践中发现团头鲂对GCHV具有天然的抗性,进一步实验证实团头鲂血清对GCHV有很高的抗性<sup>[1]</sup>,其抗病毒成分对温度及酸碱环境有较好的稳定性。这一现象表明,鱼类血清中存在的天然免疫活性物质在其对病害的防御中有重要作用,可以弥补其特异性免疫系统的不足,对其进行研究,将为鱼病的防治提供了一条新的思路。本试验用亲和层析法从团头鲂血清中分离抗GCHV因子,在此基础上对其理化特性进行了探讨。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

健康团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)20尾,体重为550g左右,10月份取自长江水产研究所实验场。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 草鱼出血病病毒(GCHV)的增殖及纯化

用含10%犊牛血清的TC199培养CIK细胞<sup>[2]</sup>,接种GCHV-854<sup>[3]</sup>。细胞出现病变后,收获细胞和培养液,病毒的纯化参考文献[4]的方法。加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 于病毒悬液,达到50%饱和度,静置过夜。4℃5000 r·min<sup>-1</sup>离心30 min,沉淀用SSC(pH 7.4)重悬,4℃,SSC透析24 h。4℃100 000 g离心45 min,沉淀用SSC(pH 7.4)重悬。加入同体积的氟利昂-113,剧烈震荡,1 000 g离心15 min,取上清,重复3次。15%~50%的蔗糖连续梯度,4℃,100 000g离心4 h,用注射器取出梯度中间的白色带,SSC稀释,4℃100 000g离心4.5 h。去离子水重悬病毒,4℃,用去离子水透析24 h。负染,日立H-600透射电镜观察,其余透析液冷冻干燥备用。

#### 1.2.2 Sepharose-4B与病毒结构蛋白的偶联

称取溴化氰活化的Sepharose-4B(Sigma公司产品)干粉1g,溶于 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl,抽滤洗涤,反复3次,存放4℃供试验之用。

称取冻干的纯化GCHV 10 mg溶于偶联溶液[ $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3,含 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,2%十二烷基硫酸钠(SDS)],室温下振荡2 h。将裂解的GCHV溶液与经上述处理的Sepharose-4B混合偶联,装柱备用。

#### 1.2.3 团头鲂血清制备及亲和层析

团头鲂断尾采血,室温下静置30 min,4℃3 500 r·min<sup>-1</sup>,离心15 min,取血清,将每3尾鱼血清混合后分装,-30℃保存备用。

0.5 mL团头鲂血清和4.5 mL磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)混匀上柱,核酸蛋白检测仪(江苏兴化分析仪器厂,NDZJ-2型)检测流出液,调节流速为 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,用5 mL PBS洗脱,重复5次。改洗脱液为 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠(pH 4.0,含 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl),5 mL洗脱,测定每管的A280, Hank氏液透析24 h, Bradford法定量<sup>[5]</sup>,备用。

#### 1.2.4 梯度SDS-PAGE(3%~30%)

低浓度胶为3%(C=2.5%,5%蔗糖),高浓度胶为30%(C=5%,20%蔗糖),凝胶尺寸为:9cm×12cm,梯度为直线梯度。电极及凝胶缓冲系统为连续系统: $0.025\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris、 $0.192\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  glycine、0.1% SDS。样品缓冲液为Laemmli(加和不加β巯基乙醇),200V电泳20 h,考马斯亮蓝R-250染色,脱色液脱色<sup>[6]</sup>。

### 1.2.5 梯度 PAGE(3%~30%)

凝胶系统与上同,不含 SDS。样品缓冲液组成:样品蛋白、1/2 浓度电极缓冲液、10%甘油、0.01%溴酚蓝。标准蛋白(购自上海华舜)分别含分子量为 205 000、116 000、97 000、66 000、45 000 和 29 000 的蛋白质。200V 电泳 20 h。考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色。

### 1.2.6 中和指数测定

固定待测样品浓度,稀释病毒。样品为 10 倍稀释的团头鲂血清及各洗脱管溶液<sup>7</sup>。

### 1.2.7 红细胞凝集及抑制试验

兔红细胞的制备:按照参考文献[8]的方法,取抗凝兔血 2 mL, 2 000r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,弃上清。红细胞用 10 倍体积的灭菌 PBS(pH 7.4)重悬,2 000r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,重复 2 次。加入 5 倍体积 1%胰蛋白酶(用 PBS 配制),37 °C 恒温水浴振荡处理 1 h,用灭菌生理盐水洗 5 次。红细胞使用浓度为 1%。

红细胞凝集试验:团头鲂血清(10 倍稀释)及经亲和层析纯化的样品用生理盐水作系列倍比稀释,96 孔血凝板上每孔加待测的各稀释度样品 50  $\mu$ L,阴性对照为生理盐水,每个稀释度样品至少作 2 孔,3 种处理分别为生理盐水、生理盐水+2 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 及生理盐+10 mmol·L<sup>-1</sup>  $\beta$  巯基乙醇,每孔加经胰酶处理过的兔红细胞 100  $\mu$ L,充分混匀,室温下静置 1 h 后观察结果。阳性对照为 PHA。血细胞凝集效价为出现红细胞凝集的最高样品稀释倍数的倒数。

红细胞凝集抑制试验:蔗糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、甘露糖和葡萄糖(分析纯,上海化学试剂采购分装厂),浓度为 50 mmol·L<sup>-1</sup>,分别作系列倍比稀释。团头鲂血清亲和层析纯化样品使用浓度为使红细胞凝集最低浓度的 4 倍<sup>9</sup>,每孔加纯化样品 50  $\mu$ L,各稀释度的糖 50  $\mu$ L 及红细胞使用液 100  $\mu$ L,充分混匀,室温下静置 1 h 观察结果,记录未出现红细胞凝集的最高糖稀释倍数。

### 1.2.8 抗血清的制备及其阻断试验

抗血清的制备:亲和纯化的样品(0.053mg·mL<sup>-1</sup>)与同体积的弗氏完全佐剂(Sigma)乳化,皮内多点注射雄性新西兰大白兔(每只 1 mL),每隔两周加强注射。3 个月颈动脉采血,分离血清、分装、冻干保存。

抗血清阻断试验:1mL 团头鲂血清加 9 mL 兔抗血清(56 °C 灭活 60 min)充分混匀,在 37 °C 下作用 2 h,1000 g 离心 15 min,取上清。单相免疫扩散<sup>10</sup>测定上清剩余抗原,测定中和指数及红细胞凝集效价。

### 1.2.9 N 末端的氨基酸序列分析

亲和纯化样品对蒸馏水透析 24 h,中途换水 3 次,超滤器(milipore)浓缩,冷冻干燥,冻干样品由北京大学生命科学学院测定氨基酸序列。

## 2 结果

### 2.1 纯化 GCHV 的电镜观察

电镜下可见病毒颗粒,病毒粒子直径为 70 nm 左右,是典型的 GCHV。

### 2.2 样品的洗脱

洗脱曲线显示(图 1),当洗脱液为 pH 4 时得到 1 个洗脱峰(A280 为 0.145)。

### 2.3 梯度 SDS-PAGE

样品缓冲液中不含  $\beta$  巯基乙醇和含  $\beta$  巯基乙醇,考马斯亮蓝染色后都只见单一的蛋白带(图 2),分子量分别为 15 000 和 17 800,表明该蛋白质只有一种亚基,迁移率的差别显示亚基内存在二硫键。

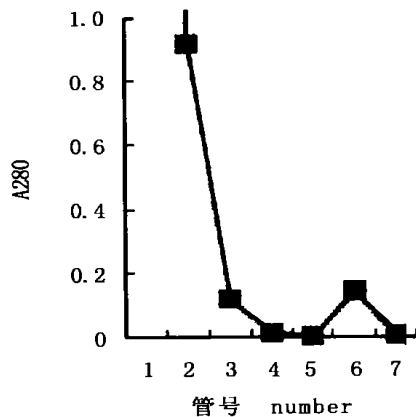


图 1 团头鲂抗病毒蛋白的亲和和纯化

Fig. 1 Affinity chromatography of anti-viral protein from *M. amblycephala*

## 2.4 梯度 PAGE

纯化的团头鲂抗草鱼出血病病毒蛋白在没有还原剂和去污剂时电泳测大小为 240 000 左右(图 3)。

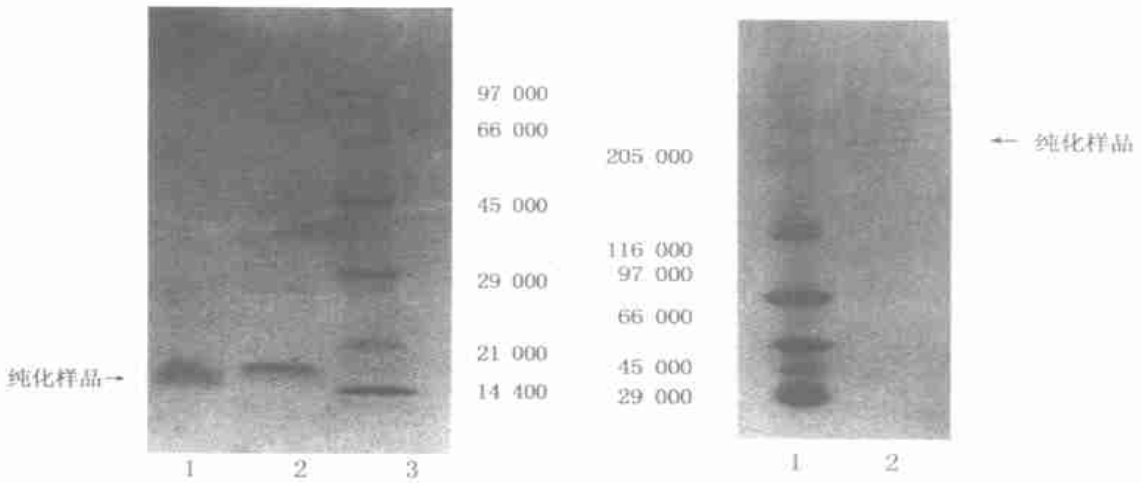


图 2 纯化样品的梯度 SDS-PAGE

Fig. 2 Gradient SDS-PAGE profile of purified protein by affinity chromatography

1. purified protein treated without  $\beta$ -mercaptanethanol;
2. Purified protein treated with  $\beta$ -mercaptanethanol;
3. The protein of standard molecular weight

图 3 纯化样品的梯度 PAGE(3%~30%)

Fig. 3 Gradient PAGE(3%~30%) of purified protein

1. the protein of standard molecular weight;
2. purified protein by affinity chromatography

## 2.5 样品对 GCHV 的中和指数

团头鲂血清、洗脱管 6 对 GCHV 的中和滴度分别为 690、69。洗脱管蛋白浓度为  $53\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，团头鲂抗 GCHV 蛋白的纯化倍数为 13 倍(表 1)。

表 1 洗脱样品对 GCHV-854 株的中和指数

Tab. 1 Neutralization index against GCHV from the sample of affinity chromatography

| 样品 sample   | 1   | 2   | 3    | 4     | 5    | 6     | 7     | 血清 serum |
|---|-----|-----|------|-------|------|-------|-------|----------|
| 蛋白浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<br>protein concentration | 5.1 | 1.2 | 0.32 | 0.065 | 0.01 | 0.053 | 0.005 | 6.5      |
| 中和指数<br>neutralization Index                                    | 0   | 10  | 1.4  | 1     | 1    | 0     | 1.4   | 690      |

## 2.6 红细胞凝集效价

团头鲂血清及其亲和纯化样品的红细胞凝集效价分别为 1280 和 16，最低凝集红细胞的蛋白浓度为  $1.14\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (根据亲和纯化样品的浓度)，并且只有含  $\beta$  巯基乙醇的实验组才有红细胞凝集现象，阳性对照 PHA 的凝集效价为 324(表 2)。

## 2.7 红细胞凝集抑制效价

D 半乳糖抑制红细胞凝集的最低浓度为 0.39

表 2 红细胞凝集效价

Tab. 2 Hemagglutinin titer of sample

|                          | 0.9% NaCl | 0.9% NaCl + $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2$ | 0.9% NaCl + $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta$ 巯基乙醇 |
|--------------------------|-----------|--|--|
| 团头鲂血清<br>Serum           | 40        | 40   | 1280   |
| 纯化蛋白<br>purified protein | 0         | 0  | 16   |
| 0.9% NaCl                | 0         | 0  | 0  |
| PHA                      | —         | 324  | —  |

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甘露糖为  $0.78 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (表 3)。D-半乳糖对团头鲂凝集素的亲和力最高, 甘露糖次之。而蔗糖、木糖、阿拉伯糖及葡萄糖浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时没有抑制效应。

## 2.8 抗血清的阻断试验

团头鲂血清经兔抗血清沉淀后, 上清中未检测出抗原, 其病毒中和指数及红细胞凝集效价几乎全部消失(表 4)。

## 2.9 N 末端氨基酸序列

团头鲂抗 GCHV 因子氨基末端 10 个氨基酸序列为: Lys-Val-Asn-Leu-Asp-Glu-Lys-Cys-Pro-Phe。检索 GenBank, 未发现与之有同源序列的蛋白质。

表 4 抗体阻断后团头鲂血清中和指数及红细胞凝集效价

Tab. 4 The neutralization index and hemagglutination titer of the *Megalobrama amblycephala* serum inhibited by rabbit anti serum against anti GCHV factor

|   | 中和指数<br>neutralization index | 红细胞凝集效价<br>hemagglutination titer |
|---|------------------------------|-----------------------------------|
| 团头鲂血清(1mL)/Hank 氏(9mL)<br><i>M. amblycephala</i> serum(1mL)/Hank's(9mL) | 690                          | 1280                              |
| 团头鲂血清(1mL)/兔抗血清(9mL)<br><i>M. amblycephala</i> serum/Rabbit anti-serum  | 10                           | 0                                 |
| Hank 氏(1mL)/兔抗血清(9mL)<br>Hank's(1mL)/Rabbit anti-serum(9mL)             | 4                            | 0                                 |

## 3 讨论

Wolf<sup>[11]</sup>报道在虹鳟的血清中发现一种大小为 6S 的蛋白, 能非特异抑制 IPNV 在细胞中的繁殖, 但是没有更进一步的研究。本文以团头鲂血清抗病毒活性为线索, 纯化到了一种抗病毒活性蛋白, 并且具有半乳糖凝集素 3 个主要特征<sup>[12-14]</sup>: 依赖外源还原剂  $\beta$  巯基乙醇的红细胞凝集活性; 对 D 半乳糖亲和力最高; 亚基分子量为 15 000。从分子结构来看不具备免疫球蛋白的特性。所以称这一抗病毒蛋白为团头鲂抗病毒半乳糖凝集素样蛋白。根据梯度 PAGE 结果, 其分子大小约 240 000Da, 推测由 16 个相同亚基以非共价组成的寡聚体。

经亲和层析纯化后, 提取物的抗 GCHV 活性及红细胞凝集活性与全血清相比均有较大损失, 表明团头鲂半乳糖凝集素样蛋白的抗病毒活性与红细胞凝集活性是平行的, 并且  $\beta$  巯基乙醇对团头鲂血清的抗病毒活性及红细胞凝集活性都有保护作用, 揭示决定这两种生物学活性的结构域有重叠。

Ezekowitz 等<sup>[14]</sup>体外实验发现, 人的 C 型凝集素 MBP(甘露糖结合蛋白)能完全抑制人免疫缺陷病毒(HIV)感染  $\text{CD}^{4+}$  H9 成淋巴细胞, 进一步证实 MBP 能选择性识别 HIV 结构蛋白 gp120 富含甘露糖糖基的多糖, 而这可能正是  $\text{CD}^{4+}$  所识别的结构域, 从而抑制了病毒对敏感细胞的入侵。推测团头鲂抗病毒半乳糖凝集素样蛋白与 GCHV 颗粒的糖基结合, 封闭了后者与细胞膜受体的结合位点, 从而阻止了病毒与易感细胞之间的识别和粘附, 其抗病毒机理可能与 MBP 相似。

表 3 单糖的红细胞抑制效价

Tab. 3 The titer of hemagglutination inhibition

| 糖 类 sugar         | 最低抑制浓度( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<br>minimum inhibition concentration |
|-------------------|---|
| 蔗 糖 saccharose    | NI  |
| D-半乳糖 D-galactose | 0.39  |
| 甘露糖 mannos e      | 0.78  |
| 木 糖 xylose        | NI  |
| 阿拉伯糖 arabinose    | NI  |
| 葡萄糖 glucose       | NI  |

注: NI 表示糖浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时无抑制效果

Notes: NI means not inhibited at  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 参考文献:

- [ 1 ] He J H. Isolation and characterization of an anti-viral galectin-like protein from *Megalobrama amblycephala* serum[ D] . Dissertation for Doctor degree, Nanjing Nanjing Agricultural University, 2002 [ 何介华. 团头鲂抗病毒半乳糖凝集素样蛋白的分离与鉴定[ D] . 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2002.]
- [ 2 ] Zuo W G, Qian H X, Xu Y F et al. , Primary study on the establishment of grass carp kidney cell[ J] . Freshwater Fisheries, 1984, 3: 38- 40. [ 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏细胞系建立的初步研究[ J] . 淡水渔业, 1984 3: 38- 40.]
- [ 3 ] Zeng L B, He L. Purification and characterization of GCHV- 854[ J] . Freshwater Fisheries, 1991, 5: 17- 19. [ 曾令兵, 贺路. 草鱼出血病病毒854株的纯化及理化特性研究[ J] . 淡水渔业, 1991, 5: 17- 19.]
- [ 4 ] Winter J R, Lannan C N, Fryer J L et al. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals[ J] . J Gen Virol, 1987, 68: 353- 364.
- [ 5 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding[ J] . Anal Biochem, 1976, 72: 248- 254.
- [ 6 ] Poduslo J F. Molecular weight estimation using SDS-pore-gradient electrophoresis[ J] . Anal Biochem, 1980, 101: 394- 406.
- [ 7 ] Dai H S. New experimental virology[ M] . Beijing, Technical Press of China, 1983. 30- 35. [ 戴华生. 新实验病毒学[ M] . 北京: 中国技术出版社, 1983. 30- 35.]
- [ 8 ] Levi G, Teichberg V I. Isolation and physicochemical characterization of electrolectin[ J] . J Biol Chem, 1981, 256(11): 5735- 5740.
- [ 9 ] Springer G F, Desai P R. Monosaccharides as specific precipitinogens of eel anti-human blood-group H(O) antibody[ J] . Biochem, 1971, 10(2): 3749- 3761.
- [ 10 ] Sakai Y, Itakura K, Kanada T, et al. Quantitation of apolipoprotein A- 1 in pooled human serum by single radial immunodiffusion and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis[ J] . Analytic Biochem, 1984, 137: 1- 7.
- [ 11 ] Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases[ M] . Cornell University Press, 1988. 115- 157.
- [ 12 ] Barondes S H, Cooper D N W, Gitt M A, et al. Galectins: structure and function of a large family of animal lectin[ J] . J Biol Biochem, 1994, 269: 20807- 20810.
- [ 13 ] Cooper D N W, Barondes S H. God must love galectin, he make so many of them[ J] . Glycobiol, 1999, 978- 984.
- [ 14 ] Ezekowitz R A B, Kuhlman M, Groopman J E, et al. A human serum mannose-binding protein inhibits *in vitro* infection by the human immunodeficiency virus[ J] . J Exp Med, 1989, 169: 185- 196.

## 欢迎订阅 2004 年《水利渔业》

《水利渔业》是由水利部中国科学院水库渔业研究所主办的水产技术刊物, 主要栏目包括: 研究与探索、名特优新、增殖养殖、资源与环境、营养与饲料、病害防治、捕捞加工、水产综述、渔业经验、水产信息等。以实用技术为主, 技术与经济并重, 兼顾信息交流, 可供水产科研、渔业开发、技术推广、教学、生产和管理的水产工作者阅读。

本刊系中国水产核心期刊, 湖北省一级优秀期刊, 水利部优秀期刊, 全国水产系统优秀期刊, 中国自然科学核心期刊, 并被《中国学术期刊(光盘)》、《中国期刊网》、《中国学术期刊综合评价数据库》全文收录。本刊为双月刊, 大 16 开本, 每期 72 页, 国内外发行, 国际标准刊号: ISSN 1003-1278, 国内统一刊号: CN42-1247/S, 邮发代号: 38-76, 每期订价: 5 元, 全年 6 期 30 元。欢迎广大新老朋友到邮局订阅, 也可直接汇款至编辑部订购。

汇款地址: 武汉市武昌路雄楚大街 578 号《水利渔业》编辑部, 邮政编码: 430079

联系电话: 027-87189555

http://www.scan.chinajournal.net.cn, E-mail: scan@chinajournal.net.cn