

# 草鱼干扰素的分离纯化及某些理化和生物学特性

邵健忠 项黎新

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

**摘 要** 通过 DEAE Sepharose 阴离子交换层析、Sephacryl S 200 凝胶层析、高效液相层析和梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术,对病毒诱生的草鱼血清干扰素进行了分离纯化。纯化的草鱼干扰素在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现单一组份,分子量为 38kD,等电点为 5.25,过碘酸 Schiff 试剂反应表现为典型的糖蛋白染色特征。理化和生物学特性研究表明,草鱼干扰素具有 100 000g(2h)离心不沉降、耐热、在 pH2-10 范围内活性稳定、抗核酸酶,但对胰蛋白酶、糖苷酶和糖氧化剂  $\text{NaIO}_4$  敏感等性质,在鱼类细胞中具有抑制不同病毒的能力,但在人、哺乳类、鸟类和贝类等细胞中无抗病毒作用,表现出抗病毒的种属特异性,与高等脊椎动物  $\alpha/\beta$  干扰素的特性相一致。

**关键词** 草鱼,干扰素,分离纯化,理化性质

## Purification and some physico-chemical and biological characterization of *Ctenopharyngodon idellus* interferon

Shao Jianzhong, Xiang Lixin,

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012)

**ABSTRACT** Serum interferon of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), which was induced by the haemorrhagic virus was purified by means of DEAE-Sepharose anion exchange chromatography, Sephacryl S-200 gel chromatography, high performance liquid chromatography and gradient polyacrylamide gel electrophoresis. The purified grass carp interferon exhibited single component when analysed by the SDS polyacrylamide gel electrophoresis. It was a glycoprotein with the molecular weight of 38kD and the isoelectric point of 5.25. Biochemical studies showed that the grass carp interferon was not sedimented at 100 000g for 2 hours, exhibited stability to heat of pH2~10, and resisting to DNase and RNase, but was sensitive to trypsin, Glucosidase and  $\text{NaIO}_4$ . It was able to inhibit different kinds of virus in the cells of grass carp, but failed in human, mammalian, avian and shellfish cells. The results showed that the grass carp interferon was specific to fish cells and viruses. Its characterization was consistent with that of high vertebrate  $\alpha/\beta$  interferon.

**KEYWORDS** *Ctenopharyngodon idellus*, interferon, purification, Physico-chemical characterization

干扰素(Interferon, IFN)是在病毒等诱生剂作用下由机体及其细胞合成的一种活性糖蛋白分子,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物学功能,目前在人类和高等脊椎动物中已有大量深入的研究。然而鱼类 IFN 的研究尚处于起步阶段,60 年代以来,若干学者虽相继从黑头软头鲮(*Pimephales promelas*)、虹

国家自然科学基金资助项目(草鱼非特异性免疫因子——干扰素的研究和草鱼干扰素基因克隆及其在衣藻中表达的研究), 39400100 和 39970589 号。

第一作者简介:邵健忠,男,1963 年 1 月生,博士,副教授。Tel: 0571- 8845635, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

收稿日期:1998 04 08

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

鳟(*Salmo gairdneri*)和牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)等鱼类中诱生出 IFN 物质<sup>[1~8]</sup>,但未见其分离纯化及理化和生物学性质的深入探讨。近年来,作者等在发现病毒诱导草鱼产生 IFN 活性因子的同时,开展了其分离纯化及部分理化和生物学性质的研究,本文报道该研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

一龄草鱼 1 000 余尾,体长 10~15cm,体重 25~50g,购自杭州市水产研究所。实验前 25℃ 饲养观察 1~2 周,确证健康后使用。

### 1.2 细胞

草鱼吻端组织细胞株 ZC7901 和胚胎细胞系 CP80 引自浙江省淡水水产研究所,草鱼肾细胞系 CIK 引自长江水产研究所,人羊膜细胞株 WISH 引自美国印地安那大学 Taylor 实验室,猪肾细胞系 PK15 和鸡胚成纤维细胞系 CEF 由浙江省农科院病毒研究所提供,三角帆蚌肾原代细胞系 HcK94 由作者实验室建立。以上细胞按常规方法用含 10% 胎牛血清的 TC199 或 RPMI1640 培养液培养。

### 1.3 病毒

草鱼出血病病毒(GCHV)、草鱼小 RNA 病毒(GCPV)和三角帆蚌瘟病病毒(HcPV)由作者实验室分离<sup>[9,10]</sup>;滤泡性口炎病毒(VSV)引自美国印地安那大学 Taylor 实验室;猪水泡病病毒(SVDV)和猪口蹄疫病毒(FMDV)由浙江省农科院病毒研究所提供;鸡传染性支气管炎病毒(IBV)和鸡马立克氏病疱疹病毒(MDHV)由浙江农业大学免疫研究所提供。以上病毒分别在 ZC7901、CP80、HcK94、WISH、PK15 和 CEF 等细胞上增殖传代,按 Reed-Muench 法测定滴度 TCID<sub>50</sub>。

### 1.4 草鱼干扰素的诱生与制备

将实验鱼饲养于 25℃ 水温中,经背鳍皮下注射 10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub> 灭活 GCHV 预诱导 3d 或 10<sup>4</sup> 单位草鱼 IFN 启动 1d 后,再用 2×10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub> 的 GCHV 感染,25℃ 3d 后采血,收集血清,-20℃ 保存。

### 1.5 草鱼干扰素的活性测定方法

用半数细胞病变抑制(CPEI<sub>50</sub>)法进行<sup>[11]</sup>,即 ZC7901 细胞经不同稀释度的 IFN 作用后,加入 100TCID<sub>50</sub> GCHV 攻击,以能抑制 50% 细胞病变的最高稀释度为一个 IFN 活性单位,用 Log<sub>2</sub>CPEI<sub>50</sub>/0.1mL 表示。

### 1.6 草鱼干扰素的分离纯化方法

#### 1.6.1 DEAE-Sephrose 阴离子交换层析

血清 IFN 样品用初始洗脱液(10mmol/L Tris-HCl, pH8.0)透析,然后上 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱(Pharmacia 产品,柱高 20cm,直径 2.6cm),以 18mL/h 的流速 4℃ 洗脱 6h 后,换用 10mmol/L Tris-HCl, pH7.0 洗脱液洗脱 6h,再用含该洗脱液的 0~0.5mol/L 的 NaCl 作线性梯度洗脱。洗脱样品用 280nm 波长检测,以 3mL/管的量作自动分部收集。经冰冻干燥浓缩后,测定 IFN 活性。

#### 1.6.2 Sephacryl S 200 凝胶层析

经离子交换层析所得的活性样品用 10mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, pH7.2 缓冲液透析,然后上 Sephacryl S 200 凝胶柱(Pharmacia 产品,柱高 100cm,直径 2.6cm),以 15mL/h 的流速洗脱 12h。样品的检测、收集与活性测定方法同前。

### 1.6.3 高效液相层析(HPLC)分离

经凝胶层析所得的活性样品进一步用岛津 Shim-Pack DIOL-150 型凝胶柱(柱长 25cm, 直径 0.79cm) 分离。洗脱液为含 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  的 10mmol/L PB 缓冲液(pH7.2), 流速 1mL/min, 检测波长 280nm, 样品经分部收集和冰冻干燥浓缩后测定 IFN 活性, 方法同前。

### 1.6.4 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离

经 HPLC 分离的活性样品再用 6%~15% 线性梯度 PAGE 分离。电极液为 0.025mol/L Tris-0.192mol/L Gly (pH8.3), 100V 电泳 6h 后取下部分凝胶用于染色和薄层扫描分析, 其它凝胶则按阴极到阳极方向依次切割成 2mm 的小条, 分别用 25mA 电泳洗脱 4h, 收集洗脱样品, 经浓缩后测定 IFN 活性。

## 1.7 SDS-PAGE 电泳及分子量测定

参照 Laemmli 的电泳方法进行<sup>[12]</sup>。层积胶浓度 3%, 分离胶 10%, 以磷酸化酶 B、牛血清白蛋白、肌动蛋白、碳酸酐酶和钙调素为标准, 测定分子量。

## 1.8 等电聚焦电泳(IEF) 及等电点测定

参照 Stewart 等方法进行<sup>[13]</sup>。凝胶浓度 4.2%, 含 2% Triton X100, 1mol/L 尿素, 0.8% Ampholine pH3.5~10。电泳后凝胶经分段洗脱, 测定 pH 值, 制备标准曲线, 测定等电点。

## 1.9 糖蛋白的 PAS 染色反应

按 Glossmann 等方法进行<sup>[14]</sup>。电泳后凝胶用 12.5% TCA 固定, 1% 过碘酸 Schiff 试剂染色, 1%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  退色后观察。

## 1.10 草鱼 IFN 的理化特性测定

提纯后的草鱼 IFN 分别用下列方法处理: (1) pH2 和 pH10 4℃ 24h; (2) 60℃ 1h; (3)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (300U/mL) 37℃ 2h; (4) 0.02mol/L  $\text{NaIO}_4$  4℃ 12h; (5) 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶 (0.15mg/mL) 37℃ 2h; (6) 胰蛋白酶 (0.5mg/mL) 37℃ 2h; (7) DNase 和 RNase (0.1mg/mL) 37℃ 2h; (8) 100 000g 离心 2h; (9) PBS 透析 24h。然后测定处理前后 IFN 活性的差异。

## 1.11 草鱼 IFN 在不同细胞中的抗病毒活性测定

分别测定草鱼 IFN 在 ZC7901、CP80、CIK、WISH、PK15、CEF 和 HcK94 细胞中对 GCHV、GCPV、VSV、FMDV、SVDV、IBV、MDHV 和 HcPV 的抗病毒活性, 观察其活性差异。

## 2 结果

### 2.1 草鱼 IFN 的分离纯化

#### 2.1.1 DEAE Sepharose 阴离子交换层析

血清 IFN 样品经 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0 初始缓冲液洗脱后可充分吸附于 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱上, 然后用 0~0.5mol/L NaCl 溶液作线性梯度洗脱, 可出现 5 个主要的洗脱峰, 对各洗脱样品逐一进行抗病毒活性测定, 结果表明, IFN 活性主要集中在第 3 峰样品管内(图 1)。

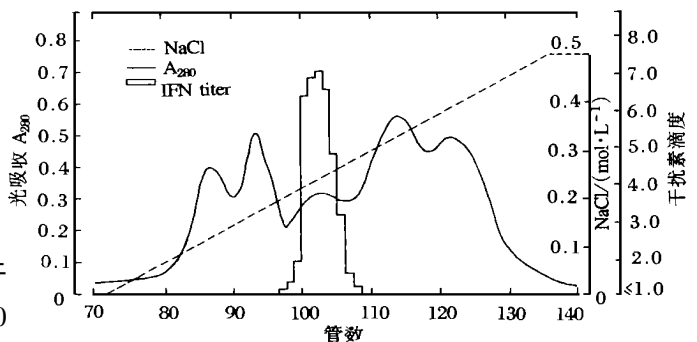


图 1 草鱼 IFN 的 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析图谱  
Fig.1 Purification of grass carp IFN by DEAE-Sepharose chromatography

### 2.1.2 Sephacryl S 200 凝胶层析

经 DEAE-Sephacrose 阴离子交换层析分离所得活性样品, 通过冰冻干燥浓缩后用 Sephacryl S-200 凝胶柱进一步分离, 可得到 3 个主要的洗脱峰, 抗病毒活性测定结果显示, IFN 主要分布在第 3 峰样品管内 (图 2)。

### 2.1.3 HPLC 分离

经 Sephacryl S 200 分离的 IFN 活性样品, 再经 HPLC 分离, 结果又出现 6 个主要的洗脱峰, 抗病毒活性测定结果显示, IFN 集中分布在第 2 峰样品管内 (图 3)。

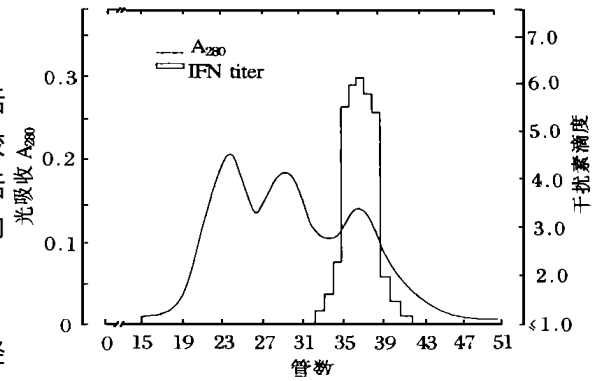


图 2 草鱼 IFN 的 Sephacryl S 200 凝胶层析图谱  
Fig. 2 Purification of grass carp IFN by Sephacryl S 200 gel chromatography

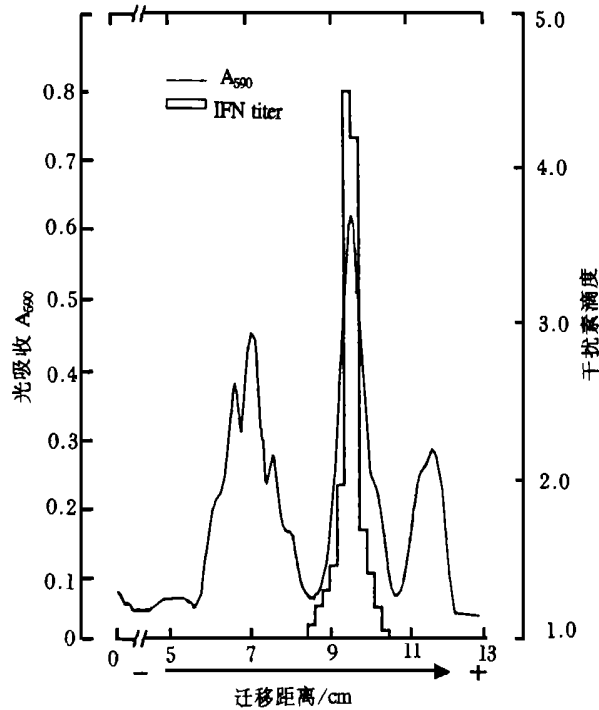


图 3 草鱼 IFN 的 HPLC 分离图谱  
Fig. 3 Purification of grass carp IFN by high performance liquid chromatography

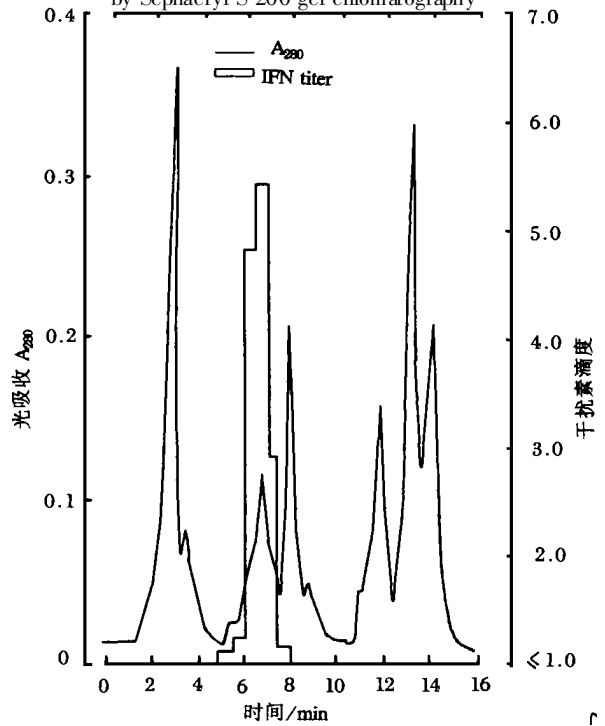


图 4 草鱼 IFN 的梯度 PAGE 分离图谱  
Fig. 4 Purification of grass carp IFN by gradient polyacrylamid gel electrophoresis

### 2.1.4 梯度 PAGE 分离

收集 HPLC 分离所得的活性样品, 经冰冻干燥浓缩后, 用 6% ~ 15% 非变性的 PAG 线性梯度电泳分离, 结果经薄层扫描分析, 呈现 5 个分离带吸收峰。抗病毒活性测定结果表明, IFN 分布在第 4 号分离带中 (图 4)。该分离带样品经电泳洗脱回收后, 在 SDS-PAG 电泳中呈现均一的组份, 说明草鱼 IFN 经以上步骤分离后达到了电泳纯 (图 5)。

## 2.2 草鱼 IFN 的分子量测定

分离纯化的草鱼 IFN 在 SDS-PAG 电泳中呈现单一的区带。根据标准蛋白的分子量与迁移距离所制备的标准曲线, 测得其分子量为 38KD (图 6)。

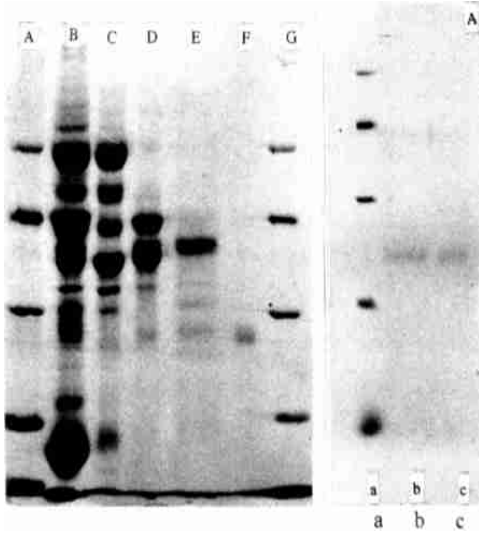


图 5 草鱼 IFN 各分离步骤的纯度检测

Fig. 5 Purity analyses of grass carp IFN eluted at each purification step

- A, G. 标准蛋白; B. 分离前的血清 IFN 样品;
- C. DEAE Sepharose 层析后的 IFN 活性样品;
- D. Sephacryl S 200 层析后的 IFN 活性样品;
- E. HPLC 分离后的 IFN 活性样品;
- F. 梯度 PAGE 分离后的 IFN 纯品。

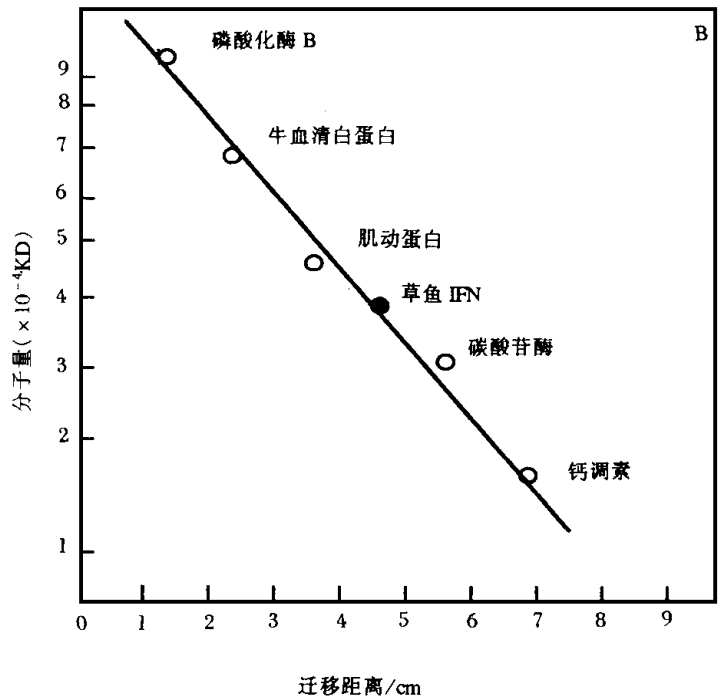


图 6 草鱼 IFN 分子量的 SDS- PAGE 测定结果

Fig. 6 Molecular weight determination of grass carp IFN by SDS- PAGE  
A. 电泳图谱 (a. 标准蛋白, b、c 草鱼 IFN ), B. 标准曲线

### 2.3 草鱼 IFN 的等电点及糖蛋白性质测定

分离纯化的草鱼 IFN 在 IEF 电泳中被聚集于酸性端, 其等电点(pI) 测定结果为 5.25。经糖的特异染色反应过碘酸 Schiff 试剂(PAS) 染色后, IFN 呈明显的红色条带, 由此证明其含有糖组分, 是一种糖蛋白。

### 2.4 草鱼 IFN 的理化特性测定

实验结果显示, 草鱼 IFN 经酸、碱、热、核酸酶、10<sup>5</sup>g 离心和透析等处理后, 其活性与对照相比, 均未出现显著性差异, 而经蛋白酶、糖苷酶和糖氧化剂 NaIO<sub>4</sub> 作用后则呈极显著差异 (表 1)。

表 1 草鱼 IFN 的理化特性测定

Tab. 1 Analysis of physicochemical characteristics of grass carp interferon

理化因子	处理条件	IFN 滴度* <sup>1</sup>	t 检验* <sup>2</sup>	理化因子	处理条件	IFN 滴度* <sup>1</sup>	t 检验* <sup>2</sup>
对 照		10.02 ± 0.11		AKP	0.15mg/ml 37°C 2h	10.02 ± 0.10	P> 0.05
HCl	pH2 4°C 24h	10.02 ± 0.12	P> 0.05	ACP	0.15mg/ml 37°C 2h	10.09 ± 0.10	P> 0.05
NaOH	pH10 4°C 24h	10.08 ± 0.10	P> 0.05	Trypsin	0.5mg/ml 37°C 2h	0	
Heat	60°C 1h	10.06 ± 0.10	P> 0.05	DNase	0.1mg/ml 37°C 2h	9.936 ± 0.01	P> 0.05
α- Glucosidase	300u/ml 37°C 2h	9.08 ± 0.08	P< 0.01	RNase	0.1mg/ml 37°C 2h	10.06 ± 0.09	P> 0.05
β- Glucosidase	300u/ml 37°C 2h	8.89 ± 0.10	P< 0.01	10 <sup>5</sup> g	4°C 2h	10.01 ± 0.01	P> 0.05
NaIO <sub>4</sub>	4°C 12h	9.44 ± 0.02	P< 0.01	Dialyze	4°C 24h	10.08 ± 0.10	P> 0.05

注: \* 1 表示 Log<sub>2</sub>CPEI<sub>50</sub>/0.1mL, X ± SD, n= 4; \* 2 表示与对照组比较。

### 2.5 草鱼 IFN 在不同细胞中的抗病毒活性测定

实验结果显示, 草鱼 IFN 在三种鱼类细胞中均具有抑制不同病毒的能力, 而在人、哺乳动物、鸟类和贝类细胞中则无抗病毒活性, 表现出其抗病毒作用具有相对的种属特异性 (表 2)。

表 2 草鱼 IFN 在不同细胞中的抗病毒活性测定  
Tab.2 Antiviral activity of grass carp interferon in different cell lines

IFN 活性测定系统			IFN 性测定系统		
细 胞	病 毒 <sup>*1</sup>	IFN 滴度 <sup>*2</sup>	细 胞	病 毒 <sup>*1</sup>	IFN 滴度 <sup>*2</sup>
ZC790I	GCHV	10.02±0.01	WISH	VSV	0
ZC790I	GCPV	10.18±0.12	PK15	SVDV	0
CP80	GCHV	10.04±0.11	PK15	FMDV	0
CP80	GCPV	10.04±0.18	CEF	IBV	0
CIK	GCHV	10.08±0.16	CEF	MDHV	0
CIK	GCPV	10.16±0.09	HeK94	HePV	0

注: \* 1 表示病毒感染剂量为 100TCID<sub>50</sub>; \* 2 表示 Log<sub>2</sub>CPEI<sub>50</sub>/0.1mL, X±SD, n= 4

### 3 讨论

本文通过离子交换层析、凝胶过滤、高效液相层析和梯度凝胶电泳等技术,首次对病毒诱生的草鱼血清 IFN 进行了分离纯化及部分理化和生物学性质研究。结果表明,草鱼 IFN 对酸、碱、热均不敏感,在 pH2~ 10 范围内活性稳定,对 60℃ 具有明显的耐受性。但用胰蛋白酶处理,其活性消失,而用核酸酶处理,活性不受影响,表现出蛋白质的性质。用 SDS-PAG 电泳测得其分子量为 38KD,用糖的特异性 PAS 染色反应显示其含有糖链修饰,用 NaIO<sub>4</sub> 或糖苷酶降解糖基,IFN 活性显著下降,这不仅进一步反映了草鱼 IFN 具有糖蛋白质性质,与 PAS 显色反应结果相一致,而且说明糖的修饰对其抗病毒功能的发挥具有重要作用。草鱼 IFN 还具有 10<sup>5</sup>g 离心不沉降、不能通过半透膜等特点,说明其不是一种巨球蛋白,也不是小分子物质,这与 IFN 的分子量测定结果也是相符的。草鱼 IFN 在鱼类细胞中具有抑制不同病毒的能力,但在人和其它动物细胞中无抗病毒活性,表明其抗病毒作用具有相对的种属特异性。草鱼干扰素的以上性质与人类和高等脊椎动物中报道的 α/β 干扰素相一致。研究结果为进一步开展鱼类 IFN 的分子生物学和基因工程等研究打下了基础。

杨汝春、李亚南同志参加部分工作,毛树坚、钱凯先教授给予大力支持,谨致谢忱!

### 参 考 文 献

- 1 Beasley A R, et al. Latent infection in marine fish cell tissue cultures. Proc Soc Exp Biol Med, 1966, 121: 1169~ 1174
- 2 Bernard J, et al. Viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout: Attempt to relate interferon production, antibody synthesis and structure of the virus with the mechanism of virulence. Ann Virol, 1985, 136(1): 13~ 26
- 3 De Kinkelin P, et al. Interferon production in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. J Gen Viral, 1973, 19: 125~ 127
- 4 Grahm S, Secombes C J. Do fish lymphocytes secrete interferon gamma? J Fish Biol. 1990, 36(4): 563~ 573
- 5 Gravel M, Malsberger R G. A permanent cell line from the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). Ann N Y Acad Sci, 1965, 126: 555~ 565
- 6 Oie H K, et al. Reovirus type 2 Induction of viral resistance and interferon production in Fathead Minnow cells. Proc Soc Exp Biol Med, 1971, 136: 369~ 373
- 7 Roge-Gaillard C, Chilmonezyk S. 1993. In vitro induction of interferon like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egtved virus. Fish Shellfish Immunol. 1993, 3(5): 383~ 394
- 8 Tamai T, Shirahata S, Sato N, et al. Purification and characterization of interferon like antiviral protein derived from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) lymphocytes immortalized by oncogens. Cytotechnology, 1993, 11(2): 121~ 131
- 9 毛树坚等. 草鱼出血病的病原研究. 水产学报, 1989, 13(1): 1~ 6
- 10 邵健忠等. 三角帆蚌瘟病病毒的精细结构与基因组及多肽的研究. 病毒学报, 1993, 9(2): 160~ 168
- 11 侯云德. 病毒基因工程原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 245~ 247
- 12 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970, 227: 680~ 685
- 13 Stewart W E, et al. Elimination and charge heterogeneities of human leukocyte interferons by chemical cleavage. Proc Natl Acad Sci. USA, 1977, 74: 4200~ 4204
- 14 Glossmann H, et al. Glycoprotein of cell surface. J Biol Chem. 1971, 246: 6339~ 6343