

文章编号: 1000-0615(2016)10-1586-09

DOI: 10.11964/jfc.20150810013

重组虹鳟IFN- γ 2的原核表达及抗IHNV活性分析

曹永生^{1,2}, 徐黎明¹, 赵景壮¹, 刘淼¹, 张奇亚², 卢彤岩^{1*}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 为获得虹鳟IFN- γ 2(rtIFN- γ 2)抗传染性造血器官坏死病毒(IHNV)活性的相关数据, 实验根据NCBI已发表序列设计引物, 提取经植物血凝素刺激后的虹鳟头肾细胞总RNA, 采用RT-PCR方法扩增471 bp的该基因完整开放阅读框。将该基因重组至原核表达载体pET32a中, 并转化大肠杆菌Rosetta, 进行诱导表达, SDS-PAGE结果显示, 目的蛋白以包涵体形式表达, 大小约为38.4 ku。重组蛋白经复性、纯化后在CHSE-214细胞上进行抗IHNV活性分析, 结果显示, rtIFN- γ 2在CHSE-214细胞上抗IHNV活性为 6.63×10^6 U/mg。Real-time PCR结果显示, rtIFN- γ 2免疫后, 虹鳟头肾、脾、肝中IRF-1、IRF-2、IFN-I、IFN- γ 和Mx表达水平均显著提高, 总体而言免疫后2天机体抗病毒状态弱于免疫后1天。攻毒保护实验结果显示, 免疫后1天进行IHNV攻击时, 鱼死亡率为40%, 而免疫后2天进行IHNV攻击时, 鱼死亡率达到80%。研究表明, 原核表达系统制备的重组虹鳟IFN- γ 2不仅具有体外抗IHNV活性, 更能激发虹鳟的抗病毒状态, 从而为虹鳟抵抗IHNV感染提供一定的保护力。

关键词: 虹鳟IFN- γ 2; 原核表达; 抗IHNV活性; 抗病毒状态; 保护率

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

II型干扰素即IFN- γ , 在不同物种之间同源性较低, 决定了IFN- γ 生物学作用具有较高的种属特异性, 同时显示出尽早开展鱼类IFN- γ 相关工作的必要性^[1]。IFN- γ 不仅是一种安全、有效的抗病毒制剂, 同时还是一种天然的免疫增强剂^[2]。IFN- γ 1是于2005年率先被发现的首个虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)IFN- γ , PHA或poly (I:C)可诱导IFN- γ 1在头肾和脾淋巴细胞中显著表达, 而制备的重组IFN- γ 1蛋白能够促进呼吸爆发和一氧化碳产生及增强吞噬细胞吞噬细菌, 还可对机体的免疫反应进行有效的调节^[3]。后续研究表明, 虹鳟IFN- γ 1具有抗传染性胰脏坏死病病毒和鲑甲病毒活性^[4]。但研究表明, 虹鳟IFN- γ 有另一个亚型的存在, 即IFN- γ 2, 两者的氨基酸同源性为90.56%, 而在传染性造血器官坏死病毒感染或

核酸疫苗免疫后, IFN- γ 2的上调比IFN- γ 1更为明显^[5]。这意味着虹鳟IFN- γ 的这两个亚型在机体抵抗病毒过程中的反应性和有效性可能存在一定的差异, 然而关于IFN- γ 2的抗病毒活性的相关数据还比较缺乏。

传染性造血器官坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)是由传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)感染的一种鲑鳟鱼类传染病, 常造成鱼苗或幼鱼70%~90%的死亡率, 在某些病例中甚至接近100%, 而康复鱼则可能成为病毒的携带者, 对世界鲑鳟鱼的水产养殖业造成了巨大的经济损失, 也是我国水生动物重大疫病之一^[6]。我国农业部首次发布的《2012年中国水生动物卫生状况报告》中显示在19个省(自治区、直辖市)

收稿日期: 2015-08-03 修回日期: 2016-03-30

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 黑龙江省应用技术研究项目与开发计划(GA13B401); 中央级公益性科研院所基
本科业务费专项(HSY201411)

通信作者: 卢彤岩, E-mail: lutongyan@hotmail.com

传染性造血器官坏死病404个样品中,样品阳性率达到7.43%,该病已成为我国虹鳟健康养殖的威胁因素之一^[7]。

本实验以虹鳟IFN- γ 2为对象,利用原核表达系统制备重组蛋白,首先在CHSE-214细胞上对其抗IHNV的活性进行检测,之后利用Real-time PCR方法测定rtIFN- γ 2免疫虹鳟后1 d和2 d干扰素相关基因的表达情况,以分析机体对rtIFN- γ 2免疫的响应,最后测定免疫后1 d和2 d rtIFN- γ 2对虹鳟抗IHNV感染的保护力。本实验提供了较为全面的虹鳟IFN- γ 2抗IHNV活性相关数据,为其将来发展成为抗病毒制剂或佐剂提供了必要的理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验鱼 健康虹鳟鱼由黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类试验站提供,体质量约5 g。

毒株、菌株和细胞系 IHNV、大麻哈鱼胚胎细胞CHSE-214、大肠杆菌DH5 α 、Rosetta均为本实验室保存。

主要试剂 RNA提取试剂盒为Promega公司产品;DNA琼脂糖凝胶回收和质粒小量提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;DNA Marker、M-MLV反转录酶、rTag DNA聚合酶、pMD18T simple载体、限制性内切酶、PrimeScriptTM RT Master Mix、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 目的基因的克隆及表达质粒的构建

处死虹鳟,迅速于冰上无菌剥取头肾,加入适量的含10%FBS的MEM培养基,注射器内柱碾压后经70 μ m的尼龙网(Fisher Scientific公司产品)过滤,经5 μ g/mL的植物血凝素刺激4 h后提取总RNA,以引物Oligo (dT)18进行反转录,获得cDNA第一条链。参考已发表的虹鳟IFN- γ 2序列(Genbank: FM864345.1),设计用于扩增rtIFN- γ 2的上下游引物,上游引物:5'-ATCGGATCCGCTCAGTACACATCAATTAAC-3'(下划线所示为BamH I酶切位点),下游引物:5'-GACAAGCTTTTACATGATGTGTGATTTGAG-3'(下划线所示为Hind III酶切位点),PCR反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性7 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸

30 s,共25个循环后,再进行72 $^{\circ}$ C终延伸10 min。琼脂糖凝胶回收目的基因片段,与pMD18T simple载体,转化大肠杆菌DH5 α ,将鉴定正确的样品送往英俊公司进行测序。利用限制性内切酶BamH I和Hind III切割阳性质粒,胶回收获得目的片段,并与切割好的pET32a载体16 $^{\circ}$ C连接过夜,转化大肠杆菌DH5 α ,利用PCR、限制性内切酶切割对重组质粒进行鉴定。

1.3 融合蛋白的表达及表达形式分析

自转化有重组质粒pET32a-rtIFN- γ 2的大肠杆菌Rosetta平板上挑取单菌落于含100 μ g/mL AMP的5 mL LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min震荡培养过夜。次日将过夜培养物以1:100比例接种于100 mL LB培养基中,220 r/min震荡培养至OD值达到0.6~0.8,加入1 mmol IPTG诱导表达,4 h后4000 r/min,4 $^{\circ}$ C下离心收集菌体。以1/10初始培养基体积的PBS重悬菌体,超声裂解破碎后分为上清和沉淀,SDS-PAGE分析目的蛋白存在形式。

1.4 目的蛋白的纯化及复性

纯化 以适当体积的复性液(2 mol/L尿素、0.4 mol/L Tris Base、1 mmol 2-巯基乙醇、0.5 mmol 氧化型谷胱甘肽、0.5 mmol 还原型谷胱甘肽、10%甘油、10%丙酮,pH 8.0)充分洗涤包涵体两次。加入3 mL变性液(8 mol/L尿素、0.1 mmol NaH₂PO₄、0.01 mmol Tris-Cl,pH 8.0),于4 $^{\circ}$ C下溶解过夜。

复性 将溶解物逐滴加入到27 mL冰浴的复性液中,边加边搅拌,4 $^{\circ}$ C下静置过夜。次日5000 r/min 4 $^{\circ}$ C下离心30 min,将上清转至透析袋中,在含3 mol/L尿素的PBS溶液中,于4 $^{\circ}$ C下静置12 h,而后更换两次PBS溶液(含1 mol/L和0 mol/L尿素),同样于4 $^{\circ}$ C下静置12 h,离心取上清保存于-80 $^{\circ}$ C备用。

1.5 rtIFN- γ 2体外抗IHNV活性的测定

于96孔细胞培养板中培养CHSE-214细胞至单层,将4倍倍比稀释度的rtIFN- γ 2以100 μ L的量加入96孔板中,每个稀释度设8个复孔,置CO₂培养箱中,15 $^{\circ}$ C处理24 h,弃培养液,加入100 TCID₅₀的IHNV(病毒滴度TCID₅₀为4.3 \times 10⁶/0.1 mL),同时设立不加病毒的阴性对照组和只加病毒的阳性对照组,继续培养并逐日在显微镜下观察和记录细胞病变情况,待阳性对照组细胞出现明显的细胞病变后用PBS洗涤细胞,每孔加

入0.1%结晶紫染色10 min, 统计出现细胞病变的孔数。以抑制50%细胞病变(CPE₅₀)的最高干扰素稀释度为1个活性单位(U)。

1.6 Real-time PCR检测重组IFN- γ 2诱导基因表达情况

将复性后的rtIFN- γ 2的以5 μ g/尾的剂量, 通过腹腔注射免疫虹鳟, 同时设立PBS对照组, 分别在免疫后1 d和2 d无菌采集头肾、脾、肝组织, 利用RNA提取试剂盒提取组织总RNA, 立即保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。

取出保存的RNA, 进行定量, 以1 μ g总RNA为模板, 利用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒进行反转录反应, 获得cDNA。参照SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书, 利用Applied Biosystems 7500, 以 β -actin基因作为内参, 采用2^{- Δ ACT}法测定与PBS对照组相比, 实验组目标基因的相对变化, 以分析目的基因表达水平差异。引物设计见表1。20 μ L反应体系为10 μ L SYBR® Premix Ex Taq™ II, 0.8 μ L上游引物(10 μ mol/L), 0.8 μ L下游引物(10 μ mol/L), 0.4 μ L ROX Reference Dye II (50 \times), 2 μ L cDNA模板和6 μ L灭菌去离子水。反应条件为95 $^{\circ}$ C 30 s, 而后95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共进行40个循环, 最终绘制熔解曲线。通过熔解曲线中峰的特异性和溶解温度、PCR产物条带的单一性的判别保证反应的有效性。

表1 Real-time PCR所用引物

Tab. 1 Primers used for real-time PCR		
引物名称 primers	扩增基因 gene	引物序列 sequence (5'-3')
IRF-1-F	IRF-1	ACACCGACTACTGGTCACTGACAAC
IRF-1-R		CAAGAAGTGGGCATGTGATCTGT
IRF-2-F	IRF-2	CTGGGCCATTATACAGGAAAAT
IRF-2-R		GCGGAAATTGGCCTTCCA
IFN-1-F	IFN-1	AGAATGCCCCAGTCCTTTTCC
IFN-1-R		GACTTTGTCTCAAACCTCAGCATCA
IFN- γ -F	IFN- γ	GTTGAGGGCCATGGATGTG
IFN- γ -R		TCCAGCCCATCAAGCAGAA
Mx-F	Mx	AGCGTCTGGCTGATCAGATT
Mx-R		AGCTGCTCGATGTTGTCCTT
β -actin-F	β -actin	GCCGCGCCGACCTCACAGACTAC
β -actin-R		CGGCCGTGGTGGTGAAGCTGTAAC

1.7 rtIFN- γ 2对虹鳟抗IHNV感染保护力的测定

采用1.6中同样的方法对虹鳟进行免疫, 同样设立PBS对照组, 分别在免疫后的1 d和2 d以50 μ L (300 pfu)剂量, 通过腹腔注射对虹鳟进行IHNV攻击。逐日观察并记录各组鱼的死亡情况至攻毒后14 d, 最终结果以累计死亡率(累计死亡鱼数/总鱼数)展现。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

以经PHA刺激后的头肾淋巴细胞cDNA为模板能够成功扩增出目的基因片段, 大小约为489 bp, 测序结果表明, 克隆所得序列编码氨基酸序列与参考序列相一致, 证实已成功获得目的基因。PCR结果显示, 利用特异性引物, 以所构建的重组质粒为模板能够扩增出目的基因片段, 而以限制性内切酶BamH I和Hind III同时切割重组质粒, 能够得到大小约为5900 bp的载体片段和489 bp的目的基因片段, 证实重组表达质粒已成功构建。

2.2 重组蛋白表达与纯化

SDS-PAGE结果显示, 诱导后的含有阳性重组质粒的Rosetta在预期位置38.4 ku处有明显的表达条带出现, 而诱导前无此条带出现, 表明目的蛋白能够在原核表达系统中正确表达(图1, 泳

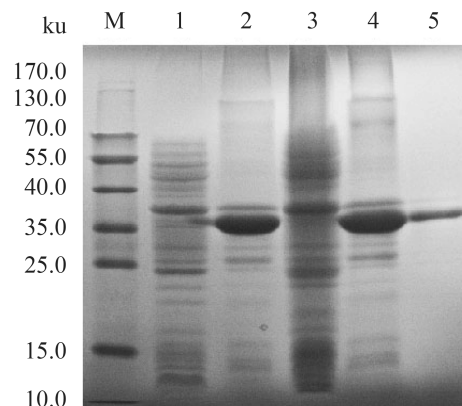


图1 重组蛋白表达与纯化

M. 蛋白质分子质量标准; 1. 表达菌株诱导前; 2. 表达菌株诱导后; 3. 表达菌株诱导后超声上清; 4. 表达菌株诱导后超声沉淀; 5. 重组蛋白的纯化

Fig. 1 Expression and purification

M. Protein Marker; 1. total protein before induction; 2. total protein after induction; 3. the soluble fraction of the transformed E. coli with IPTG induction; 4. the insoluble fraction of the transformed E. coli with IPTG induction; 5. the purified recombinant protein

道2)。菌体经超声裂解后取上清和沉淀进行SDS-PAGE分析, 显示重组蛋白主要以包涵体形式表达(图1, 泳道4)。所得的包涵体经洗涤、溶解后, 获得了纯度较高的重组蛋白, 故未进行额外的Ni柱纯化(图1, 泳道5)。重组蛋白采用稀释复性法进行复性, 过程中仅产生少量沉淀, 最终利用紫外分光光度计法测得复性后重组蛋白浓度约为0.207 mg/mL。

2.3 rtIFN- γ 2抗IHNV活性的检测

抗病毒实验结果显示, 正常细胞对照组细胞生长良好, 病毒阳性对照组细胞完全病变, 而rtIFN- γ 2处理的CHSE-214细胞无病变发生(图2)。采用梯度稀释的rtIFN- γ 2进行上述抗病毒实验(图3), 0.013 μ g/mL复性后的rtIFN- γ 2对IHNV的抑制率为53.57%, 经计算其在CHSE-214细胞上抑制IHNV活性约为 6.63×10^6 U/mg。

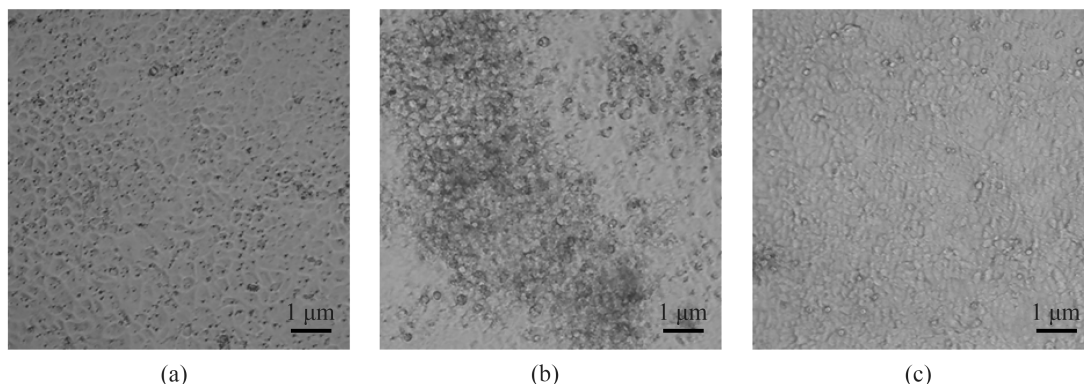


图2 重组蛋白rtIFN- γ 2体外抑制IHNV作用

(a) 正常细胞对照组; (b) 病毒对照组; (c) 干扰素处理组($\times 100$)

Fig. 2 Inhibition of rtIFN- γ 2 on IHNV in CHSE-214 cells

(a) CHSE-214 cells control; (b) IHNV control; (c) IFN treatment group ($\times 100$)

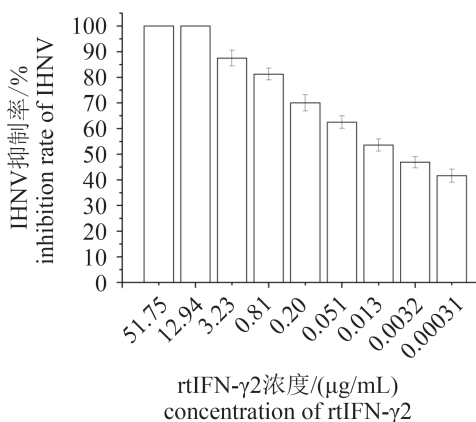


图3 在CHSE-214细胞上不同浓度的rtIFN- γ 2对IHNV的抑制情况

Fig. 3 Cytopathic inhibition rate in CHSE-214 pretreated with 4-fold serial dilutions of rtIFN- γ 2

2.4 rtIFN- γ 2体内诱导基因表达分析

在明确rtIFN- γ 2具备抗IHNV活性的基础上, 我们采用real-time PCR方法测定rtIFN- γ 2免疫后1 d和2 d, 虹鳟头肾、脾、肝中IRF-1、IRF-2、IFN-I、IFN- γ 和Mx转录水平的变化情况。

与PBS对照组相比, 在免疫后1 d, rtIFN- γ 2均能诱导各个器官中IRF-1表达水平显著上调, 其中以肝中最为明显(4.16倍); 头肾中IRF-1免疫后2 d表达水平显著高于免疫后1 d($P < 0.05$), 而脾和肝中的IRF-1在免疫后2 d表达水平显著低于免疫后1天(肝, $P < 0.01$)(图4-a)。

与PBS对照组相比, 在免疫后1 d, 肝中IRF-2显著表达(2.57倍); 同样头肾中IRF-2免疫后2 d表达水平显著高于免疫后1 d($P < 0.01$), 而脾和肝中的IRF-2在免疫后2 d表达水平显著低于免疫后1 d(肝, $P < 0.01$)(图4-b)。

与PBS对照组相比, 在免疫后1 d, 头肾、脾、肝中IFN-I表达显著增加(109.52、277.71、33.72倍), 与IRF-1、IRF-2变化情况一致, 仅头肾中IFN-I在免疫后2 d显著高于免疫后1 d($P < 0.01$)(图4-c)。

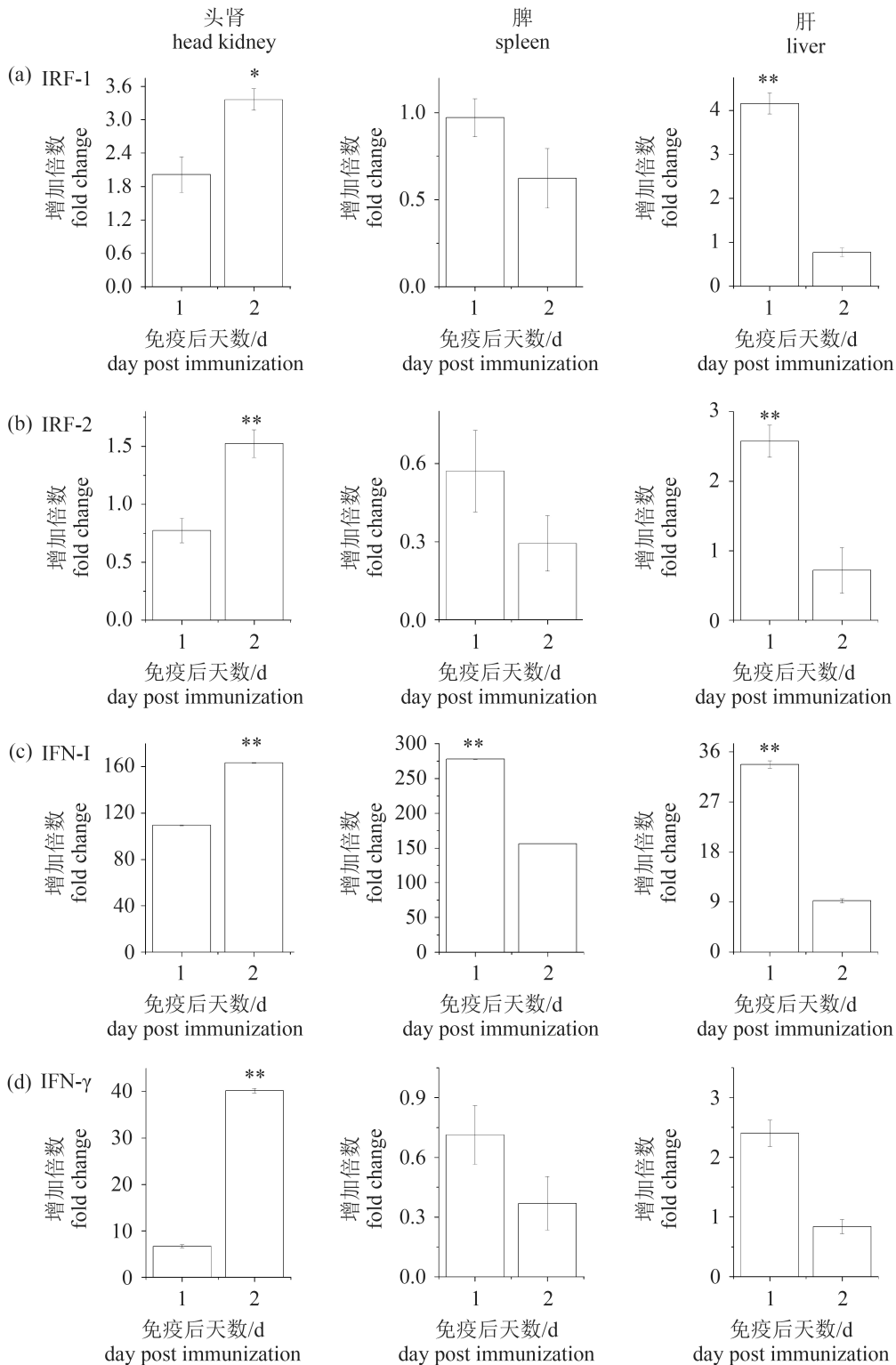
与PBS对照组相比, 在免疫后1 d, 头肾、肝中IFN- γ 表达显著增加(6.69、2.40倍), 而脾中IFN- γ 仅上升0.71倍, 与IRF-1、IRF-2、IFN-I变化情况一致, 仅头肾中IFN- γ 在免疫后2 d显著高于免疫后1天($P < 0.01$), 而脾、肝中IFN- γ 在免疫后2 d表

达水平低于免疫后1 d, 但不显著($P>0.05$) (图4-d)。

与PBS对照组相比, 在免疫后1 d, Mx在头肾、脾、肝中显著表达(197.80、35.02、52.61倍), 而在免疫后1 d和2 d, 头肾和脾中Mx表达水平无显著差异, 但肝中Mx表达水平在免疫后1 d显著

高于免疫后2 d($P<0.01$)(图4-e)。

综上, 重组rtIFN- γ 2能够有效地激发机体抗病毒状态, 但不同器官的响应不同, 头肾对rtIFN- γ 2免疫反应最为强烈, 而总体来看, 免疫后2 d机体的抗病毒状态要弱于免疫后1 d。



(图4 Fig.4)

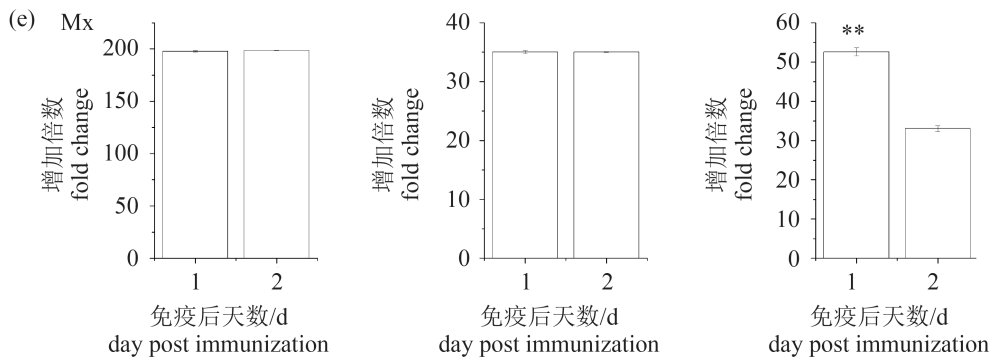


图4 免疫后1 d和2 d头肾、脾、肝中干扰素相关基因表达水平变化

(a)、(b)、(c)、(d)和(e). IRF-1、IRF-2、IFN-I、IFN- γ 和Mx在头肾、脾、肝中的表达水平变化, * P <0.05, ** P <0.01

Fig. 4 The kinetic expressions of the IFN related genes in the head kidney, spleen and liver of rainbow trout after immunization

(a), (b), (c), (d) and (e). Expression change of IRF-1, IRF-2, IFN-I, IFN- γ and Mx in head kidney, spleen and liver, * P <0.05, ** P <0.01

2.5 rtIFN- γ 2抗IHNV的保护力分析

免疫后1 d进行IHNV攻击时, 鱼死亡开始于攻击后2 d, 结束于攻击后4 d, 起始累计死亡率为20%, 最终的累计死亡率为40%; 免疫后2 d进行IHNV攻击时, 鱼死亡开始于攻击后3天, 持续到攻击后14 d, 起始累计死亡率16.67%, 攻击后7 d累计死亡率为60%, 最终的累计死亡率为80%。PBS对照组鱼死亡开始于攻击后2 d, 结束于攻击后14 d, 起始累计死亡率为20%, 攻击后1周累计死亡率为66.67%, 最终的累计死亡率为83.33%(图5)。免疫后1 d进行病毒攻击时rtIFN- γ 2的保护力明显好于免疫后2 d进行病毒攻击的保护力, 这一点与上述的机体抗病毒状态的衰减情况相一致。

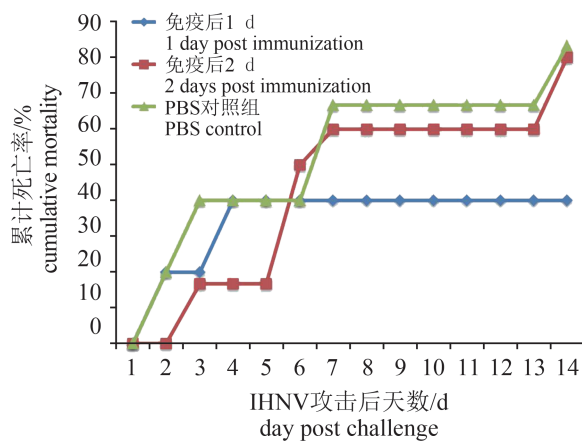


图5 rtIFN- γ 2体内抗IHNV感染保护力的测定

Fig. 5 Protection of the recombinant rtIFN- γ 2 against IHNV *in vivo*

3 讨论

随着水产养殖行业的迅猛发展, 病毒病对水产养殖业的影响已逐渐显现。掌握宿主的免疫机理, 认识病毒和宿主之间如何相互作用对鱼病毒病防控是必要的^[8]。干扰素是机体抗病毒先天性免疫应答的重要组成部分, 夏春等^[9]和张琳等^[10]分别建立了虹鳟 α 干扰素和rtIFN3的制备及纯化方法, 为其大批量生产提供了依据。IHNV常引起鱼苗或幼鱼高死亡率, 并能隐性感染, 是目前我国虹鳟养殖业的威胁因素之一, 虹鳟干扰素抗IHNV研究工作的及时补充对我国IHN的防控具有积极的意义。

rtIFN- γ 1与rtIFN- γ 2的5'端和3'端序列完全一致, 实验设计之初也预计到克隆rtIFN- γ 2基因存在一定的难度, 但我们发现所获得的多个阳性克隆中基因片段基本上都为rtIFN- γ 2(结果未显示), 一定程度上印证了rtIFN- γ 2在接受外源抗原刺激的免疫初期可能发挥显著作用。本实验在原核表达系统中成功制备了重组rtIFN- γ 2, 令人遗憾的是虽经过多次表达条件的优化, 目的蛋白仍未形成可溶形式的表达, 这可能与大肠杆菌表达系统缺少糖基化修饰, 而该重组蛋白又高水平表达有关^[11]。但所获得的包涵体经过简单的洗涤、溶解后就可获得理想纯度的重组蛋白, 省去了后续的Ni-NTA纯化步骤。更为重要的是, 复性后的rtIFN- γ 2在CHSE-214上抗IHNV活性可达 6.63×10^6 U/mg, 这为以低成本的原核表达系统制备具有活性的rtIFN- γ 2提供了有力的证据。

抗病毒状态的有效建立是机体形成抵抗病

毒感染首要防线的必要条件^[12]。rtIFN- γ 2免疫虹鳟后,能够全面地在头肾、脾、肝中显著诱导干扰素相关基因的表达,激活机体的抗病毒状态。在rtIFN- γ 2刺激后,IRF-1诱导后的表达水平要显著高于IRF-2,且IRF-2与IRF-1的表达水平及变化具有正相关性,印证了这对正负干扰素调节因子积极参与了干扰素信号通路这一个精细化调控的过程^[13],从而保证机体能够保持有效而又不过激的抗病毒状态。免疫后不同器官的响应状态存在差异,最佳抗病毒状态在头肾中的出现迟于脾和肝,脾中除IFN-1基因的诱导水平显著高于头肾和肝之外,其他基因的表达水平均明显低于头肾和肝。IFN- γ 能够激活I型干扰素信号分子ISGF3,从而诱导I型干扰素的表达^[14]。本实验发现,rtIFN- γ 2主要诱导了IFN-I的有力表达,而IFN- γ 的表达水平则要低很多,这进一步说明rtIFN- γ 2所发挥的抗病毒效应主要是依靠IFN-I来进行,与虹鳟IFN- γ 1依赖I型干扰素发挥抗传染性胰脏坏死病病毒和鲑鱼甲病毒活性相一致^[4]。Mx蛋白是干扰素诱导的主要抗病毒效应蛋白,而鱼类Mx基因的过表达,也能够为细胞提供不同水平的抗病毒能力^[15-17]。值得注意的是,免疫后2 d头肾中除Mx基因,其他基因的表达要显著高于免疫后1 d,但这并未导致其Mx表达水平的进一步提高,而免疫后1 d和2 d脾中Mx基因的表达也无显著差异,但肝中Mx的表达却显著下降。半衰期短、体内不稳定是目前IFN- γ 在临床应用过程中发现的主要缺陷^[18],虽然我们所构建的重组rtIFN- γ 2是包含6个组氨酸标签的融合蛋白,但其仍属小分子蛋白,与体外持续刺激不同的是,rtIFN- γ 2注入鱼体后,作为异源、小分子蛋白,其同样会面临着机体蛋白酶的降解或排出,导致能够对机体形成有效刺激的rtIFN- γ 2随着免疫后时间的延后而逐步减少,这也导致了如上所分析的多数关键干扰素诱导基因在免疫后2 d表达水平低于免疫后1 d的情况。因此,我们初步推测免疫后2 d机体的抗病毒状态要弱于免疫后1 d。

为验证上述推测,我们选择在rtIFN- γ 2免疫虹鳟后的1 d和2 d分别进行IHN V攻击,对其保护率进行了比较。有研究表明IFN- γ 激活细胞的抗病毒状态缓慢,而在作用后的24 h之前不能为细胞提供完全保护^[19]。而在CPE减少实验中,抑制细胞50%病变的大西洋鲑IFN- γ 的有效浓度是

IFN α 1的50倍^[4]。与预期相符,重组rtIFN- γ 2能够为机体提供有效的保护力,但其保护率不高,特别是免疫后2 d进行IHN V攻击时,鱼死亡率与PBS对照组几乎无异,这说明rtIFN- γ 2体内抗IHN V感染的能力与其所激发的抗病毒状态变化相关。

综上所述,本研究克隆了虹鳟IFN- γ 2基因,并在原核表达系统中成功制备了重组蛋白,目的蛋白经纯化和复性后,在CHSE-214细胞上具有很好的抵抗IHN V复制的能力,明确了其在体外和体内抗IHN V作用,证明rtIFN- γ 2能够显著诱导机体干扰素相关基因的表达,并在免疫后1 d为机体提供有效的保护力,为虹鳟IFN- γ 2作为广谱的抗病毒制剂和免疫增强剂的后续研究提供了有力支持。

参考文献:

- [1] Digby M R, Lowenthal J W. Cloning and expression of the chicken interferon- γ gene[J]. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1995, 15(11): 939-945.
- [2] 夏伦斌,王新华,连宏军,等. γ 干扰素及其在动物疾病防控中的应用[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(5): 74-78.
Xia L B, Wang X H, Lian H J, *et al.* Progress on IFN- γ and its application in the prevention and control of animal diseases[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(5): 74-78 (in Chinese).
- [3] Zou J, Carrington A, Collet B, *et al.* Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: The first Th1-type cytokine characterized functionally in fish[J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(4): 2484-2494.
- [4] Sun B J, Skjæveland I, Svingerud T, *et al.* 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*, 2011, 85(17): 9188-9198.
- [5] Purcell M K, Laing K J, Woodson J C, *et al.* Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 293-304.
- [6] St-Hilaire S, Ribble C S, Stephen C, *et al.* Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in

- British Columbia, Canada[J]. *Aquaculture*, 2002, 212(1-4): 49-67.
- [7] 农业部渔业局. 2012年中国水生动物卫生状况报告 [M]. 北京: 中国农业出版社. 2013, 24.
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture. 2012 Aquatic Animal Health in China [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2013, 24 (in Chinese).
- [8] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(12): 1236-1252.
Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Science China: Life Sciences*, 2015, 58(2): 156-169.
- [9] 夏春, 李奇润, 张琳. 鱼干扰素的制备及纯化方法: 中国, 201210029686[P]. 2012-07-04.
Xia C, Li Q R, Zhang L. Preparation and purification method of salmo interferon: China, 201210029686[P]. 2012-07-04 (in Chinese).
- [10] 张琳, 丁雅苓, 逯茂洋, 等. 虹鳟 I 型干扰素基因的表达与纯化[J]. *动物医学进展*, 2013, 34(4): 78-81.
Zhang L, Ding Y L, Lu M Y, *et al.* Expression and purification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type I interferon[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013, 34(4): 78-81 (in Chinese).
- [11] Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7(2): 190-197.
- [12] Levy D E, Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2001, 12(2-3): 143-156.
- [13] Harada H, Willison K, Sakakibara J, *et al.* Absence of the type I IFN system in EC cells: Transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated[J]. *Cell*, 1990, 63 (2): 303-312.
- [14] Matsumoto M, Tanaka N, Harada H, *et al.* Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma[J]. *Biological Chemistry*, 1999, 380(6): 699-703.
- [15] Larsen R, Rokenes T P, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(15): 7938-7944.
- [16] Kibenge M J T, Munir K, Kibenge F S B. Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus[J]. *Virology Journal*, 2005, 2(1): 75.
- [17] Caipang C M A, Hirano I, Aoki T. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx[J]. *Virology*, 2003, 317(2): 373-382.
- [18] Foon K A, Sherwin S A, Abrams P G, *et al.* A phase I trial of recombinant gamma interferon in patients with cancer[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1985, 20(3): 193-197.
- [19] Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, *et al.* Interferon-gamma: Biologic functions and HCV therapy (type I / II) (1 of 2 parts)[J]. *Clinical Therapeutics*, 2006, 157(4): 377-386.

Prokaryotic expression and antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) of the recombinant IFN- γ 2 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

CAO Yongsheng^{1,2}, XU Liming¹, ZHAO Jingzhuang¹, LIU Miao¹, ZHANG Qiya², LU Tongyan^{1*}

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: In order to evaluate the antiviral activity against IHNV of rainbow trout IFN- γ 2, the target gene (471 bp) was successfully amplified from the cultured primary head kidney leucocyte cultures which had been stimulated by PHA using the primers which were designed based on the NCBI reference sequence. Then, the gene was inserted into the pET32a vector and was expressed in *E. coli* Rosetta. The result of SDS-PAGE showed that the recombinant protein was successfully expressed in the inclusion bodies, which was about 38.4 ku. The recombinant protein could be simply purified by just washing two times. The antiviral ability of the refolding protein was evaluated in CHSE-214 cells. The activity of rtIFN- γ 2 against IHNV was 6.63×10^6 U/mg. Based on this, the rainbow trout were injected with rtIFN- γ 2. The results of real-time PCR indicated that rtIFN- γ 2 was potent to induce the comparable levels of IRF-1, IRF-2, IFN-I, IFN- γ and Mx transcription in head kidney, spleen and liver. Generally, the antiviral state on day 1 post immunization was stronger than that on day 2 post immunization. In addition, its protection against IHNV was 40% and 80% when the challenge was on day 1 and day 2 post immunization, which was closely correlated with the kinetic profile of the antiviral state. In conclusion, our study here showed that the rtIFN- γ 2 of rainbow trout with the activity was successfully produced in the prokaryotic expression system. Furthermore, the rtIFN- γ 2 could elicit the ideal antiviral state and provide the subsequent protection against IHNV.

Key words: IFN- γ 2 of *Oncorhynchus mykiss*; prokaryotic expression; antiviral activity against IHNV; antiviral state; protection

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com

Funding projects: National 12th 5-year Support Key Projects (2012BAD25B02); Applied technology research and development program of Heilongjiang (GA13B401); Central-Level Non-profit Scientific Research Institutes Special Funds (HSY201411)