

PolyI C 不同途径诱导大菱鲂 Mx 蛋白基因的转录

王印庚¹ 毛明光^{1,2} 刘宗柱³ 张家松¹ 陈贵平¹ 廖梅杰¹ 曲江波⁴

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071)

(²厦门大学海洋与环境学院,361005)

(³青岛农业大学生命科学院,266109)

(⁴烟台开发区天源水产有限公司,264000)

摘 要 以 PolyI C(又称聚肌胞)为诱导剂,分别通过腹腔注射、浸泡和投喂 3 种途径诱导大菱鲂 *Scophthalmus maximus* 体内抗病毒蛋白 Mx 基因的转录,利用半定量 RT-PCR 方法检测干扰素下游基因-Mx 基因的转录水平来确定该诱导剂的诱导效果。结果显示,以上 3 种途径都能高效诱导 Mx 蛋白 mRNA 的转录,均在 48h 之后达到高峰,其中以浸泡的方式更容易诱导 Mx 基因转录,且在 120h 时仍保持较高水平。Mx 基因转录的时相变化证明了国产 PolyI C 可以通过多种途径诱导抗病毒蛋白 Mx 的表达,为实际应用中确定用药途径提供了理论依据。另外,实验初步建立了半定量 RT-PCR 方法,为检测鱼体内干扰素的表达提供了技术方法。

关键词 PolyI C 大菱鲂 Mx 蛋白 干扰素诱导剂 基因转录

中图分类号 S942.5 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0001-05

Transcription of turbot *Scophthalmus maximus* Mx gene induced by polyinosinic-polycytidylic acid given in different ways

WANG Yin-geng¹ MAO Ming-guang^{1,2} LIU Zong-zhu³ ZHANG Jia-song¹
CHEN Gui-ping¹ LIAO Mei-jie¹ QU Jiang-bo⁴

(¹ Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, 361005)

(³ College of Life Science, Qingdao Agriculture University, 266109)

(⁴ Tianyuan Aquaculture Limited Company of Yantai Development Area, 264000)

ABSTRACT Transcription of turbot Mx protein confirmed to be an antiviral factor was induced by PolyI C with intraperitoneal injection, immersion and oral administration. Mx mRNA was tested by semi-quantitative RT-PCR to validate the effect of PolyI C's induction. The results illustrated that all the three induction ways could effectively induce the transcription of Mx gene and the peak of Mx mRNA quantity appeared at 48h after PolyI C application. The immersion method seemed to be the most effective way to induce Mx mRNA, as Mx mRNA could last more than 120h at a high level. This experiment proved that the homemade PolyI C

国家 863 计划(2003AA622070)、国家十一五科技支撑计划(2006BAD09A11)和行业专项(nyhyzx07-046)共同资助

收稿日期:2009-03-06;接受日期:2009-05-14

作者简介:王印庚(1963-),男,博士,研究员,主要从事水产疾病研究。E-mail:wangyg@ysfri.ac.cn,Tel:(0532)85841732

could effectively induce Mx mRNA transcription in different applications, which provided a reference to use PolyI C in aquaculture practice.

KEY WORDS Polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI C) *Scophthalmus maximus*
Mx protein Interferon inducer Gene transcription

先天性免疫系统是动物在抵抗病原过程中的第一道防御屏障,这套系统能够在数分钟内启动不同的抗病机制(Magnadottir 2006)。干扰素(Interferons, IFNs)系统是先天性免疫系统抵抗病毒感染的主要构成者。干扰素分子主要存在两种类型,即 I 型和 II 型。I 型干扰素通过诱导几种抗病毒蛋白的表达使相邻细胞处于一种抗病毒状态,这些抗病毒蛋白主要包括蛋白激酶、2'-5'寡聚腺苷合成酶、核糖核酸酶 L、RNA 特异腺苷脱氨酶和 Mx 蛋白(Samuel 2001)。由于鱼类干扰素同源性比较低,以及干扰素蛋白在体内表达停留时间短等原因,给鱼类干扰素基因的克隆和表达检测带来了一定的困难,而干扰素下游的 Mx 蛋白基因表达可以弥补这一缺陷(毛明光等 2008)。因此,目前人们普遍将 Mx 蛋白基因作为干扰素存在的标志性蛋白基因。

Mx 基因首次发现在 A2G 小鼠体内,因为它能有效抑制黏病毒,而被命名为 Mx (Myxovirus) 基因(Horrisberger *et al.* 1983)。在干扰素的刺激下,Mx 基因转录并表达 Mx 蛋白,构成机体细胞抗病毒状态的重要组分。在鱼类中,Mx 基因已在斑点绿河豚 *Tetraodon nigroviridis*,斑马鱼 *Danio rerio* (Lutfalla *et al.* 2003),河鲈 *Perca fluviatilis* (Staeheli *et al.* 1989),金头鲷 *Sparus aurata* (Tafalla *et al.* 2004),牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (Lee *et al.* 2000),大西洋庸鲽 *Hippoglossus hippoglossus* (Jensen *et al.* 2000),塞内加尔鲷 *Solea senegalensis* (Fernandez *et al.* 2006),虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* (Trobridge *et al.* 1997),大西洋鲑 *Salmo salar* L. (Robertson *et al.* 1997),大菱鲆 *Scophthalmus maximus* (Abollo *et al.* 2004) 和草鱼 *Carassius auratus* (Zhang *et al.* 2004) 等鱼体中被报道,且认为在鱼的前肾、脾脏和肝脏中表达明显。目前国内外广泛利用干扰素诱导剂 PolyI C 诱导细胞的抗病毒作用,对细胞抗病毒分子机理进行了深入的实验研究,但对用药途径的研究非常少。本研究利用 PolyI C,分别通过注射、浸泡和投喂 3 种途径诱导大菱鲆 Mx 基因的转录,并考察给药后 5 d 内 Mx 转录的时相变化,以期为 PolyI C 作为抗病毒药物的临床使用提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在烟台开发区天源水产有限公司国家级大菱鲆水产良种场进行,圆柱形鱼池高 67 cm,底面半径 54 cm,养殖用深海井水,循环供水,水流速度为 200 L/h,水温 16~18℃,大菱鲆体重 50 ± 3 g,目测健康,游动活泼;每日投喂配合饲料早晚各 1 次,实验前暂养 10 d。

人工合成的 PolyI C 注射液由青岛汉柯动物药业有限公司 GMP 药厂提供,为 1 mg/ml 无色溶剂。

1.2 实验设计

实验分为 4 个组,每组 40 尾大菱鲆。空白组不使用 PolyI C;注射组对大菱鲆腹腔注射 PolyI C,注射剂量按照每克鱼体重 $2 \mu\text{g}$;浸泡组是将大菱鲆浸泡在含 40 mg/L PolyI C 的海水中,浸泡时间为 1 h;投喂组首先将饲料喷洒 PolyI C,剂量与注射组相当,室温凉干后即可投喂,连续投喂 2 d。用药之后起第 24、48、72、96

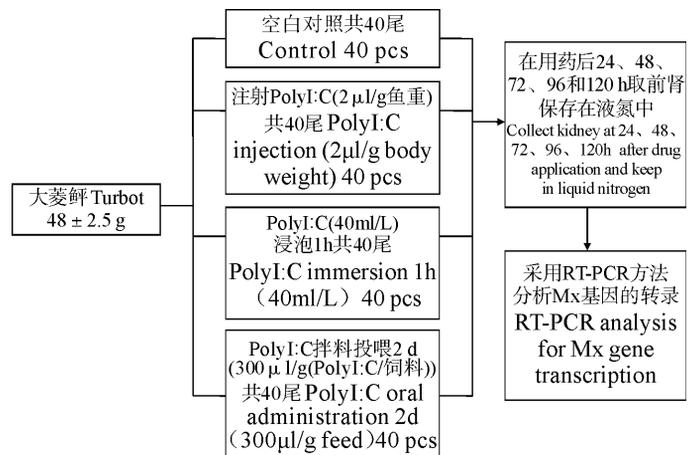


图1 实验设计

Fig. 1 Test design

和 120h 随机取样检测。

预实验中,根据实时半定量的要求,选择扩增特异性和扩增效率较高的引物来对样品进行检测,根据退火温度梯度 PCR 结果,选择最佳退火温度,并对 PCR 循环次数进行优化选择。

1.3 组织总 RNA 的提取及反转录

各处理组的样品经液氮冻存研磨,取 80 ~ 100mg, TRIZOL 提取总 RNA,最后溶解在焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的灭菌纯水 (50 μ l) 中,并加入 RNase 抑制剂及无 RNase 的 DNAase 处理。分装成 4 管,分别用于浓度测定、RNA 完整性电泳检测、RT-PCR 和 -70 $^{\circ}$ C 保存。

反转录参照 Fermentas 公司生产的 RevertAidTM 第一链 cDNA 合成试剂盒步骤合成 cDNA, cDNA 作为模板供下一步实验用。

1.4 引物的设计

从 NCBI 网站检索并下载大菱鲆 Mx 基因 (A Y635932) 和 β -actin 基因 (A Y008305),利用软件 Primer Premier 5.0 在保守区设计引物 (表 1),然后由上海生物工程有限公司合成。

1.5 PCR 扩增目的片段及半定量

参照刘青等 (2006) 的半定量 PCR 方法,建立 PCR 反应体系。PCR 反应在 BIO-RAD 型 PCR 仪上进行,退火温度在 55 ~ 60 $^{\circ}$ C 区间自动生成梯度。根据结果,选择 59.6 $^{\circ}$ C 作为反应的退火温度。反应总体积是 25 μ l,反应体系为:10 \times buffer 2.5 μ l, MgCl₂ (25mmol/L) 1.5 μ l, 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l,

dNTP mix (各 10mmol/L) 0.5 μ l, Taq 酶 (5U/ μ l) 0.2 μ l, cDNA 模板 1.5 μ l, 用 ddH₂O 补足体积。目的基因和内参基因在相同的条件下扩增,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59.6 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 33 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物用 1% 含 Gene Finder 的琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像分析系统 Gene Genius 成像,利用软件 Gene Tools 对目的条带进行分析定量,并对定量值分析作图。

2 结果与分析

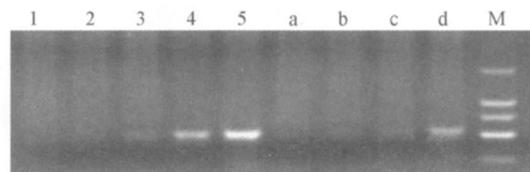
2.1 Mx 蛋白半定量 PCR 方法的建立

以引物 Mx207 优化 RT-PCR 扩增反应条件,图 2 为退火温度梯度 PCR 结果,1、2、3、4 和 5 分别是 54.2、55.0、56.6、58.5 和 59.6 $^{\circ}$ C 退火温度下的 PolyI C 注射组扩增组效果,可见 59.6 $^{\circ}$ C 退火时扩增效率较高。a、b、c 和 d 分别是 54.2、55.0、56.6 和 58.5 $^{\circ}$ C 下扩增浸泡组的效果,可见 58.5 $^{\circ}$ C 退火是扩增效率较高。根据以上结果,在 59.6 和 58.5 $^{\circ}$ C 附近选择 59 $^{\circ}$ C 作为实验 PCR 退火温度,扩增效率如图 3 所示。

表 1 实验中的相关引物

Table 1 Primers used in this experiment

引物名称 Name of primer	位置 Location	引物序列 5' 端到 3' 端 Sequence 5' to 3'	扩增长度 Amplification size (bp)
Mx219F	219 ~ 410	TCGCCGTGATTGGAG	202
Mx219R		TCCACATCTGAAGGGTT	
Mx207F	207 ~ 765	CTGTTCTGTGCCTTTGTC	557
Mx207R		CATCGCCGTGATTGGAG	
β -actin-F	65 ~ 341	GTGATGAA GCCCA GA GCA	277
β -actin-R		CGACCA GA GGCA TACA GG	



1、2、3、4 和 5 分别在 54.2、55.0、56.6、58.5 和 59.6 $^{\circ}$ C 退火温度下扩增注射组样品的结果;a、b、c、d 分别为在 54.2、55.0、56.6 和 58.5 $^{\circ}$ C 退火温度下扩增浸泡组的结果;M: 分子量标准。

Lane 1、2、3、4、5, for injection samples, PCR results of annealing at 54.2、55.0、56.6、58.5、59.6 $^{\circ}$ C, respectively; Lane a、b、c、d, for immersion samples, PCR results by annealing at 54.2、55.0、56.6、58.5 $^{\circ}$ C, respectively; M, DNA marker

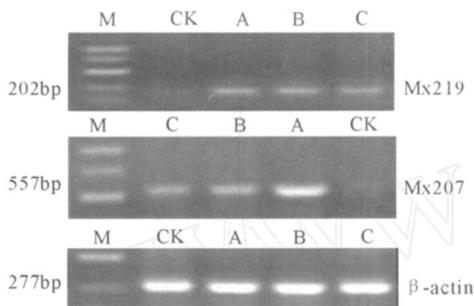
图 2 退火温度梯度 PCR

Fig. 2 PCR results of annealing at different temperatures

用3对引物分别对注射组大菱鲂前肾做RT-PCR 33个循环(30个循环扩增尚未达到指数期,35个循环扩增达到平台期),扩增结果如图3所示。可见,在202bp和559bp处各出现单一条带,且处于扩增指数期,符合半定量的要求。根据已报道的大菱鲂 β -actin 基因设计引物,RT-PCR 结果如图3,可见在227bp处有1条带,PCR 扩增效率较高,满足作为RNA内部参照物的条件。

2.2 注射 PolyI C 后大菱鲂 Mx 蛋白转录水平的时相变化

腹腔注射 PolyI C 后,大菱鲂前肾中 Mx 基因转录的时相变化如图4所示。空白对照组(CK)相对定量值在0.30~0.40之间,即大菱鲂 Mx 蛋白在没有 PolyI C 刺激时也会有一定的表达,腹腔注射 PolyI C 后48h Mx 基因表达量明显增高,并一直持续到第96h,至第120h Mx 基因转录水平又和对照组相当。



M: DNA marker; CK: 对照; A: 浸泡处理; B: 注射处理; C: 投喂处理
M: DNA marker; CK: Control; A: Immersion; B: Injection; C: Oral administration

图3 3对引物的PCR效率

Fig. 3 Efficiency of PCR with the three pairs of primers

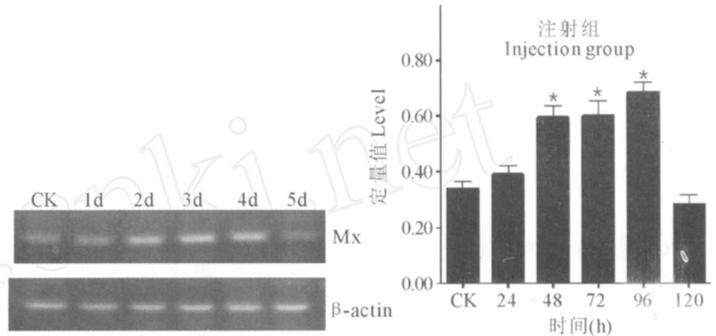


图4 腹腔注射 PolyI C 后大菱鲂 Mx 基因的转录水平

Fig. 4 Transcription level of turbot Mx gene induced by PolyI C injection

2.3 PolyI C 浸泡后大菱鲂 Mx 蛋白转录水平的时相变化

大菱鲂在稀释的 PolyI C 溶液(40 mg/L)中浸泡1h后,其前肾中 Mx 基因转录水平的时相变化如图5所示,CK为空白对照。与注射组类似,浸泡处理之后24h时大菱鲂 Mx 蛋白转录水平与对照没有明显差异;但在48h之后其转录水平一直较高,持续到120h未表现出降低。

2.4 投喂 PolyI C 后大菱鲂 Mx 蛋白转录水平的时相变化

投喂组大菱鲂前肾中 Mx 基因转录水平时相变化如图6所示,CK为空白对照。大菱鲂口服 PolyI C 喷洒饲料后,与空白对照组相比,24h时大菱鲂 Mx 基因的转录亦没有明显影响;但饲喂后48h时,转录水平达

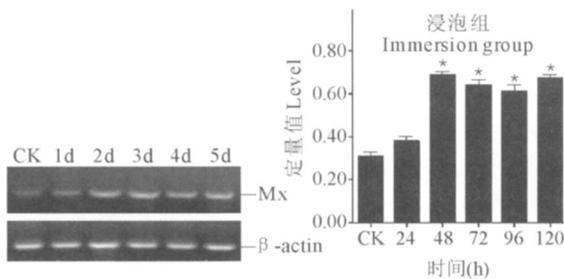


图5 PolyI C 对大菱鲂浸泡处理后诱导 Mx 基因的转录水平

Fig. 5 Transcription level of turbot Mx gene induced by PolyI C immersion

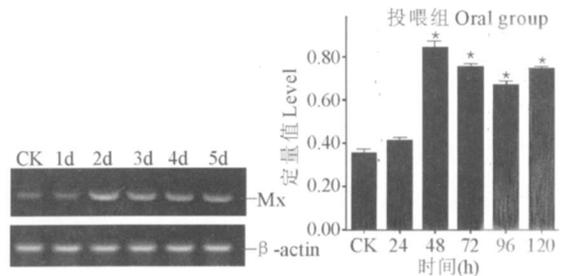


图6 PolyI C 拌料后投喂诱导 Mx 基因转录水平

Fig. 6 Transcription level of turbot Mx gene induced by PolyI C with oral administration

到 0.84 相对定量值,超过注射和浸泡处理的影响,72 h 后转录水平稍降低,但与前两种处理方式相当,且口服后 120 h Mx 基因转录水平仍处于较高水平。

3 讨论

Mx 蛋白作为干扰素诱导下的一个标志性蛋白,通过检测 Mx 基因的表达间接反应干扰素的表达情况具有一定的学术意义和应用价值。由于不同鱼种的干扰素基因同源性非常低,增加了对不同种鱼干扰素基因克隆的难度,另外干扰素在体内表达量较少,发挥作用后会被迅速降解,也给干扰素表达水平检测带来了一定困难。而 Mx 基因作为干扰素诱导的下游基因,在干扰素表达的情况下,Mx 基因随即转录表达,在胞质中能够稳定存在。本实验根据已报道的大菱鲆 Mx 基因保守区(三联体 ATP/ GTP 结合区、发动蛋白家族结构的特征序列以及亮氨酸拉链结构和定位信号)(Lina *et al.* 2005),在其三联体 ATP/ GTP 结合区设计了两对引物 Mx 219 和 Mx 207。PCR 扩增结果显示,该两对引物扩增效率较高,本文以引物 Mx 207 初步建立了相对半定量法,可以迅速检测 Mx 基因的表达。

选择合适的用药途径,对干扰素的实际应用具有重要指导作用。早在 1990 年 Eaton 就对 4 种虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, *O. nerka*, *O. gorbuscha* 和 *O. keta*)进行了用 PolyI C 后的抗病毒实验,实验通过腹腔注射和浸泡方式,保护率可以达到了 45% 以上,但未进行 PolyI C 处理后抗病毒效应时相变化的研究。本试验通过 Mx 蛋白转录水平的时相变化,首次研究了 PolyI C 不同给药途径后 120 h 内实验鱼体内抗病毒蛋白基因转录水平的时相变化。结果显示,腹腔注射、浸泡和投喂 3 种不同给药方式均能够高效诱导 Mx 基因的转录。PolyI C 结构类似病毒在复制过程中出现的双链核酸结构,因此可以作为一种类病毒药物诱导干扰素的高效表达,继而进一步诱导多种抗病毒蛋白的转录表达,使相邻细胞处于抗病毒状态。

本实验结果表明,注射、投喂和浸泡 3 种给药途径均能诱导 Mx 基因的表达。目前,对 PolyI C 诱导干扰素系统的抗病毒分子机理已基本阐明,这与细胞膜表面上的 TLR (Toll-like receptor) 受体密切相关(Rodriguez *et al.* 2005)。3 种给药途径在 24 h 内诱导 Mx 基因转录均不明显,原因可能在于细胞表面的 TLR3 受体 dsRNA 的识别有一定的过程,并且诱导干扰素的转录翻译及其超表达也需要一个过程,Mx 基因的转录需要在满足了以上两个条件的基础上才能大量表达。腹腔注射 PolyI C 后 120h 转录水平下降,这可能与体内高活性的 RNA 酶降解有关。相比而言,浸泡处理组的转录表达效果较好。巩华等(2006)认为,药物被巨大表面积鳃和皮肤吸收,而皮肤、鳃等黏膜又含有丰富、与免疫相关的细胞,细胞表面被抗原递呈细胞和 MHC 分子摄取,递呈给效应位点淋巴细胞引起免疫应答。PolyI C 拌料饲喂后,反应迅速,48 h 蛋白转录急剧升高。有关专家认为:PolyI C 直接作用于肠道,具有丰富免疫细胞的肠道黏膜表面积大,吸收功能强,诱导作用较快(苏友禄等 2008)。综合起来说,利用浸泡和伴饲投喂两种方法可以更好的诱导并维持鱼体内 Mx 蛋白的表达。

相比较而言,在应用上以浸泡方式更利于苗期的处理,以弥补苗期鱼的特异性免疫系统尚未健全的缺陷,使机体提前进入抗病状态,对于提高苗期的成活率具有重要的实际意义;而口服途径更适于用提高成鱼抗病能力,可起到类似疫苗的作用。今后,在用药剂量,尚需确定最适使用浓度;并对使用 PolyI C 浸泡 120 h 之后 Mx 基因表达水平的变化需要更深入的研究,以观察最长的药效时间。另外,针对不同疾病的保护率进行检测,为抗病毒的应用和干扰素的开发提供依据和参考。养殖鲆鲽类主要以细菌病为主(王印庚等 2004),而大菱鲆病毒性红体病和淋巴囊肿是鲆鲽类的主要病毒性疾病(史成银等 2005)。针对上述疾病,目前尚无较有效的药物和治疗方法。PolyI C 高效诱导大菱鲆 Mx 蛋白表达将有助于开创治疗鲆鲽类病毒病的一种新思路。

参 考 文 献

- 毛明光,刘宗柱,张培军. 2008. 鱼类干扰素功能及信号转导研究. 海洋科学, 2: 85 ~ 90
王印庚,张正,秦蕾,史成银,陈浩君,杨少丽,马爱军. 2004. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术. 海洋水产研究, 25(6): 61 ~ 68

- 史成银,王印庚,黄健,王清印.2005.大菱鲆红体病虹彩病毒 ATPase 基因的克隆与序列分析.高技术通讯,15(5):91~95
- 刘青,魏华.2006.两种半定量 PCR 方法在鲫雌激素样效应研究中的应用.水产学报,30(3):416~420
- 巩华,吴淑勤,潘厚军.2006.硬骨鱼类黏膜免疫机理研究概况.动物医学进展,27(6):24~28
- 苏友禄,郭志勋,徐力文.2008.军曹鱼黏膜免疫组织发育的形态学研究.中国水产科学,15(4):644~649
- Abollo, E., Ordas, C., Dios, S. *et al.* 2005. Molecular characterization of a turbot Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* 19:185~190
- Eaton, W. D. 1990. Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic: Cytidylic acid. *Disease of Aquatic Organisms*, 9 (12):193~198
- Fernandez-Trujillo, M. A., Porta, J., Borrego, J. J. *et al.* 2006. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 21:577~582
- Horisberger, M. A., Staeheli, P., and Haller, O. 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1910~1914
- Jensen, V., and Robertsen, B. 2000. Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 20:701~710
- Lee, J. Y., Hirono, I., and Aoki, T. 2000. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev. Comp. Immunol.* 24:407~415
- Lina, O. E., Ohiraa, T., Hirono, I. *et al.* 2005. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 29:443~455
- Lutfalla, G., Roest, Crollius, H., Stange-Thomann, N. *et al.* 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: The class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics*, 4:29
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (Overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20:137~151
- Staeheli, P., Yu, Y. X., Grob, R. *et al.* 1989. A double-stranded RNA inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx. *Mol. Cell. Biol.* 9:3117~3121
- Rodriguez, M. F., Wiens, G. D., Purcell, M. K. *et al.* 2005. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*, 57:510~519
- Robertsen, B., Trobridge, G., and Leong, J. A. 1997. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 21:397~412
- Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:778~809
- Trobridge, G. D., Chiou, P. P., and Leong, J. A. 1997. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J. Virol.* 71:5304~5311
- Tafalla, C., Aranguren, R., Secombes, C. J. *et al.* 2004. Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* 16:11~24
- Zhang, Y. B., Li, Q., and Gui, J. F. 2004. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon. *Immunol. Genetics*, 56:68~75