

# 温度和金属离子对干扰素诱导剂-聚肌胞配对的影响

毛明光<sup>1,2</sup> 王印庚<sup>2</sup> 尹立杰<sup>3</sup> 张家松<sup>2</sup> 刘宗柱<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学 生命科学学院, 266109)

(<sup>2</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>3</sup>青岛汉河动植物药业有限公司, 266103)

**摘要** 为提高聚肌胞(Polyinosinic-polycytidylic acid, polyI:C)的配对效果,本文研究了温度和金属离子对聚肌胞配对的影响。实验结果显示,在45℃条件下合成的聚肌胞减色效应最强,说明在该温度下聚肌苷酸(Polyinosinic acid, PI)和聚胞苷酸(Polycytidylic acid, PC)配对最紧密;Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>能够增强聚肌胞双链结构的紧密性,当Na<sup>+</sup>浓度增加到0.085mol/L后,聚肌胞的配对接近饱和;Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>对聚肌胞结构的保护效果基本一致,而Cu<sup>2+</sup>对聚肌胞结构具有明显破坏作用。建议采用45℃合成聚肌胞并添加适当浓度的Na<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>等增强其结构的紧密性,以避免机体内高活性RNA酶的降解而失去药效。

**关键词** 干扰素诱导剂 聚肌胞 配对 温度 金属离子

**中图分类号** R914.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0074-05

## Effects of temperature and metallic cations on the combination of interferon inducer polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C)

MAO Ming-guang<sup>1,2</sup> WANG Yin-geng<sup>2</sup> YIN Li-jie<sup>3</sup>

ZHANG Jia-song<sup>2</sup> LIU Zong-zhu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Qingdao Agricultural University, 266109)

(<sup>2</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>3</sup> Qingdao Hanhe Animal & Plant Pharmaceutical Co., LTD, 266102)

**ABSTRACT** Effects of temperature and metallic cations on the synthesis of polyinosinic-polycytidylic acid were tested to improve its structure. The results showed significant hypochromic effects of polyI:C formed at 45℃, which indicated that the best combination of polyI:C were achieved at this temperature, while the metallic cations including Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> could enhance the polyI:C combination. 0.085mol/L PolyI:C combination achieved saturation when Na<sup>+</sup> concentration was, and the divalent cations including Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> played positive effect on the combination. However, Cu<sup>2+</sup> tend to destroy the double-stranded structure. It is suggested that polyI:C should be made at 45℃ and suitable concentra-

国家863计划项目(2003AA622070)和国家科技部十一五科技支撑计划项目与养殖技术示范(2006BAD09A11)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuzongzhu@126.com, Tel: (0532)86080640

收稿日期: 2008-03-15; 接受日期: 2008-05-16

作者简介: 毛明光(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事动物免疫生理研究。E-mail: mmg988@yahoo.com.cn

tion of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  should be added to make its structure more tight in order to avoid RNase's digesting. This result is useful for synthesizing polyI:C at a high quality.

**KEY WORDS** Interferon inducer Polyinosinic-polycytidylic acid Synthesis  
Temperature Metallic cations

随着水产养殖业的迅速发展,病毒性疾病日趋成为养殖动物健康生长的重大威胁。由于水产养殖动物,特别是无脊椎动物的免疫体系较为低等,以及水产动物特异性免疫相关技术研究尚不充分,以干扰素为核心的非特异性免疫技术日益受到研究者的关注(邵建忠等 1999;张义兵等 2000;Jensen *et al.* 2002;周进等 2003;高淳仁等 2008;毛明光等 2008)。Eaton(1990)研究了干扰素诱导剂聚肌胞在 4 种虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*、*O. nerka*、*O. gorbusha* 和 *O. keta*) 感染的保护作用,证实是一种有效的抗病毒药物,之后一些研究者对 polyI:C 诱导鱼类干扰素及抗病毒蛋白进行了报道(Ichinohe *et al.* 2005; Fernandez-Trujillo *et al.* 2008; Lin *et al.* 2005)。研究中所应用的 polyI:C 多来源于 Sigma 公司,价格昂贵,仅限于免疫分子机理的研究,而在水产疾病防治中应用却不现实。本试验利用国产原料聚肌苷酸和聚胞苷酸通过碱基配对形成聚肌胞,并对其合成的影响因素进行了初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

聚肌苷酸(PI)和聚胞苷酸(PC)购于江门市群科药业有限公司,其余均为分析纯试剂。

UV-2401PC 型紫外分光光度计(日本岛津)、BP211D 型电子天平(德国赛多利斯)和 PHS-3C 型酸度计(上海伟业仪器厂制造)。

### 1.2 温度对聚肌胞配对的影响

准确称取 PI 0.576g 和 PC 0.566g,分别用无菌生理盐水溶解并定容至 500ml。精确量取 20ml 聚肌苷酸液和 20ml 聚胞苷酸液分别在 30℃ 下预热,并在该温度下将二者混合摇匀,静置 30min,0.45 $\mu\text{m}$  孔径的纤维素酯滤膜过滤后制得该温度下的聚肌胞,同法在 35、40、45、50、55、60 和 65℃ 下合成相应条件下的聚肌胞,各取 10ml 于安瓿瓶中封口,100℃ 煮沸灭菌 30min,然后通过空气中缓慢降至室温和在水流中迅速降至室温两种途径完成,溶液终浓度均为 1.142mg/ml。

### 1.3 金属离子对聚肌胞配对的影响

根据动物注射生理盐水所需浓度附近设计 NaCl 溶液浓度梯度:0.000、0.017、0.034、0.051、0.068、0.085、0.102、0.119、0.144 和 0.153 mol/L。用以上不同浓度的 NaCl 溶液作为溶剂配制聚肌胞,其终浓度均为 1.142mg/ml。

根据所配制的 1.142mg/ml 聚肌胞溶液中核苷酸的磷酸根浓度  $4.976 \times 10^{-2}$  mol/L,分别配制  $4.976 \times 10^{-2}$  mol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$  和  $\text{CuSO}_4$  溶液各 100ml。向 1ml 的聚肌胞中加入等体积的上述盐溶液,并用蒸馏水稀释至 25ml 得到金属离子与聚肌胞中磷酸根摩尔比分别为 1:1 的溶液,同样,加入两倍体积的盐溶液得到 2:1 的聚肌胞溶液。

### 1.4 RNA 酶对聚肌胞的降解

向上述已配制(1:1)好的含有钙离子的聚肌胞溶液加入 20 $\mu\text{l}$  10mg/ml RNA 酶,于 37℃ 水浴锅中反应,每隔 5min 在 248nm 处测量光吸收值,聚肌胞的水溶液作为空白对照。

## 1.5 聚肌胞配对的测定

聚肌胞的配对效果检测参照化药地标升国标(化药地标升国标 WS1-XG-050-2000),将已配制好的聚肌胞 25 倍稀释后在  $248 \pm 2\text{nm}$  波长处测其吸光率,并计算减色效应(Hypochromic effect):

$$\text{减色效应} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

式中,  $A_1$  为理想状态下聚肌胞的双链完全不配对时的紫外吸收值,  $A_2$  为实际合成的聚肌胞在  $248 \pm 2\text{nm}$  紫外吸收值。

减色效应越显著,说明核酸双链之间的碱基堆积程度越高,双链结合越紧密,反之,说明核酸双链结合松弛或分开。

## 2 结果

### 2.1 温度对聚肌胞配对的影响

在  $30 \sim 70^\circ\text{C}$  之间预合成聚肌胞,  $100^\circ\text{C}$  灭菌 30min 后,分别在室温( $25^\circ\text{C}$ 左右)下复性和在水流( $12^\circ\text{C}$ 左右)中复性两种途径合成聚肌胞。结果显示,复性途径对聚肌胞减色效应具有显著影响,  $45^\circ\text{C}$  处预合成并在水流中复性后,  $248 \pm 2\text{nm}$  波长处紫外吸收值明显减小,减色效应显著升高(图 1),说明在迅速退火过程中聚肌胞双链结合程度更加紧密。故在以下实验中,聚肌胞的合成均采用  $45^\circ\text{C}$  预合成并在灭菌后采用迅速冷却的方式完成。

### 2.2 金属离子对聚肌胞配对影响

#### 2.2.1 $\text{Na}^+$ 对聚肌胞合成的影响

用不同浓度的 NaCl 溶液配制聚肌胞,稀释 25 倍后测其在  $248\text{nm}$  处的紫外吸收值并计算减色效应。如图 2,随着钠离子浓度的升高,聚肌胞在  $248\text{nm}$  处的紫外吸收值不断减小,减色效应越明显,双链结合越紧密,当 NaCl 浓度高于  $0.085\text{mol/L}$  时紫外吸收值基本不变,  $\text{Na}^+$  对聚肌胞的作用达到饱和。

#### 2.2.2 二价阳离子对聚肌胞配对的影响

将已稀释二价阳离子与聚肌胞的混合液在  $200 \sim 350\text{nm}$  区间进行光吸收扫描,如图 3 所示。图 3-A 为各金属离子与聚肌胞中磷酸根摩尔比分别为  $1:1$ ,曲线 A 是聚肌胞的水溶液作为空白对照;虚线 B 是含有  $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Zn}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Ca}^{2+}$  的聚肌胞溶液,它们在  $248\text{nm}$  处的减色效应分别为  $0.217$ 、 $0.233$ 、 $0.236$  和  $0.269$ ,波长扫描基本重合;曲线 C 为  $\text{Cu}^{2+}$  对聚肌胞的作用,表现在紫外吸收值偏高,出现增色效应(图 3-A 中 C);图 3-B 为向聚肌胞中加入两倍浓度的二价阳离子,此时  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的减色效应分别为  $0.295$ 、 $0.272$ 、 $0.303$  和  $0.315$ ,加入该浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  时,溶液出现大量沉淀,核酸发生变性,经过滤后的光吸收扫描曲线如图 3-B 中 C 所示。

#### 2.2.3 $\text{Ca}^{2+}$ 对聚肌胞的保护作用

聚肌胞在 RNA 酶的作用下逐渐水解为单核苷酸,碱基充分暴露而使其紫外吸收值增加。加入  $\text{Ca}^{2+}$  的聚

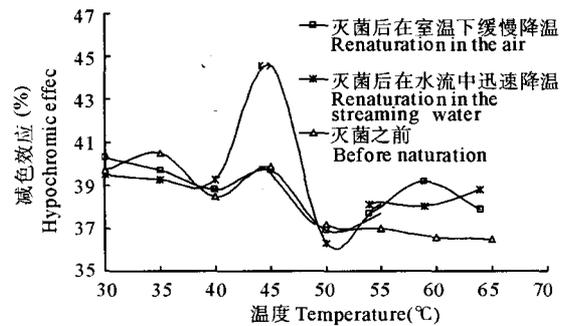


图 1 温度对聚肌胞的影响

Fig. 1 Effect of different temperature on the polyI:C synthesis

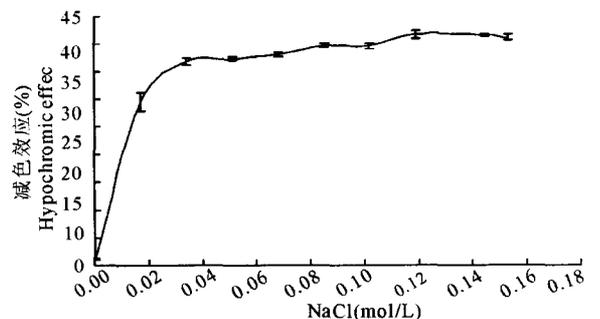


图 2 聚肌胞在不同浓度 NaCl 溶液中的减色效应

Fig. 2 The hypochromic effects of different concentration  $\text{Na}^+$  on polyI:C synthesis

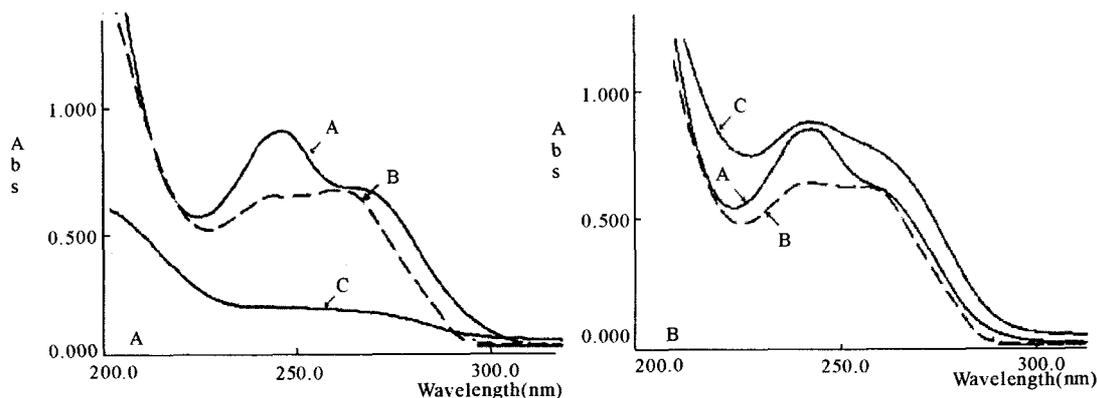


图 3 在二价金属离子的作用下聚肌胞的紫外光吸收率变化

Fig. 3 Ultraviolet analysis of polyI:C with different kind of divalent cations

肌胞溶液紫外吸收值随时间的变化如图 4 所示。

图 4 显示,聚肌胞的水溶液和含有钙离子的聚肌胞溶液在 RNA 酶的作用下,其在 248nm 处的紫外吸收值随时间的变化。对照组在 RNA 酶的作用下仅需 25min 左右紫外吸收值即到 0.8,而含有  $Ca^{2+}$  的聚肌胞在 55min 才达到 0.8,表明含有钙离子可以更好聚肌胞的抵抗 RNA 酶的降解。

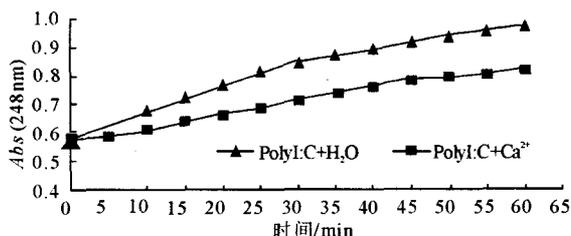


图 4  $Ca^{2+}$  对聚肌胞酶解的保护作用

Fig. 4 Effect of  $Ca^{2+}$  protecting polyI:C against RNase

### 3 讨论

#### 3.1 聚肌胞检测方法评价

检测聚肌胞的方法主要有地衣酚法(聚肌胞注射液暂时质量标准 1985)、荧光法(张培培 1990)、定磷法(张梅村等 2005)和碱解法(化药地标升国标 WS1-XG-050-2000)等,不同的方法各有其优缺点。地衣酚法和定磷法不能区分样品中单链和双链核苷酸,荧光法虽然能特异地检测 dsRNA,但毒性较大,仪器要求较高。本实验在碱解法的基础上进一步加以改进,先单独测得 PI 和 PC 溶液的  $A_{248nm}$ , 两者等浓度下的加和平均值即为聚肌胞在理想状态下完全不配对时的  $A_{248nm}$ , 核酸碱基配对形成双螺旋结构后,碱基平面堆积,减色效应显著,以此来判断聚肌胞双链结合的紧密程度。

#### 3.2 温度和金属离子对聚肌胞作用机理

温度骤降退火会使聚肌胞双链结合更紧密,这可能由于在温和条件下 PI 或 PC 自身也存在微弱的配对作用,致使 PI 和 PC 之间没有充分的配对。在  $100^{\circ}C$  热变性后,PI 和 PC 的支链充分展开,而单链内的共价键并没有破坏;而在骤降过程中,PI 和 PC 间的氢键作用力更强,避免了单链的自身结合。在  $45^{\circ}C$ , 两种合成途径减色效应较明显,原因在于该特殊 dsRNA 只含有两种碱基,其变性与复性类似于均质双链 DNA,双链在一个较小的温度范围内发生变性或复性(王镜岩等 2002)。

金属离子对核酸的性质有很大影响,这些性质包括热稳定性、三级结构、构型以及核酸与蛋白质配体的相互作用。核酸所提供的金属离子的结合部位有磷酸酯基团、核酸上的羟基以及碱基上面的杂氮环。 $Na^{+}$  与磷酸基团相互作用,通过 Debye-Huckel 静电屏蔽作用降低了单链之间的排斥作用,有利于碱基配对结合,而呈现减色效应。 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  通过定位结合作用与核酸上的磷酸基团互作,也会产生减色效应, $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  的空间位阻虽然差别较大,但与 dsRNA 的作用程度仅有细微差别。实验还发现,当金属离子达到一定浓度时,它们与磷酸基团的结合达到饱和,各曲线趋于饱和一致。图 3-A 中该浓度的  $Cu^{2+}$

使 dsRNA 双链打开,呈现出增色效应,当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度较高时就会将整个核酸结构体系破坏而发生沉淀,经过滤后出现图 3 中的结果。 $\text{Cu}^{2+}$  可能与碱基杂氮环优先结合,而使 PI 和 PC 不能配对形成双链结构。图 4 显示了  $\text{Ca}^{2+}$  能够保护聚肌胞免受 RNA 酶的迅速降解,从而赋予了聚肌胞抵抗体内 RNA 酶降解的作用,在被完全降解之前,可以充分发挥其药效。

聚肌胞作为一种新型的免疫增强剂,虽然已在医学临床上大量应用,但其配对条件的研究资料比较少,该实验结果将为配制高质量的聚肌胞提供理论依据。目前在水产养殖中常见的病毒病,如淋巴囊肿病毒病和对虾白斑病综合症病毒病(WSSV)尚无有效的药物治疗,利用干扰素诱导剂在畜禽治疗已取得了较大进展(Ichinohe *et al.* 2005; 范琳等 1998; 李凤艳等 2007),而在水产养殖中的应用尚属空白。目前,本课题组应用该法配制的聚肌胞对牙鲆淋巴囊肿病毒病有一定的治疗效果,在治疗的 7d 之内,块状囊肿出现明显脱落,而且还能在一定程度上抑制 WSSV 在南美白对虾上的感染(实验数据另行发表)。合成高质量的干扰素诱导剂-聚肌胞在水产疾病防治方面有着较大的应用潜力。

## 参 考 文 献

- 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 2002. 生物化学(第3版). 北京:高等教育出版社, 508~510
- 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, 32(2):85~90
- 化学药品地标升国标. 标准编号, WS1-XG-049-2000, D16:137
- 张义兵,王铁辉. 2000. 鲫鱼囊胚细胞干扰素的诱导及部分特性. 中国病毒学, 15(2):163~169
- 张培培. 1990. 荧光法测定聚肌胞含量的研究. 药物分析杂志, 10(4):199~201
- 张梅村,路宁. 2005. 聚肌胞注射液检验方法的探讨. 食品与药品, 7(6):51~53
- 邵建忠,项黎新,李亚南. 1999. 草鱼干扰素诱生条件的研究. 水产学报, 23(2):122~127
- 周进,黄捷,宋晓玲. 2003. 免疫增强剂在水产养殖中的应用. 海洋水产研究, 24(4):70~79
- 高淳仁,王印庚,杨志,曲江波,梁萌青,常青,朱建新,马爱军. 2008. 饲料中添加不同脂肪源、Vc 和  $\text{V}_E$  对大菱鲆生长和非特异性免疫力的影响. 海洋水产研究, 29(2):65~72
- 聚肌胞注射液暂时质量标准. 浙卫药标(8s)130号
- Jensen, I., Ibañeta, A., Sommer, A. I., and Robertsen, B. 2002. Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol*, 13:311~326
- 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
- Ichinohe, T., Izumi, W., and Ito, S. 2005. Synthetic double-stranded RNA Poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 79(5):2910~2919
- Fernandez-Trujillo, A., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Alonso, M. C., Bejar, J., Borrego, J. J., and Manchado, M. 2008. Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish & Shellfish Immunology*, 24:279~285
- Lin, O. E., Ohira, T., Hirono, I., Saito-Takib, T., and Aokia, T. 2005. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 29:443~455