

鲤 I - IFN - γ 作为锦鲤疱疹病毒核酸疫苗免疫佐剂的效果研究

于 慧¹, 张瑞雪¹, 王 好¹, 周井祥^{1*}, 刘艳辉^{2*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林省水产科学研究院, 长春 130033)

[收稿日期] 2016-07-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 08-0009-07 [中图分类号] S852.6

[摘 要] 为了研究鲤 I - IFN - γ 的免疫效果, 根据鲤 I - IFN - γ 的 mRNA 基因序列 (GenBank), 构建真核表达质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ , 重组表达质粒与不同剂量的转染试剂 EndoFectionTM Max 混合后转染鲤鱼肌肉细胞, 通过荧光倒置显微镜观察, 重组表达质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 在细胞中成功表达。以多种免疫剂量的重组表达质粒与 pIRES - ORF81 混合对鲤鱼进行肌肉注射, 每周免疫一次, 共免疫三次, 免疫前采血, 收集血清, 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测抗体水平。结果表明: 于第三次免疫后两周, 抗体水平达到最高, 联合免疫与单独免疫核酸疫苗 pIRES - ORF81 相比, 抗体水平明显升高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。鲤 I - IFN - γ 作为锦鲤疱疹病毒的免疫佐剂具有一定的免疫效果。

[关键词] 鲤 I 型 γ 干扰素; 锦鲤疱疹病毒; 核酸疫苗 pIRES - ORF81; 免疫效果

Immune Effect of Carp I - IFN - γ as Koi Herpesvirus Nucleic Acid Vaccine Adjuvants

YU Hui¹, ZHANG Rui - xue¹, WANG Hao¹, ZHOU Jing - xiang^{1*}, LIU Yan - hui^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Jilin Province Fishery Science Institute, Changchun 130118, China)

Abstract: Study on the carp I - IFN - γ immune effect, on the basis of I - IFN mRNA gene sequence Genbank login, The eukaryotic recombinant plasmid pEGFP - N1 - I - IFN were constructed. Mixing recombinant expression plasmid and transfection reagents in several immune dose transfected carp muscle cells. The expression of recombinant expression plasmid pEGFP - N1 - I - IFN - γ in carp muscle cells were observed by fluorescent inverted microscope. By using the mixture of recombinant expression plasmidin several immune dose and pIRES - ORF81 injected Carp's intramuscular and immunized once a week, three times in total. Blood was sampling before injection and serum was collected to detect antibody levels by enzyme - linked immunosorbent assay

基金项目: 公益性行业专项 - 锦鲤疱疹病毒核酸疫苗的研制及初步应用 (106037 - 2016 - 2018); 国家现代农业产业体系项目 (CARS - 46 - 29)

作者简介: 于 慧, 硕士研究生, 从事病毒分子学方面研究。

通讯作者: 周井祥, E - mail: zhjxnd@126.com; 刘艳辉, E - mail: liuyanhu9@163.com

(ELISA). Two weeks after the third immunization, experiment result showed that antibody titer reach the highest level. Compared with pIRES - ORF81 alone immune, antibody level of combined immunization increased obviously, but no significant difference was observed between them ($P > 0.05$). Show that carp I - IFN - γ have certain immune effectas koi herpesvirus immune adjuvant.

Key words: I - IFN - γ ; koi herpesvirus; nucleic acid vaccine pIRES - ORF81; immune effect

锦鲤疱疹病毒(Koi Herpesvirus, KHV)能够引发鲤鱼发生高致病性的锦鲤疱疹病毒病(Koi Herpesvirus Disease, KHVD),病毒传播迅速,致死率极高。世界动物卫生组织(OIE)已经将KHVD列为必需报告的疾病^[1]。目前仍然没有治疗该病的特效药物,只能通过相关免疫手段对其进行预防,接种疫苗被认为是水产病毒性疾病预防和治疗的最适当方法,单一疫苗对鱼的免疫效果并不能达到预期目标。因此,利用佐剂或免疫刺激剂来增加疫苗功效是一种新的途径。

干扰素(Interferon, IFN)是一种重要的细胞因子,可作为生化制剂类免疫佐剂,具有抗病毒功效,能在病毒感染后迅速起效^[2]。细胞和机体通常需要病毒、核酸、细菌内毒素等刺激才能产生干扰素。I型干扰素 γ (I - IFN - γ)是发展先天免疫反应的重要组份^[3]。它可激活IFN刺激因子(ISGs)转录,编码不同的抗病毒蛋白,释放抗病毒物质,干扰病毒复制、增殖,调节机体细胞分化^[4]、生长^[5]。

尽管在鱼类的干扰素活性很久以前就被人所知,但直到2003年三种鱼的I - IFN - γ 才被克隆,分别为斑马鱼^[6](*Danio rerio*),大西洋鲑(*Salmo salar*)^[7]和河豚鱼。目前正在部分硬骨鱼中克隆到了I型IFN基因,其中包括,鲶(*Ictalurus punctatus*)^[8],虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)^[9],黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[10],三棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)^[11],牙鲆(*Paralicht solivaceus*)^[12],舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[13],鲤(*Caprius carpio*)^[14],石斑鱼(*Epiuephelus septemfas - ciatus*)^[15],大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[16]等,并发现其中鲤、石斑鱼、舌齿鲈的I型IFN - γ 基因在鱼体抗病毒过程中起到重要作用。鱼的I - IFN - γ 有独特的基因组,5个外显子,4个内含子结构,这点是有别于其它物种的关键^[17]。

在病毒感染鱼的初期,I - IFN - γ 是发展先天免疫反应重要组份^[3]。通过病毒感染细胞产生和释放I - IFN - γ 导致IFN刺激因子的(ISGs)激活和转录,编码不同的抗病毒蛋白,通过抗病毒物质干扰病毒复制,抗增殖和免疫调节活动^[18]。关于I - IFN - γ 反应在鱼类异疱疹病毒科中了解比较少^[19]。在体外研究中,CyHV - 3有能力抑制源于鲤鱼脑细胞(CCB)的成纤维细胞中I - IFN - γ 反应,在头肾白细胞(HKL)中并无此现象。但如果先用多聚肌苷酸胞苷酸(poly I: C)刺激CCB细胞,激活I - IFN - γ 反应,通过细胞单层培养,发现这样能够减缓CyHV - 3传播速度。体外研究发现,CyHV - 3感染时,皮肤和肠中IFN编码的基因表达上调^[20-21]。

本研究选择构建pEGFP - N1 - I - IFN - γ 真核表达质粒,研究pEGFP - N1 - I - IFN - γ 与PIRES - ORF81核酸疫苗组成的联合制剂的免疫原性,为KHVD疫苗的研制提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 150条健康鲤鱼,体重为150~200 g,购自新立湖的渔场,在25℃水族箱饲养2周后再进行试验。

1.2 质粒和病毒 重组质粒PIRES - ORF81由本试验室保存^[22],KHV阳性血清由本试验室保存^[23]。

1.2 主要试剂 焦磷酸二乙酯(DEPC),北京鼎国公司;反转录试剂,TaKaRa;DL5000 Marker,DL2000 Marker,pMD18 - T Vector,限制性内切酶,T4DNA连接酶,TaKaRa公司;DNA凝胶回收试剂盒,Axy-Gen公司;质粒转染试剂EndoFectinTM - Max,长春维尔特科技有限公司;羊抗鼠IgG - HRP,上海信然生物技术有限公司;抗鲤鱼IgM单克隆抗体,A-QUATIC Diagnostic Ltd。

2 方法

2.1 鲤 I - IFN - γ 基因的引物设计与合成 根据 GenBank 上登录的鲤 I - IFN - γ 基因序列,用 Primer Premiers 5.0 软件设计引物,上游引物 P3 序列:5' - GAGCTCAATTTGAGAAAAAATCGTAACAAA - 3' ;下游引物 P4 序列:5' - AAGCTTAATTTGAGAAAAAATCGTAACAAA - 3' ;划线部分依次为限制性酶切位点 *Sac* I 和 *Hind* III,送去生工(上海)公司合成引物。

2.2 I - IFN - γ 基因的扩增 试验所用器材需提前用 DEPC 水处理,取新鲜鲤鱼头肾样品及脾脏样品充研磨成粉末状待用,用 TRIzol 法提取 RNA 并进行反转录。产物用于 PCR 扩增,基因扩增体系为 25 uL,用梯度 PCR 仪摸索最适退火温度,确定 PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,61.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,反应结束 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 I - IFN - γ 基因的克隆及鉴定 将回收的 I - IFN - γ 目的基因连接至 pMD - 18T 克隆载体,将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 菌种,向含 Amp 的固体 LB 平板中涂 100 μ L 上述菌液,恒温(37 $^{\circ}$ C)过夜培养,挑取的白色单个菌落接种于液体培养基中,碱裂解法提取质粒,用 *Sac* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定,阳性质粒送到生工(上海)进行基因测序,命名为 pMD18 - T - I - IFN - γ 。

2.4 构建重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 将目的基因 I - IFN - γ 与 pEGFP - N1 载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。转入 DH5 α 感受态细胞内,向含 Kana 液体 LB 培养基内加入挑取的单菌落,160 r/min 震荡培养(37 $^{\circ}$ C,12~14 h),碱裂解法提取质粒经 PCR 鉴定、双酶切鉴定,选取阳性质粒命名为 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 并送至生工(上海)进行测序。

2.5 重组质粒的体外表达

2.5.1 重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 的大量提取与纯化 将 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 质粒的菌液进行划线培养,挑单一白色菌落至液体培养基中振荡培养至对数生长期,之后进行菌液的扩摇,收集菌体进行质粒大量提取,采用质粒大提试

剂盒,方法参照 AxyGen 质粒大量说明书。使用分光光度计测定重组表达质粒在 260 nm 波长时的吸光值,根据重组表达质粒的浓度计算公式:质粒浓度(μ g/ μ L) = OD260 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 50 μ g/mL。

2.5.2 重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 的转染 将重组表达质粒、EndoFectionTM Max 试剂和 L - 15 培养基静置使之升至室温。用 L - 15 培养基分别稀释重组表达质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 和转染试剂 EndoFectionTM Max,稀释后室温静置 5min。将稀释后的重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 于不同浓度的转染试剂 EndoFectionTM Max 充分混匀,室温静置 5~20 min 形成 DNA - EndoFectionTM 复合物。向每个细胞培养孔中逐滴加入 DNA - EndoFectionTM 复合物,边滴加边轻柔前后晃动培养板。操作时,应避免把转染试剂直接滴在细胞生长的位置。在 26 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育细胞,转染 24 h 后在荧光倒置显微镜下观察转染情况并采集图片。分别提取细胞(转染后)总 RNA,方法与提组织 RNA 相似,再进行 RT - PCR 及 PCR。

2.6 重组质粒与核酸疫苗联合免疫体内试验 免疫试验前,随机挑选 11 尾试验鱼进行 KHVD 的检测,PCR 检测呈阴性后,将鱼分 6 组,每组 10 尾(表 1)。注射剂量均稀释为 200 μ L/尾,三次免疫间隔 14 d。

表 1 鲤鱼免疫分组及免疫剂量

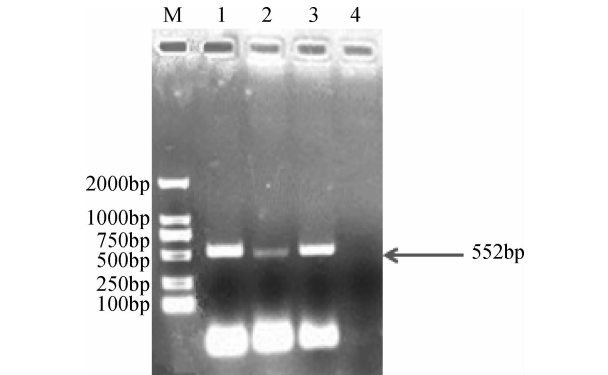
重组质粒组别	pIRES - ORF81	pEGFP - N1 - I - IFN + pIRES - ORF81 (1 μ g)	PBS
1	----	----	----
2	----	---- - 200 μ L	
3	10 μ g	----	----
4	10 μ g	5 μ g	----
5	10 μ g	10 μ g	----
6	10 μ g	20 μ g	----

2.7 重组表达质粒诱导鲤的免疫效果检测 尾静脉采血于免疫前,在一免及二免后第一周,三免后一到三周。标记的灭菌 EP 管中贮存采取的血液,静置(37 $^{\circ}$ C,2 h),4 $^{\circ}$ C 过夜,隔天离心 6000 r/min (4 $^{\circ}$ C,15 min),收集血清后贮存于 - 20 $^{\circ}$ C,用于

ELISA 检测。在 96 孔酶标板中,用包被液将纯化后的病毒液稀释,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 放置一夜洗涤后加入封闭液(新鲜配制的脱脂牛奶),置于 22 $^{\circ}$ C,孵育 2 h 后,再次洗涤,然后加入待测血清 22 $^{\circ}$ C 孵育 3 h;洗涤 5 次后加入单克隆抗体 22 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗涤 5 次后加入酶标二抗 22 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;再次洗涤 5 次,加入 100 μ L 底物溶液,22 $^{\circ}$ C 孵育 10 min;再加入 50 μ L 终止液;最后将酶标板放入酶标仪中,测定在 OD 450 nm 时的 ELISA 数据,记录结果。

3 结果

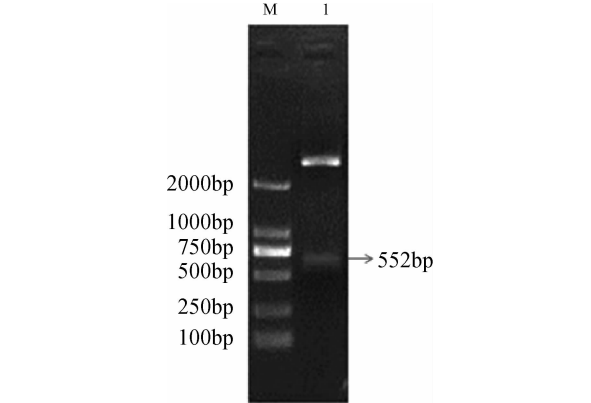
3.1 I - IFN - γ 的 PCR 扩增 分别以提取的鲤鱼头肾 RNA 及脾脏 RNA 为模板,反转录为 cDNA 后,再分别以 I - IFN - γ 的 P1,P2 序列为引物,通过 PCR 扩增得到 552 bp 的预期大小的目的片段,如图 1 所示。



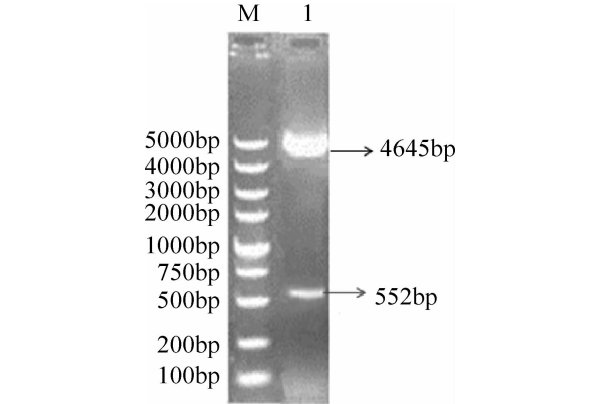
M: DNA 分子量标准;1-3:PCR 产物(I - IFN - γ);4:阴性对照
图 1 I - IFN - γ PCR 扩增产物

3.2 I - IFN - γ 基因克隆质粒的鉴定 用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 对 pMD18 - T - I - IFN - γ 阳性质粒进行双酶切鉴定。结果显示在 552bp 位置有条带,同时有一条 2000bp 以上条带。与预期相符,说明 pMD18 - T - I - IFN - γ 质粒构建成功,如图 2 所示。

3.3 重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 鉴定 分别用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 对阳性重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 进行双酶切鉴定。结果显示的目的片段大小与预期结果相符,在 552 bp 位置有条带,同时各有一条片段大小为 4645 bp 的载体条带。进一步说明已经成功将 I - IFN - γ 基因克隆到 pEGFP - N1 真核表达载体上,如图 3 所示。



M:DNA 分子质量标准;1:双酶切产物(pMD18 - T - I - IFN - γ)
图 2 双酶切鉴定 pMD18 - T - I - IFN - γ

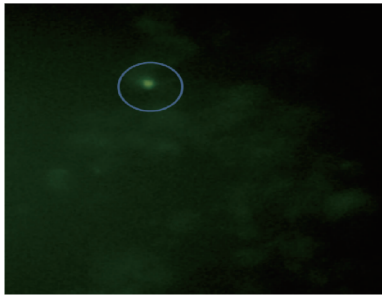


M:DNA 分子质量标准;1: pEGFP - N1 - I - IFN - γ 酶切结果
图 3 酶切鉴定重组质粒 pEGFP - IFN - N1 - I

3.4 重组表达质粒浓度 根据 2.9.2 中的计算方法计算 pEGFP - N1 - IL - 10, pEGFP - N1 - I - IFN - γ 和 PIRES - ORF81 的浓度分别为 0.85、0.9、0.8 μ g/ μ L。

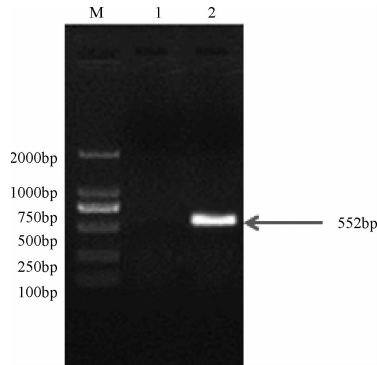
3.5 重组表达质粒的转染 根据 2.1 中所述步骤,将重组质粒 pEGFP - N1 - IL - 10 和 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 转染至锦鲤鳍条细胞中,在倒置荧光显微镜下可观察到有质粒成功转入细胞,如图 4 所示。

3.6 RT - PCR 检测真核表达质粒的转染情况 转染成功后的细胞用 Trizol 裂解,提取细胞总 RNA,RT - PCR,以 cDNA 作为模板,用 P1,P2 作为引物进行 PCR 检测。电泳位置在 552 bp 处观察到目的条带,说明 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 已转染成功,如图 5 所示。



1:重组质粒的 pEGFP - I - IFN - γ 转染结果

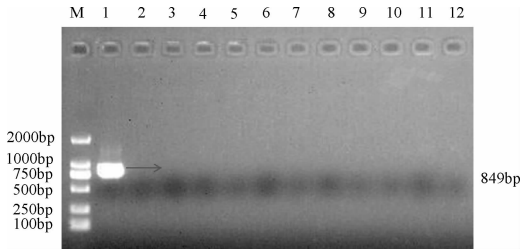
图 4 重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 的转染结果



M:DNA 分子质量标准;1:阴性对照;2: I - IFN - γPCR 产物

图 5 I - IFN - γ 基因的 PCR 扩增结果

3.7 鲤鱼组织的 PCR 检测 在试验鲤鱼中随机挑选任意 11 尾,模板:组织基因组,阳性对照:KHV,图 6 为试验结果,11 尾鱼的检测结果呈阴性,可以进行下一步试验。



1:阳性对照;2-12:鲤鱼组织 DNA 的 PCR 结果;
M:DNA 分子质量标准

图 6 鲤鱼组织 PCR 检测结果

3.8 鲤鱼血清中抗体水平 ELISA 检测结果 注射前要进行一次采血,再向不同试验组鲤鱼注射分别注射对应的免疫剂,一免及二免后一周,三免后第一至三周,尾静脉采血。通过间接 ELISA 法检测注射免疫剂后鲤鱼血清中的抗体水平。通过平均数和标准差的计算,最终得出表中数据。表 2 为结果。

表 2 鲤鱼血清抗体水平检测(OD₄₅₀)

免疫时间 组别	免疫前	一免后一周	二免后一周	三免后一周	三免后两周	三免后三周
1	0.2107 ± 0.011	0.2324 ± 0.016	0.2206 ± 0.013	0.2354 ± 0.016	0.2351 ± 0.013	0.2413 ± 0.018
2	0.2116 ± 0.008	0.2355 ± 0.011	0.2423 ± 0.023	0.2362 ± 0.023	0.2441 ± 0.009	0.2577 ± 0.013
3	0.2173 ± 0.012	0.3572 ± 0.023	0.4916 ± 0.032	0.7124 ± 0.025	0.9839 ± 0.033	0.9048 ± 0.046
4	0.2139 ± 0.027	0.3785 ± 0.028	0.5249 ± 0.038	0.7538 ± 0.036	1.0251 ± 0.022	0.9482 ± 0.012
5	0.2217 ± 0.021	0.3994 ± 0.023	0.5435 ± 0.026	0.7484 ± 0.025	1.1124 ± 0.041	0.9872 ± 0.029
6	0.2182 ± 0.024	0.3836 ± 0.035	0.5729 ± 0.025	0.7213 ± 0.035	1.2487 ± 0.029	1.0358 ± 0.037

依表所见,除了 PBS 组和空白组,其它各组鲤鱼血清中均能检测出 KHV 特异性抗体,免疫次数增多抗体水平随之增加。三免后两周,抗体水平达到峰值,之后趋于下降。增加质粒浓度抗体水平稍有增加,但不明显。PBS 组和空白组这两组与注射重组质粒组的抗体水平差异明显 ($P < 0.05$)。

根据间接 ELISA 检测试验结果绘制折线图(图 7),可知混合制剂 pEGFP - N1 - I - IFN - γ + pIRES - ORF81 相比单一核酸疫苗 pIRES - ORF81 抗体水平有所升高,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

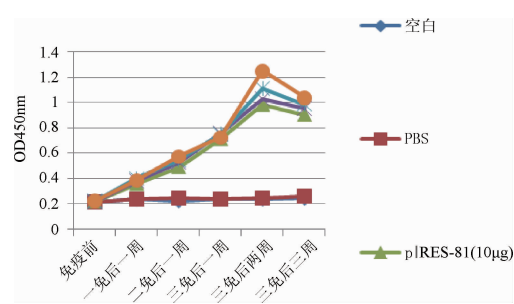


图 7 各组的血清抗体水平折线图

根据间接 ELISA 检测试验结果,绘制各组的抗

体水平的曲线,得出的免疫剂量为 5 μg 时,就可达到较好的抗体水平,随着免疫剂量的增加,抗体水平有所升高。

4 讨论与小结

硬骨鱼的干扰素具种属特异性,某种鱼的干扰素对其它鱼类抗病毒无作用。目前,已经鉴定了干扰素 I 型对许多病毒的反应^[24]。其中重组斑马鱼、鲮鱼^[25]、草鱼、虹鳟^[26]的干扰素都具有抗病毒的活性。在抑制病毒复制方面,干扰素 I 型扮演了重要角色,可诱导蛋白表达,抑制病毒 mRNA 翻译,增加宿主细胞的抵抗力,并能够在感染早期限制病毒传播和扩散。在机体抗病毒的非特异性免疫应答中起重要作用。

以 I - IFN - γ 的上述特性为依据,为了探索其是否适合作为免疫佐剂,与锦鲤疱疹病毒病的疫苗联合使用,我们进行了体外细胞转染实验,以探究目的蛋白是否能在体外锦鲤鳍条细胞中表达,通过倒置显微镜观察和 RT - PCR 检测,重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 成功转入了锦鲤鳍条细胞中,说明重组质粒 pEGFP - N1 - I - IFN - γ 能在细胞中正确表达,为接下来的体内试验提供参考依据。

体内试验选用生长发育较快的幼鱼,意在降低核酸疫苗的剂量,另外希望能让外源基因在宿主体内大量表达。免疫的最佳用量可根据鱼的大小不同进行调整。本试验采取肌肉注射的免疫方法,将联合免疫制剂 pEGFP - N1 - I - IFN - γ + pIRES - ORF81 注射入试验鱼体内,相比单一核酸疫苗 pIRES - ORF81,联合免疫制剂所产生的抗体水平更高,免疫效果更好。

参考文献:

- [1] Eide K E, Miller - Morgan T, Heidel J R, *et al.* Investigation of koi herpesvirus latency in koi[J]. J. Virol. 2011,85:4954 - 4962.
- [2] 王世若,王兴龙,韩文瑜. 现代动物免疫学(第二版)[M]. 吉林:吉林科学技术出版社,2001:430 - 438.
- [3] Zhang Peng, Lu Ling, Yao Qing, *et al.* Molecular, functional, and gene expression analysis of zebrafish hypoxia - inducible factor - 3 α . [J]. AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology (Online), 2012, 303:11.
- [4] Sen G C. Viruses and interferons[J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55: 255 - 281.
- [5] Ying Nie, Yan - Yi Wang. Innate immune responses to DNA viruses[J]. Protein & Cell, 2013, 41.
- [6] Leu J H, Yan S J, Lee T F, *et al.* Complete genomic organization and promoter analysis of the round - spotted pufferfish JAK 1, JAK 2, JAK 3, and TYK 2 genes[J]. DNA and cell biology, 2000, 19(7): 431 - 446.
- [7] McCurley Amy T, Callard Gloria V. Time Course Analysis of Gene Expression Patterns in Zebrafish Eye During Optic Nerve Regeneration. [J]. Journal of Experimental Neuroscience, 2010, 20:104.
- [8] Kumari Jaya, Bgwald Jarl, Dalmo Roy A. Eomesodermin of atlantic salmon: an important regulator of cytolytic gene and interferon gamma expression in spleen lymphocytes. [J]. PLoS One, 2013, 82.
- [9] Expression analysis of cDNAs encoding channel catfish type I interferons[J]. Fish & shellfish immunology, 2006, 21(1): 42 - 59.
- [10] Casani D, Randelli E, Costantini S, *et al.* Molecular characterization and structural analysis of an interferon homologue in sea bass (Dicentrarchus labrax L.) [J]. Molecular immunology, 2009, 46(5): 943 - 952.
- [11] Chang M, Nie P, Collet B, *et al.* Identification of an additional two - cysteine containing type I interferon in rainbow trout Oncorhynchus mykiss provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts [J]. Immunogenetics, 2009, 61(4): 315 - 325.
- [12] Shijuan Shan, Chenchen Qi, Yaoyao Zhu, *et al.* Expression profile of carp IFN correlate with the up - regulation of interferon regulatory factor - 1 (IRF - 1) in vivo and in vitro: the pivotal molecules in antiviral defense[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 03:019.
- [13] Ohtani M, Hikima J, Hwang S D, *et al.* Transcriptional regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor - 3 in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 36: 697 - 706.
- [14] Xu Qiao, Chang Ming, Sun Rong, *et al.* The first non - mammalian CXCR5 in a teleost fish: molecular cloning and expression analysis in grass carp (Ctenopharyngodon idella) [J]. BMC Immunology, 2010, 11(1).
- [15] Wei Xinxian, Li Xiao - zheng, Xiacong Zheng, *et al.* Toll - like receptors and interferon associated immune factors responses to spring viraemia of carp virus infections in common carp (Cyprinus carpio) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 05:043.
- [16] Ohta T, Ueda Y, Ito K, *et al.* Anti - viral effects of interferon administration on sevenband grouper, Epinephelus septemfasciatus [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30: 1064 - 1071.
- [17] Sun B, Robertsen B, Wang Z, *et al.* Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(4): 547 - 558.

HPLC – PDA 联合 UPLC – Q/TOF 法确证 硫酸卡那霉素注射液中的非法添加物

董玲玲¹, 曹莹², 于晓辉¹, 王静文¹, 万仁玲¹, 顾进华^{1*}

(1 中国兽医药品监察所 北京 100081; 2 上海市兽药饲料检测所 上海 201103)

[收稿日期] 2016-06-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 08-0015-05 [中图分类号] S859.83

[摘要] 确证 1 批硫酸卡那霉素注射液中的非法添加物。在对该批样品进行非法添加物常规筛查时发现其含有未知色谱峰, 且紫外光谱具有特征性, 但与现有的紫外光谱库进行比对, 无法确定该未知物的结构。结合 UPLC – Q – TOF 法给出的未知物的分子量信息推导出疑似添加物, 再用 HPLC – PDA 和 UPLC – Q/TOF 两种方法进行验证, 最终确证非法添加物。结果显示该批样品中的非法添加物为尼可刹米。通过检查该批样品中的非法添加物, 总结出确证非法添加物的一般模式, 从而为兽药处方外非法添加物的筛查与确证提供思路。

[关键词] 尼可刹米; 非法添加

基金项目: “十二五”科技支撑计划(2015BAD11B03-4)

作者简介: 董玲玲, 硕士研究生, 从事兽医药品检验工作。

通讯作者: 顾进华。E-mail: gujinhua@ivdc.org.cn

- [18] Ooi E L, Verjan N, Haraguchi I, *et al.* Innate immunomodulation with recombinant interferon – α enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(10): 1211 – 1220.
- [19] Zou Jun, Bird Steve, Secombes Chris. Antiviral sensing in teleost fish. [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, 1638.
- [20] Zou J, Secombes C J. Teleost fish interferons and their role in immunity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376 – 1387.
- [21] Adamek M, Steinhagen D, Imnazarow I, *et al.* Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(2): 151 – 159.
- [22] Adamek M, Rakus K, Chyb J, *et al.* Interferon type I responses to virus infections in carp cells: In vitro studies on Cyprinid herpesvirus 3 and Rhabdovirus carpio infections [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(3): 482 – 493.
- [23] 李新伟. 锦鲤疱疹病毒 ORF25、ORF81 基因核酸疫苗的构建及免疫原性的研究 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2012.
- [24] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(5): 340 – 343.
- [25] Chan T, Barra N G, Lee A J, *et al.* Innate and adaptive immunity against herpes simplex virus type 2 in the genital mucosa [J]. *Journal of reproductive immunology*, 2011, 88(2): 210 – 218.
- [26] Willem B. Van Muiswinkel, Miki Nakao. A short history of research on immunity to infectious diseases in fish [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 43: 130 – 150.
- [27] Chan T, Barra N G, Lee A J, *et al.* Innate and adaptive immunity against herpes simplex virus type 2 in the genital mucosa [J]. *Journal of reproductive immunology*, 2011, 88(2): 210 – 218.

(编辑: 陈希)