

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00269

斜带石斑鱼 IFN- γ 基因的克隆与表达分析

黄贝¹, 陈善楠¹, 黄文树², 聂品¹

1. 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;
2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021

摘要: IFN- γ 在天然免疫和适应性免疫应答中均发挥着重要的作用。由于低等脊椎动物 IFN- γ 与哺乳动物 IFN- γ 相似性非常低, 硬骨鱼类的 IFN- γ 近年来才得到鉴定。本研究报道了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的 IFN- γ 基因, 并对其表达进行了分析。斜带石斑鱼 IFN- γ cDNA 全长为 867 bp, 编码 200 个氨基酸。其基因组全长为 5 104 bp, 由 4 个外显子、3 个内含子组成。氨基酸序列比对显示斜带石斑鱼 IFN- γ 与高等脊椎动物 IFN- γ 的序列相似性较低, 仅为 32.5%~39%, 与其他硬骨鱼类的 IFN- γ 相似性为 38.0%~68.5%。序列分析结果显示, 斜带石斑鱼 IFN- γ 分子 C 末端中存在 IFN- γ 的特征序列以及核定位基序。二级结构分析结果显示斜带石斑鱼 IFN- γ 序列中包含 6 个 α 螺旋结构, 其排列与高等脊椎动物的 IFN- γ 类似。应用荧光定量 PCR 检测了 IFN- γ 基因在 Poly I:C 诱导后的表达变化。发现在肾、脾、鳃、头肾、皮肤和胸腺组织中, Poly I:C 能显著诱导 IFN- γ 的表达, 在胸腺中上调倍数最高, 其次为头肾、脾、肾、皮肤和鳃, 而在脑和心脏组织中没有显著变化。据此推测, IFN- γ 在斜带石斑鱼抵抗病毒感染过程中起有十分重要的作用。

关键词: 型干扰素; IFN- γ ; 基因表达; 斜带石斑鱼

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0269-07

干扰素在机体抵抗病毒感染的过程中发挥重要作用。高等脊椎动物的干扰素可以分为 I 型、II 型和 III 型干扰素^[1]。I 型干扰素, 即 IFN- γ , 主要由 CD4⁺辅助性 T 淋巴细胞(Thelper 1, Th1), 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)和 NK 细胞(natural killer, NK)分泌, 具有抗病毒和免疫调节作用^[2-4]。IFN- γ 可以通过调节 2', 5'-寡腺苷酸合成酶、双链 RNA 依赖的蛋白酶 R、鸟苷酸结合蛋等抗病毒蛋白的表达来发挥其抗病毒作用; 可活化巨噬细胞, 增强其呼吸爆发作用; 可促进抗原递呈作用; 可促进 Th1 细胞的分化; 可诱导 B 细胞发生免疫球蛋白重链类别转换等^[3-4]。近年的研究显示抗原递呈相关的细胞(antigen-presenting cells, APC)也分泌 IFN- γ , 这表明 IFN- γ

不仅在感染初期具有重要作用, 而且在适应性免疫反应方面同样具有重要作用^[4-5]。

与 I 型和 II 型干扰素不同, 脊椎动物的 I 型干扰素只有一个成员^[6]。各物种 IFN- γ 之间的相似性很低, 如人和小鼠 IFN- γ 蛋白分子之间约 52%, 人与鸡之间只有 40%。到 2004 年, 通过比较基因组学的方法, Zou 等^[7]在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)基因组数据库中发现存在一个 IFN- γ 基因, 具有与哺乳动物和鸟类相似的基因结构, 但只有 39%~41%的相似性。Igawa 等^[8]和 Milev-Milovanovic 等^[9]分别在斑马鱼(*Danio rerio*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)基因组中鉴定出两个相连的 IFN- γ 基因, 并发现其中的一个具有两种翻译剪切模式。随后, IFN- γ 在多种鱼类中得到了克

收稿日期: 2012-02-28; 修订日期: 2012-06-13.

基金项目: 国家自然科学基金委与广东省联合基金资助项目(U0631010); 国家“863”计划项目(2012AA092201).

作者简介: 黄贝(1982-), 男, 博士, 研究方向为鱼类免疫学. Tel: 027-68780001.

通信作者: 聂品, 研究员, 主要从事水产动物免疫和病害方面的研究. Tel: 027-68780736, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

隆^[10-14]。这些发现为探讨鱼类 IFN- γ 的功能以及在免疫反应中的作用奠定了基础。斜带石斑鱼是中国重要的经济养殖鱼类,本研究对斜带石斑鱼 IFN- γ 基因进行克隆和序列分析,并利用实时荧光定量 PCR 技术分析 Poly I:C 诱导后斜带石斑鱼各组织中 IFN- γ 基因转录水平的变化,旨在为该物种的免疫学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 提取总 RNA 及合成第一链 cDNA

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)体质量约 400 g, 购自湛江一养殖场, 实验前暂养 2 周。实验鱼分为 2 组, 每组 3 尾。对照组腹腔注射 PBS (pH 7.4), 刺激组腹腔注射 2.5 mg Poly I:C/kg BW; Poly I:C 用 PBS(pH 7.4)配制成注射液, 两个组的注射量均为每尾 200 μ L。刺激 24 h 后取其脑、心、肾、脾、鳃、头肾和皮肤组织。按 Trizol(Invitrogen)说明书提取总 RNA。将各组织的总 RNA 分别用 Dnase (Takara)处理后, 利用反转录试剂盒 SMART cDNA Synthesis Kit(Clontech)进行反转录合成 cDNA 第一链。

1.2 扩增斜带石斑鱼 IFN- γ cDNA 和基因组序列

根据已知硬骨鱼类 IFN- γ 序列设计简并引物

(Deg- γ F/R, 表 1)。扩增得到中间片段后, 分别设计正向和反向的巢式引物, 经两轮 PCR 反应扩增其 3'和 5'端片段。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 66 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 运行 7 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 运行 18 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。从第一轮 PCR 扩增产物中取 1 μ L 做为第二轮 PCR 反应的模板, 反应条件同上, PCR 反应运行 35 个循环。根据所获得的 IFN- γ cDNA 序列设计引物, 扩增斜带石斑鱼 IFN- γ 基因组序列。目的产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收纯化, 测序验证。

1.3 序列分析

同源基因的搜索通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLAST 软件进行; 氨基酸序列的推断通过 EXPASY 网站(<http://web.expasy.org/translate/>)的 Translate 软件进行翻译。信号肽的预测通过 SignalP3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测。蛋白质二级结构通过 PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)分析。氨基酸序列的多重比对使用 CLUSTAL W 2.0 程序。采用 MEGA4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)进行系统进化分析, 设置 1 000 次 bootstraps 进行评估。

表 1 实验中所用引物序列
Tab. 1 Primers used in the study

引物 primer	引物序列 sequence (5'-3')	引物用途 application
Deg- γ F	SMGGASATGAACARRACC	克隆中间片段 cloning for the internal fragments
Deg- γ R	GARCTCGCCTCCYCGWA	
RACE- γ 3Fout	ACCGCCAGCAATGGTGAGG	克隆基因末端序列 cloning for the 5' and 3' ends
RACE- γ 3Fin	TGACGGACCTGAGGAAACACC	
RACE- γ 5Rout	GCTGCCACCTCACCATTGCT	
RACE- γ 5Rin	GCCTCCATCTTGGTGGTCAGTG	
γ _Intron1F	ATGAACAGAACCATCCAGAACCT	
γ _Intron1R	CATCTTGGTGGTCAGTGGTTCTC	克隆内含子序列 cloning for the intronic sequences
γ _Intron2F	GAGAACCACTGACCACCAAGATG	
γ _Intron2R	CTGCCACCTCACCATTGCT	
γ _Intron3F	TGACGGACCTGAGGAAACACC	
γ _Intron3R	CTCTGATGAGTTTTGACCCTGC	
Ex- γ F	GAACCACTGACCACCAAGATG	
Ex- γ R	GATGAGTTTTGACCCTGCGTG	
ActinF	GAGAGGGAAATCGTGCGTGA	
ActinR	CATACCGAGGAAGGAAGGCTG	

1.4 RT-PCR 分析斜带石斑鱼 IFN- γ 的表达

实时荧光定量分析采用双标准曲线法。根据所获得的斜带石斑鱼 IFN- γ 序列设计引物定量引物 Ex- γ F 和 Ex- γ R, β -actin 为内参基因。将两对引物的扩增产物连接到 pMD-18T 载体, 并提取质粒。测定质粒浓度, 计算质粒拷贝数。质粒模板经倍比稀释后, 通过荧光定量 PCR 绘制标准曲线。荧光定量 PCR 用 iQTM SYBR Green Super Mix 试剂盒(Cat. 170-8882 AP, Bio-rad)在 CFX96TM Real-Time System(Bio-rad)上进行, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 荧光读板温度为 76 $^{\circ}$ C, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 并绘制溶解曲线。所有样品反应均重复 3 次。根据标准曲线计算各组织样品中 IFN- γ 的拷贝数和 β -actin 基因的拷贝数, 以 β -actin 基因的表达量对目的基因表达量进行归一化。数据分析采用张鋈^[15]报道的方法, 采用 *t* 检验分析差异是否显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 斜带石斑鱼 IFN- γ cDNA 和基因组序列

斜带石斑鱼 IFN- γ cDNA(GenBank 登录号: JX013936)全长为 876 bp, 其开放阅读框为 603 bp, 编码 200 个氨基酸, 其 5'和 3'非编码区分别包含 168 bp、108 bp。IFN- γ 基因组全长为 5 104 bp。其基因结构与其他物种的 IFN- γ 类似, 由 4 个外显子和 3 个内含子(分别为 Intron 1, 1 081 bp; Intron 2, 2 713 bp; Intron 3, 707 bp)组成。外显子分别编码 40、24、89、47 个氨基酸(图 1)。

2.2 序列分析

氨基酸序列比对结果显示斜带石斑鱼 IFN- γ 与高等脊椎动物 IFN- γ 的序列相似性较低, 仅为 32.5%~39%。与其他硬骨鱼类 IFN- γ 相似性为 38.0%~68.5%, 其中与青鳉(*Oryzias latipes*)IFN- γ 的相似性最高。与硬骨鱼类 IFN- γ rel 分子的相似性仅为 42.8%~53.9%。在斜带石斑鱼 IFN- γ 分子 C 末端中存在 IFN- γ 家族的特征序列([I/V]-QX-[K/Q]-A-X2-E-[L/F]-X2-[I/V])以及核定位基序(Nuclear localization site, NLS)(图 2)。

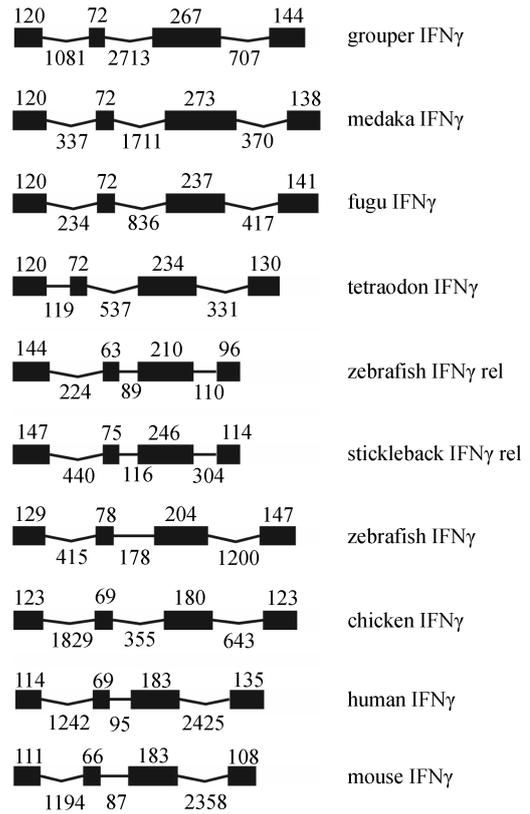


图 1 斜带石斑鱼 IFN- γ 与其他脊椎动物 IFN- γ 基因结构的比较

黑色方框表示为外显子, 方框上方的数字表示外显子大小。线条表示为内含子, 线条下方的数字表示内含子大小。直线表示其长度与下方数字成比例, 折线表示不成比例。

Fig. 1 Comparative analysis in gene structure of IFN- γ in vertebrates

Exons are expressed as black boxes, and introns as lines. The size of exons is indicated above the boxes in bp, and the size of introns below the lines also in bp. The length of exons indicated as black boxes and of introns indicated as straight line is proportional to their bp sizes, but the concave lines are non-proportional.

将硬骨鱼类 IFN- γ 和 IFN- γ rel 蛋白序列用 MEGA4.0 软件构建了 NJ 系统进化树。系统进化树的拓扑结构表明: 斜带石斑鱼 IFN- γ 与黑青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)及红鳍东方鲀 IFN- γ 聚为一枝(图 3)。鲤形目的 4 种鱼类的 IFN- γ 聚为一枝, 然后再与斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的 IFN- γ 聚在一枝。鲤形目 4 种鱼类的 IFN- γ rel 聚在一枝然后与斑点叉尾鲷的 IFN- γ rel 聚为 IFN- γ rel 大枝, 并与 IFN- γ 这一枝分开。

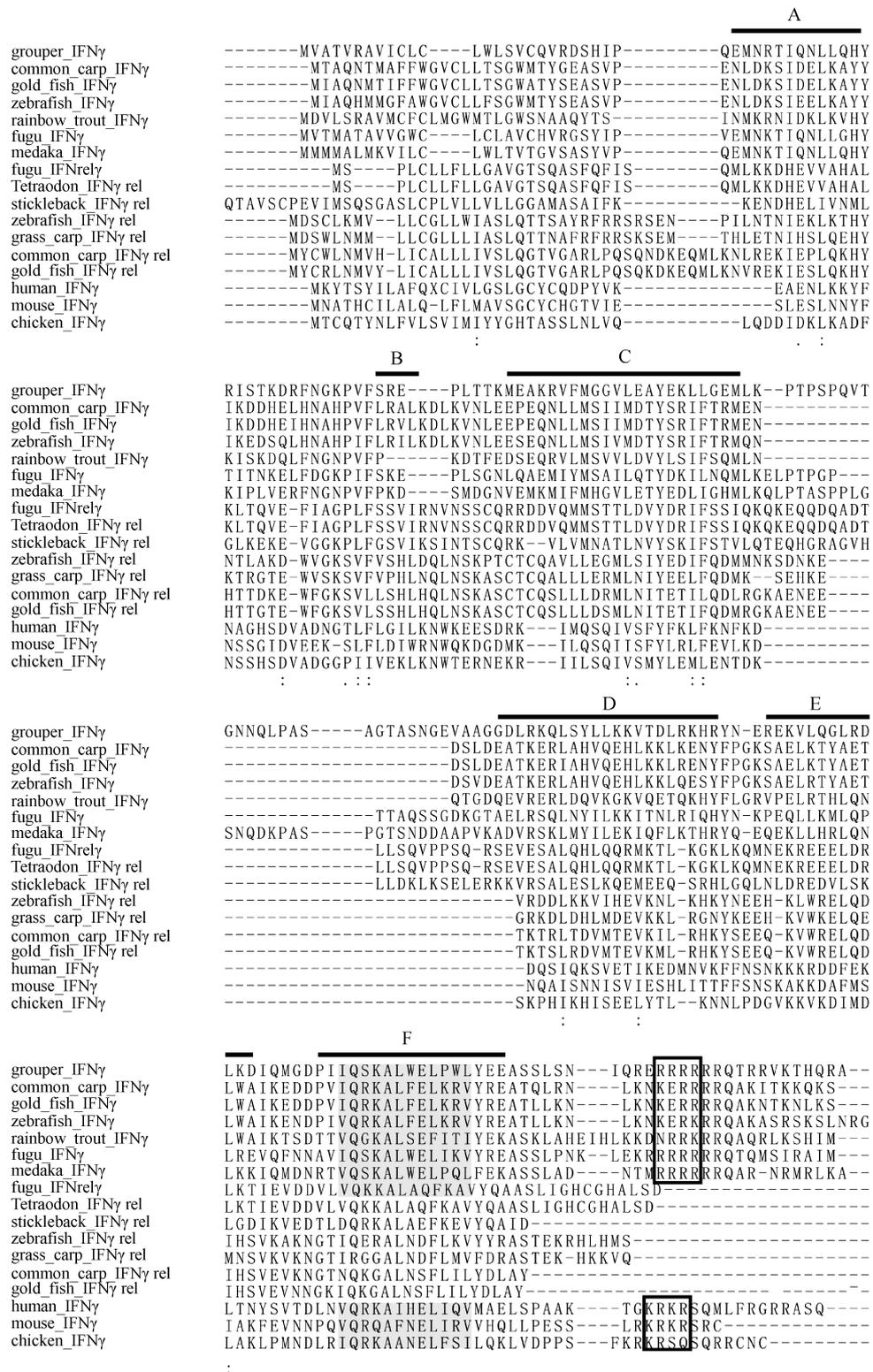


图 2 斜带石斑鱼 IFN- γ 与其他脊椎动物 IFN- γ 氨基酸序列比较

相似的氨基酸用“.”和“:”表示。保守的 α -螺旋结构(A-F)在比对序列上方用黑线表示。阴影表示 IFN- γ 特征序列, 核定位序列用黑框表示。

Fig. 2 Alignment of IFN- γ from grouper and those of other teleosts

The similar residues are indicated with dots and colons. The α -helices (A-F) of IFN- γ are indicated by the solid lines above the alignment. The IFN- γ signature motif is highlighted in gray and the nuclear localization site is boxed.

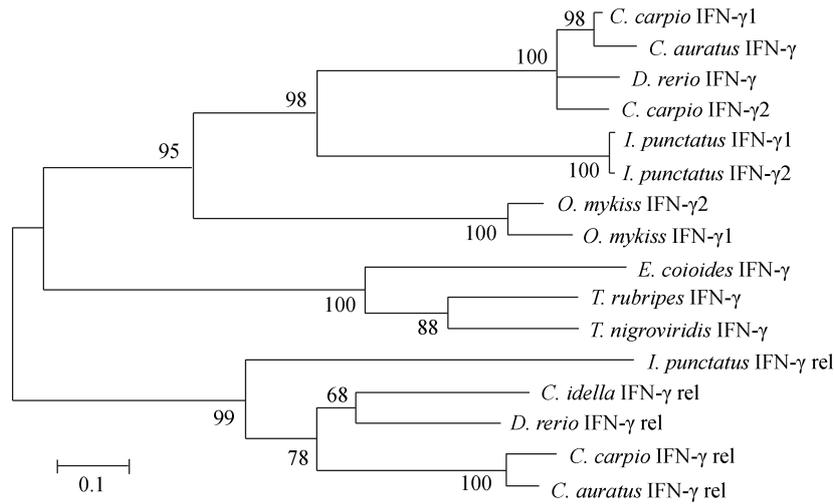


图 3 系统发育树分析硬骨鱼类 IFN 分子的进化关系

节点上的数字表示为 bootstrap 的置信度. 所用序列的 GenBank 登录号如下: 鲤 IFN- γ 1 CAJ51088.1; 金鱼 IFN- γ ACG68885.1; 斑马鱼 IFN- γ NP_998029.1; 鲤 IFN- γ 2 CAJ51089.1; 斑点叉尾鲷 IFN- γ 1 NP_001187231.1; 斑点叉尾鲷 IFN- γ 2 NP_001187263.1; 虹鳟 IFN- γ 2 NP_001153976.1; 虹鳟 IFN- γ 1 NP_001153975.1; 红鳍东方鲀 IFN- γ CAE82301.2; 黑青斑河鲀 IFN- γ CAF95605.1; 斑点叉尾鲷 IFN- γ rel AAZ40504.1; 草鱼 IFN- γ rel ACN56578.1; 斑马鱼 IFN- γ rel NP_001018629.1; 鲤 IFN- γ rel CAJ98867.1; 金鱼 IFN- γ rel ACV41807.1.

Fig. 3 Phylogenetic analysis of teleost fish type IFN molecules

Bootstrap values are indicated at nodes. GenBank accession numbers are as follows: *C. carpio* IFN- γ 1 CAJ51088.1; *C. auratus* IFN- γ ACG68885.1; *D. rerio* IFN- γ NP_998029.1; *C. carpio* IFN- γ 2 CAJ51089.1; *I. punctatus* IFN- γ 1 NP_001187231.1; *I. punctatus* IFN- γ 2 NP_001187263.1; *O. mykiss* IFN- γ 2 NP_001153976.1; *O. mykiss* IFN- γ 1 NP_001153975.1; *T. rubripes* CAE82301.2; *T. nigroviridis* CAF95605.1; *I. punctatus* IFN- γ rel AAZ40504.1; *C. idella* ACN56578.1; *D. rerio* NP_001018629.1; *C. carpio* CAJ98867.1; *C. auratus* ACV41807.1.

2.3 斜带石斑鱼 IFN- γ 的表达

斜带石斑鱼注射 Poly I:C 后, 用荧光定量 PCR 检测 IFN- γ 的表达情况(图 4)。如图所示, 在肾、脾、鳃、头肾、皮肤和胸腺组织中, Poly I:C 显著诱导 IFN- γ 上调表达。在胸腺中上调变化倍数最高, 为 27 倍; 其次是头肾、脾、肾、皮肤和鳃, IFN- γ 的表达量分别为对照组的 18、17、11、10 和 6 倍; 在脑和心组织中没有显著变化。

3 讨论

本研究从斜带石斑鱼中克隆得到了 IFN- γ 基因, 并对其在各组织中的表达进行了初步的研究。斜带石斑鱼的 IFN- γ 基因结构与已报道的其他物种 IFN- γ 的结构类似, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成。虽然其内含子序列长度大于其他硬骨鱼类 IFN- γ 的内含子, 但是其外显子大小较为保守。已有的研究揭示, 哺乳动物 IFN- γ 的内含子上存在微卫星序列, 该微卫星序列与抗病性存在相

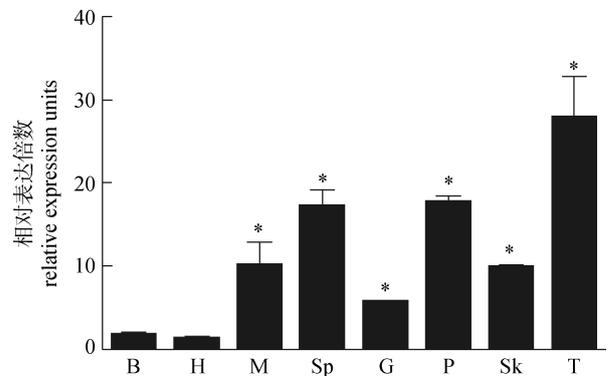


图 4 荧光定量检测斜带石斑鱼 IFN- γ 在 Poly I:C 刺激后的表达情况

B: 脑; H: 心; M: 肾; Sp: 脾; G: 鳃; P: 头肾; Sk: 皮肤; T: 胸腺. 星号表示与对照组差异显著($P < 0.05$).

Fig. 4 Real-time PCR analysis in expression of IFN- γ following the Poly I:C stimulation in orange-spotted grouper B, H, M, Sp, G, P, Sk, T indicating brain, heart, mesonephros, spleen, gill, pronephros, skin, and thymus. * over bars indicating significantly difference with control at $P < 0.05$.

关性^[16-17]。虹鳟 IFN- γ 基因的第一个内含子也包含一个多态性的微卫星位点^[13]。我们在斜带石斑

鱼 IFN- γ 的内含子上没有找到微卫星位点。斜带石斑鱼这种多态性位点的缺失现象是否为硬骨鱼类中的特例还有待于其他硬骨鱼类基因组信息的解码。

二级结构分析结果显示斜带石斑鱼 IFN- γ 序列中包含 6 个 α 螺旋结构, 其排列与高等脊椎动物的 IFN- γ 类似。这种保守的二级结构有助于形成并稳定其二聚体形式, 进而与其受体结合^[6]。此外, 在其 C 末端还存在 IFN- γ 特征序列以及核定位基序(NLS)。核定位信号在 IFN- γ 的信号转导过程中发挥着十分重要的作用, 缺失核定位信号的 IFN- γ 没有生物活性^[13, 18]。斜带石斑鱼及其他硬骨鱼类的 IFN- γ 中都包含有这段基序列, 推测这段基序同样对于硬骨鱼类 IFN- γ 的功能是至关重要的。

在异源性抗原物质刺激后, 斑点叉尾鲷的外周血淋巴细胞中的 IFN- γ 表达水平显著升高。而经 PHA 或者 Poly I:C 诱导后, 虹鳟的头肾白细胞 IFN- γ 的转录水平显著上调。本研究通过对斜带石斑鱼实施腹腔注射 Poly I:C, 24 h 后检测 IFN- γ 基因的表达变化情况。IFN- γ 在胸腺和皮肤等 T 淋巴细胞相关组织表达有显著的上调^[19], 推测斜带石斑鱼 IFN- γ 参与了 T 细胞介导的抗病毒应答。哺乳动物中的研究表明, 经抗原刺激后不仅 Th1 细胞可以分泌 IFN- γ , NK 细胞、巨噬细胞以及抗原递呈相关的细胞(APCs)也能产生 IFN- γ ^[20-22]。头肾和脾脏是硬骨鱼类重要的淋巴器官, 包含大量的巨噬细胞和淋巴细胞。本研究中的定量结果显示, 在 Poly I:C 诱导后, 头肾、脾脏等鱼类主要免疫器官中 IFN- γ 显著上调表达, 表明脊椎动物 IFN- γ 的细胞来源及功能在进化的过程中较为保守。

参考文献:

- [1] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors[J]. Immunol Rev, 2004, 202(1): 8-32.
- [2] Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines[J]. Curr Opin Immunol, 1991, 3(1): 49-55.
- [3] Boehm U, Klamp T, Groot M, et al. Cellular responses to interferon-gamma[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 749-795.
- [4] Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 163-189.
- [5] Frucht D M, Fukao T, Bogdan C, et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge[J]. Trends Immunol, 2001, 22(10): 556-560.
- [6] Savan R, Ravichandran S, Collins J R, et al. Structural conservation of interferon gamma among vertebrates[J]. Cytokine Growth F R, 2009, 20(2): 115-124.
- [7] Zou J, Yoshiura Y, Dijkstra J M, et al. Identification of an interferon gamma homologue in fugu, *Takifugu rubripes*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17(4): 403-409.
- [8] Igawa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals[J]. Mol Immunol, 2006, 43(7): 999-1009.
- [9] Milev-Milovanovic I, Long S, Wilson M, et al. Identification and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish[J]. Immunogenetics, 2006, 58(1): 70-80.
- [10] Stolte E H, Savelkoul H F, Wiegertjes G, et al. Differential expression of two interferon-gamma genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(12): 1467-1481.
- [11] Furnes C, Seppola M, Robertsen B. Molecular characterization and expression analysis of interferon gamma in Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009 26(2): 285-292.
- [12] Grayfer L, Belosevic M. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(2): 235-246.
- [13] Zou J, Carrington A, Collet B, et al. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish[J]. J Immunol, 2005, 175(4): 2484-2494.
- [14] Robertsen B. The interferon system of teleost fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(2): 172-191.
- [15] 张鋈. 荧光实时定量 PCR 技术初探[J]. 生命科学趋势, 2003, 12: 1-28.
- [16] Coltman D W, Wilson K, Pilkington J G, et al. A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a natu-

- rally-parasitized population of Soay sheep[J]. Parasitology, 2001, 122(5): 571–582.
- [17] Sayers G, Good B, Hanrahan J P, et al. Intron 1 of the interferon gamma gene: Its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds[J]. Res Vet Sci, 2005, 79(3): 191–196.
- [18] Subramaniam P S, Mujtaba M G, Paddy M R, et al. The carboxyl terminus of interferon- gamma contains a functional polybasic nuclear localization sequence[J]. J Bio Chem, 1999, 274(1): 403–407.
- [19] Rombout J H, Joosten P H, Engelsma M Y, et al. Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1998, 22(1): 63–77.
- [20] Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance[J]. Cytokine Growth F R, 1998, 9(2): 117–123.
- [21] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production[J]. J Immunol, 1998, 161(7): 3400–3407.
- [22] Di Marzio P, Puddu P, Conti L, et al. Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages[J]. J Exp Med, 1994, 179(5): 1731–1736.

Molecular characterization and expression of interferon gamma (IFN- γ) in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)

HUANG Bei¹, CHEN Shannan¹, Huang Wenshu², NIE Pin¹

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

2. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: IFN- γ is a type I interferon that plays an important role in both innate and cell-mediated immune responses. Because of the low similarity with their mammalian homologues, IFN- γ in teleost fish has only recently been identified. In this study, the cDNA sequence encoding the IFN- γ molecule was cloned from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, and its gene organization was revealed. Its expression in response to Poly I:C stimulation was also examined. The IFN- γ cDNA sequence consists of 867 bp, which encodes a putative protein of 200 amino acids. The gene is 5-kb long and contains four exons, which are comparable in size with IFN- γ genes in other vertebrates. This IFN- γ was only 32.5%–39% similar to its counterparts in higher vertebrates and 38.0%–68.5% similar to those in other teleost fish. Sequence analysis revealed that the IFN- γ in the orange-spotted grouper contains the typical IFN- γ motif and a conserved nuclear localization site in the C-terminal end and displays an alpha-helix structure similar to mammalian IFN- γ . Real time PCR analysis results showed that the expression of IFN- γ increased in the thymus, head kidney, spleen, kidney, skin, and gills following the poly I:C stimulation, indicating its role against viruses in orange-spotted grouper.

Key words: type I interferon; IFN- γ ; gene expression; *Epinephelus coioides*

Corresponding author: NIE Pin. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn