

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15049

太平洋鳕 *IRF3* 基因的克隆及绝对定量表达分析

孙航, 姜志强, 蒋洁兰, 温施慧, 李幸, 暴宁, 苏鹏, 毛明光

大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 本研究通过克隆首次得到太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)的部分序列。该序列长 1878 bp, 包含长 1377 bp 的完整开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码 459 个氨基酸, 其编码的蛋白质分子量约为 51 kD。经氨基酸序列比对发现, 太平洋鳕 IRF3 的氨基酸序列包括 1 个含有 5 个保守色氨酸残基的 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)和 1 个保守的 C 端 IRF 关联域(IRF association domain, IAD); 系统进化树分析表明, 太平洋鳕 IRF3 与其他物种的 IRF3 亲缘关系较近。应用绝对荧光定量 PCR 方法对 *IRF3* 在不同组织和不同日龄(days post-hatching, dph)仔鱼的表达水平进行检测, 并对干扰素在仔鱼期的免疫作用进行分析。组织表达绝对定量结果显示, 性腺, 肝和胸腺表达量高于其他组织。不同日龄仔鱼 *IRF3* 表达量结果显示, *IRF3* 在受精卵就已经表达, 在 25 dph 表达量大幅提高。本研究的结果为进一步研究太平洋鳕干扰素作用机制以及其在早期发育中的作用奠定了基础。

关键词: 太平洋鳕; IRF3; 干扰素; 绝对定量 PCR

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0887-09

干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)属于干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF)家族, 能够显著增高病毒介导的 I 型干扰素(Type I IFN)的表达, 提高抗病毒效应, 并且与 DNA 的损伤修复和病毒诱导的细胞凋亡有关^[1-4]。目前关于 IRF3 调节的研究主要集中在其蛋白质的磷酸化方面。Gu 等^[5]发现蛋白磷酸酶 1 对促进 IRF3 活化具有重要作用; Lin 等^[6]确定热休克蛋白 60 为一个新的 IRF3 相互作用蛋白; 在鱼类 IRF3 研究中, IRF3 基因首次在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[7]中被发现, 随后在斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)^[9]、鲫(*Carassius auratus*)^[10]和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[11]中发现了 IRF3 基因; 在鳕科鱼类中, 大西洋鳕(*Gadus morhua*)IRF 因子的相关报道已有发表^[12], 但在太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)中鲜有报道。鱼类 IRF3 与哺乳类

IRF3 的表达特征具有差异性, Sun 等^[10, 13]指出, 在鱼类和哺乳类中通过 IRF3 启动的 IFN 反应是保守的能抵抗病毒感染的基本防御机制, 其中鱼类 *IRF3* 受病毒诱导表达, 而哺乳类 *IRF3* 的表达不受病毒感染等诱导, 因此, 研究太平洋鳕 *IRF3* 基因的表达具有重要意义。目前, *IRF3* 在鱼类各组织中的表达已被广泛研究, 所用方法多为相对定量, 极少使用绝对荧光定量 PCR 方法进行分析, 且鲜有文章对鱼类仔鱼期 *IRF3* 的表达进行报道。本研究通过对 *IRF3* 在太平洋鳕仔鱼中的表达分析, 说明了干扰素系统在仔鱼期的免疫系统中起重要作用。

太平洋鳕又名大头鳕, 隶属于鳕形目(Gadiformes), 鳕科(Gadidae), 鳕属, 是世界重要海洋经济鱼类之一^[14]。近年来, 随着我国海洋捕捞业的发展, 海洋污染严重, 太平洋鳕的自然资源日益减少, 人工繁殖技术问题亟待解决。目前, 本实验室在

收稿日期: 2015-01-28; 修订日期: 2015-03-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302202); 国家 863 计划项目(2012AA10A413); 辽宁省教育厅项目(L2013276).

作者简介: 孙航(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物繁育研究. E-mail: sunhang1016@163.com

通信作者: 毛明光(1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事鱼类分子免疫学的研究. E-mail: mmg@dlou.edu.cn

太平洋鳕人工繁育技术方面已取得突破, 成功进行了人工繁育和周年饲养。但由于太平洋鳕免疫系统作用机理尚不清楚, 在实际生产中常遇到育苗前期因病大量死亡的状况。因此, 了解太平洋鳕免疫相关基因的分子机理及表达特性具有重要意义。本研究从已获得的太平洋鳕转录组信息得到了 *IRF3* 部分基因信息, 并通过基因克隆, 获得包含完整开放阅读框(open reading frame, ORF)的太平洋鳕 *IRF3* 序列, 应用实时荧光定量 RT-PCR 技术研究分析 *IRF3* 在不同组织和仔鱼时期不同日龄的表达水平, 为了解太平洋鳕的免疫功能, 及 *IRF3* 在其早期发育中的作用提供数据支持, 为工厂化人工育苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 太平洋鳕采自大连市旅顺盐场附近海域, 捕取野生成鱼, 共 3 尾(2 雌 1 雄), 平均重量 2.438 kg, 均已性成熟。于 10℃水暂养 1 周, 无异常后进行解剖, 分别取 3 尾鱼的鳃、肝、肾、肌肉、脾、脑、肠、心脏、胸腺和性腺组织于-80℃冰箱中保存待用, 做 3 个平行组。太平洋鳕仔鱼取自农业部北方海水增养殖重点实验室, 经大连市旅顺盐场所取亲鱼受精孵化培育后获得, 分别取受精卵(眼泡期), 1 日龄(days post-hatching, dph), 5 dph, 9 dph, 17 dph, 25 dph 和 33 dph 样品于-80℃冰箱中保存待用, 共做 3 个平行组, 每组取 5 尾相同日龄仔鱼。

1.1.2 主要试剂盒、工具酶和菌株 LA *Taq* 聚合酶、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株感受态

细胞、pMDTM18-T 载体、DNA 酶 I (无 RNA 酶) 和反转录试剂盒(PrimerScriptTM RT-PCR Kit)购于大连 TaKaRa 生物公司; 动物组织总 RNA 提取试剂盒(DP431)购于天根生化科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)购于 QIAGEN 公司; 质粒提取试剂盒(EasyPure Plasmid MiniPrep Kit), 2×EasyTaq PCR SuperMix 和 Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 太平洋鳕各组织总 RNA 的提取及反转录 对太平洋鳕各组织和仔鱼进行总 RNA 提取, 提取方法参照动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书。取 4 μ L 总 RNA 用于 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳, 取 2 μ L 总 RNA 用于微量分光光度计(上海光谱仪器有限公司 754 型)测定 RNA 的 OD 值, OD 比值在 1.9~2.1 的 RNA 选为可用 RNA。按照 TaKaRa PrimerScriptTM RT-PCR Kit 说明, 以 10 μ L 体系对 500 ng 总 RNA 进行反转录反应。

1.2.2 *IRF3* 基因的扩增及序列测定 根据本实验室太平洋鳕转录组信息^[15]中已获得的 *IRF3* 部分序列设计引物(表 1), 应用 IRF3F1、IRF3R1 和 IRF3F2、IRF3R2 两对引物分别对 *IRF3* 的 5'端和 3'端进行 PCR 扩增。两对引物的反应条件均为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 经纯化后连接到 pMD18-T 载体, 重组质粒分别命名为 pMD18-IRF3a 和 pMD18-IRF3b, 再经转化大肠杆菌 DH5 α , 将阳性克隆送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

表 1 实验所用的引物
Tab. 1 Primers used in this experiment

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 purpose
IRF3F1	AGACAGCAGGACGGACAT	IRF3 序列扩增 5'端上游引物
IRF3R1	GACGAGGCATTCAAGACAC	IRF3 序列扩增 5'端下游引物
IRF3F2	ACGGGTCTGTTGGTTCT	IRF3 序列扩增 3'端上游引物
IRF3R2	CCCTCTTCCGCTTCAGT	IRF3 序列扩增 3'端下游引物
IRF3F3	CCTGCTGGGTGAGACGGTT	IRF3 qPCR 上游引物
IRF3R3	GGAGATGAGGATGGGGAG	IRF3 qPCR 下游引物

1.2.3 基因序列的生物信息学分析 使用 NCBI 网站上的 BLAST 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对序列进行同源性比对和相似性分析; 使用软件 DNAMAN 5.0 和 DNAassist 2.0 对 cDNA 序列进行分析得到氨基酸序列, 并推断分子量; 采用 DNAMAN 5.0 软件进行氨基酸序列比对; 使用 SeaView, 以邻位相连法构建系统进化树。

1.2.4 绝对荧光定量 PCR 检测 *IRF3* 基因 以 pMD18-*IRF3a* 为模板按照质粒提取试剂盒的说明提取质粒。经微量核酸测定仪测定质粒的浓度及纯度, 并依据公式: 质粒拷贝数=($6.02 \times 10^{14} \times \text{质粒浓度}) / [(2692 + \text{目的基因片段长度}) \times 660]$ ^[16], 计算出质粒的拷贝数。将标准质粒用双蒸水稀释成 $10^{10} \sim 10^2$ copies/ μL 的 9 个梯度, 选取 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 这 6 个梯度作为模板, 以 *IRF3F3* 和 *IRF3R3*(表 1) 为特异引物, 进行荧光定量 PCR 反应, 每个反应设置 3 个重复。反应在 Chromo4 Real-Time Detection System (MJ Research) 上进行, 实验操作根据 Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 荧光定量 PCR 试剂盒说明进行, 反应体系为 20 μL 。反应程序为: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s; 57℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 15 s, 共 45 个循环; 55℃ 30 s, 每 30 s 升温 0.5℃, 共进行 81 个循环达到 95℃。反应结束后对扩增曲线和熔解曲线进行分析, 制作标准曲线。

分别以太平洋鳕鳃、肝、肾、肌肉、脾、脑、肠、心脏、胸腺和性腺各组织的 cDNA, 以及受精卵、1 dph、5 dph、9 dph、17 dph、25 dph 和 33 dph 的仔鱼 cDNA 为模板, 根据上述反应体系进行绝对荧光定量 PCR 反应。反应结束后根据标准曲线计算得到每个组织中 *IRF3* 基因的精确拷贝数, 并使用 Excel 2010 绘图。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 应用 Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 认为结果差异显著。

2 结果与分析

2.1 太平洋鳕 *IRF3* cDNA 序列的克隆与分析

PCR 扩增后, 根据从太平洋鳕的转录组信息已获得的 5'端和 3'端序列及克隆所得的上下游序

列进行拼接, 获得了 *IRF3* 的 cDNA 序列, 长度为 1878 bp, 包括 1 个 153 bp 的 5'UTR 和 1 个 348 bp 的 3'UTR, 含有长度为 1377 bp 的完整 ORF, 编码 459 个氨基酸, 分子量约为 51 kD。根据已获得的 *IRF3* cDNA 序列, 推导其对应的氨基酸序列如图 1 所示。

2.2 太平洋鳕 *IRF3* 氨基酸序列比对

将太平洋鳕 *IRF3* 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)的 *IRF3* 氨基酸序列进行比对, 相似性分别为 51%、39%、40%、47% 和 28%。比对结果显示: 在其 N 端有个保守的 DBD 结构域, 保守的 5 个色氨酸(W)重复包含于其内(图 2)。除 DBD 结构域外在 C 端还有一个较保守的 IRF 关联域(IRF association domain, IAD), 且太平洋鳕氨基酸序列中含有 13 个与牙鲆、鲤、斑马鱼均不同的氨基酸序列位点。

2.3 系统进化树

根据 NCBI 已注册的部分物种不同亚型的 *IRF*(主要为脊椎动物中已报道的 *IRF1*, *IRF2*, *IRF3*, *IRF7*)的氨基酸序列构建系统发育树。结果显示, 不同物种的 *IRF1*、*IRF2*、*IRF3*、*IRF7* 明显地各自聚为一支: 太平洋鳕 *IRF3* 与其他物种 *IRF3* 聚为一大支, 在 *IRF3* 这一大支中, 太平洋鳕 *IRF3* 单独为一小支, 与尼罗罗非鱼亲缘关系相对较近, 与哺乳动物 *IRF3* 相距较远; 鱼类 *IRF3* 聚为一支, 与其他物种 *IRF7* 亲缘关系相对较近, 与其他物种 *IRF1*, *IRF2* 相距较远(图 3)。

2.4 绝对荧光定量 PCR 检测 *IRF3* 基因

2.4.1 标准曲线的建立 多次重复的 PCR 产物熔解曲线分析表明, 太平洋鳕 *IRF3* 基因在设计的引物扩增下的熔解曲线呈较为锐利的单一的峰, 无引物二聚体或其他杂峰, 扩增 *IRF3* 基因的熔解温度在 87℃ 左右, 可以扩增单一的 PCR 产物, 且本实验重复性较好, 可以用于荧光实时定量分析 *IRF3* 基因的转录水平。图 4 所得的标准曲线为: $Y = -3.3449X + 41.001$, 其中 Y 为 C_T 值, X 为起始的模板数量。标准曲线的回归系数 $R^2 = 0.9896$, 这表明标准质粒在稀释的浓度范围内具有良好的线性关系。曲线的扩增效率 $E = 96.261\%$ 。

图 1 太平洋鳕 IRF3 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

灰色区域为推导的氨基酸序列; *为终止子; 起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 分别以加粗斜体表示; mRNA 稳定性相关序列 AU(ATTTA)以加粗斜体显示, DNA 结构域(DNA binding domain, DBD)中保守的色氨酸残基(W)用粗体表示.

Fig. 1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Gadus macrocephalus* IRF3

The gray area is the deduced amino acid sequence; * is the terminator; initiation codon ATG, termination codon TAG and AU(ATTA) are expressed by boldface italic; the conservative tryptophan residues (W) of the DNA binding domain (DBD) are expressed by bold.

2.4.2 太平洋鳕 *IRF3* 基因的组织差异表达和仔鱼期各日龄的差异表达

实验结果显示, *IRF3* 基因在太平洋鳕的各组织中都有表达, 其中在性腺中的表达量显著高于其他组织($P<0.05$), 在肝和胸腺中表达量其次, 在脑中表达量最少, 各组织间的表达量均有显著性差异($P<0.05$)(图 5A)。其拷贝数分别如下: 肝, 1102.775 copies/ng; 脾, 419.927 copies/ng; 肾, 551.195 copies/ng; 肠, 231.244 copies/ng; 心脏, 516.649 copies/ng; 脑, 13.016 copies/ng; 鳃, 198.548 copies/ng; 肌肉, 101.758 copies/ng; 胸腺, 695.158 copies/ng; 性腺, 2128.273 copies/ng。*IRF3*

基因从太平洋鳕仔鱼发育开始就已经表达，其中从受精卵到 5 dph 表达较稳定，25 dph 时表达量显著增高($P<0.05$)(图 5B)。其拷贝数分别如下：受精卵，6.189 copies/ng；1 dph, 6.809 copies/ng；5 dph, 8.066 copies/ng；9 dph: 5.009 copies/ng；17 dph, 5.005 copies/ng；25 dph, 10.390 copies/ng；33 dph, 6.177 copies/ng。

3 讨论

干扰素(interferon, IFN)参与的抗病毒天然免疫应答，是宿主在进化过程中形成的抵抗病毒入侵的主要防御机制之一^[17]。其中 I 型 IFN 活化的天然免疫反应具有抗病毒作用^[4]，对鱼类的疾病

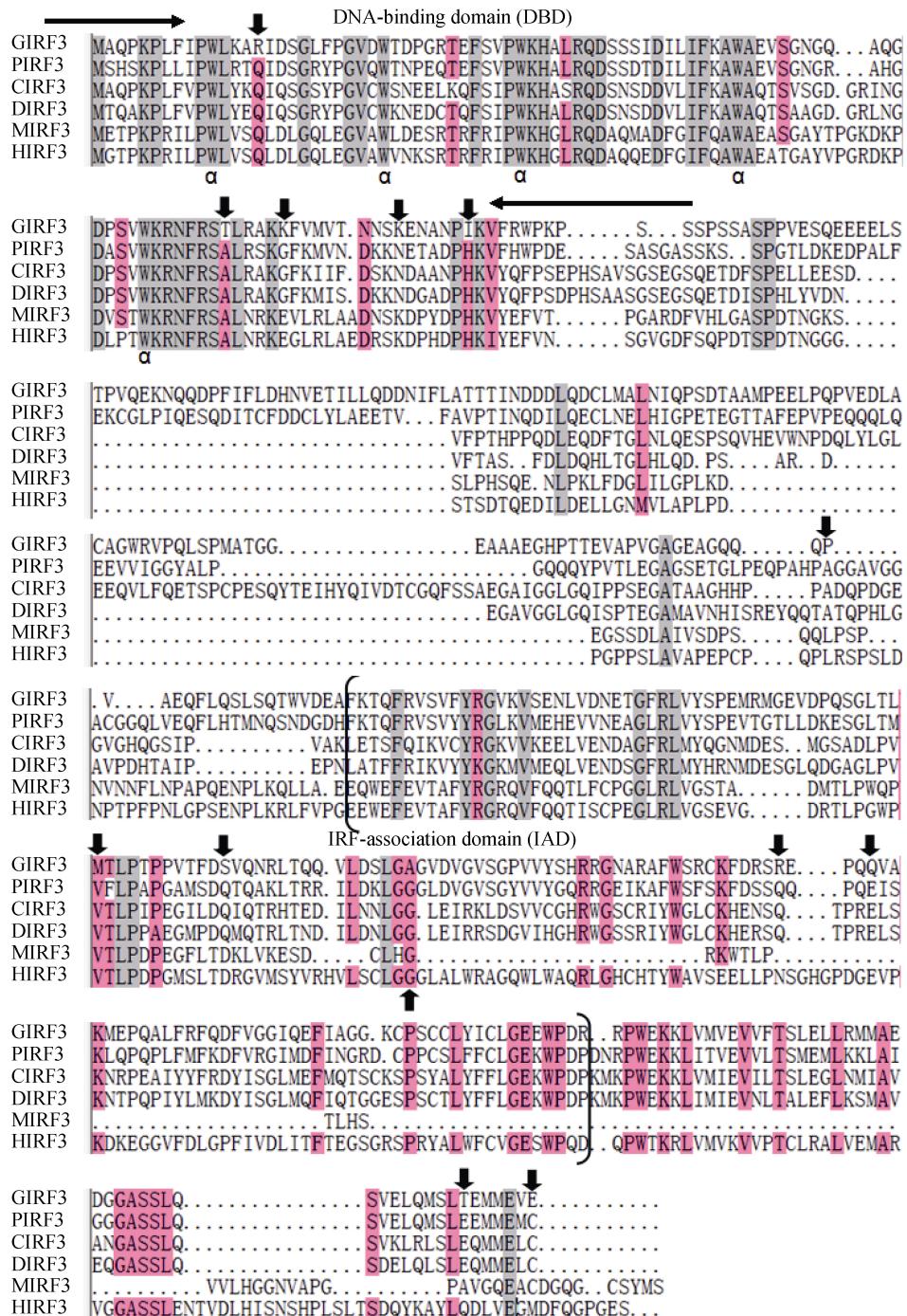


图2 太平洋鳕IRF3氨基酸序列物种间比较

灰色区域代表氨基酸序列的保守区; 黑色纵向箭头代表太平洋鳕与其他动物均不同的氨基酸位点, DBD结构域以横向箭头指示, 保守色氨酸位点(W)用 α 标记; IAD结构域用“[]”围起; 其中, GIRF3表示太平洋鳕, PIRF3表示牙鲆, CIRF3表示鲤, DIRF3表示斑马鱼, MIRF3表示小鼠, HIRF3表示人。

Fig. 2 Multiple alignments of IRF3 amino acid sequences between species

Gray area is the conservative district of amino acid sequences; the black vertical arrows indicate the different amino acid sites between *Gadus macrocephalus* and others; the horizontal black arrows indicate the DBD structure domain; the conservative tryptophan residues (W) are marked by α ; the IAD structure domain is surrounded by “[]”; GIRF3 is *Gadus macrocephalus*, PIRF3 is *Paralichthys olivaceus*, CIRF3 is *Cyprinus carpio*, DIRF3 is *Danio rerio*, MIRF3 is *Mus musculus*, HIRF3 is *Homo sapiens*.

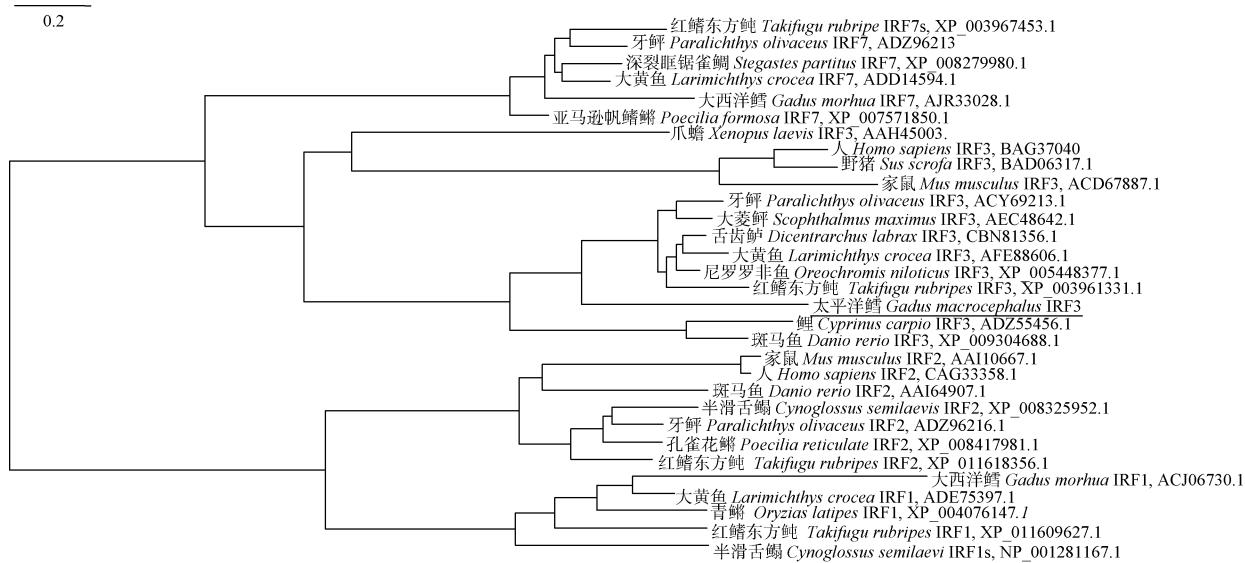


图 3 不同物种 IRF 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of IRF amino acid sequences from different species

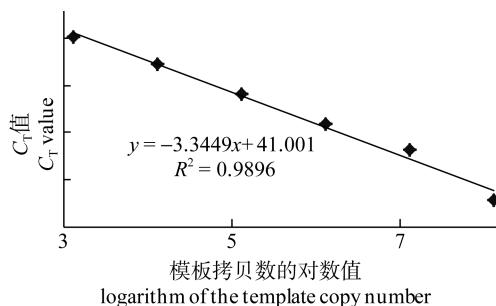
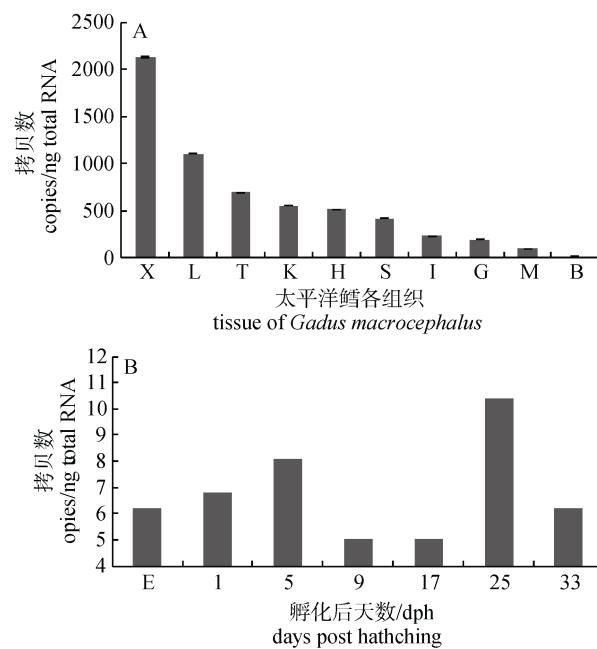


图 4 IRF3 基因的标准曲线

Fig. 4 The standard curve of *IRF3* gene

防治具有重要意义。*IRF3* 能够通过其 N 端 DNA 结合域^[18]结合 *IFNβ* 基因启动子上游保守的 DNA 序列，直接调控 *IFNβ* 的表达。因此，对太平洋鳕 *IRF3* 的研究可以为日后的产业化养殖及生长发育和疾病防治提供参考。

本研究首次在太平洋鳕中克隆得到了 *IRF3* 基因的序列，长 1878 bp，包括 1 个 153 bp 的 5'UTR 和 1 个 348 bp 的 3'UTR，包含长 1377 bp 的完整 ORF，编码 459 个氨基酸，分子量约为 51 kD，包括 1 个含有 5 个保守色氨酸残基的 DBD(图 2)，与赖启南^[19]在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)中的研究相符，确认了本研究所获得的为太平洋鳕 *IRF3* 的 cDNA 序列。对氨基酸序列进行比对发现太平洋鳕 *IRF3* 基因在脊椎动物中保守性不高，但均含有 1 个保守的 N 端 DBD 结构，还有 1

图 5 *IRF3* 基因在太平洋鳕不同组织(A)和仔鱼期各日龄(B)的绝对定量表达分析

I: 肠; H: 心脏; T: 胸腺; X: 性腺; G: 鳃; M: 肌肉; S: 脾; B: 脑; L: 肝; K: 肾; E: 受精卵.

Fig. 5 The absolute quantitative expression analysis of *IRF3* gene in different tissues (A) and different day ages (B) of *Gadus macrocephalus*

I: intestine; H: heart; T: thymus; X: gonad; G: gill; M: muscle; S: spleen; B: brain; L: liver; K: kidney; E: fertilized egg.

个保守的 C 端 IAD 结构^[19]，且 IAD 结构的保守性较高，表明 *IRF3* 的功能具有同源性(图 2)；同

时发现13个位点为太平洋鳕与鲤、牙鲆和斑马鱼这3种鱼类均不同,而这3种鱼类之间均相同,这可能是由于太平洋鳕属深海冷水鱼类,而鲤和斑马鱼属暖温性鱼类,牙鲆属冷温性鱼类,因此在长期进化中,这13个氨基酸位点发生了变异。系统进化树分析表明,太平洋鳕IRF3与其他物种IRF3聚为一支,且与尼罗罗非鱼亲缘关系相对较近,而与其他已报道动物的IRF3亲缘关系相对较远。这一结果可能是由于鱼类IRF3和哺乳类IRF3具有不同的表达特征和进化过程,且太平洋鳕与其他鱼类在分类地位和生活环境都有所不同造成的,有待进一步深入研究。

现阶段关于IRF3的研究中已经对IRF3的分子结构、磷酸化、功能等都有所涉及^[4, 18, 20],在鱼类IRF3研究中也涉及到不同鱼类IRF3的组织表达分析,但未发现IRF3在鱼类仔鱼期的表达分析的报道,对仔鱼期干扰素的研究也极少。本研究首次应用绝对荧光定量PCR对太平洋鳕IRF3的各组织表达和仔鱼期各日龄的表达进行了分析。各组织表达的绝对定量结果显示,各组织表达量由高到低依次为性腺、肝、胸腺、肾、心脏、脾、肠、鳃、肌肉、脑;仔鱼期各日龄的表达的绝对定量结果显示,受精卵、1~5 dph表达量逐渐增高,9~17 dph表达量降低,25 dph表达量显著提高($P<0.05$),33 dph降低。本研究未采用现阶段常用的相对定量方法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[21~22]),相对定量是以恒定的内参基因作为参照,来获得目的基因相对于参照基因的表达指数,只能表达组织表达量的趋势,且存在不同组织的内参的表达量不一样、仔鱼期内参表达量不稳定等因素,不能说明内参基因的恒定性,导致定量结果不准确^[23~25];绝对定量是比较准确可靠的表达定量方法,以每ng中RNA含有的拷贝数做基准进行比较,可以避免相对定量存在的许多问题^[26];因此本研究选择绝对定量来进行表达分析,更能准确反映IRF3在各组织中的表达量。各组织绝对定量结果表明,IRF3在性腺、肝、胸腺、脾、肾、心脏中表达量较多,这与IRF3在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)肝、心脏、脾的表达量最多^[27],在斜口裂

鲅鱼(*Schizothorax prenanti*)肝、心脏、脾的表达量最多相一致^[28],这说明肝、胸腺、脾、肾、心脏是IRF3参与表达的主要组织。本研究中得出IRF3在性腺中表达量显著高于其他组织,这可能是由于性腺能进行生殖传代,能够为后代的免疫提供帮助,因此表达量较高。赖启南^[19],Lai等^[29]在草鱼的研究中发现脑的本底表达较高,这与本研究结果不同,可能是由于鱼类进化地位不同,生活环境不同等原因导致IRF3表达的位置不同。仔鱼期各日龄的绝对定量结果表明,IRF3在受精卵中就已经开始表达,其中25 dph时IRF3的表达量显著提高($P<0.05$)。25 dph IRF3的大量表达与实验室育苗中25日左右仔鱼苗大量死亡的时间吻合,这可能是由于仔鱼发病导致IRF3大量表达,促使I型IFN表达量增加,进行天然免疫和抗病毒反应。IRF3能够直接调节I型IFN基因的表达,IRF3表达量的提高可以显著增加病毒介导的I型IFN的表达,提高抗病毒效应^[1~2],这种干扰素的免疫应答对于免疫系统不完善的仔鱼具有重要意义,可以为仔鱼提供抗病毒作用,提高成活率。综上所述,IRF3在太平洋鳕各组织中表达广泛,并参与了仔鱼时期的天然免疫和抗病毒反应,在太平洋鳕的疾病防治和生长发育中起重要作用。

参考文献:

- [1] Yin J K, Shi Y, Zhu X P. Cloning and prokaryotic expression of *IRF-1* gene from *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 668~677. [尹经逵, 史燕, 朱新平. 斜带石斑鱼干扰素调节因子1基因的克隆及其原核表达[J]. 中国水产科学, 2009, 16(5): 668~677.]
- [2] Moore T C, Cody L, Kumm P M, et al. IRF3 helps control acute TMEV infection through IL-6 expression but contributes to acute hippocampus damage following TMEV infection[J]. Virus Res, 2013, 178(2): 226~233.
- [3] Lin R T, Heylbroeck C, Pitha P M, et al. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(5): 2986~2996.
- [4] Di Paolo N C, Doronin K, Baldwin L K, et al. The transcription factor IRF3 triggers “defensive suicide” necrosis in response to viral and bacterial pathogens[J]. Cell Reports, 2013,

- 3(6): 1840–1846.
- [5] Gu M D, Zhang T, Lin W L, et al. Protein phosphatase PP1 negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2930–2939.
- [6] Lin L, Pan S, Zhao J Q, et al. HSPD1 interacts with IRF3 to facilitate interferon-beta induction[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114874
- [7] Holland J W, Bird S, Williamson B, et al. Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Functional analysis and transcriptional modulation[J]. *Mol Immunol*, 2008, 46(2): 269–285.
- [8] Song H D, Sun X J, Deng M, et al. Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(46): 16240–16245.
- [9] Richardson M P, Tay B H, Goh B Y, et al. Molecular cloning and genomic structure of a gene encoding interferon regulatory factor in the pufferfish (*Fugu rubripes*)[J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3(2): 145–151.
- [10] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, et al. Characterization of fish IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation of IFN response in vertebrates[J]. *J Immunol*, 2010, 185(12): 7573–7582.
- [11] Yabu T, Hirose H, Hirano I, et al. Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1998, 7(2): 138–144.
- [12] Star B, Nederbragt A J, Jentoft S, et al. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system[J]. *Nature*, 2011, 477(7363): 207–210.
- [13] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, et al. Fish MITA serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7[J]. *J Immunol*, 2011, 187(5): 2531–2539.
- [14] Jiang Z Q, Zhang Z M, Zhao C, et al. The gonad development and nutrition source of Pacific cod *Gadus microcephalus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(4): 315–320. [姜志强, 张志明, 赵翀, 等. 太平洋鳕性腺发育及营养来源的初步研究[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(4): 315–320.]
- [15] Mao M G, Li X, Alejandro P M, et al. Transcriptomic analysis and biomarkers (*Rag1* and *Igu*) for probing the immune system development in Pacific cod, *Gadus macrocephalus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 44(2): 622–632.
- [16] Li L, Zhao C P, Li H, et al. Establishment of the plasmid standard curve generation method for absolute quantification PCR[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(2): 1157–1162. [李丽, 赵成萍, 李宏, 等. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(2): 1157–1162.]
- [17] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783–801.
- [18] Jiang J, Hu F Q, Jian R, et al. Analysis of regulatory elements of IFN- β gene promoter and construction of IRF-3 reporter gene[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2006, 28(9): 896–899. [蒋静, 胡福泉, 蹇锐, 等. IFN- β 基因启动子调控区域的分析及 IRF-3 报告基因的构建[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 896–899.]
- [19] Lai Q N. Molecular characteristics of IRF-2, IRF-3 and functional analysis of IRF1 of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Nanchang: Nanchang University, 2013. [赖启南. 草鱼 IRF-2、IRF-3 基因的克隆、鉴定及 IRF-1 的功能分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.]
- [20] Liu X, Shi H X, Wang C. Interferon regulatory factor 3, A pivotal transcription factor for host antiviral responses[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2010, 37(8): 817–825. [刘星, 石贺欣, 王琛, 等. 干扰素调控因子 3: 细胞抗病毒反应的核心转录因子[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(8): 817–825.]
- [21] Zhang C Y, Xu S G, Huang X X. A novel and convenient relative quantitative method of fluorescence real time RT-PCR assay based on slope of standard curve[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 32(9): 883–888. [张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 32(9): 883–888.]
- [22] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 386–401.
- [23] Zhang J Y, Wang Y R, Nan Z B. Relative and absolute quantification-expression analysis of CsSAMDC gene as a case[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(8): 86–91. [张吉宇, 王彦荣, 南志标. 相对定量和绝对定量-以 CsSAMDC 基因表达分析为例[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(8): 86–91.]
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [25] Johansson S, Fuchs A, Ökvist A, et al. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: Application on brain cortices of human chronic alcoholics[J]. *Brain Res*, 2007, 1132(1): 20–28.
- [26] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. *J Mol Endocrinol*, 2000, 25(2): 169–193.

- [27] Huang X N. Cloning and characterization of some genes in TLR signaling pathway of large yellow croaker[D]. Xiamen: Jimei University, 2011. [黄雪娜. 大黄鱼 TLR 途径中部分基因的克隆与特征分析[D]. 厦门: 集美大学, 2011.]
- [28] LI H. Cloning and expression of Myd88 and IRF3 gene of *Schizothorax prenanti*[D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2012. [李华. 齐口裂腹鱼 MyD88 基因和 IRF3 基因的克隆及表达分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.]
- [29] Lai Q N, Lin G, Ma M S, et al. IRF-1 acts as a positive regulator in the transcription of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) IFN gene[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(6): 1432–1438.

Cloning and expression analysis of *IRF3* in *Gadus macrocephalus* using absolute quantitative PCR

SUN Hang, JIANG Zhiqiang, JIANG Jielan, WEN Shihui, LI Xing, BAO Ning, SU Peng, MAO Mingguang

Key Laboratory of Mariculture Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: *Gadus macrocephalus* is a marine teleost that is economically important throughout the world. The species has a high nutritional value and is processed into a variety of products. As a result of the increase in fisheries targeting this species, the abundance of wild populations has declined. Our laboratory has successfully carried out artificial breeding and rearing of *G. macrocephalus*. However, we observed significant mortality as a result of immune system dysfunction. To improve artificial breeding techniques for *G. macrocephalus*, the molecular mechanisms and expression characteristics of immune-related genes needs to be understood. Interferon regulatory factor 3 (IRF3) is a member of the interferon regulatory factor family. It is an important transcription factor for the expression of the interferon α/β gene and plays an important role in the host antiviral response mechanism. We obtained a cDNA sequence of *G. macrocephalus* IRF3 gene for the first time using gene cloning. The sequence was 1878 bp in length with a whole open reading frame (ORF) of 1377 bp that encoded a 459 amino acid protein. The molecular weight of the encoded protein was ~51 kDa. Amino acid sequence alignment revealed that the protein included a DNA binding domain (DBD) containing five conserved tryptophan residues and a conserved C-terminal IRF association domain (IAD). The phylogenetic tree revealed that the IRF3 of *G. macrocephalus* was clustered with the IRF3 of other species, distant from IRF1 and IRF2. The tissue and age-specific expression of IRF3 was detected using absolute quantitative PCR. Additionally, the effect of interferon during the larval stages was analyzed. The expression levels were highest in the gonad, liver, and thymus. The copy number of IRF3 in the different tissues was: 231.244 copies/ng, 516.649 copies/ng, 695.158 copies/ng, 2128.273 copies/ng, 198.548 copies/ng, 101.758 copies/ng, 419.927 copies/ng, 13.016 copies/ng, 1102.775 copies/ng, and 13.016 copies/ng in the intestine, heart, thymus, gonad, gill, muscle, spleen, brain, liver, and kidney, respectively. The expression of IRF3 was detected in fertilized eggs and remained relatively constant to 5 d post-hatching (dph) but increased by 25 dph. The copy number of IRF3 at different ages was: 6.189 copies/ng, 6.809 copies/ng, 8.066 copies/ng, 5.009 copies/ng, 5.009 copies/ng, 10.390 copies/ng, and 10.390 copies/ng in the fertilized egg, 1 dph, 5 dph, 9 dph, 17 dph, 25 dph, or 33 dph, respectively. Our results suggest that the gonad, liver, and thymus are the primary organs for IRF3 expression. Additionally, our results suggest that interferon plays an antiviral role at 25 dph. The results of this study lay the foundation for further study of the mechanism of interferon action during the early development of *G. macrocephalus* and provide basic data for studies of the immune system function in *G. Macrocephalus*.

Key words: *Gadus macrocephalus*; IRF3; interferon; absolute quantitative PCR

Corresponding author: MAO Mingguang. E-mail: mmg@dlou.edu.cn