

# 大黄鱼(*Larimichthys crocea*) I 型干扰素 基因的特征与表达分析\*

李 婵 姚翠鸾

(集美大学水产学院 农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门 361021)

**提要** 采用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术克隆了大黄鱼(*Larimichthys crocea*) I 型干扰素基因全长 cDNA 序列及其基因组序列, 并利用荧光定量 PCR 技术研究了该基因在大黄鱼不同组织中的表达谱, 以及副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、LPS、poly I:C 刺激后大黄鱼脾脏、肝脏和头肾组织中该基因在转录水平的表达变化。结果表明, 大黄鱼 I 型 IFN 基因全长 cDNA 为 878bp, 开放阅读框 558bp, 编码 185 个氨基酸。推测的大黄鱼 I 型 IFN 氨基酸序列 N 端含有 20 个氨基酸的信号肽, 其后包含一个保守的 IFab<sub>d</sub> 结构域。大黄鱼 I 型 IFN 基因包含 5 个外显子, 4 个内含子, 在大多数组织和细胞中都有表达, 其中在血细胞中表达量最高, 肌肉中表达量最低。Poly I:C 刺激可诱导大黄鱼 I 型干扰素基因在脾脏、头肾和肝脏中的表达量显著上调; LPS 刺激可诱导大黄鱼 I 型干扰素基因在脾脏和肝脏中的表达量显著上调; 灭活的副溶血弧菌可诱导大黄鱼 I 型干扰素基因在头肾和肝脏中的表达量显著上调。

**关键词** 大黄鱼; I 型干扰素; 结构特征; 免疫反应

**中图分类号** S432.1

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国近海特有的重要海水经济鱼类, 也是目前我国养殖量最大的海水鱼类之一(王志勇等, 2002)。近年来, 由于养殖环境的恶化、自身抗病力下降等因素, 大黄鱼的病毒性疾病和细菌性疾病频发, 严重威胁其健康养殖。近年来, 本实验室开展了大黄鱼 TLR9 (Yao *et al.*, 2008)、MyD88 (Yao *et al.*, 2009)、IRF1 (Yao *et al.*, 2010)、TLR3 (Huang *et al.*, 2011)、IRF3 和 IRF7 (Yao *et al.*, 2012)等抗病相关基因的研究, 为深入了解大黄鱼的免疫机制奠定了一定基础。

干扰素(Interferon, IFN)是一种具有广谱抗病毒活性的糖蛋白(Isaacs *et al.*, 1957), 在细胞和机体受到病毒感染或受核酸、细菌内毒素等诱导后由单核细胞和淋巴细胞产生的细胞因子(Joklik, 1990), 能在病毒感染后几小时内迅速起作用(张义兵等, 2000)。除抗病毒功能外, IFN 还在调节机体细胞的生长和分化、

诱导特异性免疫反应等方面具有重要作用(Stark *et al.*, 1998; Samuel, 2001; Sen, 2001)。目前发现的鱼类 IFN 至少有两类, 包括 I 型 IFN 和 II 型 IFN(张义兵等, 2004; Robertsen, 2006)。目前, 已经在斑马鱼(*Danio rerio*) (Altmann *et al.*, 2003)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Ohtani *et al.*, 2012)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Casani *et al.*, 2009)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Kitao *et al.*, 2009)、石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*) (Ohta *et al.*, 2011)等硬骨鱼中克隆到了 I 型 IFN 基因, 并发现其在鲤鱼、舌齿鲈、石斑鱼等抗病毒过程中具有重要作用。

本研究利用 RT-PCR 和 RACE-PCR 克隆了大黄鱼 I 型 IFN 基因, 并在此基础上, 克隆到了其基因组序列, 对其基因与蛋白质结构进行了分析及预测, 构建了分子系统进化树, 并利用荧光定量 PCR 技术研究了该基因在大黄鱼不同组织, 以及受到副溶血弧

\* 国家重点基础研究发展计划(973)项目, 2011CB111604 号; 国家自然科学基金资助项目, 31101882 号。李 婵, E-mail: weishengwu2007@126.com

通讯作者: 姚翠鸾, 教授, E-mail: clyao@jmu.edu.cn

收稿日期: 2012-03-30, 收修改稿日期: 2012-05-25

菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、LPS、poly I:C 刺激后脾脏、肝脏和头肾中该基因在转录水平的表达谱,为深入了解大黄鱼 IFN 基因的结构、功能及在鱼类免疫学中的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验大黄鱼与免疫刺激

大黄鱼购自福建省宁德市三都镇象溪村海区,体重(80.7±22.2)g,体长(16.6±1.5)cm。在室内曝气暂养一周后,取其皮肤、肌肉、鳃、肝脏、脾脏、心脏、肾、胃、肠、头肾、脑组织,组织分离后迅速置于 RNA 保护液中,4℃ 过夜,然后转移到-20℃ 保存。断尾取血与柠檬酸钠抗凝剂按照 1:1 比例混合,4℃ 800g 离心 5min,弃上清,血细胞迅速置于 RNA 保护液中,在 4℃ 过夜,然后转移到-20℃ 保存。

根据 Huang 等(2011)实验注射剂量,分别以 0.25ml 福尔马林灭活的副溶血弧菌( $1 \times 10^8$  CFU/ml) 0.25ml, LPS (L2880, Sigma, 1mg/ml)和 0.25ml poly I:C (27472901, GE, 1mg/ml)进行腹腔注射,作为 3 个免疫刺激组,每尾注射 0.25ml pH 7.4 磷酸盐缓冲液的大黄鱼作为对照组。实验组与对照组分别于刺激后 3h、6h、12h、24h、48h、72h 取样,每个时间点所取组织为肝脏、脾脏、头肾,每个组织取自 6 尾鱼。

### 1.2 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成

采用 Trizol(Invitrogen)总 RNA 提取方法,参照产品说明书进行。cDNA 第一链的合成按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)进行。

### 1.3 大黄鱼 I 型 IFN 基因的克隆与测序分析

大黄鱼 I 型 IFN 基因同源片段克隆:根据已知同源物种 I 型 IFN 基因序列设计两对引物:

IFN C F<sub>1</sub>: 5'-ATGCTCAACAGGATTTTCT-3'  
IFN C R<sub>1</sub>: 5'-TCAGCTCCCAGGCTTCAGC-3'  
IFN C F<sub>2</sub>: 5'-GGCTAATAACTCCACTAAC-3'  
IFN C R<sub>2</sub>: 5'-TGTGTTCTCCTCCCATGA-3'

采用巢式 PCR 扩增大黄鱼 I 型 IFN 基因同源片段。200μl 的 PCR 管中,加入如下反应体系: 10×Taq buffer 2μl, dNTPs (TaKaRa, 2.5mmol/L) 1.6μl, 正向引物 IFN C F<sub>1</sub> (10μmol/L) 1μl, 反向引物 IFN C R<sub>1</sub> (10μmol/L) 1μl, 模板(皮肤 cDNA) 1μl, Taq 酶 (TaKaRa, 5U/μl) 0.2μl, 用灭菌双蒸水补齐 20μl。PCR 反应程序: 94℃ 3min, 94℃ 45s, 50℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃ 8min。PCR 第一轮扩增后,在 20μl PCR 反应体系中,以 PCR 扩增产物 1μl 作为模板,引物 IFN C F<sub>2</sub> (10μmol/L) 1μl 和 IFN C R<sub>2</sub> (10μmol/L)

1μl, 进行第二轮 PCR 扩增,退火温度改为 52℃,其它反应条件同前。

3'末端的克隆:根据已获得的大黄鱼 I 型 IFN 基因同源片段序列设计 3' RACE 特异性引物:

IFN 3F<sub>1</sub>: 5'-ACAGCCAGGCGTCCAAAG-3'  
IFN 3F<sub>2</sub>: 5'-TCAGTTTCTGGAGGAGGC-3'

巢式 PCR 第一轮用接头引物 AOLP (5'-GGCCA CGCGTCGACTAGTAC(T)<sub>16</sub>-3')和 IFN 3F<sub>1</sub> 扩增,第二轮 PCR 用接头引物 AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3')和 IFN 3F<sub>2</sub> 扩增。反应体系中引物各加 0.5μl,其它体系同上。第一轮 PCR 反应程序中退火温度为 56℃,第二轮 PCR 反应程序中退火温度为 58℃,其它程序同前。

5'末端的扩增:合成的 cDNA 第一链经 DNA 片段纯化试剂盒(TaKaRa)纯化后,用末端转移酶 (TdT)(Fermentas),在新合成的 cDNA 末端加上 poly C 尾,作为 5' RACE PCR 的模板,用接头引物 AAP(5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(G)<sub>10</sub>-3')和基因特异性引物 IFN C R<sub>1</sub> 进行第一轮扩增,AP 和 IFN C R<sub>2</sub> 为引物进行第二轮扩增。反应体系同 3' RACE PCR。第一轮反应程序的退火温度为 55℃,延伸时间 40s,其它条件同前。第二轮 PCR 扩增,退火温度改为 53℃,延伸 30s,其它反应条件同前。

琼脂糖电泳检测上述 PCR 产物,按照 GenClean 柱式琼脂糖凝胶回收试剂盒(上海捷瑞)说明回收目的条带,连接到 pMD 19-T 载体(TaKaRa)上,转化到 *E. coli* TOP 10 感受态细胞中,菌液 PCR 检测重组子,阳性克隆由上海美吉公司进行测序。

### 1.4 大黄鱼 I 型 IFN 基因组 DNA 序列扩增

根据已获得的大黄鱼 I 型 IFN 全长 cDNA 序列,设计包含整个 ORF 的基因特异引物:

IFN O F: 5'-ACCTGGACACATCCGACTT-3'  
IFN O R: 5'-ACAAACTGCTCCGTGATT-3'

200μl 的 PCR 管中,加入如下反应体系: 10×LA Taq buffer 2μl, dNTPs (TaKaRa, 2.5mmol/L) 1.6μl, 正向引物 IFN O F (10μmol/L) 1μl, 反向引物 IFN O R (10μmol/L) 1μl, 模板(基因组 DNA) 1μl, LA Taq 酶 (TaKaRa, 5U/μl) 0.2μl, 用灭菌双蒸水补齐 20μl。PCR 反应程序: 94℃ 3min, 94℃ 45s, 49℃ 30s, 72℃ 70s, 30 个循环; 72℃ 8min。

### 1.5 基因序列分析

利用 NCBI BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性和相似性分析;使用 DNASTar 软件对序列进行拼接和编码;利用 Clustal W

工具(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行序列多重比对分析; 使用 EXPASY 工具(<http://www.expasy.org>)进行氨基酸序列分析; 利用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de>)预测保守结构域、信号肽和跨膜区; 运用在线软件 NetNGlyc 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>)预测 N-连接的糖基化位点, NetOGlyc 3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>)预测 O-连接的糖基化位点; 采用 MEGA 4.1 软件用邻位相接法(NJ法)构建系统进化树, 所用相近物种序列见表 1。

### 1.6 荧光定量 PCR 分析大黄鱼 I 型 IFN 的表达

以正常和免疫刺激后的大黄鱼组织为材料, 以反转录合成的 cDNA 第一条链为模板,  $\beta$ -actin 为内参照基因, 应用 Real-time PCR 检测方法对大黄鱼 I 型 IFN 基因进行相对定量分析。优化好的荧光定量 PCR 反应体系为 20 $\mu$ l, 每个反应包括: 2 $\times$ SYBR Green real-time PCR Master Mix 9 $\mu$ l, 正反向引物(10 $\mu$ mol/L)各 0.5 $\mu$ l, cDNA 模板 1 $\mu$ l, 灭菌超纯水 9 $\mu$ l。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2min, 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 68 $^{\circ}$ C 32s, 40 个循环。反应完成后对反应管内的产物进行熔解曲线分析, 以判断扩增产物的特异性。使用 SDS software version 2.0 (Perkin-Elmer Applied Biosystems)对荧光定量 PCR 反应的数据进行分析, 同时利用 SPSS 15.0 统计软件对数据进行非配对样本差异显著性检验分析(One-Way ANOVA, Duncan),  $P < 0.05$  为达到显著水平( $n=6$ )。最后用 Origin 7 作图。

## 2 结果

### 2.1 大黄鱼 I 型 IFN 基因全长 cDNA 的克隆

以大黄鱼皮肤 cDNA 为模板, 用引物 IFN C F1/IFN C R1 和 IFN C F2/IFN C R2 进行巢式 PCR 扩增, 获得了 308bp 特异性的目的条带。对其测序序列 BLAST 结果表明, 获得的序列为大黄鱼 I 型 IFN 基因。根据所得到的大黄鱼 I 型 IFN 基因同源片段序列, 采用 RACE-PCR 方法, 以大黄鱼皮肤 cDNA 为模板, 进行 I 型 IFN 基因 3'端和 5'端序列扩增, 3'RACE 得到 584bp 片段, 5'RACE 得到 353bp 片段。对其测序分析后发现与其它鱼类 I 型 IFN 同源性较高, 确定为大黄鱼 I 型 IFN 基因。

将同源克隆、5'RACE 和 3'RACE 获得的大黄鱼 I 型 IFN 基因的三个片段序列运用 DNASTAR 分析软件中的 SeqMan 软件进行拼接后得到大黄鱼 I 型 IFN 基因 cDNA 全长序列, 并对序列验证。采用 NCBI BlastX 在线分析表明克隆到的大黄鱼 I 型 IFN 基因全长 cDNA 序列与舌齿鲈和真鲷(*Sparus aurata*)的 IFN 基因(Interferon)的同一性分别为 85%、83%, 与石斑鱼和牙鲆的 I 型 IFN 基因(Type I IFN)的同一性分别为 75%、70%。序列分析显示, 大黄鱼 I 型 IFN 基因全长为 878bp, 包括 62bp 的 5'端非翻译区(5'-UTR), 258bp 的 3'-UTR, 558bp 的开放阅读框(ORF), 编码 185 个氨基酸。3'非翻译区包含 5 个 RNA 不稳定基序(ATTTA), 加尾信号(AATAAA)在 poly A 尾上游 19bp 处。如图 1 所示。

表 1 构建 I 型 IFN 基因系统进化树所使用的蛋白序列信息

Tab.1 The putative type I IFN protein sequences used for multiple alignments and phylogenetic analysis

物种	常用英文名	蛋白名称	登录号
<i>Dicentrarchus labrax</i>	European sea bass	Interferon	CBN81667.1
<i>Sparus aurata</i>	Gilthead sea bream	Interferon	CAP72359.2
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Japanese flounder	type I interferon	AET71736.1
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia	Interferon $\alpha$ -4-like	XP_003453448.1
<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Sevenband grouper	type I interferon	BAJ79339.1
<i>Oryzias latipes</i>	Japanese medaka	type I interferon	CAM32419.1
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu rubripes	type I interferon	CAM82750.1
<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	Interferon $\alpha$ 2	ABD39321.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	type I interferon 1	CAM28541.1
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	Interferon	CAD67754.1
<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp	type I interferon	BAG68521.1
<i>Gallus gallus</i>	Chicken	Interferon	AAA50213.1
<i>Ovis aries</i>	Sheep	Interferon $\alpha$	CAA41790.1
<i>Homo sapiens</i>	Human	Interferon	CAA23802.1
<i>Cavia porcellus</i>	Domestic guinea pig	Interferon $\alpha$ -4-like	XP_003479029.1



### 3 讨论

本研究克隆了大黄鱼 I 型 IFN 基因全长 cDNA 序列, 全长 878bp, 包括 62bp 的 5'-UTR, 258bp 的 3'-UTR, 558bp 的 ORF, 编码 185 个氨基酸。大黄鱼 I 型 IFN 基因 3'非翻译区包含 5 个 RNA 不稳定基序(ATTTA), 大西洋鲑(*Salmo salar*)有 4 个 (Robertsen *et al*, 2003), 石斑鱼多达 12 个(Ohta *et al*, 2011)。3'非翻译区存在 5—6 个 RNA 不稳定基序会导致 mRNA 不稳定 (Clark *et al*, 2003; Huang *et al*, 2011), 这些结果表明大黄鱼 I 型 IFN 基因含有较多的 RNA 不稳定基序, 推测本研究所获得的大黄鱼的 I 型 IFN 的 mRNA 不稳定性可能较高。

使用 SMART 软件对大黄鱼 I 型 IFN 进行蛋白质结构分析显示, 在其 N 末端具有 20 个氨基酸的信号肽序列, 信号肽之后的氨基酸残基包含一个 Ifabd (Interferon alpha, beta and delta) 结构域, 该结构域是 IFN 家族的特征结构域, 为细胞因子受体结合区域。大黄鱼 I 型 IFN 基因与舌齿鲈和真鲷的 IFN 基因的同源性分别为 85%、83%, 与石斑鱼和牙鲆的 I 型 IFN 基因的同源性分别为 75%、70%。因此, 初步推断出所克隆的 IFN 基因为 I 型 IFN。与其它物种一样(Casani *et al*, 2009; Ohta *et al*, 2011), 大黄鱼 I 型 IFN 包含 2 个保守的半胱氨酸残基(Cys<sub>23</sub>和 Cys<sub>125</sub>), 形成一个二硫键, 稳定 I 型 IFN 的高级结构。鱼类 I 型 IFN 根据其所含二硫键的数目分为两类, 分别是含一个二硫键的 IFNa, 含两个二硫键的 IFNb 和 IFNc (Zou *et al*, 2007; Sun *et al*, 2009)。依据这一分类方法, 推测大黄鱼 I 型 IFN 基因为 IFNa。

系统进化树分析显示, 所有鱼类聚为一支, 其它陆生动物聚为一支。鱼类中, 大黄鱼 I 型 IFN 基因与同属于鲈形目的舌齿鲈和真鲷的亲缘关系最近, 与

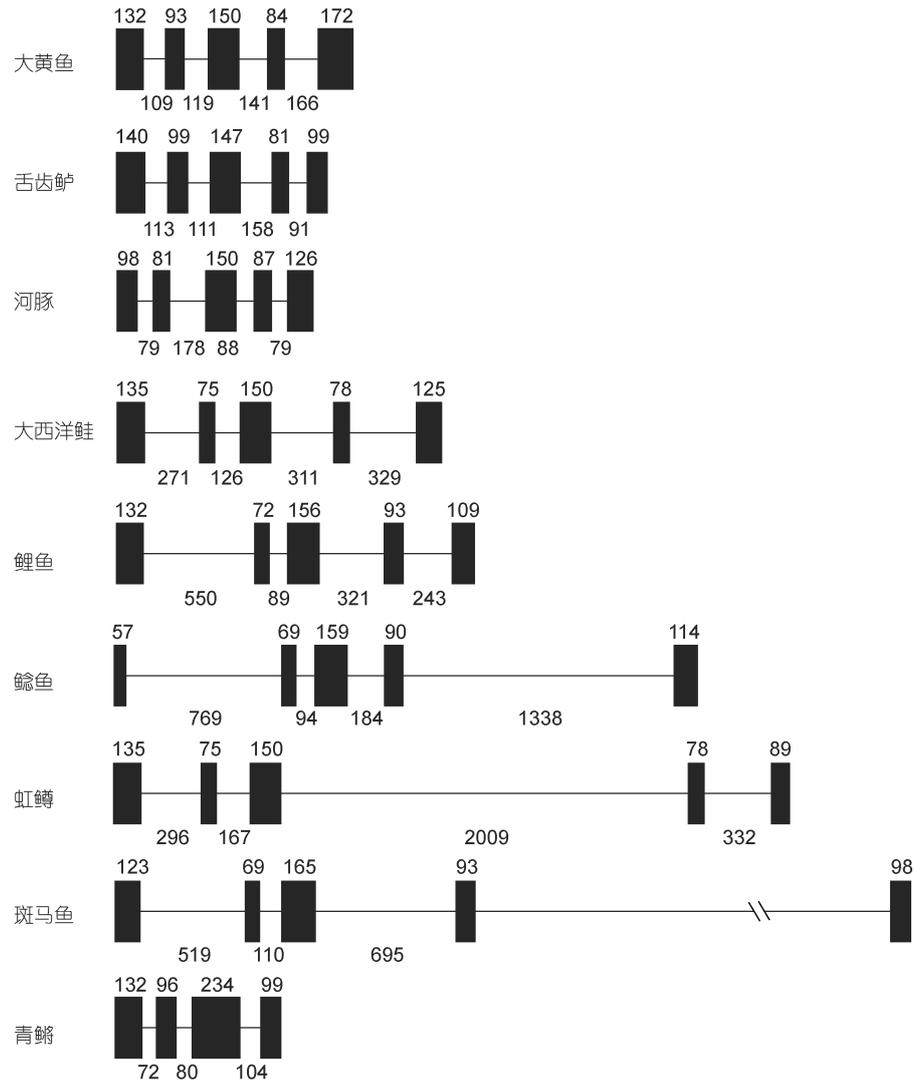


图 2 I 型 IFN 基因组结构图

Fig.2 Genomic structure of type I IFN in fish

GenBank 登录号: 舌齿鲈(AM946399)、河豚(AJ583023)、鲤鱼(AB376667)、鳊鱼 (AY267538)、大西洋鲑(AAP51035)、虹鳟(AM489415)、斑马鱼(AJ544820)、青鳉 (BN001095)

鲤形目的斑马鱼和鲤鱼的亲缘关系较远, 这与传统分类的结果一致。鸟类和哺乳动物 I 型 IFN 无内含子, 而大多数鱼类 I 型 IFN 有 4 个内含子(Coulombel *et al*, 1991; Sheppard *et al*, 2002; Casani *et al*, 2009)。大黄鱼 I 型 IFN 与大多数硬骨鱼的基因组结构相似, 都包含 5 个外显子 4 个内含子, 提示鱼类的 I 型 IFN 在进化上可能比较保守。

在正常情况下, 生物机体一般在病毒和细菌感染, 或者 poly I:C 等诱导剂人工诱导下分泌 IFN, 此外, 在部分组织和细胞中可以检测到 IFN 的组成型表达(张义兵等, 2004)。本研究利用荧光定量 PCR 技术检测了大黄鱼的 12 个组织的 I 型 IFN 的组成型表达

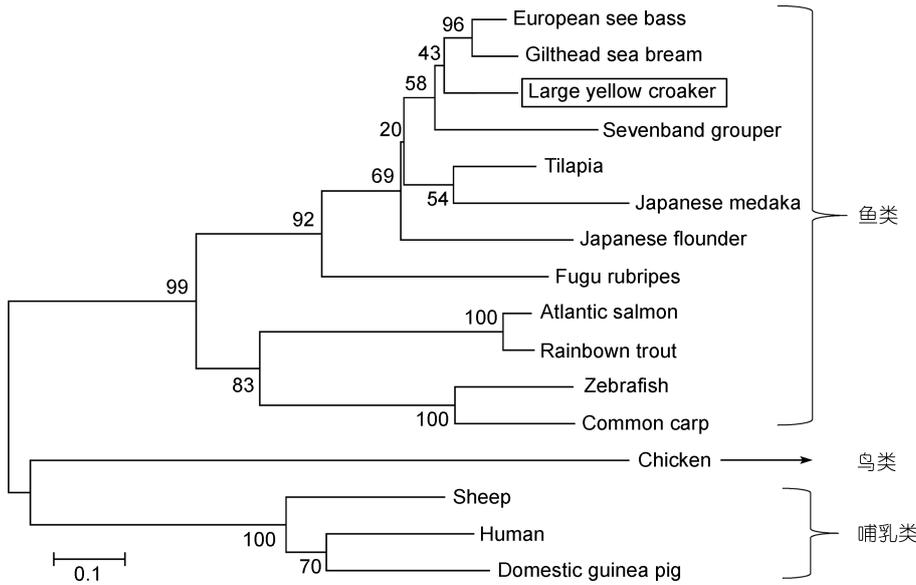


图3 IFN 基因系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of IFN sequence

注: 氨基酸序列比对采用 CLUSTAL W, 采用 NJ 法构建进化树, 所用序列的 GenBank 登录号见表 1

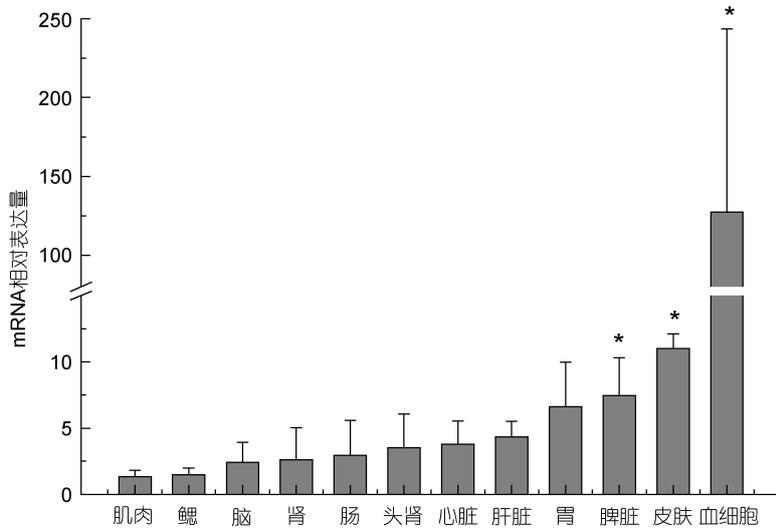


图4 大黄鱼 I 型 IFN 基因的组织表达谱

Fig.4 Tissue expression of type I IFN in large yellow croaker

注: 图中\*表示差异显著( $P < 0.05$ )

情况, 以及 LPS、poly I:C 和福尔马林灭活的副溶血弧菌刺激后脾脏、头肾和肝脏中该基因在转录水平的表达变化情况。研究结果显示, 大黄鱼 I 型 IFN 基因在血细胞中的表达量最高, 其次是皮肤和脾脏, 其它组织中也能检测到, 但表达量较低, 最低的是肌肉组织。I 型 IFN 的组成型表达在牙鲆(Ohtani *et al*, 2012)中也被检测到, 但是在不同组织中的表达丰度与大黄鱼不同, 这可能是由于不同物种、或者不同的生理

状态、发育阶段及遗传背景造成的。而在鲤鱼(Kitao *et al*, 2009)中, 利用 RT-PCR 技术从肠、肝脏、鳃、头肾、肌肉、脾脏和中肾中未检测到鲤鱼 I 型 IFN 组成型表达。造成这一结果的原因可能是荧光定量 PCR 技术较 RT-PCR 技术的检测灵敏度高, 可以检测出少量表达的 IFN。

IFN 作为重要的先天性免疫细胞因子在抵御病毒和细菌感染中发挥重要的作用(Isaacs, 1962)。目前, 多数文献报道了硬骨鱼类 IFN 的抗病毒功能以及体外重组 IFN 的生物活性, 对病原菌或者病原模式分子刺激后, 鱼类主要免疫器官中 IFN 的表达变化研究相对较少。poly I:C 刺激后, 大黄鱼 I 型 IFN 基因在脾脏、头肾和肝脏中的表达量都有不同程度地上调, 峰值分别出现 48h、12h 和 3h, 表达量的最高值出现在 poly I:C 刺激后 48h 的肝脏中, 是对照组的 16.6 倍( $P < 0.05$ )。这一结果与已有的报道基本保持一致, 例如, poly I:C 刺激后, 斑马鱼(Altmann *et al*, 2003)体外培养的肝脏细胞(ZFL cells)被诱导分泌 I 型 IFN; 石斑鱼(Ohta *et al*, 2011)头肾组织以及体外培养的头肾细胞被诱导产生 I 型 IFN 等。LPS 刺激诱导大黄鱼脾脏在刺激后 72h 及肝脏在刺激后 48h I 型 IFN 的表达量显著上调( $P < 0.05$ ); 弧菌

刺激可以诱导大黄鱼头肾在刺激后 6h 及肝脏在刺激后 24h I 型 IFN 的表达量显著上调( $P < 0.05$ ), 提示大黄鱼的干扰素不仅可以受到病毒类似物的诱导, 也可以受细菌或者细菌模式分子的诱导, 提示大黄鱼 I 型 IFN 可能在抵御病毒和细菌感染的免疫反应中发挥重要作用。但在三种免疫刺激物中, poly I:C 刺激下, 大黄鱼 I 型 IFN 的诱导表达速度最快, 表达丰度最高。这一结果与鲤鱼(Kitao *et al*, 2009)的表达模式

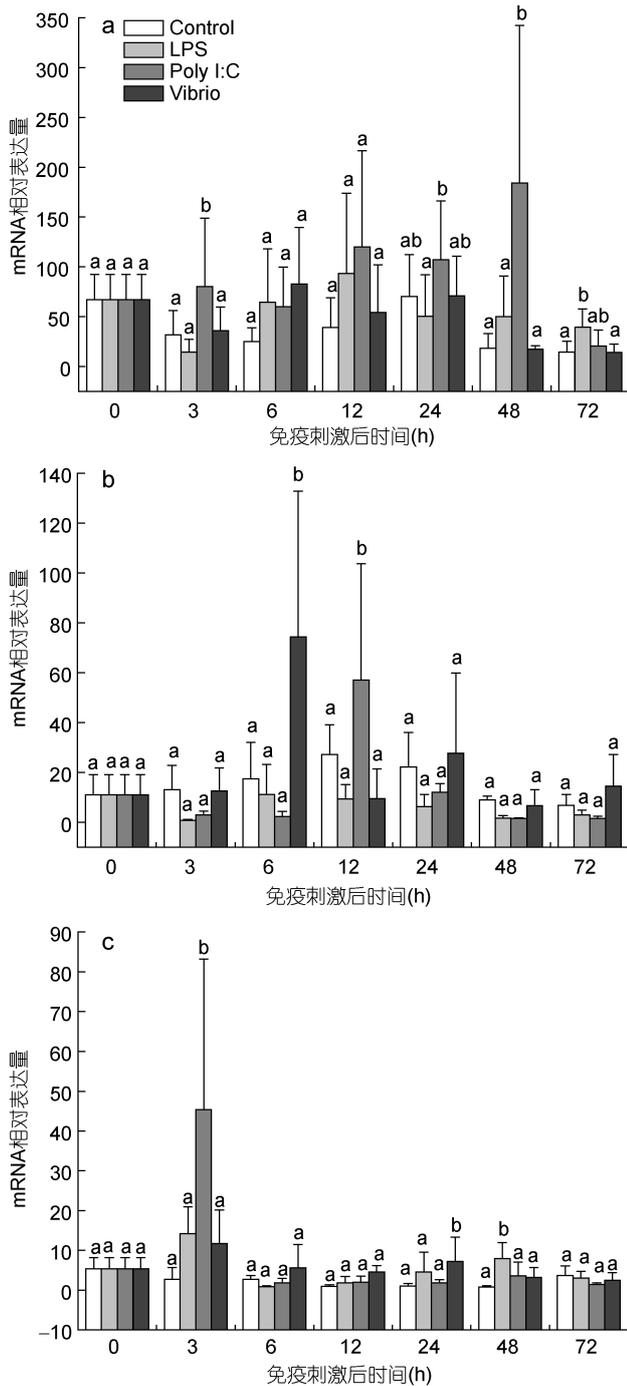


图5 免疫刺激后大黄鱼 I 型 IFN 基因在脾脏(a)、头肾(b)和肝脏(c)中的表达变化

Fig.5 Type I IFN expression changes in spleen(a), head-kidney (b), and liver (c) in large yellow croaker after immune challenge  
注: 图中柱上 a、b 表示差异显著( $P < 0.05$ )

相近。这些结果表明鱼类 I 型 IFN 基因在抵御病毒感染的免疫反应中发挥更重要的功能。

#### 参 考 文 献

王志勇, 王艺磊, 林利民等, 2002. 福建官井洋大黄鱼 AFLP

- 指纹多态性的研究. 中国水产科学, 9: 198—202
- 张义兵, 张奇亚, 桂建芳, 2004. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定. 水生生物学报, 28: 317—322
- 张义兵, 俞小牧, 2000. 鱼类干扰素的研究进展. 中国水产科学, 7: 91—101
- Altmann S M, Mellon M T, Distel D L *et al*, 2003. Molecular and Functional Analysis of an Interferon Gene from the Zebrafish, *Danio rerio*. J Virol, 77: 1992—2002
- Casani D, Randelli E, Costantini S *et al*, 2009. Molecular characterisation and structural analysis of an interferon homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Mol Immunol, 46: 943—952
- Clark A R, Dean J L E, Saklatvala J, 2003. Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. FEBS Letters, 546: 37—44
- Coulombel C, Vodjdani G, Doly J, 1991. Isolation and characterization of a novel interferon-[alpha]-encoding gene, IFN-[alpha] 11 within a murine IFN cluster. Gene, 104: 187—195
- Huang X N, Wang Z Y, Yao C L, 2011. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish Shellfish Immunol, 31(1): 98—106
- Isaacs A, 1962. Antiviral action of interferon. Br Med J, 2: 353—355
- Isaacs A, Lindenmann J, 1957. Virus interference. I. The interferon. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 147: 258
- Joklik W, 1990. Interferons. Virology, 1: 383—410
- Kitao Y, Kono T, Korenaga H *et al*, 2009. Characterization and expression analysis of type I interferon in common carp *Cyprinus carpio* L. Mol Immunol, 46: 2548—2556
- Ohta T, Ueda Y, Ito K *et al*, 2011. Anti-viral effects of interferon administration on sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Fish Shellfish Immunol, 30: 1064—1071
- Ohtani M, Hikima J, Hwang S D *et al*, 2012. Transcriptional regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Dev Comp Immunol, 36: 697—706
- Robertsen B, 2006. The interferon system of teleost fish. Fish Shellfish Immunol, 20: 172—191
- Robertsen B, Bergan V, Røkenes T *et al*, 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. J Interferon Cytokine Res, 23: 601—612
- Samuel C E, 2001. Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev, 14: 778
- Sen G C, 2001. Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol, 55: 255—281
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W *et al*, 2002. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol, 4: 63—68
- Stark G R, Kerr I M, Williams B R G *et al*, 1998. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem, 67: 227—264
- Sun B, Robertsen B, Wang Z *et al*, 2009. Identification of an

- Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev Comp Immunol*, 33: 547—558
- Yao C L, Kong P, Huang X N *et al*, 2010. Molecular cloning and expression of IRF1 in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 654—660
- Yao C L, Kong P, Wang Z Y *et al*, 2008. Cloning and expression analysis of two alternative splicing toll-like receptor 9 isoforms A and B in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 648—656
- Yao C L, Kong P, Wang Z Y *et al*, 2009. Molecular cloning and expression of MyD88 in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol*, 26: 249—255
- Yao C L, Huang X N, Fan Z J *et al*, 2012. Cloning and expression analysis of interferon regulatory factor (IRF) 3 and 7 in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Fish Shellfish Immunol*, 32(5): 869—878
- Zou J, Tafalla C, Truckle J *et al*, 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J Immunol*, 179: 3859—3871

## MOLECULAR AND EXPRESSION CHARACTERIZATIONS OF TYPE I INTERFERON FROM LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

LI Chan, YAO Cui-Luan

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture; Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

**Abstract** The full length cDNA and genomic sequence of type I interferon (type I IFN) was cloned from large yellow croaker *Larimichthys crocea* by RT-PCR and RACE-PCR. The tissue expression and temporal expression profiles of *LcIFN I* gene after the stimulation with LPS, poly I:C and pathogenic bacteria *Vibrio parahemolyticus* were described. Our results showed that the full-length cDNA of *LcIFN I* was 878bp, and open reading frame (ORF) was 558bp, which encoded 185 amino acids. A signal peptide including 20 amino acid residues was at N-terminal, and an IFab<sub>d</sub> (Interferon alpha, beta and delta) domain was next to signal peptide. *LcIFN I* genomic sequence consisted of five exons and four introns. Quantitative real-time PCR analysis indicated a broad expression of *LcIFN I* in most detected tissues, with the most predominant expression in blood cells and the weakest expression in muscle. After injection with poly I:C, *LcIFN I* expression levels showed up-regulation in head-kidney, liver and spleen; After injection with LPS, *LcIFN I* expression levels showed up-regulation in liver and spleen; *LcIFN I* transcripts showed up-regulation in the liver and head-kidney after *V. parahemolyticus* injection. Our results suggested that type I IFN might play an important role in large yellow croaker anti-viral and bacterial immune response.

**Key words** *Larimichthys crocea*; Type I interferon; characterization; immune response