# 半滑舌鳎 *IRF*-7 基因的全长 cDNA 克隆及表达分析

刘万建[1,2] 史成银[2*] 宋 展[3] 耿伟光[2] 李 赟[1] 黄 倢[2]

([1]中国海洋大学教育部 海水养殖重点实验室,青岛 266003)

([2]农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071)

([3]山东理工大学,淄博 255049)

**摘 要** 本研究克隆了半滑舌鳎干扰素调节因子 7 (*CsIRF*-7) cDNA 的全长序列,并对该基因进行了结构特征分析,同时还完成了该基因在半滑舌鳎各组织中表达水平的定量分析。结果表明,*CsIRF*-7 基因 cDNA 全长为 1 957 bp,其中包含 48 bp 的 5′-UTR、1 302 bp 的 ORF 和 607 bp 的 3′-UTR。*CsIRF*-7 cDNA 编码一个由 433 个氨基酸残基组成的多肽。氨基酸序列比对结果表明,CsIRF-7 多肽与脊椎动物 IRF-7 相似,存在高度保守的 3 个结构域:DNA 结合域(DNA binding domain,DBD)、干扰素相关区(IRF associated domain,IAD)和丝氨酸富含区(Serine-rich domain,SRD)。全长氨基酸序列同源性分析发现,CsIRF-7 与硬骨鱼类的 IRF-7 同源性较高,与 4 种硬骨鱼类的同一性和相似性分别介于 48.5%~73.6%和 65.4%~83.8%之间;其中与牙鲆的同一性和相似性最高,分别为 73.6%和 83.8%;而与哺乳类和鸟类 IRF-7 的同源性较低,其同一性和相似性分别仅为 30.3%~32.2%和 46.5%~52.5%。系统进化分析表明,*CsIRF*-7 与硬骨鱼类的 *IRF*-7 聚为一类,并与其他脊椎动物的 *IRF*-7 和 *IRF*-3 共同组成了脊椎动物 IRF-3 亚家族。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,*CsIRF*-7 基因在半滑舌鳎的肝、肾、脾、血细胞、鳃、肠和心脏等 7 种检测的组织中均有表达,在肠中表达量最高,而在肝、鳃和血细胞中表达量相对较少。

**关键词** 半滑舌鳎 干扰素调节因子 7 Poly I:C 基因克隆 表达分析

**中图分类号** S917.4 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2012)05-0039-09

# Molecular cloning and tissue expression of *IRF*-7 gene of *Cynoglossus semilaevis*

LIU Wan-jian[1,2] SHI Cheng-yin[2*] SONG Zhan[3]
GENG Wei-guang[2] LI Yun[1] HUANG Jie[2]

([1]Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

([2]Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

([3]Shandong University of Technology, Zibo 255049)

**ABSTRACT** The full-length cDNA sequence of interferon regulatory factor 7 (*IRF*-7) of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* was cloned by rapid amplification cDNA end (RACE) method. The full-length cDNA of *C. semilaevis IRF*-7 (*CsIRF*-7) is 1 957bp, containing a 48 bp 5′-

中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A0501)和国家重点基础研究发展计划课题(2006CB101802)共同资助

* 通讯作者。E-mail:shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期:2012-02-16;接受日期:2012-06-06

作者简介:刘万建(1985-),男,硕士研究生,主要从事水产养殖动物病害与免疫研究。E-mail:wanjian163@163.com,Tel:15966865191

untranslated region (5′-UTR), 1 302 bp open reading frame (ORF), and a 607 bp 3′-UTR. The putative amino acid sequence of CsIRF-7 contains 433 amino acid residues. Through protein sequence alignment of IRF-7 in vertebrates, we found that the IRF-7 contains three completely conserved residues across all species, which are DNA-binding domain (DBD), IRF associated domain (IAD) and serine-rich domain (SRD). In contrast to IRF-7 of vertebrates other than fish, the DBD which is highly conserved has five tryptophan repeats, while CsIRF-7 and other fish IRF-7s have only four tryptophans with the second tryptophan residue missing. The deduced amino acid sequence of CsIRF-7 exhibited a high-level of homology with other fish, and shared the highest similarity (83.8%) and identity (73.6%) with the IRF-7 of *Paralichthys olivaceus*. The CsIRF-7 shared a low-level of homology with mammalia and aves. Phylogenetic analysis revealed that the *C. semilaevis IRF*-7 was clustered into *IRF*-7 subgroup with fish *IRF*-7 and formed the *IRF*-3 subfamily with *IRF*-3 group and other vertebrates *IRF*-7. Quantitative real-time method was used to detect the *CsIRF*-7 mRNA expression in different tissues. The results showed that CsIRF-7 was expressed in all tested tissues including liver, kidney, spleen, gill, intestine, blood cells, and heart. The high-level expression of CsIRF-7 is detected in the intestine, heart, kidney, and spleen, while a lower-level expression in the liver, gill, and blood cells. These results will be helpful for further studies on functions of antiviral and antibacterial of *CsIRF*-7 gene.

**KEY WORDS** *Cynoglossus semilaevis* Interferon regulatory factor-7 Poly I:C Gene cloning Expression

干扰素(Interferon,IFN)是一类多功能的细胞因子,能诱导细胞产生抗病毒蛋白,在动物非特异免疫过程中起重要作用(Samuel *et al*. 2001)。干扰素调节因子(Interferon regulatory factor,*IRF*)是一种免疫调节因子,它最早作为调节干扰素转录的转录因子和干扰素诱导基因被发现(Mamane *et al*. 1999)。到目前为止,在脊椎动物中共发现有 11 种干扰素调节因子(*IRF*-1～*IRF*-11),其中 *IRF*-11 仅在硬骨鱼类中存在(Huang *et al*. 2010; Stein *et al*. 2007)。该家族基因在机体免疫系统中发挥多方面的作用,所有的 *IRF* 家族成员都参与了免疫应答,几乎所有的成员也都在细胞生长和凋亡过程中起到重要的调节作用(许巧情等 2010)。*IRF*-7 是研究较多的 *IRF*s 家族成员,也被认为是诱导 I 型干扰素及其免疫应答最重要的转录因子,对 I 型干扰素具有正反馈调节作用(Honda *et al*. 2005、2006; Sato *et al*. 1998; Marié *et al*. 1998; Levy *et al*. 2002)。

在鱼类中,*IRF*-7 最早在鲫 *Carassius auratus* 的 cDNA 差减文库中被筛选出来(Zhang *et al*. 2003),接着在乌鳢 *Channa argus*、虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 和斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 中也分别克隆得到了 *IRF*-7 基因(Jia *et al*. 2008; Kileng *et al*. 2009; Holland *et al*. 2008; Hu *et al*. 2010; Cui *et al*. 2011)。但是在鲆鲽类中,*IRF*-7 的研究仍然较少。由于鱼类的进化地位较低,其免疫机制又存在多样性和复杂性,关于鱼类的 *IRF*s 家族基因的相关研究还不多,*IRF*-7 在鱼类免疫中的功能还需要更多的研究数据来揭示。

半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 隶属硬骨鱼纲 Osteichthyes、鲽形目 Pleuronectiformes、鳎亚目 Soleoide、舌鳎科 Cynoglossidae、舌鳎属 *Cynoglossus*,为我国近海常见的温暖性底层鱼类,主要分布于我国渤海、黄海海域。自 2003 年半滑舌鳎人工繁殖取得成功以来,该鱼的人工养殖已在中国北方获得大面积推广。与此同时,围绕半滑舌鳎的发育生物学、性别控制和全雌苗种培育等方面也开展了较为深入的研究(Chen *et al*. 2007)。然而,对半滑舌鳎的免疫相关基因的研究相对较少,目前仅见 MHC 基因、TLR 基因、*MyD*88 基因

的报道（Xu *et al*.　2009；Yu *et al*.　2009；沙珍霞等　2010）。为此，本研究开展了半滑舌鳎 *IRF*-7 基因（*CsIRF*-7）全长 cDNA 的克隆、测序、结构和功能域的比对分析及该基因的组织表达分布研究，为进一步了解 *IRF*-7 在半滑舌鳎免疫应答中的作用打下了基础，同时也为半滑舌鳎抗病分子机理的研究提供依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物

半滑舌鳎 2010 年 6 月购自山东省海阳某养殖场，体重 200 ± 20 g。暂养 7d 后用于实验。其中用于克隆 *CsIRF*-7 基因全长 cDNA 的 1 尾半滑舌鳎，腹腔注射 1 mg 的 Polyinosinic：Polycytidylic acid（poly I：C），24 h 后取脾组织保存于 RNAlater 中备用。用于 *CsIRF*-7 的组织表达分析的 3 尾半滑舌鳎，不注射 poly I：C，直接取肝、肾、脾、鳃、血液细胞、肠和心脏等组织保存于 RNAlater 中备用。

### 1.2　RNA 提取和 cDNA 合成

将 **1.1** 中保存在 RNAlater 中的各组织，依照 QuickGene RNA Tissue Kit 试剂盒（Fuji Film 公司）说明书，分别提取样品总 RNA，然后用 RQ1 RNase-free DNase（Promega 公司）去除总 RNA 中的基因组 DNA，并用 NanoDrop 2000c 紫外分光光度计（Thermo 公司）测定 RNA 的浓度和纯度，取高质量的 RNA 用于 cDNA 合成。cDNA 末端快速扩增（RACE）所用 cDNA 由 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit（Clontech 公司）合成，qPCR 所用 cDNA 由 TransScript Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒（TransGen 公司）合成。合成的 cDNA 保存于－20℃备用。

### 1.3　*CsIRF*-7 cDNA 部分片段的克隆与测序

从 GenBank 中检索并下载部分硬骨鱼的 *IRF*-7 cDNA 序列，经多序列比对找出保守区，依照保守区序列设计简并引物 *CsIRF*7-F 和 *CsIRF*7-R（表 1）。25 μl PCR 反应体系包括：10×*EX Taq* Buffer 2.5 μl（TaKaRa 公司）、dNTP Mixture 2 μl（各 2.5mmol/L）、正反向引物各 1 μl（10mm）、*EX Taq* 0.15μl（TaKaRa 公司）、cDNA 模板 1 μl、RNase-free 水 17.35 μl。反应程序为：94℃预变性 1 min；94℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行纯化、克隆和测序，获得 *CsIRF*-7 cDNA 的部分片段序列。

### 1.4　应用 RACE 技术获得 *CsIRF*-7 基因的全长 cDNA 序列

依据 **1.3** 中测定的 *CsIRF*-7 cDNA 部分片段的序列，设计了 4 条 RACE 引物 *CsIRF*7-3F1、*CsIRF*7-3F2、*CsIRF*7-5R1 和 *CIRF*7-5R2（表 1），然后按照 SMART™RACE cDNA Amplification Kit（Clontech 公司）说明书分别进行 3′ RACE 和 5′ RACE 反应。PCR 反应程序为：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，70℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，6 个循环；94℃变性 30 s，68℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，30 个循环；72℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行纯化、克隆和测序。对测序结果进行拼接，最后获得 *CsIRF*-7 基因的全长 cDNA 序列。

### 1.5　序列比对与系统进化树构建

用 AccelrysGene 软件分析 *CsIRF*-7 基因的全长 cDNA 序列，预测其开放读码框（Open Reading Frame，ORF），推导出相应的氨基酸序列并预测蛋白质的分子量和等电点；用 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对，分析 CsIRF-7 多肽的结构特征；用 MatGAT 软件进行氨基酸同源数据分析（Campanella *et al*.　2003），最后应用 MEGA 4.0 软件的邻位相联法构建系统进化树。GenBank 号如下：牙鲆 *Paralichthys olivaceus*（*IRF*-1：AB005883，*IRF*-5：ADZ96215）、斑马鱼 *Danio rerio*（*IRF*-3：NP_001137376，*IRF*-4：XM_692638）、非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis*（*IRF*-7：XP_002938747）、人 *Homo sapiens*（*IRF*-1：CAA32624，*IRF*-2：CAA34073，

*IRF*-3:AAH09395,*IRF*-4:AAC50779,*IRF*-5:AAA96056,*IRF*-6:AAB84111,*IRF*-8:AAB63813),其余序列的 GenBank 检索号见表 2。

**表 1 实验所用引物及其序列**

Table 1 Primers used in this study

| 名称 Name | 序列 Sequence(5′-3′) | 用途 Application |
|---|---|---|
| *CsIRF*7-F | CAG AGT CCC CTG GAA (A/G)CA C | Homology PCR |
| *CsIRF*7-R | CAG (A/C)GG (A/G)AC CAC CTT GAC | Homology PCR |
| *CsIRF*7-3F1 | CCA GTG TTG CTC ACC CAA ACC CGA | 3′RACE first round PCR |
| *CsIRF*7-3F2 | GGC AGC TCC CCT CGC TAT ACC ATT AA | 3′RACE second round PCR |
| *CsIRF*7-5R1 | TAG ATT TTG TGC GGG TCG TCG GAG T | 5′RACE first round PCR |
| *CsIRF*7-5R2 | GGG GAA CTC GTT TAT TTT GCC ACT TG | 5′RACE second round PCR |
| *CsIRF*7-QF | GGA CTG TGC TAC GTG GGT C | Real-time PCR |
| *CsIRF*7-QR | GGT CGT CGG AGT TCT TGG | Real-time PCR |
| *β-actin* F | GTA GGT GAT GAA GCC CAG AGC A | Real-time PCR |
| *β-actin* R | CTG GGT CAT CTT CTC CCT GT | Real-time PCR |

**表 2 半滑舌鳎与 7 种脊椎动物 IRF-7 氨基酸序列的同源性比较**

Table 2 Amino acid sequence identity and similarity of CsIRF-7 with those of other 7 vertebrates

| 物种 Species | | GenBank No. | 同一性 Identity (%) | | 相似性 Similarity(%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | DBD | Whole | DBD | Whole |
| 鱼类 | | | | | | |
| 牙鲆 | *Paralichthys olivaceus* | ACY69214 | 85.2 | 73.6 | 92.6 | 83.8 |
| 斜带石斑鱼 | *Epinephelus coioides* | ADA57613 | 85.2 | 71.2 | 92.6 | 82.2 |
| 乌鳢 | *Channa argus* | ABK63482 | 83.3 | 70.3 | 91.7 | 81.5 |
| 斑马鱼 | *Danio rerio* | AAH58298 | 60.6 | 48.5 | 78.7 | 65.4 |
| 鸟类 | | | | | | |
| 鸡 | *Gallus gallus* | AAA86995 | 46.6 | 32.2 | 62.6 | 48.5 |
| 哺乳类 | | | | | | |
| 鼠 | *Mus musculus* | AAB18626 | 42.1 | 30.3 | 60.0 | 52.5 |
| 人 | *Homo sapiens* | AAB17190 | 40.5 | 30.5 | 57.6 | 46.5 |

### 1.6 *CsIRF*-7 基因的组织表达分析

根据测定的 *CsIRF*-7 基因的全长 cDNA 序列,设计引物 *CsIRF*7-QF 和 *CsIRF*7-QR (表 1)。以 *β-actin* 为内参基因,使用 Corbett Rotor-Gene 3000 实时定量 PCR 仪(Qiagen 公司),用实时荧光定量 PCR 的方法分析 *CsIRF*-7 基因在不同组织的转录水平。25 μl 的反应体系含 10mmol/L 正反向引物各 0.5 μl 、cDNA 模板 1 μl、2×*TransStart*™ SuperMix 12.5 μl (TransGen 公司)、染料 0.5 μl、RNase-free 水 10 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,45 个循环。反应结束后,通过溶解曲线的分析来鉴定扩增产物的专一性。用 *β-actin* 的表达量来校正所有样品中 RNA 量的差异。用 Livak 和 Schmittgen 的 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 方法计算各组织中 *CsIRF*-7 的相对表达量(Livak *et al*. 2001)。

### 1.7　数据分析

采用 SPSS 软件对实验结果进行单因素实验统计分析与显著性检验,$P < 0.05$ 为显著性差异。

## 2　结果与分析

### 2.1　*CsIRF*-7 基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

通过同源序列克隆方法获得了半滑舌鳎 *IRF*-7 基因 cDNA 1 057 bp 的部分片段,该序列与牙鲆的 *IRF*-7 (JF312911)同源性最高达 77%。随后进行的 3′ RACE 和 5′ RACE 扩增反应,分别获得大小为 871 bp 和 249 bp的序列。最后将获得的 3 段序列进行拼接,得到半滑舌鳎 *IRF*-7 基因全长 cDNA 序列。

半滑舌鳎 *IRF*-7 基因的 cDNA 全长为 1 957 bp ( GenBank 检索号:JQ062531),包含 48 bp 的 5′-非翻译区(5′-UTR)、1 302 bp 的开放读码框(ORF)和 607 bp 的 3′-非翻译区(3′-UTR)。其中,ORF 从全长 cDNA 的第 49 位核苷酸开始到第 1 350 位核苷酸终止,编码 433 个氨基酸残基的多肽,多肽分子量为 49.7 ku,等电点约为 5.83。3′-UTR 还包含 5 个 mRNA 不稳定结构(ATTTA)、一个加尾信号(AATAAA)和一个 poly(A)尾。

从 ORF 推测得到的半滑舌鳎 *IRF*-7 多肽具有一系列保守的蛋白结构域:DNA 结合域(DNA binding domain,DBD)、干扰素相关区(*IRF* associated domain,IAD)和丝氨酸富含区(Serine-rich domain,SRD)。其中,DBD 位于多肽的 N 末端,由开始的 108 个氨基酸组成,该结构域包含 4 个色氨酸重复结构,该重复是 *IRF*s 家族 DBD 结合域共有的特征。IAD 则位于多肽的中间部分(第 216 位～388 位)。SRD 位于多肽的 C 末端,其结构与哺乳动物的 SRD 相似(图 1)。

### 2.2　脊椎动物 IRF-7 氨基酸序列的多序列比对与同源性比较

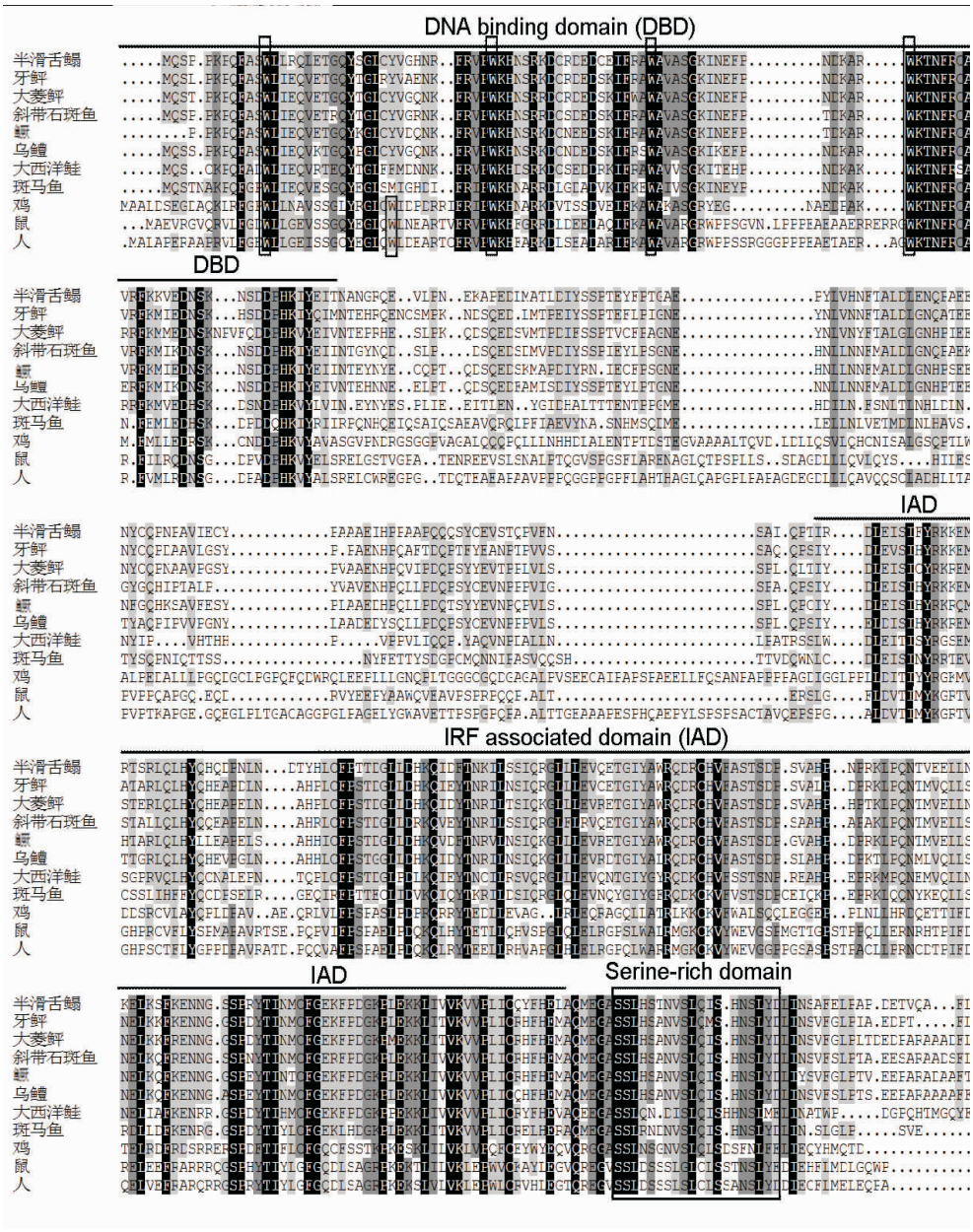
将半滑舌鳎和 GenBank 中 7 种代表性脊椎动物的 IRF-7 氨基酸序列进行多序列比对和同源性比较。结果发现,在全长氨基酸序列方面,半滑舌鳎 IRF-7 与 4 种硬骨鱼类的 IRF-7 同一性介于 48.5%～73.6%之间,最高的为牙鲆(73.6%);半滑舌鳎 IRF-7 与 4 种硬骨鱼类的 IRF-7 相似性也较高,分别为牙鲆 83.8%、斜带石斑鱼 82.2%、乌鳢 81.5%、斑马鱼 65.4%,而与鸟类和哺乳类的相似性较低,介于 46.5%～52.5%之间。与全长氨基酸序列相比,IRF-7 的 DNA 结合域部分(IRF-7 DBD)的同一性和相似性均更高:半滑舌鳎 IRF-7 DBD 与 7 种硬骨鱼类的 IRF-7 DBD 同一性介于 60.6%～85.2%之间;相似性介于 78.7%～92.6%之间,分别为牙鲆 92.6%、斜带石斑鱼 92.6%、乌鳢 91.7%、斑马鱼 78.7%(图 1、表 2)。

### 2.3　脊椎动物 *IRF*-7 系统进化树的构建与分析

为了解 *CsIRF*-7 在鱼类干扰素调节因子家族中的进化地位,以及与已知的 *IRF*s 家族之间的关系,构建了鱼类、鸟类和哺乳类的 *IRF*s 家族的进化树,进化枝上的数值表示 1 000 次重复抽样所得的支持率。结果表明,所有的 *IRF*-7 聚类在一起,其中 *CsIRF*-7 与牙鲆等硬骨鱼类的 *IRF*-7 亲缘关系较近,而与两栖类、鸟类和哺乳类 *IRF*-7 的亲缘关系较远。系统进化分析还表明,脊椎动物的 IRFs 家族共分为 4 个亚家族,其中 *CsIRF*-7 与其他脊椎动物的 *IRF*-7 和 *IRF*-3 共同构成了脊椎动物 *IRF*-3 亚家族(图 2)。

### 2.4　半滑舌鳎 *IRF*-7 基因的组织分布

用实时荧光定量 RT-PCR 的方法测定了 *CsIRF*-7 基因在半滑舌鳎各组织中的相对表达量。结果显示,*CsIRF*-7 基因呈组织特异性表达,在鱼体的肝、肾、脾、血细胞、鳃、肠和心脏等 7 个组织中均能被检测到。但 *CsIRF*-7 基因在各个组织中的表达量存在差异:在肠、心脏、肾和脾中表达量较高,其中肠中的表达量最高,为肝脏中表达量的 21.2 倍;在心脏、肾和脾中的表达量分别为肝脏中表达量的 9 倍、6.4 倍和 3.4 倍,差异均呈显著性。另一方面,*CsIRF*-7 基因在鱼体肝、鳃和血细胞中表达量相对较少,相互之间的差异不显著(图 3)。




黑色背景表示各个物种完全保守的氨基酸，“.”表示不存在氨基酸残基。DNA 结合域(DBD)、干扰素相关区(IAD)用横线在比对结果上面标注出，C-末端的丝氨酸富含区(SRD)用大方框标出。DNA 结合域区保守的色氨酸用小方框标出

Nonexistent amino acids are denoted by dots. Completely conserved residues across all species aligned are shaded in black. The DNA-binding domain (DBD) and IRF associated domain (IAD) are indicated by lines above the aligned sequence. The C-terminal serine-rich domain (SRD) is highlighted by a big box. The conserved tryptophan (W) residues in the DBD are highlighted by small boxes

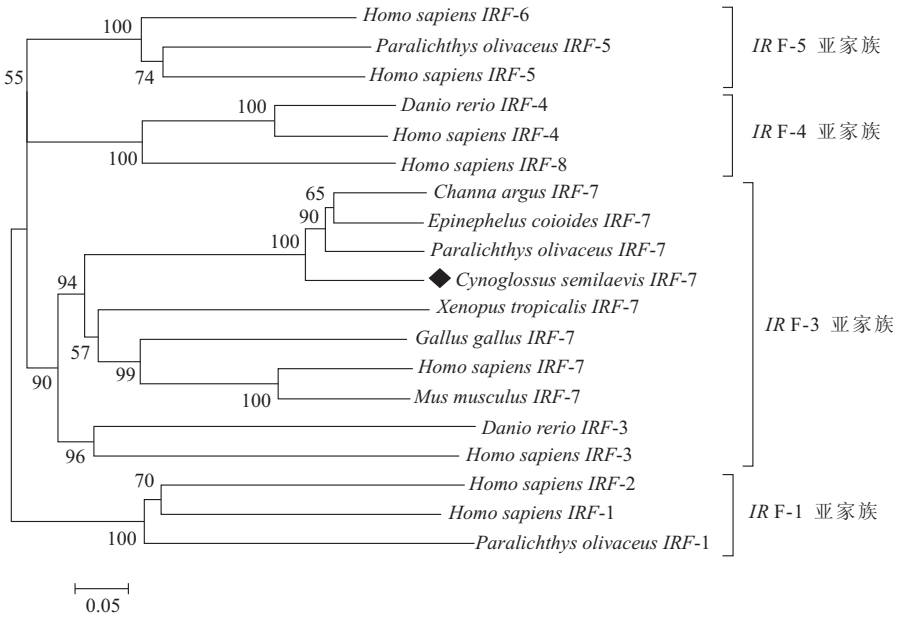
图 1 脊椎动物 IRF-7 全长氨基酸序列的结构特征及多序列比对

Fig. 1 Structure analysis and multiple alignment of IRF-7 amino acid sequences of 11 vertebrates

## 3 讨论

脊椎动物 *IRF*-7 基因被认为是诱导 I 型干扰素及其免疫应答因子最重要的转录因子，目前在硬骨鱼中，*IRF*-7 的研究报道还相对较少。为深入研究重要水产养殖鱼类半滑舌鳎 *IRF*-7 基因的功能和免疫调控作用，

本研究采用 RACE 技术，从半滑舌鳎组织中克隆得到了 *IRF*-7 基因的全长 cDNA，并进行了分子鉴定、结构和功能域分析；应用实时荧光定量 RT-PCR 技术，分析了该基因在半滑舌鳎组织中的表达水平，该研究为进一步研究半滑舌鳎 *IRF*-7 基因的蛋白表达纯化及其作用功能的研究工作打下了基础。

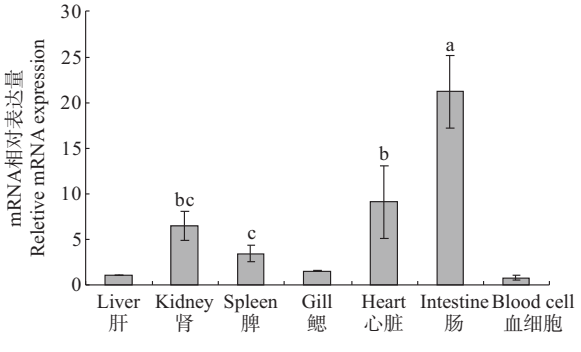



The phylogenetic neighbor-joining tree was constructed based on amino acid sequences of 19 *IRF* family members from twelve species of vertebrate

图 2　脊椎动物 *IRF*s 家族的系统发生关系

Fig. 2　Phylogenetic relationship within the *IRF* family

cDNA 序列分析结果表明，半滑舌鳎 *IRF*-7 cDNA 的 3′端有 5 个 mRNA 不稳结构，该结构具有炎性反应的调控编码基因（Sachs *et al*.　1993）。氨基酸序列比对结果发现，与鸟类和哺乳类相似，半滑舌鳎 IRF-7 基因编码的多肽也包含 DNA 结合域（DBD）、干扰素相关区（IAD）和丝氨酸富含区（SRD）等 3 个典型的结构特征。其中 DBD 包含一个由多个间隔的色氨酸重复构成的螺旋-转角-螺旋结构，这一结构能结合在 ISRE/IRF-E 序列上（Paun *et al*.　2007）。在哺乳动物中，该结构域通常有 5 个色氨酸重复，但本研究发现半滑舌鳎 IRF-7 DBD 仅由 4 个间隔的色氨酸重复序列构成，缺少了其中的第 2 个色氨酸。IAD 最先在 IRF-8 中被发现，除 IRF-1 和 IRF-2 之外的所有 *IRF*s 均具有该结构域，其保守性较高。在 IRF-7 中，IAD 可以起到干扰其活化的作用（Sharf *et al*.　1997；Yamamoto *et al*.　1994）。SRD 是 IRF-7 C 末端高度保守的区域，该结构域与病毒诱导的磷酸化有关，并负责 IRF-3 和 IRF-7 或其他 IRFs 之间的相互作用（贾伟章　2008）。以上研究表明，鱼类、鸟类和哺乳类 IRF-7 的结构特征高度保守，这些结构的相似性同时也说明其




Data were expressed as a ratio to *CsIRF*-7 mRNA expression in the liver. Values marked by different letters indicate significant difference between each other. Each column and bar represents the mean ± S. D. from three individuals

图 3　*CsIRF*-7 基因在健康半滑舌鳎 7 种组织中的表达分析

Fig. 3　The expression analysis of *CsIRF*-7 gene in seven tissues of *C. semilaevis* by real-time RT-PCR

功能的相似性。

通过氨基酸序列的同一性和相似性比较，研究发现，半滑舌鳎 IRF-7 与硬骨鱼类尤其是鲆鲽类的 IRF-7 相似性较高，而与鸟类和哺乳类的 IRF-7 相似性较低。系统进化结果表明，半滑舌鳎与硬骨鱼类的 *IRF*-7 聚类在一起，与同属鲆鲽类的牙鲆进化关系最近，而与两栖类、鸟类和哺乳类的 *IRF*-7 进化关系较远。脊椎动物 *IRF*s 家族的系统进化分析结果还证明，脊椎动物的 *IRF*s 家族分为 4 个亚家族，*IRF*-7 属于 *IRF*-3 亚家族的一个分支。

在哺乳动物中，*IRF*-7 基因通常在免疫组织中有表达，尤其是在浆细胞样树突状细胞以及 poly I:C、病毒、脂多糖和肿瘤坏死因子刺激后表达量较高（Honda *et al*. 2006；Paun *et al*. 2007；Ning *et al*. 2005）。研究表明，在鱼类中，*IRF*-7 基因在各组织中都有表达且本底表达较低，同时 *IRF*-7 在各物种表达量较多的组织并不完全相同：在鲫的脾和前肾中表达量较高（Zhang *et al*. 2003），在乌鳢的鳃和肠中表达量较高（Jia *et al*. 2008），在斜带石斑鱼的脾和肠中表达量较高（Cui *et al*. 2011），在虹鳟各组织中却检测不到 *IRF*-7 基因的表达（Holland *et al*. 2008）。本研究发现，*CsIRF*-7 基因在半滑舌鳎的肝、肾、脾、血细胞、鳃、肠和心脏等组织中都有表达，其中在肠、肾和脾等免疫应答相关器官中表达量较高，该结果与其他硬骨鱼类的研究结果相类似。但不同的是，*CsIRF*-7 基因在半滑舌鳎心脏中的表达量相对较高，在肠中的表达量最高。这种组成性表达模式差异的生物学意义有待进一步研究。肠作为鱼类的消化和吸收器官，其中分布着多种微生物并且与之直接接触，这可能与 *CsIRF*-7 在肠中的高表达有关。以上研究表明，硬骨鱼类 *IRF*-7 与哺乳动物 *IRF*-7 这种表达模式的不同，暗示着它们可能存在不同的作用过程；在脾、肾和肠中表达量较多，也暗示着 *IRF*-7 不仅参与了抗病毒的感染机制，同时也参与了抗细菌的感染机制，但其在鱼类免疫系统中具体的作用过程还需要进一步的研究。

鱼类免疫相关基因与哺乳类相比可能有较大程度的差异，因此需要更多的研究来揭示 *IRF*s 家族成员在鱼类免疫中的功能。本研究成功克隆了半滑舌鳎 *IRF*-7 基因并且对其进行了分子鉴定、结构和功能域的分析，同时完成了 *IRF*-7 在半滑舌鳎健康组织中的表达分析，为鱼类 *IRF*-7 的研究提供了数据，也为更好地了解 *IRF*s 家族基因之间相互作用奠定了基础。

## 参 考 文 献


许巧情，昌鸣先，肖凡书，李 楠，聂 品. 2010. 草鱼干扰素调节因子 5 的表达研究. 水生生物学报，34(6)：1 206～1 210

沙珍霞，王 娜，王启龙，徐田军，王 磊，董晓丽，陈松林. 2010. 半滑舌鳎髓样分化因子的克隆和表达分析. 中国水产科学，17(4)：659～670

贾伟章. 2008. 乌鳢免疫相关基因的克隆鉴定与特征分析. 见：中国科学院研究生院（水生生物研究所）博士学位论文

Campanella, J. J., Bitincka, L., and Smalley, J. 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. BMC Bioinformatics, 4: 29

Chen, S. L., Li, J., Deng, S. P., and Tian, Y. S. 2007. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Marine Biotechnology, 9(2): 273～280

Cui, H., Yan, Y., Wei, J., Huang, X. H., and Huang, Y. H. 2011. Identification and functional characterization of an interferon regulatory factor 7-like (*IRF*7-like) gene from orange-spotedd grouper, *Epinephelus coioides*. Developmental & Comparative Immunology, 35(6): 672～684

Holland, J. W., Bird, S., Williamson, B., Woudstra, C., and Seconmbes, C. J. 2008. Molecular characterization of *IRF*-3 and *IRF*-7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: functional analysis and transcriptional modulation. Molecular Immunology, 46(2): 269～285

Honda, K., and Taniguchi, T. 2006. *IRF*s: master regulators of signaling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. Nature Reviews Immunology, 6: 644～658

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., and Taniguchi, T. 2005. *IRF*-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature, 434(7 034): 772～777

Honda, K., Yanai, H., and Takaoka, A. 2005. Regulation of the type I IFN induction: a current view. Intertnational Immunology, 17(11): 1 367～1 378

Hu, G., Yin, X., Xia, J., Dong, X. Z, and Zhang, J. Y. 2010. Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 7 (*IRF*-7) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish & Shellfish Immunology, 29(6): 963～971

Huang, B., Qi, Z. T., Xu, Z, and Nie, P. 2010. Global characterization of interferon regulatory factor (*IRF*) genes in vertebrates: Glimpse of

the diversification in evolution. BMC Immunology, 11:22

Jia, W., and Guo, Q. 2008. Gene structures and promoter characteristics of interferon regulatory factor 1 (*IRF*-1), *IRF*-2 and *IRF*-7 from snakehead *Channa argus*. Molecular Immunology, 45(8): 2 419～2 428

Kileng, Ø., Bergan, V., Workenhe, S. T., and Robertsen, B. 2009. Structural and functional studies of an *IRF*-7-like gene from Atlantic salmon . Developmental & Comparative Immunology, 33(1): 18～27

Levy, D. E., Mari , I., Smith, E., and Prakash, A. 2002. Enhancement and diversification of IFN induction by *IRF*-7-mediated positive feedback. Journal of Interferon & Cytokine Research, 22(1): 87～93

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle CT}$ method . Methods, 25(4): 402～408

Mamane, Y., Heylbroeck, C., and Génin, P. 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. Gene, 237(1): 1～14

Marié, I., Durbin, J. E., and Levy, D. E. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-α genes by positive feedback through interferon regulatory factor *IRF*-7 . The EMBO Journal, 17(22): 6 660～6 669

Ning, S. B., Huye, L. E., and Pagano, J. S. 2005. Regulation of the transcriptional activity of the *IRF*7 promoter by a pathway independent of interferon signaling . The Journal of Biological Chemistry, 280(13): 12 262～12 270

Paun, A., and Pitha, P. M. 2007. The *IRF* family, revisited . Biochimie, 89(6-7): 744～753

Sachs, A. B. 1993. Messenger RNA degradation in eukaryotes . Cell, 74(3): 413～421

Samuel, C. E. 2001. Antiviral action of interferons. Clin. Microbiol. Rev. 14:778～809

Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., and Tanaka, N. 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor *IRF*-7 . FEBS, 441(1): 106～110

Sharf, R., Meraro, D., Azriel, A. *et al*. 1997. Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. Journal of Biological Chemistry, 272(15): 9 785～9 792

Stein, C., Caccamo, M., Laird, G., and Leptin, M. 2007. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. Genome Biology, 8:R251

Xu, T. J., Chen, S. L., Ji, X. S., and Sha, Z. X. 2009. Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Fish & Shellfish Immunology, 27(2): 192～201

Yamamoto, H., Lamphier, M. S., Fugita, T. *et al*. 1994. The oncogenic transcription factor *IRF*-2 possesses a transcriptional repression and a latent activation domain. Oncogene, 9(5): 1 423～1 428

Yu, Y., Zhong, Q., Li, C., Jiang, L., Wang, Z., and Zhang, Q. 2009. Isolation and characterization of Toll-like receptor 9 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Fish & Shellfish Immunology, 26(3): 492～499

Zhang, Y. B., Hu, C. Y., Zhang, J., Huang, G. P., Wei, L. H., Zhang, Q. Y., and Gui, J. F. 2003. Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulatory factor 7. Fish & Shellfish Immunology, 15(5): 453～466