

以唐学家 JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA DOI: 10.11964/jfc.20191112082



## 赤眼鳟信号转导与转录激活因子1基因 (ScSTAT1) 序列结构及免疫功能

红, 李耀国\*, 李东放, 邹 钧, 肖调义\* 罗 (湖南农业大学,湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心,湖南长沙 410128)

摘要: 为探索赤眼鳟信号转导与转录激活因子 1(signal transduction and activator of transcription 1, STAT1) 的免疫功能、实验利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得了赤眼 鳟 STAT1(命名为 ScSTAT1), ScSTAT1 的 cDNA 全长为 2 922 bp, 共编码 718 个氨基酸。 ScSTAT1 含 STAT int、STAT alpha、STAT bind 和 SH2 4 个保守功能域。系统进化分析 显示, ScSTAT1 先与草鱼 STAT1 聚为一支, 再与青鱼、鲫以及黄颡鱼等聚为一支。相 对于哺乳类和爬行类物种而言, ScSTAT1缺少含丝氨酸磷酸化位点的 C-末端转录激活 功能结构域 (transcriptional activation domain, TAD)。基因表达分析显示, 脾脏 ScSTAT1 表达量极显著高于其他组织,而肝脏中表达量最低。经细菌类似物脂多糖(LPS)、双链 RNA 类似物聚肌胞苷酸 (Poly I: C) 及草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 刺激后,赤眼鳟脾脏和体 肾组织中 ScSTAT1 表达水平总体上调。GCRV 感染后 12h 脾脏组织 ScSTAT1 表达先显著 下降,随后极显著上升;GCRV刺激后12和72h,体肾组织ScSTAT1表达量显著高于对 照组;赤眼鳟鳍条细胞系(ScF) ScSTAT1 经 RNA 干扰后基因表达水平极显著下调,且 IRF3、IRF9以及Mx均在GCRV刺激48h时极显著下调。本研究为进一步深入探索 ScSTAT1的抗病功能奠定了基础。

关键词:赤眼鳟; STAT1; 干扰素通路; 草鱼出血病; 结构与功能 中图分类号:Q781; S942.1 文献标志码:A

鱼类存在非特异性免疫和特异性免疫2种 主要免疫应答类型。干扰素 (interferon, IFN)系 统作为非特异性免疫应答中的重要组成部分, 在宿主抗病毒感染中发挥了关键作用<sup>[1]</sup>。IFN 经 诱导后会通过下游信号级联—Janus 激酶/信号转 导与转录激活因子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcriptions, JAK/STAT)传递免 疫信号<sup>[2]</sup>。STATs作为JAK/STAT信号转导途径 的主要成员,是一类存在于细胞质中具信号转

导和转录激活双重作用的功能蛋白<sup>[3]</sup>,可介导细 胞因子、生长因子和激素等多种胞外信号的传 递<sup>[4]</sup>。目前已发现的 STAT 家族成员包括 STAT1、 STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a/b 和 STAT6<sup>[5]</sup>。 STAT 家族蛋白主要包含7个结构域,分别是N端 区域、卷螺旋区域、DNA结合区域、连接域、 同源结构域2、酪氨酸磷酸化位点和非保守 TAD 结构域<sup>66</sup>。STAT1 最先以复合体形式发现于干扰 素信号通路中<sup>[7]</sup>,作为 STAT 家族第1个被发现

资助项目:国家自然科学基金(31802288, 31572615);中国博士后科学基金(2018T110833, 2017M612560);湖 南省自然科学基金(2019JJ50231)



第一作者:罗红 (照片),从事水产动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1939765787@qq.com

通信作者: 李耀国, E-mail: yaoguolijkl@163.com; 肖调义, E-mail: tyxiao1128@163.com

收稿日期: 2019-11-26 修回日期: 2020-06-05

的成员,在胞核信号传递中发挥关键作用<sup>[8]</sup>。

近年来,随着对 I型 IFN 信号通路研究的 不断深入, STAT1参与其中的功能也得以逐步 解析。感染病毒后,细胞经一系列信号传递诱 导 I 型 IFN 的产生,分泌至胞外的 IFN 与靶细胞 的干扰素受体结合并激活下游的 JAK/STAT 信号 途径<sup>[2]</sup>。具体过程为 IFN 与干扰素受体结合,促 使胞内与受体结合的 Tyk2 与 JAK1 相互磷酸化 而激活,继而使干扰素受体胞内部分形成酪氨 酸磷酸化残基,为 STAT1 与 STAT2 提供停泊位 点。胞质中 STAT1 和 STAT2 的 SH2 结构域在停 泊位点与受体结合,活化形成异源二聚体并从 细胞膜上脱落,进入细胞质与干扰素调节因子9 (interferon regulatory factor-9, IRF-9) 作用形成干 扰素刺激/因子3 (interferon-stimulated gene factor 3, ISGF3)复合体。该复合体进入细胞核并结合到 干扰素刺激基因的启动子调控序列 (IFN-stimulated response sequence, ISRE)上以促进相关基因 转录,诱导细胞进入抗病毒状态<sup>[9]</sup>。目前已证实 抗黏液病毒基因 (myxovirus-resistant, Mx) 及干扰 素刺激基因 15(interferon-stimulated gene 15, ISG 15) 等均由 IFN 信号通路诱导表达<sup>[10]</sup>。

高等哺乳动物中 STAT1 与肿瘤细胞的发生 和凋亡过程相关联, 被认为是一种肿瘤抑制因 子<sup>[11]</sup>。此外, STAT1 缺陷会导致对病毒的易感 性[12-13]。与哺乳动物相比,鱼类 STAT1 的研究主 要围绕其表达模式和免疫功能开展。目前已在 斑马鱼 (Danio rerio)<sup>[14]</sup>、金鱼 (Carassius auratus)<sup>[15]</sup>、 大西洋鲑 (Salmo salar)<sup>[16]</sup>、牙鲆 (Paralichthys olivaceus)<sup>[17]</sup>、河鲀 (Tetraodon nigroviridis)<sup>[18]</sup>、黑带 石斑鱼 (Epinephelus malabaricus)<sup>[19]</sup> 和大菱鲆 (Scophthalmus maximus)<sup>[6]</sup>等多种鱼类中成功克隆获得 STAT1 的序列。研究表明,石斑鱼感染神经坏死 病毒后其免疫组织中 STAT1 的表达上调<sup>[19]</sup>。经 IFN 处理的大西洋鲑细胞中 STAT1 磷酸化水平 提高并且迅速入核<sup>[20]</sup>。鲫囊胚细胞中瞬时过量表 达 STAT1 可以增强 ISGs 的表达以及抑制病毒的 能力, 而删除 TAD 结构域突变体的过表达则会 降低 ISGs 表达且抑制抗病毒能力<sup>[21]</sup>。河鲀STAT1 和 STAT2 融合活性蛋白与 IRF9 结合形成的 ISGF 3复合物可直接结合2个ISRE位点,增强河鲀 Mx 启动子的转录活性<sup>[18]</sup>。上述研究结果表明, 鱼类 STAT1 具有与哺乳动物 STAT1 类似的生物 学功能,参与并影响鱼类抗病毒反应。

赤眼鳟 (Squaliobarbus curriculus) 与草鱼 (Ctenopharyngodon idella) 同属于雅罗鱼亚科 (Leuciscinae),但对草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 具有强抗性<sup>[22]</sup>。本实验克隆了 ScSTAT1 的 cDNA 全长并对其生物信息学进行分析;检测了 ScSTAT1 在各正常组织和感染 GCRV 后脾脏与肾 脏中的基因表达特征;最后通过 RNA 干扰下调 STAT1 表达来研究其免疫功能,旨在为ScSTAT1 的抗 GCRV 免疫功能研究提供科学数据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验用赤眼鳟购自浏阳市北盛镇乌龙渔场, 为 2018 年 5 月繁育个体,平均体质量为 (14.50± 1.25) g。购回后于 80 L/箱的恒温 (28 °C) 循环水 养殖系统暂养 4 周, 20 尾/箱,每天定时光照 12 h 并按其体质量的 3% 早、晚各投喂 1 次饲料。活 体攻毒用 GCRV (II 型)和细胞攻毒用 GCRV (JX-0901 毒株)均由中国水产科学研究院长江水产研 究所惠赠。

#### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取1尾健康赤眼鳟的脾脏组织30 mg,采用 Total RNA Kit I (Omega,美国)提取总 RNA,经 核酸蛋白仪检测总 RNA 的浓度,并用1%的琼 脂糖凝胶电泳检测其完整性。取质量和完整性 良好的 RNA (OD<sub>260/280</sub> 值为1.8~2.2,电泳后28S rRNA: 18S rRNA条带亮度约等于2:1)2 µg,按 照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas,美国)说明书合成 cDNA,用于全长 cDNA 序列的中间片段克隆。按照 SMARTer RACE 5<sup>'/</sup> 3' Kit (Clontech,美国)试剂盒说明书分别合成 5'和 3' RACE cDNA 第一链,用作 5<sup>'/</sup>3' cDNA 末 端克隆的模板。

#### 1.3 ScSTAT1 cDNA 全长克隆

根据 GenBank 中鲫 (AY242386.1) 和草鱼 (KU-508677.1) *STAT*1 的 cDNA 序列保守区,使用 Oligo 7.0 软件设计同源 PCR 引物 ScSTAT1-F/ScSTAT1-R (表 1) 用以克隆 *ScSTAT*1 的 cDNA部分序列。 PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min, 30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳并采用 HiPure Gel Pure DNA Mini 试剂盒 (Magen,上海) 纯化回收,产物连接至 pEGM-T easy 载体 (Promega,北京),选取阳性克隆送往北京奥科鼎盛 生物科技有限公司测序。以已获得的 ScSTAT1 部 分 cDNA 序列为模板,设计特异性 RACE 外引 物 ScSTAT1-5'R1 和 ScSTAT1-3'F1 以及内引物 ScSTAT1-5'R2 和 ScSTAT1-5'F2 (表 1)。5' RACE PCR:首轮以 ScSTAT1-5'R1 和 RACE 通用引物 UPM Mix (long primer 和 short primer) (表 1)为扩 增引物,扩增条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环;72 °C 延伸 7 min。首轮 PCR 产物稀释 50 倍作为模板, 利用 ScSTAT1-5'R2 和 RACE 通用引物 NUP 行 巢式扩增,条件为 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 30 s, 64 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 5 个循环; 95 ℃ 30 s, 62 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 5 个循环; 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 25 个循环; 最后 72 ℃ 终延伸 7 min。3' RACE 步骤与 5' RACE 相同, 首轮 PCR 特异性引物用 ScSTAT1-3'F1,巢式扩 增用 ScSTAT1-5'F2 (表 1)。

|                      | Tab. 1 Frimers used in this study                                  |          |
|----------------------|--|----------|
| 引物名称 primers name    | 引物序列5'-3 primers sequence 5'-3'                                    | 用处 usage |
| 3'-RACE CDS primer A | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T) 30VN (N:A, C, G, or T; V:A, G, or C) | RACE     |
| 5'-RACE CDS primer A | (T) 25V N-3' (N:A, C, G, or T; V:A, G, or C)                       | RACE     |
| UPM Long primer      | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG                                     | RACE     |
| UPM Short primer     | CTAATACGACTCACTATAGGGC   | RACE     |
| NUP                  | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT  | RACE     |
| ScSTAT1-F1           | TCGCGGGTAATGTATCCTTG   | 中间片段克隆   |
| ScSTAT1-R1           | TGGTACACCCCTCTCATTCGGA   | 中间片段克隆   |
| ScSTAT1-5'R1         | ACCAAGAAGTTTGTCGGCCAGCAT   | RACE     |
| ScSTAT1-5'R2         | GGCATACACGGCTGTCTCCCACCAC  | RACE     |
| ScSTAT1-3'F1         | AGCACTACAGCCGCCTCAACCTGGGA   | RACE     |
| ScSTAT1-3/F2         | AAACGAGCGCTGAACTCTGAGCA  | RACE     |
| ScSTAT1-YF           | AGCTGGTTCCAAAGTGCCATCTTAC  | qPCR     |
| ScSTAT1-YR           | CAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA  | qPCR     |
| IRF3-YF              | TGTGGACACTGACGGACCCTTC   | qPCR     |
| IRF3-YR              | CGGCTGCTGATATGCTGGAGAA   | qPCR     |
| IRF7-YF              | CGCCTGTGTTCGTCACTCGT   | qPCR     |
| IRF7-YR              | GGTGGTTGGAAAGCGTATTGG  | qPCR     |
| IRF9-YF              | TGCACAGGAAATTGTCCCAC   | qPCR     |
| IRF9-YR              | ACTGCCTCAATTGTTACGTT   | qPCR     |
| Mx-YF                | CGACCACAGAAGCATTGCAGA  | qPCR     |
| Mx-YR                | CCCTTCAGTGCCTTTATCCACCA  | qPCR     |
| β-actin YF           | GCTATGTGGCTCTTGACTTCG  | qPCR     |
| β-actin YR           | GGGCACCTGAACCTCTCATT   | qPCR     |
| EF1a YF              | CGCCATTGTTGAGATGATCCCT   | qPCR     |
| EF1a YR              | GACACCAACAGCAACGGTCT   | qPCR     |

表 1 本研究相关引物 Tab. 1 Primers used in this study

#### 1.4 生物信息学分析

使用 DNAMAN 软件拼接获得 *ScSTAT*1的 cDNA 全长序列;利用 ExPASy-Translate tool (https:// web.expasy.org/translate/)预测其开放阅读框并推 导氨基酸序列;应用 ExPASy-ProtParam tool(https:// web.expasy.org/protparam/)和 SMART (http://smart. embl-heidelberg.de/)在线软件作氨基酸序列理化 性质和蛋白质结构域预测;通过 DNAMAN 软件 对 ScSTAT1 进行多序列比对;采用 I-TASSER (https:// zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER(https:// zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)和 PYMOL 软件对其进行蛋白质三级结构分析;并 用 MAGA 7.0软件 (邻接法,1000次自展检测) 构建系统进化树。

#### 1.5 ScSTAT1 组织表达检测

随机取4尾健康赤眼鳟,分别提取肠、肝 脏、脑、皮肤、脾脏、鳃、体肾以及头肾8个组 织的总 RNA 并合成第一链 cDNA。根据 ScSTAT1 开放阅读框序列设计特异性荧光定量引物 ScSTAT1-YF和 ScSTAT1-YR (表 1),选择 β-actin 和 EF1-1α作为参考基因。利用 CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, 美国)进行实时荧 光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检 测,反应体系为10 µL: 5 µL 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股 份有限公司),上、下游引物各 0.4 µL,5 倍稀释 的 cDNA 模板 1 µL 和无菌水 3.2 µL。反应条件: 95°C 30s; 95°C 5s, 60°C 40s, 采集荧光信号, 39个循环;熔解曲线从65℃上升至95℃,每 5 s 上升 0.5 ℃,采集荧光信号。每个样品设置 3 次技术重复。

#### 1.6 ScSTAT1 对免疫刺激的响应表达检测

免疫刺激实验由实验组和对照组组成,实验组分别腹腔注射细菌类似物脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、双链 RNA类似物聚肌胞苷酸 (polyinosinic acid-polycytidylic acid, Poly I:C)和 II 型 GCRV,对照组注射磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS),每种处理溶液按照 200 µL/尾的剂量注射。各组实验用鱼分别置于4个 养殖箱。在注射后的6、12、24、72和168h分 别从4个养殖箱各随机选取3尾鱼。用含乙醚的 水溶液浸泡后立即取脾脏和体肾组织,提取总 RNA 后合成第一链cDNA;利用qPCR 检测*ScSTAT*1 的相对表达量,方法同"*ScSTAT*1组织表达检测"。

### 1.7 siRNA 干扰 ScF 中 ScSTAT1 的表达

以 ScSTAT1 为靶基因,利用 DSIR Home page (http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html)和 siDirect (http://sidirect2.rnai.jp/) 2个在线网站设计 3条特异性 siRNA。靶序列分别为 siRNA 1 (5'-GGAACAACGTCTAAAGTTA-3'), siRNA 2 (5'-AGATCAGATCACTAGTCAA-3'), siRNA 3 (5'-GAATGAAGAGAGAAAGATA-3') 以及阴性对照 NC-siRNA (5'-AATAAGGAGAGAAGAGTAA-3')。根据 T7 RiboMAX Express RNAi System (Promega, 北京)说明书合成 siRNA。转染前 24 h 将 细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 细胞瓶中, 在细胞融合率达 到 40%~50% 时, 按照 Lipofectamine 3000 转染试 剂盒说明进行转染,最终每瓶 Lipofectamine 3000 用量为 7.5 μL, siRNA 为 5 μg。此外设置 1 个只 加转染试剂的对照组(MC),每个处理设置3个 重复。在转染后48h收集细胞,提取总RNA并 合成第一链 cDNA; 检测细胞中 ScSTAT1 的表达 水平以筛选出干扰效果最佳的 siRNA。将干扰效 果最佳的 siRNA 转入 ScF, 同时以 NC 为对照。 在转染 24 h 时用 GCRV 感染,每毫升培养基加 1 µL 病毒液, 收集感染后 24、48 以及 72 h 的细 胞,提取细胞总 RNA 并合成第一链 cDNA。利 用 qPCR 检测 ScF 中 ScSTAT1、IRF9、Mx、IRF3 和 IRF7 的 mRNA 水平, 方法同"ScSTAT1 组织表 达检测"。

#### 1.8 数据处理

使用 Bio-Rad CFX Manager 软件,采用  $2^{-\Delta\Delta C_r}$ 法计算单个样品中各基因的相对表达量,应用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析及多重比对,显著性水平为\*P<0.05 和\*\*P<0.01。

#### 2 结果

#### 2.1 ScSTAT1 序列结构分析

*ScSTAT*1的 cDNA 全长为 2 922 bp (GenBank: MN636786),包含 67 bp 的 5'非编码区,2157 bp 的开放阅读框和 698 bp 的 3'非编码区;在 3'非编码区具有 3 个"aacaa"或"aataaa"多聚腺苷酸加尾信号、3 个 mRNA 不稳定基序"attta"以及典型的 Poly A 尾 (图 1)。该基因共编码 718 个氨基酸,预测蛋白相对分子量为 82.92 ku,理论等电点为 5.74。SMART 结构分析显示,ScSTAT1 含 4 个

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

保守结构域,分别为STAT\_int (2~122 aa)、STAT\_ alpha (138~315 aa)、STAT\_bind (317~566 aa)和 SH2 (571~656 aa)结构域 (图 2-a)。I-TASSER 3D 结构模型预测结果显示, ScSTAT1包括25个α 螺旋和13个β折叠,其中STAT\_int由7个α螺 旋构成,STAT\_alpha由4个α螺旋构成,STAT\_ bind 即 DNA 连接域由 9 个 α 螺旋和 8 个 β 折叠 组成;而 STAT 家族经典的 SH2 结构域由 3 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠共同构成 (图 2-b)。

#### 2.2 ScSTAT1 氨基酸序列比对及系统进化树

以赤眼鳟为核心对象,选择草鱼、青鱼(Mylopharyngodon piceus)、非洲爪蟾(Xenopus laevis)、

| 1    | $at {\tt gtatcttgtctgcttatcctg} a {\tt gaa} a {\tt tactgcttttgtgccttgacctaa} a {\tt ctttgttgaa} a {\tt gATG} {\tt GCACTTTG}$  |
|------|---|
| 1    | MALW  |
| 79   | ${\tt GAACCAGCTGCAGCTGCAGCTGGACTCTCTGTATTTGGAGCAAGTGGACCAGCTTTACGATGAGGCTTTCCCCATGGAGAT}$   |
| 5    | N Q L Q L L D S L Y L E Q V D Q L Y D E A F P M E I   |
| 157  | eq:ccgacagtatccagtatccagtatcgacagtcatgactgggaatccgcagtatcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccaccctgcgcagtatccttggccacctggcgcagtatccttggccacctggcgcagtatccttggccacctggcgcagtatccttggccacctggcgcagtatcctggcagtatc |
| 31   | R Q Y L S Q W I E S H D W E S V A S N V S L A T L R   |
| 235  | ${\tt CTTCCATGAACTCCTCAACCAACTGGATGAGCACTACAGCCGTCTCAACCTGGGAAACAACTTCCTCTTACAGCATAA}$  |
| 57   | F H E L L N Q L D E H Y S R L N L G N N F L L Q H N   |
| 313  | TATACGCAAAATTAAGCGGAACCTACAGGAGCACTTCCAGGAGGATCCTGTTCACATGGCCATGATCATAGCTAATAC  |
| 83   | I R K I K R N L Q E H F Q E D P V H M A M I I A N T   |
| 391  | TCTGAATGAAGAGAGAAAGATACTGGAAACTGCACTTAGTTTGCAAGGTAAAGGTGACTCATCACAAGGGAGTTTCAT  |
| 109  | L N E E R K I L E T A L S L Q G K G D S S Q G S F M   |
| 469  | GATGGAACAACAAAATGAGCTGGCCAATAAAATCAACAATTTGAAGACGAGCGTGCAGGAAATAGAACAGGACATTCA  |
| 135  | M E Q Q N E L A N K I N N L K T S V Q E I E Q D I Q   |
| 547  | GGTTTTGGAGGATGTACAAGATGAGTATGACTTCAAGAGAAAGACCTTGCAGAGTCGAGTGGAAGCTGAAATGAATAG  |
| 161  | V L E D V Q D E Y D F K R K T L Q S R V E A E M N S   |
| 625  | CCAGAAAACAAAAGAGATCCAGCTGGAGGAAATGGCAATTCGACAAATGTTTATTGGGCTAGGCATGAAAAGAGAGAG  |
| 187  | Q K T K E I Q L E E M A I R Q M F I G L G M K R E V   |
| 703  | GGTGATAAGGGAAATGGCTAATGTACTGACTCTAGCAGAGCAGATCCAGTTCACACTCATTTCAGATGAGTTACCCGA  |
| 213  | V I R E M A N V L T L A E Q I Q F T L I S D E L P E   |
| 781  | GTGGAAGAAGCGGCAACAGATGGCTTGCATCGGTGGTCCGCCCAATGCATGTCTGGACCAGCTGCAGAGCTGGTTCAC  |
| 239  | W K K R Q Q M A C I G G P P N A C L D Q L Q S W F T   |
| 859  | AGTGGTGGCAGAGTGTCTGCAGCAGATCCGTCAGCAGCTGAAGAAAGTTCAGGAATTGGTGCAGAAGTTCACCTACAA  |
| 265  | V V A E C L Q Q I R Q Q L K K V Q E L V Q K F T Y N   |
| 937  | CAACGACCCCCTCACTCTGGGCAAGAGCCAGCTGGATGAACAGGCCCTTTCACTCTTCAAAAAACCTTATATAAATTC  |
| 291  | N D P L T L G K S Q L D E Q A L S L F K N L I L N S   |
| 1015 | TCTTGTGGTGGAGAGACAGCCGTGTATGCCCACACATCCTCAGAGACCCTTGGTGATAAAGACAGGAGTTCAATTCAC  |
| 317  | L V V E R Q P C M P T H P Q R P L V I K T G V Q F T   |
| 1093 | AGTCAAGATCAGATCACTAGTCAAACTCGCTGAATTGAACTGTCAACTCAAAGTAAAAGTCTTTATTGACAAAGATTT  |
| 343  | V K I R S L V K L A E L N C Q L K V K V F I D K D L   |
| 1171 | AACAGAGAGTGACACACTAAAAAGGATGTAGGAAATTCAATATTTTAGGAACAACGTCTAAAGTTATGAACTTAGAGGA   |
| 369  | T E S D T L K G C R K F N I L G T T S K V M N L E E   |
| 1249 | ATCCAATGGATGTCTAGCAGCTGAATTTCGCCATTTGCAATTAAAGGAAATGAAATGTAACAACAGAACCAATGAGAC  |
| 395  | S N G C L A A E F R H L Q L K E M K C N N R T N E T   |
| 1327 | TCCTCTTATCATTTCTGAGGAGCTGCACTTACTTAGATTTGAAACTCAACTCATTCAGCCAGAACTATGTGTTGATTT  |
| 421  | P L I I S E E L H L L R F E T Q L I Q P E L C V D L   |
| 1405 | ATCGATCATATCACTTCCTGTTGTGGTGATATCCCACGTAAATCAGTTACCTAGTGCTTGGGGCTCCATCTTATGGTA  |
| 447  | SIISLPVVVISHVNQLPSAWGSILWY  |
|      | (图 1 Fig 1)   |

| 1483 | CAAC | ATG         | CTC  | TGC | AGT | GAA | CCA | CAC | AAT | CTG | ACG  | TTC | TTC  | ГTG. | AAT | CCG         | CCA         | CCA  | GTG | AAA  | ГGG         | GAG | CAG  | CTT | TCA  | 4A |
|------|------|-------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-------------|-------------|------|-----|------|-------------|-----|------|-----|------|----|
| 473  | Ν    | M           | L    | С   | S   | Е   | Р   | Н   | N   | L   | Т    | F   | F    | L    | N   | Р           | Р           | Р    | V   | K    | W           | Е   | Q    | L   | S    | Κ  |
| 1561 | AGTC | ATA         | AGC  | TGG | CAG | TTT | TCT | TCG | GTC | ACG | AAA  | CGA | GCG( | CTG  | AAC | ТСТ         | GAG         | CAG  | CTG | AGA  | ATG         | CTG | GCC. | AAC | AAA  | CT |
| 499  | V    | Ι           | S    | W   | Q   | F   | S   | S   | V   | Т   | K    | R   | А    | L    | N   | S           | Е           | Q    | L   | R    | М           | L   | А    | N   | K    | L  |
| 1639 | TCTT | GGT         | CAT  | GAA | GCC | CAA | GGT | GAC | CCT | GAG | GGT  | CTC | ATC  | ГАС  | TGG | AAT         | ACA         | TTT  | TGT | AAG  | ATG         | TCT | TCT  | AAT | GAG  | AG |
| 525  | L    | G           | Н    | Е   | А   | Q   | G   | D   | Р   | Е   | G    | L   | Ι    | Y    | W   | Ν           | Т           | F    | С   | K    | М           | S   | S    | Ν   | Е    | R  |
| 1717 | GGGT | GTA         | CCA  | TTC | TGG | CTG | TGG | ATA | GAT | GGA | ATT  | CTG | GAC  | CTT  | ATT | AAA         | AAA         | CAC  | CTG | CTC  | AAC         | ATC | TGG  | AAT | GAT  | GG |
| 551  | G    | V           | Р    | F   | W   | L   | W   | Ι   | D   | G   | Ι    | L   | D    | L    | Ι   | K           | K           | Н    | L   | L    | Ν           | Ι   | W    | Ν   | D    | G  |
| 1795 | GCAT | ATT         | ATA  | GGG | TTT | TTA | AGT | AAA | GGG | CAA | GAG  | AAG | GCT  | ГТG  | TTG | AGA         | GAC         | AAA  | CTC | CCA  | GGC         | ACT | TTC  | CTC | CTG  | CG |
| 577  | Н    | Ι           | Ι    | G   | F   | L   | S   | K   | G   | Q   | Е    | K   | А    | L    | L   | R           | D           | K    | L   | Р    | G           | Т   | F    | L   | L    | R  |
| 1873 | CTTC | AGT         | GAA  | ACC | TGT | CGA | GAA | GGA | GGA | ATC | ACC. | ATC | ACA  | ГGG  | GTG | GAA         | TAT         | TCA  | AAG | AAT  | GGT         | GAA | CCT  | AAG | ATG  | CA |
| 603  | F    | S           | Е    | Т   | С   | R   | Е   | G   | G   | Ι   | Т    | Ι   | Т    | W    | V   | Е           | Y           | S    | K   | N    | G           | Е   | Р    | K   | М    | Н  |
| 1951 | TTCG | GTG         | AAG  | CCT | TAC | ACT | AAA | TCG | GAT | CTG | GCG  | TCC | ATC  | ГСС  | TTG | CCT         | AAC         | GTC  | ATC | CGG  | GAC         | TAC | ACC  | CTC | ACT( | ЭC |
| 629  | S    | V           | K    | Р   | Y   | Т   | K   | S   | D   | L   | А    | S   | Ι    | S    | L   | Р           | Ν           | V    | Ι   | R    | D           | Y   | Т    | L   | Т    | А  |
| 2029 | TGCA | GAG         | AAG  | GTT | CCA | GTG | AAT | CCC | CTC | ATC | TAC  | CTT | TAC  | CCA  | GAC | ATC         | CCA         | AAA  | GAT | GAA  | GCT         | TTT | AGT  | CGC | TAC  | ГА |
| 655  | А    | Е           | K    | V   | Р   | V   | N   | Р   | L   | Ι   | Y    | L   | Y    | Р    | D   | Ι           | Р           | K    | D   | Е    | А           | F   | S    | R   | Y    | Y  |
| 2107 | TACC | AGC         | GCA  | CCT | GAT | GAT | TCA | GAA | GAG | ATG | GAG  | ACA | GAC  | AAC  | CCT | ATC         | AAG         | CCA  | TAT | ATA  | CCC         | AGA | CGC. | ATG | ATT  | ГС |
| 681  | Т    | S           | А    | Р   | D   | D   | S   | Е   | Е   | M   | Е    | Т   | D    | Ν    | Р   | Ι           | K           | Р    | Y   | Ι    | Р           | R   | R    | M   | Ι    | S  |
| 2185 | TGTG | TCA         | GAA  | AAC | CCT | GTT | TCA | AGA | CTC | CAA | AAG  | TGT | TAG  | agc  | aca | tcg         | agg         | caa  | cgc | tgg  | ttt         | gag | gaa  | cgt | ttc  | tc |
| 707  | V S  | S E         | È N  | I   | Р   | V   | S   | R   | L   | Q   | K    | С   | *    |      |     |             |             |      |     |      |             |     |      |     |      |    |
| 2263 | cacc | aat         | gca  | tgc | tgc | atc | tga | cac | ata | gat | aac  | tat | aat  | gaa  | cga | tgg         | a <u>aa</u> | caa  | ata | gtga | ata         | ccc | aaa  | tga | ttca | at |
| 2341 | cttt | gca         | .cag | gtc | ttc | tct | cta | cta | tat | tag | tca  | taa | gaa  | tgt  | act | ac <u>a</u> | ttt         | act  | ctc | cac  | ttc         | ttg | tgt  | gaa | gaa  | ga |
| 2419 | ggag | cca         | ttt  | tct | ttt | gtc | aaa | tta | cag | aat | tta  | tag | ttaa | aaa  | cag | tgt         | aat         | ccta | att | tct  | ttt         | agt | ttg  | ttt | gtt  | tt |
| 2497 | tata | taa         | aaa  | atg | tga | ata | tat | ggt | caa | aaa | acc  | tgt | tga  | gaa  | tgc | att         | ttt         | tag  | tct | gtg  | tac         | cag | tat  | tgc | cata | aa |
| 2575 | tgga | tac         | aaa  | tac | tct | gaa | aat | ctg | ttt | ctt | tta  | aga | cat  | ttg  | ttt | gtg         | aac         | agga | aca | tcc  | tcc         | tct | atc  | ttg | tgaa | ag |
| 2653 | gact | t <u>at</u> | tta  | ttt | ttg | cac | atc | aaa | ata | tct | tta  | ctg | tata | ata  | cca | ttg         | cct         | taa  | ttg | caca | aaa         | cac | aca  | cac | act  | ga |
| 2731 | tttc | agt         | cag  | cca | ggt | aca | gtc | taa | cag | aaa | taa  | aca | acaa | acc  | atc | ctt         | ctc         | cag  | tca | gaga | ata         | ctg | ctt  | cag | atte | Cg |
| 2809 | agcc | gga         | atc  | att | ttg | ttt | cta | tgt | ttt | gaa | cat  | tag | aca  | gtg  | ttt | cat         | aat         | gtga | aat | tac  | t <u>aa</u> | taa | aga  | cta | ttaa | aa |
| 2887 | tgct | tta         | taa  | aaa  | aa  |      |      |     |             |             |      |     |      |             |     |      |     |      |    |

#### 图 1 赤眼鳟 STAT1 核酸序列及推导氨基酸序列

起始密码子由方框凸显,终止密码子用"\*"标出并以方框加以凸显; 主要结构域用灰色阴影标示,从前至后依次为 STAT\_int (2~122 aa)、STAT\_alpha (138~315 aa)、STAT\_bind (317~566 aa)和 SH2 (571~656 aa); mRNA 不稳定信号 (ATTTA)和多腺苷酸化终止信号 (AATAAA)用双下划线标示

#### Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of STAT1 from S. curriculus

The start codon is highlighted by the box, and the termination codon is marked with "\*" and indicated in box; the main domains are marked with gray shadow, and from front to back are STAT\_int (2-122 aa), STAT\_alpha (138-315 aa), STAT\_bind (317-566 aa) and SH2 (571-656 aa), respectively; the mRNA unstable motif (ATTTA) and polyadenylate termination signal (AATAAA) are double-underlined

中华鳖 (Pelodiscus sinensis)、红原鸡 (Gallus gallus)、小鼠 (Mus musculus) 以及人类 (Homo sapiens) 作为参照,通过 DNAMAN 软件对 STAT1 主 要结构域进行多序列比对 (图 3)。结果显示, STAT1 的 STAT\_int (121 aa)、STAT\_alpha (179 aa)、 STAT\_bind (250 aa) 以及 SH2 (86 aa) 4 个结构域分 别含 70、75、153 以及 48 个保守氨基酸,且 STAT\_ bind 结构域中的-E<sub>426</sub>E-和-V<sub>453</sub>VV-与激活 DNA 结 合功能有关<sup>[23]</sup>,而 SH2 结构域中的精氨酸-R<sub>602</sub> 已在哺乳动物 STAT1 中被证实为 SH2 酪氨酸结 合所必需的氨基酸<sup>[24]</sup>。STAT1 在赤眼鳟和草鱼间的 序列保守性最高;此外,鱼类的 STAT1 氨基酸序 列比其他脊椎动物要短,缺少 C 末端的转录激活 功能结构域 (transcriptional activation domain, TAD)。

系统进化树分析表明, ScSTAT1 先与草鱼 聚为一支,再与青鱼聚为1个分支,最后依次与



#### 图 2 ScSTAT1 结构域和 3D 结构模型

(a) 通过 SMART 软件预测的 ScSTAT1 结构域, 包含 STAT\_int、 STAT\_alpha、STAT\_bind 和 SH2 4个结构域; (b) 应用 I-TASSER 软件构建的 ScSTAT1 蛋白 3D 模型

#### Fig. 2 Structural domains and 3D model of ScSTAT1

(a) Structural domains of ScSTAT1 domainds predicted by SMART, including STAT\_int, STAT\_alpha, STAT\_bind and SH2;(b) ScSTAT2 3D protein model predicted by I-TASSER

鲫等鲤形目 (Cypriniformes) 鱼类, 鲇形目 (Siluriformes) 黃颡鱼 (Pelteobagrus fulvidraco)、脂鲤目 (Characiformes) 墨西哥脂鲤 (Astyanax mexicanus) 以及鲱形目 (Clupeiformes) 的齿头鲱 (Denticeps clupeoides) 聚为1个大支,此支物种 STAT1蛋白 C 端均缺少含有丝氨酸磷酸化位点的 TAD 结构域。此外,哺乳类、鸟类、两栖类和爬行类4 个亚支以及骨舌鱼目 (Osteoglossiformes)、鳗鲡目 (Anguilliformes)、鲑形目 (Salmoniformes)、鳀 形目 (Tetraodontiformes)、鲽 形目 (Pleuronectiformes)、鲈形目 (Perciformes) 以及狗鱼目 (Esociformes) 等硬骨鱼类聚为另1个大支(图4),本支 中除了鲑科的褐鳟 (S. trutta) 和两栖类的双条吻 蚓 (Rhinatrema bivittatum) 外,其他物种的 STAT1 蛋白 C 端均具有 TAD 结构域。

#### 2.3 ScSTAT1 组织表达量分析

采用 qPCR 方法检测 ScSTAT1 在健康赤眼鳟 组织中的表达量,结果显示, ScSTAT1 在所检测 的 8 个组织中均有表达 (图 5),且在脾脏中的相 对表达量极显著高于其他 7 个组织 (P<0.01),而 在肝脏中的相对表达量最低。

#### 2.4 ScSTAT1 免疫响应分析

与对照组相比,赤眼鳟经过LPS、Poly I:C 以及II型GCRV3种不同免疫原刺激后,脾脏和 肾脏组织中 ScSTAT1 mRNA 总体表达上调。各免 疫原刺激 24 h 时实验组 脾脏 ScSTAT1 表达水平 均极显著高于对照组 (P<0.01) (图 6-a)。LPS 刺激 24 h 时脾脏 ScSTAT1 表达量最高 (P<0.01), 随后 开始下降,但72h时仍显著高于对照组(P<0.05); 经 Poly I:C 处理 12 和 24 h 时 脾脏 ScSTAT1 表达 量极显著高于对照组 (P<0.01), 且同样在 24 h 时 表达量最高;经GCRV刺激后,在12h时表达 先显著下降 (P<0.05), 然后又极显著上调 (P<0.01)。 体肾中上调最明显的是 LPS 组, 在检测的 5 个时 间点 ScSTAT1 表达量均显著高于对照组,并在 72h时达到峰值; Poly I:C 处理 6 和 12 h 时体肾 ScSTAT1 表达量显著高于对照组,而在 72 h时表 达量极显著低于对照组 (P<0.01);体肾中 GCRV 刺激 12 和 72 h 时 ScSTAT1 表达量显著高于对照 组(图 6-b)。

#### 2.5 siRNA 干扰 ScF 中 ScSTAT1 的表达

ScF 细胞的 RNA 干扰实验结果表明,与 MC 相比,转染 NC-siRNA 48 h 后 ScF 中 *ScSTAT*1 表达水平无显著性变化;而 siRNA 1 处理组中 *ScSTAT*1 表达水平极显著下调 (*P*<0.01),干扰效 率为 40%; siRNA 2 处理组也出现极显著下调 (*P*<0.01),干扰效率为 60%;而 siRNA 3 处理组 则无显著变化(图 7-a)。选择干扰效率最高的 siRNA 2 作为干扰攻毒实验组,NC 为对照组。病毒刺 激 24 h 时,*ScSTAT*1 的表达水平较 NC 组显著下 调 (*P*<0.05)(图 7-b)。而其下游基因 *IRF*3 (图 7-c)、 *IRF*9 (图 7-e)以及 *Mx* (图 7-f)均在刺激 48 h 时极 显著下调 (*P*<0.01)。

#### 3 讨论

不同物种的 IFN 均需通过 STAT 和 JAK 家 族基因激活的 JAK-STAT 通路发挥抗病毒免疫作 用<sup>[25]</sup>。Zhang 等<sup>[15]</sup>利用经紫外线灭活的草鱼出血 病病毒感染鲫囊胚细胞后,大量 JAK-STAT 信号 通路相关因子的表达受到诱导,表明 JAK-STAT 通路参与了 IFN 信号传导和抗病毒免疫; Hor-vath<sup>[26]</sup>的研究证实了 *STAT*1 作为 IFN 发挥抗病毒 功能过程中的核心成员不可或缺。

从进化关系来看,ScSTAT1和同属雅罗鱼 亚科的草鱼STAT1归为一支。此外,ScSTAT1 的氨基酸序列与其他物种的STAT1高度保守, 且具有STAT家族的4个保守结构域。高度序列

| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piccus<br>非洲爪蟾 X. laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列 consensus               | MAINNORGIDTS LYLKOVTCI YT 24 FPMETROVIS GWE SETWE SYRST VSTATLF FREI DAGLE HINSENSTATUR NELCHNYR LYND AN DAGLE HINSENST NEL DAG  | 85<br>85<br>85<br>85<br>85<br>85<br>85<br>85                |
|--|---|---|
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>析 Diccus<br>非洲爪蟾 X laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红尿鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列 consensus                    | ERRICOH CELEVENY TAN IDNESKIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINNETSVCEDFODICVEDVO<br>IKRNICEH CELEVENY TAN IDNESKIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINNETSVCEDFODICVEDVO<br>IKRNICEH CELEVENY TANTINEDE KIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINNETSVCEDFOTICVEDVO<br>KRNICEH CELEVENY TANDIEED KIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINNETSVCEDFOTICVEDVO<br>KRNICEH CELEVENY TANDIEED KIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINNETSVCEDFOTICVEDVO<br>KRNICEH CELEVENY TANDIEED KIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINNETSVCEDFOTICVEDVO<br>KRNICEH CELEVENY TANDIEED KIIETELS.LOGKCISSOG.SEVECONETANEINE<br>KRNICEN CELEVENY TANDIEED KIIENARSSIKNOVGSTOT.SVCENCETELEVENY SVNSV DE CELETET<br>KRNICEN CELEVENY TANDIEED KIIENARSSIKNOVGSTOT.SVCENCETELEVENY SVNSV DE CELETET<br>KRNICEN CELEVENY TANDIEED KIIENARSSIKNOVGSTOT.SVCENCETELEVEN<br>KRNICEN CELEVENY TANDIEED KIIENARSSIKOGOGINEN.SVCENCE VELETEVEN<br>KRNICEN CELEVENSU TANDIEED KIIENARSSIKTIEN SVCENCE SVNSVENSVEL CELETET<br>KRNICEN CELEVENSU TANDIEED KIIENARSSIG   | 167<br>167<br>168<br>168<br>170<br>168<br>168               |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piceus<br>非洲爪蟾 X. laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列 consensus               | EYDEMERTICSEVEAGMSSCRIFTICISEMAIRCE IGIGE MEVVIREMANVIILACIG FILISEE FINMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSEVEAGMSSCRIFTICISEMAIRCE IGIGE MEVVIREMANVIILACIG FILISEE FINMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSEVENGEN SOITKEIGE ENAFRONTICISEN VIREMANVIILACIG FILISEE FINMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSEVENGEN SOITKEIGE ENAFRONTICISEN EINEN VIREMANVIILACIG FILISEE FINMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE KINHENGELONLIKEN ENAFRITN, MICHUEMERGIEFEN EINEN VIREMANVIILACIG FILISEE FINMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGELONLIKEN ENAFRITN, MICHUEMERGIEFEN EINEN VIREMANVIILACIG FILISEEF VIRMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGELONLIKEN ENAFRITN, MICHUEMERGIEFEN EINEN EINEN VIRMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN EINEN EINEN EINEN EINEN VIRMERGE SALINEEVVRAMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN EINEN VIRMERGIEFEN EINEN EINEN VIRMERGE SALINEEVVRAMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN EINEN VIRMERGE SALINEEVVRAMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN VIRMERGE VIRMERGE SALINEEVVRAMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERGE SALINEEVVRAMERCOACIGGEF<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN VIRMERTEILMEN EIN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERGE<br>STATA SALINGEN EINEN VIRMERTEILMENTEIN EINEN VIRMERTEILMEN<br>EYDEMERTICSE, KINHENGEN EINEN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERGE<br>STATA SALINGEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERTEILMEN<br>STATA SALINGEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMEN EINEN VIRMERTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTEILMENTE | 252<br>252<br>252<br>252<br>252<br>252<br>254<br>252<br>252 |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piceus<br>非洲爪蟾 X. laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列 consensus               | NACLECICIONETIA SI CORCURATERECATIVATERE INTERNATIONETI LASSO DECAL I FINILING UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICS NETVIA CLI CI ROCLEMO ELVORETIVADE I LASSO DECAL IFINILING UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICS NETVIA CLI CI ROCLEMO ELVORETIVADE I LASSO DECAL LENNILING UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICS NETVIA CLI CI ROCLEMO ELVORETIVADE I LASSO DECAL LENNILING UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICS NETVIA CLI CI ROCLEMO ELVORETIVADE I LASSO DECAL LENNILING UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICS NETVIA CLI CI ROCLEMO ELVORETIVADE I LASSO DECAL LENNILING UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT<br>NACLECICANETILA SI CORCULARIDELE CATI PEDE TININOVI CIRICI LENCI COS UVEROPONETHPORE VIKT   | 337<br>337<br>337<br>337<br>337<br>339<br>337<br>339        |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piceus<br>非洲爪蟾 X. laevis<br>非学狂繁 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人業 H. sapiens<br>共有序列 consensus              | GVQFTVKIRSIVELABINCC KVKVFICKULTESITIKGGRKFNILGTISKVMNIES.NGCLAAR RHLQLKFERCN.NRINF<br>GVQFTVFIRSIVELADINCC KVKVFICKULSSITIKGGRKFNILGTISKVMNIES.NGCLAAD RHLQLKFERCN.NRINF<br>GVQFTVFIRSIVELGONCC KVKVSICKULTSITIKGGRKFNILGTISKVMNIES.NGCLAAD RHLQLKFERCN.NRINF<br>GVQFTVFIRSIVELGONCC KVKVSICKULTSITIKGGRKFNILGTISKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERCN.RRINF<br>GVQFTVFIRSIVELGONNN KVKVLOKUNGKSSKSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGONNN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGONNN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGONN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGONN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGONN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSKSKSKSRKFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSKSKSKSKSKSTRFNILGTNRKVMNIESSINGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSKSKSKSKSKSKSKSFRINSGFANGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSFRINSFSSKSFANGSLAAD RHLQLKFERNAG<br>GVQFTVFIRSIVELGSTIN KVKVLOKUNGKSSKSKSKSKSKSKSKSFRINSFSSSSFSFANSFSSSKSFANSFSSSSFSFSFTIGSSTAN SKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSKSK   | 420<br>420<br>422<br>422<br>422<br>422<br>422<br>422<br>422 |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piccus<br>非洲爪蟾X. laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列consensus                 | PLINSERIETUR EETOL GEBCUTI SIISII YWYISIANOLESANGSIIWINNI CSEENTI TEFL FE PV&WEGLSAVIGWOES<br>PLINEELII FETOL GEBCUTI SIISII WWYISIANOLESANGSIIWINNI CSEENTI TEFL FE PV&WEGLSAVIGWOES<br>PLINEELII FETOL GEBCUTI SIISII WWYISIANOLESANGSIIWINNI CSEENTI TETL FE PV&WEGLSAVIGWOES<br>PLINEELII SEETOL GEGUVUL 2TISII WWYISIANOLESANGSIIWINNI TSITAVISETU FEAAMADI SINI SWANG<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII WWYISIANOLESANSIIWINNI TSITAVISETU FEAAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANGULESANSIIWINNI TSITAVISETU FEAAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANGULESANSIIWINNI TSITAVISETU FECAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANGULESANSIIWINNI TSITAVISETU FECAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANGULESANSIIWINNI TSITAVISETU FECAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANSULESANSIIWINNI STERANSI SETI FECAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANSULESANSIIWINNI STERANSI SETI FECAMASI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANSULESANSI SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANSULESANSI SUUSWOES SUUSWOES<br>PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2TISII TUVISIANSULESANSI SUUSWOESSI SUUSWOESSI PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2000 SUUSWOESSI SUUSWOESSI PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2000 SUUSWOESSI MUMI SUUSWOESSI PLIVEENTI SETUL SUUSWOESSI PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2000 SUUSWOESSI PLIVISANSUL 2000 SUUSWOESSI PLIVEELISISETOL GEGUVUL 2000 SUUSWOESSI PLIVISANSUL 2000 SUUSWOESSI PLIVEENTI 2000 SUUSWOESSI PLIVEELISISETOL 2000 SUUSWOESSI PLIVEENTI 2000 SUUSWO       | 505<br>505<br>507<br>507<br>507<br>509<br>507<br>507        |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>析 C. idella<br>析 M. piccus<br>非洲爪뼼 X. laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红尿鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列 consensus | STARED IN SECTEM AN FLICHEAGEDPECT WANTECHNSRUERE OTHE TO DITUTE THE DINING STICE FLERE STREAMENT OF THE STR  | 590<br>590<br>591<br>592<br>594<br>590<br>590               |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piccus<br>非洲爪蟾又 Laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列 consensus                 | PROKIEGTELLARSSTCIEGCTOTTWVPTENG.EKKIS VAFYTKODASISLONVIRUNTITAABKWEVNEDITULYHDIKKE<br>IRIKLEGTELLARSSTCIEGCTOTTWVPTENG.EKKIS VAFYTKODASISLONVIRUNTUTAABKWEVNEDITULYHDIKKE<br>IRIKLEGTELLARSSTCIEGCTOTTWVPTENG.EKKISVAFYTKODASISLONVIRUNTUTAABKWEVNEDITULYHDIKKE<br>IRIKLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENG.EKLESVEFYTKODASISLONVIRUNTUAABKWEVNEDITULYHDIKKE<br>IKIKLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENG.EKLESVEFYTKODASISLONVIRUNTUAABKUEVNEDITULYHDIKKE<br>IKIKLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENG.EKLESVEFYTKODASTEDIIRNKEVAABNIENNEDITULYHDIKKEN<br>IKICLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENG.EKLESVEFYTKODASTEDIIRNKEVAABNIENNEDITULYHDIKKEN<br>IKICLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENGEGI.EKLESVEFYTKODASTEDIIRNKEVAABNIENNEDITULYHDIKKEN<br>IKICLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENGEGI.EKLENAVEFYTKEDISANTEDIIRNKEVAABNIENNEDITULYHDIKKEN<br>IKICLEGTELLARSSTCIEGTTUTWVPTENGEGI.EKLENAVEFYTKEDISANTEDIIRNKEVAABNIENNEDITULYHDIKKEN<br>IKICLEGTELLARSSTCIEGTUTUVPTENGEGI.EKLENAVEFYTKEDISANTEDIIRNKEVAABNIENNEDITULYHDIKKEN<br>IKICLEGTELLARSSTCIEGTUTUVPTENGEGI.EKLENAVEFYTKEDISANTEDIIRNKEVAABNIENNEDIKULYHDIKKEN  | 674<br>674<br>674<br>674<br>675<br>675<br>675               |
| 赤眼鳟 S. curriculus<br>草鱼 C. idella<br>青鱼 M. piccus<br>非洲爪蟾 X. laevis<br>中华鳖 P. sinensis<br>红原鸡 G. gallus<br>小鼠 M. musculus<br>人类 H. sapiens<br>共有序列consensus                | A FSRYY GSAFELS BENETING IKF.YT PRPMISYSENNYSELG KC.<br>AFSRYY GSAFELS BENETING IKF.YT PRPMISYSENNYSELG KC.<br>AFSRYY GSAFELS BENETING IKF.YT PRPMISYSENNYSELG KC.<br>AFSRYY GSAFKG DE MOUT GS KGTGYT KTELISYSEN PRYSELG KC.<br>AFGYY GSAFKG DE MOUT GS KGTGYT KTELISYSEN PRYSELG TENLT PHSP DEF DEVANLYGPA FFTYWCSYNS<br>AFGYY GSAFKG DE MOUT GF KGNGYT KTELISYSEN PRYSELG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYP<br>AFGYY GSAFKG FEMDIG G KGTGYT KTELISYSEN PRYSELG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY GSAFKG FEMDIG G KGTGYT KTELISYSEN PRSELG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY GSAFKG FEMDIG G KGTGYT KTELISYSEN PRSELG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY GSAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY GSAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY GSAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP DEF DEVSAFW SPACITTWCSAYT<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN PHSSLG TENLT PHSP FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FEMELT G KGTGYT KTELISYSEN FED FED FENEL PHSSLG FED DEVST V.<br>AFGYY SPAFKG FED FENELT FED  | 718<br>718<br>751<br>752<br>754<br>749<br>750               |

图 3 不同物种 STAT1 蛋白序列比对分析

不同结构域以3线红框表示; 酪氨酸磷酸化位点以红色箭头凸显; STAT1 功能相关保守氨基酸红框表示

#### Fig. 3 Blast analysis of STAT1 proteins from different species

Different domains are indicated by 3-line red boxes; the tyrosine phosphorylated site is highlighted in a red arrow; the conserved amino acids required for STAT function are indicated by red boxes





相似性及同源结构特征表明所得 cDNA 序列为 ScSTAT1。STAT\_int 结构域位于 N 端,在 STAT1 与自身或 STAT 家族其他成员结合形成二聚体的 过程中发挥作用<sup>[27]</sup>;STAT\_alpha 结构域主要与 其他螺旋蛋白产生特异性互作,如参与 STAT1 与 IRF9 的互作<sup>[28]</sup>;STAT\_bind 主要在启动基因 转录中起发挥作用<sup>[29]</sup>;而 SH2 结构域则主要与 STAT1的活化以及二聚体形成反应有关<sup>[24,30]</sup>。以 上结构域的存在及功能表明,ScSTAT1可介导免 疫信号的传递与调控过程。近年来,在哺乳动 物中检测到多种 STAT 变异体<sup>[31]</sup>,这些变异体均 表现为C-端相关序列的缺失<sup>[32]</sup>。本研究中 ScSTAT1 TAD 结构域的缺失表明该蛋白也属于这一类 变异体蛋白。STAT 蛋白通过 C-末端 TAD 结构

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



图 5 ScSTAT1 在赤眼鳟各器官、组织中的表达分布 1. 肠, 2. 肝脏, 3. 脑, 4. 皮肤, 5. 脾脏, 6. 鳃, 7. 体肾, 8. 头肾; "\*\*"表示差异极显著 (P<0.01); n=3

# Fig. 5 Distribution of ScSTAT1 transcript in different organs and tissues of S. curriculus

1. intestine, 2. liver, 3. brain, 4. skin, 5. spleen, 6. gill, 7. trunk kidney, 8. head kidney; "\*\*" means extremely significant difference (P<0.01); n=3

域与丝氨酸激酶互作,实现免疫反应的特异性<sup>[33]</sup>。据此推测,STAT1的TAD结构域有或无可能与其互作对象及参与干扰素反应途径的选择相关<sup>[34]</sup>。

STAT1 以一种未激活的状态存在于细胞质

中,可被 IFN 及其受体的结合作用激活<sup>[17]</sup>。STAT1 以及 STAT2 表达量与心肌细胞对 IFN 的敏感度成 正比,并最终影响免疫信号的传递效率[35]。本研 究中 ScSTAT1 mRNA 在被检测的组织中表达差异 明显,且脾脏中表达量极显著高于其他组织。 研究发现,石斑鱼、牙鲆及大西洋鲑等鱼类各 组织的 STAT1 表达水平差异显著,且不同物种 间相同组织的 STAT1 mRNA 表达水平亦存在差 异,但总体检测结果均显示,脾脏、鳃以及皮 肤组织中表达量较高<sup>[17, 19, 21, 36]</sup>。ScSTAT1 mRNA 组织间表达水平差异的原因可能是各组织的免 疫学结构以及表达特定免疫分子的免疫细胞组 成存在差异[37]。而脾脏是鱼类机体中各种粒性白 细胞和红细胞等产生、储存和成熟的主要场所, 具有强大的淋巴细胞增殖功能和免疫功能[38]。据 此推测, ScSTAT1 在脾脏中的高表达可能赋予该 组织快速响应免疫刺激并对异物进行贮存、破 坏或脱毒处理的功能<sup>[39]</sup>。LPS 与 Poly I:C 作为实 验中常用到的免疫刺激物,在一定程度上可以 模拟细菌和双链 RNA 病毒的刺激条件。二者通 过不同途径均可触发干扰素反应,促进 STAT1 表达,最终通过 JAK-STAT 信号通路抑制病原<sup>[40-41]</sup>。 本研究中经 LPS 和 Poly I:C 刺激处理后, 脾脏 和肾脏中 ScSTAT1 表达水平总体均上调,提示





#### 图 6 脂多糖、聚肌胞苷酸和草鱼呼肠孤病毒感染赤眼鳟后脾脏 (a) 和肾脏 (b) 中 ScSTAT1 的表达水平

在实验中进行3次生物学重复,数据显示为平均值±SD (n=3),每个时间点实验组与对照组间基因表达量差异显著性用 t 检验进行分析, \*表示差异显著 (P<0.05),\*\*表示差异极显著 (P<0.01)

#### Fig. 6 Expression levels of *ScSTAT*1 in spleen (a) and trunk kidney (b) after infection of *S. curriculus* with LPS, Poly I:C and GCRV

Tree biological replicates were performed in the experiment and the data were shown as mean  $\pm$  SD (*n*=3), the *t* test was used to analyze the significance of differences between the gene expression levels of experimental and control group, single asterisks and double asterisks denote significant differences (*P*<0.05) and extremely significant differences (*P*<0.01), respectively

3期





(a) siRNAs 转染赤眼鳟鳍条细胞后, qPCR 检测 ScSTAT1 的表达; siRNA 2 转染赤眼鳟鳍条细胞 24 h时,用 GCRV 刺激细胞 24、48、72 h后, qPCR 检测 ScSTAT1 (b)、IRF3 (c)、IRF7 (d)、IRF9 (e)及 Mx (f) 的表达; (a)1. 空白对照组 (转染试剂组), 2. 阴性对照组, 3. siRNA 1 实验组, 4. siRNA 2 实验组, 5. siRNA 3 实验组; 图中数据表示为平均值±SD (n=3), \*表示差异显著 (P<0.05), \*\*表示差异极显著 (P<0.01)

#### Fig. 7 Expression characteristics of related genes in ScF after siRNA interference

(a) Expression of *ScSTAT*1 by qPCR after siRNAs were transfected to *S. curriculus* fin (ScF) cells; expression of *ScSTAT*1(b), *IRF3* (c), *IRF7* (d), *IRF9* (e) and *Mx* (f) by qPCR after ScF cells were transfected with siRNA 2 for 24 h and then stimulated with GCRV for 24, 48, 72 h; (a) 1. mock control, 2. negative control, 3. siRNA 1, 4. siRNA 2, 5. siRNA 3; error bars indicate the mean  $\pm$ SD (*n* = 3). \* represents significant difference, *P* < 0.05; \*\* represents extemely significant difference, *P* < 0.01

ScSTAT1具有响应细菌和病毒刺激并引发抗病反应的潜能。此外,我们发现经LPS刺激后ScSTAT1表达水平呈现先升高后下降的变化趋势,说明其被激活完成免疫信号传递后需逐步回归到正常水平,以避免过度免疫<sup>[42]</sup>。赤眼鳟肾脏ScSTAT1经GCRV感染后前期表达上调,这与多数鱼类感染病毒后STAT1表达变化趋势相符;如大西洋鲑感染传染性贫血病毒和传染性胰腺坏死病毒后STAT1表达量显著上调<sup>[16]</sup>;而点带石斑鱼脾脏细胞感染神经坏死病毒及虹彩病毒后STAT1的表达水平成倍增长<sup>[36]</sup>。此外,经GCRV感染后脾脏ScSTAT1表达量呈现先下降后上升的趋势,说明在该组织中ScSTAT1参与抗病毒反应早期过程中可能存在被病毒抑制表达的现象<sup>[43]</sup>。

病毒入侵后被模式识别受体所识别,线粒 体干扰素-β启动子刺激因子-1被激活,然后经 IRF3/7-IFN- I和 NF-kB 路径进行信号传导,诱 导 I 型 IFN 产生并进一步诱导具有限制病毒复制 和降低其感染功能的干扰素刺激基因如 Mx 等的 表达<sup>[44-47]</sup>。本研究成功通过 RNA 干扰实验研究 了 ScSTAT1 可能参与的免疫反应及功能,发现其 所在的干扰素信号通路成员 IRF3、IRF9 和 Mx 的 表达量均在病毒刺激后相对于对照组出现了显 著降低,说明 IRF3、IRF9 和 Mx 可能位于同一信 号反应通路中<sup>[48]</sup>。IRF3和IRF9均具有激活 IFN 和干扰素刺激基因并诱导抗病毒能力的功能[49], 且已有研究表明, IRF3 和 IRF7 在赤眼鳟抗 GCRV 的免疫反应中发挥着重要作用<sup>[50-51]</sup>,而 Mx 具有 抑制病毒 RNA 合成的功能<sup>[46]</sup>,因此, ScSTAT1 被 干扰后引起的 IRF3、IRF9 和 Mx 表达量显著下降, 暗示着其在抗病毒免疫过程中发挥重要作用。

综上所述,我们对 ScSTAT1 全长 cDNA 序列的分析发现该基因缺失 TAD 结构域,推测这种缺失与其互作对象及参与干扰素反应途径的选择相关;利用 qPCR 分析了 ScSTAT1 在健康组织中的分布与组织功能密切相关,并且在 GCRV 感染前期存在被病毒抑制表达的现象;另外,利用干扰技术下调 ScSTAT1 的表达,发现 IFN 系统下游 IRF3、IRF9 和 Mx 均出现显著下调,佐证了 ScSTAT1 参与 IFN 系统的信号传递并在其中发挥重要作用。本实验为进一步深入开展 ScSTAT1 在机体抗病过程中的信号传递分子机制研究奠定了基础。

#### 参考文献 (References):

- [1] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon[J]. Proceedings of the Royal Society of Series B: Biological Sciences, 1957, 147(927): 258-267.
- [2] Raftery N, Stevenson N J. Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(14): 2525-2535.
- [3] Collet B, Secombes C J. Type I-interferon signalling in fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(5): 389-397.
- [4] 薛翔, 刘红梅, 邵旦兵, 等. JAK/STAT信号通路调节机
   制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(11):
   2161-2165.

Xue X, Liu H M, Shao D B, *et al.* Research progress of regulating mechanism on JAK/STAT signaling pathway[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(11): 2161-2165(in Chinese).

- [5] 贾伟章. 乌鳢免疫相关基因的克隆鉴定与特征分析 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2007.
  Jia W Z. Molecular cloning, identification and characterization of immune-relevant genes in snakehead *Channa argus*[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2007(in Chinese).
- [6] 赵明宇.大菱鲆信号转导及转录激活因子 1 (STAT1) 和牙鲆干扰素调节因子 9 (IRF9) 全长 cDNA 克隆与 表达分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
  Zhao M Y. Molecular cloning and expression analysis of STAT1 in turbot, Scophthalmus maximus, IRF9 in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [7] Levy D E, Kessler D S, Pine R, *et al.* Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-α-stimulated transcription, reconstituted in vitro[J]. Genes & Development, 1989, 3(9): 1362-1371.
- [8] 吕品. STAT转录因子家族在医药化学中的应用[J]. 中国校外教育:上旬, 2013(8): 98.
  Lv P. Application of STAT transcription factor family in medical chemistry[J]. Education for Chinese Afterschool (Theory): First issue, 2013(8): 98(in Chinese).
- [9] 吴真. 草鱼 IRF9 与 STAT2 结合上调 IFN 与 PKR 转 录水平 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
  Wu Z. Interaction of IRF9 and STAT2 synergistically upregulates IFN and PKR transcription in Ctenopharyngodon idella[D]. Nanchang: Nanchang University, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

2018(in Chinese).

- [10] 张义兵, 桂建芳. 鱼类干扰素反应及分子调控[J]. 生物 工程学报, 2011, 27(5): 675-683.
  Zhang Y B, Gui J F. Fish interferon response and its molecular regulation: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(5): 675-683(in Chinese).
- [11] Licht V, Noack K, Schlott B, et al. Caspase-3 and Caspase-6 cleave STAT1 in leukemic cells[J]. Oncotarget, 2014, 5(8): 2305-2317.
- [12] Jouanguy E, Zhang S Y, Chapgier A, et al. Human primary immunodeficiencies of type I interferons[J]. Biochimie, 2007, 89(6-7): 878-883.
- [13] Pilz A, Ramsauer K, Heidari H, *et al.* Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons[J]. EMBO Reports, 2003, 4(4): 368-373.
- [14] Oates A C, Wollberg P, Pratt S J, et al. Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1 - deficient human cell line[J]. Developmental Dynamics, 1999, 215(4): 352-370.
- [15] Zhang Y B, Gui J F. Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus CaSTAT*1 identified from the cultured cells in response to virus infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2004, 28(3): 211-227.
- [16] Collet B, Bain N, Prevost S, et al. Isolation of an Atlantic salmon (Salmo salar) signal transducer and activator of transcription STAT1 gene: kinetics of expression upon ISAV or IPNV infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 861-867.
- [17] Park E M, Kang J H, Seo J S, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the *STAT*1 gene from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. BMC Immunology, 2008, 9(1): 31.
- [18] Cheng C H, Chou C M, Chu C Y, et al. Differential regulation of *Tetraodon nigroviridis Mx* gene promoter activity by constitutively-active forms of STAT1, STAT2, and IRF9[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 230-243.
- [19] Tso C H, Hung Y F, Tan S P, et al. Identification of the STAT1 gene and the characterisation of its immune response to immunostimulants, including nervous necrosis virus (NNV) infection, in Malabar grouper (Epinephelus malabaricus)[J]. Fish & Shellfish Immunology,

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

2013, 35(5): 1339-1348.

- [20] Skjesol A, Hansen T, Shi C Y, *et al.* Structural and functional studies of *STAT*1 from Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. BMC Immunology, 2010(1), 11: 17.
- [21] Yu F F, Zhang Y B, Liu T K, et al. Fish virus-induced interferon exerts antiviral function through Stat1 pathway[J]. Molecular Immunology, 2010, 47(14): 2330-2341.
- [22] 刘巧林. 草鱼与赤眼鳟杂交 F<sub>1</sub> 遗传特征及对草鱼呼肠 孤病毒抗性的研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
  Liu Q L. Studies on genetic characteristics and grass carp reovirus resistance of F1Hybrids between grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*)[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [23] Horvath C M, Wen Z, Darnell J E. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain[J]. Genes & Development, 1995, 9(8): 984-994.
- [24] Shuai K, Horvath C M, Huang L H T, *et al.* Interferon activation of the transcription factor *Stat91* involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions[J]. Cell, 1994, 76(5): 821-828.
- [25] Ihle J N, Kerr I M. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily[J]. Trends in Genetics, 1995, 11(2): 69-74.
- [26] Horvath C M. Weapons of STAT destruction: interferon evasion by paramyxovirus V proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(23-24): 4621-4628.
- [27] Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell Jr J E, *et al.* Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4[J]. Science, 1998, 279(5353): 1048-1052.
- [28] Horvath C M. Stark G R, Kerr I M, *et al* Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferonstimulated gene factor 3 transcription complex[J]. Molecular and Cellular Biology, 1996, 16(12): 6957-6964.
- [29] Chen X M, Vinkemeier U, Zhao Y X, et al. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA[J]. Cell, 1998, 93(5): 827-839.
- [30] Gupta S, Yan H, Wong L H, *et al.* The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-α signals[J]. The EMBO Journal, 1996, 15(5): 1075-1084.
- [31] Schindler C, Fu X Y, Improta T, *et al*. Proteins of tranhttps://www.china-fishery.cn

scription factor ISGF-3: one gene encodes the 91and 84 kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon  $\alpha$ [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(16): 7836-7839.

- [32] Park C, Lecomte M J, Schindler C. Murine Stat2 is uncharacteristically divergent[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(21): 4191-4199.
- [33] Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, *et al.* Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression[J]. The EMBO Journal, 2001, 20(1-2): 91-100.
- [34] Wen Z L, Zhong Z, Darnell Jr J E. Maximal activation of transcription by *stat*l and *stat*3 requires both tyrosine and serine phosphorylation[J]. Cell, 1995, 82(2): 241-250.
- [35] Zurney J, Howard K E, Sherry B. Basal expression levels of *IFNAR* and Jak-STAT components are determinants of cell-type-specific differences in cardiac antiviral responses[J]. Journal of Virology, 2007, 81(24): 13668-13680.
- [36] Zhang J C, Huang X H, Ni S W, et al. Grouper STAT1a is involved in antiviral immune response against iridovirus and nodavirus infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 70: 351-360.
- [37] 雷雪彬. 草鱼兔疫器官个体发育的组织结构和免疫细胞变化 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
  Lei X S. Microstructure and immune cells' distribution of early development immune organs in *Ctenopharyngodon idella*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [38] 李亚南,陈全震,邵健忠,等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究, 1995, 16(1): 83-94.
  Li Y N, Chen Q Z, Shao J Z, *et al.* Advances in research of fish immunology[J]. Zoological Research, 1995, 16(1): 83-94(in Chinese).
- [39] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648-654.
  Zhang Y A, Sun B J, Nie P. Immune tissues and cells of fish: a review[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(6): 648-654(in Chinese).
- [40] Ding X, Lu D Q, Hou Q H, et al. Orange-spotted grouper (Epinephelus coioides) toll-like receptor 22: molecular characterization, expression pattern and pertinent signaling pathways[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012,

33(3): 494-503.

- [41] Sahoo B R, Basu M, Swain B, et al. Structural insights of rohu *TLR*3, its binding site analysis with fish reovirus dsRNA, poly I: C and zebrafish TRIF[J]. International journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 531-543.
- [42] 杨冰贞, 张民, 王克坚. NF-κB 信号通路在鱼类先天性 免疫中的作用[J]. 生物技术通报, 2014(1): 46-52.
  Yang B Z, Zhang M, Wang K J. Role of NF-κB Signal Pathway in the innate immune system of fish[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(1): 46-52(in Chinese).
- [43] 常燕子, 雷延昌, 郝友华, 等. HCV 核心蛋白抑制干扰
   素α诱导的抗病毒基因表达及其机制研究[J]. 生物工
   程学报, 2007, 23(6): 1000-1004.

Chang Y Z, Lei Y C, Hao Y H, *et al.* Study of the effect of Hepatitis C virus core protein on interferon-induced antiviral genes expression and its mechanisms[J].
Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(6): 1000-1004(in Chinese).

- [44] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp[J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015: 670437.
- [45] Ranji A, Boris-Lawrie K. RNA helicases: emerging roles in viral replication and the host innate response[J]. RNA biology, 2010, 7(6): 775-787.
- [46] Poynter S J, DeWitte-Orr S J. Fish interferon-stimulated genes: the antiviral effectors[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 65: 218-225.
- [47] 彭慧珍,刘敏,刘巧林,等.赤眼鳟Mx基因全长cDNA克 隆及其经GCRV攻毒后的组织表达分析[J].水生生物 学报,2014,38(6):993-1001.

Peng H Z, Liu M, Liu Q L, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of *Mx* gene in *Squaliobarbus curriculus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 993-1001(in Chinese).

- [48] Li Y G, Jin S Z, Zhao X, et al. Sequence and expression analysis of the cytoplasmic pattern recognition receptor melanoma differentiation-associated gene 5 from the barbel chub Squaliobarbus curriculus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 485-496.
- [49] 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]. The Journal of Immunology, 2010, 185(12): 7573-7582.
  中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- [50] Wang R H, Li Y G, Zhou Z Y, et al. Involvement of interferon regulatory factor 3 from the barbel chub Squaliobarbus curriculus in the immune response against grass carp reovirus[J]. Gene, 2018, 648: 5-11.
- [51] Zhao X, Wang R H, Li Y G, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of *interferon regulatory factor* 7 of the barbel chub, *Squaliobarbus curriculus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 69: 185-194.

# Sequence structure and immune function of signal transduction and transcriptional activator *STAT*1 of barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*)

LUO Hong, LI Yaoguo<sup>\*</sup>, LI Dongfang, ZOU Jun, XIAO Tiaoyi<sup>\*</sup>

(Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The grass carp hemorrhage disease poses a serious threat to the long-term expansion of the aquaculture industry. The barbel chub (Squaliobarbus curriculus) could hybrid with the grass carp to produce progeny possessing resistance to GCRV infection and, therefore, are considered valuable genetic resources for studying the molecular mechanisms of grass carp hemorrhage. To investigate the immune function of barbel chub STAT1 (ScSTAT1) against GCRV infection, the RACE (rapid amplification of cDNA ends), qPCR (quantitative polymerase chain reaction) and RNAi (RNA interference) techniques were applied to obtain the full-length cDNA sequence of ScSTAT1, to detect its expression profile in healthy and GCRV-infected tissues, and to explore its basic immune function. The ScSTAT1 was 2 922 bp in length and encoded a protein of 718 amino acid residues. The ScSTAT1 contained conserved domains for STAT int, STAT alpha, STAT binding and SH2. Phylogenetic analysis revealed that the ScSTAT1 was closely clustered with the homologue from Ctenopharyngodon idella, forming an extended clade with those from Mylopharyngodon piceus, Carassius auratus and Tachysurus fulvidraco. Compared to the homologues from mammals and reptiles, ScSTAT1 lacked a C-terminal TAD domain where a serine phosphorylation site is present. The expression level of ScSTAT1 was shown to be the highest in the spleen among the tissues analyzed, with the lowest level detected in the liver. Treatment of fish with LPS, Poly I:C or GCRV resulted in upregulation of expressions of ScSTAT1 in the spleen and kidney. At 12 h post GCRV infection, the ScSTAT1 expression was down-regulated in the spleen, followed by increases. At 12 h and 72 h post GCRV infection, in trunk kidney the expression levels of ScSTAT1 were significantly higher than those in the control group. In the S. curriculus fin cell (ScF) line, knockdown 60% of ScSTAT1 expression by RNA interference led to decreased expression of IRF3, IRF9 and Mx at 48 h post GCRV infection. The results of the present study proved that ScSTAT1 participated in the signal transduction of the IFN system and played a key role in immune reaction against GCRV infection. The results also provide research basis for further study on the functions of *ScSTAT*1 in disease resistance in fish.

**Key words**: *Squaliobarbus curriculus*; signal transduction and activator of transcription 1 gene (*STAT*1); interferon pathway; grass carp hemorrhage; structure and function

Corresponding authors: LI Yaoguo. E-mail: yaoguolijkl@163.com;

XIAO Tiaoyi. E-mail: tyxiao1128@163.com

**Funding projects**: National Natural Science Foundation of China (31802288, 31572615); China Postdoctoral Science Foundation(2018T110833, 2017M612560); Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (2019JJ50231)