



三倍体湘云鲫 2 号 *IFNa3* 基因的克隆及功能初探

吴 慧, 侯利芬, 黄嘉仪, 冯 浩*

(湖南师范大学, 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南长沙 410081)

摘要: 三倍体湘云鲫 2 号具有不育、生长快、抗病抗逆性强等优良特性。为探究其抗病优势分子机制, 实验克隆及鉴定了三倍体湘云鲫 2 号干扰素 $a3(3nIFNa3)$ 。 $3nIFNa3$ 的 CDS 由 552 个核苷酸组成, 编码 184 个氨基酸。经预测, $3nIFNa3$ N 端 23 位氨基酸为信号肽; $3nIFNa3$ 成熟肽中存在 2 个半胱氨酸残基并参与形成二硫键, 表明其隶属于 I 型一组干扰素。实时荧光定量 PCR (qPCR) 结果显示, 宿主细胞经 poly I : C 刺激后 8 h、草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 或鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 感染后 48 h, $3nIFNa3$ 的转录水平达到最高。免疫印迹和免疫荧光结果显示, $3nIFNa3$ 为分泌型蛋白, 分子量约为 21.8 ku, 其在出胞前主要分布于细胞质中。进一步研究发现, 在宿主细胞中过表达 $3nIFNa3$ 或含 $3nIFNa3$ 的上清培养基孵育宿主细胞均能诱导内源 *ISG* 基因转录水平的显著提高。其中, $3nSTAT1$ 及 $3nVIPERIN$ 在含 $3nIFNa3$ 的上清培养基孵育后 2 h 转录水平达到最高, $3nPKR$ 则在 4 h 表达水平最高。此外, 病毒滴度测定及结晶紫染色实验表明, EPC 细胞经 $3nIFNa3$ 孵育或过表达 $3nIFNa3$ 后, 其抗 GCRV 和 SVCV 的能力均显著增强。研究表明, $3nIFNa3$ 为可分泌的细胞因子, 在宿主抗病毒天然免疫反应中发挥作用。

关键词: 三倍体湘云鲫 2 号; I 型干扰素 (IFN- I); 鲤春病毒血症病毒 (SVCV); 草鱼呼肠孤病毒 (GCRV); 天然免疫

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

I 型干扰素 (type I interferon, IFN- I) 是一类具有抗病毒、抗细菌及抗肿瘤等功能的细胞因子^[1-3], 在临床上常被用于治疗肿瘤和病毒感染等。哺乳动物 IFN- I 家族成员包括 $IFN\alpha$ 、 $IFN\beta$ 、 $IFN\epsilon$ 、 $IFN\kappa$ 、 $IFN\omega$ 、 $IFN\delta$ 、 $IFN\tau$ 和 $IFN\zeta$, 其中 $IFN\alpha$ 和 $IFN\beta$ 存在于绝大多数哺乳动物中, 而 $IFN\epsilon$ 、 $IFN\kappa$ 和 $IFN\omega$ 仅存在于真兽亚纲中^[4-5]。病毒感染时, 机体可产生 $IFN\alpha$ 和 $IFN\beta$, $IFN\alpha/\beta$ 可诱导靶细胞干扰素刺激基因 (interferon stimulated genes, ISGs) 的表达从而抑制病毒的复制。 $IFN\beta$

几乎在所有被感染病毒的细胞中都可以表达; 而 $IFN\alpha$ 仅表达于特定类型的细胞中, 如抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APC)^[6-7]。

在哺乳动物中, IFN- I 通过 JAK-STAT 信号通路将信号由细胞表面传递至细胞核, 进而导致 ISG 的产生。首先, IFN- I 与 $IFNAR1/2$ 结合并导致 $IFNAR$ 在细胞膜上的二聚化, 经过蛋白酪氨酸激酶 (janus kinase/JAK) 家族激酶的修饰, $IFNAR1/2$ 分别与 $STAT1$ 和 $STAT2$ 结合, JAK 家族激酶活化 $STAT1/2$; 活化后的 $STAT1$ 、 $STAT2$

收稿日期: 2021-05-13 修回日期: 2021-08-17

资助项目: 国家自然科学基金 (31920103016, 32002415); 湖南省自然科学基金 (2019RS1038); 湖南省现代农业 (水产) 产业项目; 湖南省学位与研究生教育改革项目 (2019JGYB095); 湖南省研究生优秀教学团队项目

第一作者: 吴慧 (照片), 从事鱼类天然免疫研究, E-mail: wuhui@hunnu.edu.cn

通信作者: 冯浩, E-mail: fenghao@hunnu.edu.cn



脱离受体, 与 IRF9 结合形成干扰素刺激基因因子 3 (interferon-stimulated gene factor 3/ISGF3) 复合体; 最后, ISGF3 复合体易位至细胞核与 ISG 基因启动子调控序列 (IFN-specific response element/ISRE) 结合, 启动不同 ISG 的转录^[8]。ISG 的数量众多, 基因敲除小鼠 (*Mus musculus*) 实验发现 *ISG15*、*MX1*、*PKR* 等 ISG 具有抗病毒作用, 不同 ISG 通过不同的机制来发挥抗病毒作用^[1]。JAK-STAT 信号通路在鱼类中也是保守的, 如大西洋鲑 (*Salmo salar*) *TYK2* 过表达能使其自磷酸化, 进而导致 *MX* 的表达^[9]; 大西洋鲑可通过 *STAT2a/b* 与 *STAT1*、*IRF9* 结合形成 ISGF3 复合物^[10]; 青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) ISG 如 *MX1* 和 *Verperin* 具有明显的抗病毒功能^[11-12]; 在大西洋鲑中, *IFNa1* 可以抑制鲑鱼甲病毒 (Salmonid alphavirus 3/SAV3) 病毒的复制, *IFNa1* 刺激后 TO 细胞 *MX*、*ISG15*、*VIPERIN*、*PKR* 等 ISG 的表达水平可以显著增强^[13]。

近年来, 鱼类干扰素的系统研究取得了一定进展, 人们对鱼类干扰素分类及功能的了解也逐渐加深。一种鱼类通常具有多个 IFN-I 拷贝, 如草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 中存在 4 种 *IFN-I* 基因, 而在大西洋鲑中发现多达 11 种 *IFN-I* 基因。这些 IFN-I 的分类方式有 2 种, 一种是根据干扰素成熟肽参与二硫键形成的半胱氨酸数量的不同, 可以将 IFN-I 分为 2 类: I 型 I 组干扰素 (含有 Cys1-Cys3 二硫键) 和 I 型 II 组干扰素 (含有 Cys1-Cys3 和 Cys2-Cys4 二硫键)^[14-15]。另一种是根据系统进化分析将 IFN-I 细分为 7 种亚型: *IFNa*、*IFNb*、*IFNc*、*IFNd*、*IFNe*、*IFNf* 和 *IFNh*, 其中 *IFNa*、*IFNd*、*IFNe* 和 *IFNh* 含有 Cys1-Cys3 二硫键, 隶属于 I 型 I 组干扰素; 而 *IFNb*、*IFNc* 和 *IFNf* 含有 Cys1-Cys3 和 Cys2-Cys4 二硫键, 隶属于 I 型 II 组干扰素^[16-18]。I 型 I 组和 II 组干扰素除二硫键数目不同外, 还有几个方面的区别, 如 I 型 I 组干扰素在多种鱼类中被广泛研究, 如青鱼、草鱼、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大西洋鲑等; 而 I 型 II 组干扰素仅在鲑科 (Salmonidae)、鲤科 (Cyprinidae)、鲈形目 (Perciformes) 几种鱼类中被发现^[19-23]。并且 I 型 I 组干扰素可以在多种细胞和组织中表达, 受到病毒感染后其表达量会明显增强; 而 I 型 II 组干扰素仅在特定白细胞群体中表达, 且表达量较低^[24]。因此, 鱼类 I

型干扰素参与了宿主抗病毒天然免疫, 如青鱼干扰素 b (black carp interferon b, bcIFNb) 能抵御草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 和鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 的感染; 在感染神经坏死病病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 和 SVCV 后, 斑马鱼 IFN-I 能诱导各类抗病毒基因的表达, 进而抵御这 2 种病毒的感染^[24-26]。

三倍体湘云鲫 2 号是利用红鲫 (*Carassius auratus* red var., ♀, 2n=100) 与湘江野鲤 (*Cyprinus carpio* ♂, 2n=100) 杂交, 在制备了世界上第一例雌雄可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤 (allo-tetraploid) 群体的基础上, 进一步利用雄性四倍体鲫鲤与雌性二倍体红鲫杂交研制的优良三倍体鱼^[27-28]。三倍体湘云鲫 2 号具备诸多优势性状: 性腺败育, 自身不能繁育; 摄食力强, 养殖成本低, 生长速度快; 成活率高, 抗病力强。鉴于鱼类的抗病能力主要依赖于鱼体自身的免疫, 因此, 针对湘云鲫天然免疫的研究对阐释湘云鲫抗病优势性状的机理至关重要。本实验克隆了三倍体湘云鲫 2 号 I 型干扰素基因 (*3nIFNa3*), 检测了聚肌胞苷酸 (poly I:C)、GCRV 或 SVCV 刺激或感染宿主细胞后 *3nIFNa3* 的表达特征, 鉴定了 *3nIFNa3* 蛋白表达及其胞内定位, 最后通过病毒滴度测定及病毒蚀斑实验证明了 *3nIFNa3* 具有抗 GCRV 和 SVCV 的活性。本研究将为系统阐明三倍体湘云鲫 2 号抗病优势的机理提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验所用三倍体湘云鲫 2 号取自湖南师范大学教育部多倍体鱼繁殖与育种技术工程研究中心。

1.2 细胞和质粒

实验所用细胞包括人类胚胎肾细胞 (HEK 293T)、鲤上皮瘤细胞 (*Epithelioma papulosum cyprini*, EPC) 细胞、草鱼肾细胞 (*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK) 和三倍体湘云鲫 2 号尾鳍 (caudal fin of triploid hybrid, 3nFC) 细胞均为实验室自有细胞。所有细胞系均用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、2 mmol/L 谷氨酰胺、100

mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养。哺乳动物细胞培养在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中, 鱼类细胞培养在含 5% CO₂ 的 26 °C 培养箱中。

所用质粒 pcDNA5/FRT/TO-HA 为实验室自有质粒, pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA 是克隆获得 3nIFNa3 的编码区序列 (coding sequence, CDS) 后, 通过 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 将 3nIFNa3 的 CDS 区插入到 C 端带有 HA 标签的 pcDNA5/FRT/TO 载体中所得。

1.3 3nIFNa3 编码区的克隆及序列比对分析

采用 total RNA 试剂盒 (Omega 公司; 美国) 从三倍体湘云鲫 2 号头肾中提取总 RNA, 使用反转录试剂盒 (Thermo 公司; 美国) 合成 cDNA 的第一条链。使用 cDNA 为模板来扩增 3nIFNa3 的 CDS。查阅三倍体湘云鲫 2 号全长转录组数据, 设计 3nIFNa3 的 CDS 引物, 通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 对其扩增; 将 PCR 产物连接至酶切后的线性表达载体 pcDNA5/FRT/TO-HA 上。测序获得 3nIFNa3 信息后, 利用 MEGA 6.0 软件和 GeneDoc 软件将 3nIFNa3 与其他脊椎动物干扰素的氨基酸序列进行比对分析, 构建系统进化树。利用 GeneDoc 软件将多种鱼类的 I 型 I 组及 II 组干扰素进行氨基酸序列比较及分析。

1.4 病毒的生产及滴度测定

实验中所用到的 GCRV 为华中农业大学张永安教授馈赠, 病毒株型号为 GCRV106; SVCV 为青岛农业大学聂品教授馈赠, 病毒株型号为 SVCV741。制备病毒液时, 将低感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的 GCRV 或 SVCV 加入到含 2% FBS 培养基培养的 CIK 或 EPC 细胞中, 当细胞病变效应程度约为 50%, 收集含病毒的上清培养液储存于 -80 °C 冰箱。

病毒滴度测定时, 将含病毒的上清液 3 冻 3 融后过滤, 将依次稀释 10 倍 (10^{-1} ~ 10^{-7}) 的病毒加入到 EPC 细胞中, 孵育 2 h 后加入含 2% FBS 和 0.75% 甲基纤维素的半固体培养基, 72 h 后当细胞出现明显的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 时, 进行结晶紫染色, 计算病毒斑数量并计算病毒的滴度。

1.5 实时荧光定量 PCR (qPCR)

将浓度为 25 μg/mL 的 poly I : C、感染复数

为 0.003 的 GCRV 或 SVCV 分别刺激 3nFC 细胞, 分别在 0、2、8、12、24 和 48 h 时收获细胞提取细胞总 RNA, 通过 qPCR 测定 3nIFNa3 的 mRNA 表达水平。使用含 3nIFNa3 的上清孵育 3nFC 细胞, 分别在 0、2、4、8 和 20 h 时收获细胞并提取细胞总 RNA, 通过 qPCR 测定 3nSTAT1、3nVIPERIN、3nPKR 及 3nMX1 等 4 种 ISG 的 mRNA 表达水平。将编码 3nIFNa3 的质粒在 3nFC 细胞中表达, 转染 48 h 后收获细胞并提取细胞总 RNA, 通过 qPCR 测定前述 4 种 ISG 的 mRNA 表达水平。

1.6 免疫印迹

将 HEK293T 和 EPC 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞密度为 80%~90% 时, 每孔转染 3 000 ng 的 pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA, 对照组转染等量 pcDNA5/FRT/TO。转染 48 h 后, 收获细胞并制备总蛋白样。用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 方法分离蛋白质; 恒压半湿法将蛋白样品转移到 PVDF 膜; 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; 随后加一抗 (抗 HA 或 Actin 的鼠单抗; 1 : 3 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 PVDF 膜 4 次, 每次 10 min; 加二抗 (羊抗鼠 IgG; 1 : 30 000) 4 °C 孵育 1 h, 重复上述洗膜步骤; 最后用显色剂 BCIP 和 NBT 在 PVDF 膜上显影。

1.7 免疫荧光

将 HEK293T 和 EPC 细胞接种于 24 孔板中, 待细胞密度为 50% 时, 每孔转染 500 ng 的 pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA。转染 24 h 后, PBS 清洗细胞, 4% 多聚甲醛在 4 °C 下固定细胞 15 min; PBS 清洗细胞, 0.2% Triton-X-100 穿透细胞 15 min; PBS 清洗细胞, 10% FBS 封闭 1 h; 加一抗 (抗 HA 的鼠单抗; 1 : 1 000) 孵育 3 h, 对照组不加一抗, PBS 洗 4 次, 每次 10 min; 加二抗 (抗鼠的 Alexa 488 偶联荧光二抗; 1 : 1 000) 孵育 1 h, PBS 洗 4 次, 每次 10 min; 封片。晾干后利用激光共聚焦显微镜拍照并分析。

2 结果

2.1 3nIFNa3 的基因克隆及氨基酸序列分析

3nIFNa3 的 CDS 由 552 个核苷酸组成, 共编码 184 个氨基酸, 预测其蛋白相对分子量为 21.8 ku, 前 23 位氨基酸为 3nIFNa3 的信号肽序

列。其成熟肽有 2 个半胱氨酸, 可形成 1 对二硫键, 因此将其归为 I 组 I 型干扰素 (图 1-a)。为进一步了解 3nIFN α 3 的进化地位, 以三倍体湘云鲫 2 号为核心对象, 选择人 (*Homo sapiens*)、家猫 (*Felis catus*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、凤头鸊鷉 (*Podiceps cristatus*)、啄羊鹦鹳 (*Nestor notabilis*)、绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*)、草鱼、斑马鱼、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑及青鱼作为参考, 通过 BioEdit、MEGA 7.0 和 GeneDoc 软件对其构建系统进化树并进行比较分析 (图 1-b)。发现 3nIFN α 3 与 3nIFN α 、3nIFN α 2 相似

度最高, 三倍体湘云鲫 2 号与青鱼、斑马鱼聚为一分支, 再与斑点叉尾鲴聚为一分支, 这说明三倍体湘云鲫 2 号与青鱼、斑马鱼、斑点叉尾鲴等亲缘关系较近。以三倍体湘云鲫 2 号为核心, 选择斑马鱼、青鱼、虹鳟、大西洋鲑及草鱼, 通过 GeneDoc 和 MEGA 7.0 软件对上述干扰素的氨基酸进行多序列比对, 发现 3nIFN α 、3nIFN α 2、3nIFN α 3、DrIFN1 及 bcIFN α 的成熟肽有 2 个半胱氨酸, 可形成 1 对二硫键, 隶属于 I 型 I 组干扰素; DrIFN2、bcIFN β 、OmIFN、SsIFN 和 CiIFN 的成熟肽有 4 个半胱氨酸, 可形成 2 对二硫键, 隶属于 I 型 II 组干扰素 (图 1-c)。

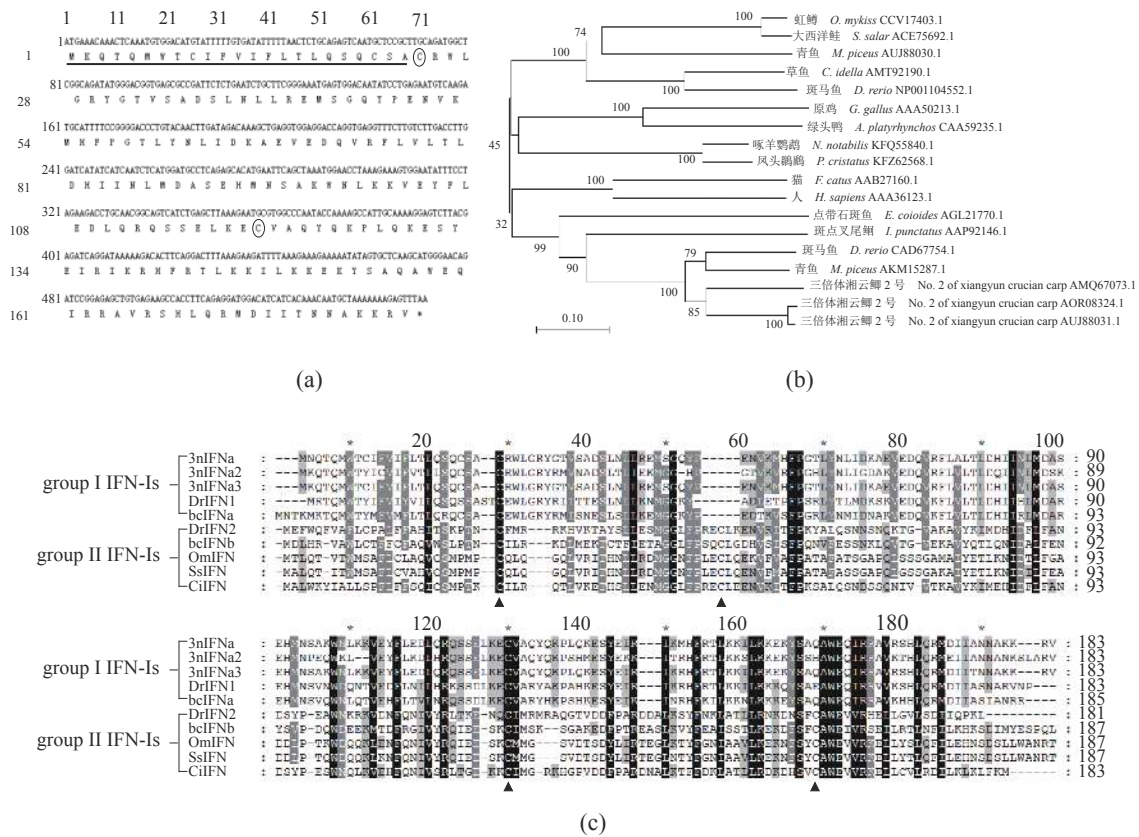


图 1 3nIFN α 3 的序列分析

(a) 3nIFN α 3 的核苷酸序列和预测的氨基酸序列, 预测的信号肽用横线下标表示, 2 个半胱氨酸残基用椭圆形圈出; (b) 脊椎动物的干扰素进化树分析, 通过 MEGA 6.0 软件分析 3nIFN α 3 和其他 IFN 的氨基酸序列; (c) 通过 MEGA 7.0 软件和 GeneDoc 软件比较 3nIFN α 3 与 I 型 I 组及 I 型 II 组干扰素的氨基酸序列, 黑色表示物种间高度保守的氨基酸序列, 灰色表示物种间相似的氨基酸序列, 预测参与二硫键的半胱氨酸残基用三角形 (▲) 表示

Fig. 1 Sequence analysis of 3nIFN α 3

(a) The nucleotide sequence and the predicted amino acid sequence of 3nIFN α 3 were numbered separately, the predicted signal peptide was underlined and two cysteine residues (C) are circled; (b) phylogenetic tree of vertebrate IFN, The amino acid sequence of 3nIFN α 3 was aligned with selected IFN-Is from different species by using MEGA 6.0 software; (c) comparisons of 3nIFN α 3 with other group I and group II IFN-Is protein sequences by using MEGA 7.0 program and GeneDoc program, black indicates highly conserved amino acid, gray represents similar amino acid among species, the cysteine residues predicted to be engaged in disulfide bridge are indicated by a triangle (▲)

2.2 3nIFN α 3 免疫响应分析

为探究 3nIFN α 3 在体外的免疫响应, 实验使用 poly I : C、GCRV、SVCV 3 种免疫原刺激或感染 3nFC 细胞, 分别在 0、2、8、12、24 和 48 h 后收取细胞提取总 RNA。通过 qPCR 检测宿主细胞中 3nIFN α 3 的 mRNA 表达水平。poly I : C 刺激后 3nIFN α 3 的 mRNA 水平总体呈先上升后下降的趋势, 在刺激 8 h 时其基因转录水平达到最高值, 随后在 48 h 时显著下降 ($P < 0.05$) (图 2-a)。经 GCRV 感染 12 h 时, 3nIFN α 3 的转录水平变化不明显, 而在感染 24 h 时, 3nIFN α 3 的 mRNA 表达水平显著上升, 在 48 h 时高达 2 389.6 倍 (图 2-b, $P < 0.01$)。经 SVCV 感染前 24 h, 3nIFN α 3 的 mRNA 水平变化不明显, 在 48 h 时达到 720.5 倍 (图 2-c, $P < 0.05$)。

2.3 3nIFN α 3 蛋白的表达及细胞内定位

为后续研究 3nIFN α 3 的功能, 实验构建了 3nIFN α 3 的表达载体, 并将其转染至 HEK293T 及 EPC 细胞中, 转染 48 h 后收取培养基上清液及细胞, 通过免疫印迹实验检测 3nIFN α 3 蛋白的表达情况。结果发现在哺乳动物细胞和鱼类细胞中, 均可成功表达 3nIFN α 3 蛋白, 并检测到培养基上清液中也含有 3nIFN α 3 蛋白, 这说明了 3nIFN α 3 是一种可分泌型蛋白 (图 3-a, b)。为验证 3nIFN α 3 出胞前的细胞内定位, 将 3nIFN α 3 表达载体转染至 HEK293T 及 EPC 细胞中, 通过免疫荧光实验检测到 3nIFN α 3 出胞前分布于细胞质中 (图 3-c, d)。

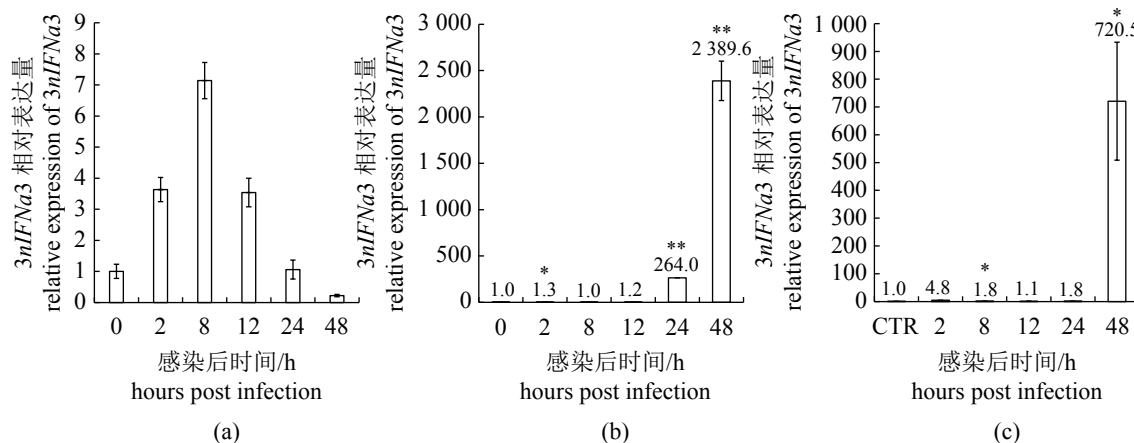


图 2 poly I : C (a)、GCRV (b) 和 SVCV (c) 刺激后 3nIFN α 3 的体外表达水平

未感染或刺激的 3nIFN α 3 的 mRNA 水平作为对照设置为 CTR

Fig. 2 3nIFN α 3 expression *ex vivo* in response to poly I : C (a), GCRV (b) and SVCV (c)

CTR. 3nIFN α 3 mRNA level without infection was set up as control

2.4 3nIFN α 3 诱导下游 ISG 的表达

为研究 3nIFN α 3 的功能, 实验将含 3nIFN α 3 的培养基上清孵育 3nFC 细胞, 分别在 0、2、4、8 及 20 h 收取 3nFC 细胞; 或过表达 3nIFN α 3 表达载体于 3nFC 细胞中, 转染 36 h 后收取 3nFC 细胞, 提取 RNA 并进行 qPCR 检测。qPCR 实验结果发现, 使用 3nIFN α 3 培养基上清孵育的 3nFC 细胞中, 3nSTAT1 和 3nVIPERIN 转录水平均在 2 h 时达到最高, 分别为 72.9 倍及 224.7 倍, 之后基因转录水平慢慢下降 (图 4-a, b, $P < 0.01$); 3nPKR 整体趋势出现先上升后下降的趋势, 基因相对表达量在 4 h 为最高 (图 4-c, $P < 0.01$)。在过表达 3nIFN α 3 质粒的 3nFC 细胞中, 相比对照组, 3nSTAT1、3nPKR 和 3nVIPERIN 的 mRNA 水平均出现显著增加 (图 4-e~g, $P < 0.05$)。而 3nMX1 的基因表达水平在 3nIFN α 3 培养基上清孵育组及过表达 3nIFN α 3 组均未有显著性差异 (图 4-d, h)。

2.5 3nIFN α 3 能提高细胞的抗病毒能力

以往的研究已发现 3nIFN α 和 3nIFN α 2 均为抗病毒因子, 在宿主天然免疫应答中起抵御病毒侵染的作用。为探究 3nIFN α 3 是否具有与 3nIFN α 、3nIFN α 2 类似的功能, 实验将 3nIFN α 3 表达载体 (实验组) 及空载体 (对照组) 转染到 EPC 细胞中, 将未转染的 EPC 设置为空白对照组 (MOCK 组), 转染 24 h 后用指定 MOI 的 GCRV 和 SVCV 感染细胞, 感染 24 h 后测定病毒滴度。结果发现, 实验组上清病毒滴度明显比对照组及空白组低, 二者存在显著性差异 (图 5-a, c, $P < 0.05$)。结晶

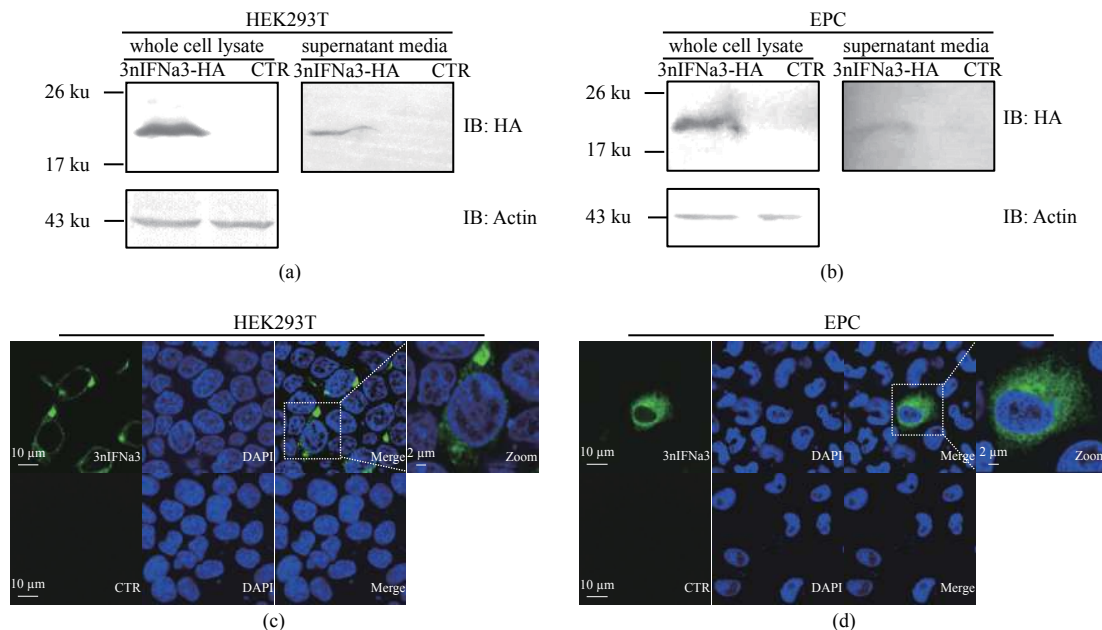


图 3 3nIFNa3 的蛋白表达及亚细胞定位

(a)(b) HEK293T 细胞和 EPC 细胞转染指定的质粒, 转染后将全细胞裂解液和上清培养基用于免疫印迹实验, IB. 免疫印迹, 3nIFNa3-HA. pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA; CTR. pcDNA5/FRT/TO; (c)(d) 3nIFNa3 在 HEK293T 细胞 (c) 和 EPC 细胞 (d) 中的免疫荧光

Fig. 3 Protein expression and subcellular localization of 3nIFNa3

(a)(b) HEK293T cells (a) and EPC cells (b) were transfected with indicated plasmid; the whole cell lysate and supernatant media of the transfected cells were used for IB as described in methods separately. IB. immunoblot, 3nIFNa3-HA. pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA; CT. pcDNA5/FRT/TO; (c)(d) 3nIFNa3 immunofluorescence staining of HEK293T cells (c) and EPC cells (d)

紫染色实验结果发现, 实验组的病毒斑数明显比对照组及空白组少 (图 5-b, d)。为探究分泌出胞的成熟肽是否具有抗病毒功能, 在 EPC 中加入指定体积的含 3nIFNa3 上清的培养基, 孵育 24 h 后再使用指定 MOI 的 GCRV 和 SVCV 感染细胞。结果发现, 在 EPC 细胞中加入的 3nIFNa3 上清培养基体积越多, 其上清病毒的滴度越低 (图 6-a, c)、病毒斑数越少 (图 6-b, d), 呈现出越强的抗病毒能力。

3 讨论

有研究报道, 不同倍性的硬骨鱼类会呈现不同的免疫活性。二倍体及三倍体的香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 和大西洋鲑应对传染病有相似的抵御能力; 而三倍体的秀美花鱈 (*Poecilia formosa*) 和大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 拥有比其二倍体更强的抵御病原入侵的能力^[29-32]。杂交可以将不同物种的基因组结合起来, 从而导致后代基因型和表型的改变。本实验室通过杂交已成功研制出三倍体湘云鲫 2 号和四倍体鲫鲤, 并发现三倍体湘云鲫 2 号相比其父母本拥有更强

的抗病毒能力, 表明三倍体湘云鲫 2 号的天然免疫机制通过杂交后有所变化。研究推测同源亲本基因间错误的 DNA 切除或其他潜在机制导致了高比例的嵌合基因, 从而导致了杂交鱼基因型的改变^[33-34]。

为系统研究 3nIFNa3 在三倍体湘云鲫 2 号天然免疫中的作用, 实验研究了 3nFC 细胞在受到 poly I : C、GCRV 和 SVCV 这 3 种免疫原刺激后, 3nIFNa3 在不同时间点的相对表达量, 结果发现这 3 种免疫刺激均可上调 3nIFNa3 的转录水平。不同的是 3nIFNa3 在应对不同的刺激时会呈现出不同的表达形式, poly I : C 刺激后, 3nIFNa3 应答较早但相对表达程度较低; 而 GCRV 和 SVCV 刺激早期 3nIFNa3 的相对表达量变化不明显, 而后期显著升高。研究认为这可能与 GCRV 和 SVCV 存在逃逸机制有关。GCRV 为双链 RNA 病毒, 其基因组由 11 个片段组成, 包括 L1-L3、M4-M6 及 S7-S11。在草鱼中, 有研究发现 GCRV 可以抑制 TBK1 的 K63 连接的泛素化、促进 TBK1 的 K48 连接的泛素化来抑制 TBK1 活性, 从而抑制 IRF7-IFN 介导的抗病毒信号通路的激活^[35]。SVCV

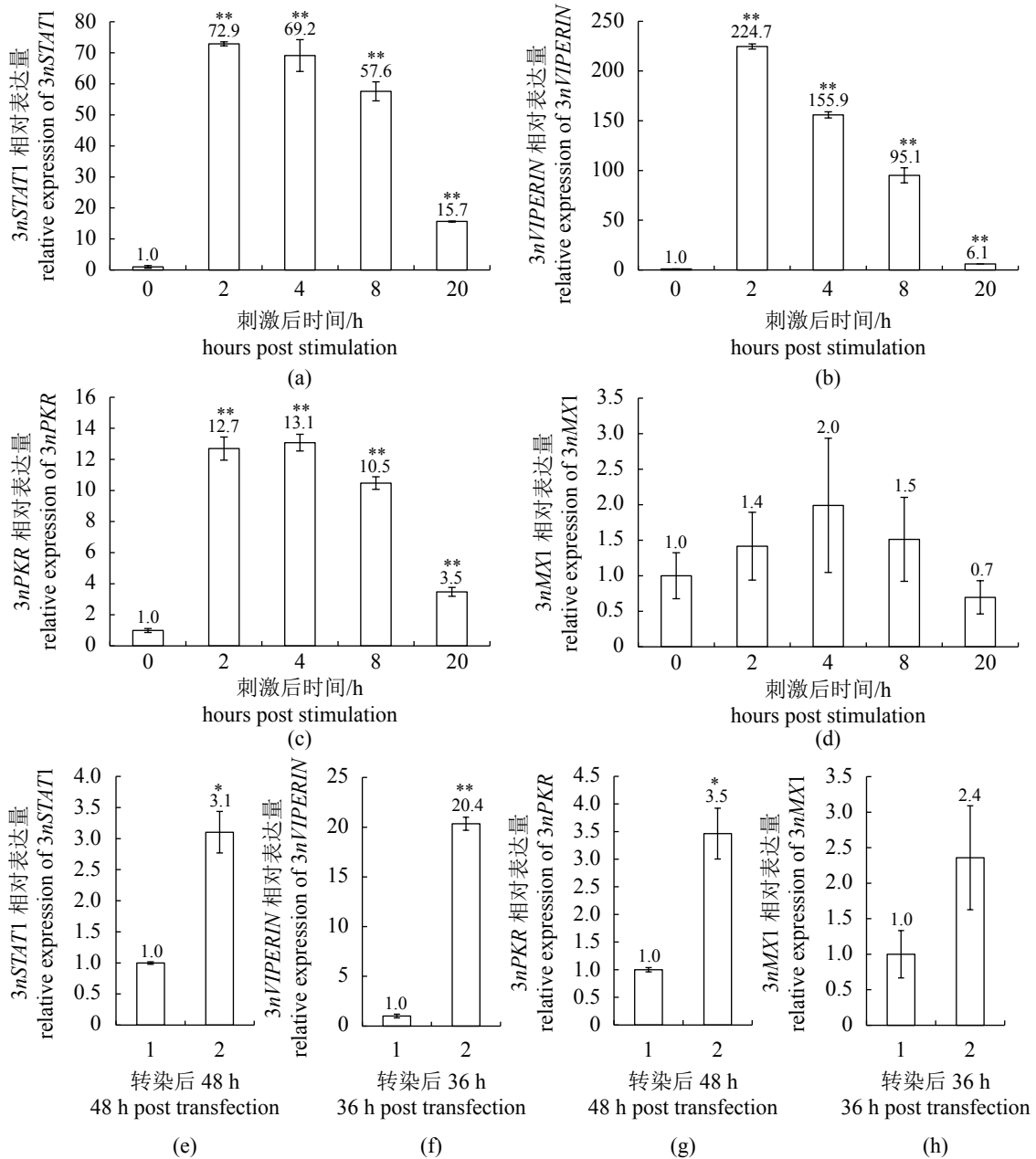


图4 3nIFN α 3 诱导下游基因及 ISG 的表达

(a~d) 使用 1.6 ng/ μ L 浓度的 3nIFN α 3 上清培养基孵育六孔板中的 3nFC 细胞, 细胞在 0、2、4、8 及 20 h 收获细胞并提取 RNA, 通过 qPCR 检测下游基因 ISG 的 mRNA 水平, 通过 ELISA 实验确定 3nIFN α 3 在培养基中的浓度为 1.6 ng/ μ L, 将未用上清孵育细胞的 3nSTAT1、3nVIPERIN、3nPKR 和 3nMX1 的 mRNA 水平分别设置为 1, 作为各组对照; (e~h) 六孔板中的 3nFC 细胞分别转染 3nIFN α 3 质粒 (2) 或空载体 (1), 在 48 h 收获细胞, 用于提取 RNA, 通过 qPCR 检测下游基因 ISG 的 mRNA 水平, 转染空载体的细胞作为对照, 分别将转染空载体的 3nSTAT1、3nVIPERIN、3nPKR 和 3nMX1 的 mRNA 水平设置为 1; 3nIFN α 3. pcDNA5/FRT/TO-3nIFN α 3-HA, pcDNA5. pcDNA5/FRT/TO

Fig. 4 3nIFN α 3 induces the expression of downstream gene and ISGs

(a~d) 3nFC cells in 6-well plate were treated with the 3nIFN α 3-containing conditioned media (1.6 ng/ μ L), the cells were harvested at 0, 2, 4, 8 and 20 h post stimulation separately and used for RNA isolation, the relative downstream gene and ISGs mRNA level was examined by qPCR, the concentration of 3nIFN α 3 in the media was 1.6 ng/ μ L, which was determined by ELISA, the mRNA levels of 3nSTAT1, 3nVIPERIN, 3nPKR and 3nMX1 without treatment (0 h) was set up as 1 (as control) separately; (e~h) 3nFC cells in 6-well plate were transfected with 3nIFN α 3 (2) or the empty vector (1) separately, the cells were harvested at 48 h post transfection and used for RNA isolation, the relative downstream gene ISGs mRNA level was examined by qPCR, the cells with empty vector were used as control and the relative mRNA level of the indicated gene in the control was defined as 1; 3nIFN α 3. pcDNA5/FRT/TO-3nIFN α 3-HA, pcDNA5. pcDNA5/FRT/TO

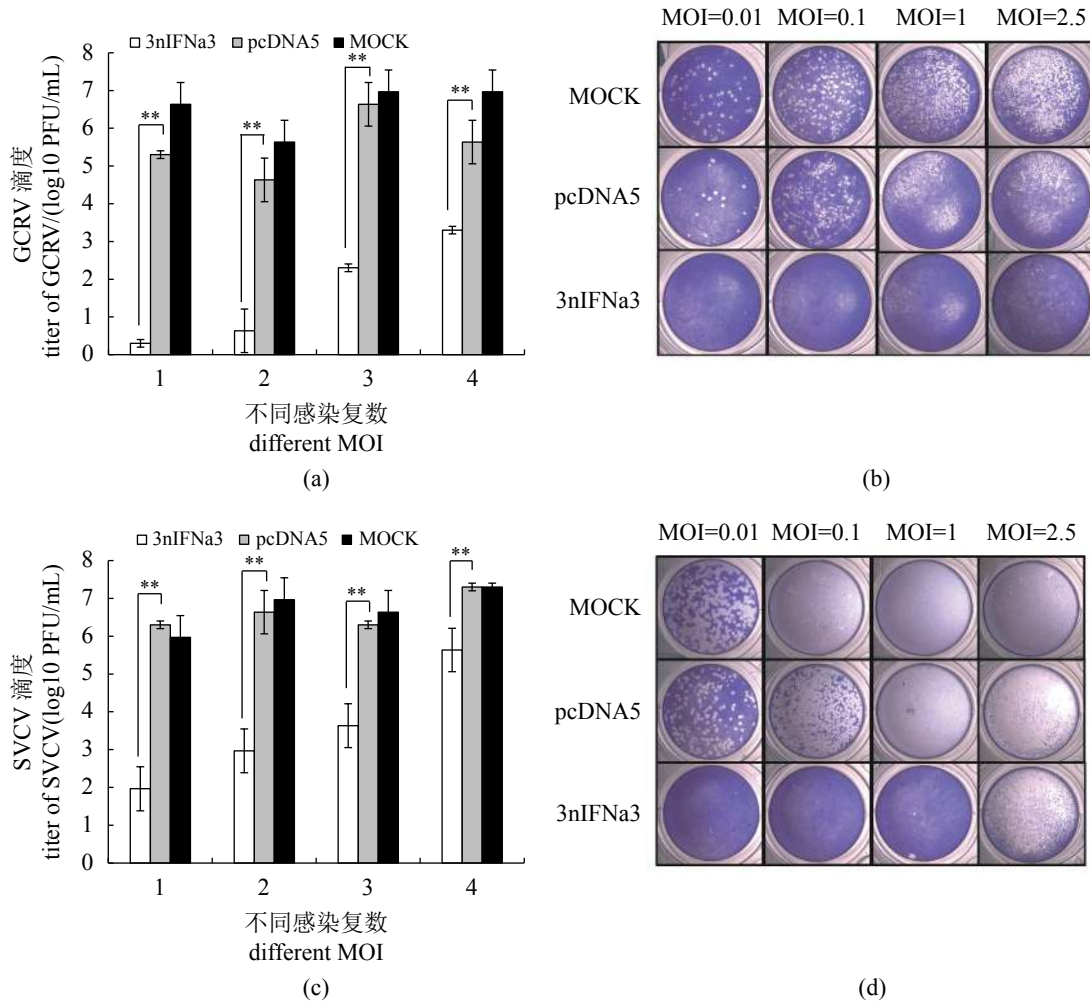


图 5 在 EPC 细胞中过表达 3nIFNa3 拥有更强的抵抗 GCRV 和 SVCV 的抗病毒能力

(a~d) 转染 300 ng 3nIFNa3 载体或空载体到 24 孔板的 EPC 细胞中, 转染 24 h 后感染不同感染复数 MOI=0.01(1)、MOI=0.1(2)、MOI=1(3)、MOI=2.5(4) 的 GCRV(a 和 b) 或 SVCV(c 和 d); 感染 24 h 后使用结晶紫将细胞染色 (b 和 d), 或将培养基上清取出, 通过病毒噬斑实验测定上清中病毒滴度 (a 和 c); 3nIFNa3, pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA, pcDNA5, pcDNA5/FRT/TO, MOCK. 未转染质粒的 EPC 细胞

Fig. 5 EPC cells over-expressing 3nIFNa3 showed enhanced antiviral ability against GCRV and SVCV

(a-d) EPC cells in 24-well plate were transfected with 300 ng of 3nIFNa3 or the empty vector separately and infected with GCRV (a and b) and SVCV (c and d) at 0.01 (1), 0.1 (2), 1 (3) or 2.5 (4) MOIs at 24 h post transfection, the cell monolayers were stained with crystal violet (b and d) and virus titers in the supernatant media were examined by plaque assay at 24 h post infection (a and c); 3nIFNa3, pcDNA5/FRT/TO-3nIFNa3-HA, pcDNA5, pcDNA5/FRT/TO, MOCK. EPC cells without transfection

是单链 RNA 病毒, 可编码 N、P、M、G 及 L 等 5 种蛋白^[36-37]。在斑马鱼中有研究发现, SVCV 的 P 蛋白可以抑制 TBK1 的激酶活性来负调控 IFN 信号; SVCV 的 N 蛋白可以靶向 MAVS 来抑制 IFN1 的产生^[38-39]。因此, 研究推测由于 SVCV 及 GCRV 的负调控机制导致干扰素上游基因的活性被抑制, 从而使得病毒感染早期 3nIFNa3 的相对表达量较低。

在 SVCV 或 GCRV 病毒感染后期, 胞内 PRR (如 RIG-I 或 MDA5) 识别该病毒, 通过一系列分子将病毒刺激信号向核内传递, 进而起始 3nIFNa3

的转录, 使得病毒感染晚期 3nIFNa3 的相对表达量较高。不同细胞被病毒感染或 poly I : C 刺激后, 干扰素在各时期的基因表达量也存在差异, 如在大西洋鲑 TO 细胞中, poly I : C 刺激 24 h 后干扰素基因的相对表达水平处于最高水平, 而 48 h 基本无表达^[40]; 在虹鳟 RTG-2 和 RTS-11 细胞中, poly I : C 刺激后 IFNa、IFNb、IFNc、IFNd 的相对表达量在 2 h 最高, 而 IFNf 和 IFNe 的相对表达量分别在 6 和 24 h 到达最高; 在虹鳟头肾细胞中, poly I : C 刺激后 IFNa、IFNb、IFNc、IFNd、IFNe 和 IFNf 表达量均在 2 h 最高; 在斑马

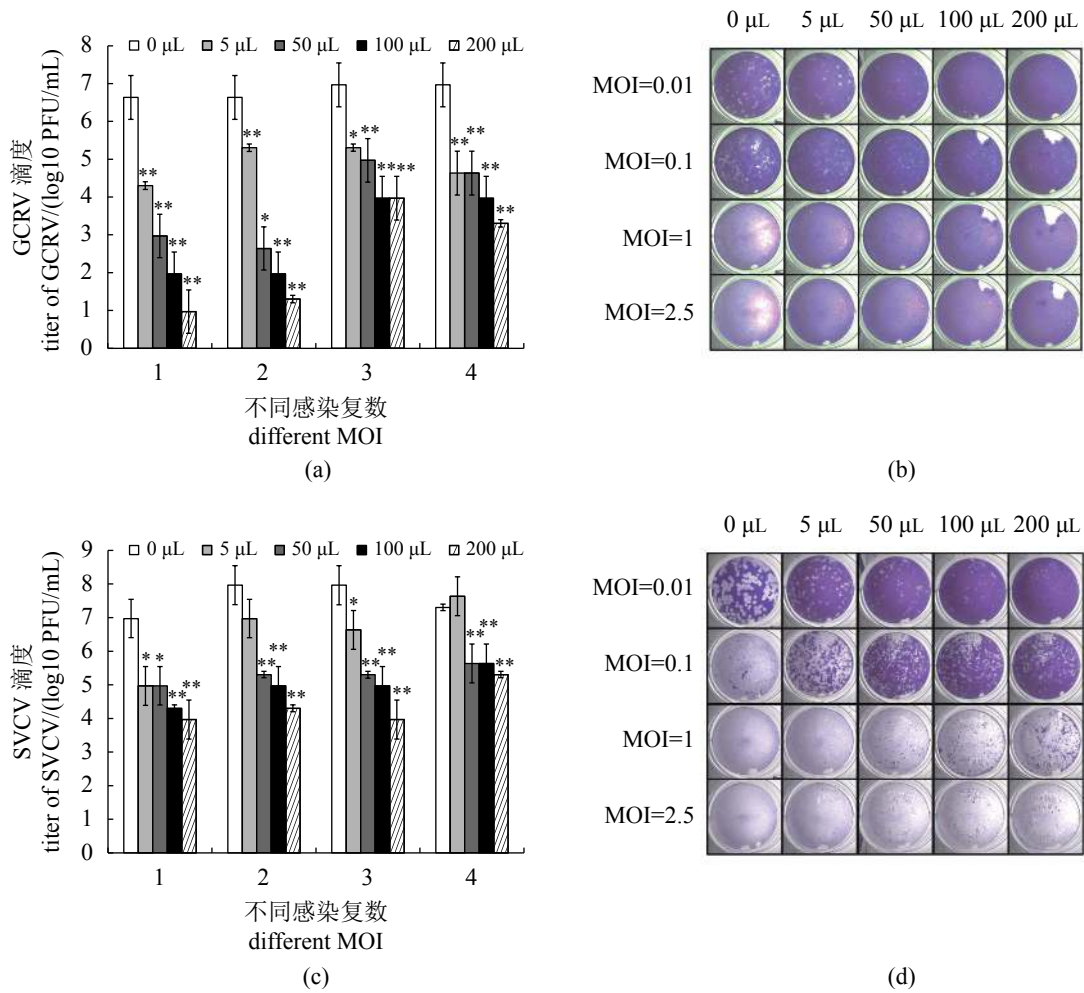


图 6 3nIFNα3 孵育的 EPC 呈现更强的抵御 GCRV 和 SVCV 的能力

(a~d) 使用指定量的含 3nIFNα3 的培养基孵育 EPC，24 h 后感染不同感染复数 MOI=0.01(1)、MOI=0.1(2)、MOI=1(3)、MOI=2.5(4) 的 GCRV(a 和 b) 或 SVCV(c 和 d)；通过 ELISA 实验检测到 3nIFNα3 的浓度为 1.6 ng/μL；将培养基上清取出，通过噬斑实验检测上清中病毒滴度 (a 和 c)，或感染 24 h 后将使用结晶紫将细胞染色 (b 和 d)

Fig. 6 3nIFNα3 treated EPC cells showed enhanced antiviral ability against GCRV and SVCV

(a-d) EPC cells in 24-well plate were treated with indicated amount of the 3nIFNα3-containing conditioned media for 24 h, and then infected with GCRV (a and b) and SVCV (c and d) at 0.01 (1), 0.1 (2), 1 (3) or 2.5 (4) MOIs separately; the concentration of 3nIFNα3 in the media was 1.6 ng/μL, which was determined by ELISA; virus titers in the supernatant media of EPC were determined by plaque assay (a and c) and the cell monolayers were stained with crystal violet (b and d)

鱼中，NNV 刺激后 *IFNφ1*、*IFNφ2* 及 *IFNφ3* 的相对表达量分别在 6、24 及 6 h 到达最高。

I 型干扰素通过其受体将信号传递至细胞核中，诱导 ISG 的表达，从而发挥抗病毒效应。哺乳动物 I 型干扰素受体为 IFNAR1 和 IFNAR2，二者均属于 II 型细胞因子受体家族成员，但 IFNAR1 含有 4 个 III 型纤维连接蛋白 (fibronectin type III domain, FNIII) 结构域，而 IFNAR2 仅包括 2 个 FNIII 结构域。与之相对应，在鱼类中 II 型细胞因子受体家族被命名为细胞因子受体家族 B (cytokine receptor family B, CRFB)^[41-42]，CRFB 相比

IFNAR 更为复杂。哺乳类 I 型干扰素信号仅由 IFNAR1 和 IFNAR2 来传递，而鱼类 I 型干扰素的信号传递相对比较复杂，I 型 I 组干扰素与 I 型 II 组干扰素的信号传递是不一样的。如在斑马鱼中，IFN1 和 IFN4 属于 I 型 I 组干扰素，其信号是由 CRFB1 和 CRFB5 复合体介导的；而 IFN2 和 IFN3 属于 I 型 II 组干扰素，其信号是由 CRFB2 和 CRFB5 复合体介导^[43-44]。在大西洋鲑中，由 CRFB5a、CRFB5b、CRFB5c 中选取一种，再与 CRFB1a 组成复合体来传递 IFNα 的信号；由 CRFB5x 与 CRFB2 的复合体来传递 IFNβ 的信

号; 由 CRFB5a 或 CRFB5c 中的一种与 CRFB2 形成复合体来传递 IFN α 的信号^[45]。有研究发现, 哺乳动物 I 型干扰素可以直接或间接影响 T 细胞的免疫, 起到调节适应性免疫反应的作用^[46]。I 型干扰素可直接对 T 细胞的免疫应答进行正向或负向调节: 当抗原的刺激信号优先于 IFN 信号时, 会诱导 T 细胞以 STAT4 依赖的途径进行增殖及分化; 反之, 则会诱导 T 细胞以 STAT1 依赖的途径走向凋亡^[47-49]。I 型干扰素也可通过调节新抗原的数量、诱导 APC 的成熟和促进自然杀伤细胞的活化来间接影响 T 细胞免疫^[46]。鱼类 I 型干扰素暂未发现除抗病毒以外的功能, 其完整的功能有待进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Sadler A J, Williams B R G. Interferon-inducible antiviral effectors[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(7): 559-568.
- [2] Decker T, Müller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(9): 675-687.
- [3] Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, *et al.* Type I interferons in anticancer immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(7): 405-414.
- [4] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 202(1): 8-32.
- [5] de Weerd N A, Nguyen T. The interferons and their receptors—distribution and regulation[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2012, 90(5): 483-491.
- [6] Barchet W, Cella M, Odermatt B, *et al.* Virus-induced interferon α production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling *in vivo*[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2002, 195(4): 507-516.
- [7] Reizis B, Bunin A, Ghosh H S, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions[J]. *Annual Review of Immunology*, 2011, 29(1): 163-183.
- [8] Darnell J E Jr, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins[J]. *Science*, 1994, 264(5164): 1415-1421.
- [9] Sobhkhaz M, Hansen T, Iliev D B, *et al.* The Atlantic salmon protein tyrosine kinase Tyk2: molecular cloning, modulation of expression and function[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 553-563.
- [10] Sobhkhaz M, Skjesol A, Thomassen E, *et al.* Structural and functional characterization of salmon STAT1, STAT2 and IRF9 homologs sheds light on interferon signaling in teleosts[J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 4(1): 858-871.
- [11] Xiao J, Yan J, Chen H, *et al.* Mx1 of black carp functions importantly in the antiviral innate immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 584-592.
- [12] 田戎, 陈慧, 周旻昱, 等. 青鱼 Viperin 是一种抗病毒蛋白[J]. *生命科学研究*, 2018, 22(4): 259-270.
- Tian Y, Chen H, Zhou M Y, *et al.* Viperin of black carp *Mylopharyngodon piceus* is an antiviral protein[J]. *Life Science Research*, 2018, 22(4): 259-270(in Chinese).
- [13] Sun B J, Skjæveland I, Svingerud T, *et al.* Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(17): 9188-9198.
- [14] Zou J, Secombes C J. Teleost fish interferons and their role in immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376-1387.
- [15] Chawla-Sarkar M, Leaman D W, Borden E C. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines[J]. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2001, 7(6): 1821-1831.
- [16] Sun B J, Robertsen B, Wang Z Q, *et al.* Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(4): 547-558.
- [17] Chang M X, Nie P, Collet B, *et al.* Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts[J]. *Immunogenetics*, 2009, 61(4): 315-325.
- [18] Ding Y, Ao J Q, Huang X H, *et al.* Identification of two subgroups of type I IFNs in perciforme fish large yellow

- croaker *Larimichthys crocea* provides novel insights into function and regulation of fish type I IFNs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 343.
- [19] Zou J, Gorgoglione B, Taylor N G H, *et al.* Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: characterization of the IFN locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups[J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 193(5): 2273-2286.
- [20] Liao Z W, Wan Q Y, Su J G. Bioinformatics analysis of organizational and expressional characterizations of the IFNs, IRFs and CRFBs in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 61: 97-106.
- [21] López-Muñoz A, Roca F J, Meseguer J, *et al.* New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(6): 3440-3449.
- [22] Langevin C, Aleksejeva E, Passoni G, *et al.* The antiviral innate immune response in fish: evolution and conservation of the IFN system[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(24): 4904-4920.
- [23] Boudinot P, Langevin C, Secombes C, *et al.* The peculiar characteristics of fish type I interferons[J]. *Viruses*, 2016, 8(11): 298.
- [24] Zou J, Tafalla C, Truckle J, *et al.* Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(6): 3859-3871.
- [25] Wu H, Liu L Q, Wu S Z, *et al.* IFN β of black carp functions importantly in host innate immune response as an antiviral cytokine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 1-9.
- [26] Chen H Y, Liu W T, Wu S Y, *et al.* RIG-I specifically mediates group II type I IFN activation in nervous necrosis virus infected zebrafish cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 427-435.
- [27] 刘少军, 孙远东, 张纯, 等. 三倍体鲫鱼——异源四倍体鲫鲤(♂)×金鱼(♀)[J]. *遗传学报*, 2004, 31(1): 31-38.
Liu S J, Sun Y D, Zhang C, *et al.* Triploid crucian carp-allotetraploid hybrids (♂) × goldfish (♀)[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(1): 31-38(in Chinese).
- [28] Shen J M, Liu S J, Sun Y D, *et al.* A new type of triploid crucian carp-red crucian carp (♀) × allotetraploid (♂)[J]. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(12): 1348-1352.
- [29] Chalmers L, Taylor J F, Roy W, *et al.* A comparison of disease susceptibility and innate immune response between diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) siblings following experimental infection with *Neoparamoeba perurans*, causative agent of amoebic gill disease[J]. *Parasitology*, 2017, 144(9): 1229-1242.
- [30] Inada Y, Yoshimura K, Taniguchi N. Study on the resistance to vibriosis in induced triploid ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(10): 1587-1591.
- [31] Ching B, Jamieson S, Heath J W, *et al.* Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during live *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Heredity*, 2010, 104(2): 224-234.
- [32] Lampert K P, Fischer P, Schartl M. Major histocompatibility complex variability in the clonal Amazon molly, *Poecilia formosa*: is copy number less important than genotype?[J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(6): 1124-1136.
- [33] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 416-425.
- [34] Liu S J, Luo J, Chai J, *et al.* Genomic incompatibilities in the diploid and tetraploid offspring of the goldfish×common carp cross[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(5): 1327-1332.
- [35] Rao Y L, Ji J F, Liao Z W, *et al.* GCRV hijacks TBK1 to evade IRF7-mediated antiviral immune responses in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 492-499.
- [36] Ahne W, Bjorklund H V, Essbauer S, *et al.* Spring viremia of carp (SVC)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 52(3): 261-272.
- [37] Teng Y, Liu H, Lv J Q, *et al.* Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(8): 1457-

- 1465.
- [38] Li S, Lu L F, Wang Z X, *et al.* The P protein of spring viremia of carp virus negatively regulates the fish interferon response by inhibiting the kinase activity of TANK-binding kinase 1[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(23): 10728-10737.
- [39] Lu L F, Li S, Lu X B, *et al.* Spring viremia of carp virus n protein suppresses fish IFN α 1 production by targeting the mitochondrial antiviral signaling protein[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(9): 3744-3753.
- [40] Robertsen B, Bergan V, Røkenes T, *et al.* Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2003, 23(10): 601-612.
- [41] Lutfalla G, Crollius H R, Stange-Thomann N, *et al.* Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: The class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish[J]. *BMC Genomics*, 2003, 4: 29.
- [42] Stein C, Caccamo M, Laird G, *et al.* Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish[J]. *Genome Biology*, 2007, 8: R251.
- [43] Aggad D, Mazel M, Boudinot P, *et al.* The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(6): 3924-3931.
- [44] Levraud J P, Boudinot P, Colin I, *et al.* Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(7): 4385-4394.
- [45] Robertsen B. The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 41-52.
- [46] Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(4): 231-242.
- [47] van Boxel-Dezaire A H H, Rani M R S, Stark G R, *et al.* Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 361-372.
- [48] Brierley M M, Fish E N. Stats: Multifaceted regulators of transcription[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005, 25(12): 733-744.
- [49] Plataniias L C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(5): 375-386.

Molecular cloning and preliminary functional study of *IFNa3* in No.2 of Xiangyun crucian carp

WU Hui, HOU Lifan, HUANG Jiayi, FENG Hao*

(State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: No.2 of Xiangyun crucian carp possesses the advantages of sterility, rapid growth and improved disease and stress resistance. In order to explore the molecular mechanism of its disease resistance, triploid hybrid interferon $\alpha 3$ (*3nIFNa3*) has been cloned and characterized. The CDS of *3nIFNa3* comprised 552 nucleotides, encoding 184 amino acids. The first 23 amino acids of N-terminal were signal peptides. There are 2 cysteine residues involved in the formation of disulfide bonds in mature peptides of *3nIFNa3*, which indicates that *3nIFNa3* belongs to group I type I interferon. qPCR results showed that the mRNA levels of *3nIFNa3* in the host cells reached the peak at 8 h after poly (I: C) stimulation and reached the highest at 48 h after GCRV or SVCV infection. Both Western blot and immunofluorescence results showed that *3nIFNa3* was a secretory protein and its molecular weight was around 21.8 ku, which was mainly distributed in the cytoplasm before secretion. Further studies showed that the transcription of endogenous *ISG* genes were significantly up-regulated after the host cells overexpressed *3nIFNa3* or were incubated with the *3nIFNa3*-containing conditioned media. The transcription levels of *3nSTAT1*, *3nVIPERIN* or *3nPKR* reached the highest at 2, 2 or 4 h after the host cells were incubated with the *3nIFNa3*-containing conditioned media. Besides, the results of the classic plaque assay and the crystal violet staining showed that EPC cells presented significantly enhanced antiviral ability against GCRV and SVCV after incubation with *3nIFNa3* or overexpression of *3nIFNa3*. The above results show that *3nIFNa3* is a secretory cytokine and plays an important role in the host antiviral innate immune response.

Key words: No. 2 of Xiangyun crucian carp; type I interferon (IFN- I); spring viremia of carp virus (SVCV); grass carp reovirus (GCRV); innate immunity

Corresponding author: FENG Hao. E-mail: fenghao@hunnu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31920103016, 32002415); Natural Science Foundation of Hunan Province (2019RS1038); Modern Agricultural Industry Program of Hunan Province; Degree & Postgraduate Education Reform Project of Hunan Province (2019JGYB095); Excellent Education Team for Postgraduate in Hunan Province