



赤眼鳟 LGP2 序列结构、组织表达及与 MDA5 互作特征

李耀国, 廖依静, 王静安, 肖调义*

(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: 为探究赤眼鳟遗传学和生理学实验室蛋白 2 (laboratory of genetics and physiology 2, LGP2) 的功能特征及抗草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 育种参考潜力, 实验克隆获得了 2 940 bp 的赤眼鳟 *lgp2* (*Sclgp2*) 全长 cDNA 和 721 bp 的 5' 端上游序列。*Sclgp2* cDNA 编码 680 个氨基酸, 包含 DEXDc (DEXD/H-box helicase domain)、HELICc (helicase superfamily C-terminal domain) 和 CTD (C-terminal regulatory domain) 结构域; 其 5' 端上游序列含有 MafB (muscle aponeurosis fibromatosis B) 和 IRF3 (interferon regulatory factor 3) 等转录因子结合位点。不同物种 LGP2 的功能结构域、磷酸化修饰位点数具有相似性, 同时也存在结构域排布位置及序列的差异。赤眼鳟和草鱼 *lgp2* cDNA 序列比较初步发现 2 个位于 RNA 结合功能区的 GCRV 抗性关联位点。系统进化分析显示, 赤眼鳟 LGP2 先与草鱼、鲫和青鱼聚在一起, 再与鲤科鱼类等聚为一大支。荧光定量表达分析显示, 赤眼鳟脾脏中 *sclgp2* 表达水平显著高于其他组织, 肌肉、心脏中表达量次之, 而肠中表达量最低。GCRV 感染后, 肝脏中 *ifn1* 表达水平在 24~72 h 显著下降, 其他组织 *sclgp2* 和 *ifn1* 表达水平未有显著变化。相关性分析结果显示, 赤眼鳟肌肉 *sclgp2* 与 *ifn1* 表达水平呈极显著正相关 (0.999)。酵母双杂交互作检测发现, 赤眼鳟 LGP2 与 MDA5 存在弱相互作用, 而其 DEXDc (1~201 aa)、HELICc (390~476 aa) 以及 CTD (553~668 aa) 结构域与 MDA5 无互作。该研究成功获得了 *sclgp2* 全长 cDNA 及 5' 端上游序列, 明确了其序列结构、免疫表达及与 MDA5 的互作特征, 为赤眼鳟 LGP2 免疫功能属性研究奠定了基础, 并为草鱼抗 GCRV 育种提供了参考。

关键词: 赤眼鳟; 生理学实验室蛋白 2 (LGP2); 序列结构; 表达特征; 蛋白互作; GCRV 抗性

中图分类号: Q 786; S 942.1

文献标志码: A

鱼类生活的水环境中存在大量真菌、细菌、病毒和寄生虫等病原微生物。作为低等脊椎动物, 鱼类免疫防御反应高度依赖先天性免疫。病原入侵时, 细胞中起监控作用的模式识别受体需快速感应和识别病原并引发抗病免疫^[1-2]。模式识别受体主要有 Toll 样受体、视黄酸诱导基因 I 样受体

(retinoic acid inducible gene I-like receptors, RLR)、NOD 样受体和 AIM 样受体等几大类^[3-4]。其中 RLR 为细胞质内模式识别受体家族, 包括黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5)、视黄酸诱导基因-I (retinoic acid-induced gene-I, RIG-I) 以及遗传学和生理学

收稿日期: 2021-10-11 修回日期: 2022-04-02

资助项目: 国家自然科学基金 (32172966, 31802288, U20A2063); 湖南省教育厅资助科研项目 (19B265); 中央引导地方科技发展资金 (2022ZYC085)

第一作者: 李耀国 (照片), 从事水产动物抗性育种研究, E-mail: yaoguolijkl@163.com

通信作者: 肖调义, 从事水产动物抗性育种研究, E-mail: tyxiao1128@163.com



实验室蛋白 2 (laboratory of genetics and physiology 2, LGP2), 主要在胞浆中识别和结合病毒核酸并诱导相应免疫反应^[5]。

RLR 家族成员具有序列、结构和功能的同源性, 均可识别病毒 RNA。但在功能结构域组成、结合病原 RNA 类型和能力以及介导抗病免疫反应方面存在明显差异^[6]。RIG-I 偏向于识别病毒的 5'ppp 平末端 RNA、短双链 RNA 和单链 RNA, MDA5 可被长片段双链 RNA 和病毒双链 RNA 复制中间体等激活^[7-9]。LGP2 由 N 端的 DEXDc 结构域、中间 HELICc 结构域和 C 端的 CTD 结构域组成, 主要依靠 HELICc 和 CTD 结合双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 的突出末端^[10]。相较于 RIG-I 和 MDA5, LGP2 N 端缺乏激活下游免疫反应的 CARD 结构域, 但具有较 RIG-I 和 MDA5 更强的病毒核酸 RNA 亲和力; 可依感染病毒类型和时期正向或负向调控 RIG-I 和 MDA5 介导的干扰素反应^[11-15]。LGP2 可影响 MDA5 与病毒核酸 RNA 的结合, 激活 IPS-1 并通过 TBK1-IRF3/7-IFN 路径介导病毒感染免疫^[16-18]。在斑马鱼 (*Danio rerio*)、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 中发现 LGP2 的序列及表达与抗病毒功能直接相关, 是开展鱼类抗性选育的潜在分子资源^[15, 19-20]。

草鱼常因感染草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 而发生出血病, 死亡率高且无特效药, 严重阻碍了我国水产养殖业的健康发展^[21-23]。赤眼鲢 (*Squaliobarbus curriculus*) 与草鱼同属雅罗鱼亚科 (Leuciscinae), 俗称为“野草鱼”, 可与草鱼杂交获得 GCRV 强抗性子代, 是 GCRV 抗性资源供体和研究鱼类抗性差异的优良材料^[24]。本实验拟获取赤眼鲢关键胞质模式识别受体 *lgp2* (*sclgp2*) 的全长 cDNA 及 5' 端上游序列, 分析其序列结构、表达特征与 GCRV 感染免疫的关系, 并明确其与 MDA5 的相互作用, 为深入理解 LGP2 参与 GCRV 感染免疫功能和高抗性草鱼选育研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

该研究所用的赤眼鲢购自湖南省浏阳市北盛镇乌龙渔场, 平均体重为 (12.80±1.25) g。所用草鱼购自岳阳市湘阴县水产科学研究所, 平均体重为 (23.45±1.72) g。购回后于 80 L/箱的恒温循环水

养殖系统 28 °C 暂养 2 周, 每天按鱼体重的 3% 投喂饲料。攻毒用 GCRV106 毒株由中国水产科学研究院长江水产研究所惠赠。本研究获得了湖南农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照湖南农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取健康赤眼鲢脾脏组织 30 mg, 根据 Total RNA kit I (Omega, 美国) 说明书提取总 RNA, 经微量测定仪 (eppendorf, 德国) 测定核酸浓度和纯度, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。取纯度高和无降解的 RNA (A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.2, 电泳条带 28S rRNA : 18S rRNA 亮度比值约为 2 : 1) 2 μg, 按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, 美国) 说明书合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板克隆 *sclgp2* cDNA 序列中间片段; 按照 SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clontech, 美国) 说明书分别合成 5' 和 3' RACE-ready cDNA 模板, 并以此模板克隆 5' 和 3' 的 cDNA 序列。

1.3 *sclgp2* 全长 cDNA 克隆

基于 GenBank 中青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) (KX344501.1) 和草鱼 (FJ813483.2) *lgp2* cDNA 的保守区序列, 利用 Oligo 7.0 软件设计 *sclgp2* cDNA 中间序列克隆 PCR 引物 LGP2-F1 和 LGP2-R1; LGP2-F2 和 LGP2-R2 以及 LGP2-F3 和 LGP2-R3 (表 1)。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min; 30 个循环的 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 72 °C 终延伸 7 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 进行纯化回收, 连接至 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 北京), 转化 DH5α 感受态细胞并挑取阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。基于获得的 *sclgp2* 部分 cDNA 序列设计特异性 RACE 外引物 LGP2-5' W 和 LGP2-3' W 以及内引物 LGP2-5' N 和 LGP2-3' N (表 1)。5' RACE PCR 首轮 PCR 引物为 LGP2-5' W 和通用引物; 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 95 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 7 min。首轮 PCR 产物经 50 倍稀释后作为巢式 PCR 模板, 引物分别为 LGP2-5' N 和通

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primers	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	用途 purpose
LGP2-F1	GGACAGCAGTGACAAGGACT	PCR
LGP2-R1	GGTGGAGATGAGGAGGTTGAG	PCR
LGP2-F2	GTCTCGTGGCATCATCTT	PCR
LGP2-R2	TCCCAATCTTCAAAGGTCTT	PCR
LGP2-F3	AACGGCTGTCTCATTCG	PCR
LGP2-R3	ACACTCACACACCTTTCTC	PCR
LGP2-5'W	TCTAGGGACGACTTCCTTCAGCTCTGGT	RACE
LGP2-5'N	AGGCCAAAACCTGAGGCAGTTTCCTT	RACE
LGP2-3'W	CCTGGAGGCAAATCACTCACAAAGCAGTGG	RACE
LGP2-3'N	ACATGAGCAGCCGTTTCCCTGACCT	RACE
LGP2BF	CGTGGAGAAGAAAGTGAGA	PCR
LGP2BR	AGTCCCTGGAGAAAAGAAGT	PCR
LGP2 P1	AAGTCAAACCTCTGTACCTGAAACTCAACA	PCR
LGP2 P2	ATTCAAACAGGGGAGGATTGCCACCTTC	PCR
LGP2 P3	ATCGAGAGGTCTGTGTGCTGTTTTGGA	PCR
LGP2 P4	TGTGCTGTTTTGGACCTTCTCTGCTCTT	PCR
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	PCR
AP2	ACTATAGGCACGCGTGGT	PCR
LGP2-YF	GCATCATCTGGCTTCCCCTGAG	qPCR
LGP2-YR	GCACCTTGTGACGAGCACTG	qPCR
IFN YF	AATGCTCTGCTTGCGAATG	qPCR
IFN YR	CCTGGAAATGACACCTTGG	qPCR
β -actin YF	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG	qPCR
β -actin YR	GGGCACCTGAACCTCTCATT	qPCR
EF1 α YF	CGCCATTGTTGAGATGATCCCT	qPCR
EF1 α YR	GACACCAACAGCAACGGTCT	qPCR

用引物, 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 25 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。3' RACE 的步骤同 5' RACE, 对应首轮特异性扩增引物为 LGP2-3'W, 巢式 PCR 引物为 LGP2-3'N。PCR 产物经电泳检测、切胶回收, 连接转化 DH5 α 细胞后挑阳性克隆送测序。

1.4 *sclgp2* cDNA 5'端上游序列克隆

sclgp2 的 5'端上游序列克隆按 Universal Genome Walker 2.0 试剂盒 (Clontech, 美国) 说明进行。按 NcleoSpin Tissue 说明书提取赤眼鳟肌肉基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。利用 4 种限制性内切酶 (*Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II、*Stu* I) 分别对 DNA 进行酶切, 纯化产物并构建

基因组文库, 随后通过 T4 连接酶给产物加上接头。基于已克隆获得的 *sclgp2* cDNA 近 5' 端序列, 设计 5' 端上游序列克隆特异性引物 LGP2 P1 和 LGP2 P2 (表 1)。首轮 PCR 模板为 4 个构建好的基因组文库, 引物为 LGP2 P1 和 AP1。反应程序: 95 °C 25 s, 72 °C 3 min, 7 个循环; 95 °C 25 s, 67 °C 3 min, 32 个循环; 67 °C 7 min。首轮 PCR 产物稀释 50 倍后作为巢式 PCR 模板, 引物为 LGP2 P2 和 AP2。反应程序: 95 °C 25 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 95 °C 25 s, 67 °C 3 min, 67 °C 7 min, 20 个循环。PCR 产物经测序验证。后基于第一次克隆所得序列设计引物 LGP2 P3 和 LGP2 P4 (表 1), 再进行一轮 5' 端上游序列克隆 PCR, 拼接 2 次克隆测序序列得到 5' 端上游序列。

1.5 赤眼鳟和草鱼 *lgp2* 的 RNA 结合功能区序列比较

对每尾草鱼和赤眼鳟腹腔注射 400 μ L GCRV。按发病情况将草鱼分为抗性个体 (未有出血病症状且 2 周后仍正常存活) 和易感个体 (出血病症状明显且 1 周内发病); 赤眼鳟一直未见发病症状, 为抗性对照。选取抗性草鱼、赤眼鳟和易感草鱼各 5 尾, 采集脾脏组织后提取总 RNA 并逆转录成 cDNA 模板, 进行 PCR 反应, 引物为 LGP2BF 和 LGP2BR。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收并送测序。

1.6 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件拼接获得 *sclgp2* 的 cDNA 全长; 基于 ExPASy-Translate tool (<https://web.expasy.org/>) 预测 *sclgp2* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF)、编码的氨基酸序列和理化性质。通过 EMBL 多序列比对工具 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) 和 DNAMAN 软件对 LGP2 进行氨基酸序列比对和编辑。通过 MEGA 7.0 软件并选择邻接法构建系统进化树。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线软件分析蛋白质结构域, 采用 I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 和 PyMOL 软件对 LGP2 进行蛋白三级结构预测和展示, 并通过 NetPhos 3.1 Server 软件预测蛋白磷酸化位点。利用 Gene-regulation 下 AliBaba 2.1 程序联合 TRANSFAC 4.0 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/>)

[index.html](#)) 以及 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 预测 5'端上游序列的转录因子结合位点。

1.7 赤眼鳟健康及感染组织的 *sclgp2* 表达水平检测

分别采集 4 尾健康赤眼鳟的肠道、肝脏、肌肉、脑、皮肤、脾脏、鳃、肾脏、头肾和心脏 10 个组织, 提取组织总 RNA 并合成 cDNA 第一链。设计荧光定量引物 LGP2-YF 和 LGP2-YR, 以 β -actin 和 *EF1- α* 为参考基因 (表 1), 在 CFX96 Touch Real-Time PCR 仪 (Bio-rad, 美国) 上进行荧光定量 PCR 实验。反应体系为 5 μ L 2 \times 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 μ L, 1 μ L cDNA 模板和 3.2 μ L 无菌水; 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 45 个循环, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s; 熔解曲线从 65 $^{\circ}$ C 上升至 95 $^{\circ}$ C, 每 5 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C, 采集荧光信号。对赤眼鳟进行攻毒, 实验组腹腔注射 400 μ L GCRV, 对照组每尾鱼注射 400 μ L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)。在注射后的 12、24、48 和 72 h 分别随机选取 3 尾实验鱼, qPCR 检测肠道、肝脏、肌肉、皮肤、脾脏和头肾组织 *sclgp2* 和 *ifn1* 的相对表达量。

1.8 LGP2 及其结构域与 MDA5 的互作检测

利用酵母双杂交检测赤眼鳟 LGP2 及其结构域与 MDA5 的相互作用。通过基因合成方式构建了酵母双杂交的 BD 载体 pGADT7-LGP2 以及 AD 载体 pGBKT7-MDA5, 使用 Y2H Gold 酵母菌为实验菌株。具体反应组合: ① Bait 自激活检测, pGADT7-AD 和 pGBKT7-MDA5; ② Prey 自激活检测, pGADT7-LGP2 和 pGBKT7; ③ pGADT7-LGP2 和 pGBKT7-MDA5 互作验证; ④ pGADT7-T 和 pGBKT7-53 互作阳性对照; ⑤ pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 互作阴性对照。此外, 对赤眼鳟 LGP2 结构域 pGADT7-DEXD-H-box (1~476 aa)、pGADT7-DEXD (1~201 aa)、pGADT7-H-box (390~476 aa) 以及 pGADT7-RD (553~668 aa) 与 MDA5 的互作分别进行了酵母双杂交检测。

1.9 数据分析

使用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件进行 qPCR 数据处理。通过 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析, 利用 Pearson 相关性系数分析基因表达量之间的关联性。P<0.05 为差异显著, 采用

GraphPad Prism 6.0 软件进行数据作图。

2 结果

2.1 *sclgp2* 全长 cDNA 序列分析

基于 cDNA 全长克隆测序结果, 通过序列拼接得到 2 940 bp 的全长 *sclgp2* cDNA 序列 (GenBank: MH512892.1)。具体包含 45 bp 的 5'非编码区, 852 bp 的 3'非编码区和对应编码 680 个氨基酸残基的 2 043 bp 开放阅读框; 3'非编码区具有“*AATAAA*”加尾信号和 poly (A), 且存在 5 个“*ATTTA*”mRNA 不稳定基序信号 (图 1)。

对抗性草鱼、赤眼鳟以及易感草鱼 *lgp2* 的 RNA 结合功能区序列进行了扩增和测序, 序列比对后初步发现 2 个 GCRV 抗性关联位点。抗性草鱼和 *sclgp2* 的第 684 位碱基为 C, 易感草鱼为 A; 抗性草鱼和 *sclgp2* 的第 1 029 位碱基为 T, 而易感草鱼为 C。

2.2 LGP2 多序列比对及系统进化树分析

对赤眼鳟、草鱼、斑马鱼、大蟾蜍 (*Bufo bufo*)、乌龟 (*Mauremys reevesii*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、智人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的 LGP2 氨基酸序列作了多序列比对 (图 2)。结果显示, 赤眼鳟与草鱼 LGP2 的相似度最高, 为 95.0%; 其次是与斑马鱼 LGP2, 相似度为 76.9%; 与其他几个物种的相似度则在 49.4%~52.8% 之间。各比对物种 LGP2 均具有较为保守的 DEXDc、HELICc 和 CTD 结构域, 分别存在 86、43 和 32 个保守氨基酸残基。

系统进化分析结果显示, 整个 LGP2 系统进化树可分为 3 大支 (图 3)。赤眼鳟首先与草鱼、鲫和青鱼聚为一支, 再与鲤科 (Cyprinidae) 和鲴科 (Ictaluridae) 鱼类聚为一大支; 鲈形目 (Perciformes)、鲷形目 (Pleuronectiformes)、鲹形目 (Cypriodontiformes)、鲈形目 (Tetraodontiformes)、鲑形目 (Salmoniformes) 和狗鱼目 (Esociformes) 等硬骨鱼类 LGP2 聚为一大支; 此外, 哺乳类、鸟类、爬行类和两栖类聚为一大支。

2.3 *sclgp2* cDNA 5'端上游序列分析

通过染色体步移法获得了 *sclgp2* 的 721 bp 5'端上游序列 (GenBank: MZ188977), 在此基础上通过 AliBaba 2.1 和 JASPAR 软件预测了转录因子结

```

1      acatgggacacacagacctctcgatacacagtgacaacagcagagATGGAGGTCACCTCTTAGATCATACCAGGAG
1      M E V T L R S Y Q E
76     GAAGTGGTGCAGGGCGCTCAAAGGGGAGAACAGCATCATCTGGTCTCCCACTGGTGGAGGAAAAACCCGTGCT
11     E V V Q A A L K G E N S I I W L P T G G G K T R A
151    GCAGTTTATGTTGCCAAGAAACATTTGGAGACTACACCTAATGCCAAAGTGGCAGTGTCTCGTCAACAAGGTGCAC
36     A V Y V A K K H L E T T P N A K V A V L V N K V H
226   CTGGTGGACCAGCACTATAACAATGAATTC AACCTTACCTTGGGAAGGCATACAGGGTAAAGGCCATCAGTGGG
61     L V D Q H Y N N E F K P Y L G K A Y R V K A I S G
301    GACAGCAGTGACAAGGACTTATTTGGGCGCTTGTCCAGGACTCAGACCTGATCATCTGCACGGCTCAGATCTTG
86     D S S D K D L F G R L V E D S D L I I C T A Q I L
376    GAGAACCCCTGAACAGCAGAGGAGGAAAAACAGTGGAGCTCACAGACTTCAGCCTGCTGATCATAGACGAA
111    E N A L N S T E E E K H V E L T D F S L L I I D E
451    TGTCCACACGCAAAAGGAGTGTCTATAACAAGATTATGGCCGCTATGTGGAGAAGAAATGAGAAAAGAA
136    C H H T Q K E S V Y N K I M G R Y V E K K L R K I
526    AGAAACTGCCTCAGTTTGGGCCACAGCATCACCTGGTACAGGAGGAAATAAGACTGGAAAAGCTGTG
161    R K L P Q V L G L T A S P G T G G N K T L E K A V
601    GAACATGCTTGCAGATCTGTCGAATCTGGATTCAATTTGTCCACCAAGAATTATAAACCCAGAGCTGAAG
186    E H V L Q I C A N L D S V I V S T K N Y K P E L K
676    GAAGTCGTCCTAGACCAGAAAGCAATATGACATTTGTTGAAAAAGAGCTCTGGATCCATTTGGCGACCACTTG
211    E V V P R R R K Q Y D I V E K R A L D P F G D H L
751    AAGTTAATGATGCTTTGATTCACGGTTCATGCCATCAACGGTGGAGCGTAGCCTGCGGGAGGTGGCACCCAG
236    K L M M S L I H G F M P S T V S R S L R E V G T Q
826    GAATATGAAGCTGATGTTGGAACTAGAGAAAATAGGTGTAAGCAAGAGAACAGACTGATCACTCAGTGTGGC
261    E Y E A D V V E L E K I G V K Q E N R L I T Q C A
901    CTGCATCTGGCCAATACAAGATGCTCTCTCATTACGACACCGTTCGATGGTGGACGCTCAATGTTCTG
386    L H L R C A Q Y N D A L L I H D T V R M V D A F N V L
976    GACGAGTTCTACAATTCAGGAGCAACAATTTGCTGGATGGAACAGACTTCTTCCAGGGGCTTTTATGATGAG
311    D E F Y N S R S N K L L D G T D F F L Q G L F D E
1 051  AACCGTGTGAGCTAAAACAGCTGGACTGGATGCCCGTATGAAAAACCAATTTGGCCAGTTGCAACGCAGC
336    N R V E L K Q L A L D A R Y E N P K L A Q L Q R T
1 126  CTGCTGAAGGAGTTGAAGAGAACAAAATGCTCGCGGCATTATCTTTTGAAGACACGCGGGGCACACATTGT
361    L L K E F E E N K M S R G I I F S K T R R R G T H C
1 201  CTGTATGACTGGGTGAGCCCAACCTGAGCTGCAGAAGTCAAAATCAGCGTGGCATTCTCACTGGAACGGGT
386    L Y D W V S A N P E L Q K V K I S A G I L T G T G
1 276  ACTGGTAAACACATGAACAGAAATAACAGAAGAATACCAATAAAGATTTAGAGTAGGGCACTCAACCTC
411    T G V N H M N Q N K Q K N T I K D F R V G H L N L
1 351  CTCATCTCCACCACTGATCCGAGGAAGGACTTGATATTGCAGAATGCAACTAGTTGTCCGTTACGGCTGTGG
436    L I S T S V A E E G L D I A E C N L V V R Y G L L
1 426  ACCAATGAAATCGCTCAGCAGCAGGCGAGTGGACGGCTCGAGCTCTGAACAGCGTCTACTCGTGGTAGCTGAA
461    T N E I A Q C Q A S G R A R A I N S V Y S V V A E
1 501  GAAGTGGGCGTGAACACGCAAGGAATTCACCAATGAGTATCTAGAAGTCTGACCTCAAAAGCTATTGATCAA
486    E G G R E L R K E F T N E Y L E S L T S K A I D Q
1 576  GTACAGATGATGATCCAGGGAGTTCAGAATCAAGATATCTGAGCTTCAACAAATGGCTGTCTCATTCCGATT
511    V Q S M S P R E F R I K I S E L Q Q M A V L I R I
1 651  GAAGCCGCAAGAAAAAGGATGCGAGAAAGCAGCGCTACAGTCCTGGTCAAGTTGAGCTTCAATGCGAGGATGT
536    E A A R K K D A R K Q R Y S P G Q V E L Q C R G G C
1 726  TTCGTTTTTGTGGCCTGGAGAAGATATAAGAAAGATAGAGAATTCACACCATGCAATATCAACCCGAGTTT
561    F V F V G L G E D I R K I E N S H H V N I N P E F
1 801  CAGAAGCATTATAGAAGTGGGAAAGTGTCTTGGAGAAGACCTTTGAAGTTGGGAGCCTGGACGGGTTATC
586    Q K H Y R T G G K V F L E K T F E D W E P G R V I
1 876  AACTGCAGTAAATGTGGAAGGAATGGGAATGGAGATTAATTCAGAAGGTGGCAATCTCCCTGTTGAAAT
611    N C S K C G K E W G M E I K F K V A I L P C L N
1 951  ATAAAGAGCTTTTCTTGTAGTACTCCTGGAGGCAATTCACCTACAAGCAGTGGAAAGATGTGATGTTACAGTG
636    I K S F S L S T P G G K F T H K Q W K D V E F Q V
2 026  ACAGAGTTTACTTACTACTATGAGCAGCCGTTTCCCTGACCTGGACTTAGACGACATGAacaccaactaa
661    T E F D F I D Y M S S R F P D L D L D D *
2 101  actcagtcagaatgctgtagctgtcactgtgccagaatttctcactaaagtgaatatctctataaccagtgcca
2 176  gatcgtgaaggtactaccattatgattactgttcatcagcataatataaataatgaattatctatccagatata
2 251  tgcgattttacatcttggttggtcatagttgtcaaatataaattgggaacctctgttcagtacaatatagctgt
2 326  ttgtaaatgtgtactcaaatcttagtatttacttagtattctgttgtgtaagagttttgtttatttgtt
2 401  ttgtctgagaaagggtgtgtgaggttaaatgctttagatagatataatcttaacatatctcaggattatct
2 476  tgggtccatctcggggaacaagactgtgctctatgattatagttattgttgacattactgtcaaatatgt
2 551  ttataaatgcactccaagctcttaatggccctcttaaacactagctcagactggccttcagattgctc
2 626  aaacaattacatatattcaactaaagatgctttatcctaagtgacttacaatatgaagataaatatgaacacat
2 701  tcgaaatgtgtgagcttctttagactggctgggttcaggttgtttatagacttaaaactgtttcccaaa
2 776  aaaggtgaaatagtataatgaatgcttataaaatagaccttttaaatctgcataacatataacacatgag
2 851  attctgtatattacatctgcaatatatgacttttaaaataaaacacagttatgctctgcaaaaaaaaaaaaa
2 926  aaaaaaaaaaaaaa

```

图1 *sc1p2* 的 cDNA 及氨基酸残基序列

起始密码子用方框标出, 终止密码子用方框及“*”标出; 阴影标示 DEXDc(1~201 aa)、HELICc(390~476 aa) 和 CTD(553~668 aa) 结构域; 波浪线标示 mRNA 不稳定信号 (ATTTA), 双下划线标示加尾信号 (AATAAA)。

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *sc1p2*

The start codon is marked with the box, the termination codon is marked with “*” and a box; the domains of DEXDc (1-201 aa), HELICc (390-476 aa) and CTD (553-668 aa) are indicated with gray shadow; the mRNA unstable motif (ATTTA) is represented by a wavy line, and the polyadenylation signal (AATAAA) is indicated by double underline.

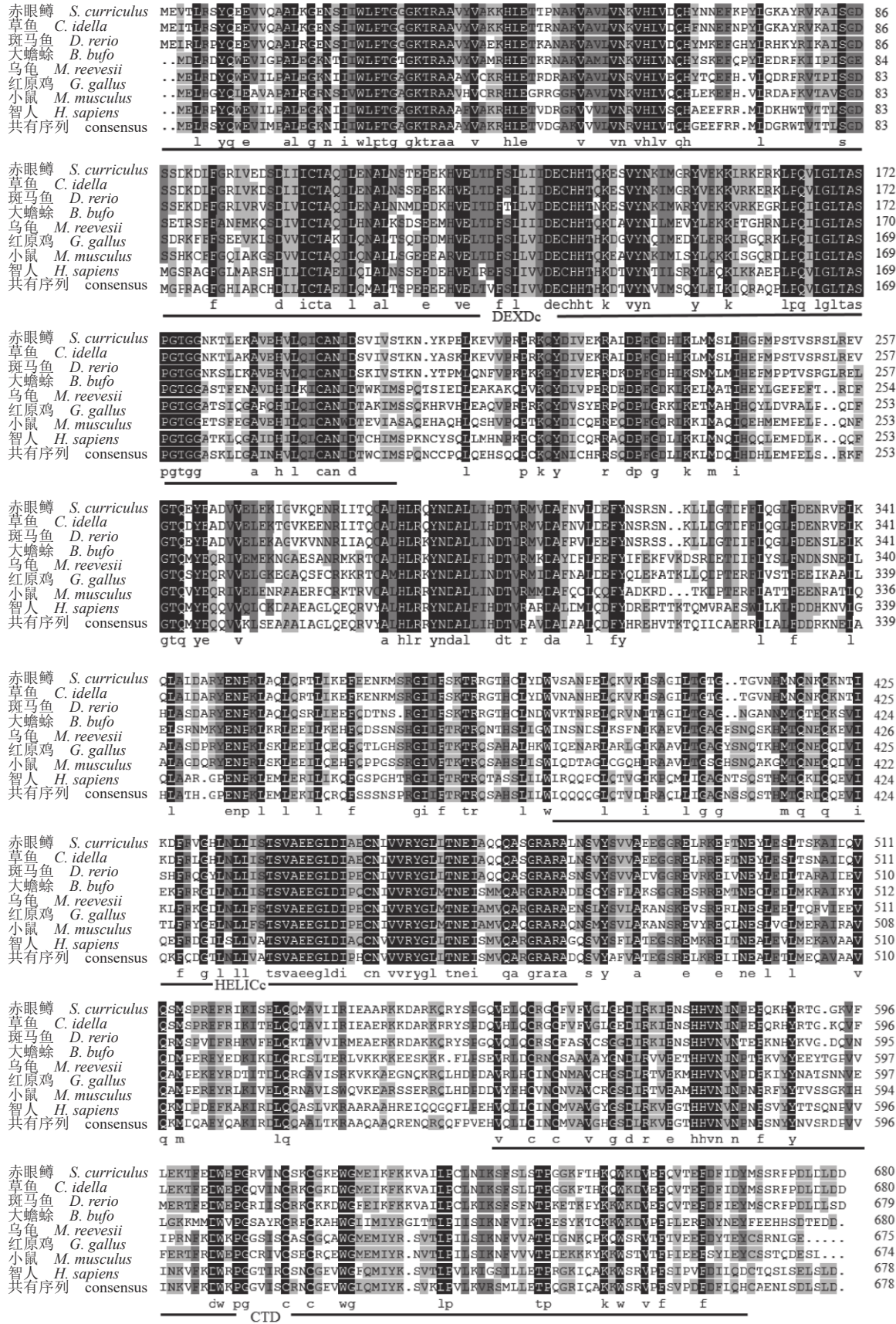


图 2 各物种 LGP2 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of LGP2s from different species

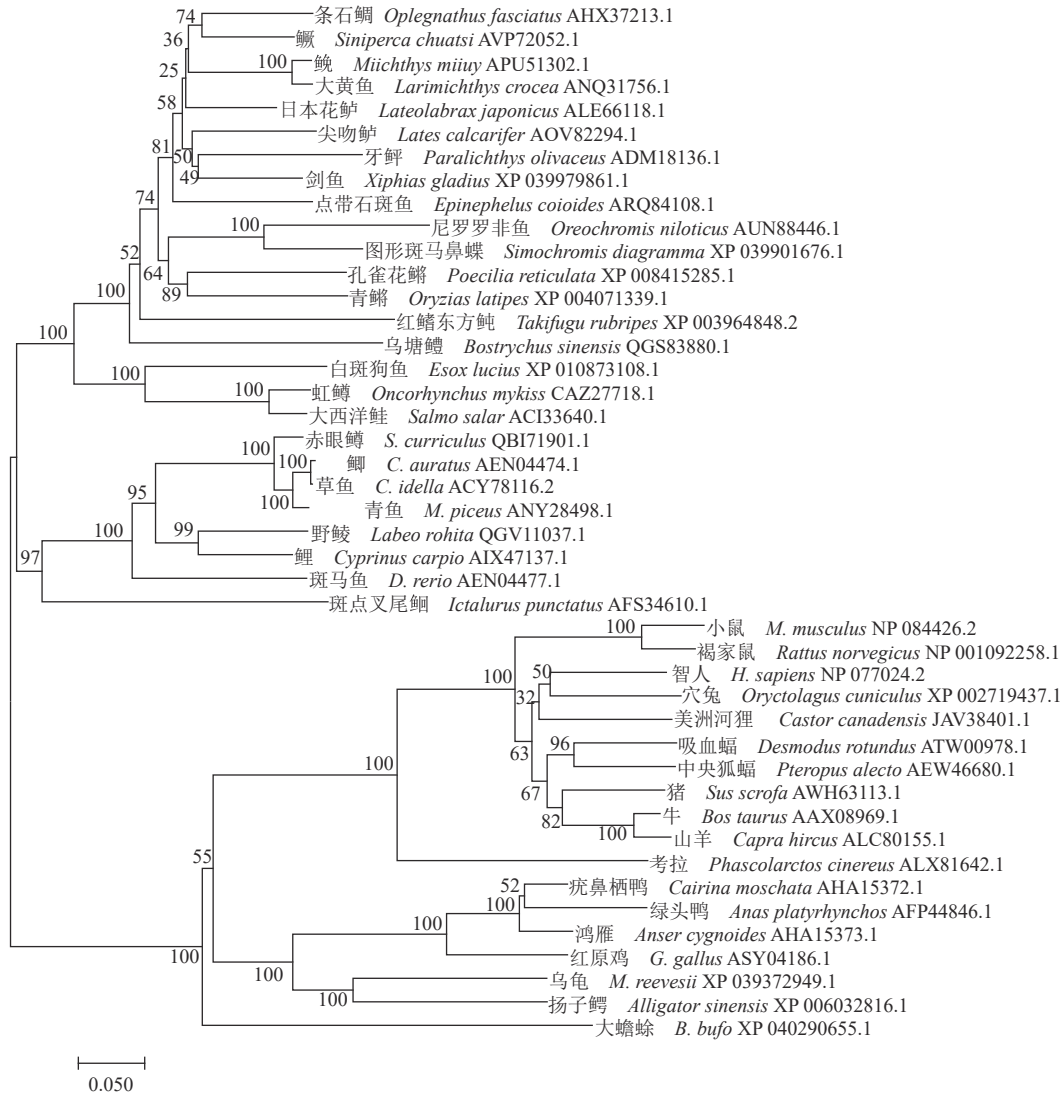


图 3 LGP2 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of LGP2

合位点。预测结果显示, *sclgp2* 5'端上游序列包含 TATA box 结合蛋白 (TATA-box binding protein, TBP)、cAMP 应答元件调节子 (cAMP responsive element modulator, CREM)、MafB (muscle aponeurosis fibromatosis B)、八聚体结合转录因子 1 (octamer transcription factor 1, Oct-1)、GATA 结合因子 1 (GATA binding factor 1, GATA1) 以及干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 等转录因子结合位点 (图 4)。

2.4 LGP2 蛋白结构分析

对赤眼鳟 LGP2 蛋白特征进行了分析, 并以草鱼和斑马鱼为对照。结果显示, 赤眼鳟、草鱼和斑马鱼 LGP2 的相对分子质量分别为 77.48、77.80 和 77.93 ku, 理论等电点分别为 7.88、8.28

和 8.56。赤眼鳟、草鱼和斑马鱼 LGP2 的磷酸化修饰位点数分别为 50 (Thr: 20, Ser: 25, Tyr:5)、55 (Thr: 21, Ser: 27, Tyr: 7) 和 55 (Thr: 20, Ser: 27, Tyr: 8)。3 种鱼结构域序列及排布存在差异, 其中赤眼鳟 LGP2 蛋白包含 3 个结构域, 分别为 DEXDc 结构域 (1~201 aa)、HELICc 结构域 (390~476 aa) 和 CTD 结构域 (553~668 aa); 草鱼 LGP2 结构域为 DEXDc (1~213 aa)、HELICc (390~476 aa) 和 CTD (553~668 aa); 斑马鱼 LGP2 结构域为 DEXDc (1~220 aa)、HELICc (389~475 aa) 和 CTD 结构域 (552~667 aa) (图 5)。此外, 赤眼鳟 LGP2 包含 26 个 α 螺旋和 21 个 β 折叠, 草鱼 LGP2 包含 26 个 α 螺旋和 20 个 β 折叠, 斑马鱼 LGP2 包含 26 个 α 螺旋和 21 个 β 折叠。

```

CTGGCTGGTAAAGGACGTTTTTAAAGAGCAGAGAAGGTCCAAAACAGACATGGGACACACAGACCTCTCGATATA
                                     TBP
CAGTGACGACAGCAGGTGAGTGGATCTGCTGACACGTTCCAGATATTTCTTGATCTAAATGTAGTTTTTCAA
      CREM      MafB
TACATAACCATAAAGCAGAGTAGTAGCTTTGATATTTTAAACATGGAGTATTACATTATTCATTTTTAGATTAAT
      Oct-1      MEB-1
TAGCTCACAAGTTGTTAACAGAGCAGAACATCAATGGTAAAGCTACTAGTAACATGCCACCTTTAAATGCTTATA

AGAAGTTATGAAAGTAGCCAAAAGGTCTAAACCTTAGTGCACCTTTTACTCTACCTGTATCTTACTGTATGTTTC

AGAATGGCACAAGGTTAATATATTCACTTTCATACTGCACCTGGTAAATTTAGTTTAATCTAAAGATTAATCTTTA
      HNF1A      GATA1      HNF1A
ATCTTCTCCCTTATGTTATGAATTTAACAGTTCATAAAGATACTTTATCACTAGAAAAGAAAACTGAAAATAACC
      GATA1      IRF3
TGTTAAACATTAAAAGTATTATGCAATCATTTAAGACATTTCTCTCACATAGAACCTTTCTGGCATAAAGGAGTTC
      HNF1B      CEBPA
TTTAAATGTGTCAACAATTTAGAACCCCCCTTTTTTCTAAGAGTGACATGAACACTATTTTGATAAAAAAC
      MAFB
TAAATGGCTTCCACTGTGTTTTGCTGACCTCCATCTGTGAATGATGAGGTCACTCTT
      NF-1      MafB

```

图 4 *sclgp2* 5'端上游序列转录因子结合位点预测

加粗下划线表示转录因子结合位点, 起始密码子用方框标示, 可能的甲基化位点加粗字体表示。

Fig. 4 Transcription factor binding site prediction in *sclgp2* 5' upstream region sequence

The bold underline represents transcription factor binding site, the start codon is indicated by box, and possible methylation sites are indicated in bold font.

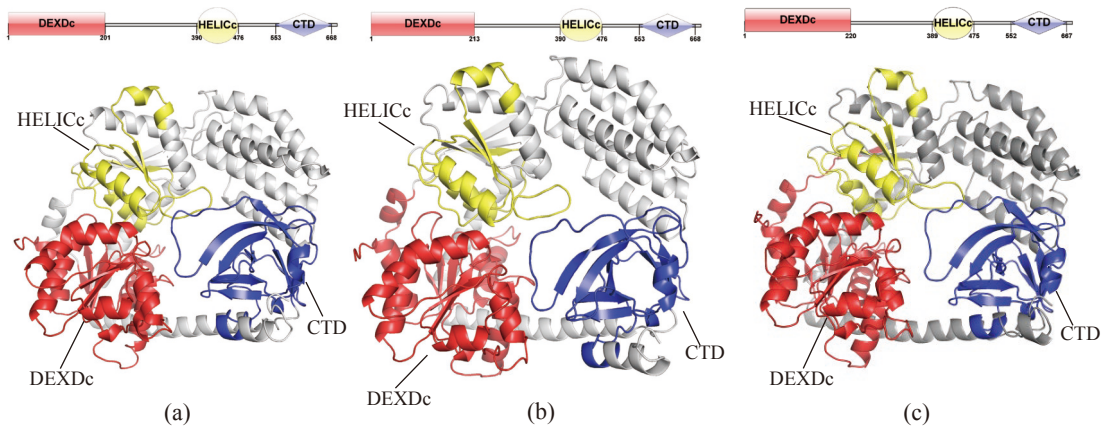


图 5 赤眼鳟 (a)、草鱼 (b) 和斑马鱼 (c) LGP2 结构比较

Fig. 5 Structure comparison of LGP2s from *S. curriculus* (a), *C. idella* (b) and *D. rerio* (c)

2.5 *sclgp2* 的组织表达特征分析

基于 qPCR 检测了健康赤眼鳟肠道、肝脏、肌肉、脑、皮肤、脾脏、鳃、肾脏、头肾和心脏组织中 *sclgp2* 的基因相对表达量。结果显示, *sclgp2* 在所有检测组织中均有表达, 脾脏组织中 *sclgp2* 表达量显著高于其他组织, 肌肉、心脏组织中表达量次之, 而肠组织中表达量最低 (图 6)。

感染 GCRV 后不同时间点赤眼鳟各组织 *sclgp2* 表达量无显著差异; 感染 GCRV 的肝脏、头肾、肠道及肌肉组织中 *sclgp2* 的表达量呈现先下降后上升的趋势。肝脏中 *ifn1* 表达水平在感染后 24~72 h 显著下降; 其他组织各时间点无显著差异 (图 7)。相关性分析结果显示, 赤眼鳟感染

GCRV 后, 肌肉中 *sclgp2* 与 *ifn1* 表达水平呈极显著正相关 (0.999, $P < 0.01$)。

2.6 赤眼鳟 LGP2 及其结构域与 MDA5 互作检测结果

酵母双杂交自激活检测显示, AD 质粒 pGADT7-LGP2 在 Y2HGold 菌株中无自激活, BD 质粒 pGBKT7-MDA5 在 Y2H Gold 菌株中亦无自激活。各组合反应在 SD/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板上均生长正常, 质粒转化成功。阴性对照在选择性培养基 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA 上不生长, 而阳性对照生长且变蓝, 说明酵母双杂交实验体系正常。pGADT7-LGP2 与 pGBKT7-MDA5 在 Y2H Gold 中存在一定互作, 激活了 HIS3 和 ADE2 基

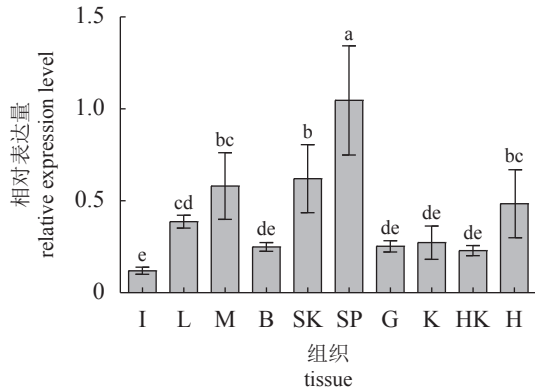


图 6 赤眼鲮不同组织中 *sclgp2* 基因表达水平

I. 肠道, L. 肝脏, M. 肌肉, B. 脑, SK. 皮肤, SP. 脾脏, G. 鳃, K. 肾脏, HK. 头肾, H. 心脏; 不同小写字母示组织间 *sclgp2* 表达量差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 6 Expression levels of *sclgp2* in different tissues of *S. curriculus*

I. intestine, L. liver, M. muscle, B. brain, SK. skin, SP. spleen, G. gill, K. kidney, HK. head kidney, H. heart; different lowercase letters indicate significant differences of *sclgp2* gene expressions among tissues ($P < 0.05$).

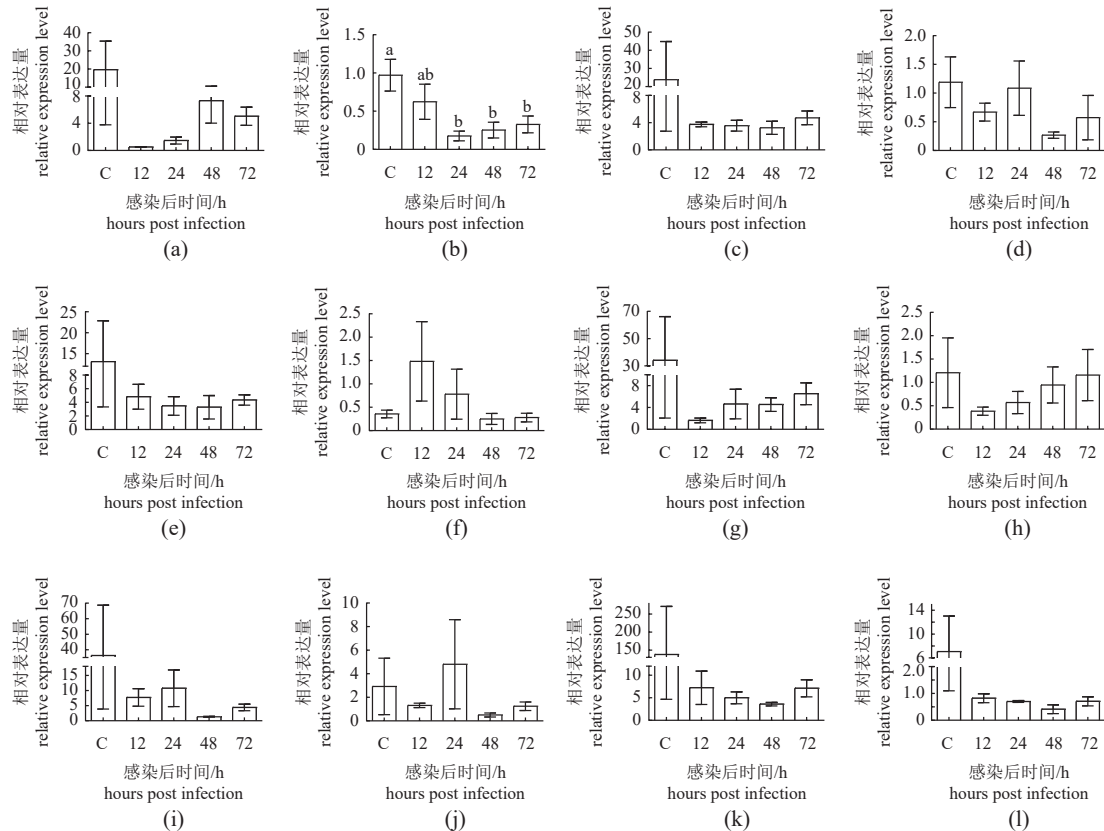


图 7 赤眼鲮感染 GCRV 后 *sclgp2* 和 *ifn1* 的组织表达水平

(a), (c), (e), (g), (i) 和 (k) 分别为肝脏、脾脏、头肾、肠、皮肤和肌肉中 *sclgp2* 的表达水平; (b), (d), (f), (h), (j) 和 (l) 分别为肝脏、脾脏、头肾、肠、皮肤和肌肉中 *ifn1* 的表达水平。

Fig. 7 Tissue expression levels of the *sclgp2* and *ifn1* in *S. curriculus* after GCRV infection

(a), (c), (e), (g), (i) and (k) represent expression levels of *sclgp2* in liver, spleen, head-kidney, intestine, skin and muscle, respectively; (b), (d), (f), (h), (j) and (l) indicate expression levels of *ifn1* in liver, spleen, head-kidney, intestine, skin and muscle, separately.

因, 但未激活 MEL 基因 (图 8)。

pGBKT7-MDA5、pGADT7-DEXD-H-box、pG-ADT7-DEXD、pGADT7-H-box 以及 pGADT7-RD 与 pGADT7 或 pGBKT7 共转后在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA 筛选平板上均不生长, 上述质粒无自激活。pGADT7-DEXD-H-box、pGADT7-DEXD、pGADT7-H-box、pGADT7-RD 分别与 pGBKT7-MDA5 共转后在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA 筛选平板上不生长, 说明上述赤眼鲮 LGP2 结构域与 pGBKT7-MDA5 在酵母水平均无互作 (图 9)。

3 讨论

LGP2 属 RLR 家族成员, 其作为胞质识别受体, 可调控 MDA5 等介导的病毒感染免疫反应^[25]。该实验从赤眼鲮中克隆得到了 *sclgp2* 全长 cDNA 序列, 其编码的氨基酸序列与草鱼和青鱼具有 95% 以上的相似度, 且与同属鲤科的草鱼、鲫和

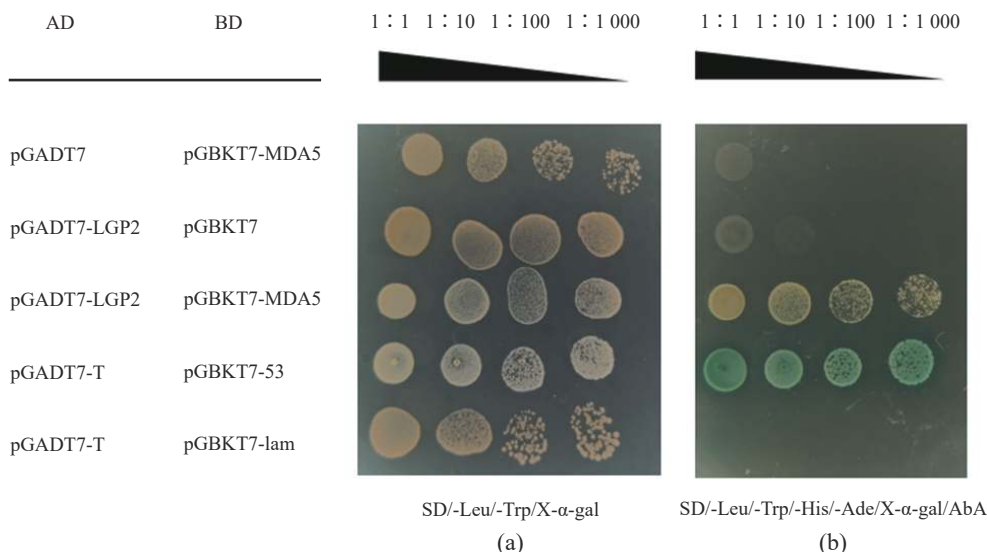


图 8 赤眼鳟 LGP2 与 MDA5 的酵母双杂交互作检测

(a) 酵母双杂交体系质量检测; (b) LGP2 与 MDA5 的互作检测; 下同。

Fig. 8 Yeast two-hybrid assay of LGP2 and MDA5 from *S. curriculus*

(a) quality detection of yeast two hybrid system; (b) interaction detection of LGP2 and MDA5; the same below.

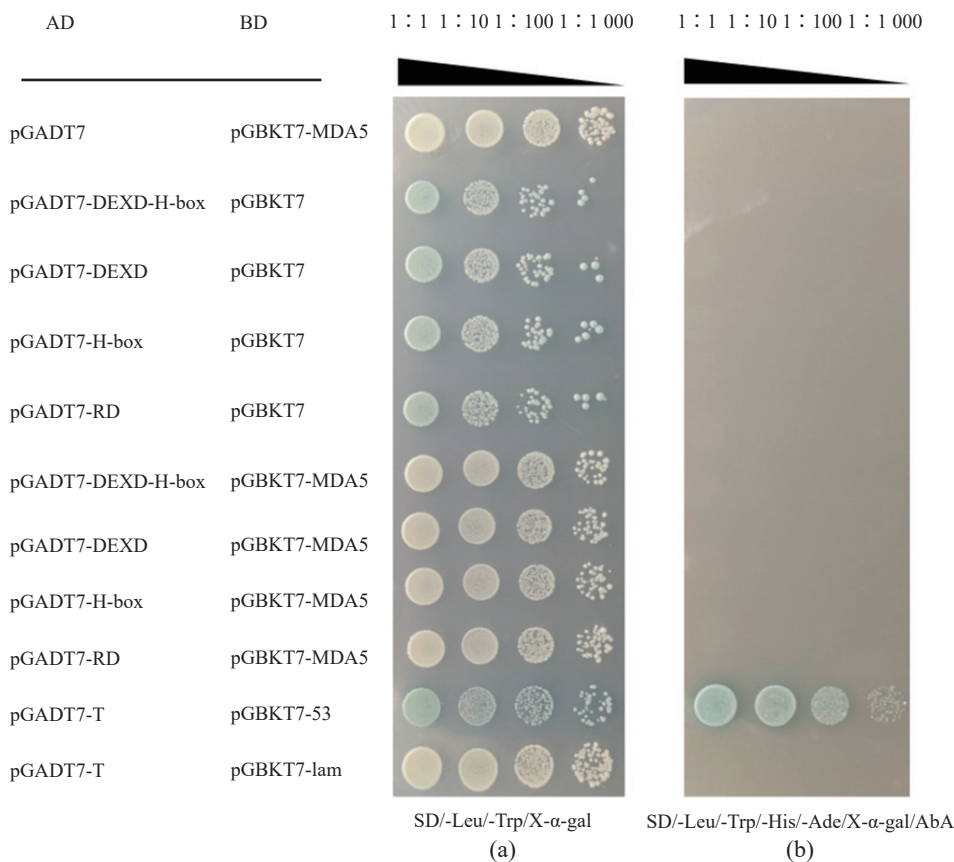


图 9 LGP2 各主要结构域与 MDA5 的酵母双杂交检测

Fig. 9 Yeast two-hybrid assay of major domains of LGP2 and MDA5

青鱼 LGP2 聚为一支。此外, 赤眼鳟与草鱼、斑马鱼等物种的 LGP2 蛋白结构相似, 均具有 DEXDc、

HELICc 和 CTD 结构域, 3 个结构域均存在较多的保守氨基酸残基, 提示赤眼鳟与其他动物中

LGP2 功能相似。

鱼类抗病免疫力具有种属和个体差异, 如赤眼鳟对 GCRV 表现为抗性^[24], 而草鱼感染 GCRV 后可根据发病速度和状况分为易感群体和抗性群体^[26]。该研究中通过比较 GCRV 抗性草鱼、赤眼鳟与易感草鱼 *lgp2* 的序列差异, 在其具 RNA 结合功能的区域初步发现 2 个 GCRV 抗性关联位点。LGP2 蛋白 HELICc 和 CTD 结构域中 RNA 结合功能位点是其结合病毒 RNA 并调控下游 IFN 反应的关键^[27]。如相较于正常 LGP2, CTD 的 K648 和 K649E 突变可使其结合 RNA 的能力减少 56 倍, 用谷氨酸替换 Helicase 结构域的 Lys138 和 Arg490 则亲和力降低 2.7 倍, 同时双位点突变和谷氨酸替换可使亲和力下降 1 500 倍, 且突变体激活 MDA5 介导的干扰素反应减弱^[28]; 而 LGP2 K634E 和 K651E 双位点突变可使其 CTD 失去结合 RNA 的能力^[9]。赤眼鳟和草鱼 LGP2 的抗性关联位点差异是否影响其识别结合 GCRV 有待深入研究。

基因的 5' 端上游序列是转录起始所需的重要序列, 转录因子可结合到其中的启动子区调控基因的转录和表达^[29]。该研究从克隆得到的 *sclgp2* 5' 端上游序列预测到多个转录因子结合位点, 如 TBP、Oct-1、MafB 和 IRF3 等。IRF3 是干扰素刺激基因, 受到病毒感染时, 可放大 IFN 抗病毒免疫反应^[30]。而转录因子 MafB 具有抑制 I 型干扰素抗病毒免疫反应的功能, 且可阻止 IRF3 与干扰素启动子结合。如在未受到病毒感染时, MafB 会抑制 IFN 启动子活性, 避免自身免疫疾病以及组织损伤^[31]。提示 IRF3 和 MafB 会共同调控干扰素的表达。此外, 研究显示过表达 IRF3 可增强牙鲈 *lgp2* 的转录活性^[32]。*sclgp2* 5' 端上游序列同时具有 MafB 和 IRF3 转录因子结合位点, 提示这 2 个转录因子也可能共同调控 *lgp2* 的表达, 进而从上游 LGP2 角度调控干扰素反应。

sclgp2 在机体各组织中广泛表达, 在脾脏、肌肉、皮肤和心脏中的表达量显著高于其他组织。这与草鱼相似, 草鱼脾脏、皮肤、心脏和肠道的 *lgp2* 表达量高于其他组织^[33]。值得注意的是, *sclgp2* 在肌肉中高表达, 而草鱼 *lgp2* 在肌肉中低表达, 表明赤眼鳟具有较草鱼更丰富的 *lgp2* 组织分布。感染 GCRV 后随着时间推移, *sclgp2* 并未发生显著的波动, 前期的研究显示, 赤眼鳟免疫分子具有较草鱼对应分子更强的抗 GCRV 功能^[34];

作为对 GCRV 感染表现为抗性的鱼类, 赤眼鳟 LGP2 等免疫分子本底水平可能足够应对和抵抗病毒入侵。相关性分析发现, 感染 GCRV 后赤眼鳟各组织中 *sclgp2* 与 *ifn1* 的表达量呈极显著正相关, 提示赤眼鳟 LGP2 可能正向调控 IFN 抗病毒反应。

本研究通过酵母双杂交互作检测实验, 发现赤眼鳟 LGP2 与 MDA5 存在弱相互作用, 提示 LGP2 调控 MDA5 免疫反应的过程可能不是大幅度直接作用。已有研究显示, LGP2 可以正向或负向调控 MDA5 介导的抗病毒免疫反应。如青鱼 LGP2 与 MDA5 共转染可显著增强干扰素表达并明显提高细胞抗病毒能力^[35]。石斑鱼 LGP2 的过表达使 MDA5 和 ISG15 等免疫基因表达下降, 而虹彩病毒和神经坏死病毒的复制量显著增加^[36]。LGP2 正调控 MDA5 的可能机制: 病毒感染后, MDA5 在细胞质中沿着病毒 RNA 链聚集成核, 相邻 MDA5 通过蛋白交互作用形成稳定结构; 而 LGP2 可通过改变核酸构象或者清除核蛋白使病毒 RNA 暴露出来, 辅助 MDA5 与病毒 RNA 的结合, 最终形成相对较短且稳定的 MDA5-RNA 丝状体, 诱导更强的抗病毒免疫信号^[13, 37]。而负向调控机制可能是 LGP2 抑制 IRF3/IRF7 的合成和磷酸化以及 IFN 启动子活性或者通过竞争 IPS-1 的结合位点来抑制抗病信号传递^[38-39]。LGP2 与 MDA5 互作的具体细节、动态变化过程以及对调控干扰素抗病毒反应的影响需要进一步明确。

综上, 本研究克隆得到了 *sclgp2* 的全长 cDNA 和 5' 端上游序列, 发现其存在 GCRV 抗性关联位点。*sclgp2* 在健康组织中呈组成型表达, 且肌肉中有明显表达。感染 GCRV 后, 肌肉中 *sclgp2* 及 *ifn1* 表达水平呈极显著正相关。赤眼鳟 LGP2 与 MDA5 存在弱相互作用。上述实验为赤眼鳟 *lgp2* 的功能属性研究提供了支持, 并提示了其可能具有的抗 GCRV 育种参考潜力。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Aoki T, Hikima J I, Hwang S D, *et al*. Innate immunity of finfish: primordial conservation and function of viral RNA sensors in teleosts[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1689-1702.
- [2] Chen S N, Zou P F, Nie P. Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) in fish: current know-

- ledge and future perspectives[J]. *Immunology*, 2017, 151(1): 16-25.
- [3] 敖敬群, 陈新华. 鱼类模式识别受体的研究进展[J]. *生命科学*, 2012, 24(9): 1049-1054.
- Ao J Q, Chen X H. Research progress on pattern-recognition receptors in fish[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(9): 1049-1054 (in Chinese).
- [4] Hansen J D, Vojtech L N, Laing K J. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(9): 886-897.
- [5] Chow K T, Gale M Jr, Loo Y M. RIG-I and other RNA sensors in antiviral immunity[J]. *Annual Review of Immunology*, 2018, 36: 667-694.
- [6] Cagliani R, Forni D, Tresoldi C, *et al.* RIG-I-like receptors evolved adaptively in mammals, with parallel evolution at *LGP2* and *RIG-I*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(6): 1351-1365.
- [7] Yoo J S, Kato H, Fujita T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 20: 131-138.
- [8] Chan Y K, Gack M U. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(6): 360-373.
- [9] Li X J, Ranjith-Kumar C T, Brooks M T, *et al.* The RIG-I-like receptor *LGP2* recognizes the termini of double-stranded RNA[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(20): 13881-13891.
- [10] 李倩, 李向茸, 冯若飞. *LGP2*参与抗病毒天然免疫应答的研究进展[J]. *病毒学报*, 2019, 35(2): 313-317.
- Li Q, Li X R, Feng R F. Research progress in the role of *LGP2* in antiviral innate immune response[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2019, 35(2): 313-317 (in Chinese).
- [11] Duic I, Tadakuma H, Harada Y, *et al.* Viral RNA recognition by *LGP2* and *MDA5*, and activation of signaling through step-by-step conformational changes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(20): 11664-11674.
- [12] Takahashi K, Kumeta H, Tsuduki N, *et al.* Solution structures of cytosolic RNA sensor *MDA5* and *LGP2* C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(26): 17465-17474.
- [13] Bruns A M, Horvath C M. *LGP2* synergy with *MDA5* in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling[J]. *Cytokine*, 2015, 74(2): 198-206.
- [14] Chen X H, Yang C R, Su J G, *et al.* *LGP2* plays extensive roles in modulating innate immune responses in *Ctenopharyngodon idella* kidney (CIK) cells[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(1): 138-148.
- [15] Wan Q Y, Wang L, Su J G, *et al.* Genetic structure, polymorphism identification of *LGP2* gene and their relationship with the resistance/susceptibility to GCRV in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Gene*, 2013, 521(1): 166-175.
- [16] Bruns A M, Leser G P, Lamb R A, *et al.* The innate immune sensor *LGP2* activates antiviral signaling by regulating *MDA5*-RNA interaction and filament assembly[J]. *Molecular Cell*, 2014, 55(5): 771-781.
- [17] Krishnan R, Babu P G, Jeena K, *et al.* Molecular characterization, ontogeny and expression profiling of mitochondrial antiviral signaling adapter, MAVS from Asian seabass *Lates calcarifer*, Bloch (1790)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 79: 175-185.
- [18] 罗红, 李耀国, 李东放, 等. 赤眼鲟信号转导与转录激活因子1基因(*ScSTAT1*)序列结构及免疫功能[J]. *水产学报*, 2021, 45(3): 381-395.
- Luo H, Li Y G, Li D F, *et al.* Sequence structure and immune function of signal transduction and transcriptional activator *STAT1* of barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(3): 381-395 (in Chinese).
- [19] Zhang Q M, Zhao X, Li Z, *et al.* Alternative splicing transcripts of zebrafish *LGP2* gene differentially contribute to IFN antiviral response[J]. *The Journal of Immunology*, 2018, 200(2): 688-703.
- [20] Mou C Y, Wang Y, Zhang Q Y, *et al.* Differential interferon system gene expression profiles in susceptible and resistant gynogenetic clones of gibel carp challenged with herpesvirus *CaHV*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 86: 52-64.
- [21] 陈芸. 用RNA干扰(RNAi)抗草鱼出血病病毒的初步研究[D]. 武汉: 中国科学院研究生院, 2005.
- Chen Y. Study of disease resistant on grass carp reovirus by RNA interference (RNAi)[D]. Wuhan: Chinese Academy of Sciences, 2005 (in Chinese).
- [22] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(12): 1940-1950.

- 1236-1252.
- Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2014, 44(12): 1236-1252 (in Chinese).
- [23] 迟妍妍, 田园园, 叶星, 等. 南方养殖草鱼呼肠孤病毒的分子特性比较及双重PCR检测方法的建立[J]. *病毒学报*, 2011, 27(4): 358-365.
- Chi Y Y, Tian Y Y, Ye X, *et al.* Molecular properties of grass carp reovirus in Southern China and establishment of a duplex PCR detection method[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(4): 358-365 (in Chinese).
- [24] 刘巧林. 草鱼与赤眼鳟杂交 F₁ 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 F₁ hybrids between grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*)[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [25] Pulido M R, Martínez-Salas E, Sobrino F, *et al.* MDA5 cleavage by the leader protease of foot-and-mouth disease virus reveals its pleiotropic effect against the host antiviral response[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(8): 718.
- [26] 尚雪莹. 草鱼 RLRs 家族基因的甲基化状态与草鱼出血病的关联研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- Shang X Y. Correlation studies between methylation of RLRs and resistance/susceptibility to GCRV in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016 (in Chinese).
- [27] Childs K S, Randall R E, Goodbourn S. LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64202.
- [28] Uchikawa E, Lethier M, Malet H, *et al.* Structural analysis of dsRNA binding to anti-viral pattern recognition receptors LGP2 and MDA5[J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(4): 586-602.
- [29] Gupta H, Chandratre K, Sinha S, *et al.* Highly diversified core promoters in the human genome and their effects on gene expression and disease predisposition[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 842.
- [30] 赵祥, 张义兵. 鱼类IRF家族在干扰素抗病毒免疫反应中的调控功能[J]. *水产学报*, 2021, 45(9): 1592-1604.
- Zhao X, Zhang Y B. IRF-mediated regulation of IFN antiviral response in fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(9): 1592-1604 (in Chinese).
- [31] Liu T M, Wang H, Zhang D N, *et al.* Transcription factor MafB suppresses type I interferon production by CD14⁺ monocytes in patients with chronic hepatitis C[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1814.
- [32] Hikima J I, Yi M K, Ohtani M, *et al.* LGP2 expression is enhanced by interferon regulatory factor 3 in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51522.
- [33] Huang T, Su J G, Heng J F, *et al.* Identification and expression profiling analysis of grass carp *Ctenopharyngodon idella* LGP2 cDNA[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2): 349-355.
- [34] 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.
- [35] Liu J, Li J, Xiao J, *et al.* The antiviral signaling mediated by black carp MDA5 is positively regulated by LGP2[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2017, 66: 360-371.
- [36] Yu Y P, Huang Y H, Yang Y, *et al.* Negative regulation of the antiviral response by grouper LGP2 against fish viruses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 358-366.
- [37] Satoh T, Kato H, Kumagai Y, *et al.* LGP2 is a positive regulator of RIG-I-and MDA5-mediated antiviral responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(4): 1512-1517.
- [38] Rodriguez K R, Horvath C M. Paramyxovirus V protein interaction with the antiviral sensor LGP2 disrupts MDA5 signaling enhancement but is not relevant to LGP2-mediated RLR signaling inhibition[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(14): 8180-8188.
- [39] Rao Y L, Wan Q Y, Yang C R, *et al.* Grass carp laboratory of genetics and physiology 2 serves as a negative regulator in retinoic acid-inducible gene I-and melanoma differentiation- associated gene 5-mediated antiviral signaling in resting state and early stage of grass carp reovirus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 352.

Sequence structure, tissue expression of LGP2, and its interaction with MDA5 in *Squaliobarbus curriculus*

LI Yaoguo, LIAO Yijing, WANG Jing'an, XIAO Tiaoyi*

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

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) are susceptible to grass carp reovirus (GCRV) and exhibit severe hemorrhage when infected. In contrast, *Squaliobarbus curriculus* (*Sc*) are resistant to GCRV. We have generated *C. idella*/*S. curriculus* hybrid fish which are relatively more resistant to GCRV than *C. idella*. These fish populations provide valuable resources for investigating the genetic mechanisms of the antiviral immunity. The laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) is a member of RIG- I like receptor family and is involved in recognition of viral nuclear acid at the first line of defense. Understanding its functions in antiviral immunity will have a significant impact on the molecular breeding of fish with resistant traits. In this study, the full-length cDNA (2 940 bp) and the 5' upstream sequence (721 bp) of the *S. curriculus* *lgp2* (*ScLgp2*) gene were sequenced. The 5' upstream region contains several putative transcription factor binding sites for MafB (muscle aponeurosis fibromatosis B) and IRF3 (interferon regulatory factor 3). The *ScLgp2* encodes a protein of 680 amino acids which consists of conserved DEXD/H (DEXD/H-box helicase domain), HELICc (helicase superfamily C-terminal domain) and CTD (C-terminal regulatory domain). The functional domains and the number of predicted phosphorylation sites are similar to that in other fish species, with differences in domain arrangement and amino acid sequences. Furthermore, by comparing the sequences of *C. idella* and *S. curriculus* LGP2 proteins, two GCRV sites associated with GCRV resistance in the RNA binding region were identified. In the phylogenetic tree, ScLGP2 was clustered in a clade containing the homologs from *C. idella*, *Carassius auratus* and *Mylopharyngodon piceus*, forming an expanded clade with the homologs from other cyprinid fish. Quantitative PCR analysis revealed that the mRNA expression level of *ScLgp2* was the highest in the spleen, followed by muscle and heart, whereas the lowest was detected in the intestine. The expression levels of *ScLgp2* and *ifn1* remained unchanged in most tissues except that the *ifn1* expression was significantly down-regulated in the liver at 24-72 h after GCRV infection. Interestingly, the mRNA expression levels of *ScLgp2* in the muscle positively correlated with that of *ifn1* (0.999, $P < 0.01$). ScLGP2 weakly interacted with ScMDA5, yet DEXDc (1-201 aa), HELICc (390-476 aa) and CTD (553-668 aa) were not engaged in such interaction. Taken together, the present study provides basis for studying the functions of ScLGP2 and exploring the *ScLgp2* gene as a potential marker for genetic breeding of disease resistant *C. idella*.

Key words: *Squaliobarbus curriculus*; laboratory of genetics and physiology 2; sequence structure; expression characteristic; protein interaction; GCRV resistance

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32172966, 31802288, U20A2063); The Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (19B265); the Central Guidance on Local Science and Technology Development Fund of Hunan Province (2022ZYC085)