

DOI: 10.11964/jfc.20240214358

仿刺参干扰素调节因子 3 基因的克隆及其功能分析

姜建洋, 李宏阳, 王称杨, 李成华, 邵丽娜*
宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘要:

【目的】 研究仿刺参干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 基因功能。

【方法】 本研究首先采用 RACE 技术, 通过克隆和序列拼接获得了仿刺参 IRF3 基因的全长 cDNA 序列, 并命名为 *AjIRF3*。*AjIRF3* 基因全长 2 023 bp, 编码 441 个氨基酸。

【结果】 序列分析显示, *AjIRF3* 基因 C 末端具有 1 个 IAD 结构域; 系统进化树分析结果显示, *AjIRF3* 能与 IRF3 家族成员聚合且与软体动物欧洲玉黍螺的亲缘关系最近。组织分布显示, *AjIRF3* 在所有检测的组织中均能表达, 其中在肌肉中表达量最高, 肠次之, 体腔细胞中的表达量最低。灿烂弧菌胁迫下, *AjIRF3* 在仿刺参体腔细胞中的表达量明显上调, 且在 6 h 达到最高值, 为对照组的 3.64 倍; 进一步在 LPS 和 poly(I:C) 胁迫下, *AjIRF3* 均在 48 h 达到最高值, 分别为对照组的 3.20 倍和 8.57 倍。亚细胞定位结果显示, *AjIRF3* 主要分布于细胞质中, 但经灿烂弧菌胁迫后 *AjIRF3* 主要从细胞质易位到细胞核中。此外, 干扰 *AjIRF3* 后, 仿刺参体腔细胞凋亡率与 NC 组相比显著下降 16%; 进一步用灿烂弧菌胁迫后发现, 体腔细胞中的胞内菌数量与 NC 组相比显著上调 19.83 倍, 表明干扰仿刺参 IRF3 后促进了病原感染。

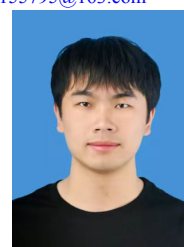
【结论】 仿刺参 IRF3 能够响应病原感染, 并在抵御病原感染过程中发挥重要作用。研究结果为防控仿刺参腐皮综合征的发生提供了理论基础。

关键词: 仿刺参; 干扰素调节因子 3; 表达分析; 细胞凋亡

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 俗称刺参, 是最具经济价值的养殖种类之一, 2022 年产量约 25 万 t, 仅第一产业产值即高达 400 亿元, 是我国海洋农业的重要组成部分^[1]。然而, 随着仿刺参养殖产业的发展, 其病害问题也日益突出。仿刺参常见的疾病类型主要有烂边病、烂胃病、滑板病和腐皮综合征。其中, 腐皮综合征以其发病快、发病广、危害重而备受人们重视^[2]。研究表明, 灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 是诱发仿刺参腐皮综合征发生的最主要病原^[3]。遗憾的是, 目前针对绿色、有效防控仿刺参疾病发生的技术手段仍较为匮乏。究其原因, 主要是对宿主免疫防御系统仍缺乏系统深入的认识。因此, 大力开展此方面的研究工作, 对解决仿刺参病害发生具有重要的意义。



第一作者: 姜建洋, 从事棘皮动物免疫学与病害防控研究, E-mail: 15064155795@163.com



通信作者: 邵丽娜, 从事棘皮动物免疫学与病害防控研究, E-mail: shaoyina@nbu.edu.cn



资助项目: 国家自然科学基金 (42176102)

收稿日期: 2024-02-14
修回日期: 2024-05-14

文章编号:
1000-0615(2025)01-019407-14
中图分类号: Q 785; S 947.9
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



干扰素调节因子 (interferon regulatory factors, IRFs) 作为一类重要的转录因子, 在免疫细胞中广泛表达, 参与固有和获得性免疫的调节^[4-5]。其中, 干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 在抵御病原感染方面具有重要作用^[6-8]。正常情况下, IRF3 主要位于细胞质中, 而在病毒、细菌等病原刺激下 IRF3 发生二聚化并入核激活 IRF3/IFN- β 信号通路, 以对抗病原感染。IRF3 还能促进单核细胞凋亡, 保护细胞免受病毒侵害^[9-12]。此外, IRF3 在调节炎症介质产生、增强免疫细胞招募等方面也起着至关重要的作用^[11, 13-15], 表明 IRF3 是脊椎动物免疫系统中应对病原感染的重要调节因子。

在海洋无脊椎动物中, 对 IRF3 基因的研究相对缺乏, 仅在萨氏海鞘 (*Ciona savignyi*)^[16]、欧洲玉黍螺 (*Littorina littorea*)^[17] 中有所报道。目前, 尚无仿刺参 IRF3 的相关研究报道, 基于仿刺参在水产养殖业中的重要性以及病害问题的紧迫性, 本研究拟通过 cDNA 末端快速克隆 (RACE) 技术扩增仿刺参 IRF3 (*AjIRF3*) 基因全长; 并通过荧光定量 PCR (qPCR)、RNA 干扰等技术研究该基因在灿烂弧菌胁迫下的功能特征, 预期成果将为仿刺参病害的免疫防治奠定理论基础, 推动仿刺参养殖产业健康可持续发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

50 头健康仿刺参 [(125 \pm 15) g] 采自大连桃源市场桃花岛水产商行, 实验前在天然海水 [盐度 28 \pm 1, 温度 (16 \pm 1) $^{\circ}$ C] 中暂养 3 d; 灿烂弧菌为本实验室保存菌种^[18]。本研究获得了宁波大学实验动物中心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宁波大学实验动物中心伦理规范, 并按照宁波大学实验动物中心伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验方法

灿烂弧菌的培养及仿刺参体外感染 将保存于-80 $^{\circ}$ C 的灿烂弧菌接种于 2216E 液体培养基 (5 g/L 胰蛋白胨, 1 g/L 酵母提取物, pH 为 7.6, 过滤海水定容) 中, 在 28 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床中

过夜培养, 6 000 \times g 离心 10 min 后收集菌体并重新悬浮于无菌海水中。将 50 头健康仿刺参随机分为 2 组, 即对照组和实验组, 每组 25 头。实验组养殖水体中加入终浓度为 10⁷ CFU/mL 的灿烂弧菌进行浸浴感染, 对照组不加任何处理。分别在胁迫后的 0、6、12、24 和 48 h 收集 3 头仿刺参的体腔液, 并用 160 目尼龙网过滤后与等渗抗凝剂 (0.068 mol/L Tris-HCl, 0.019 mol/L KCl, 0.02 mol/L EDTA, 0.48 mol/L NaCl, pH 7.6, 去离子水定容) 进行 1:1 混合 (体积比), 于 16 $^{\circ}$ C、800 \times g 离心 10 min。随后去上清液, 使用等渗缓冲液 (0.01 mol/L Tris-HCl, 0.001 mol/L EDTA, 0.53 mol/L NaCl, pH 7.6, 去离子水定容) 重悬细胞, 于 16 $^{\circ}$ C、800 \times g 离心 10 min 并重复收集一次。收集对照组 (0 h) 仿刺参中的体腔细胞、肌肉、触手、呼吸树和肠进行组织表达分析, 每个组织设置 3 个生物学重复。体腔液收集同上述步骤, 其他组织进行液氮研磨。所有实验样品中加入 1 mL TRIzol (TaKaRa, 日本) 以裂解细胞或组织, 并将裂解后的样品置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

脂多糖 (LPS) 和聚肌胞苷酸 [poly(I:C)] 胁迫仿刺参原代体腔细胞 按上述方法收集仿刺参体腔细胞后使用 Leiboviz's-15 (Gibco, 美国) 培养基 (额外添加 0.39 mol/L NaCl, 100 μ g/mL 硫酸庆大霉素, 100 U/mL 双抗) 重悬细胞制成细胞悬液并以血球计数板计算仿刺参体腔细胞浓度, 并稀释至 10⁶ 个/mL, 以 500 μ L/孔的体积加入到 24 孔培养板中, 于 16 $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 h 后待用。对于 LPS 和 poly (I:C) 胁迫, 在每孔中加入终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS (Sigma, 美国) 和 10 μ g/mL 的 poly (I:C) (Sigma, 美国), 对照组不加任何处理。分别在胁迫 0、3、6、12、24 和 48 h 后去掉培养基, 加入 1 mL TRIzol 以裂解细胞, 收集裂解后的细胞并保存于-80 $^{\circ}$ C, 用于后续 *AjIRF3* 基因表达分析。

仿刺参各组织总 RNA 的提取 按 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本) 说明书对上述仿刺参各组织中的总 RNA 进行提取。

仿刺参各组织 cDNA 的合成 根据 cDNA 逆转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 的使用说明, 将仿刺参各组织总 RNA 进行反转录, 用于

随后的 *AjIRF3* 基因的组织表达分析和诱导表达分析。

cDNA 末端快速扩增 (RACE) 根据仿刺参转录组数据库 (PRJNA774950), 得到 *AjIRF3* 基因的部分核心序列。将该序列作为仿刺参 *IRF3* 基因克隆的核心序列进行 RACE 扩增 (表 1)。参照 3', 5'-RACE 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 的操作流程, 分别进行仿刺参 *IRF3* 基因的 3' 和 5'-RACE 扩增。将扩增得到的产物连接至 pMD19-T vector (TaKaRa, 日本), 连接产物通过转化筛选出阳性克隆并进行测序 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 中国]。

***AjIRF3* 基因的生物信息学分析** 利用 BLAST 软件工具拼接 5' 和 3'-RACE 扩增片段序列, 获得 *AjIRF3* 基因的 cDNA 全长; 利用 ORF Finder 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf-finder/>) 预测 cDNA 全长序列中的开放阅读框 (ORF); 利用在线网址 (<http://www.expasy.org/>)

将 *AjIRF3* cDNA 序列推导成氨基酸序列; 通过 NCBI 网站上的 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 对 *AjIRF3* 基因进行同源对比分析; 利用在线网站 (<http://www.smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 *AjIRF3* 的结构域特征; 利用 MEGA 7.0 软件构建进化树对 *AjIRF3* 进行进化分析。

***AjIRF3* 基因在仿刺参各组织及灿烂弧菌、LPS、poly(I:C) 胁迫下的表达分析** 对获得的 *AjIRF3* 基因的 ORF 序列设计 qPCR 引物 (表 1)。利用 SYBR Green 荧光染料 (TaKaRa, 日本) 进行 qPCR 分析, 检测 *AjIRF3* 基因在体腔细胞、肌肉、触手、呼吸树和肠组织中的表达情况; 同时检测 *AjIRF3* 基因在灿烂弧菌、LPS 和 poly(I:C) 处理前后的表达情况。使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪实施, 反应参数设置为 94 °C 5 min; 94 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s 共 40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量^[19], 以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。本实验中柱状图均用 Graphpad Prism 软件绘制。

***AjIRF3* 基因原核表达载体的构建** 根据上述 *AjIRF3* 基因的全长序列, 设计含 *BamH I* 和 *Xho I* 限制性内切酶位点的引物 (表 1), 扩增反应后, 用胶回收试剂盒 (百泰克生物技术有限公司, 中国) 回收 PCR 产物并与载体 pMD19-T vector 连接, 转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态 (TaKaRa, 日本), 通过转化筛选出阳性克隆并进行测序, 将测序正确的克隆质粒用 *BamH I* 和 *Xho I* 限制性内切酶进行双酶切, 与经同样酶切的 pGEX-4T-2 原核表达载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, PCR 筛选阳性克隆, 经测序获得编码框正确的表达载体 pGEX-4T-2-*AjIRF3* 重组质粒。

***AjIRF3* 重组蛋白的诱导表达** 利用质粒提取试剂盒 (Omega, 美国) 纯化阳性菌株重组质粒 pGEX-4T-2-*AjIRF3*, 转化至大肠杆菌表达感受态 BL21 (DE3) (Novagen, 德国), 获得的阳性菌株即为 *AjIRF3* 表达菌株。将该表达菌株再接种到氨苄质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 培养液

表 1 本实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primers	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 purpose
<i>AjIRF3</i> 3-1	CACATGAATCCAACGATATACTTT	全长扩增
<i>AjIRF3</i> 3-2	AACTGTGGGATGGACTTTGCCAT	
<i>AjIRF3</i> 5-1	CTCGTTATTCCTCTCGATGGATC	
<i>AjIRF3</i> 5-2	AGCTGCTTATGGTTCCTCAGAA	
<i>AjIRF3</i> F	ATGTCACCAGACCAAGAC	原核表达
<i>AjIRF3</i> R	CTATTGTTCATTATTCTACTTTG	
<i>AjIRF3</i> BamH I F	GGATCCATGTCACCAGACCAAGAC	
<i>AjIRF3</i> Xho I R	CTCGAGCTATTGTTCATTATTCTACTTTG	
<i>AjIRF3</i> qF	ATTCTCAGCCTGCTCATC	定量
<i>AjIRF3</i> qR	CCTGATGAAGAAGATGGGTGTGT	
<i>Ajβ-actin</i> qF	AAGAGCCGTGTTCCATCC	
<i>Ajβ-actin</i> qR	GTGCCACATCATTCGTTT	
si- <i>AjIRF3</i>	CAGGGACAGUACCAUUAATT UUUAUGGUACUGUCCUGTT	干扰
siRNA negative control (NC)	UUGAACUCCUCUUGACGGTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT	
M13 F	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	测序
M13 R	GAGCGATAACAATTTACACAGG	

中, 37 °C 摇床培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时, 加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 使其终浓度为 0.001 mol/L, 于 37 °C 诱导 5 h 后收集 2 mL 菌液, 离心收集菌体, 加入 200 μL 细胞裂解液充分裂解细菌, 取出 20 μL 作为全菌液对照; 剩余菌液在冰上超声破碎, 功率为 300 W, 8 s/次, 工作 4 次, 每次间隔 15 s。然后于 4 °C, 13 000 × g 离心 10 min, 取 20 μL 上清液, 沉淀重新用 100 μL 细胞裂解液进行重悬, 作为包涵体液; 用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDA-PAGE) 检测, 确定 pGEX-4T-2-*AjIRF3* 蛋白是否诱导表达成功, 并分析其主要存在于包涵体还是上清液中。

***AjIRF3* 重组蛋白的纯化** 使用 50 mL 离心管收集 100 mL 上述诱导的菌液, 于 16 °C, 8 000 × g 离心 10 min; 用 10 mL 包涵体洗涤液 (1 mol/L 尿素, 0.02 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.001 mol/L EGTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.9, 去离子水定容), 重悬细菌沉淀; 冰上超声破碎, 功率设置 300 W, 超声 5 s 停 10 s, 共 10 min; 12 000 × g, 4 °C 离心 20 min, 收集沉淀; 加入包涵体裂解液 (8 mol/L 尿素, 0.02 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.2% Triton X-100, 0.03 mol/L 咪唑, 0.1% β-巯基乙醇, pH 7.9, 去离子水定容), 重悬沉淀, 超声破碎, 超声 5 s 停 10 s, 共 10 min, 至溶液基本变清; 12 000 × g 离心 20 min, 收集上清液; 吸取 1 mL GST 介质 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 加入纯化柱中, 用去离子水冲洗 2 次, 再用包涵体裂解液平衡 1 次; 在柱中加入待纯化的蛋白溶液, 4 °C 条件下混匀 2 h 或过夜; 收集流出液重复上柱 2 次; 用 5 mL 移液器吸取 10 mL 杂蛋白洗涤液 (6 mol/L 尿素, 0.001 mol/L Tris-HCl, 0.015 mol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, 2 mol/L 咪唑, 0.5% β-巯基乙醇, pH 7.9, 去离子水定容), 洗涤介质 10 次, 加入 0.6 mL 变性蛋白洗脱液 (6 mol/L 尿素, 1 mol/L Tris-HCl, 2.5 mol/L NaCl, 2 mol/L 咪唑, pH 4.5, 去离子水定容), 收集流出液; 加入 1 mL 变性蛋白洗脱液 (使介质悬浮), 浸泡 10 min, 收集流出液, 重复 5 次, 用于 SDS-PAGE 分析。

***AjIRF3* 多克隆抗体的制备** 通过 SDS-PAGE 对煮过的纯化后蛋白进行分离, 将蛋白胶用 0.29 mol/L KCl 溶液浸泡 10 min, 切割显现出来的白色胶条。将白色胶条充分研磨后加入 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 进行充分研磨, 形成含有纯化蛋白的溶液, 通过皮下注射将该溶液注入 4 只 BALB/c 小鼠 (*Mus musculus*), 每周 1 次, 共 3 周, 第 4 周取血前 1 天断粮, 眼球取血后于 4 °C 静置过夜, 于 4 °C, 3 000 × g 离心 30 min, 将上清液分装并冻存于 -80 °C 冰箱备用。

蛋白质印迹 (Western blot) 分析 使用蛋白质定量检测试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司) 测定灿烂弧菌胁迫后仿刺参体腔细胞中的蛋白浓度, 并进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白胶进行适当裁剪, 裁剪时需要包含彩虹 Marker 和目的蛋白; 对硝酸纤维素膜 (NC) 和滤纸进行适当裁剪; 用预冷的转膜缓冲液 (SDS 0.39 g/L, 甘氨酸 2.9 g/L, Tris 5.8 g/L, 甲醇 200 mL/L, 去离子水定容) 分别浸泡蛋白胶, 转膜用海绵垫、NC 膜以及滤纸。在电塑料板上从正极到负极依次放置 3 层滤纸、NC 膜、蛋白胶及 3 层滤纸; 正确安装后加入足量预冷的转膜缓冲液, 转膜电压设为 45 V, 电流设为 70 mA, 4 °C 条件下转膜 3 h。完成转膜后, NC 膜蛋白面剪角标记, 并用 10% 脱脂奶粉 [0.1% PBST (KH₂PO₄ 2.4 g/L, KCl 2 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 14.4 g/L, NaCl 80 g/L, 0.1% Tween-20, 去离子水定容) 配制] 封闭 2 h; 夹出 NC 膜, 孵育一抗 (用 10% 脱脂奶粉稀释 500 倍), 4 °C 孵育过夜。夹出 NC 膜, 加入 0.3% PBST (KH₂PO₄ 2.4 g/L, KCl 2 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 14.4 g/L, NaCl 80 g/L, 0.3% Tween-20, 去离子水定容) 漂洗 15 min, 重复 2 次; 之后孵育二抗 (用 10% 脱脂奶粉稀释 5 000 倍), 室温孵育 2 h; 夹出 NC 膜, 加入 0.3% PBST 漂洗 15 min, 重复 2 次。按照说明书配制显色液 (新赛美生物科技有限公司), 在暗室中通过凝胶成像系统对 NC 膜进行显影拍摄。

免疫荧光分析 收集仿刺参体腔液, 利用血球计数板对仿刺参体腔细胞数量进行计数,

以确定细胞浓度。选择适当规格的细胞培养板,并在细胞培养板内放置与之相匹配的细胞爬片,加入 500 μL 浓度为 10^6 个/mL 的细胞悬液,并于 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜;次日,培养板中加入终浓度为 10^7 CFU/mL 的灿烂弧菌。灿烂弧菌胁迫 6 h 后,去除培养基,用 PBS 清洗 2 次,加入 1 mL 多聚甲醛固定 30 min;除去多聚甲醛,加入 1 mL 0.1% Triton X-100 通透 10 min;而后 1 \times TBST (Tris 1.211 g/L、NaCl 4.007 g/L,去离子水定容)漂洗 3 次,加入 1 mL 封闭液 (5% BSA, TBST 配制),室温孵育 1 h;除去封闭液,1 \times TBST 漂洗 3 次,加入 1 mL 一抗工作液 (一抗稀释 400 倍),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;除去一抗工作液,1 \times TBST 漂洗 3 次,加入 1 mL 二抗工作液 (二抗稀释 2 000 倍),室温避光孵育 2 h;除去二抗工作液,1 \times TBST 漂洗 3 次;加入 1 mL DAPI 工作液 (稀释 5 000 倍),室温避光孵育 5 min;除去工作液,1 \times TBST 漂洗 3 次,使用激光共聚焦显微镜观察免疫荧光。

AjIRF3 干扰效率检测 上海吉玛制药技术有限公司合成干扰 *AjIRF3* 基因的 siRNA 引物 (表 1), 10 μL si-NC 或 si-*AjIRF3* (2×10^{-5} mol/L) 分别与 10 μL 的转染试剂 (上海碧云天生物技术股份有限公司)、80 μL PBS 混合成转染工作液,室温孵育 20 min;将 12 头仿刺参随机分为 si-NC 组和 si-*AjIRF3* 组,每组 6 头。si-NC 组每头仿刺参注射 100 μL si-NC 转染工作液;同样,si-*AjIRF3* 组注射 100 μL si-*AjIRF3* 转染工作液。干扰 24 h 后,分别提取仿刺参体腔细胞的总 RNA 和总蛋白进行干扰效率分析。

细胞凋亡率检测 *AjIRF3* 干扰后,使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司) 测定仿刺参体腔细胞的凋亡情况。收集仿刺参体腔液,于 16 $^{\circ}\text{C}$, 800 $\times g$ 离心 5 min 收集体腔细胞。进一步利用血球计数板对仿刺参体腔细胞数量进行计数,并将细胞浓度稀释至 10^7 个/mL。在 1 mL 细胞溶液中避光加入 195 μL FITC 结合液轻轻混匀;随后加入 5 μL 的 FITC 和 10 μL 的 PI 染色液并轻轻混匀,室温避光孵育 15 min。孵育过程中重悬细胞 2~3 次以改善染色效果,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率,并重复 3 次。

胞内菌落检测 首先,按照上述方法,对 *AjIRF3* 基因进行干扰。干扰 24 h 后,去除培

养液,加入不含抗生素但含有灿烂弧菌 (终浓度为 10^7 CFU/mL) 的 L-15 培养基继续培养 3 h。随后,收集体腔细胞并用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素作用 2 h 以杀灭胞外细菌;PBS 洗涤后加入 0.2% Triton X-100 裂解体腔细胞,将细胞裂解液悬空滴于 2216 E 固体培养基上进行培养,培养 24 h 后检测胞内菌生长情况。

2 结果

2.1 *AjIRF3* 基因的全长克隆及序列分析

AjIRF3 全长 2 023 bp,其中开放阅读框为 1 326 bp,编码 441 个氨基酸,5'非编码区 (untranslation region, UTR) 为 247 bp,3'非编码区为 450 bp (图 1)。推测的 *AjIRF3* 蛋白分子质量为 48.8 ku,理论等电点为 5.47。SMART 预测结果显示,*AjIRF3* 蛋白的 C 末端具有 1 个 IAD 结构域,该结构域主要负责与其他家族成员或其他转录因子的同源和异构体相互作用。进一步预测蛋白二级和三级结构,发现 *AjIRF3* 蛋白具有 4 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠 (图 2)。多序列比对结果显示,各物种之间的 IAD 结构域保守性相对较低。两两比对结果显示,*AjIRF3* 与斑马鱼 (*Danio rerio*) *IRF3* (NP_001137376.1) 的同源性为 35%,与日本花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) (AXI69832.1)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (NP_001244191.1)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (AGC31487.1)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) (WMV97601.1)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) (NP_001290316.1)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) (XP_005448377.1)、理氏裂腹鱼 (*Schizothorax richardsonii*) (APY 18926.1) 的同源性约为 28%~30%,而与无脊椎动物欧洲玉黍螺 *IRF3* (QNL15276.1) 的同源性为 27% (图 3)。

2.2 *AjIRF3* 进化树分析

使用 Mega 7.0 软件,以邻位相接法 (neighbor-joining, NJ) 分析仿刺参 *IRF3* 蛋白与其他物种 *IRF3* 蛋白的进化关系,采用 Bootstrap 工具包重复 2 000 次检验。结果显示,仿刺参 *IRF3* 首先与软体动物欧洲玉黍螺聚为一支,表明仿刺参 *IRF3* 的分子进化地位与欧洲玉黍螺的生物学分类地位较近,最后与脊椎动物 *IRF3* 聚合 (图 4)。

```

1 AACATAGGCCAGTGTGAATGTATGTAGCATAGTGATTATTGGAAGCTCCAATTAGTTAT
61 GGTCTAGGCCAGCCACCTTCAATGTTGCAGCTAGTGTAAATAGTCAACTAGGCCAA
121 CACACCACAGGCTCATACTTTACTTTGAACTACGCCATAAAGTTGGGAAAAAATATAA
181 TGAACAAATGTTGTTCTGGGAGAAAGGAAAAGGGTGTATAAAATCGCCACTAGGT
1 M P N L H S Y F L T I H I L R S A G
241 ATATGTTATGCCAAACTACACAGCTATTTCCTTACTATTCATATTTACGTTCTGCAGG
19 L I N S A T M S S E G T I S S F D Y E Q
301 ATTAATTAATTCAGCCACTATGAGTTCGAAAGAACATAAGCAGCTTTGACTATGAGCA
39 A L M D I H D Q S I L Q R M S P D Q D M
361 AGCCTTGATGGATATACATGATCAGAGCATATTGCAAAGAATGCACCAGACCAAGCAT
59 Q D A E T Y T E P C I Y Q E T S S A Q I
421 GCAAGATGCAGAAACGTATACAGAGCCGTGATATATCAGGAAACATCAAGTCTCAAT
79 I T D P S R G I T R K F L S S A S I S L
481 AATCACTGATCCATCGAGGAATAACGAGAAAGTCTTGAGTTCAGCCAGCATTTCAC
99 S S E G T E I P Q I L D Q I R M E G D N
541 GAGTTCGGAAGGTACCGAGATTCCACAGATCTCGATCAAAATACGGATGGAAGGTGAAA
199 A P L P Q L R I S S G D F N V D S Q P A
601 TGCTCCGTTGCCGAACTAAGGATATCCTCAGGAGACTTCAACGTTGATTCTCAGCCGTC
139 H Q M P V M S P D S G H L G A A D N P S
661 TCATCAAAATGCCTGTTATGTCACCTGATTCTGGGCACTTAGGAGCTGCAGATAATCCATC
159 S M N P V M E P S P T I H R P E T N D V
721 TCTATGAAATCCTGTCATGGAACCATCGCAACAATTCATCGTCCAGAAACGAAATGATG
179 A P S R N D D S S A S R I N A A A D P N
781 GGCACCTTAGAAACGATGATCTCTGCTCTAGAAATTAATGCTGCAGCTGATCCAAA
199 N G L P S A C K M K L M V S Y L S S K H
841 CAATGTTTACCATCTGCTGTTAAAATGAAGCTGATGGTGAGTTACCTTTCATCAAAACA
219 T I E E K E Y D V S L P G G I L L F H E K
901 TACCATCGAGAAGGATGACGCTCTCTCCGGTGGGATTCTTCTTTCATGAGAA
239 V P R D I P Q G Y H F I R F P P L P Q A
961 AGTTCGAAGGACATCCACAGGGCTATCATTTCATCCGTTTCCACCCTACTCAGC
259 E K A N D D L S L N P K E K K N I R N I
1 021 AGAAAAAGCAATGATGACCTATCACTGAATCCTAAAGAGAAGAAAAATATAGAAACAT
279 L E N M Q G G L Q I R C H Q G C I Y A T
1 081 TCTTGAAAAATGCAAGGGGATTGCAGATAAGATGCACCAGGGTTGCATCTATGCCAC
299 R R S K A K I F Y T S V E T G V D T S L
1 141 ACGGAGATCAAAAGGCCAAAATTTCTACACCAGTGTGAAACAGGTGGACACATCATT
319 E L P R C Q E T M I F N G V S Y S K T L
1 201 GGAACCCCGAGGTGTCAGGAAACGATGATTTCACCGTGTTCGTATTCAAAAACACT
339 M H G Y L H V I E S S P A L A A N E S N
1 261 AATGCATGGCTATTTACATGTAATCGAATCAAGTCCCGCCTTCGAGCAATGAGTCGAA
359 R Q F A H H M N P T I Y F T F A Q K W C
1 321 TCGTCAATTTGCACACCACATGAAATCCAAAGATATACTTTACCTTTGCTCAAAAGTGGTG
379 P G T V P L N K T L V W A K L T P S L A
1 381 TCCAGGACAGTACCATAAATAGACCTGGTATGGGCAAACTGACCCCAAGTTGGC
399 R E L W D G L C H P S A N N L A S V N S
1 441 CCGTGAAGTGGGATGGACTTGGCATCCTTCAGCCAACAATCTTGCATCTGTTAATAG
419 Y S G L I Q I S A V D S D E L N K V E I
1 501 TTATAGTGGCCTACATAAAATTTCTGCAGTAGATTCTGATGAATGAAACAAAGTAGAAAT
439 M E Q *
1 561 AATGGAAACAATAGATATAGATGTTTTCATTTTCATAGTACAGCATGATCGGTGGTGTGAT
1 621 CAACAGCATAACAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAAATTCCTTACCCCCCTTCCCTGTCCC
1 681 ACTGTAACACCCATATCCAGAAATAAGGAAATCTTCACTAAGTCAGAAATAAAGGTGTC
1 741 TGTTCCTGTAATAGATGACATAGTAACTGTATGTACATGAAGACTTCCCAATCACC
1 801 TCTCCTCTCCCTCGCTCCATCTAAATTAATCAATGCTTGAGGTTGCTCCATGAGTT
1 861 TCATCCTTTCATGTTGTTAATGTGAATATTAAATGCAAAATATTGCTTCTGCTTCAA
1 921 CTCTGCACATGCAATGATAGAAGATGTACAGTTATATCTACGCTCGAGTACTATTTTG
1 981 CTCAACATCTTTGATCTTTCATTTGAAAAAAGAAAAA

```

图1 *AjIRF3* 基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

黑色加粗字体分别为起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG; 多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 RNA 不稳定序列 ATTTA 用加粗斜体表示; IAD 结构域用灰色阴影表示。

Fig. 1 The full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of *AjIRF3*

The start codon ATG and stop codon TAG were blacked; the polyadenylation signal (AATAAA) and RNA instability sequence (ATTTA) were indicated by bold italics; IAD domain was shown in gray shadow.

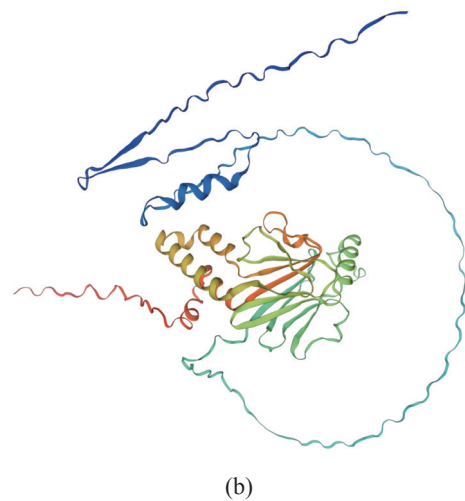
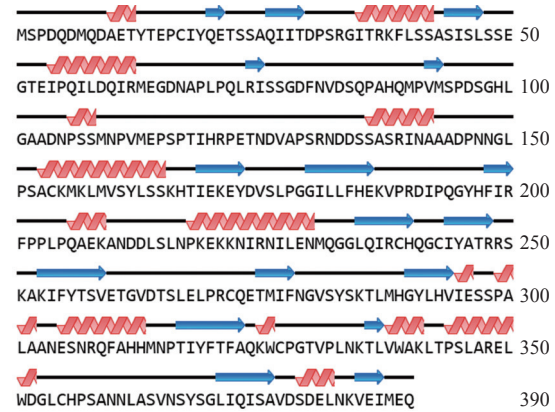


图2 *AjIRF3* 蛋白结构预测

(a) *AjIRF3* 蛋白二级结构预测; (b) *AjIRF3* 蛋白三级结构预测。

Fig. 2 Structural prediction of *AjIRF3* protein

(a) secondary structure prediction of *AjIRF3* protein; (b) tertiary structure prediction of *AjIRF3* protein.

2.3 *AjIRF3* 基因组织表达分析

为研究 *AjIRF3* 基因在仿刺参不同组织中的分布情况, 实验利用 qPCR 技术检测了 *AjIRF3* mRNA 在体腔细胞、肌肉、触手、呼吸树和肠中的表达水平(图5)。结果显示, *AjIRF3* 基因在所有检测的仿刺参组织中均能表达, 其中, 在肌肉中的表达量最高, 为体腔细胞的 7.38 倍 ($P<0.01$), 其次是肠、呼吸树和触手, 分别为体腔细胞的 2.57 倍 ($P<0.01$)、1.98 倍 ($P<0.01$) 和 1.77 倍 ($P<0.05$)。

2.4 *AjIRF3* 基因在灿烂弧菌胁迫下的 mRNA 表达水平

研究表明, 血细胞是海洋无脊椎动物应对

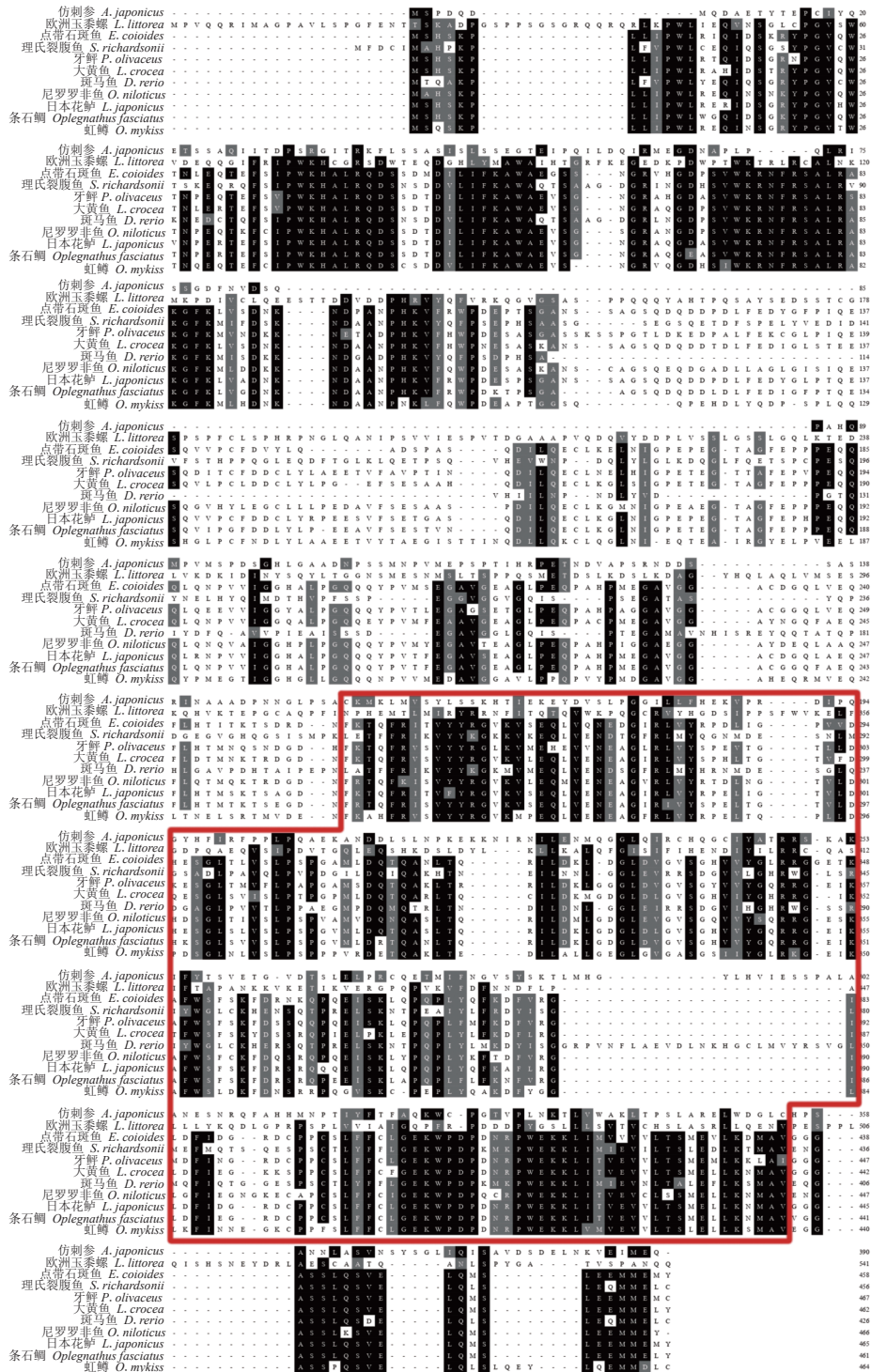


图3 仿刺参 IRF3 蛋白与其他物种 IRF3 蛋白的氨基酸多序列比对

黑色为高相似区域, 灰色为较高相似区域, 红色框部分为 IAD 结构域。

Fig. 3 Multiple sequence alignment of IRF3 protein in *A. japonicus* and other species

Black was high similarity area, gray was higher similarity area, the red box showed the IAD domain.

病原感染的最主要免疫器官。棘皮动物中, 体腔细胞在识别、凝集和清除病原等过程中起着关键作用^[20]。因此, 实验进一步研究了灿烂弧

菌胁迫下, *AjIRF3* 在体腔细胞中的表达变化情况。在灿烂弧菌胁迫期间, 实验组仿刺参均未吐脏, 但与对照组相比, 出现明显的摇头、身

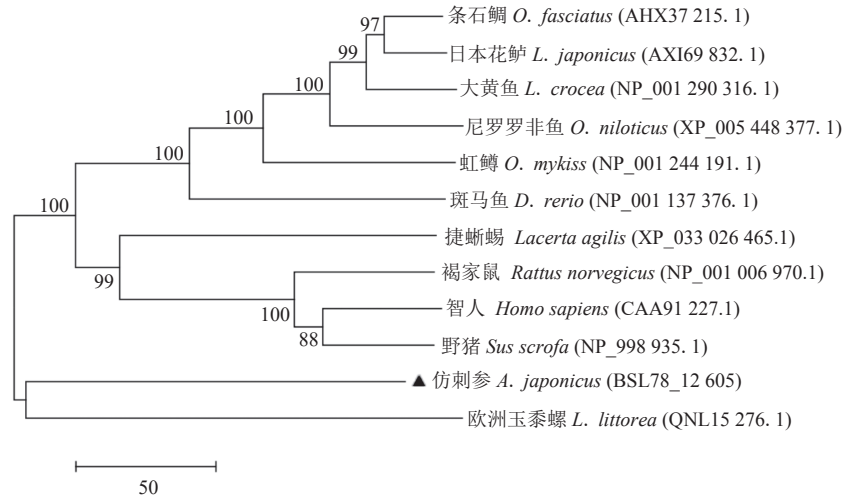
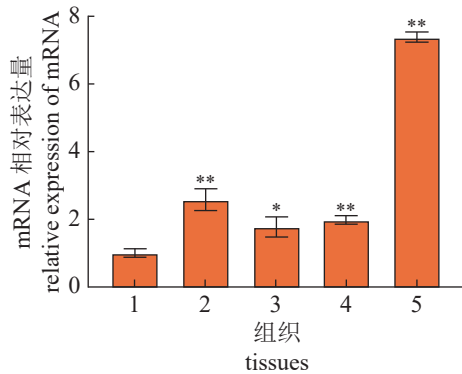


图4 NJ法构建的IRF3系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of the known IRF3 proteins from various organisms

图5 *AjIRF3* 在仿刺参不同组织中的表达水平

1. 体腔液; 2. 肠; 3. 触手; 4. 呼吸树; 5. 肌肉; “*” 差异显著 ($P<0.05$), “**” 差异极显著 ($P<0.01$); 下同。

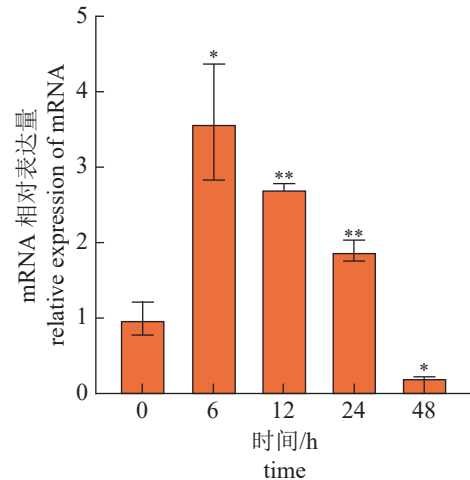
Fig. 5 mRNA expression level of *AjIRF3* in different tissues of *A. japonicus*

1. coelomocyte; 2. intestines; 3. tentacle; 4. respiratory tree; 5. muscle; “*” significant differences ($P<0.05$), “**” extremely significant differences ($P<0.01$); the same below.

体萎缩等现象。当灿烂弧菌感染 6 h 时, *AjIRF3* mRNA 水平达到最高值, 为对照组 (0 h) 的 3.64 倍 ($P<0.05$) (图 6); 随后, *AjIRF3* mRNA 水平一直维持在较高水平, 胁迫至 12 h 时为对照组的 2.72 倍 ($P<0.01$); 胁迫 24 h 后, 仍比对照组显著上调 1.89 倍 ($P<0.01$); 直到胁迫至 48 h 时, *AjIRF3* mRNA 的表达量显著降低, 与对照组 (0 h) 相比下降了 80.60%。

2.5 *AjIRF3* 基因在 LPS 和 poly(I:C) 胁迫下的 mRNA 表达水平

LPS 胁迫后, *AjIRF3* mRNA 表达水平不断上调并在 48 h 达到最高值, 为对照组 (0 h) 的

图6 灿烂弧菌胁迫后 *AjIRF3* 的 mRNA 表达水平

0 h 为对照组; 下同。

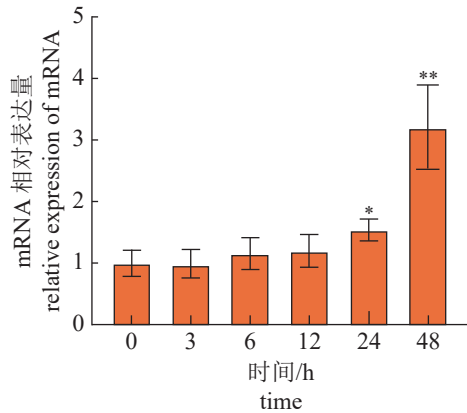
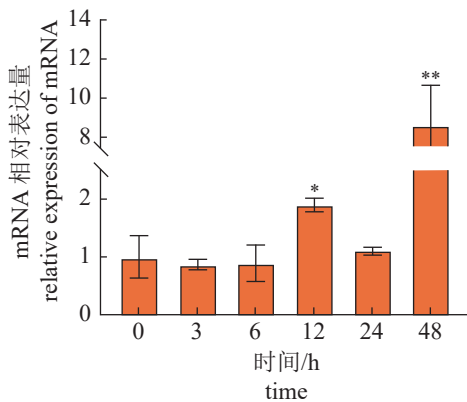
Fig. 6 mRNA expression level of *AjIRF3* after *V. splendidus* infection

The 0 h served as control group; the same below.

3.20 倍 ($P<0.01$) (图 7); poly(I:C) 胁迫后, *AjIRF3* mRNA 表达水平也在 48 h 达到最高值, 为对照组 (0 h) 的 8.57 倍 ($P<0.01$) (图 8)。

2.6 *AjIRF3* 重组蛋白的表达验证

首先, 将重组质粒 pGEX-4T-2-*AjIRF3* 转化至 BL21 (DE3) 感受态中, 并进行诱导纯化, 获得重组的 *AjIRF3* 蛋白, 结果显示, 阳性菌株在诱导前后有 1 条约 70 ku 的目的蛋白条带明显变粗 (图 9, 泳道 4), 且该蛋白主要以包涵体的形式存在 (图 9, 泳道 3)。随后, 通过 GST 介质过柱, 获得了单一的条带 (图 9, 泳道 5), 表明纯

图7 LPS 胁迫后 *AjIRF3* 的 mRNA 表达水平Fig. 7 mRNA expression level of *AjIRF3* after LPS infection图8 poly(I:C) 胁迫后 *AjIRF3* 的 mRNA 表达水平Fig. 8 mRNA expression level of *AjIRF3* after poly(I:C) infection

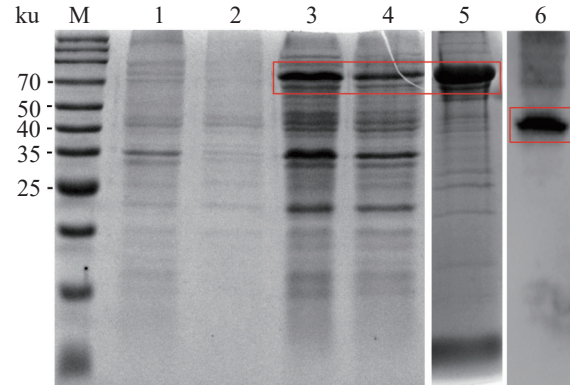
化后的蛋白即是目的蛋白, 且该蛋白分子质量大小与网站预测大小相符。最后 Western blotting 结果表明所制备的 *AjIRF3* 抗体特异性高(图9, 泳道6)。

2.7 灿烂弧菌胁迫下 *AjIRF3* 的蛋白表达水平

灿烂弧菌胁迫后, 仿刺参体腔细胞中 *AjIRF3* 蛋白表达结果显示, 灿烂弧菌感染 6 h 后, *AjIRF3* 蛋白表达水平达到最高值, 为对照组的 4.13 倍 ($P < 0.01$), 在感染 12 和 24 h 后分别为对照组的 2.83 倍 ($P < 0.01$) 和 1.87 倍 ($P < 0.01$) (图10), 蛋白表达水平与上述 *AjIRF3* mRNA 表达水平基本一致。

2.8 *AjIRF3* 蛋白的亚细胞定位

对仿刺参体腔细胞中的 *AjIRF3* 蛋白进行定位, 结果显示, *AjIRF3* 蛋白在细胞质和细胞核

图9 重组 *AjIRF3* 蛋白的诱导表达、纯化及抗体验证

M. 蛋白标准分子质量, 1. IPTG 诱导前全菌液蛋白, 2. IPTG 诱导后可溶性蛋白, 3. IPTG 诱导后包涵体蛋白, 4. IPTG 诱导后全菌液蛋白, 5. 纯化后 *AjIRF3* 蛋白, 6. Western blotting 检测 *AjIRF3* 抗体特异性; 红色框区域指示目标蛋白。

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of *AjIRF3* recombinant protein and antibody validation

M. protein marker, 1. before IPTG induction, 2. after IPTG induction with soluble proteins, 3. after IPTG induction with inclusion body proteins, 4. after IPTG induction, 5. purified *AjIRF3* protein, 6. the specificity of *AjIRF3* polyclonal antibody was detected by Western blotting; the red box indicated *AjIRF3* protein.

中均有分布, 但主要分布于细胞质中; 当灿烂弧菌胁迫 24 h 后, 大量 *AjIRF3* 蛋白从细胞质易位到细胞核中(图版)。

2.9 *AjIRF3* 基因干扰效率

为研究 *AjIRF3* 基因功能, 首先对 *AjIRF3* 的干扰效率进行检测(图11)。结果显示, 当干扰 24 h 后, *AjIRF3* 的 mRNA 水平与 NC 组相比, 显著下调 81.9% ($P < 0.01$) (图11-a); 干扰 48 h 后, *AjIRF3* 在蛋白水平的表达量与 NC 组相比, 显著下调 72.7% ($P < 0.01$) (图11-b, c), 表明 *AjIRF3* 基因干扰成功。

2.10 细胞凋亡率及胞内菌落检测

当 *AjIRF3* 干扰 24 h 后, 仿刺参体腔细胞凋亡率与 NC 组相比显著下调 16% ($P < 0.01$) (图12-a, b)。灿烂弧菌胁迫后发现, 干扰 *AjIRF3* 后体腔细胞中的胞内菌数量与 NC 组相比显著上调 19.83 倍 ($P < 0.05$) (图12-c), 表明 *AjIRF3* 干扰后促进灿烂弧菌增殖。

3 讨论

IRF3 是合成 I 型干扰素的关键转录因子, 以激活 I 型干扰素和干扰素刺激基因 (interferon

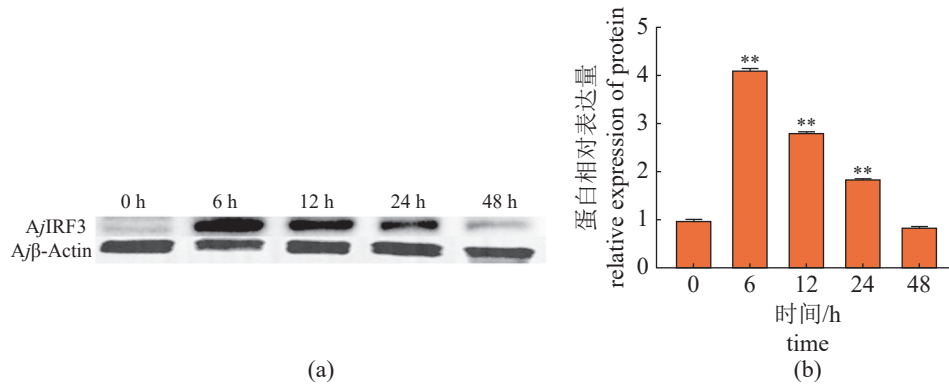
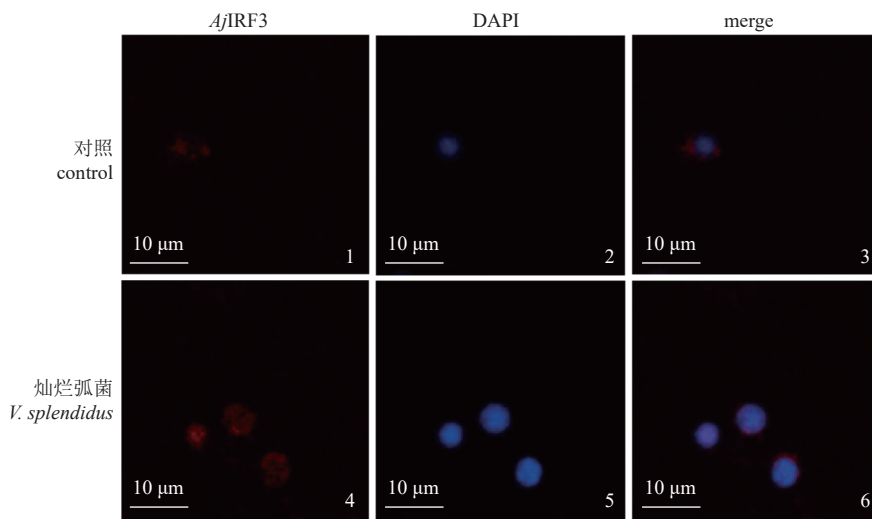


图 10 灿烂弧菌胁迫后体腔细胞中 *AjIRF3* 的蛋白表达水平

(a) Western blotting 检测 *AjIRF3* 表达情况; (b) *AjIRF3* 蛋白表达水平的灰度值。

Fig. 10 Protein expression level of *AjIRF3* after *V. splendidus* infection

(a) the protein expression level of *AjIRF3* was detected by Western blotting; (b) gray value analysis of *AjIRF3* protein.



图版 *AjIRF3* 蛋白的亚细胞定位

红色荧光显示 *AjIRF3*; 蓝色荧光显示细胞核。

Plate Subcellular localization of *AjIRF3* in *A. japonicus* coelomocyte

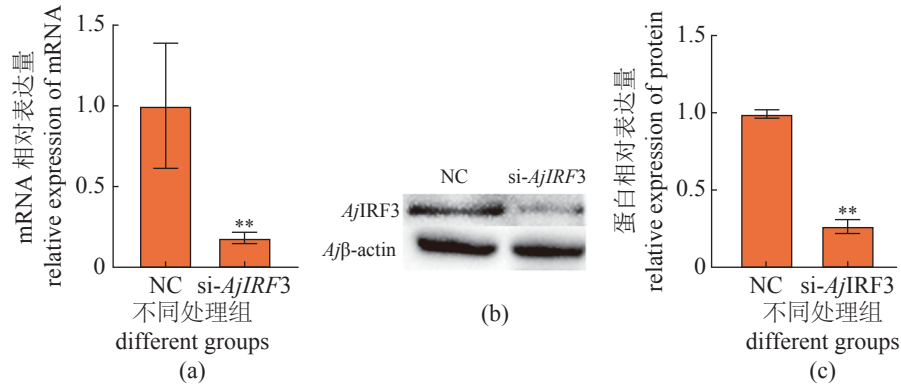
Red fluorescence indicated *AjIRF3*, blue fluorescence indicated the nucleus.

stimulated genes, ISGs) 而闻名, 在抵御病原感染中具有重要作用^[21]。与脊椎动物相比, 目前无脊椎动物 *IRF3* 基因的功能研究鲜有报道。因此, 本研究以无脊椎动物仿刺参为对象, 鉴定并分析了仿刺参 *IRF3* 基因在先天免疫防御中的功能。

首先, 通过 RACE 技术扩增仿刺参 *IRF3* 基因全长, 并利用生物信息学技术对 *AjIRF3* 基因和其推导的蛋白进行结构分析和功能预测, 结果显示, 其开放阅读框全长为 1 326 bp, 编码 441 个氨基酸残基。脊椎动物 *IRF3* 同其他 *IRFs* 一样具有高度保守的 5 个色氨酸残基的 N 末端 DBD 结构域和一个 C 末端 IAD 结构域^[22],

其中, DBD 结构域具有螺旋-转角-螺旋结构, 能识别干扰素反应元件和干扰素调控因子^[23]。*IRF* 家族除了 *IRF1* 和 *IRF2* 之外, 均具有 IAD 结构域, 参与 *IRF* 同源/异源二聚体的生成, 并与其他转录因子相互作用^[24]。SMART 结果显示, *AjIRF3* 蛋白具有一个 IAD 结构域, 但与无脊椎动物欧洲玉黍螺 *IRF3* 一样, 缺少 5 个保守的色氨酸残基^[17]。系统进化树分析结果显示, *AjIRF3* 首先与欧洲玉黍螺 *IRF3* 聚合, 表明与无脊椎动物具有更近的进化关系。

组织分布结果显示, *AjIRF3* 在所有检测的组织中均能表达, 表明仿刺参 *IRF3* 具有广泛的生理作用。其中, 体腔细胞在先天免疫防御中

图 11 *AjIRF3* 干扰效率检测

(a) qPCR 检测受干扰后 *AjIRF3* mRNA 表达水平; (b) Western blot 检测 *AjIRF3* 蛋白表达水平; (c) *AjIRF3* 蛋白表达水平的灰度值分析。

Fig. 11 Detection of *AjIRF3* interference efficiency

(a) the mRNA expression level of *AjIRF3* after interference; (b) the protein expression level of *AjIRF3*; (c) gray value analysis of *AjIRF3* protein.

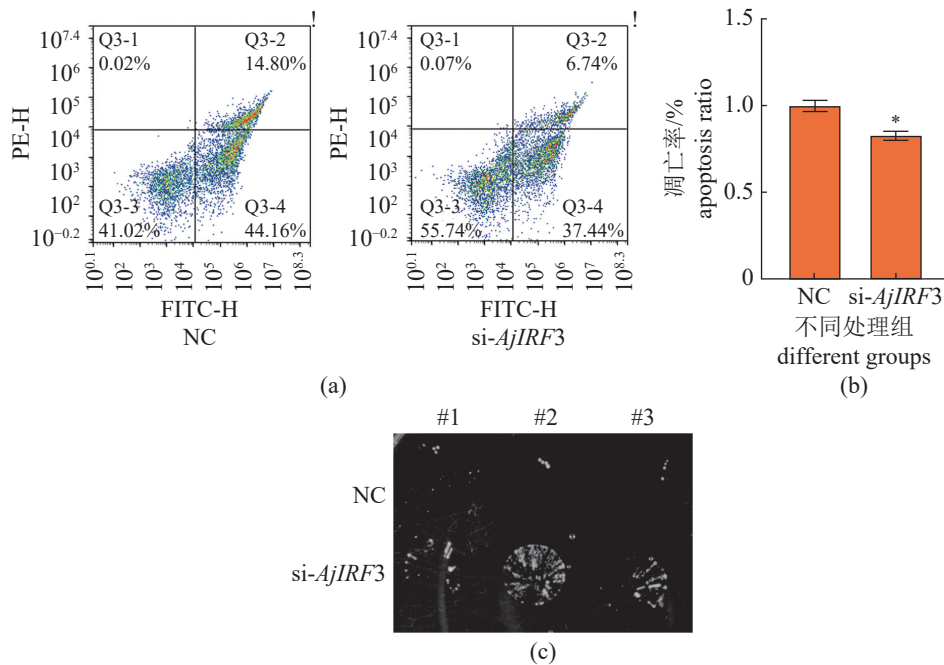


图 12 细胞凋亡率及胞内菌检测

(a) 流式细胞仪分析 *AjIRF3* 干扰后仿刺参体腔细胞凋亡的变化; (b) 体腔细胞凋亡率统计分析; (c) *AjIRF3* 干扰后仿刺参体腔细胞中的胞内菌情况, #1、#2 和 #3 表示 3 次实验重复。

Fig. 12 Cell apoptosis rate and colony count

(a) flow cytometry was used to analyze the changes of coelomocyte apoptosis after *AjIRF3* interference; (b) statistical analysis of apoptosis rate of coelomocyte; (c) the intracellular bacteria in the coelomocyte after *AjIRF3* interference, #1, #2, and #3 represented three experimental replicates.

起着核心作用, 因此, 实验进一步分析了病原感染后仿刺参 *IRF3* 基因在体腔细胞中的表达变化情况。研究发现, 灿烂弧菌、LPS 和 poly(I:C) 胁迫后, *AjIRF3* 在仿刺参体腔细胞中的表达水平均显著上调。而日本花鲈^[25]、虹鳟^[26]、大黄鱼^[27] 在病原感染后 *IRF3* 的表达趋势也均显著上调, 并在 48 h 时达到最高峰, 表明 *AjIRF3* 可

以快速响应病原感染。LPS 作为细菌细胞壁的组成部分, 通过模式识别受体如 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 4 被宿主细胞识别, 从而激活信号传导途径, 进一步导致转录因子如 *IRF3* 的激活^[28]。poly(I:C) 作为模拟病毒感染的双链 RNA 模拟物, 其胁迫后的 *AjIRF3* 响应可能通过识别病毒 RNA 并激活相关的信号通路来

实现^[28-29]。因此, *AjIRF3* 作为一个多功能的转录因子, 能够响应不同病原感染, 并在抵御病原感染过程中发挥重要作用。

为深入研究 *AjIRF3* 的基因功能, 实验成功构建了 pGEX-4T-2-*AjIRF3* 的重组表达载体, 诱导、纯化后获得了 *AjIRF3* 的重组蛋白, 并获得了高度特异的多克隆抗体。亚细胞定位研究发现, *AjIRF3* 主要定位于细胞质, 而灿烂弧菌感染后 *AjIRF3* 荧光信号主要定位于细胞核内。哺乳动物中的研究表明, 病毒诱导的 *IRF3* 核转位是调节干扰素和 *ISGs* 表达所必需的^[30-31], 但 *AjIRF3* 缺少 DBD 结构域, 可能无法直接与细胞核内的 DNA 序列相结合, 其可能通过 IAD 结构域与其他 *IRFs* 或转录因子相结合继而发挥作用。此外, 许多研究表明 *IRF3* 可以通过多种途径调控细胞凋亡, 并在清除病原中发挥重要作用^[32-33]。本研究发现, 干扰 *AjIRF3* 后, 仿刺参的体腔细胞凋亡率显著降低, 且受灿烂弧菌胁迫后, 胞内菌数量与 NC 组相比明显增多。综上, 仿刺参 *IRF3* 基因在先天免疫防御中具有重要作用, 其可能通过调控细胞凋亡途径进而抵御病原的感染, 研究结果为防治仿刺参腐皮综合征提供理论基础。

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023. Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fisheries statistical yearbook 2023[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2023 (in Chinese).
- [2] Deng H, He C B, Zhou Z C, *et al.* Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 18-27.
- [3] Liu H Z, Zheng F R, Sun X Q, *et al.* Construction of cDNA library from intestine, mesentery and coelomocyte of *Apostichopus japonicus* Selenka infected with *Vibrio* sp. and a preliminary analysis of immunity-related genes[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2012, 11(2): 187-196.
- [4] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, *et al.* The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis[J]. *Annual Review of Immunology*, 2008, 26: 535-584.
- [5] Kaur A, Fang C M. An overview of the human immune system and the role of interferon regulatory factors (IRFs)[J]. *Progress in Microbes and Molecular Biology*, 2020, 3(1): a0000129.
- [6] Li N, Zhou H, Wu H M, *et al.* STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3[J]. *Redox Biology*, 2019, 24: 101215.
- [7] Savitsky D, Tamura T, Yanai H, *et al.* Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2010, 59(4): 489-510.
- [8] AL Hamrashdi M, Brady G. Regulation of IRF3 activation in human antiviral signaling pathways[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2022, 200: 115026.
- [9] Chattopadhyay S, Fensterl V, Zhang Y, *et al.* Role of interferon regulatory factor 3-mediated apoptosis in the establishment and maintenance of persistent infection by Sendai virus[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(1): 16-24.
- [10] Peters K, Chattopadhyay S, Sen G C. IRF-3 activation by Sendai virus infection is required for cellular apoptosis and avoidance of persistence[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(7): 3500-3508.
- [11] Carrigan S O, Junkins R, Yang Y J, *et al.* IFN regulatory factor 3 contributes to the host response during *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(6): 3602-3609.
- [12] Liang Y, Liang Y, Wang Q, *et al.* Viperin inhibits interferon- γ production to promote *Mycobacterium tuberculosis* survival by disrupting TBK1-IKK ϵ -IRF3-axis and JAK-STAT signaling[J]. *Inflammation Research*, 2024, 73(6): 897-913.
- [13] Moore T C, Cody L, Kumm P M, *et al.* IRF3 helps control acute TMEV infection through IL-6 expression but contributes to acute hippocampus damage following TMEV infection[J]. *Virus Research*, 2013, 178(2): 226-233.
- [14] Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(9): 644-658.
- [15] Sun Y, Cao Z J, Zhang P P, *et al.* IFN regulatory factor 3 of golden pompano and its NLS domain are involved in antibacterial innate immunity and regulate the expression of type I interferon (IFN α 3)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1128196.
- [16] Zhang Z X, Wei J K, Ren R M, *et al.* Anti-virus effects of interferon regulatory factors (IRFs) identified in ascidian *Ciona savignyi*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 273-282.
- [17] Gorbushin A M. Toll-like signaling pathway in the transcriptome of *Littorina littorea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*,

- 2020, 106: 640-644.
- [18] Shao Y N, Li C H, Ou C R, *et al.* Divergent metabolic responses of *Apostichopus japonicus* suffered from skin ulceration syndrome and pathogen challenge[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(45): 10766-10771.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components[J]. *Immunity*, 1999, 11(4): 443-451.
- [21] Chakravarty S, Varghese M, Fan S, Taylor R T, Chakravarti R, Chattopadhyay S. IRF3 inhibits inflammatory signaling pathways in macrophages to prevent viral pathogenesis[J]. *Science Advances*, 2024, 10: 1-13.
- [22] Li J Y, Xiao J, Gao M, *et al.* IRF/Type I IFN signaling serves as a valuable therapeutic target in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 92: 107350.
- [23] Lin R T, Génin P, Mamane Y, *et al.* Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(17): 6342-6353.
- [24] Eroshkin A, Mushegian A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 1999, 77(5): 403-405.
- [25] Zhang W W, Li Z L, Jia P, *et al.* Interferon regulatory factor 3 from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) exerts antiviral function against nervous necrosis virus infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 88: 200-205.
- [26] 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.
- [27] Yao C L, Huang X N, Fan Z J, *et al.* Cloning and expression analysis of interferon regulatory factor (IRF) 3 and 7 in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 869-878.
- [28] Lin R T, Heylbroeck C, Pitha P M, *et al.* Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(5): 2986-2996.
- [29] Liu H Y, Ye G Q, Liu X H, *et al.* Vimentin inhibits type I interferon production by disrupting the TBK1-IKKε-IRF3 axis[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(2): 111469.
- [30] Reimer T, Brcic M, Schweizer M, *et al.* Poly(I: C) and LPS induce distinct IRF3 and NF-κB signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, 83(5): 1249-1257.
- [31] Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(11): a028423.
- [32] Sun L, Li Y, Misumi I, *et al.* IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A[J]. *PLOS Pathogens*, 2021, 17(9): e1009960.
- [33] Chauhan M, Osbron C A, Koehler H S, Goodman A G. STING dependent BAX-IRF3 signaling results in apoptosis during late-stage *Coxiella burnetii* infection[J]. *Cell Death and Disease*, 2024, 15: 195.

Cloning and functional study of interferon regulatory factor 3 of *Apostichopus japonicus*

JIANG Jianyang, LI Hongyang, WANG Chengyang, LI Chenghua, SHAO Yina*

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Interferon regulatory factor 3 (*IRF3*) is an important member of the interferon regulatory factor family and plays an important role in defending against pathogen infection. To investigate the function of the *IRF3* gene in *Apostichopus japonicus*, we obtained the full-length cDNA sequence of the *IRF3* gene in *A. japonicus* by cloning and sequence splicing using RACE technology, and named it *AjIRF3*. The full-length sequence of *AjIRF3* gene is 2 023 bp and encodes 441 amino acids. Sequence analysis revealed that the C terminus of *AjIRF3* contains an IAD domain. Phylogenetic tree analysis indicated that *AjIRF3* is a new member of the *IRF3* family and is more closely related to the invertebrate mollusc *Littorina littorea*. Tissue distribution analysis showed that *AjIRF3* is expressed in all tissues, with the highest expression in muscle, followed by intestine, and the lowest expression in coelomocyte. Furthermore, the expression of *AjIRF3* in coelomocyte was significantly up-regulated under *Vibrio splendidus* infection and reached its highest level at 6 h, which was 3.64-fold higher ($P<0.05$) than that of the control. Moreover, *AjIRF3* mRNA expression levels peaked at 48 h after lipopolysaccharide (LPS) and poly(I:C) infection, increasing by 3.20-fold ($P<0.01$) and 8.57-fold ($P<0.01$), respectively, compared with the control. Subcellular localization studies showed that *AjIRF3* is distributed in the cytoplasm, but it is mainly translocated from the cytoplasm to nucleus after *V. splendidus* infection. Additionally, we found that the apoptosis rate of coelomocyte was significantly decreased by 16% ($P<0.01$) following *AjIRF3* interference. More importantly, our result showed that the number of intracellular bacteria in the si-*AjIRF3* group was significantly increased by 19.83-fold ($P<0.05$) compared with NC group after *V. splendidus* infection. Collectively, these findings suggest that *AjIRF3* plays important roles in innate immunity and regulates apoptosis to resist pathogen infection.

Key words: *Apostichopus japonicus*; interferon regulatory factor 3; expression analysis; apoptosis

Corresponding author: SHAO Yina. E-mail: shaoyina@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (42176102)