



斑石鲷 *irf3* 基因鉴定及其在虹彩病毒感染下的表达模式

李开敏^{1,2}, 王磊^{1,3*}, 巩志宏¹, 王清滨⁴, 李华²,
杨桂文², 黄友华⁵, 陈松林^{1,3}

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 山东师范大学, 山东 济南 250014;
3. 崂山实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237;
4. 莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 261418;
5. 华南农业大学海洋学院, 海洋生物资源保护与利用粤港澳高校联合实验室, 广东省水产免疫与健康养殖工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 干扰素调节因子 (*irf3*) 是干扰素调节因子 (IRF) 家族的一员, 是 I 型干扰素依赖性免疫反应的主要转录调节因子, 在针对 DNA 和 RNA 病毒的先天免疫反应中发挥重要作用。本研究中, 斑石鲷 *irf3* 基因 (*Oplegnathus punctatus* interferon regulatory factors 3, *Opirf3*) 来自实验室斑石鲷基因组数据库, 经分析鉴定 *Opirf3* 的 CDS 序列全长 1 362 bp, 可编码 453 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 50.0 ku, 理论等电点为 4.97, 有一个 IRF 结构域和一个 IRF-3 结构域。荧光定量分析结果显示, *Opirf3* 在斑石鲷肝脏、鳃、心脏、皮肤、脾脏、肠、脑、肾脏、胃和头肾组织均有表达; 虹彩病毒感染 7 d 时, 免疫组织肝脏、脾脏和肾脏中 *Opirf3* 的表达水平显著上调。斑石鲷肾细胞系体外刺激实验显示, 不同浓度 poly I:C 刺激后, *Opirf3* 的表达量较对照组均显著升高, poly I:C 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 肾脏细胞中 *Opirf3* 的相对表达水平升高, 为对照组的 86.8 倍。siRNA 干扰后, 斑石鲷肾细胞系中 *Opirf3* 表达水平显著下调 30%, 下游基因 *IFN- α* 、*CD40*、*CD80* 和 *IL-1 β* 显著下调, *IL-6* 显著上调。以上结果可能表明 *Opirf3* 基因参与了 I 型 IFN 在斑石鲷抗虹彩病毒过程中的先天免疫反应。本研究可为斑石鲷抗病分子育种提供理论依据。

关键词: 斑石鲷; *irf3*; 基因表达; siRNA

中图分类号: Q 786; S 941.41

文献标志码: A

干扰素调节因子 (IRFs) 是一类细胞内转录因子, 参与调节多种生物学过程, 最开始被认为是调节干扰素 (interferon, IFN) 表达的转录因子^[1]; 后来研究发现 IRFs 还参与 Toll 样受体和其他模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 引

发的基因表达调控, 从而证实了它们在宿主抵抗病原体中的核心作用^[2-4]。此外 IRFs 在造血细胞发育分化方面也发挥重要作用^[5]。目前在脊椎动物中发现了 11 个 IRF 家族成员, 哺乳动物中发现 9 个成员 (*irf1~irf9*)^[6-7], 鸟类中鉴定出 *irf1~irf10*^[8],

收稿日期: 2023-02-15 修回日期: 2023-06-09

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFF1000303); 山东省重点研发计划 (2021LZGC028, 2023ZLYS02); 山东省良种工程项目 (2022LZGC016); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2023TD20); 山东省泰山学者攀登计划

第一作者: 李开敏 (照片), 从事水产生物抗病基因功能研究, E-mail: 2020020879@stu.sdnu.edu.cn

通信作者: 王磊, 从事水产生物育种和抗病遗传机制研究, E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn



在硬骨鱼斑马鱼 (*Danio rerio*) 中首次鉴定出 *irf11*, 说明鱼类具有完整的干扰素调节机制^[9-12]。与哺乳动物相似, 鱼类先天免疫系统也有防御系统和调节机制^[13], 鱼类利用 IFN 诱导系统对抗病毒感染^[14-15]。研究表明, 病毒感染诱导的鱼类 IFNs 可增强抗病毒活性, 并加速 IFN 刺激基因 (interferon-stimulated gene, ISG) 的表达以抑制病毒复制^[16]。在鱼类中 IRFs 家族在 DNA 和 RNA 病毒感染过程中发挥重要作用^[17-22]。干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factors 3, *irf3*) 是 IRF 家族成员, 在诱导病毒感染细胞中 I 型 IFN (IFN- α 和 IFN- β) 的表达上发挥重要作用, 在结构上与 *irf7* 同源^[7-8], *irf3* 在大多数组织和细胞中均呈组成型表达^[23-24], 主要存在于细胞质中^[25]。病毒感染后, PRRs 启动信号转导并激活丝氨酸/苏氨酸激酶 (TANK-binding kinase 1, TBK1), 使 *irf3* 的 C 端富含丝氨酸区域特定几个丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化, 诱导 IRF3 和 NF- κ B 蛋白复合物从细胞质到细胞核的易位。易位到细胞核后, IRF3 和 NF- κ B 启动转录, 导致经典的 JAK-STAT 通路和干扰素刺激基因因子 3 (ISGF3) 的激活^[26-27]。研究报道, 小鼠 (*Mus musculus*) 缺乏 *irf3* 导致体内产生的 IFN 急剧减少, 因而更容易受到病毒感染^[28]。目前, 在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[18]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[19]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[29]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[30]、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)^[31]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[12]、鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[32] 等鱼类中开展了 *irf3* 基因的克隆鉴定和初步表达分析。

斑石鲷 (*Oplegnathus punctatus*) 又名斑鲷、黑金鼓, 属于鲈形目 (Perciformes) 石鲷科 (Oplegnathidae) 石鲷属 (*Oplegnathus*), 主要分布在西太平洋温带水域, 具有显著的经济和生态价值^[33]。斑石鲷在我国东南沿海均有分布, 是我国名贵的海水养殖品种之一。随着国内斑石鲷养殖业集约化水平不断提高, 从苗种到养成阶段各种病害频发, 严重制约了斑石鲷的健康养殖, 其中虹彩病毒病成为制约斑石鲷健康养殖的主要问题^[34]。目前关于 *irf3* 基因在斑石鲷抗虹彩病毒感染中的功能研究尚未见报道。

本研究以斑石鲷为对象, 初步分析其 *irf3* 基因的序列特征和进化地位, 通过实时荧光定量 PCR 检测了 *Opirf3* 在斑石鲷各健康组织以及虹彩病毒感染后免疫组织中的表达水平; 构建斑石鲷

肾细胞系 poly I:C 体外刺激模型, 在细胞水平上检测 *Opirf3* 的抗病毒免疫应答模式; 在斑石鲷肾细胞系上对 *Opirf3* 进行 siRNA 干扰后, 检测 *Opirf3* 下游免疫相关基因的表达水平, 以期实现对 *Opirf3* 在斑石鲷抗虹彩病毒感染过程中免疫作用初探, 旨在为斑石鲷抗病分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验样品

正常组织样品 本实验所用的斑石鲷购自山东莱州明波水产有限公司, 健康无病, 体重为 (150 \pm 15) g, 实验前在水箱暂养 1 周。随机选取 4 尾斑石鲷, 麻醉后解剖取肝脏、脾脏、肾脏、头肾、肠道、鳃、皮肤、心脏、胃和脑组织, 将组织立即放入盛有 RNA 保存液的冻存管中, 随后转移至 -80 °C 冰箱保存。

虹彩病毒感染样品 上述健康斑石鲷每尾腹腔注射 100 μ L (10^9 个拷贝数) 虹彩病毒进行感染实验, 对照组腹腔注射 100 μ L 磷酸缓冲溶液 (PBS), 在感染后 0、1、4、7 和 10 d 这 5 个时间点取样, 每个时间点感染组和对照组各随机选取 5 尾斑石鲷, 麻醉后解剖取其肝脏、脾脏和肾脏组织, 立即放入盛有 RNA 保存液的冻存管, 存于 -80 °C 冰箱保存。本感染实验所用的虹彩病毒由华南农业大学惠赠^[35]。

斑石鲷细胞系 用于免疫刺激实验和 siRNA 干扰的斑石鲷肾细胞系均来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室。

本研究获得了中国水产科学研究院黄海水产研究所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中国水产科学研究院黄海水产研究所伦理规范, 并按照中国水产科学研究院黄海水产研究所伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 斑石鲷 RNA 提取和 cDNA 合成

样品使用 TRIzol 法提取 RNA, 实验方法严格参照说明书, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察各样品 RNA 条带的完整性, 并用 DNA/Proteins Analyzer P100 测定 RNA 的浓度及纯度, 选择条带完整、质量良好的 RNA, 进行 cDNA 合成。使用

Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 进行 cDNA 合成。反转录产物经 PCR 反应验证质量, PCR 反应体系: cDNA 1 μ L, TaKaRa Ex *Taq* 10 μ L, 正反引物各 1 μ L, ddH₂O 7 μ L; 反应条件 34 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察条带, 选择质量好的 cDNA 用于后续荧光定量实验。

1.3 *Opir3* 序列分析

Opir3 序列来源于本实验室的斑石鲷基因组数据库^[36]。使用 DNAMAN 软件预测 *Opir3* 基因的氨基酸序列; 使用 SWISS-PROT (<https://www.expasy.org/>) 预测 *Opir3* 基因分子质量和理论等电点; 使用 SMART 在线网站 (https://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 预测同源保守功能结构域。在 NCBI 下载不同脊椎动物的 Irf3 氨基酸序列, 并用 BLAST 进行同源比对; 使用 DNAMAN 进行物种间 Irf3 氨基酸序列多重比对; 使用 MAGE7

软件的 ClustalW 进行序列比对, 采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育进化树, 设置 Bootstrap method 重复 1 000 次, 来计算各分支的置信度。

1.4 *Opir3* 的组织表达分析

使用 Primer premier 5.0 软件, 根据 *Opir3* 的 CDS 区设计荧光定量引物 (表 1), 以斑石鲷 β -actin 为内参基因, 反转录得到的健康斑石鲷肝脏、脾脏、肾脏、头肾、肠道、鳃、皮肤、心脏、胃和脑组织的 cDNA 为模板, 使用 AG 荧光定量试剂盒、ABI 7500 Fast Real-time PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 测定 *Opir3* 基因的表达水平。PCR 反应体系: 10 μ L SYBR mix、0.4 μ L ROX、0.8 μ L F (10 μ mol/L)、0.8 μ L R (10 μ mol/L)、7 μ L ddH₂O、1 μ L cDNA 模版。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *Opir3* 基因在各组织中的相对表达量。

表 1 本研究所用的引物及其序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence	扩增效率/% amplification efficiency	用途 application
siRNA-1	GCGGUAUCAGCUAACUCUUTT		siRNA 干扰
siRNA-2	GCAGUAUCCAGUAACGUUUT		siRNA treatment
siRNA-3	CCAAGCCAAUCUGACCCAAT		
<i>Opir3</i> -F	TGACCAAGACCAGTGAGGGA	108	实时荧光定量PCR
<i>Opir3</i> -R	TGTAGACTAAGCGGATTCCA		real-time fluorescent quantitative PCR
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	106	
β -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC		
CD40-F	GAAAGCGATGAGCCAAGC	94	
CD40-R	TTCTGTCGTCCCATTCTCC		
CD80-F	CAATCCTCTGTACAATAGCC	94	
CD80-R	TCTCCGTCCTTGCGTCA		
IL-6-F	AAAAGATGAGGAACCCTGACA	102.50	
IL-6-R	TCTGCGAAAAGGTCGG		
IL-1 β -F	TGGTGCATTCTCTTCTAC	94.90	
IL-1 β -R	TCCACTGGCTTGTTGTTCTC		
IFN- α -F	ACAGTCCCAGTTGGTTTTTCAT	96	
IFN- α -R	CTTGTCGGTATCCCAGGTAA		

1.5 虹彩病毒感染后 *Opir3* 在免疫组织中的表达分析

以斑石鲷 β -actin 为内参基因, 反转录得到的虹彩病毒感染的肝脏、脾脏和肾脏组织的 cDNA 为模板, 使用上述相同的荧光定量方法检测 *Opir3* 在虹彩病毒感染的免疫组织中的相对表达水平。

1.6 斑石鲷肾细胞体外刺激实验

将单层培养、生长状态良好的斑石鲷肾细胞系接种到 12 孔板上, 24 h 后细胞覆盖率达到 90% 左右。将 12 孔板的培养基吸弃去, 1 \times PBS 洗涤 3 次后换上新鲜的 L15 培养基。不同浓度 poly I:C 刺激斑石鲷肾细胞实验: 向 12 孔板的每个孔

中分别加入终浓度为 0、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 poly I:C, 对照组加入等体积的 PBS, 将上述细胞样品放在 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 6 h 后, 分别收集细胞样品, TRIzol 法提取 RNA, 制备定量模板。荧光定量 PCR 检测 poly I:C 刺激后斑石鲷肾细胞系中 *Opirf3* 的相对表达水平。

1.7 siRNA 干扰实验

委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成 *Opirf3* 的 siRNA, 根据 *Opirf3* 的 ORF 区序列筛选到 3 个 siRNA 位点, 分别为 siRNA1、siRNA2 和 siRNA3, siRNA 序列和 *Opirf3* 免疫相关基因引物序列见表 1。将适量生长状态良好的斑石鲷肾细胞系接种到 2 个 12 孔板中, 在 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养至细胞贴壁且覆盖率达到 30%~50% 即可进行 siRNA 转染实验。使用 riboFECTTM CP 转染试剂盒进行 *Opirf3* 的 siRNA 转染, siRNA 转染终浓度为 50 nmol/L, 每孔转染体系: 1 \times CP buffer 60 μL , CP Regent 6 μL , siRNA (siRNA1-3; NC; cy3) 2.5 μL 。3 个 *Opirf3*-siRNA 位点重复 6 个孔, NC 重复 4 个孔, 用于检测荧光转染效率的 cy3 有 2 个孔。转染后 24 h 荧光显微镜下观察, 判断转染效率; 72 h 使用 TRIzol 收集细胞, 使用 TRIzol 法提取 RNA, 制备定量模板, 荧光定量 PCR 检测 3 个位点的敲降效率。以敲降效率最高的位点转染的斑石鲷肾细胞的 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR 检测 *irf3* 免疫相关基因 *IFN- α* 、*CD40*、*CD80*、*IL-6* 和 *IL-1 β* 的表达水平。

1.8 荧光定量 PCR 引物扩增效率检测

荧光定量 PCR 产物送青岛睿博兴科生物技术有限公司进行测序, 测序成功后, 将公司返还的 PCR 纯化产物与 pEASY[®] T1 载体 [天根生化科技(北京)有限公司] 进行连接转化, 严格按照说明书进行操作。挑取白色单克隆接种于含有氨苄 (AMP⁺) 的 LB 液体培养基中, 200 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15 h。用无内毒素质粒小提中量试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 提取质粒, 测定质粒浓度为 100 ng/ μL 。参考北京擎科生物科技股份有限公司《绝对定量标准曲线制作方法》, 将上述提取的质粒梯度稀释 10~10 000 倍, 作为荧光定量 PCR 模板, 上机进行荧光定量检测, 得到对应的 CT 值和拷贝数, 从而制作标准曲线, 标准曲线的斜率即为引物的扩增效率。

1.9 数据分析

实验数据采用 SPSS 软件进行方差分析, 组织表达数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。其余实验数据采用独立样本 *t* 检验进行方差分析, *代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 *Opirf3* 序列分析

Opirf3 cDNA 开放阅读框为 1 362 bp, 编码 453 个氨基酸, 预测蛋白分子质量为 50.0 ku, 理论等电点为 4.97。SMART 软件预测显示 *Opirf3* 有 1 个 IRF 结构域和 1 个 IRF-3 结构域, 分别位于第 1~108 和 250~430 位氨基酸 (图 1)。

2.2 *Opirf3* 多序列比对与系统进化分析

经 BLAST 比对发现, *Opirf3* 编码的氨基酸序列与其他硬骨鱼类 *irf3* 编码的氨基酸序列具有较高的相似性, 与条石鲷 (*O. fasciatus*)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、鳊和条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*) 的相似性分别为 91.90%、84.47%、84.26% 和 84.01%; 与两栖动物非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的相似性最低, 为 31.08%; 与人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 等的相似性较低, 分别为 31.41%、31.47% 和 31.41% (表 2)。

使用 DNAMAN 对表 1 所述氨基酸序列进行多重比对, 发现不同物种间 *Irf3* 氨基酸序列非常保守 (图 1)。为探究确定斑石鲷 *Irf3* 在动物进化过程中的地位, 利用 MAGE 7 软件, 通过 Neighbor-joining 法构建了脊椎动物的系统进化树。系统分析结果显示, 哺乳动物小鼠、人和黑猩猩的 *Irf3* 聚为一支, 两栖类非洲爪蟾单独为一支, 斑石鲷 *Irf3* 与其他硬骨鱼类聚为另一支。说明在进化上斑石鲷 *Irf3* 与哺乳动物的亲缘关系较远, 而与硬骨鱼条石鲷的亲缘关系最近, 与牙鲆、半滑舌鳎等的亲缘关系较近 (图 2)。

2.3 *Opirf3* 组织表达分析

为了研究 *Opirf3* 在斑石鲷各组织中的表达模式, 通过荧光定量 PCR 检测健康斑石鲷肝脏、鳃、心脏、皮肤、脾脏、肠道、脑、肾脏、胃和头肾组织中 *Opirf3* 相对表达水平。结果显示, *Opirf3* 在斑石鲷各组织中均有表达, 但表达水平有差异 (图 3), 在肝脏中的表达水平显著高于其他组织。

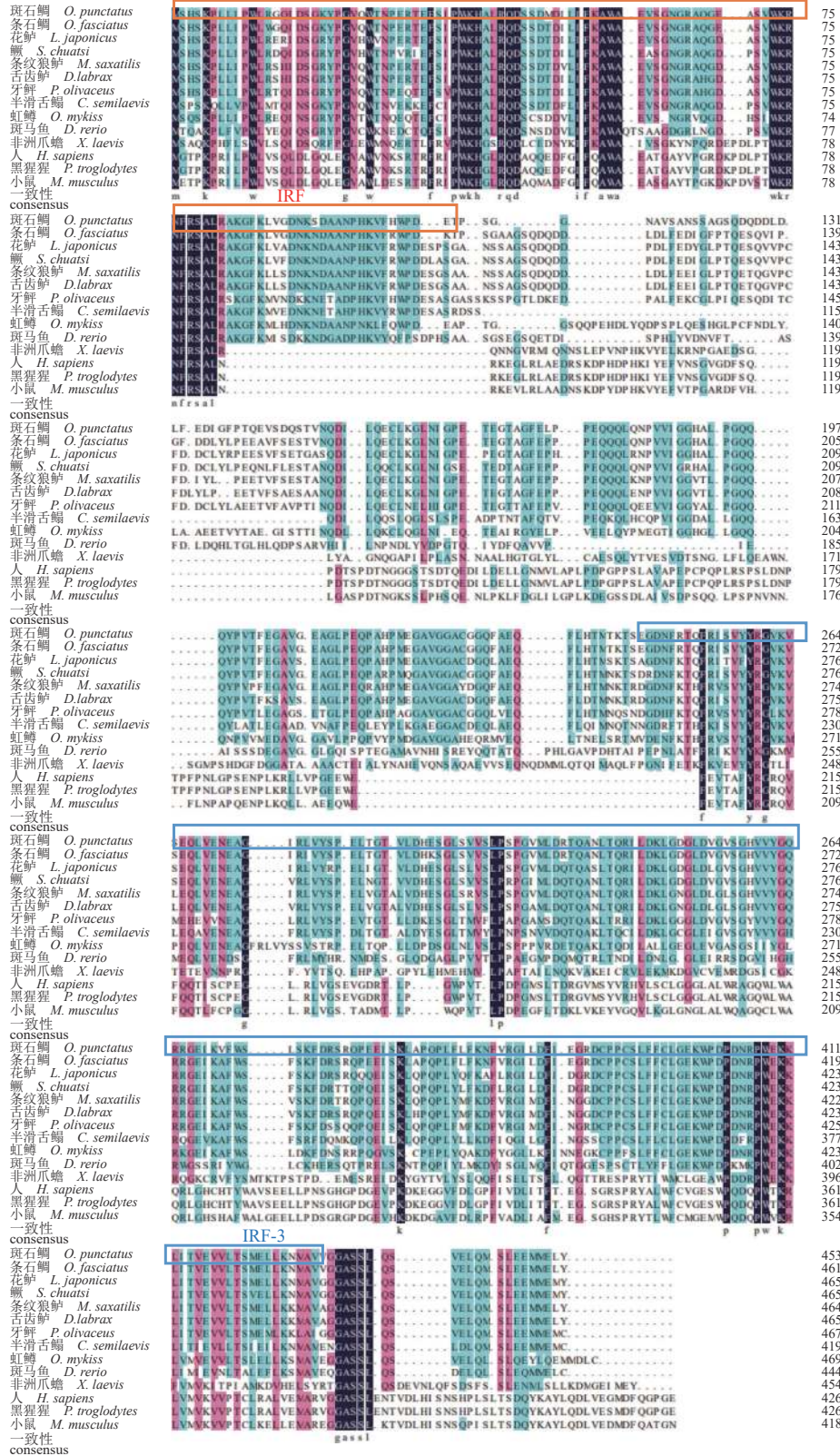


图1 斑石鲷与其他物种 Irf3 氨基酸序列多重比对

黑色区域. 氨基酸位点相似性为100%; 粉色区域. 氨基酸位点相似性≥75%; 蓝色区域. 氨基酸位点相似性≥50%。

Fig. 1 Multiple alignment of the deduced amino acids of Irf3 between *O. punctatus* and other species

Black region. amino acid site similarity is 100%; pink region. amino acid site similarity ≥75%; blue area. amino acid site similarity ≥50%.

表 2 斑石鲷与其他脊椎动物 Irf3 的氨基酸序列相似性

Tab. 2 Degree of homology between Irf3 of <i>O. punctatus</i> and other vertebrates		
物种 species	序列号 accession no.	相似性/% similarity
条石鲷 <i>O. fasciatus</i>	AHX37215.1	91.90
花鲈 <i>L. japonicus</i>	AXI69832.1	84.47
鳊 <i>S. chuatsi</i>	XP_044035778.1	84.26
条纹狼鲈 <i>M. saxatilis</i>	XP_035528312.1	84.01
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	CBN81356.1	83.62
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	XP_019962614.1	74.41
半滑舌鲷 <i>C. semilaievis</i>	XP_008312881.1	63.13
虹鲷 <i>O. mykiss</i>	XP_021420088.2	61.24
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	XP_017213957.1	44.96
小鼠 <i>M. musculus</i>	NP_058545.1	31.47
黑猩猩 <i>P. troglodytes</i>	XP_016792055.1	31.41
人 <i>H. sapiens</i>	NP_001562.1	31.41
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	XP_041425541.1	31.08

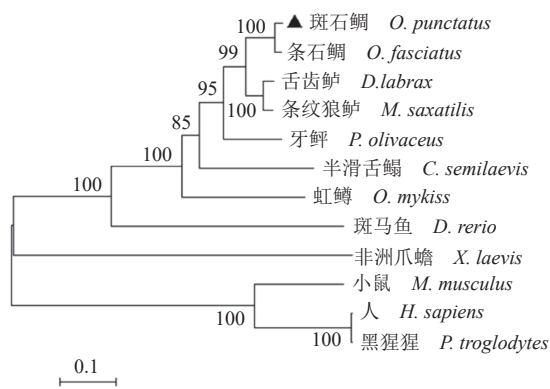


图 2 IRF3 氨基酸序列系统进化树分析

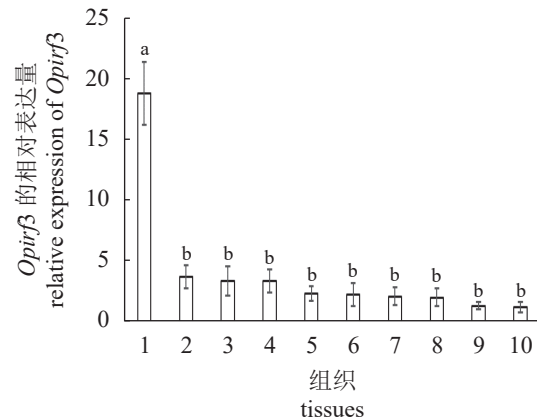
Fig. 2 Phylogenetic analysis of IRF3 amino acid sequence

2.4 虹彩病毒感染后 *Opirf3* 在免疫组织中的表达分析

斑石鲷腹腔注射 SKIV-SD 后, 于不同时间点取肝脏、脾脏和肾脏 3 种免疫组织, 通过荧光定量 PCR 检测 *Opirf3* 的表达水平变化。结果显示, 肝脏、脾脏和肾脏组织中 *Opirf3* 的表达水平在注射时间为 7 和 10 d 时均显著升高, 但不同组织中 *Opirf3* 的相对表达水平略有差异 (图 4)。注射时间为 7 和 10 d 时, 肝脏中 *Opirf3* 相对表达水平分别为 0 d 的 4.6 倍、5.7 倍; 脾脏中 *Opirf3* 相对表达水平分别为 0 d 的 7.3 倍和 7.0 倍; 肾脏中 *Opirf3* 的相对表达水平分别为对照组的 8.9 倍和 14.2 倍。

2.5 斑石鲷肾细胞体外刺激实验

为了进一步探讨 *Opirf3* 在斑石鲷抗病毒感染

图 3 斑石鲷组织中 *Opirf3* 的相对表达水平

1. 肝脏, 2. 鳃, 3. 心脏, 4. 皮肤, 5. 脾脏, 6. 肠道, 7. 脑, 8. 肾脏, 9. 胃, 10. 头肾, $n=4$; 数值用平均值 \pm 标准差表示, 不同字母表示各表达水平之间差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Fig. 3 Relative expression of *Opirf3* in *O. punctatus* tissues

1. liver, 2. gill, 3. heart, 4. skin, 5. spleen, 6. intestine, 7. brain, 8. kidney, 9. stomach, 10. head kidney, $n=4$; values are expressed by mean \pm SE, and different letters indicate significant differences in expression levels ($P<0.05$); the same below.

中发挥的作用, 本实验设计了斑石鲷肾细胞系的体外刺激实验。分别用不同浓度的 poly I:C 刺激斑石鲷肾细胞系, 6 h 后收集细胞, 提取细胞 RNA 制备定量模板, 荧光定量 PCR 检测 poly I:C 刺激后肾细胞中 *Opirf3* 的表达水平, PBS 作为对照组。结果显示, 不同浓度 poly I:C 刺激后, 肾细胞中 *Opirf3* 的表达水平均显著升高 (图 5), 在刺激浓度为 50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, *Opirf3* 的表达水平分别是刺激浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的 80.8、86.8 和 60.6 倍。

2.6 siRNA 干扰

由转染效率图可知, *Opirf3* 的 siRNA 在肾细胞中的转染效率较高, 为 90% 以上, 实验结果可靠 (图版)。荧光定量 PCR 检测发现, 3 个位点均有敲降, 其中 siRNA-3 对 *Opirf3* 的干扰效果最为明显, 较对照组 siRNA-NC 显著下降 (下调了 30%, 图 6)。因此, 实验检测 siRNA-3 干扰后 *Opirf3* 免疫相关基因的表达, 以期探究 *Opirf3* 对下游免疫相关基因表达的影响。在 siRNA 干扰 *Opirf3* 后, 分别检测了干扰素 α (interferon alpha, *IFN- α*)、CD40 抗原 (CD40 antigen, *CD40*)、CD80 抗原 (CD80 antigen, *CD80*)、白细胞介素 6 (interleukin 6, *IL-6*) 和白细胞介素 1 β (interleukin 1 beta, *IL-1 β*) 的表达水平, 结果显示, *IFN- α* 、*CD40*、*CD80* 和 *IL-1 β* 的表达水平较对照组 siRNA-NC 显著下降, *IL-6*

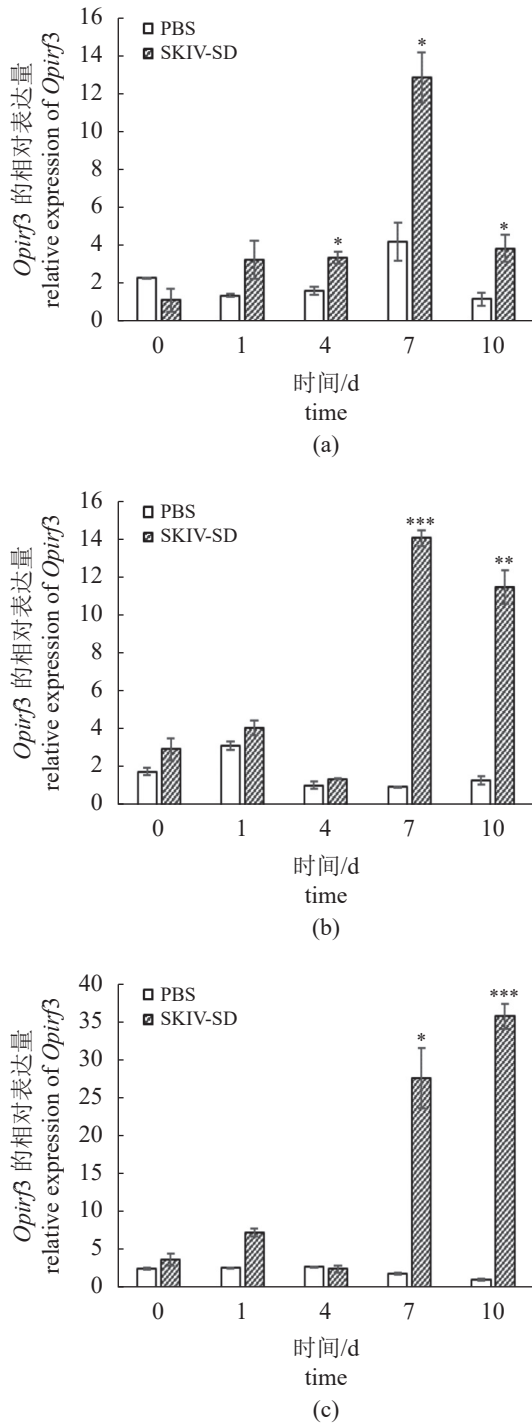


图4 虹彩病毒感染后不同时间点肝脏(a)、脾脏(b)和肾脏(c)中 *Opirf3* 的表达水平

PBS组4个平行 ($n=4$), SKIV-SD组5个平行 ($n=5$); 数值用平均值 \pm 标准误差表示, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 下同。

Fig. 4 Relative expression of *Opirf3* in the liver (a), spleen (b) and kidney (c) at difference time points after SKIV-SD infection

There were 4 parallels ($n=4$) in PBS group and 5 parallels ($n=5$) in SKIV-SD group. Values are represented by mean \pm SE, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; the same below.

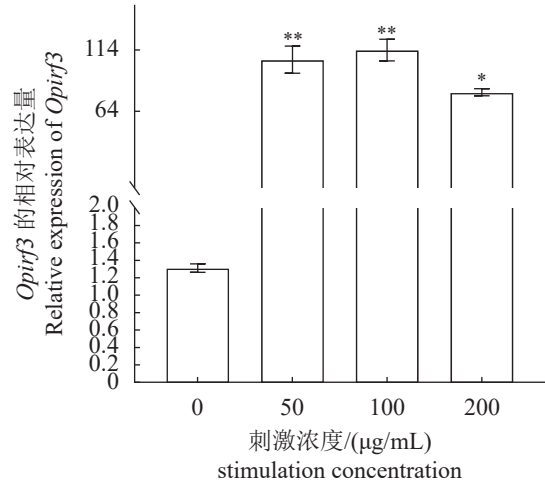


图5 不同浓度 poly I:C 刺激 6 h 后斑石鲷肾细胞中 *Opirf3* 的表达水平

每组3个平行, $n=3$ 。

Fig. 5 Expression level of *Opirf3* in kidney cells at 6 h after stimulation by different concentrations of poly I:C

There were 3 parallel per group, $n=3$.

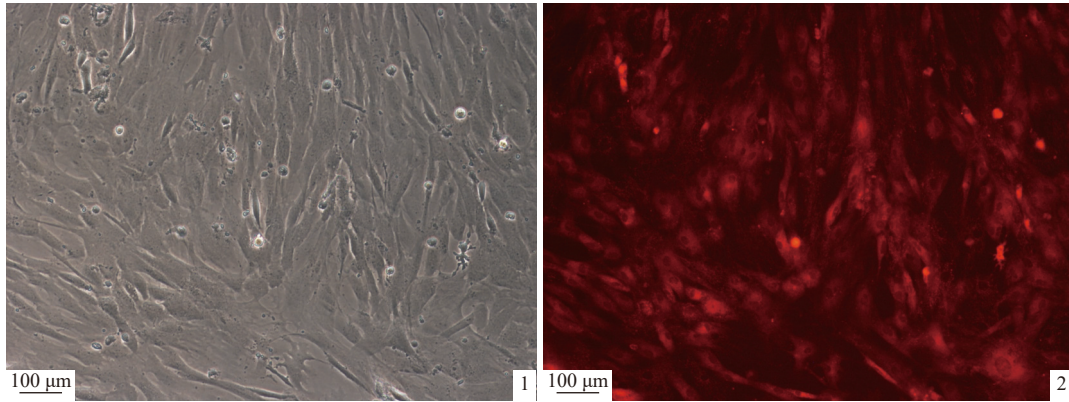
表达水平较对照组显著上调(图7)。

3 讨论

IRF 家族的功能由特定的蛋白质结构域决定^[32]。本研究预测了斑石鲷 *Irf3* 的蛋白结构, 发现 N 端有一个 IRF 结构域, 作为 DNA 结合域 (DBD), 这一结构域在硬骨鱼和哺乳动物中略有差别, 在哺乳动物中, *Irf3* 的 DBD 有 5 个色氨酸重复序列, 而硬骨鱼中仅有 4 个间隔的色氨酸重复序列^[3,9]。该重复序列是 *Irf3* 与启动子元件结合必不可少的, 它们可以形成螺旋-转角-螺旋结构而与下游靶基因启动子中的 IRF 调节元件 (IRFE) 和 IFN 刺激反应元件 (ISRE) 共有序列结合^[37]。在 C 端是 IRF3 结构域, 能够激活双链 RNA 激活因子 1 并防御病毒入侵^[38]。这些结构特征表明 *Opirf3* 在斑石鲷 I 型干扰素激活和抗病毒免疫方面发挥重要作用。

斑石鲷组织特异性表达分析显示, *Opirf3* 在斑石鲷肝脏、鳃、心脏、皮肤、脾脏、肠道、脑、肾脏、胃和头肾组织中均有表达, 在肝脏中的表达水平最高。这种普遍存在的表达模式, 与其他已报道的鱼类相似, 半滑舌鲷、虹鳟、尖吻鲈和花鲈中 *irf3* 在各组织中均有表达, 但不同组织中的表达水平略有差异, 尖吻鲈中 *irf3* 在脾脏和肾脏中表达水平最高, 花鲈中 *irf3* 在肝脏中的表达水平最高^[12, 23, 29, 31]。

poly I:C 类似于双链 RNA, 是一些病毒的关



图版 斑石鲷肾细胞 siRNA 转染效率图

1. 明场观察; 2. 红色荧光观察。

Plate Map of siRNA transfection efficiency in kidney cells of *O. punctatus*

1. brightfield observation; 2. red fluorescence observation.

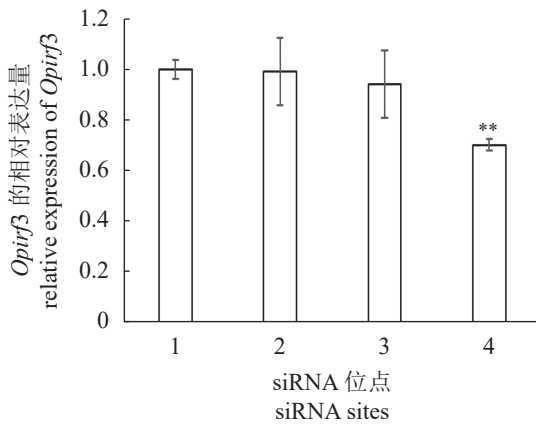


图 6 不同靶点 siRNA 对 *Opirf3* 的干扰效果

1. siRNA-NC, 2. siRNA-1, 3. siRNA-2, 4. siRNA-3, siRNA-NC 组 4 个平行 ($n=4$), siRNA-1、siRNA-2 和 siRNA-3 组 6 个平行 ($n=6$)。

Fig. 6 Changes in the expression of three sites after knocking down *Opirf3*

1. siRNA-NC, 2. siRNA-1, 3. siRNA-2, 4. siRNA-3, there were 4 parallel ($n=4$) in the siRNA-NC group and 6 parallel ($n=6$) in the siRNA-1, siRNA-2 and siRNA-3 groups.

键病原体成分^[39], 研究表明病毒和 poly I:C 处理诱导硬骨鱼中 *irf3* 转录。花鲈中, 赤点石斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 和 poly I:C 刺激后, 细胞和组织中 *irf3* 的表达水平均显著上调; 鳊中 poly I:C 刺激后, 显著上调了免疫相关组织中 *irf3* 的表达水平; 半滑舌鳎感染细胞肿大虹彩病毒 (Megalocytivirus) 后, *irf3* 在免疫组织中的表达水平显著上升; 尖吻鲈感染神经坏死病毒 RGNNV 后, 脑和肝脏、脾脏和肾脏中 *irf3* 的表达水平显著上升^[23, 29, 31-32]。本研究中 SKIV-SD 感染斑石鲷 7 d 后, *Opirf3* 在肝脏、脾脏和肾脏中的表达水平显著上

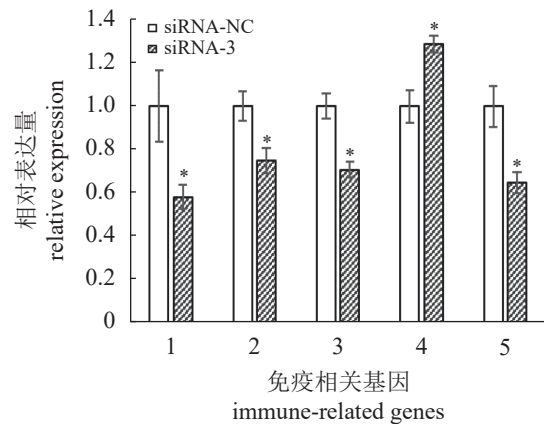


图 7 *Opirf3* siRNA 干扰后免疫相关基因在斑石鲷肾细胞中的表达水平

1. *IFN-α*, 2. *CD40*, 3. *CD80*, 4. *IL-6*, 5. *IL-1β*, siRNA-NC 作为阴性对照, siRNA-NC 组 4 个平行 ($n=4$), siRNA-3 组 6 个平行 ($n=6$)。

Fig. 7 The relative expression levels of immune-related genes in *O. punctatus* kidney cells after *Opirf3* siRNA treatment

1. *IFN-α*, 2. *CD40*, 3. *CD80*, 4. *IL-6*, 5. *IL-1β*, siRNA-NC as a negative control, there were 4 parallel ($n=4$) in the siRNA-NC group and 6 parallel ($n=6$) in the siRNA-3 group.

调。以上结果提示, *irf3* 在硬骨鱼抗病毒感染过程中发挥重要作用。

IRF3 是硬骨鱼中一种重要的转录因子, 调节 I 型干扰素的表达以抵御病毒感染^[9, 12]。在花鲈脑细胞中过表达的 *irf3* 显著抑制了 RGNNV 复制。鳊中, *irf3* 的过表达刺激干扰素-β 启动子和含有 ISRE 的启动子的活性。牙鲆中, poly I:C 刺激下过表达的 *irf3* 极大提高了 I 型 IFN 的转录活性^[23, 32, 40]。这些研究结果表明, 硬骨鱼 *irf3* 参与了

病毒感染的先天免疫应答, 并且诱导产生 I 型干扰素以应对病毒感染^[23]。在斑石鲷肾细胞中对 *Opirf3* 进行 siRNA 干扰后检测免疫相关基因, 发现 *IFN- α* 显著下调, 证明 *Opirf3* 直接调控 I 型干扰素信号通路。检测其他免疫相关基因发现, *CD40*、*CD80*、*IL-6* 和 *IL-1 β* 被不同程度的激活或抑制。其中 *CD40* 是表达于多种细胞表面的跨膜糖蛋白, 属于肿瘤坏死因子受体超家族, 在生发中心应答、T 依赖抗原应答和触发促炎症反应等方面发挥重要作用^[41-44]。*CD80* 是免疫球蛋白超家族成员, 调控 T 细胞适度活化所必须的膜糖蛋白, 若表达失调将导致一系列免疫疾病的发生^[45]。*IL-6* 和 *IL-1 β* 在免疫和癌症等方面发挥着重要的作用^[46]。此外研究证明, *irf7* 也是 I 型 IFN 表达的关键调控因子, 在硬骨鱼的抗病毒反应中发挥重要作用^[327], 主要在免疫组织中表达^[24]。半滑舌鳎感染细胞肿大虹彩病毒 (Megalocytivirus) 后, *irf7* 在免疫组织肝脏、脾脏和肾脏中的表达水平显著上调^[29]; 神经坏死病毒 (RGNNV) 感染尖吻鲈后, 脑和肝脏、脾脏等免疫组织中 *irf7* 的表达量均显著上调^[31]。本团队在前期研究中克隆了 *irf7* 序列, 并发现 *irf7* 在斑石鲷感染虹彩病毒后表达量升高^[47]。斑石鲷 *irf3* 和 *irf7* 的结构存在相似性, 活化的 *irf3* 形成同二聚体或与 *irf7* 形成异二聚体, 与 NF- κ B、转录共刺激分子 CBP /p300 等形成全复合物, 进入细胞核启动 I 型 IFN 的转录^[3, 47]。本研究对 *Opirf3* 基因进行了鉴定和表征; 分析了斑石鲷感染虹彩病毒后免疫组织的表达模式, 同时还进行了体外细胞刺激实验和 siRNA 实验。以上实验结果初步表明, 虹彩病毒感染后, 斑石鲷免疫组织和细胞中 *Opirf3* 基因的表达上调, 进而激活 I 型 IFN 通路来抵抗病毒对宿主细胞的侵袭。但关于斑石鲷 *Opirf3* 介导的 I 型 IFN 通路的激活机制仍需要后续研究。本实验为斑石鲷抗虹彩病毒病的研究奠定一定的理论基础, 也为斑石鲷的分子抗病育种提供一定的理论参考依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, et al. Interferon regulatory factors: the next generation[J]. *Gene*, 1999, 237(1): 1-14.
- [2] Hiscott J. Convergence of the Nf-Kappab and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response[J]. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 2007, 18(5-6): 483-490.
- [3] 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.
- [4] Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 349-360.
- [5] Stellacci E, Testa U, Petrucci E, et al. Interferon regulatory factor-2 drives megakaryocytic differentiation[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 377(2): 367-378.
- [6] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense[J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19: 623-655.
- [7] Barnes B, Lubyova B, Pitha P M. On the role of IRF in host defense[J]. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2002, 22(1): 59-71.
- [8] Huang B, Qi Z T, Xu Z, et al. Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution[J]. *Bmc Immunology*, 2010, 11: 22.
- [9] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, et al. Characterization of fish IRF3 as an ifn-inducible protein reveals evolving regulation of IRN response in vertebrates[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(12): 7573-7582.
- [10] Xiang L X, He D, Dong W R, et al. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of bacteria-challenged *Lateolabrax japonicus* reveals insight into the immune-relevant genes in marine fish[J]. *Bmc Genomics*, 2010, 11: 472.
- [11] Gu Y F, Wei Q, Tang S J, et al. Molecular characterization and functional analysis of IRF3 in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 55: 130-137.
- [12] Holland J W, Bird S, Williamson B, et al. Molecular characterization of RFE3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: functional analysis and transcriptional modulation[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 46(2): 269-285.
- [13] Zhu L Y, Nie L, Zhu G, et al. Advances in research of

- fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(1-2): 39-62.
- [14] Briolat V, Jouneau L, Carvalho R, *et al.* Contrasted innate responses to two viruses in zebrafish: insights into the ancestral repertoire of vertebrate IFN-stimulated genes[J]. *Journal of Immunology*, 2014, 192(9): 4328-4341.
- [15] Aggad D, Stein C, Sieger D, *et al.* *In vivo* analysis of IFN-gamma1 and IFN-gamma2 signaling in zebrafish[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(11): 6774-6782.
- [16] Lopez-Munoz 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]. *Journal of Immunology*, 2009, 182(6): 3440-3449.
- [17] Hu G B, Xia J, Lou H M, *et al.* An IRF-3 Homolog that is up-regulated by DNA virus and Poly I: C in turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 1224-1231.
- [18] Yao C L, Huang X N, Fan Z, *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.
- [19] Feng H, Liu H, Kong R, *et al.* Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1159-1169.
- [20] Shi J, Zhang Y B, Zhang J S, *et al.* Expression regulation of zebrafish interferon regulatory factor 9 by promoter analysis[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 534-543.
- [21] Huang Y, Huang X, Cai J, *et al.* Identification of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) interferon regulatory factor 3 involved in antiviral immune response against fish RNA virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 345-352.
- [22] Li S, Lu L F, Feng H, *et al.* IFN regulatory factor 10 is a negative regulator of the IFN responses in fish[J]. *Journal of Immunology*, 2014, 193(3): 1100-1109.
- [23] Zhang W, Li Z, Jia P, *et al.* Interferon regulatory factor 3 from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) exerts antiviral function against nervous necrosis virus infection[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 88: 200-205.
- [24] Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(21): 15325-15329.
- [25] Au W C, Moore P A, Lowther W, *et al.* Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(25): 11657-11661.
- [26] Wang Z, Ji J, Peng D, *et al.* Complex regulation pattern of IRF3 activation revealed by a novel dimerization reporter system[J]. *Journal of Immunology*, 2016, 196(10): 4322-4330.
- [27] 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.
- [28] Sato M, Suemori H, Hata N, *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction[J]. *Immunity*, 2000, 13(4): 539-548.
- [29] Zhang J, Li Y X, Hu Y H. Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 272-282.
- [30] Kim K H, Lee S, Park J W, *et al.* Analysis of tissue-specific interferon regulatory factor 3 (IRF3) gene expression against viral infection in *Paralichthys olivaceus*[J]. *Developmental Reproduction*, 2021, 25(4): 235-244.
- [31] Krishnan R, Kurcheti P P, Mushtaq Z, *et al.* Interferon-regulatory factors, IRF3 and IRF7 in Asian seabass, *Lates calcarifer*: characterization, ontogeny and transcriptional modulation upon challenge with nervous necrosis virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 468-476.
- [32] Chen X, Shen Y, Wu M, *et al.* IRF3 from mandarin fish thymus initiates interferon transcription[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 133-144.
- [33] Wu Y, Xiao Y, Xiao Z, *et al.* Identification of male-specific molecular markers by recombination of *RhoGEF10* gene in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J].

- Genes (Basel), 2022, 13(7).
- [34] 王海波, 史成银, 谢国驹, 等. 真鲷虹彩病毒引起养殖斑石鲷大规模死亡的研究 [J]. 渔业科学进展, 2020, 41(04): 151-158.
- Wang H B, Shi C Y, Xie G S, *et al.* Red seabream iridovirus causing mass mortality in farmed spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(04): 151-158(in Chinese).
- [35] Huang X, Wei J, Zheng Q, *et al.* Isolation, identification and genomic analysis of an ISKNV-type megalocytivirus from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J]. Aquaculture, 2021: 736032.
- [36] Li M, Zhang R, Fan G, *et al.* Reconstruction of the origin of a Neo-Y sex chromosome and its evolution in the spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*[J]. [Molecular Biology and Evolution](#), 2021, 38(6): 2615-2626.
- [37] Paun A, Pitha P M. The IRF family, revisited[J]. [Biochimie](#), 2007, 89(6-7): 744-753.
- [38] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection[J]. [Nature Immunology](#), 2006, 7(2): 131-137.
- [39] Fortier M E, Kent S, Ashdown H, *et al.* The viral mimic, polyinosinic: polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism[J]. [American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology](#), 2004, 287(4): 759-766.
- [40] Ohtani M, Hikima J, Hwang S D, *et al.* Transcriptional regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. [Developmental and Comparative Immunology](#), 2012, 36(4): 697-706.
- [41] Grewal I S, Flavell R A. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses[J]. [Immunology Today](#), 1996: 410-414.
- [42] Karnell J L, Rieder S A, Ettinger R, *et al.* Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: humoral immunity and beyond[J]. [Advanced Drug Delivery Reviews](#), 2019: 92-103.
- [43] Kawabe T, Naka T, Yoshida K, *et al.* The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation[J]. [Immunity](#), 1994: 167-178.
- [44] Stout R, Suttles J. The many-roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses[J]. [Immunology Today](#), 1996: 487-492.
- [45] Miura Y, Isogai S, Maeda S, *et al.* CTLA-4-Ig internalizes CD80 in fibroblast-like synoviocytes from chronic inflammatory arthritis mouse model[J]. [Scientific Reports](#), 2022, 12(1): 16363.
- [46] Kang S, Narazaki M, Metwally H, *et al.* Historical overview of the interleukin-6 family cytokine[J]. [Journal of Experimental Medicine](#), 2020, 217(5).
- [47] 宋煜, 李开敏, 徐文腾, 等. 斑石鲷 Irf7 基因克隆及其在病毒感染下的表达 [J]. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 50-57.
- Song Y, Li K M, Xu W T, *et al.* Cloning and expression of *irf7* gene in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) under virus infection[J]. Progress in Fishery Science, 2023, 44(2): 50-57 (in Chinese).

Identification of *irf3* gene in *Oplegnathus punctatus* and its expression pattern analysis under iridescent virus infection

LI Kaimin^{1,2}, WANG Lei^{1,3*}, GONG Zhihong¹, WANG Qingbin⁴, LI Hua²,
YANG Guiwen², HUANG Youhua⁵, CHEN Songlin^{1,3}

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods,
Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Shandong Normal University, Jinan 250014, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,
Laoshan Laboratory, Qingdao 266237, China;
4. Laizhou Mingbo Aquatic Products Co., Ltd., Laizhou 261418, China;
5. University Joint Laboratory of Guangdong Province,
Hong Kong and Macao Region on Marine Bioresource Conservation and Exploitation,
Guangdong Aquatic Animal Immunity and Health Aquaculture Engineering Technology Research Center,
College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Interferon regulatory factor 3, a member of the interferon regulator factor (IRF) family, are major transcriptional regulators of type I interferon-dependent immune responses and play an important role in innate immune responses against DNA and RNA viruses. In this study, The *irf3* gene (interferon regulatory factors 3, *Opirf3*) was obtained from the *Oplegnathus punctatus* genome database, and analyses found that the CDS sequence of *Opirf3* has a total length of 1 362 bp, encoding 453 amino acids. The molecular weight of predicted protein is 50.0 ku, the theoretical isoelectric point is 4.97, and has an IRF domain and an IRF-3 domain. RT-PCR showed that *Opirf3* was expressed in liver, gills, heart, skin, spleen, intestine, brain, kidney, stomach and head kidney of *O. punctatus*. When the fish were infected with SKIV-SD for 7 days, the expression levels of *Opirf3* in the liver, spleen and kidney of immune tissues were significantly upregulated. *In vitro* stimulation experiments of the kidney cell line of *O. punctatus* showed that the expression of *Opirf3* was significantly upregulated after stimulation with different concentrations of poly I:C, and the relative expression level of *Opirf3* was the highest at a concentration of 100 µg/mL, which was 87.9 times higher than that of the control group. After siRNA interference, the expression level of *Opirf3* was significantly reduced by 30%, the *Opirf3* related genes *IFN-α*, *CD40*, *CD80* and *IL-1β* were significantly downregulated, and *IL-6* was significantly upregulated. These results may indicate that the *Opirf3* gene is involved in the innate immune response of type I IFN in the resistance to SKIV-SD of *O. punctatus*. This study can provide a theoretical basis for the molecular breeding of disease resistance of *O. punctatus*.

Key words: *Oplegnathus punctatus*; *irf3*; gene expression; siRNA

Corresponding author: WANG Lei. E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2022YFF1000303); Key Research and Development Project of Shandong Province (2021LZGC028, 2023ZLYS02); Shandong Province Breeding Project (2022LZGC016); Central Public-interest Scientific Institute Basal Research Fund, CAFS (2023TD20); Taishan Scholar Climbing Program of Shandong Province, China