

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200423001

http://www.yykxjz.cn/

马腾, 王磊, 赵玉柱, 吴垚磊, 周茜, 陈张帆, 朱春华, 陈松林. 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因 cDNA 克隆及其在虹彩病毒感染下的表达分析. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 31–39  
MA T, WANG L, ZHAO Y Z, WU Y L, ZHOU Q, CHEN Z F, ZHU C H, CHEN S L. Molecular characterization and expression analyses of the viral infection of the interferon-stimulated gene 15 (*isg15*) in *Epinephelus lanceolatus*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 31–39

## 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因 cDNA 克隆及其在虹彩病毒感染下的表达分析

马 腾<sup>1,2</sup> 王 磊<sup>1①</sup> 赵玉柱<sup>1,2</sup> 吴垚磊<sup>1,2</sup> 周 茜<sup>1</sup>  
陈张帆<sup>1</sup> 朱春华<sup>3</sup> 陈松林<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 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 山东 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江) 广东省名特优鱼类生殖调控与繁育技术工程中心 广东海洋大学 广东 湛江 524088)

**摘要** 本研究利用 PCR 和 RACE 技术首次获得了鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)干扰素刺激基因 15 (interferon stimulated gene 15, *isg15*) 全长序列。*isg15* 基因序列长为 910 bp, 包含一个 468 bp 的开放阅读框, 可编码 155 个氨基酸, 预测分子量为 17.09 kDa, 理论等电点为 9.33。保守结构域分析显示, 鞍带石斑鱼 ISG15 蛋白包含 2 个类似泛素结构域, 且 C 末端具有高度保守的“Leu Arg Leu Arg Gly Gly (LRLRGG)”结构域。序列分析和系统发育分析显示, 鞍带石斑鱼与斜带石斑鱼(*E. coioides*) *isg15* 的相似性最高, 为 88.24%, 与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 和大黄鱼(*Larimichthys crocea*) *isg15* 的相似性分别为 61.18% 和 60.59%。采用实时荧光定量 PCR 技术检测了鞍带石斑鱼健康组织中的 *isg15* 表达, 以及虹彩病毒(iridovirus)感染后不同时间脾脏和肾脏中的 *isg15* 表达变化。结果显示, *isg15* 在血液中的表达量最高, 在肝脏、肾脏等组织中的表达量较高。经虹彩病毒感染后, *isg15* 在脾脏和肾脏中的表达显著升高, 在 72 h 到达最高水平, 说明 *isg15* 在鞍带石斑鱼防御虹彩病毒的过程中发挥着重要作用。对鞍带石斑鱼 *isg15* 基因的分析 and 表达模式的研究, 有助于进一步了解 *isg15* 基因在硬骨鱼体内的抗病毒调控机制, 为鞍带石斑鱼抗病分子育种提供基础数据。

**关键词** 鞍带石斑鱼; 虹彩病毒; *isg15*; 抗病毒功能基因; 免疫反应

**中图分类号** S942.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)05-0031-09

\* 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)资助项目(ZJW-2019-06)、山东省良种工程(2016LZGC009)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室人才项目(2018-MFS-T08; 2017ASTCP-OS15)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD20)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022018026)共同资助 [This work was supported by the fund of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang) (ZJW-2019-26), Shandong Breeding Project (2016LZGC009), Projects from Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018-MFS-T08; 2017ASTCP-OS15), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD20), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022018026)]. 马 腾, E-mail: 675377294@qq.com

① 通讯作者: 王 磊, E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-04-23, 收修改稿日期: 2020-05-13

干扰素(interferons, IFNs)是一种在脊椎动物的抗病毒防御(Coccia *et al*, 2015; Skaug *et al*, 2010)、免疫激活(Lin *et al*, 2014; Blomstrom *et al*, 1986)和细胞增长调节(Lenschow *et al*, 2007; Cunha *et al*, 1996)过程中起着重要作用的细胞因子(Yoo *et al*, 2014; Zhao *et al*, 2005)。目前, 已知的 I 型和 II 型 *ifn* 基因在鱼类对病毒感染的先天免疫和适应性免疫中起关键的抗病毒防御作用(Zou *et al*, 2011; Liu *et al*, 2010; Baeck *et al*, 2008)。被病毒感染的细胞识别病毒的 dsRNA, 且触发 IFNs 基因与其同源受体结合, 进而启动 JAK/STAT 信号联系, 导致干扰素刺激基因(interferon stimulated genes, ISGs)的转录诱导过程(Robertsen *et al*, 2006; Liu *et al*, 2002; Loeb *et al*, 1992)。干扰素刺激基因是先天免疫系统的主要部分, 对限制细胞内和细胞间的病毒复制和传播非常重要, ISGs 的作用机制对靶向目标有效的抗病毒感染起着至关重要的作用(Hubel *et al*, 2019; Yasuike *et al*, 2011; Giannakopoulos *et al*, 2009)。ISG15 是一种可以作用于细胞内的抗病毒蛋白(Daniel *et al*, 2017; Ozato *et al*, 2008), 它可以通过病毒与细胞蛋白结合在细胞内发挥作用, 或者可以作为细胞因子作用于细胞外(Moreno *et al*, 2018; Okumura *et al*, 2007)。鱼类中, ISG15 是鱼体被病毒感染后经干扰素诱导最早表达且表达量最高的蛋白之一(Álvarez *et al*, 2018; Zhang *et al*, 2007)。Liu 等(2010)研究报道, 美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)的 ISG15 同源物能够直接表现出免疫调节的特性。鳕(*Gadus morhua*) (Røkenes *et al*, 2007)、鲑(*Salmo salar*) (Seppola *et al*, 2007)和鲫(*Carassius auratus*) (Furnes *et al*, 2009)的 ISG15 同源物能够与细胞蛋白形成复合物发挥抗病毒的作用。因此, *isg15* 不仅能够调节免疫反应, 还具有直接的抗病毒作用, 研究鱼类 *isg15* 对于解析鱼类抗病毒分子的免疫机制具有重要意义。

鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)是一种名贵的海水养殖品种, 随着消费需求的增长, 养殖密度不断增加, 病害问题已成为制约石斑鱼类养殖业健康可持续发展的主要瓶颈。目前, 虹彩病毒(iridovirus)是海水和淡水养殖鱼类最严重的病毒性病原之一, 在世界各地已从 100 多种鱼类中分离鉴定出虹彩病毒(Gray *et al*, 2015)。虹彩病毒是危害石斑鱼类最大的传染病之一(Ohta *et al*, 2011), 但关于鞍带石斑鱼干扰素刺激基因 15 的克隆及功能研究尚未见报道。

本研究以鞍带石斑鱼为研究对象, 对其 *isg15* 基因进行全长 cDNA 克隆并初步分析其结构特征, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术检测了该基

因在鞍带石斑鱼不同组织中的表达模式, 以及感染虹彩病毒后主要免疫组织的表达特征, 旨在为探究 *isg15* 基因在鞍带石斑鱼免疫应答中的作用机制提供数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 正常组织** 本实验所用的鞍带石斑鱼取自海南晨海水产有限公司, 采集 18 月龄健康鞍带石斑鱼, 麻醉后用注射器对心脏取血, 然后解剖取其心脏、肝脏、鳃、肠、皮肤、肾脏、脾脏、脑等组织, 将组织样品立即放入 RNA 保存液中, 存放于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于提取正常组织 RNA。

**1.1.2 虹彩病毒感染及样品收集** 将 18 月龄的健康鞍带石斑鱼腹腔注射虹彩病毒(由华南农业大学的秦启伟教授提供)进行感染, 每尾  $100\ \mu\text{L}$  ( $10^9$  拷贝数)。在感染后的 0、12、24、72 和 96 h 共 5 个时间点, 以磷酸缓冲液(PBS)作为对照, 分别取 5 尾鞍带石斑鱼, 将活鱼麻醉后迅速采集脾脏和肾脏组织, 放入 RNA 保存液中, 存放于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

### 1.2 鞍带石斑鱼总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

用于全长克隆的总 RNA 提取按照 RNAiso Plus Total RNA (TaKaRa)提取试剂说明书进行操作, 提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检查完整性, 并利用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及纯度, 判断核酸和蛋白质的污染情况。选取质量良好的 RNA, 按照 PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa)和 SMARTer RACE 5'/3' kit 的操作说明书进行反转录, 分别得到 cDNA、5'RACE cDNA 及 3'RACE cDNA, 保存至 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 分别用于 *isg15* 基因中间片段的克隆以及 5'RACE 和 3'RACE 扩增。

### 1.3 *isg15* 基因的全长 cDNA 的克隆

**1.3.1 中间片段的克隆验证** 中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林团队主导完成了鞍带石斑鱼全基因组测序和精细图谱绘制(Zhou *et al*, 2019), 首先, 根据鞍带石斑鱼基因组数据库中的部分 *isg15* 序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(*isg15*-F1/*isg15*-R1)(表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增: Mix  $7.5\ \mu\text{L}$ , *isg15*-F1  $0.6\ \mu\text{L}$ , *isg15*-R1  $0.6\ \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $5.3\ \mu\text{L}$ , 模板 cDNA  $1\ \mu\text{L}$ 。程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 55 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;  $4^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物经 1% 的琼

表 1 本研究所用到的引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence	用途 Purpose
isg15-F1	ATGGATATAACCATCGTTATGC	同源扩增
isg15-R1	CAGACGCAGATTCAGGTCGAT	Homologous amplification
5'-RACE-GSP	ACCCTCCTCTTGAATAAGTCCAC	
5'-RACE-NGSP	CTTGTCCTGGATGCGTTGTTC	克隆 5'和 3'末端
3'-RACE-GSP	AAATGGACTTACCTGCACTTTA	Cloning the 5' and 3' ends
3'-RACE-NGSP	TGTTCAAAGTGGGACCAAGTCA	
ACTIN-RT-F	GAGAGGGAAATCGTGCGTGA	
ACTIN-RT-R	CATACCAAGGAAGGAAGGCTG	实时荧光定量 PCR
isg15-RT-F	CCTATGACATCAAAGCTGACGAGAC	Real-time fluorescent quantitative PCR
isg15-RT-R	GTGCTGTTGGCAGTGACGTTGTAGT	

脂糖凝胶电泳检测,并用凝胶回收试剂盒回收、纯化,再利用 T-A 克隆方法克隆到 pEAZY-T1 载体上,转化至大肠杆菌感受态细胞中,涂板于含氨苄西林的固体培养基,37℃过夜培养 12~16 h,挑取单菌落于 1 mL 含氨苄西林的液体培养基中,37℃ 200 r/min 震荡培养 6 h,进行菌液 PCR 检测,挑取阳性克隆。将含有目的片段的阳性菌落交由北京睿博兴科生物技术有限公司(青岛区)进行测序(王双艳等,2019)。

**1.3.2 5'RACE 和 3'RACE 的克隆** 根据克隆得到的 *isg15* 基因片段序列,分别设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性扩增引物(5'-RACE-GSP/5'-RACE-NGSP 和 3'-RACE-GSP/3'-RACE-NGSP)(表 1)。分别以 5'RACE cDNA 和 3'RACE cDNA 为模板进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增,第 1 轮反应体系为 10 μL,根据 TaKaRa *Taq*<sup>TM</sup> Hot Start Version 说明书介绍的体系比例加样混合,进行 Touch down PCR 程序反应。第 1 轮 PCR 反应产物稀释 50 倍作为第 2 轮普通 PCR 扩增反应的模板,反应体系为 50 μL,同上按比例加样混合后进行 PCR 反应,将得到的 PCR 产物根据中间片段的克隆的验证方法处理并测序。

根据基因测序获得的 *isg15* 基因 5'和 3'及中间片段序列,利用 DNAMAN 软件进行拼接,获得 *isg15* 基因全长序列。

#### 1.4 *isg15* 基因的序列分析及进化树的构建

利用在线软件 ExPASy (<http://www.au.expasy.org>)对 *isg15* 基因的 cDNA 序列进行蛋白翻译、分子量及等电点预测;使用 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)预测保守结构域。在 NCBI 上下载同源序列,利用 DNAMAN 进行同源序列比对分析(王杉等,2020),利用 MEGA5.1 软件以邻位法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

#### 1.5 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因的表达模式检测

使用 qRT-PCR 检测健康的鞍带石斑鱼不同组织中的表达量;使用 qRT-PCR 检测鞍带石斑鱼经过虹彩病毒感染刺激后 5 个时间点的脾脏和肾脏的表达情况。根据 *isg15* 基因全长序列,设计 qRT-PCR 正反向引物(isg15-RT-F/isg15-RT-R)(表 1),并以(ACTIN-RT-F/ACTIN-RT-R)(表 1)作为内参基因。以鞍带石斑鱼在感染虹彩病毒后不同时间的脾脏和肾脏 cDNA 为模板,在 7500 Fast Real-time PCR 仪上进行 qRT-PCR。20 μL 体系:10 μL SYBR,上、下游引物(10.0 μmol/L)各 0.8 μL,0.4 μL ROX reference dye II, cDNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.0 μL。每次反应均设阴性对照和无模板对照,每个反应设 3 个重复。扩增程序:95℃ 5 min,95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环。所得实验数据采用相对 CT 法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )进行 *isg15* 基因 mRNA 的表达量计算,实验得到的数据采用 SPSS 软件进行方差分析,设定  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因的克隆及序列分析

鞍带石斑鱼 *isg15* 基因序列全长为 910 bp,其中,5'-非编码区为 64 bp,开放阅读框为 468 bp,3'-非编码区为 378 bp,预测分子量为 17.09 kDa,理论等电点为 9.33(图 1)。SMART 软件预测鞍带石斑鱼 ISG15 含有 2 个类泛素结构域 UBQ(ubiquitin-like domain),分别在 1~76 和 86~156 位置,其中,C 端结构域含有泛素 C 末端具有的 LRLGG 结构域(图 1)。

### 2.2 *isg15* 基因多序列比对及系统进化树分析

鞍带石斑鱼 *isg15* 基因编码的氨基酸序列经 BLAST 比对发现,与其他硬骨鱼类的 *isg15* 基因有较

```

1 accacctgaagacgaagacatttgcagaggaatttataaaagtgaacacaagacctctctcatcATGGATATAAC
1 M D I T
76 CATCGTTATGCTGAACGGGACTTCCACACACTGAGCGTGCACCCAGGGGACACAGTGGGCTCTCTGAAACAACG
5 I V M L N G T S H T L S V H P G D T V G S L K Q R
151 CATCCAGGACAAGTTTGGAGTCCCCTGTGAGAAGCAGAAGCTGATGTTTGTGAATGGTCAGAAGACTCACCTGAG
30 I Q D K F G V P C E K Q K L M F V N G Q K T H L S
226 CAATGACGTAATGTCCATCAGCTCCTACGGTTTGCACCCCGGTGCCAGGGTGTCCCTGTGCTGGTGATCGAGCCGCC
55 N D V M S I S S Y G L H P G A R V S L L V I E P P
301 GACCATCCAGGTGTTTCGTCAGAAACGAGAAGGGGAAGCTCAACACCTATGACATCAAAGCTGACGAGACTGTGGA
80 T I Q V F V R N E K G K L N T Y D I K A D E T V D
376 CAACTTAAAGAGCAGGGTCCAGAGCAGAGAGGGGGTCCCGGTGAGCCAGCAGAGGCTCATTACCAGGGCAGAGA
105 N L K S R V Q S R E G V P V S Q Q R L I H Q G R E
451 GATGACGGGGGCAAACCTGGCGGACTACAACGTCACTGCCAACAGCACCATCGACCTGAATCTGCGTCTGAGGGG
130 M T G G K L A D Y N V T A N S T I D L N L R L R G
526 AGGCTGAggactggctattgactctgaaggttcatactctgaacattcctgattatcatatagtattaaaaaatg
155 G *
601 attttctgtagcctacctttatTTTTTTTattattattaaagaaatgatcataattcaaatgtctttattttttt
676 gtattttcattttgaacaaaaaaaaaatcaatgcattcctcctgtgtgtaaatcatgcatgtcttaaaaactgttt
751 aagacttaatttgcaatagaatatgttattctcaggacaagcacggttgactttaatttaaaaaatacacctt
826 gtcattgggatttgttaactggacactgtttaaaaaaaataataaagttcaaatgtattgaaagtcaaaaaaa
901 aaaaaaaaaa
    
```

图 1 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因的 cDNA 序列及其编码序列  
 Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *E. lanceolatus isg15*

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方，用大写字母表示。蓝色区域表示 *isg15* 基因的 2 个类似泛素结构域 UBQ (Ubiquitin-like domain) 序列特征；方框所示为起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)，下划线(—)所示为 polyA 结构。The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence and expressed in capital letters. Blue boxes represent sequences of *isg15* two ubiquitin-like domain. Start codon (ATG) and termination codon (TGA) are shown in the box, and the underline (—) shows the polyA structure

高的同源性，与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的相似性为 88.24%，与大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)的相似性为 61.18%、60.59%和 60.00%，与爬行动物陆龟(*Gopherus evgoodei*)的相似性为 33.53%，与 2 种哺乳动物小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)的相似性为 32.94%和 31.18% (表 2)。

使用 DNAMAN 进行氨基酸多重序列比对，结果显示，不同物种间的 ISG15 序列非常保守(图 2)。为了确定 *isg15* 的系统进化关系，通过 MEGA 5.1 软件，采用 Neighbor-joining 法构建了脊椎动物 *isg15* 系统进化树(图 3)。系统发育分析显示，9 种鱼类的 *isg15* 聚为一簇，爬行动物陆龟分为一支，2 种哺乳动物的 *isg15* 聚为一簇。

### 2.3 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因在健康个体中的表达模式

为研究 *isg15* 基因在健康鱼类中的表达模式，采用荧光定量 PCR 技术检测 *isg15* 基因在鞍带石斑鱼健康个体的不同组织内基因相对表达水平变化。结果显示，*isg15* 基因主要在血液中表达，肝脏、肾脏中的 mRNA 水平较高，其次是鳃、肠、心脏、脾脏、皮肤、大脑和肌肉(图 4)。

表 2 鞍带石斑鱼和其他物种的 ISG15 的氨基酸相似性  
 Tab.2 Degree of homology similarity between ISG15 of *E. lanceolatus* and other vertebrates

物种 Species	基因登录号 GenBank Access No.	相似性 Similarity/%
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	AGC26172.1	88.24
大菱鲂 <i>Scophthalmus maximus</i>	AHW76806.1	61.18
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	AZS32234.1	60.59
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	BAJ16365.1	60.00
棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	AYK27734.1	58.82
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	BAI48419.1	55.29
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NP_001117112.1	47.06
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001191098.1	44.71
陆龟 <i>Gopherus evgoodei</i>	XP_030438564.1	33.53
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_056598.2	32.94
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_005092.1	31.18

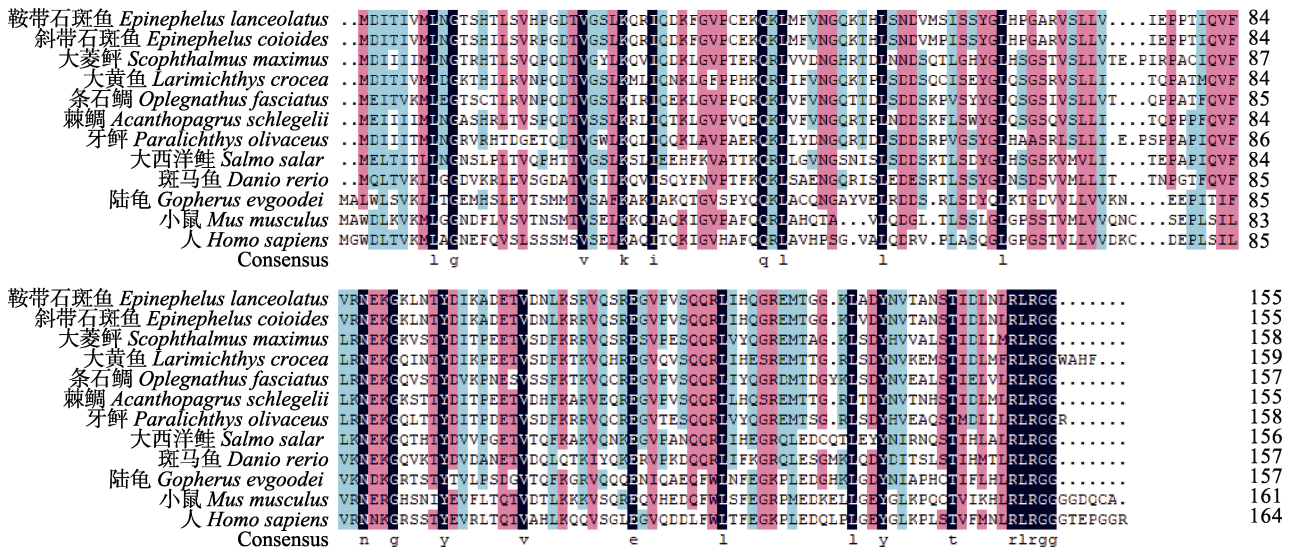


图 2 ISG15 的氨基酸序列多重序列比对结果

Fig.2 The multiple sequence alignment of the ISG15 amino acid

黑色区域: 相似性 100%; 粉红区域: 相似性 ≥75%; 蓝色区域: 相似性 ≥50%  
Black area: Similarity 100%; Pink area: Similarity ≥75%; Blue area: Similarity ≥50%

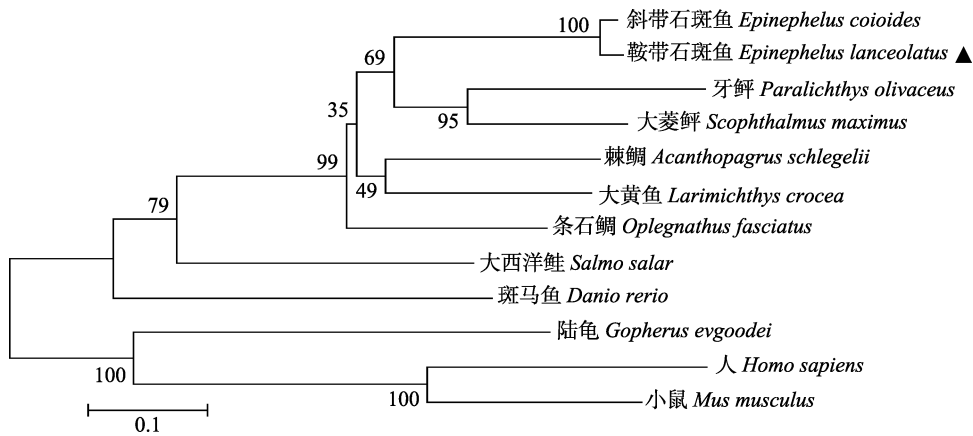


图 3 鞍带石斑鱼 *isg15* 与其他物种 *isg15* 系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *isg15* sequence of *E. lanceolatus* with other vertebrate *isg15*

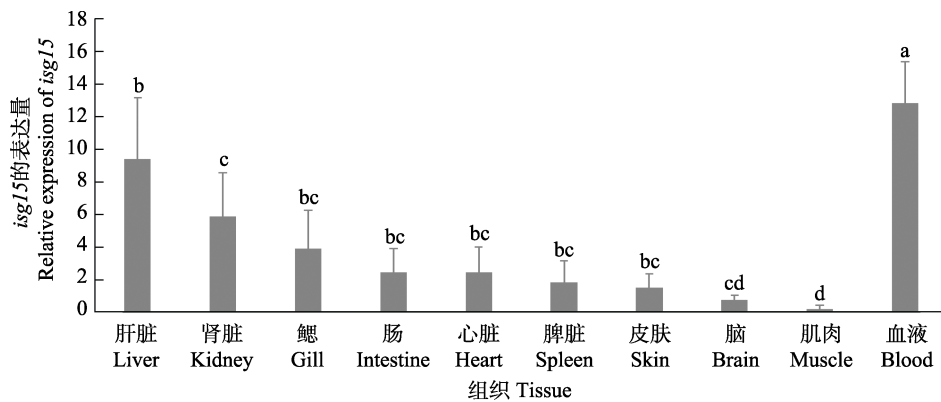


图 4 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因在不同组织的表达分布

Fig.4 Expression profile of *isg15* in different tissues of *E. lanceolatus*

字母“a、b、c、d”表示 SPSS 17.0 软件使用 Duncan 算法计算的子集分组。不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )  
Letters of “a, b, c, d” indicate the Duncan grouping in SPSS 17.0. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )



## 2.4 注射虹彩病毒后 *isg15* 基因在脾脏的表达模式

本研究采用荧光定量PCR技术检测 *isg15* 基因在鱼体注射虹彩病毒的处理下,脾脏在不同时间(0、12、24、72和96 h)基因相对表达水平变化。*isg15* 基因在鱼体注射虹彩病毒后脾脏中相对表达变化的检测结果显示,与0 h相比,各组脾脏内 *isg15* 基因的相对表达量在感染后72 h显著上调至8.3倍,在感染后96 h降低为6.6倍(图5)。

## 2.5 注射虹彩病毒后 *isg15* 基因在肾脏的表达模式

*isg15* 基因在鱼体注射虹彩病毒后肾脏中相对表达变化的检测结果显示, *isg15* 基因的相对表达量在肾脏中的表达变化更为剧烈,72 h时其转录水平上调约11倍,96 h时下降至6.5倍(图6)。

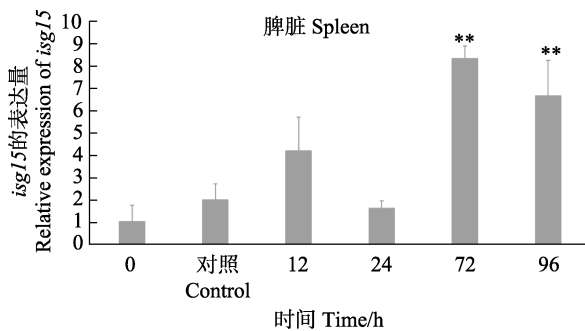


图5 虹彩病毒感染后鞍带石斑鱼 *isg15* 基因在脾脏中的表达分布

Fig.5 The expression of *E. lanceolatus isg15* in spleen after iridovirus infection

数据分析采用 *t* 检验方法验证, \*\*代表  $P < 0.01$ 。下同  
Data analysis was verified by *t*-test, \*\* represented  $P < 0.01$ .  
The same as below

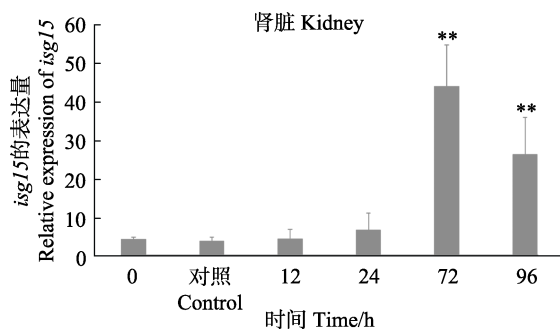


图6 虹彩病毒感染后鞍带石斑鱼 *isg15* 基因在肾脏中的表达分布

Fig.6 The expression of *E. lanceolatus isg15* in kidney after iridovirus infection

## 3 讨论

本研究通过 PCR 及 RACE 方法成功获得了鞍带

石斑鱼 *isg15* 基因 cDNA 的全长序列。SMART 在线软件预测鞍带石斑鱼 ISG15 含有 2 个类泛素结构域 UBQ, 然而与泛素相比, ISG15 与目的蛋白结合并不会导致靶蛋白的降解, 而是发挥生理信号功能, 与基因转录调控、蛋白质翻译以及机体应激反应等生理过程有密切联系(Liu *et al*, 2014)。鞍带石斑鱼 ISG15 的 C 端结构域也含有泛素 C 末端相同的 LRLRGG 结构域, 其对 ISG15 与细胞内靶蛋白分子的连接极其重要(图 1)。大多数泛素或类泛素样蛋白通过在 LRLRGG 结构域的末端加上几个氨基酸, 从而使其处于失活状态, 而类泛素样蛋白的活化则通过蛋白酶释放有活性的尾部(Dao *et al*, 2005)。*isg15* 基因是 ISGs 家族的重要成员之一, 各个物种中的 *isg15* 基因均具有一定的保守性和保守功能(Moreno *et al*, 2018)。序列分析显示, 克隆获得的鞍带石斑鱼 *isg15* 与斜带石斑鱼上的 *isg15* 相似度最高, 达到 88.24%, 与大菱鲆、大黄鱼和条石鲷的相似性高于 60%, 与哺乳动物和小鼠的相似性高于 30%(图 2), 这说明了亲缘关系越相近的物种, 同源性越高。鞍带石斑鱼和其他几种已报道的鱼类, 如斜带石斑鱼、条石鲷、棘鲷等的 ISG15 蛋白 C 端 LRLRGG 结构域之后没有末端氨基酸, 说明其处于天然活化状态, 推测鞍带石斑鱼的 ISG15 具有天然的抗病毒作用。

最初研究证明, 鱼类中的 I 型 IFN 具有抗病毒活性, 对包括斑马鱼(*Danio rerio*)中的蛇头横纹肌病毒(Altmann *et al*, 2003)、鲑中的传染性胰腺疾病(IPNV)(Robertson *et al*, 2003)和斜带石斑鱼中的神经坏死病毒(NNV)(Ohta *et al*, 2011)都有抑制作用。后期研究发现, IFN 还能够诱导 ISG15 的表达。ISG15 通过与 JAK1 和 STAT1 等重要干扰素信号通路成员的结合, 调控细胞对干扰素信号的反应(Malakhov *et al*, 2003)。最新研究证明, *isg15* 具有直接的抗病毒能力, 其中, Wang 等(2012)研究发现, 半滑舌鳎的 *isg15* 基因具有非结合形式的抗病毒能力; Langevin 等(2013)研究发现, 斑马鱼 *isg15* 在 EPC 细胞中过表达后能够抑制虹彩病毒等病毒的感染。因此, *isg15* 是抗病毒防御体系的重要部分, 可以在动物机体抗病毒方面发挥重要作用, 但 *isg15* 在石斑鱼类抗病毒反应中的作用机制和调控通路需要进一步研究。

本研究对 *isg15* 基因在健康鞍带石斑鱼各个组织中的表达模式进行了探究, 发现 *isg15* 基因在鞍带石斑鱼的各个组织中均有表达, 在血液中表达量最高, 在肝脏、肾脏中的表达水平较高, 说明 *isg15* 主要在免疫组织中表达。鱼类免疫相关的基因在血液中表达较高的现象也早有报道, 如牙鲆的 *efhd2* 和 *tbcd25*

基因在血液中表达量最高(侯吉伦等, 2019)。血液也是鱼体重要的免疫器官, 是各类免疫细胞和免疫因子的天然携带者, 在鱼体免疫应答过程中发挥重要的生理和生化作用。血液也是鱼体内各个器官间物质运输的载体, 机体受到感染时, 血液中的细胞因子能够快速到达病区。因此, 推测在病毒感染后, 鞍带石斑鱼 *isg15* 基因在血液中快速表达, 随着血液流动运输到病毒攻击的部位, 发挥抗病毒的免疫作用。本研究对虹彩病毒感染后鞍带石斑鱼 *isg15* 的表达变化检测发现, 在脾脏和肾脏中, *isg15* 的相对表达量呈现先升高后下降的趋势, 在感染虹彩病毒 72 h 出现峰值, 其中, 在脾脏中升高了 8 倍, 在肾脏中升高了近 11 倍, 说明鞍带石斑鱼 *isg15* 基因在对抗虹彩病毒感染的过程中响应快速, 在脾脏和肾脏中发挥着重要的防御作用。

综上所述, 本研究首次对鞍带石斑鱼 *isg15* 基因进行了 cDNA 全长克隆、进化分析及表达模式研究, 同时, 证明 *isg15* 基因在鱼体血液中的相对表达量远高于其他内脏组织, 在脾脏和肾脏中发挥着防御病毒的作用, 可为进一步研究 *isg15* 在抗病分子育种中的作用机制提供理论基础。

## 参 考 文 献

- ALTMANN S M, MELLON M T, DISTEL D L, *et al.* Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Virology*, 2003, 77(3): 1992–2002
- ÁLVAREZ-TORRES D, GÓMEZ A V, ARIZCUN M, *et al.* Identification of an interferon-stimulated gene, *isg15*, involved in host immune defense against viral infections in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 73: 220–227
- ÁLVAREZ-TORRES D, PODADERA A M, ALONSO M C, *et al.* Molecular characterization and expression analyses of the *Solea senegalensis* interferon-stimulated gene 15 (*isg15*) following NNV infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 66(1): 423–432
- BAECK G W, KIM J W, PARK C I. Identification and expression analysis of an interferon stimulated gene 15 (ISG15) from black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 679–681
- BLOMSTROM D C, FAHEY D, KUTNY R, *et al.* Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein: Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(19): 8811–8816
- Coccia E M, Battistini A. Early IFN type I response: Learning from microbial evasion strategies. *Seminars in Immunology*, 2015, 27(2): 85–101
- CUNHA J D, RAMANUJAM S, WAGNER R J, *et al.* In vitro and in vivo secretion of human *isg15*, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *Journal of Immunology*, 1996, 157(9): 4100–4108
- DAO C T. ISG15: A ubiquitin-like enigma. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10(1): 2701–2722
- FURNES C, KILENG Ø, RINALDO C H, *et al.* Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) possesses three homologues of ISG15 with different expression kinetics and conjugation properties. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(12): 1239–1246
- GIANNAKOPOULOS N V, ARUTYUNOVA E, LAI C, *et al.* ISG15 Arg151 and the ISG15-conjugating enzyme Ube1L are important for innate immune control of Sindbis virus. *Journal of Virology*, 2009, 83: 1602–1610
- GRAY M J, CHINCHAR V G. *Ranaviruses: Lethal pathogens of ectothermic vertebrates*. New York, USA: Springer, 2015, 9–57
- HOU J L, GUO Y N, FU Y S, *et al.* Cloning and expression analysis of *efhd2* and *tbcl25* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 57–68 [侯吉伦, 郭亚男, 付元帅, 等. 牙鲆 *efhd2* 和 *tbcl25* 基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 57–68]
- HUBEL P, URBAN C, BERGANT V, *et al.* A protein-interaction network of interferon-stimulated genes extends the innate immune system landscape. *Nature Immunology*, 2019, 20(4): 493–502
- LANGEVIN C, AA L M V D, HOUEL A, *et al.* Zebrafish ISG15 exerts a strong antiviral activity against RNA and DNA viruses and regulates the interferon response. *Journal of Virology*, 2013, 87(18): 10025–10036
- LENSCHOW D J, LAI C, FRIAS-STAHLEI N, *et al.* IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(4): 6–1371
- LIN F C, YOUNG H A. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2014, 25(4): 369–376
- LIU C S, SUN Y, ZHANG M, *et al.* Identification and analysis of a *Sciaenops ocellatus* ISG15 homologue that is involved in host immune defense against bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 167–174
- LIU C, ZHAO Q N, LI X Q, *et al.* Progress on ubiquitin-like protein ISG15. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(11): 92–97 [刘诚, 赵倩楠, 李晓泉, 等. 类泛素蛋白 ISG15 研究进展. *动物医学进展*, 2014, 35(11): 92–97]
- LIU M J, REIMSCHUESSEL R, HASSEL B A. Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15 kDa (ISG15) orthologue: A ubiquitin-like gene induced by

- nephrotoxic damage. *Gene*, 2002, 298(2): 129–139
- LOEB K R, HAAS A L. The interferon inducible 15 kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(11): 7806–7813
- MALAKHOV M P, KIM K I, MALAKHOVA O A, *et al.* High-throughput immunoblotting: Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(19): 16608–16613
- MORENO P, ALVAREZ-TORRES D, GARCIA-ROSADO E, *et al.* Differential antiviral activity of European sea bass interferon-stimulated 15 protein (ISG15) against RGNNV and SJNNV betanodaviruses. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 83(1): 148–157
- OHTA T, UEDA Y, ITO K, *et al.* Anti-viral effects of interferon administration on sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(4/5): 1064–1071
- OKUMURA F, ZOU W, ZHANG D E. ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes and Development*, 2007, 21(3): 255–260
- OZATO K, SHIN D M, CHANG T H, *et al.* TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(11): 849–860
- ROBERTSEN B. The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 172–191
- ROBERTSEN B, BERGAN V, RØKENES T, *et al.* Atlantic salmon interferon genes: Cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2003, 23(10): 601–612
- RØKENES T P, LARSEN R, ROBERTSEN B. Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology*, 2007, 44(5): 950–959
- SEPPOLA M, STENVIK J, STEIRO K, *et al.* Sequence and expression analysis of an interferon stimulated gene (ISG15) from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, 31(2): 156–171
- SKAUG B, CHEN Z J. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell*, 2010, 143(2): 187–190
- WANG S Y, WANG L, CHEN Z F, *et al.* Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene in the half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鲷多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 51–57]
- WANG S, XU W T, LI M, *et al.* Molecular cloning and expression pattern analysis of TGF- $\beta$ 1 in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 78–87 [王杉, 徐文腾, 李明, 等. 斑石鲷 TGF- $\beta$ 1 基因克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 78–87]
- WANG W, ZHANG M, XIAO Z Z, *et al.* *Cynoglossus semilaevis* ISG15: A secreted cytokine-like protein that stimulates antiviral immune response in a LRGG motif-dependent manner. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44884
- YASUIKE M, KONDO H, HIRONO I, *et al.* Identification and characterization of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* interferon-stimulated gene 15 (Jf-ISG15). *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, 34(1): 83–91
- YOO J S, KATO H, FUJITA T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 20: 131–138
- ZOU J, SECOMBES C J. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376–1387
- ZHAO C, DENISON C, HUIBREGTSE J M, *et al.* Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(29): 10200–10205
- ZHANG Y B, WANG Y L, GUI J F. Identification and characterization of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in crucian carp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 52–61
- ZHOU Q, GAO H, ZHANG Y, *et al.* A chromosome-level genome assembly of the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) provides insights into its innate immunity and rapid growth. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(5): 1322–1332

(编辑 冯小花)



## Molecular Characterization and Expression Analyses of the Viral Infection of the Interferon-Stimulated Gene 15 (*isg15*) in *Epinephelus lanceolatus*

MA Teng<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>1①</sup>, ZHAO Yuzhu<sup>1,2</sup>, WU Yaolei<sup>1,2</sup>, ZHOU Qian<sup>1</sup>,  
CHEN Zhangfan<sup>1</sup>, ZHU Chunhua<sup>3</sup>, CHEN Songlin<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Guangdong Research Centre on Reproductive Control and Breeding Technology of Indigenous Valuable Fish Species, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

**Abstract** This study aimed to explore the pathogenic mechanism of the iridescent virus and provide the theory basis for clinical diagnosis and treatment in *Epinephelus lanceolatus*. The full-length *E. lanceolatus* interferon-stimulated gene 15 (*isg15*) was obtained by PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of *isg15* was 910 bp, including an open reading frame (ORF) of 468 bp, which encoded a polypeptide of 155 amino acids. The molecular mass of the deduced amino acid sequence was 17.09 kDa, with an estimated pI of 9.33. Conserved domain analysis revealed that the *isg15* protein of *E. lanceolatus* contained two ubiquitin-like domains, and the C-terminal had a highly conserved motif of "Leu Arg Leu Arg Gly Gly (LRLRGG)". Sequence and phylogenetic analyses showed that the amino acid sequence of *isg15* in *E. lanceolatus* had the closest identity to *Epinephelus coioides*, with a similarity of approximately 88.24%. In addition, the homologous similarity of the *E. lanceolatus* *isg15* with *Scophthalmus maximus* and *Larimichthys crocea* was 61.18% and 60.59%, respectively. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression patterns of the *isg15* gene in the healthy tissues of *E. lanceolatus* and the changes in the spleen and kidney at different times after infection with the iridovirus. The results showed that the *isg15* gene was mainly expressed in the blood of *E. lanceolatus* and was highly expressed in various immune-related tissues, such as the liver and kidney. Upon induction with iridovirus, *isg15* gene expression was up-regulated in the kidney and spleen, and reached a peak at 72 h, indicating that *isg15* may play an important role in the immune response of *E. lanceolatus* against viral infection. In this study, the analyses and expression patterns of *isg15* in *E. lanceolatus* were studied, which is helpful to further understand the antiviral regulatory mechanism of *isg15* in teleosts, and provides a theoretical basis for the disease-resistant molecular breeding of *E. lanceolatus*.

**Key words** *Epinephelus lanceolatus*; Iridovirus; Interferon stimulated gene 15; Anti-viral gene; Immune response

① Corresponding author: WANG Lei, E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn