

## 鲫鱼干扰素调节因子 1 功能初步研究

史燕<sup>1,2</sup> 赵哲<sup>1</sup> 张义兵<sup>1</sup> 朱新平<sup>2</sup> 石军<sup>1</sup> 张奇亚<sup>1</sup> 桂建芳<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072; 2. 中国水产科学院珠江水产研究所,广州 510380)

**摘要:**将鲫鱼 *IRF1* 基因的 ORF 与真核表达质粒 pDNA3.1(+) 相连,构建了真核重组表达载体,转染并通过 G418 筛选获得了稳定转染 *IRF1* 基因的细胞株。同时利用原核表达系统成功获得了包含鲫鱼 *IRF1* C 端 165 个氨基酸的多肽,制备了抗鲫鱼 *IRF1* 的多克隆抗体。进一步从 RNA 和蛋白水平证明,在稳定转染 *IRF1* 基因的细胞株中 *IRF1* 能够组成型的过量表达,并且 *IRF1* 的过量表达伴随 *IFN* 基因的表达水平增强。同时 Poly I:C 的诱导能使稳定表达 *IRF1* 的细胞中干扰素系统基因 *STAT1* 和 *IFI58* 的表达显著增强。研究结果表明,过量表达 *IRF1* 能调控鲫鱼 *IFN* 以及 *ISG* 基因的表达。

**关键词:** *IRF1*; 基因转染; 过量表达; 多克隆抗体; 表达调控

**中图分类号:** S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)04-0509-06

干扰素调节因子 (Interferon regulatory factor, IRF) 是一类转录因子,主要调节 I 型干扰素 (Type I IFN)、干扰素刺激基因 (Interferon stimulated genes, ISGs)、其他细胞因子和趋化因子的表达<sup>[1,2]</sup>。IRF 家族已发现 9 个成员, N 端为保守的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD), 由 115 个氨基酸组成, 形成螺旋-转角-螺旋 (Helix-turn-helix) 的结构, 在 DNA 识别区包含五个高度保守的色氨酸 (Trp)<sup>[3]</sup>。IRF1 是 IRF 家族中最早被发现的成员, 在许多细胞中都有组成型表达<sup>[4]</sup>。深入研究表明, 在病毒感染的细胞中, IRF1 能够与 *IFN*- 基因启动子的特殊序列结合, 从而激活 *IFN*- 的表达。

鱼类 *IRF1* 的研究始于对牙鲈 *IRF1* 基因的克隆<sup>[5]</sup>。目前, *IRF1* 基因在虹鳟、河豚、斑马鱼和鲫鱼等鱼类中已得到克隆<sup>[5-10]</sup>。过量表达牙鲈 *IRF1* 能够诱导牙鲈细胞的抗病毒状态, 伴随一种细胞因子的产生<sup>[11]</sup>。但这种细胞因子是否就是干扰素, 以及抗病毒状态的产生是否与过量表达 *IRF1* 导致的 *ISG* 的表达有关还没有直接证据。最近, 本实验室证明鲫鱼 *IRF1* 定位在细胞核, 提示鲫鱼 *IRF1* 可能参与 *ISG* 的表达调控<sup>[12]</sup>。利用基因转染方法, 本研究进一步获得了稳定转染并过量表达鲫鱼 *IRF1* 的细胞株。进一步分析表明, 过量表达 *IRF1* 能诱导

鲫鱼 *IFN* 以及 *ISG* 基因的表达。

### 1 材料与方法

**1.1 重组质粒的构建** 根据本实验室克隆的鲫鱼 *IRF1* 基因的全长 cDNA 序列 (EF174419), 利用原核表达载体 pET32a(+) 和真核表达载体 pDNA3.1(+) 的多克隆位点, 设计特异引物, 分别含有酶切位点 *EcoR* / *Xho* 和 *Nhe* / *Kpn* (表 1)。从鲫鱼囊胚细胞 (Blastulae embryonic cells of crucian carp, CAB) smart cDNA 文库中 PCR 扩增 *IRF1* 基因目的片段, PCR 程序为 94 预变性 5min, 32 个循环扩增 (94 变性 30s, 58 退火 30s, 72 延伸 60s), 最后 72 延伸 10min。用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 再对 pET32a(+), pDNA3.1(+) 质粒和 *IRF1* 基因目的片段分别进行双酶切, 回收目的片段。连接、转化 DH5 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序。

**1.2 细胞培养、基因转染及 Poly I:C 诱导** CAB 用含 10% 新生牛血清的 199 培养基 (GBCO) 置 28 常规培养。用构建好的 pDNA3.1/*IRF1* 重组质粒转染 CAB 细胞。用于基因转染的 CAB 细胞传代于 6 孔板中, 8—24h 细胞密度为 90% 左右。转染时, 4μg 质粒和 10μL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 分别与 250μL 无血清 199 培养基混匀, 5min 后混

收稿日期: 2007-08-30; 修订日期: 2008-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (NO. 30471333, 30671617) 资助

作者简介: 史燕 (1980—), 女, 汉族, 安徽来安人; 博士; 主要从事鱼类免疫遗传学研究。E-mail: syan800@yahoo.com.cn

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

合,温育 20min后加入细胞中吸附培养 6h,换新鲜 199培养基培养,48h后,换含浓度为 300 $\mu$ g/mL G418的新鲜 199培养基继续培养,每 3天换一次培养基。得到稳定整合的细胞后,换含 200 $\mu$ g/mL

G418的 199培养基培养。设转染 pcDNA3.1 (+)空质粒的 CAB 细胞为对照。Poly I C (Sigma, 100 $\mu$ g/mL) 诱导稳定转染 pcDNA3.1/*IRF1* 和 pcDNA3.1 (+)空载体的细胞,参照本实验室方法<sup>[13]</sup>。

表 1 实验所用引物序列及作用

Tab. 1 Primers used for all the experiments

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequences(5'-3')	作用 Usage
RF1Y-F	AGA GAA TTCGGTCGTGACAGCCGGAA	质粒构建
RF1Y-R	GATCTCGAGTGA GAGGACACA TGGTCGG	Plasmid construction
RF1Z-F	ACA TCGCTAGCTACTAAACCA TGCCCTG	质粒构建
RF1Z-R	ACGAGGGTACCGTACGAGGTTGAG	Plasmid construction
RFIRT-F	CGGCTGGGAGGTGGACAAA	Real-time PCR
RFIRT-R	GCCGCA GCCTTTGTGTGATG	
CaSTAT1-F	AA GAA GCGGCAACA GATGGC	Real-time PCR
CaSTAT1-R	CA TACACGGCTGTCCTCCA	
CaIF58-F	AGACCACCCACACGTCG	Real-time PCR
CaIF58-R	GAGGTCA TCA GGCCTGGTAC	
CaIFN-F	GCTCTGCTTGC GAA TGGCT	Real-time PCR
CaIFN-R	AGGCGTCTGGAAATGACA	
-actin F	CACTGTGCCCA TCTACGAG	Real-time PCR
-actin R	CCA TCTCCTGCTCGAAGTC	

**1.3 原核表达与多克隆抗体的制备** 将构建的原核表达质粒 pET32a/*IRF1* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),小量培养优化条件,再按 1:100 的比例,37 $^{\circ}$ C 扩大培养至 OD 值为 0.6,用 1mmol/L 的 IPTG 于 28 $^{\circ}$ C 诱导表达 12h后,收集菌体。超声破碎表达菌,收集上清中的目的蛋白,用 Ni-NTA 离子交换树脂亲和层析法 (Novagen) 纯化蛋白。用纯化后的蛋白免疫白兔,分 3 次免疫,每次间隔 15 天,每次蛋白量约 400 $\mu$ g。第一次用完全弗氏佐剂乳化蛋白,后两次用不完全弗氏佐剂乳化蛋白。第三次免疫 10d 后采血,收集血清。

**1.4 Real-time PCR** 细胞总 RNA 利用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取。取 10 $\mu$ g 总 RNA,在 20 $\mu$ L 体系中以随机引物法合成 cDNA 第一链 (Promage),采用 SYBR Green I Dye (Invitrogene) 在 DNA Engine Chromo 4 Real-time System (MJ Research) 上进行 Real-time RT-PCR。反应体系: 1 $\mu$ L cDNA 为模板,0.2 $\mu$ mol/L 引物,1U Taq DNA 聚合酶,0.1 $\mu$ mol/L dNTP,1 $\times$  缓冲液。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min,94 $^{\circ}$ C 20s,53 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 20s,共 38 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。*-actin* 作为内参扩增,所有反应均重复三次。结果利用  $2^{-C(T)}$  方法计算目的基因相对 *-actin* 的表达倍数关系<sup>[14]</sup>。

**1.5 Western blot 检测和免疫吸附实验** 细胞总蛋白利用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取。相同量的蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶 (溶于 TBST 中) 封闭 1h,以 1:1000 比例加入抗鲫鱼 RF1 多克隆抗体,室温反应 1h。TBST (25mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 洗涤 3 次,1:1000 加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体 (Vector),室温 1h,洗去二抗后在 BCIP/NBT (Promega) 底物中显色。为了进一步鉴定兔抗 RF1 多克隆抗体对鲫鱼 RF1 的特异性识别,将抗 RF1 多克隆抗体与过量的重组 RF1-C/His 融合蛋白在 4 $^{\circ}$ C 中和 16h,然后用于 Western blot 分析。

## 2 结果

### 2.1 稳定转染细胞系中 IRF1 mRNA 水平的检测

将鲫鱼 *IRF1* 基因的全长 ORF (870 bp) 连接到 pcDNA3.1 (+) 载体上,构建真核表达质粒 pcDNA3.1/*IRF1*。转染 CAB 细胞,经过约 1 个月的 G418 筛选,获得能在含 300 $\mu$ g/mL G418 的 199 培养基中生长的转植外源基因的细胞株。比较已经获得的两种转植外源基因的细胞株 (转染 pcDNA3.1/*IRF1* 的 CAB 细胞和转染空载体 pcDNA3.1 的 CAB 细胞) 中

*IRF1* 基因的表达, real-time PCR 检测显示, 鲫鱼 *IRF1* 基因在 mRNA 水平的表达明显增强, 增加倍数约 750 倍 (图 1), 表明 *IRF1* 在稳定转染的 CAB 细胞中能过量表达。检测鲫鱼 *IFN* 基因在两种细胞株中的表达发现, 在过量表达 *IRF1* 基因的 CAB 细胞中, *IFN* 基因 mRNA 的组成型表达水平显著提高, 表达量是转染空载体细胞的 2.25 倍 (图 1)。

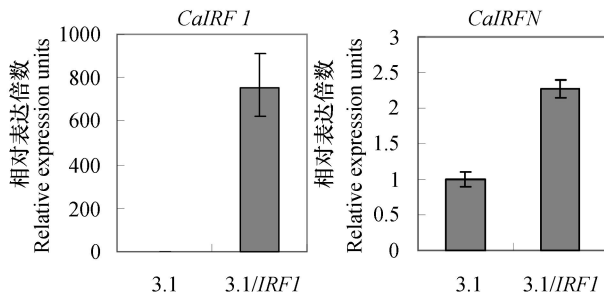


图 1 稳定转染 pDNA3.1 和 pDNA3.1/*IRF1* 质粒细胞株的 real-time PCR 检测

Fig.1 Expression of *CaIRF1* and *CaIFN* mRNA in cells stably transfected with plasmids pDNA3.1 and pDNA3.1/*IRF1* by real-time PCR

3.1: 稳定转染 pDNA3.1 的 CAB 细胞株; 3.1/*IRF1*: 稳定转染 pDNA3.1/*IRF1* 的 CAB 细胞株; 每个样品做三组重复计算标准偏差; 相对表达量计算以 *-actin* 基因为内参

3.1: the CAB cells stably transfected with plasmid pDNA3.1; 3.1/*IRF1*: the CAB cells stably transfected with plasmid pDNA3.1/*IRF1*; Error bars represent standard deviations obtained by measuring each sample three times from three independent experiments; The shown data have been normalized to *-actin* gene expression

## 2.2 *IRF1* 融合蛋白的表达和纯化

将包含 *IRF1* C 端 165 个氨基酸的 cDNA 片段连接到 pET32a, 构建原核表达质粒 pET32a/*IRF1*, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳检测到一个 42kDa 蛋白条带, 符合预期融合蛋白 *IRF1*-C/His 的大小, 对照菌在相同位置没有明显蛋白带存在。检测表达融合蛋白的菌体经超声波破碎后的上清和沉淀, 发现目的蛋白大部分在上清中。收集上清用镍离子亲和树脂纯化, 成功纯化出融合蛋白 *IRF1*-C/His (图 2)。

## 2.3 稳定转染细胞系的蛋白水平检测

以融合蛋白作为免疫原制备了兔抗 *IRF1* 多克隆抗体。Western blot 检测表明, 稳定转染鲫鱼 *IRF1* 基因的细胞中, *IRF1* 蛋白表达显著高于稳定转染空载体的细胞 (图 3 中 1 和 2 泳道)。Western blot 检测的蛋白分子质量约为 41kDa, 与预期一致。经免疫吸附实验发现, 经过量的重组 *IRF1*-C/His 融合蛋白中和后的抗 *IRF1* 多克隆抗体不能识别稳定转染鲫鱼

*IRF1* 基因的细胞中 41kDa 的蛋白 (图 3 中 3 和 4 泳道), 证明了兔抗 *IRF1* 多克隆抗体的识别特异性。

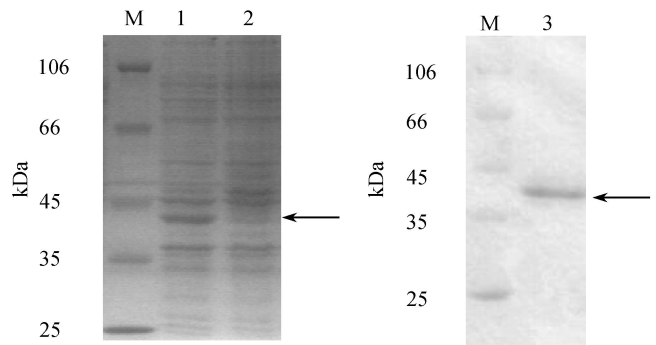


图 2 鲫鱼 *IRF1* C 端多肽融合蛋白的原核表达及纯化

Fig.2 Expression of *CaIRF1* C-terminal sequence

1: 1mmol/L IPTG 诱导 12h 产物; 2: 未诱导产物; 3: 诱导蛋白纯化产物; M: 蛋白分子量标准

1: Protein induced with 1mmol/L IPTG; 2: Uninduced protein; 3: *IRF1*-C/His fusion protein; M: Protein marker

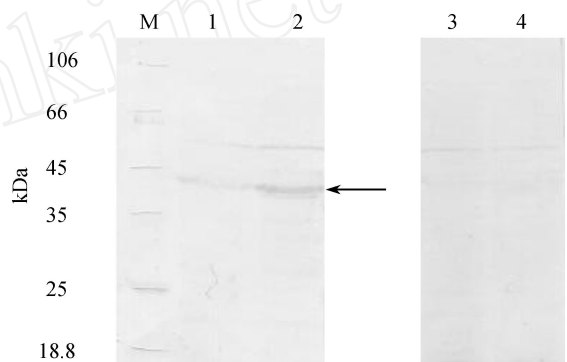


图 3 稳定转染 pDNA3.1 和 pDNA3.1/*IRF1* 质粒细胞株 *IRF1* 蛋白表达的 Western blot 检测

Fig.3 Expression of *CaIRF1* protein in cells stably transfected with plasmids pDNA3.1 and pDNA3.1/*IRF1* by Western blot

1: 稳定转染 pDNA3.1 的细胞蛋白; 2: 稳定转染 pDNA3.1/*IRF1* 的细胞蛋白; 3 和 4: 免疫吸附后的 pDNA3.1 和 pDNA3.1/*IRF1* 的细胞蛋白; M: 蛋白分子量标准

1: Protein of CAB cells stably transfected with plasmid pDNA3.1; 2: Protein of CAB cells stably transfected with plasmid pDNA3.1/*IRF1*; 3 and 4: The anti-*CaIRF1* antiserum was pre-adsorbed with the purified recombinant *IRF1*-C/His peptide for 16h at 4 °C, and subsequently used in western blotting; M: Protein marker

## 2.4 Poly I:C 诱导稳定筛选细胞的基因表达

为了检测 *IRF1* 过量表达对干扰素系统其他基因表达的影响, 用 poly I:C 诱导稳定整合 pDNA3.1/*IRF1* 的细胞和空载体 pDNA3.1 的细胞, 然后利用 real-time PCR 检测相关基因的表达。结果显示, 经 poly I:C 诱导后, 在整合空载体的细胞中, *STAT1* 和

*IF158* 基因的表达量分别是未诱导的 41 倍和 80 倍,而在稳定整合 *pDNA3.1/IRF1* 的细胞中,*STAT1* 和 *IF158* 基因的表达量分别是未诱导的 56 倍和 122

倍,*STAT1* 和 *IF158* 基因的表达量分别比空载体细胞高 15 倍和 42 倍,表明过量表达 *IRF1* 对于其他基因的表达有显著影响(图 4)。

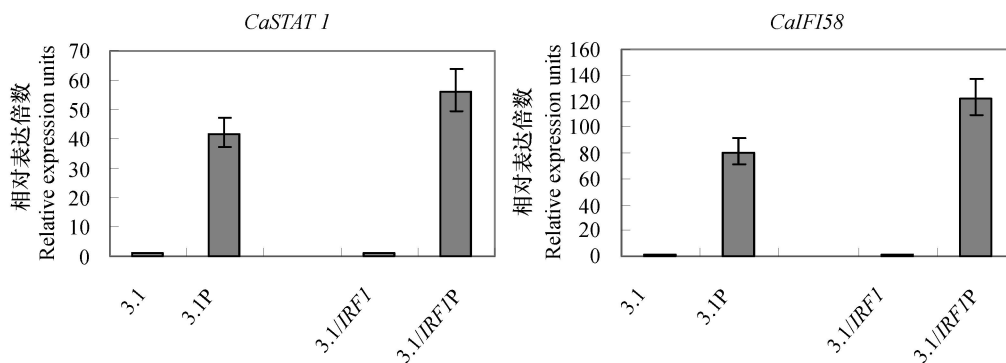


图 4 Poly I C 诱导稳定转染外源基因细胞的 real-time PCR 检测

Fig. 4 Expression of *CaSTAT1* and *CaIF158* by real-time PCR in the stably transfected cells treated with poly I C

3.1 和 3.1/*IRF1* 分别为转染 *pDNA3.1* 和 *pDNA3.1/IRF1* 质粒的两种筛选细胞; 3.1P 和 3.1/*IRF1P* 分别为 poly I C 诱导后的两种细胞;

每个样品做三组重复计算标准偏差, 相对表达量计算以 *-actin* 基因为内参

3.1 and 3.1/*IRF1* showed the CAB cells stably transfected with plasmids *pDNA3.1* and *pDNA3.1/IRF1*; 3.1P and 3.1/*IRF1P* showed the stably transfected CAB cells treated with poly I C; Error bars represent standard deviations obtained by measuring each sample three times from three independent experiments; The shown data have been normalized to *-actin* gene expression

### 3 讨论

鱼类 *IRFs* 家族在结构上与哺乳类相似, N 端约 115 个氨基酸为 DBD 结构域, 非常保守。在制备多克隆抗体时, 为了保证抗体识别的特异性, 往往选取蛋白序列中较特异的片段通过原核表达后作为抗原。本研究原核表达鲫鱼 *IRF1* 的 C 端长 165 个氨基酸的多肽用于抗体制备, 既去除了 *IRFs* 家族中保守的 DBD 结构域, 又在最大程度上保留了多个抗原识别位点。参照朱蓉等的方法<sup>[15]</sup> 进行的免疫吸附实验也证明了制备的抗鲫鱼 *IRF1* 抗体能特异性识别 *IRF1* 蛋白。

目前鱼类已鉴定的 *IRFs* 家族基因有四种, *IRF1*、*IRF2*、*IRF3* 和 *IRF7* genes<sup>[5-10]</sup>, 但很少见到功能研究的报道。最近的研究表明, *IRF1* 表达与牙鲆细胞抗病毒状态的形成有关<sup>[11]</sup>。在本实验中, 通过筛选稳定整合并过量表达鲫鱼 *IRF1* 的细胞株, 证明过量表达 *IRF1* 蛋白伴随 *IFN* 基因的组成型表达增强。因此, 鱼类 *IRF1* 应该具有哺乳类 *IRF1* 的类似功能, 即 *IRF1* 表达能导致细胞 *IFN* 基因的表达, 产生的 *IFN* 蛋白再诱导细胞抗病毒状态的产生。

哺乳类的研究还显示, *IRF1* 能够调控干扰素系统基因的表达。本实验室通过构建差减 cDNA 文库, 鉴定了一系列鱼类干扰素系统基因<sup>[16, 17]</sup>。本研

究在分析 poly I C 诱导转植外源基因细胞株的基因表达时发现, 在过量表达 *IRF1* 的细胞株中, 两个鲫鱼干扰素刺激基因 *STAT1* 和 *IF158* 的表达显著增强。*STAT1* 蛋白是 JAK-STAT 信号通路中的重要成分, 参与干扰素抗病毒信号的放大<sup>[18]</sup>。而 *IF158* 是重要的干扰素诱导表达基因, 虽然其生理功能还不清楚, 但是最近的研究表明, 其同一家族的两个成员 *IF156* 和 *IF154* 是干扰素发挥抗病毒作用的两个重要因素<sup>[19, 20]</sup>。因此, 过量表达 *IRF1* 还可以通过调控某些重要 ISG 的表达, 从而调控细胞抗病毒状态的形成。

除了调控干扰素系统基因的表达, *IRF1* 还与细胞生长调节、细胞凋亡等功能相关<sup>[21, 22]</sup>。最近利用 GFP 报告基因进行鲫鱼 *IRF1* 蛋白的定位研究, 发现在鲫鱼 *IRF1* 蛋白的 DBD 中, 还存在一个哺乳类 *IRF1* 不具有的核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS), 表明鲫鱼 *IRF1* 可能通过更复杂的调控方式调控干扰素系统基因的表达<sup>[12]</sup>。因此, 本文获得的稳定转染鲫鱼 *IRF1* 基因的细胞株为进一步阐明鱼类 *IRF1* 的功能提供了一个好的研究材料。

### 参考文献:

- [1] Manane Y, Heylbroeck C, Gáin P, et al Interferon regulatory factors: the next generation [J]. *Gene*, 1999, 237: 1-14

- [ 2 ] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, *et al* RF family of transcription factors as regulators of host defense [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, **19**: 23—55
- [ 3 ] Escalante C R, Yie J, Thanos D, *et al* Structure of RF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation [J]. *Nature*, 1998, **391**: 103—106
- [ 4 ] Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, *et al* Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, RF-1, that specifically binds to IFN- $\gamma$  gene regulatory element [J]. *Cell*, 1988, **54**: 903—913
- [ 5 ] Yabu T, Hirose H, Hirono I, *et al* Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1998, **7**: 138—144
- [ 6 ] Richardson M P, Tay B H, Goh B Y, *et al* Molecular cloning and genomic structure of a gene encoding interferon regulatory factor in the pufferfish (*Fugu rubripes*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, **3**: 145—151
- [ 7 ] Collet B, Hovens G C, Mazzoni D, *et al* Cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interferon regulatory factor 1 and 2 (RF-1 and RF-2) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, **27**: 111—126
- [ 8 ] Zhang Y B, Hu C Y, Zhang J, *et al* Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulator factor 7 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, **15**: 453—466
- [ 9 ] Song H D, Sun X J, Deng M, *et al* Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 16240—16245
- [ 10 ] Ordás M C, Abolín E, Costa M M, *et al* Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor-1 (RF-1) of turbot and sea bream [J]. *Mol Immunol*, 2006, **43**: 882—890
- [ 11 ] Cai pang C M, Hirono I, Aoki T. Induction of antiviral state in fish cells by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, interferon regulatory factor-1 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, **19** (1): 79—91
- [ 12 ] Shi Y, Zhang Y B, Zhao Z, *et al* Molecular characterization and functional analysis of *Carassius auratus* interferon regulatory factor-1 [J]. *Dev Comp Immunol*, 2008, **32** (2): 134—146
- [ 13 ] Zhang Y B, Jiang J, Chen Y D, *et al* The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells [J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, **31**: 232—243
- [ 14 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method [J]. *Methods*, 2001, **25**: 402—408
- [ 15 ] Zhu R, Zhang Y B, Zhang Q Y, *et al* Preparation of polyclonal antibody and virus induced tissue expression of *Paralichthys Olivaceus* HR I [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**: 119—124 [朱蓉, 张义兵, 张奇亚, 等. 牙鲈 HR I 多克隆抗体的制备及病毒诱导的组织表达分析. 水生生物学报, 2007, **31**: 119—124]
- [ 16 ] Zhang Y B, Zhang Q Y, Gui J F. Interferon system and identification of interferon system genes in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**: 317—322 [张义兵, 张奇亚, 桂建芳. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定. 水生生物学报, 2004, **28**: 317—322]
- [ 17 ] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**: 113—118 [张义兵, 石耀华, 桂建芳. 鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 2003, **27**: 113—118]
- [ 18 ] Zhang Y B, Gui J F. Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, **28**: 211—227
- [ 19 ] Terenzi F, Pal S, Sen G C. Induction and mode of action of the viral stress-inducible murine proteins, P56 and P54 [J]. *Virology*, 2000, **340**: 116—124
- [ 20 ] Guo J, Hui D J, Merrick W C, *et al* A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3 [J]. *EMBO J*, 2000, **19**: 6891—6899
- [ 21 ] Tamura T, Ishihara M, Lamphier M S, *et al* An RF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogenactivated T lymphocytes [J]. *Nature*, 1995, **376**: 596—599
- [ 22 ] Tanaka N, Ishihara M, Lamphier M S, *et al* Cooperation of the tumour suppressors RF-1 and p53 in response to DNA damage [J]. *Nature*, 1996, **382**: 816—818

## PRELIMINARY INVESTIGATION ON CRUCIAN CARP INTERFERON REGULATORY FACTOR 1 ROLE IN FISH INTERFERON SYSTEM

SHI Yan<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhe<sup>1</sup>, ZHANG Yi-Bing<sup>1</sup>, ZHU Xin-Ping<sup>2</sup>, SHI Jun<sup>1</sup>, ZHANG Qi-Ya<sup>1</sup> and GUI Jian-Fang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academic of Fishery Science, Guangzhou 510380)

**Abstract:** More attention has been paid to fish interferon (IFN) system since it played a key role in fish innate immune system. The interferon regulatory factor (IRF) family comprises transcription factors that regulate the expression of interferon and IFN-stimulated genes (ISGs) by binding to characteristic elements in their promoters. Among IRFs, at least four members, IRF1, IRF3, IRF5 and IRF7, have been implicated as direct transducers of virus-mediated IFN signaling. IRF1 was the first IRF family member known to activate the IFN gene, and found to be constitutively expressed in most cell types. In our laboratory, a cDNA library of CAB cells (Blastulae embryonic cells of crucian carp) has been established, which is an ideal cell model system for studying fish antiviral-relevant genes, and the full-length cDNA of crucian carp *IRF1* (*CaIRF1*) was cloned from the library. Furthermore, subcellular localization and inductive expression of *CaIRF1* were also characterized in the previous study. In order to further investigate the role of *CaIRF1* in fish innate immune system, the stably transfected cells were obtained with *CaIRF1* overexpression in the study. Firstly, the cDNA fragment containing C-terminal 165 amino acids of *CaIRF1* was cloned and integrated into a prokaryotic expression vector pET32a, and then a recombinant protein with the expected size was expressed under the induction of IPTG and purified according to the protocol of the His Bind Purification Kit. The anti-*CaIRF1* polyclonal antibody was prepared by immunizing rabbit with the purified recombinant protein and subsequently used to detect the stably transfected cells in western blotting analysis. Secondly, we cloned *CaIRF1* gene with in-frame restriction sites into a eukaryotic expression vector pcDNA3.1, which is under the control of a strong cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Then, the recombinant eukaryotic expression vector was transfected into CAB cells, and the stably transfected cells were selected with G418 for a month. After that, the stably transfected cells were detected to confirm the *CaIRF1* overexpression by real-time PCR and western blotting analysis. Real-time PCR analysis showed expression of *CaIRF1* was obviously higher in mRNA level in the stably transfected cells than that in the control cells; Moreover, the data also revealed that mRNA level of *IFN* gene was up-regulated in the stably transfected cells. Correspondingly, expression of *CaIRF1* was also increased in protein level in the stably transfected cells as compared with the control cells by western blotting analysis; to verify the specificity of the anti-*CaIRF1* polyclonal antibody, the antiserum was pre-adsorbed with the purified recombinant *CaIRF1*-C/H is peptide for 16h at 4 °C. As a result, the pre-adsorbed antiserum could not recognize the corresponding peptide in the subsequent western blotting. So, the results from real-time PCR and western blotting analysis confirmed that *CaIRF1* had been overexpressed in the stably transfected cells. To study effect of *CaIRF1* overexpression on expression levels of other genes in interferon system, the stably transfected cells were induced with poly I:C, and the two genes, *STAT1* and *IFI58* were detected by real-time PCR. The results displayed that the expression were obviously up-regulated in mRNA levels. In conclusion, our data indicates that *CaIRF1* may have the same function as mammalian IRF1, which mediates the antiviral state in cells by regulating the expression of *IFN* and *ISG* genes. Therefore, further studies will be needed to understand the importance of *CaIRF1* in fish interferon system.

**Key words:** IRF1; Gene transfection; Overexpression; Polyclonal antibody; Expression regulation