

黄颡鱼*FTR67*基因的克隆及功能研究

郭文浩 丹成 梅洁 张义兵

MOLECULAR CLONING AND FUNCTION ANALYSIS OF *TACHYSURUS FULVIDRACO FTR67*

GUO Wen-Hao, DAN Cheng, MEI Jie, ZHANG Yi-Bing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0109>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

斑马鱼*flr56*基因克隆表达及功能研究

MOLECULAR CLONING, EUKARYOTIC EXPRESSION AND FUNCTION STUDY OF *FTR56* FROM *DANIO RERIO*

水生生物学报. 2020, 44(1): 20–25 <https://doi.org/10.7541/2020.003>

黄颡鱼*Wnt*家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应

CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF FOUR *WNT* GENES IN YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND THEIR RESPONSE TO COPPER EXPOSURE

水生生物学报. 2018, 42(3): 463–472 <https://doi.org/10.7541/2018.058>

高温和皮质醇对黄颡鱼性别分化的影响

EFFECTS OF HIGH TEMPERATURE AND CORTISOL ON SEX DIFFERENTIATION OF YELLOW CATFISH (*TACHYSURUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2021, 45(1): 106–117 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.044>

性类固醇激素对黄颡鱼雌雄生长二态性的影响

EFFECTS OF SEX STEROID HORMONES ON SEXUAL SIZE DIMORPHISM IN YELLOW CATFISH (*TACHYSURUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 379–388 <https://doi.org/10.7541/2020.046>

黄颡鱼MHC class II基因全长的克隆及饲料维生素D₃对其组织表达的影响

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND THE EFFECT OF DIETARY VITAMIN D₃ ON TISSUE EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX– II IN YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2017, 41(5): 992–999 <https://doi.org/10.7541/2017.124>

应用DNA分子标记鉴定黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的研究

IDENTIFICATION OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*, *PELTEOBAGGRUS VACHELLI* AND THEIR INTERSPECIFIC HYBRID BY DNA MARKERS

水生生物学报. 2017, 41(2): 321–325 <https://doi.org/10.7541/2017.39>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0109

黄颡鱼 *FTR67* 基因的克隆及功能研究

郭文浩^{1,2} 丹 成² 梅 洁³ 张义兵²

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 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; 3. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 鱼类TRIM(Tripartite motif)家族的特异性扩张产生了一个硬骨鱼类特有的亚家族finTRIM (Fish novel TRIM, FTR), 为探究finTRIM在黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)先天抗病毒免疫中发挥的作用, 文章鉴定了1个与斑马鱼(*Danio rerio*) *FTR67* 同源性较高的黄颡鱼finTRIM基因, 命名为*TfFTR67* (*Tachysurus fulvidraco FTR67*)。系统进化树分析表明, *FTR67* 在有些鱼类物种中发生了基因重复, 导致基因拷贝增多。*TfFTR67* 不受SVCV的诱导表达, 是一个组成型表达的基因。过量表达*TfFTR67* 抑制poly(I:C)及RLR信号分子诱导的干扰素反应, 同时促进病毒在细胞中的复制。鉴于*TfFTR67* 与斑马鱼*FTR67* 的表达特征和功能不同, 研究结果表明, 鱼类*FTR67* 在不同物种中发生了基因重复和功能歧化。

关键词: finTRIM; 特异性扩张; 干扰素反应; 负调控; 黄颡鱼

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2023)05-0747-09



TRIM (Tripartite motif) 家族蛋白的命名源于这一类蛋白的N端有3个连续的保守结构域: 1个RING (Really Interesting New Gene)、1—2个B-Box及1个CC (Coiled-coil), 合称为RBCC^[1]。除了N端的RBCC结构域, 大多数TRIM蛋白还有不同的C端结构域。TRIM家族首先在人中被鉴定命名^[2]。此后发现, 脊椎动物的TRIM家族在不同物种中发生了不同程度的扩张。如人有80多个TRIM成员, 但硬骨鱼类除了与人保守的TRIM外, 还存在一类特有的TRIM亚家族, 称为finTRIM (Fish novel TRIM, FTR), 并首先在斑马鱼(*Danio rerio*)中进行了命名(*FTR1-84*)^[3,4]。由于finTRIM在不同的鱼类物种中也有特异性扩张, 因此有些finTRIM基因为特定物种的独有基因^[4,5]。

TRIM家族的快速扩张可能与脊椎动物免疫反应的精确调控直接相关^[6]。研究表明, 人约50%的TRIM家族成员参与干扰素(Interferon, IFN)介导的抗病毒免疫反应的调控^[7]。IFN是脊椎动物特有的, 在天然抗病毒免疫中发挥重要作用的细胞因子。在病毒感染的细胞中, 病毒复制产生的核酸能被细胞表达的模

式识别受体如RLR [Retinoic acid inducible gene- I (RIG- I)-like receptors]等快速识别, 从而诱导细胞IFN及下游如*Mx*等称为干扰素刺激基因(IFN stimulated genes)的表达, 抵御病毒入侵^[8]。鱼类finTRIM也在IFN抗病毒反应中发挥作用^[9]。如斑马鱼*FTR36*^[10]、*FTR67*^[11]和*FTR83*^[12]在鱼类细胞中过量表达时正调控IFN反应。我们实验室最近鉴定的*FTRCA1* (*FTR Carassius auratus 1*)和*FTRPC1/2/3/4*, 根据目前已知的数据分析表明是物种特异的TRIM基因, 并显现出负调控IFN抗病毒免疫反应的功能^[13-15]。

黄颡鱼是我国一种重要的淡水养殖鱼类^[16], 每年因各种病害导致巨大的经济损失^[17,18]。目前, 黄颡鱼基因组已经被成功解析^[19]。我们在系统分析黄颡鱼的TRIM家族时, 克隆了一个与斑马鱼*FTR67* 同源性高的基因。本文报道对黄颡鱼*FTR67* 基因的克隆和功能初步分析。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

3种鱼类细胞系, CAB (Crucian carp *C. auratus*)

收稿日期: 2022-03-25; 修订日期: 2022-04-15

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900302); 国家自然科学基金(31972826和32102838)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFD0900302); the National Natural Science Foundation of China (31972826 and 32102838)]

作者简介: 郭文浩(1998—), 男, 硕士; 研究方向为鱼类免疫学。E-mail: 862699825@qq.com

通信作者: 张义兵(1969—), 博士, 研究员; E-mail: ybzhang@ihb.ac.cn

blastulae embryonic cells)、EPC (Epithelioma papulosum cyprinid)和CO (Grass carp ovary)按本实验常规方法置28℃培养箱培养^[20]。SVCV (Spring viraemia of carp virus)在EPC细胞中繁殖扩增并测定病毒滴度。

1.2 黄颡鱼感染、组织RNA提取及RT-PCR

实验用黄颡鱼取自武汉市水产科学研究所(3月龄),分成两组,分别腹腔注射 1×10^7 TCID₅₀/mL的SVCV或PBS(每尾300 μL)。在注射0和48h取鳃、心、肝、脾、眼、脑、肠、鳍、头肾、体肾、皮肤和肌肉等12个组织提取总RNA,用TRUEscript RT MasterMix kit试剂盒(Aidlab公司)合成第一链cDNA。荧光定量PCR实验使用Hieff qPCR SYBR Green Master Mix试剂(YEASEN公司)在Bio-Rad CFX96™ Real-Time system上运行,每个样本设置3个重复。引物见表1。

1.3 基因克隆及序列分析

根据黄颡鱼基因组中命名为TRIM25-like (GenBank登录号: XP_027021882.1)的cDNA序列,在其3'UTR和5'UTR上设计了正向和反向两条引物。以黄颡鱼12个组织的cDNA混样为模板进行PCR扩增。扩增产物序列与登录序列完全匹配,表

表1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this experiment

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'—3')
TfFTR67-F	CAGCCTGTCACATCGAGAC
TfFTR67-R	CCAAAGCTGAGAGATGCCTTAG
TfFTR67-F-hm	GCCACTGTGCTGGATgccaccATGGCGCAGGCGGGG
TfFTR67-R-hm	TGGAATTCTGCAGATCTACCGCGCTCTTCTCCG
TfIFNpro-F-hm	GAGCTCTTACGCGTGccaccGTCGGGTGATGTTTACA
TfIFNpro-R-hm	CTCGAGCCCCGGGCTAGCATGTTCTCGCTCTCTGCTCG
TfFTR67-RT-F	CCTTCCTGCAGAGCTACCGG
TfFTR67-RT-R	GTATTTGACTCCGCATCAGCC
TfIFN-RT-F	GATCGATAAGGCCAACACAG
TfIFN-RT-R	CAGTGTCTGCTGTCCCA
TfMx1-RT-F	GCGCGAGTCTAAGTGAACAG
TfMx1-RT-R	AGCTCGAGTGGACATCTTGT
Tfactin-RT-F	GTCCGTGACATCAAGGAGAAGC
Tfactin-RT-R	AGGAGGAAGAGGCAGCAGTG
EPCIFN-RT-F	ATGAAACTCAAATGTGGACGTA
EPCIFN-RT-R	GATAGTTTCCACCCATTTCCT
EPCMx1-RT-F	GGCTGGAGCAGGTGTTGGTATC
EPCMx1-RT-R	TCCACCAGGTCCGGCTTTGT
EPCactin-RT-F	CAGATCATGTTTGAGACC
EPCactin-RT-R	ATTGCCAATGGTGATGAC

明该基因为正常表达基因,最后命名为TfFTR67。为构建系统进化树,BLAST搜索斑马鱼*Danio rerio*、金鱼*Carassius auratus*、草鱼*Ctenopharyngodon idella*、电鳗*Electrophorus electricus*、苏氏圆腹鲱*Pangasianodon hypophthalmus*、大盖巨脂鲤*Colossoma macropomum*、虎皮鱼*Puntigrus tetrazona*、鲤*Cyprinus carpio*、胖头鱼*Pimephales promelas*、青鳉*Oryzias latipes*和红鳍东方鲀*Takifugu rubripes*等物种基因组,从每个物种中至少选择一个与TfFTR67最为同源的finTRIM序列。鉴于finTRIM与TRIM16和TRIM25最为同源,同时搜寻部分TRIM25和TRIM16序列,一同利用MEGA X软件通过邻近法构建系统进化树。运用在线软件SMART (<https://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构、在线软件JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/analysis>)分析基因启动子序列。

1.4 质粒构建

利用同源重组方法,将TfFTR67的ORF序列插入到真核表达载体pcDNA3.1(-)的EcoR V酶切位点构建TfFTR67的真核表达载体。将黄颡鱼IFN基因(GenBank登录号: NW_020847830.1)的启动子序列插入到pGL3-Basic的Nhe I酶切位点,构建荧光素酶基因表达载体(TfIFNpro-luc)。其他表达质粒见本实验室已发表论文[21, 22]。

1.5 细胞转染及荧光素酶活性检测

细胞转染使用Polyethylenimine (PEI, MW25000, 贮存浓度1 μg/μL)并参考本实验室建立的方法进行^[20]。细胞接入48孔板过夜,在第2天加入0.01 μg pRL-TK、0.1 μg启动子质粒、0.1 μg真核表达质粒(3种质粒比例为1:10:10)的混合液转染。如有需要,细胞在24h后再次转染poly(I:C)(polyinosinic-polycytidylic acid, 1 μg/mL)。细胞用双荧光素酶报告基因系统试剂盒(Promega)裂解,然后在荧光素酶分析仪(Junior LB 9509)上检测荧光素酶值。每个样品设置3个重复,每个实验重复3次以上。表达值为每个样品的荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值。

1.6 病毒滴度检测

采用微量细胞病变(Cytopathic effect, CPE)抑制法在EPC细胞中进行。将细胞接入96孔板培养过夜,去掉培养基,加入用无血清199培养基10倍梯度稀释的检测样品,每个稀释度重复8孔,每孔100 μL。28℃培养5—7d,待细胞出现明显CPE,然后加入结晶紫染色。通过TCID₅₀方法计算病毒滴度。

1.7 数据分析

使用GraphPad9.0软件进行差异显著性分析。

***表示 $P < 0.001$, **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 黄颡鱼 *TfFTR67* 的克隆鉴定

BLAST分析命名为 *TRIM25-like* (XP_027021882.1) 的黄颡鱼基因时, 发现与斑马鱼 *FTR67* 同源性高(图 1A), 因此将该基因命名为 *TfFTR67*。此外, *TfFTR67* 与苏氏圆腹鲈和草鱼的 *FTR67* 也具有很高的序列相似性, 但是与含有 C 端 PRY/SPRY 结构域的鲫 *FTRCA1* 和斑马鱼 *FTR42* 相比, 仅在 N 端具有较高的序列同源性(图 1A)。 *TfFTR67* 仅由 TRIM 蛋白的三联体结构域 RING、B-BOX 和 Coiled-coil 组成; 由于缺少 C 端结构域, *TfFTR67* 蛋白大小明显小于鲫 *FTRCA1* 和斑马鱼 *FTR42*(图 1B)。

将从斑马鱼等 12 个物种中搜索的与 *TfFTR67* 最为同源的 41 个序列, 与 12 个 TRIM16 和 TRIM25 序

列一起构建系统进化树(图 2)。我们发现所有的 TRIM16 和 TRIM25 各聚一支, 而其他聚为一支(fin-TRIM)。 *TfFTR67* 与斑马鱼、金鱼、苏氏圆腹鲈、草鱼等物种的 *FTR67* 形成一个小的进化枝, 同属于 finTRIM。尽管在斑马鱼等物种中只找到一个 *FTR67*, 但是在金鱼基因组中发现至少有 3 个序列与 *FTR67* 同源。相反, *FTR82*、*FTR83* 和 *FTR84* 在所有的硬骨鱼类中只有一个直向同源基因(Orthologous gene)。

尽管组成 *FTR67* 这个进化支的所有序列在公共数据库中命名各异, 但基因共线性分析发现: 3 个金鱼 *FTR67* 序列分别位于不同的染色体或 Scaffold 中; 且与黄颡鱼、斑马鱼和苏氏圆腹鲈 *FTR67* 的基因座相比, 上下游的基因组成非常保守(图 3)。以上结果表明, *FTR67* 在有些鱼类物种如金鱼中发生了基因复制。



图 1 *FTR67* 的氨基酸序列及蛋白结构域组成分析

Fig. 1 Multiple alignments and domain arrangements of *FTR67*s

A. 黄颡鱼、斑马鱼、苏氏圆腹鲈、草鱼 *FTR67* 与鲫 *FTRCA1* 和斑马鱼 *FTR42* 蛋白的多重序列比对; 结构域用黑框表示; (*) 和 (.) 分别表示氨基酸的一致性和相似性; B. 黄颡鱼、斑马鱼、苏氏圆腹鲈、草鱼 *FTR67* 与鲫 *FTRCA1*、斑马鱼 *FTR42* 的蛋白结构域组成

A. Multiple alignments of several fish *FTR67* proteins and crucian carp-specific *FTRCA1* and zebrafish *FTR42*. The domains of protein are indicated by boxes. The identical (*) and similar (.) amino acids are indicated; B. Schematic representation of *FTR67* from yellow catfish, striped catfish, zebrafish and goldfish, crucian carp *FTRCA1* and zebrafish *FTR42* proteins

2.2 黄颡鱼FTR67不受病毒诱导表达

RT-PCR结果显示: SVCV感染能显著诱导 IFN

和 $Mx1$ 在黄颡鱼组织中的转录表达(图 4A), 但几乎不能诱导 $TfFTR67$ 的表达(图 4B)。鉴于被病毒或

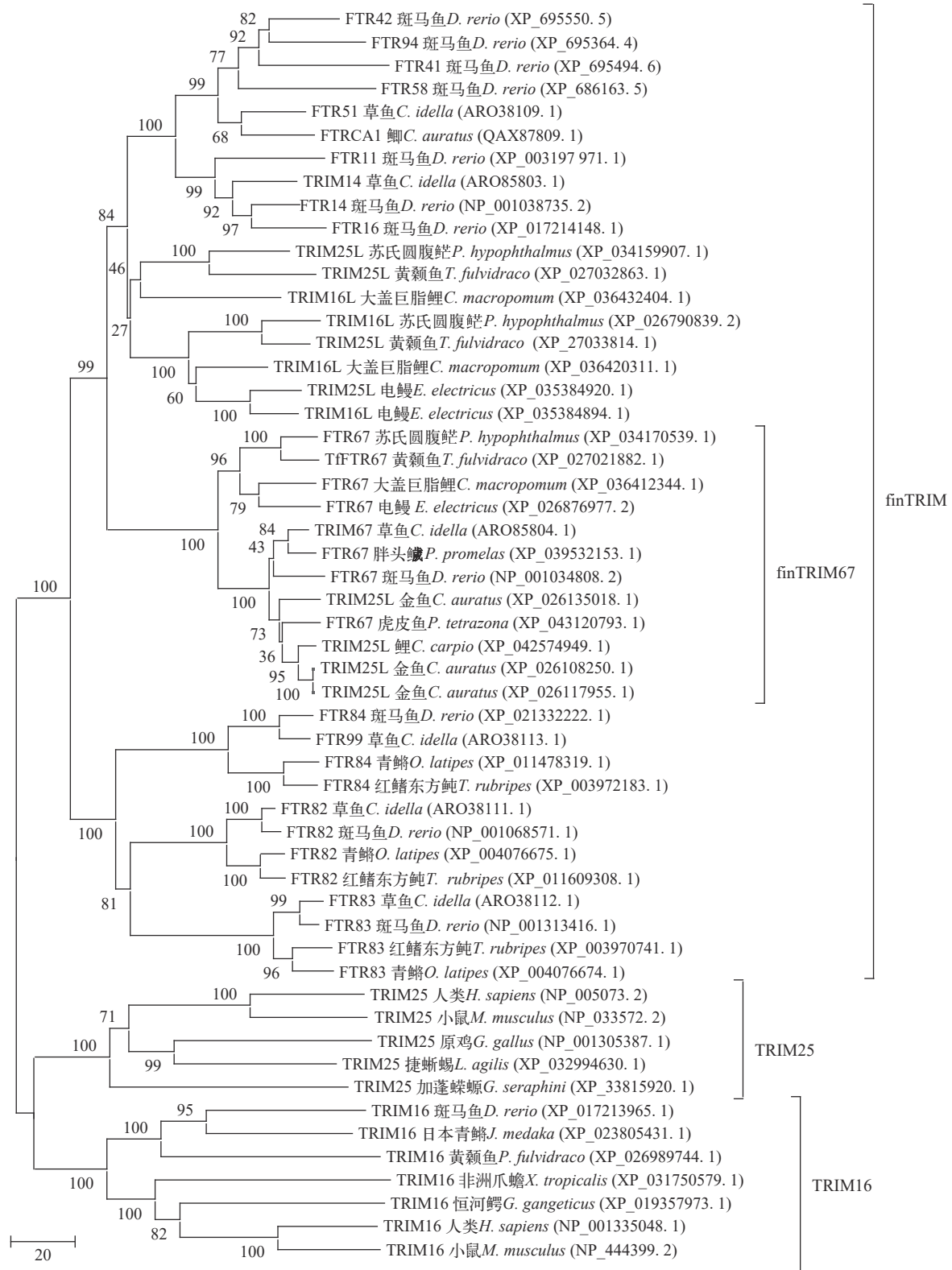


图 2 黄颡鱼FTR67的系统进化树分析

Fig. 2 The evolutionary relationship of yellow catfish FTR67 with other finTRIM proteins

利用MEGA X软件进行多重序列比对, 在此基础上运用邻近法构建系统进化树

A neighbor-joining tree is constructed based on analysis of protein sequences using MEGA X program

IFN诱导表达的基因的启动子上一般存在特异的干扰素刺激反应元件[ISRE, 一致序列为(G/A/T)GAAAN(1-2)GAAA(G/C)(A/T/C)]^[23, 24], 我们分析了*TfFTR67*基因的5'侧翼序列, 在距转录起始位点上游的1 kb 之内的序列中没有找到可能的ISRE基序(图 4C), 但是能找到如SP1、NF- κ B等转录因子的结合基序(图 4D)。因此, *TfFTR67*是一个组成型表达的黄颡鱼*finTRIM*基因。

2.3 过量表达黄颡鱼*FTR67*负调控IFN介导的抗病毒反应

我们克隆了*TfIFN*基因的一段566 bp长的5'侧翼序列(-620)~(-55), 发现该序列存在2个典型的ISRE元件(图 5A)。用该序列构建*TfIFN*启动子驱动荧光素酶表达的质粒(*TfIFN*pro-luc; 图 5B)。转染poly(I:C)及RLR信号通路分子均能诱导*TfIFN*pro-luc的活性(图 5C), 证明该5'侧翼序列具有启动子活性。

相同的转染实验还发现: 过量表达*TfFTR67*抑制poly(I:C)对*TfIFN*pro-luc的激活, 而且具有剂量依赖性; 此外, *TfIFN*pro-luc的组成型表达也能被过量表达的*TfFTR67*所抑制(图 5D)。用斑马鱼IFN ϕ 1启动子驱动的荧光素酶质粒(DrIFN ϕ 1pro-luc)进行类似实验, 也获得了相同的结果(图 5E)。以前的研究表明, 转染poly(I:C)通过RLR介导的信号途径来诱导IFN的表达^[22]。与对照相比, 过量表达*TfFTR67*同样能够抑制RLR信号分子(RIG-I、MDA5、MAVS、MITA、TBK1、IRF3和IRF7)对鱼类IFN启动子的激活(图 5F)。

2.4 过量表达黄颡鱼*FTR67*促进SVCV复制

先期过量表达*TfFTR67*的EPC细胞, 与对照细胞相比, 用SVCV病毒感染后CPE更显著(图 6A), 且细胞上清液中的病毒是对照上清的8倍(图 6B)。在

过量表达*TfFTR67*的细胞中, 内源*IFN*和*Mx1*基因的转录受到了显著抑制(图 6C)。以上结果表明, 过量表达*TfFTR67*可能通过抑制细胞的IFN反应促进病毒的复制。

3 讨论

TRIM家族首先在人基因中获得系统解析, 并被依次命名^[2]。鉴于斑马鱼的基因组相对完整, 因此斑马鱼TRIM家族成员在鱼类中最先获得命名^[4]。命名原则: 如果确定与人TRIM存在直向同源的进化关系, 如*TRIM16*和*TRIM25*等, 则在斑马鱼中也被命名为*TRIM16*和*TRIM25*; 对于特异于硬骨鱼类的*finTRIM*家族, 也先期在斑马鱼中依次命名(*FTR1-84*)^[4]。

随着越来越多的鱼类物种被成功解析了基因组, 公共数据库也积累了越来越多的TRIM同源基因。但由于大多没有经过系统的进化分析, 因此, 很多序列在命名上存在着混乱。比如很多*fin-TRIM*基因简单以*TRIM16L*或*TRIM25L*命名, 以致难以区分这些基因之间的差异。这是因为只要是*fin-TRIM*亚家族成员, 就只与*finTRIM*家族以外的*TRIM16*和*TRIM25*最为同源。有些*finTRIM*基因即使经过了进化树分析, 但是由于在分析时采用的序列数据不足, 因此也可能得出不太正确的结论。如*FTR82/83/84*在所有鱼类物种中都存在“一一对应”的直向同源基因^[4], 但是在公共数据库中, 草鱼*FTR84*就被命名为*FTR99*(ARO38113.1; 图 2), 青鳉(XP_004076674.1)和河豚(XP_003970741.1)的*FTR84*则被简单命名为*TRIM16L*^[13]。

由此可见, 对于物种特异的*finTRIM*, 如果简单以与斑马鱼的某个FTR同源而命名, 就容易引起误

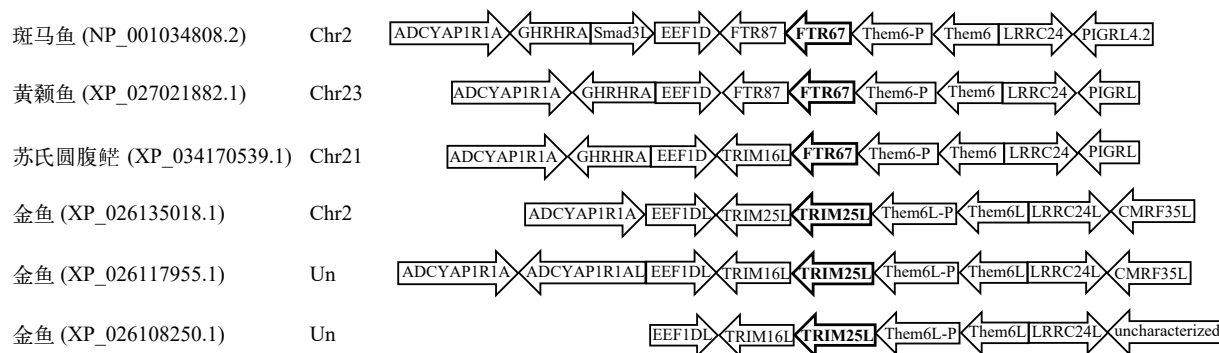


图 3 黄颡鱼、苏氏圆腹鲱、斑马鱼和金鱼*FTR67*基因座位的共线性分析

Fig. 3 Syntenic analyses of *FTR67* gene loci from yellow catfish, striped catfish, zebrafish and goldfish

通过BLAST分析并结合进化树分析, 三个粗体*TRIM25L*为金鱼*FTR67*同源基因, 黑框中的*TRIM16L*和*TRIM25L*实际上是*FTR87*的同源基因, *GMRF35L*是*PIGRL*的同源基因

BLAST searches combined with phylogenetic tree analyses show that three goldfish *TRIM25L*s in bolds are the orthologs of *FTR67*, the *TRIM25L* and *TRIM16L* in boxes are the orthologs of *FTR87*, and *GMRF35L* is the ortholog of *PIGRL*

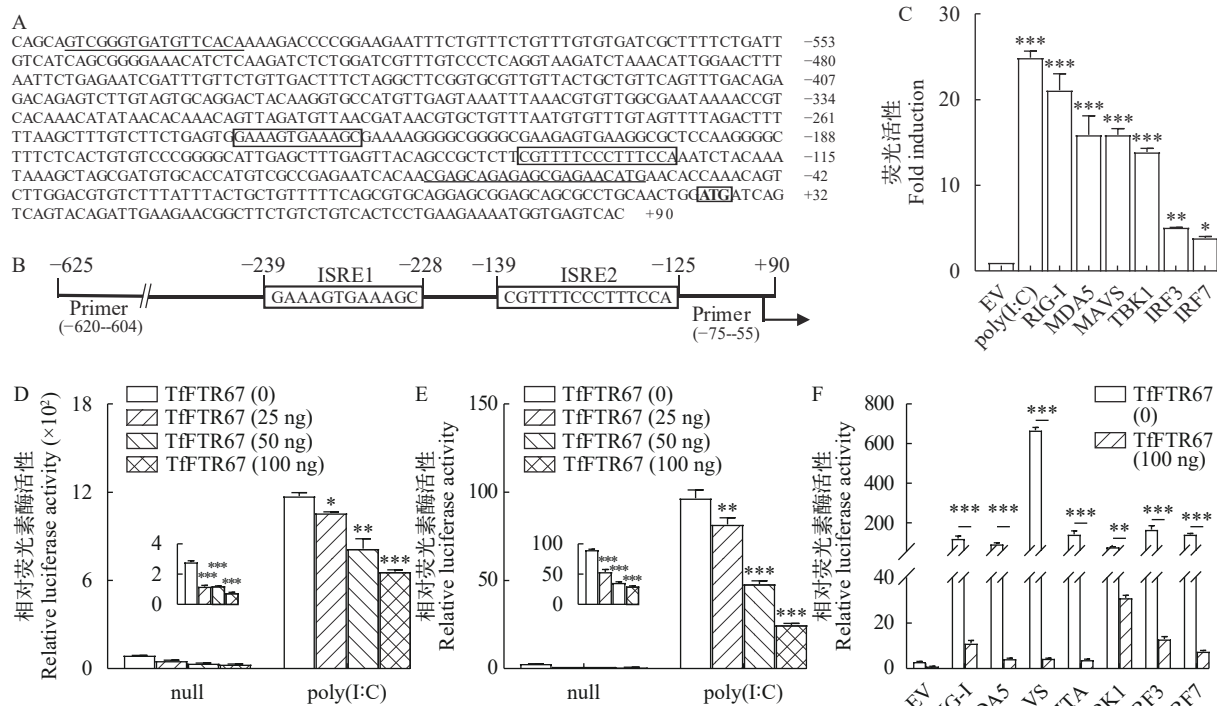


图5 过量表达TfFTR67抑制干扰素反应

Fig. 5 Overexpression of TfFTR67 negatively regulates IFN response

A. 黄颡鱼*IFN*基因的5'侧翼序列; 黑框表示预测的ISRE基序, 下划线序列用于克隆TfIFN启动子序列构建TfIFNpro-luc质粒的引物, 黑框框体字表起始密码子; B. TfIFNpro-luc表达质粒示意图; 数字表示相对于转录起始位点碱基对的位置; C. 转染poly(I:C)及过量表达RLR信号分子激活黄颡鱼IFN启动子的活性; D和E. 过量表达TfFTR67抑制胞内poly(I:C)诱导的TfIFNpro-luc的激活(D)及DrIFN1pro-luc的激活(E); F. 过量表达TfFTR67抑制RLR信号分子对DrIFN1pro-luc的激活

A. 5' flanked sequences of yellow catfish *IFN* gene. The putative ISRE motifs are indicated in box, and the underlined highlights the primer for cloning TfIFN promoter DNA to construct TfIFN-pro-luc. The transcription start site is indicated by box and in bold; B. Schematic of TfIFNpro-luc. Numbers indicate the positions of base pairs relative to the transcription start site of TfIFN; C. Yellow catfish IFN promoter is activated by poly (I:C) transfection and overexpression of each of RLR signaling molecules; D and E. Overexpression of TfFTR67 inhibit the poly (I:C)-triggered activation of TfFTR67pro-luc (D) and DrIFN1pro-luc (E); F. Overexpression of TfFTR67 inhibit the activation of DrIFN1pro-luc by RLR signaling molecules

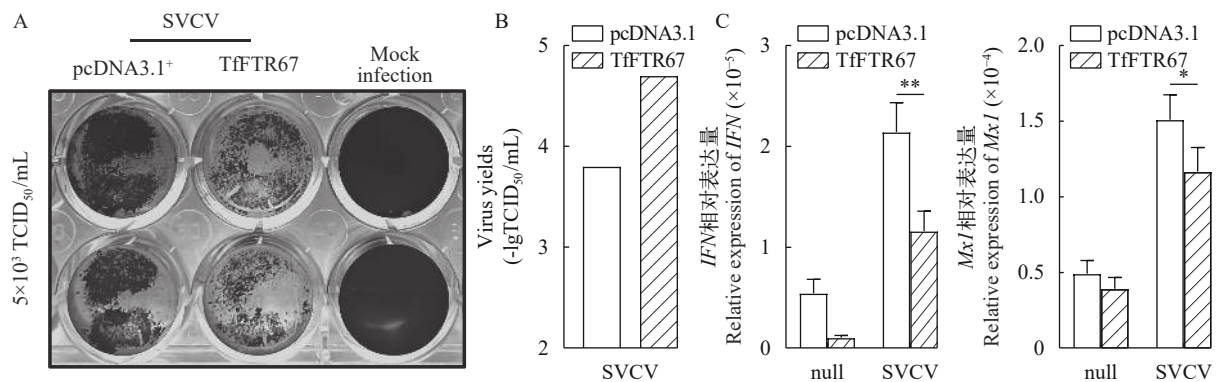


图6 过量表达TfFTR67促进病毒复制

Fig. 6 Overexpression of TfFTR67 promotes viral replication

在EPC细胞中过量表达TfFTR67, 12h后感染SVCV(5×10³ TCID₅₀/mL)。继续培养72h后, 通过结晶紫染色观察细胞CPE(A), 检测细胞上清液中的病毒滴度(B), RT-PCR检测细胞中*IFN*和*Mx1*基因的转录(C)

EPC cells transfected with TfFTR67 are infected with SVCV (5×10³ TCID₅₀/mL), followed by crystal violet staining observation (A), viral title detection of supernatants (B), and RT-PC detection of *IFN* and *Mx1* transcripts (C)

基因在不同物种中的基因拷贝发生了变化,同时也发生了功能歧化。

参考文献:

- [1] Reddy B A, Etkin L D, Freemont P S. A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1992, **17**(9): 344-345.
- [2] Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments [J]. *Embo Journal*, 2001, **20**(9): 2140-2151.
- [3] van der Aa L M, Levraud J P, Yahmi M, *et al.* A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish [J]. *BMC Biology*, 2009(7): 7.
- [4] Boudinot P, van der Aa L M, Jouneau L, *et al.* Origin and evolution of TRIM proteins: new insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(7): e22022.
- [5] Langevin C, Levraud J P, Boudinot P. Fish antiviral tripartite motif (TRIM) proteins [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(86): 724-733.
- [6] Rajsbaum R, Garcia-Sastre A, Versteeg G A. TRIM-munity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, **426**(6): 1265-1284.
- [7] Versteeg G A, Rajsbaum R, Sanchez-Aparicio M T, *et al.* The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors [J]. *Immunity*, 2013, **38**(2): 384-398.
- [8] Zhao X, Gong X Y, Li Y L, *et al.* Characterization of DNA binding and nuclear retention identifies zebrafish IRF11 as a positive regulator of IFN antiviral response [J]. *Journal of Immunology*, 2020, **205**(1): 237-250.
- [9] Li Y L, Zhang Y B. Ubiquitination-mediated regulation of RLR-triggered antiviral signaling in fish and mammals [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 976-988. [李依琳, 张义兵. 鱼类和哺乳类RLR介导的抗病毒免疫反应的泛素化修饰调控 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(5): 976-988.]
- [10] Chen B, Huo S, Liu W, *et al.* Fish-specific finTRIM FTR36 triggers IFN pathway and mediates inhibition of viral replication [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(84): 876-884.
- [11] Huo S, Jiao H, Chen B, *et al.* FTR67, a member of the fish-specific finTRIM family, triggers IFN pathway and against spring viremia of carp virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(103): 1-8.
- [12] Langevin C, Alekseejeva E, Houel A, *et al.* FTR83, a member of the large fish-specific finTRIM family, triggers IFN pathway and counters viral infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017(8): 617.
- [13] Wu M, Zhao X, Gong X Y, *et al.* FTRCA1, a species-specific member of finTRIM family, negatively regulates fish IFN response through autophagy-lysosomal degradation of TBK1 [J]. *Journal of Immunology*, 2019, **202**(8): 2407-2420.
- [14] Wu M, Dan C, Gui J F, *et al.* Fish species-specific TRIM gene FTRCA1 negatively regulates interferon response through attenuating IRF7 transcription [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(90): 180-187.
- [15] Li Y L, Zhao X, Gong X Y, *et al.* Molecular identification and function characterization of four finTRIM genes from the immortal fish cell line, EPC [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020(113): 103775.
- [16] Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, *et al.* YY supermale generated gynogenetically from XY female. in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 718-725. [刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从XY雌鱼雌核发育产生YY超雄黄颡鱼 [J]. *水生生物学报*, 2007, **31**(5): 718-725.]
- [17] Xiong Y, Wang S, Dan C, *et al.* The role of antimicrobial peptide HB β -C in *Ichthyophthirius multifiliis* resistance in all-male and hybrid yellow catfish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(5): 975-985. [熊阳, 王帅, 丹成, 等. 抗菌肽HB β -C在全雄和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异中的作用 [J]. *水生生物学报*, 2021, **45**(5): 975-985.]
- [18] Zhang X, Shen W, Xu C, *et al.* Discovery of a novel Piscanivirus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in China [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2019(74): 103924.
- [19] Gong G, Dan C, Xiao S, *et al.* Chromosomal-level assembly of yellow catfish genome using third-generation DNA sequencing and Hi-C analysis [J]. *GigaScience*, 2018, **7**(11): giy120.
- [20] Li Y L, Gong X Y, Qu Z L, *et al.* A novel non-mammalian-specific HERC7 negatively regulates IFN response through degrading RLR signaling factors [J]. *Journal of Immunology*, 2022, **208**(5): 1189-1203.
- [21] 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]. *Journal of Immunology*, 2010, **185**(12): 7573-7582.
- [22] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, *et al.* Fish MITA serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7 [J]. *Journal of Immunology*, 2011, **187**(5): 2531-2539.
- [23] Zhao X, Zhang Y B. IRF-mediated regulation of IFN antiviral response in fish [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, **45**(9): 1592-1604. [赵祥, 张义兵. 鱼类IRF家族在干扰素抗病毒免疫反应中的调控功能 [J]. *水产学报*, 2021, **45**(9): 1592-1604.]
- [24] Zhang Y B, Gui J F. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, **38**(2): 193-202.

MOLECULAR CLONING AND FUNCTION ANALYSIS OF *TACHYSURUS FULVIDRACO FTR67*

GUO Wen-Hao^{1,2}, DAN Cheng², MEI Jie³ and ZHANG Yi-Bing²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: TRIM (Tripartite motif) proteins play direct antiviral and indirect regulatory roles in vertebrate innate antiviral responses. The independent expansion of fish TRIM family gives rise to a subfamily unique to teleosts, named finTRIM (fish novel TRIM, FTR). In the current study, we identified a yellow catfish *finTRIM* gene, which is most homologous to zebrafish (*Danio rerio*) *FTR67*, thus named *TfFTR67* (*Tachysurus fulvidraco* *FTR67*). Phylogenetic tree analysis showed that *FTR67* has undergone gene duplication in some fish species, resulting in increased gene copies. RT-PCR showed that *TfFTR67* is virally inducible and thus is a constitutively expressed gene. Overexpression of *TfFTR67* inhibited the interferon response induced by poly(I:C) transfection and overexpression of RLR signaling molecules, and also promoted virus replication in fish cells. A previous report has shown that zebrafish *FTR67* is induced by virus infection, and overexpression of zebrafish *FTR67* enhances fish interferon response. Therefore, yellow catfish *FTR67* displays the expression characteristics and function features that are different from those of zebrafish *FTR67*. In addition, three copies of *FTR67* are found in goldfish genome, indicating that there is independent expansion of *FTR67* gene in certain fish species. Actually, we do not know whether there is only one copy of *FTR67* gene in yellow catfish genome although a single one is found up to now. These data together suggest that fish *FTR67* has undergone gene duplication and functional diversification after radiation of fish species.

Key words: finTRIM; Independent expansion; Interferon response; Negative regulation; *Tachysurus fulvidraco*

“健康养殖”专栏征稿函

为加快我国水产养殖方式转变,提升产业发展质量,全力推进水产养殖业绿色健康发展,《水生生物学报》特组织“健康养殖”专栏,现面向广大学者征稿。

“健康养殖”专栏长期征稿,请登录《水生生物学报》官网(ssswxb.ihb.ac.cn)在线投稿,要求论文选题新颖,具有创新性;写作条理清晰,文字简练流畅,论点明确,数据可靠。

感谢您一直以来的大力支持!欢迎您踊跃投稿!