|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 第 35 卷 第 1 期 | 广东海洋大学学报 | Vol.35 No.1 |
| 2015 年 2 月 | Journal of Guangdong Ocean University | Feb. 2015 |

红笛鲷 ***IRAK-4*** 基因 **cDNA** 全长的克隆及组织表达分析

黄郁葱 1,2,3,4，鲁义善 3,4，简纪常 3,4，吴灶和 4, 5

（1. 中国科学院南海海洋研究所，广东 广州 510301；2. 中国科学院大学，北京 100049 ；3. 广东海洋大学水产学院 // 4. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室，广东 湛江 524088；5. 仲恺农业工程学院，广东 广州 510225）

摘 要：白细胞介素-1 受体相关激酶 4 ( interleukin-1 receptor-associated kinase 4，IRAK-4) 是一种参与机体先天性免疫和适应性免疫反应过程中的关键分子。采用 RT-PCR 和cDNA 末端快速扩增（RACE-PCR）的方法从红笛鲷（*Lutjanus sanguineus*）头肾中克隆 *IRAK-4* 基因的 cDNA 全序列（登录号：KF279357）。该序列全长 2 015 bp，包含 5′ 非编码区（5′ UTR）205 bp，3′ 非编码区（3′ UTR）421 bp，开放阅读框（ORF）1 389 bp，编码

462 个氨基酸。根据推导的氨基酸序列预测其蛋白分子质量为 52.0 ku，理论等电点为 5.19。氨基酸序列比对结果显示，红笛鲷 *IRKA-4* 基因氨基酸序列与其他物种的同源性为 54.2% ~ 85.7%。系统进化分析结果显示，红笛鲷与斜带石斑鱼（*Epinephelus coioides*）聚为一支，两者有较近的亲缘关系。用荧光定量 PCR 分析红笛鲷基因的组织表达差异，红笛鲷 *IRKA-4* 基因在各组织中均有不同程度的表达，其中在皮肤、肝脏和胃中表达量最高，其次是胸腺、鳃、心脏、肠、肌肉和脾脏，在头肾、后肾和脑的表达量最低。

关键词**：**红笛鲷；IRAK-4；基因克隆；组织表达

中图分类号：Q78；Q959.483 文献标志码：A 文章编号：1673-915（9 2015）01-0018-10

**Full-length cDNA Cloning and Tissue Expression Analysis of *IRAK-4***

**Gene from Humphead Snapper (*Lutjanus sanguineus*)**

# HUANG Yu-cong 1, 2, 3,4, LU Yi-shan 3, 4, JIAN Ji-chang3, 4, WU Zao-he 4, 5

（1. *South China Sea Institute of Oceanology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Guangzhou* 510301, *China*;

2. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*; 3. *Fisheries College*, *Guangdong Ocean University* // 4. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology*

*for Aquatic Economic Animals*, *Zhanjiang* 524088, *China*; 5. *Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, *Guangzhou* 510225, *China*）

# **Abstract**: Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) is a key molecular which participates in the innate immune and adaptive immune processes. In this paper, full length cDNA sequence of *IRAK-4* gene was amplified by RT-PCR and RACE PCR from head kidney of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus* (GenBank accession number: KF279357). The total cDNA sequence of humphead snapper *IRAK-4* was 2 015 bp, including 3' UTR of 421 bp，5' UTR of 205 bp，an open reading frame (ORF) of 1 389 bp encoding 462 amino acids with Molecule Mass of 52.0 ku and pI of 5.19. The deduced amino acid sequence of humphead snapper IRAK-4 shared 54.2% - 85.7% identities with other species IRAK-4. Phylogenetic analysis showed that humphead snapper was clustered closely with orange-spotted grouper. In addition, the mRNA expression levels in different tissues were analyzed by

收稿日期：2014-12-30

基金项目：十二五国家科技支撑计划（2012BAD17B03），广东省海洋经济创新发展区域示范专项（GD2012-B01-004），国家自然基金（41240041） 第一作者：黄郁葱（1978－），男，讲师，主要从事水产动物病害防治。E-mail : [hyczjou@163.com](mailto:hyczjou@163.com)

通信作者：吴灶和，教授，主要从事水产动物免疫学及病害控制。E-mail : [wuzaohe@163.com](mailto:wuzaohe@163.com)

# real time quantitative PCR. The result showed that humphead snapper *IRAK-4* expressed in all examined tissues with highest levels in skin, liver and stomach, moderate levels in thymus, gill, heart, intestine, muscle and spleen, and lowest levels in head kidney, kidney and brain.

**Key words**: *Lutjanus sanguineus*; *IRAK-4*; gene cloning; tissue expression

# 先天性免疫是机体抵抗病原入侵的第一道防线，它的启动主要依赖于模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）识别病原体病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns， PAMPs)[1]。Toll 样受体（Toll-like receptors, TLRs） 作为机体最重要的模式识别受体之一，通过启动不同信号途径参与机体的先天性免疫与获得性免疫调节，在宿主防御微生物感染中起重要作用[2-5]。白细胞介素-1 受体相关激酶（interleukin-1 receptor-asso- ciated kinase, IRAK）是 TLR 信号通路中的重要接头分子，在信号通路中发挥重要的枢纽作用。迄今为止，哺乳类的 IRAK 家族共鉴定出 4 个成员： IRAK-1、IRAK-2、IRAK-M 和 IRAK-4。其中 IRAK-1

和 IRAK-4 在信号通路中起正向调节作用，IRAK-2 和 IRAK-M 则起负向调节作用[6-10]。该家族所有成员均有一个保守的 N-端死亡结构域（Death Domain， DD）、中央激酶区域（Kinase Domain，KD）和较长的 C 端区域（不包括 IRAK-4）。IRAK-4 是 IRAK家族中最重要的一种激酶[10-11]，通过该激酶和接头分子的作用，介导一系列胞内的信号转导，最终诱导包括前炎症细胞因子等一系列基因的表达[7-12]。*IRAK-4* 基因缺陷的小鼠 IL-1R/TLR 信号通路被严重阻断，抑制了 NF-κB 激活和炎症因子的产生，不能有效抵抗细菌和病毒攻击，表明 IRAK-4 在先天性免疫中起关键作用[13]。此外，IRAK-4 的激酶失活可抑制动脉粥样硬化的形成[14]。

目前，斑马鱼（*Danio rerio*）[15]、松江鲈鱼（*Tra*- *chidermus fasciatus*）[16]、半滑舌鳎（*Cynoglossus semi*- *laevis*）[17]、虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）[18]、石斑鱼（*Epinephelus coioides*）[19]等多种鱼类的 *IRAK-4* 基因相继得到克隆鉴定。研究发现，不同鱼类的 *IRAK-4* 组织分布不同，且在受病原细菌、寄生虫及病毒刺激后表达量上调[15-19]，表明鱼类 *IRAK-4* 在鱼体抵御病原侵染的免疫反应中可能发挥着重要作用。红笛鲷（*Lutjanus sanguineus*）是我国南方沿海地区重要的经济鱼类之一，然而近年来养殖规模的不断扩大和养殖环境不断恶化，病害频繁暴发，给其养殖业造成巨大经济损失[20]。本研究运用 RT-PCR 方法克隆到 *IRAK-4* cDNA 全序列，并分析其基因结构特征和相应的氨基酸序列及组织分布，为阐明该基因在

# 抵御病原感染过程中的作用提供依据。

1. 材料与方法
   1. 材料

健康红笛鲷（80～100 g）购自湛江某海水养殖场，大肠杆菌 DH5α和哈氏弧菌（*Vibrio harveyi*） 由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存。RNAlater 购自 Ambion 公司，Trizol 购自 Invitrogen 公司， TransStart Green qPCR SuperMix 试剂盒购自全式金生物技术公司， Ex-taq、LA-taq、M-MLV 逆转录酶、SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 等 购 自 TaKaRa 公司，Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司。

* 1. 组织采样

实验鱼暂养1 周后，随机选取健康红笛鲷3 尾， 分别取肝、头肾、脾、肾脏、脑、心脏、鳃、皮肤、肌肉、肠和胃组织，立即投入 RNAlater 中，转入

−80 ℃超低温冰箱保存备用，收集的组织主要用于

cDNA 克隆和组织分布分析。

* 1. 总 RNA 提取和 cDNA 一链合成

按 Trizol 说明书分别提取组织总 RNA。用凝胶电泳检测 RNA 完整性，用紫外分光光度计检测RNA 浓度和纯度，保证其 *D*(260 nm)/ *D*(280 nm) 在

1.8 ~ 2.0。所提取的各组织总 RNA 经 Dnase I 消化后，按照 M-MLV 说明书合成 cDNA 第一链用于后续实验。另取头肾的总RNA，按SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书分别合成用于 3′ 与5′ RACE 扩增的 cDNA 模板。

* 1. 引物设计与中间片段扩增

根据 GenBank 上已登录的 *IRAK-4* 基因核苷酸序 列（*Gadus morhua*，HM046453；*Plecoglossus altive- lis altivelis*，AB469846）的保守区域设计简并引物IRAK-4F 与IRAK-4R（表1），扩增红笛鲷*IRAK-4* 基因的部分序列。降落 PCR 反应条件如下：94 ℃ 下预 变 性 4 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，

# 5 个循环；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，5 个循 环 ；94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30 个循环；72 ℃下延伸 5 min，4 ℃条件下保存。PCR 反应产物经 10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测，切胶回收后，与 pMD-18T Vector 连接转化 DH5α，阳性克

隆送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

表 **1** 实验中所用的引物序列

### Table 1 Sequences of primers used for cloning and expression

引物名称 引物序列（5′ - 3′ ） 用途

IRAK-4F CCCACAATCCTCTCTGTCATCA

IRAK-4R TGGCGGGAGTCCAGACARTATT IRAK-4F1 GCTGATGAAGATTACAGGCAACTTTG IRAK-4F2 TGACGAGAGCATCAGCCAAACGG IRAK-4R1 GCCAGGACAGCGGAGGAGTTC IRAK-4R2 CTGGTTGGAAGGTTGTTGTAGA reIRAK-4F CATCAGCCAAACGGACATCAACG reIRAK-4R ACCTCATCTCCATCAAGAACTGT

β-actinF GTCATGTGGATCAGCAAGCAGGA

β-actinR CGCCCGAGTGTGTATGAGAAATG

同源克隆

3′ RACE-PCR

5′ RACE-PCR

荧光定量 PCR

荧光定量 PCR

* 1. *IRAK-4* 基因 3′ 与 5′ 端扩增

# 根据简并引物扩增获得的部分序列，设计

*IRAK-4* cDNA 全长的 3′ RACE 和 5′ RACE 引物

（表 1）。IRAK-4F1、IRAK-4R1 分别与试剂盒自带的 UPM Mix 引物进行 3′ 与 5′ RACE 第一轮降落PCR 扩增。反应条件为：94 ℃下预变性 3 min；94

℃ 30 s，68 ℃ 2 min，5 个循环；94 ℃ 30 s，64 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，5 个循环；94 ℃ 30 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，25 个循环；72 ℃下延伸 5 min，4

℃条件下保存。将第 1 轮 PCR 产物稀释 20 倍作为第 2 轮的模板，分别 IRAK-4F2、IRAK-4R2 与试剂盒引物 NUP 进行第 2 轮降落 PCR 扩增，反应条件为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃ 30 s，62 ℃ 45 s， 72 ℃ 2 min，30 个循环；于 72 ℃下延伸 5 min，4 ℃条件下保存。余下步骤同 1.2.3。

* 1. 生物学信息分析

扩增获得的序列使用 DNAMAN6.0 进行序列拼接，利用 N[CBI (ht](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)t[p://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) cgi) 进行序列同源性比对和相似性分析，采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)>

和 ExPASy Proteomics Server（[http://ca.expasy.org](http://ca.expasy.org/)） 推导氨基酸序列、确定开放阅读框（ORF）、计算分子质量 *m*M 和预测理论等电点 pI 等，通过在线分析 软 件 SignalP 4.0 Server (http:// [www.cbs.dtu.dk/](http://www.cbs.dtu.dk/) services/SignalP) 预测信号肽序列，采用 TMHMM Server 2.0 [(ht](http://www.cbs.dtu.dk/)t[p://www.cbs.dtu.dk/](http://www.cbs.dtu.dk/) services/TMHMM)

预测跨膜结构域，用 NetGlyc1.0（[http://www.cbs.dtu.](http://www.cbs.dtu/) dk/services/NetNGlyc）和 NetPhos2.0（http://www.cb s.dtu.dk/ services/ NetPhos/）分析蛋白质 *N*-糖基化位点和磷酸化位点，用 SMART [(http:/](http://smart.embl-hei/)/[smart.embl-hei](http://smart.embl-hei/)

delberg.de/) 和 InterProScan Sequence Search (http:// [www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search)](http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search)) 分 析蛋白质结构功能域，亚细胞定位预测采用 PSORT II Prediction（<http://psort.hgc.jp/form2.html>）。采用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.

pl?page=npsa\_sopma.html) 预测蛋白二级结构。采用 SWISS-M[ODEL(http://swissmodel.expasy](http://swissmodel.expasy.org/work).org[/work](http://swissmodel.expasy.org/work) space/ index.php?func=modelling\_simple1）预测蛋白质三维结构，使用 ClastalX 2.0 及 MEGA 6.0 软件， 以邻位相连法（neighbor-joining）构建系统进化树。

* 1. 红笛鲷 *IRAK-4* 基因的组织表达分析

# 利用引物 reIRAK-4F、reIRAK-4R 与内参基因*β-actin* 引物 β-actinF、β-actinR，通过荧光定量 PCR 分析红笛鲷 *IRAK-4* 基因在各组织中的表达。将合成的 cDNA 第一链用无菌 ddH2O 适当稀释后作为荧光定量 PCR 的模板，以红笛鲷 β-actin 为内参基因，利用 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪分析红笛鲷 *IRAK-4* 基因的表达量，每个样本设 3 个重复。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性20 s，60 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 20 s，40 个循环。PCR 反应结束后以各组织中最低的 mRNA 表达量为基准，通过 2¯ΔΔCT 方法计算红笛鲷 *IRAK-4* 基因在不同组织中的相对表达量。

1. 结 果
   1. *IRAK-4* 基因的全长 cDNA 序列分析

红笛鲷 *IRAK-4* 基因 cDNA 序列全长 2 015 bp

# （GenBank 登录号 KF279357），包含 5′ 非翻译区（5′ UTR）205 bp，3′ 非翻译区（3′ UTR）421 bp，开放阅读框 1 393 bp，编码 462 个氨基酸（图 1）。3′ UTR

含一加尾信号（AATAAA）和不稳定基序（ATTTA）。

1 CGTTTTGGGGAAGTTGCTCAATATCGGAAAGACACATTTTACTCAACTGTGAACAAAGTA

61 TCAGTACGCTAATGTTCTGCTTTTATGGATGCGTTCAATATATGAGGATAATAACAGTCA

121 TAATGGCGCTGTGAGTCGTACATCATGTCGGTGTAACCGTCAGATTAAACCTAAAGTCAG

181 GTTTGTGTCAGTATTTTGTAGCATCATGAATAATTCAGTAACTTCCGCTACTTATATTCG

M N N S V T S A T Y I R

241 CAACCTCAGTTTAAGTTTACGACGCAGGTTGTCCGATTTTCTGGACCCTCAGGACAGGTG N L S L S L R R R L S D F L D P Q D R W

301 GAAAGATGTTATTGTGTCCATACGGAAGAAGAATGGGGAGTTCAGGTACTCTCAGAATCA K D V I V S I R K K N G E F R Y S Q N H

361 TGTGAGGAGGTTTGAAGGCCTTGTTGCACGAGGTAAAAGTCCTACAGAGGAGCTGCTGAA V R R F E G L V A R G K S P T E E L L N

421 TGACTGGGGGACCACCAACAGCACAGTGGGTGAACTGATGGACATCCTGAGGAGTCACAA D W G T T N S T V G E L M D I L R S H K

481 GTTACTGGCTGCTGCTAGTGTTCTGCTACCTGAGGAAGAGGCCGTCTCATCGGAGCGACA L L A A A S V L L P E E E A V S S E R Q

541 GCAGGCCCCTCCAGCAGTAGAACTCTACAACAACCTTCCAACCAGACAGCTGGAAGAAAC Q A P P A V E L Y N N L P T R Q L E E T

601 AGAGACGCAGCGACCGCCTGACACCTCTGTTCTGCAGCCACAGAGTCCATGTGAGACCAG E T Q R P P D T S V L Q P Q S P C E T S

661 TGAACTAGAACTCACAGGTTTCTCCAGCTTCTTGTACAACGAGCTGATGAAGATTACAGG E L E L T G F S S F L Y N E L M K I T G

721 CAACTTTGATGACCGTCCCATATCGGACGGCGGCAGCAGACTGGGAGAGGGAGGCTTCGG N F D D R P I S D G G S R L G E G G F G

781 CACCGTATACAAAGGTCTCCTCAATGACAAACCTGTCGCAGTGAAAAAACTCAATCCAAT T V Y K G L L N D K P V A V K K L N P M

841 GGAGGACGTTTCCCTGGACGAGCTGCGAGTTCAGTTCAACCAAGAGATCGAAACGCTGAA E D V S L D E L R V Q F N Q E I E T L K

901 GGTGTTGAAACACGAGAACTTGGTCGACATGGTTGGATTTTCCTGTGATGGACAGCACCC V L K H E N L V D M V G F S C D G Q H P

961 ATGTTTGGTGTATGCCCTAATGGCCAATGGTTCTCTTCTAGATCGACTAGCTTGCATGGA

C L V Y A L M A N G S L L D R L A C M E

1021 GGGAACTCCTCCGCTGTCCTGGCGACAGAGATGCTTGATAGCTGAAGGTACAGCAAGTGG G T P P L S W R Q R C L I A E G T A S G

1081 TTTGGAGTATCTGCACAGTAACCATCATGTGCACAGAGATGTTAAAAGCGCAAATATCCT L E Y L H S N H H V H R D V K S A N I L

1141 GCTAGATGAAAAATTAGTGGCAAAGATCTCAGACTTTGGGCTGACGAGAGCATCAGCCAA L D E K L V A K I S D F G L T R A S A K

1201 ACGGACATCAACGACCATGATGACGGAGAGGGTTGTGGGTACCCGTGCATACATGGCACC

|  |  |
| --- | --- |
|  | R T S T T M M T E R V V G T R A Y M A P |
| 1261 | TGAGGCGCTGAGAGGAGAGATCACACCAAAATCTGATGTCTTCAGCTTTGGAGTGGTGTT |
|  | E A L R G E I T P K S D V F S F G V V L |
| 1321 | GTTAGAAATATTGTCTGGACTCCCGCCAGCGGATGAAAACCGCGAGCCACAGTTCTTGAT |
|  | L E I L S G L P P A D E N R E P Q F L M |
| 1381 | GGAGATGAGGTATGATATAGACGATGAAGACGAGGAGCTGACTTTACAGGACTTCCTGGA |
|  | E M R Y D I D D E D E E L T L Q D F L D |
| 1441 | CAAAAAGATGGGAGACTTGGAGCAGAGCCAGGTGGAGAGTGTCTACTCTTTGGCCTCTAA |
|  | K K M G D L E Q S Q V E S V Y S L A S N |
| 1501 | CTGCCTACATGACAGGAAAAACAGACGGCCAGTCATCAGACAGGTACTACTGGAGCTTAA |
|  | C L H D R K N R R P V I R Q V L L E L K |
| 1561 | AGGAGTCGTCAAGACCATTTCGCTGGATTTTTAGGCACAGGAGTGAAGTAAAGCATTCCA |
|  | G V V K T I S L D F \* |
| 1621 | GAGAAGCTGGAGGATTTCTGAGTGCACGCACTGACAAATATATTTCATTTAGTTACACAG |
| 1681 | AAATACATGTTGCTTGTTTACTGAAAAAATACGTTTTTTGCAACAGTATCTCTTTCTTTG |
| 1741 | TAATGATAAATGCTTTTTTCATCTTAACTGTAAATAATTTAATATATTTTTGTAAGAAGC |
| 1801 | ACATACCTTAGTTTTTAGTTCAGTAACTGCAGTATTCTGTAATGGCATTAAGAATTTTGT |
| 1861 | GAGGTCTCACAAAATGCCCGGAAAAATTACGAAGAGTATCTTGAAAGTGTTGAAAGCAAT |
| 1921 | TGCTCTTGCCACAGTGTTTTTATCATGTATTTATTGCAGAGAAGG***AATAAA***ATGAATGCA |
| 1981 | ACAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |

丝氨酸/苏氨酸激酶结构域用下划线表示，死亡结构域用灰度表示，糖基化位点以下划双线表示，加尾信号以加粗斜体表示。

S\_TKc is underlined and death domain is highlighted in gray. The potential N-glycosylation sites are double-underlined. The polyadenylation signal sequence is in bold and italic.

图 **1** cDNA序列及推导的氨基酸序列

**Fig.1** cDNA sequence and deduced amino acid sequence

# IRAK-4 氨基酸组成和蛋白结构分析

根据推导的氨基酸序列，预测其理论分子质量为 52.0 ku，等电点为 5.19。该基因氨基酸序列含有一个典型的 IRAK 家族所有的死亡结构域（1 ~ 104 aa）、丝氨基酸/苏氨酸激酶结构域（183 ~ 462 aa）及蛋白激酶家族的特征基序，如蛋白激酶 ATP 结合域信号（ protein kinase ATP-binding region signature，LGEGGFGTVYKGLLNDKPVAVKK）、丝氨酸/ 苏氨酸蛋白激酶活性位点信号（ Serine/ Threonineprotein kinases active-site signature,

HVHRDVKSANILLD）（图 1）。利用 SignalP 4.0 Server 程序对红笛鲷 IRAK-4 氨基酸序列进行 N 端信号肽结构的预测，未发现有信号肽序列。用TMHMM Server v.2.0 程序预测，发现该蛋白不存

在跨膜区。用 NetNGlyc 1.0 预测，发现其含有 4 个*N*-糖基化位点。用 NetPhos 2.0 软件预测，发现共有17 个丝氨酸磷酸化位点，10 个苏氨酸磷酸化位点，

1. 个酪蛋白激酶磷酸化位点。

通过 SOPMA 软件进行二级结构分析，结果显示，在 IRAK-4 蛋白的二级结构中， α- 螺旋占37.88%，β-转角占 7.58%，无规卷曲占 41.77%，延伸链占 12.77%（图 2）。将红笛鲷 DD 和 S\_TKc 氨基酸序列提交至 SWISS-MODEL 程序，自动搜索同源蛋白作模板，得到 IRKA-4 三级结构模型。结果显示，红笛鲷 DD 空间结构与小鼠的 DD 高度相似（图 3），包括 6 个α螺旋；红笛鲷 S\_TKc 空间结构与小鼠的 S\_TKc 高度相似（图 4）。

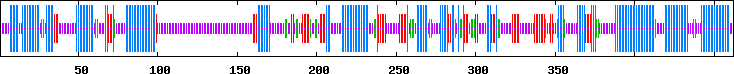
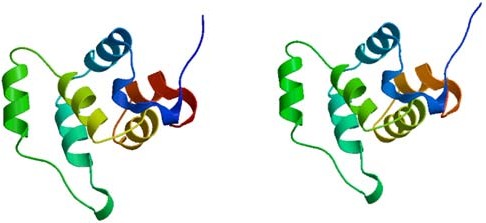


图 **2** SOPMA 软件对 IRAK4 蛋白二级结构的分析结果

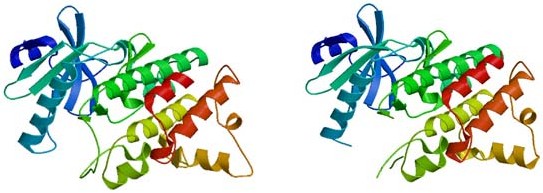
**Fig.2** Secondary structure of IRAK-4 protein analyzed by SOPMA

（a） （b）

图 **3** 预测的红笛鲷IRAK-4 DD (a)与小鼠的 IRAK-4 DD (b) 空间结构的比较

**Fig. 3** Comparison of the predicted 3D structure between sanpper IRAK-4 (1 - 106 aa) and solution structure of the death domain

from mouse IRAK-4 (PDB ID: 1wh4, chain A)



（c） （d）

图 **4** 预测的红笛鲷 IRAK-4 的 S\_TKc (c)与人 IRAK-4 的 S\_TKc (d) 空间结构的比较

**Fig.4** Comparison of the predicted 3D structure of IRAK-4 (183-462 aa) and crystal structure of the S\_TKc from human

IRAK-4(PDB ID: 2NRU, chain B)

# 氨基酸同源性比较及系统进化分析

利用 Clustal X2.0 软件，对红笛鲷 IRAK-4 和NCBI 数据库已登录的其他物种的 IRAK-4 进行氨基酸序列同源性比对分析，结果如图 5 所示，红笛鲷与其他物种的 IRAK-4 具有不同程度的同源性，

其中红笛鲷 IRAK-4 与斜带石斑鱼（*E. coioides*）、松江鲈鱼（*T. fasciatus*）和半滑舌鳎（*C. semilaevis*） 的 IRAK-4 同源性较高，同源率分别为高达 85.7%、82.7%和 72.2%，与爪蟾（*Xenopus tropicalis*）的同源性最低，为 52.1%。

*L.sanguineus* MNNSVTSATYIRNLSLSLRRRLSDFLDPQDRWKDVIVSIRKKNGEFRYSQNHVRRFEGLVARGKSPTEELLNDWG 75

*L.sanguineus* MNNSVTSATYIRNLSLSLRRRLSDFLDPQDRWKDVIVSIRKKNGEFRYSQNHVRRFEGLVARGKSPTEELLNDWG 75

*E.coioides* MNNSVTSATYIRRLSYSSLRKLSDFLDPQDRWKDVIVSIRKPNGELRYSQHHVRRFEGVVAQGKSPTVELLADWG 75

*T.fasciatus* MSSSVSSSTYVRSLSYSVRRRLSYFLDPQDRWREVIASIRKPSGELRYSQLHVRRFEGLVAQGKSPTLELLVDWG 75

*T.rubripes* MSNSVTSATYIRNLSYSIRRQLSGILDPQERWKEIIISIRKPNGDFRYSQHNVRRFAGLVAQGKSPTEELLADWG 75

*C.semilaevis* MNNSVTSATYLRNIGYSLRRQLSDFLDPQERWREVCVSIRKPSGEMRYTQLHLRRFEGVVAQRKSPTMELLNDWG 75

*G.morhua* MNKQITSSTYIRKLNFSILRKLSDFLDPDDRWKEVIVLIMKPSGEPRYTQIEVRRFASLAKQGESPTIDFLTNWG 75

*O.mykiss* MSNTITSATFIRNLNYGVRRKLSDLLDPQDSWKDVIVLIHKPTGEPRYSQQHLRRFEAVVLQGRSPTMELLNDWG 75

*I.punctatus* MSSSITSETLVRKLSHSTLRNLSDFLDPQDAWKGVLVDIHKDTGEPRYTQLHLRRFERLVTQGKSPTVELLYDWG 75

*X.tropicalis* MSKTVTPSTYVRNLSHGMHRQLADLLDPQEGWKKIAVNIMKPSGDARYSQFHIRRFEGTVQMGKSPTCELLYDWG 75

*M.musculus* MNKPLTPSTYIRNLNVGILRKLSDFIDPQEGWKKLAVAIKKPSGDDRYNQFHIRRFEALLQTGKSPTCELLFDWG 75

*H.sapiens* MNKPITPSTYVRCLNVGLIRKLSDFIDPQEGWKKLAVAIKKPSGDDRYNQFHIRRFEALLQTGKSPTSELLFDWG 75

\* \* \* \* \*\* \* \* \*

*L.sanguineus* TTNSTVGELMDILRSHKLLAAASVLLPEEEAVSSERQ-QAPPAVEL-----YNNLPTRQLEETETQRPPDTSVLQ 144

*E.coioides* TSNSTVGELVDILRSHKLLAAASVLLPVEEAATPVRQPASPPAAEP-----NSSLPTRLVGETKTQPPADSPDLQ 145

*T.fasciatus* TSNSTVGELVDILRSHKLLAAASVLLPEEEAVPPETQ-PTSPAVET-----NSLLSTRLLEETGTRPPLELAVLQ 144

*T.rubripes* TSNCTVGELVDILKSHKLLAAAAIVLP--DAVPAEAQQPDPPSAET-----YSALPTRLLDNKGTQTVPSSAPTQ 143

*C.semilaevis* TTNSTVGDLVDILRSLKLFAAASLLLPDTVGVVGSEETQILPSAAT-----HCEFPTTPLDMKATQLMSPVIPVQ 145

*G.morhua* TTNATVGELVDILKSNKLLAAAALLLP-------EPASEVLPQAEN-----DRNTPTVEFEPQ-SWPLPVCPNPQ 137

*O.mykiss* TSNCTVGELVDILMSHRLMAAASIILPYAINNPRPAVPQPPDSPRDKEMVGNSDAATRPLGRTEEQTKEQPPPDS 150

*I.punctatus* TTNCTVGELVEILIRHKLLAPARVLLPDITAAPVATHWRAVEDPPTEYHREQTQLCAVKLDKAQLKEETPSTLPD 150

*X.tropicalis* TTNCTVQDLKDLLQKNGFSAAASLLLPAKNTENVNASTRPVSSAIN----APCEMSAAEVIDTCNPHTYQSKGPE 146

*M.musculus* TTNCTVGDLVDLLVQIELFAPATLLLPDAVPQTVKSLPPREAATVAQTH-GPCQEKDRTSVMPMPKLEHSCEPPD 149

*H.sapiens* TTNCTAGDLVDLLIQNEFFAPASLLLPDAVPKTANTLPSKEAITVQQKQ-MPFCDKDRTLMTPVQNLEQSYMPPD 149

\* \* \*

*L.sanguineus* PQSPCETSEL-ELTGFSSFLYNELMKITGNFDDRPISDGGSRLGEGGFGTVYKGLLNDKPVAVKKLNPMEDVSLD 218

*E.coioides* PQILLESSE----PGFSSFLYNELMKITGNFDDRPISDGGCRIGEGGFGTVYRGLLNDKPVAVKKLNAMEDVSLD 216

*T.fasciatus* PQIPTESSEPGYTDSISSFFYNELMEITGNFDDRPVSDGGRRLGEGGFGTVYKGLLNDKPVAVKKLNPMDDISLD 219

*T.rubripes* IQLDSCDPEP---TSFSSISYNDLIKITDGFNDRPVSEGGCRLGEGGFGAVYKGVLNHKLVAVKKLIPVEDMSLE 215

*C.semilaevis* PLQTSPKLRSQDKQGFYSSTYEELMEITGNFDDRPVSGGGGRLGEGGFGTVYKGLINEKPVAVKKLTPMEDISVD 220

*G.morhua* PEKPAETAEP-DSTGYLSFLYHELMDITGNFDDRPTSEGGNRLGEGGFGTVYKGFVNNLPVAVKKLSPEEDILAD 211

*O.mykiss* TSEPQEDPEPNGTAGFLRLSFHELKKITGHFDERPVSEGGSRLGEGGFGTVYKGLINGKPVAVKKLHSMEDISLE 225

*I.punctatus* STTRPEESEEPDEEGFYSFTYRELTRITGNWDERPASLGGSRLGEGGFGIVFKGLHNIKPVAVKKLNLVDDLSPE 225

*X.tropicalis* ----ENEVDDFDDMGIGRFSFTEVKQSTNNFDIRPVSEGGNKLGEGGFGVVFKGEIKEKIVAVKKLTELVDASIQ 217

*M.musculus* SSSPDNRSVESSDTRFHSFSFHELKSITNNFDEQPASAGGNRMGEGGFGVVYKGCVNNTIVAVKKLGAMVEISTE 224

*H.sapiens* SSSPENKSLEVSDTRFHSFSFYELKNVTNNFDERPISVGGNKMGEGGFGVVYKGYVNNTTVAVKKLAAMVDITTE 224

\*

*L.sanguineus* ELRVQFNQEIETLKVLKHENLVDMVGFSCDGQHPCLVYALMANGSLLDRLACMEGTPPLSWRQRCLIAEGTASGL 293

*E.coioides* ELRVQFNQEIQTLQVLKHENLVDMVGFSSDGQHPCLVYDLMANGSLLDRLACLEGSPPLSWRRRCLIAEGTAIGL 291

*T.fasciatus* ELRVQFNQEVQTLKVLKHENLVDMVGFSCDGQHPCLVYALMVNGSLLDRLACLEGSPPLSWRQRSLIAEGTARGL 294

*T.rubripes* DLQIQFHQEIQTLTVLQHENLVDMVGFSCDGQYPCVIYPLMPNGSLLDRLACLEGTPPLSWKQRCLIAEGTASGL 290

*C.semilaevis* ELQIQFQQEIQTLKVLKHENLVDLIGFSCDGQHPCLVYAFMANGSLLDRLACLDNSLPLTWRQRCSIAEGTARGL 295

*G.morhua* ELRLQFRQEIETLKTLKHPNLVDMVGFSCDGQYPCLVYVLMDNGSVLDQLACMEESPPLSWSTRCLIATGSARGL 286

*O.mykiss* ELSVQFIQEVQTLMVLKHENLVDMVGFSRDGHHPCLVYAYMSNGSLLDRLACLDGSPPLSWHRRCLIAVGTARGL 300

*I.punctatus* ELRSQFNQEIQTLKMLKHVNLVNMVGYSCDGQYPCLVYAYMSNGSLLDRLACLDGSSPLSWQVRCAITLGTARGL 300

*X.tropicalis* DLTCQFEQEIKIMGKCQHENLVKLLGYSKDGDQYCLIYTYMPNGSLLDRLACLNDTPPISWVLRCNIAYGTANGI 292

*M.musculus* ELKQQFDQEIKVMATCQHENLVELLGFSSDSDNLCLVYAYMPNGSLLDRLSCLDGTPPLSWHTRCKVAQGTANGI 299

*E.coioides* MNNSVTSATYIRRLSYSSLRKLSDFLDPQDRWKDVIVSIRKPNGELRYSQHHVRRFEGVVAQGKSPTVELLADWG 75

*T.fasciatus* MSSSVSSSTYVRSLSYSVRRRLSYFLDPQDRWREVIASIRKPSGELRYSQLHVRRFEGLVAQGKSPTLELLVDWG 75

*T.rubripes* MSNSVTSATYIRNLSYSIRRQLSGILDPQERWKEIIISIRKPNGDFRYSQHNVRRFAGLVAQGKSPTEELLADWG 75

*C.semilaevis* MNNSVTSATYLRNIGYSLRRQLSDFLDPQERWREVCVSIRKPSGEMRYTQLHLRRFEGVVAQRKSPTMELLNDWG 75

*G.morhua* MNKQITSSTYIRKLNFSILRKLSDFLDPDDRWKEVIVLIMKPSGEPRYTQIEVRRFASLAKQGESPTIDFLTNWG 75

*O.mykiss* MSNTITSATFIRNLNYGVRRKLSDLLDPQDSWKDVIVLIHKPTGEPRYSQQHLRRFEAVVLQGRSPTMELLNDWG 75

*I.punctatus* MSSSITSETLVRKLSHSTLRNLSDFLDPQDAWKGVLVDIHKDTGEPRYTQLHLRRFERLVTQGKSPTVELLYDWG 75

*X.tropicalis* MSKTVTPSTYVRNLSHGMHRQLADLLDPQEGWKKIAVNIMKPSGDARYSQFHIRRFEGTVQMGKSPTCELLYDWG 75

*M.musculus* MNKPLTPSTYIRNLNVGILRKLSDFIDPQEGWKKLAVAIKKPSGDDRYNQFHIRRFEALLQTGKSPTCELLFDWG 75

*H.sapiens* MNKPITPSTYVRCLNVGLIRKLSDFIDPQEGWKKLAVAIKKPSGDDRYNQFHIRRFEALLQTGKSPTSELLFDWG 75

\* \* \* \* \*\* \* \* \*

## L.sanguineus E.coioides T.fasciatus T.rubripes C.semilaevis G.morhua O.mykiss I.punctatus X.tropicalis M.musculus H.sapiens

TTNSTVGELMDILRSHKLLAAASVLLPEEEAVSSERQ-QAPPAVEL-----YNNLPTRQLEETETQRPPDTSVLQ 144

TSNSTVGELVDILRSHKLLAAASVLLPVEEAATPVRQPASPPAAEP-----NSSLPTRLVGETKTQPPADSPDLQ 145

TSNSTVGELVDILRSHKLLAAASVLLPEEEAVPPETQ-PTSPAVET-----NSLLSTRLLEETGTRPPLELAVLQ 144

TSNCTVGELVDILKSHKLLAAAAIVLP--DAVPAEAQQPDPPSAET-----YSALPTRLLDNKGTQTVPSSAPTQ 143

TTNSTVGDLVDILRSLKLFAAASLLLPDTVGVVGSEETQILPSAAT-----HCEFPTTPLDMKATQLMSPVIPVQ 145

TTNATVGELVDILKSNKLLAAAALLLP-------EPASEVLPQAEN-----DRNTPTVEFEPQ-SWPLPVCPNPQ 137

TSNCTVGELVDILMSHRLMAAASIILPYAINNPRPAVPQPPDSPRDKEMVGNSDAATRPLGRTEEQTKEQPPPDS 150

TTNCTVGELVEILIRHKLLAPARVLLPDITAAPVATHWRAVEDPPTEYHREQTQLCAVKLDKAQLKEETPSTLPD 150

TTNCTVQDLKDLLQKNGFSAAASLLLPAKNTENVNASTRPVSSAIN----APCEMSAAEVIDTCNPHTYQSKGPE 146

TTNCTVGDLVDLLVQIELFAPATLLLPDAVPQTVKSLPPREAATVAQTH-GPCQEKDRTSVMPMPKLEHSCEPPD 149

TTNCTAGDLVDLLIQNEFFAPASLLLPDAVPKTANTLPSKEAITVQQKQ-MPFCDKDRTLMTPVQNLEQSYMPPD 149

\* \* \*

*L.sanguineus* PQSPCETSEL-ELTGFSSFLYNELMKITGNFDDRPISDGGSRLGEGGFGTVYKGLLNDKP

VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL VAVKKL

*E.coioides* PQILLESSE PGFSSFLYNELMKITGNFDDRPISDGGCRIGEGGFGTVYRGLLNDKP *T.fasciatus* PQIPTESSEPGYTDSISSFFYNELMEITGNFDDRPVSDGGRRLGEGGFGTVYKGLLNDKP *T.rubripes* IQLDSCDPEP TSFSSISYNDLIKITDGFNDRPVSEGGCRLGEGGFGAVYKGVLNH

KL KP LP

*C.semilaevis* PLQTSPKLRSQDKQGFYSSTYEELMEITGNFDDRPVSGGGGRLGEGGFGTVYKGLINE *G.morhua* PEKPAETAEP-DSTGYLSFLYHELMDITGNFDDRPTSEGGNRLGEGGFGTVYKGFVNN *O.mykiss* TSEPQEDPEPNGTAGFLRLSFHELKKITGHFDERPVSEGGSRLGEGGFGTVYKGLINGKP *I.punctatus* STTRPEESEEPDEEGFYSFTYRELTRITGNWDERPASLGGSRLGEGGFGIVFKGLHNIKP *X.tropicalis* ENEVDDFDDMGIGRFSFTEVKQSTNNFDIRPVSEGGNKLGEGGFGVVFKGEIKEKI

*M.musculus* SSSPDNRSVESSDTRFHSFSFHELKSITNNFDEQPASAGGNRMGEGGFGVVYKGCVNNTI

*H.sapiens* SSSPENKSLEVSDTRFHSFSFYELKNVTNNFDERPISVGGNKMGEGGFGVVYKGYVNNTT

NPMEDVSLD 218

NAMEDVSLD 216

NPMDDISLD 219

IPVEDMSLE 215

TPMEDISVD 220

SPEEDILAD 211

HSMEDISLE 225

NLVDDLSPE 225

TELVDASIQ 217

GAMVEISTE 224

AAMVDITTE 224

\*

*L.sanguineus* ELRVQFNQEIETLKVLKHENLVDMVGFSCDGQHPCLVYALMANGSLLDRLACMEGTPPLSWRQRCLIAEGTASGL 293

*E.coioides* ELRVQFNQEIQTLQVLKHENLVDMVGFSSDGQHPCLVYDLMANGSLLDRLACLEGSPPLSWRRRCLIAEGTAIGL 291

*T.fasciatus* ELRVQFNQEVQTLKVLKHENLVDMVGFSCDGQHPCLVYALMVNGSLLDRLACLEGSPPLSWRQRSLIAEGTARGL 294

*T.rubripes* DLQIQFHQEIQTLTVLQHENLVDMVGFSCDGQYPCVIYPLMPNGSLLDRLACLEGTPPLSWKQRCLIAEGTASGL 290

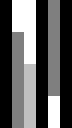
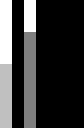
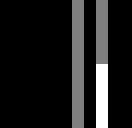
*C.semilaevis* ELQIQFQQEIQTLKVLKHENLVDLIGFSCDGQHPCLVYAFMANGSLLDRLACLDNSLPLTWRQRCSIAEGTARGL 295

*G.morhua* ELRLQFRQEIETLKTLKHPNLVDMVGFSCDGQYPCLVYVLMDNGSVLDQLACMEESPPLSWSTRCLIATGSARGL 286

*O.mykiss* ELSVQFIQEVQTLMVLKHENLVDMVGFSRDGHHPCLVYAYMSNGSLLDRLACLDGSPPLSWHRRCLIAVGTARGL 300

图 **5** 红笛鲷 IRAK-4 与其他物种 IRAK-4 氨基酸序列比对

**Fig. 5** Alignment of IRAK-4 amino acid sequences with other known IRAK-4 molecules

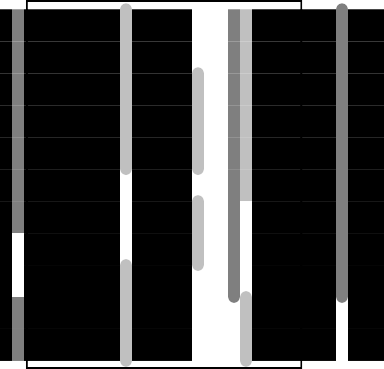
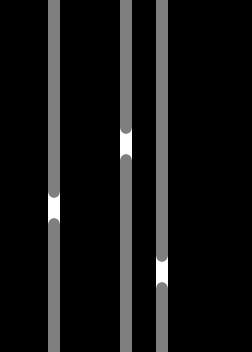
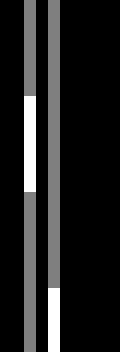
*I.punctatus* ELRSQFNQEIQTLKMLKHVNLVNMVGYSCDGQYPCLVYAYMSNGSLLDRLACLDGSSPLSWQVRCAITLGTARGL 300

*X.tropicalis* DLTCQFEQEIKIMGKCQHENLVKLLGYSKDGDQYCLIYTYMPNGSLLDRLACLNDTPPISWVLRCNIAYGTANGI 292

*M.musculus* ELKQQFDQEIKVMATCQHENLVELLGFSSDSDNLCLVYAYMPNGSLLDRLSCLDGTPPLSWHTRCKVAQGTANGI 299

*H.sapiens* ELKQQFDQEIKVMAKCQHENLVELLGFSSDGDDLCLVYVYMPNGSLLDRLSCLDGTPPLSWHMRCKIAQGAANGI 299

\*

1. *sanguineus* EYLHSNHHVHRDVKSANILLDEKLVAKISDFGLTRASAKRTSTTMMTERVVGTRAYMAPEALRGEITPKSDVFSF *E.coioides* EYLHSNHHVHRDVKSANILLDAEFVAKISDFGLTRASAKRTSTTMMTERVVGTRAYMAPEALRGEITPKSDVFSF *T.fasciatus* EYLHSNHHVHRDVKSANILLDETFVAKISDFGLTRASAKRTSTTMMTERIVGTRAYMAPEALRGEITPRSDVFSF *T.rubripes* EFVHRNHHVHRDVKSANILLDEKLVAKISDFGLTRASPKGTSTTMKTERIVGTCAYMAPEALRGQVTPKSDIFSF *C.semilaevis* EYLHRNHHVHRDVKSANILLDETLMAKISDFGLTRASTKGTSTTMMTERIVGTCAYMAPEALRGKITPKSDIFSF *G.morhua* DYLHNNHHVHRDIKSGNILLDDHFVAKISDFGLTRASPTRSSVTMQTERIVGTRAYMAPEALRGEITPKSDVFSF *O.mykiss* DYLHSNHHVHRDVKSGNILLDELLVPKISDFGLTRASATRSSATVMTERIVGTTAYMANEALRGEITPKSDIYSF *I.punctatus* EYLHNNNHIHRDVKSGNILLDESFVPKISDFGLTRASAKLSCTTVITERIVGTTAYMAPEALRGEITPKSDVFSF

368

366

369

365

370

361

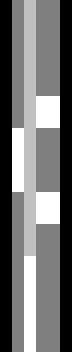
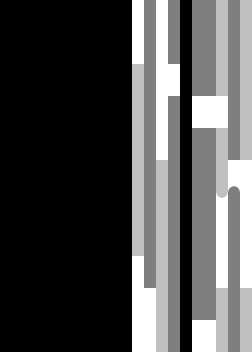
375

375

*X.tropicalis* NYLHENSHVHRDIKSANILLDDTLVPKISDFGLSRATGQ-FSKTMMTERIVGTTAYMAPEALRGEITIKSDIFSF 366

1. *musculus* RFLHENHHIHRDIKSANILLDKDFTAKISDFGLARASAR-LAQTVMTSRIVGTTAYMAPEALRGEITPKSDIYSF

*H.sapiens* NFLHENHHIHRDIKSANILLDEAFTAKISDFGLARASEK-FAQTVMTSRIVGTTAYMAPEALRGEITPKSDIYSF

\*

373

373

## L.sanguineus E.coioides T.fasciatus

KNQ

GVVLLEILSGLPPADENREPQFLMEMRYDIDDEDEELTLQDFLDKKMGDLEQSQVESVYSLASNCLHDRKNRRPV GVVLLEILSGLRPADENREPQFLMEMRYDIDDEDEELTLEDFLDKKMSDWELSQVESIYSLASNCLHDRKNRRPV GVVLLEILSGLPPAAENREPQFLMEMRHDIDDEDEELTLEDFLDKTMGDWDLSQVESVYSLACNCLHDRKNRRPV

443

441

444

## T.rubripes

GVVLLEILSGLPPVDENHNPQFLMEVPSAIEDEDEELTFEGFLDTKMEDVQLGQAESVYTLACSCLQDR

RPV

440

C.semilaevis

KVK

GVVLLEILSGLPPANENREPQFLMEFRYDIDDESEDLTLEEFIDKKMSDSELRQVETIYSLACNCLNDRKDRRPV

445

## G.morhua

GVVLLEIISGLPPVDENREMPCLMELRYEIEDEDEDLTLEGFVDKKMRDAGMAQVERTYTLACQCLEDR

RPT

436

## O.mykiss I.punctatus X.tropicalis M.musculus H.sapiens

GVVLLEILSGLPPVDENRDPKFLMEMKDEIDE--EEMALEDFVDKKMTDWDLPLVERTYFLASDCLSDKKNKRPL GVVLLEILSGLPPVDENRDPKLLMEMKDEIED--EEITLEEFIDKKILDLDMESVERMYNVASQRLNERKNRRPL GVVLLEIISGLAPVDENRSPSLLLDIKEEIEE--EEKTIEEYTDKKMGDVEPNTLKKMYTVASQCLNQMKNRRPV GVVLLELITGLAAVDENREPQLLLDIKEEIED--EEKTIEDYTDEKMSDADPASVEAMYSAASQCLHEKKNRRPD GVVLLEIITGLPAVDEHREPQLLLDIKEEIED--EEKTIEDYIDKKMNDADSTSVEAMYSVASQCLHEKKNKRPD

448

448

439

446

446

indentity(%)/similarity(%)

*L.sanguineus* IRQVLLELKGVVKTISLDF------- 100.0/100.0 462

*E.coioides* IKQVLLELKGVVKSISLDVEAQE--- 85.7/91.1 464

*T.fasciatus* IKQVLLELKGIVKSMLLYFEAQQ--- 82.7/90.3 467

*T.rubripes* SKQVLLELSGVVKSISLEQQ------ 71.6/85.5 460

*C.semilaevis* IQQVLSEIEGVVESISTTFHT----- 72.2/84.1 466

*G.morhua* IKQVLAELEDVSRGLSAAASGTGS-- 66.0/79.1 460

*O.mykiss* MEEVLTELEDVVKSISLEQLGPQSEA 65.7/79.4 474

*I.punctatus* MNEVIAELEGS--------------- 62.7/76.3 459

*X.tropicalis* ITRVLQNLEDIKNLVSSS-------- 52.1/69.5 457

*M.musculus* IAKVQQLLQEMSA------------- 54.5/73.4 459

*H.sapiens* IKKVQQLLQEMTAS------------ 54.2/74.0 460

星号所示为重要功能的氨基酸，功能基序用黑色方框标记.

Key amino acids are indicated by \*, and functional motives are boxed.

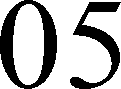
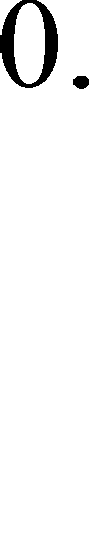
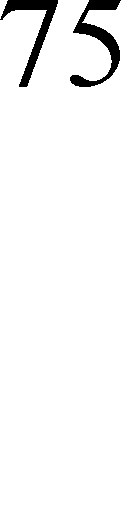
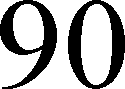
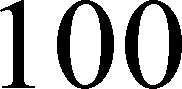
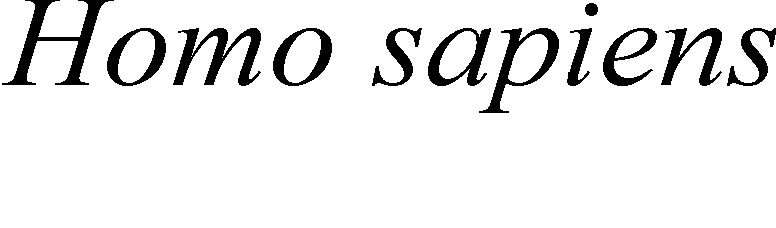
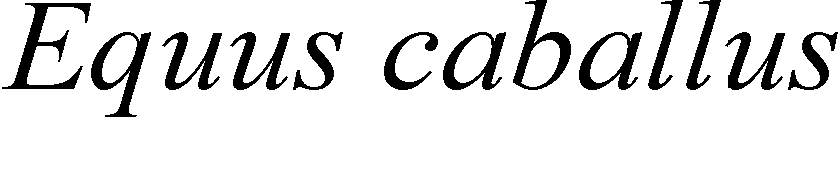
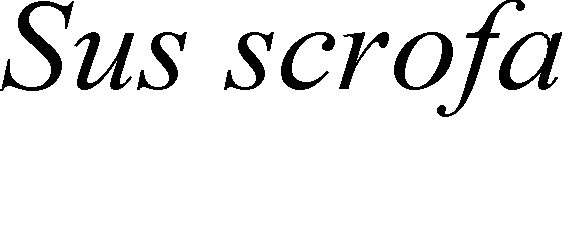
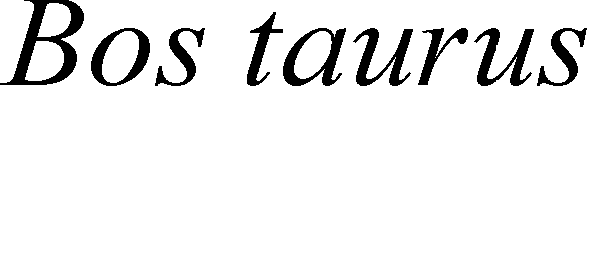
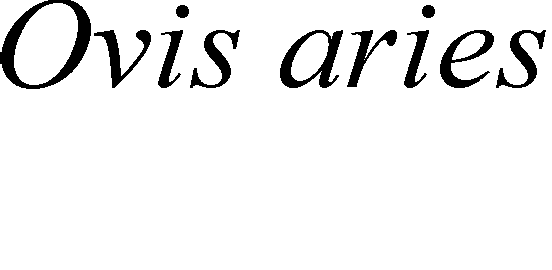
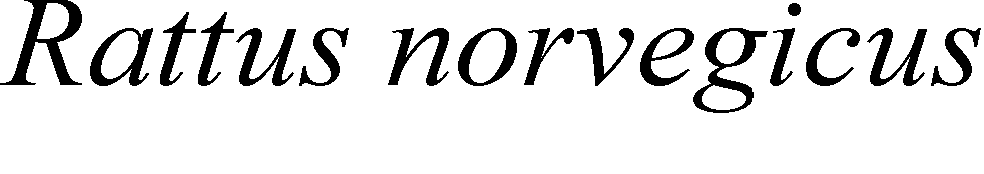
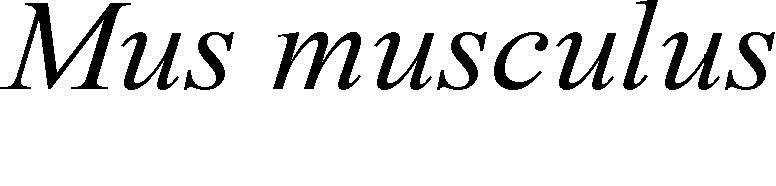
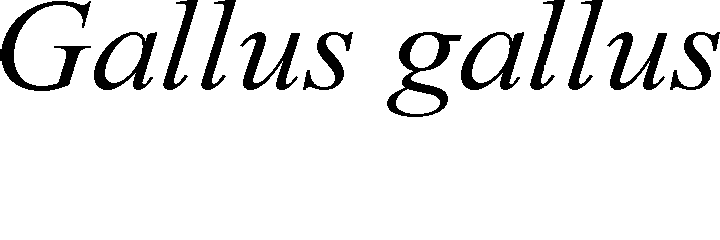
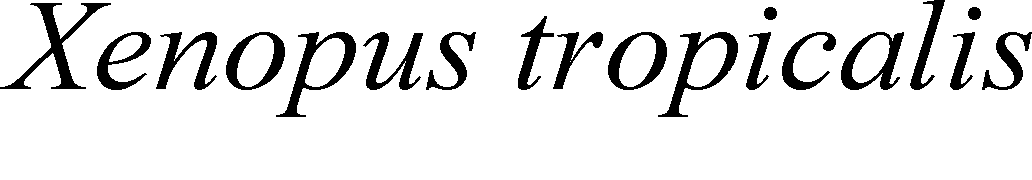
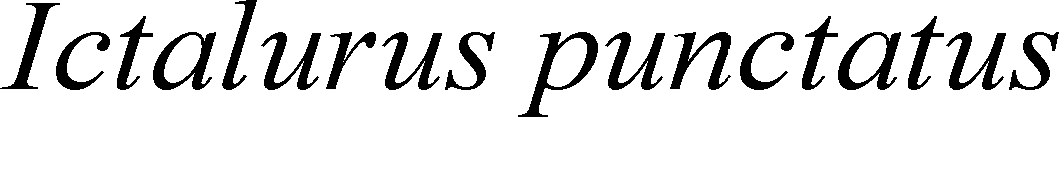
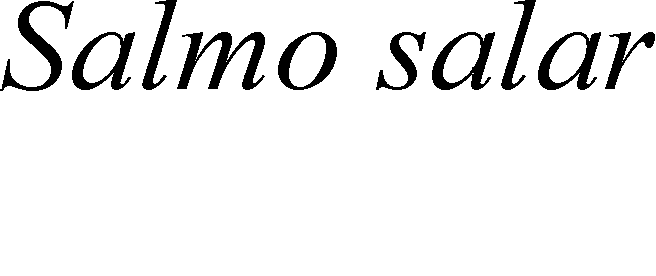
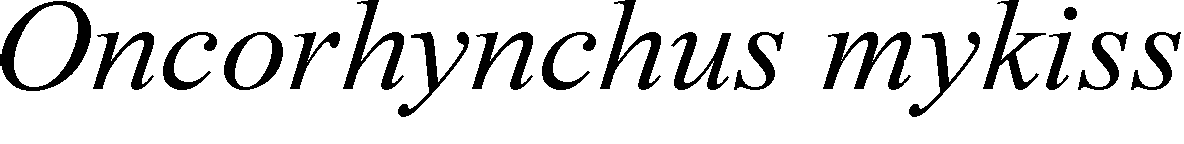
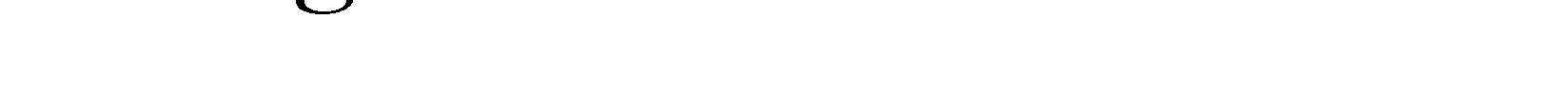
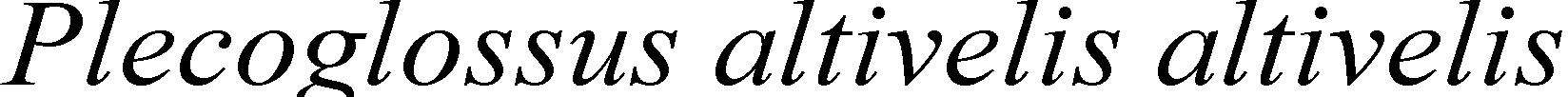
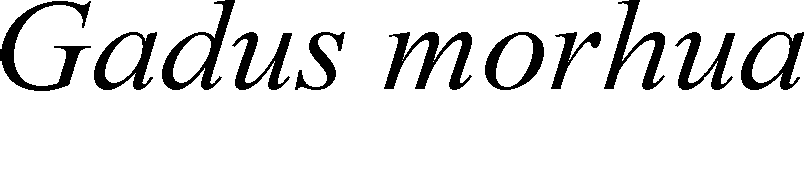
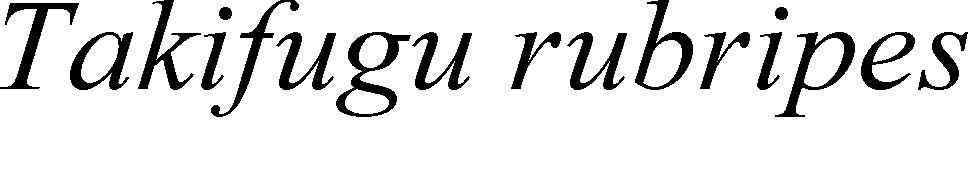
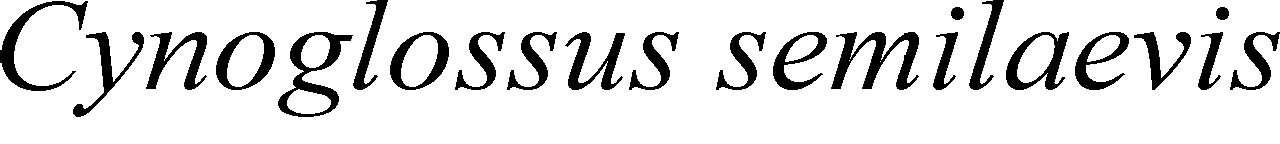
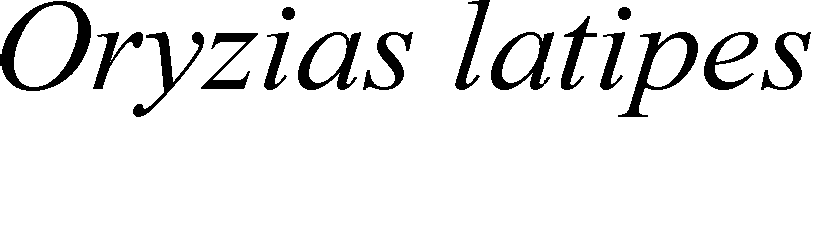
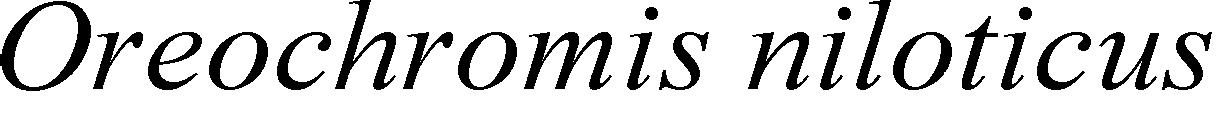
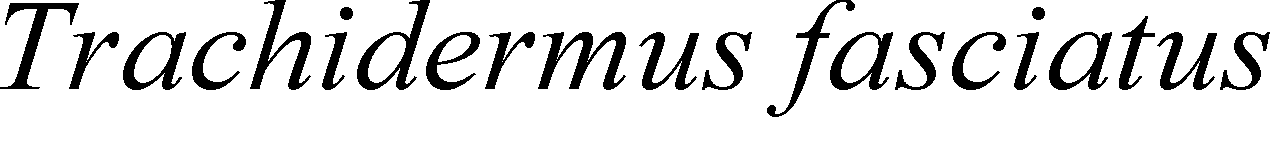
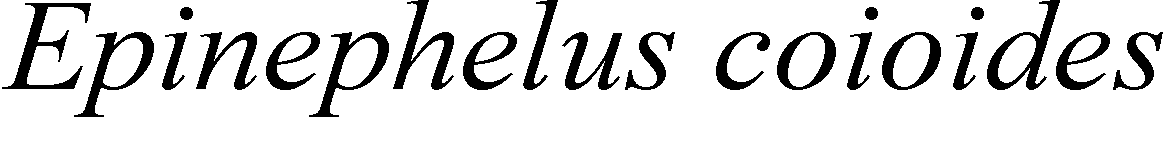
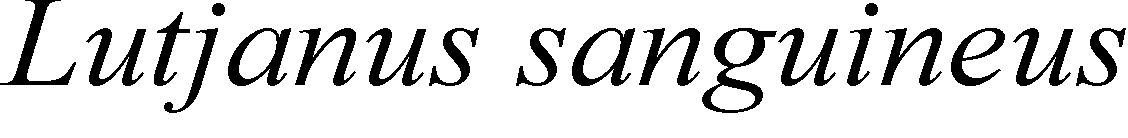
### 续图 5 (Continued)

利用 MEGA 6.0 的 Neighbor-joining 法构建的 *IRAK-4* 基因系统进化树见图 6。图 6 显示，红笛鲷首先与鲈形目的石斑鱼（*E. coioides*）聚在一起，然后再与其他鱼类聚成一个大的分支，两栖类、鸟类和哺乳类聚在一起，与鱼类形成两个独立的进化分支。

* 1. ***IRKA-4*** 组织表达分析

# *IRKA-4* 在被检测的鳃、脑、肌肉、皮肤、肠、头肾、脾脏、肝脏、心脏等组织中均有不同程度的表达，在皮肤、肝脏和胃中表达量最高，其次为胸腺、鳃、心脏、肠和脾脏，在脑中的表达量最低（图 7） 。

图 **6** 基于 NJ 法构建 IRAK-4 氨基酸序列系统进化树



自展值为 1000 bootstrap value=1000

**Fig. 6** Phylogenetic tree of snapper and other vertebrate IRAK-4s constructed with the Neighour-Joining method

700

600

500

红笛鲷*IRAK-4*基因相对表达量

400

300

200

100

24

21

18

15

12

9

6

3

0

脑 肌肉 皮肤 鳃 肝 心 脾 肠 头肾 后肾 胸腺 胃

**3** 讨 论

组织

图 **7** 红笛鲷 *IRAK-4* 基因的组织表达

**Fig.7** Tissue distribution of *IRAK-4* in healthy snapper

# 和哺乳动物的 IRAK-4 类似，红笛鲷 *IRAK-4* 基因编码的氨基酸序列具有保守的死亡结构域和激酶结构域。

本研究通过同源克隆和 RACE PCR 技术获得红笛鲷 *IRAK-4* 基因，该基因 cDNA 全长 2 015 bp， 开放阅读框 1 393 bp，编码 462 个氨基酸，分子质量为 52.0 ku，等电点为 5.19。与已发现的其他鱼类

在 TLR/IL-1R 信号通路中，IRAK-4 通过其死亡结构域与接头分子 MyD88、IRAK-2 的死亡结构域相互作用，组装成一个称为“myddosome”的紧密连接复合体[21]，同时 IRAK-1 被募集至受体复合

物，并与 IRAK-4 紧密接触，从而使 IRAK-1 的 KD 区磷酸化并激活 IRAK-1，引发后续的信号传导。在哺乳动物 IRAK-4 死亡结构域中，参与复合体分子间相互连接的关键氨基酸残基（R12、V16、R20、F25、Q50、F51、R54、E69、T76、N78、A95）高

度保守。在红笛鲷和其他硬骨鱼中 V16 则变异较大，分别被 L/H/F/Y 所取代，被看作是 TLR 信号通路分子共同进化的一个证据，因为 MyD88 中的连接碱基同样发生了变异[18]。此外， 硬骨鱼中与IRAK-2 相连接的 F25 和 F51 同样发生较大的变异， 在红笛鲷中 F51 被 N 取代，由于目前在鱼类中尚未发现 IRAK-2，故这两个碱基变异是否对 IRAK-4 与IRAK-2 间的连接产生影响尚需要进一步研究。建模结果显示，红笛鲷 IRAK-4 的死亡结构域含有 6 个α螺旋，与小鼠的死亡结构域高度相似，同时还含有一个保守的关键碱基 W74，该碱基在小鼠中位于三维结构的疏水性核心，介导α螺旋的空间连接

[22]。根据死亡结构域空间结构的高度相似性和关键

氨基酸残基的保守性，推测鱼类 IRAK-4 与哺乳动物 IRAK-4 的结构和功能相似。

激酶结构域是 IRKA-4 的另一个重要功能结构域，哺乳动物 IRAK-4 的激酶结构域包含一个对蛋白激酶活性起关键作用的激活环，IRAK-4 激酶活性主要依赖激活环上 3 个特定的氨基酸（T342、T345 和 S346）自磷酸化[14]，由该 3 个氨基酸的定点突变结果，发现催化活性分别降至 57%、66%和50%[23]。红笛鲷的 IRAK-4 激酶结构域中前面的两个苏氨酸酸残基（T342、T345）与哺乳动物相同， 但第 3 个丝氨酸残基被谷氨酸取代，导致该自磷酸化位点的缺少，该位点的缺失是否会导致其激酶活性下降有待进一步的研究。同时红笛鲷蛋白激酶ATP 结合域信号含有两个重要的赖氨酸（KK213），这两个赖氨酸在其他鱼类和哺乳动物中高度保守， 突变可导致人 IRAK-4 激酶活性丧失[24]。在丝氨酸/ 苏氨酸蛋白激酶活性位点信号序列中保守的天冬氨酸残基（D340）在红笛鲷中同样存在，对于其保持激酶活性至关重要[25]。此外，在红笛鲷 IRAK-4 还含有一个被称为“gatekeeper”的酪氨酸，它是IRAK 家族 4 个成员所特有的氨基酸，目前已被证实在激酶选择性结合各种小分子和 ATP 竞争抑制剂方面发挥重要作用[25]。

在哺乳动物中，*IRAK-4* 广泛表达于各种组织中，其中在肾脏和肝脏表达量最高[24]。目前的研究表明，鱼类 *IRAK-4* 在各个组织均有不同程度的表

达，斑马鱼和斜带石斑鱼的 *IRAK-4* 在头肾和脾脏中表达量最高[15,19]，表明其在免疫系统中具有重要作用。然而本研究显示，*IRAK-4* 在红笛鲷的皮肤和肝脏中表达量最高，与松江鲈鱼的研究结果相似[17]。皮肤是鱼类防御病原侵染的第一道防线， *IRAK-4* 在皮肤中的高量表达预示着其可能在抵御外源病原入侵中发挥重要作用。鱼类 *IRAK-*4 在细菌、病毒寄生虫刺激后表达量上调或下调[15,17-19]， 表明鱼类 *IRAK-4* 对不同刺激物具有不同的免疫应答机制。同时鱼类 *IRAK-4* 转染实验发现，其功能与哺乳动物不同，显著削弱 NF-κB 活性，其确切的作用机制尚不清楚。因此，今后通过构建真核表达载体，转染鱼类细胞探索其对鱼类细胞 TLR/IL-1R 信号通路的影响，分析其调节免疫细胞功能及抗病原微生物免疫反应中的功能和作用机制，将为我们进一步了解 *IRAK-4* 在鱼类免疫系统中的作用提供新的理论依据。

参 考 文 献

1. Akira S, Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity [J]. International Immunology, 2005, 17 (1): 1-14.
2. Janeway C A Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. Annual Review of Immunology, 2002, 20: 197-216.
3. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition recap- tors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. Nature Immunology, 2010, 11(5): 373-384.
4. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nature Immunology, 2001, 2: 675–680.
5. Schnare M, Barton G M, Holt A C, et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses [J]. Nature Immunology, 2001, 2(10): 947-950.
6. 章卓, 万敬员, 周岐新. IRAK 家族中 TIR 信号通路的

关键因子[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(3): 76-79.

1. 李帆, 芮耀诚. IRAK-4 在白介素-1 受体/Toll 样受体(IL-1R/TLRs) 介导的炎症信号通路中的关键作用 [J]. 药学实践杂志, 2011, 29(1): 11-14.
2. 尹卫国, 肖建华. IRAK 家族在TLR 介导的信号通路中的功能和意义[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(2): 109-115.
3. Suzuki N, Suzuki S, Yeh W C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity [J]. Trends in Immunology, 2002, 23(10): 503-506.
4. Kim T W, Staschke K, Bulek K, et al. A critical role for IRAK-4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity [J]. Journal Experimental Medicine, 2007, 204(5): 1025-1036.
5. Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members [J]. Molecular Cell, 2003, 11(2):293-302.
6. Flannery S, Bowie A G. The interleukin-1 receptor-asso- ciated kinases: critical regulators of innate immune signaling [J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80(12): 1981-1991.
7. Rekhter M, Staschke K, Estridge T, et al. Genetic ablation of IRAK4 kinase activity inhibits vascular lesion formation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 367(3): 642-648.
8. Suzuki N, Suzuki S, Duncan G S,. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4 [J]. Nature, 2002, 416(6882): 750-756.
9. Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Molecular Immunology, 2005, 42(9): 1057-1071.
10. Yu Y, Zhong Q, Li C, et al. Identification and characterization of IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 32(4): 609-615.
11. Liu Y, Yu S, Chai Y, et al. Lipopolysaccharide-induced gene expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and interleukin-1β in rough skin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 690-698.
12. Brietzke A, Goldammer T, Rebl H, et al. Characteriza-

tion of the interleukin 1 receptor -associated kinase 4(IRAK4)-encoding gene in salmonid fish: the functional copy is rearranged in *Oncorhynchus mykis*s and that factor can impair TLR signaling in mammalian cells[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 36(1): 206-214.

1. Li Y W, Mo X B, Zhou L, et al. Identification of IRAK-4 in grouper (*Epinephelus coioides*) that impairs MyD88-dependent NF-κB activation[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2014, 45(1): 190-197.

[21] Motshwene P G, Moncrieffe M C, Grossmann J G, et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(37): 25404-25411.

1. Lin S C, Lo Y C, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling [J]. Nature, 2010, 465(7300): 885-890.
2. Lasker M V, Gajjar M M, Nair S K. Cutting edge: molecular structure of the IL-1R-associated kinase-4 death domain and its implications for TLR signaling[J]. Journal of Immunology, 2005, 175 (7): 4175-4179.
3. Cheng H, Addona T, Keshishian H, et al. Regulation of IRAK-4 kinase activity via autophosphorylation within its activation loop[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 352(3): 609-616.
4. Li S, Strelow A, Fontana E J, et al. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase [J]. PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(8): 5567-5572.
5. Wang Z, Liu J, Sudom A, et al. Crystal structures of IRAK-4 kinase in complex with inhibitors: a serine / threonine kinase with tyrosine as a gatekeeper [J]. Structure, 2006, 14(12): 1835-1844.

# （责任编辑：刘庆颖）