

日本鳗鲡 *TRAF3* 基因的克隆、表达及亚细胞定位分析

陈鹏云^{1,2,3}, 林 鹏^{1,2,3}, 王艺磊^{1,2,3}, 王添禹^{1,2,3}, 张 炎^{1,2,3}, 冯建军^{1,2,3}

(1. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021; 3. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 相关因子 3 (TRAF3) 是激活 NF- κ B、I 型 IFN 信号通路的重要调节因子。克隆了日本鳗鲡 *TRAF3* 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *AjTRAF3*, 可编码 568 个氨基酸, 具有保守的 TRAF 结构域 (MATH 结构域)、锌指 (ZF) 结构域和环指结构域 (RING domain)。系统发育树分析表明 *AjTRAF3* 与其他鱼类 *TRAF3* 聚为一支, 而哺乳类、鸟类、两栖类分别聚为一支。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果显示: 天然状态下日本鳗鲡各组织均检测到有 *AjTRAF3* 基因的表达, 其中肝脏表达量最高; LPS、Poly I:C、嗜水气单胞菌免疫注射日本鳗鲡后, 能引起肝脏、脾脏和肾脏中 *AjTRAF3* 基因的表达水平显著提高; 日本鳗鲡肝脏细胞经不同病原相关分子模式 LPS、Poly I:C、CpG、PGN 和不同浓度嗜水气单胞菌感染刺激后, 其 *AjTRAF3* 基因的表达水平均显著升高。亚细胞定位研究显示天然状态下 *AjTRAF3* 蛋白在细胞质中聚集呈散点状分布, 经 LPS 和 Poly I:C 刺激后, *AjTRAF3* 蛋白分子可进入细胞核且呈散点状分布。以上结果表明 *AjTRAF3* 在日本鳗鲡抗病毒、细菌免疫应答反应中发挥重要作用。

[关键词] 日本鳗鲡; *TRAF3* 基因; 表达分析; 亚细胞定位

[中图分类号] S 968.43

Molecular Cloning, Expression Analysis *in vivo* and *in vitro*, and Subcellular Localization of *TRAF3* from Japanese Eel (*Anguilla japonica*)

CHEN Pengyun^{1,2,3}, LIN Peng^{1,2,3}, WANG Yilei^{1,2,3}, WANG Tianyu^{1,2,3}, ZHANG Yan^{1,2,3}, FENG Jianjun^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021 China;

2. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) plays an important role in the activation of NF- κ B and type I IFN signaling pathway. In the present study, the full-length cDNA of a *TRAF3* homologue, *AjTRAF3*, was cloned from Japanese eel. *AjTRAF3* encoded a polypeptide of 586 amino acids, which had the conserved TRAF domain (MATH), zinc finger (ZF) domain, and ring domain. *AjTRAF3* was clustered together with other fish families in the phylogenetic tree, whereas mammals, birds, and amphibians were grouped into different separated branches. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis revealed a broad expression for *AjTRAF3* in a wide range of tissues, and was highly expressed in the liver. *In vivo*, the *AjTRAF3* expressions in the

[收稿日期] 2022-05-17

[基金项目] 福建省自然科学基金项目 (2020J01671, 2021J01830); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金项目 (RE202208, RE202307); 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室开放基金项目 (2020ESHML02)

[作者简介] 陈鹏云 (1998—), 硕士生, 从事水产动物免疫学研究。通信作者: 冯建军 (1972—), 博士, 副教授, 从事水产动物免疫学研究。E-mail: fengjj@jmu.edu.cn

liver and the kidney of *A. japonica* were significantly increased following injection with the bacterial mimic LPS, the viral mimic Poly I: C and *Aeromonas hydrophila*. The expression level of *AjTRAF3* gene in eel liver cells was significantly increased after being stimulated by different pathogen related molecular models LPS, Poly I: C, CpG, PGN and different concentrations of *A. hydrophila* infection. Subcellular localization studies showed that *AjTRAF3* was scattered in the cytoplasm of cells under natural state. *AjTRAF3* was found to aggregate into spots partly in the nucleus after the stimulation of LPS and Poly I: C. These results collectively suggested that *AjTRAF3* was an important factor possibly involved in Japanese eel defense against viral and bacterial infection.

Keywords: *Anguilla japonica*; *AjTRAF3* gene; expression analysis; subcellular localization;

0 引言

肿瘤坏死因子受体 (TNF-R) 相关因子 (TRAF) 家族是调节 Toll 样受体 (TLR)、NOD 样受体 (NLR)、RIG-I 样受体 (RLR) 和细胞因子受体等多种信号转导途径的重要接头蛋白^[1-4]。迄今, 哺乳动物已发现 TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6 及 TRAF7 家族蛋白分子, 参与了细胞增殖、凋亡、分化、应激等多种反应^[5-6]。

作为 TRAF 家族成员中的重要分子, TRAF3 在激活 NF- κ B 和 I 型 IFN 信号通路中发挥关键作用^[1]。TRAF3 蛋白分子含有保守的环指结构域、锌指结构域和 MATH-TRAF 结构域, 其中 N 端环指结构域和 C 端 MATH-TRAF 结构域与 TRAF3 功能密切相关^[7-8]。TRAF3 最早从人类 cDNA 文库中被鉴别出来, 该分子能够与 CD40 结合, 对下游信号通路具有活化作用^[9-10], 后续在小鼠的研究中表明 TRAF3 是 TLR3/4 介导的 I 型 IFN 信号通路中的重要接头蛋白^[11-12], 还参与了 RLR 介导的 I 型 IFN 的产生^[8,13]。

目前, TRAF3 同源基因已经在一些硬骨鱼中被克隆分析, 包括鲤 (*Cyprinus carpio*)^[14]、红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*)^[15]、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[16]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[17]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[18] 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[19] 等。鱼类 TRAF3 基因为组成型表达模式, 在各组织中均有表达, 且在免疫相关的组织器官中高表达^[14-16]。当鱼体受到病毒感染后 TRAF3 基因的表达水平显著上调, 提示其在抗病毒免疫应答中发挥着重要作用^[14,16,18]。近期的研究发现过表达 TRAF3 能够引起 IFN 表达水平的提高^[16-17], 但其分子调控机制尚需进一步研究。

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 系我国出口创汇的重要养殖种类, 其味道鲜美、营养价值高^[20]。然而, 由于鳗鲡养殖密度过高导致病害频繁发生, 影响了鳗鲡产业的健康发展^[21]。与其他经济鱼类相比, 鳗鲡的免疫学基础研究十分薄弱, 其中与抗病毒免疫应答密切相关的 I 型 IFN 信号通路仅对 TBK^[22]、TLR3^[23]、RIG^[24]、IFN^[25] 等部分免疫因子进行了克隆分析与初步的功能研究, 而 TRAF3 作为激活 NF- κ B 和 I 型 IFN 信号通路的关键因子在鳗鲡相关研究中尚未见报道。因此, 本实验首次克隆日本鳗鲡重要的免疫相关因子 TRAF3 全长 cDNA 序列, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测不同病原体相关分子模式, 以及经鳗鲡主要病原菌——嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 刺激后的日本鳗鲡主要免疫组织器官和肝脏细胞的 TRAF3 基因表达变化, 并通过 TRAF3 绿色荧光融合蛋白质的亚细胞定位进行免疫功能分析, 以期在日本鳗鲡 TRAF3 因子在机体抗病毒、细菌免疫应答中的作用机制研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

日本鳗鲡, 体重约 45 ~ 50 g, 购自福建福清鳗鱼养殖场, 于实验室循环水中暂养一周后备用。小鼠睾丸间质细胞和日本鳗鲡肝脏细胞为本实验室保存有的。本实验所用菌株为嗜水气单胞菌, 采用胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基 28 °C 培养 24 h 后收集菌体, 用 PBS (0.01 mmol/L, pH = 7.4) 重悬后

备用^[26]。

1.2 引物设计及 *AjTRAF3* 全长 cDNA 的克隆

根据本实验室日本鳗鲡转录组数据获得日本鳗鲡 *TRAF3* 基因序列, 通过 Primer 5.0 软件设计 *TRAF3* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列, 利用 head to toe PCR 反应验证该基因的 ORF 是否正确。使用 5′和 3′RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (TaKaRa, 日本) 进行 RACE PCR 扩增, 扩增产物经凝胶纯化, 克隆至 pMD19-T (simple) 载体, 并按上述方法测序获得日本鳗鲡 *TRAF3* 基因的 cDNA 全长序列 (见表 1)。根据日本鳗鲡 *TRAF3* ORF 序列和绿色荧光蛋白真核质粒 pEGFP-N1 多酶切位点, 设计带有双酶切位点的 *TRAF3* 引物序列 (见表 1)。以测序正确的日本鳗鲡 *TRAF3* 基因 pMD19-T (simple) 重组质粒为模板克隆 *AjTRAF3* 的 ORF, 并用相应引物插入 pEGFP-N1 载体中, 构建 pEGFP-TRAF3 重组质粒后再测序确认。

表 1 用于 *AjTRAF3* 基因克隆和表达分析的引物

Tab.1 Primers used for <i>AjTRAF3</i> gene cloning and expression analysis		
类别 Type	引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Sequences of primer(5′→3′)
头至趾引物 Primers for ORF cloning	TRAF3-ORF5′	ATGTCATCAGGGCGGAATGGG
	TRAF3-ORF3′	TCAGGGGTCTGGGCAGATCG
RACE PCR 特异性引物 Specific primers for 3′ RACE	TRAF3-3′-outer	CTACAAGCGGCGGAAACAGGAGG
	TRAF3-3′-inner	TCAAGCCCGACCCCAACA
RACE PCR 通用引物 Universal primers for RACE	UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT- GGTAAACAACGCAGAGT
	UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
qRT-PCR 引物 Specific primers for qRT-PCR	5′CDS primer	(T)25VN
	3′CDS primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN
	SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
	TRAF3-real-5′	GTGACTACAAGCGGCGGAAA
	TRAF3-real -3′	CACCACGAAGAACAGCGACA
	β-actin-5′	AATCCACGAGACCACCTTCAA
	β-actin-3′	GTGGCGTACAGGTCCTTACG
绿色荧光蛋白重组质粒引物 Specific primers for green fluorescent protein recombinant expression plasmid	5′ pEGFP-TRAF3	AAGCTTATGTCATCAGGGCGGAATGGG
	3′ pEGFP-TRAF3	TGGATCCCGGGGTCGGGCAGATCG
通用引物 Universal primers	M13-F	TGTA AAAACGACGCGCACT
	M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC
	pEGFP-F	TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG
	pEGFP-R	CGTCGCGCTCCAGCTCGACCAG

1.3 方法

1.3.1 日本鳗鲡免疫刺激试验

购买的日本鳗鲡经实验室暂养 1 周后, 用丁香酚对其麻醉, 随后解剖和采集日本鳗鲡各组织样品, 包括肝脏、脾脏、肾脏、鳃、肠、心脏、皮肤和肌肉, 每个组织 6 尾, 用于 RNA 提取。

采用平板计数法计数, 将前期收集的嗜水气单胞菌用 PBS 稀释至 4 × 10⁴ cfu /mL, 将购自 SIGMA 公司的 LPS 和 Poly I: C 用 PBS 溶解稀释至终质量浓度分别为 4 mg/mL 和 2 mg/mL。将日本鳗鲡分成

4 组, 实验组分别于腹腔注射 200 μL 的 LPS、Poly I: C 和 4×10^4 cfu/mL 嗜水气单胞菌液, 对照组腹腔注射 200 μL 的灭菌 PBS 溶液^[23]。每组随机选取 6 尾, 在注射后的第 0、6、12、24、48、72 小时共六个时相, 分别采集鳊的肝脏、脾脏、肾脏三种组织器官, 用于 RNA 提取实验。

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一条链的合成

用 OMEGA 试剂盒提取日本鳊肝脏、脾脏、肾脏、鳃、肠、心脏、皮肤和肌肉组织 RNA, 用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (购自 Takara, Bio 中国) 进行日本鳊不同组织、肝脏细胞 cDNA 模板制备^[23]。

1.3.3 日本鳊肝脏细胞系刺激试验

当细胞贴壁覆盖率达到 90% 以上, 用含 0.25% (体积分数) 胰酶的消化液进行消化, 随后转入 3 cm 的细胞培养板, 待细胞长满后再更换细胞培养液。实验方法参照徐元凯^[27]的设计, 各实验组分别加入 Poly I:C (50 $\mu\text{g/mL}$)、LPS (30 $\mu\text{g/mL}$)、CpG (10 $\mu\text{g/mL}$)、PGN (30 $\mu\text{g/mL}$), 以及浓度分别为 10^6 、 10^7 、 10^8 cfu/mL 的嗜水气单胞菌, 对照组加入等体积细胞培养液, 分别在免疫刺激后的第 0、3、6、12、24、48 小时, 提取细胞 RNA, 逆转录合成 cDNA 用于荧光定量 PCR 实验。

1.3.4 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 总反应体系为 20 μL , 其中含有 9 μL 1:10 稀释的原始 cDNA, 10 μL 2 \times SYBR Green Master Mix (Vazyme TM, Q111-02), 以及 0.5 μL 各引物, 在 Roche Light Cycler 480 机器 (Roche, Sussex, UK) 上进行扩增。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s (40 个循环)。结果根据 Roche 480 自动给出的每个样品的 C_p 值, 用比较 CT 方法 (即 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法) 计算出样品的 RQ 值。

使用 SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 分析实验数据。天然日本鳊不同组织的基因表达水平差异采用方差分析和 Duncan 多重比较法, 不同实验组之间的基因水平差异分析采用成组 t-检验分析法 (显著性差异: $P < 0.05$, 极显著差异: $P < 0.01$)。

1.3.5 亚细胞定位小鼠睾丸间质细胞

使用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen 公司) 将构建好的表达载体 pEGFP-N1-AjTRAF3 转染小鼠睾丸间质细胞, 24 h 后将细胞置于倒置荧光显微镜下确认绿色荧光蛋白表达后, 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ Poly I:C 和 30 $\mu\text{g/mL}$ LPS 溶液处理细胞, 待刺激 24 h 后进行亚细胞定位观察, 同时设置对照组。

1.3.6 生物信息学分析

用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析序列相似性; 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 分析 AjTRAF3 的全长 cDNA 序列; 用 ExPASy (<http://cn.expasy.org/tools/pitool.html>) 预测等电点及分子质量; 用 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>) 进行序列多重比对; 用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构域特征; 用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) 预测蛋白质三级结构; 用 MEGA 6.0 软件构建邻位相接法系统进化树。

2 结果

2.1 AjTRAF3 的 cDNA 序列分析

日本鳊 AjTRAF3 的 cDNA 全长为 2243 bp, 包含 87 bp 的 5'-UTR、446 bp 的 3'-UTR 和 1707 bp 的 ORF 序列, 编码 568 个氨基酸。预测蛋白质分子质量为 65.1 ku, 等电点 pI 为 8.27。SMART 结构域分析显示 AjTRAF3 分子包含环指结构域 (51—91 aa) 和 MATH 结构域 (360—563 aa) (见图 1)。

2.2 AjTRAF3 系统发育树分析

系统发育树显示, 日本鳊 TRAF3 与亚洲龙鱼 (*Scleropages formosus*) 最为接近, 并与其他鱼类聚为一支, 哺乳类、鸟类、两栖类各聚为一支 (见图 2)。

1 ATGCCGTTTACCGAAGCGGAGTCTGTTAAGATTGCCAGAAAAACAGTGGTGTGGATTGGACGGCGACAAGGATCTAAT 80
81 ACATGTG**atg**tcatcaggcggaatggggacggccgtgaggtgcaggtgccccagcagagggcgccctcgctggcgaga 160
1 M S S G R N G D G R E V Q V P Q Q R A P S L A Q K 25
161 agccctggagcagagccggccttctgctgcccagccgggttccgggaccacttcgtctcagccccagcccaagtac 240
26 P W S E P G F L P L Q A G F R D H F V L Q P E P K **Y** 51
241 tgctgcccaggcctgccggtggtcctgtgcaacccgcgccagactgagtcgggtcatcgcttctgtgagacctgcacatc 320
52 **C C Q A C R L V L C N P R Q T E C G H R F C E T C I S** 78
321 tgagctgctcagagcgtccaccagctgtgtcctgcagatatggagccactctttgaggacaagatatcagggaatgtgt 400
79 **E L L R A S H P V C P A D M** E P L F E D K I F R D V C 105
401 gctgccacaggagatcatgcttgaagtgactgcaggagtgagaagaatggttcagagaacacagctagactctcaa 480
106 C H R E I M A L K V Y C R S E K N G C R E Q M S L Q 131
481 caggttatggatcacctgcaggtgtgcccataatttgaggtgccatgccctctggggaagtgtaggagaggatgatgag 560
132 Q V M D H L T V C P Y F E V P C P L G K C R E R M M R 158
561 gaaagacatgccgaccatctgaactggaagtgcacacccggaagccacctgcgaattctgcaaacacaagatggccc 640
159 K D M P D H L N W K C R H R E A T C E F C K H K M A Q 185
641 agacagagctgcagaacacaaaggacacccgtgtgccctgctttccccgtggcctgtcccaataactgcacctactctcc 720
186 T E L Q K H K D T V C P A F P V A C P N N C T Y S S 211
721 atcctgcgcagcagctgcagagacaccagcaggactgtcccaagcccaggtcacctgctctctccaccgctacggttg 800
212 I L R S E L Q R H Q Q D C P K A Q V T C S F H R Y G C 238
801 caccttcaagggtctgaaccaggaaatgaagagcacgactccctctgtgtctctgaacacctgcggctgatggtgcca 880
239 T F K G L N Q E M K E H D S L C V S E H L R L M V A K 265
881 agaacactaccctggaggtcgaagtgaggatgttaagggcgagctgcaggagcgctataagtgctgccaggtctgaac 960
266 N T T L E A K V E D V K G E L Q E R Y K V L P G L N 291
961 gctcggctgatggaggtggagctctcgccagcaggagatgagagagaagaaccggcagctggaaacagagctgcaaatat 1040
292 A R L M E V E S R H E E M R E K N R Q L E Q K L A N I 318
1041 acagaagcagctgagctctcactcagagaagctgatggagctggagctgcgttctctccgttcggtgcgtgagg 1120
319 Q K Q L S S H S E K L M E L E M E L R S F R S V R E D 345
1121 atgtggagacctgcggggggcggttagagagcatccgcacacgcgtcactgcactggagggcagccgttggtccctccaac 1200
346 V E T L R G A V E S I R T R V T A L E G S R G P S N 371
1201 tccggaccgcatgcgcttgcagcgtccctggagacgcagctctctcgcctgacgacatgctgagcgtgcacgagatcag 1280
372 S G P H A L A G S L E T Q L S R H D D M L S V H E I R 398
1281 gctggcggacatggacctccgtttccagggtgctggagacggccagcttcaacggcagctcatctggaagatccgtgact 1360
399 L A D M D L R F Q V L E T A S F N G T L I W K I R D Y 425
1361 acaagcggcggaacaggaggcggtggcgcttaagacgctgtccctgtacagccagcccttctacaccggctactttggg 1440
426 K R R K Q E A V A S K T L S L Y S Q P F Y T G Y F G 451
1441 tacaagatgtgcgcgcgtgtacctgaacgggacggcatgggcaagggcacgcacctgtcgtctgttcttcgtgtgat 1520
452 Y K M C A R V L N G D G M G K G T H L S L F F V V M 478
1521 gcgcggcgagtagcagccctgtcctcacttgcccttcaagcagaagtgacgctgatgctgatggaccaggcccccccc 1600
479 R G E Y D A L L T W P F K Q K V T L M L M D Q G P A R 505
1601 gcaagcacctggggcagcccttcaagccccgaccccaacagcagcagcttccgcagaccacgggagacatgaacatcgcg 1680
506 K H L G D A F K P D P N S S S F R R P T G D M N I A 531
1681 tccggtgcccccttctcgtcgcgcagaccgtgctggagaacggcacctacatcaaggacacaccatcttcatcaaggt 1760
532 S G C P L F V A Q T V L E N G T Y I K D D T I F I K V 558
1761 cacagtggatacctccgatctgcccgacccctga**CCCTCA**CACTCACCCACCCAGCAGCTGGGGGGCTGCAACAAA 1840
559 T V D T S D L P D P * 568
1841 CACAGCTCAGGACACCCGAGAGAGAGAGAGGGGTGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCG 1920
1921 TGAGAGAGAGATGAGGTGAGAGAGAGAGAGGGTAAGAGAGAGATGGGGTGAGAGAGAGAGAGTGAACATAGGGTGTG 2000
2001 AGAATGTGAAGAGAGCGAGACAGGGTGAGAGAGGGATCGGAGAGATGGACAGAGACATGGGGAGAATGATAGGGGT 2080
2081 TGGAGAGAGGTTAATGAGAGAGATGGATAGGGAGGGAGAGAGAGAGAGGTAGTGGGAAGTT**AATAA**GAGAGAAAAAAGA 2160
2161 GTGTGGAGTGGGTTAATGTGAGAGAGATGGACAGAGTAGCAGATGTAGATATGGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2243

大写字母代表5'和3'非编码区序列,小写字母代表编码区序列;上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)和终止信号(AATAAA)加粗标记;环指结构域用方框标记;MATH结构域用双下划线表示

Capital letters represent 5' and 3' non coding area sequences respectively, and lowercase letters represent coding area sequences; the upper part is the nucleotide sequence, and the corresponding lower part is the encoded amino acid sequence; the start codon (ATG), the stop codon (TGA) and the stop signal (AATAAA) are marked in bold; the ring domain is marked with a box; and the MATH domain is indicated with a double underline

图1 日本鳗鲡*AjTRAF3*基因cDNA及其推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *AjTRAF3* gene from *A. japonica*

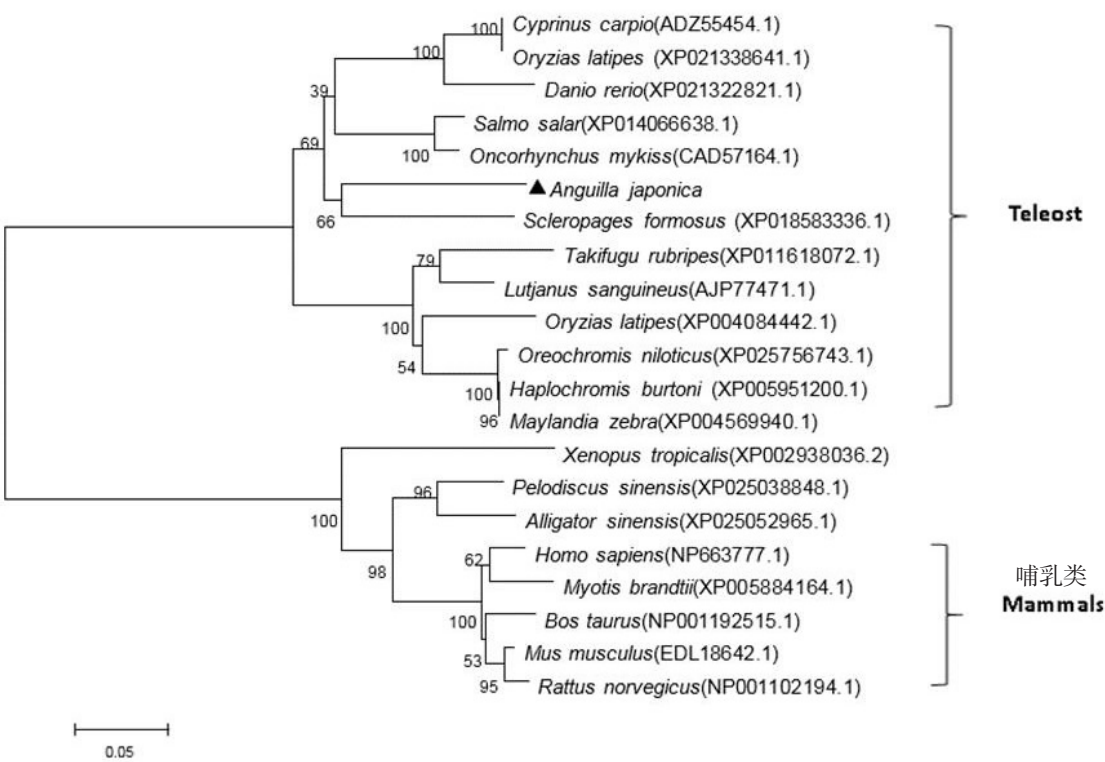


图2 日本鳗鲡*AjTrAF3*和其他物种*TRAF3*氨基酸序列系统发育树（*AjTrAF3*用▲标出）

Fig.2 Phylogenetic tree of the *TRAF3* amino acid sequences between *A. japonica* and other species (*AjTrAF3* was marked with solid triangle)

2.3 *AjTrAF3* 氨基酸多重比较分析

将日本鳗鲡 *TRAF3* 基因的氨基酸序列与亚洲龙鱼、大西洋鲑（*Salmo salar*）、虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）、小鼠（*Mus musculus*）和智人（*Homo sapien*）等其他物种进行多重序列比对，分析表明日本鳗鲡 *TRAF3* 与鸟类和哺乳类的一样，均具有环指结构域、2 个锌指模序、Coiled-coil 和 MATH 结构域（见图 3）。

		RING finger	
<i>Anguilla japonica</i>	MSSGRNGDGVQVPQQRAP-----SLAQKPWS---EPGFLPLQAGFRDHFVLQPEPKYCCQACRLVLCNPRQTECGHR		71
<i>Scleropages formosus</i>	MSAGRNVDGRELQIPLHQRPSSLA-----QRSWT---EPGFLPLQGGFRDRFVLPEPKYCCACHLVLCNPKQTECGHR		72
<i>Salmo salar</i>	MSAGRNADVRELQIPLQHRSPSLAVLSLAQRWPSPDPETGFLPQHGGFWDFHIATPEPKYCCACRLVLCNPRQTECGHR		80
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MSAGRNADVRELQIPLQHCSPSLAALSQAQRWPSPDEAGFLPQHGGFWDFHIATPEPKYCCACRLVLCNPRQTECGHR		80
<i>Mus musculus</i>	MESSKKMDAAG---TLQPNPP-----LKLQPDGAGS-VLVPEQGGYKEKFKVTVEDKYCKEACRLVLCNPKQTECGHR		70
<i>Homo sapien</i>	MESSKKMDSPG---ALQTNPP-----LKLHTRDSAGTPVFPEQGGYKEKFKVTVEDKYCKEACHLVLCSKPKQTECGHR		71
	.:.	: *	: : * . * . : * : * * * : * : * : * : *
	RING finger		Zinc finger1
<i>Anguilla japonica</i>	FCETCISELRLASHIPVCPADMEPLFEDKIFRDVCCCHREIMALKVYCRSEKNGCKEQMSLHQVMDHL-TVCPYFEVPCPLG		150
<i>Scleropages formosus</i>	FCETCILDLLSKRDPVCPVDMPLFEDKIFRDVCCNREIMALKVYCRNEKNGCKEQMSLHQVMDHL-NVCPYFEVPCPLG		151
<i>Salmo salar</i>	FCETCISEQLSKPNPVCADMEPLFKDKIFRDVCCCHREIMALRVYCRSEKNGCKEQMSLHQVMDHL-NVCPYFEVPCPLG		159
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FCETCISEQLSKPNPVCADMEPLFKDKIFRDVCCCHREIMALRVYCRSEKNGCKEQMSLHQVMDHL-NVCPYFEVPCPLG		159
<i>Mus musculus</i>	FCESCMALLSSSPKCTACQESIHKDKVFKDNCKREILALQVYCRNEGRGCAEQLTGLHLLVHLKNECQFEELPCLRA		150
<i>Homo sapien</i>	FCESCMALLSSSPKCTACQESIHKDKVFKDNCKREILALQVYCRNESRGCAEQLMLGHLVHLKNDCHFEELPCVRP		151
	***: * * * . * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
	Zinc finger1		Zinc finger2
<i>Anguilla japonica</i>	KCRERMRKMDPDHLNWKCRHREATCEFCFKHMAQTEQLQKHKTVCPAFPVACPNCTYSLLRSELQRHQDCPQAQVT		230
<i>Scleropages formosus</i>	KCKEKMRRKMDPDHLNWKCRHREATCEFCFKHMALETLQKHKTVCPAFPVACPNCTYSLLRSELSSHQDCPQAQVS		231

[illegible]

“ - ”表示空位经手工优化；“ * ”表示相同氨基酸残基；数字表示不同的氨基酸序号；各结构域用粗线标出

Gap positions were manually optimized and are indicated by hyphens; amino acid residues found identical in all of the compared sequences were indicated by * ; numbers represent different amino acid sequence numbers; each domain is marked with a thick line

图3 日本鳗鲡 *AjTRAF3* 和其他物种 *TRAF3* 的氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of *TRAF3* amino acid sequence between *A. japonica* and other species

2.4 *Aj*TRAF3 空间结构分析

采用 SWISS-MODEL 软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)同源建模的方法, 将日本鳗鲡 *Aj*TRAF3 基因的蛋白质序列与软件搜索得到的模板进行联配, 通过 *Aj*TRAF3 基因推导出的氨基酸构建其三维结构。日本鳗鲡 *Aj*TRAF3 基因的蛋白质序列是由 4 个 α 螺旋和 7 个 β 折叠片组成的三聚体, 其三维丝带结构图与人类 TRAF3 基因的蛋白质序列的三维丝带结构相似, 但旋转方向不同 (见图 4)。

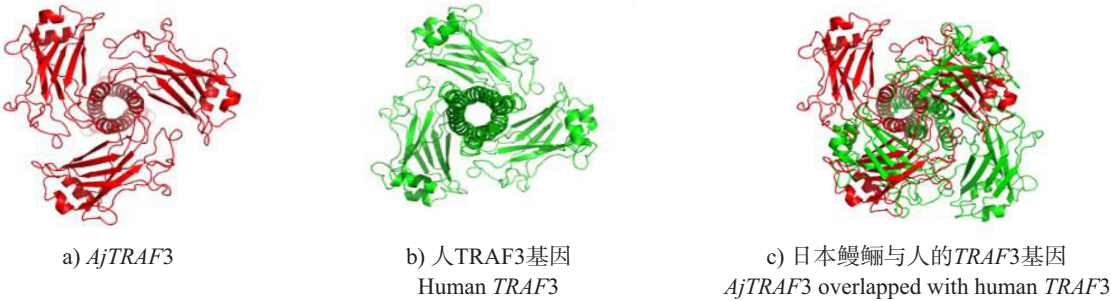


图4 *Aj*TRAF3与人类TRAF3基因的蛋白质三维结构图比较

Fig.4 TRAF3 three-dimensional structure comparison between Japanese eel and human

2.5 *Aj*TRAF3 基因在天然状态下的组织表达分析

天然状态下的日本鳗鲡 *Aj*TRAF3 基因为组成型表达模式, 且肝脏中的表达量最高, 其次是肠、鳃、脾脏、皮肤、肾脏中的, 而心脏和肌肉中的表达水平相对较低 (见图 5)。

2.6 免疫刺激对日本鳗鲡肝脏、肾脏、脾脏中 *Aj*TRAF3 基因表达的影响

日本鳗鲡经 LPS 刺激后, 肝脏中 *Aj*TRAF3 mRNA 的表达水平在 6 h 时 (3.4 倍, $P < 0.01$)、肾脏中的在 6 h (4.0 倍, $P < 0.01$) 和 12 h 时 (1.35 倍, $P < 0.01$)、脾脏中的在 6 h 时 (1.4 倍, $P < 0.05$) 都显著升高, 其他时相各脏器中的未见明显变化, 但发现脾脏中的在 72 h 时 (0.74 倍, $P < 0.05$) 显著下调 (见图 6a)。

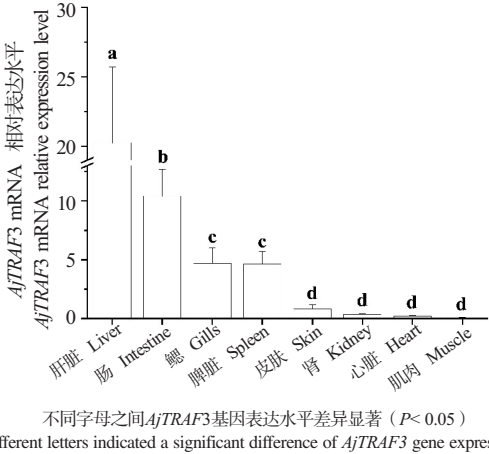


图5 *Aj*TRAF3基因在健康日本鳗鲡各组织中的相对表达水平
Fig.5 Relative expression levels of *Aj*TRAF3 transcripts in different tissues of healthy Japanese eel

Poly I:C 免疫注射日本鳗鲡后, 其肝脏和肾脏中 *Aj*TRAF3 mRNA 的表达水平在 6 h 时显著上调, 而脾脏中的表达水平在 24、48、72 h 时均有显著升高 ($P < 0.01$) (见图 6b)。

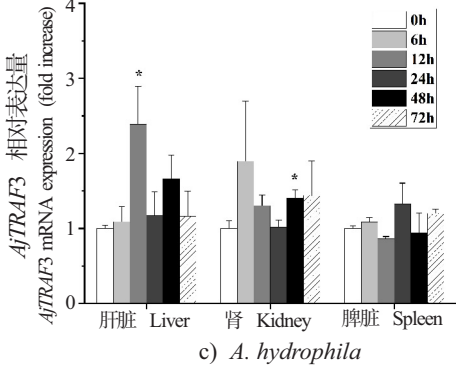
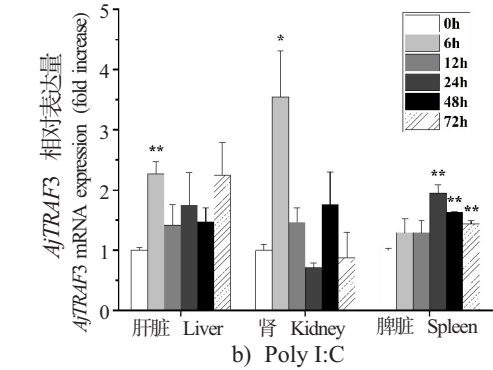
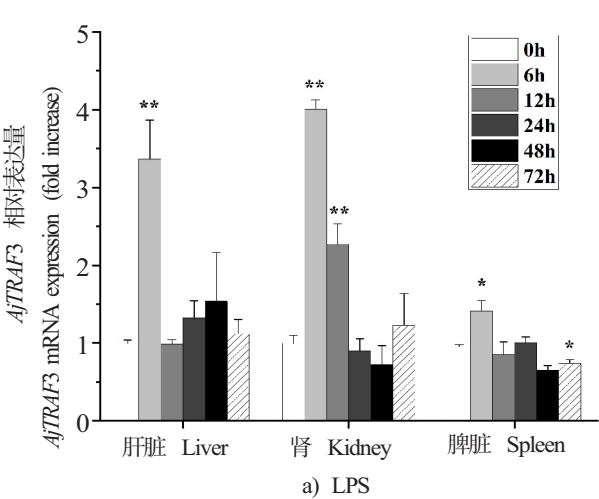
嗜水气单胞菌能够引起日本鳗鲡肝脏中 *Aj*TRAF3 基因的表达量在 12 h 时 (2.3 倍, $P < 0.05$)、肾脏中的在 48 h 时 (1.4 倍, $P < 0.05$) 显著提高, 但脾脏中的表达水平未见明显变化 (见图 6c)。

2.7 不同病原相关分子模式刺激下 *Aj*TRAF3 基因在日本鳗鲡肝脏细胞中的表达变化

在不同病原相关分子模式 LPS、Poly I:C、CpG-DNA 和 PGN 刺激下, 日本鳗鲡肝脏细胞中 *Aj*TRAF3 基因的表达水平见图 7。

LPS 刺激后 12 h 时 (1.7 倍, $P < 0.01$)、24 h 时 (3.8 倍, $P < 0.01$) 及 48 h 时 (1.7 倍, $P < 0.01$), 日本鳗鲡肝脏中 *Aj*TRAF3 基因的表达水平均有显著升高, 且在 24 h 时达到峰值; Poly I:C 刺激后 3~48 h, *Aj*TRAF3 基因的表达水平均有显著提高, 并且在 12 h 时升高到 38.5 倍 ($P < 0.01$), 达到峰值; CpG 能够引起 *Aj*TRAF3 的表达水平在 6 h 时显著下调 ($P < 0.01$), 在 24 h 时 (1.1 倍, $P < 0.01$) 显著升高, 其他时相未见明显变化; PGN 刺激后 *Aj*TRAF3 基因的表达水平在 24 h 时 (2.0 倍, $P < 0.01$)、48 h 时 (2.6 倍, $P < 0.01$) 均显著增强。

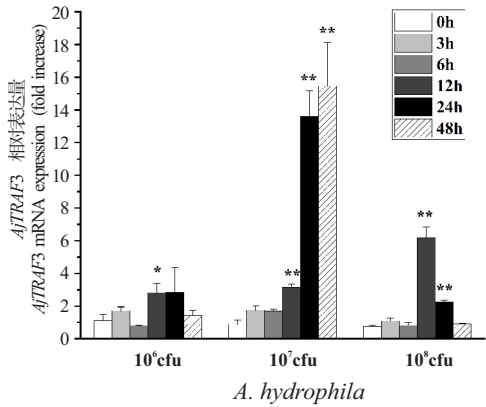
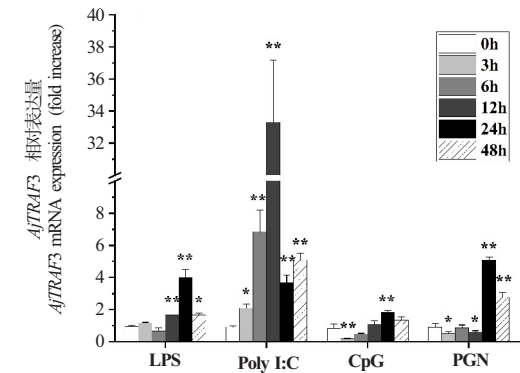
三种不同浓度的嗜水气单胞菌感染日本鳗鲡肝脏细胞, 其 *AjTRAF3* 基因的表达水平见图 7。 10^6 cfu/mL 的嗜水气单胞菌仅在感染后 12 h 时 ($P<0.05$) 引起 *AjTRAF3* 基因的表达水平升高; 当细菌浓度升高至 10^7 cfu/mL 后, *AjTRAF3* 基因的表达水平在感染后 12 h 时 (1.8 倍, $P<0.01$)、24 h 时 (10.5 倍, $P<0.01$) 和 48 h 时 (14.5 倍, $P<0.01$) 均显著提高; 当细菌浓度达到 10^8 cfu/mL 时, *AjTRAF3* 基因的表达量在感染后 12 h 时 (4.1 倍, $P<0.01$) 显著增加并达到峰值, 在 24 h 时 ($P<0.01$) 也有显著上调, 但其他时相未见明显变化。



“*”表示相同时相实验组与对照组之间存在显著差异 ($P<0.05$), “**”表示极显著差异 ($P<0.01$)
Statistical differences between the expression level of each sample and that of the PBS control at the same sampling time were indicated with asterisks (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$)

图6 LPS、Poly I:C以及嗜水气单胞菌感染对肝脏、肾脏、脾脏*AjTRAF3*基因水平的表达变化

Fig.6 The effect of LPS, Poly I:C, and *A. hydrophila* on *AjTRAF3* gene expression in the liver, kidney, and spleen of Japanese eels



“*”表示相同时相实验组与对照组之间存在显著差异 ($P<0.05$), “**”表示极显著差异 ($P<0.01$)
Statistical differences between the expression level of each sample and that of the PBS control at the same sampling time were indicated with asterisks (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$)

图7 LPS、Poly I:C、CpG-DNA、PGN、嗜水气单胞菌刺激对日本鳗鲡肝脏细胞*AjTRAF3*基因表达水平的影响
Fig.7 The effects of LPS, Poly I: C, CpG DNA, PGN and *A. hydrophila* on *AjTRAF3* gene expression of Japanese eel liver cells

2.8 *Aj*TRAF3 基因的亚细胞定位

*Aj*TRAF3 基因的亚细胞定位结果（见图 8）表明：在天然状态下，*Aj*TRAF3 蛋白主要在细胞质中分布，且部分蛋白分子聚集于细胞核附近呈点状分布；经 LPS 刺激后，*Aj*TRAF3 蛋白可以进入细胞核，呈聚集点状分布；Poly I:C 刺激后，*Aj*TRAF3 蛋白分子主要在细胞核，呈聚集点状分布。

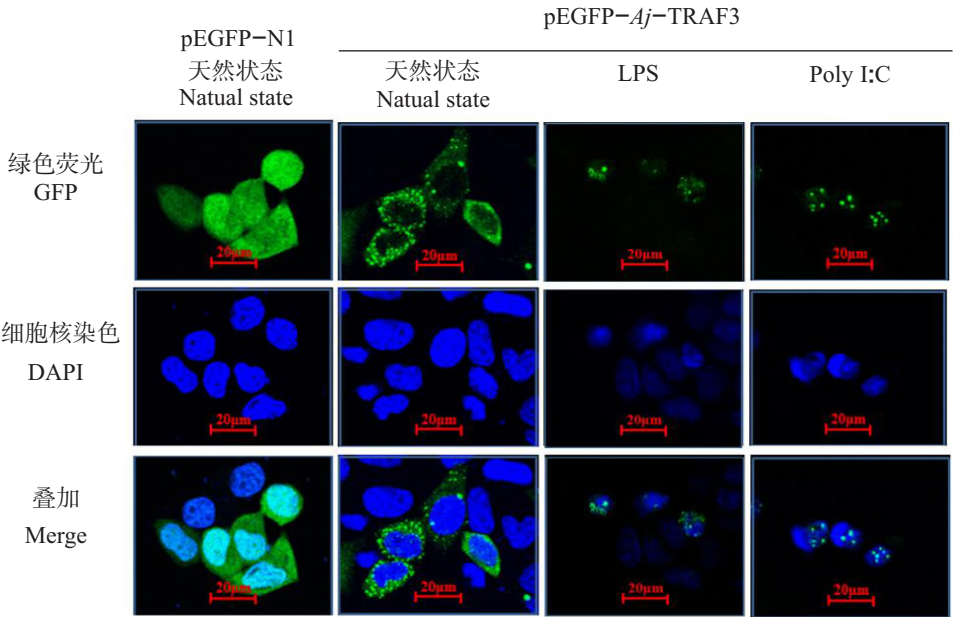


图8 小鼠辜丸间质细胞系中pEGFP-N1 pEGFP-N1-*Aj*TRAF3融合蛋白的表达情况
Fig.8 Expression of pEGFP-N1 and pEGFP-N1-*Aj*TRAF3 fusion proteins in mouse leydig cells

3 讨论

3.1 *Aj*TRAF3 基因的结构特征

日本鳎 *Aj*TRAF3 基因由 568 个氨基酸组成，具有 TRAF3 蛋白家族典型的环指结构域、锌指结构域和 TRAF 结构域，其蛋白三维结构图与人类 *TRAF3* 基因的高度一致，提示该分子具有哺乳动物 *TRAF3* 基因类似的免疫调节功能。

3.2 *Aj*TRAF3 基因的天然表达分析

日本鳎 *Aj*TRAF3 基因在各组织中均有表达，其组成型表达模式与其他硬骨鱼类相符^[14-16]。日本鳎 *Aj*TRAF3 基因在肝脏中的高水平表达与花鲈^[16]一致。有研究表明 *TRAF3* 基因在大黄鱼的鳃^[17]、红笛鲷的脾脏^[15]中也有高水平表达，反映了 *TRAF3* 基因在硬骨鱼类中的表达模式具有种属特异性，其免疫功能也可能存在差异。

3.3 免疫刺激后的 *Aj*TRAF3 基因表达变化

硬骨鱼类 *TRAF3* 在抗病毒免疫功能中的研究已有不少报道。鲤春病毒血症病毒（SVCV）可诱导鲤脾脏、头肾和肠中 *TRAF3* 基因的表达水平显著提高^[14]，而赤点石斑神经坏死病毒（RGNNV）感染后可使斜带石斑鱼脾脏细胞，以及花鲈肝脏、脾脏和脑细胞中 *TRAF3* 的表达量显著升高^[16,18]。本研究发现 Poly I:C 作为病毒类似物可以诱导日本鳎肝脏、脾脏及肾脏中 *Aj*TRAF3 的表达水平显著升高；此外，体外实验也发现，经 Poly I:C 刺激后，日本鳎肝脏细胞中 *Aj*TRAF3 的表达量也显著上调，以上结果表明 *Aj*TRAF3 参与了日本鳎抗病毒免疫应答反应，但其免疫调控机制尚需进一步研究。

目前的研究发现 *TRAF3* 参与了鱼体抗病原菌感染的免疫反应。尼罗罗非鱼经无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）感染后其头肾、脾脏和皮肤中 *TRAF3* 的表达水平上升^[18]。变形假单胞菌（*Pseudomonas plecoglossicida*）可以诱导大黄鱼脾脏、小肠和外周血中 *TRAF3* 的表达水平提高^[17]，提示

TRAF3 作为 NF- κ B 和 I 型 IFN 信号通路中的重要调控因子,参与了鱼体抗病原菌的免疫应答反应。嗜水气单胞菌是养殖鳗鲡的重要病原菌,能够引起鳗鲡肝脏严重充血、肾小球坏死脱落等败血症状^[28]。本研究发现嗜水气单胞菌能够引起日本鳗鲡肝脏、脾脏、肾脏中 *AjTRAF3* 的表达水平显著升高,推测 *TRAF3* 在日本鳗鲡抗细菌信号通路中发挥重要的调控作用,但其机制尚需进一步研究。此外,本研究发现,当嗜水气单胞菌浓度从 10^6 cfu/mL 提高至 10^7 cfu/mL 后, *AjTRAF3* 的表达水平显著提高并达到峰值,但继续提高菌液浓度至 10^8 cfu/mL 后, *AjTRAF3* 的表达水平有所降低,究其原因可能是高浓度的嗜水气单胞菌引发了鱼体免疫应答负调控作用,使其避免过度免疫反应对机体造成的伤害^[29]。

LPS 和 PGN 分别为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的重要表面抗原。研究^[17]表明 LPS 可以诱导大黄鱼脾脏和头肾中的 *TRAF3* 高表达,PGN 刺激后脾脏、头肾、鳃及外周血中 *TRAF3* 的表达水平均显著升高。此外,也有研究^[15]发现 LPS 诱导了红笛鲷头肾中 *TRAF3* 的高表达。本研究发现经 LPS 刺激后的日本鳗鲡肝脏、肾脏、脾脏,以及体外培养的日本鳗鲡肝脏细胞中 *TRAF3* 的表达水平显著升高,而且 PGN 也能引起日本鳗鲡肝脏细胞中 *TRAF3* 的表达水平显著上升,提示 *TRAF3* 参与了日本鳗鲡抵御革兰氏阴性和革兰氏阳性病原菌的免疫反应。

3.4 *AjTRAF3* 基因的亚细胞定位

亚细胞定位对于蛋白质功能的深入研究具有重要意义。天然状态下,日本鳗鲡 *AjTRAF3* 基因的融合蛋白主要在小鼠细胞的细胞质中呈点状分布且在细胞核附近聚集,与青鱼 *TRAF3*^[30] 和大黄鱼 *TRAF3*^[17] 基因的绿色荧光融合蛋白在 HEK 293T 细胞的定位结果一致。目前,鱼类有关病原体相关分子模式引起 *TRAF3* 基因的亚细胞定位变化的研究尚未见报道。本研究证实了经 LPS 和 Poly I:C 刺激后, *AjTRAF3* 蛋白在细胞核中呈散点状分布,该结果与日本鳗鲡核转录因子 STAT1 的亚细胞定位相符^[27],提示病原微生物刺激细胞后, *AjTRAF3* 蛋白可以进入细胞核对免疫相关信号通路的传递进行调控,但具体机制尚需进一步研究。

4 结论

本文克隆鉴定了日本鳗鲡 *AjTRAF3* 基因的 cDNA 全长。实时荧光定量 PCR 结果显示, LPS、Poly I:C、嗜水气单胞菌能够引起日本鳗鲡肝脏、脾脏和肾脏,以及体外培养的日本鳗鲡肝脏细胞中 *AjTRAF3* 基因的表达水平显著提高;亚细胞定位研究发现,经 LPS 和 Poly I:C 刺激后, *AjTRAF3* 蛋白从细胞质中进入细胞核,且呈散点状分布。以上结果表明 *AjTRAF3* 在日本鳗鲡抗病毒和抗细菌免疫应答反应中发挥着重要作用。

[参考文献]

- [1] XIE P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases [J]. Journal of Molecular Signaling, 2013, 8(1): 7.
- [2] SO T, NAGASHIMA H, ISHII N. TNF receptor-associated factor (TRAF) signaling network in CD4(+) T-Lymphocytes [J]. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2015, 236(2): 139-154.
- [3] YANG X D, SUN S C. Targeting signaling factors for degradation, an emerging mechanism for TRAF functions [J]. Exercise Immunology Review, 2015, 266(1): 56-71.
- [4] LANLANI A I, ZHU S, GOKHALE S, et al. TRAF molecules in inflammation and inflammatory diseases [J]. Pharmacological Reports, 2018, 4(1): 64-90.
- [5] INOUE J, ISHIDA T, TSUKAMOTO N, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling [J]. Experimental Cell Research, 2000, 254(1): 14-24.
- [6] WAJANT H, HENKLER F, SCHEURICH P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators [J]. Cellular Signalling, 2001, 13(6): 389-400.
- [7] HÄCKER H, TSENG PH, KARIN M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator Nat [J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(7): 457-468.

- [8] SAHA S K, PIETRAS E M, HE J Q, et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif [J]. EMBO Journal, 2006, 25(14): 3257-3263.
- [9] HU H M, O'ROURKE K, BOGUSKI M S, et al. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40 [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(48): 30069-30072.
- [10] CHENG G, CLEARY A M, YE Z S, et al. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling [J]. Science, 1995, 267(5203): 1494-1498.
- [11] OGANESYAN G, SAHA S K, GUO B, et al. Critical role of TRAF3 in the toll-like receptor dependent and independent antiviral response [J]. Nature, 2006, 439(7073): 208-211.
- [12] HÄCKER H, REDECKE V, BLAGOEV B, et al. Specificity in toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6 [J]. Nature, 2006, 439(7073): 204-207.
- [13] PAZ S, VILASCO M, WERDEN SJ, et al. A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response [J]. Cell Research, 2011, 21(6): 895-910.
- [14] FENG H, LIU H, KONG R, et al. Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4/5): 1159-1169.
- [15] CAI J, XIA H, HUANG Y, et al. Identification and characterization of tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 3 from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 243-251.
- [16] ZOU P F, SHEN J J, LI Y, et al. TRAF3 enhances TRIF-mediated signaling via NF- κ B and IRF3 activation in large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 114-124.
- [17] ZHANG W, JIA P, LIU W, et al. Functional characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) in innate immune [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 75: 1-7.
- [18] WU S, SUN M, ZHANG L, et al. Grouper TRAF3 inhibits nodavirus infection by regulating the STING-mediated antiviral signaling pathway [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 123: 172-181.
- [19] 夏洪丽, 汪志文, 黎源, 等. 罗非鱼 *TRAF3* 基因的表达及功能研究 (英文) [J]. 水生生物学报, 2023, 47(2): 308-315.
- [20] 农村农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 年中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- [21] 刘常标, 高飞. 福建省鳗鲡产业发展回顾与思考 [J]. 渔业研究, 2020, 42(2): 179-184.
- [22] 徐元凯, 彭欣慰, 林鹏, 等. 日本鳗鲡 *TBK1* 基因的克隆与免疫功能分析 [J/OL]. 水产学报. [2022-07-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20220709.1212.004.html>.
- [23] 余丽丽, 林鹏, 郭松林, 等. 日本鳗鲡 *TLR3* 基因的克隆及其免疫功能分析 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 160-171.
- [24] HUANG B, WANG Z, ZHANG C, et al. Identification of a novel RIG-I isoform and its truncating variant in Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 373-380.
- [25] HUANG B, WANG Z, LIANG Y, et al. Identification of four type I IFNs from Japanese eel with differential expression properties and Mx promoter inducibility [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 91: 62-71.
- [26] FENG J, LIN P, GUO S, et al. Identification and characterization of a novel conserved 46 kD maltoporin of *Aeromonas hydrophila* as a versatile vaccine candidate in European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 64: 93-103.
- [27] WANG T, LIN P, GUO S, et al. Molecular characterization and expression analysis of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 86: 956-964.
- [28] 郭松林, 冯建军, 熊静, 等. 嗜水气单胞菌在欧洲鳗鲡体内的免疫组织化学定位与病理观察 [J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 494-499.
- [29] NAKAGAWA R, NAKA T, TSUTSUI H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses [J]. Immunity, 2002, 17(5): 677-687.
- [30] WANG X, SONG X, XIE X, et al. TRAF3 enhances STING-mediated antiviral signaling during the innate immune activation of black carp [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 88: 83-93.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)