

伍冰倩,刘妮妮,杨鑫豪,等. 新型免疫分子 TRIM23 参与斑马鱼抗嗜水气单胞菌免疫应答[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):153-156.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.037

新型免疫分子 TRIM23 参与斑马鱼 抗嗜水气单胞菌免疫应答

伍冰倩,刘妮妮,杨鑫豪,张 靛,周泽建,张 红,匡奕敦,赵 珩

(中央民族大学生命与环境科学学院,北京 100081)

摘要:为获得纯化的斑马鱼 TRIM23 (tripartite motif 23) 重组蛋白并研究其免疫功能,试验采用逆转录 PCR (RT-PCR) 技术扩增 TRIM23 全长序列,将其与原核表达载体 pGEX-4T-1 连接并转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞,用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,利用谷胱甘肽硫基转移酶 (GST) 蛋白纯化介质的蛋白后,将其与嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 孵育,检测抑菌活性。结果显示,重组表达载体 pGEX-TRIM23 在宿主菌 Rosetta 中表达出约 91 ku 的重组蛋白,且蛋白部分以可溶形式存在于上清中,经体外抑菌试验检测发现,TRIM23 蛋白能够抑制嗜水气单胞菌的增殖。基于以上研究,推测 TRIM23 在斑马鱼抗细菌免疫应答过程中发挥作用。

关键词:新型免疫分子;TRIM23;斑马鱼;原核表达;嗜水气单胞菌

中图分类号: S942.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0153-04

近年来,我国的水产养殖业快速发展,但随着高密度集约化养殖模式的大面积推广,鱼类疾病时有发生,其中细菌性疾病暴发较频繁,是水产养殖面临的主要难题之一^[1]。嗜水气单胞菌是水产养殖中很常见的致病菌,属于弧菌科 (Vibrionaceae) 气单胞菌属 (*Aeromonas*),它在水环境中广泛存在,能感染鲤鱼、银鲫、草鱼、青鱼及中华鳖等绝大多数淡水鱼类,并可引发细菌性败血症,该鱼病危害范围广,流行季节长,可导致鱼类大量死亡,造成巨大的经济损失^[2]。因此,嗜水气单胞菌受到广泛关注,常作为一种代表性病原菌被用于相关研究中。

在长期进化过程中,真核生物体内逐渐形成了特定的宿主蛋白来抵御病原体的入侵,TRIM (tripartite motif, 三结构域蛋白家族) 就属于其中一类,该蛋白几乎存在于所有多细胞动物中,因 N 端拥有保守的由 1 个 RING 结构域、1 个或 2 个 B-box 结构、1 个卷曲螺旋 (coil-coiled) 组成的 RBCC 基序,所以也被称为 RBCC 蛋白^[3],许多研究表明,TRIM 蛋白具有抗菌、抗病毒功能,能够参与调节相关免疫信号通路^[4]。鱼类 TRIM 蛋白由 *ftr* 基因和 *btr* 基因编码,*ftr* 基因起源不明,是鱼类所特有的,在病毒侵染下能够表达编码蛋白,而 *btr* 基因起源于哺乳动物 *TRIM39* 的直接同源基因。*ftr* 基因和 *btr* 基因编码的 TRIM 蛋白种类非常多,仅在斑马鱼中就存在 240 种^[5-6],但关于其研究进展缓慢,至今绝大部分鱼类 TRIM 蛋白家族成员的功能还是未知的。

TRIM23 蛋白是 TRIM 蛋白家族成员之一,拥有 ARF 结构域^[7]。目前研究表明,人 TRIM23 蛋白是免疫信号通路中的重要调节因子,参与调控机体的先天性抗病毒免疫反应及炎症反应,Arimoto 等发现病毒侵染细胞时,TRIM23 能够使 NEMO 分子的 K27 泛素化,进而激活 NF- κ B 及 IRF3 信号通路^[8];另外,Pooler 等研究表明,TRIM23 通过与巨细胞病毒的基因产物 UL144 相互作用,能够加强 UL144 与 TRAF6 之间的互作,从而上调 NF- κ B 的活性^[9]。TRIM 蛋白在硬骨鱼中具有免疫活性,推测 TRIM23 在鱼类免疫方面也起到了作用。因此,本研究以斑马鱼 TRIM23 为研究对象,构建 pGEX-TRIM23 原核表达载体,对蛋白进行诱导表达及纯化,通过将 TRIM23 与嗜水气单胞菌在体外孵育,初步研究 TRIM23 对嗜水气单胞菌繁殖的影响,为深入研究斑马鱼 TRIM23 的免疫功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验地点 试验于 2016 年 6 月至 2017 年 9 月于中央民族大学生命与环境科学学院进行。

1.1.2 试验动物 斑马鱼由笔者所在实验室繁殖保存,饲养约 1 周后,解剖分离其肾脏,立即用液氮处理后,置于 -80 °C 保存备用。

1.1.3 表达载体及菌株 pGEX-4T-1 原核表达载体、嗜水气单胞菌菌株由笔者所在实验室保存;*E. coli* Top10 感受态细胞及 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞均购自天根生化公司。

1.1.4 酶和试剂 TRIzol[®] Reagent,购自拜力生物公司;M-MLV 逆转录酶,购自普洛麦格公司;*Pfu* 高保真酶、pEASY[®]-Blunt 克隆载体,购自全式金生物公司;限制性内切酶 *Eco*R I、*Sal* I 及 *T₄* DNA 连接酶,购自 NEB 公司;*Taq* 聚合酶、DL2000 DNA marker、6 × loading buffer,购自 TaKaRa 公司;质粒小量提

收稿日期:2017-10-23

基金项目:中央民族大学一流学科建设项目(编号:YDZXK201618)。

作者简介:伍冰倩(1994—),女,湖南衡阳人,硕士,主要从事免疫学研究。E-mail:763495914@qq.com。

通信作者:赵 珩,博士,教授,主要从事免疫学研究。Tel:(010)68936623;E-mail:hengzhao2000@gmail.com。

取试剂盒、凝胶回收试剂盒,购自天根生化公司;预染蛋白 marker,购自 Fermentas 公司;谷胱甘肽巯基转移酶(GST)蛋白纯化介质,购自碧云天公司;氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、三羧甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、溶菌酶,购自索莱宝科技公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 在 GenBank 上得到斑马鱼 *TRIM23* 基因的全长序列,根据所得序列,用 Prime 5.0 软件设计合成 1 对寡核苷酸引物,上游引物包含 *EcoR* I 酶切位点,序列为 5'-CGGAATTCATGGCCGCTGCTGTCG-3',下游引物包含 *Sal* I 酶切位点,序列为 5'-GCGTCGACCGCCACATCCAGAACCC-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 斑马鱼 *TRIM23* 基因的扩增 取成年斑马鱼的肾脏,用 TRIzol 法提取肾脏总 RNA,逆转录获得 cDNA,再以 cDNA 为模板 PCR 扩增 *TRIM23* 全长序列。PCR 反应体系总体积为 50 μ L,含 1 μ L 模板 DNA,5 μ L 10 \times buffer,2.5 μ L 10 μ mol/L 上游引物,2.5 μ L 10 mmol/L 下游引物,1.5 μ L 2.5 mmol/L dNTP,1 μ L *Pfu* 高保真酶,36.5 μ L ddH₂O。PCR 扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min,循环 32 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收,连接至 pEASY 克隆载体,转化到 *E. coli* Top10 感受态细胞中,筛选阳性克隆。

1.2.3 重组载体 pGEX-TRIM23 的构建 利用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pEASY-TRIM23 克隆载体及 pGEX-4T-1 表达载体,分别回收纯化酶切产物,用 T₄ DNA 连接酶将 2 个目的片段于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜后,将连接产物转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞,在含有氨苄青霉素(Amp)LB 固体培养基上筛选转化菌落,提取质粒,用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切验证,筛选阳性克隆送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.2.4 *TRIM23* 蛋白的诱导表达 将测序正确的 pGEX-TRIM23 重组载体转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞中,筛选转化菌落。挑选单克隆接种至含有 Amp LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养过夜。次日,按 1:100 的比例将培养过夜的菌液转接于 200 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 继续培养至 $D_{600\text{nm}}=0.6$ 左右,加入 IPTG,设置终浓度为 0.5、1.0 mmol/L,30 $^{\circ}$ C、170 r/min 诱导培养 5 h。离心收集菌体,加入适当 PBS(即磷酸缓冲盐溶液,含 140 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na₂HPO₄,1.8 mmol/L KH₂PO₄,pH 值为 7.3)重悬,超声破碎裂解,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min,分别取 20 μ L 裂解液上清和沉淀液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),检测融合蛋白的表达情况。

1.2.5 *TRIM23* 蛋白的纯化 将收集的菌体重悬于 PBS 中,加入终浓度为 1 mg/mL 的溶菌酶,混匀,冰上放置 30 min,超声破碎,然后于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min,收集上清。往上清中加入平衡好的 GST 标签蛋白纯化介质,4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 60 min 后,将混合物装入 1 mL 亲和层析纯化柱中,打开纯化柱底部的盖子,在重力作用下使柱内液体流出,洗涤纯化柱 5 次,每次加入 2 个柱体积的 PBS,接着洗脱目的蛋白 10 次,每

次用 1 个柱体积的洗脱缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L 谷胱甘肽(GSH),pH 值为 8.0],分别收集各穿柱液进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.6 体外检测 *TRIM23* 蛋白对嗜水气单胞菌的影响 将嗜水气单胞菌接种至 LB 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,按 1:100 的比例将培养过夜的菌液转接于 100 mL LB 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h,10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体并用 TBS(即三乙醇胺缓冲盐溶液,含 50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,pH 值为 7.5)冲洗 3 次,然后用 TBS+Ca²⁺ 缓冲液(含 10 mmol/L CaCl₂ 的 TBS 缓冲液)重悬至 1 \times 10⁵ CFU/mL,备用。

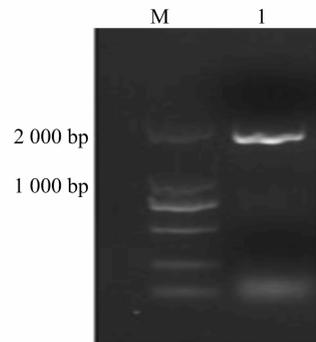
1.2.6.1 检测不同浓度 *TRIM23* 蛋白对嗜水气单胞菌的影响 将细菌重悬液分装到 1.5 mL 无菌离心管中,每管 100 μ L,加入纯化的 *TRIM23* 蛋白,设置浓度梯度 0、6、12、24、30、36、42 μ g/mL,用 TBS 补足总体积至 200 μ L,25 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,按一定比例稀释菌液,取 50 μ L 均匀涂布于 LB 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养过夜,计数。

1.2.6.2 检测 *TRIM23* 在不同时间对嗜水气单胞菌的影响 将细菌重悬液分装到 1.5 mL 无菌离心管中,每管 100 μ L,加入纯化的 *TRIM23* 蛋白(蛋白终浓度为 30 μ g/mL),用 TBS 补足总体积至 200 μ L,对照组不加 *TRIM23* 蛋白,设置时间梯度 0、1、2、4 h,25 $^{\circ}$ C 孵育。按一定比例稀释菌液,取 50 μ L 均匀涂布于 LB 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养过夜,计数。

2 结果与分析

2.1 *TRIM23* 基因的扩增

由图 1 可知,以斑马鱼肾脏 cDNA 为模板进行 *TRIM23* 基因的 PCR 扩增,产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 731 bp 的单一一条带,与目的基因大小相符。



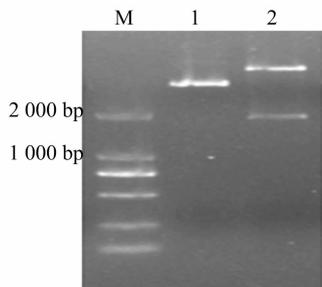
M—2 kb DNA marker; 1—*TRIM23* 基因 PCR 产物
图1 斑马鱼 *TRIM23* 基因的 PCR 扩增

2.2 重组载体 pGEX-TRIM23 的双酶切鉴定

将重组载体 pGEX-TRIM23 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示,在接近 2 000 bp 处有 1 条被切下的条带,说明 *TRIM23* 基因已被连入 pGEX-4T-1 质粒中。对所得阳性克隆进行基因测序,测序结果表明,连入 pGEX-4T-1 载体中的 *TRIM23* 基因与 GenBank 中 *TRIM23* 基因的碱基序列一致,阅读框正常,说明原核表达载体 pGEX-TRIM23 构建成功。

2.3 *TRIM23* 蛋白的诱导表达

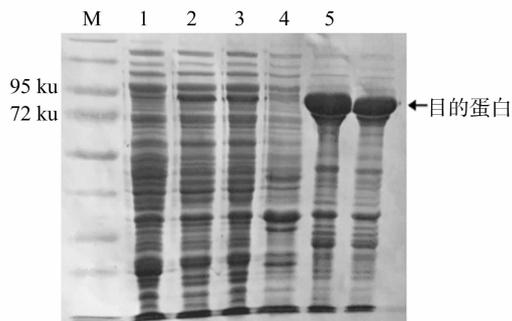
将重组载体 pGEX-TRIM23 转化到 Rosetta 感受态细胞



M—2 kb DNA marker; 1—重组质粒 pGEX-TRIM23;
2—重组质粒 pGEX-TRIM23 的双酶切产物

图2 重组质粒 pGEX-TRIM23 的双酶切验证

中,37 ℃、220 r/min 培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 时,加入终浓度分别为 0.5、1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h,收集细菌超声裂解,分别取裂解液上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。由图 3 可知,在泳道 3~4 和泳道 6~7 中,95 ku 区域均出现了目的条带,融合蛋白分子量大小约为 91 ku,与预期目的蛋白大小一致,表明 TRIM23 蛋白被成功诱导表达,且以可溶性和包涵体的形式分别存在于上清及沉淀中。



M—蛋白 marker; 1—IPTG 诱导的含 pET28a 空载体的大肠杆菌裂解液上清; 2—0.5 mmol/L IPTG 诱导的重组大肠杆菌裂解液上清; 3—1.0 mmol/L IPTG 诱导的重组大肠杆菌裂解液上清; 4—IPTG 诱导的含 pET28a 空载体的大肠杆菌裂解液沉淀; 5—0.5 mmol/L IPTG 诱导的重组大肠杆菌裂解液沉淀; 6—1.0 mmol/L IPTG 诱导的重组大肠杆菌裂解液沉淀

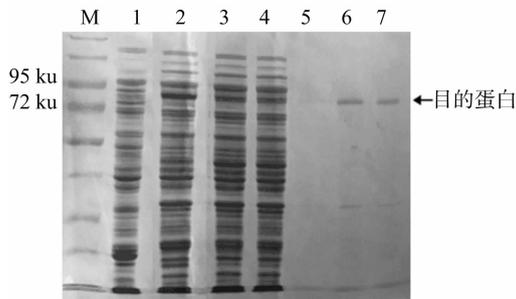
图3 重组蛋白 TRIM23 的诱导表达

2.4 TRIM23 蛋白的纯化

将收集的菌液用超声破碎裂解后,离心获取上清,与 GST 标签蛋白纯化介质孵育,分别取上样流穿液、洗涤液、洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。由图 4 可知,泳道 4~5 为与 GST 标签蛋白纯化介质孵育后的流穿液,其中未出现目的条带,说明 TRIM23 蛋白已经特异性结合到纯化介质上,经 PBS 多次洗涤纯化柱,泳道 6 中基本不存在明显杂带,说明非特异性结合在纯化介质上的杂蛋白已经被洗脱下来,泳道 7~8 为蛋白洗脱液,在 95 ku 区域内均出现明显条带,说明 TRIM23 蛋白被成功洗脱下来。

2.5 TRIM23 对嗜水气单胞菌的影响

2.5.1 不同浓度 TRIM23 蛋白对嗜水气单胞菌的影响 将终浓度为 0、6、12、24、30、36、42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TRIM23 蛋白分别与嗜水气单胞菌在室温下孵育 3 h,随后测定活细菌数,由图 5 可知,当 TRIM23 蛋白浓度 $\geq 12 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,试验组的细菌数量均低于空白对照组,且随着蛋白浓度的增加,细菌数量呈现减少的趋势,但当蛋白浓度增加至 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细菌数量趋



M—蛋白 marker; 1—含 PGEX-4T-1 空载体的大肠杆菌裂解液上清; 2—重组大肠杆菌裂解液上清; 3~4—与纯化介质孵育后的上样流穿液; 5—第 5 次洗涤液; 6~7—蛋白洗脱液

图4 重组蛋白 TRIM23 的纯化

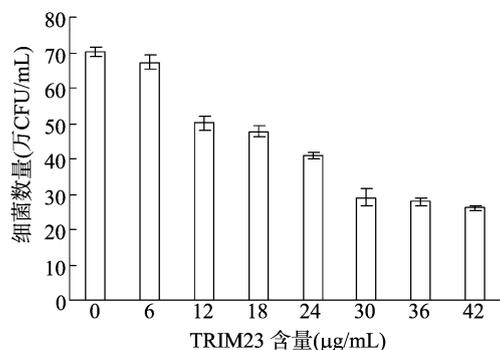


图5 不同浓度 TRIM23 蛋白对嗜水气单胞菌增殖的影响

于稳定。

2.5.2 TRIM23 蛋白在不同时间对嗜水气单胞菌的影响 将终浓度为 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TRIM23 蛋白与嗜水气单胞菌分别孵育 0、1、2、4 h,测定活细菌数,由图 6 可知,在整个孵育过程中,空白对照组及 TRIM23 处理试验组的细菌数均有一定的增长,但孵育 1、2、4 h 时,TRIM23 处理试验组的细菌数均低于对照组的细菌数,说明 TRIM23 蛋白能够抑制嗜水气单胞菌的增殖。

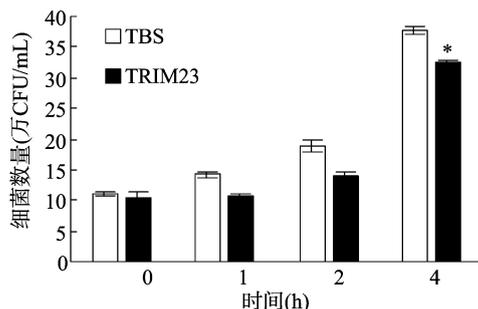


图6 TRIM23 在不同时间对嗜水气单胞菌增殖的影响

3 讨论与结论

TRIM 蛋白的免疫功能近年来一直倍受关注,研究成果颇丰,如 Yap 等发现 TRIM5 具有限制鼠白血病病毒 (murine leukemia virus, 简称 MLV) 的能力^[10]; TRIM56 能够与牛腹泻病毒 (bovine diarrhoea virus, 简称 BDV) 的氨基蛋白酶结合,从而限制 BDV 的复制^[11]; Uchil 等全面分析了人类及小鼠中 55 种具备抗逆转录病毒活性的 TRIM 蛋白,发现其中约有 20 种拥有干扰逆转录病毒进入细胞及释放的能力^[12]; Gack 等

研究表明,TRIM25 能够泛素化 RIG-I,进而激活 RIG-I 信号通路^[13];TRIM21 能够与 PIN1 分子的互作,以阻止 PIN1 与 IRF3 的结合,从而增强 IRF3 的稳定性,最终加强 I 型干扰素的表达^[14]。但就目前的研究而言,TRIM 蛋白免疫功能的研究主要集中在人、小鼠等物种,而关于鱼类的研究报道很少,尚存在大量空白,因此本研究探讨斑马鱼 TRIM23 蛋白表达及其对嗜水气单胞菌的影响,为深入研究 TRIM23 的免疫功能提供实践基础。

细菌性感染是制约水产养殖业发展的一个重要因素^[15],而嗜水气单胞菌是引发淡水鱼类败血症的主要致病菌,一旦感染鱼类,就会造成鱼类的大量死亡^[16-18]。为了初步研究 TRIM23 蛋白的免疫功能,笔者利用含有 GST 融合标签的 pGEX-4T-1 原核表达载体进行蛋白的体外表达,获得纯化的 TRIM23 蛋白后,将其与嗜水气单胞菌孵育,发现该蛋白对嗜水气单胞菌的增殖有一定的抑制作用,这表明 TRIM23 参与了斑马鱼抗细菌免疫应答反应,但是其具体的作用机制仍需进一步研究,对人 TRIM23 的研究表明,其在病毒感染时以泛素连接酶身份参与激活 NF- κ B 信号通路,那么在细菌感染过程中,斑马鱼 TRIM23 能否同样参与调控 NF- κ B 信号通路也有待试验证实。

本研究构建了 pGEX-TRIM23 原核表达载体,成功获得了纯化的 GST-TRIM23 融合蛋白,并发现其能够抑制嗜水气单胞菌的增殖,这为探寻与 TRIM23 相互作用的蛋白,阐明 TRIM23 参与斑马鱼抗细菌免疫反应的机制奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 林福森. 养殖鱼类常见细菌性疾病的防治[J]. 江西水产科技, 2016(4):41-45.
- [2] 唐英,夏虎,陆风辉,等. 鱼类感染嗜水气单胞菌后的病理特征及其防控措施[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版),2017,29(3):33-38.
- [3] Ikeda K, Inoue S. Trim proteins as ring finger E3 ubiquitin ligases[J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*,2012,770:27-37.
- [4] Menab F W, Rajsbaum R, Stoye J P. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation[J]. *Current Opinion in Immunology*,2011,23(1):46-56.
- [5] Pasquier L D. Fish 'n' TRIMs;minireview[J]. *Journal of Biology*, 2009,8:50.
- [6] Philippe H, Emilie L, Valérie B, et al. A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish[J]. *BMC Biology*,2009,7(1):1-23.
- [7] Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins[J]. *EMBO Molecular Medicine*,2011,3(9):513-527.
- [8] Arimoto K I, Griffin D E. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2010,107(36):15856-15861.
- [9] Poole E, Groves I, Macdonald A, et al. Identification of TRIM23 as a cofactor involved in the regulation of NF- κ B by human cytomegalovirus[J]. *Journal of Virology*,2009,83(8):3581-3590.
- [10] Yap M W, Nisole S, Lynch C, et al. Trim5 protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2004,101(29):10786-10791.
- [11] Wang J, Liu B M, Wang N, et al. TRIM56 is a virus- and interferon-inducible E3 ubiquitin ligase that restricts pestivirus infection[J]. *Journal of Virology*,2011,85(8):3733-3745.
- [12] Uchil P D, Quinlan B D, Chan W T, et al. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle[J]. *PLOS Pathogens*,2008,4(2):e16.
- [13] Gack M U, Shin Y C, Joo C H, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity[J]. *Nature*,2007,446(7138):916-920.
- [14] Yang K, Shi H X, Liu X Y, et al. TRIM 21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response[J]. *Journal of Immunology*,2009,182(6):3782-3792.
- [15] 孔杰,李小义,王艳艳,等. 1 株鲟源金黄杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):129-132.
- [16] 李梦茜,张振旺. 罗非鱼细菌性败血症病原菌嗜水气单胞菌拮抗菌株的筛选和鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):129-131.
- [17] 葛卫强,王高学. 鱼类细菌性疾病的分类及防治[J]. 畜牧与饲料科学,2010,31(1):47-48.
- [18] 谢云显. 浅议淡水鱼类细菌性败血症鱼病的防治[J]. 农民致富之友,2016(14):284.