

doi: 10.7541/2020.003

斑马鱼 *fin56* 基因克隆表达及功能研究

邝 鸣^{1,2,3,4} 刘皖蒙^{1,2,3,4} 姚 健^{1,2,3,4} 霍诗天^{1,2,3,4} 刘学芹^{1,2,3,4}

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070; 3. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 武汉 430070; 4. 水产养殖国家级实验教学示范中心, 武汉 430070)

摘要: 为进一步了解硬骨鱼类特有的 *finTRIM* (Fish novel tripartite motif, *fin*) 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 抗病毒天然免疫中的作用, 研究克隆了斑马鱼 *fin56* 基因并分析了其对鲤春病毒血症病毒 (Spring viremia of carp virus, SVCV) 增殖的抑制作用。根据 NCBI 中斑马鱼 *fin56* 序列设计引物, 采用 PCR 方法, 扩增 *fin56* CDS 区, 连接至真核表达载体 pcDNA4.0-His, 构建真核表达质粒 pcDNA4.0-*fin56*-His, 进行生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测 SVCV 感染斑马鱼胚胎成纤维细胞 (ZF4) 后 *fin56* mRNA 的变化。系统进化树分析显示, 斑马鱼 *fin56* 单独聚为一支。氨基酸多序列比对结果显示, 其与黑猩猩、牛、鼠的 *TRIM56* 相似度为 22%—23%。*fin56* 二级结构具有 1 个 RING 指结构域, 1 个 B-box 结构域, 1 个卷曲螺旋结构域和 1 个 B30.2 结构域。qRT-PCR 检测结果显示, *fin56* 在 SVCV 感染后 24h 表达量显著上升。在过表达 *fin56* 后, SVCV 的 G 蛋白 mRNA 水平和蛋白水平在 12h 和 24h 相比对照组明显减少, 培养基上清中 SVCV 滴度也明显降低, 表明 *fin56* 抑制 SVCV 的增殖。实验为进一步揭示 *finTRIM* 在鱼类病毒性疾病中的免疫调节机制提供参考。

关键词: *fin56*; 克隆表达; SVCV; 抗病毒; 斑马鱼

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)01-0020-06

天然免疫在机体抵抗病原体感染中发挥重要作用。细胞中天然免疫信号转导途径的激活受各种转录或翻译修饰以及翻译后修饰(包括磷酸化、乙酰化和泛素化)的调节^[1]。*TRIM* 蛋白参与许多细胞过程, 如发育过程, 肿瘤抑制和细胞周期调节。一些 *TRIM* 蛋白通过不同的机制与抗病毒防御相关, 通常由 I 型 IFN 诱导或作为调节剂和增强剂对病毒感染作出反应^[2]。在哺乳动物中, *TRIM25* 在 p53/Mdm2 环中具有双重功能: *TRIM25* 可增强 p53/Mdm2 的丰度, 也可抑制 p53 的转录活性并抑制对 DNA 损伤的反应^[3]。人 (*Homo sapiens*) *TRIM11* 在肺癌中发挥重要作用, 其过表达促进肺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[4]。人 *TRIM56* 通过阻止病毒 RNA 合成来限制 A 型和 B 型流感病毒增殖^[5]。除哺乳动物外, 许多研究表明 *TRIM* 蛋白在鱼类抗病毒免疫系统中发挥重要作用。大黄鱼 *TRIM8* 通过调节促炎因子

和干扰素信号传导发挥抗病毒作用^[6]。石斑鱼 *TRIM32* 和 *TRIM39* 可以抑制虹彩病毒和诺达病毒的复制^[7,8], 并且一些鱼类 *TRIM* 蛋白在抗病毒信号传导途径中发挥负调节作用, 例如石斑鱼 *TRIM16* 负调控干扰素免疫反应并促进 DNA 病毒的复制^[9]。石斑鱼 *TRIM62* 促进单股正链 RNA (ssRNA) 病毒石斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 的复制^[10]。

TRIM 家族蛋白包含 3 个结构域, 1 个 RING 结构域, 1 个或 2 个 B-box 结构域和 1 个卷曲螺旋 (Coiled-coil) 结构域。此外还具有 1 个高度可变的 C 末端, 含有 PRY / SPRY 结构域, 也称为 B30.2 结构域或 NHL 结构域^[11,12]。*FinTRIM* 是在硬骨鱼类中发现的一个新的 *TRIM* 亚家族, 在病毒感染的虹鳟中被最先鉴定^[13]。目前对于 *finTRIM* 在鱼类免疫系统中的作用研究较少。最近的研究表明, *fin36* 可以通过 IFN 途径激活免疫反应从而抑制 SVCV 的复制^[14]。

收稿日期: 2019-01-28; 修订日期: 2019-07-15

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900505); 国家自然科学基金(31172434); 中央高校基本科研业务费专项资金(2662018YJ022)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900505); the National Natural Science Foundation of China (31172434); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662018YJ022)]

作者简介: 邝鸣(1997—), 男, 湖南郴州人; 本科生; 主要从事鱼类疾病学研究。E-mail: kuangming19970622@qq.com

通信作者: 刘学芹, 女, 山东烟台人; 博士, 教授, 博士生导师; 主要从事水产病毒致病机理与综合防控研究。E-mail: xueqinliu@mail.hzau.edu.cn

*itr83*的过表达可以抑制IHNV、VHSV、SVCV的复制^[15]。

鲤春病毒血症(Spring viremia of carp, SVC)是由SVCV引起的高死亡率的严重疾病,属于弹状病毒科的鲤春病毒属的成员。SVCV是一种单股负链RNA(ssRNA)病毒,编码五种病毒蛋白并导致水产养殖严重损失^[16-18]。尽管SVCV在水产养殖中造成严重损害,但对该病毒的致病机制还了解甚少,且目前尚无针对SVCV的疫苗^[19]。

本研究克隆了斑马鱼*itr56*,对其进行生物信息学分析和真核表达载体的构建,过表达后检测其对SVCV复制的影响,为研究FinTRIM在天然免疫中的作用及机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

主要试剂: M199和DMEM细胞基础培养液购自Hyclone, OPTI-MEM、青霉素-链霉素溶液、0.25% Trypsin-EDTA、胎牛血清(FBS)均购自Gibco公司, 结晶紫购自BIOSHARP公司, 甲基纤维素购自Sigma-Aldrich公司, 转染试剂Fugene HD reagent购自Promega, ECL化学发光显色液购自武汉聚能译通生物有限公司, SVCV-G单克隆抗体为本实验室制备, 鼠源His单抗、兔源Actin多抗、HRP标记山羊抗鼠IgG、HRP标记山羊抗兔IgG购自于爱博泰克生物科技有限公司, 真核表达载体pcDNA4.0-His由本实验室保存, 2×Taq PCR Mix、反转录酶、限制性内切酶、DNA Marker、RNAiso Plus及PrimeScript™RT Reagent Kit with gDNA Eraser等购自Takara公司, 蛋白Marker及T4 DNA连接酶购自Thermo公司, DNA纯化回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自OMEGA公司。

主要仪器: 核酸及蛋白凝胶电泳仪、凝胶成像仪为BioRad公司生产, 台式冷冻离心机(Eppendorf); Nanodrop 2000浓度定量仪、-80℃超低温冰箱为Thermo生产, 超净工作台、生物安全柜、生化培养箱(北京东联哈尔仪器制造有限公司), 二氧化碳恒温培养箱(日本三洋公司), 实时荧光定量PCR仪(Roche LightCycler® 480II), ECL化学发光仪(美国通用电器), 转膜仪(京六一仪器长), 恒温水浴锅(精宏), 二氧化碳恒温培养箱(日本三洋公司)。

1.2 细胞和病毒

SVCV毒株及FHM、ZF4细胞均为本实验室保存, 分别使用含有10%胎牛血清、和1%双抗(青霉素-链霉素各100 μg/mL)的M199、DMEM培养基中置于28℃, 5% CO₂的恒温培养箱中培养。

1.3 克隆斑马鱼*itr56* CDS区全长

根据实验说明书, 使用RNAiso Plus试剂提取斑马鱼脾的总RNA, 使用PrimeScript RT™试剂盒反转录获得相应cDNA。根据NCBI中斑马鱼*itr56* (序列号: XM_003200557.5) CDS序列设计引物*itr56-F*和*itr56-R*, 将PCR产物插入pcDNA4.0-His载体中, 构建pcDNA4.0-FTR56-His质粒。*Kpn* I 和*Xba* I 分别加入到上游引物和下游引物中。引物序列见表1。

表1 引物列表

Tab. 1 Primers list

用途 Application	名称 Prime name	序列Sequence (5'—3')
Plasmid construction	<i>itr56-F</i>	GGGGTACCATGGCTGAATCCA GGTTTTTC
Plasmid construction	<i>itr56-R</i>	GCTCTAGATCTGTACACAGTT TAAGTC
qRT-PCR	<i>qitr56-F</i>	CGACTACTGGCATCACGAGG
qRT-PCR	<i>qitr56-R</i>	CTGTCACACTCCACGTCTCC
qRT-PCR	SVCV-G-F	CGACCTGGATTAGACTTG
qRT-PCR	SVCV-G-R	AATGTTCCGTTTCTCACT
qRT-PCR	TBP-F	TTACCCACCAGCAGTTTAG
qRT-PCR	TBP-R	ACCTTGGCACCTGTGAGTA

1.4 序列分析

使用ClustalX2进行序列比对, 并使用ESPrpt 3.0(<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)呈现。所述系统进化树是基于FTR56的氨基酸序列使用邻接法(NJ)算法(MEGA版本5.1)构成。使用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对FTR56结构域的示意结构进行预测。

1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

通过qRT-PCR检测FTR56 mRNA的表达变化, 将长满单层的ZF4细胞按照10⁶个/孔(6孔板)的密度均匀传代, 待细胞长至80%—90%时, 吸弃原培养基, 然后用PBS溶液轻微洗涤细胞1次, 按照5MOI SVCV感染剂量感染ZF4细胞, 28℃孵育1h后更换成细胞维持培养基, 置于细胞培养箱中继续培养, 于6h、12h和24h用PBS洗三次, 收取细胞样, 提取RNA并反转录获得cDNA。根据SYBR Green Real-time PCR Master Mix试剂盒标准操作说明设置反应条件, 通过Light Cycler/Light Cycler 480 System (Roche)分析荧光信号。PCR条件如下: 95℃ 5min, 然后40个循环的95℃ 15s, 60℃ 20s和72℃ 20s。qRT-PCR的所有引物如表1所示。通过使用2^{-ΔΔC_t} (其中C_t是阈值循环)方法将它们与相应的对照进行比较来计算相对倍数变化。进行三次独立实验以进行统计分析。

1.6 质粒转染和病毒感染

将培养的FHM细胞转接到6孔板。24h后显微

镜下观察,当细胞量铺满板底的80%—90%时使用FuGENE HD转染试剂转染。用2 μ g的pcDNA4.0-FTR56质粒或pcDNA4.0质粒转染FHM细胞。在转染24h后,吸弃原培养基,然后用PBS溶液轻微洗涤细胞1次,按照0.05MOI SVCV感染剂量感染FHM细胞,28℃孵育1h后更换成细胞维持培养基,置于细胞培养箱中继续培养。在感染后6h、12h和24h后收集上清液用于测定病毒滴度,收取细胞用于qRT-PCR和蛋白免疫印记。

1.7 蛋白免疫印记(Western blot)

用RIPA裂解缓冲液处理细胞,之后进行SDS-PAGE电泳后将样品转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。在室温下用5%脱脂乳封闭1h后,将膜与小鼠抗His抗体(1:1000稀释)或小鼠抗SVCV-G(实验室制备和保存)2h,兔抗- β -Actin抗体(1:10000稀释)用作对照,用TBST洗涤三次后,然后用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(1:2000稀释)孵育45min,使用化学发光底物和ECL化学发光仪进行检测。

1.8 空斑实验

将FHM细胞接入12孔板,20h后单层细胞铺满底壁。用无血清DMEM洗涤两遍。10倍梯度稀释病毒,每孔加入500 μ L已稀释的病毒液,每个浓度级做三孔重复。病毒吸附1h后,除去感染培养基,在28℃下用含有5%FBS和1.5%羧甲基纤维素的M199培养基覆盖。在第60h,将细胞用10%甲醛固定过夜(10—12h)并用0.5%结晶紫染色3h时,读数并计算。

1.9 统计学处理

所有相关实验至少进行三次,结果相似。使用Prism 6(GraphPad软件)展示统计数据。结果表示为平均值 $\pm$ SDM。使用双向ANOVA比较数据。对于

所有比对, $P<0.05$ 被认为是显著的并且用*标记, $P<0.01$ 用**标记, $P<0.001$ 用***标记并且 $P<0.0001$ 用****标记。

2 结果

2.1 FTR56的序列特征

系统进化树显示FTR56的进化关系于黑猩猩、牛、鼠的TRIM56分开,单独聚为一簇(图1)。FTR56具有finTRIM系列典型域结构,包含RING结构域,B-box结构域和PRY/SPRY(B30.2)结构域(图2)。FTR56的全长CDS长度为1686 bp并编码了561个氨基酸。比对结果表明,斑马鱼FTR56与其他物种TRIM56的同源性较低,与人、鼠、牛、黑猩猩TRIM56氨基酸序列相似性为13.57%,13.61%,14.10%和13.68%。

2.2 FTR56在FHM细胞中的过表达检测

将FHM细胞接入12孔板,20h后单层细胞铺满底壁后,将pcDNA4.0-His或pcDNA4.0-FTR56-His转染到细胞中。转染后36h,用RIPA裂解缓冲液处理细胞,使用western blot测定法验证FTR56在FHM细胞中成功过表达(图3)。

2.3 SVCV感染对ftr56 mRNA水平的影响

使用qRT-PCR在6h、12h和24h的时间点检测SVCV感染组ZF4细胞中FTR56的转录水平并和未感染组进行比较,MOI为5,TBP(TATA box binding protein)用作内参。与对照组相比,FTR56的转录水平6h和12h无显著变化,SVCV感染后24h显著上调(图4)。

2.4 FTR56过表达抑制SVCV的增殖

为了研究FTR56是否具有抵御病毒感染的能力,我们检测了FTR56过表达对SVCV复制的影响。

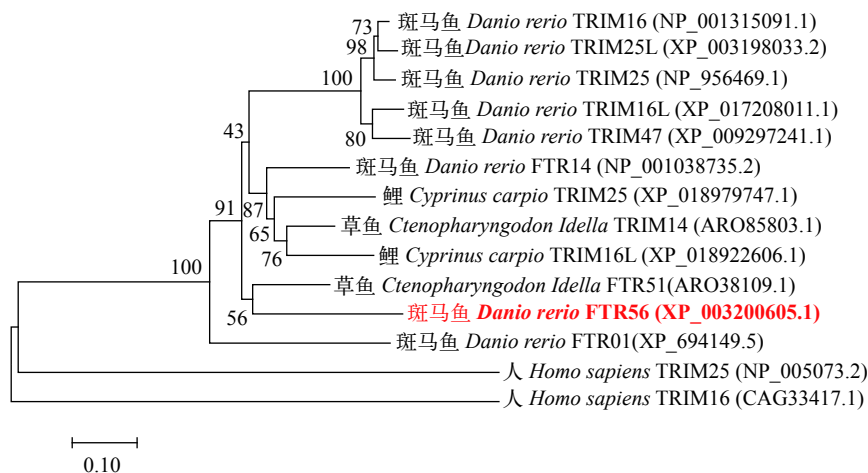


图1 Neighbor-joining法建立斑马鱼FTR56系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of zebrafish FTR56 using neighbor-joining methods

响。将pcDNA4.0-FTR56-His质粒转染FHM细胞,同时设转染pcDNA4.0-His空载体做为对照。在转染24h后,以MOI为0.05的剂量,接种SVCV病毒,在感染后6h、12h和24h收集细胞,通过qRT-PCR检测



图2 FTR56是硬骨鱼类中finTRIM家族的成员

Fig. 2 FTR56 is a member of the finTRIM family in teleost fish

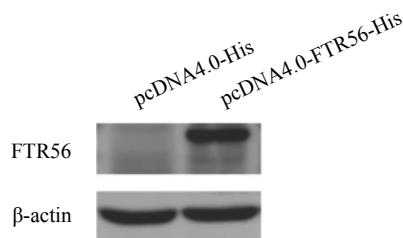


图3 Western blot检测FTR56在FHM细胞中的过表达情况

Fig. 3 Western blot assay used to detect the overexpression of FTR56 using anti-His tag mouse monoclonal antibody was used in the test

SVCV G基因mRNA的表达;以病毒G蛋白的单抗作为一抗,通过Western blot检测SVCV G基因蛋白表达;收集上清,通过空斑试验检测SVCV病毒的增殖滴度。结果显示FTR56在感染12h和24h显著抑制SVCV G mRNA的表达和蛋白合成(图5a、5b),同时在病毒感染6h、12h和24h对病毒的滴度也有

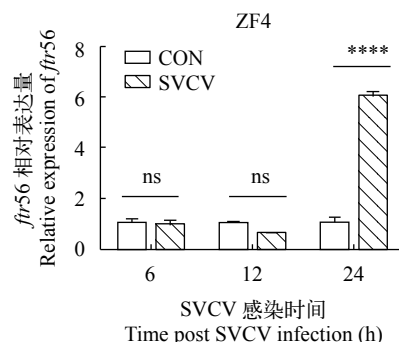


图4 *ftr56* mRNA在SVCV感染ZF4细胞6h、12h和24h的相对表达水平

Fig. 4 Relative mRNA expression of *ftr56* in FHM cells infected with SVCV at 6h, 12h and 24h

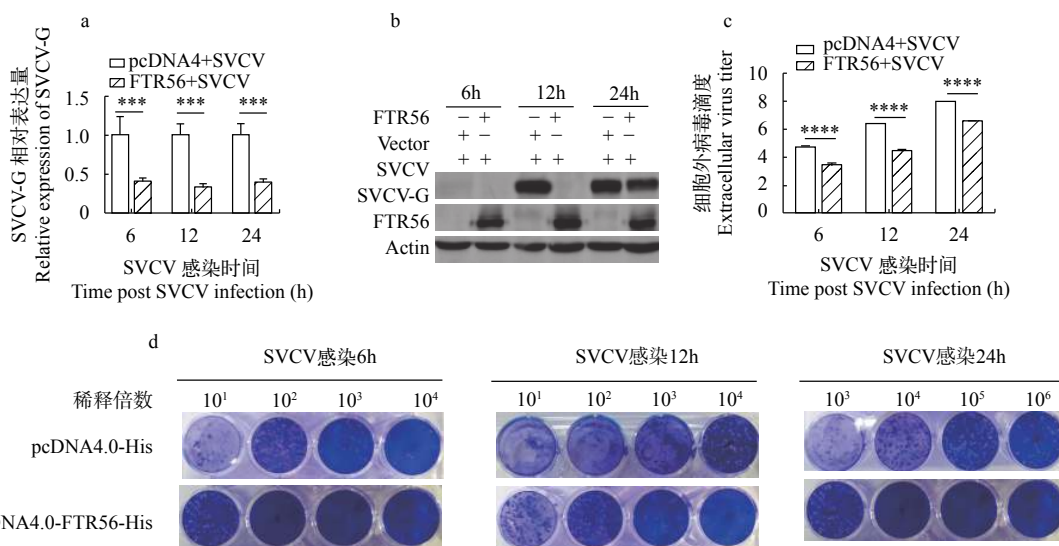


图5 过表达FTR56抑制了SVCV的复制

Fig. 5 Overexpression FTR56 inhibited the replication of SVCV

a. 用SVCV感染转染pcDNA4.0-FTR56-His或pcDNA4.0-His质粒的FHM细胞后SVCV-G的相对表达水平; b. 转染pcDNA4.0-FTR56-His或pcDNA4.0-His质粒后SVCV-G的蛋白水平, 将FHM细胞接种在6孔板中。用2 μ g的pcDNA4.0-FTR56-His或pcDNA4.0-His质粒转染每个孔, 收取细胞用于蛋白质免疫印迹; c. 收集上清液, 通过空斑形成试验测定病毒滴度。使用双向ANOVA测试进行统计学分析, 误差线是一式三份的SD, **** $P < 0.0001$; d. 在转染后24h, 用MOI 0.05 SVCV处理细胞。在病毒感染6h、12h和24h后收集上清液, 并在60h后通过结晶紫染色评估病毒诱导的CPE

a. The relative expression level of SVCV-G after transfected with pcDNA4.0-FTR56-His or pcDNA4.0-His plasmids in FHM cells infected with SVCV; b. The protein level of SVCV-G after transfected with FTR56 or vector plasmids. FHM cells were seeded in 6-well plates. Each well was transfected with 2 μ g of pcDNA4.0-FTR56-His or pcDNA4.0-His plasmids. The cells were harvested for western blot analysis; c. The supernatant was collected and viral titer was determined by plaque formation assay. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA test. Error bars are the SDs in triplicate. **** $P < 0.0001$; d. FHM cells were transfected with pcDNA4.0-FTR56-His or pcDNA4.0-His plasmids. At 24h post transfection, cells were treated with MOI 0.05 SVCV. The supernatant was collected after 6h, 12h and 24h viral infection and viral-induced CPE was assessed by crystal violet staining at 60h post SVCV infected. empty plasmid-transfected cells were also used as controls

显著抑制作用(图 5c、5d)。结果表明FTR56对SVCV的复制具有抑制作用。

3 讨论

TRIM家族具有E3泛素连接酶活性,可以影响许多重要的细胞过程,如细胞凋亡、细胞周期调节、分化、代谢途径和细胞对病毒感染的反应^[11]。在哺乳动物中,TRIM家族成员可以调节和协调先天免疫和抗病毒反应^[11, 12, 20, 21]。最近的一些研究表明TRIM家族在鱼类天然免疫中也发挥重要作用,来自石斑鱼的TRIM8同源物通过增加干扰素调节因子3(IRF3)和IRF7的转录以及增强的IRF3/IRF7诱导的干扰素刺激的应答元件(ISRE)启动子活性来发挥其抗病毒活性^[6],鲤TRIM32和TRIM47可以抑制SVCV的复制^[22, 23]。目前对finTRIM研究较少,迄今为止还没有关于鱼类FTR56分子功能的研究。本研究克隆并表达了斑马鱼FTR56,探究其在病毒感染中的功能。

TRIM蛋白从N末端到C末端由1个RING结构域,1个或2个B-box结构域,卷曲螺旋结构域,PRY和SPRY结构域组成的B30.2结构域等^[24]。因此,TRIM蛋白也称为RBCC蛋白。研究表明,TRIM蛋白的RING结构域和B30.2结构域在对病毒感染的反应中起重要作用^[14],FTR83和FTR82含有1个RING结构域,2个B-box结构域,1个卷曲螺旋结构域,以及一个B30.2结构域^[15],FTR36含有1个RING结构域,1个B-box结构域,2个卷曲螺旋结构域和一个B30.2结构域^[14]。而FTR56具有一个B-box结构域,和一个卷曲螺旋结构域。

TRIM参与多种抗病毒反应机制,其常作为调节因子起作用^[25]。许多TRIM基因在病毒感染后上调并在鱼类免疫系统中发挥关键作用,如TRIM8、TRIM13和TRIM25^[6, 26, 27],斑马鱼中的这些finTRIM基因可能在免疫系统中发挥重要作用。对斑马鱼finTRIM的研究表明,FTR83和FTR36显著增加IFN表达并调节ISG的表达,在体外和体内介导对RNA病毒的有效抗病毒活性^[14, 15]。在本研究中FTR56在SVCV感染的ZF4细胞中mRNA水平24h显著上调,在FHM细胞中过表达FTR56,在SVCV感染12h和24h显著抑制SVCV G的转录水平和蛋白质水平,进一步通过空斑实验检测,病毒滴度相比于对照组显著降低。通过这些研究结果表明斑马鱼FTR56是一个关键的抗病毒蛋白。

本研究克隆了斑马鱼fir56基因,对其序列和表达谱的一系列特征进行了生物信息学分析,并进行了真核表达。在FHM细胞中过表达FTR56,发现其

对SVCV的复制具有显著抑制作用,本研究的结果为深入了解斑马鱼FTR56的抗病毒机制的研究提供了基础,为加强水产养殖病毒性疾病的预防和控制提供新的信息。

参考文献:

- [1] Uchil P D, Hinz A, Siegel S, *et al.* TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity [J]. *Journal of Virology*, 2013, **87**(1): 257-272.
- [2] Rajsbaum R, GarcíaSastre 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.
- [3] Zhang P, Elabd S, Hammer S, *et al.* TRIM25 has a dual function in the p53/Mdm2 circuit [J]. *Oncogene*, 2015, **34**(46): 5729-5738.
- [4] Wang X, Shi W, Shi H, *et al.* TRIM11 overexpression promotes proliferation, migration and invasion of lung cancer cells [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, **35**(1): 100.
- [5] Liu B, Li N L, Shen Y, *et al.* The C-terminal tail of TRIM56 dictates antiviral restriction of influenza A and B viruses by impeding viral RNA synthesis [J]. *Journal of Virology*, 2016, **90**(9): 4369.
- [6] Huang Y, Yu Y, Yang Y, *et al.* Fish TRIM8 exerts antiviral roles through regulation of the proinflammatory factors and interferon signaling [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(54): 435-444.
- [7] Wang W, Huang Y, Yu Y, *et al.* Fish TRIM39 regulates cell cycle progression and exerts its antiviral function against iridovirus and nodavirus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(50): 1-10.
- [8] Yu Y, Huang X, Liu J, *et al.* Fish TRIM32 functions as a critical antiviral molecule against iridovirus and nodavirus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(60): 33-43.
- [9] Yu Y, Huang X, Zhang J, *et al.* Fish TRIM16L exerts negative regulation on antiviral immune response against grouper iridoviruses [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(59): 256-267.
- [10] Yang Y, Huang Y, Yu Y, *et al.* Negative regulation of the innate antiviral immune response by TRIM62 from orange spotted grouper [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(57): 68-78.
- [11] Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases [J]. *Bioessays*, 2005, **27**(11): 1147-1157.
- [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] Aa L M V D, 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**(1): 7.
- [14] 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*, 2018 (84): 876-884.
- [15] Christelle L, Elina A, Armel H, *et al.* TR83, a member of the large fish-specific finTRIM family, triggers IFN pathway and counters viral infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017(8): 617.
- [16] Ashraf U, Lu Y, Lin L, *et al.* Spring viraemia of carp virus: recent advances [J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(5): 1037-1051.
- [17] Chen B, Li C, Wang Y, *et al.* 14-3-3 β / α -A interacts with glycoprotein of spring viremia of carp virus and positively affects viral entry [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(81): 438-444.
- [18] Wang Y, Zhang H, Lu Y, *et al.* Comparative transcriptome analysis of zebrafish (*Danio rerio*) brain and spleen infected with spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(69): 35-45.
- [19] Muhammad A, Xueqin L, Guangxin L, *et al.* Spring viraemia of carp virus induces autophagy for necessary viral replication [J]. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(4): 595-605.
- [20] Ozato K, Shin D M, Chang T H, *et al.* TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(11): 849-860.
- [21] Versteeg G A, Benke S, García-Sastre, Adolfo, *et al.* In-TRIMs immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2014, 25(5): 563-576.
- [22] Yeda W, Zeming L, Yuanan L, *et al.* Molecular characterization, tissue distribution and expression, and potential antiviral effects of TRIM32 in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1693.
- [23] Wang Y, Kuang M, Lu Y, *et al.* Characterization and biological function analysis of the TRIM47 gene from common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Gene*, 2017(627): 188-193.
- [24] Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments [J]. *Embo Journal*, 2014, 20(9): 2140-2151.
- [25] Versteeg G, Rajsbaum R, Sánchez-Aparicio, *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.
- [26] Huang Y, Yang M, Yu Y, *et al.* Grouper TRIM13 exerts negative regulation of antiviral immune response against nodavirus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(55): 106-115.
- [27] Yang Y, Huang Y, Yu Y, *et al.* RING domain is essential for the antiviral activity of TRIM25 from orange spotted grouper [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(55): 304-314.

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

KUANG Ming^{1,2,3,4}, LIU Wan-Meng^{1,2,3,4}, YAO Jian^{1,2,3,4}, HUO Shi-Tian^{1,2,3,4} and LIU Xue-Qin^{1,2,3,4}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China; 3. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Fishery College, Wuhan 430070, China)

Abstract: To understand the role of zebrafish finTRIM in antiviral innate immunity, the zebrafish *ftr56* gene was cloned and analyzed for its effect on the proliferation of spring viremia of carp virus (SVCV). Primers were designed according to the zebrafish FTR56 sequence. The FTR56 CDS region was amplified by PCR and ligated into the eukaryotic expression vector pcDNA4.0-His to construct the eukaryotic expression plasmid pcDNA4.0-FTR56-His and conducted bioinformatics analysis. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of FTR56 mRNA in SVCV-infected zebrafish embryo fibroblasts (ZF4). Phylogenetic tree analysis showed that the zebrafish FTR56 was individually clustered. The amino acid sequence alignment showed that the similarities with TRIM56 of chimpanzees, cattle and mice were 22%—23%. The FTR56 secondary structure has one RING finger domain, one B-box domain, one coiled-coil region and one B30.0 domain. The FTR56 mRNA level increased significantly at 24h after SVCV infection. After overexpression of FTR56, the mRNA and protein levels of G protein of SVCV reduced significantly at 12h and 24h compared with the control group associated with significantly decreased SVCV titers in the culture supernatant, indicating that FTR56 inhibited SVCV proliferation. This study provide a reference for further revealing the immunoregulatory mechanism of finTRIM in fish viral diseases.

Key words: FTR56; Clonal expression; SVCV; Antiviral; *Danio rerio*