

蒯思函, 杨兵兵, 李倩倩, 等. 克氏原螯虾 *traf6 like* 基因参与抗细菌先天免疫反应的研究 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (10): 1245-1249.
LIN S H, YANG B B, LI Q Q, et al. Molecular Mechanism of *traf6 like* Gene in Innate Immunity of *Procambarus clarkii* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (10): 1245-1249.

克氏原螯虾 *traf6 like* 基因参与抗细菌先天免疫反应的研究

蒯思函¹, 杨兵兵¹, 李倩倩¹, 沈秀丽², 杜志强^{1*}

(1. 内蒙古科技大学生命科学与技术学院, 内蒙古 包头 014010; 2. 内蒙古科技大学图书馆, 内蒙古 包头 014010)

摘要:【目的】深入研究克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*) *traf6 like* 基因参与先天免疫调节的功能。【方法】以 *Pc-traf6 like* 基因为研究对象, 利用 RNAi 技术干扰目的基因表达量之后, 进行细菌模拟刺激, 并且通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞凋亡相关基因表达量的变化情况。【结果】干扰 *Pc-traf6 like* 基因, 通过干扰效果检测, 显示 48 h 时干扰效果良好, 可用于后续试验。在目的基因干扰后, 进行金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 刺激, 检测表明促凋亡基因 *Bax*、抗凋亡基因 *Bcl 2*、细胞凋亡关键基因 *Caspase 3* 不同程度上调表达; 在目的基因干扰后, 进行鲶爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 刺激, 检测表明促凋亡基因 *Bax*、抗凋亡基因 *Bcl 2*、细胞凋亡关键基因 *Caspase 3* 不同程度上调表达。【结论】*Pc-traf6 like* 基因被干扰, 机体在受到金黄色葡萄球菌及鲶爱德华氏菌刺激后, *Bax*、*Bcl 2* 和 *Caspase 3* 基因的相对表达量上调, 推测 *Pc-traf6 like* 基因通过调控细胞凋亡参与了先天免疫反应。

关键词: 克氏原螯虾; RNA 干扰; 细胞凋亡; 先天免疫

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 10-1245-05

Molecular Mechanism of *traf6 like* Gene in Innate Immunity of *Procambarus clarkii*

LIN Sihan¹, YANG Bingbing¹, LI Qianqian¹, SHEN Xiuli², DU Zhiqiang^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 2. Library, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: 【Objective】Role of *traf6 like* gene in innate immunity regulation of *Procambarus clarkia* (*Pc-traf6 like*) was investigated. 【Methods】RNAi technology was employed to interfere the expression of *Pc-traf6 like* gene. Bacterial simulation was performed to determine the changes of apoptosis-related gene expression by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). 【Result】The interference on the gene was effective after 48 h for the subsequent experiments. The interference-induced pro-apoptotic gene *Bax*, anti-apoptotic gene *Bcl 2*, and apoptotic protease *Caspase 3* were upregulated in varying degrees with the stimulation of *Staphylococcus aureus* or *Edwardsiella ictaluri*. 【Conclusion】After the *Pc-traf6 like* gene was effectively interfered, the relative expressions of *Bax*, *Bcl 2*, and *Caspase 3* were upregulated after the *P. clarkia* was stimulated by either *S. aureus* or *E. ictaluri* indicating an involvement of *Pc-traf6 like* gene in the innate immune response by the regulating apoptosis.

Key words: *Procambarus clarkii*; RNA interference; apoptosis; innate immunity

0 引言

【研究意义】克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*), 俗称淡水小龙虾, 因其肉质鲜美, 营养丰富, 深受消费者喜爱。小龙虾是我国重要的水产养殖种类,

但是近年来由于多种细菌性病害的出现, 给小龙虾的养殖业带来了巨大的经济损失, 研究克氏原螯虾的免疫学防病抗病机制具有重要意义^[1]。在无脊椎动物中, 先天免疫是对抗病原微生物侵染的关键^[2-3], 选择先天免疫相关的基因进行研究具有重要的理论

收稿日期: 2022-01-21 初稿; 2022-04-02 修改稿

作者简介: 蒯思函 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 无脊椎动物的先天免疫 (E-mail: 2836019366@qq.com)

* 通信作者: 杜志强 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 无脊椎动物的先天免疫 (E-mail: nmdzq@163.com)

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2020JQ03); 国家自然科学基金项目 (32060834); 内蒙古自治区研究生科研创新项目 (S20210160Z)

指导意义。【前人研究进展】近年来,肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (traf6) 被广泛研究。Li 等^[4]于 2021 年获得克氏原螯虾的 *traf6 like* 基因的全长 cDNA 序列,并进行抗细菌先天免疫的研究。Wang 等^[5] 研究结果显示,凡纳滨对虾 *Traf6* 基因对溶藻弧菌和白斑综合征病毒的感染有应答,且可以激活抗菌肽基因从而参与先天免疫反应。Lin 等^[6]提出香港牡蛎的 *traf6* 同源物可以抑制 p53 的活性,并抑制凋亡过程,参与了先天免疫和适应性免疫。Szymon^[7] 的研究结果显示,细胞凋亡在免疫机制中发挥重要作用。细胞凋亡是在动物中发现的一种程序性细胞死亡,在 1972 年首次被描述^[8]。因凋亡的形态学和生化特征,故人们很容易将其与其他类型的细胞死亡区分开来。当细胞凋亡开始时,会出现膜通透性转变,其特征是线粒体内部跨膜电位的破坏^[9]。和四梅等^[10]通过对 *Caspase* 细胞凋亡通路进行研究,详细介绍了水生无脊椎动物的细胞凋亡通路。Arlette 等^[11]对 Bcl 2 凋亡家族的基因进行研究,详细说明各基因发挥的作用。【本研究切入点】然而在克氏原螯虾中, *traf6 like* 基因是如何通过调控细胞凋亡来参与抗细菌先天免疫反应的研究尚有待深入探讨。【拟解决的关键问题】通过对克氏原螯虾 *traf6 like* 基因 (*Pc-traf6 like*) 干扰后,进行细胞凋亡相关基因的检测,初步研究 *Pc-traf6 like* 参与抗细菌先天免疫的分子机制,为进一步研究无脊椎动物抗细菌先天免疫提供理论参考,同时也为提高克氏原螯虾抗病能力的相关研究提供理论与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康克氏原螯虾(每只 20~25 g),购于包头市友谊海鲜市场瑞福祥水产门店,原产地为江苏省淮安市盱眙县。试验所用克氏原螯虾在实验室进行为期一周的预养,淘汰不健康克氏原螯虾;在正式试验前,对小龙虾进行了金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及鲶爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 的病原检测。

1.2 试验方法

1.2.1 PCR 扩增目的基因干扰片段 将含有 *Pc-traf6 like* 目的基因的大肠杆菌提前接菌活化,进行 PCR 扩增干扰片段。根据前期转录组测序得到的序列,设计目的基因的干扰引物 *Pc-traf6 like*-F (5'-gcgtaatacgaactcctataggaggagcaccttcagagta-3') 和 *Pc-traf6 like*-R (5'-gcgtaatacgaactcactataggcaacgcattcgtagtgt-3')。PCR 反应

程序如下:预变性 94 ℃, 5 min;变性, 94 ℃, 30 s (35 cycle);退火 55 ℃, 45 s (35 cycle);延伸 72 ℃, 40 s (35 cycle);后延伸 72 ℃, 10 min。

使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(索莱宝生物科技有限公司),将上述含有 PCR 产物的琼脂糖凝胶进行胶回收,回收得到的 DNA 模板-40 ℃ 保存。

1.2.2 体外转录 使用 *In vitro* Transcription T7 Kit 试剂盒(宝生物有限责任公司),将上述 DNA 进行体外转录,制备 *Pc-traf6 like* 双链 RNA,置于-80 ℃ 保存备用。

1.2.3 RNA 干扰 按照上述方法准备 *Pc-traf6 like* 双链 RNA 和 *GFP* (绿色荧光蛋白) 双链 RNA,使用无菌 1×PBS 缓冲液分别将金黄色葡萄球菌和鲶爱德华氏菌进行稀释。试验分为 4 组: *GFP* 干扰组、*Pc-traf6 like* 干扰组、*GFP* 干扰+细菌刺激组、*Pc-traf6 like* 干扰+细菌刺激组,每尾虾于血窦处注射双链 RNA,注射量为 20~25 μL (3000 ng·μL⁻¹),于第二腹节处分别注射 2 种细菌,注射量为 100 μL (2×10⁷ CFU),并在 0、2、6、12、24、48 h 解剖小龙虾,取血淋巴、肝胰腺等组织,每个时间点取 3 尾虾。

取上述肝胰腺样品 50~80 mg 置于无菌玻璃匀浆器中,分别加入于 4 ℃ 保存的 TRIzol 试剂,进行冰浴匀浆,提取总 RNA,并使用 NANO Drop 2000 仪器进行浓度检测,提取总 RNA 置于-80 ℃ 保存。

使用逆转录试剂盒,将上述提取的总 RNA 进行逆转录,得到 cDNA,并使用 NANO Drop 2000 仪器进行浓度检测,合成的 cDNA 置于-80 ℃ 保存。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 利用荧光定量 PCR 进行干扰效果、干扰及细菌刺激后的相关基因表达模式的检测。目的基因特异性引物为 *Pc-traf6 like*-RT-F (5'-gcatctgggacccgactc-3') 和 *Pc-traf6 like*-RT-R (5'-ctactaccaccaccgaatc-3'), 18S 内参基因特异性引物为 18S rRNA-RT-F (5'-tcttcttagagggttagcgc-3') 和 18S rRNA-RT-R (5'-aaggggattgaacgggtta-3')。PCR 反应程序如下: 95 ℃, 30 s; 95 ℃, 5 s (40 cycle); 60 ℃, 34 s (40 cycle); 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 60 s; 95 ℃, 15 s。设 3 次生物学重复,采用 2^{-ΔΔCT} 算法计算相对表达量并进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 *Pc-traf6 like* 双链 PCR 扩增

将制备得到的 *Pc-traf6 like* 双链 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳验证。结果显示:在 250~500 bp 处有明亮条带,与理论值 449 bp 相符合(图 1)。

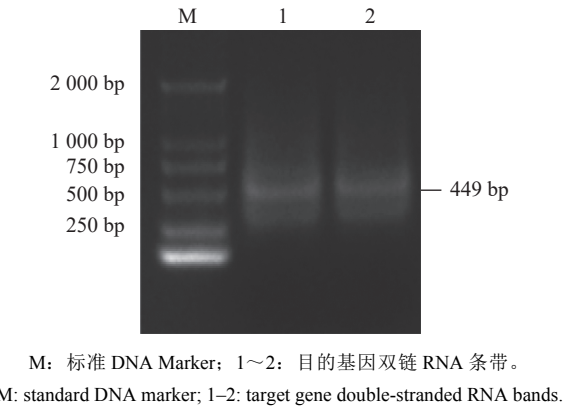


图 1 *Pc-traf6 like* 基因双链 RNA 电泳

Fig. 1 Electrophoresis on double-stranded RNA validation of *Pc-traf6 like* gene

2.2 RNA 干扰效果检测

利用实时荧光定量 PCR 进行 RNA 干扰效果检测，结果显示，在干扰后 48 h 时，干扰率约为 28%，表明目的基因 *Pc-traf6 like* 干扰效果良好，制备的 *Pc-traf6 like* 双链 RNA 可用于后续试验（图 2）。

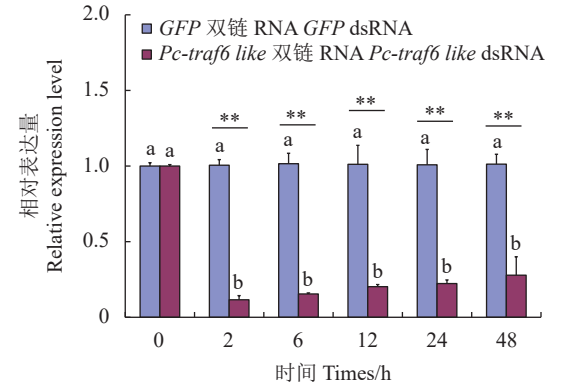


图 2 *Pc-traf6 like* 基因双链 RNA 干扰效果检测

Fig. 2 Detection of interference on double-stranded RNA of *Pc-traf6 like* gene

2.3 金黄色葡萄球菌刺激后细胞凋亡相关基因检测

利用实时荧光定量 PCR 进行细胞凋亡相关基因的检测，结果显示，干扰 *Pc-traf6 like* 基因后，利用金黄色葡萄球菌进行刺激，检测 *Bax*（图 3-A）、*Bcl 2*（图 3-B）、*Caspase 3*（图 3-C）基因的表达情况。结果显示，与对照组相比，*Bax*、*Bcl 2*、*Caspase 3* 基因表达分别呈现上调趋势；不同时间点之间，*Bax* 基因表达整体呈升高趋势，12 h 表达量最高；*Bcl 2* 基因表达整体呈升高趋势，2 h 表达量最高；*Caspase 3* 基因表达整体呈升高趋势，6 h 及 48 h 表达量较高。

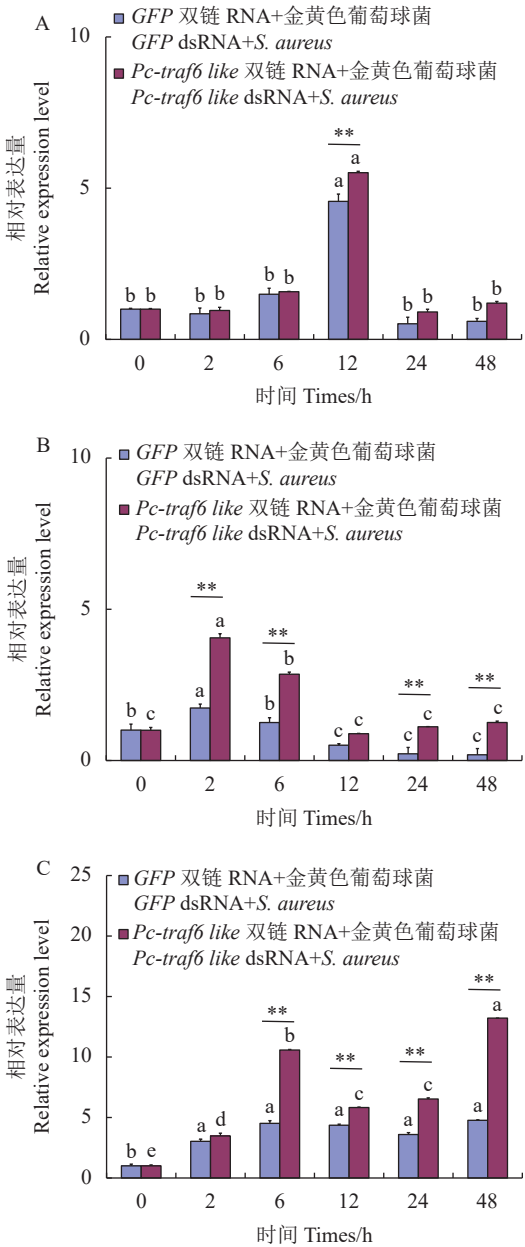


图 3 金黄色葡萄球菌刺激后细胞凋亡相关基因的表达分析

Fig. 3 Expressions of apoptosis-related genes after *S. aureus* stimulation

2.4 鲑爱德华氏菌刺激后细胞凋亡相关基因检测

利用实时荧光定量 PCR 进行细胞凋亡相关基因的检测，干扰 *Pc-traf6 like* 基因后，利用鲑爱德华氏菌进行刺激，检测 *Bax*（图 4-A）、*Bcl 2*（图 4-B）、*Caspase 3*（图 4-C）基因的表达情况。结果显示，与对照组相比，*Bax*、*Bcl 2*、*Caspase 3* 基因表达分别呈现上调趋势；不同时间点之间，*Bax* 基因表达整体呈升高趋势，12 h 表达量最高；*Bcl 2* 基因表达整体呈升高趋势，2 h 表达量最高；*Caspase 3* 基因表达整体呈升高趋势，6 h 及 48 h 表达量较高。

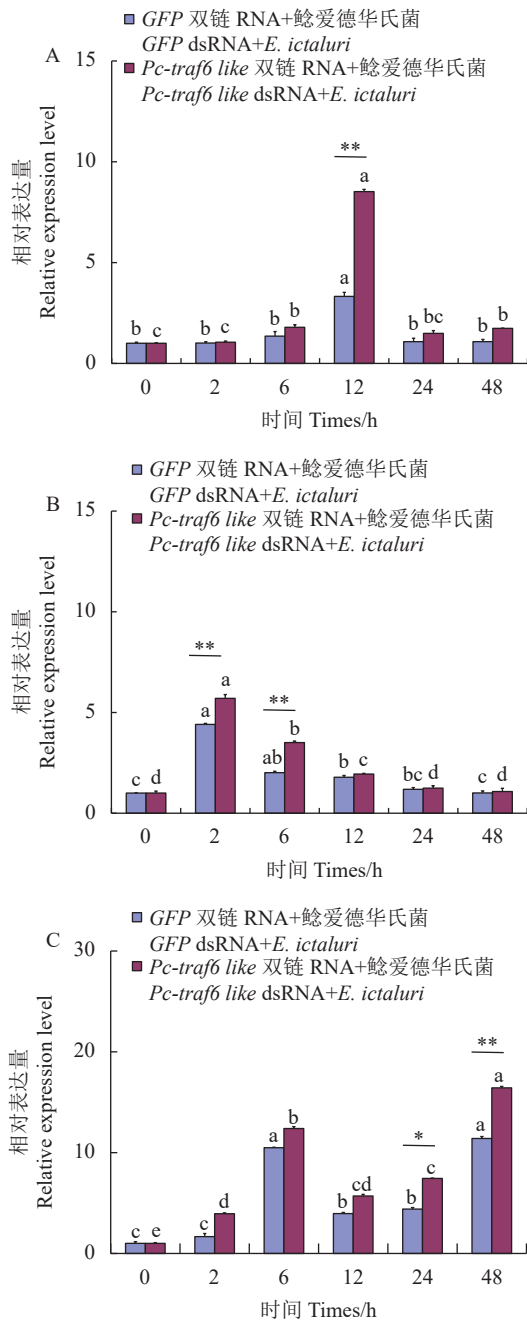


图 4 鲢爱德华氏菌刺激后细胞凋亡相关基因的表达模式

Fig. 4 Expressions of apoptosis-related genes after *E. ictaluri* stimulation

3 讨论

肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (traf6) 是 E3 泛素连接酶, 参与先天免疫反应和适应性免疫反应, 并调节凋亡过程^[12-14], 近年来被广泛研究。2011 年, Wang 等^[5]在研究中得到凡纳滨对虾 (*Litopenaeus Vannamei*) traf6 (*Lv-traf6*) 的全长 cDNA 序列, 并推测该基因可能通过调节 AMP 基因表达在抗菌和抗病毒反应中发挥重要作用。同样, 在本研究中发现了克氏原螯虾 *traf6 like* 基因在抗细菌先天免疫中发挥重要作用。2009 年, Qiu 等^[15]在栉孔扇贝 (*Chlamys*

Farreri) 中发现了 *traf6* 基因 (*Cf-traf6*), 通过肽聚糖 (Peptidoglycan, PGN) 处理后, *Cf-traf6* 在 1.5~3 h mRNA 的表达水平下调, 后恢复到原有水平, 表明 *Cf-traf6* 可能参与了扇贝的信号转导和免疫应答。2020 年, Lin 等^[6]通过 RNAi 等试验, 发现 *traf6* 的同源物能抑制香港牡蛎 (*Crassostrea Hongkongensis*) 中的 p53 活性, *Ch-traf6* 在上游通过激活 Pellino 抑制血细胞凋亡, 在细胞凋亡过程发挥作用。本研究中, 通过使用 RNAi 技术对克氏原螯虾 *traf6 like* 基因进行沉默, 发现该基因通过调控细胞凋亡从而参与了抗细菌免疫应答。2017 年, Fan 等^[16]通过对长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 中的 *traf6* 基因进行干扰, 结果表明 *Cg-traf6* 可能参与了抵御细菌和病毒的先天免疫防御系统。同样, 在本研究中发现克氏原螯虾 *traf6 like* 基因参与了抗细菌先天免疫反应。

本研究采用 RNA 干扰目的基因的方法开展研究, 通过检测细胞凋亡相关基因, 研究先天免疫防御反应。Ayllón 等^[17]通过 RNA 干扰的方法, 将 Bcl 2 和凋亡抑制蛋白 IAP 的 dsRNA 注射到肩突硬蜱中, 发现会严重影响蜱的饱血率和吸血体重, 其中注射 Bcl 2 分子 dsRNA 的蜱几乎不能完成吸血过程直至死亡, 推测 Bcl 2 分子在蜱内源性细胞凋亡中可能起到关键作用。在本研究中, 干扰目的基因后, *Bcl 2* 基因表达量有相应的变化, 推测 *Bcl 2* 在小龙虾抗细菌先天免疫中发挥作用。目前, 在贝类、甲壳类、文昌鱼和水螅等物种中均有文献报道肿瘤坏死因子 (*Tumor necrosis factor*, *TNF*) 和 *caspase* 的表达情况, 主要对免疫过程中细胞凋亡的作用和肿瘤坏死因子受体 (*Tumor necrosis factor receptor*, *TNFR*)、*Caspase* 等表达情况进行分析^[18-19]。Chang 等^[20]的研究结果显示凋亡敏感基因 (*Sensitive to apoptosis gene*, *SAG*) 的下调表达会导致促凋亡蛋白 Bax 增多, 使线粒体中 Bax/Bcl 2 失衡, 诱导 *Caspase 9* 和 *Caspase 3* 激活, 从而促进细胞发生凋亡。本试验通过对 *Pc-traf6 like* 基因进行 RNA 干扰后进行细菌刺激 (金黄色葡萄球菌、鲢爱德华氏菌), 进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果显示促凋亡基因 *Bax*、抗凋亡基因 *Bcl 2* 均上调表达, 下游细胞凋亡关键基因 *Caspase 3* 上调表达, 引起细胞凋亡, 从而调控免疫应答。曾高淳等^[21]研究表明, *Bax* 和 *Bcl 2* 基因同属于 Bcl-2 家族分子, 细胞凋亡取决于 Bcl-2 家族分子中促凋亡/抗凋亡力量组合的天平倾向。本研究中, 促凋亡基因 *Bax* 上调程度高于抗凋亡基因 *Bcl 2*, 诱导 *Caspase 3* 激活, 最终引起细胞凋亡。

本研究为后续 *Pc-traf6 like* 基因的重组表达、蛋白功能及其他研究提供了一定的理论依据, 为小龙

虾通过调控细胞凋亡参与先天免疫机制的进一步研究奠定基础。随着深入研究, 无脊椎动物先天免疫系统逐渐被完善, 小龙虾 *Pc-traf6 like* 基因在其抗细菌先天免疫反应的信号通路中发挥了重要作用, 继续深入研究该基因对完善理论基础具有重要意义, 同时可以制定合理有效的方案以减少细菌性疾病对虾类等水产动物的危害, 为水产养殖业带来经济价值。

参考文献:

- [1] WU Z Q, JIANG C, LING F, et al. Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate immunity and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Aquaculture*, 2015, 438: 105–114.
- [2] 刘文杰, 章跃陵. 无脊椎动物先天免疫分子研究概述 [J]. *生物学教学*, 2017, 42 (7): 71–73.
LIU W J, ZHANG Y L. Overview of molecular research on innate immunity of invertebrates [J]. *Biology Teaching*, 2017, 42 (7): 71–73. (in Chinese)
- [3] CERENIUS L, JIRAVANICHPAISAL P, LIU H P, et al. Crustacean immunity [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 708: 239–259.
- [4] LI B, YANG B B, SHEN X L, et al. Molecular characterization and expression analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (*traf6*) like gene involved in antibacterial innate immune of fresh water crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 517–526.
- [5] WANG P H, GU Z H, WAN D H, et al. The shrimp NF- κ B pathway is activated by white spot syndrome virus (WSSV) 449 to facilitate the expression of WSSV069 (ie1), WSSV303 and WSSV371 [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e24773.
- [6] LIN Y, MAO F, ZHANG X Y, et al. TRAF₆ suppresses the apoptosis of hemocytes by activating pellino in *Crassostrea hongkongensis* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 103: 103501.
- [7] KACZANOWSKI S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging [J]. *Physical Biology*, 2016, 13 (3): 031001.
- [8] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26 (4): 239–257.
- [9] MARCHETTI P, CASTEDO M, SUSIN S A, et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996, 184 (3): 1155–1160.
- [10] 和四梅, 张丽莉, 王艺磊, 等. Caspase细胞凋亡通路及其在水生无脊椎动物的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2013 (9): 54–61.
HE S M, ZHANG L L, WANG Y L, et al. Caspase-apoptosis signal transduction pathway and its research advance in aquatic invertebrates [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013 (9): 54–61. (in Chinese)
- [11] WERNER A B, DE VRIES E, TAIT S W G, et al. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (25): 22781–22788.
- [12] HSU H, XIONG J, GOEDDEL D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation [J]. *Cell*, 1995, 81 (4): 495–504.
- [13] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, KOPP E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways [J]. *Molecular Cell*, 1998, 2 (2): 253–258.
- [14] WESCHE H, HENZEL W J, SHILLINGLAW W, et al. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex [J]. *Immunity*, 1997, 7 (6): 837–847.
- [15] QIU L M, SONG L S, YU Y D, et al. Identification and expression of TRAF₆ (TNF receptor-associated factor 6) gene in Zhikong Scallop *Chlamys farreri* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26 (3): 359–367.
- [16] MAO F, LI J, ZHANG Y H, et al. Molecular cloning and functional analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF₆) in *Crassostrea gigas* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68: 37–45.
- [17] AYLLÓN N, VILLAR M, GALINDO R C, et al. Systems biology of tissue-specific response to *Anaplasma phagocytophilum* reveals differentiated apoptosis in the tick vector *Ixodes scapularis* [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11 (3): e1005120.
- [18] JIN P, HU J, QIAN J J, et al. Identification and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (*LITAF*) gene from *Amphioxus* (*Branchiostoma belcheri*): An insight into the innate immunity of *Amphioxus* and the evolution of *LITAF* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32 (6): 1223–1228.
- [19] WIENS G D, GLENNEY G W. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35 (12): 1324–1335.
- [20] CHANG S C, DING J L. Ubiquitination by SAG regulates macrophage survival/death and immune response during infection [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2014, 21 (9): 1388–1398.
- [21] 曾高淳, 吴苗, 曾令基, 等. 青蒿琥酯调节BCL-2家族蛋白平衡诱发肌成纤维细胞凋亡 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37 (18): 2332–2338.
ZENG G C, WU M, ZENG L J, et al. Myofibroblasts apoptosis induced by artesunate via regulating balance of BCL-2 family [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2021, 37 (18): 2332–2338. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)