

赤眼鳟 *TRAF6* 基因的 cDNA 克隆及其 应对 GCRV 的免疫表达特性

陈开健^{1,2}, 王静安^{1#}, 刘巧林^{1,2}, 王荣华¹, 徐莹¹, 赵鑫¹, 肖调义^{1,2*}

(1.湖南农业大学湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 2.水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 湖南 常德 415000)

摘 要: 为研究赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)肿瘤坏死因子受体相关因子 6 基因的结构特性及其应对 GCRV 的免疫表达特性, 采用 RACE 技术获得了赤眼鳟 *TRAF6* 基因的 cDNA 全长(共 2 621 bp), 其中包含 5'端非编码区 50 bp, 开放阅读框 1 629 bp, 3'端非编码区 942 bp; 该基因编码 542 个氨基酸, 推导的蛋白质相对分子质量为 61 670, 理论等电点为 6.01。SMART 结构分析结果显示, *TRAF6* 基因编码的蛋白包含 1 个 RING 结构域、2 个锌指结构域、1 个螺旋卷曲结构域和 1 个 MATH 结构域。系统进化树分析结果表明, 赤眼鳟 *TRAF6* 与团头鲂 *TRAF6* 的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果显示, *TRAF6* 在赤眼鳟的 12 种组织中均有表达, 其中在肝脏中的表达量最高, 在中肠中的表达量最低; 经 GCRV 感染后, 赤眼鳟脾脏和头肾中 *TRAF6* 均呈波动上调趋势, 在 24 h 达到峰值, 表明 *TRAF6* 参与了赤眼鳟抗 GCRV 的免疫应答反应。

关 键 词: 赤眼鳟; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 基因; 草鱼呼肠孤病毒(GCRV)

中图分类号: Q785; S965

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2016)06-0641-06

Molecular cloning and expression characteristics response to GCRV of *TRAF6* in *Squaliobarbus curriculus*

Chen Kaijian^{1,2}, Wang Jing'an^{1#}, Liu Qiaolin^{1,2}, Wang Ronghua¹, Xu Ying¹, Zhao Xin¹, Xiao Tiaoyi^{1,2*}

(1.Hunan Engineering Research Center for Utilization of Characteristics of Aquatic Resources, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde, Hunan 415000, China)

Abstract: In order to investigate whether tumor necrosis factor-associated factor 6 gene involved in antiviral immune response, the full-length cDNA of *TRAF6* in *Squaliobarbus curriculus* was cloned by using RACE-PCR method. The full-length cDNA of *TRAF6* is 2 621 bp including a 5'-terminal untranslated region of 50 bp, a 3'-terminal untranslated region of 942 bp and an open reading frame of 1 629 bp encoding a polypeptide of 542 amino acid residues. The putative isoelectric point and molecular weight of *TRAF6* was 6.01 and 61 670, respectively. The protein encoded by this gene includes one ring domain, two zinc fingers, one coiled-coil region, and one MATH domain. Phylogenetic analysis showed that the *TRAF6* was the most homogeneous to *Megalobrama amblycephala*. The expression of *TRAF6* could be detected in all the 12 tested tissues by RT-PCR, which the highest expressed in the liver and the lowest expressed in midgut. After injection with grass carp reovirus (GCRV), the *TRAF6* expression level was up and down regulated in both spleen and head kidney, and reached the peak at 24 h, respectively. The results suggest that *TRAF6* gene might play important roles in the immune response of *Squaliobarbus curriculus* against GCRV.

收稿日期: 2016-10-20

修回日期: 2016-11-01

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31402289); 国家自然科学基金项目(31272652; 31572615)

作者简介: 陈开健(1971—), 男, 湖南永州人, 博士, 副教授, 主要从事水生动物遗传育种研究, chenkaijian2002@aliyun.com; #共同第一作者, 王静安(1993—), 女, 浙江台州人, 硕士研究生, 主要从事水生动物遗传育种研究, 409626183@qq.com; *通信作者, 肖调义, 博士, 教授, 主要从事水生动物遗传育种研究, tyxiao1128@163.com

Keywords: *Squaliobarbus curriculus*; tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 gene (TRAF6); grass carp reovirus(GCRV)

Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)可通过识别病原的相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)与下游的不同受体接头蛋白结合,激活细胞内的信号转导途径,在先天性免疫应答和获得性免疫应答反应中起重要作用^[1]。肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-associated factors 6, TRAF6)是 TRAFs 家族中唯一既与肿瘤坏死因子(TNF)超家族又与白细胞介素-1 受体/Toll 样受体(IL-1/TLR)超家族密切相关的重要接头分子,介导多条信号转导通路^[2]。在 TLRs 介导的信号转导途径中,TRAF6 参与 MyD88 依赖途径和 TRIF 信号转导途径,是激活 NF- κ B 通路和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的交叉点^[3]。TRAF6 基因是在 1996 年 Ishida 等^[4]研究酵母双杂交系统对 CD40 信号转导的影响时发现的,目前,TRAF6 基因已在多种物种中被克隆出来,其中已报道存在 TRAF6 基因鱼类有大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[5]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[6]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[7]、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[8]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[9]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[10]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[11]等。研究表明,TRAF6 基因在鱼类抗细菌、病毒和寄生虫的免疫反应中发挥了重要作用,团头鲂^[10]、东北林蛙^[12]等在嗜水气单胞菌胁迫下 TRAF6 的表达量上调;草鱼^[9]在多子小瓜虫感染后 TRAF6 的表达量上调;斑马鱼^[6]在感染乌鳢杆状病毒后 TRAF6 的表达量上调。TRAF6 也可作为泛素连接酶(E3)与泛素结合酶(E2)Ubc13/Uev1A 结合,形成多聚泛素链而起连接作用^[13],与适应性免疫和固有免疫、炎症反应、骨代谢、胚胎发育和组织发育等密切相关^[14-15],参与多种疾病的免疫调控,有望成为相关疾病的治疗靶点。

赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*)作为淡水养殖主要的优质经济鱼类之一,对环境具有较强的适应性和抗病力。赤眼鲮抗草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的能力优于草鱼^[16-17]。赤眼鲮 *MyD88*、*TLR3* 等抗

GCRV 的相关基因已被成功克隆,这些基因均参与了赤眼鲮抗 GCRV 病毒的免疫反应^[18-20]。为探究 TRAF6 基因是否参与了赤眼鲮抗 GCRV 病毒免疫反应,本试验中克隆赤眼鲮 TRAF6 基因的 cDNA 全长,开展生物信息学分析,检测 TRAF6 在赤眼鲮不同组织中的分布,研究赤眼鲮在感染 GCRV 后其 TRAF6 基因在脾脏和头肾等组织中的表达特性,旨在为进一步研究鱼类 TRAF6 在 TLRs 信号通路中的抗病毒免疫机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

赤眼鲮(6月龄)取自湖南农业大学水产基地,平均体质量为(90±10) g。试验前挑选健康赤眼鲮作为试验材料,置于室内循环水养殖系统中暂养1个月,水温控制在(28±1)℃,每天定时光照12 h,并按鱼体质量的1%投喂普通草鱼饲料。试验用 GCRV 病毒由中国水产科学院长江水产研究所曾令兵研究员提供。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 50~80 mg 赤眼鲮脾脏组织,按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction (TaKaRa, China)试剂盒说明书提取总 RNA,其 RNA 质量和浓度采用 BioSpectrometer Basic 核酸蛋白仪(Eppendorf, 德国)检测,完整性用 1%琼脂糖凝胶电泳检测;按照 SMARTer®RACE 5'/3'cDNA Kit Components(Clontech)试剂盒说明书合成 5'-RACE Ready cDNA 和 3'-RACE Ready cDNA。

1.2.2 赤眼鲮 TRAF6 基因全长 cDNA 的克隆

根据 GenBank 中已提交的鱼类 TRAF6 序列,利用 Primer Premier 6.0 软件设计引物 TRAF6-3'和 TRAF6-5',以上述 cDNA 为模板进行 3'和 5'目的片段扩增。所有引物均在生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。按照 SMARTer® RACE

5'/3'Kit 用户手册进行 3'-RACE 和 5'-RACE 的 PCR。PCR 产物切胶回收后克隆至 pMD19-T 载体 (TaKaRa, China), 转染至 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆菌落送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。

表 1 本研究中所用引物的序列

Table 1 Primer sequences in the research	
引物名称	引物序列(5'—3')
TRAF6-3'	CTGCCTAATGCCATCAGTTGCCGCCCAT
TRAF6-5'	CTGATCTTGACGCACCAGCCGACCC
TRAF6-RTF	ACTGGAGGAGGCAACCCG
TRAF6-RTR	TGGGCTGTGGAGGACTATGG
β -actin-RTF	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG
β -actin-RTR	GGGCACCTGAACCTCTCATT

1. 2. 3 赤眼鳟 *TRAF6* 序列的生物信息学分析

用 SeqMan 7.1 软件拼接 *TRAF6* 基因全长 cDNA 序列; 用 ExPASy-Translate tool 预测开放阅读框; 用 ExPASy-Compute pI/Mw tool 计算相对分子质量和等电点; 用 BLAST 进行序列相似性比较; 用 SMART 进行蛋白质结构域预测; 用 MEGA 5.1 软件邻接法构建系统进化树。

1. 2. 4 赤眼鳟 *TRAF6* 的组织表达分析

随机选取 3 尾健康赤眼鳟, 分别取其脾、肝、肾、前肠、中肠、后肠、头肾、脑、鳃、鳍条、肌肉和皮肤共 12 个组织混样, 提取总 RNA, 以 Oligo (dT)₁₈ 为引物, 按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, 美国) 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链, 选用 β -actin 基因作为内参基因, 设计内参引物 β -actin-RTF/RTR 和特异性荧光定量引物 TRAF6-RTF/RTR 扩增 *TRAF6* 片段(表 1)。使用 SYBR Green I 染液在 CFX96 荧光定量 PCR 仪

(Bio-Rad, USA) 上进行荧光定量检测。反应程序为 95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 15 s, 35 个循环。溶解曲线温度从 65 ℃ 升至 95 ℃, 每 5 s 增加 0.5 ℃。数据处理使用 CFX manager software 3.1 (Bio-Rad, 美国), 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析其相对表达值, 作图软件使用 GraphPad Prism 6。

1. 2. 5 GCRV 感染后 *TRAF6* 在免疫组织中的表达特征分析

将 180 尾健康赤眼鳟随机分成 6 组。设置实验组和对照组, 对照组每尾鱼注射 0.2 mL 磷酸缓冲液(PBS), 实验组每尾鱼注射 0.2 mL GCRV 病毒液。GCRV 感染后 0、6、12、24、48、72、96、120、144 h 每组随机选取 3 尾鱼, 取其脾脏和头肾组织样提取总 RNA, 合成第一链 cDNA, 并按上述步骤进行实时荧光定量 PCR。

2 结果与分析

2.1 赤眼鳟 *TRAF6* 基因的 cDNA 全长

赤眼鳟 *TRAF6* 基因 cDNA 全长为 2 621 bp (GeneBank 登录号为 KU365989), 包含 50 bp 的 5' 非编码区, 942 bp 的 3' 端非编码区和 1 629 bp 的开放阅读框, 编码 542 个氨基酸, 3' 端非编码区无终止信号, 含有 6 个 attA 不稳定基序, 并存在典型的 poly(A) 尾。该基因预测的蛋白质相对分子质量为 61 670, 理论等电点为 6.01。SMART 蛋白质序列分析结果(图 1) 显示, *TRAF6* 基因编码的蛋白具有 4 个结构域: RING 结构域(71~109 个氨基酸), 锌指结构域(共 2 个, 分别为 152~204、205~262 个氨基酸), 螺旋卷曲结构域(311~374 个氨基酸) 和 MATH 结构域(379~503 个氨基酸)。

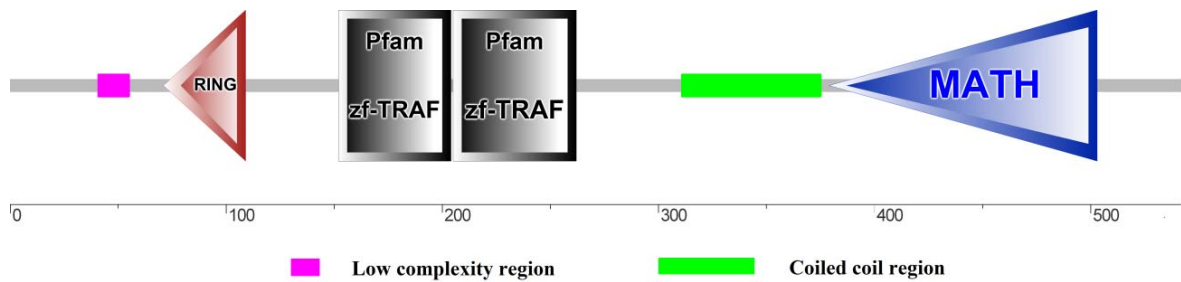


图 1 赤眼鳟 *TRAF6* 结构域预测结果

Fig.1 Schematic diagram for structure prediction of *TRAF6*

2.2 赤眼鳟 TRAF6 的系统进化分析

氨基酸相似性比较结果(表 2)显示, 赤眼鳟 TRAF6 氨基酸序列与团头鲂的相似性最高为 98%, 与草鱼、鲤鱼、斑马鱼和鲫鱼等鲤科鱼类的相似性均达 90%以上, 与其他鱼类的相似性为 61%~71%, 与鸟类和哺乳动物的相似性为 58%~59%。系统进化树分析结果显示, 整个系统分 2 大支, 鱼类单独聚为一支, 两栖类、鸟类和哺乳动物聚为另一支; 赤眼鳟、团头鲂和草鱼聚为一簇后, 和其他鲤科鱼类聚为一大簇(图 2)。

表 2 赤眼鳟 TRAF6 氨基酸序列与其他物种的相似性

Table 2 Percentage identities in amino acid sequence of TRAF6

with other species		
物种名称	GenBank 登录号	相似性/%
<i>Megalobrama amblycephala</i>	AKC45381.1	98
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	AGI51678.1	97
<i>Cyprinus carpio</i>	ADF56651.2	93
<i>Danio rerio</i>	NP_001038217.1	90
<i>Clupea harengus</i>	XP_012670256.1	71
<i>Scleropages formosus</i>	KPP69926.1	69
<i>Esox lucius</i>	XP_010894216.1	68
<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450846.1	65
<i>Epinephelus coioides</i>	AGQ48128.1	64
<i>Paralichthys olivaceus</i>	AJE25833.1	63
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008308373.1	61
<i>Calypste anna</i>	XP_008497219.1	59
<i>Mus musculus</i>	NP_033450.2	59
<i>Homo sapiens</i>	NP_004611.1	58

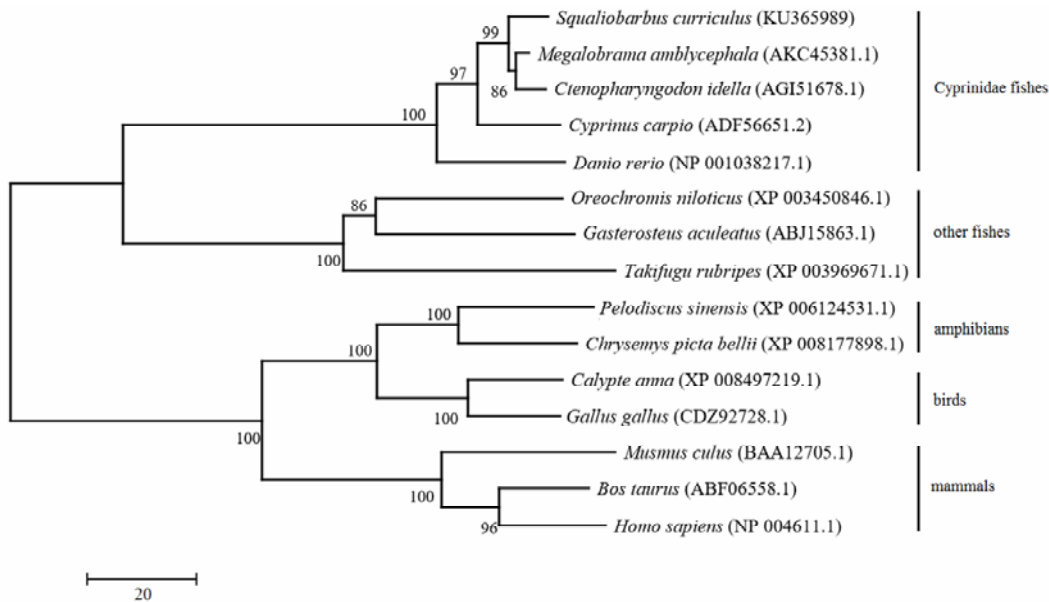


图 2 赤眼鳟 TRAF6 氨基酸序列的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic relationship of fish TRAF6 proteins

2.3 不同组织中 TRAF6 的相对表达量

实时荧光定量 PCR 结果显示, TRAF6 在赤眼鳟的 12 种组织中均有表达, 但表达量存在明显差

异, 其中在肝脏中的表达量最高, 在脑和鳃中的表达量次之, 在其余组织中均有不同程度的表达, 在中肠中的表达量最低(图 3)。

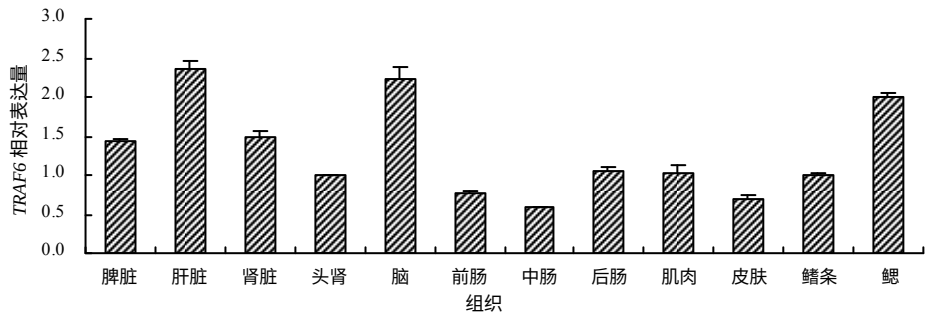


图 3 不同组织中 TRAF6 的相对表达量
Fig.3 Relative expression of TRAF6 in different tissues

2.4 GCRV 感染后 TRAF6 的表达特性

GCRV 感染后, *TRAF6* 在赤眼鳟免疫组织脾脏和头肾中不同时间的表达趋势基本相同: 感染初期(感染后 0~6 h), *TRAF6* 的表达量上调; 感染后 12 h 时出现下调, 感染后 24 h 再次显著上调, 出现峰值; 感染后 48 h 又出现下调; 感染后 96 h 上调, 且维持在较高水平, 感染后 144 h 恢复至正常水平, 即 GCRV 感染后, *TRAF6* 在赤眼鳟免疫组织中的表达量呈波动上调趋势, 在感染后 24 h 达到峰值(图 4, 图 5)。

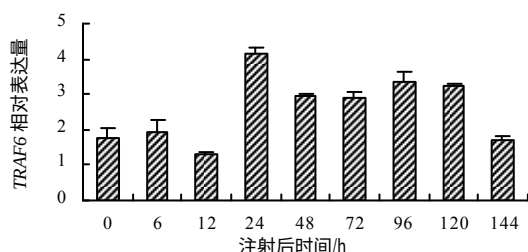


图 4 GCRV 感染后 *TRAF6* 在脾脏中的表达水平

Fig.4 Expression analysis of *TRAF6* in spleen after challenged with GCRV

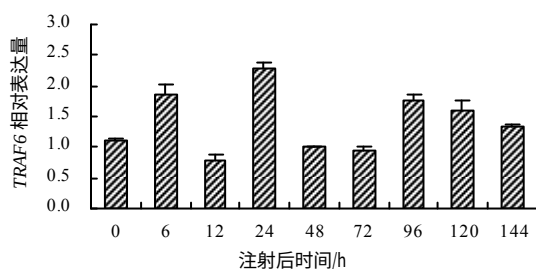


图 5 GCRV 感染后 *TRAF6* 在头肾中的表达水平

Fig.5 Expression analysis of *TRAF6* in head kidney after challenged with GCRV

3 讨论与结论

本试验中克隆获得了 *TRAF6* 基因的 cDNA 全长, 共编码 542 个氨基酸。该基因氨基酸序列不仅在鱼类中高度保守, 在鸟类和哺乳动物中均具有 TRAFs 家族基因的 4 个典型结构域, 其 N 端的 RING 结构域和锌指结构域对于下游信号通路 (NF- κ B 或 JNK) 的激活具有重要作用^[21]; RZ (RING and zinc finger) 能够与 MATH 结构域相互作用并介导 *TRAF6* 的泛素化^[22]; 螺旋卷曲结构域是 *TRAF6* 泛素化和 NF- κ B 信号通路活化所必需的^[23]。

不同物种的 *TRAF6* 在不同组织中的表达量存在差异。本研究中 *TRAF6* 在已检测的赤眼鳟组织

中均有不同程度的表达, 且在肝脏中的表达量最高, 而半滑舌鳎的 *TRAF6* 基因在鳃中的表达量最高^[11], 大黄鱼的在脾脏中的表达量最高^[5], 草鱼的在头肾中的表达量最高^[9]。*TRAF6* 在不同鱼类中的表达模式存在差异, 但均与免疫发生的组织或器官密切相关, 据此可推测 *TRAF6* 可能在鱼类的免疫应答中发挥了重要作用。

本研究中赤眼鳟在感染 GCRV 后, 其头肾和脾脏中 *TRAF6* 的表达呈现出波动上调趋势。这可能与 *TRAF6* 参与多条信号转导途径 (TRIF 依赖性途径和 MyD88 依赖性途径) 有关。*TRAF6* 作为 TLRs 信号转导通路的重要接头分子, 它的上调表达会激活 IRAK1/2、TAK1、IRF7 等一系列上、下游因子^[2], 但鱼类的免疫信号通路较为复杂, 赤眼鳟 *TRAF6* 在应对 GCRV 抗病毒免疫反应中的调控方式有待研究。

本研究结果表明, 赤眼鳟 *TRAF6* 主要由 RING 结构域、锌指结构域、螺旋卷曲结构域和 MATH 结构域组成, 具有 TRAFs 家族的典型结构特征, 在健康赤眼鳟组织中的表达差异明显; GCRV 攻毒后, *TRAF6* 在赤眼鳟脾脏和头肾中的表达量上调。这些结果提示 *TRAF6* 参与了赤眼鳟抗 GCRV 的免疫应答反应, 但其作用机制还有待研究。

参考文献:

- [1] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2001, 1(2): 135-145. DOI:10.1038/35100529.
- [2] Lu Y, Jiang B C, Cao D L, et al. *TRAF6* upregulation in spinal astrocytes maintains neuropathic pain by integrating TNF- α and IL-1 β signaling[J]. Pain, 2014, 155(12): 2618-2629. DOI:10.1016/j.pain.2014.09.027.
- [3] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway[J]. Science, 2003, 301(5633): 640-643. DOI:10.1126/science.1087262.
- [4] Ishida T, Mizushima Si, Azuma S, et al. Identification of *TRAF6*, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region[J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 28745-28748. DOI:10.1074/jbc.271.46.28745.
- [5] 孔鹏. 大黄鱼 Toll 样受体免疫信号传导通路相关基因

- 的克隆与表达[D]. 保定: 河北大学, 2008.10.7666/d.y1996368.
- [6] Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length *TLR3*, *IRAK-4*, and *TRAF6* in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(9): 1057–1071. DOI:10.1016/j.molimm.2004.11.005.
- [7] Kongchum P, Hallerman E M, Hulata G, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *TLR9*, *MyD88* and *TRAF6* genes in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(1): 361–371. DOI:10.1016/j.fsi.2010.11.012.
- [8] Li Y W, Li X, Xiao X X, et al. Molecular characterization and functional analysis of *TRAF6* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44(1): 217–225. DOI:10.1016/j.dci.2013.12.011.
- [9] Zhao F, Li Y W, Pan H J, et al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) *TRAF6* and *TAK1*: molecular cloning and expression analysis after *Ichthyophthirius multifiliis* infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(6): 1514–1523. DOI:10.1016/j.fsi.2013.03.003.
- [10] Tran N, Liu H, Jakovlić I, et al. Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) *MyD88* and *TRAF6*: characterisation, comparative homology modelling and expression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4): 7077–7097. DOI:10.3390/ijms16047077.
- [11] 陈燕, 樊琳, 刘田田, 等. 半滑舌鳎 *TRAF6* 基因和 *TAK1* 基因的克隆及表达分析[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(5): 867–876. DOI:10.3724/SP.J.1118.2015.15082.
- [12] 史雪灿, 柴龙会, 牛曙东, 等. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙皮肤 *MyD88* 和 *TRAF6* 基因表达的动态变化[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(6): 59–63. DOI:10.3969/j.issn.1007-5038.2015.06.012.
- [13] Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the IkappaB kinase complex by *TRAF6* requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 351–361. DOI:10.1016/s0092-8674(00)00126-4.
- [14] Zhou X, Li Y, Ding J, et al. Down-regulation of tumor necrosis factor-associated factor 6 is associated with progression of acute pancreatitis complicating lung injury in mice[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 217(4): 279–285. DOI:10.1620/tjem.217.279.
- [15] Lomaga M A, Yeh W C, Sarosi I, et al. *TRAF6* deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(8): 1015–1024. DOI:10.1101/gad.13.8.1015.
- [16] 刘巧林. 草鱼与赤眼鳟杂交 F_1 遗传特征及对草鱼呼肠孤病毒抗性的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [17] 王红权. 基于 GCRV 抗性提高的草鱼免疫特性分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [18] 彭慧珍, 刘敏, 刘巧林, 等. 赤眼鳟 *Mx* 基因全长 cDNA 克隆及其经 GCRV 攻毒后的组织表达分析[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 993–1001. DOI:10.7541/2014.147.
- [19] 王荣华, 李伟, 肖调义, 等. 赤眼鳟 *MyD88* 基因 cDNA 克隆与表达特性研究[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(3): 459–466.
- [20] 肖调义, 李伟, 王荣华, 等. 赤眼鳟 Toll 样受体 3 基因 cDNA 全长克隆及表达分析[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(5): 894–901.
- [21] Yin Q, Lin S C, Lamothe B, et al. E2 interaction and dimerization in the crystal structure of *TRAF6*[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(6): 658–666. DOI:10.1038/nsmb.1605.
- [22] Wang K Z, Galson D L, Auron P E. *TRAF6* is autoinhibited by an intramolecular interaction which is counteracted by trans-ubiquitination[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(3): 763–771. DOI:10.1002/jcb.22589.
- [23] Yang K, Zhu J, Sun S, et al. The coiled-coil domain of *TRAF6* is essential for its auto-ubiquitination[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(1): 432–439. DOI:10.1016/j.bbrc.2004.09.070.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库