



## 草鱼 TAB2 与 TAK1 蛋白互作鉴定及其对两种抗菌肽基因表达的影响

杨文飞, 郭佳静, 赵文平, 李椹年\*  
(安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

**摘要:** 为了探究草鱼 TAB2 (*CiTAB2*) 与 *CiTAK1* 能否互作及其对 2 种草鱼抗菌肽基因 (*Cihepcidin* 与 *Ci $\beta$ -defensin1*) 表达的影响, 实验首先采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法分析拟态弧菌感染后 *Citab2* 和 *Citak1* 在草鱼免疫相关组织中的时空表达模式。然后利用荧光共定位、免疫共沉淀及 Western blot 技术鉴定 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 在细胞内共定位及相互作用情况。最后将过表达质粒 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pEGFP-N1-*Citab2* 共同转染草鱼肾细胞 (CIK 细胞), 检测 *Cihepcidin* 与 *Ci $\beta$ -defensin1* 的相对 mRNA 表达水平。结果显示, 拟态弧菌感染能够显著改变 *Citab2* 和 *Citak1* 的相对表达水平, 前者于感染后不同时间在各检测组织中表现出不同的时空表达模式, 而后者均呈现先上调后下调的表达模式; 荧光显微镜下观察到 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 共定位于转染后的 HEK293T 和 CIK 细胞的胞质中, 且在 HEK293T 细胞内能够形成 *CiTAB2*-*CiTAK1* 蛋白复合物; 共同过表达 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 后, CIK 细胞内 *Cihepcidin* 与 *Ci $\beta$ -defensin1* 的相对 mRNA 表达水平在各检测时间点均显著上调。结果表明, *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 存在互作关系且二者互作能够促进上述两种抗菌肽的转录表达。本研究从蛋白互作调控抗菌肽表达的角度为防治鱼类弧菌病提供了新策略。

**关键词:** 草鱼; 转化生长因子- $\beta$  激活激酶 1 (TAK1); TAK1 结合蛋白 2 (TAB2); 蛋白互作; 抗菌肽基因表达

中图分类号: S 942.1

文献标志码: A

转化生长因子- $\beta$  激活激酶 1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase-1, TAK1) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[1]</sup>。TAK1 结合蛋白家族 (TAK1 binding proteins, TABs) 包含 TAB1、TAB2 和 TAB3 等 3 个成员<sup>[2]</sup>。在哺乳动物中已探明 TAK1 与 TAB2 的相互作用 (简称互作) 能够激活 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路, 进而通过调控抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs)、细胞因子和趋化因子等免疫分子表达参与宿主抗菌免疫过程<sup>[3]</sup>。目

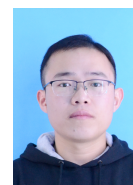
前, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[4-5]</sup>、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[6]</sup> 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[7-8]</sup> 等多种硬骨鱼类的 *tak1* 和 *tabs* 基因均被克隆鉴定, 且已有报道大黄鱼 TAB2 与 TAK1 存在互作关系<sup>[8]</sup>。生物信息学分析显示, 草鱼 TAB2 (*CiTAB2*) 和 TAK1 (*CiTAK1*) 与大黄鱼相应蛋白的氨基酸同源性分别为 73.9% 和 92.8%, 且具有相似的结构域, 推测 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 可能存在互作关系, 但仍需验证。

收稿日期: 2021-09-20 修回日期: 2021-11-16

资助项目: 国家自然科学基金 (31672698); 安徽农业大学研究生创新基金 (2020ysj-29)

第一作者: 杨文飞 (照片), 从事鱼类病原微生物与免疫学研究, E-mail: 302721210@qq.com

通信作者: 李椹年, 从事鱼类病原微生物与免疫学研究, E-mail: lijinnian2000@163.com



拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) 是引起鱼类弧菌病的常见病原菌<sup>[9-11]</sup>。由于国内尚无商品化的渔用拟态弧菌疫苗, 行业内主要使用抗生素类药物防治拟态弧菌所致的鱼类弧菌病。然而, 抗生素类药物的频繁使用, 不仅增加细菌产生耐药性, 导致抗菌疗效甚微, 而且造成水环境污染、药物残留及水产品安全等问题。因此, 亟需探索有效防治鱼类弧菌病的新方法。

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是生物体经诱导产生的具有广谱抗菌活性和免疫调节作用的一类小分子多肽<sup>[12]</sup>。因其具有广谱抗菌、作用机理独特、低耐药和低致敏等特点, AMPs 被认为是最有前景的抗生素替代品。迄今为止, 抗菌肽数据库 (<http://aps.unmc.edu/AP/>) 中收录的鱼源 AMPs 已达 100 余种。其中,  $\beta$ -防御素 1 ( $\beta$ -defensin1) 和铁调素 (hepatic bactericidal proteins, hepcidin) 是 2 种富含半胱氨酸, 且具有广谱抗菌活性的抗菌肽<sup>[13-14]</sup>。

我们前期研究中用 *Cihepcidin* 和 *Ci* $\beta$ -defensin-1 的重组真核表达质粒转染鲤上皮瘤细胞系 (epithelima popuasum cuprini, EPC) 细胞, 采用平板涂布法检测并发现转染后 48 h 的细胞培养上清液对拟态弧菌生长具有抑制作用。但是, *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作能否促进这 2 种抗菌肽表达仍不清楚。对此, 本研究以 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 为研究对象, 分析 *Citab2* 与 *Citak1* 对拟态弧菌感染的响应, 在细胞水平鉴定这 2 种蛋白是否存在共定位与互作关系, 检测 *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作对抗菌肽基因 *Cihepcidin* 和 *Ci* $\beta$ -defensin1 表达的影响, 以期从蛋白互作调控抗菌肽表达的角度防治鱼类弧菌病提供新策略。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**实验用鱼** 健康草鱼 [体重 (100 ± 5)g] 购自合肥市高新技术农业园。恒温 (26 °C) 循环水养殖系统暂养 2 周, 每天定时光照 12 h 并按其体重的 3% 早、晚各投喂 1 次饲料。本研究获得了安徽农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (2019036), 实验过程中操作人员严格遵守安徽农业大学伦理规范, 并按照安徽农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

**实验菌株、细胞和载体** 拟态弧菌菌株

04-14 由本实验室从患病草鱼体内分离鉴定并保存<sup>[15]</sup>; 草鱼肾细胞系 (*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK) 和人胚肾上皮细胞系 (human embryonic kidney 293T, HEK293T) 均由本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ) 感受态细胞购于北京擎科新业生物技术有限公司; 真核表达载体 pEGFP-N1、pCMV-Myc 和 pmCherry-N1 由中国农业科学院上海兽医研究所刘光清研究团队惠赠。

**主要试剂** 胎牛血清 (FBS)、MEM 和 DMEM 细胞培养液均为美国 Gibco 公司产品; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、TRIzol 试剂、FastKing RT Kit (With gDNase) 反转录试剂盒和 SuperReal PreMix Plus 荧光定量试剂盒购自天根生物科技 (北京) 有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Lipofectamine 3000、RIPA 裂解液和特超敏 ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; Anti-Myc 免疫磁珠购自上海翎因生物科技有限公司; Myc-Tag 鼠源单克隆抗体、GFP-Tag 鼠源单克隆抗体、pEGFP-Tag 鼠源单克隆抗体购自 Abways technology。

### 1.2 拟态弧菌感染后组织中 *Citab2* 与 *Citak1* 的表达模式分析

实验用草鱼随机分为感染组和对照组, 经浓度为 100 mg/L 的 MS-222 麻醉后, 分别腹腔注射 0.2 mL 浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL 的拟态弧菌菌株 04-14 菌液和 0.2 mL 无菌生理盐水。分别于注射后 24、48 和 72 h 从各组采集 3 尾实验鱼的免疫相关组织 (脾脏、头肾、肝脏、鳃和肠)。用 TRIzol 试剂提取组织总 RNA, 按照 FastKing RT Kit (With gDNase) 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 作为实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测用模板。

根据 *Citab2* 与 *Citak1* 序列设计特异性引物, 选择  $\beta$ -actin 作为参考基因 (表 1), qPCR 检测拟态弧菌感染后上述靶基因在免疫相关组织中的相对表达量。qPCR 反应体系: 2 $\times$ SGExceel UltraSYBR Mixture 10  $\mu$ L, cDNA 模板 100 ng, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 预变性 3 min、95 °C 20 s, 58 °C 20 s, 72 °C 25 s, 共计 40 个循环。每个样品 3 个技术重复, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[16]</sup> 计算目的基因 mRNA 相对表达水平, 分析感染后其表达模式。

### 1.3 重组真核表达质粒的构建

为了在细胞水平探究 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 的

表 1 本研究所用引物的序列信息

Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 application	来源 source
<i>Citab2</i> -qRT-F	TCTGACCCGCTTTCACCTC	qPCR	本实验
<i>Citab2</i> -qRT-R	CCATCTCGTTGACTTCTTCTTTC		
<i>Citak1</i> -qRT-F	AGACAGGACAGACACCAAT	qPCR	[4]
<i>Citak1</i> -qRT-R	CATCTTACAGTGCTGCTCAA		
<i>Ciβ-actin</i> -F	TCTGCTATGTGGCTCTTG	qPCR	[17]
<i>Ciβ-actin</i> -R	CCTGAACCTCTCATTGC		
<i>Citab2</i> -pM-F	<u>CGGAATTC</u> CGATGTACCCGTTTGAGGAGAT	真核质粒构建 construction of pCMV-Myc- <i>Citab2</i>	本实验
<i>Citab2</i> -pM-R	<u>CCCTCGAG</u> GGTCATGATGTGCCCTGTCTCT		
<i>Citab2</i> -pE-F	<u>CCCTCGAG</u> GGATGGCACAGGGAAACCAGC	真核质粒构建 construction of pEGFP-N1- <i>Citab2</i> 和 pmCherry-N1- <i>Citab2</i>	本实验
<i>Citab2</i> -pE-R	<u>GGAATTC</u> CTCAGAAATGCCGTGAAATTC		
<i>Citak1</i> -pE-F	<u>CCCTCGAG</u> GGATGTACCCGTTTGAGGAGAT	真核质粒构建 construction of pEGFP-N1- <i>Citak1</i>	本实验
<i>Citak1</i> -pE-R	<u>GGAATTC</u> CTCATGATGTGCCCTGTCTCT		
<i>Cihepcidin</i> -qRT-F	CAGCCGTTCCGTTTCGTACA	定量PCR qPCR	[18]
<i>Cihepcidin</i> -qRT-R	AGCCTTTGTTACGACAGCAG		
<i>Ciβ-defensin1</i> -qRT-F	TTGCTTGTCCTTGCCGTCT	qPCR	[18]
<i>Ciβ-defensin1</i> -qRT-R	AATCCTTGCCACAGCCTAA		

注: 下划线部分为酶切位点序列。

Notes: The underlined part is the sequence of enzyme digestion sites.

共定位、互作及其对抗菌肽基因表达的影响, 需首先构建 4 种重组真核表达质粒 (pmCherry-N1-*Citab2*、pCMV-Myc-*Citab2*、pEGFP-N1-*Citab2* 和 pEGFP-N1-*Citak1*)。构建步骤: 根据真核表达载体、*Citab2* 和 *Citak1* 的序列特征设计 3 对含有酶切位点的特异性引物 (表 1), 以草鱼头肾组织 cDNA 为模板, PCR 扩增 *Citab2* 和 *Citak1*。将回收纯化的 PCR 产物与空载体依次进行双酶切、酶连及转化 DH5α 感受态细胞。取转化后的感受态细胞涂布于含 100 μg/mL 氨苄西林 (Amp) 的 LB 培养基, 37 °C 培养至长出菌落, 随机挑取 3 个菌落进行扩大培养后, 抽提质粒进行 PCR 和双酶切鉴定, 以鉴定重组真核表达质粒是否构建成功。

#### 1.4 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 的细胞共定位分析

将生长状态良好且密度为  $2 \times 10^5$  个/孔的 HEK 293T 和 CIK 细胞分别接种至 24 孔细胞培养板, 用 DMEM 或 MEM 完全培养液于 37 °C (HEK293T 细胞) 或 28 °C (CIK 细胞)、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养至 50% 汇合度后, 弃去孔内培养液, 更换为不含血清与双抗的细胞培养液, 使用 Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂将重组真核表达质粒 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pmCherry-N1-*Citab2* 共同转染至 HEK293T 和 CIK 细胞中。转染体系: 1 μg 质粒 (1 : 1, 质

量比)、1.5 μL 转染试剂和 50 μL 不含血清与双抗的细胞培养液。转染后 48 h, 弃去细胞孔内培养液, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤 3 次, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min, PBS 洗涤 3 次, 再用 DAPI 染核 12 min, PBS 洗涤 3 次, 荧光倒置显微镜下观察 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 在细胞中共定位情况。

#### 1.5 蛋白质免疫共沉淀实验

利用免疫共沉淀实验 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 与 Western blot (WB) 鉴定 *CiTAB2* 与 *CiTAK1* 在 HEK293T 细胞中是否存在互作。将 HEK293T 细胞接种 6 孔细胞培养板,  $2 \times 10^6$  个/孔, 用 DMEM 完全培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 12 h。待细胞汇合度达到 85% 时, 用 Lipofectamine 3000 将重组真核表达质粒 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1-*Citak1* 共同转染 HEK293T 细胞中, 同时设置 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1 以及 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pCMV-Myc 共转染对照组。转染体系: 2 μg 质粒、5 μL 转染试剂和 250 μL 不含血清与双抗的 MEM 培养液。转染后 48 h, 弃去孔内培养液, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 再加入 500 μL 含有 1% 苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液, 于冰上裂解细胞 10 min, 4 °C, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。其中一部分细胞裂解上



清液保存至-80 °C 用作阳性对照 (Input 组), 另一部分用于下一步 Co-IP。

吸取 20 μL Anti-Myc 免疫磁珠至 EP 管, 用预冷的 TBST 在磁力架上洗涤 3 次。将 200 μL 各共转组细胞裂解上清液加入洗涤后的免疫磁珠中, 置于翻转混合仪上, 4 °C 条件下混合 12 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 收集 Co-IP 后的蛋白复合物样品 (IP 组)。Input 组和 IP 组蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 转移至 PVDF 膜, 分别以 1 : 1 000 稀释的 Myc-Tag 和 GFP-Tag 鼠源单克隆抗体为一抗, 1 : 10 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗进行 WB 检测, 特超敏 ECL 试剂盒显影。

### 1.6 CiTAB2-CiTAK1 互作对抗菌肽 Cihepcidin 和 Ciβ-defensin1 mRNA 表达的影响

CIK 细胞培养与转染体系同“CiTAB2 与 CiTAK1 蛋白的细胞共定位分析”。将 pEGFP-N1-Citak1 与 pEGFP-N1-Citab2 分别单转和共转 CIK 细胞, 同时做转染空载体 pEGFP-N1 对照。分别于转染后 24、36 和 48 h 收集细胞样品, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 并反转录为成 cDNA, 使用 Cihepcidin 和 Ciβ-defensin1 特异性引物 (表 1), qPCR 检测 2 种抗菌肽基因在 CIK 细胞中的 mRNA 表达水平, qPCR 反应体系与条件同“拟态弧菌感染后组织中 Citab2 与 Citak1 的表达模式分析”。

### 1.7 数据分析

使用 SPSS 18.0 软件和  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算拟态弧菌感染后草鱼免疫相关组织中 Citab2 与 Citak1, 以及共同转染 Citab2 与 Citak1 后 CIK 细胞中 Cihepcidin 和 Ciβ-defensin1 的 mRNA 相对表达量, 并进单因素方差分析及多重比较,  $0.01 < P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 拟态弧菌感染后组织中 Citab2 与 Citak1 的表达模式

拟态弧菌感染后草鱼免疫相关组织中的 Citab2 与 Citak1 时空表达模式结果显示, 感染后 24 h 脾脏与头肾中 Citab2 mRNA 表达水平即达到峰值, 分别为对照组的 2.816 倍和 15.4 倍 ( $P < 0.01$ ), 随后 2 个检测时间点略有下降, 但仍显著高于未感染对照组 ( $P < 0.05$ )。与未感染对照组相比, 肝脏组织中 Citab2 mRNA 表达水平在感染后 24 h 无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 随后 2 个检测时间点则显著上调 ( $P < 0.01$ ); 肠和鳃组织中 Citab2 mRNA 表达水平分别在感染后 24 和 48 h 显著上调 ( $P < 0.01$ ), 而在其余检测时间点无显著变化 ( $P > 0.05$ )。各免疫相关组织中 Citak1 mRNA 表达模式是一致的, 均表现为在感染后 24 h 显著上调 ( $P < 0.01$ ), 随后两个检测时间点则显著下调 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

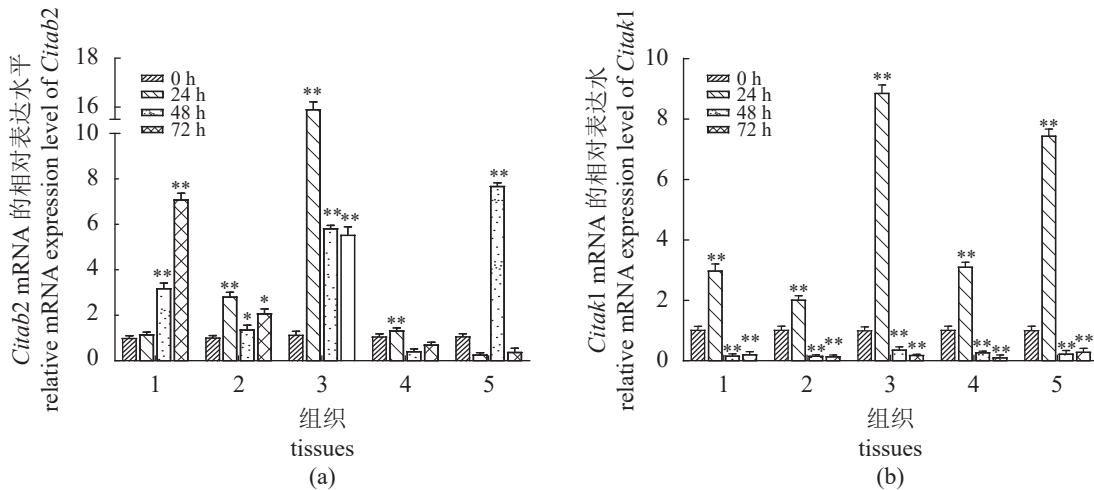


图 1 拟态弧菌感染后不同时间 Citab2 (a) 和 Citak1 (b) 在草鱼免疫相关组织中的相对表达水平变化

1. 肝脏, 2. 脾脏, 3. 头肾, 4. 肠, 5. 鳃; \*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 误差线表示标准误差 ( $n = 3$ )。

Fig. 1 The fold changes of Citab2 (a) and Citak1 (b) in immune-related tissues of *C. idella* at different time after *V. mimicus* infection

1. liver, 2. spleen, 3. head kidney, 4. intestine, 5. gill; single asterisks and double asterisks denote significant differences ( $P < 0.05$ ) and extremely significant differences ( $P < 0.01$ ); respectively, error bar is shown as the standard error ( $n = 3$ ).

实验表明 *CiTAB2* 和 *CiTAK1* 具有响应拟态弧菌感染并诱导机体免疫应答的潜能。

### 2.2 4种重组真核表达质粒的PCR与双酶切验证结果

采用酶切酶连方法构建4种重组真核表达质粒 pEGFP-N1-*Citab2*、pEGFP-N1-*Citak1*、pmCherry-N1-*Citab2* 和 pCMV-Myc-*Citab2*，并进行质

粒 PCR 和双酶切验证。结果显示，以质粒 DNA 为模板扩增到目的基因 *Citab2*(图 2, 泳道 2、6 和 10, 2 178 bp) 或 *Citak1*(图 2 泳道 14, 1 626 bp); 双酶切反应后均获得 2 条 DNA 条带，大小分别与空载体 (pEGFP-N1/4 715 bp、pCMV-Myc/3 770 bp 及 pmCherry-N1/4 707 bp) 和目的基因 (*Citab2*/2 178 bp 或 *Citak1*/1 626 bp) 大小一致 (图 2 泳道 4、8、13 和 16)，说明上述 4 种重组真核表达质粒构建成功。

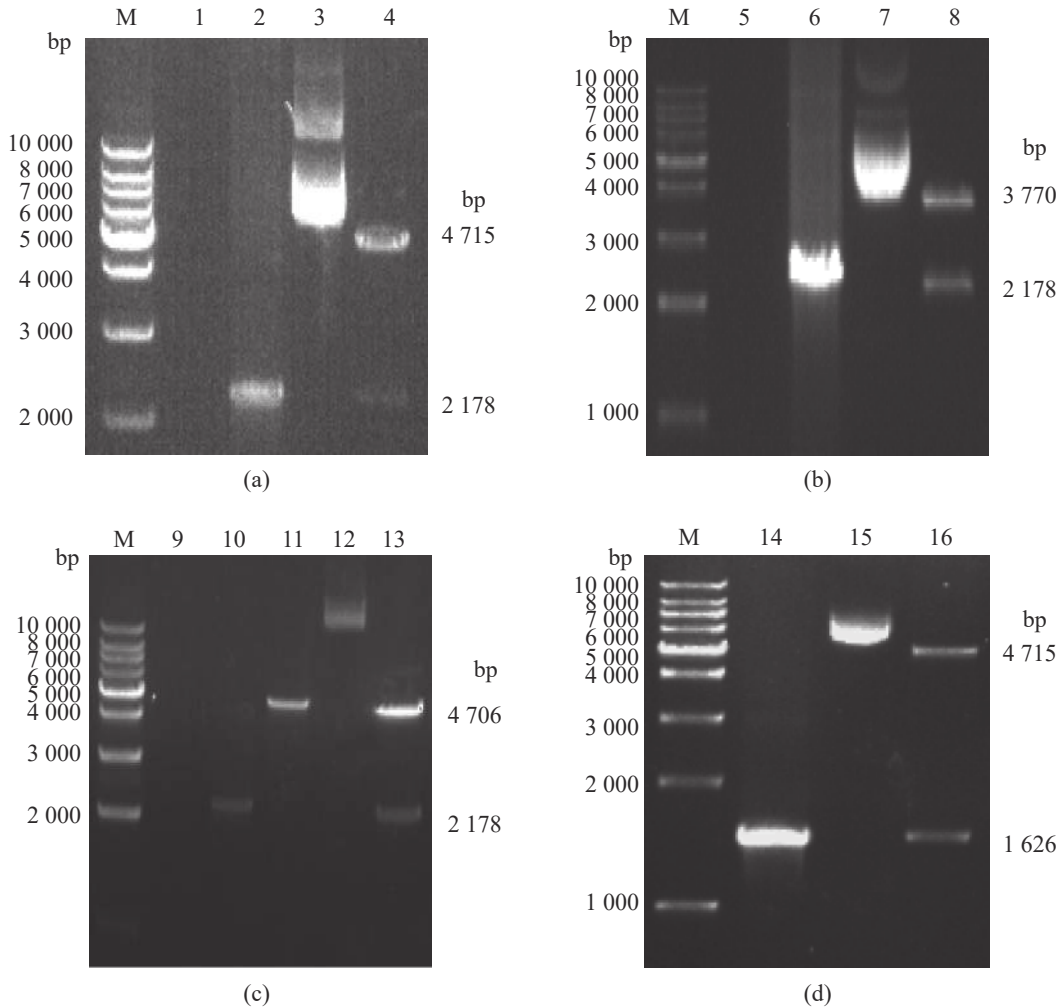


图 2 重组质粒 pEGFP-N1-*Citab2*(a), pCMV-Myc-*Citab2*(b), pmCherry-N1-*Citab2*(c) 和 pEGFP-N1-*Citak1*(d) 的 PCR 与双酶切验证

M. 标准物质 10 000; 1、5 和 9. ddH<sub>2</sub>O 阴性对照; 2. pEGFP-N1-*Citab2* 的 PCR 产物; 3. pEGFP-N1-*Citab2*; 4. pEGFP-N1-*Citab2* 的双酶切产物; 6. pCMV-Myc-*Citab2* 的 PCR 产物; 7. pCMV-Myc-*Citab2*; 8. pCMV-Myc-*Citab2* 的双酶切产物; 10. pmCherry-N1-*Citab2* 的 PCR 产物; 11. pmCherry-N1 的双酶切; 12. pmCherry-N1-*Citab2*; 13. pm-Cherry-N1-*Citab2* 的双酶切; 14. pEGFP-N1-*Citak1* 的 PCR 产物; 15. pEGFP-N1-*Citak1*; 16. pEGFP-N1-*Citak1* 的双酶切。

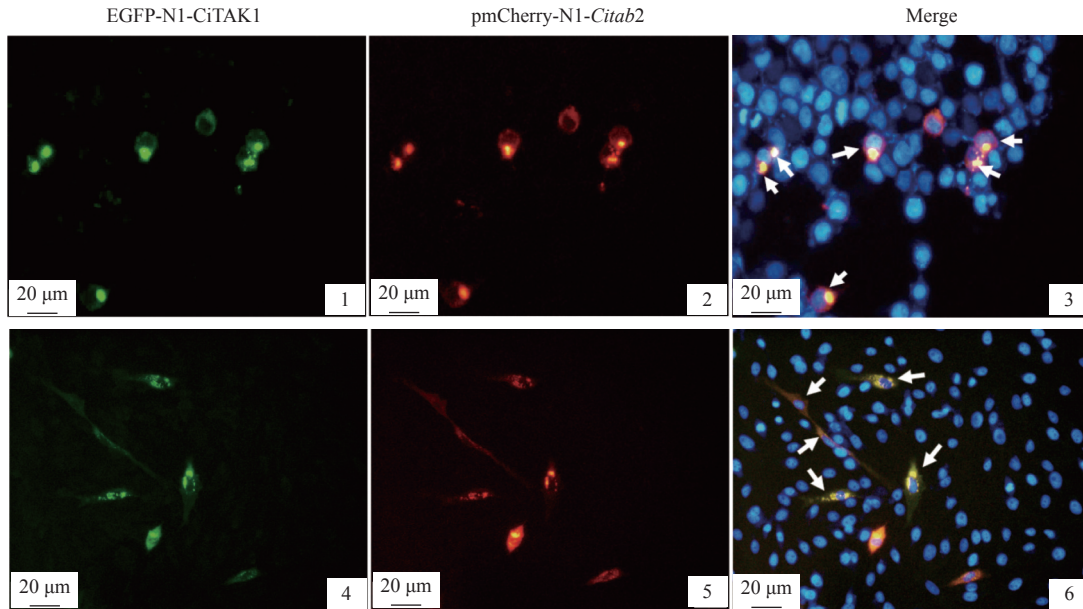
Fig. 2 PCR and double enzyme digestion verification of recombinant plasmid pEGFP-N1-*Citab2* (a), pCMV-Myc-*Citab2* (b), pmCherry-N1-*Citab2* (c) and pEGFP-N1-*Citak1* (d)

M. DL 10 000; 1, 5 and 9. ddH<sub>2</sub>O negative control; 2. PCR product of pEGFP-N1-*Citab2*; 3. pEGFP-N1-*Citab2*; 4. double enzyme digestion of pEGFP-N1-*Citab2*; 6. PCR product of pCMV-Myc-*Citab2*; 7. pCMV-Myc-*Citab2*; 8. double enzyme digestion of pCMV-Myc-*Citab2*; 10. PCR product of pmCherry-N1-*Citab2*; 11. double enzyme digestion of pmCherry-N1; 12. pmCherry-N1-*Citab2*; 13. double enzyme digestion of pm-Cherry-N1-*Citab2*; 14. PCR product of pEGFP-N1-*Citak1*; 15. pEGFP-N1-*Citak1*; 16. double enzyme digestion of pEGFP-N1-*Citak1*.

### 2.3 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 在细胞中的共定位

将重组真核表达质粒 pmCherry-N1-*Citab2* 和 pEGFP-N1-*Citak1* 分别共同转染 HEK293T 和 CIK 细胞。共转 48 h 后, 倒置荧光显微镜下观察到 DAPI 染色后的细胞核呈蓝色, 融合蛋白 EGFP-N1-*Citak1* 和 mCherry-N1-*Citab2* 在 2 种细胞的胞

质中均有表达, 分别发出绿色和红色荧光, 使得融合图中阳性细胞胞质中发出黄色荧光, (图版)。结果显示, *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 在 HEK293T 和 CIK 细胞的胞质中存在共定位, 同时推测二者在细胞内可能有相互作用。



图版 *Ci*TAK1 与 *Ci*TAB2 在 HEK293T 和 CIK 细胞中的共定位

1~3. HEK293T 细胞, 4~6. CIK 细胞; 3 和 6. 分别为 1 和 2 及 4 和 5 的合并图, 箭头指示 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 共定位在胞质中 (黄色)。

#### Plate Co-localization of *Ci*TAK1 and *Ci*TAB2 in HEK293T and CIK cells

1-3. HEK293T cells, 4-6 CIK cells; 3,6. merged image of 1 and 2, as well as 4 and 5, arrows indicate the co-localization of *Ci*TAK1 and *Ci*TAB2 in the cytoplasm (yellow).

### 2.4 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 互作的鉴定结果

将真核表达质粒 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1-*Citak1*、pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1 以及 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pCMV-Myc 分别共转染 293T 细胞。转染后 48 h, 以带有 Anti-Myc 抗体的免疫磁珠与各共转组细胞裂解液样品进行 Co-IP, 再分别用抗 Myc 和 EGFP 标签抗体对蛋白复合物进行 WB 检测。结果显示, 用 Myc 抗体进行的 WB 检测结果中, 在 Input 组共转 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1-*Citak1* 以及 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1 的细胞裂解液样品中均检测到 Myc-*Ci*TAB2 蛋白条带 (85.6 ku), 说明共转后 pCMV-Myc-*Citab2* 在细胞中得到表达; 在 IP 组共转 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1-*Citak1* 以及 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1 的蛋白复合物中也均检测到 Myc-*Citab2* 蛋白条带, 表明带 Myc 标签的 *Ci*TAB2 蛋白被成功捕获。由于 Myc 标签蛋

白本身很小 (约 3.0 ku), 共转 pCMV-Myc 与 pEGFP-N1-*Citak1* 的蛋白复合物中未检测到该标签蛋白条带 (图 3)。

用 EGFP 抗体进行的 WB 检测结果中, 在 Input 组共转 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pCMV-Myc-*Citab2* 以及 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pCMV-Myc 的细胞裂解液样品中均检测到 EGFP-N1-*Citak1* 蛋白条带 (89.5 ku), 共转 pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1 的细胞裂解液中检测到大小约为 26.9 ku 的 EGFP 标签蛋白条带, 说明带有 EGFP 标签的 *Ci*TAK1 表达载体表达正常。在 IP 组, 仅从共转 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pCMV-Myc-*Citab2* 的 IP 产物中检测到 *Ci*TAK1 融合蛋白条带 (89.5 ku), 从而证明在细胞内 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 能够相互作用 (图 3)。

### 2.5 *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作对 *Cihepcidin* 与 *Ciβ-defensin1* mRNA 表达的影响

采用 qPCR 方法检测共同过表达 *Ci*TAB2 与

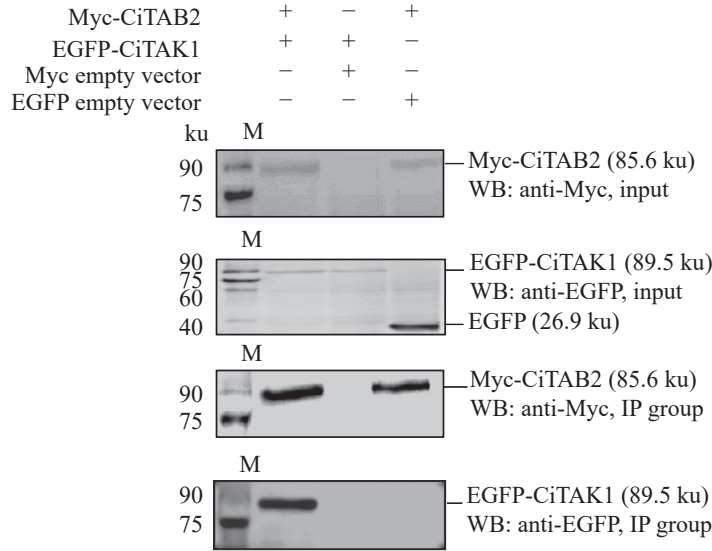


图3 CiTAB2与CiTAk1在HEK293T细胞内的相互作用

Fig. 3 Protein interaction between CiTAB2 and CiTAk1 in HEK293T cells

CiTAk1对*Cihepcidin*与*Ciβ-defensin1* mRNA表达水平的影响。结果显示, 相对于空载体转染组, 共转组中2种抗菌肽基因 mRNA水平在各检测时间点均显著上调 ( $P < 0.01$ ) (图4); 2个单转组中*Cihepcidin* mRNA水平在转染后24 h均无显著变

化 ( $P > 0.05$ ), 36 h均显著上调 ( $P < 0.01$ ), 48 h仍显著上调 (单转*CiTAk1*,  $P < 0.01$ ) 或回降到对照水平 (单转*CiTAB2*,  $P > 0.05$ ) (图4-a); 2个单转组中*Ciβ-defensin1* mRNA水平在转染后24 h显著下调 (单转*CiTAk1*,  $P < 0.01$ ) 或无显著变化 (单

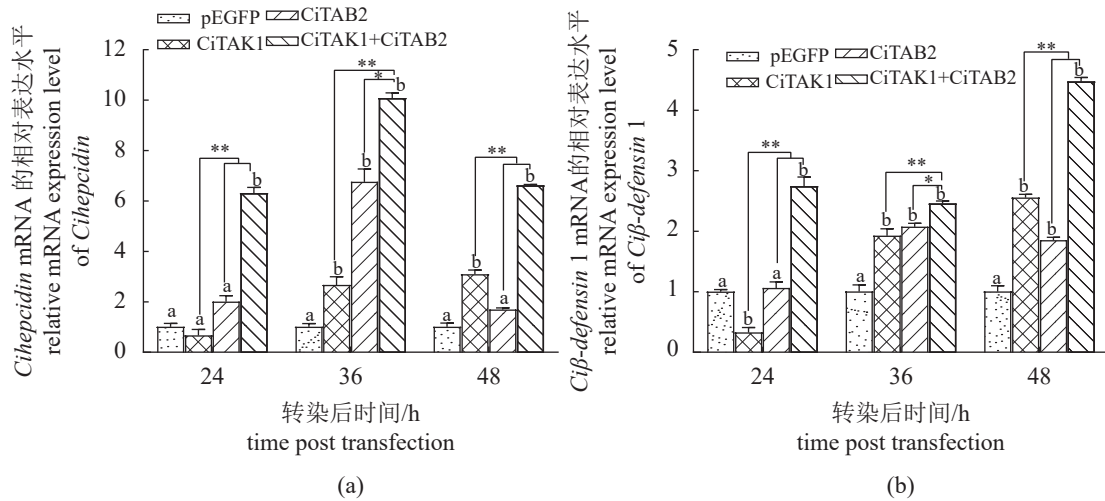


图4 CiTAB2-CiTAk1互作对两种抗菌肽基因 mRNA 表达的影响

(a) pEGFP-Ci-Ciata1 或/与 pEGFP-Ci-Citab2 单转或共转后不同时间点 CIK 细胞中 *Cihepcidin* mRNA 的相对表达量; (b) pEGFP-Ci-Ciata1 或/与 pEGFP-Ci-Citab2 单转或共转 CIK 细胞后不同时间点 *Ciβ-defensin1* mRNA 的相对表达量; 不同小写字母表示同一时间点下重组质粒转染组与空质粒转染组间的显著差异 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 星号表示同一时间点下共转组与单转组间的显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 误差线表示标准误差 ( $n=3$ )。

Fig. 4 Effects of CiTAB2-CiTAk1 interaction on the mRNA expression of two antimicrobial peptides genes

(a) relative mRNA expression of *Cihepcidin* at different time points in the CIK cells single-transfected or co-transfected with plasmids pEGFP-Ci-Ciata1 or/and pEGFP-Ci-Citab2; (b) relative mRNA expression of *Ciβ-defensin1* at different time points in the CIK cells single-transfected or co-transfected with plasmids pEGFP-Ci-Ciata1 or/and pEGFP-Ci-Citab2. Different lowercase letters indicate significant differences between recombinant plasmid-transfected and empty plasmid-transfected groups at the same test time point ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). Single asterisks and double asterisks denote significant differences ( $P < 0.05$ ) and extremely significant differences ( $P < 0.01$ ) between single-transfected and co-transfected groups at the same test time point, respectively. Error bar is shown as the standard error ( $n=3$ ).



转 *Ci*TAB2,  $P > 0.05$ ), 随后均显著上调 ( $P < 0.01$ ) (图 4-b)。进一步分析发现, 共转组中 2 种抗菌肽基因 mRNA 表达水平在各检测时间点均显著高于 2 个单转组 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。结果表明, *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作能促进这 2 种抗菌肽基因的表达。

### 3 讨论

信使 RNA(mRNA) 是联系 DNA 与蛋白质之间的桥梁, 特定基因的 mRNA 表达量能够反映该基因的表达丰度。因此, 检测病原微生物感染后体内某种基因的 mRNA 水平变化, 可作为判断该基因是否参与感染或抗感染过程的重要指标。Zhao 等<sup>[4-5]</sup>用多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 人工感染草鱼, qPCR 检测并发现腮、脾脏、头肾和皮肤中 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 基因均上调, 但其时空表达模式并不完全一致。本研究也得到类似结果, 拟态弧菌感染能显著提高 *Citab2* 与 *Citak1* 在草鱼免疫相关组织中的 mRNA 表达水平, 其中 *Citab2* 在各检测组织中的时空表达模式不同, *Citak1* 在各检测组织中均呈现为感染后 24 h 显著上调, 随后显著下调。此外, 拟态弧菌感染后抗菌肽 *hepcidin* 和  $\beta$ -*defensin1* 的 mRNA 表达水平在肝脏、头肾和鳃等组织中也显著上调。上述结果表明, *Ci*TAB2 和 *Ci*TAK1 具有响应拟态弧菌感染并诱导机体免疫应答的潜能, 同时也启发我们进一步探究 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 是否有相互作用及其互作对抗菌肽表达的影响。

蛋白质之间的相互作用 (简称蛋白互作) 是指 2 种或 2 种以上的蛋白质分子通过非共价键形成蛋白质复合体的过程<sup>[19]</sup>。研究蛋白互作的技术或方法较多, 其中免疫共沉淀 (Co-IP) 是利用抗原与抗体特异性结合原理鉴定活细胞内蛋白互作的理想方法<sup>[20]</sup>。Wang 等<sup>[8]</sup>使用 protein A/G 磁珠通过免疫共沉淀方法证实大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) TAK1 与 TAB2 可以相互作用, 并上调 NF- $\kappa$ B 表达。本实验以带有 Anti-Myc 抗体的免疫磁珠和 3 组共转染样品 (pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1-*Citak1*、pCMV-Myc-*Citab2* 与 pEGFP-N1、pEGFP-N1-*Citak1* 与 pCMV-Myc) 的细胞裂解液孵育后分别进行 Co-IP, 所得的蛋白质复合物再用抗 Myc 和 EGFP 标签抗体进行 WB 鉴定, 结果表明 *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 在 HEK293T 细胞内存在互作。同时, *Ci*TAB2 与 *Ci*TAK1 在 HEK293T 与 CIK 细胞中均共定位在胞质部位, 进一步佐证了 Co-IP 的实验

结果。人胚肾上皮细胞系 HEK293T 具有生长繁殖速度快、外源基因转染效率高及蛋白表达水平高等优势<sup>[21]</sup>, 而外源基因在鱼类细胞系 CIK、EPC 和 FHM 中的转染效率均很低、目的蛋白表达量少, 导致免疫共沉淀下来的互作蛋白很少, 难以检测出来。因此, 本研究中选择 HEK293T 作为细胞模型在细胞水平鉴定草鱼 TAB2 与 TAK1 的互作关系。

蛋白互作参与细胞内大部分生化反应进程, 在细胞信号转导、基因表达调控及细胞迁移等方面发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。为了探讨 *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作对 2 种抗菌肽基因 *Cihepcidin* 与 *Ci* $\beta$ -*defensin1* 表达的影响, 研究中将过表达质粒 pEGFP-N1-*Citak1* 与 pEGFP-N1-*Citab2* 单转或共转 CIK 细胞, 检测转染后不同时间内源性 *Cihepcidin* 与 *Ci* $\beta$ -*defensin1* mRNA 表达情况。结果显示, 相对于空载体转染组与单转组, 共转组中 2 种抗菌肽基因 mRNA 表达水平在各检测时间点均显著上调, 表明 *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作能够促进抗菌肽 *Cihepcidin* 和 *Ci* $\beta$ -*defensin1* 的转录表达。研究中同时发现单转 pEGFP-N1-*Citak1* 或 pEGFP-N1-*Citab2* 后 36 h 也能显著上调上述 2 种抗菌肽基因的 mRNA 表达水平, 其原因可能是过表达的 *Ci*TAK1 或 *Ci*TAB2 与内源性 *Ci*TAB2 或 *Ci*TAK1 发生了相互作用, 进而调控抗菌肽表达。然而 *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 互作调控抗菌肽表达的细胞信号通路机制仍需深入研究。

综上所述, 本研究证实草鱼 TAB2 与 TAK1 存在细胞内共定位与相互作用关系, 且两者互作能够促进抗拟态弧菌抗菌肽 *Cihepcidin* 和 *Ci* $\beta$ -*defensin1* 的转录表达。研究结果从蛋白互作调控抗菌肽表达的角度为防治鱼类弧菌病提供新策略。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- $\beta$  signal transduction[J]. *Science*, 1995, 270(5244): 2008-2011.
- [2] Shinohara H, Yasuda T, Kurosaki T. TAK1 adaptor proteins, TAB2 and TAB3, link the signalosome to B-cell receptor-induced IKK activation[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(18): 3264-3269.
- [3] Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, et al. TAB2, a novel



- adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAP-KKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(4): 649-658.
- [4] 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 Immunology*, 2013, 34(6): 1514-1523.
- [5] Zhao F, Li Y W, Pan H J, *et al.* TAK1-binding proteins (TAB1 and TAB2) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Identification, characterization, and expression analysis after infection with *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(2): 389-399.
- [6] Li Y W, Li X, Wang Z, *et al.* Orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* Tak1: molecular identification, expression analysis and functional study[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(2): 417-430.
- [7] Bao S Y, Sun Q X, Yao C L. The interaction of TAK1 and TAB1 enhances LPS-induced cytokine release via modulating NF- $\kappa$ B activation (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 450-458.
- [8] Wang L P, Jiang L H, Liu G, *et al.* Molecular characterization and expression of TAK-binding proteins (TAB1-3) in *Larimichthys crocea* infected by *Vibrio parahaemolyticus* and LPS[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 98: 108-118.
- [9] Zhang X, Li Y W, Mo Z Q, *et al.* Outbreak of a novel disease associated with *Vibrio mimicus* infection in fresh water cultured yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 119-124.
- [10] Geng Y, Liu D, Han S, *et al.* Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 82-84.
- [11] 蔺凌云, 冯东岳, 潘晓艺, 等. 黄颡鱼拟态弧菌的鉴定、毒力相关因子及药敏特性[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(4): 799-810.
- Lin L Y, Feng D Y, Pan X Y, *et al.* Identification, virulence-related factors, and antimicrobial susceptibility of *Vibrio mimicus* from yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 799-810 (in Chinese).
- [12] Narayana J L, Chen J Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents[J]. *Peptides*, 2015, 72: 88-94.
- [13] Wei X L, Babu V S, Lin L, *et al.* Hepcidin protects grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) against *Flavobacterium columnare* infection via regulating iron distribution and immune gene expression[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 274-283.
- [14] Yang K, Hou B R, Ren F F, *et al.* Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) beta-defensin 1: implications for its role in inflammation control[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(1): 87-94.
- [15] Liu X Q, Gao H H, Xiao N, *et al.* Outer membrane protein U (OmpU) mediates adhesion of *Vibrio mimicus* to host cells via two novel N-terminal motifs[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119026.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Zhang A Y, Chen D Y, Wei H, *et al.* Functional characterization of TNF- $\alpha$  in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(5): 1123-1132.
- [18] Huang C, Feng L, Jiang W D, *et al.* Deoxynivalenol decreased intestinal immune function related to NF- $\kappa$ B and TOR signalling in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 470-484.
- [19] Hayes S, Malacrida B, Kiely M, *et al.* Studying protein-protein interactions: progress, pitfalls and solutions[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(4): 994-1004.
- [20] Rao V S, Srinivas K, Sujini G N, *et al.* Protein-protein interaction detection: methods and analysis[J]. *International Journal of Proteomics*, 2014, 2014: 147648.
- [21] Thomas P, Smart T G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2005, 51(3): 187-200.
- [22] Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains[J]. *Science*, 2003, 300(5618): 445-452.

## Identification of the interaction between TAB2 and TAK1 proteins from *Ctenopharyngodon idella* and effect of their interaction on the expression of two antimicrobial peptides genes

YANG Wenfei, GUO Jiajing, ZHAO Wenping, LI Jinnian\*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** To investigate whether grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TAB2 (*Ci*TAB2) can interact with *Ci*TAK1 and the effect of their interaction on the expression of two antimicrobial peptides (AMPs) genes *Cihepcidin* and *Ci $\beta$ -defensin1*, the temporal and spatial expression patterns of *Citab2* and *Citak1* in the immune-related tissues of grass carp after *Vibrio mimicus* infection were firstly analyzed by qPCR in the present study. Subsequently, fluorescence co-localization, co-immunoprecipitation and Western blot were used to identify the intracellular co-localization and interaction between *Ci*TAB2 and *Ci*TAK1 proteins. Finally, the mRNA expression levels of *Cihepcidin* and *Ci $\beta$ -defensin1* were examined after the overexpression plasmids pEGFP-N1-*Citak1* and pEGFP-N1-*Citab2* were co-transfected into CIK cells. The results showed that *V. mimicus* infection significantly altered the relative mRNA expression levels of *Citab2* and *Citak1*. Among them, the former showed different spatio-temporal expression patterns in each examined tissue at different time points post-infection, while the expression pattern of the latter was up-regulated then down-regulated in all examined tissues. *Ci*TAB2 and *Ci*TAK1 were co-localized in the cytoplasm of both HEK293T and CIK cells observed under a fluorescence microscope, and the *Ci*TAB2-*Ci*TAK1 protein complex could be formed in HEK293T cells post-transfection. After co-overexpression of *Ci*TAB2 and *Ci*TAK1, the mRNA expression levels of *Cihepcidin* and *Ci $\beta$ -defensin1* were significantly up-regulated in the CIK cells at each test time point. These results indicated that *Ci*TAB2 could interact with *Ci*TAK1 and their interaction was able to promote the transcriptional expression of these two AMPs, which provides a new strategy for the control of fish vibriosis from the perspective of protein interaction.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase-1 (TAK1); TAK1 binding proteins 2 (TAB2); protein interaction; gene expression of AMPs

**Corresponding author:** LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31672698); Graduate Innovation Foundation of Anhui Agricultural University Project (2020ysj-29)