

猪 *TRIM11* 基因克隆及其促进猪伪狂犬病毒在体外增殖的研究

宋爽, 曾磊, 鲁绍芳, 郭珍珍, 鲁维飞, 韩立强, 王江, 王月影, 褚贝贝*, 杨国宇*

(河南农业大学 农业部动物生化与营养重点开放实验室, 郑州 450002)

摘要: 为初步研究猪 *TRIM11* 的免疫学功能, 以猪颌下淋巴结 cDNA 为模板扩增 *TRIM11* 基因 cDNA 并对该基因进行了蛋白质结构预测和组织表达谱分析, 将该基因与 PiggyBac 载体相连获得真核表达载体 PB-*TRIM11*, 之后转染 PK15 细胞获得稳定表达细胞系。用猪伪狂犬病毒 (PRV) 刺激过表达 *TRIM11* PK15 细胞和对照组细胞后, 于不同时间收获细胞上清, 比较两组细胞上清中病毒滴度变化。结果表明, 猪 *TRIM11* 的 ORF 长度为 1 407 bp, 编码 468 个氨基酸, 该氨基酸序列含有 3 个 TRIM 家族保守的结构域。组织表达谱分析显示, 猪 *TRIM11* 在脂肪组织、肺的表达量较高, 而在心、回肠、十二指肠、直肠中的转录量较低。成功克隆了猪 *TRIM11* cDNA 序列并构建了真核转录载体 PB-*TRIM11*, qRT-PCR 检测结果表明 *TRIM11* 在 PK15 细胞系中成功表达。检测感染 PRV 后过表达 *TRIM11* PK15 细胞和对照组细胞上清液病毒的 TCID₅₀ 发现过表达 *TRIM11* 组的病毒滴度始终高于对照组。过表达 *TRIM11* 有一定的促进 PRV 增殖的作用, 为进一步研究猪 *TRIM11* 在天然免疫中的作用奠定了基础。

关键词: 三基序结合蛋白; 猪伪狂犬病毒; 病毒增殖; 稳定细胞系

中图分类号: S852.4; S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)06-1239-08

Molecular Cloning of Porcine *TRIM11* Gene and Its Promotion Effect on Pseudorabies Virus Replication *in vitro*

SONG Shuang, ZENG Lei, LU Shao-fang, GUO Zhen-zhen, LU Wei-fei, HAN Li-qiang, WANG Jiang, WANG Yue-ying, CHU Bei-bei*, YANG Guo-yu*

(Key Laboratory of Animal Biochemistry and Nutrition, Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to preliminary study the immunologic functions of porcine *TRIM11*, the cDNA of the target gene was amplified from the cDNA of porcine submandibular lymph node, the protein structure of porcine *TRIM11* was predicted and its tissue expression profile was analysed, the cloned porcine *TRIM11* cDNA was connected into PiggyBac (PB) transposon vector, then the recombinant vector (PB-*TRIM11*) was transfected to PK15 cells to establish stably transfected PK15 cell line. The results showed that the coding length of the cloned porcine *TRIM11* was 1 407 bp and the sequence code 468 amino acids. Porcine *TRIM11* protein was characterized by the presence of the tripartite motif. Tissue transcription profile analysis showed that, the transcription of *TRIM11* was higher in fat, lung, whereas the transcription of porcine *TRIM11* was lower in heart, ileum, recutum, duodenum. DNA sequence analysis of *TRIM11* showed that the cloned *TRIM11* cDNA was consistent with sequence from GenBank and the recombinant vector (PB-*TRIM11*) was constructed. The transfected PK15 cell line stably expressing *TRIM11* was estab-

收稿日期: 2015-12-01

基金项目: 国家自然科学基金(3149600030); 农业部转基因专项(2014ZX0801015B); 河南省基础与前沿技术研究计划项目(142300413209)

作者简介: 宋爽(1990-), 女, 河南许昌人, 硕士生, 主要从事动物生物化学研究, E-mail: Domhill@163.com

* 通信作者: 褚贝贝, E-mail: chubeibeihau@hotmail.com; 杨国宇, 教授, 博士, 主要从事动物生物化学研究, E-mail: haubiochem@163.com

lished successfully and the transcription of *TRIM11* was identified by qRT-PCR. PK15 cell line that stably express porcine *TRIM11* and control cells were infected with pseudorabies virus (PRV), respectively, then the cell supernatants were harvested at various time points after infection and the virus titers were detected. The results showed that the viral TCID₅₀ of the *TRIM11* over-expression group was higher than the control all the time. It indicates that the *TRIM11* over-expression cells might be more susceptible to PRV. The study provides the experimental basis for the role of porcine *TRIM11* in the innate immunity system in the future.

Key words: tripartite motif protein; pseudorabies virus; virus multiplication; stable cell line

三基序结合蛋白(TRIM)家族在人上已发现超过70个家族成员。所有的TRIM蛋白都含有一个由锌指结构、1或2个B-box、1个卷曲螺旋(RBCC)组成的N端三结构域^[1]。TRIM蛋白功能多种多样,除了参与细胞增殖、分化、发育、形态发生和细胞凋亡,也在免疫相关信号通路和抗病毒免疫反应中发挥重要作用^[2]。TRIM11(含有468个氨基酸残基)是一种典型的RBCC蛋白且形成寡聚物,在细胞质与细胞核中都存在^[3]。近年来有研究表明,TRIM11可以与TBK1含有接头蛋白的复合体结合,抑制RIG-I介导的IFN- β 产生的信号通路,降低I型疱疹病毒感染中IFN的产生量,负调控抗病毒免疫反应^[4]。

猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)也称为奥叶基氏病毒或猪I型疱疹病毒,是疱疹病毒科中疱疹病毒甲亚科的一员,其基因组是一个双链线性DNA分子^[5]。主要感染猪和其他家畜,在偶然情况下也会感染野生动物^[6]。猜测猪*TRIM11*基因在病毒感染细胞过程中也可能起到负调控抗病毒免疫反应作用。作者选择猪的*TRIM11*基因作为研究对象,对其进行克隆,并构建真核表达质粒PB-*TRIM11*,之后转染PK15细胞,构建稳定表达猪*TRIM11*基因的PK15细胞系。通过PRV感染过表达细胞系,对*TRIM11*基因对PRV增殖的作用进行了初步研究。

表1 扩增*TRIM11*和参照基因引物

Table 1 The primers used to amplify *TRIM11* and reference gene

引物名称 Primer name	序列 Sequence
TRIM11 L	5'-ACTGCTAGCTTCCTCCGTTACATCGGTGTTATGG-3' (<i>Nhe</i> I)
TRIM11 R	5'-ACTATTTAAATCTGCTCACTGGGGAGCCAGCATGTC-3' (<i>Swa</i> I)
Q-TRIM11 L	5'-AGGGCGAGCTATTTGCTGGTAAC-3'
Q-TRIM11 R	5'-TCCAGCCTCGTAGTCCAGAAAGATG-3'
GAPDH L	5'- TGGTGAAGGTCGGAGTGAAC-3'
GAPDH R	5'- GGAAGATGGTGATGGCCTTTC-3'

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

猪伪狂犬病毒(PRV strain Bartha K16),猪肾传代细胞PK15细胞,非洲绿猴肾细胞Vero细胞均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

猪颌下淋巴结、睾丸、肺等组织提取RNA反转录的cDNA,大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态Top10由本实验室保存;氨苄青霉素、嘌呤霉素为美国Sigma公司产品;Ex Taq酶、反转录试剂盒PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、DL2000为TaKaRa公司产品;Q5®热启动超保真DNA聚合酶、限制性内切酶*Nhe* I、*Swa* I、T4 DNA连接酶为NEB公司产品;质粒中提试剂盒为QIAGEN公司产品;转染试剂Turbofect为Thermo公司产品。

1.3 引物设计

参照GenBank中的猪源*TRIM11*(序列号:GACC01000116.1)基因序列,设计了包含*Nhe* I和*Swa* I酶切位点的扩增引物,以及用于Q-PCR定量的特异引物。引物均由生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

1.4 猪 TRIM11 基因序列和系统进化分析

用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测猪 TRIM11 的 CDS 序列,猪 TRIM11 分子大小和等电点用 DNASTar 进行计算,二级结构域模式分析用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)。构建猪 TRIM11 的系统进化树。首先从 NCBI 数据库上下载不同物种间 TRIM11 蛋白序列,然后在 MEGA 6 software 中构建系统进化树,计算方法为 NJ 法。NJ 法系统进化树的稳健性使用自展内部分枝法(Bootstrapping)评定,Bootstrap Replication 为 1 000。

1.5 猪 TRIM11 基因的克隆与 PB-TRIM11 表达载体构建

利用 PCR 技术,以实验室保存的猪颌下淋巴结组织提取的 RNA 反转录成的 cDNA 为模板,扩增得到猪 TRIM11 基因的 cDNA 序列。产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离回收大小为 1 432 bp 左右条带,并进行纯化。用 *Nhe* I 和 *Swa* I 分别双酶切载体 PiggyBac 和纯化得到的目的片段,连接过夜后转化 Top10 感受态细胞。将转化后的菌液涂布于预先加入 Amp 的 LB 琼脂平板,37 °C 过夜。挑取单菌落扩大培养,采用菌液 PCR,琼脂糖凝胶电泳筛选阳性克隆,命名为 PB-TRIM11,送生物工程(上海)股份有限公司测序。将鉴定正确的质粒按中提试剂盒说明书进行提取,-20 °C 保存,备用。

1.6 PB-TRIM11 质粒转染 PK15 细胞

将处于对数生长期的 PK15 细胞接种于 6 孔板中,达到 80% 融合度时,利用 Turbofect 进行转染。48 h 后以 PiggyBac 系统自带的 GFP 为依据,荧光显微镜下观察转染效率。更换含有 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素的培养基进行筛选,加压筛选 4 周后,荧光显微镜下可见有绿色荧光且抗嘌呤霉素的阳性细胞克隆,扩增培养即可得到稳定表达猪 TRIM11 的 PK15 细胞系。

1.7 荧光定量 PCR 法检测 TRIM11 mRNA 转录水平

将稳定转染 TRIM11 基因和稳定转染 PiggyBac 空载体的 PK15 细胞,以 $7.5 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 分别接种于 6 孔板中,每组在 6 孔板中做 3 个复孔,6 h 后收集细胞,Trizol 法提取细胞总 RNA,按照反转录试剂盒操作说明将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,荧光定量 PCR 法检测 TRIM11 mRNA 表达水平。两组之间比较采用 independent-

sample *T* test ($P < 0.05$)。

1.8 TRIM11 对 PRV 增殖的影响

1.8.1 猪伪狂犬病毒(PRV strain Bartha K16)的培养及预处理 将实验室保存的一支 PRV 悬液接种于长满单层 PK15 细胞的 25 cm² 细胞瓶内,于 37 °C 孵育 1 h 后,每瓶加 8 mL 含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液,培养至 24 h 细胞出现明显病变时收获培养物。将培养物反复冻融 3 次后,1 500 r · min⁻¹ 离心 15 min,收集病毒上清液,置 -80 °C 备用。取 96 孔微量培养板,每孔接种 1×10^4 个 PK15 细胞,待细胞长成单层后,取 100 μL 制得的病毒悬液,用 DMEM 培养液进行 10 倍稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-10}$),同时设立阴性对照,接种 96 孔微量培养板,测定所制病毒悬液的 TCID₅₀。TCID₅₀ 计算按 Reed-Muench 法进行。

1.8.2 过表达猪 TRIM11 对 PRV 增殖的影响

将稳定转染 TRIM11 基因和稳定转染 PiggyBac 空载体的 PK15 细胞,以 $7.5 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 分别接种于 6 孔板中,每组做 3 个复孔,待细胞长至单层后接种 0.1 MOI PRV,37 °C 孵育 1 h 后用 PBS 漂洗细胞去除未吸附的病毒,每孔加入 2 mL 含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液继续培养。于病毒感染 12、24、36 h 后观察细胞病变并收集细胞上清液测定 TCID₅₀。取 96 孔微量培养板,每孔接种 1×10^4 个 Vero 细胞,待细胞长成单层后,取 100 μL 待测细胞上清液,用 DMEM 培养液进行 10 倍稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-10}$),同时设立阴性对照,接种 96 孔微量培养板,测定 TCID₅₀。TCID₅₀ 计算按 Reed-Muench 法进行。两组之间比较采用 independent sample *T* test ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 猪 TRIM11 基因的序列分析及蛋白质二级结构域模式

首先从 NCBI 数据库中搜索预测的猪 TRIM11 基因的 CDS 序列(序列号为:GACC01000116.1)。猪 TRIM11 的 CDS 区长 1 407 bp,编码 468 个氨基酸(图 1),蛋白质的相对分子质量为 53 ku,等电点为 5.409。TRIM 家族的显著特点是具有 3 个结构域(tripartite motif)^[7],蛋白质二级结构域模式分析显示 TRIM11 蛋白含有 3 个 TRIM 家族保守的结构域,这三个结构域从 N 端到 C 端的顺序依次是 RING 结构、2 个 B-box 结构域、一个卷曲结构域

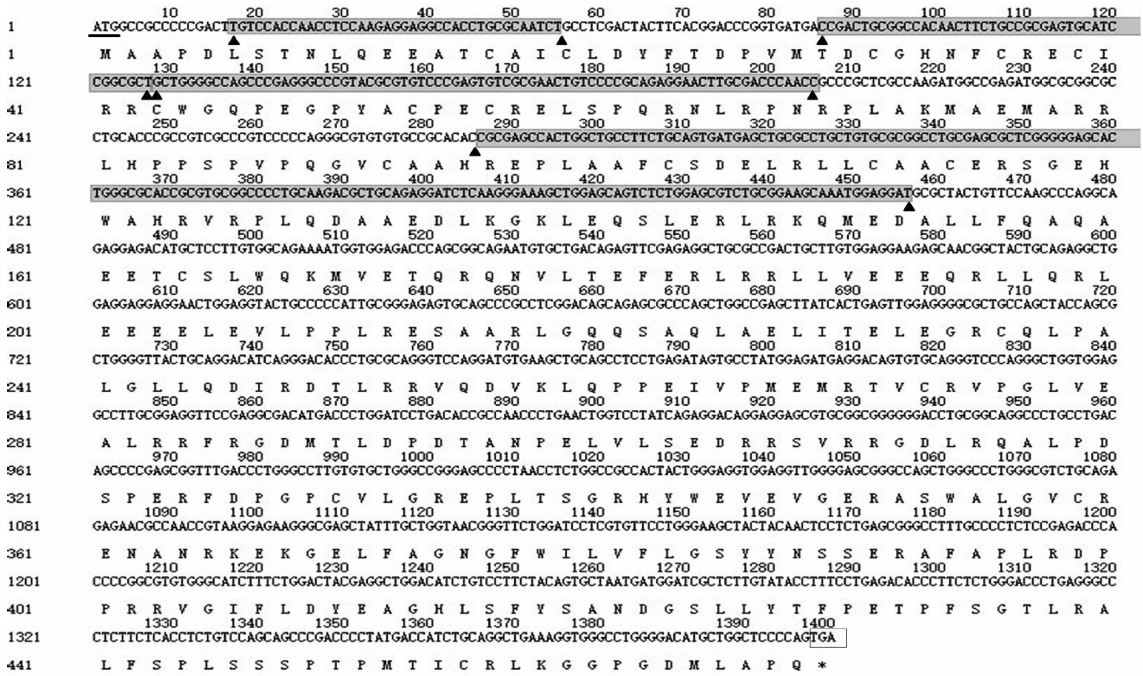
(coiled-coil domain), 此外该蛋白 C 端结构域为 PRY 结构域和 SPRY 结构域。PRY 和 SPRY 结构域组成了 B30.2 结构域^[8](图 2)。

2.2 猪 TRIM11 序列相似性和在不同物种间的系统进化

在 TRIM11 序列系统进化树上,猪和牛、虎鲸、山羊先聚在一起,然后又与太平洋海象聚成一支,与人和褐家鼠最后也聚成了一支。结果显示,猪和牛、虎鲸、山羊的亲缘关系很近,其相似性高达 98%、99%、98%,人和猪的相似性为 72%(图 3)。

2.3 荧光定量 PCR 分析猪 TRIM11 基因的组织特异性

为了分析猪 TRIM11 基因 mRNA 在不同组织中的转录及分布情况,本研究使用了猪的 15 个组织提取的 RNA 反转录的 cDNA,采用荧光定量 PCR 的方法进行了分析,以 GAPDH 为内参,采用与心组织的比值作为目的基因的相对转录水平,猪 TRIM11 基因在不同组织中的转录和分布明显不同,在肺、脂肪组织中的转录量较高,而在心、十二指肠、回肠、直肠中的转录量较低(图 4)。



划线处为起始密码子,边框处为终止密码子,阴影部分从起始密码子到终止密码子依次为预测的 RING、BBOX、Coiled-Coil domain、PRY 结构域和 SPY 结构域。结构域起止用三角符号标注

The start codon is underlined and the stop codon is boxed. The shaded parts represent the predicted RING domain, two B-box motifs, coiled-coil region, PRV domain, SPRY domain. Use a small triangle to sign the starting point or the ending point of the predicted domain/motif/region

图 1 猪 TRIM11 基因的 CDS 序列和氨基酸序列

Fig. 1 The CDS sequence and Amino Acid Sequence of porcine TRIM11

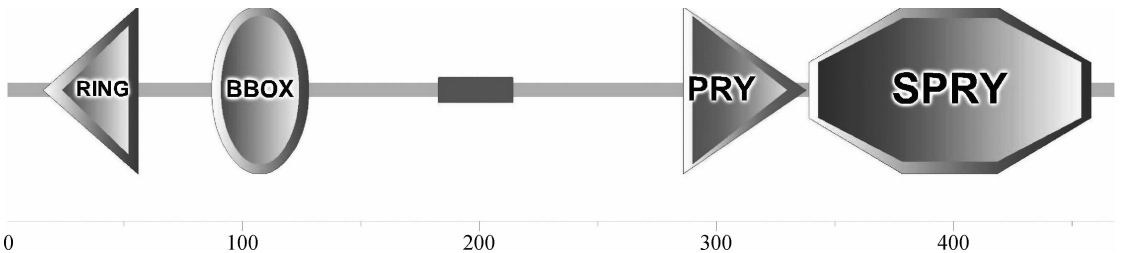
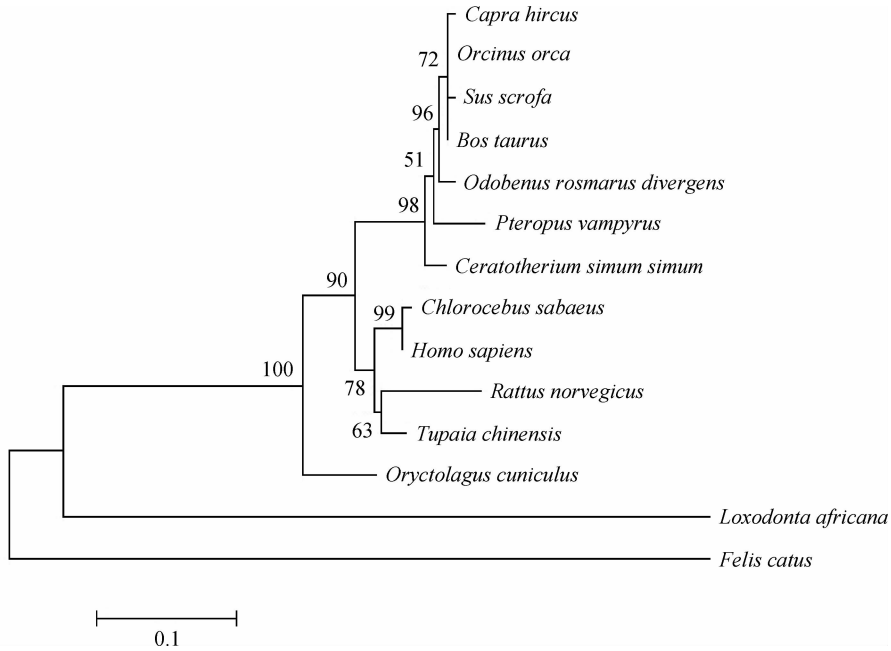


图 2 猪 TRIM11 蛋白二级结构域模式

Fig. 2 Schematic model of porcine TRIM11



用 MEGA 6 软件采用邻接法构建系统进化树,不同物种 TRIM11 蛋白序列从 GenBank 中获得,序列号为: JAA53691(*Sus scrofa*), XP_004420550.1(*Ceratotherium simum simum*), XP_011370226.1(*Pteropus vampyrus*), XP_004780674.1(*Mustela putorius furo*), XP_848259.1(*Canis lupus familiaris*), XP_004407123.1(*Odobenus rosmarus divergens*), XP_004284071.1(*Orcinus orca*), XP_007986332.1(*Chlorocebus sabaesus*), XP_006534642.1(*Mus musculus*), XP_003980669.1(*Felis catus*), NP_001071388.1(*Bos taurus*), XP_011542587.1(*Homo sapiens*), XP_013820385.1(*Capra hircus*), XP_006246567.1(*Rattus norvegicus*), XP_006147045.1(*Tupaia chinensis*), XP_008250757.1(*Oryctolagus cuniculus*), XP_010599060.1(*Loxodonta africana*)

The MEGA 6 software was used to construct the phylogenetic tree with the neighbor-joining method. The protein sequences of TRIM11 from different species were taken from GenBank, under accession numbers: XP_004420550.1(*Ceratotherium simum simum*), XP_011370226.1(*Pteropus vampyrus*), XP_004780674.1(*Mustela putorius furo*), XP_848259.1(*Canis lupus familiaris*), XP_004407123.1(*Odobenus rosmarus divergens*), XP_004284071.1(*Orcinus orca*), XP_007986332.1(*Chlorocebus sabaesus*), XP_006534642.1(*Mus musculus*), XP_003980669.1(*Felis catus*), NP_001071388.1(*Bos taurus*), XP_011542587.1(*Homo sapiens*), XP_013820385.1(*Capra hircus*), XP_006246567.1(*Rattus norvegicus*), XP_006147045.1(*Tupaia chinensis*), XP_008250757.1(*Oryctolagus cuniculus*), XP_010599060.1(*Loxodonta africana*)

图 3 不同物种间 TRIM11 蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the TRIM11 proteins from different species

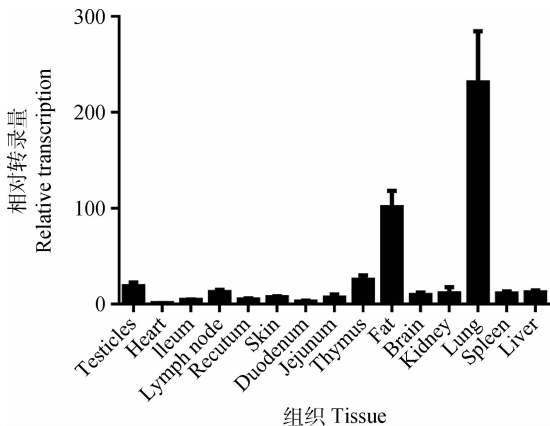
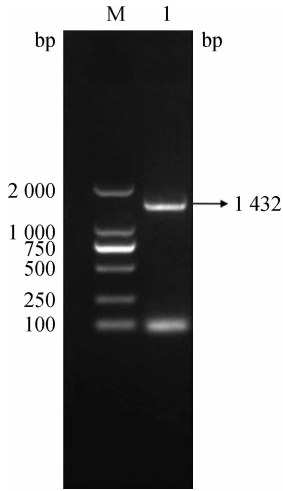


图 4 猪 TRIM11 mRNA 在不同组织中的相对转录量

Fig. 4 Relative porcine TRIM11 mRNA transcription in different tissues

2.4 猪 TRIM11 基因的克隆及 PB-TRIM11 重组质粒的构建

采用降落 PCR 技术,扩增 TRIM11 基因。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得单一目的条带,目的片段大小与预期的 TRIM11 基因(1 432 bp)一致(图 5)。将经 *Nhe* I 和 *Swa* I 双酶切的载体 PiggyBac 和猪 TRIM11 基因连接,转化 Top10 感受态,经氨苄青霉素筛选,进行菌液 PCR 鉴定。将鉴定为阳性的菌液送至上海生物工程股份有限公司测序,测序结果 Blast 分析显示,该重组质粒包含了猪 TRIM11 基因 CDS 序列与两端的酶切位点序列,提示成功构建了猪 PB-TRIM11 重组质粒。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. *TRIM11* 的 PCR 扩增产物

M. DNA marker (DL2000); 1. PCR product of *TRIM11*

图 5 猪 *TRIM11* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 5 PCR product of pig *TRIM11*

2.5 PB-TRIM11 转染 PK15 的荧光显微镜观察

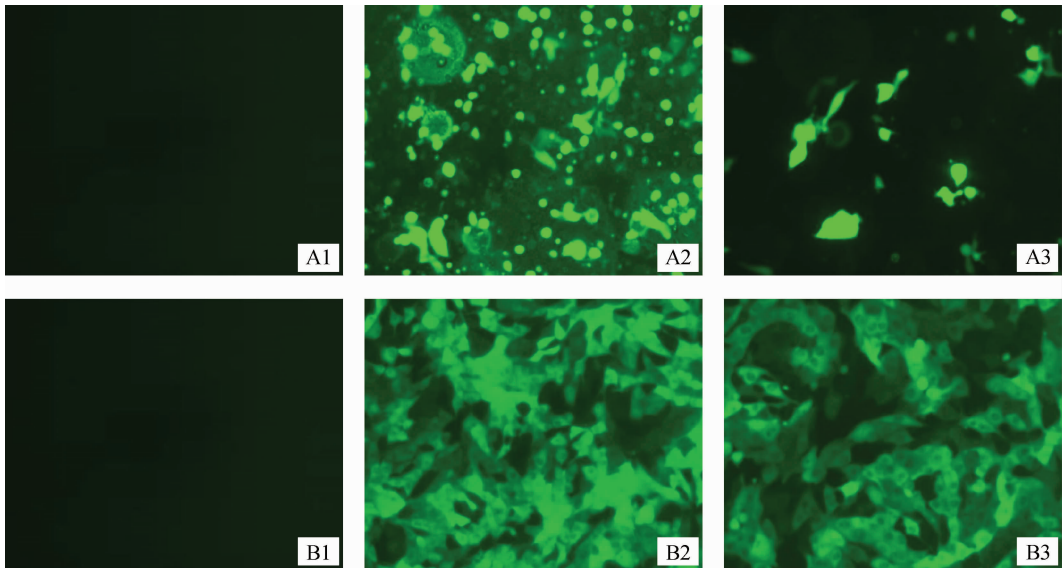
将 PB-TRIM11 重组质粒转染 PK15 细胞, 由于 PiggyBac 载体上有绿色荧光蛋白 GFP, 转染 48 h 后在荧光显微镜下观察转染效果(图 6)。经嘌呤霉素筛选 4 周后, 可见单克隆出现, 细胞 GFP 表达稳定。

2.6 猪 PB-TRIM11 重组质粒在细胞中的表达检测

以 *GAPDH* 为内参, 荧光定量检测稳定转染 PB-TRIM11 细胞中的 *TRIM11* mRNA 的转录情况。结果显示(图 7), 和转染 PiggyBac 组相比, 稳定转染 PB-TRIM11 组的 *TRIM11* 转录量显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 过表达猪 *TRIM11* 对 PRV 病毒增殖的影响

经过测定, 制得的 PRV 悬液在 PK15 细胞上的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-6.23} \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1}$ 。过表达 *TRIM11* 组



A1, B1. PK15 细胞; A2, A3. 转染 PiggyBac 空白载体和 PB-TRIM11 载体 48 h 的 PK15 细胞; B2, B3. 分别表示转染 PiggyBac 空白载体和 PB-TRIM11 载体 28 d 的 PK15 细胞

A1, B1. PK15 cells; A2, A3. PK15 cells transfected with PiggyBac empty vector or PB-TRIM11 vector after 48 hours; B2, B3. PK15 cells transfected with PiggyBac empty vector or PB-TRIM11 vector after 28 days (200 \times)

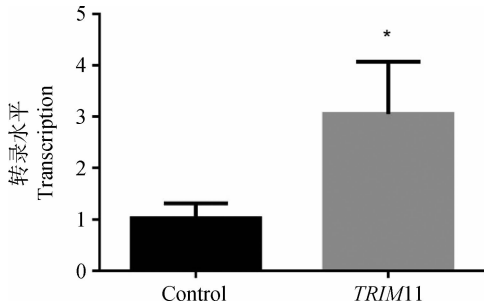
图 6 荧光显微镜下转染结果 (200 \times)

Fig. 6 Transfection results under fluorescence microscope (200 \times)

与 PiggyBac 空载组的细胞分别接种 0.1 MOI PRV 12、24、36 h 后, 于显微镜下放大 100 倍观察细胞病变情况, 可以看到两组细胞于 12 h 开始出现病变, 24 h 细胞变圆形成合胞体病变明显, 36 h 细胞脱落明显出现拉丝现象。

过表达 *TRIM11* 组与 PiggyBac 空载体组的细

胞分别接种 0.1 MOI PRV 12、24、36 h 后, 收取细胞上清液检测病毒滴度发现, 过表达 *TRIM11* 组的病毒滴度始终高于 PiggyBac 空载体组, 这种差异在 12 h 时更明显, 约 $1 - \log_{10}(P < 0.05)$, 随着时间的延长而缩小, 提示过表达 *TRIM11* 在 PRV 感染早期, 一定程度上促进了病毒的增殖(图 8)。

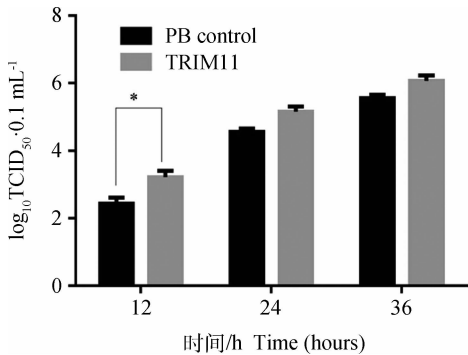


Control. 转染 PiggyBac vector 组; * . $P < 0.05$; 以 *GAPDH* 为内参

Control. The PK15 cells stably transfected with PiggyBac vector; * indicated the significant level at 5%; *GAPDH* was used as internal standard

图 7 荧光定量 PCR 检测 PK15 细胞中 *TRIM11* mRNA 转录水平

Fig. 7 The transcription level of *TRIM11* mRNA in PK15 cells determined by fluorescence quantitative



* . $P < 0.05$

图 8 稳定表达 *TRIM11* 的 PK15 细胞对 PRV 增殖的影响

Fig. 8 The PK15 cells stably expressing *TRIM11* influence on PRV multiplication

3 讨论

最大的含有 RING 结构域的蛋白家族是三结构域 (TRIM) 蛋白也称为 RING/B-box/Coil (RBCC) 蛋白家族。在功能上,许多 TRIM 蛋白家族成员如 TRIM8、TRIM25、TRIM32 等的 RING 结构具有 E3 泛素连接酶活性^[9]。近年来的研究表明 TRIM 蛋白在病毒感染中调节 I 型干扰素产生的有关信号通路,调控抗病毒免疫反应。例如,最近有研究报道 TRIM32 参与病毒诱导的 MITA 泛素化修饰,正调控 I 型干扰素表达信号通路,抑制 VSV 病毒复制^[10]。TRIM25 能够泛素化病毒 RNA 受体视黄酸诱导基因-I (RIG-I) 的 N 末端,这种改变能够激活 RIG-I 下游配体结合参与线粒体抗病毒信号通路(MAVS)直接引起 I 型干扰素 (IFN) 的产生

从而抑制病毒复制^[11]。TRIM8 通过介导 TAK1 K63 连接的聚泛素化,在 IL-1 β 和 TNF α 诱导的 NF- κ B 激活中充当了一个关键的调节因子,而 NF- κ B 在免疫调节中起着关键作用,TAK1 也参与了模式识别受体介导的信号通路^[12]。

TRIM11 是 TRIM/RBCC 蛋白家族中 E3 泛素连接酶中的一员,因其与人体肽相互作用而被知晓。虽然之前也有报道称 TRIM11 参与了 HIV-1 复制的抑制^[13],但最近在 Y. Lee 等^[4]的研究中发现在 HSV-1 感染中 TRIM11 可以和 TBK1 (RIG-I 介导的 IFN- β 产生信号通路的关键因子) 的 CC2 结构域结合抑制 IRF3 的激活最终导致 IFN- β 产生的减少,负调控抗病毒免疫反应,这种作用不依赖于其 RING 结构域。

伪狂犬病毒 (PRV) 是一种猪的 α 疱疹病毒,其与人类病原体单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1)、HSV-2 以及水痘带状疱疹病毒有关^[14]。推测在 PRV 感染中 TRIM11 也可能抑制抗病毒免疫反应。作者选择猪的 *TRIM11* 基因为研究对象,对其进行克隆,构建真核表达载体 PB-TRIM11,之后用 PB-TRIM11 和 PiggyBac 空载体转染 PK15 细胞,经嘌呤霉素筛选后,构建稳定细胞系,探究在 PK15 细胞中过表达 TRIM11 对 PK15 细胞感染 PRV 后的影响。结果表明经筛选后的转染 PB-TRIM11 的 PK15 细胞比对照组细胞 *TRIM11* 基因约过表达 1 倍。在 0.1 MOI 的 PRV 感染细胞 0、12、24、36 h 时,过表达 TRIM11 组上清中的病毒滴度始终高于对照组,且在 12 h 时这种差异更明显 ($P < 0.05$),提示过表达 TRIM11 在 PRV 感染早期,一定程度上促进了 PRV 的增殖。以往有研究^[15] RIG-I 介导了 PRV 感染早期诱导的 IFN- β 表达,推测 *TRIM11* 促进 PRV 增殖的作用可能与其负调控 RIG-I 诱导 I 型干扰素产生的信号通路有关,有待进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] OZATO K, SHIN D M, CHANG T H, et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11): 849-860.
- [2] 仇艳光, 王江雁, 王 沛. TRIM 蛋白家族结构与抗病毒功能[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(1): 107-110. QIU Y G, WANG J Y, WANG P. The structure of TRIM family and antiviral function[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2013, 29(1): 107-110. (in Chinese)

- [3] ISHIKAWA H, TACHIKAWA H, MIURA Y, et al. TRIM11 binds to and destabilizes a key component of the activator-mediated cofactor complex (ARC105) through the ubiquitin-proteasome system[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(20):4784-4792.
- [4] LEE Y, SONG B, PARK C, et al. TRIM11 negatively regulates IFN β production and antiviral activity by targeting TBK1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e63255.
- [5] YU X L, ZHOU Z, HU D M, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(1):102-104.
- [6] SCOTT A D. Overview of Pseudorabies [J/OL]. http://www.merckvetmanual.com/mvm/nervous_system/pseudorabies/overview_of_pseudorabies.html, 2014-10.
- [7] 田利源, 陈红星, 邓继先. 一个新的与泛素化有关的蛋白家族—TRIM 家族[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2):270-272.
- TIAN L Y, CHEN H X, DENG J X. TRIM protein: a family involved in ubiquitination[J]. *Letters In Biotechnology*, 2007, 18(2):270-272. (in Chinese)
- [8] RYU S. Investigation of the FAT10 conjugation pathway[D]. Konstanz: University of Konstanz, 2012.
- [9] PETROSKI M D, DESHAIES R J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1):9-20.
- [10] 张 静. TRIM32 调控病毒诱导的 I 型干扰素表达的分子机制[D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- ZHANG J. The mechanisms of virus-induced expression of type I interferon by TRIM32[D]. Wuhan: Wuhan University, 2013. (in Chinese)
- [11] 刘 童, 安利国, 杨桂文. TRIM 在病毒免疫防御机制中的作用[J]. 国际病毒学杂志, 2012, 19(2):57-60.
- LIU T, AN L G, YANG G W. The role of TRIM in the immune defense against virus[J]. *International Journal of Virology*, 2012, 19(2):57-60. (in Chinese)
- [12] LI Q, YAN J, MAO A P, et al. Tripartite motif 8 (TRIM8) modulates TNF α - and IL-1 β -triggered NF- κ B activation by targeting TAK1 for K63-linked polyubiquitination[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48):19341-19346.
- [13] YUAN T, YAO W T, HUANG F, et al. The human antiviral factor TRIM11 is under the regulation of HIV-1 Vpr[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e104269.
- [14] BRUKMAN A, ENQUIST L W. Suppression of the interferon-mediated innate immune response by pseudorabies virus[J]. *J Virol*, 2006, 80(13):6345-6356.
- [15] 谢立兰. 伪狂犬病毒和猪传染性胃肠炎病毒诱导 β 干扰素产生的分子机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- XIE L L. Studies on the molecular mechanisms that PRV induced and TGEV induced IFN- β production [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011. (in Chinese)

(编辑 白永平)