



日本鳗鲡 TRAF3 基因的克隆及功能研究

凌露露¹, 梁英^{1,2}, 黄文树^{1,3}, 聂品⁴, 黄贝^{1,3*}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室, 广东 湛江 524088;

3. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

4. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266237)

摘要: 为探究鱼类 TRAF3 在鱼类抗病毒免疫应答中的功能及作用机制, 实验利用逆转录 PCR 克隆获得了日本鳗鲡 TRAF3 转录本 (*AjTRAF3*), 利用生物信息学软件分析了 *AjTRAF3* 的结构特征, 利用实时荧光定量 PCR (qPCR)、双荧光素酶报告系统以及免疫共沉淀等方法对其表达规律、功能及作用机理进行了初步分析。*AjTRAF3* 的开放阅读框长度为 1 707 bp, 编码 568 个氨基酸。序列结构分析结果显示, *AjTRAF3* 由 N 端的环结构域 2 个锌指结构域以及 1 个螺旋结构域和 C 端高度保守的 TRAF-C (MATH) 结构域组成。qPCR 结果显示, *AjTRAF3* 在日本鳗鲡各组织中均有表达, 脑组织中表达量最高, 其次为头肾, 心脏中的表达量最低。Poly I:C 刺激 6 h 后, 日本鳗鲡脾脏组织中 *AjTRAF3* 上调倍数最高, 为对照组的 15.83 倍。迟缓爱德华氏菌感染 24 h 后, 日本鳗鲡脾脏组织中 *AjTRAF3* 上调倍数最高, 为对照组的 31.47 倍。此外, 本研究构建了 *AjTRAF3* 真核表达质粒, 发现过表达 *AjTRAF3* 能显著上调炎症及抗病毒相关基因的表达, 可显著增强 *AjIFN2*、*AjIFN4* 和 *NF-κB* 启动子荧光素酶活性。并能显著上调由 *AjRIG-IN*、*AjMAVS*、*AjIRF3* 诱导的 *AjIFN2*、*AjIFN4* 和 *NF-κB* 启动子活性。免疫荧光结果显示, *AjTRAF3* 主要定位于细胞质中, 且与 *AjMAVS* 存在共定位。免疫共沉淀结果显示, *AjTRAF3* 通过 MATH 结构域与 *AjMAVS* 相互结合, 缺失该结构域后, 其与 *AjMAVS* 的相互作用消失, 推测 *AjTRAF3* 可通过介导 *RIG-I/MAVS* 信号转导途径调控鱼类的抗病毒免疫应答。本研究结果为进一步揭示鱼类 TRAF3 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 日本鳗鲡; TRAF3; MAVS; 共定位; 启动子

中图分类号: Q 785; S 942

文献标志码: A

肿瘤坏死因子 (TNF) 是一种促炎细胞因子, 可介导细胞增殖、凋亡和分化等多种生物学过程^[1-4]。TNF 通过结合肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 和 TNFR2 进行信号传导^[3]。肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF) 作为接头蛋白, 可接收来自 TNFRs, 白细胞介素受体 1 (IL1R) 等细胞因子受体、模式

识别受体等传递的信号, 调控机体免疫应答^[5]。目前脊椎动物中已鉴定出 7 个 TRAFs 家族成员, 分别命名为 TRAF1~7^[6]。TRAFs 家族成员在结构上相似, 除 TRAF1 外, 其余 TRAF 家族成员 N 端均具有一个 RING 结构域, 随后为数个串联的锌指结构域以及一个保守的 C 端 TRAF 结构域

收稿日期: 2022-08-03 修回日期: 2022-11-22

资助项目: 国家自然科学基金 (32073011); 厦门市自然科学基金 (3502Z20206022); 福建省自然科学基金 (2020J01666); 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室开放基金 (PBEA2021ZD05)

第一作者: 凌露露 (照片), 从事鱼类免疫学研究, E-mail: 1965731125@qq.com

通信作者: 黄贝, 从事水产动物免疫学、水产动物疾病防控研究, E-mail: huangbei@jmu.edu.cn



(除 TRAF7 外), 该结构域由一个卷曲螺旋基序和一个 β -夹心基序组成^[7]。

TRAF3 最初被认为是一种可与 TRAF1 和 TRAF2 竞争性结合 CD40 蛋白^[8-9]。随后发现 TRAF3 参与多个信号传导途径, 包括干扰素途径 (IFN)、核转录因子 κ B 途径 (NF- κ B) 及丝裂原活化蛋白激酶途径 (MAPK) 等^[10]。在经典的 I 型 IFN 信号传导途径中, 模式识别受体如视黄酸诱导基因-I 样受体 (RLRs) 和 Toll 样受体 (TLRs) 识别入侵病原上保守的病原相关分子模式后, 通过下游接头蛋白 MyD88、TRIF 或 MAVS 等传递信号^[10-11]。TRAF3 可与 MAVS 或 TRIF 结合, 进而招募并激活 NEMO、TBK1/IKK ϵ 激酶复合体, 并通过激活 IRF3 与 IRF7, 调节 I 型干扰素和抗炎细胞因子的产生^[11-13]。此外, TRAF3 还参与了细胞凋亡、胚胎发育等多种生物学过程^[12, 14]。

目前, TRAF3 基因已在多种鱼类中被克隆鉴定, 包括大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[15]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[16]、红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*)^[17]、日本花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[18] 和青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[19] 等。鱼类 TRAF3 在结构上与哺乳类 TRAF3 相似, 均具有 N 端的 RING 结构域, 锌指结构域和 C 端的 TRAF 结构域 (包括螺旋结构域和 MATH 结构域)。基因表达结果显示, 大黄鱼 TRAF3 在鳃中具有较高的表达水平, 在心脏中表达水平较低^[15]。此外, 鱼类 TRAF3 还可被病毒或 Poly I:C 等诱导表达^[20]。过表达大黄鱼 TRAF3 可显著增强 TRIF 介导 IRF3 的激活^[15]。感染青鱼 TRAF3 真核表达质粒可显著增强 IFN 启动子活性^[19]。体外过表达鲈 TRAF3 可显著上调 IFN 启动子活性^[18]。过表达团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) TRAF3 以剂量依赖方式正向控制 NF- κ B 信号通路^[21]。而上述有关鱼类 TRAF3 介导的传递信号过程等尚不清楚, 有待于进一步研究。

鳊是我国重要的水产养殖品种, 对我国水产品出口创汇做出了巨大的贡献^[22]。随着鳊养殖业的迅速发展, 养殖密度持续增大, 致使鳊病害时有发生, 严重阻碍我国鳊产业健康发展^[23]。因此在鳊苗资源逐年下降的背景下, 开展鳊免疫抗病机理的研究, 拓展疾病防治的免疫学途径的重要性日益凸显。基于此, 本研究克隆了日本鳊 (*Anguilla japonica*) TRAF3 基因, 利用双荧光报告系统分析了 AjTRAF3 对 RLR 介导的 IFN 和 NF- κ B 启动子活化的作用。利用免疫荧光

分析了 AjTRAF3 在细胞中的分布。并利用免疫共沉淀技术研究了 AjTRAF3 与 MAVS 相互结合。本研究结果为进一步阐释鱼类 TRAF3 的生物学功能及其介导的免疫信号转导机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康日本鳊 (约 200 g) 购于福建省福清某养殖场。实验前暂养于循环水养殖水箱 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)。暂养 2 周后解剖日本鳊并收集各组织, 置于 TRIzol (Invitrogen 公司) 试剂后, 于液氮中速冻, 保存于 -80°C 冰箱用于后续实验。

对日本鳊进行腹腔注射 Poly I:C (1 mg/100 g, Sigma) 或迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) (2×10^7 CFU/100 g), 设置磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 注射组为对照, 每组 6 尾鱼。分别于注射后 6、12、24 和 48 h 取样, 收集肝脏、肠道、头肾、鳃、皮肤和脾脏组织, -80°C 保存用于后续实验。实验过程中操作人员严格遵守动物实验伦理规范, 并按照集美大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 细胞培养

人胚胎肾 293T 细胞 (HEK293T, ATCC[®] CRL-3216[™]) 培养于含 10% FBS (Gibico, 美国)、2% 青链霉素 (Hyclone, 美国) 的 DMEM 培养基 (Hyclone, 美国), 培养条件为 37°C , 5% CO_2 。鲤上皮瘤细胞 (EPC, ATCC[®] CRL-2872[™]) 培养于含 10% FBS (Gemini, 美国)、2% 青链霉素 (Hyclone, 美国) 的 MEM 培养基 (Hyclone, 美国), 培养条件为 28°C , 5% CO_2 。

1.3 RNA 的提取、cDNA 合成及目的基因检测

参照 TRIzol[®] Reagent 试剂盒说明书提取日本鳊各组织的总 RNA, 并利用琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 完整性, 分光光度计 NanoDrop2000 (Thermo, 美国) 检测 RNA 浓度和纯度。参照 Evo M-MLV 反转录试剂盒 II (AG, 中国) 说明书反转录制备 cDNA 模板, 并用 1 \times TE buffer 稀释后, 利用 qPCR 检测 AjTRAF3 在组织中的表达量, 以 β -actin 为内参基因。

1.4 引物设计和基因克隆

利用斑马鱼 (*Danio rerio*) TRAF3 基因序列作

为种子序列, 对日本鳗鲡基因组数据 (GCA_003597225.1) 进行 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 比对。根据比对结果设计 *AjTRAF3* 开放阅读框 (ORF) 的上下游引物 *AjTRAF3-F/R* 进行 PCR 扩增 (表 1), 以日本鳗鲡 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: Ex *Taq* 酶 0.25 μ L, 10 \times Ex *Taq* buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, 模板 1 μ L, 上下游引物各 2 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 扩增 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将纯化后的产物与 pMD19-T(TaKaRa, 日本) 载体连接, 导入至大肠杆菌 (*Escherichia*

coli)DH5a 感受态中, 经 PCR 检验的阳性克隆送至厦门珀瑞生物科技有限公司测序。

1.5 序列的生物信息学分析

利用 NCBI 的 BLAST 软件进行基因同源性搜索; 利用 NCBI 的 Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白质的结构域; 利用 ExPASy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白分子量、等电点、蛋白亲水性和疏水性; 利用 Clustal-X 软件进行氨基酸多重比对, 利用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (Neighbor

表 1 本研究所用引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primers name	引物序列(5'-3') primers sequence (5'-3')	用途 application
AjTRAF3-F	ATGTCATCAGGGCGGAATGG	ORF扩增
AjTRAF3-R	GGGGTCGGCAGATCAGAG	ORF amplification
AjTRAF3-Flag-F	CCCAAGCTTATGTCATCAGGGCGGAATGG	真核表达载体构建 expression vector construction
AjTRAF3-Flag-R	GGGGTACCGAGGGGTCGGGCAGATCGGA	
qAjTRAF3-F	GGGAAGTGTAAGGAGAGGATGA	qPCR
qAjTRAF3-R	GCAGGATGGAGGAGTAGGTG	
EPC-ISG15-qF	CAGCCTTGAGGATGATTCAG	
EPC-ISG15-qR	TGCCGTTGTAAATCAGTCG	
EPC-TNF α -qF	TGTGTGCTGCTGCTGCTGTTT	
EPC-TNF α -qR	TCGTAAGCCTGAGCCCAGTTCC	
EPC-Mx-qF	ATGAATCCTGGAAGCCCTC	
EPC-Mx-qR	GAACCTCGGAAGAATTTGC	
EPC-IFN-qF	ATGAAAACCTCAAATGTGGACGTA	
EPC-IFN-qR	GATAGTTTCCACCCATTTCCCTTAA	
EPC-Viperin-qF	GCAAAGCGAGGGTTACGAC	
EPC-Viperin-qR	CTGCCATTACTAACGATGCTGAC	
EPC-IRF1-qF	GTGTCCAGAATGCGCATGCG	
EPC-IRF1-qR	GCCCACTGCTTGAACAGACA	
EPC-IRF3-qF	GTTTAGAGGGACAATTAAGTGGACTA	
EPC-IRF3-qR	GTTTAGAGGGACAATTAAGTGGACTA	
EPC-IRF7-qF	CCATTCATTGCTGACATCTACAGT	
EPC-IRF7-qR	GTTTCGTCTCAAAGTTGCTCCTC	
EPC-STAT1-qF	TGAGAACAATAGCCGACAAAC	
EPC-STAT1-qR	CATTCCAGATGTTGAGCAGGT	
EPC- β -actin-qF	GGGCACCTGAACCTCTCATT	
EPC- β -actin-qR	CTGCTATGTGGCTCTTGACTTTG	
AjIFN2-pro-F	CTAGCTAGCTTGTAGCCTACCTGTACACGTT	荧光素酶质粒构建 luciferase plasmid construction
AjIFN2-pro-R	CCCAAGCTTCTCGCGTCCATGGCTTA	
AjIFN4-pro-F	CTAGCTAGCCTTACAACCTAACTTCCCTCAAT	
AjIFN4-pro-R	CCCAAGCTTAGGGAGGGTTAAGCACAGTC	

Joining, NJ) 构建系统进化树, 设置参数为 JTT 模型, bootstrap 值为 1 000。

1.6 真核表达质粒构建

设计带 *Hind* III 和 *Kpn* I (TaKaRa, 日本) 酶切位点的特异性引物, 以 pMD19-T 重组载体质粒为模板扩增目的片段。扩增产物经 1.2% 琼脂糖胶分离, 切胶回收纯化。利用限制性内切酶将目的片段进行酶切, 通过 T4 连接酶 (TaKaRa, 日本) 连接至 p3×Flag-CMV 载体。重组质粒导入至大肠杆菌 DH5 α 感受态后, 经 PCR 检验阳性克隆后送往厦门铂瑞生物科技公司测序验证。AjMAVS、AjRIG-Ia、AjIFN2-pro、AjIFN4-pro 等真核表达载体及启动子报告质粒均由本实验室构建。

1.7 双荧光素酶报告系统分析

HEK293T 细胞于 24 孔板培养至每孔 0.8×10^6 个细胞。利用 Lipofectamine[®] 3000 (Invitrogen, 美国) 将 AjTRAF3-Flag 质粒 (100 ng) 转染至细胞中, 同时转染启动子质粒 (100 ng)、pRL-TK 海肾内参基因质粒 (100 ng, Promega, 美国), 以转染 p3×Flag-CMV 空质粒 (100 ng) 的细胞为对照组。转染 24 h 后收集细胞, 利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒 Dual-Lucifera[®] Reporter Assay System (Promega, 美国) 检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶发光值。

1.8 日本鳗鲡 TRAF3 过表达对下游抗病毒相关基因的 mRNA 转录水平的影响

EPC 细胞接种在 6 孔培养板, 接种密度为 2×10^6 个细胞/孔。培养至汇合度为 80%。24 h 后每孔转染 2 μ g 空载质粒或 AjTRAF3 质粒。转染 24 h 后收集细胞, 利用 TRizol 法提取总 mRNA, 经反转录后利用 qPCR 检测抗病毒相关基因 *TNF α* 、*ISG15*、*Mx*、*IFN*、*Viperin*、*IRF3*、*IRF1*、*IRF7* 和 *STAT1*(表 1) 表达水平的变化, 以 β -actin 为内参, 每个样品重复 3 次。

1.9 免疫荧光分析

HEK293T 细胞接种于预置细胞爬片的 6 孔培养板中, 接种密度为 2×10^5 个细胞/孔。利用磷酸钙法转染 AjTRAF3-Flag 质粒和 AjMAVS-His 质粒。转染后 24 h, 利用 5 mmol/L DiO (Beyotime, 中国) 染细胞膜 10 min, 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min, 0.1% TritonX-100 通透细胞 10 min, 并利用 10% 羊血清封闭 1~2 h。于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育一抗

(anti-Flag, Proteintech, 美国, 1 : 100; anti-His, Proteintech, 美国, 1 : 100) 8 h。细胞爬片经 PBS 洗涤 3 次后室温孵育二抗 (CL594, Proteintech, 美国, 1 : 200; CL488, Proteintech, 美国, 1 : 200) 90 min。细胞爬片经 PBS 洗涤 3 次后, 利用 DAPI 染料进行核染, 含抗淬灭剂的封片试剂进行封片, 并利用激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 拍照观察。

1.10 免疫共沉淀分析

HEK293T 细胞接种于 100 mm 细胞培养皿 (Thermo Fisher, 美国) 中, 补齐 DMEM 培养基至 10 mL。待细胞贴壁后, 利用磷酸钙转染 AjTRAF3-Flag 和 AjMAVS-His 质粒各 6 μ g。转染 24 h 后收集细胞, 用 1 mL 含有 10 μ L PMSF (100 \times , Beyotime, 中国) 细胞裂解液在冰上裂解 30 min。裂解产物于 4 $^{\circ}$ C, 12 000 \times g, 离心 10 min。取上清液并加入 40 μ L Anti-Flag 琼脂糖珠 (Sigma, 德国), 于水平摇床上 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。收集样品后利用 1 \times TBS 洗涤 3 遍, 用于后续免疫印迹分析。

样品经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜 (Sigma, 德国)。利用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 1% 脱脂奶粉稀释一抗 (Anti-Flag, Proteintech, 美国, 1 : 5 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。膜经 1 \times TBS 洗涤 3 遍后, 利用 1% 脱脂奶粉稀释二抗 (HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Proteintech, 美国, 1 : 5 000), 1 \times TBS 洗涤 3 遍, 利用 ECL 显色系统进行显色并拍照。

2 结果

2.1 日本鳗鲡 TRAF3 基因序列分析

日本鳗鲡 TRAF3 ORF 长度为 1 707 bp, 编码 568 个氨基酸。其蛋白分子量为 65.07 ku, 理论等电点为 7.741, 平均亲水性指数为 -0.541。蛋白质结构域分析结果显示, AjTRAF3 由 N 端的 RING 结构域、2 个锌指结构域、1 个螺旋结构域以及 C 端高度保守的 MATH 结构域组成 (图 1)。

将 AjTRAF3 与青鱼、虹鳟、鲤、草鱼、斑马鱼、青鳞、红鳍东方鲀、中华鳖、绿海龟、红原鸡、小鼠和人 TRAF3 的氨基酸序列进行相似性分析, 结果显示, AjTRAF3 与青鱼 TRAF3 同一性最高, 为 78.7%, 其次为虹鳟 (75.4%)、鲤 (74.9%)、草鱼 (73.9%)、斑马鱼 (73.8%)、青鳞 (68.2%)、红鳍东方鲀 (67.2%)、中华鳖 (56.9%)、绿海龟 (55.6%)、红原鸡 (53.8%)、人 (53.9%) 和小鼠 (53.4%) (表 2)。且各物种 TRAF3 的 N 端 MATH

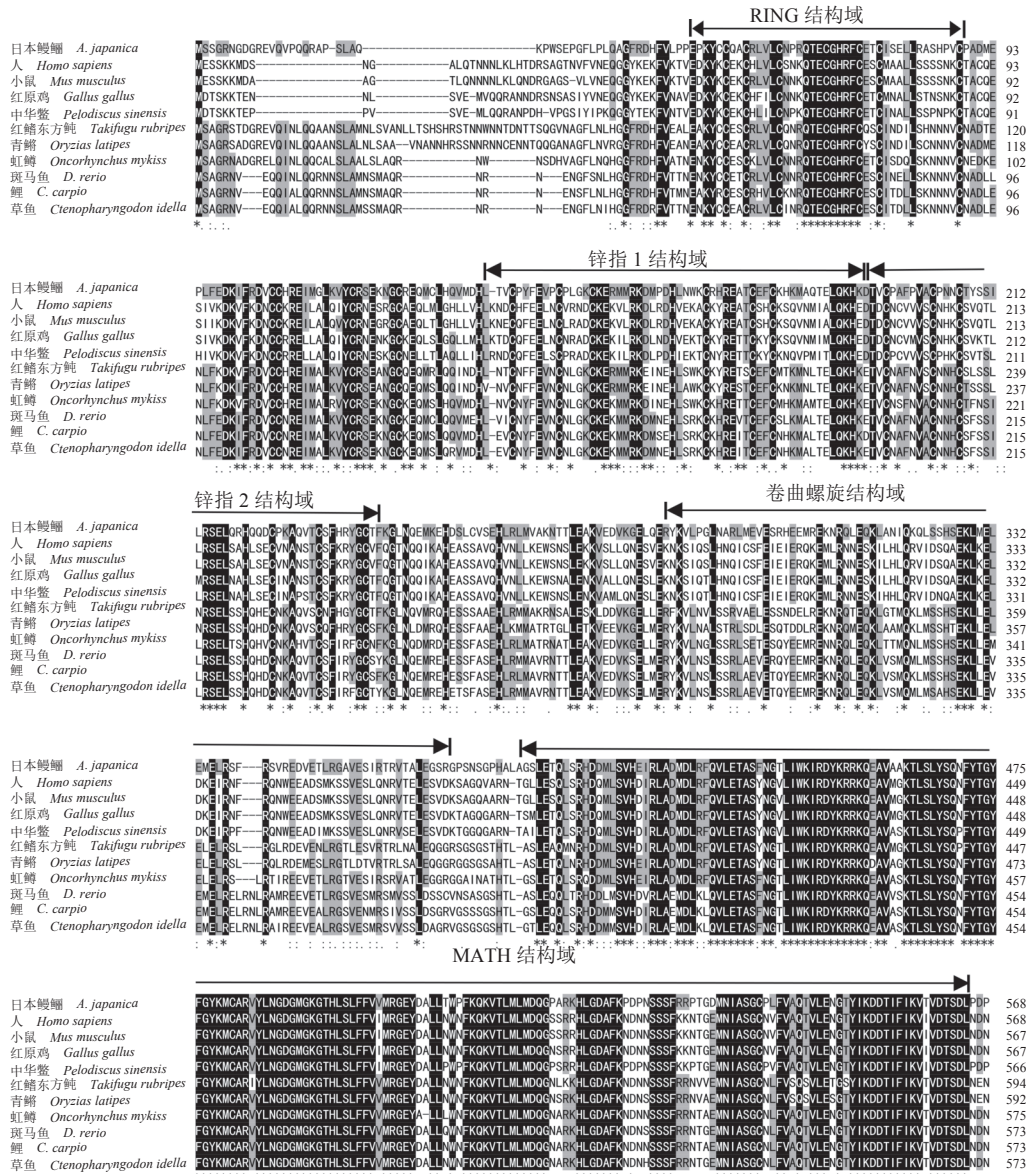


图1 AjTRAF3 与其他脊椎动物 TRAF3 氨基酸序列比对

黑色阴影处的序列表示所有序列均具有相同氨基酸, 灰色阴影处的序列表示保守和半保守氨基酸, * 表示与 AjTRAF3 相同的氨基酸; 序列上方黑色箭头示 RING 结构域、锌指结构域、螺旋结构域和 MATH 结构域。

Fig. 1 Comparison of AjTRAF3 with its orthologues in other vertebrates

Amino acids shaded in black are identical to the consensus sequence, whereas those in gray represent conserved and semi-conserved identities, * indicates the amino acids identical to AjTRAF3; arrows above the sequences indicate the conserved RING domain, zinc finger domain, helix domain, and MATH domain, respectively.

结构域具有高度保守性(图1)。系统进化分析结果显示, 日本鳗鲡 TRAF3 与美丽硬仆骨舌鱼(Scleropages formosus) TRAF3 聚为一枝; 所有鱼类 TRAF3 聚为一枝, 两栖动物、爬行动物、鸟类和哺乳动物 TRAF3 聚为一枝(图2)。

2.2 AjTRAF3 组织表达分析

利用 qPCR 分析 AjTRAF3 在日本鳗鲡不同组织器官的表达情况。结果显示, AjTRAF3 在所有

检测的组织器官中均有表达, 脑中表达水平最高, 其次是头肾、肠道、脾、性腺、肝脏、鳃、肌肉、鳔和皮肤, 在心脏中表达水平最低(图3)。

Poly I:C 刺激能显著增强日本鳗鲡肝脏、肠道、脾脏、头肾、皮肤和鳃中的 AjTRAF3 表达水平。Poly I:C 刺激 6 和 12 h 后, 鳃组织中 AjTRAF3 的表达量分别为对照组的 2.12 倍和 1.64 倍(图 4-a); 肝脏组织中 AjTRAF3 的表达量分别为对照组的 5.95

表 2 *AjTRAF3* 与其他脊椎动物 *TRAF3* 氨基酸序列相似性比较

Tab. 2 Sequence identity and similarity between *AjTRAF3* and its orthologues in other vertebrates

物种 species	登录号 accession no.	长度/bp length	同一性/% identity	相似性/% similarity	
青鱼	<i>M. piceus</i>	AUP40798.1	573	78.7	87.9
虹鳟	<i>O. mykiss</i>	NP_001118087.1	575	75.4	83.7
鲤	<i>C. carpio</i>	ADZ55454.1	573	74.9	83.9
草鱼	<i>C. idella</i>	AVR54984.1	573	73.9	84.1
斑马鱼	<i>D. rerio</i>	NP_001003513.1	573	73.8	84.2
青鳉	<i>O. latipes</i>	XP_004084442.1	592	68.2	80.8
红鳍东方鲀	<i>T. rubripes</i>	XP_011618072.1	594	67.2	79.4
中华鳖	<i>P. sinensis</i>	XP_006120037.1	566	56.9	72.8
绿海龟	<i>C. mydas</i>	XP_037756915.1	581	55.6	71.3
人	<i>H. sapiens</i>	AAH75087.1	568	53.9	69.5
红原鸡	<i>G. gallus</i>	XP_025006703.1	567	53.8	70.7
小鼠	<i>M. musculus</i>	NP_035762.2	567	53.4	69.3

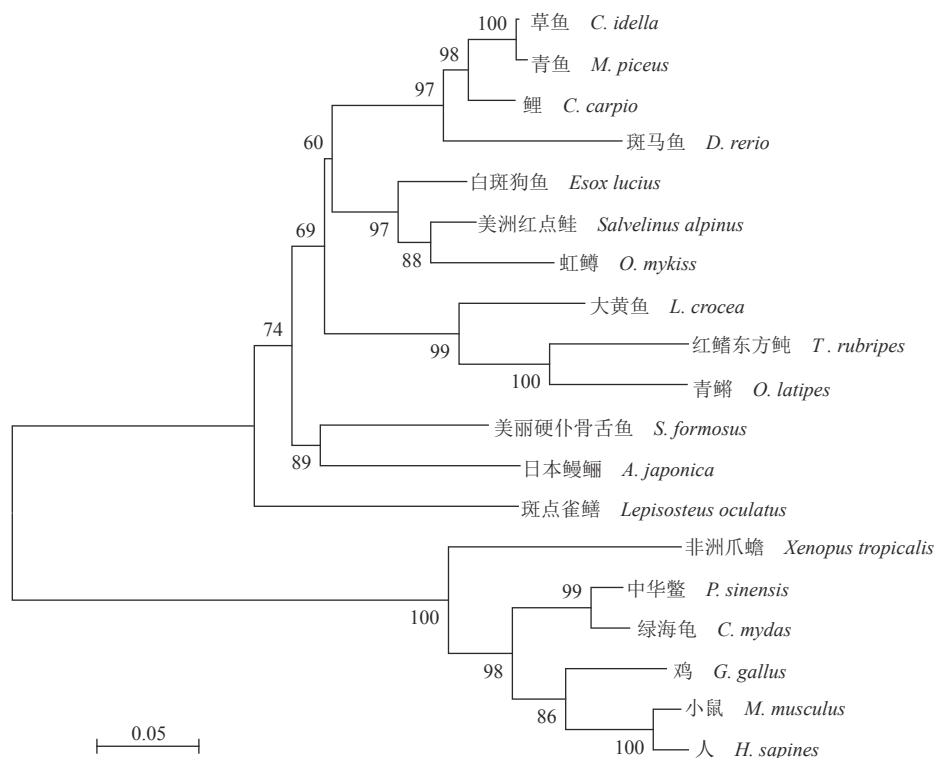


图 2 脊椎动物 *TRAF3* 系统进化树

利用 MEGA 7.0 软件的 NJ 法构建系统进化树, 节点上的数字表示为 bootstrap 的置信度。

Fig. 2 Phylogenetic tree of vertebrate *TRAF3*

The neighbor-joining phylogenetic tree was constructed by MEGA7.0 software. Bootstrap values are indicated at nodes.

倍和 5.76 倍 (图 4-d); 刺激 24 h 后, 头肾、肠和脾脏中 *AjTRAF3* 的表达量最高, 分别为对照组的 4.29 倍、12.12 倍和 15.83 倍和 (图 4-b, c, f); 鳃和

皮肤中 *AjTRAF3* 的表达量随 Poly I:C 刺激时间的增加而增加 (图 4-a, e)。迟缓爱德华氏菌分别感染 6 和 12 h 后, 头肾中 *AjTRAF3* 的表达量分别为对

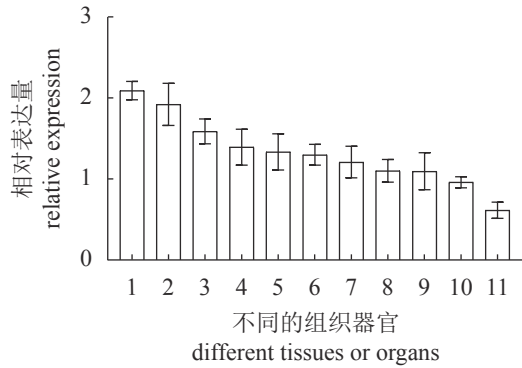


图3 *AjTRAF3* 基因日本鳗鲡不同组织器官中的相对表达量

1. 脑, 2. 头肾, 3. 肠道, 4. 脾脏, 5. 性腺, 6. 肝脏, 7. 鳃, 8. 肌肉, 9. 鳔, 10. 皮肤, 11. 心脏; $n=6$ 。

Fig. 3 Expression of *AjTRAF3* in different tissues or organs of *A. japonica*

1. brain, 2. head kidney, 3. intestine, 4. spleen, 5. gonad, 6. liver, 7. gill, 8. muscle, 9. swim bladder, 10. skin, 11. heart; $n=6$.

照组的 3.41 倍和 2.34 倍(图 4-b); 感染 6 h 后, 肝脏中 *AjTRAF3* 的表达量最高, 为对照组的 21.54 倍(图 4-d), 感染 24 h 后, 脾脏中 *AjTRAF3* 的表达量

最高, 为对照组的 31.47 倍(图 4-f), 鳃、肠、皮肤中 *AjTRAF3* 的表达量随迟缓爱德华氏菌感染时间增加而增加(图 4-a, c, e)。

2.3 过表达 *AjTRAF3* 对抗病毒相关基因 mRNA 转录水平的影响

将 *AjTRAF3*-Flag 质粒或空载质粒转染至 EPC 细胞。转染 24 h 后收集细胞提取总 RNA 并进行经反转录。利用 qPCR 检测炎症及抗病毒相关基因 *TNF α* 、*ISG15*、*Mx*、*IFN*、*Viperin*、*IRF1*、*IRF3*、*IRF7* 和 *STAT1* 表达水平的变化。结果显示, 过表达 *AjTRAF3* 可显著增强抗病毒相关基因的表达水平, 其中 *IRF1* 的表达量上调 2.63 倍, *IRF3* 上调 3.11 倍, *TNF α* 上调 5.83 倍, *ISG15* 上调 9.34 倍, *IRF7* 上调 11.74 倍, *Mx* 上调 21.83 倍, *IFN* 上调 27.46 倍, *STAT1* 上调 236.21 倍。 *Viperin* 上调 390.93 倍(图 5)。

2.4 *AjTRAF3* 对 RLR 信号通路中关键因子的调控作用

利用双荧光素酶报告系统检测 *AjTRAF3* 对日

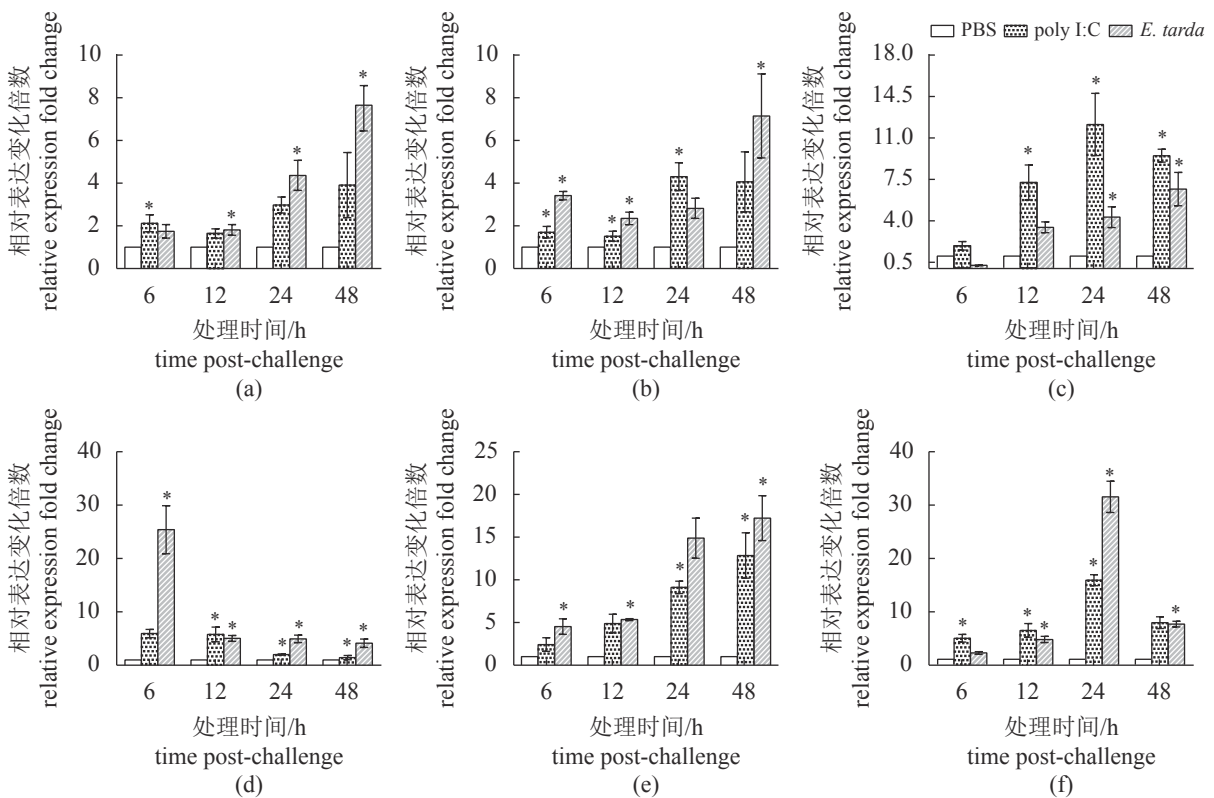


图4 日本鳗鲡不同组织中 *AjTRAF3* 的表达变化

(a) 鳃, (b) 头肾, (c) 肠, (d) 肝脏, (e) 皮肤, (f) 脾脏; *. 注射组和对照组存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Expression analysis of *AjTRAF3* in tissues or organs following *in vivo*

(a) gills, (b) head kidney, (c) intestine, (d) liver, (e) skin, (f) spleen; *. significant difference between injection group and control group ($P < 0.05$).

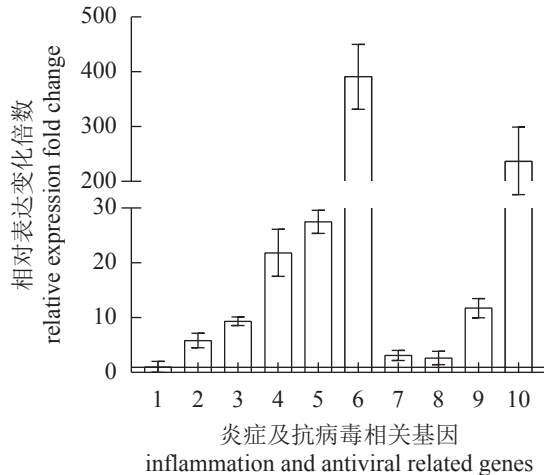


图5 *AjTRAF3* 调控炎症相关及抗病毒相关基因的表达

Fig. 5 Induction of inflammation-associated and anti-viral-related genes by *AjTRAF3*

1. control, 2. *TNFa*, 3. *ISG15*, 4. *Mx*, 5. *IFN*, 6. *Viperin*, 7. *IRF3*, 8. *IRF1*, 9. *IRF7*, 10. *STAT1*.

本鳊 I 型 *IFN* 和 *NF-κB* 启动子的调控作用。结果显示, 转染 *AjTRAF3* 可以显著上调 *AjIFN2*、*AjIFN4* 和 *NF-κB* 启动子活性(图6)。此外, *AjTRAF3* 与 *AjRIG-IN*、*AjMAVS*、*AjIRF3* 共同转染时, 均能增强由 *AjRIG-IN*、*AjMAVS*、*AjIRF3* 介导的 *AjIFN2*、*AjIFN4* 和 *NF-κB* 启动子活化(图6)。

2.5 *AjTRAF3* 的亚细胞定位以及与 *AjMAVS* 的共定位

利用免疫荧光分析了 *AjTRAF3* 在细胞中的分布, 结果显示 *AjTRAF3* 主要呈点状分布在细胞质(图版-1~5)。此外, 共定位分析结果显示, *AjTRAF3*-Flag 与 *AjMAVS*-His 存在共定位现象, 且与线粒体染色区域重叠(图版-6~20)。

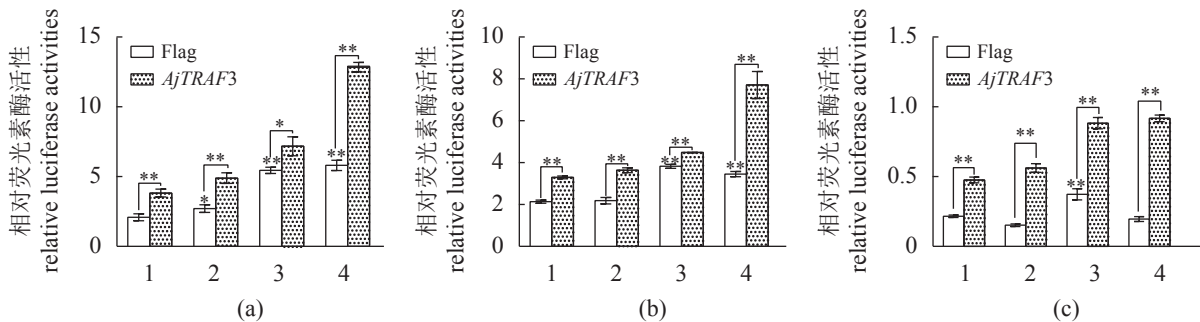


图6 过表达 *AjTRAF3* 显著增强 RLR 信号通路中关键因子对 *AjIFN2*、*AjIFN4* 和 *NF-κB* 启动子的激活作用

Fig. 6 Overexpression of *AjTRAF3* enhancing the RLR-mediated promoter activation of *AjIFN2*、*AjIFN4* and *NF-κB* (a)*AjIFN2*-pro, (b)*AjIFN4*-pro, (c)*NF-κB*-pro; 1. Flag, 2. *AjRIG-IN*, 3. *AjMAVS*, 4. *AjIRF3*; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

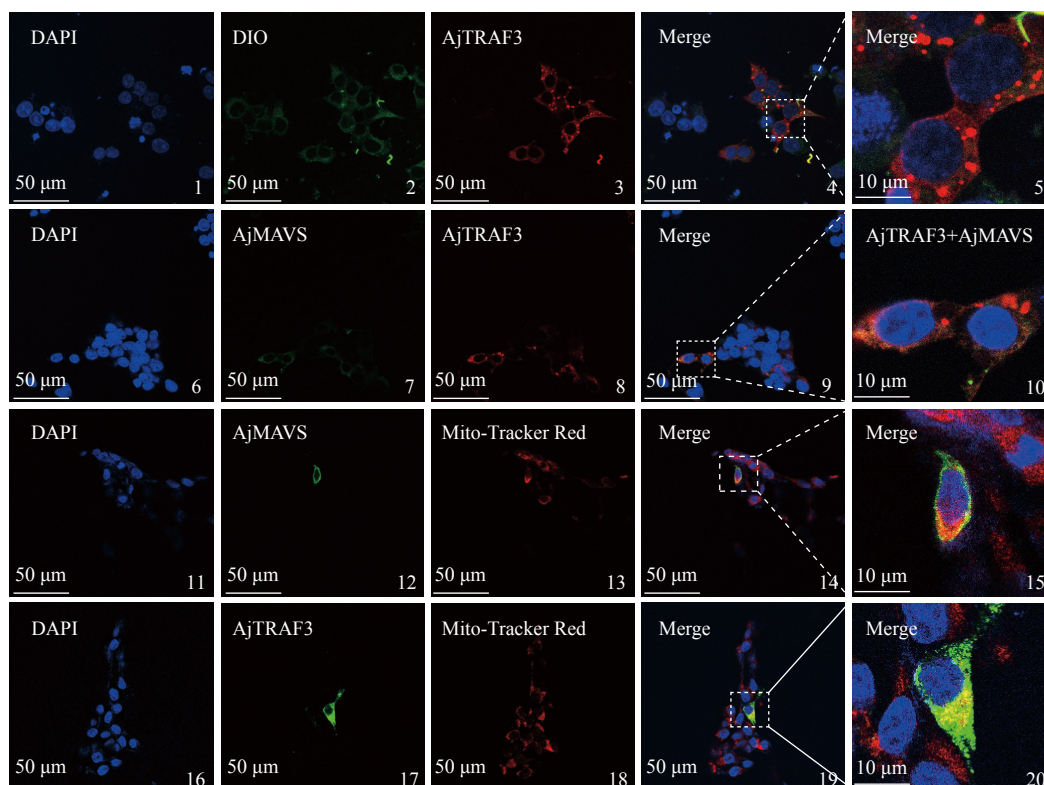
2.6 免疫共沉淀分析

由于 *AjTRAF3* 与 *AjMAVS* 存在空间上的共定位, 推测两者可能存在互作关系。本研究利用免疫共沉淀技术检测了两者之间的相互作用。结果显示, *AjTRAF3*-Flag 与 *AjMAVS*-His 共转染细胞后, 两个蛋白均成功表达, 且携带 His 标签的 *AjMAVS* 蛋白可在 Flag 抗体的免疫沉淀物中检测出来。而对照组中 Flag 空载体与 *AjMAVS*-His 质粒共转染时, *AjMAVS*-His 蛋白未被沉淀下来。表明 *AjTRAF3*-Flag 与 *AjMAVS*-His 存在相互作用(图7-a)。

为了进一步确定 *AjTRAF3* 与 *AjMAVS* 互作的关键区域, 实验构建了 *AjTRAF3*-ΔMATH-Flag 和 MATH-Flag 真核表达载体, 并进行免疫共沉淀分析。结果显示, MATH 结构域蛋白与 *AjMAVS* 存在相互作用(图7-b), 缺失该结构域后, *AjTRAF3* 与 *AjMAVS* 之间的相互作用消失(图7-c), 表明 *AjTRAF3* 的 MATH 结构域对于 *AjTRAF3* 与 *AjMAVS* 的结合至关重要。

3 讨论

本研究克隆并鉴定了日本鳊 *TRAF3*, 利用荧光定量分析了 *AjTRAF3* 在日本鳊各组织中的表达及在病原感染后的表达变化。与大黄鱼 *TRAF3* 的组织分布类似, *AjTRAF3* 广泛分布于日本鳊各组织中, 且在肾脏、肝脏、肠道和脾脏等免疫相关器官中表达量较高^[15]。此外, Poly I:C 刺激和迟缓爱德华氏菌感染后, *AjTRAF3* 在各组织中表达水平显著上调。在青鱼的研究中, Poly I:C、脂多糖(LPS)刺激, 以及鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)和草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)感染后, *TRAF3*



图版 *AjTRAF3* 和 *AjMAVS* 的亚细胞定位

1. DAPI(蓝色) 示细胞核, 2. DiO(绿色) 示细胞膜染色, 3. 红色示 *AjTRAF3* 的定位, 4. Merge 示 DAPI, DiO 和目的基因合并图片, 5. Merge 列中方框区域的高倍视图; 6. DAPI(蓝色) 示细胞核, 7. 绿色示 *AjMAVS* 的定位, 8. 红色示 *AjTRAF3* 的定位, 9. Merge 示 DAPI、MAVS 和 TRAF3 合并图片, 10. Merge 列中方框区域的高倍视图; 11. DAPI(蓝色) 示细胞核, 12. 绿色示 *AjMAVS* 的定位, 13. Mito-Tracker Red 示线粒体, 14. Merge 示 DAPI, MAVS 和线粒体合并图片, 15. Merge 列中方框区域的高倍视图; 16. DAPI(蓝色) 示细胞核, 17. 绿色示 *AjTRAF3* 的定位, 18. Mito-Tracker Red 示线粒体, 19. Merge 示合并图片; 20. Merge 列中方框区域的高倍视图。

Plate Subcellular localization of *AjTRAF3* and *AjMAVS*

1. Cell nuclei are stained with DAPI (blue), 2. cell membrane are stained with DiO (green), 3. red signals reflect expression of *AjTRAF3*, 4. Merge indicates the overlapping between the image corresponding to cell membrane and *AjTRAF3*, 5. the boxed area in the panels labeled “Merged” is shown in higher magnification; 6. cell nuclei are stained with DAPI (blue), 7. green signals reflect expression of *AjMAVS*, 8. red signals reflect expression of *AjTRAF3*, 9. Merge indicates the overlapping between the image corresponding to cells expressing *AjMAVS* and *AjTRAF3*, 10. the boxed area in the panels labeled “Merged” is shown in higher magnification; 11. cell nuclei are stained with DAPI (blue), 12. green signals reflect the expression of *AjMAVS*, 13. mitochondria are stained with Mito-Tracker Red, 14. Merged image shows the co-localization of *AjMAVS* and Mitochondria, 15. the boxed area in the panels labeled “Merged” is shown in higher magnification; 16. cell nuclei were stained with DAPI (blue), 17. green signal reflects the expression of *AjTRAF3*, 18. mitochondria are stained with Mito-Tracker Red, 19. Merged image shows the co-localization of *AjTRAF3* and Mitochondria, 20. the boxed area in the panels labeled “Merged” is shown in higher magnification.

基因表达水平均显著增强^[19]。此外, 大黄鱼中的研究结果显示, Poly I:C、LPS、肽聚糖 (PGN) 刺激和香鱼假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 感染可显著诱导大黄鱼脾脏、头肾、鳃等组织中 *TRAF3* 的表达, 推测鱼类 *TRAF3* 参与机体的抗病毒及抗菌免疫反应^[15]。双荧光素酶报告系统分析结果显示, 过表达 *AjTRAF3* 可显著增强由 *RIG-I*、*MAVS* 及 *IRF3* 诱导 I 型 *IFN* 及 *NF-κB* 启动子活性, 并可增强 I 型 *IFN* 通路转录因子 (*IRF1*、*IRF3*、*IRF7*、*STAT1*) 及抗病毒效应基因 (*Viperin*、*ISG15*) 和炎症相关因子 *TNFα* 等基因的表达, 进

一步证实了 *AjTRAF3* 参与了鱼类抗病毒及抗菌免疫应答。在其他鱼类中的相关研究中也得到相似结果, 如过表达大黄鱼 *TRAF3* 可显著增强 TRIF 介导 *IRF3* 的激活^[15], 过表达团头鲂 *TRAF3* 以剂量依赖的方式正向调控 *NF-κB* 信号通路, 表明 *TRAF3* 在鱼类免疫应答中发挥重要作用^[21]。

免疫荧光结果显示, *AjTRAF3* 主要呈点状分布在细胞质, 并且与线粒体上存在共定位。蛋白质的线粒体定位依赖于翻译后分选途径。经该途径分选的蛋白质在细胞质基质的游离核糖体中被合成, 然后通过特定的信号序列转运至线粒体^[24]。

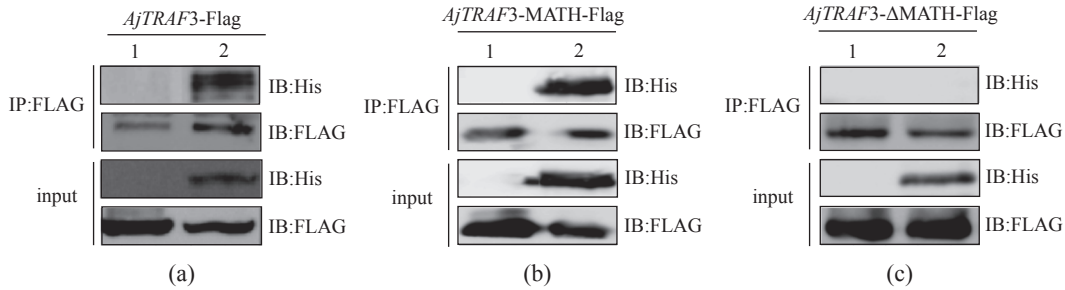


图 7 AjTRAF3 和 AjMAVS 的相互作用

免疫共沉淀检测 AjMAVS 与 AjTRAF3(a), AjTRAF3 的 MATH 结构域 (b) 及缺失 MATH 结构域的 AjTRAF3(c) 直接的相互作用; 将携带 Flag 标签的 AjTRAF3, AjTRAF3 的 MATH 结构域或缺失 MATH 结构域的 AjTRAF3 突变体真核表达质粒与 AjMAVS 真核表达质粒共转染至 HEK293T 细胞, 利用抗 Flag 抗体交联琼脂糖对细胞裂解产物进行免疫沉淀, 并利用抗 Flag 和抗 His 进行免疫印迹; 1. 空载体, 2. AjMAVS。

Fig. 7 Interaction between AjTRAF3 and AjMAVS

Co-immunoprecipitation analysis of the interaction between AjMAVS and wild type AjTRAF3 (a), or truncated forms of AjTRAF3, including AjTRAF3-MATH (b) and AjTRAF3- Δ MATH (c); HEK293T cells were co-transfected His-tagged AjMAVS with Flag-tagged AjTRAF3, or AjTRAF3-MATH or AjTRAF3- Δ MATH, respectively. Cell lysates from transfected cells were incubated with anti-Flag M2 for co-immunoprecipitation and blotted with anti-Flag or anti-His; 1. Empty vector, 2. AjMAVS.

然而, AjTRAF3 的序列中不存在潜在的线粒体定位信号, 推测其可能通过与其他分子结合进入线粒体。最近的一项研究表明, 病毒感染导致 TRAF3IP3 在线粒体中迅速积累, 并与 TRAF3 特异性结合, 以促进 TRAF3 向 MAVS 募集^[25]。本研究利用免疫共沉淀实验进一步证实了 AjTRAF3 与 MAVS 存在相互作用。AjTRAF3 通过 MATH 结构域结合 MAVS, 并且单独的 MATH 结构域足以结合 MAVS。哺乳动物中的研究表明, 在 RLR 介导的 I 型 IFN 基因的表达过程中, RLR 识别双链 RNA 后活化 MAVS, 进而招募 TRAF3 与 MAVS 结合, 并诱导 TRAF3 的 K63 多聚泛素化。活化的 TRAF3 通过 Coiled-coil 结构域与 TBK1/IKK ϵ 的 α -螺旋二聚化结构域 (scaffold dimerization domain, SDD) 结合, 促使 TBK1/IKK ϵ 复合物磷酸化, 其 RING 结构域的 E3 泛素酶活性促使 NEMO 泛素化并激活 IKK α/β ^[26]。活化后的 TBK1/IKK ϵ 进而磷酸化 IRF3 或 IRF7, 启动 I 型 IFN 基因的表达^[9, 27]。AjTRAF3 的结构域构成与已报道的高等脊椎动物 TRAF3 相似, 均包含氨基酸端的环指和锌指结构域, 以及羧基端的螺旋结构域和 MATH 结构域构成, 表明其介导的信号转导过程可能类似于哺乳动物, 即可通过与 MAVS 的相互结合, 调控 RLR 介导的 I 型 IFN 抗病毒免疫应答。然而鱼类 TRAF3 与 MAVS 的具体结合位点, 以及结合后的活化机制等尚不清楚, 还有待进一步的研究。

总之, 本研究克隆获得了日本鳗鲡 TRAF3 并对其介导的免疫应答机制进行了初步的分析。发

现 AjTRAF3 在日本鳗鲡各组织器官中均有表达, 且 Poly I:C 和迟缓爱德华氏菌刺激可显著增强 AjTRAF3 的表达水平。利用免疫荧光和免疫共沉淀等方法证实了 AjTRAF3 通过其 MATH 结构域结合位于线粒体上的 MAVS, 从而调控由 RLR 介导的 I 型 IFN 抗病毒免疫应答。本研究结果有助于进一步揭示 TRAF3 在鱼类先天免疫应答中的功能和作用机制。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Kopp E B, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1999, 11(1): 13-18.

[2] Wang Y Y, Zhang P, Liu Y F, et al. TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(2): 159-168.

[3] Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, et al. Role of the interaction of tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in bone-related cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1481.

[4] Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives[J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(9): 372-377.

[5] Ha H, Han D, Choi Y W. TRAF-mediated TNFR-family signaling[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2009, 87(1): 1-19.

[6] Xu L G, Li L Y, Shu H B. TRAF7 potentiates MEKK3-

- induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(17): 17278-17282.
- [7] Bradley J R, Pober J S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)[J]. *Oncogene*, 2001, 20(44): 6482-6491.
- [8] Cheng G H, Cleary A M, Ye Z S, *et al.* Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling[J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1494-1498.
- [9] Saha S K, Cheng G H. TRAF3: a new regulator of type I interferons[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(8): 804-807.
- [10] Hu H M, O'Rourke K, Boguski M S, *et al.* A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(48): 30069-30072.
- [11] Yoo J S, Kato H, Fujita T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 20: 131-138.
- [12] Häcker H, Tseng P H, Karin M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(7): 457-468.
- [13] Oganessian G, Saha S K, Guo B C, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response[J]. *Nature*, 2006, 439(7073): 208-211.
- [14] Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W Z, *et al.* Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(12): 1364-1370.
- [15] Zou P F, Shen J J, Li Y, *et al.* TRAF3 enhances TRIF-mediated signaling via NF- κ B and IRF3 activation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 114-124.
- [16] Feng H, Liu H, Kong R Q, *et al.* Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1159-1169.
- [17] Cai J, Xia H L, Huang Y C, *et al.* Identification and characterization of tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 3 from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 243-251.
- [18] Zhang W W, Jia P, Liu W, *et al.* Functional characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) in innate immune[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 1-7.
- [19] Wang X, Song X J, Xie X C, *et al.* TRAF3 enhances STING-mediated antiviral signaling during the innate immune activation of black carp[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 88: 83-93.
- [20] Li H Y, Fu Q H, Wang S, *et al.* TNF-receptor-associated factor 3 in *Litopenaeus vannamei* restricts white spot syndrome virus infection through the IRF-Vago antiviral pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 2110.
- [21] Lv Y N, Xu Q, Mao Y, *et al.* TRAF3 of blunt snout bream participates in host innate immune response to pathogenic bacteria via NF- κ B signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 592-604.
- [22] 张婷婷, 赵峰, 张涛, 等. 中国鳗鱼产业发展及其资源保护建议[J]. *渔业信息与战略*, 2019, 34(4): 235-243.
- Zhang T T, Zhao F, Zhang T, *et al.* Development of eel aquaculture industry and its resource conservation in China[J]. *Fishery Information & Strategy*, 2019, 34(4): 235-243 (in Chinese).
- [23] 钟全福, 叶小军, 陈斌, 等. 鳗鲡工业化循环水养殖的病害特点及防控策略[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(S2): 357-361.
- Zhong Q F, Ye X J, Chen B, *et al.* Disease characteristics and control strategies of eel's industrial recirculating aquaculture system[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2021, 60(S2): 357-361 (in Chinese).
- [24] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学 [M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 138-141.
- Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. *Cell biology*[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2011: 138-141 (in Chinese).
- [25] Zhu W T, Li J X, Zhang R, *et al.* TRAF3IP3 mediates the recruitment of TRAF3 to MAVS for antiviral innate immunity[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(18): e102075.
- [26] Belgnaoui S M, Paz S, Samuel S, *et al.* Linear ubiquitination of NEMO negatively regulates the interferon antiviral response through disruption of the MAVS-TRAF3 complex[J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(2): 211-222.
- [27] Paz S, Vilasco M, Werden S J, *et al.* A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response[J]. *Cell Research*, 2011, 21(6): 895-910.

Identification and functional characterization of TRAF3 in Japanese eel (*Anguilla japonica*)

LING Lulu¹, LIANG Ying^{1,2}, HUANG Wenshu^{1,3}, NIE Pin⁴, HUANG Bei^{1,3*}

(1. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Zhanjiang 524088, China;

3. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

4. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266237, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the function and regulatory mechanism of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) in fish antiviral immune response. In the present study, the transcript encoding TRAF3 (*AjTRAF3*) was obtained from Japanese eel, *Anguilla japonica*, by using reverse transcription PCR. The structural characteristics of *AjTRAF3* were analyzed using bioinformatics softwares and its expression profile and functional mechanism were investigated by qPCR, luciferase reporter and co-immunoprecipitation assay. The open reading frame of *AjTRAF3* was 1 707 bp long, encoding a polypeptide consisting of an N-terminal ring domain, two Zn Finger domains, a helical domain, and a C-terminal TRAF-C (MATH) domain. qPCR analysis revealed a wide tissue distribution of *AjTRAF3*, with the highest expression in brain, followed by head kidney, and the lowest in heart. The highest induction of *AjTRAF3* in response to Poly I:C stimulation was observed at 24 hour post injection (hpi) in spleen, being 15.83 fold higher than control. The highest up-regulation of *AjTRAF3* after *E. tarda* infection was observed in spleen at 24 hpi, being 31.47 fold higher than control. Furthermore, the eukaryotic expression plasmid was constructed to study the function of *AjTRAF3* *in vitro*. Our results revealed increased expression of antiviral related genes and increased luciferase transactivation of the *AjIFN2*, *AjIFN4* and *NF-κB* promoter in cells overexpressed with *AjTRAF3*. Further, *AjRIG-IN*, *AjMAVS*- or *AjIRF3*-induced *AjIFN2*, *AjIFN4* and *NF-κB* promoter activation was significantly enhanced in cells co-transfected with *AjTRAF3*. In addition, sub-cellular localization analysis revealed the cytoplasmic distribution of *AjTRAF3* and the co-localization of *AjTRAF3* with MAVS on mitochondria. Lastly, co-immunoprecipitation assays showed that *AjTRAF3* interacts with *AjMAVS* via the MATH domain, whereas a mutant lacking this domain lost the ability to interact with *AjMAVS*. Collectively, these data suggested that *AjTRAF3* can induce antiviral responses by regulating *RIG-I/MAVS*-mediated signaling. These findings contribute to understanding of function of *AjTRAF3* in antiviral response.

Key words: *Anguilla japonica*; TRAF3; MAVS; co-localization; promoter

Corresponding author: HUANG Bei. E-mail: huangbei@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32073011); Natural Science Foundation of Xiamen, China (3502Z20206022); Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J01666); the Open Research Fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture (PBEA2021ZD05)