文章编号:1000-5404(2013)14-1447-04

论著

人类组织中 TRAF3IP3 基因表达的检测及转染胚肾 HEK293 细胞后的亚细胞定位

王 洋[1],王 沂[1],余 源[1],刘 青[1],毛 焕[2],熊艳杰[2],张秀军[1] (063000 河北 唐山,河北联合大学:生命科学学院[1],附属医院病理科[2])

[摘要] **目的** 克隆 TRAF3IP3 基因,明确 TRAF3IP3 在部分人类组织中的表达谱并鉴定其表达产物的亚细胞定位。**方法** 采用实时定量 PCR 检测 TRAF3IP3 基因在人体各组织中的表达情况;克隆 TRAF3IP3 基因开放读码框区(ORF)并构建真核亚细胞定位质粒。转染人胚肾 HEK 293 细胞,激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的亚细胞定位。**结果** 实时定量 PCR 证实 TRAF3IP3 基因在被检测的 11 种组织中均有表达,其中在淋巴结、脾、骨髓、胃和睾丸中的表达水平较高;成功克隆了 TRAF3IP3 基因 ORF 区并构建成为荧光定位质粒,激光共聚焦显微镜观察证实 TRAF3IP3 蛋白主要定位于核膜,在核周呈颗粒状分布。**结论** TRAF3IP3 基因在淋巴细胞富集的器官呈高表达,可能参与免疫系统的发育、成熟及调控,其表达产物在细胞内主要定位于核膜及核周胞浆。

[关键词] TRAF3IP3;组织表达谱;亚细胞定位
[中图法分类号] R322.61;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

Expression of human TRAF3IP3 gene in human different organs and its subcellular localization in transfected HEK 293 cells

Wang Yang[1], Wang Yi[1], Yu Yuan[1], Liu Qing[1], Mao Huan[2], Xiong Yanjie[2], Zhang Xiujun[1] ([1]College of Life Sciences, [2]Department of Pathology, Affiliated Hospital, Hebei Union University, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the tissue expression profile of human TRAF3IP3 gene, also known as TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase-activating modulator (T3JAM) and its subcellular localization. **Methods** The mRNA expression of TRAF3IP3 was detected in 11 human tissue samples, including the liver, thyroid, colon, spleen, stomach, testis, uterus, fat tissue, bone marrow, lung and lymph node by real-time PCR. The subcellular location plasmid containing the full-length TRAF3IP3 cDNA was constructed. And then the recombinant plasmid was transfected into HEK 293 cells. Subcellular location of TRAF3IP3 was detected by confocal laser scanning microscopy. **Results** TRAF3IP3 mRNA was expressed in all detected human tissues, and highly expressed in the lymph node, spleen, bone marrow, stomach and testis. The human TRAF3IP3 eukaryotic expression vector was constructed successfully. Confocal laser scanning microscopy showed TRAF3IP3 protein was located in the nuclear membrane, in a perinuclear granular distribution. **Conclusion** TRAF3IP3 mRNA is highly expressed in the lymphocyte-richened tissues, and TRAF3IP3 protein is mainly located in the nuclear membrane and perinuclear region, which might be involved in the development, maturation and regulation of immune system.

[**Key words**] TRAF3IP3; tissue expression profile; subcellular location

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072093). Corresponding author: Zhang Xiujun, Tel: 86-315-3726335, E-mail: zhangxiujun66@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81072093)
[通信作者] 张秀军,电话:(0315)3726335,E-mail:zhangxiujun66@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130508.0910.002.html(2013-05-08)

TRAF3IP3(TRAF3 interacting protein 3)是2003年发现的一个人类基因,又被称作T3JAM[TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase (JNK)-activating modulator]。该基因编码产物特异性地与TRAF3(TNF receptor-associated factor 3)蛋白相互作用,募集TRAF3形成垢剂不溶的复合物,并介导JNK信号通路激活[1]。2007年国家人类基因组北方研究中心通过高通量和高内涵细胞筛选鉴定发现该基因能够通过JNK信号通路介导HeLa和293T细胞增殖[2]。目前,有关该基因的具体功能和作用机制仍然未知。本研究通过实时定量PCR方法检测了该基因在部分人类组织中的表达谱,并对其表达产物的亚细胞定位进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

真核表达质粒EGFP-C3、大肠杆菌*E. coli* DH5α均由本实验室保存;Trizol试剂、Platinum® Pfx DNA聚合酶购自Invitrogen公司;M-MLV逆转录酶为Promega公司产品;T4 DNA连接酶、pUM-T载体、胶回收试剂盒购自北京百泰克公司;Hoechst 33342购自Sigma公司;SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ试剂盒、限制性内切酶*Sal* Ⅰ和*Xho* Ⅰ购自大连宝生物公司;Oligo(dT)$_{17}$及所有引物由生工公司合成。正常人结肠、甲状腺、肝脏、子宫、睾丸、脾、胃、肺、骨髓、脂肪、淋巴结组织均由河北联合大学附属医院提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 组织cDNA的获得

将组织标本液氮研磨后,采用Trizol试剂提取组织样本总RNA,紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测RNA纯度和质量。取总RNA 2 μg经M-MLV逆转录酶合成cDNA第1链。

1.3 TRAF3IP3基因表达谱分析

使用Rotor-Gene 3000荧光实时定量PCR仪以SYBR Green染色法检测组织样本中TRAF3IP3 mRNA表达的相对水平。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照基因,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各样品TRAF3IP3 mRNA的相对表达量,为满足该方法应用条件,将包含TRAF3IP3 ORF两侧序列的TRAF3IP3-pUM-T质粒及GAPDH-pUM-T质粒梯度稀释作为模板,用于标准曲线的制备,以保证目的基因与内参基因扩增效率一致且均接近1。根据GenBank中的人TRAF3IP3基因(NM_025228.2)序列设计检测引物,上游引物序列为5′-CGCAACAGGTGCTTGGAGGT-3′,下游引物序列为5′-AAGTGGTCACATTGGGACGG-3′,扩增片段长度148 bp;GAPDH上游引物5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,下游引物5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′,扩增片段长度226 bp。采用25 μL反应体系,反应条件:95 ℃预变性10 s;95 ℃变性15 s,60 ℃延伸30 s,共40个循环。每一样品均设3个重复孔,计算其均值作为相对表达值。每次PCR反应后均进行熔解曲线分析以确认扩增产物的特异性,同时结合琼脂糖凝胶电泳观察PCR结果。

1.4 TRAF3IP3基因的克隆及真核表达载体构建

根据GenBank中的人TRAF3IP3基因序列,设计全长基因读码框架两端的引物,上游引物:5′-CGCAACAGGTGCTTGGAGGT-3′,下游引物:5′-CAAGGCAGTTGTCACAAATTATTCA-3′,以骨髓cDNA为模板进行PCR,反应条件:94 ℃ 5 min预变性,然后94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min,30个循环,72 ℃延伸7 min。PCR产物*Taq*酶加Poly A尾后连入pUM-T克隆载体,质粒在*E. coli* DH5α中扩增,提质粒测序验证插入片段序列的正确性。然后通过内侧上游引物5′- CCCTCGAGATGATCAGCCCAGACCCC-3′和下游引物5′- GCGTCGACTCAGATCATCAGGTTGTCTTT-3′扩增开发读码框区并分别引入*Xho* Ⅰ和*Sal* Ⅰ酶切位点(划线部分),扩增产物首先连入pUM-T载体,经测序正确后双酶切连入真核表达载体EGFP-C3。

1.5 TRAF3IP3蛋白的亚细胞定位

将生长状态良好的HEK293细胞按每孔5×10^5个转移到预先置有盖玻片的6孔板中,用含10%小牛血清的DMEM培养液在37 ℃,5% CO_2条件下培养24 h。将TRAF3IP3真核定位质粒磷酸钙法转染细胞,24 h后向培养体系中加入终浓度5 μg/mL的Hoechst 33342,37 ℃孵育30 min,取出覆盖有细胞的盖玻片,PBS洗涤后激光共聚焦显微镜观察。

2 结果

2.1 TRAF3IP3表达谱分析

采用Rotor Gene 6.1.81软件观察实时定量PCR的熔解曲线,结果显示PCR产物单一性良好,见图1;琼脂糖凝胶电泳进一步证实扩增片段与所设计大小一致,见图2。对11种正常人体组织中TRAF3IP3基因的表达情况进行检测,结果显示该基因在各组织中均有表达,但表达水平相差较大,其中淋巴结、脾、骨髓、胃、睾丸表达水平较高,见图3。

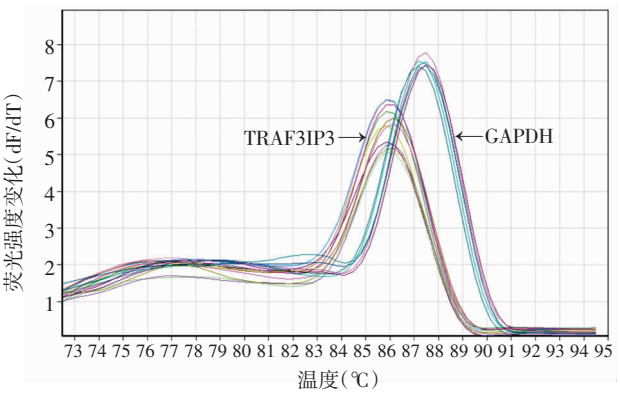
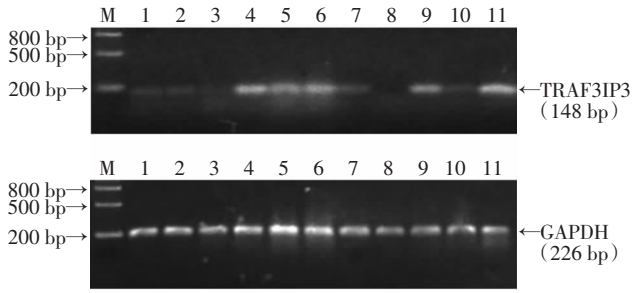


图1 TRAF3IP3和GAPDH实时定量PCR扩增熔解曲线

2.2 TRAF3IP3真核表达载体的构建

采用TRAF3IP3基因读码框两端的引物扩增获得包含TRAF3IP3 ORF区的一段DNA序列,并连入克隆载体pUM-T测序,以测序正确的质粒作为扩增TRAF3IP3全长ORF区的模

板。琼脂糖凝胶电泳显示在约 1 670 bp 处出现 TRAF3IP3 特异性片段，与预期大小相符，见图 4；将 TRAF3IP3 经双酶切连入到 EGFP-C3 载体，提取质粒经 *Xho* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后琼脂糖凝胶电泳可见目的条带，见图 5。结合测序结果证明 TRAF3IP3-EGFP-C3 真核表达载体构建成功。



M：DNA 标准；1：肝脏；2：甲状腺；3：结肠；4：脾；5：胃；6：睾丸；7：子宫；8：脂肪；9：骨髓；10：肺；11：淋巴结

图 2　实时定量 PCR 检测不同组织中 TRAF3IP3 的表达

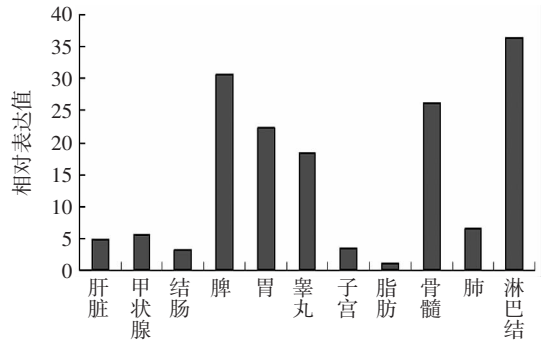
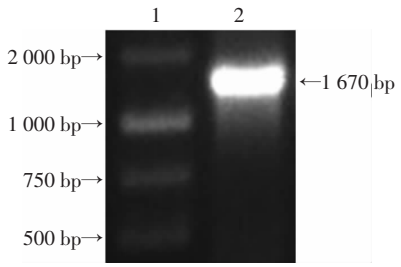
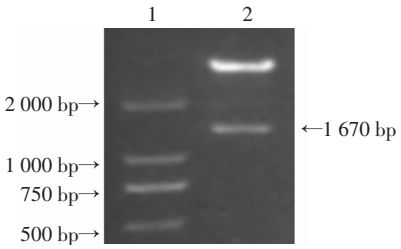


图 3　人体各组织中 TRAF3IP3 mRNA 的相对表达水平



1：标准；2：TRAF3IP3

图 4　TRAF3IP3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

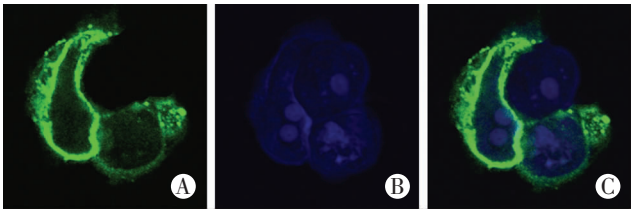


1：标准；2：*Xho* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切的 TRAF3IP3-EGFP-C3 质粒

图 5　TRAF3IP3-EGFP-C3 表达载体的双酶切鉴定

2.3　TRAF3IP3 的亚细胞定位

共聚焦显微镜检测 EGFP-TRAF3IP3 融合蛋白在 HEK 293 细胞中的亚细胞定位，EGFP 和 Hoechst 33342 的激发光波长分别为 488 nm 和 346 nm。结果显示，TRAF3IP3-EGFP-C3 转染细胞的绿色荧光主要位于核膜和核周胞浆中，其中核膜上荧光强度最高，核周胞浆中荧光呈颗粒状分布。见图 6。



A：EGFP-TRAF3IP3 融合蛋白的细胞定位；B：Hoechst 33342 染核；C：EGFP-TRAF3IP3 与 Hoechst 33342 的融合图像

图 6　激光共聚焦显微镜观察 TRAF3IP3 蛋白在 HEK293 细胞中的定位　（×1 000）

3　讨论

TNF receptor associated factor（TRAF）家族是一类在哺乳动物中发现的遗传上高度保守的胞内接头蛋白。TRAF 蛋白是一类重要的信号转导子，主要参与 TNF 受体家族和 Toll 样受体家族介导的胞内信号传递，TRAF 蛋白利用其 C 端的 TRAF 结构域与这些受体的胞内部分结合，进而激活下游 NF-κB 和 JNK 信号通路，影响细胞的增殖、分化和凋亡，并参与多种生物学过程的调控。目前，已经发现 7 种人类 TRAFs 蛋白：TRAF1～7[3-4]。其中，TRAF3 又称为 CD40 结合蛋白，是体内作用最为广泛的一种 TRAF 蛋白，能够和包括 CD40、LT-βR 和 BR3 在内的多种 TNF 受体超家族成员作用介导信号的转导，在天然免疫和炎症反应中发挥着重要的作用[5-9]。与 TRAF2、4、5、6 不同，TRAF3 并不结合在细胞内的膜结构上，而是游离于胞浆中，且 TRAF3 在去垢剂中溶解性很好，单独过表达 TRAF3 并不能激活 JNK 途径[10-12]。之后研究显示，通过引入膜定位信号人工将 TRAF3 定位于胞内膜结构能够激活 JNK 途径[13]。而在活体内，TRAF3 如何定位到细胞膜结构上的机制一直未知。2003 年，Dadgostar 等[1]发现一个新蛋白 TRAF3IP3 能够将 TRAF3 定位于胞内膜结构并激活 JNK 途径，从而揭示了 TRAF3 在生理条件下发挥作用的可能机制。

TRAF3IP3 属于Ⅳ型单次跨膜蛋白，Predict Protein 分析显示，该蛋白的主要二级结构是 α 螺旋，占整个分子的 96.23%。靠近 C 端跨膜区（300～513 aa）附

近有两段叠螺旋结构域,分别与肌凝蛋白尾端7次重复结构域和ezrin/radixin/moesin(ERM)家族结构域有很高的同源性,是与TRAF3蛋白的亮氨酸拉链区域发生特异作用的部位。研究显示,TRAF3IP3仅与TRAF3发生作用,而与其他TRAF家族蛋白没有作用。TRAF3IP3与TRAF3结合后形成去垢剂不溶性的复合物,并激活(c-Jun N-terminal kinase)JNK信号途径,但不能激活NF-κB途径。TRAF3IP3的过表达可以增加S期和G_2/M期细胞的比例,促进细胞的增殖[1-2]。目前,已经在包括非洲爪蟾、原鸡、灵长类动物在内的多种脊椎动物基因组中发现TRAF3IP3的同源序列,对小鼠TRAF3IP3基因的表达谱分析显示,该基因以组织特异性的方式高表达于脾、胸腺和骨髓内[1]。本研究结果证实人类TRAF3IP3表达谱特点与小鼠类似,主要高表达于淋巴细胞富集的器官,包括脾、骨髓、淋巴结等,提示其可能参与免疫系统的发育、成熟及调控。

增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是一种常用的分子示踪和筛选标记,具有稳定无毒性、不影响细胞活力、自发荧光、容易检测、不依赖特异性抗体等优点[14-15]。但EGFP标签分子量较大,有可能通过空间位阻干扰目的基因产物的折叠及其与细胞内成分的相互作用,从而影响其定位。解决此问题的最佳方法就是将EGFP融合在目的蛋白远离功能区、定位区的一端。此外还可以在目的基因和EGFP基因之间引入一小段柔性linker。一般来说,EGFP的N端结构比较紧凑,目的蛋白融合在EGFP的N端往往需要引入linker,而羧基末端结构比较松弛,EGFP与下游目的基因之间通常不需要linker就能达到互不干扰[16]。在本实验中,首先通过生物信息学对TRAF3IP3蛋白进行了全面分析,结果显示该蛋白的跨膜区位于C末端,而N端没有定位信号或者信号肽区,因此,目的蛋白被融合到了EGFP的下游。

本研究结果显示,TRAF3IP3蛋白主要定位于核周,在核膜上表达量最高,核周胞浆主要呈颗粒状分布,有可能定位于某种细胞器上。表达谱分析显示,人类TRAF3IP3基因主要高表达于淋巴细胞富集的器官,提示该基因可能参与免疫系统的发育、成熟与调控,这些结果为该基因的进一步研究提供了线索。

参考文献:

[1] Dadgostar H, Doyle S E, Shahangian A, *et al*. T3JAM, a novel protein that specifically interacts with TRAF3 and promotes the activation of JNK(1)[J]. FEBS Lett, 2003, 553(3): 403-407.

[2] Ma X, Wang X, Gao X, *et al*. Identification of five human novel genes associated with cell proliferation by cell-based screening from an expressed cDNA ORF library[J]. Life Sci, 2007, 81(14): 1141-1151.

[3] Ha H, Han D, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling[J]. Curr Protoc Immunol, 2009, Chapter 11: Unit11. 9D.

[4] Chapard C, Hohl D, Huber M. The role of the TRAF-interacting protein in proliferation and differentiation[J]. Exp Dermatol, 2012, 21(5): 321-326.

[5] Moore C R, Liu Y, Shao C, *et al*. Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice[J]. Leukemia, 2012, 26(5): 1122-1127.

[6] Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, *et al*. TRAF family member-associated NF-κB activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation[J]. J Biol Chem, 2012, 287(34): 29114-29124.

[7] McPherson A J, Snell L M, Mak T W, *et al*. Opposing roles for TRAF1 in the alternative versus classical NF-κB pathway in T cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(27): 23010-23019.

[8] Zepp J A, Liu C, Qian W, *et al*. Cutting edge: TNF receptor-associated factor 4 restricts IL-17-mediated pathology and signaling processes[J]. J Immunol, 2012, 189(1): 33-37.

[9] Missiou A, Rudolf P, Stachon P, *et al*. TRAF5 deficiency accelerates atherogenesis in mice by increasing inflammatory cell recruitment and foam cell formation[J]. Circ Res, 2010,107(6): 757-766.

[10] Oganesyan G, Saha S K, Guo B, *et al*. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response[J]. Nature, 2006, 439(7073): 208-211.

[11] Bowie A G. TRAF3: uncovering the real but restricted role in human[J]. Immunity, 2010, 33(3): 293-295.

[12] Hildebrand J M, Yi Z, Buchta C M, *et al*. Roles of tumor necrosis factor receptor associated factor 3 (TRAF3) and TRAF5 in immune cell functions[J]. Immunol Rev, 2011, 244(1): 55-74.

[13] Dadgostar H, Cheng G. Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2539-2544.

[14] Craggs T D. Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation[J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(10): 2865-2875.

[15] Remington S J. Green fluorescent protein: a perspective[J]. Protein Sci, 2011, 20(9): 1509-1519.

[16] Snapp E. Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2005, Chapter 21: Unit 21. 4.

(**收稿**:2013-01-15;**修回**:2013-01-17)

(编辑 汪勤俭)