



渔业科学进展
Progress in Fishery Sciences
ISSN 2095-9869, CN 37-1466/S

《渔业科学进展》网络首发论文

- 题目： 黑鲷 TRAF1 基因克隆、SNP 位点筛选及其与耐低温性状的关联分析
作者： 俞晗，高波，张志伟，祝斐，贾超峰，孟乾，徐大凤，杜书然
收稿日期： 2025-05-20
网络首发日期： 2025-09-29
引用格式： 俞晗，高波，张志伟，祝斐，贾超峰，孟乾，徐大凤，杜书然. 黑鲷 TRAF1 基因克隆、SNP 位点筛选及其与耐低温性状的关联分析[J/OL]. 渔业科学进展.
<https://link.cnki.net/urlid/37.1466.S.20250929.0839.001>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.3963/j.issn.2095-9869.20250520001

<http://www.yykxjz.cn/>

俞晗, 高波, 祝斐, 贾超峰, 孟乾, 徐大凤, 杜书然. 黑鲷 *TRAF1* 基因克隆、SNP 位点筛选及其与耐低温性状的关联分析. 渔业科学进展, 2025, 46

YU H, GAO B, ZHANG Z W, ZHU F, JIA C F, MENG Q, XU D F, DU S R. Structure and SNP locus screening of *TRAF1* in black seabream and analysis of its association with low-temperature tolerance traits. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46

黑鲷 *TRAF1* 基因克隆、SNP 位点筛选 及其与耐低温性状的关联分析*

俞 晗^{1,2} 高 波² 张志伟^{1,2①} 祝 斐²
贾超峰² 孟 乾² 徐大凤² 杜书然²

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
2. 江苏省海洋水产研究所 江苏省鱼类遗传育种重点实验室 南通 226007)

摘要 为探究肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF)基因家族中 *TRAF1* 与黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)耐低温性状的关联及作用, 本研究通过 RACE 技术克隆获得了黑鲷 *TRAF1* 基因的 cDNA 全长序列, 利用软件生物信息学分析其基因结构, 并通过实时荧光定量 PCR 法分析其在黑鲷各组织的表达量以及低温胁迫下在部分组织中的表达模式, 初步探究 *TRAF1* 基因的相关功能。从耐受组与敏感组中筛选与耐低温相关的黑鲷 *TRAF1* 基因 SNP 位点。结果显示, 黑鲷 *TRAF1* 基因 cDNA 全长为 3528 bp, 包含 5'UTR (93 bp)、ORF (1 566 bp) 和 3'UTR (1 869 bp), 共编码 521 个氨基酸, 有 1 个环指结构域和 MATH 结构域。*TRAF1* 基因在黑鲷肝脏、脑、肌肉、鳃、肾、心脏和肠各组织中均有表达, 其中, 在肾脏中的表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$)；低温胁迫下, 与对照组相比, 黑鲷 *TRAF1* 基因在心脏、脾、肌肉、脑和肝脏组织中均呈现低温耐受组表达量升高、低温敏感组表达量降低的情况。通过比较耐受组和敏感组黑鲷 *TRAF1* 基因的 DNA 序列, 共发现 16 个 SNP 位点, 其中, 2 个 SNP 位点位于外显子区域, 14 个位于 3'UTR 区, 位于编码区的 SNP g.5862 位点和位于非编码区的 SNP g.7827 位点以及 SNP g.8229 位点的 GG 基因型与黑鲷的耐低温性状显著相关($P<0.05$)；实时荧光定量 PCR 检测显示, 黑鲷 *TRAF1* 基因 3 个 SNP 位点上, 每个 SNP 位点的 3 种基因型中, GG 基因型的表达量均显著高于另外 2 种基因型($P<0.05$), 可作为黑鲷耐低温性状分子标记辅助育种的候选标记。

关键词 黑鲷; 低温耐受; *TRAF1* 基因; 基因克隆; SNP 位点

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)00-0000-14

* 江苏省自然科学基金(BK20221268)和江苏省水产良种保种项目(2024-SJ-004)共同资助。俞 晗, Email: 1766480206@qq.com

① 通信作者: 张志伟, 研究员, Email: zhzhwei2005@126.com

收稿日期: 2025-05-20, 收修改稿日期: 2025-06-27

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF)是一类胞内接头蛋白, 最先发现时它是作为 TNF—R 超家族的下游信号通路中的一员, 后来发现 TRAFs 是 TNFR 和 TLR、NLR 等家族的信号传导通路中重要的信号传导因子(金虹等, 2017)。TRAFs 能够调节 MAPK 等信号通路的激活, 可参与 TNF 受体(TNF receptor, TNFR)、白细胞介素 1 受体(interleukin-1 receptor, IL-1)和 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)等多个家族的信号传导通路(Arkee *et al.*, 2020; Bishop, 2004; Wajant *et al.*, 2001; Bradley *et al.*, 2001), 具有影响细胞的增殖、存活、凋亡, 参与炎性反应、免疫应答等多种功能, 是细胞内重要的信号传导蛋白(Inoue *et al.*, 2000)。

迄今为止, TRAFs 家族共发现 7 种 *TRAF* 基因(王承兴等, 2000), 分别命名为 *TRAF1~7*。*TRAF1* 基因最初于 1994 年由 Rothe 等利用酵母双杂交技术从小鼠(*Mus musculus*)的胞毒 T 细胞系 CT6 中发现了与 TNFR2 结合的 2 种蛋白, 并将他们命名为 *TRAF1* 和 *TRAF2*(Rothe *et al.*, 1994)。早期研究表明, *TRAF1* 通过与 *TRAF2* 相互作用对 T 细胞中的 TNFR2 信号转导起负调节作用(Jang *et al.*, 2024), 但最近的研究表明, *TRAF1* 在 TNFR2、CD30 和 LMP1 介导信号通路下游起正调节作用, 通常与 *TRAF2* 相关(Zheng *et al.*, 2010; Greenfeld *et al.*, 2015)。尽管人类的许多疾病中有 *TRAF1* 的参与, 包括类风湿关节炎(程韬等, 2017)、胰岛素抵抗(Zhang *et al.*, 2015)、脓毒症心肌损伤(刘敏等, 2024)和胃癌(杨燕, 2012)等。但对鱼类有关 *TRAF1* 基因的研究报道较少。

黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)隶属脊索动物门(Chordata)、辐鳍鱼纲(Actinopterygii)、鲈形目(Perciformes)、鲷科(Sparidae)、棘鲷属(*Acanthopagrus*), 俗称黑加吉、黑立和乌颊鱼等, 主要分布在西太平洋的浅海地带, 不作远距离的洄游, 从俄罗斯东北部到越南中部沿海地带都有广泛分布, 由于其具有肉味鲜美、营养价值高、广温广盐、适应性强的特点, 已成为我国重要的海水养殖鱼类之一(Wang *et al.*, 2023)。然而, 在长江以北流域, 黑鲷养殖过程中的越冬管理常因机体抗寒能力不足和机体免疫抵抗力低下等原因, 出现死亡现象。因此, 改良黑鲷不耐低温的遗传

特性, 提高机体抵御外界环境变化的抗逆能力具有重要意义。基于课题组前期黑鲷低温胁迫转录组研究结果, 发现低温敏感组与低温耐受组间存在显著差异表达基因 *TRAF1*, 暗示其在响应低温胁迫中发挥了一定的调控作用, 但黑鲷 *TRAF1* 基因在低温胁迫下的具体表达模式尚不清楚。本研究以黑鲷 *TRAF1* 基因为研究对象, 进行基因结构功能及低温胁迫下 SNP 位点筛选研究, 以期为开展黑鲷对不良环境的适应性研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及样品制备

本实验所用黑鲷样品均来自江苏省海洋水产研究所吕四养殖基地。随机选取 605 尾[(20.2 ± 3.04) cm, (34.53 ± 2.52) g]规格相近、无外伤、体格健壮且活力好的黑鲷个体用于后续实验。随机挑选 5 尾黑鲷, 剪取肝脏、脑、肌肉、鳃、肾、心脏和肠, 经液氮速冻, 置于 -80°C 冰箱, 用于后续 *AsTRAF1* 基因克隆及各组织表达量分析。剩余 600 尾用于低温胁迫实验。

将上述 600 尾 1 龄黑鲷个体随机分配到 2 个 $3\text{ m} \times 3\text{ m} \times 1.5\text{ m}$ 的室内养殖池中, 每个养殖池中各暂养黑鲷个体 300 尾, 养殖水体为 2.7 m^3 循环水, 水温保持在 15°C , 暂养持续 2 周。依据前期预实验和相关研究, 15°C 是维持黑鲷正常生理代谢的最适低温极限, 随着温度的降低, 黑鲷的生理功能会发生变化。因此, 15°C 用作黑鲷的初始低温。每天喂食 2 次商业颗粒饲料(009:00 和 18:00), 投喂量为生物量的 3%, 每天更换一半养殖水。实验开始前 24 h 停止喂食, 一个水池的水温保持不变, 仍为 15°C , 为对照组(CG); 另一个水池的水温以 $3^{\circ}\text{C}/\text{d}$ 的速度降低。在整个实验过程中, 养殖水池中的海水保持持续通气。随着温度的降低, 一些个体失去平衡, 鳃盖和鳍条变得不活跃, 定义为低温敏感组(CS), 此时水温为 3.8°C 。随着水温继续降低, 仍有 20% 的个体可以自由泳动, 这些个体定义为低温耐受组(CT), 此时水温为 2.8°C 。

从对照组(CG)、低温敏感组(CS)和低温耐受组(CT)随机取 5 尾黑鲷, 剪取各组肝脏、脑、肌肉、心脏和脾脏, 液氮速冻, 置于 -80°C 冰箱备用, 用于后续 *AsTRAF1* 基因表达模式分析。对 200 尾来自同一

时期规格相似的黑鲷进行冷驯化实验, 实验结束后, 仍以 1 °C/d 的速率进行降温, 直至所有鱼体出现失衡, 侧翻或腹部朝上, 鳃盖运动几乎或完全停止, 轻触后 5 s 内仍不能回正现象, 取尾鳍组织。每个取样个体单独存放, 记录编号和失衡温度。以最先出现失衡的 60 尾黑鲷为低温敏感群体, 以最后失衡的 60 尾黑鲷为低温耐受群体。对 2 组黑鲷失衡的温度进行记录。将剪取的组织液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱, 用于后续 SNP 实验。

1.2 *AsTRAFL* 基因 cDNA 全长克隆

使用总 RNA 抽提纯化试剂盒与 RNase-Free DNA 清除试剂盒提取总 RNA, 并对提取的 RNA 质量进行检测。采用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司, 简称生工生物]将质量检测合格的 RNA 进行 cDNA 合成。根据课题组前期肝脏转录组数据库中获得的 *AsTRAFL* 基因 CDS 区, 利用 Oligo 6.0 软件设计引物(表 1), 进行中间片段的 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认条带无误后送测序, 获得 *AsTRAFL* 基因的中间片段。根据测得的 *AsTRAFL* 基因 cDNA 中间序列分别设计用于 3'RACE 和 5'RACE 末端扩增的特异性引物(表 1), 利用巢式 PCR 扩增获得 3'UTR 和 5'UTR, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收纯化目的片段, 随后与 pMD19-T 载体链接, 并转化到 DH5 α 感受态

细胞中, 氨苄抗性平板筛选阳性克隆并进行菌液 PCR 鉴定。最后送生工生物测序。最后将测序获得的 CDS 区, 3'UTR 和 5'UTR 序列利用 DNAMAN 8 软件进行拼接, 最后获得 *AsTRAFL* 基因 cDNA 的全长。

1.3 *AsTRAFL* 基因生物信息学分析

使用 NCBI 预测开放阅读框(ORF)及其编码氨基酸序列;运用 ExPASy 的 ProtParam 工具分析蛋白分子量、理论等电点等理化性质;利用 SMART、Wolf psort、Signal P、TMHMM、NetNGlyc 和 NetOGlyc 预测蛋白质三级结构、分析蛋白质功能结构域、亚细胞定位和糖基化位点;利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列多重比对, 利用 MEGA 5.1 构建进化树(赖卓欣等, 2019)。

1.4 *AsTRAFL* 的各组织表达及低温胁迫下在部分组织中的表达模式分析

利用实时荧光定量(qPCR)方法检测 *AsTRAFL* 基因在黑鲷不同组织中的表达量以及在低温胁迫处理之后对照组(CG)、低温敏感组(CS)和低温耐受组(CT)中的部分组织的相对表达量。利用 Oligo 6.0 软件设计内参基因 β -actin 及 *AsTRAFL* 基因实时荧光定量特异性引物(表 1)。使用 ABI 公司的 7300 plus Real-Time PCR system 进行 qPCR, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。每组样

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
TRAFL-F	GTCAGCAGTGTCTCCAGTC	CDS 区扩增
TRAFL-R	GACAAATATCCCATCGTAGGT	Amplification of the CDS region
TRAFL-5'-R	1-AGCTGCTTGAACAGTGCACACA 2-CTGGTAAAGAGTTGACGCACTCC 3-CTCCATGGGCACTGACAGCACAC 1-GGTTACGCTGGAGGCTTCTCAC 2-CTGGAGCGGACGGTCACAATGAA 3-AGCAGCCCATCAGTGAGATGAAC 4-GATATTGATCAGCTAATATTCTCC 5-AGCTGCTGGTTAACATACCTG	RACE 扩增 5'端 5' end amplification by RACE RACE 扩增 3'端 3' end amplification by RACE
TRAFL-3'-F	TGGAGCGGACGGTCACAATGA	实时荧光定量 PCR
TRAFL-RT-R	TGTCTGCGCGAGAGAAGTCA	Real-time fluorescent quantitative PCR
β -actin-RT-F	TCCTGACAGAGCGTGGCTACTC	
β -actin-RT-R	ACCGAGGAAGGATGGCTGGAAG	
SNP1F	AGGATATAGCACCAGATTGATGG	

SNP1R	GGCGAGCAGAGGTAAGAAGC	
SNP2F	CTACTTGAGCTGTGATCCATACTGC	
SNP2R	ACTTCCTGTTCTCTCCACTCTGC	
SNP3F	CATATAAACTAGACCATTACGCAC	
SNP3R	ATGGGTGTGGTATCAATCTACTCGT	
SNP3FC	TGAAAGGTTTTAGGAAATGGTGC	
SNP4F	TTTATGAAGCATCAGTTACACCCCT	SNP 位点筛选
SNP4R	GAGATTGGGGCTTCAGGT	SNP site screening
SNP5F	CAAGGGAAATTCCACTCACTACAC	
SNP5R	ACCGAGCTGTGGCGTTA	
SNP5FC	GGAAGCTACACCAAGCAAACAAT	
SNP6F	TTAGAATTGATGAGAGGTCAGAGG	
SNP6R	AATTATGCTAAAATGTACAGAGGT	
SNP6RC	ACTCTACATTCAAAAAGTGGCGTG	

品设置 3 个生物学平行和 3 次技术重复。

1.5 *AsTRAF1* 基因 SNP 分析

利用前期实验中获得的低温敏感组和低温耐受组的黑鲷尾鳍样品，提取 DNA 样品。根据黑鲷的全基因组数据(Zhang et al, 2018)，获得 *TRAF1* 基因的 DNA 全长并据此设计引物(表 1)进行扩增，产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，将条带清晰明亮且特异性较高的扩增产物进行测序。测序结果采用 SnapGene 进行序列比对，筛选 SNP 位点，并基于直接测序结果，利用 Chromas 软件观察测序峰图(林志杰, 2022)；利用软件 Haploview 4.2 计算 D'值和 R2 值及进行连锁不平衡分析和单倍型分析；使用 PopGen 32 软件统计分析 SNP 的基因型、基因型频率、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)以及哈迪-温伯格平衡(HWE)等遗传参数；根据等位基因遗传频率利用 PIC-CALC 软件计算 SNP 位点的多态信息含量(PIC)；不同基因型与耐低温度性状差异分析采用 SPSS 25.0 软件中的 ANOVA 法进行分析(宋欣霖等, 2023)。利用实时荧光定量方法检测筛选出的 SNP 位点各基因型 *AsTRAF1* 基因相对表达量。对突变前后编码区 SNP 位点进行蛋白结构预测分析比对。

2 结果与分析

2.1 *AsTRAF1* 基因 cDNA 全长及序列分析

AsTRAF1 基因 cDNA 全长 3 528 bp, 5'UTR 长

93 bp, ORF 长 1 566 bp, 3'UTR 长 1 869 bp, 一共编码 521 个氨基酸，包括 10 个外显子和 9 个内含子(图 1)。理论等电点为 7.67，预测蛋白分子量为 58.91 kDa, Asp+Glu 带负电荷的残基共 65 个，Arg+Lys 带正电荷的残基共 67 个。脂肪指数为 77.89，不稳定指数为 42.72，为不稳定蛋白，疏水性为 -0.375，蛋白结构域为 373~498 bp。亚细胞定位为细胞外基质。该蛋白无信号肽，无跨膜区域，蛋白均在膜外。使用 SWISS-MODEL 预测 *AsTRAF1* 蛋白质三级结构，结果如图 2 所示。使用 NetPhos 3.1 和 NetNGlyc 1.0 功能位点预测结果显示，*AsTRAF1* 氨基酸序列中有 29 个丝氨酸磷酸化位点、12 个苏氨酸磷酸化位点、3 个酪氨酸磷酸化位点、O 端糖基化位点和 N 端糖基化位点。

2.2 *AsTRAF1* 基因编码氨基酸序列比对及系统进化树分析

将 *AsTRAF1* 氨基酸序列与草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的同源序列进行比对分析(图 3)，序列的一致性均在 34.51%~45%。为探究黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)中 *TRAF1* 的进化来源及其与其他物种的保守性关系，本研究选取了 14 个物种的氨基酸序列进行系统进化树构建，根据图 4 可得，进化树分出 2 个大支，其中，黑鲷与硬骨鱼聚为一大支；哺乳类与两栖类和爬行类聚为一大支，符合进化规律。

2.3 *AsTRAF1* 基因各组织表达量及低温胁迫下部分组织表达模式分析

通过 qPCR 技术检测 *AsTRAF1* 基因其在不同组织中的表达量, 其表达水平如图 5 所示, 其在黑鲷的肝脏、脑、肌肉、鳃、肾、心脏和肠中均有表达。其中, *AsTRAF1* 基因在肾中的表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$), 其次是肌肉、心脏和肝脏, 表达含量最低的是脑。

经低温胁迫处理后的黑鲷部分组织中 *AsTRAF1* 基因的表达模式如图 6 所示, 在心脏、脾、肌肉、脑和肝脏中, 与对照组相比, *AsTRAF1* 基因均呈现在低温耐受组中表达量显著升高($P<0.05$)、在低温敏感组中表达量降低的情况。肌肉中低温敏感组 *AsTRAF1* 基因基本趋近于不表达。心脏与脾 *AsTRAF1* 基因低温敏感组与对照组无显著差异($P>0.05$)。由此表明, *AsTRAF1* 基因的表达与黑鲷对低温胁迫的响应密切相关。

2.4 *AsTRAF1* 基因 SNP 位点遗传多态性分析

将 *AsTRAF1* 基因的 DNA 全长分段扩增后, 进行序列比对分析, 比对结果显示(表 2), 在 *AsTRAF1* 基因上共获得了 16 个 SNP, 其中, 2 个 SNP 位点位于外显子区域, 14 个位于 3'UTR 区。对 SNP 位点的遗传信息分析显示, 低温敏感组 SNP 位点 PIC 为 0.062~0.356, 其中, 低度多态性($PIC<0.25$) SNP 位点 7 个, 中度多态性($0.25\leq PIC<0.50$) SNP 位点 9 个; 低温耐受组 SNP 位点 PIC 为 0.116~0.373, 其中, 低度多态性($PIC<0.25$)

SNP 位点 4 个, 中度多态性($0.25\leq PIC<0.50$) SNP 位点 12 个; 低温敏感组 H_o 为 0~0.466, H_e 为 0.064~0.464; 低温耐受组 H_o 为 0~0.600, H_e 为 0.124~0.497; 根据卡方检验, 低温敏感组和低温耐受组中分别有 2 个和 1 个 SNP 位点 HWE 值小于 0.05, 偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态($P<0.05$)。

2.5 *AsTRAF1* 基因 SNP 位点基因型分型结果及耐低温相关性分析

SNP 位点经遗传多态性分析后, 筛选出 5 个两组同时位于中度多态性且未偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态的 SNP 位点, 对两个群体进行基因分型, 结果如表 3 所示。用 ANOVA 分析法进行基因型与黑鲷耐低温性能的关联性分析, 根据分析结果可得(表 4), 外显子区域中的 SNP g.5862 位点以及 3'UTR 区中的 SNP g.7827 位点和 SNP g.8229 位点与黑鲷的耐低温性状显著相关($P<0.05$), 其余的 3'UTR 上的 SNP g.8326 和 SNP g.8479 位点与黑鲷的耐低温性状无显著差异($P>0.05$)。在 SNP g.5862 位点与 SNP g.7827 位点上, GG 基因型个体在死亡温度上显著低于 AA 和 AG 基因型($P<0.05$); 在 SNP g.8229 位点上, GG 基因型个体在死亡温度上显著低于 CC 和 CG 基因型($P<0.05$)。

2.6 *AsTRAF1* 基因 SNP 位点与表达水平关联分析

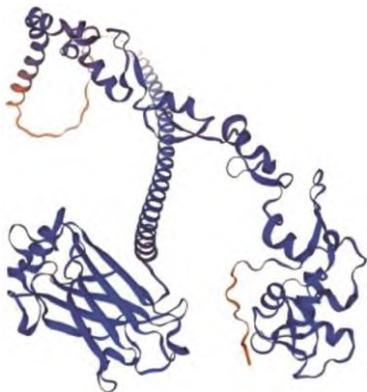
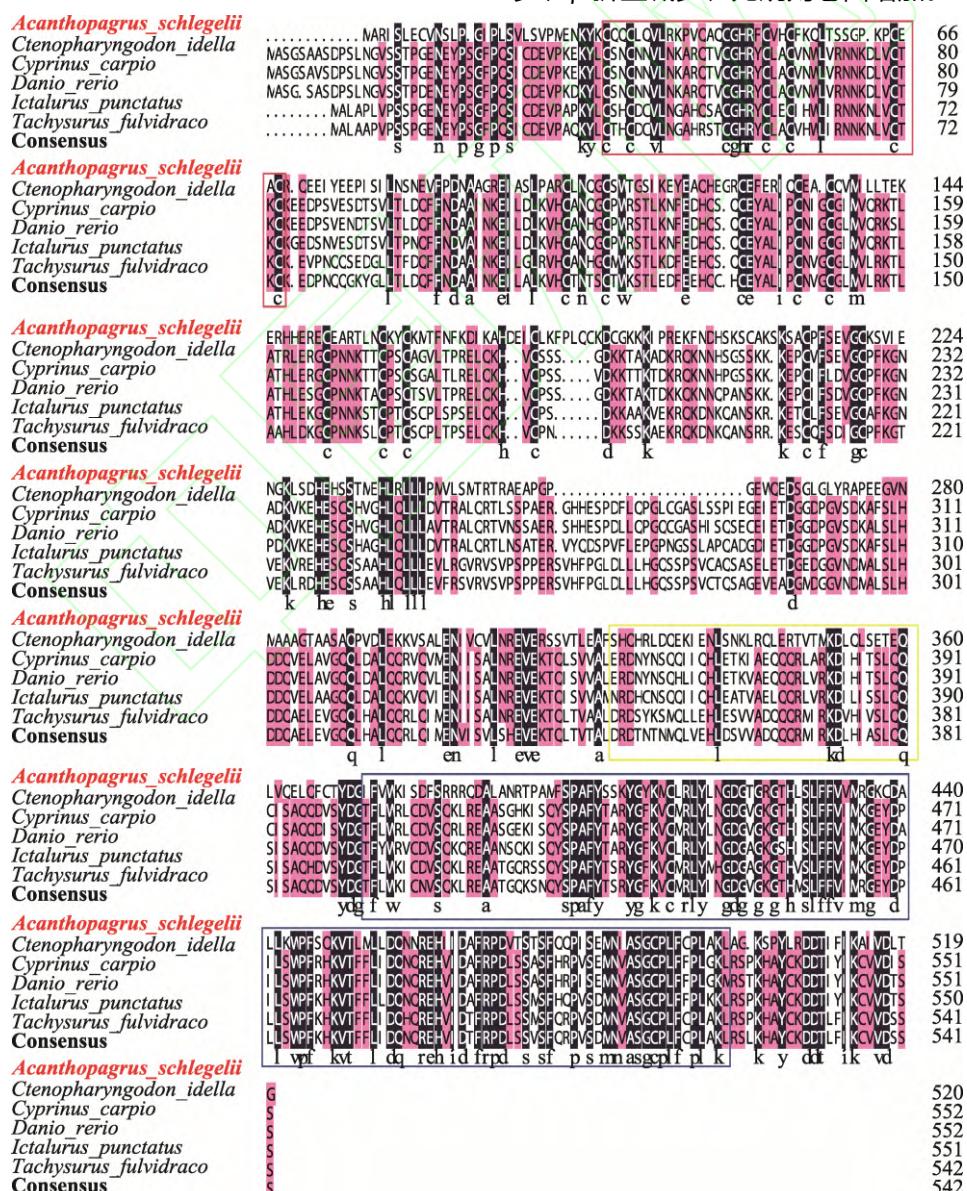
为进一步分析 *AsTRAF1* 基因 SNP 位点与耐低温性状的相关性, 采用实时荧光定量法检测了

图 1 *AsTRAF1*cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA of *AsTRAF1* and its encoded amino-acid sequence

方框内为起始密码子和终止密码子；黄色填充区域表示环指结构域(ring-finger, 30~68aa)；绿色填充区域表示卷曲螺旋结构(coiled-coil, 324~360aa)；灰色填充区域表示 MATH 结构域(373~498aa)；圆圈内为 N 端糖基化位点；3'端包含多聚腺苷酸加尾信号(polyadenylation signal)用下划线表示；红色填充区域表示 poly(A)尾巴。

The start codon and stop codon are within the box; the yellow-filled region represents the ring-finger domain (ring-finger, 30–68 aa); the green-filled region represents the coiled-coil structure (coiled-coil, 324–360aa); the grey-filled region represents the MATH domain (373–498 aa); the N-terminal glycosylation site is within the circle; the polyadenylation signal at the 3' end is underlined; the red-filled region represents the poly(A) tail.

图 2 *AsTRAFL* 蛋白质三级结构Fig.2 The tertiary structure of *AsTRAFL* protein图 3 *AsTRAFL* 氨基酸与其他物种同源氨基酸序列比对Fig.3 Sequence alignment of *AsTRAFL* amino acids and homologous amino-acid sequences from other species

SNP g.5862、SNP g.7827 和 SNP g.8229 三个位点中，每种基因型 *AsTRAFL* 基因的相对表达量。结果显示(图 7)，3 个 SNP 位点均为优势基因型 GG 基因型基因表达量显著高于另外 2 种基因型。

2.7 *AsTRAFL* 基因 SNP g.5862 位点编码蛋白结构预测

SNP g.5862 位点突变前后蛋白质二级结构预测见图 8，蛋白质三级结构预测见图 9，SNP g.5862 位点为甘氨酸变为丝氨酸的非同义突变，进而引起蛋白质二级结构和三级结构的改变，具体表现为 α -螺旋减少、 β -折叠减少、无规则卷曲增加。

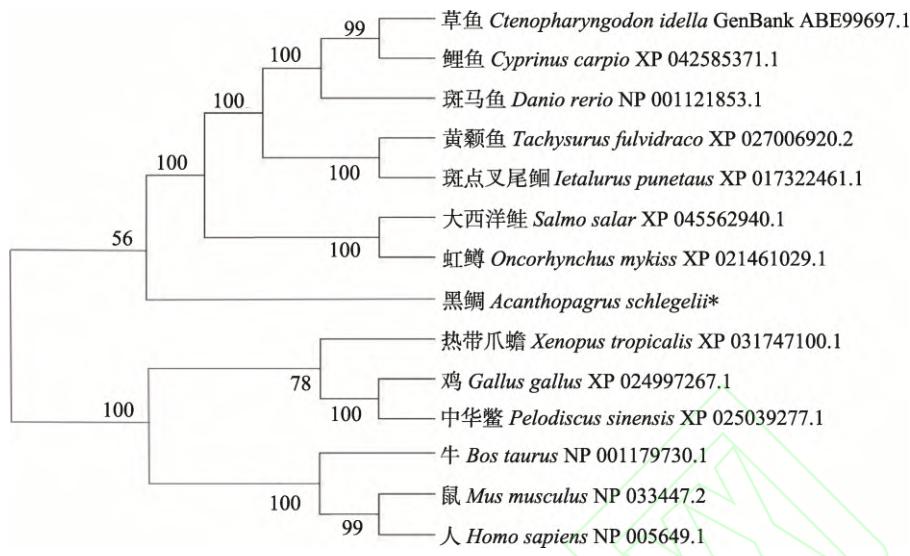


图4 AsTRAF1 氨基酸系统进化树

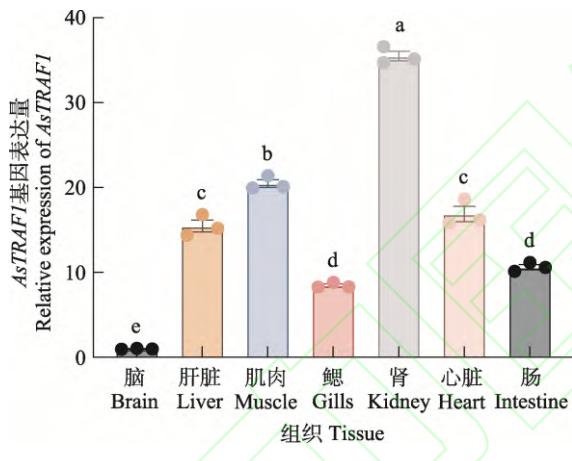
Fig.4 The *AsTRAF1* amino acid phylogenetic tree

图5 AsTRAF1基因各组织表达量

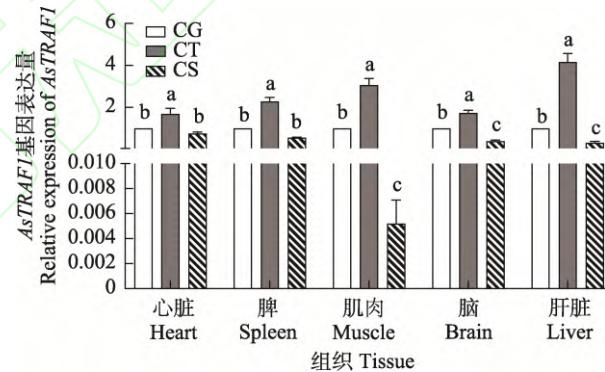
Fig.5 The expression level of *AsTRAF1* in various tissues

标有不同字母者表示有显著性差异($P<0.05$)。下同。
Groups labeled with different letters indicate a significant difference ($P<0.05$). The same below.

3 讨论

作为 TRAF 家族的独特成员, *TRAF1* 已被研究多年, 但由于在大部分硬骨物种中表现 *TRAF1* 的缺失, 例如半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Li *et al.*, 2020)、蛇头鱼(*Channa argus*) (Han *et al.*, 2025)和驼背鲈(*Cromileptes altivelis*) (Xu *et al.*, 2024)等, 目前对 *TRAF1* 的研究主要聚焦于哺乳动物中, 在鱼类中鲜有报道。在本研究中, 通过 RT-PCR 和 RACE 克隆技术获得了 *AsTRAF1* 基因的全长 cDNA。序列分析表明,

AsTRAF1 基因 N 端含有一个 RING 指结构域, 这与之前众多对 *TRAF1* 的结构研究结果并不一致, 之前

图6 低温胁迫下 *AsTRAF1* 基因部分组织表达模式Fig.6 The expression patterns of the *AsTRAF1* gene in some tissues under low-temperature stress

CG: 对照组, 为 15°C 处理的黑鲷; CT: 低温耐受组, 为低温胁迫处理下存活的黑鲷; CS: 低温敏感组, 为低温胁迫处理下失活的黑鲷。

CG: Control group, consisting of black sea breams treated at 15°C. CT: Cold-tolerant group, including black sea breams that survived under cold stress treatment. CS: Cold-sensitive group, comprising black sea breams that became inactive under cold stress treatment.

研究均表明 *TRAF1* 不含 RING 指结构域(Sabbagh *et al.*, 2008), 目前在鱼类 *TRAF1* 结构已有报道中, 黑鲷 *TRAF1* 基因是除黄颡鱼(尤沈丽, 2023)外另外一个 N 端含有 RING 指结构域的鱼类, 结构分析推测 *AsTRAF1* 基因可能在黑鲷中发挥与其他鱼类不同的

生物学功能。拥有该结构域，能够具有 E3 泛素连接酶活性介导下游多个通路以及参与降解泛素化的作

用(Jang *et al*, 2024)。C 端含有的 MATH 结构域以及 *TRAFL* 家族共有的结构特征——*TRAFL* 结构域都与其

表 2 *AsTRAFL* 基因 SNP 多态性
Tab.2 *AsTRAFL* gene SNP polymorphism

序号 No.	位点 Position	群体 Group	有效等位基因数	H_o	H_e	多态信息含量 PIC	哈迪-温伯格平衡 HWE
			N_e				
1	SNP g.5862	低温敏感组 LTSG	1.867 2	0.466 7	0.464 4	0.356 6	0.907 8
		低温耐受组 LTTG	1.724 1	0.600 0	0.420 0	0.331 8	0.121 3
2	SNP g.7011	低温敏感组 LTSG	1.300 6	0.133 3	0.231 1	0.204 4	0.051 3
		低温耐受组 LTTG	1.219 5	0.200 0	0.180 0	0.163 8	0.729 4
3	SNP g.7381	低温敏感组 LTSG	1.142 1	0.133 3	0.122 4	0.116 8	0.843 7
		低温耐受组 LTTG	1.142 1	0.133 3	0.122 4	0.116 8	0.847 3
4	SNP g.7669	低温敏感组 LTSG	1.557 1	0.333 3	0.357 8	0.293 8	0.681 3
		低温耐受组 LTTG	1.470 6	0.400 0	0.320 0	0.116 8	0.383 0
5	SNP g.7704	低温敏感组 LTSG	1.068 9	0.066 7	0.064 4	0.062 3	1.000 0
		低温耐受组 LTTG	1.219 5	0.200 0	0.180 0	0.268 8	0.729 4
6	SNP g.7737	低温敏感组 LTSG	1.867 2	0.466 7	0.464 4	0.356 7	0.907 8
		低温耐受组 LTTG	1.991 2	0.400 0	0.497 8	0.163 8	0.370 7
7	SNP g.7827	低温敏感组 LTSG	1.557 1	0.333 3	0.357 8	0.293 8	0.681 3
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.373 9	0.192 6
8	SNP g.7833	低温敏感组 LTSG	1.470 6	0	0.320 0	0.268 8	0.000 028
		低温耐受组 LTTG	1.923 1	0	0.480 0	0.314 6	0.000 058
9	SNP g.8224	低温敏感组 LTSG	1.724 1	0.200 0	0.420 0	0.331 8	0.028 0
		低温耐受组 LTTG	1.965 1	0.600 0	0.491 1	0.364 8	0.467 5
10	SNP g.8229	低温敏感组 LTSG	1.642 3	0.400 0	0.391 1	0.314 6	0.962 8
		低温耐受组 LTTG	1.470 6	0.400 0	0.320 0	0.370 5	0.383 1
11	SNP g.8326	低温敏感组 LTSG	1.724 1	0.466 7	0.420 0	0.331 8	0.763 2
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.268 8	0.192 6
12	SNP g.8378	低温敏感组 LTSG	1.300 6	0.266 7	0.231 1	0.204 4	0.611 1
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.314 6	0.192 6
13	SNP g.8479	低温敏感组 LTSG	1.800 0	0.533 3	0.444 4	0.345 7	0.517 3
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.314 6	0.192 6
14	SNP g.8530	低温敏感组 LTSG	1.384 6	0.200 0	0.277 8	0.239 2	0.194 3
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.314 6	0.192 6
15	SNP g.8538	低温敏感组 LTSG	1.384 6	0.200 0	0.277 8	0.239 2	0.194 3
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.314 6	0.192 6
16	SNP g.8550	低温敏感组 LTSG	1.219 5	0.200 0	0.180 0	0.163 8	0.729 4
		低温耐受组 LTTG	1.642 3	0.533 3	0.391 1	0.314 6	0.192 6

他 *TRAFL* 基因结构一致(Liu *et al*, 2020)。*TRAFL* 结构域分为 *TRAFL-N* 和 *TRAFL-C*，通过介导与受体和其他信号转导蛋白的结合和上游相互作用，在 *TRAFL* 功能

中发挥重要作用(Takeuchi *et al*, 1996)，与其他脊椎动物的同源物相比，*TRAFL-C* 结构域是 *AsTRAFL* 基因中最保守的部分，而 *TRAFL-N* 结构域则不太保守。这

与 *TRAF* 家族中对于 *TRAF-C* 高度同源和 *TRAF-N* 很多分歧的特点一致(Carpentier *et al*, 1999)。据报道, *TRAF* 结构域高度保守的 C 端部分能够与 TNFR2、CD40、CD30、LT- β R、41-BB、BCMA 和一些细胞质蛋白的细胞内部分结合, 对于 *AsTRAF1* 基因与上游分子的连接具有至关重要的作用(Eliopoulos *et al*, 2003; Fotin-Mleczek *et al*, 2004)。多变的 *TRAF-N* 端结构域则有助于 *TRAF1* 蛋白的寡聚化(Rothe *et al*, 1994)。*AsTRAF1* 基因序列比对结果表明, 特定结构域的氨基酸序列高度保守, 这些序列的组成对维持 *AsTRAF1* 基因结构和功能的完整有重要作用。

目前, *TRAF1* 基因的 mRNA 表达在哺乳动物以及脊椎动物中均已有报道。在哺乳动物, 例如小鼠和人(*Homo sapiens*)中, *TRAF1* 在扁桃体、脾脏、肺和

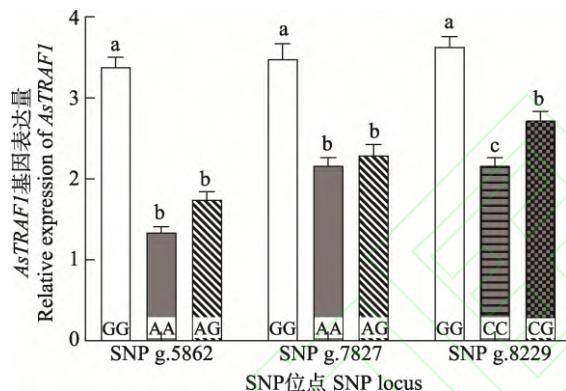


图 7 3 个 SNP 位点不同基因型的 *AsTRAF1* 表达量
Fig.7 The expression levels of *AsTRAF1* among different genotypes at the three SNP loci

睾丸中选择性表达(Mosialos *et al*, 1995), 而在脑、心脏、肝脏、肾脏和肌肉中不表达。这与其他脊椎动物中的表达模式并不一致。在黄颡鱼(尤沈丽, 2023)的研究中发现, *TRAF1* mRNA 广泛分布在所有检测的组织中, 其中, 在性腺表达量最高, 其次是脾脏, 在鳍中表达量最低($P<0.05$); 在草鱼(Xu *et al*, 2008)的研究中, *TRAF1* mRNA 也广泛分布在所检测的组织中,

在心脏中表达量最高, 其次在头肾、胸腺中, 随后在脑、鳃、肝和脾脏中, 而在躯干和肾中表达量最低; 在本研究中, *TRAF1* 基因在所研究的黑鲷各个组织中也都有不同程度的表达, 其中, 在肾中的表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$), 其次是肌肉、心脏和肝脏, 表达量最低的是脑组织。通过几种脊椎动物 *TRAF1* mRNA 组织表达模式与哺乳动物相比较, 可以看出由于物种差异, 在脊椎动物中 *TRAF1* 基因可能发挥着更大的作用。根据各组织的表达量研究结果, *AsTRAF1* mRNA 在免疫相关组织中有较高表达量, 这与 *TRAF1* 基因的功能定位相一致, 其主要功能为参与免疫应答调节相关途径(金虹等, 2017)。*AsTRAF1* 基因在黑鲷低温胁迫实验中各组样品部分组织中的表达模式分析表明, 其在所有组织中呈现在低温耐受组高表达, 在低温敏感组中低表达的特征, 说明在低温胁迫下, *AsTRAF1* 基因参与了黑鲷的低温胁迫应答。尤其在肌肉中, *AsTRAF1* 基因表达低温耐受组与低温敏感组相较有显著差异, 而先前的研究证实, 鱼类在低温胁迫时会通过调整脂肪酸组成来应对外界环境变化(Hsieh *et al*, 2003)。肌肉是脂肪代谢最重要的组织器官, 机体受环境胁迫时, 肌肉提供必需的脂肪酸以抵抗外界环境变化(Mourente *et al*, 2002)。而在暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)低温胁迫下肌肉组织 MAPK 通路的研究中已经证实 MAPK 通路的激活促进了肌肉脂肪酸的合成(褚鹏, 2021), 故而猜测可能是 *AsTRAF1* 通过调控了 MAPK 信号通路中 JNK 通路的激活(Sabbagh *et al*, 2008)来调节下游脂肪细胞的分化的上调, 从而使得鱼体能够在一定程度上调节脂肪合成来应答低温胁迫对鱼体产生的影响。

SNP 位点可分为编码区和非编码区 SNP 位点。编码区的 SNP 位点可以改变蛋白质的氨基酸从而影响功能表达, 而非编码区的 SNP 位点主要是在转录

表 3 *AsTRAF1* 基因 SNP 在 2 个群体中的基因型检测结果
Tab.3 The genotyping results of the *AsTRAF1* gene SNP in two populations

位点 Position	基因型 Genotype	低温敏感组 LTSG		低温耐受组 LTTG	
		样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency
SNP g.5862	AA	4	0.066 7	0	0
	GG	28	0.466 7	24	0.400 0

	AG	28	0.466 7	36	0.600 0
	AA	2	0.033 3	0	0
SNP g.7827	GG	38	0.633 3	28	0.466 7
	AG	20	0.333 3	32	0.533 3
	CC	2	0.033 3	0	0
SNP g.8229	GG	34	0.566 7	36	0.600 0
	CG	24	0.400 0	24	0.400 0
	AA	2	0.033 3	0	0
SNP g.8326	AG	24	0.466 7	32	0.533 3
	GG	30	0.500 0	28	0.466 7
	AA	26	0.433 3	28	0.466 7
SNP g.8479	AG	32	0.533 3	32	0.533 3
	GG	2	0.033 3	0	0

阶段影响转录因子的结合以及剪切位点, 不会改变基因编码的氨基酸序列(Reumers *et al*, 2008)。在本研究中, 在黑鲷的 *TRAFl* 基因编码区发现了 2 个 SNP 位点, 非编码区发现了 14 个 SNP 位点。经过遗传多态性分析, 初步筛选出与耐低温性状相关的 SNP 位点有 5 个, 随后进行耐低温性状关联分析, 发现位于编码区的 SNP g.5862 位点和位于非编码区的 SNP g.7827 位点以及 SNP g.8229 位点与黑鲷的低温抗性有关。编码区的 SNP g.5862 位点和非编码区的 SNP g.7827 位点均为 GG 基因型耐受温度显著高于 AA 基因型, 而 SNP g.8229 位点则是 GG 基因型耐受温度显著高于 CC 基因型, 因此, 推断 GG 基因型为黑鲷耐低温优势基因型。SNP g.5862 位点属于非同义突变, 由甘氨酸变为丝氨酸, 丝氨酸的羟基可能引入磷酸化位点, 产生新的调控机制, 从蛋白质二级结构来看, 该位点突变造成 α -螺旋减少、 β -折叠减少、无规则卷曲增加, 可能会对蛋白质的稳定性和功能产生影响, 增强其信号传导功能, 进而提高黑鲷对低温的耐受能力, 从蛋白质三级结构来看, 突变后 MATH 结构域

(373~498aa)的局部构象发生偏移, 尤其是 β 3-strand 区域。MATH 结构域是 *TRAFl* 与 TNFR2、TRAF2 互作的关键区域, 其构象变化可能会增强二聚化能力, 促进 *TRAFl*-TRAF2 复合物形成, 正调控 NF- κ B 通路(Zheng *et al*, 2010)。而位于非编码区的 SNP g.7827 位点以及 SNP g.8229 位点虽然不直接参与蛋白质的表达翻译, 但其可能会对 *TRAFl* 基因的转录或者在 mRNA 剪切时起到调控作用, 同样的研究在人类基因组非编码区中也有发现(Gao *et al*, 2014), 人类微小 RNA-155 (hsa-miR-155)能够通过与靶基因 3'非翻译区结合来调控相关基因表达, rs5186 (A1166C)是 *AGTR1* 基因 3'UTR 区域的一个 SNP, 与高血压的发生密切相关。研究发现, A1166C 等位基因可能通过破坏 miR-155 的结合位点, 导致 *AGTR1* 表达水平升高, 从而增加高血压的风险。此外, Wang 等(2011)研究发现, 位于细胞色素 P4503A4 基因(CYP3A4)内含子区域中的一个 SNP 位点对该基因具有显著调控作用, 具有该 SNP 位点 CC 基因型个体中, 肝脏组织中的 mRNA 表达水平都显著上调。艾加林等(2019)

表 4 *AsTRAFl* 基因 SNP 不同基因型与耐低温性状关联分析

Tab.4 Analysis of the association between different genotypes of SNP in the *AsTRAFl* and the low-temperature tolerance trait

位点 Position	类型 Type	基因型 Genotype	失衡温度 Unbalanced temperature/°C
SNP g.5862	外显子	AA	4.73±0.49 ^c
		GG	3.27±0.34 ^a
		AG	3.93±0.39 ^b
		AA	4.87±0.42 ^b
SNP g.7827	3'UTR	GG	3.33±0.26 ^a
		AG	3.74±0.51 ^{ab}

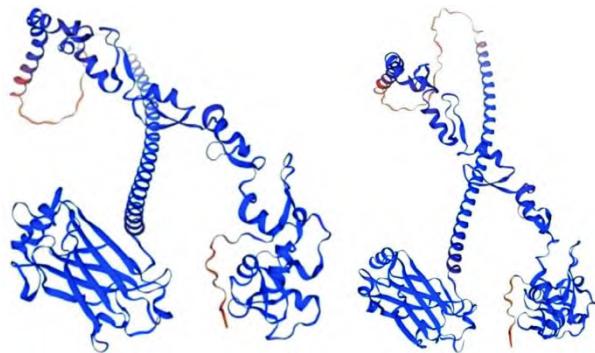
		CC	5.57 ± 0.55^c
SNP g.8229	3'UTR	GG	3.13 ± 0.37^a
		CG	4.26 ± 0.49^b
		AA	4.53 ± 0.19
SNP g.8326	3'UTR	AG	4.94 ± 0.27
		GG	4.72 ± 0.45
		AA	4.67 ± 0.20
SNP g.8479	3'UTR	AG	4.85 ± 0.20
		GG	4.75 ± 0.22

注：同一组数据中，相同字母表示该位点不同基因型之间差异不显著($P<0.05$)，不同字母表示差异显著($P>0.05$)。

Note: In the same set of data, the same letter indicates that the difference between different genotypes at the same locus is not significant ($P < 0.05$), while different letters indicate significant difference ($P > 0.05$).

表 5 *AsTRAF1* 基因突变前后蛋白质二级结构预测

Tab.5 Prediction of secondary structure of protein before and after mutation of the *AsTRAF1* gene

图 8 *AsTRAFL* 基因突变前后蛋白质二级结构预测Fig.8 Predicted protein secondary structure before and after *ASTRAFL* gene mutationA: *AsTRAFL* 无突变位点; B: *AsTRAFL* 有突变位点 SNP g.5862。h: α -螺旋; e: β -折叠; c: 无规则卷曲。A: *AsTRAFL* without mutation sites; B: *AsTRAFL* with the mutation site SNP g.5862. h: α -helix; e: β -sheet; c: Random coil.图 9 *AsTRAFL* 基因突变前后蛋白质三级结构预测Fig.9 Predicted three-dimensional structure of the protein before and after *ASTRAFL* gene mutation

研究发现,九孔鲍(*Haliotis diversicolor*)*MSTN* 基因作为肌肉生长发育负调控因子,位于编码区的 SNP g909C>T 位点的 TT 基因型个体 mRNA 表达量显著低于另外 2 种基因型。*TRAFL* 基因可以通过及时介导细胞凋亡程序,提高细胞凋亡率,防止损伤细胞聚集,避免积累坏死细胞对机体产生损害,增强机体抗逆能力(Kalliolias *et al.*, 2016),而在本研究中,位于编码区和非编码区的 SNP 位点优势基因型 GG 个体 *AsTRAFL* 基因表达量均显著高于另外 2 种基因型,说明 3 个位点的 GG 基因型与黑鲷抗低温性状显著相关。结果与以上报道相一致,SNP g.5862、SNP g.7827 和 SNP g.8229 位点的突变会上调 *TRAFL* 基因的表达量,从而提高黑鲷耐低温能力。综上,本研究结果可作为以耐低温为育种目标的分子标记,用于黑鲷耐低温品系遗传选育。

参 考 文 献

- AI J L, LI Z M, LIU J Y, *et al.* Single nucleotide polymorphisms of myostatin gene and its association with growth traits in *Haliotis diversicolor* supertexta. *Journal of Tropical Oceanography*, 2019, 38(2): 78–85 [艾加林, 栗志民, 刘建勇, 等. 九孔鲍 *MSTN* 基因 cSNP 多态性及与生长性状关联分析. *热带海洋学报*, 2019, 38(2): 78–85]
- ARKEE T, BISHOP G A. TRAF family molecules in T cells: Multiple receptors and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 107(6): 907–915
- BISHOP G A. The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(10): 775–786
- BRADLEY J R, POBER J S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*, 2001, 20(44): 6482–6491
- CARPENTIER I, BEYAERT R. TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF- κ B activation. *FEBS Letters*, 1999, 460(2): 246–250
- CHENG T, GENG D C, WANG M J, *et al.* Expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 in rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*, 2017, 37(6): 529–531 [程韬, 耿德春, 王鸣军, 等. 类风湿关节炎患者外周血肿瘤坏死因子受体相关因子 1 表达研究. *中国实用内科杂志*, 2017, 37(6): 529–531]
- CHU P. Effects of low temperature stress on MAPK pathway and lipid metabolism in muscle tissue of dark-striped pufferfish. Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2021 [褚鹏. 低温胁迫对暗纹东方鲀肌肉组织 MAPK 通路和脂类代谢的影响. 南京师范大学硕士研究生学位论文, 2021]
- ELIOPoulos A G, WAITES E R, BLAKE S M S, *et al.* TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *Journal of Virology*, 2003, 77(2): 1316–1328
- FOTIN-MLECZEK M, HENKLER F, HAUSSER A, *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(1): 677–685
- GAO X, SHI X, FU X, *et al.* Human tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN) protein modulates the kinetics of AGTR1-3'UTR granule formation. *FEBS Letters*, 2014, 588(13): 2154–2161
- GREENFELD H, TAKASAKI K, WALSH M J, *et al.* TRAF1 coordinates polyubiquitin signaling to enhance Epstein-Barr virus LMP1-mediated growth and survival pathway activation. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(5): e1004890
- HAN X F, CHE M Y, SU X, *et al.* Molecular characterization of TRAF gene family in snakehead (*Channa argus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2025, 158: 110135
- HSIEH S L, CHEN Y N, KUO C M. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. *Aquaculture*, 2003, 220(1/2/3/4): 903–918
- INOUE J I, ISHIDA T, TSUKAMOTO N, *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: Adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Experimental Cell Research*, 2000, 254(1): 14–24

- JANG H, KIM S, KIM D Y, et al. TRAF1 from a structural perspective. *Biomolecules*, 2024, 14(5): 510
- JIN H, LI J, GAO L. Research progress of tumor necrosis factor receptor-associated factors. *China Medical Herald*, 2017, 14(11): 39–42 [金虹, 李竟, 高凌. 肿瘤坏死因子受体相关因子的研究进展. *中国医药导报*, 2017, 14(11): 39–42]
- KALLIOLIAS G D, IVASHKIV L B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, 12(1): 49–62
- LAI Z X, LIU Y, WANG Q H, et al. cDNA Cloning of FBP gene in *Pinctada fucata martensi* and its response to temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 106–114 [赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensi*)FBP 基因的克隆及其对温度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 106–114]
- LI K M, LI M, WANG N, et al. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the TRAF gene family in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 13–25
- LIN Z J. Development of growth-related SNPs markers in *Sparus macrocephalus* and their association with growth traits. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2022 [林志杰. 黑鲷生长相关SNPs标记开发及其与生长性状关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2022]
- LIU M, CHEN X Y, LÜ J L, et al. ALKBH5 reduce septic-induced myocardial dysfunction by regulating the TRAF1/NF-κB pathway. *The Journal of Practical Medicine*, 2024, 40(17): 2381–2389 [刘敏, 陈喜云, 吕建磊, 等. ALKBH5 通过 TRAF1/NF-κB 通路减轻脓毒症心肌损伤的机制. *实用医学杂志*, 2024, 40(17): 2381–2389]
- LIU T F, WU Y J, HAN Y W, et al. Genome-wide characterization of TNF receptor-associated factors in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* and their expression profiling in response to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 101: 88–98
- MOSIALOS G, BIRKENBACH M, YALAMANCHILI R, et al. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, 1995, 80(3): 389–399
- MOURENTE G, DÍAZ-SALVAGO E, BELL J G, et al. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: Attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture*, 2002, 214(1/2/3/4): 343–361
- REUMERS J, CONDE L, MEDINA I, et al. Joint annotation of coding and non-coding single nucleotide polymorphisms and mutations in the SNP effect and PupaSuite databases. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D825–D829
- ROTHE M, WONG S C, HENZEL W J, et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1994, 78(4): 681–692
- SABBAGH L, PULLE G, LIU Y Q, et al. ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival *in vivo*. *Journal of Immunology*, 2008, 180(12): 8093–8101
- SONG X L, YANG J W, HANS S Y, et al. Sequence characteristics of Rab7 of *Pinctada fucata martensi* and its relationship with low temperature tolerance. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(6): 155–165 [宋欣霖, 杨佳雯, 韩书雅, 等. 马氏珠母贝 Rab7 基因序列特征及其与耐低温性状的关系. *渔业科学进展*, 2023, 44(6): 155–165]
- TAKEUCHI M, ROTHE M, GOEDDEL D V. Anatomy of *traf2* distinct domains for nuclear factor-κB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(33): 19935–19942
- WAJANT H, HENKLER F, SCHEURICH P. The TNF-receptor-associated factor family: Scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cellular Signalling*, 2001, 13(6): 389–400
- WANG C X, CAO Y. Traf—an adaptor protein that regulates cell survival and death. *Foreign Medical Sciences (Pathophysiology and Clinical Medicine)*, 2000(6): 434–436 [王承兴, 曹亚. TRAF——调节细胞生存和死亡的衔接蛋白. *国外医学(生理病理科学与临床分册)*, 2000(6): 434–436]
- WANG D, GUO Y, WRIGHTON S A, et al. Intrinsic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *The Pharmacogenomics Journal*, 2011, 11(4): 274–286
- WANG Y, CHEN Z Q, WEI M L, et al. Liver transcriptome analysis of the black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) under acute low-temperature stress. *Life*, 2023, 13(3): 721
- XU X N, WANG P, SUN H B, et al. Genome-wide identification of the TRAF gene family in humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) and analysis of their expression in response to *Vibrio harveyi* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 154: 109959
- XU Z Y, SUN B J, CHANG M X, et al. Characterization and expression analysis of TNFR-associated factor 1 (TRAF1) in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 121(1/2): 44–57
- YANG Y. The effect of interference targeting TRAF1 on the apoptosis and migration of gastric cancer cell. Master's Thesis of Central South University, 2012 [杨燕. 胃癌细胞中 TRAF1 基因的干扰对其凋亡和迁移功能的影响. 中南大学硕士研究生学位论文, 2012]
- YOU S L. Molecular characterization and expression analysis of TRAF genes family in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2023 [尤沈丽. 黄颡鱼 TRAF 基因家族分子特征和表达分析. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2023]
- ZHANG W L, TANG Z Q, ZHU X H, et al. TRAF1 knockdown alleviates palmitate-induced insulin resistance in HepG2 cells through NF-κB pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 467(3): 527–533
- ZHANG Z Y, ZHANG K, CHEN S Y, et al. Draft genome of the protandrous Chinese black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*.

GigaScience, 2018, 7(4): 1–7

ZHENG C, KABALEESWARAN V, WANG Y Y, et al. Crystal structures of the TRAF2: CIAP2 and the TRAF1: TRAF2:

CIAP2 complexes: Affinity, specificity, and regulation. Molecular Cell, 2010, 38(1): 101–113

(编辑 冯小花)

Structure and SNP Locus Screening of *TRAF1* in Black Seabream and Analysis of Its Association with Low-Temperature Tolerance Traits

YU Han^{1,2}, GAO Bo², ZHANG Zhiwei^{1,2①}, ZHU Fei², JIA Chaofeng², MENG Qian², XU Dafeng², DU Shuran²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Fish Genetics and Breeding, Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China)

Abstract To investigate the function of the tumor necrosis factor receptor-associated factor (*TRAF1*) gene in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* under low-temperature stress, the full-length cDNA sequence of *TRAF1* in black seabream was obtained using RACE cloning technology. Gene structure was analyzed using bioinformatics tools, and the expression levels in various tissues of black seabream. Gene expression patterns under low-temperature stress were analyzed using qPCR. The SNP sites of *TRAF1* related to low-temperature tolerance in black seabream were screened by direct sequencing. Genetic polymorphism analysis was conducted on the selected SNP loci, including genotype typing, correlation analysis for low-temperature tolerance, association analysis between SNP loci and the expression level of *TRAF1* in black seabream, and protein structure prediction encoded by the coding region loci. The results showed that the full-length cDNA of *TRAF1* in black seabream was 3,528 bp, including a 5'UTR of 93 bp, an ORF of 1,566 bp, and a 3'UTR of 1,869 bp, encoding 521 amino acids, including 10 exons and 9 introns, with a theoretical isoelectric point of 7.67 and predicted molecular weight of 58.91 kDa. A total of 65 negatively charged residues (Asp + Glu) and 67 positively charged residues (Arg + Lys) were identified. The fat and stability indices were 77.89 and 42.72, respectively, and were classified as unstable proteins. The hydrophobicity was -0.375 and the protein domain was 373–498 bp. Subcellular localization was observed in the extracellular matrix. This protein had no signal peptide or transmembrane region and the entire protein was located outside the membrane. In addition to one ring finger domain and one MATH domain, there were 29 serine phosphorylation, 12 threonine phosphorylation, 3 tyrosine phosphorylation, 1 N-terminal glycosylation, and 1 C-terminal glycosylation sites. In the black seabream, *TRAF1* expression was detected in various tissues, including the liver, brain, muscle, gills, kidney, heart, and intestine, with the highest expression level in the kidney tissue, which was significantly higher than that in other tissues ($P<0.05$); the lowest expression was observed in the brain. Under low-temperature stress, compared to the control group, the expression level of *TRAF1* was high in the low-temperature tolerant group and decreased in the tissues of the heart, spleen, muscle, brain, and liver in the low-temperature sensitive group. By comparing the full-length DNA sequences of *TRAF1* between the tolerant and sensitive black seabream groups, 16 SNP loci were identified through screening. Among them, two SNP loci were located in the exon region and 14 were located in the 3'UTR region.

① Corresponding author: ZHANG Zhiwei, Email: zhzhwei2005@126.com

The SNP g.5862 locus in the exon region and the SNP g.7827 locus in the 3'UTR region were significantly correlated with the low temperature tolerance trait of black seabream ($P<0.05$). At the SNP g.5862 and g.7827 loci, individuals with the GG genotype had significantly lower death temperatures than those with the AA and AG genotypes ($P<0.05$). At the SNP g.8229 locus, individuals with the GG genotype had significantly lower death temperatures than those with the CC and CG genotypes ($P<0.05$). Quantitative real-time fluorescence detection revealed that among the three SNP loci of *TRAF1* in the black sea bream, the GG genotype at each locus exhibited significantly higher gene expression levels than did the other two genotypes ($P<0.05$). The SNP at g.5862 was a non-synonymous mutation in which glycine was changed to serine, which in turn caused alterations in the secondary and tertiary structures of the protein. Specifically, it was characterized by a reduction in α -helices and β -sheets, and an increase in random coils. This SNP can be used as a candidate marker for the molecular marker-assisted breeding of black sea bream having low-temperature tolerance traits.

Key words *Acanthopagrus schlegelii*; Cold tolerance; *TRAF1* gene; Gene cloning; SNP locus