

鱼类特有的Ring型E3泛素连接酶MARCH5A基因在刺激隐核虫感染下的表达分析

张东玲¹, 喻达辉², 陈健¹, 叶坤¹, 王志勇^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 广州 510300)

摘要: 为探究大黄鱼MARCH5A的免疫作用, 实验采用反转录PCR确认了该基因的cDNA序列。该序列全长1045 bp, 包含1个长度为867 bp的开放阅读框, 编码288个氨基酸; 序列分析显示该蛋白含1个RINGv和4个跨膜结构域。进化树分析表明大黄鱼有11个MARCH家族蛋白(与哺乳动物相同), 但鱼类存在多个亚型, MARCH5A为鱼类特有蛋白, 其蛋白理化性质和三维结构均与MARCH5B存在一定的差异。荧光定量PCR分析显示, MARCH5A在健康大黄鱼的多个组织中均有表达, 在血液和心脏中表达量最高, 其次为鳃和脑, 而在肾脏和皮肤中表达量最少。刺激隐核虫感染大黄鱼后, MARCH5A在皮肤中早期表达量显著上调, 第2天为对照组的9.65倍, 后期下调。在鳃、脾脏和头肾中的前期表达量也有所增加, 后期下降。结果表明大黄鱼MARCH5A在抗刺激隐核虫免疫应答过程中可能发挥重要作用。

关键词: MARCH5A; 刺激隐核虫; 免疫应答; 大黄鱼; E3泛素连接酶

中图分类号: Q 786; S 917

文献标志码: A

先天免疫是机体抵抗病原的第一道防线, 也是激活适应性免疫的基础, 在宿主清除病原的免疫过程中起着关键作用。鱼类是低等的脊椎动物, 与哺乳动物相比其适应性免疫受到水温、pH、光照周期、溶解氧等多种因素的影响。因此, 先天免疫在鱼类抵抗病原感染中的作用尤为重要^[1-2]。Membrane-associated RING-CH (MARCH) 是一类RING型E3泛素连接酶。目前, 对哺乳动物研究发现, MARCH蛋白由11个成员组成。这类蛋白精确的生理作用并不明确, 但有文献表明其与免疫相关, 如MARCH1和MARCH8可下调MHCII、CD86、TfR、HLA-DM和Fas的表达, 而MARCH4和MARCH9可下调MHCI、A2.1和CD4的表达^[3-5]。在鱼类, 仅Rebl等^[6]报道了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) MARCH5A和MARCH5B, 其中MARCH5A涉及免疫反应。实验

前期研究工作发现大黄鱼(*Larimichthys crocea*) MARCH5B与TLR7对于刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的感染呈正相关性^[7]。本研究主要报道鱼类特有MARCH5A的分子特征、分子进化与刺激隐核虫感染下的表达分析。

刺激隐核虫是一种体表寄生的原生纤毛虫, 可以感染几乎所有的海水鱼类, 危害严重时可形成暴发性流行的水生动物疫病, 造成重大的经济损失^[8-10]。大黄鱼是我国主要的海水经济养殖鱼类之一, 也是我国近海特产养殖鱼类^[11]。但是近年病害频发, 尤其以刺激隐核虫最为严重。2010年10月, 我国大黄鱼主产区宁德三都澳青山、斗帽等最密集的养殖区因感染此虫损失严重, 约12万个网箱的养殖大黄鱼死亡超过60%, 3000多户渔民受灾, 短短1个月直接经济损失近2亿元^[12-13]。目前, 对于刺激隐核虫的防

收稿日期: 2015-06-07 修回日期: 2015-08-27

资助项目: 国家自然科学基金(U1205122); 福建省自然科学基金(2015J05069)

通信作者: 王志勇, E-mail: zywang@jmu.edu.cn

治主要有药物防治和淡水浸泡,但由于水体面积大,环境污染和鱼类应激等原因,均受到限制^[14-15]。因此,有必要对大黄鱼的抗刺激隐核虫免疫防御体系进行系统研究,以便找到一种切实可行的免疫防治方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼 健康大黄鱼,平均体质量(130±15)g,购自福建省宁德市海区,寄生虫感染实验在宁德市一个养殖厂进行。实验前,进行镜检和阻动实验,确定实验鱼无刺激隐核虫及其他的体表寄生虫感染。

刺激隐核虫 采自己感染此类寄生虫的大黄鱼。在养殖大黄鱼的水泥池底角落和池壁边铺满平板,收集包囊,暗室25~26℃,培养2.5d,孵化出幼虫。

菌株和质粒 大肠杆菌 DH5α 和 pMD19-T 载体购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 刺激隐核虫感染和样品的采集

对于健康组织的采集,实验前,大黄鱼驯养10d,投喂商品化饲料。剖取5尾大黄鱼,采集每尾鱼的脑、心脏、鳃、肝脏、脾脏、肾脏、头肾、胃、肠道、皮肤、肌肉和血细胞,共12个组织,放入RNA保护液,-80℃保存。

对于刺激隐核虫感染实验,大黄鱼分为实验组和对照组,每组80尾。实验组,用孵化2h内的刺激隐核虫幼虫感染健康大黄鱼,感染剂量为25 000幼虫/尾^[16]。由于刺激隐核虫幼虫感染鱼体后,形成滋养体并自行脱落,在养殖池底形成包囊,3d后孵化出幼虫,会再次感染鱼类。

为了避免重复感染,感染3d后将鱼类移到新池。对照组除不感染寄生虫外,所有处理与实验组相同。寄生虫感染后,实验组和对照组在首次感染后6h、12h、1d、2d、3d和5d,共6个时间点,分别采集大黄鱼皮肤、鳃、脾脏和头肾,每个时间点每组取5尾鱼。

1.3 总RNA提取和cDNA合成

将组织样品按照Trizol试剂盒(英俊,广州)说明进行RNA的提取。总RNA用DNase I (Promega,北京)37℃,30min去除基因组DNA。琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,并用Nandodrop 2000进行纯度分析和浓度测定。模版cDNA第一链的合成用PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa,大连)反转录获得。

1.4 MARCH5A基因的cDNA序列确认

根据本实验室已有大黄鱼多个组织的转录组数据库拼接MARCH5A基因的cDNA序列,并根据拼接的cDNA序列设计引物MARCH5AF/R(表1)扩增MARCH5A。PCR反应条件为95℃5min;95℃30s,57℃45s,72℃1min,30个循环;72℃7min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,回收目的产物,并克隆至pMD19-T载体,由上海Invitrogen公司测序。

1.5 MARCH5A的生物信息学分析

应用NCBI中的BLAST工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行MARCH5A氨基酸的同源序列比对。并将MARCH5A的cDNA Map到大黄鱼全基因组数据库,内含子长度设置为小于750 000。根据MARCH5A cDNA片段的起始和结束位置,分析MARCH5A的基因组结构和可变剪切序列。如果Map到多个blast结果,选择最小的E-values结

表1 本研究所用的引物序列

Tab. 1 Primers used in this experiment

引物 primer	序列 sequence (5'-3')	用途 purpose
MARCH5AF	AGTTCTACTTTTCAGGCAGGTTT	cDNA identification
MARCH5AR	AGCCGACTCTCTAACGGACACTT	
MARCH5AqF	GGTCGTGGGACATAAGAAGGGT	
MARCH5AqR	AGCCTCACGATGTAATCCTCCC	qRT-PCR
β-actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	qRT-PCR
β-actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	

果分析MARCH5A的基因组结构和可变剪切序列。

此外, 应用Expert蛋白分析系统(http://www.expasy.org/)预测蛋白分子量和等电点。Signal 4.1预测蛋白的信号肽。ProtParam (http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) 对蛋白的理化性质进行分析, 并结合ProtScale (http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1) 分析蛋白质的疏水性。SWISS-MODEL(http://swissmodel.expasy.org/interactive)在线预测蛋白结构。SMART 4.0 (http://www.smart.embl-heidelberg.de/)分析序列蛋白的保守结构域、功能基序。采用ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) 和MEGA 5.0 (http://www.megasoftware.net/mega5/mega.html)对不同鱼类、鸟类、两栖类和哺乳类的MARCH家族蛋白进行氨基酸序列比对和蛋白进化分析, 构建系统进化树。

1.6 qRT-PCR分析

采用SuperReal PreMix Plus (TIANGEN, 北京)试剂盒, 使用ABI 7500 Real-time Detection System仪器。以反转录的cDNA为模板, 确定引物的扩增效率, 并确定样品的模板浓度。以肌动蛋白(β -

actin)为内参基因, 定量PCR的反应体系: 2×SuperReal PreMix Plus 10 μ L, 正反向引物MARCH5AqF/R(10 μ M) 各0.6 μ L, cDNA模板 6.8 μ L, 50×ROX Reference Dye 2.0 μ L, 反应总体积 20 μ L。每组样品生物重复5尾鱼, 技术重复3次。qPCR反应条件为95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 40个循环; 72 $^{\circ}$ C 32 s。数据处理: 根据定量PCR得出的Ct值计算出每个反应的RQ值 ($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$)^[17], 分析出基因的相对表达量, 由mean \pm SE来表示。使用SPSS16.0统计软件对数据进行样本显著性差异分析, $P < 0.05$ 为差异性显著。

2 结果

2.1 大黄鱼MARCH5A的cDNA序列分析

将大黄鱼转录组数据拼接后, 经PCR确认获得1045 bp MARCH5A的 cDNA序列(GenBank, No: KT023068), 包括81 bp 5'非翻译区, 97 bp 3'非翻译区和867 bp开放阅读框(ORF)(图1)。ORF编码288个氨基酸, 包括1个RINGv结构域(C4HC3,11~67 aa), 4个跨膜区结构域(100~122, 137~159, 204~223, 233~250 aa)(图2-a)。Signal

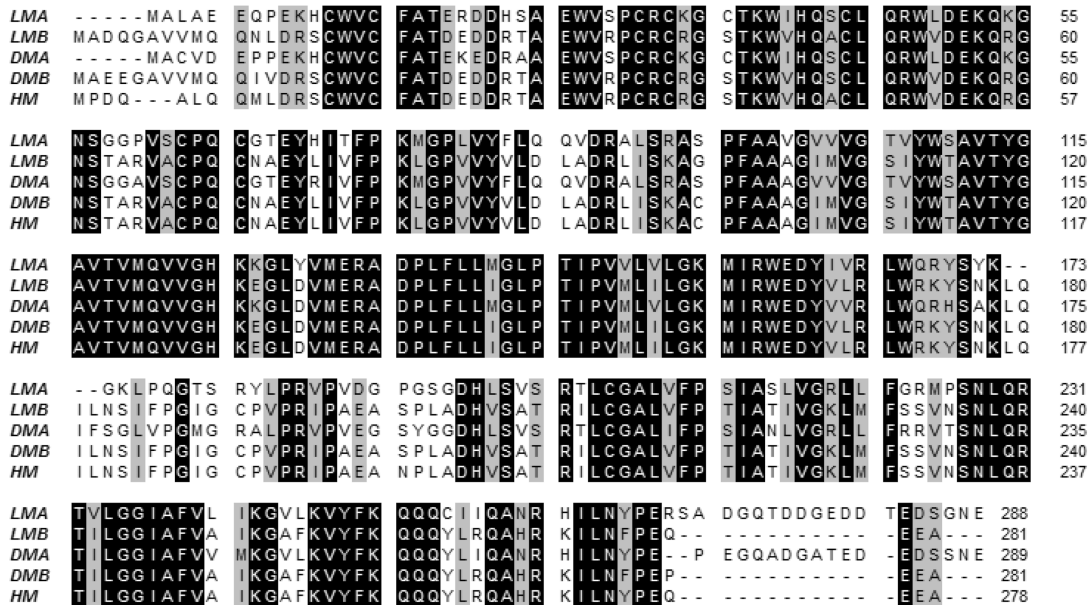


图1 大黄鱼MARCH5A/B与其他物种MARCH5氨基酸序列比对

LMA. 大黄鱼MARCH5A; LMB. 大黄鱼MARCH5B; DMA. 斑马鱼MARCH5A; DMB. 斑马鱼MARCH5B; HM. 人类MARCH5; 黑色区域. 相同序列; 灰色区域. 相似序列

Fig. 1 Alignment of the deduced amino acid sequences of *L. crocea* MARCH5 with other orthologus

LMA. *L. crocea* MARCH5A; LMB. *L. crocea* MARCH5B; DMA. *D. rerio* MARCH5A; DMB. *D. rerio* MARCH5B; HM. *Homo species* MARCH5; black background. identical sequence; grey background. similar sequence

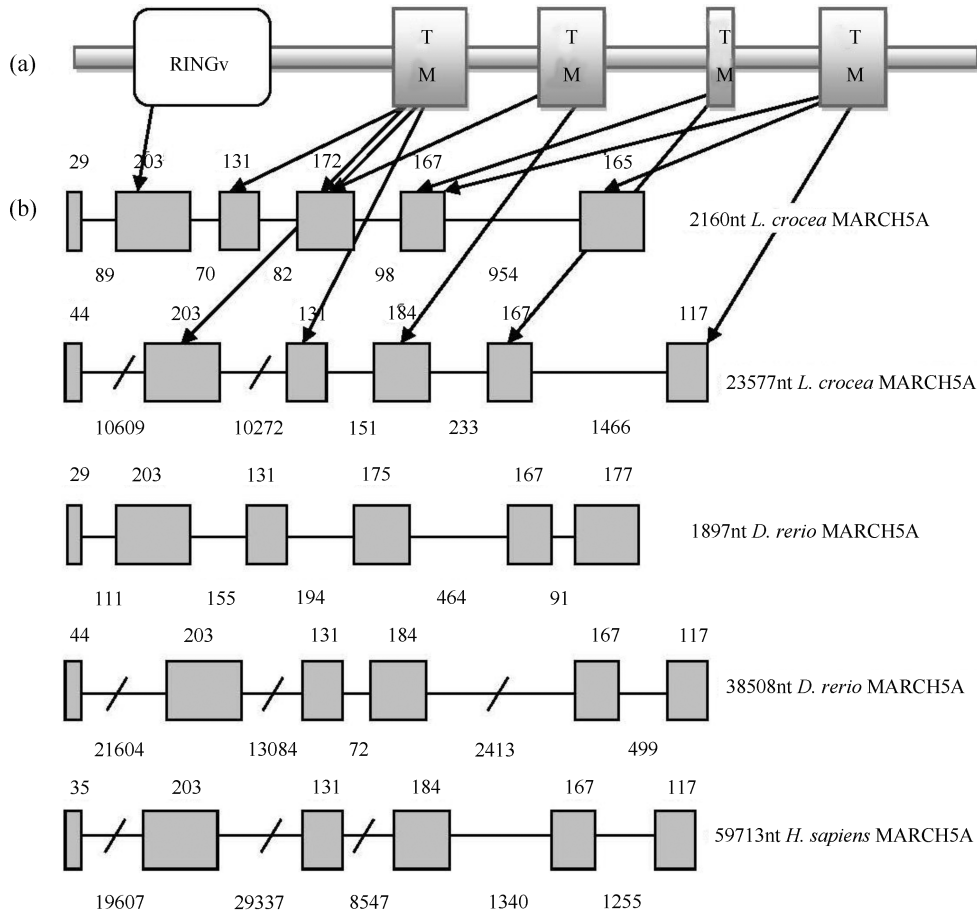


图2 *MARCH5A/B*基因组结构分析

(a) SMART预测的*MARCH5A/B*蛋白结构域,方框代表1个RINGv结构域和4个跨膜结构域(TM);(b)比较分析大黄鱼、斑马鱼和人类*MARCH5*基因组结构。方框代表外显子,直线代表内含子;外显子和内含子碱基长度分别在图示的上方和下方标示

Fig. 2 Structure features of *MARCH5A/B* genes

(a) Schematic representation of Lc*MARCH5A/B* domains predicted by SMART programs; (b) Diagrammatic comparison of *MARCH5* gene from *L. crocea*, *D. rerio*, *H. sapiens*; exons are represented by boxes, intron are represented by boxes; exon and intron lengths in base pairs are shown on the top and bottom of each figure, respectively

4.1sever分析显示其没有信号肽。Expasy推测其蛋白分子量为32.096 ku,等电点为8.48。同源比对显示大黄鱼*MARCH5A*与深裂眶锯雀鲷(*Stegastes partitus*)(相似度90%)、虹鳟(相似度84%)、斑马鱼(*Danio rerio*)(相似度79%)、人(*Homo sapiens*)(相似度64%)的*MARCH5*同源性较高。

2.2 大黄鱼*MARCH5A*的基因组序列分析

通过与本实验室大黄鱼全基因组序列比对,发现*MARCH5A*没有可变剪切结构,基因组全长为2160 bp,基因结构与斑马鱼和人类基因结构大致相同,包括6个外显子和5个内含子,并且2、3、5外显子长度在*MARCH5A/B*是保守的(图2)。*MARCH5A*的RINGv结构域由第2个外显子编

码,第2和第3个跨膜区分别由第4和第5个外显子编码,而第1和第4个跨膜区分别由第3、4和5、6外显子共同编码,这与*MARCH5B*4个跨膜区分别对应不同的外显子编码是不同的。此外,值得注意的是,*MARCH5A*的内含子长度普遍非常短(<1000 bp),而*MARCH5B*的内含子长度大多极长(大黄鱼*MARCH5B*的3个内含子长度均大于1000 bp,人类达到29 337 bp)。

2.3 大黄鱼*MARCH5A*的蛋白理化性质和三维结构分析

经ProtParam对*MARCH5A*进行分析,其氨基酸序列中带正电荷的精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)共31个,带负电荷的天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)共27个,不稳定指数为49.75,为不稳定

性蛋白。结合ProtScale分析, 得到疏水值(grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0.130, 故MARCH5A为亲水性蛋白, 但亲水性并不强(图3-a)。对比MARCH5A和MARCH5B理化性质, 后者带正电荷的精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)共31个, 带负电荷的天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)共23个, 不稳定指数为37.86, 为稳定性蛋白。经ProtScale分析, 得到疏水值为0.153, 故MARCH5B为疏水性蛋白, 但疏水性并不强(图3-b)。

应用SWISS-MODEL分别对MARCH5A/B进行三维结构预测, 结果显示二者主要以无规则折叠构成(图4)。对比MARCH5A和MARCH5B蛋白结构, 发现二者在结构上有一定的差异性, 说明二者在功能上有一定的分化差异。

2.4 MARCH家族蛋白进化树分析

对哺乳动物研究发现, MARCH家族由11个成员组成, 即MARCH1~11, 蛋白之间呈现出不同的组织分布^[18]。利用Ensemble 和NCBI搜索了所有的MARCH家族蛋白, 发现除MARCH10外, 斑马鱼有其余的MARCH家族蛋白(图5)。而大黄鱼有MARCH1~11所有蛋白。鱼类比哺乳类有更多的MARCH家族蛋白亚型, 如鱼类有7个MARCH8, 2个MARCH5, 这可能由于鱼类在进化过程中发生全基因组倍增(whole genome duplication, WGD), 导致鱼类许多新基因的产生^[19]。但某些MARCH家族蛋白也表现出在哺乳动物中倍增, 如人类有8个MARCH10, 而大黄鱼体内只发现1个MARCH10, 并且与哺乳动物MARCH10进化完全不同, 其他鱼类中并未发现MARCH10蛋

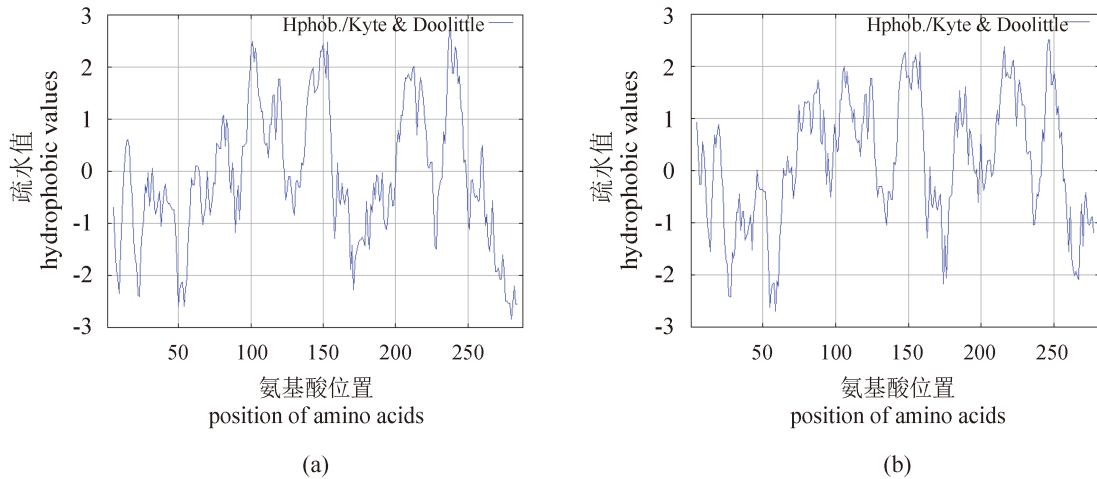


图3 MARCH5A(a)和MARCH5B(b)蛋白疏水性预测

Fig. 3 The hydrophobic prediction of MARCH5A(a) and MARCH5B(b) protein

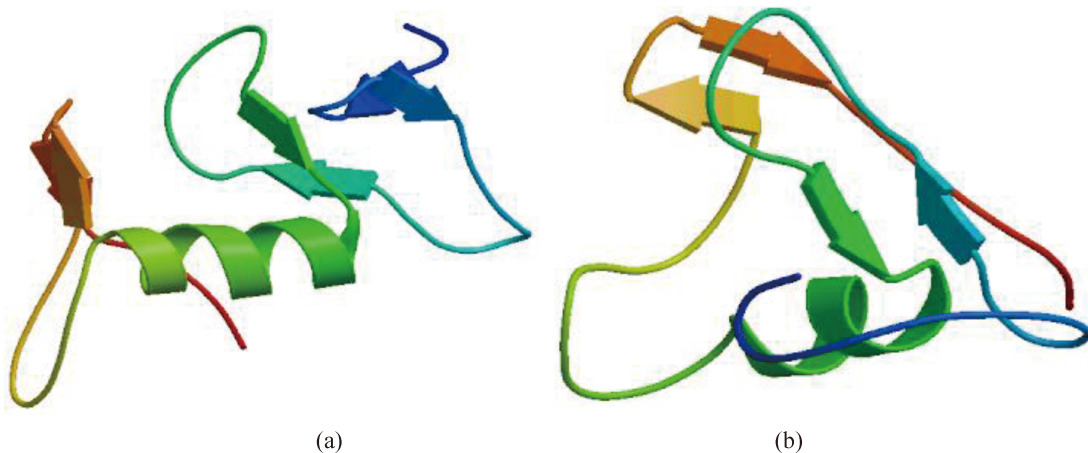


图4 MARCH5A(a)和MARCH5B(b)蛋白分子的空间结构

Fig. 4 The spatial structure of MARCH5A (a) and MARCH5B (b) predicted by SWISS-MODEL

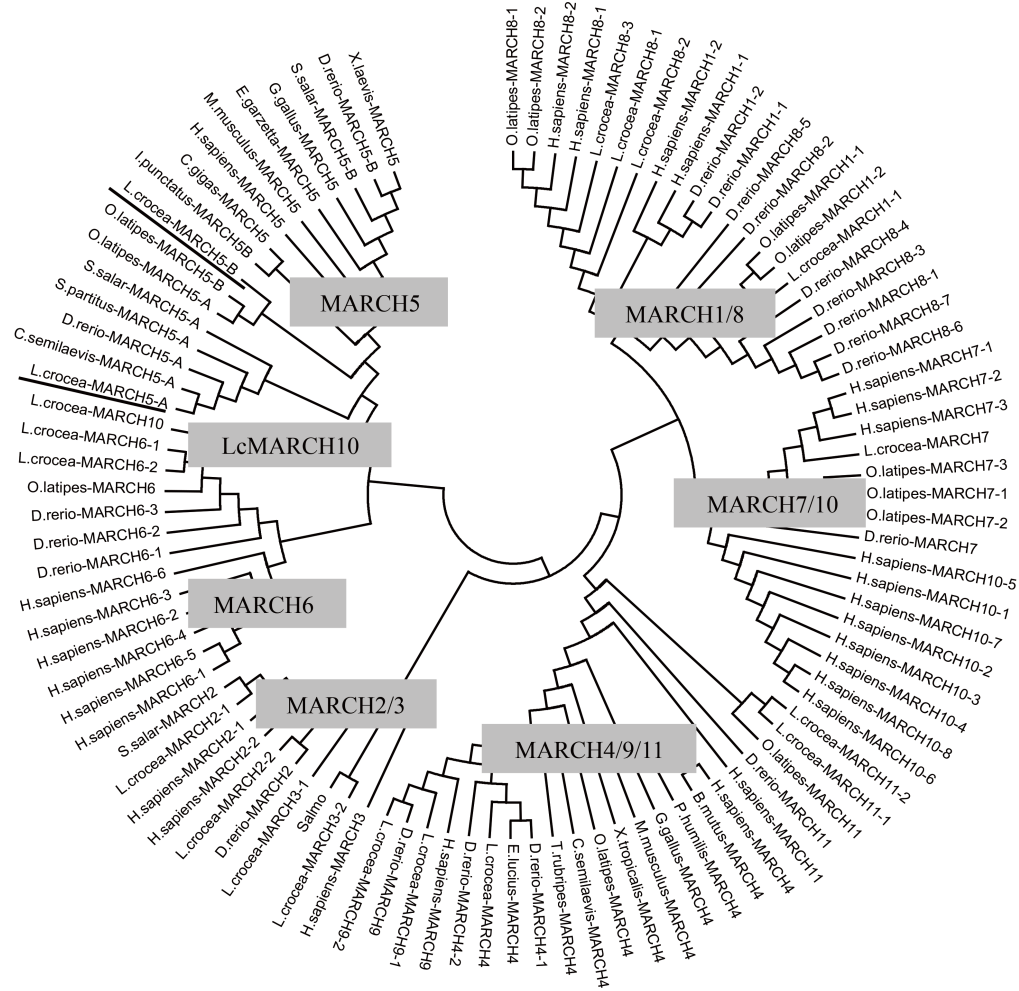


图5 MARCH家族蛋白系统进化树分析

画线部分为大黄鱼MARCH5A/B, 阴影部分代表MARCH家族不同的蛋白成员

Fig. 5 Phylogenetic analysis of MARCH family proteins from different species

Underline presents MARCH5A/B of *L. crocea*, grey background indicates the different proteins of MARCH family

白。此外, 鱼类有2个MARCH5, MARCH5B与哺乳类、鸟类和两栖类进化距离较近, 聚为一支。而MARCH5A与其他鱼类聚为一支, 为鱼类特有的一种蛋白。

2.5 大黄鱼 MARCH5A组织表达谱分析

荧光定量结果显示, MARCH5A广泛分布在健康大黄鱼的脑、心脏、鳃、肝脏、脾脏、肾、头肾、胃、肠、皮肤、肌肉和血液12个组织中(图6), 其中在血液和心脏中表达量最高, 其次为鳃和脑部, 而在肾脏和皮肤中表达量最少。

2.6 刺激隐核虫感染大黄鱼诱导 MARCH5A的表达分析

为了探究MARCH5A是否参与刺激隐核虫感染诱导的大黄鱼免疫应答, 实验应用qRT-PCR检

测了刺激隐核虫感染后大黄鱼皮肤、鳃(2个感染部位)和脾、头肾(2个主要免疫器官)中的MARCH5A表达量的变化, 以不感染刺激隐核虫的大黄鱼为空白对照组。在皮肤中(图7-a), MARCH5A在刺激隐核虫感染的初期6 h至2 d表达量显著上调, 分别为对照组的6.86、1.25、3.71和9.65倍($P < 0.05$)。随后, 在感染后的第3天, MARCH5A表达量显著下调, 为对照组的15.13%。到第5天, MARCH5A表达量恢复至对照组水平。在鳃部(图7-b), MARCH5A同样在感染初期表达量上调或无显著变化, 随后第2天和第3天表达量显著下调, 到第5天恢复至对照组水平。在脾脏和头肾中(图7-c, d), MARCH5A表达量与在皮肤和鳃中有所不同。脾脏中, MARCH5A在感染初期的第1天表达量下调, 第

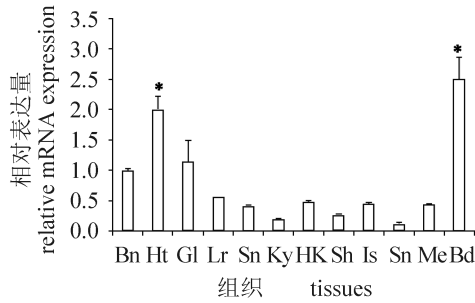


图 6 MARCH5在健康大黄鱼的不同组织中的表达分析

*代表显著性差异表达, $P < 0.05$; Bn.脑部; Ht.心脏; Gl.鳃; Lr.肝脏; Sn.脾脏; Ky.肾脏; HK.头肾; Sh.胃; Is.肠; Sn.皮肤; Me.肌肉; Bd.血液

Fig. 6 Constitutive expression of MARCH5 in healthy *L. crocea* tissues determined by qRT-PCR

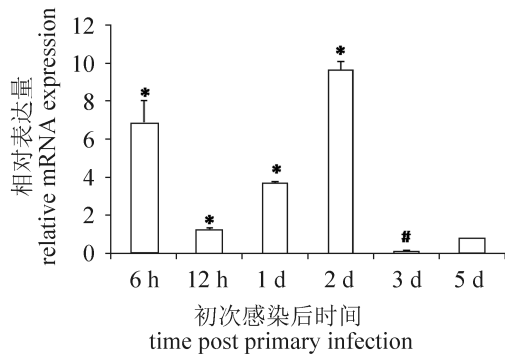
* indicated significant expression, $P < 0.05$; Bn. brain; Ht. heart; Gl. gill; Lr. liver; Sn. spleen; Ky. kidney; HK. head-kidney; Sh. stomach; Is. intestines; Sn. skin; Me. muscle; Bd. blood

2天显著上升, 但也仅为对照组的1.40倍。在头肾中, 从6 h至第3天, MARCH5A早期表达量呈

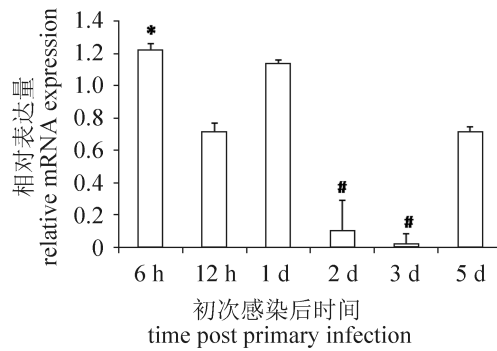
上升趋势, 但至第5天, 表达量下调。

3 讨论

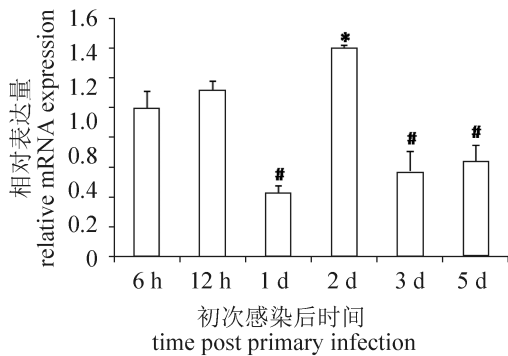
先天性免疫是机体与病原不断相互抗衡的过程。其主要由模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)、识别病原相关分子模式(recognize pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)和信号转导相关分子组成^[20-21]。E3泛素连接酶可以增强免疫信号通路中蛋白分子的表达, 也可以减弱蛋白的表达, 因此在机体的先天免疫中占有重要地位^[22-25]。而且, 越来越多的研究表明MARCH家族蛋白参与先天免疫应答, 是一类重要的免疫相关蛋白^[3-5,26-28]。本研究在大黄鱼体内确认了鱼类特有的MARCH5A蛋白, 该蛋白有1个E3泛素连接酶特有的RING γ 型结构域和4个跨膜区结构域(图1)。MARCH家族蛋白有2个(MARCH1-4, 8, 9, 11)、4个(MARCH5)和13个(MARCH6)跨膜区, 但MARCH7和MARCH10并



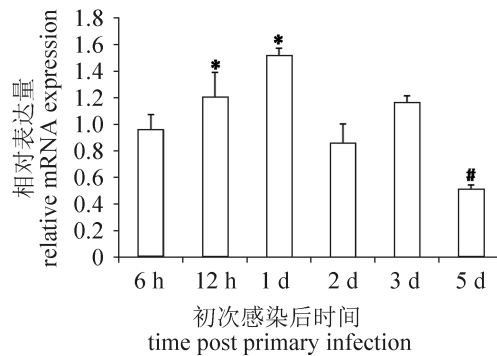
(a)



(b)



(c)



(d)

图 7 刺激隐核虫感染大黄鱼后, MARCH5基因的表达分析

(a) 皮肤; (b) 鳃; (c) 脾; (d) 头肾; *表示显著上升, #表示显著下降, $P < 0.05$

Fig. 7 MARCH5 expression of *L. crocea* infected by *C. irritans* detected by real-time PCR at different time points after challenge

(a) skin; (b) gill; (c) spleen; (d) head-kidney; * and # indicate significant up-regulation and down-regulation, respectively, $P < 0.05$

没有跨膜区,对于跨膜区的作用,目前仍无定论。

进化树分析表明大黄鱼MARCH5B与哺乳类、鸟类和两栖类聚为一支(图5),而MARCH5A仅与鱼类聚为一支,表明MARCH5A为鱼类特有蛋白。蛋白理化性质(图3)和三维结构(图4)分析发现MARCH5A与MARCH5B疏水性和蛋白结构存在较大的差异,说明MARCH5A在功能上可能与MARCH5B存在一定的分歧。此外,进化树分析(图5)表明MARCH1/8、MARCH2/3、MARCH7/10和MARCH4/9/11各聚为一支,MARCH5和MARCH6分别单独聚为一支。有文献报道MARCH1/8和MARCH4/9分别调控细胞表面MCHII和MCHI类分子的表达^[3,29],MARCH7/10主要表达在精巢,参与精子的发育^[30-31]。MARCH2/3以及MARCH11与MARCH4/9的作用是否相似有待进一步研究。另外,人类MARCH7有3个亚型单独聚为一支,而鱼类MARCH10目前仅在大黄鱼转录组中发现,且与人类MARCH10进化距离较远,以上数据提示这些蛋白可能具有其特有的作用。

MARCH5广泛分布在所检测的健康大黄鱼的12个组织中(图6),其中在血液和心脏中表达量最高,其次为鳃和脑部,而在肾脏和皮肤中表达量最少。这与虹鳟MARCH5A主要表达在脾脏、鳃和头肾不一致,可能与物种、发育阶段和遗传背景的不同有关^[6]。大黄鱼MARCH5B同样广泛分布在12个组织中,但在心脏中表达量并不高^[7],这说明二者在功能上存在一定的差异。此外,哺乳动物MARCH5主要表达在上皮细胞、淋巴细胞、树突状细胞和内皮细胞中^[18]。鱼类血液、脾脏和头肾为主要免疫器官,而哺乳类淋巴细胞和树突状细胞是免疫细胞,因此MARCH5极有可能与机体免疫相关。

MARCH5又称线粒体泛素连接酶(mitochondrial ubiquitin ligase, MITOL),亚细胞定位于线粒体。线粒体是一个重要的细胞免疫信号转导平台,有文献表明多个线粒体基因参与机体免疫^[32-34]。本研究表明大黄鱼在刺激隐核虫感染下,MARCH5A在皮肤、鳃、脾脏和头肾中表达量早期上调,后期下降,尤其在皮肤中第2天为对照组的9.65倍(图7)。对于刺激隐核虫的感染,多个基因在皮肤中(主要感染部位)表达量显著上调,如Nrpd1^[35],TLR21^[36],IL-8,COX-2,C-

type lectin和transferrin^[37]。此外,虹鳟MARCH5A在病毒性出血性败血症病毒(VHSV)感染下,在鳃中的表达量增加1.7倍^[6]。哺乳动物MARCH5结合并通过K63位泛素化TANK,因而解除了TANK对TRAF6的抑制,从而正向调控TLR7信号通路^[38]。这些数据表明MARCH5A在大黄鱼先天性免疫应答中有着重要的作用。

参考文献:

- [1] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69-73.
Nie P. Recent advances of non-specific immunity in fish [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(1): 69-73 (in Chinese).
- [2] 张艳秋,詹勇,许梓荣. 鱼类免疫机制及其影响因子[J]. 水产养殖, 2005, 26(3): 1-5.
Zhang Y Q, Zhan Y, Xu Z R. Recent developments in immunity system of Fish [J]. Journal of Aquaculture, 2005, 26(3): 1-5 (in Chinese).
- [3] Bartee E, Mansouri M, Hovey Nerenberg B T, et al. Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins [J]. Journal of Virology, 2004, 78(3): 1109-1120.
- [4] Ohmura H M, Goto E, Matsuki Y, et al. A novel family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases [J]. Journal of Biochemistry. 2006, 140(2): 147-154.
- [5] Thibodeau J, Bourgeois D M C, Huppé G, et al. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes [J]. European Journal of Immunology, 2008, 38(5): 1225-1230.
- [6] Rebl A, Köbis J M, Fischer U, et al. MARCH5 gene is duplicated in rainbow trout, but only fish-specific gene copy is up-regulated after VHSV infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(6): 1041-1050.
- [7] Zhang D L, Yu D H, Chen J, et al. Co-expression of march5b and tlr7 in large yellow croaker *Larimichthys crocea* in response to *Cryptocaryon irritans* infection [J]. Journal of Fish Biology, 2015, 87(2): 360-370.
- [8] Colorni A. Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control [J]. Aquaculture, 1987, 67(1-2): 236-237.
- [9] Yambot A V, Song Y L, Sung H H. Characterization of

- Cryptocaryon irritans*, a parasite isolated from marine fishes in Taiwan [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 2003, 54(2): 147–156.
- [10] Wright A D G, Colomi A. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite [J]. *European Journal of Protistology*, 2002, 37(4): 375–378.
- [11] Xu H, Zhang D L, Yu D H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *scd1* gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea* under cold stress [J]. *Gene*, 2015, 568(1): 100–108.
- [12] Wu C W, Zhang D, Kan M Y, *et al.* The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity [J]. *Nature Communications*, 2014, 19(5): 5227.
- [13] 周旻曦. 大黄鱼刺激隐核虫病病原生物学特性的研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
Zhou M X. Study on the biological characteristics of *Cryptocaryon irritans* on *Pseudosciaena crocea* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2012 (in Chinese).
- [14] Hirazawa N, Oshima S I, Hara T, *et al.* Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocaryon irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major* [J]. *Aquaculture*, 2001, 198(3–4): 219–228.
- [15] Hirazawa N, Goto T, Shirasu K. Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cysts and theronts [J]. *Aquaculture*, 2003, 223(1–4): 1–13.
- [16] Niu S F, Jin Y, Xu X, *et al.* Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 513–524.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] Nathan J A, Lehner P J. The trafficking and regulation of membrane receptors by the RING-CH ubiquitin E3 ligases [J]. *Experimental Cell Research*, 2009, 315(9): 1593–1600.
- [19] Volff J N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish [J]. *Heredity*, 2005, 94(3): 280–294.
- [20] Aoki T, Takano T, Santos M D, *et al.* Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives [C]//Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, *et al.* *Fisheries for Global Welfare and Environment*. Tokyo: Terrapub, 2008.
- [21] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 137–151.
- [22] Wang C, Chen T Y, Zhang J, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 ‘preferentially’ promotes TLR-mediated production of type I interferon [J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(7): 744–752.
- [23] Zhang J, Hu M M, Wang Y Y, *et al.* TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(34): 28646–28655.
- [24] Zhang M, Wang L J, Zhao X Y, *et al.* TRAF-interacting protein (TRIP) negatively regulates IFN- β production and antiviral response by promoting proteasomal degradation of TANK-binding kinase 1 [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(10): 1703–1711.
- [25] Liao Z Y, Chen X J, Nie D S, *et al.* A RING finger protein 114 (RNF114) homolog from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) possesses immune-regulation properties via modulating RIG-I signaling pathway-mediated interferon expression [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 507–516.
- [26] Yan Y Q, Jiang W, Liu L, *et al.* Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. *Cell*, 2015, 160(1–2): 62–73.
- [27] Muthukumarana P A D S, Lyons G E, Miura Y, *et al.* Evidence for functional inter-relationships between FOXP3, leukaemia inhibitory factor, and axotrophin/MARCH-7 in transplantation tolerance [J]. *International Immunopharmacology*, 2006, 6(13–14): 1993–2001.
- [28] Muthukumarana P, Chae W J, Maher S, *et al.* Regulatory transplantation tolerance and “stemness”: evidence that Foxp3 may play a regulatory role in SOCS-3 gene transcription [J]. *Transplantation*, 2007, 84(Suppl.1): 6–11.
- [29] Ohmura H M, Matsuki Y, Aoki M, *et al.* Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR [J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(1): 341–354.
- [30] Zhao B Q, Ito K, Iyengar P V. MARCH7 E3 ubiquitin ligase is highly expressed in developing spermatids of

- rats and its possible involvement in head and tail formation [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2013, 139(3): 447–460.
- [31] Iyengar P V, Hirota T, Hirose S, *et al.* Membrane-associated RING-CH 10 (MARCH10 protein) is a microtubule-associated E3 ubiquitin ligase of the spermatid flagella [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(45): 39082–39090.
- [32] Zhong B, Yang Y, Li S, *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation [J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 538–550.
- [33] Scott I. Mitochondrial factors in the regulation of innate immunity [J]. *Microbes and Infection*, 2009, 11(8–9): 729–736.
- [34] Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, *et al.* Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1 [J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(7): e1001012.
- [35] Zhang D L, Han F, Yu D H, *et al.* Characterization of E3 ubiquitin ligase neuregulin receptor degradation protein-1 (Nrpd1) in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its immune responses to *Cryptocaryon irritans* [J]. *Gene*, 2015, 556(2): 98–105.
- [36] Li Y W, Luo X C, Dan X M, *et al.* Molecular cloning of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR21 and expression analysis post *Cryptocaryon irritans* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(3): 476–481.
- [37] Li Y W, Dan X M, Zhang T W, *et al.* Immune-related genes expression profile in orange-spotted grouper during exposure to *Cryptocaryon irritans* [J]. *Parasite Immunology*, 2011, 33(12): 679–687.
- [38] Shi H X, Liu X, Wang Q, *et al.* Mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 Promotes TLR7 signaling by attenuating TANK action [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(5): e1002057.

Expression analysis of fish-specific Ring type E3 ubiquitin ligase *MARCH5A* gene with *Cryptocaryon irritans* induction

ZHANG Dongling¹, YU Dahui², CHEN Jian¹, YE Kun¹, WANG Zhiyong^{1*}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. South China Sea Resource Exploitation and Protection Collaborative Innovation Center, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: MARCH5, as an E3 ubiquitin ligase, is one of the important immune regulatory factors in mammals. To investigate the immune function of *MARCH5A* in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, the full-length cDNA of *MARCH5A* was identified in this study (named LcMARCH5A). The full-length of *MARCH5A* cDNA is 1045 bp, containing an ORF of 867 bp which encoded a 288 aa protein with one RINGv domain and four trans-membrane domains. The analysis of phylogenetic tree showed that there are 11 MARCH family proteins, same as those in mammals. However, there are many isoforms of MARCH proteins in fishes, and *MARCH5A* is fish-specific gene copy, and there are some differences in physical and chemical parameters and spatial structure between LcMARCH5A and LcMARCH5B. Tissues distribution showed that *MARCH5A* transcripts were broadly distributed in all detected tissues, with high expression in blood and heart, moderate in gill and brain, low in kidney and skin as indicated by qPCR analysis. After *Cryptocaryon irritans* challenge, the mRNA of *MARCH5A* was significantly up-regulated early in the skin and reached a peak with 9.65-fold to the control at day 2, then down-regulated thereafter. In the gill, spleen and head-kidney, the expression also increased early, and later decreased. These results showed that *MARCH5A* plays an important role in fish defense against *C. irritans* infection.

Key words: MARCH5A; *Cryptocaryon irritans*; immune response; *Larimichthys crocea*; E3 ubiquitin ligase

Corresponding author: WANG Zhiyong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U1205122); Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2015J05069)