



大黄鱼 *UBXN1* 基因鉴定及其过表达后的转录组分析

张东玲, 唐欣, 王志勇*

(集美大学, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探究一种包含泛素调节性 X 结构域的蛋白 (ubiquitin regulatory X domain-containing protein, *UBXN1*) 在大黄鱼抗盾纤毛虫感染中的作用, 以及可能涉及的免疫信号通路。本实验克隆鉴定了大黄鱼 *UBXN1* 基因, 并利用在线软件对其序列特征进行生物信息学分析; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *UBXN1* 在健康大黄鱼各组织中的表达, 及盾纤毛虫感染后的诱导表达变化; 并进行了 *UBXN1* 的亚细胞定位; 转录组测序分析了 *UBXN1* 过表达前后的差异表达基因。结果显示, *UBXN1* 基因 cDNA 全长为 915 bp, 编码 304 个氨基酸。蛋白多重序列比对和结构预测表明 *UBXN1* 是一个进化保守的蛋白, 包含 UBA 和 UBX 结构域。qRT-PCR 分析表明 *UBXN1* 在所检测的 11 种组织中均有表达, 脑中表达量最高, 其次是肝脏、心脏和肾脏, 在肌肉中表达量最低; 盾纤毛虫感染大黄鱼后, *UBXN1* 在脾脏、脑、肝脏和肾脏中表达量早期显著升高, 后期逐步恢复至正常水平。亚细胞定位分析表明, *UBXN1* 在大黄鱼肾脏细胞质和细胞核中均有表达。在 293T 细胞过表达 *UBXN1*, 转录组差异表达分析筛选到 12 个上调基因, 4 个下调基因, 其中 *RPL41/RPL39/XIST/RNA45SN4* 表达量显著增加, 而 *ATP8/ND4L* 表达量显著减少。研究表明 *UBXN1* 在大黄鱼抗寄生虫免疫应答中发挥重要作用。本实验为进一步研究 *UBXN1* 的免疫信号通路奠定基础。

关键词: 大黄鱼; 包含泛素调节性 X 结构域的蛋白 (*UBXN1*); 盾纤毛虫; 转录组; 免疫

中图分类号: Q 786; S 942.1

文献标志码: A

包含泛素调节性 X 结构域的蛋白家族 (ubiquitin regulatory X domain-containing protein, *UBXN*) 是一种具有泛素相关蛋白基序的蛋白亚类。在哺乳动物, 该家族有 13 个成员, 即 *UBXN1*、*UBXN2A-2C*、*UBXN3A-3B*、*UBXN4*、*UBXN6~11*, 每个成员蛋白质 C 末端都具有一个 UBX 结构域, 但 N 端结构域是多种多样的, 并且因为在细胞内定位方式的不同而发挥着不同的作用。根据结构的不同, *UBXN* 家族分为 2 类, 第一类 UBA-UBX 组成员 (*UBXN1/2C/3A-3B/7*) 包含一个 N 端

UBA 结构域和一个 C 端 UBX 结构域; 第二类 UBX 组成员 (*UBXN2A-2B/4/6/8-11*) 只含有一个 C 端 UBX 结构域。Alexandru 等^[1] 通过蛋白质组学研究表明, UBA-UBX 组成员能够识别 K48 和 K11 链, 优选 K11, 并与不同家族的 E3 泛素连接酶结合, 表明 UBA-UBX 组成员在泛素-蛋白酶体途径中发挥着重要作用。泛素-蛋白酶体途径在免疫应答、抗原提呈、信号转导、细胞周期调控等生物学功能中发挥着重要作用, 因此, *UBXN* 家族蛋白极可能涉及生物的免疫过程。

收稿日期: 2022-12-23 修回日期: 2023-04-16

资助项目: 国家自然科学基金 (32172964); 福建省自然科学基金重点项目 (2022J02042)

第一作者: 张东玲 (照片), 从事鱼类抗病遗传育种研究, E-mail: zhangdongling@jmu.edu.cn

通信作者: 王志勇, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: zywang@jmu.edu.cn



UBXN1 是一个含有 UBA 与 UBX 结构域的泛素结合蛋白, 最开始被鉴定为一个含有 UBA 结构域的人类 (*Homo sapiens*) Y33K 蛋白^[2], 后被发现广泛分布于真核生物中^[3-5]。研究发现, UBXN1 不仅参与 p97 依赖的调控内质网中错误折叠蛋白质的降解过程, 而且不依赖于 p97, 作为干扰素通路的下游靶基因。UBXN1 在病毒感染后期被强烈诱导表达, 并通过竞争 TRAF3/6 与线粒体外膜蛋白 MAVS 结合及 MAVS 寡聚化, 最终灭活 RNA 病毒感染激活的干扰素信号通路和 NF- κ B 信号通路, 避免过度炎症的发生; 敲降 UBXN1, 能够诱导 IFN- β 和促炎细胞因子表达, 并抑制西尼罗河病毒和登革热病毒的复制^[6]。Wang 等^[7] 进一步证实了 UBXN1 负向调控 NF- κ B 信号通路, UBXN1 能够与泛素连接酶 cIAP1/2 结合, 通过竞争 cIAPs 与 TRAF2 的结合, 显著降低 TNF α 诱导的 TNFR1 复合物的组装和 RIPK1 的泛素化。此外, Hu 等^[8] 研究发现 UBXN1 能够阻断 NF- κ B 经典信号通路, 并通过与 Cul1 的相互作用抑制逆转录病毒和慢病毒复制。Yi 等^[9] 也表明 PTRF 通过抑制 UBXN1 表达激活 NF- κ B 活性。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国养殖产量最大的海水经济鱼类, 网箱养殖是其主要的养殖模式。高密度的养殖模式造成大黄鱼病害频发, 盾纤毛虫病是鱼苗期主要病害, 死亡率高达 30%, 尤其以网箱暂养阶段更为严重^[10-11]。前期工作中, 实验在大黄鱼抗盾纤毛虫全基因组关联分析 (GWAS) 中发现 UBXN1 可能与该病的抗性相关^[10]。在此基础上, 本研究对大黄鱼 UBXN1 基因序列和结构进行分析, 采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 UBXN1 组织表达谱和诱导表达变化, 并进行了亚细胞定位研究, 及过表达后的转录组分析。研究结果为诠释 UBXN1 基因的免疫功能和信号通路提供了新的参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用大黄鱼来源于福建省宁德市官井洋大黄鱼养殖有限公司, 体重约为 4 g, 实验前检测无寄生虫感染。本研究实验过程中操作人员严格遵守集美大学实验动物管理和使用伦理规范, 并按照集美大学实验动物管理和使用伦理委员会制定的规章制度执行。

<https://www.china-fishery.cn>

1.2 大黄鱼 UBXN1 的序列确认和生物信息学分析

取大黄鱼肝脏和脾脏, 混合后用于提取 RNA, 提取方法按照 TransZol Up Plus RNA 试剂盒说明书操作。cDNA 合成根据 Promega 的 GoScript 反转录试剂盒操作说明进行, 合成的第一链 cDNA 于 -20 °C 保存备用。在本实验室大黄鱼基因组数据库中搜索 UBXN1 cDNA 序列全长, 设计引物 (表 1), PCR 扩增, 测序确认 UBXN1 序列。使用 SMART 软件 (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode) 分析蛋白的功能结构域, ClustalX 进行序列比对, EXPASY 在线分析蛋白分子质量和理论等电点。

1.3 大黄鱼 UBXN1 的组织分布和诱导表达分析

用于组织分布检测的组织包括头肾、肾脏、脾脏、鳃、肝脏、肠道、皮肤、胃、心脏、脑和肌肉。以 β -actin 为内参进行 qRT-PCR (表 1), 每组样品生物重复 3 尾鱼, 技术重复 4 次。qRT-PCR 反应条件为 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因的相对表达量, SPSS 软件 20.0 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

寄生虫感染实验中, 盾纤毛虫 (Scuticociliatia) 分离于染病的大黄鱼鱼苗, 在海水中 16 °C 培育扩增, 每日投喂混合性菌群。大黄鱼鱼苗分为实验组和对照组, 每组 50 尾。盾纤毛虫的感染剂量为 4.3×10^5 个/L, 感染前先将水池水位下降至 1/3, 盾纤毛虫感染大黄鱼 48 h 后, 随机抽检鱼苗, 发现均被盾纤毛虫感染后, 注满清洁海水, 每日检测鱼苗病变及感染虫体数量。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, 实验组和对照组在感染后 0 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d 和 7 d 共 7 个时间点, 分别采集大黄鱼脾脏、脑、肝脏和肾脏, 每个时间点每组取 5 尾鱼。qRT-PCR 分析大黄鱼在盾纤毛虫感染下, UBXN1 基因的表达变化。

1.4 亚细胞定位和过表达转化物的构建

设计构建亚细胞定位和过表达转化物的引物 pEGFP-UBXN1F/R 和 pcDNA-UBXN1F/R (表 1), 并以肝脏 cDNA 为模板, PCR 扩增获得插入片段。用 Sac I 和 Sma I 酶切 pEGFP-N1 载体质粒, Xho I 和 Hind III 酶切 pcDNA3.1(+)-Myc-HisB 载体质粒,

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

表 1 实验中用到的引物

Tab. 1 Primers in the experiments

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	目的 purpose
qUBXN1F	GGACAAACTGGCAAGGCAGAGG	qRT-PCR
qUBXN1R	CAGACGGACCTGTATCCTGGACTC	
β -actinF	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	
β -actinR	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	
pEGFP-UBXN1F	CCGGACTCAGATCTCGAGCTCgtaggcagagcaacaacactagag	cDNA identification and subcellular localization
pEGFP-UBXN1R	TGGCGACCGGTGGATCCCGGggtcttttggtaacaaccagcacag	
pcDNA-UBXN1F	AACGGGCCCTCTAGACTCGAGgtaggcagagcaacaacactagagag	overexpression
pcDNA-UBXN1R	AGTTTTTGTCTAGAAAGCTTggtcttttggtaacaaccagcacagctg	

37 °C 酶切 30 min, 按照 ClonExpress® II 一步克隆说明书将胶回收产物和酶切后的质粒进行连接。连接产物转化至 DH5 α 细胞, 挑取单克隆, 条带大小验证正确后, 送厦门瑞辰铂生物科技有限公司测序。

1.5 大黄鱼 UBXN1 的亚细胞定位和过表达

对于亚细胞定位分析, 使用电转法将重组质粒 pEGFP-UBXN1 转染至大黄鱼头肾细胞 (福建农林大学陈新华教授赠送), 28 °C, 培养基为 Leibovitzs L-15。细胞转染 24 h 后, 去除培养基, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗细胞 2 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min。去除多聚甲醛, 缓冲液重复清洗 3 次, 0.2% Triton X-100s 透化细胞。用 DAPI 避光核染 15 min, PBS 清洗细胞 2 次, 激光共聚焦显微镜拍片观察。

对于过表达分析, 293T 细胞在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 24 h, 细胞铺满底部 70%~80% 时进行转染。按照 Lipofectamine™ 3000 Reagent 试剂盒 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 说明书进行转染, 设置 pEGFP-N1 作为空载对照, pEGFP-UBXN1 作为实验组。细胞转染 24 h 后, 收集细胞, 免疫印迹 (Western Blot) 检测 UBXN1 表达水平。

1.6 Western Blot 检测

转染后的细胞用预冷的 PBS 清洗 2 次, RIPA lysis 裂解细胞 15 min, 4 °C 条件下 12 000 \times g, 离心沉淀蛋白 10 min; 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 在半干转膜仪 (Bio-Rad, 美国) 上将蛋白转印至 PVDF 膜上, TBS-T 洗涤 3 次, 5% BSA 的 TBS-T 室温封闭 1 h。加入 1 : 1 000 的 His-tag 抗体 (兔多抗), 4 °C 孵育过夜; TBS-T 洗涤 3 次, 二抗 (山羊抗兔) 继续孵育 1 h, 清洗 3 次, 加入显

色液, 拍照观察。

1.7 UBXN1 过表达后的转录组分析

确认蛋白过表达后, 收集细胞提取 RNA (3 个生物学重复), 将质量合格的 RNA 样品进行文库构建, 采用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行高通量测序。转录组数据用 FastQc 软件过滤得到净数据 (clean reads), STAR 软件将 clean reads 比对到人类参考基因组 (GenBank: GRCH38)。StringTie 软件对每个样本进行转录本组装, 并利用 StringTie 软件 merge 功能将所有组装的转录本进行合并, 组成一个所有个体的综合转录本。使用 FeatureCounts 工具对基因表达量进行计数 (count 计数)。基于对基因表达量的计数, 利用 DESeq2 软件对实验组和对照组样本进行差异表达基因筛选, $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 0.9$, $P_{\text{adj}} < 0.01$ 作为筛选标准。

2 结果

2.1 UBXN1 序列和结构分析

大黄鱼 UBXN1 的 ORF 全长为 915 bp, 编码 304 个氨基酸 (aa), 包含 9 个外显子、8 个内含子。蛋白质的分子质量约为 34.35 ku, 理论等电点为 4.75。SMART 结构域预测 UBXN1 有 2 个功能结构域, UBA 和 UBX (图 1)。同源序列比对, 大黄鱼与棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) UBXN1 氨基酸一致性高达 98.03%, 与模式生物青鳞 (*Oryzias latipes*) UBXN1 氨基酸一致性为 82.74%, 与人类 UBXN1 同源性为 32.01%。

2.2 大黄鱼 UBXN1 的组织分布和亚细胞定位分析

采用荧光定量 PCR 技术检测 UBXN1 在健康

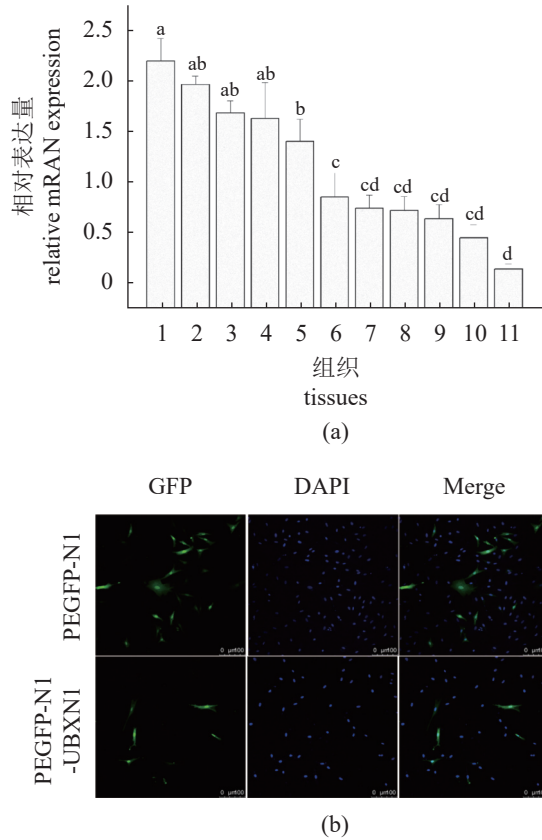


图2 *UBXM1* 在大黄鱼不同组织中的表达 (a) 和头肾细胞中的亚细胞定位 (b)

不同小写字母表示不同组织表达量差异显著 ($P < 0.05$): 1. 脑, 2. 肝脏, 3. 心脏, 4. 肾脏, 5. 鳃, 6. 脾脏, 7. 皮肤, 8. 头肾, 9. 肠道, 10. 胃, 11. 肌肉; GFP. 绿色荧光蛋白, DAPI. 细胞核被染色, Merge. GFP 和 DAPI 图合并。

Fig. 2 Tissues distribution (a) and subcellular localization of *LcUBXM1* (b)

Different lowercase letters indicate that there are significant differences between different tissues ($P < 0.05$): 1. brain, 2. liver, 3. heart, 4. kidney, 5. gill, 6. spleen, 7. skin, 8. head kidney, 9. intestine, 10. stomach, 11. muscle; GFP. green fluorescent protein, DAPI. cytoplasm dyed, Merge. GFP and DAPI pictures merged.

2.4 大黄鱼 *UBXM1* 在 293T 细胞过表达后转录组分析

Western Blot 检测外源蛋白 *UBXM1* 在 293T 细胞中的表达变化。与空载体对照组相比, 大黄鱼 *UBXM1* 在 293T 细胞成功过表达 (图 4-b)。转录组差异表达基因筛选表明, 与对照组相比, 12 个基因上调表达, 4 个基因下调表达 (图 4-a, 表 2), *RPL41/RPL39/XIST/RNA45SN4* 表达量显著增加, 而 *ATP8/ND4L* 表达量显著减少。KEGG 富集分析显示 (图 5), 差异表达基因富集到 10 个信号通路中, 涉及多种疾病的发生。

表 2 差异表达的基因

基因名称 gene name	\log_2 倍数改变 \log_2 (Fold Change)	校正 P 值 P_{adj}
<i>RPL41</i>	2.067 75	2.15E-11
<i>RPL39</i>	1.815 64	8.19E-18
<i>XIST</i>	1.701 34	2.09E-06
<i>RNA45SN4</i>	1.618 73	7.30E-17
<i>UQCRHL</i>	1.290 31	4.41E-14
<i>NCR3LG1</i>	1.115 51	2.82E-10
<i>RPS27</i>	1.105 00	1.12E-07
<i>KCNQ1OT1</i>	0.988 56	0.000 69
<i>NHP2</i>	0.988 44	5.36E-09
<i>LSM7</i>	0.982 13	1.77E-05
<i>SSBP1</i>	0.941 14	0.000 12
<i>CIAO2B</i>	0.939 17	0.003 36
<i>ATP8</i>	-1.642 41	9.90E-52
<i>ND4L</i>	-0.932 66	5.90E-57
<i>PSENE1</i>	-0.919 43	3.08E-05
<i>ND6</i>	-0.847 45	9.23E-27

3 讨论

盾纤毛虫是一种兼性寄生虫, 在大黄鱼体内均可寄生, 可通过血液到达机体各个组织器官, 以脑组织居多, 最终鱼体出血、衰竭死亡。盾纤毛虫除感染大黄鱼外, 还可感染多种海水鱼、虾、蟹、海参、沙蚕等, 目前盾纤毛虫病尚无有效防治措施。实验前期从海区采集大黄鱼感染盾纤毛虫易感和抗性个体, 进行低深度重测序, GWAS 分析发现一个极显著的 SNP 位于 *UBXM1* 外显子上。多项研究表明 *UBXM1* 负向调控 NF- κ B 信号通路^[6-9], Valle 等^[12] 通过盾纤毛虫和大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 互作转录组分析发现 NF- κ B 信号通路参与寄生虫感染过程, 因此, 推测 *UBXM1* 可能参与大黄鱼抗盾纤毛虫过程。

目前, 哺乳动物 *UBX* 家族成员仅有小部分生理功能被发现, 大部分成员仍未被研究, 鱼类中未见有关 *UBX* 家族成员的报道。大黄鱼 *UBXM1* 包含 UBA 和 *UBX* 结构域, UBA 结构域能够结合泛素链^[13], 而 *UBX* 结构域包含大约 80 个氨基酸残基, 与泛素具有弱同源性, 三维结构和泛素的十分相似, 能够与 AAA-ATP 酶的分子伴侣-蛋白即含缬酪肽蛋白 (valosin-containing protein, VCP/p97) 的氨基末端相结合^[14]。通过蛋白质间相互作用

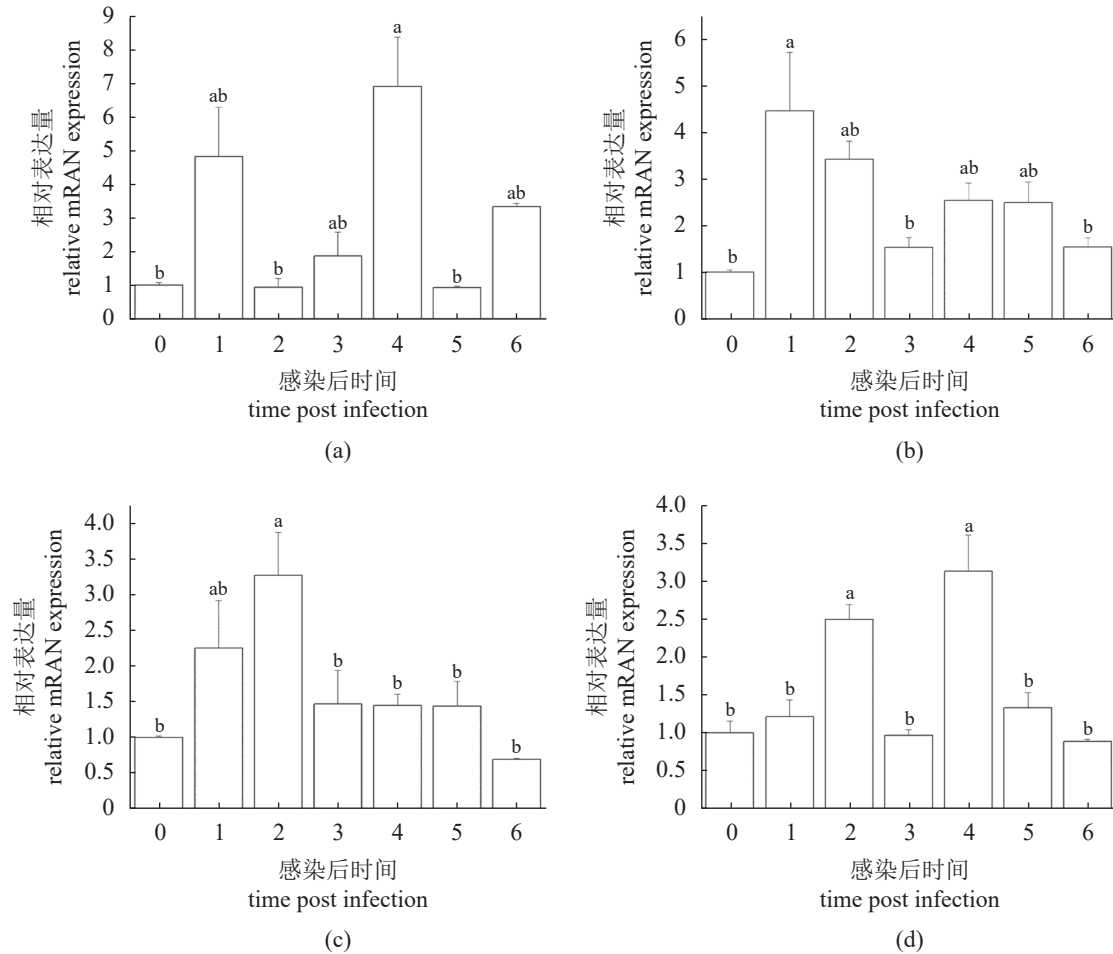


图3 盾纤毛虫感染下大黄鱼 *UBXM1* 在不同组织中的表达变化

(a) 脾脏, (b) 脑, (c) 肝脏, (d) 肾脏; 0. 0 h, 1. 12 h, 2. 1 d, 3. 2 d, 4. 3 d, 5. 5 d, 6. 7 d; 不同小写字母表示不同时间点表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 The expression level of *LcUBXM1* upon scuticociliate in different tissues

(a) spleen, (b) brain, (c) liver, (d) kidney; 0. 0 h, 1. 12 h, 2. 1 d, 3. 2 d, 4. 3 d, 5. 5 d, 6. 7 d; different lowercase letters indicate that there are significant differences between different time intervals ($P < 0.05$).

用研究表明, VCP 蛋白的氨基末端结构域的两个亚结构域之间的疏水口袋是其与 UBXM1 结构域的结合位点, VCP 与 UBXM1 结构域的结合具有比与泛素蛋白结合更高的亲和力^[15-17]。VCP 蛋白在细胞膜融合、转录调控、细胞周期调控、纺锤体组装和蛋白质折叠过程中扮演着重要的角色^[18-21], 这提示 UBXM1 可能在细胞信号传导过程中扮演着重要的角色。此外, VCP 的突变在哺乳动物多个组织中产生疾病表型^[22-23], 提示 UBXM1 可能与疾病发生相关, 或者调控免疫信号传导。

在哺乳动物, UBXM1 的 UBA 结构域 (1~86 aa) 可以与线粒体外膜上的 MAS (438~467 aa) 相结合, 因此 UBXM1 应该存在于哺乳动物的细胞质中, 这与实验的亚细胞定位结果一致, 说明

鱼类与哺乳动物 UBXM1 的免疫功能相似。但是, 本研究发现 UBXM1 也在细胞核中表达, 暗示鱼类 UBXM1 还存在其他信号调控通路。盾纤毛虫感染大黄鱼早期, UBXM1 在脾脏、脑、肝脏和肾脏的表达量有所提高, 在感染后期恢复至正常水平。Yuan 等^[24] 研究发现, 猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 感染猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 晚期时, UBXM1 的蛋白和 RNA 表达量显著增加; 进一步研究发现, UBXM1 可以与猪传染性胃肠炎病毒的 S1 结合, 敲降 UBXM1, TGEV 在 IPEC-J2 中复制量显著减少, 且 S1 蛋白下调表达; 相反, 过表达 UBXM1, TGEV 复制量急剧增加。此外, UBXM1 可以降解肌纤维蛋白质, 其启动子区域单核苷酸的多态性与猪肌肉系水力水平相关^[25]。寄生虫感

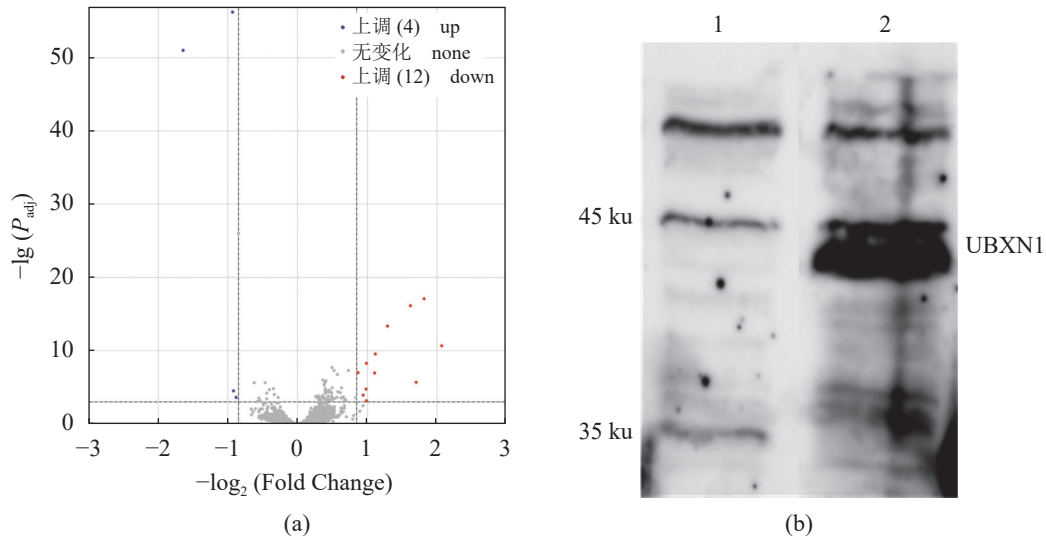


图 4 大黄鱼 *UBXN1* 差异表达基因及其蛋白在 293T 细胞系中的表达情况

(a) 大黄鱼 *UBXN1* 差异表达基因火山图; (b) 外源大黄鱼 *UBXN1* 蛋白在 293T 细胞系成功过表达; 1. 空载体组, 2. 过表达组。

Fig. 4 The volcano plot of differentially expressed genes and the exogenous expression in 293T cells of *LcUBXN1*

(a) the volcano plot of differentially expressed genes; (b) the exogenous expression of *LcUBXN1* protein in 293T cells confirmed by western blot using anti-His antibody. 1. empty vector group, 2. overexpression group.

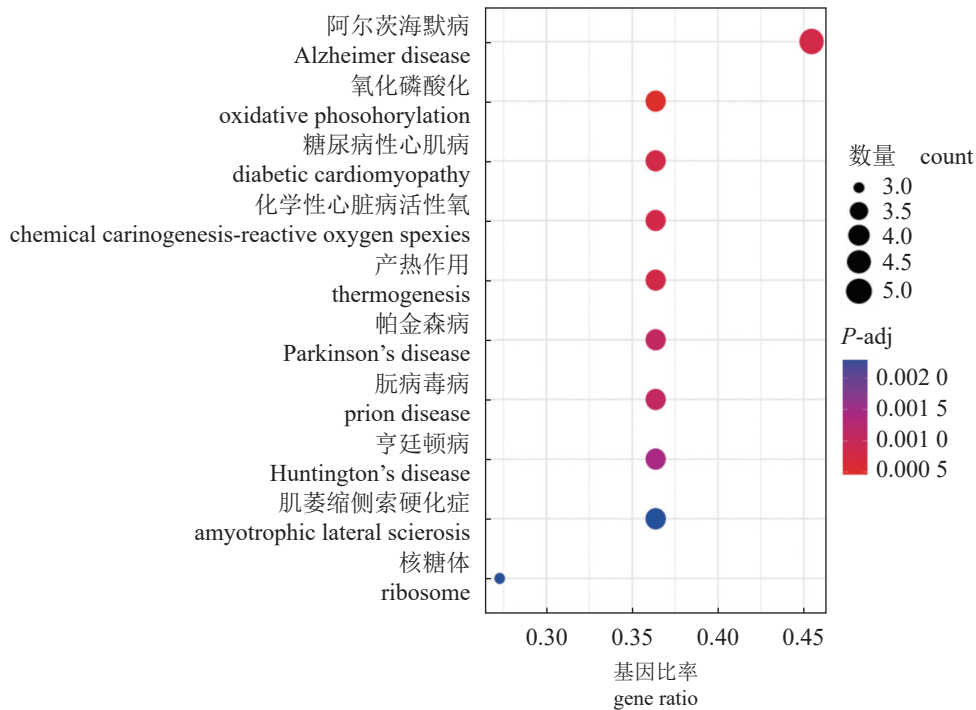


图 5 大黄鱼 *UBXN1* 过表达后差异基因在 KEGG 数据库中的注释

Fig. 5 Distribution of genes after *UBXN1* overexpression in *L. crocea* in KEGG pathways

染机理比较复杂, 与病毒感染宿主机制不同, 暗示 *UBXN1* 在寄生虫感染宿主过程中可能扮演不同角色。*UBXN1* 单核苷酸多态性与大黄鱼抗盾纤毛虫性状相关性需进一步深入研究。

转录组筛选差异表达基因, 相比空载体对照组, *RPL41/RPL39* 表达量显著增加, 而 *ATP8/ND4L* 表达量显著减少, 通路富集分析表明, 差异表达基因多与疾病发生相关。张洁等^[26] 报道 *RPL41*

呈剂量依赖性抑制卵巢癌 A2780 细胞的增殖, 通过调控 *Bax* 和 *Bcl-2* 基因表达, 参与细胞程序化死亡过程, 导致 A2780 细胞凋亡。Surmiak 等^[27] 研究发现, 嗜中性粒细胞在抗蛋白酶 3 IgG F 刺激下 RPL41 表达量显著升高。Dave 等^[28] 研究表明, 乳腺癌病例 RPL39 A14V 突变率高达 97.5% (39/40 肿瘤样本)。Huang 等^[29] 发现, 敲降 RPL39 增加了沙门氏菌 (*Salmonella*) 在猪中性粒细胞内的增殖。下调基因 *ATP8* 和 *ND4* 是线粒体基因, 调控线粒体能量代谢, 并促进 ROS 生成, 也与肿瘤的发生相关^[30-31]。尽管目前还没有报道这些差异表达基因在鱼类中的作用, 但似乎都与免疫相关。未来的工作应主要集中在 UBXN1 对这些基因的调控作用及深入研究它们的免疫功能。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Alexandru G, Graumann J, Smith G T, *et al.* UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1 α turnover[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 804-816.
- [2] Hofmann K, Bucher P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(5): 172-173.
- [3] Schubert C, Buchberger A. UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(15): 2360-2371.
- [4] He Z B, Xie Y, Si F L, *et al.* Identification and characterization of a gene encoding a UBX domain-containing protein in the migratory locust, *Locusta migratoria manilensis*[J]. *Insect Science*, 2013, 20(4): 497-504.
- [5] Yamauchi S, Sasagawa Y, Ogura T, *et al.* Differential expression pattern of UBX family genes in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 358(2): 545-552.
- [6] Wang P H, Yang L, Cheng G, *et al.* UBXN1 interferes with Rig-I-like receptor-mediated antiviral immune response by targeting MAVS[J]. *Cell Reports*, 2013, 3(4): 1057-1070.
- [7] Wang Y B, Tan B, Mu R, *et al.* Ubiquitin-associated domain-containing ubiquitin regulatory X (UBX) protein UBXN1 is a negative regulator of nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(16): 10395-10405.
- [8] Hu Y N, O'Boyle K, Auer J, *et al.* Multiple UBXN family members inhibit retrovirus and lentivirus production and canonical NF κ B signaling by stabilizing I κ B α [J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(2): e1006187.
- [9] Yi K K, Cui X T, Liu X, *et al.* PTRF/Cavin-1 as a novel RNA-binding protein expedites the NF- κ B/PD-L1 axis by stabilizing lncRNA NEAT1, contributing to tumorigenesis and immune evasion in Glioblastoma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 12: 802795.
- [10] Zhang Z X, Wang Z Y, Fang M, *et al.* Genome-wide association analysis on host resistance against the rotten body disease in a naturally infected population of large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737615.
- [11] 唐嘉嘉, 江飏, 李志成, 等. 养殖大黄鱼寄生虫病的研究进展 [J]. 水产科学, 2022, 41(1): 150-159.
- Tang J J, Jiang B, Li Z C, *et al.* Research progress of parasitic diseases in cultured large yellow croaker *Larimichthys crocea*: a review[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(1): 150-159 (in Chinese).
- [12] Valle A, Leiro J M, Pereiro P, *et al.* Interactions between the parasite *Philasterides dicentrarchi* and the immune system of the turbot *Scophthalmus maximus*. A Transcriptomic Analysis[J]. *Biology*, 2020, 9(10): 337.
- [13] Ishibashi T, Ogawa S, Hashiguchi Y, *et al.* A novel protein specifically interacting with Homer2 regulates ubiquitin-proteasome systems[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2005, 137(5): 617-623.
- [14] Ye Y H, Meyer H H, Rapoport T A. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol[J]. *Nature*, 2001, 414(6864): 652-656.
- [15] Mengus C, Neutzner M, Bento A C P F, *et al.* VCP/p97 cofactor UBXN1/SAKS1 regulates mitophagy by modulating MFN2 removal from mitochondria[J]. *Autophagy*, 2022, 18(1): 171-190.
- [16] Lalonde D P, Bretscher A. The UBX protein SAKS1 negatively regulates endoplasmic reticulum-associated degradation and p97-dependent degradation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(6): 4892-4901.
- [17] Mukkavalli S, Klickstein J A, Ortiz B, *et al.* The p97-UBXN1 complex regulates aggresome formation[J].

- Journal of Cell Science*, 2021, 134(7): jcs254201.
- [18] Bodnar N, Rapoport T. Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase [version 1; peer review: 4 approved][J]. *F1000Research*, 2017, 6: 1318.
- [19] Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system[J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(2): 117-123.
- [20] Raman M, Havens C G, Walter J C, *et al.* A genome-wide screen identifies p97 as an essential regulator of DNA damage-dependent CDT1 destruction[J]. *Molecular Cell*, 2011, 44(1): 72-84.
- [21] Raman M, Sergeev M, Garnaas M, *et al.* Systematic proteomics of the VCP-UBXD adaptor network identifies a role for UBXN10 in regulating ciliogenesis[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(10): 1356-1369.
- [22] Shu H Y, Peng Y Z, Hang W J, *et al.* Emerging role of VCP/p97 in cardiovascular diseases: novel insights and therapeutic opportunities[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(1): 485-494.
- [23] Zhang X Y, Gui L, Zhang X Y, *et al.* Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(14): E1705-E1714.
- [24] Yuan P, Huang S L, Yang Z, *et al.* UBXN1 interacts with the S1 protein of transmissible gastroenteritis coronavirus and plays a role in viral replication[J]. *Veterinary Research*, 2019, 50(1): 28.
- [25] He J W, Lin X S, Yang H X, *et al.* UBXN1 is a strong candidate gene in regulation of pork water-holding capacity[J]. *Archives Animal Breeding*, 2021, 64(1): 109-118.
- [26] 张洁, 杨菁, 程艳香, 等. 核糖体蛋白 RPL41 对人卵巢癌 A2780 细胞增殖和凋亡的影响及其机制 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(1): 20-23.
- Zhang J, Yang J, Cheng Y X, *et al.* Effects and mechanism of ribosomal protein RPL41 on proliferation and apoptosis of human ovarian cancer A 2780 cells[J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2020, 19(1): 20-23 (in Chinese).
- [27] Surmiak M, Kaczor M, Sanak M. Proinflammatory genes expression in granulocytes activated by native proteinase-binding fragments of anti-proteinase 3 IgG[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2015, 66(4): 609-615.
- [28] Dave B, Gonzalez D D, Liu Z B, *et al.* Role of RPL39 in metaplastic breast cancer[J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2017, 109(6): djw292.
- [29] Huang T H, Jiang C Y, Yang M, *et al.* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium inhibits the innate immune response and promotes apoptosis in a ribosomal/TRP53-dependent manner in swine neutrophils[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 105.
- [30] Grzybowska-Szatkowska L, Ślaska B, Rzymowska J, *et al.* Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 genes in patients with breast cancer[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(4): 1772-1778.
- [31] Cavalcante G C, Ribeiro-Dos-Santos Â, De Araújo G S. Mitochondria in tumour progression: a network of mtDNA variants in different types of cancer[J]. *BMC Genomic Data*, 2022, 23(1): 16.

Identification of *UBXN1* and transcriptome analysis after its overexpression in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

ZHANG Dongling, TANG Xin, WANG Zhiyong*

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Scuticociliatia disease is a major threat to large yellow croaker *Larimichthys crocea* at the fry stage. In the previous study, a ubiquitin regulatory X domain-containing protein (*UBXN1*) gene was found to be involved in Scuticociliatia disease resistance through genome-wide association analysis. To further confirm its gene function in resistance against Scuticociliatia, we identified *UBXN1* gene sequence and investigated its expression characteristics, as well as signal pathway. The complete cDNA sequence of *UBXN1* was 915 bp, encoding 304 amino acids. The putative *UBXN1* protein was evolutionarily conserved and contained a UBA and a UBX domain. Moreover, *UBXN1* had varying degrees of expressions in different tissues, among which the highest expression was observed in brain, moderate expression was in liver, heart and kidney, and the lowest expression was in muscle by qRT-PCR detection. It also showed that induced expression was found in spleen, brain, liver, and kidney during the early phase of infection, and the expression gradually recovered to the control level at the late phase. Further subcellular localization analysis showed that *UBXN1* uniformly distributed in cytoplasm and nucleus. In addition, 16 differentially expressed genes were found in a comparative transcriptome analysis between the *UBXN1* over expression group and control vector group, including up-regulated genes *RPL41/RPL39/XIST/RNA45SN4* and down-regulated genes *ATP8/ND4L*. These findings provide new insights into finfish *UBXN1* and its potential regulatory signaling pathway.

Key words: *Larimichthys crocea*; ubiquitin regulatory X domain-containing protein, *UBXN1*; Scuticociliaia; transcriptome; immune

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32172964); Key Projects of Fujian Provincial Natural Science Foundation (2022J02042)