

## 刺参主要卵黄蛋白 *MYP1*、*MYP2* 在不同幼体发育阶段、 成体组织及温度胁迫条件下的相对定量表达

李成泽, 常亚青\*, 丁 君, 高银雪, 程 龙, 左然涛, 曹学顺

(大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为探讨温度胁迫对刺参基因表达的影响, 从已构建的刺参耐寒基因筛选 cDNA 文库中选取差异基因主要卵黄蛋白 (major yolk protein, MYP): *MYP1* 和 *MYP2*, 利用实时荧光定量 PCR 研究了其在刺参胚胎发生和个体发育 9 个阶段 (受精卵、囊胚期、原肠期、小耳状幼体、中耳幼体、大耳幼体、樽形幼体、五触手幼体和稚参)、成体 7 种组织 (呼吸树、体腔液、肠、纵肌、体壁、雄性性腺和雌性性腺)、长时温度胁迫 (20 °C、4 °C, 30 d) 和低温短时胁迫 (7 °C、4 °C、1 °C、-2 °C, 12 h) 成体肠组织中的表达量。结果发现, *MYP1* 和 *MYP2* 表达模式基本相同: (1) 在胚胎发育阶段樽形幼体时期开始表达, 随后的阶段持续表达, 到稚参阶段表达量最高; (2) 在 7 种组织中, 肠中的表达量最高, 在体腔液中基本不表达, 其余组织中均有表达; (3) 在长时 (30 d) 温度胁迫下, 肠组织中 *MYP* 表达量由高到低依次为 4 °C、12 °C、20 °C, 且在 4 °C 的表达量为 20 °C 的 6 倍左右; (4) 在低温短时胁迫 (1 °C、-2 °C, 12 h) 条件下, 肠组织中 *MYP* 表达量受到显著抑制, 约为常温条件下的一半。研究表明, *MYP* 在刺参胚胎发育的樽形幼体阶段开始合成, 成体合成部位主要为肠, 水温过低会抑制其表达。

**关键词:** 刺参; 表达; 主要卵黄蛋白; 幼体发育; 温度胁迫

**中图分类号:** Q 132.7; S 968.9

**文献标志码:** A

在卵生动物的卵子形成过程中, 卵母细胞收集蛋白、脂质、糖类、维生素、类胡萝卜素等原料储存至卵黄中, 用以提供维持胚胎形成所需的营养物质。在蛋白中含量较为丰富的是卵黄蛋白 (yolk protein, YP), 它是普遍存在于非哺乳卵生动物体内的一种糖蛋白, 由于在海胆卵中含量最为丰富, 称为主要卵黄蛋白 (major yolk protein, MYP)<sup>[1-2]</sup>。与其他卵生动物雌性特有不同, 在棘皮动物门海胆纲、海参纲和海星纲个体的雌性和雄性体内都存在 MYP<sup>[3-4]</sup>。MYP 主要由肠合成, 以颗粒状储存在营养吞噬细胞中, 作为配子发生和胚胎发育时期营养供应的来源<sup>[5]</sup>。Unuma 等<sup>[6]</sup>利用 RT-PCR 研究 *MYP* 在海胆幼体发育阶段中表达, 发现该基因在八腕幼体时期开始表达。

经序列比对发现, 海胆中 *MYP* 的 cDNA 序列

与一些金属转运蛋白同源性较高, 其在生殖细胞的发生过程中有转运金属离子的作用<sup>[2,7]</sup>。近年来, 有研究发现作为 MYP 的前体卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vg), 在水产动物的先天免疫过程中发挥着重要作用, 其作为一个多元的分子识别受体, 能够识别脂多糖、葡聚糖、肽聚糖、磷酸及病毒等, 能够破坏细菌的细胞壁, 具有杀菌和抗氧化等功能<sup>[8]</sup>。在海参中, 经脂多糖注射诱导, 在肠组织的表达差异基因中包含 *MYP*<sup>[9]</sup>。

有关 *MYP* 的研究在刺参 (*Apostichopus japonicus*) 中鲜有报道, Atushi 等<sup>[3]</sup>通过高效液相色谱法纯化刺参体腔液中的蛋白, 通过氨基酸测序和 cDNA 克隆获得了两种相似的蛋白, 其与海胆 *MYP* 具有 30% 同源性, 将其命名为 *AjMYP1* 和 *AjMYP2*。在本实验室构建的刺参耐

收稿日期: 2013-09-23 修回日期: 2013-12-10

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31072230); 国家海洋局海洋公益项目 (201105016-3); 辽宁省农业攻关计划重大项目 (2011203003)

通信作者: 常亚青, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

http://www.scxuebao.cn

寒基因 cDNA 文库中,发现 *MYP1* 和 *MYP2* 的表达与温度相关。刺参在我国主要产于辽宁、山东、河北等区域,目前已经成为我国北方沿海最重要的养殖品种之一<sup>[10-11]</sup>。在刺参幼体发育阶段会经历一系列的形态和生理方面的变化,另外温度也是影响刺参生存、生长发育和繁殖的重要环境因子之一,为了阐明 *MYP* 在刺参中的表达模式及其与温度之间的关系,本实验研究了 *MYP1* 和 *MYP2* 在刺参胚胎和幼体发育阶段、成体组织、温度长时胁迫和低温短时胁迫下的表达量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 刺参产卵、受精和幼体培养

实验所用亲本刺参为农业部北方海水增养殖重点实验室养殖的辽宁本地成体刺参(336.0 g),将种参置于养殖容器中单独培养,注射刺参催产剂,待雌参排卵后,将种参捞出,加入适量精液进行人工授精,并搅拌均匀。受精卵的孵化温度为 21~22 ℃,到小耳幼体时开始投喂角毛藻(*Chaetoceros*)和海洋红酵母,每天补充一定量的新水,至大耳幼体初期时开始换水,当大耳幼体后期长出 5 对触手原基时投放波纹板附着基,适量充气,并持续投喂少量单胞藻(*Chlamydomonas*)和稚参饵料,至完全附着后全部投喂稚参饵料。

### 1.2 温度处理

**温度长时胁迫** 取常温 10~12 ℃ 养殖的一龄刺参 20 头(18~22 g),在 20 ℃ 和 4 ℃ 养殖池内养殖 30 d 后,进行样品采集。

**降温处理** 取常温 10~12 ℃ 养殖的一龄刺参 50 头(18~22 g),降温降处理:常温→7 ℃→4 ℃→1 ℃→-2 ℃,降温速率 3 ℃/12 h,每降至一个温度维持 12 h 后取样。

### 1.3 样品采集

**不同发育阶段** 取刺参胚胎和幼体发育 9 个阶段(受精卵、囊胚期、原肠期、小耳状幼体、中耳幼体、大耳幼体、樽形幼体、五触手幼体和稚参)的样品用筛绢收集于 1.5 mL 离心管内,短暂离心去除多余海水后经液氮冷冻,于 -80 ℃ 冰箱保存。

**成体组织** 取健康性成熟的二龄刺参(50~60 g),饥饿处理 3 d 后分离体腔液、呼吸树、肠、纵肌、体壁、雌性性腺和雄性性腺 7 种组

织,将样品收集于 1.5 mL 离心管内,经液氮冷冻后,于 -80 ℃ 冰箱保。

**温度长时胁迫** 取常温 10~12 ℃、20 ℃ 和 4 ℃ 养殖条件下的刺参各 9 头,分离其肠组织经液氮冷冻后,于 -80 ℃ 冰箱保存。

**低温短时胁迫** 在 7、4、1 和 -2 ℃ 进行样品采集,每个温度 9 头样品,分离其肠组织于液氮中冷冻,于 -80 ℃ 冰箱保存。

### 1.4 总 RNA 提取

参照动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)操作步骤分别提取刺参不同发育阶段、不同组织、温度长时胁迫和低温短时胁迫样品的总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Implen NanoPhotometer 核酸蛋白分析仪(德国)检测其纯度和浓度,将样品保存于 -80 ℃ 备用。

### 1.5 cDNA 的制备

取 500 ng 总 RNA 于 200 μL 的离心管中进行反转录,所用试剂盒为 PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa, 中国大连)。20 μL 体系包含 25 pmol Oligo dT Primer, 50 pmol random 6 mers, 4 μL 5 × PrimeScript™ buffer, 1 μL PrimeScript™ RT enzyme Mix I, 剩余体积用 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补足。样品混匀后于 PCR 仪进行反转录,37 ℃ 15 min; 85 ℃ 5 s。

### 1.6 引物设计筛选及选择内参基因

根据 NCBI GenBank 中序列号 AB509225 和 AB509226 下载 *MYP1* 和 *MYP2* 序列,利用 Beacon Designer 设计 RT-PCR 的引物(表 1),检测其引物特异性和扩增效率。设计刺参两种内参基因 β 肌动蛋白(*β-actin*)和细胞色素 b(*cytochrom b, Cyt b*)的引物,选择表达比较稳定的作为内参基因。

### 1.7 RT-PCR

利用 RT-PCR 研究 *MYP1* 和 *MYP2* 在刺参 9 个发育阶段、7 种组织、温度胁迫和低温处理肠组织中的表达量,所用仪器为 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Life Technologies, USA),试剂盒为 SYBR Premix Ex Taq™ II Kit (*Tli* RNaseH Plus, TaKaRa)。参照试剂盒说明书,20 μL 体系中包含 10 μL 2 × SYBR Premix Ex Taq™ II (*Tli* RNaseH Plus), 0.4 μL ROX Reference Dye II, 1 μL cDNA 模板,上下游引物

各 0.4  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;40 个循环的 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  32 s;溶解曲线阶段 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。利用 SPSS 17.0 分析软件进行统计分析,在单因素

方差分析 (One-Way ANOVA) 达到显著水平 ( $P < 0.05$ ) 时,采用 Duncan 检验进行多重比较,数据表示为平均值  $\pm$  标准差的形式。

表 1 RT-PCR 引物  
Tab.1 Primers for RT-PCR

| 基因<br>gene     | 引物序列(5'→3')<br>sequence(5'→3')                             | 扩增片段长度/bp<br>amplicon size | 扩增效率/%<br>amplification efficiency | 出处<br>references |
|----------------|--|----------------------------|------------------------------------|------------------|
| MYP1           | F1:AAGCCATCCACCTTTGAC                                      | 92                         | 101                                | AB509225         |
|                | R1:CTCTGCCATCTCACGAAC                                      |                            |                                    |                  |
|                | F2:CATGTTAAGGAAACCGACCTAAC                                 | 213                        | 97                                 |                  |
|                | R2:GTGCTTGATCCATTCATATTGCTC                                |                            |                                    |                  |
| MYP2           | F1:AGGAGGGAGACATTGCTT                                      | 100                        | 103                                | AB509226         |
|                | R1:ATGATGCTTTCTGGGTTG                                      |                            |                                    |                  |
|                | F2:AATTCATGAAGAACCGTATGCTCA                                | 215                        | 95                                 |                  |
|                | R2:TCCCTGAATTTCTTTCTGTC                                    |                            |                                    |                  |
| $\beta$ -actin | F:CAT TCA ACC CTA AAG CCA ACA<br>R:TGG CGT GAG GAA GAG CAT | 198                        | 101                                | [12]             |
| Cyt b          | F:TGAGCCGCAACAGTAATC<br>R:AAGGGAAAAGGAAGTGAAG              | 139                        | 100                                | [13]             |

## 2 结果

### 2.1 引物筛选结果及内参基因的确立

MYP1 (F1R1) 和 MYP2 (F1R1) 所得溶解曲线熔点峰窄且尖为单峰,说明其特异性好;且其扩增效率与内参基因接近,可以使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对表达量的计算(图 1,图 2)。

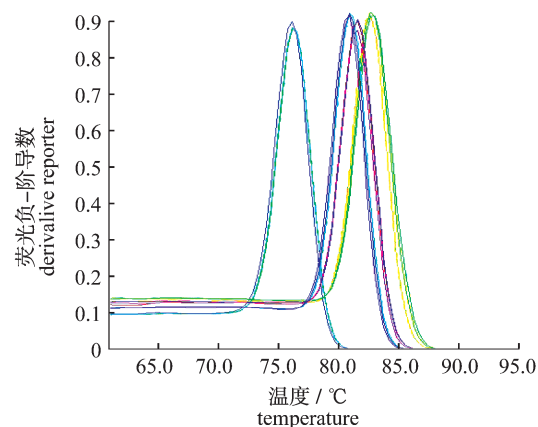


图 1 溶解曲线  
Fig.1 Melt curve

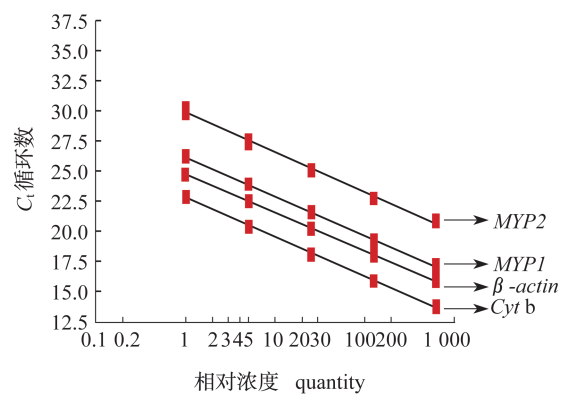


图 2 标准曲线  
Fig.2 Standard curve

刺参两种内参基因  $\beta$ -actin 和 Cyt b 的表达稳定性结果表明:在不同组织中, $\beta$ -actin 表达较为稳定;而在其他样品中 Cyt b 表达相对稳定。

### 2.2 MYP 在刺参不同发育阶段的表达

MYP1 和 MYP2 在刺参胚胎和幼体发育 9 个阶段的表达趋势相同,在樽形幼体之前不表达,而在樽形幼体时突然开始表达,在随后的五触手幼体阶段有所降低,而在稚参时期表达量出现急剧增加,与其他发育阶段有显著差异(图 3)。

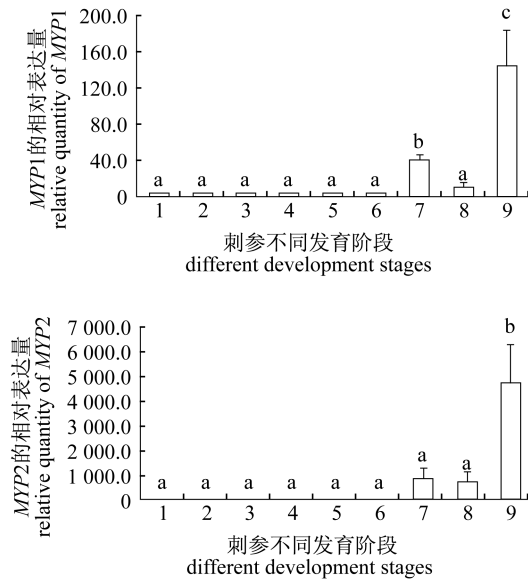


图3 *MYP* 在刺参不同发育阶段的表达量

1. 受精卵; 2. 囊胚; 3. 原肠胚; 4. 小耳状幼体; 5. 中耳状幼体; 6. 大耳状幼体; 7. 樽形幼体; 8. 五触手幼体; 9. 稚参  
标有不同字母的值之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 3 Relative mRNA levels of *MYP* genes at different development stages of *A. japonicus* by using qRT-PCR analysis

1. fertilized egg; 2. blastula; 3. gastrula; 4. early auricularia; 5. auricularia; 6. late auricularia; 7. doliolaria; 8. pentactula; 9. juvenile

Data bearing different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). The same as the following

### 2.3 *MYP* 的组织特异性表达

*MYP1* 和 *MYP2* 在刺参不同组织中的表达趋势一致,在肠中表达量最高,显著高于其他组织中的表达量,在体腔液中基本不表达,其余组织中均有表达(图4)。

### 2.4 长时温度胁迫下刺参肠组织中 *MYP* 的表达

在长时温度胁迫下,刺参肠中 *MYP1* 和 *MYP2* 的表达量随水温的降低而升高(图5)。*MYP* 在 4 °C 养殖条件下刺参的肠中表达量最高,在 20 °C 养殖条件下刺参的肠中表达量最低,4 °C 条件下刺参肠中 *MYP* 的表达量较常温和 20 °C 条件显著提高约 3 倍和 5 倍 ( $P < 0.05$ )。而常温和 20 °C 条件下 *MYP* 的表达量未见显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 短时低温胁迫下刺参肠组织中 *MYP* 的表达

在连续降温处理后,刺参肠中 *MYP1* 和 *MYP2*

表达量在降温初期(7 °C)显著降低,适应之后在 4 °C 表达量迅速回升至最高值,随水温进一步降低,*MYP* 表达量降至较为恒定的水平,在 1 °C 和 -2 °C 刺参肠中 *MYP* 表达量约为常温条件下的一半(图6)。

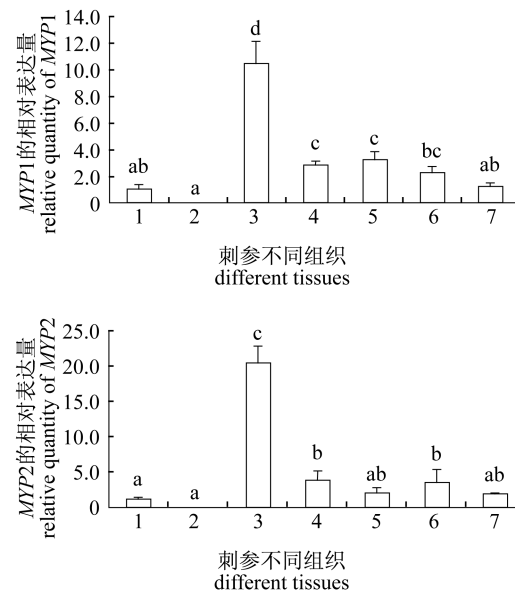


图4 *MYP* 在刺参不同组织的表达量

1. 呼吸树; 2. 体腔液; 3. 肠; 4. 纵肌; 5. 体壁; 6. 雄性性腺; 7. 雌性性腺

Fig. 4 Relative mRNA levels of *MYP* genes at different tissue in *A. japonicus* by using qRT-PCR analysis

1. respiratory tree; 2. coelomocyte; 3. intestine; 4. muscle; 5. body wall; 6. testis; 7. ovary

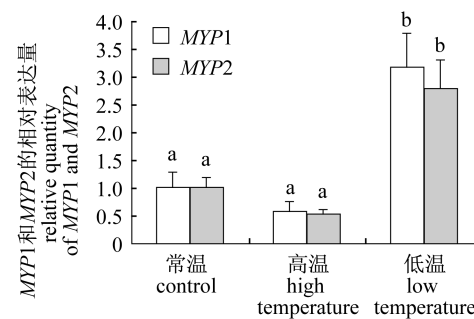


图5 高低温长时处理对 *MYP* 在肠组织中的表达量影响

Fig. 5 Effects of high and low temperature challenges on transcriptional levels of *MYP* genes in intestine of *A. japonicus*

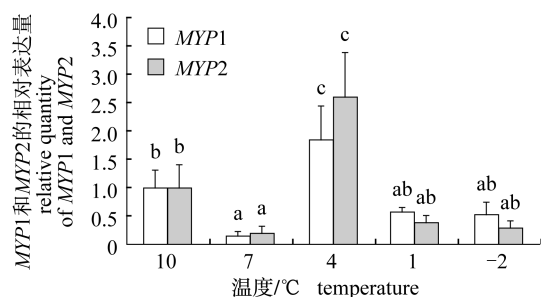


图6 低温胁迫对MYP在肠组织中的表达量影响

Fig. 6 Effects of cold temperature challenges on transcriptional levels of MYP genes in intestine of *A. japonicus*

### 3 讨论

#### 3.1 内参基因的选择

$\beta$ -actin 和 Cyt b 常作为内参基因用于刺参基因表达方面的研究,杨爱馥等<sup>[13]</sup>比较了仿刺参  $\beta$ -actin 和 Cyt b 基因表达的稳定性,发现 Cyt b 在不同发育阶段和不同组织(体壁、肠道和呼吸树)中均表达稳定;而  $\beta$ -actin 只在不同组织中表达稳定。本研究也发现 Cyt b 在不同发育阶段表达稳定,因此选为内参基因研究不同发育阶段、长时温度胁迫和短时低温胁迫下 MYP 基因表达量。与上述结果不同的是,本研究发现  $\beta$ -actin 较 Cyt b 稳定表达于不同组织,因此本实验选择  $\beta$ -actin 作为研究 MYP 组织差异性表达的内参基因。上述结果差异可能是由于本实验所选组织中包含雄性性腺和雌性性腺所致,Cyt b 的表达量会受到性腺类别的影响。因此,在进行海参目的基因组织差异性表达的研究中,研究者要根据所选组织是否包括性腺组织来选择使用 Cyt b 或  $\beta$ -actin。

#### 3.2 MYP 在胚胎幼体发育阶段和组织中的表达

在海胆幼体发育阶段,MYP 最早合成出现在八腕幼虫时期<sup>[6]</sup>,Unuma 等<sup>[14]</sup>发现配子形成之前性腺中 MYP 含量达到总蛋白含量的 80%,配子形成之后 MYP 含量逐渐减少至原来的一半,表明 MYP 作为储存营养物质用于配子形成。在刺参胚胎发育阶段,随着耳状幼体的不断生长,消化道从原来的简单管状构造逐渐分化成界限分明的口、食道、胃、肠和肛门等部分<sup>[11]</sup>,变态为樽形幼体时 MYP 开始出现表达,到稚参时期表达量迅速增加,推测卵中 MYP 的含量仅能维持樽形幼

体之前的胚胎阶段的,因此到樽形幼体时需开始合成新的 MYP 供生长需要,当幼体成长为稚参时更需大量的营养物质,致使 MYP 合成量迅速增加。MYP1 和 MYP2 在表达趋势一致,同时在樽形幼体时开始表达,稚参时期表达量达最高值,但是二者的相对表达量是有差异的。

在海胆中体腔液中存在大量的 MYP,推测它是由肠道合成分泌到体腔液中的,经体腔液运送至所需部位,且具有转运金属离子的功能<sup>[15]</sup>。MYP 在刺参不同组织中的表达研究发现,与海胆极为类似,均在肠中表达量最高,另外肠道在刺参免疫应答方面作为屏障抵抗病原体的过程中有重要作用<sup>[9,16]</sup>,推测在刺参中 MYP 由肠道合成,经体腔液运送至所需组织,除了储存于营养吞噬细胞中作为营养供给来源外,有可能具有免疫功能。

#### 3.3 MYP 在温度胁迫下的表达

温度是影响刺参生长、发育、繁殖和分布的重要因素<sup>[17-19]</sup>,为适应温度胁迫,刺参在进化过程中形成了夏眠的适应策略,随着温度升高,刺参代谢速率增加,当温度继续升高,刺参进入夏眠阶段,能量消耗降低<sup>[20-21]</sup>,肠道开始退化,MYP 作为运输蛋白,运输离子或其他大分子是一个耗能过程,因此 MYP 在高温时表达量降低。吉成龙等<sup>[22]</sup>构建了刺参高温胁迫消减 cDNA 文库,发现 MYP1 在高温胁迫时下调表达。与之相类似,20 °C 长时胁迫下,刺参 MYP 表达量较常温有所降低,但差异并不显著,这可能与本实验所选温度还未达刺参夏眠温度有关,因此未来研究需要探讨更高温度下 MYP 的表达规律。在 4 °C 胁迫时,刺参需增强代谢速率保证机体适应低温,因此 MYP 表达量比常温时高;同时也发现温度过低(1 °C 和 -2 °C)时,MYP 表达量显著降低,这说明在此温度胁迫下,刺参代谢耗能过程减缓,不需过多营养物质供应,这与构建的刺参耐寒基因筛选 cDNA 消减杂交文库结果一致,该研究同样发现在 -2 °C 时,MYP 表达受到抑制。

#### 参考文献:

- [1] Unuma T, Okamoto H, Konishi K, et al. Cloning of cDNA encoding vitellogenin and its expression in red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*[J]. Zoological Science, 2001, 18(4): 559 - 565.
- [2] Brooks J M, Wessel G M. The major yolk protein in sea urchins is a transferrin-like, iron binding protein

- [J]. *Developmental Biology*, 2002, 245(1): 1 – 12.
- [ 3 ] Atushi F, Tatsuya U, Kaoru O, *et al.* Molecular characterization of the major yolk protein of the Japanese common sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its expression profile during ovarian development [ J ]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 2010, 155 ( 1 ): 34 – 40.
- [ 4 ] Thomas A A P, Maria B. Evolution of yolk protein genes in the Echinodermata [ J ]. *Evolution & Development*, 2012, 14(2): 139 – 151.
- [ 5 ] Unuma T, Suzuki T, Kurokawa T, *et al.* A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin, *Pseudocentrotus depressus* [ J ]. *Biology Bulletin*, 1998, 194(1): 92 – 97.
- [ 6 ] Unuma T, Konishi K, Kiyomoto M, *et al.* The major yolk protein is synthesized in the digestive tract and secreted into the body cavities in sea urchin larvae [ J ]. *Molecular Reproduction & Development*, 2009, 76(2): 142 – 150.
- [ 7 ] Unuma T, Ikeda Y, Yamano K, *et al.* Zinc-binding property of the major yolk protein in the sea urchin implications of its role as a zinc transporter for gametogenesis [ J ]. *Febs Journal*, 2007, 274 ( 19 ): 4985 – 4998.
- [ 8 ] Zhang S C, Wang S H, Li H Y, *et al.* Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector [ J ]. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2011, 43(3): 303 – 305.
- [ 9 ] Ramirez-Gomez F, Ortiz-Pineda P A, Rivera-Cardona G, *et al.* LPS-induced genes in intestinal tissue of the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [ J ]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6178.
- [ 10 ] Chang Y Q, Shi S B, Zhao C, *et al.* Characteristics of papillae in wild, cultivated and hybrid sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) [ J ]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(63): 13780 – 13788.
- [ 11 ] Chang Y Q, Ding J, Song J, *et al.* Research and breeding of sea cucumber, sea urchin biology [ M ]. Beijing: China Ocean Press, 2004: 67 – 76. [ 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004: 67 – 76. ]
- [ 12 ] Zhao H, Yang H S, Zhao H L, *et al.* Heat stress-mediated gene expression in the body wall of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* [ J ]. *Aquatic Biology*, 2011, 12(1): 23 – 31.
- [ 13 ] Yang A F, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Stability comparison of cytb and  $\beta$ -actin genes expression in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [ J ]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12 ( 1 ): 79 – 84. [ 杨爱馥, 周遵春, 董颖, 等. 仿刺参 cytb 和  $\beta$ -actin 基因表达稳定性比较. 中国农业科技导报, 2010, 12(1): 79 – 84. ]
- [ 14 ] Unuma T, Yamamoto T, Akiyama T, *et al.* Quantitative changes in yolk protein and other components in the ovary and testis of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* [ J ]. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(2): 365 – 372.
- [ 15 ] Brooks J M, Wessel G M. Selective transport and packaging of the major yolk protein in the sea urchin [ J ]. *Developmental Biology*, 2003, 261 ( 2 ): 353 – 370.
- [ 16 ] Wang P, Chang Y, Yu J, *et al.* Acute peristome edema disease in juvenile and adult sea cucumbers *Apostichopus japonicus* ( Selenka ) reared in North China [ J ]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 96(1): 11 – 17.
- [ 17 ] Chen Y, Gao F, Liu G S, *et al.* The effects of temperature, salinity and light cycle on the growth and behavior of *Apostichopus japonicus* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31 ( 5 ): 687 – 691. [ 陈勇, 高峰, 刘国山, 等. 温度、盐度和光照周期对刺参生长及行为的影响. 水产学报, 2007, 31 ( 5 ): 687 – 691. ]
- [ 18 ] Yu M Z, Chang Y Q. The effects of low temperature on some physiological phenomena in different populations of sea cucumber *Apostichopus japonicus* juveniles [ J ]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(1): 31 – 36. [ 于明志, 常亚青. 低温对不同群体仿刺参某些生理现象的影响. 大连水产学院学报, 2008, 23(1): 31 – 36. ]
- [ 19 ] Liu W, Chang Y Q, Ding J. A preliminary study of effects of mild and acute drop of temperature on serum non-specific immunity in “Shuiyuan No. 1” sea cucumber populations and the cultured sea cucumber populations [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1342 – 1348. [ 刘伟, 常亚青, 丁君. 温度缓降和骤降对刺参“水院 1 号”和大连养殖群体非特异性免疫影响的初步研究. 水产学报, 2013, 37 ( 9 ): 1342 – 1348. ]
- [ 20 ] An Z H, Dong Y W, Dong S L. Temperature effects on growth-ration relationships of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* ( Selenka ) [ J ]. *Aquaculture*, 2007, 272(1 – 4): 644 – 648
- [ 21 ] Ji T T, Dong Y W, Dong S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber,

- Apostichopus japonicus* Selenka: Aestivation and temperature [ J ]. Aquaculture, 2008, 283 ( 1 - 4 ): 180 - 187.
- [22] Ji C L, Sun G H, Yang J M, *et al.* Construction and analysis of the subtracted cdna library of *Apostichopus japonicus* ( selenka ) under high temperature stress [ J ]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42 ( 1 ): 60 - 66. [ 吉成龙, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 高温胁迫消减 cDNA 文库的构建与分析. 海洋与湖沼, 2011, 42 ( 1 ): 60 - 66. ]

### Relative expression of major yolk protein, *MYP1* and *MYP2*, in larval development, adult tissues and intestine of sea cucumber (*Apostichopus japonicas*) under various temperature stress

LI Chengze, CHANG Yaqing\*, DING Jun, GAO Yinxue, CHENG Long, ZUO Rantao, CAO Xueshun  
(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** In the present study, we investigated how temperature stress affected gene expressions of sea cucumber *Apostichopus japonicas*. Major yolk protein (*MYP*) gene was selected as a candidate indicator from our former pilot screening study on cold-resistant genes. Two isoforms of *MYP* namely, *MYP1* and *MYP2*, were both involved, to enhance the reliability of inferences drawn by the current study. Temporal expression features of the two *MYPs* were surveyed for nine developmental stages (fertilized egg, blastula, gastrula, early auricularia, auricularia, late auricularia, doliolaria, pentactula, juvenile) via RT-PCR. Tissue distribution for adult *A. japonicas* was studied for seven tissues (respiratory tree, coelomocyte, intestine, muscle, body wall, testis, ovary). Expression profiles of the two *MYPs* corresponding to a long-term High/Low temperature treatment and a temporal acute cold shock treatment were investigated respectively, with intestine as the target tissue. The two *MYPs* presented similarities for temporal expression and tissue distribution: gradually enhanced expression from doliolarias stage to juvenile stage; and tissue-ubiquitous (but not in coelomic fluid) expression with greatest abundance in intestine. Interestingly, although the expressions of *MYP* presented a negative linear relationship with the constant environmental temperature (six times higher for 4 °C compared to 20 °C), a sharp cold shock treatment significantly suppressed them.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; expression; major yolk protein; larval development; temperature stress

**Corresponding author:** CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn