文章编号:1000-0615(2017)04-0481-09

DOI: 0.11964/jfc.20160410364

大黄鱼冷诱导结合蛋白(CIRP)基因cDNA克隆及 低温胁迫对其时空表达的影响

苗 亮, 李明云*, 陈莹莹, 胡 谋, 陈 炯

(宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室,浙江宁波 315211)

摘要:为研究冷诱导结合蛋白(CIRP)在大黄鱼低温适应过程中的作用,采用同源克隆技 术获得了大黄鱼CIRP基因,并通过实时荧光定量PCR (aRT-PCR)技术检测了低温胁迫下 大黄鱼各组织中CIRP基因的表达变化。结果显示,大黄鱼CIRP基因cDNA序列全长1211 bp, 推测编码一个由182个氨基酸组成、分子量为19 ku的蛋白。序列比对显示硬骨鱼类 CIRP基因序列较为保守、特别是N端的RNA识别基序(RRM)高度保守。系统进化树分析 显示大黄鱼CIRP与银鳕相似性最高(81.5%),所有硬骨鱼类聚为一个大支。慢性低温胁 '迫中(12 ℃缓降至6 °C),皮肤和肌肉中CIRP基因的表达量呈随温度降低而升高的趋势,6 °C 时表达量分别为12℃时的11.56倍和9.03倍; 鳃、脑和心脏中CIRP基因表达量均呈先显著 上升后显著下降的趋势, 其峰值均出现在8°C时, 表达量分别为12°C时的5.07、7.69 和2.83倍; 肠、肾脏、肝脏和脾脏中的表达量随温度降低而下降, 6°C时的表达量最 低,与12°C时相比降幅分别为80.0%、65.6%、91.2%、55.6%。急性低温胁迫(由12°C骤 降至8℃并胁迫4h)条件下, 鳃、皮肤、脑、肝脏、心脏中CIRP基因表达量均呈先升高 后降低的变化,反映了机体对低温胁迫的应激、适应过程;肌肉和肠中的表达量则始终 显著低于胁迫前。慢性和急性低温胁迫中各组织CIRP表达量变化的差异提示,大黄鱼机 体在低温胁迫响应和适应中有着多种调节机制。研究表明,CIRP基因参与了大黄鱼应对 低温胁迫的过程。

关键词:大黄鱼;低温胁迫;冷诱导结合蛋白(CIRP);组织表达 中图分类号:Q785;S965.3 文献标志码:A

大黄鱼(Larimichthys crocea)为鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属 (Larimichthys)的一种暖水性鱼类,是浙江、福建 沿海的重要海水养殖鱼类之一^[1]。近年来,冬季 寒潮多次侵袭我国东海与南海沿岸,低温致使 网箱养殖的大黄鱼大量死亡,经济损失惨重^[2]。 选育耐低温能力强的大黄鱼、解决浙江等海区 大黄鱼越冬难的问题是养殖业的迫切需求。目 前对大黄鱼耐低温的研究主要集中在生理生化 和蛋白质组等方面^[3-6],结果显示,大黄鱼在低 温环境下血清生理生化、抗氧化水平、组织酶

活、蛋白质组等的变化,均是基因差异表达和 调控的综合体现。Xu等^[7]和刘浩^[8]均对大黄鱼硬 脂酰辅酶A去饱和酶-1(SCD1)基因在低温下的表 达变化和对细胞膜流动性的影响进行了研究, 但要探究大黄鱼的低温耐受机理,仍需要在基 因水平上做更多的探索。

冷诱导结合蛋白(cold inducible RNA-binding protein, CIRP)是1997年Nishiyama等^[9]从小鼠睾丸 细胞中发现的一种参与机体应激调节(如冷应 激、紫外线照射、缺氧等)的蛋白。研究发现, 冷应激可诱导*CIRP*过量表达, 会抑制细胞的生

资助项目:国家"八六三"高技术研究发展计划(2012AA10A403-4);浙江省重大科技专项(2016C02055-7) 通信作者:李明云, E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2016-04-15 修回日期: 2016-08-06

长和代谢,并使细胞分裂G1期延长^[10]。非应激 状态下细胞中CIRP含量较少,蓄积在细胞核的 应激颗粒中;当受到环境胁迫时,机体细胞通 过IRES翻译机制增加CIRP的合成^[9,11],并从细胞 核转移至细胞质中,参与DNA损伤修复、保障 转录和翻译的稳定,使细胞、组织快速适应外 界反应,对机体发挥保护性作用^[12]。另外CIRP 还参与生殖发育调节、肿瘤发生、冬眠等多种 生理过程^[13]。目前已获取了大西洋鲑(Salmo salar)、 牙鲆(Paralichthys olivaceus)、斑马鱼(Danio rerio)、虹鳟(Oncorhynchus mykiss)等鱼类的 CIRP基因序列,序列比对分析显示与哺乳类、 两栖类的CIRP基因有较高的保守性,并且参与 低温、渗透压等胁迫下的应激调节^[14-15]。

2013—2014年,本实验对大黄鱼进行了急 性、慢性低温胁迫,然后对*CIRP*基因cDNA全长 进行了克隆及序列分析,并研究了低温胁迫对 其时空表达的影响,旨在了解CIRP在大黄鱼对 抗低温胁迫中的作用机制,进一步从分子水平 理解大黄鱼的低温适应性,为研究其他鱼类应 对低温胁迫的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验用鱼为象山港湾水产苗种有限公司网 箱养殖的1龄"东海1号"大黄鱼,共400尾,体质 量44.58~56.66g、体长15.51~17.08 cm。鱼在水泥 池中暂养2 d,水温与其生活海区水温一致,然 后进行低温实验。暂养和实验期间均不喂食, 每天换同温度过滤海水1次,换水量约1/3。

1.2 低温胁迫实验及样品采集

分别对大黄鱼进行慢性和急性低温胁迫实验, 通过Bilon DC型低温恒温循环水槽控制水温。模 拟养殖海区冬季水温降低的一般规律进行慢性 低温胁迫,在暂养水泥池中将水温从12.0°C开 始以0.5°C/d的速率进行降温,每次降温后维 持24h;分别在水温降至10、8和6°C并稳定2h 后取样,每次随机取6尾存活且正常的鱼。

急性低温胁迫中根据冬季冷空气来临时海 区水温可突降4°C的实际情况,随机将30尾鱼从 暂养池(水温12°C)直接放入8°C的实验池中,分 别在低温胁迫前(0h)和胁迫后0.5、2和4h4个时 间点取样,每次随机取6尾存活且正常的鱼。 实验共设置3个重复;经测量,实验期间水温 为(8±0.2)℃。

每次取样时用丁香酚将大黄鱼麻醉后立即 解剖取鳃、皮肤、肌肉、肠、脑、肾脏、肝 脏、脾脏、心脏等组织,液氮速冻后-80°C冰箱 保存,用Trizol法提取各组织总RNA。

1.3 大黄鱼CIRP基因cDNA全长克隆及序列分析

根据已知鱼类CIRP基因保守序列设计引物 CIRP(+)/CIRP(-);以肝脏总RNA为模板反转录 合成cDNA,以cDNA为模板扩增CIRP基因片 段。根据克隆得到的CIRP部分片段设计特异性 引物CIRP-3 GSP Outer/CIRP-3 GSP Inner和CIRP-5 GSP Outer/CIRP-5 GSP Inner,用3'-Full RACE Core Set Ver.2.0(TaKaRa)和BD SMART[™] RACE cDNA Ampilification Kit (Clontech)进行3'RACE 和5'RACE扩增大黄鱼CIRP基因cDNA序列的3'端 和5'端序列,步骤和操作均按说明书进行。引物 合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公 司进行(表1)。

对测序结果拼接后获得大黄鱼*CIRP*基因cDNA 序列,进行BLASTX分析(http://www.ncbi.nlm. nih.gov/),用SignalP 4.0程序进行信号肽序列预测 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/),用 ClustalW程序进行多重序列比对(http://clustalw.ddbj. nig.ac.jp/),用MEGA 4.0软件构建系统进化树^[16]。

表 1 克隆大黄鱼*CIRP*基因所用引物信息 Tab. 1 The information of primers used for cloning *CIRP* gene of *L. crocea*

引物	序列(5'-3')								
primer name	sequence(5'-3')								
CIRP(+)	GCAGATCTCGCGGTTTCGGCT								
CIRP(-)	CGTGTGCAGCATAGCCGTCGT								
CIRP-3 GSP Outer	CAGAGGACGCTAAAGACGCAAT								
CIRP-3 GSP Inner	AGTGACCGCTCTGGAACCTA								
CIRP-5 GSP Outer	TCTCCACCCCGAAACATCT								
CIRP-5 GSP Inner	GCTGTCATTGCGTCTTTAG								
CIRP-RT(+)	TGGCTGCGGCCTTCGGCAAATA								
CIRP-RT(-)	TGCCACGCTGGCCCGATGAAAA								
β -actin-RT(+)	ACGTTGCCATCCAGGCTGTGCT								
β -actin-RT(-)	ACGCACGATTTCCCTCTCGGCT								

1.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

根据获取的大黄鱼*CIRP*基因cDNA序列设计 qRT-PCR检测引物CIRP-RT(+)/CIRP-RT(-)(表1), 以 β -actin作为内参,用Eppendorf实时定量PCR 仪进行qRT-PCR扩增检测。反应体系包括: SYBR[®] Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus) 10 μL, 正、反向引物各1 μL, cDNA模板1 μL, dd H₂O 7 μL, 总体积20 μL。反应程序为 94 °C 预变性2 min; 94 °C 变性 15 s、58 °C退火15 s和72 °C 延伸30 s, 记录CT值,循环40次。反应完成后,系统在65~ 94 °C、每次升温0.5 °C生成熔解曲线。

1.5 数据处理

参照Livak等^[17]提出的2^{- $\Delta\Delta$ Ct}计算方法,以大 黄鱼 β -actin为内参计算*CIRP* mRNA相对表达量。 在DSP数据处理软件中用LSD法(least significant difference,最小显著差法)对样品中*CIRP*基因表达量变化做统计学分析,以*P*<0.05为具有显著性差异。

2 结果

2.1 大黄鱼CIRP基因cDNA全长序列

大黄鱼*CIRP*基因cDNA序列全长1211 bp,含 一个长度为546 bp的开放阅读框(ORF),3'、5'非 编码区长度分别为599和66 bp。经预测,该基因 编码一个由182个氨基酸组成的蛋白,分子量大 小约为19 ku、等电点为8.92,该蛋白N端包含一 个RNA识别基序(RNA recognition motif, RRM)(6~81 aa),C端有一个甘氨酸富含区(图1)。

1 GAAACTCACTCGACCTGCAGCGCCGCTCCTCCTCTGCTCCACCGCTACACAGAGCTACATTAAAG 66 67 ATGTCGGACGACGGGGTAAACTGTTCATCGGAGGACTGAGGCTTCGAGACCAGCGAGGAGTCTCTGGCGCGCCTTCGGCAAATATGGAACCATCGAAAAA 165 M S D E G K L F I G G L S F E T S E E S L A A A F G K Y G T I E K 33 1 166 GTGGATGTGATCAGAGACAAAGAGAGGGGCAGATCTCGCGGTTTCGGCGTTTGTGAAATACGATAATGCAGAGGACGCTAAAGACGCAATGACAGCAATG 264 34 V D V I R D K E T G R S R G F G F V K Y D N A E D A K D A M T A M 66 265 AACGGCAAGTCTCTAGATGGTCGGGCTATTCGTGTGGATGAAGCAGGAAAGGGTGGACGCTCCAGAGGTGGTGTTTTCATCGGGCCAGCGGGCAGCAGA 363 67 NGKSLDGRAIRVDEAGKGGRSRGGFSSGQRGSR 99 100 F S G S R G R G G G Y N G D R S Y G G D R N Y G D R C F G G G E R 132 AGCTTTGGTGGTAGCGGCGGATACAGGAGTGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGGATACTCCTCAAGCGGCTACAGAGACAATAGGGGTCAGGGTGGATATAGT 561 463 133 SFGGSGGYRS<mark>GGGGGGGGG</mark>YSSSGYRDNRGQGGYS 165 D R S G T Y R D G Y D G Y A A H E * 166 182 661 859 TTAACTAAAAGGCATCTGTATAAATCTGATAACTTTAAGTCCCGATATGGGGATCAAAACAACGGCTCTCCACAAGGTTTTTCGTTCAACGGCCACTACA 957 1211

图 1 大黄鱼 CIRP 基因全长 cDNA 序列及相应的氨基酸序列

*表示终止密码子; 下划线为开放读码框(ORF); 阴影部分为RNA识别基序(RRM); 细线方框内为甘氨酸富含区

Fig. 1 Full-length cDNA sequence and corresponding amino acids sequence of *CIRP* gene of *L. crocea* * indicates the stop codon; underline stands for ORF; shadow stands for RNA recognition motif (RRM); Gly-rich region is marked with filament box

2.2 大黄鱼CIRP与其他物种序列比对及系统 进化树分析

序列比对显示,包括大黄鱼在内的各种鱼 类CIRP氨基酸序列具有较高的保守性,特别是 N端的RNA识别基序(RRM)高度保守(图2)。构建 的系统进化树显示,包括大黄鱼在内的所有硬 骨鱼类的CIRP序列聚为一个大支,序列相似性 为66.7%~81.5%;其中大黄鱼、银鳕(Anoplopoma fimbria)、牙鲆、大西洋鲑等海水鱼类先聚为一 个小支后再与虹鳟、斑马鱼等淡水鱼相聚;在 硬骨鱼类中,大黄鱼CIRP氨基酸序列与银鳕相 似度最高(81.5%)、与虹鳟相似度最低(71.6%); 大黄鱼等硬骨鱼类的CIRP序列与哺乳类、爬行 类、两栖类、软骨鱼类序列相似度均低于60%, 在系统进化树上相距较远(图3)。

2.3 慢性低温胁迫下大黄鱼各组织*CIRP*基因 mRNA的表达变化

正常越冬水温(12°C)组织表达特征分析表

RRM

大黄鱼 L. croced	MSDEGKLFI	GGLSFETS	SEESLAA	AFGKYGT	IEKVDVI	RDKETGR	SRGFGFV	KYDNAEDAF	KDAMTAMNO	KSLDGR	IRVDEAG	KGG-RSR-	GGFS	SGQRGSR	
银鳕 A. fimbria	MSDEGKLFI	GGLSFET	VEESLAA.	AFGKYGT	IEKVDVI	RDRETEK	SRGFGFV	KYDNAEDAF	KDAMDGMNO	QTLDGR	TIRVDEAG	KGG-RSR-	GNFS	GGSRGTR	GG-
大西洋鲑 S.salar	MSDEGKLF	GGLSFDT	FEESLAE.	AFAKYGN	IAKVDVI	RDKETGF	SRGFGFV	KYDNAEDAF	KDALEGMNG	KSVDGR	TIRVDEAG	KGGGRSG-	GGGG	GGFRGSR	GGG
虹鳟 O. mykiss	MSDEGKLF	GGLCFDTI	DETSLEE.	AFSKYGN	IAKVDVV	RDRETRF	SRGFGFV	TFENPEDAF	KDAMAAMNG	KSVDGR	IRVDEAG	KSGGRSDF	≀GGGGGFR	GGSGGFR	GGS
斑马鱼 D. rerio	MSDEGKLFI	GGLSYDT	T EQSL EE	AF <mark>SKYG</mark> T	IAKVDVI	RDRETDF	SRGFGFV	TFENPEDAF	KDAMAAMNO	KQVDGRN	IRVDEAG	KSGGRS	GGFR	GGSRG	GGR
	****	*** *	* ** *	** ***	* ****	** **	******	* ****	*** ***	***	******	* * **	*	* *	
				_											_
大黄鱼 L. croced	tFSGSRGF	RGGGYN-GI	DRSYGG-	DRNYGD-	-RCFGGG	G-ERSFGG	SGGY	RSGGGG-	GGGYS	SSG	-YRDNRGQ	GGYSDR	SGTYR	DGYDGYA.	AHE
银鳕 A. fimbria	YGGGGG	RGGGYN-GI	DRSYG	DRSYGD-	-RSSHS-	-EGRFGG	SQYRNSG	GGGG G G-	GGGYS	S	-YRDNRGQ	GGYSDRG-	ASSYR	DGYDE	
大西洋鲑 S.salar	G-YGGGGGGY	GGGRGRGC	GGG <mark>YG</mark> GG	DRGYGE-	-RSYGGG	GDRSYGG	GDRSYGG	GGGYRSGG-	GGGYS	SGGGC	GYRDNRGQ	GGYGDRS-	GGSYR	DSYDS	
虹鳟 O. mykiss	GGFRGGRGH	RGGGYGGGI	DRSYGG-	DRSYGGG	ERSYGG-	-ERSYGG	-DRSYGG	GGDRSYGGS	SYRS <mark>GG</mark> GYS	SGGGSGG	GYREARS-	GGESGYG0	GRSGGSYR	DSYDSYA'	ΓHE
斑马鱼 D ^{rerio}	GFFRGSRGI	RGGGGGYGGI	DRSYGS-	DRSFGG-	DRSYGG-	DRSYGG	GDRGYGG	G-ERSYG	GGDRS	YGGGGGG	GY-SNRS-	GGYS	-SGGGYR	DNRF-	

图 2 大黄鱼与其他硬骨鱼类CIRP氨基酸序列比对

GenBank登录号:银鳕A. fimbria (ACQ58801.1);大西洋鲑S. salar (NP_001133148.1);虹鳟O. mykiss (NP_001158591);斑马鱼D. rerio (NP 001017797.1)。细线方框内为RNA识别基序(RRM)

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of CIRP among L. crocea and other teleost

GenBank accession number: sablefish *A. fimbria* (ACQ58801.1); Atlantic salmon *S. salar* (NP_001133148.1); rainbow trout *O. mykiss* (NP_001158591); zebrafish *D. rerio* (NP 001017797.1). RNA recognition motif (RRM) is marked with filament box





明,大黄鱼CIRP基因在肝脏中表达量最高,在 肌肉和肾脏中为中等表达,而在鳃、皮肤、 肠、脑、脾脏和心脏等组织中表达水平较低(图4)。 在慢性低温胁迫条件下,9个组织中CIRP基因表 达量呈不同的变化规律,其中鳃、脑和心脏3个 组织均呈现先显著上升后显著下降的变化 (P<0.05),其峰值均出现在8°C时,相对表达量 分别为12°C时的5.07、7.69、2.83倍;肠、肾 脏、肝脏和脾脏4个组织均显著下降(P<0.05),6℃ 时表达量都下降至最低水平,与12°C时相比下 降幅度分别为80.0%、65.6%、91.2%和55.6%;皮 肤和肌肉组织则在整个胁迫过程中呈持续升高 趋势,且在6°C时表达量仍然处于很高的水平, 分别为12°C时的11.56倍和9.03倍(图4)。

http://www.scxuebao.cn

2.4 急性低温胁迫下大黄鱼各组织*CIRP*基因 mRNA的表达变化

经急性低温胁迫后,鳃、皮肤、脑、肝脏 和心脏5个组织中CIRP基因的表达均呈先上升后 下降趋势,鳃、脑、肝脏3个组织经过0.5 h低温 胁迫后表达量显著升高、达到峰值(P<0.05),比 在0 h时分别升高了约1.47、6.92和1.71倍(图5)。 急性低温胁迫2~4 h时,鳃和脑中的表达量均降 至与0 h时相当的水平(P>0.05);而肝脏中表达量 持续降低,2 h时表达量与0 h时相当、4 h时则显 著低于0 h时的表达水平(P<0.05),降幅为 94.2%。急性低温胁迫0.5 h时皮肤和心脏中 CIRP表达量均未发生显著变化(P>0.05);胁迫2 h 时则显著升高(P<0.05),分别为胁迫前(0 h)的 4 期



图 4 实时荧光定量PCR检测慢性低温胁迫下大黄鱼各组织CIRP基因mRNA表达变化

1. 鳃; 2. 皮肤; 3. 肌肉; 4. 肠; 5. 脑; 6. 肾脏; 7. 肝脏; 8. 脾脏; 9. 心脏。图中数据表示为平均值±标准差(n=3)。同一组织中不同温度下的表达量之间无相同小写字母表示存在显著性差异(P<0.05),下同

Fig. 4 Changes of *CIRP* mRNA expression levels in different tissues of *L. crocea* under chronic cold stress detected by qRT-PCR

1. gill; 2. skin; 3. muscle; 4. intestine; 5. brain; 6. kidney; 7. liver; 8. spleen; 9. heart. Error bars indicate the mean and standard deviation (n=3). Without the same letter among different temperatures in the same tissue indicate significant difference (P<0.05), the same below





1.89倍和3.06倍;4 h时虽然比2 h时出现显著降低 (P<0.05),但仍高于胁迫前。急性低温胁迫中肌 肉、肠和肾脏3个组织的CIRP表达量总体均呈下 降趋势:肌肉中的表达量在0.5 h时显著降低 (P<0.05),降幅为27.6%,之后表达量均处于这一 水平;肠中的表达量在0.5 h显著降低(降幅为 50.0%, P<0.05),之后表达量虽有所升高但始终 低于胁迫前的水平;肾脏中的表达量在0~2 h期 间变化不显著(P>0.05),4h时出现显著降低(P<0.05),降幅为87.1%; 脾脏中的表达量在0.5h时显著升高了1.91倍(P<0.05),之后表达量略有波动但变化均不显著(P>0.05)。

3 讨论

本研究克隆得到大黄鱼*CIRP*基因cDNA全长 序列,预测编码一个由182个氨基酸组成、分子 量约为19ku的蛋白。序列比对分析显示大黄鱼 CIRP蛋白包含一个N端的RNA识别基序和一个 C端的甘氨酸富含区,这与之前报道的小鼠、人 类、非洲爪蟾、大西洋鲑等多种生物的CIRP--致,均属于富含甘氨酸的RNA结合蛋白家族^[9,18]。 系统进化树分析表明硬骨鱼类中CIRP基因进化 关系较近,特别是RNA识别基序高度保守;其 他脊椎动物CIRP基因虽然独成一支、与硬骨鱼 类CIRP基因同源性较低,但也均含有N端RNA识 别基序,表明这一结构对于其功能是非常重要的, 也提示该基因在不同生物中可能有着相似的功 能^[13];而哺乳类、爬行类、两栖类等脊椎物种独 成一支、与鱼类关系较远,显示了鱼类进化的 特异性及CIRP在进化中随物种进化而发生同源 性改变。

CIRP基因mRNA存在于动物的多种组织细 胞中,并且表达量各不相同[14, 19-22]。正常越冬水 温(12 ℃)下的组织表达分析表明,大黄鱼CIRP在 肝脏中表达量最高,肌肉和肾脏中有中等表达, 皮肤、心脏、肠、鳃、脑和脾脏中表达水平较 低,表明肝脏可能是非应激状态下冷诱导结合 蛋白CIRP的主要储备区。包括哺乳类在内的各 种动物、甚至微生物,在受到低温胁迫时都会 诱导产生一系列的冷休克蛋白,这些冷休克蛋 白对机体组织和细胞具有一定的保护作用[11]。冷 诱导RNA结合蛋白(CIRP)作为一种典型的冷休克 蛋白,降低温度可使其表达水平升高^[14]。研究显 示低温可诱导CIRP基因高表达, 使细胞分裂 G1期延长,从而抑制细胞的生长和代谢^[10]。正 常情况下CIRP蛋白蓄积于细胞核的应激颗粒 中,含量较少[12];当外界环境发生改变时(如低 温、缺氧、紫外线照射等应激原刺激),机体内 的CIRP合成增多,并通过C末端甲基化而由细胞 核转移至细胞质,参与DNA损伤修复、保障转 录和翻译的稳定, 使细胞、组织快速适应外界 反应,对机体发挥保护性作用^[23]。

在慢性和急性降温过程中,大黄鱼各组织中CIRP表达量变化程度和发生变化的温度点、时间点各不相同,这可能与不同组织的生理特性、承担的功能不同等因素有关^[21]。在慢性低温胁迫下,CIRP基因在大黄鱼鳃、皮肤、肌肉、脑和心脏等组织中的表达量均显著升高,表明该基因参与了机体对降温的适应;皮肤和肌肉在整个降温过程中呈持续升高趋势,且在6℃时

表达量仍然处于很高的水平,比12°C时分别升高了约11.26、9.93倍,是慢性低温协迫中应对低温响应的主要组织。不同强度低温刺激大黄鱼各组织中CIRP基因表达量的改变可能是由于5'非翻译区转录物受到冷刺激强度和时间的影响而产生不同水平的mRNA来调控CIRP基因的表达^[21]。之前的研究显示"东海1号"大黄鱼的耐低温限度为5.5~6°C^[23],本实验中当水温由8降至6°C时,鳃、脑和心脏中的表达量均出现显著降低,提示此时的低温可能已经超过了大黄鱼的耐受能力,抑制了CIRP基因的表达。

在急性低温胁迫中,大黄鱼各组织CIRP基 因表达时间和表达量与慢性胁迫下的表达变化 规律有所差异。急性低温胁迫0.5 h时,脑和肝脏 中CIRP基因表达量大幅升高,表明当突然遭遇 8 °C低温刺激时,一方面脑作为调控机体的最高 级中枢要积极应对,同时肝脏也紧急转录合成 大量CIRP mRNA以供机体所需。但急性低温胁 迫4 h后肝脏中CIRP基因表达量显著降低至与慢 性低温胁迫中水温降至6 °C时相当的极低水平, 表明即使是在大黄鱼耐受范围之内的低温8 ℃条 件下,突然、长时间的胁迫也会对肝组织造成 与极限低温(6 ℃)相似的干扰,影响了CIRP基因 的表达。胡金伟等^[15]发现牙鲆肝脏中CIRP表达 量在低温胁迫后先显著升高、胁迫时间延长后 又显著降低,这与本研究结果相似。

本研究克隆了大黄鱼*CIRP*基因cDNA全长序 列,低温胁迫实验表明该基因参与大黄鱼对低 温的调节,研究结果为大黄鱼耐低温机制研究 提供了基础资料。在哺乳类中的研究显示CIRP 除参与应激调节外还参与生殖、发育、肿瘤发 生等多种生理过程^[11,13],其在大黄鱼中的功能 如何还有待于今后深入研究。

参考文献:

- [1] 刘家富, 韩坤煌. 我国大黄鱼产业的发展现状与对策
 [J]. 福建水产, 2011, 33(5): 4-8.
 Liu J F, Han K H. Current development situation and countermeasure of large yellow crocker industry in China[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2011, 33(5): 4-8 (in Chinese).
- [2] 徐镇, 江锦坡, 陈寅儿. 不同品系大黄鱼致死低温的研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2006, 19(4): 462-464.
 Xu Z, Jiang J P, Chen Y E. Study on low lethal

temperature of different strains of *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Ningbo University (NSEE), 2006, 19(4): 462-464 (in Chinese).

[3] 冀德伟,李明云,王天柱,等.不同低温胁迫时间对大黄鱼血清生化指标的影响[J].水产科学,2009,28(1):
 1-4.

Ji D W, Li M Y, Wang T Z, *et al*. Effects of low temperature stress periods on serum biochemical indexes in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Fisheries Science, 2009, 28(1): 1-4 (in Chinese).

 [4] 李明云, 冀德伟, 吴海庆, 等. 低温胁迫下大黄鱼肝脏 蛋白质组双向电泳分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 323-328.

Li M Y, Ji D W, Wu H Q, *et al.* 2-DE analysis in liver of *Pseudosciaena crocea* during low temperature stress[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(2): 323-328 (in Chinese).

 [5] 李明云,吴玉珍,冀德伟,等.低温选择大黄鱼 (Pseudosciaena crocea)的肝脏蛋白质组双向电泳分析
 [J].海洋与湖沼,2010,41(3):348-351.

> Li M Y, Wu Y Z, Ji D W, *et al.* 2-DE analysis of liver of *Pseudosciaena crocea* after low temperature breeding[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(3): 348-351 (in Chinese).

[6] 张晓丽, 胡玉珍, 李明云, 等. 养殖大黄鱼在自然海区 降温不同阶段抗氧化水平及血清酶活性的变化[J]. 海 洋科学, 2013, 37(11): 27-34.

> Zhang X L, Hu Y Z, Li M Y, *et al.* Changes in antioxidant level and serum enzyme activity of farmed large yellow croaker during natural water cooling in winter[J]. Marine Sciences, 2013, 37(11): 27-34 (in Chinese).

- [7] 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.
- [8] 刘浩.大黄鱼硬脂酰辅酶A去饱和酶-1(SCD-1)基因的 克隆与鉴定及在低温条件下对膜流动性影响[D].舟山:浙江海洋学院, 2015.

Liu H. Molecular clone, identification of Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and effect of SCD1 on membrane fluidity under cold stress[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2015 (in Chinese).

- [9] Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, et al. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth[J]. The Journal of Cell Biology, 1997, 137(4): 899-908.
- [10] Hamid A A, Mandai M, Fujita J, et al. Expression of cold inducible RNA-binding protein in the normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma[J]. International Journal of Gynecological Pathology, 2003, 22(3): 240-247.
- [11] Aloia R C, Raison J K. Membrane function in mammalian hibernation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, 1989, 988(1): 123-146.
- [12] De Leeuw F, Zhang T, Wauquier C, et al. The coldinducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylationdependent mechanism and acts as a translational repressor[J]. Experimental Cell Research, 2007, 313(20): 4130-4144.
- [13] 李士泽,金福厚,赵巧香,等.冷诱导RNA结合蛋白的 生物学功能研究进展[J].生理科学进展,2009,40(3): 271-273.

Li S Z, Jin F H, Zhao Q X, *et al.* Progress of research on CIRP and its biological functions[J]. Progress in Physiological Sciences, 2009, 40(3): 271-273 (in Chinese).

- [14] Pan F, Zarate J, Choudhury A, et al. Osmotic stress of salmon stimulates upregulation of a cold inducible RNA binding protein (CIRP) similar to that of mammals and amphibians[J]. Biochimie, 2004, 86(7): 451-461.
- [15] 胡金伟, 尤峰, 王倩, 等. 牙鲆耐寒相关基因CIRP、 HMGB1的克隆及表达特征分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(1): 29-38.

Hu J W, You F, Wang Q, *et al.* Cloning and expression analysis of cold-tolerance related genes, *CIRP* and *HMGB1*, in *Paralichthys olivaceus*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(1): 29-38 (in Chinese).

- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [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] Peng Y, Yang P H, Tanner J A, et al. Cold-inducible RNA binding protein is required for the expression of adhesion molecules and embryonic cell movement in *Xenopus laevis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 344(1): 416-424.
- [19] 刘爱军,薛菁晖,张志文,等. 冷诱导RNA结合蛋白 mRNA在低体温大鼠脑内的表达[J]. 中华神经医学杂 志, 2007, 6(12): 1228-1231.
 Liu A J, Xue J H, Zhang Z W, *et al.* Expression of coldinducible RNA-binding protein mRNA in the rat's brain under hypothermia[J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2007, 6(12): 1228-1231 (in Chinese).
- [20] Nishiyama H, Danno S, Kaneko Y, et al. Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature[J]. The American Journal of Pathology, 1998, 152(1): 289-296.
- [21] Sugimoto K, Jiang H J. Cold stress and light signals

induce the expression of cold-inducible RNA binding protein (*cirp*) in the brain and eye of the Japanese treefrog (*Hyla japonica*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(4): 628-636.

- [22] Xue J H, Nonoguchi K, Fukumoto M, *et al.* Effects of ischemia and H₂O₂ on the cold stress protein CIRP expression in rat neuronal cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(11-12): 1238-1244.
- [23] 苗亮,李明云,陈炯,等.快长、耐低温大黄鱼新品种东海1号的选育[J].农业生物技术学报,2014,22(10):
 1314-1320.

Miao L, Li M Y, Chen J, *et al.* Breeding of fast growth and low temperature tolerance of new variety Donghai No. 1 large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(10): 1314-1320 (in Chinese).

http://www.scxuebao.cn

Cloning of cold inducible RNA-binding protein (CIRP) gene in Larimichthys crocea and its expression analysis under cold treatments

MIAO Liang, LI Mingyun^{*}, CHEN Yingying, HU Mou, CHEN Jiong

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to investigate the function of cold inducible RNA-binding protein (CIRP) of large yellow croaker Larimichthys crocea in cold acclimatization, CIRP gene was cloned and the expression changes were analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The full-length of cDNA sequence of CIRP is 1211 bp, encodes 182 amino acid residues and the protein molecular weight is 19 ku. Amino acid sequence alignment showed that CIRP was conserved in teleost, especially the RNA recognition motif (RRM) at N-terminal was highly conserved. The phylogenetic tree analysis showed that CIRP of L. crocea had the highest identity to sablefish Anoplopoma fimbria (81.5%), CIRP of L. crocea and other teleost formed a clade. During chronic cold stress (water temperature slowly decreased from 12 °C to 6 °C), the CIRP expression of skin and muscle significantly increased with the temperature decreasing, in which the expression levels at 6 °C rose 11.56 and 9.03 times compared to 12 °C. In gill, brain and heart, the expression of CIRP increased at first and then decreased, and the maximum appeared at 8 °C which were 5.07, 7.69 and 2.83 times compared to 12 °C. The expression level significantly decreased with the temperature increasing in intestine, kidney, liver and spleen, and the decreasing amplitude at 6 °C were 80.0%, 65.6%, 91.2% and 55.6% compared to 12 °C respectively. During acute cold stress (from 12 °C to 8 °C immediately and maintained for 4 h), the expression levels of CIRP in gill, skin, brain, liver and heart increased first and then decreased, reflected the stress and adaptation process of L. crocea to cold. Compared to 12 °C, the CIRP expression in muscle and intestine were always at a lower level during acute cold stress. The difference of tissue expression of *CIRP* between chronic and acute cold stresses suggested that there were multiple regulation mechanisms replying to cold stress in L. crocea. The present study indicated CIRP was involved in L. crocea responding to cold stress, and the results could provide fundamental data for further research on the mechanism of response to low temperature in L. crocea.

Key words: Larimichthys crocea; cold treatment; cold inducible RNA-binding protein (CIRP); tissue expression

Corresponding author: LI Mingyun. E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10A403-4); Key Technologies R&D Project of Zhejiang Province (2016C02055-7)