

文章编号: 1000-0615(2018)11-1673-11

DOI: 10.11964/jfc.20171111029

大黄鱼高温适应的转录组学分析

邓素贞, 韩兆方, 陈小明, 李庆昌, 肖世俊, 李佳凯, 刘贤德*

(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)

摘要: 为了探究大黄鱼高温胁迫条件下基因表达水平的变化, 实验利用Illumina Hiseq 2500的125 pair-ended测序模式分别对大黄鱼高温处理组和常温对照组进行了转录组测序。对照组(3个生物学重复)和高温处理组(3个生物学重复)分别获得15.28和13.92 Gb测序数据, GC含量平均值约为51%。过滤后的高质量测序reads使用Bowtie2软件比对到大黄鱼参考转录组序列上估计基因表达量, 进而进行基因表达差异统计学检验。以常温对照组为参比, 高温处理组中阈值设为 $|\log_2(FC)| > 2$ 和 $FDR < 0.05$, 共检测到1 259条显著差异表达基因。其中, 821条基因为高表达, 438条基因为低表达。随机选取12条差异表达基因, 运用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)进行了验证, 结果证实转录组分析可靠。进一步将所有差异表达的基因进行GO功能注释和KEGG通路富集分析, 结果发现大量差异表达基因的功能与氧化还原反应、蛋白质折叠和去折叠、糖和脂代谢以及某些疾病的发生相关。该研究结果为下一步深入研究大黄鱼高温适应的调控机制提供了重要的参考材料。

关键词: 大黄鱼; 转录组测序; 差异表达基因; qRT-PCR

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属鲈形目(Percomorphes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Larimichthys*), 为暖温性鱼类, 对水温的适应范围为10~32 °C, 最适生长温度范围为18~25 °C, 不同地理群体对温度的适应范围有所差异^[1]。自1987年突破大黄鱼人工育苗以来, 经过近30年的发展, 已成为我国养殖量最大的海水鱼类, 年产量高达16.55万t^[2]。近年来, 由于全球气候变暖以及极端天气出现的频率和强度增强, 海水温度持续偏高, 导致大黄鱼温度适应性减弱、抗病力下降, 并且水温的上升导致病原微生物的增殖和生长, 加速疾病的传播, 引发大黄鱼大量发病死亡, 给人工养殖业造成了难以回避的损失^[3-5], 严重威胁大黄鱼产业的健康可持续发展。因此, 应用分子生物学手段, 加快开展大黄鱼耐热性状相关的功能基因筛选及其调控机理研究, 对于揭示耐热性状的分子机制, 培

育抗高温的养殖品种至关重要。

大黄鱼为暖温性鱼类, 容易产生高温应激。肝脏是鱼类最大的消化腺, 也是最重要的代谢器官之一, 物质代谢能力旺盛^[6], 在机体中具有解毒、免疫防御和激素合成等作用。在热应激过程中, 肝脏对于机体减少或免受高温应激的伤害具有极其重要的作用^[7]。在虹鳟上的研究发现, 热应激后会导致虹鳟肝脏或肝细胞中Hsp90 β , Hsp90b2, Hsp70b, Hsp60, Hsp47和Hsp40等热应激蛋白基因的表达量升高^[8-11]。因此本研究选用肝脏组织作为实验材料进行大黄鱼高温适应转录组学分析。

转录组技术是利用高通量测序对特定组织或细胞中所有RNA反转录而成的cDNA文库进行测序, 可在没有研究物种基因信息的情况下, 直接对任何物种的转录组进行分析, 是目前进行基因发现、查找控制特异性状的潜在主效基

收稿日期: 2017-11-07 修回日期: 2018-03-12

资助项目: 国家自然科学基金(31172397); 福建省高校新世纪优秀人才支持计划(JA14167)

通信作者: 刘贤德, E-mail: xdlu@jmu.edu.cn

因和研究基因表达调控的有效方法^[12]。应用转录组技术研究非生物胁迫下关键基因的变化趋势,解析生物适应环境的复杂的分子机制,已成为当前研究的热点。Smith等^[13]通过转录组测序分析,初步找到了一些与杜氏虹银汉鱼(*Melanotaenia duboulayi*)高温适应性相关的候选基因,探索了该鱼类在适应逐渐变暖的气候环境里起关键调控作用的生化过程。Liu等^[14]通过转录组测序分析,发现了鲇(*Silurus asotus*)在高温应激下诱导表达的一系列基因,并探讨了KEGG代谢富集通路中蛋白质折叠、降解、合成、能量代谢、离子运输和细胞骨架重构在高温应激时的功能特点。Bilyk等^[15]利用转录组测序分析,探索了博氏南冰魮(*Pagothenia borchgrevinki*)应对温度胁迫的分子机制,并首次推测性别会影响鱼类应对温度胁迫时基因的转录。

在水产养殖生产实践中,鱼类经常会遭受环境胁迫的影响而发生应激反应^[16]。国内外研究表明,由于受高温(或其他)刺激,鱼类下丘脑-垂体-肾间组织轴会迅速作用释放大量促肾上腺皮质激素,从而导致头肾细胞皮质醇激素的合成,并释放到血液中去^[17]。皮质醇同糖皮质激素受体复合物结合,转移到细胞核内,形成二聚体之后结合到特定的DNA区域(其位置处于目标基因的启动子区域),调节包括新陈代谢、免疫反应及繁殖相关基因的转录模式,从而保护鱼体自身免受损害^[18-19]。由于高温胁迫会影响鱼类的很多基因表达^[14, 20],再使用以往单个基因的研究方法来研究高温适应机理已很难奏效,必须借助组学的方式,从整个转录组学层面进行研究^[21]。

前期一些研究发现了3个与高温相关的微卫星标记^[22],38个SNP标记^[23],以上研究是在基因组层面,不能反应高温应激条件下基因的表达情况。基于此,本研究以大黄鱼为研究对象,通过转录组分析,揭示大黄鱼高温胁迫条件下与常温对照组的转录组差异并从中挖掘关键基因及调控途径,对于研究大黄鱼适应机理具有重要的参考意义,也为下一步培育耐高温大黄鱼提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于2014年5—6月在宁德市金铃水产有

限公司养殖场进行,选取宁德市三都镇青山渔排同一网箱规格均一、健康无伤的大黄鱼30尾[体质量(88.45±5.62)g,体长(18.53±0.64)cm,10月龄]放于宁德市金铃水产有限公司育苗场内水泥池(3 m×3 m×1 m)中暂养一周后开始实验,暂养期间水温(25.0±0.2)°C,正常投喂饵料,每天换水1次。

1.2 高温实验

实验分为实验组和对照组[(25.0±0.3)°C],每组15尾幼鱼。实验组从初始水温25°C按每天升高1°C的速度升温,升至32°C时停止升温,水温在32°C维持14 d后取样。实验期间,连续充气,正常投喂饵料,每天换水1次,换水前将新水预热至实验温度。对照组水温维持在(25.0±0.3)°C,正常换水、投饵,与实验组同一时间取样。实验组和对照组的大黄鱼各随机取9尾,解剖取其肝脏组织,立即置于液氮中速冻,然后在-80°C冰箱保存,备用。

1.3 RNA提取、文库构建和测序

取-80°C保存的肝脏组织样品,按100 mg组织加入1 mL Trizol reagent (Invitrogen, USA)混匀匀浆,以常规Trizol法提取肝脏组织总RNA。使用DNase I (TaKaRa Biotechnology, China)经37°C水浴30 min消化总RNA中残留的DNA,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,紫外分光光度计检测其纯度及浓度。高温养殖和常温养殖的大黄鱼,参考Liu等^[14]通过混样的方法消除个体之间的差异。对照组和实验组各9个肝脏RNA样品,每3个样品等量混合在一起,构成每组各3个生物学重复^[24]。在对照组和实验组中,利用皮尔逊相关系数 r 作为生物学重复相关性的评估指标,相关性统计见附件1,得出常温对照组和实验组各3个生物学重复中每2个样品的 r^2 均大于0.93,说明样品间的相关性较强。利用Illumina公司的TruSeq™ RNA sample preparation kit完成cDNA文库的构建,并通过Illumina HiSeq 2500测序平台的125 paired-end模式进行转录组测序(北京贝瑞和康)。

1.4 差异表达基因分析及功能注释

将去除接头和低质量序列后得到的clean reads利用Bowtie 2软件比对大黄鱼参考转录组序列^[25],根据FPKM^[26](fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)值估计高温组和对

照组的基因表达量。利用edgeR软件^[27]检测差异表达基因, 阈值设为 $|\log_2(\text{FC})|>2$ 和 $\text{FDR}<0.05$ 。通过GSEA软件^[28]对差异基因进行GO功能注释和KEGG通路富集分析。

1.5 实时荧光定量PCR分析

选择12个差异表达基因, 用Primer Premier 5软件设计引物(表1), 进行实时荧光定量PCR分

析。将各样品3次生物学重复的RNA采用第一链cDNA合成试剂盒(Promega公司, 美国)反转录为cDNA, 以反转录产物为模板。以 β -actin为内参, 采用TaKaRa公司的SYBR Green RT-PCR试剂盒, 利用LightCycler 480(Roche公司, 瑞士)进行荧光定量检测。各样品每个基因重复3次, 按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法进行定量计算相对表达量。

表 1 实验所用的引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

差异表达基因 DEGs	正向引物序列(5'-3') forward (5'-3')	反向引物序列(5'-3') reverse (5'-3')
<i>β-actin</i>	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT
<i>stoml2</i>	GCTTCCCTCGTCCCTTC	ATCCGCTGCCTTCGTTA
<i>chacl</i>	AGAGGTGTGTTGGGAGG	GGGTTGTCAGAAGTAGCG
<i>bhmt</i>	TCTGCTGCCAGGTCTGAAGATGA	GCCACCTCTCAGGATCAACTCAAG
<i>cyp26a1</i>	ACTCCTGCGTGCTGGTCTATCC	TGCTCGTCGGTCTGATCTGTT
<i>ndufaf4</i>	CCATACTACACAGGCGTGACACTG	GCTCAGAGGTCCAAACAAGGTTGA
<i>tim44</i>	AGGAGGTGAGTCGTAAGATTGG	AGCAGAGTGCATGGCTGTCTTG
<i>dnaja3</i>	TCTGTCGGTCAGTGTCTTTGGTA	GGGAAGGGTATCGCTCGTATT
<i>hsp27</i>	GTCCTCAGAAACCACGATACCT	ACTGTGCTGCTGTCTCTCTACT
<i>plekha4</i>	GGAGCTGAATTTGCTGCTGTTG	GCCTCTTGGTCGTCATCTCAT
<i>fst5</i>	GGAGCAAGGTAGTTGTGGTCGT	ACAGAGTCATAGAGTGCCAGGGT
<i>loc104928179</i>	GAGATGCTCGGGAAGGTAGGA	GCTGTTGCTTGAAGCGTTTATGTC
<i>hamp</i>	TTCTGTGCCAAGTGTTCATCCC	CAAAGTAAGTGTAGCCCAAACCTCATT

2 结果

2.1 mRNA测序数据

利用Illumina HiSeq 2500的125PE测序模式, 分别对大黄鱼对照组和高温处理组进行了转录组测序。对照组和高温处理组分别获得15.28和13.92 Gb测序数据。去除接头序列、低质量序列后, 分别得到14.85和13.47Gb clean data。碱基质量及组成分析显示, 每组GC含量区间为51.32%~51.99%, 各样品Q30的碱基质量值比例均不小于92.18%(表2)。

2.2 样品基因表达量总体分布

大黄鱼常温对照组和高温处理组间的比较能反映它们在基因表达水平上的基本差异(图1-a), 在图中的每个点表示一个基因, 以 $\log_{10}(\text{FPKM})$ -control为横坐标, $\log_{10}(\text{FPKM})$ -heat为纵坐标, 其

绝对值越大, 说明表达量越高。在 $\text{FDR}<0.05$ 和 $|\log_2(\text{FC})|>2$ 条件下, 高温处理组与常温组相比, 共获得1 259个差异表达基因。图中绿色和红色的点代表有显著性表达差异的基因, 绿色代表基因表达量下调, 红色代表基因表达量上调, 黑色的点代表无显著性表达差异的基因。其中有821个差异基因上调, 438个差异基因下调(图1-b)。

2.3 表达模式分析

以不同实验条件下1 259条差异基因的FPKM值为表达水平, 做层次聚类(hierarchical clustering)分析, 不同的颜色区域代表不同的聚类分组信息, 红色表示表达量高的基因, 绿色表示表达量低的基因(图2)。这些基因的聚类结果显示, 高温处理组和对照组差异基因表达模式相差较大, 而组内样品间差异基因表达模式相似。从聚类结果可以得出结论, 在高温处理

表 2 测序数据的统计汇总

Tab. 2 Statistic summary of the sequencing data

样品 samples	对照组1 control 1	对照组2 control 2	对照组3 control 3	高温组1 heat 1	高温组2 heat 2	高温组3 heat 3
raw reads	40 376 718	43 740 896	38 183 996	35 579 074	41 076 914	34 759 306
raw bases/bp	5 047 089 750	5 467 612 000	4 772 999 500	4 447 384 250	5 134 614 250	4 344 913 250
clean reads	40 118 930	43 427 210	38 145 284	35 340 334	40 836 130	34 527 144
clean reads ratio/%	99.36	99.28	99.90	99.33	99.41	99.33
clean bases/bp	4 879 475 846	5 276 683 699	4 696 031 255	4 295 361 468	4 975 388 611	4 195 515 422
clean bases ratio/%	96.68	96.51	98.39	96.58	96.90	96.56
average reads length/bp	107.07	114.57	109.99	138.07	129.22	136.01
Q30/%	94.63	94.32	92.18	94.52	94.99	94.48
GC content/%	51.41	51.32	51.87	51.54	51.99	51.74

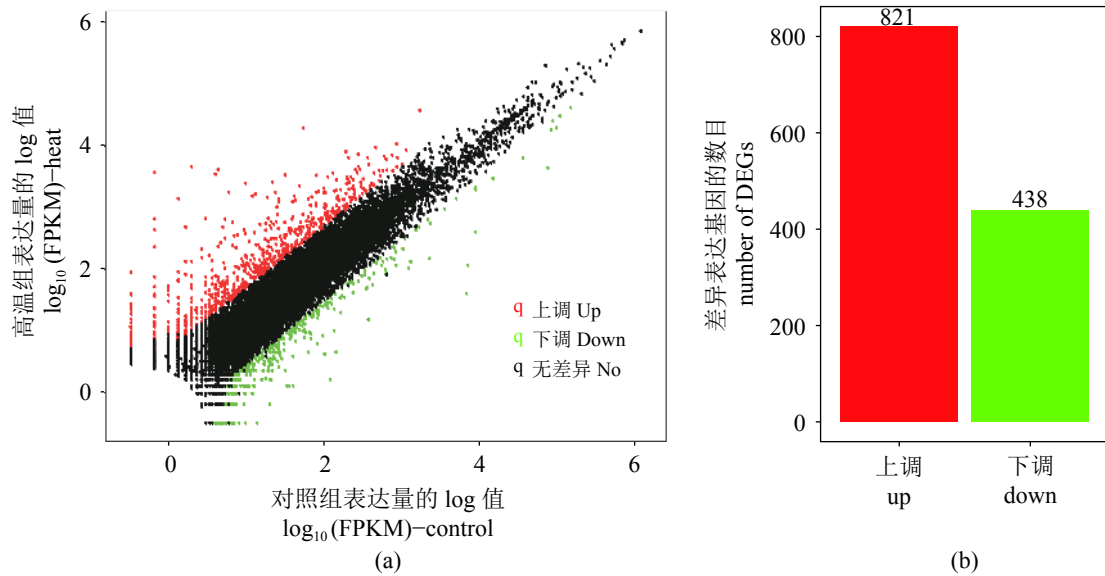


图 1 高温处理组和对照组基因表达量检测结果

(a) 基因表达量在2组中的比较; (b) 差异表达基因中上调和下调基因的数量

Fig. 1 Comparison of gene expression value (FPKM) between heat and control samples for detecting differently expressed genes (DEGs)

(a) FPKM value comparison. (b) The number of up-regulation and down-regulation DEGs

后, 大量基因表达发生明显的变化, 样品中的上调差异表达基因数量较多, 可能参与大黄鱼高温应答的互作通路。

2.4 差异基因的GO和KEGG注释

利用R语言中的GSEA软件包对差异表达基因进行GO富集分析, GO总共有3个ontology, 分别描述基因的分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component)、生物过程(biological

process)。在GO功能分类体系中, 1 259条差异表达基因共得到116个GO功能注释。上调基因映射到60个GO节点, 下调基因映射到56个GO节点。本实验选取30个最显著富集的GO节点(图3), 在分子功能类型中包含10个子类别, 其中长链脂肪酸联合酶活性, 电子载体活性, 未折叠蛋白结合, 细胞色素c氧化酶活性, 2铁-2硫群结合中的差异表达基因较多。在细胞组分功能类型中, 线粒体、线粒体内膜所含差异表达基因比例较

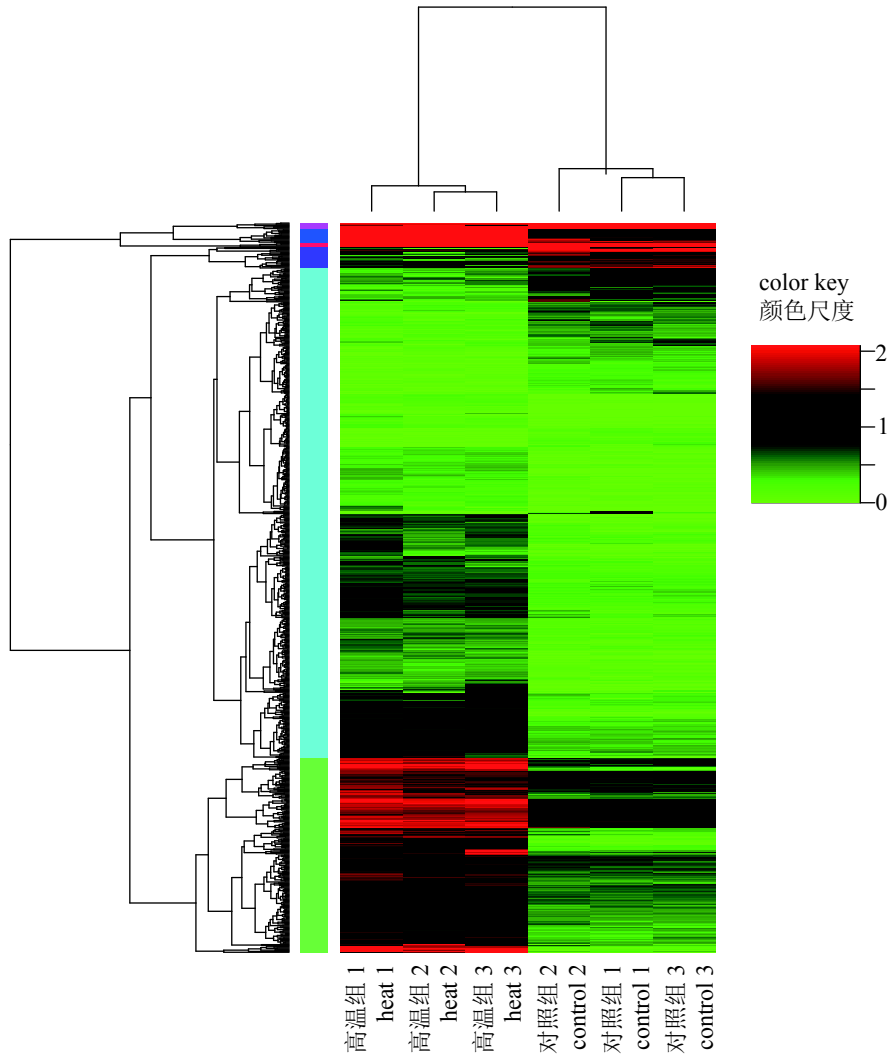


图 2 差异基因的聚类热图

不同列代表不同样品, 不同行代表不同基因

Fig. 2 Heatmap analysis of DEGs between heat and control samples

Different columns represent different samples, and different rows represent different genes

高, 线粒体膜间隙运输, 线粒体基质富集也较为显著。涉及生物过程功能的差异表达基因包含16个子类别, 主要的生命过程是氧化还原过程, 由上调基因组成。分子伴侣介导的蛋白折叠辅因子, 糖酵解, 蛋白复性, 线粒体蛋白加工, 应激反应中的差异表达基因富集较为显著, 表明大黄鱼肝脏在高温胁迫过程中产生了大量参与调控代谢的活动过程。

KEGG数据库富集出在高温处理后, 表现出显著差异的代谢途径, 其中 Q 值为多重假设检验校正之后的 P 值。 Q 值越小, 表示差异表达基因在该通路中的富集显著性越高。高温处理组和常温对照组的差异表达基因注释到了51条特定的

代谢通路, 上调基因注释了42条通路, 下调基因注释了9条通路, 本实验选取了19条显著富集的代谢通路(图4)。包括氨基酸生物合成, 碳代谢、谷胱甘肽代谢, 军团病, 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 内质网蛋白质加工等通路, 其中参与内质网蛋白质加工通路的基因所占比例最高。内质网的加工主要包括酰基化、羟基化、二硫键、糖基化形成等, 而其中最主要的是糖基化, 几乎所有需要在内质网合成的蛋白质最终都要被糖基化。大黄鱼高温胁迫后内质网蛋白质加工通路所涉及的基因为17个, 而与高温胁迫最为相关的热激蛋白基因Hsp70和Hsp90即是属于这个通路。

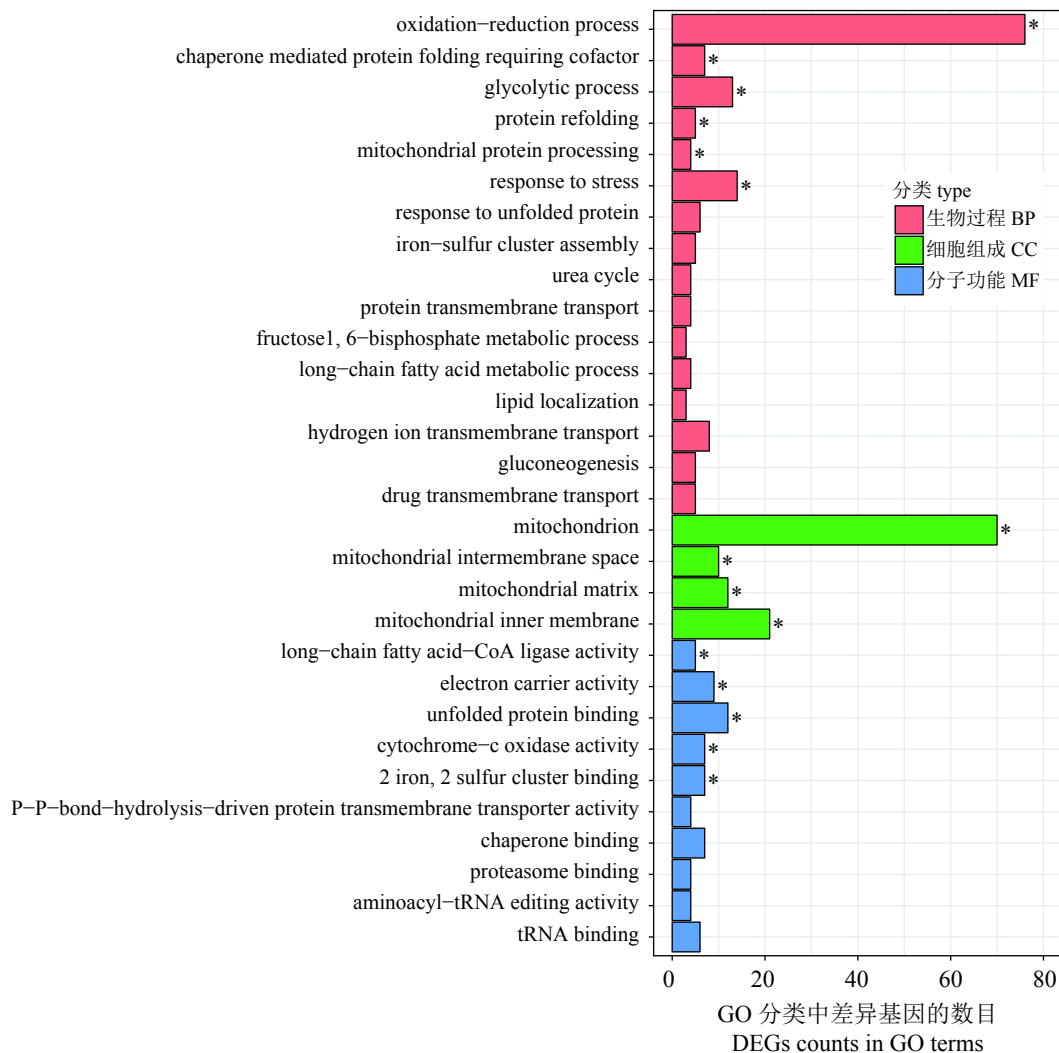


图3 前30个显著富集的GO terms

Fig. 3 The most enriched top 30 GO terms and corresponding DEGs numbers of each term

2.5 实时荧光定量PCR结果

从转录组分析结果中随机挑选12条差异表达显著的基因，通过荧光定量PCR(qRT-PCR)相对定量法检测高温处理组与对照组基因转录的差异，并与转录组分析结果进行比较(图5)，结果表明，被测基因的表达趋势与转录组中基因表达分析结果一致，证明了转录组分析结果的可靠性。

3 讨论

全球气温升高的情况日趋严重^[29]，物种为了生存下来必须要尽快适应温度的变化。物种适应高温的策略主要有2种：一是通过遗传变异或者突变产生耐高温的潜能，二是通过改变生

存环境。自然界动物一般在栖息地生存条件恶化时，例如发生严重自然灾害或动物大量繁殖后，就会发动大规模迁移以避免种群的灭顶之灾，而我国大黄鱼以近海人工网箱养殖为主，大黄鱼生存环境固定且网箱水深较浅，其活动空间受到很大的约束，因此研究大黄鱼的高温适应机理及培育耐高温大黄鱼至关重要。

在外界环境发生变化后，生物体内并非某一个基因或者是某一个信号通路发生改变，而是整个调控网络的变化。在本实验中，高温处理组与对照组相比，共有1 259条差异表达基因，表达量上调的基因有821条，表达量下调的基因有438条。表明高温可能激活了细胞的代谢，以应答高温应激环境下对大黄鱼体内造成的伤害。早期研究表明，当机体受到逆境胁迫

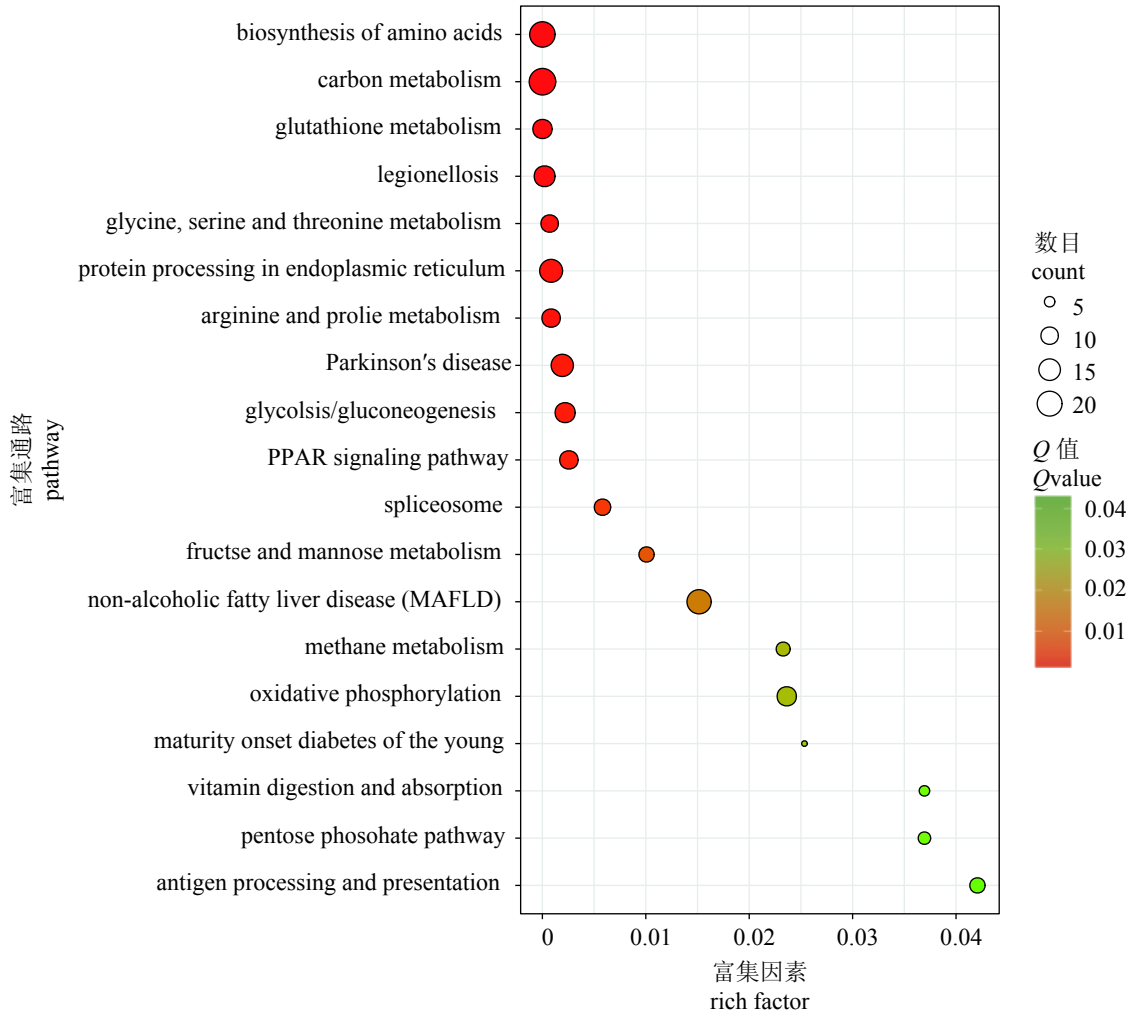


图 4 代谢通路KEGG显著富集结果

纵轴表示代谢通路, 横轴表示富集丰富度, 点的大小表示通路中差异基因的多少, 点的颜色表示Q值的范围。颜色梯度由红到绿对应富集显著性由高到低

Fig. 4 The significantly enriched pathways and corresponding DEGs number of each pathway

The vertical axis refers to pathways, horizontal axis rich factor. The size of the dot refers to the number differential expression genes in this pathway. The color of the dot refers to correspond to the scope of Q value. The color gradient is from red to green and the corresponding enrichment is high to low

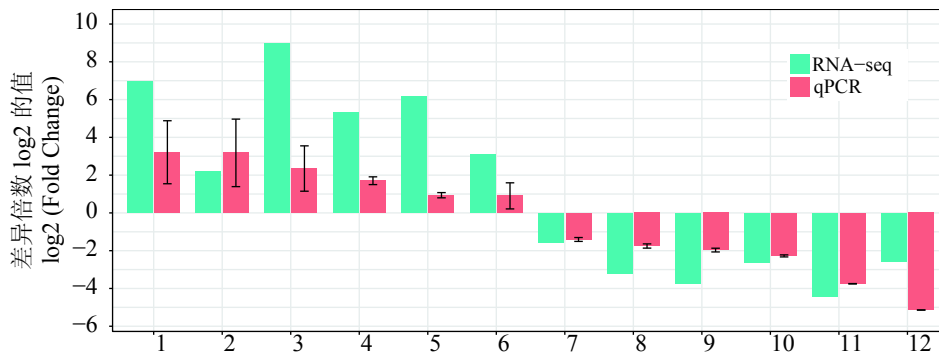


图 5 12个差异表达基因的qRT-PCR及转录组的比较分析

Fig. 5 Comparison of twelve DEGs by qRT-PCR and transcriptome analysis

1. *fstls*, 2. *bhmt*, 3. *pleakha4*, 4. *loc104928179*, 5. *hamp*, 6. *chacl*, 7. *dnaja3*, 8. *stom12*, 9. *hsp27*, 10. *tim44*, 11. *ndufaf4*, 12. *cypz6al*

时,很多的酶和结构蛋白都会受到结构和功能的改变,此时机会激发热激蛋白的合成,来保护机体自身抵御逆境^[30]。本实验中,大黄鱼高温处理组和常温对照组差异表达基因的KEGG通路注释后发现参与内质网蛋白质加工通路的基因最多。内质网基因加工途径中上调基因主要包括Sec61, PDIs, NEF, Hsp70和Hsp90。Sec61复合体主要是将未组装的蛋白质亚基或折叠错误的肽链转至细胞质基质进行泛素化降解; PDIs则是对细胞的分化发育,功能维持以及细胞活性的维持起重要作用^[31]。热激蛋白HSP70和HSP90以及扩增调控因子(NEF)的显著上调表明了热激蛋白受高温胁迫时激发表达的特性,这些伴侣蛋白与变性蛋白质相互作用,防止其聚集和错误折叠,可以使大黄鱼尽可能避免高温带来的伤害。

除热应激蛋白外,更多的基因可能通过代谢通路相互作用共同应答高温胁迫。我们发现11条差异基因显著富集到PPAR信号通路中($P<0.001$)。研究表明,PPAR信号通路与动物免疫防御和抗炎方面有关,PPAR α 调节因子影响长链脂肪酸和脂蛋白代谢,调控脂质代谢,在脂肪肝的发生、发展中具有重要作用^[32]。由此推测本实验中大黄鱼在高温环境下新陈代谢、能量消耗加强;随后糖酵解、糖异生作用增强,高温的持续进而引发糖代谢、脂肪代谢紊乱,免疫力下降;最终导致患多种疾病的趋势增加。例如在KEGG通路中显著富集的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、早发性糖尿病等。另外,显著富集的谷胱甘肽代谢通路,由上调基因组成,其作用是保护细胞免遭氧化损害,为维持细胞的内环境提供还原性物质^[33],以抵抗高温胁迫。

4 结论

利用Illumina Hiseq 2 500测序平台,本实验首次对大黄鱼高温处理组和对照组进行了转录组测序。以常温对照组为参比,高温处理组检测共发现1 259条差异表达基因,其中821条基因为显著性高表达,438条基因为显著性低表达。对样品进行聚类获得差异基因聚类热图,显示高温处理组和对照组之间表达模式差异巨大,而组内样品间表达模式相似。对差异表达的基因进一步进行GO功能注释和KEGG功能富集分

析,发现高温对大黄鱼能量代谢、蛋白质折叠、物质跨膜运输以及某些疾病的发生率有显著影响。本研究结果对于研究大黄鱼高温适应机理、培育耐高温新品种提供了参考。

参考文献:

- [1] 沈益绿,陈亚瞿.低盐度驯化对大黄鱼和黑鲟存活的影响[J].水利渔业,2007,27(6):47-48.
Shen A L, Chen Y Q. Effects of low salinity domestication on the survival of *Pseudosciaena crocea* and *Sparus macrocephalus*[J]. Reservoir Fisheries, 2007, 27(6): 47-48(in Chinese).
- [2] 农业部渔业局.中国渔业统计年鉴2017[M].北京:中国农业出版社,2017.
Bureau of Fisheries. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. China fisheries yearbook 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017(in Chinese).
- [3] 倪海儿,王国良.网箱养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)疾病与环境因子的关系[J].海洋与湖沼,2009,40(1):72-77.
Ni H E, Wang G L. Relationship between diseases in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* marine cage culture and environmental factors[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(1): 72-77(in Chinese).
- [4] 金珊,王国良,赵青松,等.海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究[J].水产科学,2005,24(1):17-19.
Jin S, Wang G L, Zhao Q S, et al. Epidemiology of vibriosis in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson) in marine cage culture[J]. Fisheries Science, 2005, 24(1): 17-19(in Chinese).
- [5] Jia Q J, Fan Z J, Yao C L. Identification and expression profiles of ERK2 and ERK5 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) after temperature stress and immune challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(2): 410-419.
- [6] 黄布敏,袁莉刚,曲亚玲,等.虹鳟胆管系统组织学观察[J].甘肃农业大学学报,2013,48(1):31-36.
Huang B M, Yuan L G, Qu Y L, et al. The morphology study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(1): 31-36(in Chinese).
- [7] 周彦静,刘哲,夏斌鹏,等.持续热应激对虹鳟肝脏组织形态结构的影响[J].甘肃农业大学学报,2017,

- 52(6): 1-5.
- Zhou Y J, Liu Z, Xia B P, *et al.* Effect of continuing heat stress on the liver tissue morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2017, 52(6): 1-5(in Chinese).
- [8] Li Z, Liu Z, Wang Y N, *et al.* Effects of heat stress on serum cortisol, alkaline phosphatase activity and heat shock protein 40 and 90 β mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Biologia, 2016, 71(1): 109-115.
- [9] Jia Y D, Cavileer T D, Nagler J J. Acute hyperthermic responses of heat shock protein and estrogen receptor mRNAs in rainbow trout hepatocytes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2016, 201: 156-161.
- [10] Shi H N, Liu Z, Zhang J P, *et al.* Effect of heat stress on heat-shock protein (Hsp60) mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(2): 5280-5286.
- [11] Wang Y N, Liu Z, Li Z, *et al.* Effects of heat stress on respiratory burst, oxidative damage and *SERPINH1* (*HSP47*) mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(2): 701-710.
- [12] Li E C, Li C. Use of RNA-seq in aquaculture research[J]. Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences, 2014, 2: e108.
- [13] Smith S, Bernatchez L, Beheregaray L B. RNA-seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 375.
- [14] Liu S K, Wang X L, Sun F Y, *et al.* RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish[J]. Physiological Genomics, 2013, 45(12): 462-476.
- [15] Bilyk K T, Cheng C H C. RNA-seq analyses of cellular responses to elevated body temperature in the high Antarctic cryopelagic nototheniid fish *Pagothenia borchgrevinkii*[J]. Marine Genomics, 2014, 18: 163-171.
- [16] 高金伟, 习丙文, 滕涛, 等. 急性胁迫对团头鲂铁稳态及其相关基因表达的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1562-1570.
- Gao J W, Xi B W, Teng T, *et al.* Effects of acute stress on iron homeostasis and iron homeostasis related genes in *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(10): 1562-1570(in Chinese).
- [17] Janey Z, Jeney G, Maule A G. Cortisol measurements in fish[M]//Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, *et al.* Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1992: 157-166.
- [18] Aluru N, Vijayan M M. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling[J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 164(2-3): 142-150.
- [19] Jaxion-Harm J, Ladich F. Effects of temperature change on cortisol release by common carp *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Fish Biology, 2014, 84(4): 1221-1227.
- [20] Jeffries K M, Hinch S G, Sierocinski T, *et al.* Transcriptomic responses to high water temperature in two species of Pacific salmon[J]. Evolutionary Applications, 2014, 7(2): 286-300.
- [21] Oszolak F, Milos P M RNA sequencing: Advances, challenges and opportunities[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(2): 87-98.
- [22] Chen X M, Li J K, Wang Z Y, *et al.* Thermal tolerance evaluation and related microsatellite marker screening and identification in the large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017, 35(3): 566-571.
- [23] 陈小明, 李佳凯, 王志勇, 等. 基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4): 735-740.
- Chen X M, Li J K, Wang Z Y, *et al.* Genome-wide association study of thermal tolerance in large yellow croaker *Larimichthys crocea* based on slaf-seq technology[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(4): 735-740(in Chinese).
- [24] Robles J A, Qureshi S E, Stephen S J, *et al.* Efficient experimental design and analysis strategies for the detection of differential expression using RNA-Sequencing[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 484.
- [25] Xiao S J, Han Z F, Wang P P, *et al.* Functional marker detection and analysis on a comprehensive transcriptome of large yellow croaker by next generation sequencing[J]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0124432.
- [26] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [27] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: A

- Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [28] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [29] Brander K M. Global fish production and climate change[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(50): 19709-19714.
- [30] Parsell D A, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins[J]. *Annual Review of Genetics*, 1993, 27(1): 437-496.
- [31] 刘昭弟. 高温胁迫下三裂叶蟛蜞菊转录组测序与分析[D]. 广州: 广州大学, 2017.
- Liu Z D. Transcriptome sequencing and analysis of *Wedelia trilobata* under high temperature stress[D]. Guangzhou: Guangzhou University, 2017(in Chinese).
- [32] Adegate E, Adem A, Hasan M Y, *et al.* Medicinal chemistry and actions of dual and pan PPAR modulators[J]. *Open Medicinal Chemistry Journal*, 2011, 5(2): 93-98.
- [33] Tate S S, Meister A. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 1981, 39(1): 357-368.

Transcriptome analysis of high-temperature adaptation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

DENG Suzhen, HAN Zhaofang, CHEN Xiaoming, LI Qingchang,
XIAO Shijun, LI Jiakai, LIU Xiande*

(Key Laboratory of Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture,
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to investigate the variations of gene expression of *Larimichthys crocea* under high temperature stress, two libraries of high temperature treatment group and control group were constructed and sequenced using the Illumina HiSeq 2500 platform (paired-end). High temperature treatment group (heat1, heat2, heat3) and control group (control1, control2, control3) obtained 15.28 Gb and 13.92 Gb raw data respectively, and the average GC content of each library was 51%. After strict filtering, clean reads were then mapped to the *Larimichthys crocea* reference transcriptome using the Bowtie 2 software, the amount of gene expression were also estimated according to the reads mapped to genes. EdgeR software package was then used to determine the differential gene expression of 2 groups of samples with a threshold criteria $FDR < 0.05$ and $|\log_2(FC)| > 2$. Totally 1259 differentially expressed genes (DEGs) were identified under high temperature stress, among which 821 genes were up-regulated and 438 genes were down-regulated. Twelve DEGs were random selected for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis, and the results confirmed that the transcriptome analysis was reliable. Furthermore, the DEGs were subject to GO and KEGG enrichment analysis, the results showed that most of the DEGs were involved in oxidation-reduction, reduction reactions, protein folding and defolding, glucose and lipid metabolism, and the occurrence of certain diseases. The results above mentioned provide foundation information for further study on the molecular mechanism of high temperature tolerance in *Larimichthys crocea*.

Key words: *Larimichthys crocea*; transcriptome sequencing; differentially expressed genes; qRT-PCR

Corresponding author: LIU Xiande. E-mail: xdliu@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31172397); The New Century Excellent Talents of Fujian Province University (JA14167)