

文章编号: 1000-0615(2019)06-1407-09

DOI: 10.11964/jfc.20180811413

## 大菱鲆高温胁迫应答主效QTL候选基因的表达特性分析

刘晓菲<sup>1,2,3</sup>, 马爱军<sup>2,3\*</sup>, 黄智慧<sup>2,3\*</sup>, 刘志峰<sup>2,3</sup>, 杨双双<sup>2,3</sup>, 杨凯<sup>2,3</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室,  
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东青岛 266071)

**摘要:** 为研究大菱鲆高温胁迫下相关应激基因的表达影响, 采用Real-time PCR对本课题组已定位到的大菱鲆高温胁迫应答主效QTL中的4个候选基因(*p53*、*UBE2H*、*ZNF469*和*MAGI2*基因)在不同温度胁迫下的肝脏、鳃、脾脏、皮肤4个组织中的表达量进行检测。以大菱鲆正常生活水温14℃为对照组, 20℃、23℃、25℃和28℃为实验组, 进行数据分析。结果显示, 4个基因在各个组织中均有表达, 且表达量具有组织和温度特异性。其中*UBE2H*的表达量在4个组织中均呈现出先上升后下降的趋势, 在肝脏、脾脏、皮肤组织中20℃时急剧上升并达到峰值且差异显著; 在鳃组织中23℃时达峰值, 差异显著。*p53*在4个组织中的表达量均有先上升后下降的趋势, 但在鳃和皮肤组织中28℃时表达量急剧升高达到峰值且差异显著。*ZNF469*和*MAGI2*在4个组织中均在20℃时大量表达, 并远高于其他温度。研究表明, 在大菱鲆高温胁迫应答过程中*p53*基因与DNA修复和细胞凋亡密切相关, 而*UBE2H*基因参与的泛素-蛋白酶体途径对*p53*基因具有反馈调节作用, 是维持细胞稳态的关键基因; *ZNF469*和*MAGI2*在作为鱼类应答高温胁迫的生物标志物方面具有重要研究价值。

**关键词:** 大菱鲆; *p53*基因; *UBE2H*基因; *ZNF469*基因; *MAGI2*基因; 高温胁迫

**中图分类号:** Q 785; S 965

**文献标志码:** A

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是我国北方主要海水养殖经济鱼类, 年产量已超过8万t, 占全球总产量的85%<sup>[1]</sup>。其属冷水性鱼类, 最适生长温度为13~17℃, 最高生长温度为21~22℃, 最低生长温度为7~8℃, 最高致死温度为26~28℃, 最低致死温度为0~3℃<sup>[2]</sup>。温度作为海洋生物的主要环境因子之一, 直接影响着鱼体的生理、生化状态以及行为<sup>[3]</sup>, 在非最适生长的高温条件下, 鱼体会产生一系列的应激反应, 并导致个体生长迟缓、免疫能力下降甚至死亡<sup>[4-5]</sup>。近年来, 大菱鲆养殖区域不断向南方扩展, 呈现出南北接力的态势, 加之全球气候变暖导致的海水温

度逐年上升, 使我国大菱鲆养殖业面临着新的挑战。因此, 对大菱鲆开展耐受高温分子机理研究, 在积极应对高温胁迫对大菱鲆的伤害以及耐高温选育工作等方面, 都极为重要。

近年来, 随着分子生物学技术的迅速发展, 国内外对水产动物耐高温选育以及分子机理研究成为热点。如大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[6-7]</sup>、褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[8]</sup>、牙鲆<sup>[9]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[10]</sup>等均开展了与耐温性状相关的分子标记筛选工作, 为水产动物分子辅助育种研究提供依据。MIPS<sup>[11]</sup>、caspase3<sup>[12]</sup>、TCP-1-beta<sup>[13]</sup>、TCP-1-eta<sup>[13-14]</sup>、HSP70<sup>[15]</sup>、尿苷胞苷激酶-1<sup>[16]</sup>等与

收稿日期: 2018-08-16 修回日期: 2018-11-15

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47-01); 青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才”培养计划(2017ASTCP-OS04); 国家自然科学基金(41706168); 山东省农业良种工程项目(2016LZGC031); 山东省重点研发计划(2016GSF115019)

通信作者: 马爱军, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn; 黄智慧, E-mail: huangzh@ysfri.ac.cn

温度胁迫相关的功能基因得到验证并获得全长克隆,对相关物种耐温分子机理研究具有理论意义。李成泽<sup>[16]</sup>在开展仿刺参(*Apostichopus japonicus*)耐寒研究中阐明了低温对非特异性免疫系统及营养物质储存和转运的影响;朱华平等<sup>[17]</sup>发现基因*AQP1*与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)耐寒性状显著相关。刘超等<sup>[18]</sup>研究指出高温刺激会导致虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)谷丙转氨酶GPT活性、p53蛋白含量、总抗氧化能力TAOC以及HSP70含量变化显著,它们分别与机体的蛋白质代谢活性、DNA损伤和细胞凋亡、抗氧化能力、维持蛋白质和溶酶体稳态有关。此外,高温还会影响心脏对机体的供氧供血能力。姜礼燧<sup>[19]</sup>对26种鱼类进行热激实验并进行组织学检查,归纳出生物热致死机制包括神经系统的破坏、酶系统和呼吸中心损害、血液系统破坏以及组织结构破坏等。

本课题组在开展大菱鲆分子育种的工作中,为了提高耐高温性状的选育效率,获得控制该性状的分子标记及关键基因,进行了大菱鲆高密度遗传连锁图谱构建与耐高温性状QTL定位研究,共获得7个QTL区间,并通过QTL区间内的全基因组比对及功能注释分析,筛选候选基因<sup>[20]</sup>。在此背景下,本实验采用荧光定量PCR技术对9个候选基因进行组织特异性表达分析,以及高温胁迫对其影响效应分析。其中,4个候选基因在耐高温实验中具有较为显著的差异性,以此开展实验,以期阐明大菱鲆高温胁迫应答的分子调控机理提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

耐温实验用鱼取自山东省烟台市天源水产养殖公司,均为人工繁育的健康幼鱼,体质量均为(290±10.2)g,体长均为(18.5±2.1)cm。

### 1.2 组织处理与取样

挑选活力正常的80尾鱼,在水缸中暂养2周后,选取60尾进行升温实验。期间每日10:00、18:00各投喂一次人工饵料,持续充气,换水一次。升温方法参考Ndong等<sup>[21]</sup>,稍作改动:设计5个温度,即14℃(常温)、20℃、23℃、25℃和28℃。首先(14±0.5)℃(常温)持续24h,之后每12h升温1℃至实验温度,采用静水法,自动恒温加热器控

温,保证各实验组同步升温。在每个温度点持续24h/48h后从每个水缸中各取3尾鱼的心、肝脏、脾脏、肾脏、鳃、肠道、皮肤、肌肉、脑共9个组织放入RNase-Free冻存管,所有样品采集后,迅速放入液氮中,后置于-80℃冰箱冷冻保存。

### 1.3 总RNA提取、定量与完整性检测及cDNA合成

采用RNAprep pure Tissue Kit试剂盒提取样品总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量,紫外分光光度计检测样品浓度。再利用TranScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix试剂盒合成cDNA第一链。

### 1.4 引物设计与筛选

根据QTL置信区间内9个候选基因的原始序列,在NCBI中同源比对尖吻鲈(*Lates calcarifer*)序列的ORF区,设计引物通过RT-PCR获得一段保守序列,并与QTL结果验证,在NCBI预测是否为目的基因片段,在经过验证的保守序列内设计荧光定量引物。以大菱鲆*β-actin*基因为内参,所有引物以Primer 5.0设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用Oligo 6.0检验引物优劣,BLASTX验证引物特异性和唯一性。相关引物序列见表1。

### 1.5 荧光定量PCR

荧光定量PCR在ABI7300 FAST RealTime PCR扩增仪上进行,按照TransStart® Top Green qPCR SuperMix使用说明,采用SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量PCR扩增反应。PCR反应体系为20 μL: TransStart® Top Green qPCR SuperMix(2×) 10.0 μL,上下游引物各0.4 μL(10 μmol/L), ROX Reference Dye(50×) 0.4 μL, DNA模板1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.8 μL。反应程序为94℃预变性30s; 94℃变性5s, 60℃退火30s, 循环40次。

### 1.6 数据分析

对每个反应做3个平行复孔,检验扩增曲线和溶解曲线的结果是否吻合,对各样品的C<sub>T</sub>值求平均值。以大菱鲆*β-actin*基因为内参,运用公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算各基因的相对表达量,公式中 $\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{目的基因}} - C_{T\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (C_{T\text{目的基因}} - C_{T\text{管家基因}})_{\text{对照组}} / (C_{T\text{实验组目的基因}} - C_{T\text{实验组管家基因}}) - (C_{T\text{对照组目的基因}} - C_{T\text{对照组管家基因}})$ <sup>[22]</sup>。采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)及Duncan氏检验对

表 1 9个候选基因qPCR引物序列

Tab. 1 Primers of nine candidate genes in quantitative PCR

引物名称 primer name	序列 (5'-3') primer sequence
UBE2H-F	CTTCCACACGCCTCCTTCATACG
UBE2H-R	GCAAGCACGAGGTCACCATCC
P53-F	CAGTCGCTATCGCTCCGCT
P53-R	CCAAGTCAAAGGTCTCCGTG
ZNF469-F	AAGGGGTAGCATCCTCCATC
ZNF469-R	TGCCTGTCCGTTAGTGTCTGT
MAGI2-F	ATAATAACCTGTCTGGAATAAC
MAGI2-R	GGGAAGAAAATGTAGCCTGT
PIDD-F	GACATCCTACTAAGTCGCCCT
PIDD-R	CAACCACCTCCTTCTTTTTCT
K-ras-F	GCAGGTAGTGATTGACGGA
K-ras-R	GATGGCAAAGACACAGAGG
$\alpha$ -甘露糖苷酶-F	GGGAGGAGTCATTCCGCCAG
$\alpha$ -甘露糖苷酶-R	AGCATCCAGAGCCAGCAGG
UBE2Q2-F	GGCTTTACAACCTGCCACAA
UBE2Q2-R	CTGCTCTCCCATTCTTCCTC
UBE2N-F	ACGGTGCTGTATCAATC
UBE2N-R	GGCTTTTTCTATGGCTTC
$\beta$ -actin-F	CATGTACGTTGCCATCCAAG
$\beta$ -actin-R	ACCAGAGGCATACAGGGACA

数据进行统计学分析,  $P < 0.05$ 表示差异显著。最后用Excel软件作图。

## 2 结果

*PIDD*及*K-ras*基因未检测到有效信号,  $\alpha$ -甘露糖苷酶基因在4个组织中均表现出先下降后上升的趋势, 但表达量结果不显著; *UBE2N*基因在肝脏中呈不断上升的趋势, 在其他3个组织中均呈现先下降后上升的趋势; *UBE2Q2*基因总体呈先上升后下降的趋势, 同样结果不显著。因此筛选了以下4个具有表达差异显著性的基因进行详细分析。

### 2.1 温度胁迫对UBE2H mRNA表达的影响

以大菱鲆 $\beta$ -actin基因为内参, 荧光定量PCR检测肝脏、鳃、脾脏和皮肤组织中UBE2H mRNA

的相对表达量。结果显示, UBE2H mRNA在各个组织中均普遍表达, 其中在肝脏和皮肤组织中的表达量较高, 在肝脏、鳃、脾脏组织中表达量均呈现先上升后下降的趋势, 在皮肤组织中的表达量总体趋势与其他3个组织大致相同, 只是在23 °C后略有上调, 25 °C与28 °C时维持平稳。其中肝脏、脾脏、皮肤组织中UBE2H mRNA的表达量均在20 °C时达到峰值, 差异显著( $P < 0.05$ ); 鳃组织中在23 °C时达峰值, 差异显著( $P < 0.05$ ); 肝脏、皮肤组织中UBE2H mRNA的表达量在20 °C时急剧上升, 肝脏组织中UBE2H mRNA的表达量随温度升高而逐渐下降, 而皮肤组织中UBE2H mRNA的表达量又急剧下降回到初始值再上升至平稳(图1)。

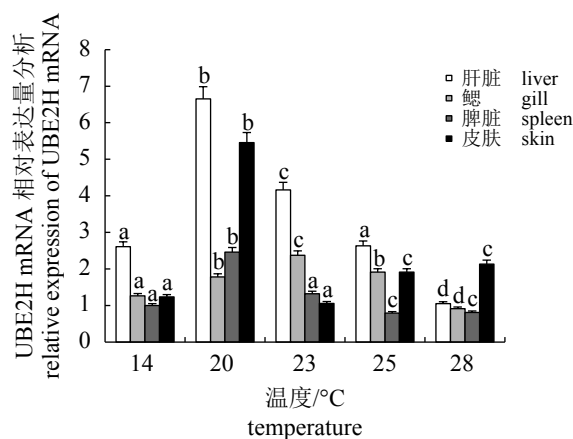


图 1 UBE2H mRNA在肝脏、鳃、脾脏、皮肤中的表达

不同的字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 1 UBE2H mRNA expression in liver, gill, spleen and skin

Different letters represent significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), the same below

### 2.2 温度胁迫对p53 mRNA表达的影响

以大菱鲆 $\beta$ -actin基因为内参, 荧光定量PCR检测肝脏、鳃、脾脏和皮肤组织中p53 mRNA的相对表达量。结果显示, p53 mRNA在肝脏、鳃、脾脏、皮肤中均有表达, 且相比与对照组均呈上调表达, 其中p53 mRNA在肝脏、鳃、脾脏、皮肤组织中的表达量总体呈现出先升高后降低然后在28 °C又升高的趋势。在鳃和皮肤组织中, p53 mRNA的表达量在28 °C时表达量急剧升高达到峰值, 远高于对照组, 而在肝脏和脾脏中p53 mRNA的表达量在20 °C时表达量达到峰值(图2)。

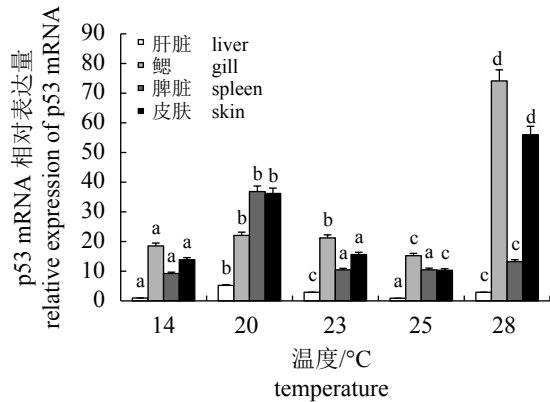


图2 p53 mRNA在肝脏、鳃、脾脏、皮肤中的表达

Fig. 2 p53 mRNA expression in liver, gill, spleen and skin

### 2.3 温度胁迫对ZNF469 mRNA表达的影响

以大菱鲆 $\beta$ -actin基因为内参, 荧光定量PCR检测肝脏、鳃、脾脏和皮肤组织中ZNF469 mRNA的相对表达量。结果显示, ZNF469 mRNA在各个组织中均普遍表达, 其中在肝脏和皮肤组织中的表达量较高, 在肝脏、脾脏中均在20 °C急剧上升达峰值, 后急剧下降至初始值并维持平稳, 最高值远高于各温度水平, 差异显著( $P < 0.05$ )。在鳃、皮肤组织中均在20 °C、28 °C急剧上调表达并远高于其他温度, 差异显著( $P < 0.05$ )(图3)。

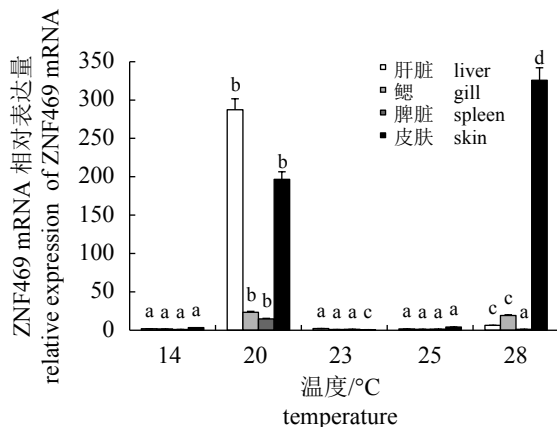


图3 ZNF469 mRNA在肝脏、鳃、脾脏、皮肤中的表达

Fig. 3 ZNF469 mRNA expression in liver, gill, spleen and skin

### 2.4 温度胁迫对MAGI2 mRNA表达的影响

以大菱鲆 $\beta$ -actin基因为内参, 用荧光定量

PCR检测MAGI2 mRNA的相对表达量。结果显示, MAGI2 mRNA在各个组织中均普遍表达, 其中在肝脏和皮肤组织中的表达量较高, 在肝脏、鳃、皮肤组织中均在20 °C急剧上升达到峰值, 后急剧下降至初始值并维持平稳, 最高值远高于各温度水平, 差异极显著( $P < 0.01$ )。在脾脏中, 先急剧升高至20 °C达峰值且差异极显著( $P < 0.01$ ), 后急剧下降, 再上升后下降, 差异不显著(图4)。

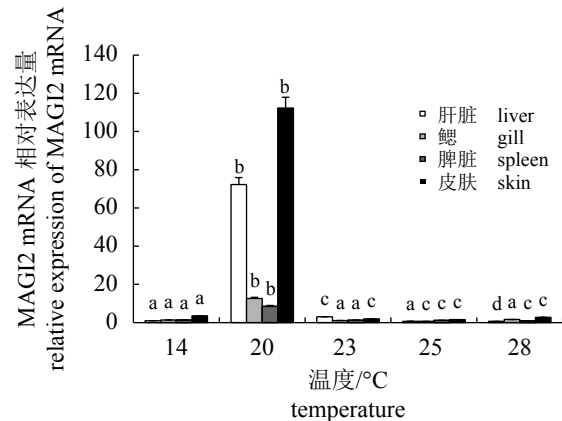


图4 MAGI2 mRNA在肝脏、鳃、脾脏、皮肤中的表达

Fig. 4 MAGI2 mRNA expression in liver, gill, spleen and skin

## 3 讨论

温度是影响海洋生物分布、生理状态、形态以及行为的重要环境因子<sup>[23]</sup>。高温刺激会引起鱼体的应激反应, 包括鱼体内各种消化酶及抗氧化酶的活性, 鱼体的呼吸和能量代谢, 氧运输及释放, 还有免疫能力等, 这些过程会调动大量的抗逆因子的转录及表达<sup>[24-26]</sup>。本实验通过构建高密度遗传连锁图谱获得与耐高温性状相关的QTL, 并在此区间内进行基因注释与富集。在此基础上, 挑选9个基因开展表达谱分析, 其中4个候选基因在耐高温性状中具有显著性差异。

### 3.1 高温胁迫对UBE2H基因表达响应分析

泛素结合酶E2H(ubiquitin-conjugating enzyme E2H, UBE2H)属于泛素结合酶E2家族成员, 其主要功能是在E1激活泛素后协助特异性E3s将活化的泛素转移到底物上, 从而使底物转移到蛋白酶体上进行降解<sup>[27-28]</sup>。已有研究证实, UBE2H的主要作用蛋白为组蛋白和细胞骨架蛋白, 同时参与运动神经元的退行性途径<sup>[29]</sup>。UBE2H是泛素-



蛋白酶体途径(UPP)的重要组成部分, UPP是调节细胞内蛋白水平与功能的重要机制, 此过程在细胞疾病和健康状态、生存和死亡的一系列基本过程中(细胞凋亡、DNA修复)均扮演重要角色, 蛋白质降解异常与许多疾病的发生密切相关。

本实验结果表明, 当环境变化时, 机体UBE2H mRNA的表达量在4个组织中均呈现先升高后降低的趋势, 且主要在20℃时出现高峰。本研究推测, 由于高温胁迫导致鱼体中多种酶活性降低, 受损的蛋白在鱼体中累积, 从而启动大量UPP途径, UBE2H基因含量随之上升以降解这些蛋白, 从而使机体适应环境的改变。本实验结果表明, UBE2H对高温变化的响应极为敏感, 其参与鱼体内受损或有害酶的结合并最终达到降解的目的, 以维持机体正常的生命活动, 推测UBE2H在DNA修复、细胞凋亡等过程中扮演着重要角色。当温度继续升高时, 机体中多种酶的失活以及DNA的受损引起UBE2H基因表达量的降低, 从而导致大菱鲆处于细胞失衡状态, 最终导致死亡。

### 3.2 高温胁迫对p53基因表达响应分析

p53是一种重要的肿瘤抑制基因, 也是细胞中重要的转录因子, 参与DNA损伤修复、细胞凋亡、细胞周期控制、胚胎发育等重要生命活动。对于可修复的损伤, p53调控细胞周期停滞, 并进行修复, 对不可修复的DNA损伤则启动细胞凋亡程序。

本实验中大菱鲆在受到高温刺激后, 温度由14℃上升到20℃时p53基因的表达量也上升, 推测是机体在高温应激时DNA损伤导致p53上调表达, 行使DNA修复或细胞凋亡的功能, 随后温度继续升高, 而p53基因的表达量出现小幅下降则可能是因为机体的反馈调节机制使p53维持在相对稳定状态, 杜文静<sup>[30]</sup>的研究结论也证实了这一观点, 一些负调控因子会阻止p53在细胞中的累积; 同时温度的持续升高即20℃之后造成的损害也同样导致了p53基因含量的降低。但当温度到达致死温度(28℃)时, 机体处在极端环境中, p53基因调控因子也受到损伤并导致p53大量表达以执行细胞凋亡的功能, 此时机体的器官、组织全面受损, 濒临死亡。在肝脏和脾脏中, 20℃是大菱鲆进行自我修复或者凋亡的高峰期; 而在鳃和皮肤组织中, 28℃是大菱鲆进行自我修复或者凋亡的高峰期。温度临界点, 稳

态无法维持导致细胞死亡, 最终导致鱼体死亡。

### 3.3 p53与泛素化降解

本实验中, p53基因与UBE2H基因在逐渐升温的过程中都呈现出先上升后下降的趋势, 推测p53基因的表达量与泛素-蛋白酶体途径密切相关。当温度升高, p53与泛素连接酶之间的固有链接被打断, 连接酶行使降解自身的功能, 使p53上调表达, 行使DNA修复及细胞凋亡功能, 这一观点在杜文静<sup>[30]</sup>的研究中也被证实。但当p53蛋白大量存在时, 机体会启动UPP途径对p53进行降解, 以阻止p53在细胞内的大量累积。因此, p53基因的上调表达伴随着UBE2H基因的上调表达, 以维持细胞内的稳态; 由于细胞内调节机制对物质变化能迅速作出反应, 因此在本实验中UBE2H基因的表达量变化与p53基因大致相同, 并不存在明显的滞后性。仅在鳃组织中UBE2H基因在23℃时达到峰值, p53基因在20℃达到峰值, 可以看出UBE2H随着p53蛋白的增加而上升。但当温度继续升高时, 机体中多种酶活性降低, 部分DNA受损及细胞死亡影响了DNA的正常转录, 因此, 两者的表达量都降低。

### 3.4 高温胁迫对ZNF469基因表达响应分析

锌指蛋白是一类具有手指状结构域的转录因子, 是真核生物中普遍存在的一类DNA结合蛋白, 在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育、增强植物抗逆性等方面具有重要价值。

本实验中ZNF469基因在20℃条件下, 在鱼体的4个组织中表达量均急剧升高, 随后又急剧下降, 推测是在鱼体感受到温度变化超过其最适生长温度时, 抗逆基因被大量表达以响应胁迫, 而锌指蛋白对这些靶分子的修饰作用至关重要, 经修饰后的靶分子才能特异性执行其功能并发挥作用。田路明等<sup>[31]</sup>的报道也证实ZNF469基因与特定的靶DNA或靶蛋白结合负责调控基因的表达以响应植物的逆境胁迫。ZNF469基因在高于20℃时急剧下降, 推测ZNF469基因与靶分子迅速结合而减少或因其他反馈调节因子所导致。国内外对ZNF469基因的研究较少, 仅在脆性角膜综合征等疾病中有相关报道<sup>[32]</sup>。Wang等<sup>[33]</sup>指出非编码区的ZNF469的高表达可以用作预测癌症的标志。目前ZNF469参与生物体高温胁迫应答的机制还没有相关报道, 是否可以将

其作为一种新的热应激标志物还需要进一步研究。

### 3.5 高温胁迫对MAGI2基因表达响应分析

MAGI2是膜相关鸟苷酸激酶转化蛋白2(membrane-associated guanylate kinase inverted 2), 又称为S-SCAM(synaptic scaffolding molecule), 是膜相关鸟苷酸激酶(membrane-associated guanylate kinase, MAGUK)家族成员之一。它属于一类突触支架分子, 在装配和锚定信号蛋白中起支架蛋白的作用, 可通过调控信号转导, 将通路组分以复合体的形式定位在细胞的特定区域, 诸如细胞膜、细胞质基质、细胞核、高尔基体、内体及线粒体。

目前, 国内外对MAGI2的研究相对较少, 最近Mahdian等<sup>[34]</sup>的研究将MAGI2视为一种检测前列腺癌(PCa)的新型生物标志物, 可提供早期预警, 但在动物抗逆研究中还没有相关报道。本实验中, MAGI2基因在20℃时出现急剧上调表达, 推测是大菱鲆在受到高温胁迫时, 需要MAGI2基因大量表达以调控机体的多种信号通路对高温胁迫做出应答。随后MAGI2基因又急剧下降, 可能是MAGI2基因已参与信号通路, 与其他成分形成了“复合体”或受到细胞内一些反馈调节机制的影响。MAGI2基因有可能成为鱼类抗逆性的重要指示因子。有关MAGI2基因在大菱鲆高温胁迫应答中参与的信号通路及其作用机理还需进一步研究。

综上所述, p53和UBE2H与大菱鲆高温胁迫应答机制中的DNA损伤和细胞凋亡密切相关; ZNF469基因和MAGI2基因或将成为大菱鲆鱼类响应高温胁迫的一种新型的生物标志物, 作为一种指示因子用来评价耐温选育子代的耐温性能。

#### 参考文献:

- [1] 刘龙腾, 朱雪梅, 赵明军. 中国大菱鲆产业发展演进与趋势分析[J]. *农业展望*, 2018, 14(9): 51-59.  
Liu L T, Zhu X M, Zhao M J. Development course and trends of turbot industry in China[J]. *Agricultural Outlook*, 2018, 14(9): 51-59(in Chinese).
- [2] 雷霖霖, 刘新富. 大菱鲆*Scophthalmus maximus* L. 引进养殖的初步研究[J]. *现代渔业信息*, 1995, 10(11): 1-3.  
Lei Q L, Liu X F. An primary study on culture of turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Journal of Modern Fisheries Information*, 1995, 10(11): 1-3(in Chinese).
- [3] Beitingger T L, Bennett W A, McCauley R W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 58(3): 237-275.
- [4] Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M, et al. Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1/2/3/4): 491-500.
- [5] 夏丹丹, 马爱军, 黄智慧, 等. 环境胁迫对大菱鲆C-型凝集素功能的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(2): 161-170.  
Xia D D, Ma A J, Huang Z H, et al. Effect of environmental stress on the function of C-type lectin in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 161-170(in Chinese).
- [6] 王惠儒, 柳敏海, 油九菊, 等. 大黄鱼群体遗传多样性分析及耐低温性状相关微卫星标记的筛选[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2014, 33(1): 6-13.  
Wang H R, Liu M H, You J J, et al. Genetic diversity analysis and screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* Richardson[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2014, 33(1): 6-13(in Chinese).
- [7] 穆方申, 苗亮, 李祥云, 等. 微卫星技术筛选大黄鱼耐低温标记[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(1): 34-38.  
Mu F S, Miao L, Li M Y, et al. Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(1): 34-38(in Chinese).
- [8] 李三磊, 徐冬冬, 楼宝, 等. 褐牙鲆耐热相关分子标记筛选及遗传多样性分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(4): 516-523.  
Li S L, Xu D D, Lou B, et al. The screening of molecular markers correlated to thermal-tolerance and genetic diversity analysis of selective stocks of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(4): 516-523(in Chinese).
- [9] 池信才, 王军, 宋思扬, 等. 耐温牙鲆分子标记辅助选育研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2007, 46(5): 693-696.  
Chi X C, Wang J, Song S Y, et al. Study on the breeding selection of thermal tolerance flounder (*Paralichthys olivaceus*) by a molecular marker[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, 46(5): 693-696(in Chinese).

- Chinese).
- [10] 常玉梅, 孙效文, 梁利群. 鲤鱼耐寒性状研究[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 102-105.  
Chang Y M, Sun X W, Liang L Q. Study on cold tolerant traits for common carp *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(2): 102-105(in Chinese).
- [11] 李明云, 苗亮, 陈莹莹, 等. 大黄鱼MIPS基因克隆及低温胁迫下的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(2): 292-301.  
Li M Y, Miao L, Chen Y Y, et al. Cloning of MIPS gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and the expression analysis under cold treatments[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(2): 292-301(in Chinese).
- [12] 孙盛明, 朱健, 戈贤平, 等. 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)caspase3基因克隆及其在高温胁迫中的表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(10): 4090-4099.  
Sun S M, Zhu J, Ge X P, et al. Cloning of caspase3 gene in *Megalobrama amblycephala* and analysis of its expression in high temperature stress[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(10): 4090-4099(in Chinese).
- [13] 谢建丽, 林勇, 曾兰, 等. 尼罗罗非鱼TCP-1-beta和TCP-1-eta的分子特征及其低温诱导表达[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 634-639.  
Xie J L, Lin Y, Zeng L, et al. Molecular characterization and induction expression of TCP-1-BETA and TCP-1-ETA under low temperatures in tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 634-639(in Chinese).
- [14] 殷勤, 彭金霞, 崔亮, 等. 凡纳滨对虾TCP-1-eta基因的克隆及与耐寒性状的相关性[J]. 遗传, 2011, 33(2): 168-174.  
Yin Q, Peng J X, Cui L, et al. Molecular cloning of *Litopenaeus vannamei* TCP-1-eta gene and analysis on its relationship with cold tolerance[J]. Hereditas (Beijing), 2011, 33(2): 168-174(in Chinese).
- [15] 明建华, 谢骏. 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)两种热休克蛋白 70(HSP70s)的原核表达、纯化及鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 185-191.  
Ming J H, Xie J. Prokaryotic expression, purification and identification of two hsp70s in Wuchang bream *Megalobrama amblycephala*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(1): 185-191(in Chinese).
- [16] 李成泽. 刺参候选耐寒基因的克隆与表达分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2014.  
Li C Z. Gene cloning and expression analysis of cold tolerant related genes in *Apostichopus japonicus*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [17] 朱华平, 刘玉姣, 刘志刚, 等. 低温胁迫对尼罗罗非鱼水通道蛋白基因(AQP1)表达的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1181-1189.  
Zhu H P, Liu Y J, Liu Z G, et al. Effects of cold stress on Aquaporin gene (AQP1) expression in tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1181-1189(in Chinese).
- [18] 刘超, 吴富村, 林思恒, 等. 高温刺激导致虾夷扇贝死亡因素的探究[J]. 海洋科学, 2016, 40(11): 91-98.  
Liu C, Wu F C, Lin S H, et al. Pilot study on reasons for yesso scallop's (*Patinopecten yessoensis*) survival after heat shock[J]. Marine Sciences, 2016, 40(11): 91-98(in Chinese).
- [19] 姜礼燾. 热冲击对鱼类影响的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 77-81.  
Jiang L F. Effects of thermal shock on fishes[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(2): 77-81(in Chinese).
- [20] 黄智慧. 大菱鲆耐高温性状QTL定位分析及相关功能基因研究[D]. 青岛: 黄海水产研究所, 2017.  
Huang Z H. QTL mapping analysis and related functional genes of high temperature traits in turbot[D]. Qingdao: Yellow Sea Fisheries Research Institute, 2017 (in Chinese).
- [21] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, et al. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(6): 686-694.
- [22] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2000, 46(1/2): 69-81.
- [23] Pörtner H O. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view[J]. Marine Ecology Progress Series, 2008, 373: 203-217.
- [24] 木云雷, 宋广军. 水温和盐度对大菱鲆稚鱼存活的影

- 响[J]. *水产科学*, 2005, 24(12): 1-3.
- Mu Y L, Song G J. The effects of temperature and salinity on survival rate of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(12): 1-3(in Chinese).
- [25] 郭黎. 大菱鲆在不同温度、盐度及其交互作用下机体生理生化指标[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Guo L. Study on physiological and biochemical of turbot at different temperature, salinity, and their interaction[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [26] 刘宝锁, 张天时, 孔杰, 等. 大菱鲆生长和耐高温性状的遗传参数估计[J]. *水产学报*, 2011, 35(11): 1601-1606.
- Liu B S, Zhang T S, Kong J, *et al.* Estimation of genetic parameters for growth and upper thermal tolerance traits in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1601-1606(in Chinese).
- [27] 兰秋艳, 高媛, 李衍常, 等. 泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(1): 14-30.
- Lan Q Y, Gao Y, Li Y C, *et al.* Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination[J]. *Chin J Biotech*, 2016, 32(1): 14-30.
- [28] 张莹莹, 朱恒奇, 赵莉霞, 等. 小鼠泛素结合酶 UBE2W 的抗体制备及组织表达谱分析[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 547-552.
- Zhang Y Y, Zhu H Q, Zhao L X, *et al.* Generation of mouse UBE2W antibody and analysis of UBE2W expression in mouse tissues[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(4): 547-552(in Chinese).
- [29] Martin I, Vourc'h P, Mahé M, *et al.* Association study of the ubiquitin conjugating enzyme gene UBE2H in sporadic ALS[J]. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 2009, 10(5-6): 432-435.
- [30] 杜文静. p53 蛋白在细胞凋亡中的作用机制研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2008.
- Du W J. The role of p53 in cell apoptosis[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2008 (in Chinese).
- [31] 田路明, 黄丛林, 张秀海, 等. 逆境相关植物锌指蛋白的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2005(6): 12-16.
- Tian L M, Huang C L, Zhang X H, *et al.* Advances of plant zinc finger proteins involved in abiotic stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2005(6): 12-16(in Chinese).
- [32] Rohrbach M, Spencer H L, Porter L F, *et al.* ZNF469 frequently mutated in the brittle cornea syndrome (BCS) is a single exon gene possibly regulating the expression of several extracellular matrix components[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2013, 109(3): 289-295.
- [33] Wang P S, Chou C H, Lin C H, *et al.* A novel long non-coding RNA *linc-ZNF469-3* promotes lung metastasis through *miR-574-5p-ZEB1* axis in triple negative breast cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(34): 4662-4678.
- [34] Mahdian R, Nodouzi V, Asgari M, *et al.* Expression profile of MAGI2 gene as a novel biomarker in combination with major deregulated genes in prostate cancer[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(9): 6125-6131.



## Expression characteristics analysis of major QTL candidate genes in response to high temperature stress in turbot (*Scophthalmus maximus*)

LIU Xiaofei<sup>1,2,3</sup>, MA Aijun<sup>2,3\*</sup>, HUANG Zhihui<sup>2,3\*</sup>, LIU Zhifeng<sup>2,3</sup>,  
YANG Shuangshuang<sup>2,3</sup>, YANG Kai<sup>2,3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding,

Qingdao Key Laboratory of Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Turbot (*Scophthalmus maximus*) is an important economic species extensively cultured in China. In this study, we exerted acute high temperature stress on turbot to identify the expression characteristics of four candidate genes including *UBE2H*, *p53*, *ZNF469*, and *MAGI2* genes in the liver, gill, spleen and skin. These genes are derived from the QTL related to high temperature resistance located at high-density genetic linkage maps. The relative expressions of *UBE2H*, *p53*, *ZNF469*, and *MAGI2* mRNA in four experimental groups (temperature 20 °C, 23 °C, 25 °C and 28 °C) and one control group (temperature 14 °C) were tested using real-time quantitative PCR. Data analysis demonstrated that the four genes were expressed in all tissues, and the expression levels were tissue and temperature specific. The relative expression of *UBE2H* mRNA firstly increased and then decreased in four tissues. The expression levels in the liver, spleen, and skin tissues increased rapidly at 20 °C and reached a peak value, and peaked at 23 °C in gill tissue. The expression of *P53* mRNA increased first and then decreased in four tissues. However, the expression of *p53* increased sharply at 28 °C and peaked significantly. It was speculated that the tissue was severely damaged and the cells are heavily apoptotic. *ZNF469* and *MAGI2* were abundantly expressed at 20 °C in four tissues, than other temperatures. Therefore, we think that both can serve as biomarkers for response to high temperature stress in turbot.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; *p53*; *UBE2H*; *ZNF469*; *MAGI2*; high temperature stress

**Corresponding author:** MA Aijun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn; HUANG Zhihui. E-mail: huangzh@ysfri.ac.cn

**Funding projects:** Modern Agro-industry Technology Research System under Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCPOS04); National Natural Science Foundation of China (41706168); Key Research and Development Plan of Shandong (2016GSF115019); Agricultural Fine Breed Project of Shandong (2016LZGC031)