

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181211001

http://www.yykxjz.cn/

杨凯, 黄智慧, 马爱军, 刘晓菲, 杨双双. 高温胁迫条件下大菱鲆肾脏转录组研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 86-95
Yang K, Huang ZH, Ma AJ, Liu XF, Yang SS. Transcriptome study of kidney of turbot under high-temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 86-95

高温胁迫条件下大菱鲆肾脏转录组研究*

杨凯^{1,2,3} 黄智慧^{1,3} 马爱军^{1,3}① 刘晓菲^{1,3} 杨双双^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 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 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071)

摘要 为探索大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)耐高温的分子机制, 筛选耐高温相关基因, 采用高通量测序平台(IlluminaHiSeq-2500)分别对5个不同高温处理组的大菱鲆肾脏组织开展转录组测序, 进行生物信息学分析, 包括GO(基因功能注释)、SSR(简单重复序列)分析等。结果显示, 通过组装得到Unigenes总数目为68525, 长度范围为201~23456 bp, 平均长度为1124 bp, N50长度为2316 bp。将Unigenes分别在Nr、Swissprot、KEGG、KOG、GO数据库进行序列比对及功能注释, 共注释25498条, 其中, Nr数据库注释到的Unigenes最多; 按GO功能分类, 共分为细胞组分、分子功能及生物学过程3类, 包括56个功能组, 其中, 大量Unigenes与细胞进程、代谢过程、催化活性、生物调节、应激反应相关。将Unigenes进行pathway注释, 归属于218条代谢通路, 分为5类KEGG途径: 代谢途径、遗传信息处理、细胞过程、环境信息和生物系统。进行转录因子分析, 共检测到65类转录因子, 其中, C2H2锌指蛋白家族的基因数目最多。通过对不同温度胁迫下基因表达谱结果进行分析, 不同温度组之间存在着显著差异, 在不同温度胁迫组中, 20℃组与28℃组存在差异最大, 差异基因达到4734个, 其中, 上调基因3386个, 下调基因1348个。本研究建立了大菱鲆热应激肾脏转录组数据库, 为大菱鲆高温胁迫分子机理研究提供了参考数据。

关键词 大菱鲆; 肾脏; 高温胁迫; 转录组; 生物信息学分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0086-10

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为我国北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一(雷霖霖等, 2002)。大菱鲆为冷温性鱼类, 对温度等环境指标要求较严, 适宜生长水温为12℃~19℃; 通常在良好的充气和流水

条件下, 耐受高温可达25℃~26℃(马爱军等, 2012), 但对夏季高温耐受能力较差。因受水温条件限制, 我国北方主要采用“养殖大棚+深井海水”模式进行养殖, 但近年来, 随着地下海水的匮乏, 南北接力养殖

* 现代农业产业技术体系专项(CARS-47-G01)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“鳌山人才”培养计划项目(2017ASTCP-OS04)、国家自然科学基金项目(41706168)、山东省良种工程(2016LZGC031)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-JC0302)共同资助 [This work was supported by Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-47-G01), Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2017ASTCP-OS04), National Natural Science Foundation of China (41706168), Good Seed Project of Shandong Province (2016LZGC031), and Chinese Academy of Fishery Sciences Basal Research Fund Under Contract (2016HY-JC0302)] 杨凯, E-mail: 791590743@qq.com

① 通讯作者: 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-12-11, 收修改稿日期: 2019-01-03

模式的出现, 养殖生产中对大菱鲆耐高温新品种的需求日益增加(关键等, 2013)。另外, 应用分子生物学手段, 加快开展大菱鲆耐热性状的分子机制研究, 对于培育耐高温的养殖品种具有较大意义。

转录组是指生物体的细胞或组织在特定的状态下基因组所转录的全部 mRNA, 反映了基因在不同生命阶段、生理状态、组织类型以及环境条件下表达的情况(罗辉等, 2015)。生物抗逆性受多个信号转导途径的调控, 需要多基因协同表达(崔文晓等, 2017), 因此, 开展转录组测序分析, 筛选关键信号通路及主效基因、转录因子等, 并利用关键转录因子的调控作用促使多个功能基因表达来提高鱼类机体的抗逆性, 是一种非常有效的方法和途径。近年来, 从转录水平分析生物对环境胁迫的分子响应机制的相关研究屡见不鲜。如在水生生物中, Bilyk 等(2014)利用转录组测序分析, 探索了博氏南冰鱧 (*Pagothernia 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; Huang 等(2018)在热应激条件下对虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 头肾进行了转录组表达谱研究, 但仅开展了常温组(18)、高温组(24) 2 个温度点的比较分析。

本研究为了尽可能完整、系统地获得热应激对大菱鲆肾脏影响的数据信息, 通过增加温度点, 对头肾组织进行转录组测序和生物信息学分析, 包括基因功能注释、SSR(简单重复序列)分析等, 探讨差异基因的表达情况, 为建立大菱鲆热应激条件下的物质代谢途径, 构建信号转导通路模型, 及发掘新的耐温基因提供一定的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 养殖实验及样品采集

实验用大菱鲆养殖于山东省烟台市开发区天源水产有限公司, 均为人工繁育的健康幼鱼。幼鱼为随机挑选, 平均体重为(100±12.3) g, 于实验室玻璃水缸(1 m 直径, 1 m 深)暂养 7 d。根据实验经验, 共设计 5 个实验温度: (13±1)°C(常温 CT)、20°C(T1)、23°C(T2)、25°C(T3)和 28°C(T4)。升温方法参照 Diegane 等(2007)并优化: 从常温(13±1)°C 按每 12 h 增加 1°C 的速度升高至实验水温, 每个处理组设 3 个平行组, 每组投放 15 尾大菱鲆幼鱼。驯养与实验期间, 每日早晚各投喂 1 次自制人工饵料, 并换水 1 次。采用静水法, 自动恒温加热器控温; 到达实验温度并维持 12 h 后, 每个平行组取 3 尾鱼体肾脏组织, 即每个处理组共取 9 尾幼鱼, 将 9 个样本放入 1.5 ml EP 管中

用液氮速冻, 置于-80°C 保存备用。

1.2 RNA 提取

将对对照组及处理组中的每个平行组的 3 个样本混合均匀后, 提取样品总 RNA, 即每组处理 3 份生物学重复。提取方法: 取肾脏组织在液氮中研磨成粉末, 用动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取总 RNA。用 NanoDrop 2000 核酸检测仪(Thermo 公司, 美国)检测 RNA 纯度, 用核酸分析仪 Agilent2100 (安捷伦科技公司, 美国)检测总 RNA 浓度及 RNA 质量。

1.3 肾脏转录组文库构建及测序

RNA-Seq 文库制备及测序由广州基迪奥生物科技有限公司完成, 测序平台为 Illumina HiSeq™2500, 采用双末端测序方法。

1.4 序列拼接与功能注释、富集

去除原始序列数据中含有接头及低质量的序列后, 得到 Clean reads, 并进行 De novo 组装。使用短 reads 组装软件 Trinity 将转录组从头组装成 Unigenes 数据集。通过 blastx 将 Unigenes 序列比对到 Nr、SwissProt、KEGG 和 COG, 得到 Unigenes 的蛋白功能注释信息。对所有 Unigenes 进行 GO 功能分类统计、KEGG Pathway 注释及通路富集分析。

1.5 预测编码蛋白框和转录因子

按 Nr、Swiss-Prot、KEGG 和 COG/KOG 的优先级顺序将 Unigenes 序列与以上蛋白库做 blastx 比对(E 值 $<1\times 10^{-5}$), 利用 Hmsearch 将 Unigenes 的 ORF 比对到 TF 数据库(Animal TFdb)预测 TF, 并将预测的 TF 按照家族类型分类。

1.6 微卫星(SSR)分析

简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)又称微卫星 DNA, 利用 MISA 软件对转录组的所有 Unigenes 进行搜索, 查找 SSR。搜索标准为: 单、一、二、三、四、五、六核苷酸基序(Motif)至少重复次数分别为 10、8、5、4、3、3, 对查找的 SSR 类型进行特征分析(贾新平等, 2014)。

1.7 基因表达差异分析

Unigene 表达量的计算使用 RPKM 法(Reads Per kb per Million reads)计算, RPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响, 计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差

异。分组之间的差异基因统计,利用 FDR 与 \log_2FC 筛选,筛选条件为 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$,其中,FC (Fold Change, FC) 标示两样品间表达量的比值。得到差异表达基因之后,对差异表达基因进行 GO 功能富集分析,KEGG Pathway 注释及通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据组装

利用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序技术对大菱鲂不同温度胁迫条件下肾脏组织开展转录组测序分析,1 个对照组与 4 个实验温度组共获得 Raw reads

及去除杂质后的 Clean reads (表 1)。由表 1 可以看出,共得到 224,473,610 个 Clean reads 片段,包含了 99.7 Gb 的序列信息,GC% 含量平均值为 51.05%。在测序质量值统计评估方面,碱基 Q30 为 88.65%,由以上数据得出,该转录组测序数据量和质量都较高,可为后续的组装提供可靠的原始数据。

采用 Trintiy 软件对 Clean reads 组装,共获得 Unigenes 总数目为 68525,长度范围为 201~23456 bp,平均长度 1124 bp, N50 长度 2316 bp。组装数据统计见表 2。Unigenes 长度分布图见图 1,结果显示,组装完整性较高,从而为后续信息学注释及差异基因的筛选奠定了基础。

表 1 大菱鲂高温胁迫转录组测序数据统计
Tab.1 Statistics of transcriptome sequencing data of heat stress of turbot

样品名称 Sample	Raw reads 总数 Total raw reads	Clean reads 总数 Total clean reads	GC 含量 GC percentage(%)	Q20 Q20 percentage(%)	Q30 Q30 percentage(%)
CK	42,653,941	41,620,119	50.7	95.6	89.1
T1	42,406,232	41,045,886	51.2	95.3	88.4
T2	43,270,232	42,340,163	50.7	95.8	89.3
T3	44,316,876	43,130,094	51.1	95.5	88.5
T4	57,697,730	56,337,348	51.2	95.6	88.9

表 2 大菱鲂高温胁迫转录组组装数据统计
Tab.2 Statistics of transcriptome assembly data of heat stress of turbot

Unigene 总数 Unigene total number	Unigene 最大长度 Unigene max-length (bp)	Unigene 最小长度 Unigene min-length (bp)	Unigene 平均长度 Unigene average length (bp)	N50 长度 N50 length (bp)
68525	23456	201	1124	2316

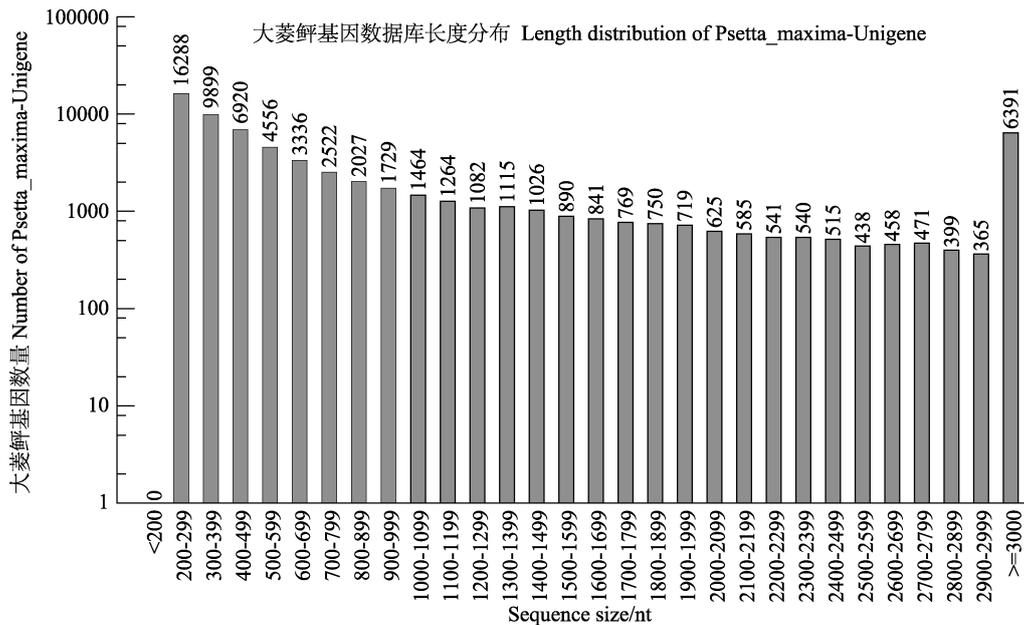


图 1 Unigene 长度分布
Fig.1 The statistics of sequence length of unigenes

2.2 大菱鲂肾脏转录组 Unigenes 的功能注释、分类和代谢途径分析

2.2.1 Unigenes 的注释及序列相似性分析 将 Unigenes 分别在 Nr、Swissprot、KEGG、KOG、GO 数据库进行序列比对及功能注释, 共注释 25498 条 Unigenes。其中, Nr 数据库注释到的 Unigenes 数量最多, 具体结果分别为: Nr 库 25442 条, Swissprot 库 21179 条, KEGG 库 15488 条, KOG 库 17111 条, Go 库 12760 条(表 3)。

表 3 Unigene 的注释结果
Tab.3 The result of Unigene's annotation

数据库 Database	注释 Unigene 数目 Number of annotated Unigene	注释 Unigene 百分比 Percentage of annotated Unigene(%)
Nr	25442	37.1
Swissprot	21179	30.9
KOG	17111	24.9
GO	12760	18.6
Kegg	15488	22.6
Annotation genes	25498	37.2
Total unigenes	68525	100

利用 Blastx 将组装出来的 Unigene 序列与 Nr 数据库进行比对, 结果显示, 功能注释匹配的物种中, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)所占的比例最高(29.2%), 随后依次是雀鲷(*Stegastes partitus*) (23.1%)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (5.3%)、革首南极鱼(*Notothenia coriiceps*) (4.7%)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (4.7%)等物种。

2.2.2 Unigenes 的 GO 分类 采用 Blast2Go 软件, 结合 GO 数据库对大菱鲂的 Unigene 进行功能分类, 从宏观上分析大菱鲂热应激胁迫后表达基因的功能分布特征。在 Go 分类体系中, 共有 3 个 Ontology, 分别描述基因的生物学过程(Biological process)、细胞组分(Cellular component)和分子功能(Molecular function)。结果表明, 共有 12760 条 Unigenes 获得 GO 注释, 划分为 56 个功能组, 并对每个功能组涉及的 Unigene 进行统计分析(图 2)。注释到 Molecular function 上的基因数目最多, 为 10053 个, 其次是 Biological process 9644 个, Cellular component 6270 个。其中, 细胞进程 6041 个, 单生物代谢过程 5240 个, 代谢过程 4842 个, 催化活性 4681 个, 细胞 3874 个, 生物调节 3535 个, 应激反应 1840 个和信号转导 1334 个功能组中涉及的 Unigenes 较多。这一分类结果显示了大菱鲂热应

激过程中基因表达谱的总体情况。

2.2.3 Unigenes 的 KOG 功能分类 蛋白质直系同源数据库(COG/KOG)对基因产物进行直系同源分类。研究显示, 大菱鲂肾脏转录组共获得 17111 个注释信息, 可归属于 25 类, 并对每类 Unigenes 进行统计分析。其中, 信号转导机制为 8661 个, 一般功能预测为 6528 个, 翻译后修饰、蛋白质折叠和分子伴侣为 3346 个, 转录为 2435 个, 细胞内转运、分泌和小泡运输为 2174 个, 细胞构架为 1925 个, 其他类别的基因表达丰度均各不相同(图 3)。

2.2.4 Unigenes 的 KEGG 分析 结合 KEGG 数据库注释信息, 进一步将大菱鲂肾脏 Unigenes 进行 Pathway 注释, 其中, 有 15488 个 Unigenes 获得对应的 Ko 编号, 归属于 218 条代谢通路, 分类为 5 类 KEGG 途径: 代谢途径、遗传信息处理、细胞过程、环境信息和生物系统。其中, 代谢途径主要包括碳水化合物代谢通路、氨基酸代谢通路、能量代谢通路、脂类代谢通路、核苷酸代谢通路等, 占据 KO 注释 Unigenes 的 25.4%(3941 条); 遗传信息处理主要包括翻译, 折叠、分选和相互作用, 转录, 复制和修复等, 共注释到 1907 条 Unigenes, 占 12.3%; 细胞过程主要由转运和代谢作用, 细胞生长与死亡, 运输分解代谢, 细胞连接等组成, 共注释到 2927 条 Unigenes, 占 18.9%; 环境信息主要包括信号转导, 信号分子与相互作用, 共注释 3230 条 Unigenes, 占 20.8%; 此外 2161 条 Unigenes 被注释到生物系统中。Unigenes 数量最多的 20 个代谢途径见图 4, 涉及细胞内吞、信号转导、能量代谢、循环系统、细胞连接等。

2.3 CDS 分析

通过 Blast 比对得到 CDS 核酸和氨基酸序列分布, ESTscan 预测编码区的核酸和氨基酸序列的长度分布(图 5)。

2.4 Unigenes 的转录因子分析

转录因子是能够结合在基因上游特异的核苷酸序列上的蛋白质, 能调控其靶基因的转录。对大菱鲂肾脏 Unigenes 进行转录因子分析, 共检测到 65 类转录因子。其中, C2H2 锌指蛋白家族的基因数目最大, 达到 429 个 Unigenes; 调节动物生长发育、响应逆境胁迫相关的 Homeobox 同源异位基因, 有 101 个 Unigenes; 与 Bhlh 家族相关的有 86 个 Unigenes; 参与抗逆响应的 TF-Bzip 家族相关的 Unigenes 有 83 个; 参与组织损伤修复、细胞迁移、再生等生命进程的 HMG

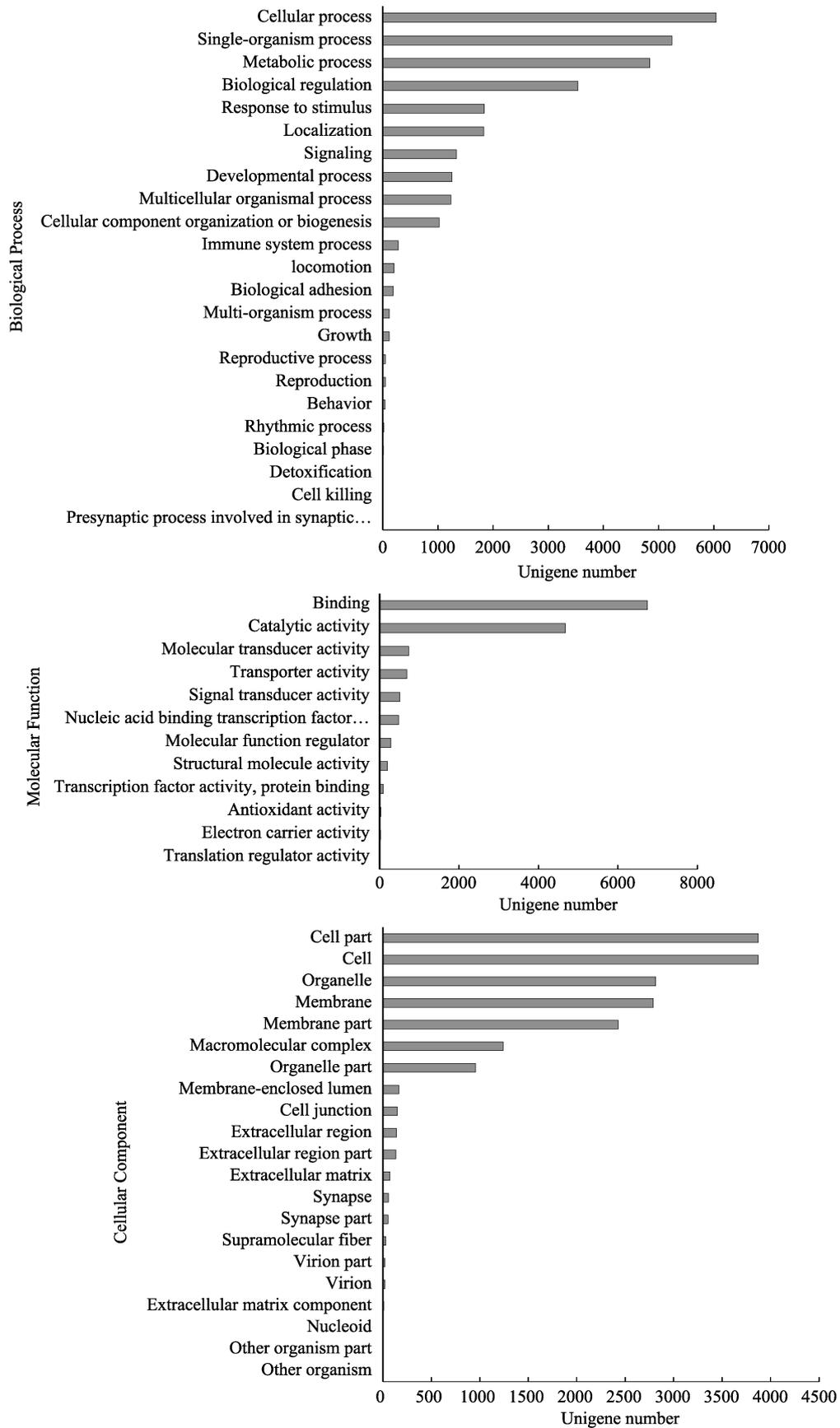


图 2 Unigenes 的 GO 功能分类图
Fig.2 GO functional categories of Unigenes

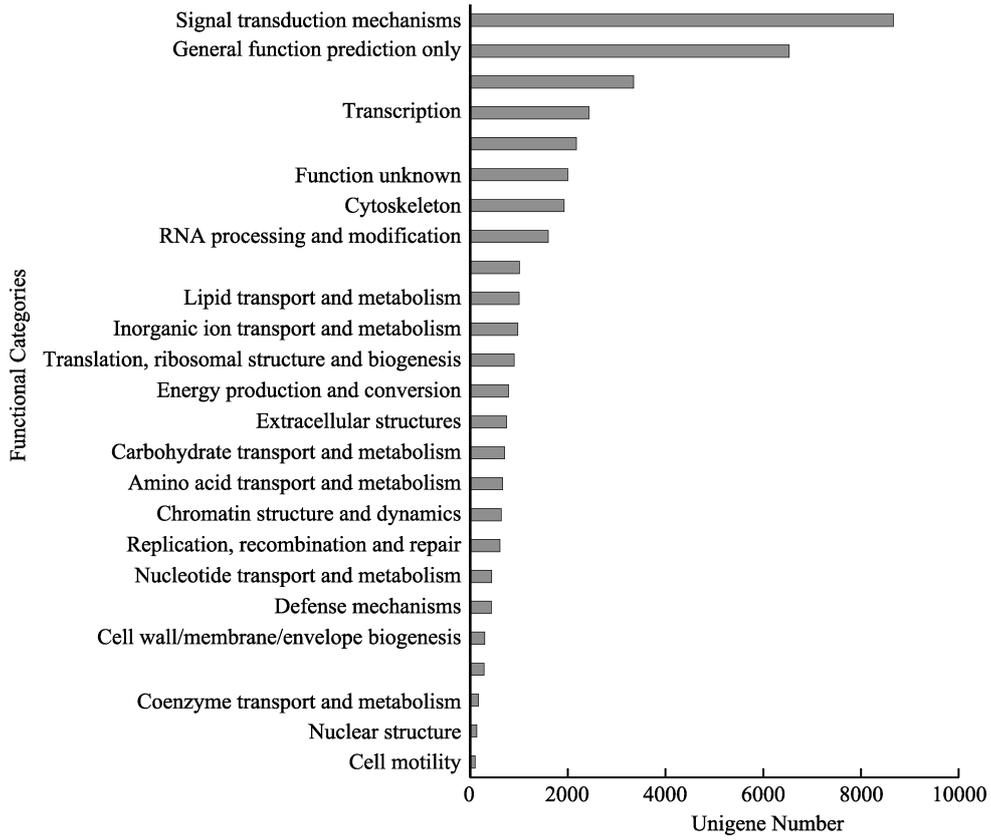


图 3 Unigenes 的 KOG 功能分类
Fig.3 KOG function classification of Unigenes

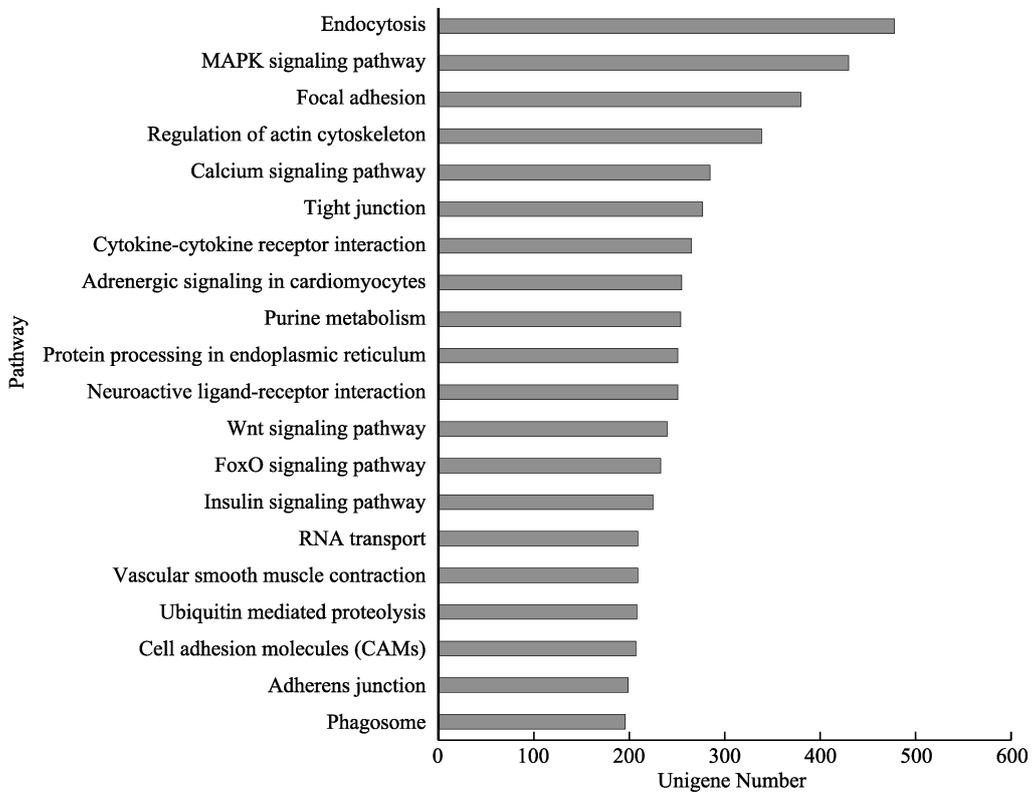


图 4 Unigenes 的 KEGG 功能分类
Fig.4 KEGG function classification of Unigenes

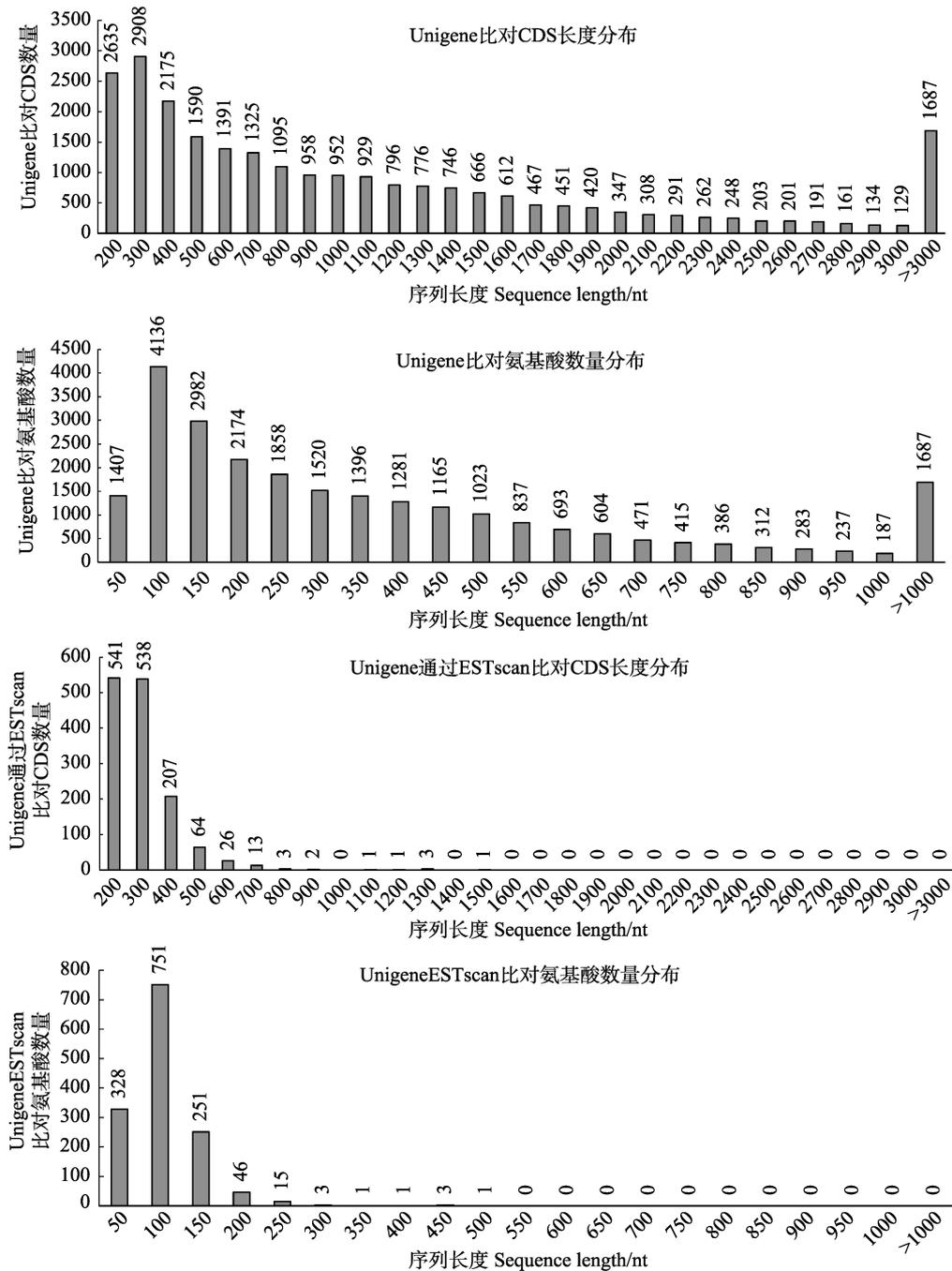


图 5 CDS 分析

Fig.5 CDS analysis

基因有 55 个 Unigenes; MYB 家族 42 个, ZBTB 家族 38 个; Fork-head 家族 34 个, THR-like 家族 33 个; 其余家族基因数目相对较少。

2.5 SSR 分析

对大菱鲂肾脏转录组的 68525 条 Unigenes 进行 SSR 位点搜索, 共检测到 21177 个 SSR 位点。SSR 类型丰富, 其中, 包括二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复, 各碱基重复数量分别为 1100、

7604、1941、393 和 231 个。

2.6 基因在大菱鲂不同温度胁迫中的表达分析

对 5 组不同高温胁迫环境(CT: 常温, T1: 20℃, T2: 23℃, T3: 25℃, T4: 28℃)的基因进行表达比较分析, 结果显示(图 6), CT 组同 4 个高温组均表现出较大的差异, 而且上调基因占较大比重; T1 组与 T4 组存在较大的差异, 差异基因达到 4734 个, 其中, 上调基因 3386 个, 下调基因 1348 个; T1 与 T3 组差异

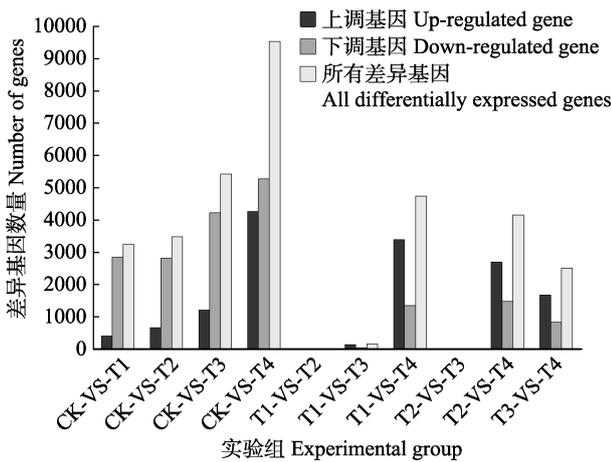


图 6 差异基因统计

Fig.6 Statistics of different expression genes

表达基因 163 个, 其中, 上调基因 131 个, 下调基因 32 个; T2 与 T4 组差异基因 4157 个, 其中, 上调基因 2691 个, 下调基因 1466 个; T3 与 T4 组差异表达基因 2501 个, 其中, 上调基因 1673 个, 下调基因 828 个; 而 T1 与 T2 组、T2 与 T3 组的差异表达基因较少, 分别为 25 和 36。

3 讨论

作为变温性动物, 鱼类对环境温度等指标要求较严, 其中, 热应激是影响鱼体生长发育最严重的环境胁迫(周朝伟等, 2018), 鱼类在长期进化过程中对热应激的响应形成了一套完善的应答协调机制, 因此, 揭示其热应激胁迫的分子机制, 培育出耐高温的新品种, 在目前全球气候变暖的背景下显得尤为迫切。

转录组高通量测序是功能基因组研究的一个重要技术手段, 通过数字基因表达谱技术, 可以将不同组织、各个发育阶段以及逆境胁迫下的差异表达基因快速检测出来, 在功能基因组学研究方面正在发挥着重要的作用(王申昌等, 2016)。该技术目前在水产动物中的应用显著增加, 对于鱼类疾病、免疫、生长、抗逆、系统进化和生物毒理过程及机理等方面的研究都有极大帮助(陈琼等, 2014; 陈之航等, 2017)。为尽可能完整、系统地获得热应激对大菱鲆肾脏影响的转录组数据信息, 本研究选取 5 个不同的温度梯度处理, 开展了大菱鲆高温胁迫转录组分析。

通过对不同温度胁迫下基因表达谱结果进行分析, 不同温度组之间存在较显著的差异, 尤其是 CT、T1、T3 和 T4 组, 4 个温度组的差异表达基因较多, 而 T2 与 T1、T3 组之间的差异基因个数较少。我们推测, 随着温度的升高, 鱼体的生理机能发生不断的

变化从而适应胁迫, 当到达某个温度区域时, 机体将处于一个平衡态, 机体变化相对较小, 但如果温度继续升高, 则打破这一平衡, 继续调整, 从而适应胁迫。

逆境条件下, 许多胁迫相关基因在转录水平都会有所增加, 其主要原因是转录因子对目标基因启动子的顺式作用元件的特异结合(赵丽娟等, 2016)。本研究对大菱鲆肾脏热应激转录因子进行了分析, 共检测到 65 类转录因子, 为深入研究大菱鲆热应激适应机制提供分子基础和依据。其中, C2H2 锌指蛋白家族的基因数目最多, 其又称为 TFIIIA 类型的锌指蛋白(TFIIIA 因子是 RNA 聚合酶 III 转录 5S rRNA 基因所必需), 在真核细胞中广泛富集的锌指蛋白之一(Laity *et al*, 2001)。在植物中研究较多, 主要参与胁迫应答信号转导和细胞过程, 如 ZAT7 基因在盐胁迫下的表达主要在根中有所增高(Yilmaz *et al*, 2007); TF III A 型锌指蛋白 SCOF-1, 作为冷调控基因(Cold-regulated, COR)的正调节物, 通过与脱落酸效应元件相互作用来调控 COR, 增强植物的耐寒能力(Kim *et al*, 2001); 从牵牛花中得到的锌指蛋白 ZPT2-3, 其在植物体内的过表达可以增强耐寒能力(Sugano *et al*, 2003)。在人类疾病方面也有相关的研究报道, 其对信号通路的下游基因表达有着明显的调控作用, 可以选择性结合特异的靶结构, 调控细胞的生长、增殖、分化和凋亡等(雷陈, 2010)。但在水生生物中的研究却极少, 本文研究结果显示, 高温胁迫条件下, C2H2 锌指蛋白家族 Unigene 数目远远高于其他转录因子, 其中, 差异表达基因数为 108 个, 表明 C2H2 锌指蛋白家族的部分基因在大菱鲆热胁迫条件下发生表达水平的变化, 哪些基因与热应激相关? 这些基因是如何参与胁迫应答信号转导过程的? 目前, 在海水鱼类未见报道, 本课题组将在今后的研究中继续深入开展。

本研究首次利用 Illumina Hiseq 高通量测序技术对大菱鲆肾脏组织在 5 个不同温度胁迫条件下的 cDNA 文库进行测序, 建立了大菱鲆热应激肾脏转录组数据库, 相关数据更加完整、系统, 为今后开展海水鱼类热应激胁迫分子调控机制提供数据支撑, 也为耐高温选育工作提供更多新的功能基因和分子标记。

参 考 文 献

- Bilyk KT, Cheng CHC. RNA-seq analyses of cellular responses to elevated body temperature in the high Antarctic *Cryopelagic nototheniid* fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Marine Genomics*, 2014, 18: 163-171
- Chen Q, Gu ZF, Wang AM, *et al*. Data reassembling reveals

- more information of transcriptome for *Pinctada fucata martensii* Dunker. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 97–102 [陈琼, 顾志峰, 王爱民, 等. 马氏珠母贝转录组数据的重新组装. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 97–102]
- Chen ZH, Dong JJ, Sun CF, *et al.* cDNA cloning and analyses of two myosin heavy chain isoforms of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on transcriptome sequencing. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 51–61 [陈之航, 董浚键, 孙成飞, 等. 基于转录组测序对翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*) 2种肌球蛋白重链基因的克隆与分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 51–61]
- Cui WX, Ma AJ, Huang ZH, *et al.* Effects of salinity stress on the mRNA expression of PRL and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 32–40 [崔文晓, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) PRL 基因、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因对盐度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 32–40]
- Diegane N, Chen YY, Lin YH, *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22: 686–694
- Guan J, Liu HJ, Guan SG, *et al.* Selection of high temperature broodstocks of turbot by using population selection method. *Scientific Fish Farming*, 2013(3): 50–51 [关健, 刘洪军, 官曙光, 等. 使用群体选育法选择大菱鲆耐高温亲鱼群体. *科学养鱼*, 2013(3): 50–51]
- Huang JQ, Li YJ, Liu Z, *et al.* Transcriptomic responses to heat stress in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 32–40
- Jia XP, Sun XB, Deng YM, *et al.* High-throughput sequencing and analysis of the transcriptome of the bird's nest fern. *Journal of Horticulture*, 2014, 41(11): 2329–2341 [贾新平, 孙晓波, 邓衍明, 等. 鸟巢蕨转录组高通量测序及分析. *园艺学报*, 2014, 41(11): 2329–2341]
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, *et al.* A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant Journal*, 2001, 25(3): 247–259
- Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(1): 39–46
- Lei C. Initial exploration of the function of ZNFD-a C2H2-type zinc finger protein. Master's Thesis of Suzhou University, 2010 [雷陈. C2H2 型锌指蛋白——ZNFD 的生物学功能初探. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2010]
- Lei JL, Men Q, Wang YG, *et al.* The factory farming mode of Dalingyu “greenhouse shed + deep well seawater”. *Marine Aquatic Research*, 2002, 23(4): 1–7 [雷霖霖, 门强, 王印庚, 等. 大菱鲆“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. *海洋水产研究*, 2002, 23(4): 1–7]
- Luo H, Ye H, Xiao SJ, *et al.* Application of transcriptomics technology in aquatic animal research. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 598–607 [罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用. *水产学报*, 2015, 39(4): 598–607]
- Ma AJ, Huang ZH, Wang XA, *et al.* Breeding and temperature resistance performance evaluation of high temperature resistant line of turbot. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 797–804 [马爱军, 黄智慧, 王新安, 等. 大菱鲆耐高温品系选育及耐温性能评估. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 797–804]
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, *et al.* Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant Journal*, 2003, 36(6): 830–841
- Wang SC, Hu SL, Cao Y, *et al.* High-throughput transcriptome sequencing and differentially expressed gene analysis of Liangshan Cizhu. *North China Agricultural Journal*, 2016, 31(3): 65–71 [王身昌, 胡尚连, 曹颖, 等. 梁山慈竹高通量转录组测序及差异表达基因分析. *华北农学报*, 2016, 31(3): 65–71]
- Yilmaz SC, Morsy MR, Song LH, *et al.* The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(12): 9260–9268
- Zhao LJ, Yi XY, Zeng YL. Research progress on plant stress related C2H2 zinc finger protein. *Molecular plant breeding*. 2016, 14(3): 578–585 [赵丽娟, 易小娅, 曾幼玲. 植物逆境相关 C2H2 型锌指蛋白的研究进展. *分子植物育种*, 2016, 14(3): 578–585]
- Zhou CW, Hu XW, Lei L, *et al.* Effects of heat stress on biochemical indices and HSP70 mRNA expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 65–71 [周朝伟, 胡续雯, 雷骆, 等. 热应激对银鲫生化指标和 HSP70 mRNA 表达的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 65–71]

(编辑 冯小花)

Transcriptome Study of Kidney of Turbot under High-Temperature Stress

YANG Kai^{1,2,3}, HUANG Zhihui^{1,3}, MA Aijun^{1,3}^①, LIU Xiaofei^{1,3}, YANG Shuangshuang^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract In order to explore the molecular mechanism of high-temperature tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* L., and to screen heat tolerance related genes, the IlluminaHiSeq-2500 platform was used to sequence the transcriptome of five turbot kidneys from five different heat treatments, through bioinformatics analysis, including GO (gene function annotation), SSR (simple repeat sequence) analysis, etc. The main results obtained were as follows: the total number of Unigenes obtained by assembly was 68525, the length range was 201~23456 bp, the average length was 1124 bp, and the length of N50 was 2316 bp. Sequence alignment and function annotation of Unigenes was conducted in Nr, Swissprot, KEGG, KOG, and GO databases. A total of 25,498 clusters were obtained, of which the Nr database noted the most Unigenes; and according to GO function classification, had three kinds of cell components, molecular functions, and biological processes, including 56 functional groups. A large number of Unigenes were related to cell processes, metabolic processes, catalytic activities, biological regulation, and stress response. Further, Unigenes were classified into 218 metabolic pathways and five KEGG pathways: metabolic pathway, genetic information processing, cellular processes, environmental information, and biological systems. A total of 65 transcription factors were detected by transcription factor analysis, with the C2H2 Zn finger protein family having the highest number of genes. Through the analysis of gene expression profiles under different temperature stress, there were significant differences among different temperature groups, In the 20°C and 28°C groups, the difference was the largest; 4734 genes, of which 3386 were up-regulated and 1348 were down-regulated. In this study, we established a database of renal transcriptional groups in turbot under heat stress, which provides abundant data for the study of molecular mechanisms of heat stress in turbot.

Key words Turbot; Kidney; Hyperthermia stress; Transcriptome; Bioinformatics analysis

① Corresponding author: MA Aijun, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn