

DOI: 10.12264/JFSC2021-0186

黑鲟 *scd1a* 和 *scd1b* 基因克隆及其对急性低温的应答

陈自强^{1,2}, 张志勇¹, 张志伟¹, 卫明亮^{1,2}, 林志杰^{1,2}, 祝斐¹, 贾超峰^{1,2}, 陈淑吟¹, 孟乾¹

1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏省鱼类遗传育种重点实验室, 江苏 南通 226007;
2. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 为探究硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)在黑鲟(*Acanthopagrus schlegelii*)响应低温过程中的作用, 利用 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得了黑鲟 *scd1a* (*Asscd1a*)和 *scd1b* (*Asscd1b*)基因的 cDNA 全长序列, 并检测了其在急性低温胁迫下不同组织中的表达情况。以 19.8 °C 为对照组, 6 °C 为胁迫组进行低温胁迫(以 1 °C/h 的速度降温, 下降至 6 °C 并保持 24 h), 在胁迫状态下能正常游动的为耐受组, 失衡状态的黑鲟为敏感组。结果表明, *scd1a* 的 cDNA 全长为 3281 bp (GenBank No. MZ004439), 包括 111 bp 的 5'UTR、2162 bp 的 3'UTR 和 1008 bp 完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸; *scd1b* 基因 cDNA 全长为 1560 bp (GenBank No. MZ004440), 包括 152 bp 的 5'UTR、400 bp 的 3'UTR 和 1008 bp 完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸。多重序列比对结果显示, 黑鲟与其他硬骨鱼类 *scd* 基因的氨基酸序列有较高的相似度(70%~98%), 均含有 3 个高度保守的组氨酸元件。系统进化树分析表明, 黑鲟 *scd1a* 和 *scd1b* 基因编码氨基酸序列分别与黄鳍鲷的 SCD 和 SCD b 聚为一簇, 两者之间有着较近的进化关系。正常水温下, *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 主要在肝脏中表达, 脑中弱表达, 鳃中不表达; 低温胁迫下, *Asscd1a* 在肝脏中的表达前期受到抑制, 后期显著上调, 而 *Asscd1b* 在肝脏中则呈现表达持续上调的趋势, 且上调幅度远高于 *scd1a*; *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 在脑的表达均受到抑制; 鳃中 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 均显著上调; 耐受组 *Asscd1* 基因的两种亚型在肝脏、脑和鳃 3 个组织中的表达均比敏感组变化更为迅速。*Asscd1a* 和 *Asscd1b* 剧烈变化的表达量说明其在黑鲟低温响应过程中发挥重要作用。

关键词: 黑鲟; *scd1* 基因; 低温胁迫; 基因克隆

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0200-11

鱼类作为变温动物, 由于缺乏体温调节的机制, 鱼体的温度随着环境温度的变化而变化, 而体温对机体的生命活动有着重大的影响。长期生活在昼夜和季节水温波动的环境中, 鱼类已经进化出适应性反应机制^[1]。有研究表明, 当大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)遭受低温胁迫时, 可以通过肌醇-1-磷酸合成酶的过表达来维持细胞膜的稳定性, 从而提高自身的抗寒能力^[2]; 而美洲鲈 (*Alosa sapidissima*)则可以通过诱导抗氧化酶的表

达来抵御低温造成的细胞氧化损伤和凋亡^[3]。不同鱼类有着相同或独特的低温适应机制。

细胞膜是细胞内外的联系界面, 细胞膜的流动性对于能量转换、物质运输和信号传递等功能具有重要意义。而当鱼类处在低温环境中时, 细胞膜的膜相由液晶相变为凝胶相, 使得膜的流动性下降导致细胞膜的部分功能丧失, 从而造成应激性生理反应^[4]。鱼类能够通过改变细胞膜中的脂肪酸比例来应对这种情况, 主要为上调不饱和脂

收稿日期: 2021-04-29; 修订日期: 2021-06-08.

基金项目: 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201744); 江苏省“333 工程”科研资助项目(BRA2020372); 江苏省自然科学基金项目(BK20181202); 江苏省水产良种保种及亲本更新项目(2021-SJ-032).

作者简介: 陈自强(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生生物遗传育种. E-mail: 810780548@qq.com

通信作者: 张志伟, 博士, 研究员, 研究方向为水生生物遗传育种. E-mail: zhzhwei2005@126.com

肪酸的比例, 从而降低细胞膜的相变温度, 维持细胞膜的流动性, 达到提高抗寒能力的目的。这种低温调控响应在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)以及鲤(*Cyprinus carpio*)的低温适应性研究中均有发现^[5-7]。有研究表明, 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (stearoyl-CoA desaturase-1, SCD1)作为单不饱和脂肪酸合成的限速酶, 是调节细胞膜中饱和和不饱和脂肪酸比例的关键基因之一^[8]。在对 *scd1* 基因的进一步研究中发现, *scd1* 基因在大黄鱼和鲤中存在两种亚型 *scd1a* 和 *scd1b*, 在不同的低温胁迫条件下, 两种亚型呈现出不同的调节方式, 说明不同刺激下可能存在不同的调节机制^[9-10]。探究鱼类的 *scd1* 基因在低温环境下的应答机制具有重要的意义。

黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)隶属鲷科(Sparidae), 棘鲷属, 是中国南北沿海地区养殖的重要海水经济鱼类。但是由于黑鲷难以在 4 °C 以下的水体长期生存, 而江苏以北地区的冬季水温一般都在 4 °C 以下, 尤其在寒潮等天气下, 水温将降至 0 °C 以下, 养殖黑鲷难以在室外自然越冬, 需要进行室内越冬, 这严重限制着黑鲷养殖业的发展^[11]。目前黑鲷的研究主要集中在遗传育种和营养成分等方面, 与黑鲷低温响应机制相关的报道较少^[12-13]。本实验室为探究黑鲷在低温胁迫下的响应机制, 对黑鲷低温胁迫下的抗氧化酶、热休克蛋白以及转录组测序等方面进行了探究, 发现黑鲷在低温响应过程中关键的耐寒相关基因 *scd1* 的转录本调节模式与根据别人的研究所预测的趋势相反, 在黑鲷肝脏中还发现 *scd1* 基因存在 *scd1a* 和 *scd1b* 两种亚型并均与低温响应相关^[14]。本研究通过对黑鲷 *scd1* 基因的两种亚型(*Asscd1a* 和 *Asscd1b*)进行 cDNA 全长克隆以及测定其在低温胁迫下的表达变化趋势, 拟从分子水平阐述黑鲷的低温响应机制, 为黑鲷低温响应机制的探索以及黑鲷耐寒品种的选育提供参考和数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用鱼来自江苏省海洋水产研究所吕四养殖基地。体长为(12.1±0.3) cm, 体重为(58.58±2.56) g

的 8 月龄黑鲷, 共计 200 尾。暂养在长×宽×高为 3.9 m×2.6 m×1.6 m 的水泥池中, 水温为 19.8 °C, 持续充气并保持溶解氧≥6 mg/L, 每日投喂 1 次, 每 3 天换水 1 次, 换水量约 1/3, 实验前 48 h 停止投喂。暂养两周后, 随机挑选 108 尾健康黑鲷进行实验。

SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)购自天根生化公司(北京); SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit、La Taq 酶、pMD19-T 载体和 *E.coli* DH5α 感受态细胞均购自美国 Clontech 公司; 柱式动物组织总 RNA 抽提纯化试剂盒、RNase-Free DNA 清除试剂盒、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒以及实验中所有使用的引物均来自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 低温胁迫实验

在预实验中发现, 将正常水温以 1 °C/h 的速度降温到 6.0 °C 时, 约半数黑鲷出现倒游或侧躺的失衡现象, 而降至 5 °C 时, 黑鲷基本都处于失衡侧躺状态, 无法正常游动, 因此本实验设置 6 °C 为冷胁迫温度。将黑鲷随机分配到 9 个规格为 90 cm×65 cm×55 cm (长×宽×高)的泡沫箱中, 每个箱子 12 尾, 其中 6 个为冷胁迫组, 3 个为常温组。将黑鲷转移至泡沫箱 12 h 后, 利用制冷加热循环器(CW-1500A 型, RESUN, 中国)对低温胁迫组采取 1 °C/h 的速度降温, 待水温降到 6 °C 后维持并开始计时, 分别在 0 h、6 h、12 h、18 h 以及 24 h 进行取样。实验期间保持充足供氧, 低温胁迫组水温维持在(6±0.2) °C, 对照组水温为 19.8 °C。同一时间点分别从不同泡沫箱各取出一条进行采样, 耐受组(正常游动)、敏感组(失衡侧躺)和对照组(常温)各取 3 尾, 取样前使用 MS-222 麻醉剂将其快速麻醉后进行解剖, 取其肝脏、鳃和脑 3 种组织, 生理盐水洗净并分别放置在 1.5 mL 的离心管中, 使用液氮快速冷冻后保存在-80 °C 冰箱。

1.3 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因 cDNA 克隆

使用总 RNA 抽提纯化试剂盒与 RNase-Free DNA 清除试剂盒将样品进行 RNA 提取, 并使用 Nano-drop 2000 型核酸分析仪(Thermo Fisher 公司)和琼脂糖凝胶电泳对 RNA 提取质量进行检测, 采用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(生工生物,

上海)将质量合格的 RNA 进行第一链 cDNA 合成。根据先前实验测定的黑鲷肝脏转录组数据库中的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因部分序列设计引物 SCD1aF、SCD1aR、SCD1bF 和 SCD1bR (表 1), 使用黑鲷肝脏 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经过琼脂糖电泳确认条带后送公司测序, 获得黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的中间片段。

根据测得的黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因 cDNA 中间序列分别设计出用于 3'端和 5'末端扩增的特异性引物(表 1)。通过 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 试剂盒进行 3'RACE 和 5'RACE, 按照说明书的操作和步骤, 扩增黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 3'UTR 和 5'UTR 片段, 以稀释 20 倍后的 RACE 产物作为模板, 进行第二轮 PCR 扩增(巢式 PCR)。

扩增产物经过电泳检验后, 利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对目的条带进行回收与纯化, 并连接至 pMD19-T 载体中, 然后转化到 DH5 α 感受态细胞, 使用通用引物 M13-F 和 M13-R 对挑选出来的阳性克隆菌进行 PCR 验证, 对插入目的条带的阳性克隆菌送测序。所有测序工作均由上海

生工生物工程有限公司进行, 本研究所用引物均使用 Oligo 7 软件设计。

1.4 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因的生物信息学分析

使用 SeqMan 软件去除测序结果中的载体序列并进行拼接, 利用 Edit Seq 软件预测拼接后的黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因 cDNA 序列的开放阅读框(ORF)和氨基酸序列; 采用 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)和 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)对信号肽和跨膜结构进行预测; 运用 ExPASy Proteomics Server (<http://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白质理化性质推导分析; 在 NCBI 上下载其他物种 *scd1* 的 cDNA 序列, 利用 Clustal W 和 MEGA 6.06 软件进行多重序列比对和系统进化树构建(邻位相接法)。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测及数据处理

根据测得的黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 cDNA 序列, 使用软件 AlleleID 6.0 设计扩增引物 SCD1a-RT 和 SCD1b-RT (表 1), 对反应体系优化后, 通过

表 1 本研究所用引物信息
Tab. 1 Information of primers used in the study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	目的 purpose
SCD1a-RT	F: CCACGGGAGAACAAGTTTG R: CCAGGTAGCACATCAGGTC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
SCD1b-RT	F: TGTTCAGAGACGGCACTAC R: GGGCACGATGAAGCAAAGG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
β -actin-RT	F: CGACGGTCAGGTCATCAC R: GCCAGCAGACTCCATTCC	内参基因 reference gene
SCD1a	F: AGAAGAAGCAGACAAGTCCA R: GACACTCTCTTGCGGTCCT	部分序列扩增 partial sequence amplification
SCD1b	F: CATGGCAGCAGAAACATCGAC R: CCCATGAAGCACATCAAGTCT	部分序列扩增 partial sequence amplification
M13	F: GTTGTAACGACGGCCAG R: CAGGAAACAGCTATGAC	载体引物 vector primer
A-3'GSP Outer	TCATCCCTTCCGCATCTCCTTTGACCT	3'RACE
A-3'GSP Inter	ATGACAAGAACATCAACCCACGGGAG	3'RACE
A-5'GSP Outer	TCCCTCACCTATGGCACTGAACGTGAC	5'RACE
A-5'GSP Inter	GAGTTCAGCTTGCGTCCTTTCTCGA	5'RACE
B-3'GSP Outer	TATTGATGACCCTCCTGCACGTCGCTTC	3'RACE
B-3'GSP Inter	GCTACCTCTTCAAGTGCCTCGGTGT	3'RACE
B-5'GSP Outer	TTGATGACCCTCCTGCACGTCGCTTC	5'RACE
B-5'GSP Inter	CTACCTCTTCAAGTGCCTCGGTGT	5'RACE

标准曲线法计算引物扩增效率在 91%~97%。使用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂, 在 ABI 公司的 7300 plus Real-Time PCR system 仪器上采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行 qPCR, 并设置 3 个重复的扩增和 3 个阴性对照。以 β -actin 为内参基因, 测定黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因在不同时间点和不同组织之间的相对表达量, 并使用 SPSS 22.0 软件的单因素方差分析(one-way-ANOVA)和 Duncan 检验, 进行多重比较和显著性分析, $P < 0.05$ 时为差异显著。利用 Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因 cDNA 序列及结构分析

将 5'RACE (*scd1a*: 933 bp, *scd1b*: 796 bp)、3'RACE (*scd1a*: 2416 bp, *scd1b*: 1161 bp)与中间序列(*scd1a*: 690 bp, *scd1b*: 686 bp)使用 SeqMan 软件拼接后获得黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 cDNA 序列。*Asscd1a* 的 cDNA 全长为 3281 bp (GenBank 登录号 MZ004439), 包括 111 bp 的 5'端非编码区(5UTR)、2162 bp 的 3'端非编码区(3UTR)和 1008 bp 的完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸(图 1)。预测其编码蛋白质的分子量约为 38.5 kD, 分子式为 $C_{1761}H_{2684}N_{472}O_{470}S_{16}$, 碱性氨基酸(Arg+Lys)有 38 个, 酸性氨基酸(Asp+Glu)有 31 个, 理论等电点为 9.04, 总平均亲水性为 -0.125, 属于亲水性蛋白, 不稳定系数为 35.04, 属于稳定蛋白, 脂溶指数为 87.61。*Asscd1b* 的 cDNA 全长为 1560 bp (GenBank 登录号 MZ004440), 包括 1008 bp 的完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸以及 152 bp 的 5'UTR 和 400 bp 的 3'UTR (图 2), 其分子量约为 38 kD, 分子式为 $C_{1740}H_{2660}N_{470}O_{468}S_{12}$, 理论等电点为 9.20, 碱性氨基酸(Arg+Lys)有 38 个, 酸性氨基酸(Asp+Glu)有 30 个, 不稳定系数为 31.96, 为稳定蛋白, 脂溶指数为 87.64, 总平均亲水性为 -0.102, 是亲水性蛋白。*Asscd1a* 和 *Asscd1b* 均未检测到信号肽, 说明二者均不属于分泌蛋白, 且均有 3 个高度保守的组氨酸元件和 4 个跨膜结构。

2.2 多重序列比对和进化树分析

利用黑鲷(MZ004439 和 MZ004440)、乌鳢

(*Channa argus*, KAF3708188.1)、黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*, XP_036978990.1 和 XP_036937428.1)、金头鲷(*Sparus aurata*, AFP97552.1); 棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*, TKS85683.1)、青鳞(*Oryzias melastigma*, KAF6716482.1)、斑纹隐小鲈(*Kryptolebias marmoratus*, XP_017289154.1)、新西兰背

```

1 ACATGGGGACTGTAGTTTTTTGGATAAGCGACCTGCTTCATCTCCGTTAAACACCCCCAAAAATACTACTACT
76 CGTCTCGTCTTTGAGCATCACCAAAACCGTGCACCGATGACGAGGCGGAGGCGTTGGAGAAGAAGCAGCACAAG
1 M T E A E A L E K K Q H K
151 TCCAGTAAACAAAATGGGGATGTTCTCCAGAGGCGCACAGAGAAGCAGTGTTCAGTACACATACAAGAGA
14 S S N Q N G D V L P E A T R E D V F D H T Y K E K
226 GAGGGCCAAAACCTGGCAGGATAATCGTCTGGAAAGATGTCATGTTGATGACTGTATTACATATAGGTGCCCTG
39 E G P K Y Y K L S V L L M C F V P M S V P W Y L
301 TACGCCATCTCCCTCATCCCTCCGATCTCCTTTGACCTTGTCTTGGTCCGTACTTGTGTTTATAAGTGT
64 Y A I S L I P S A S P L T L L W S V L C F L I A
376 TTAGGAGTCACTGCGAGGACTCATCGCTGTGGAGTCACAGATCTCAAGGCCCTATTACCTGAGGACTTT
89 L G V T A G A H R L W S H R S Y K A S L P L R I F
451 CTTGGTGTGCTAACTCCATGGCATTTCAGAAATGATATCTTGAATGGGCCCGGACACAGGGTCCACCAAAA
114 L G V A N S M A F Q N D I F E W A R D H R V H H K
526 TATTCAGAGACAGATGCTGACCCCTACAACGCCGTGGGGGCTTCTTCTTGTCCACATCGGCTGGCTGCTGGT
139 Y S E T D A D P H N A V R G F F F A H I G W L L V
601 CGCAAACCCCGACGTCATCGAGAAGGACGCAAGCTGGAAGTCACTGACCTGCTGTGACAAAGTGTGAATG
164 R K H P D V I E K G R K L E L T D L L S D K V V M
676 TTTCAAAGGAAGTATTACAAGCTGTGTGCTGCTCATGTGCTTCTGTCGCCATGTCTGTGCTTGGTACCTG
189 F Q R K Y Y K L S V L L M C F V P M S V P W Y L
751 TGGGGGAGTCCCTGTGGTGGCTACTTCTGTCGCCGCCCTGCTGAGGTACACCCCTGGTGTGAACCCACCTGG
214 W G E S L W V A Y F V P A L L R Y T L V L N A T W
826 CTGTCAACAGCGCCGCTCACATGTGGGGGAACCGTCCCTATGACAAGAACAATCAACCCACGGGAACAAGT
239 L V N S A A H M W G N R P Y D K N I N P R E N K F
901 GTCACGTTCAAGTCCATAGGTGAGGGATCCCAATATATCACTCTTCCCTACGACTATGCTACAGCCGAG
264 V T F S A I G E G F H N Y H H S F P Y D Y A T S E
976 TTTGGCTCAAGATGAACCTTACCATTGCTTCACTGCTTCACTGACCTGATGTGCTACTGGCCCTGGCCAAGGACCC
289 F G C K M N L T T C F I D L M C Y L G L A K D R K
1126 AGATGTCACAGGATGGTCTGCGCCGGAATACAGCCGCAAGGAAAGGAAAGTTCACAGCTTGTGACAGCTTCAAT
1201 CTCACTCTGAGGATAAAGTACAGCTTCAAGGGGCTCAACCAACATTTGCTGTGTTTGTGGTGTGTTGAGG
1276 TGTAACCTAACAAAAATTTTCAAGATGGATAACAACACATTTGCTAAGCCCTTGGCCCTCAGTTTCTAATGTT
1351 CGAGTCAGCCGAAGGCTTGCAGAAAGTGTGTTAGATTTGAAGTAGATGCGTTTAAAAAAAAGTCAACTTCACTC
1426 TCCCGTGTGTTGCCACTTGGTGTGCTTCTTCAAGAGTCACTGAGCCGATCATTTTATGTAAGTATTACT
1501 CAATATAATCAAACTAGACAAGAAAGTGAGCACTGAAATGAGGAGTAACGCTCACTGCTGATTAGGTGACTGT
1576 TGCTTTATCGAGTTTACAGCAAGTTTTTACAGTCTGATATAAGTTCATTTATGAGCGCTCAAAAGATCTGAA
1651 AATAAAGGGATGAGAGTTTGAACAATATTTTGTAAAAAGAAAGAAAGTGTCTTAATGAATGAATGAGGACA
1726 TGATAGAAGATGAGGGAACCCAGACCATTTATAACTGACTAGCAGTACGCCAAAACCTTATGAAACCCGAGA
1801 GTCATCTGTGTGTTTGTCTGTGTAACCTGGTTTTCTTCAACAAAACAAATGATGTCACACCGCTGAT
1876 TATGTTGTGTTGATGATTAGAGTTTCTCGAGACAATAAAGGACACATTTATGTAATTAATGAACTGCCGTT
1951 CGATATGATAACAGAAAATGATAATGTAATATAGAGCCCTGCAATGTTGACGCTTGTACTTTTTGTGTTT
2026 TTACTGAATACATCGAGTCCAAAGAGCGTGCCAATCGTGCATATTTATAACCACTCAATGTTCCACTAGAG
2101 CACACTAAAGTCGATATCGCTTCTCACTCATCTGGGAAGTTTTTAAACTGATGCGCATCAGTGGCTTCCGCTC
2176 TTCTCTCTTTTCAATCCGAAACATCTGCAGCAGAGCGATCCCGTGGTGTGACGTGCCC GCCACGCCGTGCGA
2251 CAGTTCGGGTGTACAAAACAGCGTCCACCCATGATGATGATATCTGTGATAGTGTGCTGATGAGGTTGTT
2326 TLTCTCGCAGAACCCGTCTATTTTTTAAAGTGGCGTGGAGCCGATCACTTTTGGATCACTCAAGACTGTTG
2401 CCGTGTGTTTCTGAGGCGGGGTGTTGCTTCTTGTGTTGCCAAAAGCTGATGTTCAATGAGGAAAATTC
2476 ACGTGCATCATGTTTATCTTCAATCTGGTGTGAGGAATGCTAATCTTATGATGTTTATTTATTCAAA
2551 AAATGTTTATCCCTTTTTGACCTAAAATATATGCTGTAACCTGAACTGCTTTTTCTGCATCCAAGATTG
2626 ACAGTCTCGTACAAAACAAATATAATCAATTTAGCACTGTTGTTTTTACCCCCCAAGAGTCAGGATAC
2701 AACCTAATGCTTATGACTTGCATCCATCTGATCTTCACTGCTTTCACGTTTTGCCAATTTAAAAACAAAAGGTTCCA
2776 AAGTACCAAAAACAAGTCTGACCGAGGTCATGTTTACAGGCTGAGGACACAGGTGGAACGTCATTTTATCT
2851 GAAACCCATTAATTTAGGCAATGTTAGCATGACACATTAAGTACTGTAATGCAATAGAGGACAGAGGT
2926 TAATCTCTGACCGCTGGTGCAACCGTTCAATCTGAGATTAACCTGCAACCTGTGTGCTGGTGGATGTGC
3001 CAACTAGTCTCAACCCATCGGCAACTCCAGACAAGTGGCCGTCATGATGATCTTAGAGCCCTTAACATA
3076 ACCGACAATGAAAATATACAAGCCAAGCAACAACCTCTGCGCAAGGAGCCGGAATAACACGCTTATGA
3151 CGAAGAGGATCAAAAGTGTCCCTCTGAATGATTCGCTCAATCTCACTGATTTCTATTTTGAATAAGGATTC
3226 ACAATATTTCAATCAATCGTAAAAAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAAT

```

图 1 黑鲷 *scd1a* 基因 cDNA 全长序列及预测氨基酸序列 *表示终止密码子; 起始密码子和终止密码子均加粗显示; 加尾信号(AATAAA)用下划线标出; 方框表示组氨酸富含区域。
Fig. 1 Full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Asscd1a* gene in *Acanthopagrus schlegelii* * indicates the stop codon. The translation initiation codon (ATG) and stop codon (TAG) are in bold. The polyadenylation signal sequence (AATAAA) is underlined. His-rich region is marked with filament box.

```

1  ACATGGGGGACTTCATCTCTGACGAGGACCGCGGTTTGTCTCTGACGCTTTCGGTTTCAGTTACCTGCAATCC
76  AGGTGCGCAGCGCGCGGAAACCCGGAATCATCCGCGCGCAAGCAGCAGACAGCGAGTTCAGTTGACCTGGAACTTCAGCGA
151  AAATGACCGGAGACGGAAACCCGGAATCATCCGCGCGCAAGCAGCAGACAGCGAGTTCAGTTGACCTGGAACTTCAGCGA
1  M T E T E T R N H H A G K Q Q N G G A M A A E T
226  CGACGGTGGAGGATGTTTTGACGACACTCCGCGAGAAAGAGTCCAAACCGCGGAGGACGGTGGTGGGA
25  S T V E D V F D D T Y A E K E G P K P P R T L V W
301  GGAACATCATATTGATGACCTCTCGACGTCGCTTTCAGGGCTGGTTCCTCTCCATCCGATCGGCTC
50  R N I I L M T L L H V A S L Y G L V L L L P S A S A
376  CAACTCTCGCTTGGACTGTAGTGTGCTACCTCTCAGTGCCTCGGTGTGACTGCTGGCGGCAGAGATTGGGA
75  P T L A W T V V C Y L F S A L G V T A G A H R L W
451  GGCACAGATCTATAAGGCTTCATTTCCCTCGGAGTTCCTCTGCTTTCGCAACTCGATGGCTTTTCAGAAATG
100  S H R S Y K A S F P L R V F L A L A N S M A F Q N
526  ACATATATGAGTGGGCAAGGACACCGCTGTCCACCAAGTACTCGGAGACGGACGACGCCCAACATGCCA
125  D I Y E W A R D H R V H H K Y S E T D A D P H N A
601  AGCGGGGTTCTTCTTCCGCCACATGGTTGGCTGCTGCAACACATCCGACGCTATTGAGAAGGGCAAAA
150  K R G F F F A H I G W L L V R K H P D V I E K G K
676  AACTGGAAGTATGACACTGAAGGGGATAAAGTGTATGTTCCAGAGACGGCACTACCAACTCTCGGTGCTGA
175  K L E L I D L K A D K V V M F Q R R H Y K L S V L
751  TCCTTGTCTCATCGTGCACGCTTGGTCCCTGGTACTTCTGGGGTGAATCTTGGCTGTGGGATCTCGTCC
200  I L C F I V P T L V P W Y F W G E S L A V G Y F V
826  CCGGCTGCTCAGATACACTGTGATGCTCAACGCCACTGGCTGGTCAACAGCGCTGCGCACATATGGGGCAACA
225  P G L L R Y T V M L N A T W L V N S A A H I W G N
901  GGCCTTATGACAAGACCAATTAACCGGAGAAAACACTCACTGGTTCCTTAAGTGCATAGGGGAAAGGATTCACA
250  R P Y D K T I N P R E N S L V A L S A I G E G F H
976  ACTACCATCACACTTCCCTTTCGACTATGCCACCAAGTGAAGTTGGCTGCAAGCTCAATCTCACCCCGCTTCA
275  N Y H H T F P F D Y A T S E F G C K L N L T T A F
1051 TAGACTTGTGTGCTTATGGTCTGCCAAGGACCGCAAGCGGGTGTGAAGGAGACAGTGTGCTCGCTCGGCTCC
300  I D L M C F M G L A K D R K R V L K E T V V A R V
1126  AGAGAAGCGGGGACGGCAGCTACAAGTGCTGATGTCACACTAGCTTCAAACTCGATAACGCTGTGGTGAACC
325  Q R T G D G S Y K S G *
1201 AAGACAACCGTAGCAACGGGTAATAGCAATTTTAGCGATTGGGGGGTGTTCACGACGCTTCTGATTAATAGT
1276 TAAACCTCTCTCGAGACTAATATGCTTAAAGAAATGACAGACCTTTTATAAATGTGTAGGCTCTTTAA
1351 GTTGTGAAGTGTCTCAACCACTATTAGCCACAGCCAGCGACTCGGTACACGTGCAAGCACAGCTTTTCCACCG
1426 TAATATAAACAGACAGGAGAGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTAATGGGATTAAGTCTC
1501 TCTTGGCAACAGTAGGACAACCAACAGTCTGTGTGAGCGGTGTCTAAAGCAGCAATT

```

图 2 黑鲷 *scd1b* 基因 cDNA 全长序列及预测氨基酸序列
*表示终止密码子; 起始密码子和终止密码子均加粗显示;
方框表示组氨酸富含区域。

Fig. 2 Full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Asscd1b* gene in *Acanthopagrus schlegelii*
* indicates the stop codon. The translation initiation codon (ATG) and stop codon (TAG) are in bold.
His-rich region is marked with filament box.

唇鱼(*Notolabrus celidotus*, XP_034537733.1)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*, XP_038593057.1)、金鲳(*Trachinotus ovatus*, ALI53628.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, AKA66436.1、MT325796.1、MT325797.1)、大海鲢(*Megalops cyprinoides*, XP_036402457.1)、海鲈(*Dicentrarchus labrax*, CBN-81527.1)、银鲳(*Pampus argenteus*, QGT37389.1)、翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*, QEU52182.1)、伯氏肩孔南极鱼(*Trematomus bernacchii*, ACI16378.1)、独角雪冰鱼(*Chionodraco hamatus*, CAB56151.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_942110.2)的 SCD 序列进行多重序列比对和进化树分析。多重序列比对结果显示(图 3), 所有 SCD 的氨基酸序列高度保守, 黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 编码蛋白与各种硬骨鱼类的 SCD 序列之间具有较高的同源性, 相似度为 70%~98%, 其中 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 的同源性为 74.33%。所

有 SCD 的氨基酸都有 3 个高度保守的组氨酸元件(HRLWSH、HRV/AHH 和 HNYHH)。

基于 SCD 的氨基酸序列, 采用 NJ 法构建系统进化树, 结果如图 4 显示。在本研究中克隆获得的 *Asscd1a* 基因编码氨基酸序列与黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*)的 SCD (XP_036978990.1)首先聚为一个小簇, 相似度 98%, 而获得的黑鲷 SCD1b 与黄鳍鲷的 SCD b 首先聚为一个小簇, 相似度 97%, 说明黑鲷与同属鲷科的黄鳍鲷具有较近的亲缘关系。而黑鲷的 SCD1a 和 SCD1b 分别聚于不同的簇中, 说明两者是不同的 SCD1 亚型。

2.3 正常生长水温下 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 在肝脏、脑和鳃中的表达情况

在正常的水温下, 黑鲷的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因主要在肝脏显著表达, 在脑中表达量较低, 在鳃中几乎不表达。同时, 在不同组织中均以 *scd1a* 为主, 其表达量高于显著 *scd1b* ($P<0.01$, 图 5)。

2.4 低温胁迫下 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因在肝脏中的表达变化

生物体内的平衡是动态的, 在急性低温胁迫下, 对照组黑鲷的 *scd1a* 表达量波动变化, 在胁迫 24 h 后显著上升($P<0.05$)。敏感组和耐受组 *scd1a* 表达量均呈现先抑制后升高的趋势, 其中耐受组比敏感组对于温度变化的感知更灵敏。经过 14 h 的逐步降温至预设温度后, 耐受组在开始计时的胁迫 0 h 已经被抑制($P<0.05$), 并从胁迫 6 h 开始其表达量开始上调, 在 18 h 达到最大值并维持; 而敏感组的 *scd1a* 基因表达量在胁迫 6 h 才发生变化, 并被持续抑制至 12 h 后才出现上调趋势($P<0.05$, 图 6)。对照组中的 *scd1b* 基因表达量无明显变化, 而敏感组和耐受组的 *scd1b* 基因表达量均呈现持续上升的趋势, 分别在胁迫 6 h 和 0 h 开始发生变化($P<0.05$, 图 7)。其中, 肝脏中 *scd1b* 的上调幅度远大于 *scd1a*。

2.5 低温胁迫下 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因在脑中的表达变化

在受到急性低温胁迫后, 黑鲷脑中的 *scd1a* (图 8)和 *scd1b* (图 9)表达均受到抑制。对照组中的 *scd1a* 和 *scd1b* 波动变化, 而敏感组中 *scd1a* 和 *scd1b* 的表达量持续受到抑制, 分别在胁迫 0 h 和

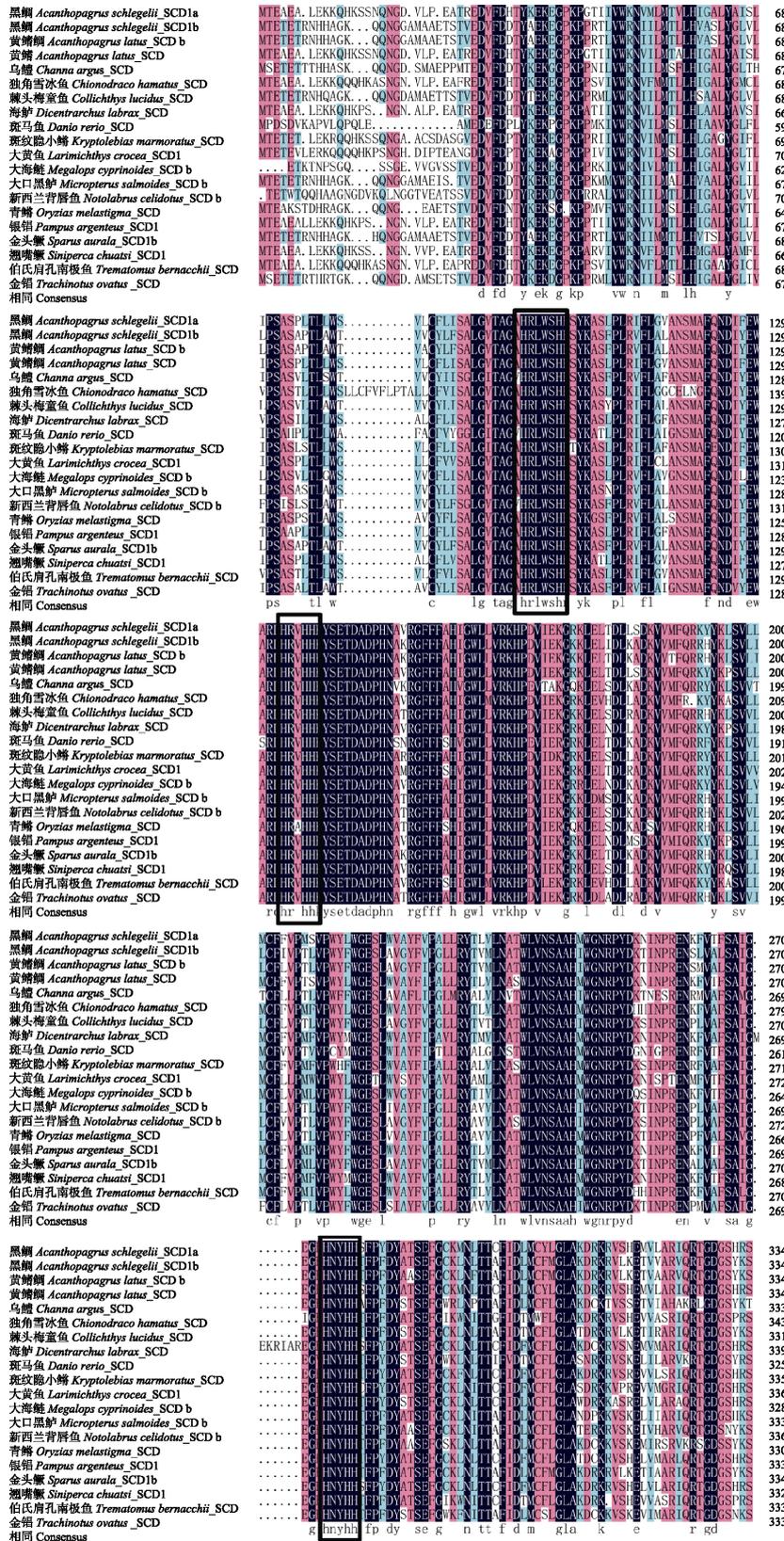


图 3 不同物种 SCD 氨基酸序列比对
方框表示组氨酸富含区域。

Fig. 3 Amino acid sequences alignment of SCD in different species
His-rich region is marked with filament box.

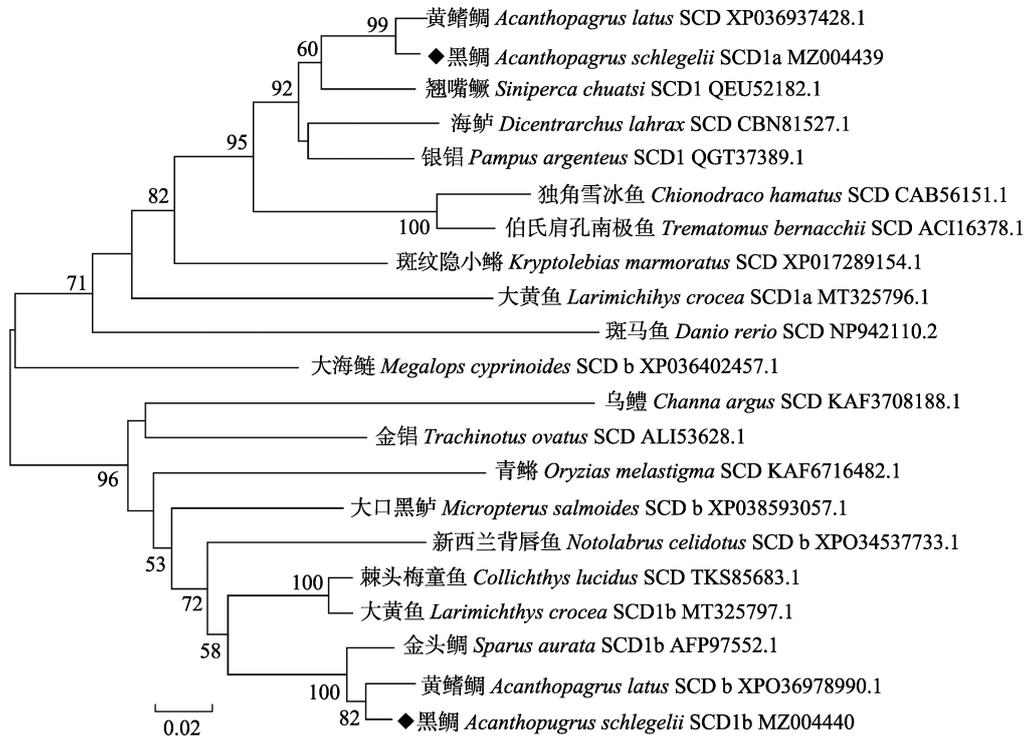


图 4 基于 SCD 氨基酸序列的系统进化树(NJ 法)

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of SCD (Neighbor-Joining method)

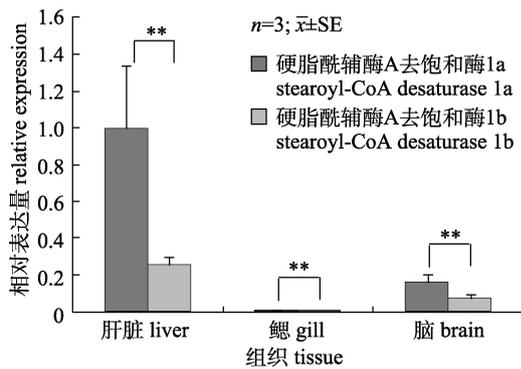


图 5 黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 在正常水温中的组织表达

**表示 *scd1a* 和 *scd1b* 表达量差异极显著($P<0.01$)。

Fig. 5 Tissue expression of *scd1a* and *scd1b* genes in *Acanthopagrus schlegelii* under normal growth water temperature
** indicates extremely significant difference between *scd1a* and *scd1b* gene expression level ($P<0.01$).

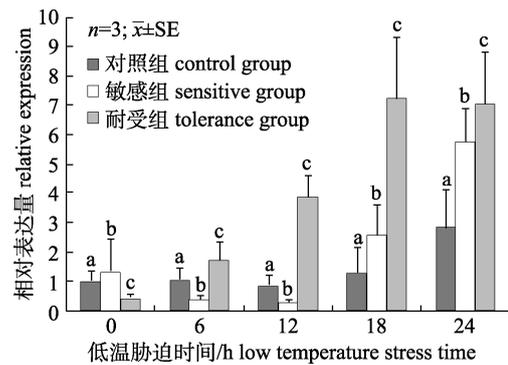


图 6 急性低温胁迫下黑鲷肝脏 *scd1a* 表达情况

同一胁迫时间柱形图上不同小写字母表示不同组别间存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 6 The expression of *scd1a* in the liver of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters at the same stress time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

胁迫 6 h 开始显著下调($P<0.05$); 而 *scd1* 的两种亚型均在耐受组波动变化, 并均在胁迫 18 h 开始受到抑制, 表达量随之显著下调($P<0.05$)。

2.6 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因在鳃中的表达变化

在受到急性低温胁迫后, 对照组的 *scd1a* 的表达量在同一水平波动变化, 而敏感组和耐受组在受到一定时间的低温胁迫后开始发生变化, 分

别在胁迫 18 h 和 12 h 开始持续上调($P<0.05$, 图 10)。鳃中 *scd1b* 的表达情况与 *scd1a* 相似, 但以更快的速度发生相应的变化, 敏感组和耐受组分别在胁迫 12 h 和 0 h 已经开始出现上调趋势($P<0.05$, 图 11)。耐受组的 *scd1* 基因对低温的响应比敏感组的反应更迅速。

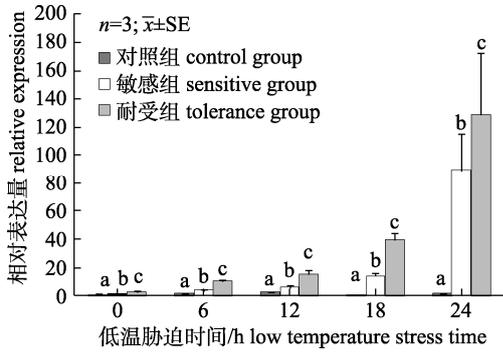


图 7 急性胁迫下黑鲟肝脏 *scd1b* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 7 The expression of *scd1b* in the liver of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

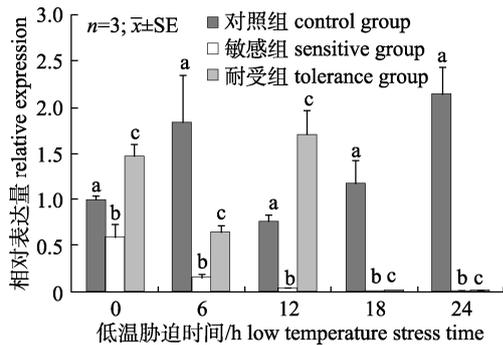


图 8 低温胁迫下黑鲟脑中 *scd1a* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 8 The expression of *scd1a* in the brain of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

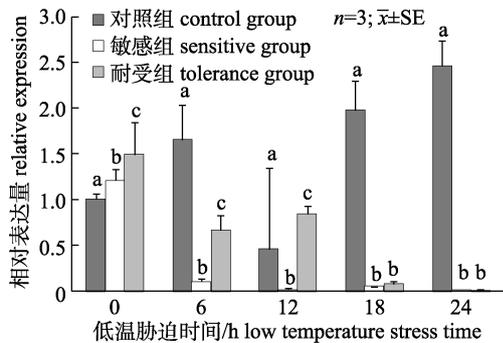


图 9 低温胁迫下黑鲟脑中 *scd1b* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 9 The expression of *scd1b* in the brain of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

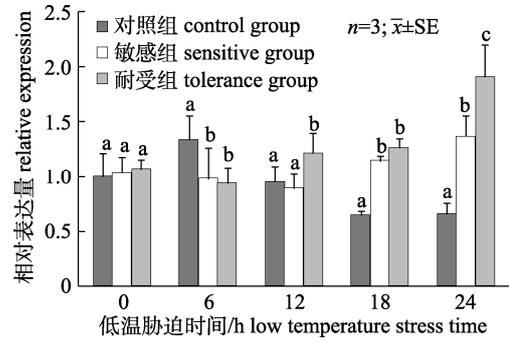


图 10 急性低温胁迫下黑鲟鳃中的 *scd1a* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 10 The expression of *scd1a* in the gill of black porgy under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

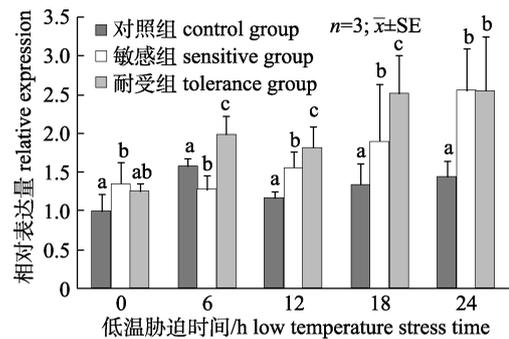


图 11 急性低温胁迫下黑鲟鳃的 *scd1b* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 11 The expression of *scd1b* in the gill of black porgy under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

3 讨论

鱼类作为变温动物, 其生活环境的温度对鱼类的各个方面都有着重大的影响, 低温环境刺激鱼体发生冷应激反应, 机体将通过调节体内的一系列反应协同互动, 从而使体内的反应达到新的平衡^[15]。Lyons 等^[4]认为, 鱼体在处于低温环境时细胞膜的膜相首先因冷刺激而发生变化, 低温的刺激使得细胞膜的膜相由液晶相变为凝胶相, 导致细胞膜丧失一定的流动性。细胞膜的流动性与物质运输、能量转换和细胞识别等有着密切的关系, 细胞膜的流动性下降, 将丧失部分功能^[16]。为了维持生理稳态, 鱼类通过增加细胞膜脂肪酸

中的不饱和脂肪酸比例来提高细胞膜的流动性,这对于鱼类适应低温环境有着重要的意义。SCD1 是合成单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA)的限速酶,在鱼类适应低温变化过程中起着关键作用^[17]。在 *scd1* 基因的研究中发现, *scd1* 基因的过表达能够增加细胞膜上饱和脂肪酸的比例,从而显著提高了细胞膜的流动性,SCD1 快速调节膜的流动性能够保护细胞抵御低温伤害,这是最重要的低温适应机制^[18]。

多重序列比对结果显示,黑鲷 SCD1a 和 SCD1b 基因与硬骨鱼类的 SCD 氨基酸序列均含有 3 个高度保守的组氨酸元件,8 个组氨酸残基形成的组氨酸盒结构是 SCD 酶的催化中心,这是 SCD 具有活性所必需的部分^[19]。克隆获得的两个 cDNA 序列与硬骨鱼类的 SCD 有着较高的同源性(70%~98%),说明这两个 cDNA 序列属于 *scd* 家族基因。系统进化树分析显示,SCD1a 和 SCD1b 分别与黄鳍鲷的 SCD 和 SCD b 聚为一簇,相似度分别为 98%和 97%,说明黑鲷与黄鳍鲷有着较近亲缘关系,具有共同的进化起源和相似的功能。

大量研究表明, *scd* 基因在不同物种或不同组织中存在多种亚型且具有物种和组织表达特异性,其中 *scd1* 主要在肝脏中表达,在脑组织低表达^[20]。本研究发现,在正常水温中,黑鲷 *scd1* 的两种亚型均主要在肝脏显著表达,在脑中有较低的表达,在鳃中几乎不表达,说明 *scd1* 基因主要在肝脏中发挥功能^[21]。在正常水温中黑鲷肝脏中的 *scd1a* 基因表达量远高于 *scd1b* 基因,提示常温下黑鲷肝脏中的 SCD1 主要以 SCD1a 形式存在,这与李明云等^[10]对大黄鱼 *scd1* 基因研究中得到的结果恰好相反。在正常水温环境下,大黄鱼主要以 SCD1b 形式存在,说明不同种类和不同组织之间 *scd1* 基因的调节方式存在差异。在低温胁迫组中,黑鲷肝脏中的 *scd1a* 基因先受到抑制后上调表达,而对照组的 *scd1a* 基因的表达量随着胁迫时间的延长也随之显著增加,说明黑鲷肝脏 *scd1a* 基因除了受冷应激调控外还可能还存在其他调节方式,这与徐浩^[22]对大黄鱼的饥饿胁迫实验得到的结果相似,说明饥饿可能诱导黑鲷肝脏 *scd1a* 的表达,同时有研究表明当同时受到冷应激和饥饿的双重

调控时,大黄鱼肝脏中的 *scd1* 基因转录呈现先受到抑制后过量表达的现象^[23],这可能也是黑鲷肝脏中 *scd1a* 受到抑制的原因,但需要后续进一步验证。黑鲷肝脏中的 *scd1b* 基因在胁迫组中呈现持续上调的趋势,且上调倍数远高于 *scd1a* (*scd1a*: 7 倍, *scd1b*: 129 倍),这提示黑鲷 *scd1a* 基因和 *scd1b* 基因在低温应答过程中以不同的调节方式协同调控自身的急性低温适应机制并发挥着至关重要的作用,使得黑鲷能在低温环境存活。在低温胁迫实验中黑鲷脑组织中的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因表达量受到抑制,但与敏感组相比,耐受组的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因在胁迫 0 h 的表达量均显著高于对照组,直到胁迫 12 h 后出现显著的抑制趋势,这暗示黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因在降温 and 低温胁迫过程中的表达趋势可能是先上调后抑制,有研究表明脑组织在低温适应过程中参与 SCD1 的代谢过程且主要受冷刺激调控,因此能够快速响应冷刺激^[23]。在鳃中的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的表达量虽然翻倍增加,但由于基础表达量极低,所以 *scd1* 基因在鳃丝中低温调节机制中不一定能发挥显著的作用,这一结果在对大黄鱼 *scd1a* 和 *scd1b* 的研究中也有体现^[10]。从低温应答过程中的 *scd1a* 和 *scd1b* 在 3 种组织的表达量变化来看,对低温耐受的黑鲷具有对低温反应更灵敏的特点,上调表达速度更快,表达更不容易受到抑制特点,说明黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因积极响应对低温胁迫的应答过程,并在低温调节机制中有着关键的作用。

4 结论

通过同源克隆和 RACE 技术首次从黑鲷中获得 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 cDNA 序列,通过多重序列比对和系统进化树结果分析发现二者为 *scd1* 基因的不同亚型,并与黄鳍鲷有着较近的亲缘关系。实时荧光定量结果显示,在低温胁迫下 *scd1a* 和 *scd1b* 基因表达主要在肝脏显著上调,但上调幅度和时间有所差异,这提示 *scd1a* 和 *scd1b* 基因参与黑鲷对低温耐受的调控过程并且以不同的调节方式发挥作用,但其适应低温胁迫的作用途径以及与其他耐低温基因的综合调控网络仍有待进一步研究。本研究结果可为探索黑鲷的低温响应

机制以及黑鲟的耐寒品种选育提供参考和数据支撑。

参考文献:

- [1] Nie M M, Tan X G, Lu Y L, et al. Network of microRNA-transcriptional factor-mRNA in cold response of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(2): 583-597.
- [2] 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. [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.]
- [3] Zhang D K, Gao J C, Wang Y Y, et al. Influences of low temperature stress on antioxidant status and expression of stress-related genes of American shad, *Alosa sapidissima*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2020(2): 144-151. [张德康, 高建操, 王裕玉, 等. 低温胁迫对美洲鲟抗氧化状态及应激相关基因表达的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 2020(2): 144-151.]
- [4] Lyons J M, Raison J K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury[J]. *Plant Physiology*, 1970, 45(4): 386-389.
- [5] Hsieh S L, Kuo C M. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 141(1): 95-101.
- [6] Zerai D B, Fitzsimmons K M, Collier R J. Transcriptional response of delta-9-desaturase gene to acute and chronic cold stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(5): 800-806.
- [7] Trueman R J, Tiku P E, Caddick M X, et al. Thermal thresholds of lipid restructuring and Δ^9 -desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(3): 641-650.
- [8] 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]. Ningbo: Zhejiang Ocean University, 2015. [刘浩. 大黄鱼硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1(SCD1)基因的克隆与鉴定及在低温条件下对膜流动性影响[D]. 宁波: 浙江海洋学院, 2015.]
- [9] Polley S D, Tiku P E, Trueman R T, et al. Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver delta 9-acyl-CoA desaturase isoforms[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2003, 284(1): R41-R50.
- [10] Li M Y, Miao L, Chen Y Y, et al. Gene cloning of *SCD-1a* and *SCD-1b* in Donghai No. 1 large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and their responses to cold stress[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(10): 1820-1829. [李明云, 苗亮, 陈莹莹, 等. 东海 1 号大黄鱼 *SCD-1a* 和 *SCD-1b* 基因克隆及其对低温胁迫的应答[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(10): 1820-1829.]
- [11] Zhuang P, Wang Y H, Li S F, et al. Fishes of the Yangtze Estuary[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006: 326-328. [庄平, 王幼槐, 李圣法, 等. 长江口鱼类[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 326-328.]
- [12] Kang C B, Lee S H, Hwang J H, et al. Morphological development of larvae and juveniles of *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Development & Reproduction*, 2014, 18(4): 311-319.
- [13] Wang S T, Li P, Chen S Y, et al. Lipid content and fatty acid profile of *Acanthopagrus schlegelii*, *Pagrosomus major* and their hybrids[J]. *Food Science*, 2016, 37(20): 81-85. [王思婷, 李鹏, 陈淑吟, 等. 黑鲟与真鲷及其杂交子一代脂肪含量测定与脂肪酸成分分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(20): 81-85.]
- [14] Chen Z Q, Zhang Z Y, Zhu F, et al. The effects of acute low temperature stress on activities of antioxidant enzymes and heat shock protein content in *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2020, 55(6): 784-792. [陈自强, 张志勇, 祝斐, 等. 急性低温对黑鲟抗氧化酶活性和热休克蛋白含量的影响[J]. *动物学杂志*, 2020, 55(6): 784-792.]
- [15] Ning J H, Qin Y B, Hu L C, et al. Effects of abrupt and gradual decreases in water temperature on blood physiological and biochemical parameters in dusty rabbit fish *Siganus fuscescens*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(3): 294-301. [宁军号, 秦宇博, 胡伦超, 等. 水温骤降和缓降胁迫对褐篮子鱼血液生理生化指标的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(3): 294-301.]
- [16] Yan L X, Li H Y, Xia W L. Bioglass could increase cell membrane fluidity with ion products to develop its bioactivity[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(11): e12906.
- [17] Harris F M, Best K B, Bell J D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2002, 1565(1): 123-128.
- [18] Xu Y Q, Zheng Y M, Ding Z K. Research progress on the effects, mechanisms, and control of cold stress in aquatic animals[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1149-1159. [许友卿, 郑一民, 丁兆坤. 冷应激对水生动物代谢的影响及调控研究进展[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1149-1159.]
- [19] Wang J, Yu L, Wang H, et al. Identification and characteri-

- zation of hamster stearoyl-CoA desaturase isoforms[J]. Lipids, 2008, 43(3): 197-205.
- [20] Hu Y, Xiao L X, Liang B. Stearoyl-CoA desaturase in *Caenorhabditis elegans*[J]. Acta Biophysica Sinica, 2015, 31(1): 13-23. [胡英, 肖丽霞, 梁斌. 秀丽线虫硬脂酰辅酶 A 去饱和酶的研究进展[J]. 生物物理学报, 2015, 31(1): 13-23.]
- [21] Ntambi J M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol[J]. Journal of Lipid Research, 1999, 40(9): 1549-1558.
- [22] Xu H. Preliminary study about effects of starvation on cold tolerance capacity in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2015. [徐浩. 饥饿胁迫对大黄鱼耐低温能力的影响及其机制的初步探讨[D]. 厦门: 集美大学, 2015.]
- [23] 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.

Cloning of *Acanthopagrus schlegelii scd1a* and *scd1b* genes associated with response to acute low temperature

CHEN Ziqiang^{1,2}, ZHANG Zhiyong¹, ZHANG Zhiwei¹, WEI Mingliang^{1,2}, LIN Zhijie^{1,2}, ZHU Fei¹, JIA Chaofeng^{1,2}, CHEN Shuyin¹, MENG Qian¹

1. Jiangsu Key Laboratory of Genetic and Breeding for Marine Fishes, Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to explore the role of stearoyl-CoA desaturase-1 (*scd1*) in the response of black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) to low temperature, the full-length cDNAs of *scd1a* and *scd1b* genes in the liver of black porgy were analyzed, and their expression in different tissues under acute low temperature stress was quantified. A temperature of 19.8 °C was used for the control group and 6 °C was used for the stress low temperature groups (cooling, at a rate of 1 °C/h, to 6 °C, which was maintained for 24 h). In the stress group, the individuals that could swim normally comprised the tolerant group and the ones in an unbalanced state comprised the sensitive group. The results showed that the full length of *scd1a* cDNA was 3281 bp (GenBank: No. MZ004439), including a 111-bp long 5' non-coding region, 2162-bp long 3' non-coding region, and 1008-bp long complete open reading frame, which encodes a total of 335 amino acids; the full length of *scd1b* gene cDNA was 1560 bp (GenBank: No. MZ004440), including a 1008-bp long complete open reading frame, encoding a total of 335 amino acids, and a 152-bp long 5'UTR and 400-bp long 3'UTR. The multiple sequence alignment results showed that the SCD amino acid sequences of black porgy and other bony fishes have a high degree of similarity (70%–98%), and both contain 3 highly conserved histidine elements. Phylogenetic tree analysis showed that the black porgy *scd1a* and *scd1b* genes were clustered with the *A. latus scd* and *scd b* genes, respectively, and there was a close evolutionary relationship between the two species. Using real-time quantitative polymerase chain reaction, it was found that at a water temperature of 19.8 °C, *Asscd1a* and *Asscd1b* were mainly expressed in the liver, weakly expressed in the brain, and not expressed in the gills. The expression of *scd1a* in the liver was inhibited in the early stage and significantly up-regulated in the later stages ($P < 0.05$); *scd1b* expression showed a continuous up-regulation trend in the liver, while being up-regulated to higher levels than *scd1a*. This suggests that the regulation of expression of black porgy *scd1a* and *scd1b* genes is coordinated and plays a vital role in the acute low temperature response mechanism through different regulatory methods. The expression of *Asscd1a* and *Asscd1b* in the brain was inhibited, and in the gills, their expression was significantly up-regulated ($P < 0.05$). The two sub-types of *scd1* in the tolerance group showed more rapid changes in the three tissues compared to the sensitive group. The dramatic changes in the expression of *Asscd1a* and *Asscd1b* indicate that they play an important role in the low temperature response of black porgy. The findings of the current study provide reference and supportive data for understanding the low temperature response mechanism and the breeding of cold-tolerant black porgy strains.

Key words: *Acanthopagrus schlegelii*; *scd1*; low temperature stress; gene clone

Corresponding author: ZHANG Zhiwei. E-mail: zhzhwei2005@126.com