中国水产科学　2024 年 2 月, 31(2): 144−154
Journal of Fishery Sciences of China

DOI: 10.12264/JFSC2023-0286

鳜 *twist2* 序列特征、时空表达模式及靶向 miRNAs 预测分析

程聪益[1, 2], 朱鑫[2], 曾维[2], 宾琴[2], 王玮[2], 褚武英[2], 张建社[2]

1. 湖南师范大学生命科学学院省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南　长沙　410081;
2. 长沙学院生物与化学工程学院水生动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 湖南　长沙 410022

摘要: Twist2 在调控动物发育过程发挥了重要作用。为解析鳜(*Siniperca chuatsi*) *twist2* 基因的表达模式以及参与肌肉发育调节的功能和机制, 本研究从鳜基因组数据库获得 *twist2* 基因序列, 采用生物信息学方法对 Twist2 蛋白特征和同源进化进行了分析。鳜 *twist2* 基因所编码的蛋白由 162 个氨基酸组成, 具有一个保守功能域 bHLH 结构域。基于氨基酸序列的多序列比对结果显示, Twist2 蛋白在脊椎动物中具有较高的相似性; 采用 RT-qPCR 技术分析了鳜 *twist2* 基因的时空表达规律, 发现 *twist2* 基因在不同发育阶段存在表达差异, 原肠期之前表达水平较低, 从神经胚期开始显著上升, 尾芽期表达最高; 在鳜组织中的表达情况显示, 该基因在脾脏中表达量较高, 其次是脑和红肌。采用整胚原位杂交技术检测其早期胚胎不同发育阶段的 *twist2* 基因定位, 发现其主要在神经胚层和体节中特异性表达。采用 Targetscan 和 RNAhybrid 工具对可能靶向鳜 *twist2* 基因的 miRNAs 进行预测, 结果发现 *miR-30a*、*miR-30b*、*miR-30e-5p* 和 *miR-204* 可能作用于 *twist2* 3′UTR, 提示 *twist2* 是 *miR-30a*、*miR-30b*、*miR-30e-5p* 和 *miR-204* 的潜在靶基因。鳜短期饥饿胁迫实验显示, 在饥饿 3 d 时 *twist2* 的表达与上述 miRNAs 的表达呈明显的负相关, 表明 *twist2* 与上述 4 个 miRNAs 存在潜在的调控关系。因此, 本研究结果将有助于从分子水平了解 *twist2* 基因的序列特征、时空表达规律以及其调控肌肉生长发育的潜在功能, 为鱼类发育生物学以及健康养殖提供理论依据。

关键词: 鳜; *twist2*; 时空表达; miRNA; 短期饥饿
中图分类号: S917　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1005−8737−(2024)02−0144−11

twist2 (twist basic helix-loop-helix transcription factor 2)也称为 *dermo1*, 属于碱性螺旋-环-螺旋(basic Helix-Loop-Helix, bHLH)家族成员, 在调控动物发育过程发挥了重要作用。在脊椎动物中, Twist 家族包括 *twist1* 和 *twist2* 两个基因, 两者所编码的蛋白在结构上相似, 功能部分重叠[1-2]。*twist2* 所编码的蛋白在机体中发挥转录因子的功能, 可调节骨骼和肌肉细胞增殖和分化, 其保守结构域 bHLH 能与 DNA 启动子上特定的 E-box (CANNTG)序列元件结合, 招募互作蛋白形成功能性的异源二聚体, 从而调控靶基因的表达[3-4]。

Twist2 可抑制肌源性 bHLH 蛋白的转录活性, 如生肌决定因子 MyoD (myogenic differentiation, MyoD)、肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, Mef2), 对肌肉生成基因行使负调控作用[5-6]。在转染过表达 *twist* 基因的细胞中, 肌源性调节因子 MyoD 的表达水平显著降低, 且肌细胞生成素(myogenin, MyoG)和肌肉分化标志物 MyHc 的表达也降低, 证实了 Twist 家族蛋白与肌肉发育相关基因的互作相关性[7]。然而, 在小鼠(*Mus musculus*)中发现, 表达 Twist2 的肌源性祖细胞是一种以前未被识别的纤维型特异性干细胞, Twist2 的表达使前体细胞处于未分化状态, 在适当的信号抑制表达的情况下, 可以启动肌细胞分化生长, 并参与出生后的肌肉生长和再生[8]。至目前, *twist2* 基因在鱼类中的表达模式和调控作用尚

收稿日期: 2023-11-23; **修订日期:** 2023-12-21.
基金项目: 国家自然科学基金国际合作重点项目(31820103016); 国家自然科学基金区域创新发展联合重点项目(U21A20263); 国家自然科学基金青年基金项目(32002370).
作者简介: 程聪益(1998–), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类肌肉生长调控. E-mail: 1299520050@qq.com
通信作者: 张建社, 教授, 研究方向为鱼类肌肉品质与调控. E-mail: jzhang@ccsu.edu.cn

不清楚，亟待深入研究。

MicroRNAs (miRNAs)是一类保守的小 RNA 分子，抑制冗余的 mRNA，降低翻译效率[9]。Long 等[10]的研究报道了 *miR-138* 通过直接靶向 Twist2 调控结直肠癌的转移，Han 等[11]通过体外和体内实验验证了 *miR-22-5p* 可调节 Twist2 的表达来调节非小细胞肺癌增殖和侵袭; *miR-1236-3p* 被确定为 Twist2 的直接靶标调节肝癌细胞的增殖[12]。然而，关于 *twist2* 与 miRNAs 靶向关系的研究主要集中在癌细胞发展方面，但在水生动物中有关 miRNAs 靶向 *twist2* 的研究尚未报道，本研究在鳜中初步筛选了靶向 *twist2* 的相关 miRNAs。

鳜(*Siniperca chuatsi*)俗称桂花鱼，是我国大力推广养殖的重要名贵经济鱼类之一[13-14]。研究表明，饥饿胁迫会影响幼鱼的生长，且在能量利用和肌肉品质等方面产生显著差异[15]。然而也有报道称适当的短期禁食可以改善鱼体的肌肉品质[16]。研究表明，miRNAs 已经成为一类新的肌肉发生的关键调控因子，并且参与饥饿胁迫下的基因表达调控[17-18]。Chu 等[19]在鳜肌肉中系统地研究了 miRNAs 在骨骼肌中与糖、脂代谢中的可能相关性，并已在鳜中鉴定了 33 个 miRNA 在肌肉中高丰度表达，通过特定靶基因调控不同类型肌肉纤维的发育和性能。因此，本研究分析了鳜 *twist2* 基因的序列特征，时空表达特征，通过饥饿胁迫实验，挖掘可能存在靶向调控的 miRNAs，为探究 *twist2* 参与鳜肌肉发育调节的潜在生物学功能提供有价值参考数据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验所用鳜体重(97.74±0.35) g，源于长沙市望城区团山湖村鳜养殖场，实验鱼暂养在实验室养殖水箱中，以适应环境和评估鱼的健康状况，期间水温(21±0.2) ℃，溶解氧(6.20±0.21) mg/L。养殖稳定后在冰上取脑、心、肝、肌肉等组织置于液氮快速冷冻，用于组织表达检测。不同发育时序的鳜胚胎材料由湖南省水产科学研究所鳜原种场提供，其胚胎发育阶段的确定参考了本实验室已发表的研究[20]。

1.2　实验方法

1.2.1　鳜 *twist2* 基因的生物信息学分析　基于鳜 UCSC 基因组数据库[UCSC genome browser gateway (igb-berlin.de)]获得 *twist2* 基因序列和氨基酸序列，采用 ProtParam 在线分析了 Twist2 蛋白的理化性质; 采用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线预测其二级和三级结构; 从 NCBI 数据库收集其他物种 Twist2 蛋白序列，并采用 DNAMAN 和 GENEDOC 进行多序列比对。

1.2.2　靶向鳜 *twist2* 基因的 miRNAs 预测　采用 TargetScanFish (https://www.targetscan.org/fish-62/)和 RNAhybrid (http://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid)在线预测软件，并采用斑马鱼 *twist2* 基因 3′UTR 作为靶序列，筛选出种子 miRNAs。通过基因组数据库获得 *twist2* 的 3′UTR 序列，根据 TargetScanFish 筛选的种子 miRNA 进行互补验证。

1.2.3　组织和胚胎 RNA 提取　采用 Monzol (Monad, 中国)提取鳜成体组织及不同胚胎发育时期样品总 RNA，实验步骤参照公司提供的说明进行。采用微量核酸测定仪(N60，德国 IMPLEN 公司)测定总 RNA 的浓度和纯度，而后采用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量，用于后续逆转录反应。

1.2.4　cDNA 的合成及 RT-qPCR 分析　mRNA 逆转录采用 PrimeScript^{TM} RT reagent Kit with gDNAEraser (Perfect Real Time)逆转录试剂盒(TaKaRa，中国)，以 1 μg 总 RNA 为模板，两步法合成 cDNA，总反应体系为 20 μL，反应条件: 42 ℃, 2 min; 37 ℃, 15 min, 85 ℃, 5 s; 稀释 10 倍，用于 qPCR 反应模板。

miRNA 逆转录采用 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa，中国)，反应总体系为 10 μL。Poly(A)加尾反应与 cDNA 合成反应同步进行，反应条件: 37 ℃，60 min; 85 ℃，5 min，逆转产物 −40 ℃保存。

从基因组数据库中检索到鳜 *twist2* 基因和 *rpl13a* 基因序列信息，采用 Primer premier 5.0 软件设计引物(表 1)。根据本实验室已有鳜 miRNA 数据库[19]，设计 miRNAs RT-qPCR 引物，由擎科生物有限公司合成，下游引物和内参基因均由

miRNA 逆转试剂盒提供。采用荧光定量 PCR 仪(CFX96, 美国 BIO-RAD 公司)进行反应, 其 RT-qPCR 反应体系为 12 μL, 分别包括 SYBR Premix Ex Taq$^{\text{TM}}$ Ⅱ 6 μL、cDNA 模板 0.5 μL、ddH_2O 4.5 μL、上下游引物各 0.5 μL。反应程序: 95 ℃预变性 3 min; 95 ℃变性 5 s; 58 ℃退火、延伸 30 s, 反应 39 个循环, 每组反应设 3 个重复。

1.2.5 RNA 探针制备 在 *twist2* 基因 cDNA 全长序列中设计引物(表 1), 经 PCR 扩增后将特异目的片段进行切胶回收并纯化, 置于−20 ℃中保存备用。使用 DIG RNA Labeling Mix Kit (Roche)制备 RNA 探针, 反应体系如下: 在无酶微量离心管中配制 20 μL PCR 反应体系, 包含 DNA 纯化产物 10 μL、Labeling Mix 2 μL、Transcription Buffer 2 μL、T7 酶 2 μL 和 ddH_2O 4 μL, 混匀离心后 37 ℃反应 2 h, 反应完成后加入 2 μL DNA 酶 37 ℃反应 15 min, 以消化剩余模板。

1.2.6 整体胚胎原位杂交 参考斑马鱼整胚原位杂交技术, 并针对鳜胚胎发育特点进行优化。收集鳜发育不同阶段胚胎样品, 加入 4%的多聚甲醛固定, 过渡到甲醇溶液中并于−20 ℃冰箱中保存; 开始实验时依次用 100%~25%的甲醇梯度复水, 5 μg/mL 蛋白酶 K 消化(尾芽期前不处理, 体节期处理 1.5 min, 肌效期处理 2 min, 心搏期 2.5 min, 血液循环期处理 8 min), 用 4% PFA 室温再次固定后加入 1 mL HYB 杂交液(含 1 mg/L 的 RNA 探针)于 65 ℃恒温箱杂交过夜; 50%甲酰胺漂洗后, 使用酶连地高辛抗体 4 ℃孵育过夜, 最后加入染色液(BM Purple AP Substrate, precipitating), 4 ℃摇床避光进行, 每 40 min 在显微镜下观察染色情况; 染色结束后, 加入 1 mL PBST 终止显色反应, 漂洗后在体式显微镜下观察原位杂交结果, 对每个胚胎及时进行图像采集。

1.2.7 短期饥饿实验 随机选 18 尾健康的鳜[平均体重(98.32±0.53) g], 分成正常投喂组和饥饿处理组(3 d 和 7 d), 每组 6 尾鱼。分别养殖于同一规格的网箱里, 饥饿处理结束后进行取样, 液氮冷冻后置于低温冰箱保存。

1.2.8 数据统计分析 基因表达数据均以均值±标准误差($\bar{x} \pm \mathrm{SD}$)表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$法计算目的基因在不同样本之间的相对表达量。数据满足正态分布, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)计算数据的显著性, 差异显著时通过 Duncan's 法进行多重比较检验, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

表 1 荧光定量引物

Tab. 1 The primers for RT-qPCR

引物名称 primer name	引物序列(5′-3′) sequence (5′-3′)
twist2-F	AAGCTCGCCTCCAGATACAT
twist2-R	GCTGACATAGACCAAGCACC
myod-F	CAACGACGCCTTTGAGACCCTG
myod-R	GTCCGAATCCCGCTGTAGTGT
myog-F	CGAGACCAACCCTTACTTCTTCCCT
myog-R	GACTCCCACACAAGCCCATCAT
rpl13a-F	CACAAGAAGGAGAAGGCTCGGGT
rpl13a-R	TTTGGCTCTCTTGGCACGGAT
sch-miR-204-F	TTCCCTTTGTCATCCTATGC
sch-miR-30a-F	TGTAAACATTCCCGACTGGA
sch-miR-30b-F	GGTGTAAACATCCTACACTCAGC
sch-miR-30e-F	TGTAAACATCCTTGACTGGAAG
twist2-ISH-F	ACGGCTTCAAAGGTGGACAA
twist2-ISH-R	TAATACGACTCACTAGGGCCATCCTCCACACGGAGAAC

2 结果与分析

2.1 鳜 *twist2* 基因序列特征和相似性分析

twist2 的 cDNA 序列 ORF 区长度为 486 bp, 编码 162 个氨基酸。采用在线工具 ExPASy-ProtParam 预测分析, 鳜 *twist2* 基因所编码蛋白理化性质特征如表 2 所示, 其分子量为 18.33 kDa, 等电点(pI)为 9.45。该蛋白包括 20 个(Asp、Glu)酸性氨基酸, 26 个(Arg、Lys)碱性氨基酸, 其中亮氨酸含量最高, 精氨酸、谷氨酸次之。Twist2 蛋白的亲水性平均系数为−0.903, 说明该蛋白质为亲水性蛋白。对 Twist2 蛋白进行磷酸化位点和 N-糖基化位点预测, 共有 30 个磷酸化修饰位点和 5 个 N-型糖基化修饰位点。亚细胞定位预测结果显示, Twist2 蛋白主要定位在细胞核。采用 NCBI Conserved Domain Search 工具预测, 鳜 Twist2 蛋白的保守结构域分析发现(图 1a)含有 1 个功能域和一个 twist 框, 属于 bHLH 结构域超家族。

同时, 采用在线软件 SOPMA 预测了鳜 Twist2 蛋白的二级结构(图 1b), 其蛋白中 49.38%组成 α-螺旋, 41.98%随机卷曲结构, 3.09%的延长链和 5.56%的 β-转角。采用在线软件 SWISS-MODEL 预测 Twist2 蛋白三级结构模型(图 1c), 具有两段螺旋结构和一个环形结构, 符合 bHLH 蛋白构象。

采用 DNAMAN 和 GENEDOC 软件将鳜 *twist2* 基因所编码的氨基酸序列与其他物种进行多序列比对结果显示, 鳜 *twist2* 基因与其他脊椎动物的氨基酸序列之间的序列相似度较高(图 2),

表 2　鳜 *twist2* 基因结构和蛋白理化特征

Tab. 2　Summary of *twist2* gene in *Siniperca chuatsi*

指标 item	特征 properties
染色体 chromosome	LG12
总长度/bp total length	3 620
CDS 长度/bp CDS length	489
氨基酸数目/个 number of amino acids	162
分子量/kDa molecular weight	18.33
等电点 theoretical pI	9.45
外显子数/个 number of exons	2
保守结构域 conserved domain	bHLH
平均疏水性指数 average hydrophobicity index	−0.903
亚细胞定位 subcellular location	胞质、核内

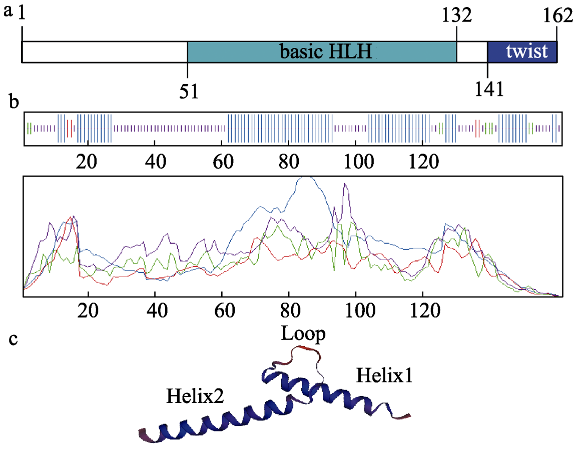


图 1　鳜 Twist2 结构预测

a. 保守结构域; b. 二级结构; c. 三级结构预测.

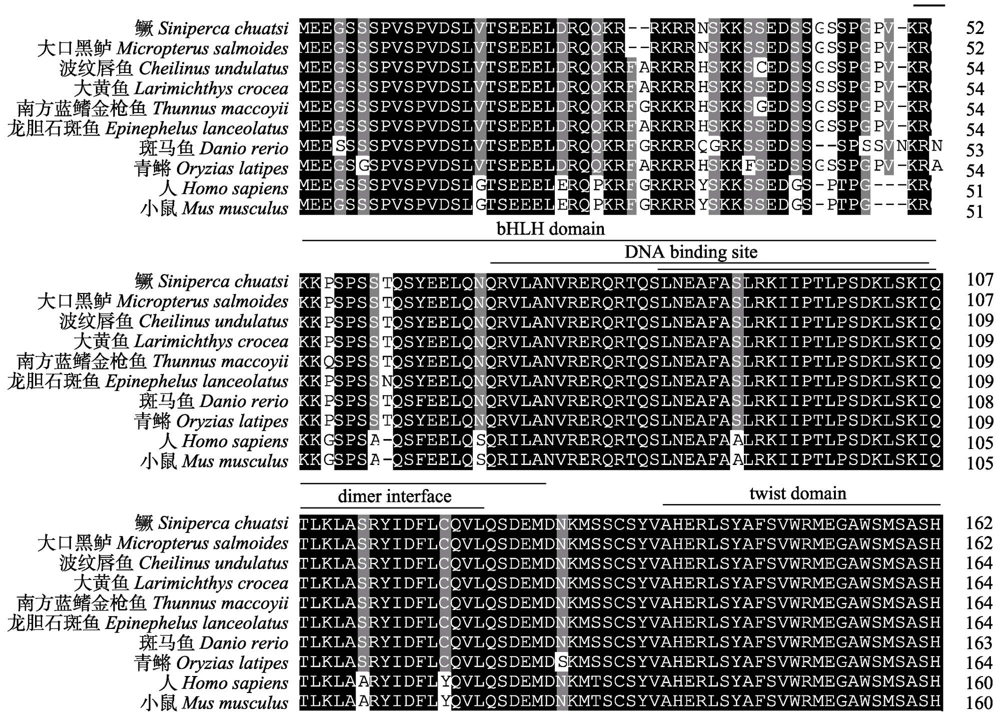
蓝色: α-螺旋; 绿色: β-折叠; 紫色: 无规则卷曲;

红色: 延伸链.

Fig. 1　Prediction of the stucture of Twist2 in *Siniperca chuatsi*

a. Conservative domain; b. Secondary structure; c. Tertiary structure.

Blue: α- helix; green: β- turn; purple: Random coil; Red: Extended strand.



```
鳜 Siniperca chuatsi                    MEEGSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKR--RKKRNSKKSSEDSSGSSPGPV-KR   52
大口黑鲈 Micropterus salmoides          MEEGSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKR--RKKRNSKKSSEDSSGSSPGPV-KR   52
波纹唇鱼 Cheilinus undulatus            MEEGSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKRFARKKRHSKKSCEDSSGSSPGPV-KR   54
大黄鱼 Larimichthys crocea              MEEGSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKRFARKKRHSKKSSEDSSSSSPGPV-KR   54
南方蓝鳍金枪鱼 Thunnus maccoyii         MEEGSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKRFGRKKRHSKKSGEDSSGSSPGPV-KR   54
龙胆石斑鱼 Epinephelus lanceolatus      MEEGSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKRFARKKRHSKKSSEDSSGSSPGPV-KR   54
斑马鱼 Danio rerio                      MEESSSSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKRFGRKKRQGRKSSEDSS--SPSSVNKRN  53
青鳉 Oryzias latipes                    MEEGSGSPVSPVDSLVTSEEELDRQQKRFARKKRHSKKFSEDSSGSSPGPV-KRA  54
人 Homo sapiens                         MEEGSSSPVSPVDSLGTSEEELERQPKRFGRKKRYSKKSSEDGS-PTPG---KR   51
小鼠 Mus musculus                       MEEGSSSPVSPVDSLGTSEEELERQPKRFGRKKRYSKKSSEDGS-PTPG---KR   51

鳜 Siniperca chuatsi                    KKPSPSSTQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  107
大口黑鲈 Micropterus salmoides          KKPSPSSTQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  107
波纹唇鱼 Cheilinus undulatus            KKPSPSSTQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  109
大黄鱼 Larimichthys crocea              KKPSPSSTQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  109
南方蓝鳍金枪鱼 Thunnus maccoyii         KKQSPSSTQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  109
龙胆石斑鱼 Epinephelus lanceolatus      KKPSPSSNQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  109
斑马鱼 Danio rerio                      KKPSPSSTQSFEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  108
青鳉 Oryzias latipes                    KKPSPSSTQSYEELQNQRVLANVRERQRTQSLNEAFASLRKIIPTLPSDKLSKIQ  109
人 Homo sapiens                         KKGSPSA-QSFEELQSQRILANVRERQRTQSLNEAFAALRKIIPTLPSDKLSKIQ  105
小鼠 Mus musculus                       KKGSPSA-QSFEELQSQRILANVRERQRTQSLNEAFAALRKIIPTLPSDKLSKIQ  105

鳜 Siniperca chuatsi                    TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  162
大口黑鲈 Micropterus salmoides          TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  162
波纹唇鱼 Cheilinus undulatus            TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  164
大黄鱼 Larimichthys crocea              TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  164
南方蓝鳍金枪鱼 Thunnus maccoyii         TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  164
龙胆石斑鱼 Epinephelus lanceolatus      TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  164
斑马鱼 Danio rerio                      TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDNKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  163
青鳉 Oryzias latipes                    TLKLASRYIDFLCQVLQSDEMDSKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  164
人 Homo sapiens                         TLKLAARYIDFLYQVLQSDEMDNKMTSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  160
小鼠 Mus musculus                       TLKLAARYIDFLYQVLQSDEMDNKMTSCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH  160
```

图 2　鳜与其他物种 Twist2 氨基酸序列多序列比对

氨基酸残基上的颜色表示序列之间的相似度, 相似度越高, 氨基酸残基上的颜色越深.

Fig. 2　Multiple sequence alignment of amino acid sequence of Twist2 in *Siniperca chuatsi* and other species

The color on the amino acid residues indicates the degree of similarity between the sequences.

The higher the similarity, the darker the color on the amino acid residues.

尤其是结构域 bHLH 和 C 末端，其中与大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) Twist2 氨基酸序列相似性为 100%、与斑马鱼相似性为 91.46%，与人类(*Homo sapiens*) Twist2 氨基酸序列相似性为 86.59%。

2.2 靶定鳜 *twist2* 基因的 miRNAs 预测筛选

根据 miRNAs 与 *twist2* mRNA 3′UTR 区互补结合的自由能和保守性，通过在线软件 TargetScanFish 和 RNAhybrid 筛选共有的 4 个 miRNAs 进行分析(图 3)，结果发现 *miR-204*、*miR-30a*、*miR-30b*、*miR-30e-5p* 分别与鳜 *twist2* mRNA 的 3′UTR 序列存在靶结合位点。

2.3 鳜 *twist2* 基因时空表达特征

为探索 *twist2* 在鳜中的表达模式，采用 RT-qPCR 技术检测了其在鳜心、肝、脾、肾、肌肉等组织中的表达情况。结果表明，*twist2* 基因在鳜所检测的组织中均有表达，在脾中表达较高，其次是脑和红肌，但在肝脏中表达量较低(图 4a)。此外，胚胎发育不同时期的检测结果显示，*twist2* 基因在鳜整个胚胎发育阶段均有表达，但在不同发育阶段存在明显表达差异，原肠期前表达量低，从神经胚期开始显著升高($P<0.05$)，至尾芽期达到峰值，肌效期之后稳定表达(图 4b)。

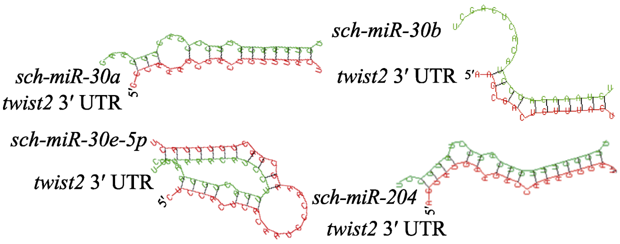


图 3 miRNAs 与 *twist2* 3′UTR 的结合位点预测

Fig. 3 Prediction of binding sites between miRNAs and *twist2* 3′UTR

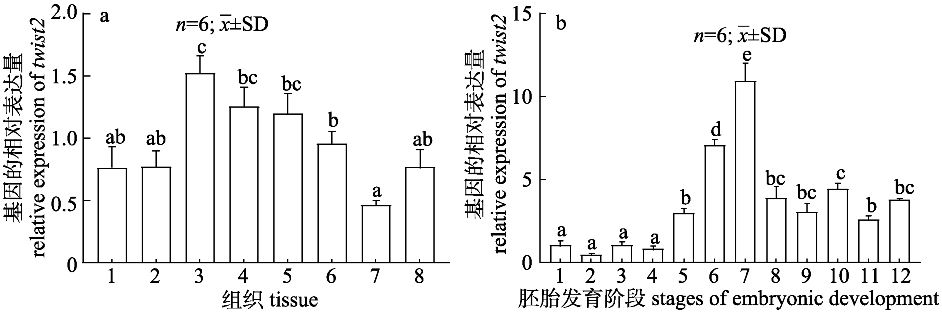


图 4 鳜 *twist2* 基因时空表达谱

a. 鳜 *twist2* 基因组织表达模式, 1. 心, 2. 肾, 3. 脾, 4. 脑, 5. 红肌, 6. 白肌, 7. 肝, 8. 肠; b. 鳜 *twist2* 基因胚胎发育表达模式, 1. 未受精卵, 2. 卵裂期, 3. 囊胚期, 4. 原肠中期, 5. 神经胚期, 6. 视泡期, 7. 尾芽期, 8. 肌效期, 9. 心搏期, 10. 血液循环期, 11. 胸鳍原基期, 12. 出膜期; 不同小写字母表示表达存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 4 Spatiotemporal expression profiles of *twist2* gene in *Siniperca chuatsi*

a.Expression patterns of mandarin *twist2* gene tissue, 1. heart, 2. kidney, 3. spleen, 4. brain, 5. red muscle, 6. white muscle, 7. liver, 8. intestine; b.Embryonic development expression patterns of the mandarin *twist2* gene, 1. unfertilized eggs, 2. cleavage, 3. blastula, 4. mid-gastrula, 5. neurula, 6. optic vesicle, 7. tail bud, 8. muscular effect, 9. heart beating, 10. blood circulation, 11. pectoral fin primordium, 12. hatching larvae; different lowercase letters indicate significant differences in expression ($P<0.05$).

2.4 鳜 *twist2* 基因在胚胎发育阶段的表达及组织定位

利用 *twist2* 反义探针，针对不同发育时期各挑选 20 枚正常发育，形态完整的鳜胚胎进行整胚原位杂交，检测 *twist2* 特异性表达情况。结果如图 5 所示，鳜 *twist2* 的表达在不同胚胎发育阶段显现出不同的分布趋势，其反义探针在原肠期之前无特异性表达，但在神经胚期开始出现强特异性表达，在尾芽期的体节中表达丰富，值得注意的是在胚体尾部出现持续性表达的特点。

2.5 不同饥饿时间对鳜 *twist2*、*myod* 和 *myog* 基因的表达影响

采用 RT-qPCR 技术检测了 *twist2*、*myod* 和 *myog* 在鳜不同饥饿处理下肌肉中的表达情况。结果表明(图 6)，在饥饿 3 d 时，*myod* 和 *myog* 的表达显著下降($P<0.05$)，而 *twist2* 基因的表达水平上升($P<0.05$)；当饥饿 7 d 时，*myod* 和 *myog* 的表达上

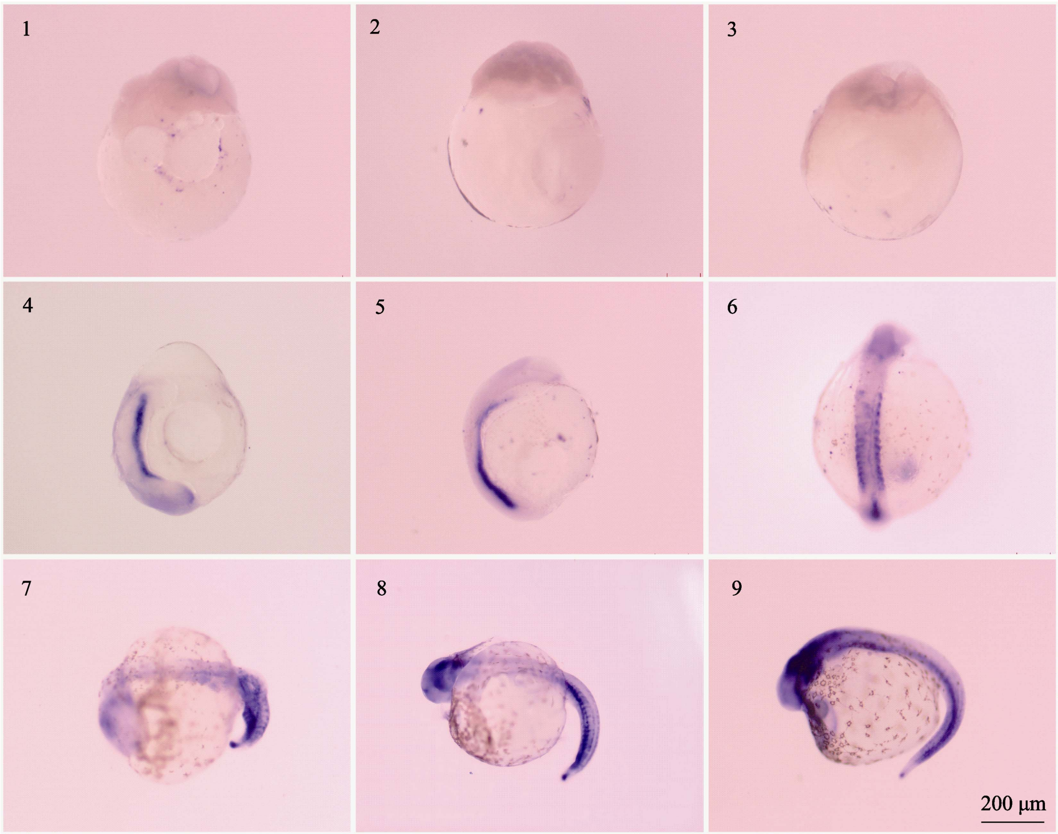


图 5　鳜 *twist2* 基因时空表达定位

1. 卵裂期, 2. 囊胚期, 3. 原肠早期, 4. 神经胚期, 5. 视泡期, 6. 尾芽期, 7. 肌效期, 8. 心搏期, 9. 血液循环期.

Fig. 5　Temporal and spatial expression localization of *twist2* in *Siniperca chuatsi*

1. cleavage; 2. blastula; 3. early-gastrula; 4. neurula; 5. optic vesicle; 6. tail bud; 7. muscular effect; 8. heart beating; 9. blood circulation.

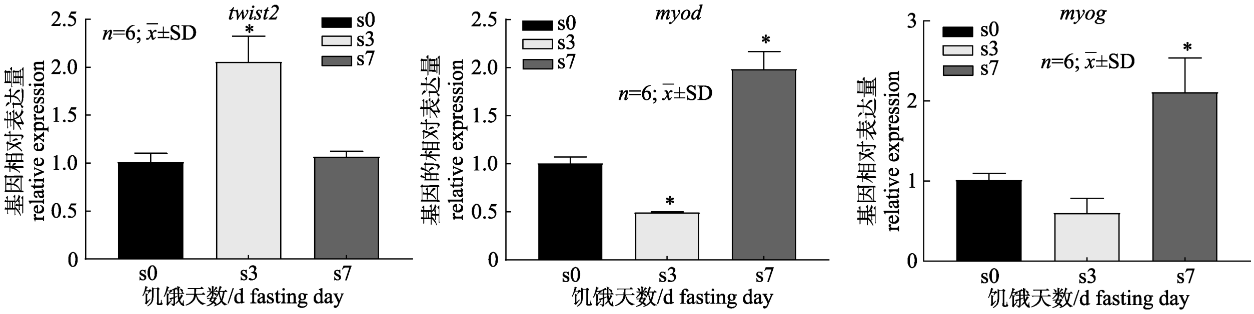


图 6　短期饥饿胁迫后 *twist2*, *myod*, *myog* 基因在鳜肌肉中的表达差异

s0、s3、s7 分别代表饥饿 0 d, 饥饿 3 d, 饥饿 7 d; *代表相对表达量具有显著性差异($P<0.05$).

Fig. 6　Differences in the expression of *twist2*, *myod*, *myog* gene in *Siniperca chuasi* muscle after short-term starvation stress

s0, s3, and s7 represent 0 days of hunger, 3 days of hunger, and 7 days of hunger, respectively;

* indicates significant difference in relative expression ($P<0.05$).

升，而 *twist2* 基因的表达与对照组无显著差异。*twist2* 和生肌调节因子的短期饥饿应答表现为 *twist2* 的表达呈现先上升后下降的趋势，而 *myod* 和 *myog* 的表达呈现先下降后上升。

2.6　不同饥饿时间对鳜 microRNAs 表达影响

采用 RT-qPCR 技术检测了 *miR-30a*、*miR-30b*、*miR-30e-5p*、*miR-204* 在鳜不同饥饿处理下肌肉中的表达情况。结果表明(图 7)，在饥饿胁迫后，靶

向 *twist2* 基因的 miRNAs 均出现显著性下降($P<0.05$)。在饥饿 3 d 后，与饥饿 0 d 组相比，*twist2* 的表达与 miRNAs 的表达呈现明显的负相关，在饥饿 7 d 后，*miR-30a*, *miR-30b* 表达与饥饿 3 d 时比较有所升高，而 *miR-204* 表达持续下降。

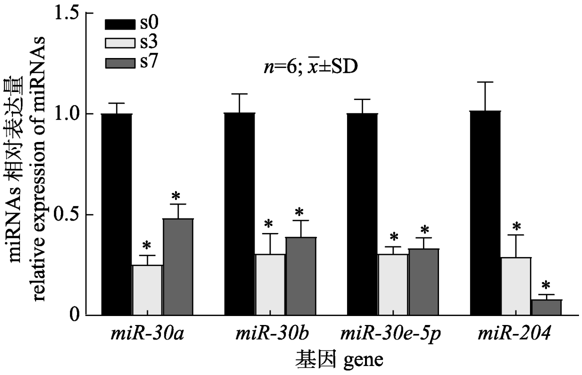


图 7 短期饥饿胁迫后 miRNAs 在肌肉中的表达差异
s0、s3、s7 分别代表饥饿 0 d、饥饿 3 d、饥饿 7 d;
*代表具有显著性差异($P<0.05$).
Fig. 7 Differences in the expression of miRNAs in muscle after short-term starvation stress
s0, s3, and s7 represent 0 days of hunger, 3 days of hunger, and 7 days of hunger, respectively; * indicates significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 *twist2* 基因序列分析

Twist2 作为一种转录因子，参与诸多基因的转录调控，如直接或间接与 MyoD、Mef2 结合，在肌肉的发育过程中起到负调控作用[6,21]。哺乳动物 Twist2 包含 3 个功能结构域：基本结构域(basic)、螺旋–环–螺旋结构域(HLH)和扭曲框(twist)[22]。笔者采用生物信息学方法对鳜 Twist2 蛋白序列进行分析，结果表明鳜转录因子 Twist2 同样具有 bHLH 结构域，该结构域包含 basic 结构域和 HLH 区域，介导高亲和力 DNA 与特定六核苷酸序列的结合，并能与其他蛋白质相互作用形成具有功能性的二聚体。其与大口黑鲈、斑马鱼、人等物种的序列相似性在 85%以上，在脊椎动物中具有较高的相似性。据报道小鼠 Twist 的功能结构域与 MyoD 的转录元件发生相互作用，这种联系被认为是 Twist 调节脊椎动物肌肉生成的一种机制[7]。这些结果表明，*twist2* 基因在鳜与其他物种中高度保守，推测 *twist2* 基因在不同物种中可能发挥相似的生物学功能。

3.2 *twist2* 基因的时空表达

Twist 家族的转录因子在中胚层分化中发挥重要作用，并参与肌肉发育和细胞增殖等过程的转录网络调控，是胚胎发育的关键基因[23-24]。Barnes 等[24]发现 *twist2* 在果蝇(*Drosophilidae*)胚胎发育时期的肌肉前体细胞中表达，与中胚层和肌肉的形成相关。在斑马鱼胚胎中，*twist* 基因的表达存在于头部间质、中间中胚层、尾芽和心脏瓣膜[25]。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)胚胎中，*twist2* 在形成真皮和肌肉的外细胞层中表达[26]。本研究结果显示，鳜 *twist2* 在胚胎发育阶段显示出发育时序的明显差异，其在原肠期前表达量低，从神经胚期开始显著升高，尾芽期表达出现峰值。整胚原位杂交结果表明，鳜 *twist2* 的表达在不同胚胎发育阶段显现出不同的分布趋势，其反义探针在原肠期之前无特异性表达，但在神经胚期开始出现强特异性表达，在尾芽期的体节中表达丰富，这说明它在早期发育中对于神经和肌肉的形成具有重要作用，提示可能控制脊索和肌肉的形成和定位，对胚胎器官的形成过程具有重要意义。神经胚期是脊索动物早期胚胎发育中继原肠胚后的重要发育阶段，在这一阶段脊索两侧中胚层慢慢增厚发育成体节。由于不同物种在胚胎发育过程中的表达变化存在差异，因此在其他物种中研究表达模式，有利于深入剖析 Twist 家族成员在胚胎发育中的作用。

已有研究表明，*twist2* 的表达不仅具有发育时序的差异性，还具有组织的特异性。陈洁等[27]的研究报道，*twist2* 基因在唇䱻(*Hemibarbus labeo*)皮肤、鳃和肌肉中有较高的表达。斑马鱼 *twist2* 在皮肤和鳞片组织中表达，确定其在发育和再生过程中具有维持鳞片、形状和组织的功能[28]。在金鲳鱼(*Trachinotus ovatus*)各组织中 *twist* 表达较高的是脾脏和胃，其次是大脑和肾脏[29]。本研究分析了 *twist2* 基因在鳜不同组织中的表达差异，在脾脏和脑中表达量较高，但肝脏中表达量较低。这些结果表明，*twist2* 可能对神经胚期之后的器官形成以及在脾脏、肌肉等组织器官有重要生

理功能。值得注意的是，在唇䱻脾脏中的 *twist2* 表达较低，而在鳜和金鲳鱼脾脏中表达较高，说明 *twist2* 的表达模式和功能在物种间存在差异。

3.3　短期饥饿对 *twist2* 和 miRNAs 表达影响

在食物缺少或者饥饿的状态下,鱼类一方面通过降低代谢水平、自身消耗等途径形成对饥饿胁迫的忍耐能力，另一方面机体受到饥饿胁迫后，受到某种信号调控转录因子的表达[30-31]。由于肌肉生长机制依赖于 MyoD、MyoG 等的表达，而这些生长因子又会受到外界因素的影响，因此可建立短时间的限食模型。对尼罗罗非鱼进行短期的禁食(5 d 和 10 d)，检测 *myod* 和 *myog* 的 mRNA 水平，与正常投喂相比，其表达量显著降低[32]。研究表明 Twist2 的敲除会导致 MyoG 上调, MyoG 是肌源性分化的关键转录开关[33]。本研究表明，饥饿 3 d 后，鳜肌肉 *myod*、*myog* 和 *twist2* 基因的表达发生显著变化，与饥饿 0 d 相比，*twist2* 的表达水平显著升高，而 *myod* 和 *myog* 显著下降，骨骼肌的增殖与分化受到抑制，可能机体在接收到饥饿信号后，为了节约能量，维持蛋白质稳态的一种保护机制，推测 *twist2* 也参与了应答饥饿胁迫的调控。

为进一步探究 *twist2* 基因在鳜中的表达调控机制，利用在线的生物学方法预测筛选了潜在靶向 *twist2* 3′UTR 的 miRNAs。miRNAs 已经成为发育和生理过程的重要转录后调节因子[19,34-35]。随着对 miRNAs 研究的深入，越来越多新的 miRNAs 被鉴定参与靶基因的调控[36]。通过在线工具预测筛选到 *miR-204*、*miR-30a*、*miR-30b*、*miR-30e-5p* 与鳜 *twist2* mRNA 的 3′UTR 序列存在结合的靶位点。在本研究的饥饿实验中，在饥饿 3 d后预测靶向 *twist2* 基因的 miRNAs 表达水平也出现了显著变化，上述 4 种 miRNAs 和 *twist2* 基因在正常摄食和饥饿状态下的鳜肌肉中表现出相反的表达模式。*miRNA-30-5p* 被报道可调节肌肉分化和肌肉相关基因的选择性剪切[37]，而 *miR-30b* 参与血管平滑肌细胞钙化[38], *miR-204* 可以靶向 Pax7、IGF1 和 MEF2C，调节靶基因的表达，并与骨骼肌再生密切相关[39]。本研究通过在线工具初步筛选到靶向鳜 *twist2* 基因的相关 miRNAs，这些 miRNAs 可能通过靶向鳜 *twist2* 基因参与了肌肉增殖与分化的调控，但具体的调控机制有待进一步研究。

本研究分析了鳜 *twist2* 基因的序列结构特征和在鳜不同胚胎发育阶段的时空定位和表达模式，结合 miRNA 的靶基因预测，及饥饿处理实验，推测 *miR-30a*、*miR-30b*、*miR-30e-5p*、*miR-204* 可能参与鳜 *twist2* 基因的表达调控，为进一步深入分析 *twist2* 基因在鱼类早期发育，参与调控鱼类肌肉生长分化提供了重要的理论依据。

参考文献:

[1] Hebrok M, Füchtbauer A, Füchtbauer E M. Repression of muscle-specific gene activation by the murine Twist protein[J]. Experimental Cell Research, 1997, 232(2): 295-303.

[2] Zhao C X, Yang Z. Biological function and molecular mechanism of Twist2[J]. Hereditas, 2015, 37(1): 17-24. [赵承孝, 杨泽. Twist2 的生物学功能及其分子机制[J]. 遗传, 2015, 37(1): 17-24.]

[3] Franco H L, Casasnovas J, Rodríguez-Medina J R, et al. Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(4): 1177-1186.

[4] Zhou L L, Li Q J, Chen A, et al. KLF15-activating Twist2 ameliorated hepatic steatosis by inhibiting inflammation and improving mitochondrial dysfunction via NF-κB-FGF21 or SREBP1c-FGF21 pathway[J]. FASEB Journal, 2019, 33(12): 14254-14269.

[5] Gong X Q, Li L. Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(14): 12310-12317.

[6] Ge X X, Lu S M, Zhang Y M, et al. The role and mechanism of transcription factor Twist in skeletal muscle cells[J]. Medical Laboratory Science and Clinics, 2019, 30(11): 38-41. [葛肖肖, 逯素梅, 张艳美, 等. 转录因子 Twist 在骨骼肌细胞中的作用及机制研究进展[J]. 医学检验与临床, 2019, 30(11): 38-41.]

[7] Hjiantoniou E, Anayasa M, Nicolaou P, et al. Twist induces reversal of myotube formation[J]. Differentiation, 2008, 76(2): 182-192.

[8] Liu N, Garry G A, Li S, et al. A Twist2-dependent progenitor cell contributes to adult skeletal muscle[J]. Nature Cell

Biology, 2017, 19(3): 202-213.

[9] Makeyev E V, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs[J]. Science, 2008, 319(5871): 1789-1790.

[10] Long L M, Huang G Q, Zhu H Y, et al. Down-regulation of *miR-138* promotes colorectal cancer metastasis via directly targeting Twist2[J]. Journal of Translational Medicine, 2013, 11(1): Article No.275.

[11] Han X M, Li H, Liu S H, et al. Study on the potential mechanism of miR-22-5p in non-small-cell lung cancer[J]. Disease Markers, 2022, 2022: 3750734.

[12] Chen J H, Qi Z H. The elevated Circ_0067835 could accelerate cell proliferation and metastasis via miR-1236-3p/Twist2 axis in *hepatocellular carcinoma*[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 2825172.

[13] Li M F. Research progress on biology of mandarin fish[J]. Modern Fisheries Information, 2010, 25(7): 16-21. [李明锋. 鳜鱼生物学研究进展[J]. 现代渔业信息, 2010, 25(7): 16-21.]

[14] Chu W Y, Chen J, Zhou R X, et al. Characterization and ontogenetic expression analysis of the myosin light chains from the fast white muscle of mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fish Biology, 2011, 78(4): 1225-1238.

[15] Chen L P. Expression of MRFs and muscle growth during starvation and refeeding in *Megalobrama amblycephala*[D]. WuHan: Huazhong Agricultural University, 2013. [陈丽萍. 饥饿再投喂对团头鲂幼鱼生肌调节因子表达和肌肉特性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.]

[16] Guderley H, Lapointe D, Bédard M, et al. Metabolic priorities during starvation: Enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, Gadus morhua L[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(2): 347-356.

[17] Zhu X, Ye S H, Li Y, et al. Temporal and spatial expression characteristics of miR-21 and regulation of adaptive rhythm expression under short-term starvation stress in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(5): 665-672. [朱鑫, 叶苏杭, 李源, 等. 鳜 miR-21 的时空表达特征及短期饥饿胁迫下的适应性节律表达调控[J]. 中国水产科学, 2022, 29(5): 665-672.]

[18] Xie M, Ding Y, Ru H, et al. Spatio-temporal expression characteristics of miR-133a-5p and effect of fasting on its rhythmic expression in *Siniperca chuatsi*[J]. Life Science Research, 2023, 27(4): 283-289. [谢敏, 丁颖, 茹惠, 等. 翘嘴鳜(*Sinperca chuatsi*) miR-133a-5p 的时空表达特征及饥饿对其节律性表达的影响[J]. 生命科学研究, 2023, 27(4): 283-289.]

[19] Chu W Y, Zhang F L, Song R, et al. Proteomic and microRNA Transcriptome Analysis revealed the microRNA-SmyD1 network regulation in Skeletal Muscle Fibers performance of Chinese perch[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): Article No.16498.

[20] Liu X L, Bin S Y, Wang K Z, et al. Artificial propagation and embryonic development observation of mandarin fish[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2013, 31(2): 100-106. [刘希良, 宾石玉, 王开卓, 等. 翘嘴鳜的人工繁殖与胚胎发育观察[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2013, 31(2): 100-106.]

[21] Cheng J, Chu W Y, Zhang J S. Progresses and perspectives of the studies on fish muscle-related genes and their expression[J]. Life Science Research, 2010, 14(4): 355-362. [成嘉, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉组织发生和分化相关基因的研究进展[J]. 生命科学研究, 2010, 14(4): 355-362.]

[22] Mudry J M, Massart J, Szekeres F L, et al. TWIST1 and TWIST2 regulate glycogen storage and inflammatory genes in skeletal muscle[J]. The Journal of Endocrinology, 2015, 224(3): 303-313.

[23] Sandmann T, Girardot C, Brehme M, et al. A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*[J]. Genes & Development, 2007, 21(4): 436-449.

[24] Barnes R M, Firulli A B. A twist of insight-the role of Twist-family bHLH factors in development[J]. The International Journal of Developmental Biology, 2009, 53(7): 909-924.

[25] Germanguz I, Lev D, Waisman T, et al. Four twist genes in zebrafish, four expression patterns[J]. Developmental Dynamics, 2007, 236(9): 2615-2626.

[26] Dumont E, Rallière C, Rescan P Y. Identification of novel genes including Dermo-1, a marker of dermal differentiation, expressed in trout somitic external cells[J]. The Journal of Experimental Biology, 2008, 211(Pt 7): 1163-1168.

[27] Chen J, Lü Y P, Dai Q M, et al. Molecular characterization of two *twist* genes in barbel steed (*Hemibarbus labeo*) and their relationship with intermuscular bone development[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(4): 489-496. [陈洁, 吕耀平, 戴庆敏, 等. 唇䱻*twist*1 和 *twist*2 基因克隆及其在肌间刺骨化过程中的表达[J]. 水产学报, 2021, 45(4): 489-496.]

[28] Jacob T, Chakravarty A, Panchal A, et al. Zebrafish *twist2/dermo*1 regulates scale shape and scale organization during

skin development and regeneration[J]. Cells ＆ Development, 2021, 166: 203684.

[29] Ma Z, Fu M, Qin J G, et al. Molecular cloning of twist gene and its expression in golden pompano *Trachinotus ovatus* (linnaeus 1758) larvae at different water temperatures[J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2018, 70: 1-11.

[30] Xu H Z, Zhang H D, Wang G L, et al. Comparison of physiological status of short-term starvation and feeding of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) at low temperature in winter[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(9): 1572-1581. [徐杭忠, 张皓迪, 王贵龙, 等. 冬季低水温鳜短期饥饿和摄食的生理状态比较[J]. 水产学报，2022, 46(9): 1572-1581.]

[31] Wu P, Chen L, Cheng J, et al. MiRNAs-modulation of Nrf2 signaling networks in regulation oxidative stress of Chinese perch skeletal muscle after fasting treatment[J]. Marine Biotechnology, 2020, 22(5): 620-630.

[32] Nebo C, Portella M C, Carani F R, et al. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 164(4): 268-274.

[33] Li S, Chen K N, Zhang Y C, et al. Twist2 amplification in rhabdomyosarcoma represses myogenesis and promotes oncogenesis by redirecting MyoD DNA binding[J]. Genes & Development, 2019, 33(11-12): 626-640.

[34] Wu P, Chen L, Cheng J, et al. The miRNA expression profile directly reflects the energy metabolic differences between slow and fast muscle with nutritional regulation of the Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology, 2021, 259: 111003.

[35] Zhu X, Chen D X, Hu Y, et al. The microRNA signature in response to nutrient restriction and refeeding in skeletal muscle of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(2): 180-189.

[36] Zhou W, Xie Y D, Li Y, et al. Research progress on the regulation of nutrition and immunity by microRNAs in fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 113: 1-8.

[37] Zhang B W, Cai H F, Wei X F, et al. miR-30-5p regulates muscle differentiation and alternative splicing of muscle-related genes by targeting MBNL[J]. International Journal of Molecular Sciences 2016, 17(2): 182.

[38] Zhou W, Xu J S, Bai Y L, et al. Role of miR-30b in calcification of rat vascular smooth muscle cells induced by high phosphorus[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2021, 37(1): 54-59. [周薇, 徐金升, 白亚玲, 等. miR-30b 在高磷诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1): 54-59.]

[39] Tan Y, Shen L Y, Gan M L, et al. Downregulated miR-204 promotes skeletal muscle regeneration[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 3183296.

Sequence characterization, spatiotemporal expression patterns and predictive analysis of miRNAs targeting *twist2* in *Siniperca chuatsi*

CHENG Congyi[1, 2], ZHU Xin[2], ZENG Wei[2], BIN Qin[2], WANG Wei[2], CHU Wuying[2], ZHANG Jianshe[2]

1. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Quality Control, College of Biological and Chemical Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China

Abstract: Twist2 (Twist family transcription Factor 2) is a member of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) family that plays an important role in the regulation of animal development. However, the expression patterns and regulatory roles of *twist2* genes in fishes are poorly understood. This study aimed to understand the expression pattern of the *twist2* gene and its functions in the regulation of muscle development in *Siniperca chuatsi*. The *twist2* gene sequence was obtained from the transcriptome database of *S. chuatsi* and Twist2 protein characterization and homology were analyzed using bioinformatic methods. The protein encoded by the *twist2* gene of *S. chuatsi* consists of 162 amino acids with a conserved functional bHLH structural domain and the results of multiple sequence comparison based on the amino acid sequences showed that the Twist2 protein has a high similarity in vertebrates. The spatiotemporal expression pattern of the *twist2* gene of *S. chuatsi* was analyzed by RT-qPCR and the expression pattern of the *twist2* gene was found to be differentially expressed at different developmental stages. The expression level was low before the mid-gastrula stage, increased significantly from the neurula stage, reached its highest level in the tail-bud stage, and was widely expressed in *S. chuatsi* tissues; its expression was highest in the spleen, followed by the brain and red muscle. Whole embryo *in situ* hybridization was used to detect the localization of *twist2* at different developmental stages in early embryos and it was found to be specifically expressed mainly in the neuroectoderm and somites. Targetscan and RNAhybrid tools were used to predict miRNAs that might target the mandarin *twist2* gene. *miR-30a*, *miR-30b*, *miR-30e-5p*, and *miR-204* were found to potentially act on the *twist2* 3' UTR, suggesting that *twist2* is a potential target gene for *miR-30a*, *miR-30b*, *miR-30e-5p*, and *miR-204*. The short-term starvation stress experiment in *S. chuatsi* showed that the expression of *twist2* after three days of starvation was significantly negatively correlated with the expression of the above miRNAs, suggesting that there is a potential regulatory relationship between *twist2* and the above four miRNAs. Therefore, the results of this study will contribute to understanding the sequence characteristics and spatiotemporal expression patterns of the *twist2* gene and the functions of potential upstream miRNAs in regulating muscle growth and development at the molecular level, which will provide a theoretical basis for the developmental biology of fish, as well as for healthy aquaculture.

Key words: *Siniperca chuatsi*; *twist2*; spatiotemporal expression patterns; miRNA; short-term starvation

Corresponding author: ZHANG Jianshe. E-mail: jzhang@ccsu.edu.cn