

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.18179

全同胞家系中生长差异翘嘴鲌肌肉转录组分析

曾爽, 刘宣歌, 王鹏飞, 胥鹏, 曾雷, 周磊, 唐琴冬, 陈挚, 李桂峰

中山大学生命科学学院, 水生经济动物研究所, 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)是中国重要的经济水产养殖品种, 对翘嘴鲌基因表达模式进行研究有助于筛选优势个体, 培育生长特性优良的品种。为了解体重明显差异翘嘴鲌个体的差异基因表达信息, 为翘嘴鲌培育提供基因指导, 本研究从同一家系中挑选体重明显差异的 3 月龄翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)个体进行肌肉转录组测序, 研究不同体型个体间基因表达模式差异。结果显示, 来自同一家系的翘嘴鲌个体在相同养殖条件下仍出现明显体重差异, 养殖 3 个月后, 极大个体(overweight)平均体重可达到极小个体(underweight)的 4 倍。分别对极大个体和极小个体的肌肉组织进行转录组测序, 共获得 73353 个非重复序列基因(unigenes), 通过基因表达量比较共获得 8942 个差异基因, 对差异表达基因进行定义发现, *GHR2*、*IGFR1*、*4ebp*、*Mhc*、*Mlc*、*Troponin* 等基因在极小个体中具有更高的表达水平。通过 KEGG 通路富集显示, 蛋白质生成、蛋白质消化、RNA 转运通路富集了大量差异表达基因。本研究发现体重差异明显的翘嘴鲌个体具有不同基因表达模式, 转录组测序获得了大量差异表达基因信息, 为翘嘴鲌生长研究提供了丰富的基因资源。

关键词: 翘嘴鲌; 转录组; 体重差异; 差异表达基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)01-0053-09

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)是中国特有的重要经济鱼类, 分布于中国除青藏高原外的各大水系, 属于鲈形目(Perciformes), 鲈科(Serranidae), 鲌属。翘嘴鲌具有生长速度快、肉质好、个体大的特点, 是重要的养殖品种^[1]。与此同时, 与翘嘴鲌生长、应激相关基因的克隆和表达也受到关注^[2-3]。Wang 等^[4]从 GH (growth hormone)、IGF (Insulin-like growth factor)基因上筛选出 6 个 SNP (single nucleotide polymorphisms)位点, 并验证其与翘嘴鲌生长具有显著的相关性。Zhu 等^[5]通过饥饿再投喂实验对翘嘴鲌肌肉进行了 microRNA 分析, 并且筛选出 4 个在急性肌肉萎缩刺激条件下对肌肉中基因转录、翻译有重要作用的 miRNAs 位点。了解不同生长性状翘嘴鲌的分子表达模式差异, 可以帮助揭示翘嘴鲌生长调控网络, 筛选分子育种标记, 改良翘嘴鲌品质。

转录组测序可以帮助分析特定组织的基因表达情况, 寻找生物调控网络和机理。通过转录组测序可获得大量基因表达信息, 用于比较不同状态下基因表达量的差异, 获取与目的性状相关的基因表达情况, 从而了解调控目的性状的基因网络。随着测序技术的逐渐成熟, 转录组测序被应用于免疫、性别、生长、应激等多种表型相关的关键基因调控网络研究和重要性状分子标记鉴定, 水产动物中转录组测序研究也越来越多^[6]。Wang 等^[7]用转录组测序技术筛选了抗肠道败血病候选基因和疾病相关表达差异显著的单核苷酸多态性位点; Sun 等^[8]采用 Illumina 测序技术筛选斑点叉尾鲌(*Ictalurus punctatus*)性别相关基因, 并通过进一步的分析发现许多涉及性腺发生、精子发生、性别分化的基因; Jeukens 等^[9]利用 RNA-seq 技术研究了短小型和正常体型白鲑(Salmonidae)的适应

收稿日期: 2018-05-23; 修订日期: 2019-05-15.

基金项目: 广东省海洋与渔业局项目(A201401A02); 广东省科技厅科技计划项目(2014A020208022).

作者简介: 曾爽(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事翘嘴鲌生长研究. E-mail: jiexiazengshuang@163.com

通信作者: 李桂峰, 教授, 主要从事鱼类育种和鱼类资源开发与利用研究. E-mail: liguif@mail.sysu.edu.cn

性转录组变化,发现白鲢短小型高表达基因主要与免疫、DNA 复制以及能量代谢有关,而正常体型则与蛋白质合成有关。

鱼类的生长伴随鱼类整个生活周期,受到基因和环境等多方面因素的共同影响,由于其调控机制非常复杂,受到了研究者广泛的关注。而转录组测序可以在没有研究物种基因信息的情况下进行分析,对其功能基因组进行深入研究。本研究首次使用转录组测序对体重差异翘嘴鲻进行差异基因分析,为翘嘴鲻生长相关基因的研究提供了完整的基因表达背景。

本研究根据全同胞家系翘嘴鲻出现体型显著差异现象,通过对体型差异翘嘴鲻个体进行肌肉转录组测序,对差异表达基因进行注释和通路富集分析,研究同一家系在相同养殖条件下,极大个体(Overweight)和极小个体(Underweight)翘嘴鲻肌肉基因表达模式差异,了解大、小个体间差异基因表达特点,为深入开发翘嘴鲻生长相关分子标记提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中翘嘴鲻亲鱼来自于佛山市南海区百容水产良种股份有限公司,经人工授精繁殖后,获得翘嘴鲻全同胞家系。每天饱食投喂,养殖水温在 26~28℃,pH 变化范围在 6.5~7.0,溶氧保持在 6 mg/L 以上。养殖 3 个月后,对所有个体进行称重、测量,从中选择体型极大个体和极小个体各 5 尾,禁食 24 h,使用 MS-222 将实验鱼麻醉后快速对肌肉组织进行取样。

1.2 RNA 提取方法

将样本在液氮中充分研磨,按照 E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit II 试剂盒操作规范进行 RNA 提取,使用 DNase I 对提取到的总 RNA 消化 1 h,去除 DNA 残留。分别取 1 μL RNA 样品用核酸蛋白测定仪和 Agilent2100 对 RNA 样品的纯度、质量和浓度进行检测,同时取 800 ng RNA 于 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测 RNA 样品完整性。

1.3 RNA 逆转录及建库

分别将翘嘴鲻极大个体和极小个体各 5 尾的

肌肉组织 RNA 等量混合,得到两个 RNA pools,用 Oligo(dT)磁珠富集纯化 mRNA,以片段 mRNA 为模板,逆转录酶和六碱基随机引物合成 cDNA 第一链,再用 RNaseH 和 DNA 聚合酶合成第二链。使用 T4 DNA 聚合酶、Klenow DNA 聚合酶和 T4 多聚核苷酸激酶修复 DNA 末端,T4 DNA 连接酶连接测序接头,通过纯化选择 200 bp+25 bp 的 cDNA 片段扩增得到 DNA 文库。采用双端测序(paired-end)技术,将构建好的两个测序文库用 Illumina HiSeqTM2000 进行测序,获得 900 bp 左右的双端测序的片段(paired-end reads)。

1.4 测序数据分析

测序得到的原始图像数据经碱基识别(base calling)转化为序列数据称之为原始数据(raw data)或原始片段(raw reads),经过对 raw reads 序列进行筛选,去除含 adaptor、N 比例大于 5%及低质量 reads(质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整个 read 的 50% 以上),得到可供后续分析的过滤后片段(clean reads)。使用短 reads 组装软件 Trinity 做转录组从头组装,使用序列聚类软件 TGICL 做进一步序列拼接和去冗余处理,得到不含 N 的非重复序列基因(Unigene)。用 SOAPaligner/soap2 将 clean reads 比对到参考基因组和参考基因序列中进行基因注释。

1.5 基因功能注释及分类

将 Unigene 序列与蛋白数据库 Nr (nonredundant protein)、Swiss-Prot、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)和 COG (Clusters of Orthologous Groups)做 Blastx 比对(evalue<0.00001),取比对结果最好的蛋白确定 Unigene 的序列方向。根据 Nr 注释信息,通过 Blast2GO 软件对得到的 Unigene 进行 GO(Gene Ontology)富集。用 WEGO 软件对所有 Unigene 做 GO 分类统计,将 Unigene 描述为分子功能、细胞组分、参与的生物过程 3 个功能分类,认识该物种的基因功能分布特征。

1.6 差异基因表达分析

使用 RPKM 法(Reads Per Kb per Million reads)计算基因表达量。RPKM 法可以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。对差异检验的 P 值作多重假设检验校正, 通过控制 FDR(False Discovery Rate)来决定 P 值的域值。FDR 值越小, 差异倍数越大, 表明表达差异越显著。差异表达基因评判标准为 $FDR \leq 0.001$ 且倍数差异不低于 2 倍的基因。分别用 WEGO 软件对差异表达基因进行 GO 功能分类统计和用 KEGG 数据库对差异表达基因进行 Pathway 注释。

1.7 差异基因荧光定量 PCR(Real-time PCR)验证

提取肌肉中 RNA 进行逆转录, 以肌肉 cDNA 为模板, 对转录组结果中 6 个差异表达显著的部分基因进行荧光定量 PCR 验证, 包括生长轴的生长激素受体(GHR2)和胰岛素样生长因子受体(IGFR1)、肌肉纤维组成蛋白(Mhc)、涉及蛋白和折叠和运输的热休克蛋白 Hsp90(heat shock 90)、涉及蛋白质生成的 4ebp、肌肉纤维调节蛋白(MyoD)。以 18S、 β -actin 为内参基因, 通过 RT-PCR(realtime fluorescence quantitative PCR)检测不同基因的表达水平。

2 结果与分析

2.1 体重差异翘嘴鲈的选择

本实验在相同养殖条件下, 从同一家系的 60 尾健康翘嘴鲈个体中挑选极大个体(Overweight)、极小个体(Underweight)各 5 尾, 极大个体组平均体重(60.2 ± 5.7) g; 极小个体组平均体重(13.2 ± 1.4) g, 极大个体组平均体重可达极小个体组 4 倍, 体长、体高也分别达到极小个体组两倍, 具有明显的体型差异(表 1)。

表 1 翘嘴鲈极大个体和极小个体生长性状
Tab. 1 Growth traits of overweight and underweight *Siniperca chuatsi*

个体 individual	体重/g weight	体长/mm length	体高/mm height
O-1	62.2	138	46
O-2	80.1	147	52
O-3	55.2	132	43
O-4	54.3	131	45
O-5	59.3	135	44
U-1	12.6	79	24
U-2	7.8	71	23
U-3	16	85	26
U-4	12.9	82	24
U-5	12.8	79	26

注: O 表示极大个体, U 表示极小个体。
Note: O means overweight; U means underweight.

2.2 测序数据质量及拼接

经 Illumina 测序后, 两个翘嘴鲈转录组样本共获得 95581082 条 raw reads, 其中极大个体组 48963598 条, 极小个体组 46617484 条; 经过筛选去除低质量序列后, 共得到 91264026 条 clean reads, 平均长度约为 100 bp, 占总 reads 数的 95.48%; 测序结果中 GC 含量为 51.31%, Q20 百分比为 98.57%, 具有良好的测序质量, 两个转录组本间无显著数据量差异, 可用于分析两个转录本表达模式差异。经 Trinity 拼接组装后, 两个转录本共得到 73353 条 Unigene, 平均长度为 703 bp(表 2)。在去除短序列和重复序列之后, 经过 Nr、Swiss-Prot、KEGG 和 COG4 个数据库共定义 39005 条 Unigene。Nr、COG、Swissprot 及 KEGG 分别定义了 38833 条、10926 条、33749 条和 19791 条 Unigene, 确定 Unigene 序列方向后, 通过定义最多 Unigene 数量的 Nr 数据库进行注释(图 1)。

表 2 翘嘴鲈极大个体和极小个体转录组测序数据产出及拼接结果汇总

Tab. 2 The brief information of deep sequencing and assembly for overweight and underweight *Siniperca chuatsi*

类别 category	数据 data
总 reads 数 number of reads	95581082
可用 reads 数 clean reads	91264026 (95.48%)
总碱基数/nt total nucleotides	9126402600
Q20 比例/% Q20 ratio	98.57
N 比例/% N ratio	0.00
GC 比例/% GC ratio	51.31
Contigs 总数 number of contigs	80314
Contigs 平均长度 average length of contigs	621
Unigene 总数 number of unigenes	73353
Unigene 平均长度/bp average length of unigenes	703

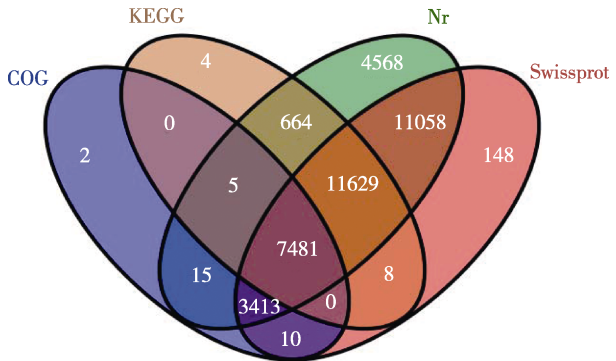


图 1 Nr、COG、KEGG、Swissprot 数据库比对结果
Fig. 1 Detection of homologous genes in public databases (Nr, COG, KEGG, Swissprot)

2.3 差异表达基因分析

计算 RPKM 的大小衡量基因表达水平的高低, 经过 RPKM 标准化计算处理后, 共获得 8942 个差异表达基因, 其中 7858 个 Unigene 在极小个体中表达量较高。GO 富集将 5150 个差异表达基因富集到 3 个分集, 分别是生物过程 1530 条、细胞组

分 1737 条和分子功能 1883 条。
在生物过程分集中, 细胞(cell)和细胞成分(cell part)是主要的功能分组; 分子功能分集中, 连接(binding)是主要功能分组; 细胞代谢过程(cellular process)是生物过程分集中的主要功能分组(图 2)。

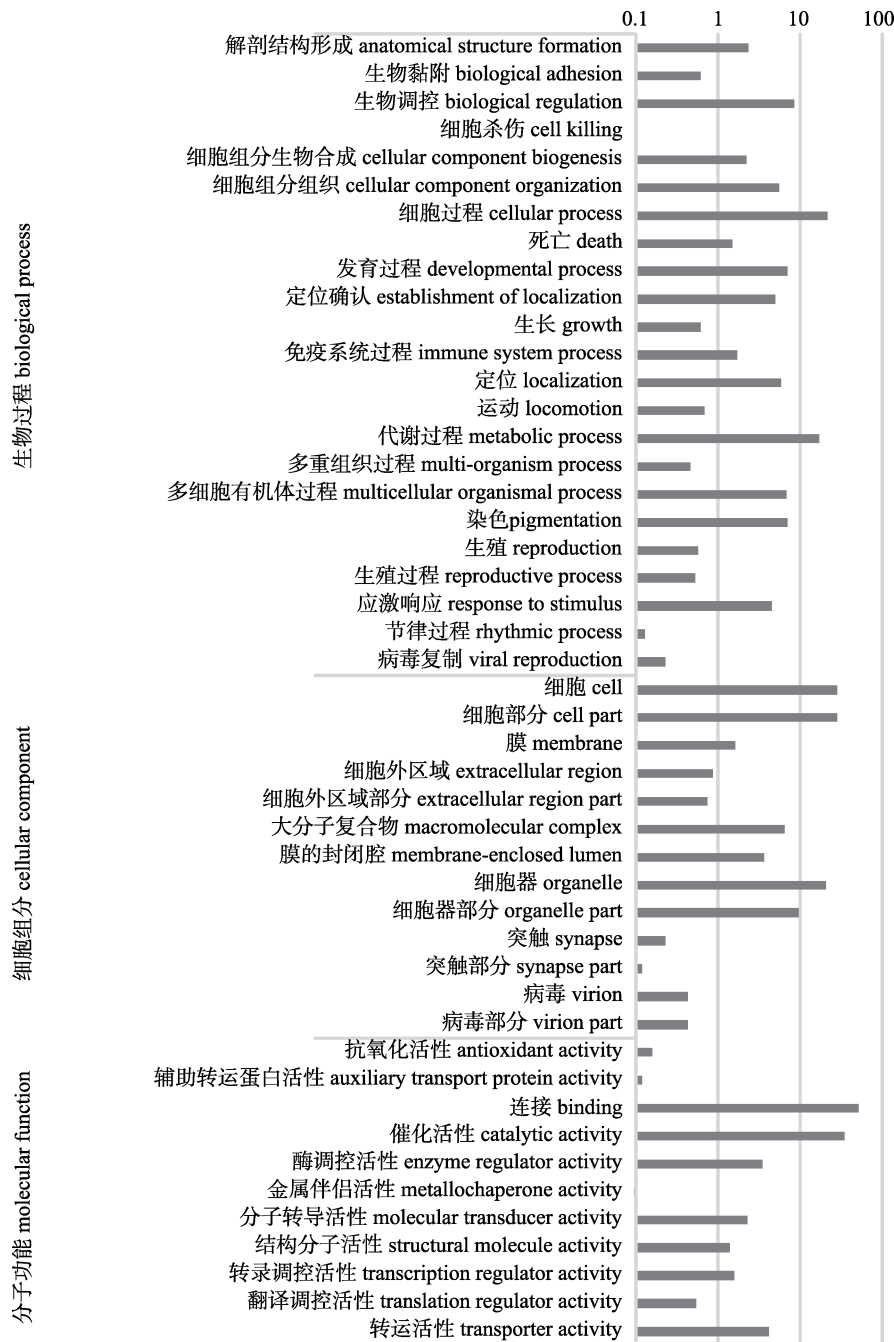


图 2 翘嘴鲶极大个体和极小个体转录组测序差异表达基因 GO 数据库比对结果
横轴表示 GO 注释的基因数目以 10 为底数的对数。

Fig. 2 The GO analysis of different expression genes between overweight and underweight *Siniperca chuatsi*
The lateral axis indicates the number of genes annotated by GO after log transformation.

通过翘嘴鲻转录组数据分析得到了大量的差异表达基因, 其中大部分基因在极小个体组表达量更高, 如 GHR2 (growth hormone receptor 2)、IGFR1 (type 1 insulin-like growth factor receptor)等(表 3)。通过 KEGG 分析, 以 $P<0.05$ 判定为有显著意义, 共获得 25 个通路。富集差异表达基因最多的通路是内质网蛋白加工(protein processing in endoplasmic reticulum)、泛素调节的蛋白质降解(ubiquitin mediated proteolysis)以及 RNA 转运(RNA transport), 分别是 119 条(3.77%)、101 条(3.2%)和 91 条(2.88%)差异表达基因(表 4)。

表 3 翘嘴鲻极大个体和极小个体差异表达基因
Tab. 3 The different expression genes between underweight and overweight *Siniperca chuatsi*

基因编号 gene ID	定义 annotation	小个体中 RPKM 值 underweight RPKM	大个体中 RPKM 值 overweight RPKM	log ₂ 比值 log ₂ ratio	P	FDR
Unigene0032360	生长激素受体-1 前体 growth hormone receptor isoform 1 precursor	5.014	0.001	-12.292	5.24E-51	3.03E-49
Unigene0032361	生长激素受体-1 growth hormone receptor 1	189.052	37.474	-2.335	3.22E-05	3.10E-05
Unigene0026866	胰岛素样生长因子受体-1 type 1 insulin-like growth factor receptor	1.517	0.001	-10.567	6.09E-07	5.42E-06
Unigene0033081	心肌样肌钙蛋白 troponin T, cardiac muscle-like	4.009	0.001	-11.969	1.15E-19	2.87E-18
Unigene0068992	心肌样肌球蛋白轻链-1 myosin light chain 1, cardiac muscle-like	3.163	0.253	-3.646	3.44E-06	2.74E-05
Unigene0032402	原肌球蛋白 α 链 tropomyosin alpha-1 chain	1.783	0.237	-2.909	2.22E-07	2.10E-06
Unigene0021259	快肌样肌球蛋白重链-1 myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like	4.05	0.578	-2.808	5.39E-09	6.18E-08
Unigene0002916	肌动蛋白 actin	5.893	0.741	-2.992	5.70E-12	8.74E-11
Unigene0068993	肌球蛋白轻链-4 亚型 X1 myosin light chain 4-like isoform X1	6.423	0.058	-6.789	6.95E-32	2.66E-30
Unigene0072056	热休克蛋白 90 β heat shock protein hsp90 beta	8.095	1.88	-2.106	6.28E-95	1.35E-05
Unigene0022967	真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	45.133	5.536	-3.027	3.95E-216	7.09E-07
Unigene0056264	丝/苏氨酸激酶 D3 激酶 X2 serine/threonine-protein kinase D3 isoform X2	0.001	0.736	9.523	2.18E-05	5.91E-214
Unigene0026704	肠道样脂肪酸结合蛋白 fatty acid-binding protein, intestinal-like protein	0.001	0.985	9.944	2.90E-06	0.0005445
Unigene0027806	免疫球蛋白超家族成员 22 immunoglobulin superfamily member 22	0.176	1.609	3.193	1.97E-07	3.76E-21
Unigene0075065	肌源性调节因子 myogenic regulatory factor MyoD1	3.248	6.625	1.029	8.51E-08	0.000379

2.4 Real-time PCR 验证结果

RT-PCR 扩增产物结果显示, 熔解曲线单一; 实验有限循环值在 15~30 之间, 且内参基因 18S 的 C_t 比其他待测基因 C_t 值小, β -actin 在不同个体间表达量稳定。通过 RT-PCR, 基因表达差异趋势与转录组结果相同(图 3)。

3 讨论

鱼类的生长伴随于鱼类整个生活周期, 与基

因、环境等多方面因素有关, 在体内受到生长与生殖调控轴相互作用的影响^[10]。过去的研究中发现, 许多鱼类中都存在不同家系个体具有显著生长差异的特性, 甚至来自同一家系的个体也会出现明显生长差异的现象, 具有显著生长差异的个体成为研究生长差异调控机制的重要对象^[11-13]。Kocmarek 等^[13]对同一品系虹鳟在不同产卵期的大个体和小个体肌肉和肝脏分别进行 mRNA 微阵列分析, 评估不同季节(晚秋 vs 春初)和体型(大

表 4 翘嘴鲌极大个体和极小个体差异表达基因通路分析

Tab. 4 The pathway analysis of different expression genes between underweight and overweight *Siniperca chuatsi*

通路编号 pathway ID	通路 pathway	差异表达定义基因数量 DEGs with pathway annotation	所有定义基因数量 all genes with pathway annotation	P
ko03050	蛋白酶体 proteasome	42 (1.33%)	73 (0.37%)	5.69E-16
ko03008	真核生物核糖体生物合成 ribosome biogenesis in eukaryotes	62 (1.96%)	168 (0.85%)	3.04E-11
ko04141	内质网蛋白质加工 protein processing in endoplasmic reticulum	119 (3.77%)	435 (2.2%)	7.21E-10
ko04120	泛素介导蛋白质水解 ubiquitin mediated proteolysis	101 (3.2%)	357 (1.8%)	2.01E-09
ko03013	RNA 转运 RNA transport	91 (2.88%)	383 (1.94%)	4.08E-05
ko04974	蛋白质消化和吸收 protein digestion and absorption	44 (1.39%)	177 (0.89%)	0.001422099
ko00230	嘌呤代谢 purine metabolism	71 (2.25%)	341 (1.72%)	0.009785118
ko05414	扩张型心肌病 dilated cardiomyopathy	80 (2.53%)	398 (2.01%)	0.01530128
ko03040	剪接体 spliceosome	71 (2.25%)	353 (1.78%)	0.02097551
ko05410	肥厚型心肌病 hypertrophic cardiomyopathy	77 (2.44%)	393 (1.99%)	0.02970835

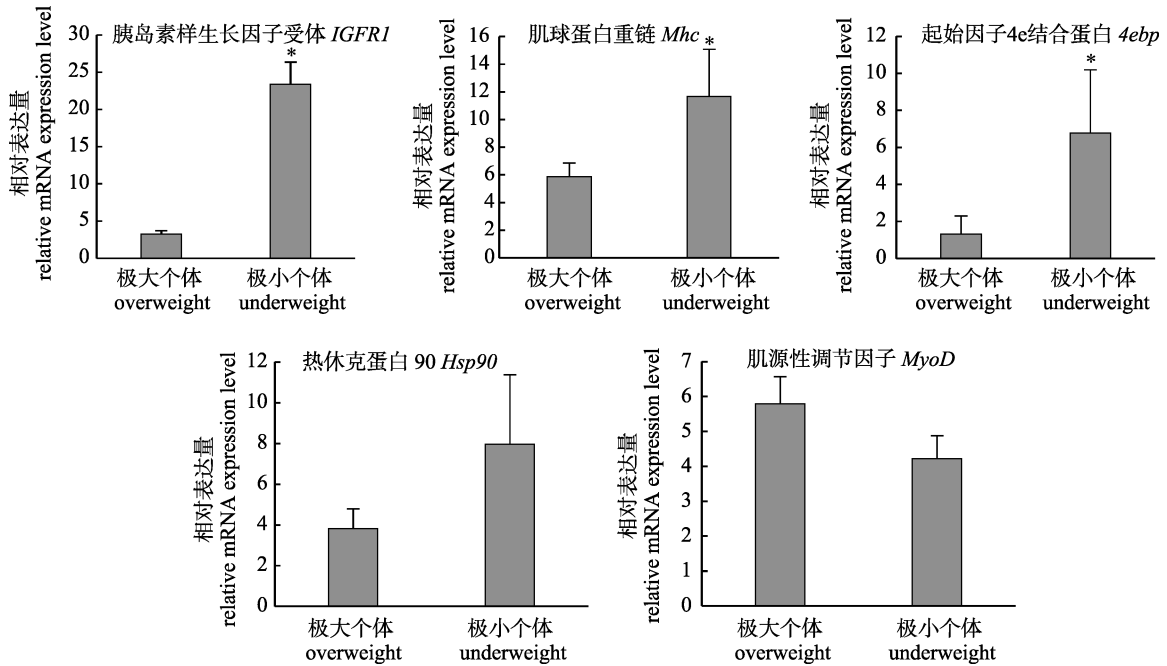


图 3 翘嘴鲌极大个体和极小个体差异表达基因荧光定量 PCR 验证

y 轴表示相对表达量, 误差线表示标准差, *表示显著差异($P<0.05$).

Fig. 3 The RT-PCR analysis of gene expression in overweight and underweight *Siniperca chuatsi*

The y-axis indicates relative expression level. Error bars mean standard deviation.

* indicate the differences between the two groups are significant ($P<0.05$).

vs 小)间转录组水平差异。王博等^[14]通过对生长存在显著差异的翘嘴鲌个体进行肌肉 microRNA 转录组测序,发现 miR-122、miR-192、miR-451、let-7j-5p 共 4 个表达显著差异的 miRNA,差异表达 miRNAs 参与生长、发育、代谢等重要途径。与其他鱼类类似,本研究发现,来自同一家系的

翘嘴鲌在相同养殖条件下生长至 3 月龄,出现明显的生长差异现象。通过挑选出极大个体和极小个体各 5 尾,极大个体组体重可达极小个体组 4 倍以上,体长、提高均可达其 2 倍,具有明显的体形差异。

在活鱼体内,鱼体体重的 30%~80%为骨骼肌

重量,是鱼类经济价值的主要体现。鱼类出生后肌肉的生长主要通过纤维细胞的增殖(hyperplasia)和肥大(hypertrophy)达到肌纤维数量、直径和长度的增加,最终达到生长的目的,而这一过程受到一系列基因在转录水平上的综合调控^[15]。生长因子、调控蛋白、转录因子都被证实参与了鱼类肌肉形成的调控过程^[16]。本研究通过对极大个体和极小个体肌肉组织进行转录组测序,共获得 8942 个差异表达基因,其中大部分差异表达基因在极小个体中表达量增加。极小个体组包含更多的表达量上调的基因说明极小个体组具有更高的基因表达活性。相似的结果在其他研究中也观察到。Kocmarek 等^[13]对不同大小的虹鳉微阵列分析结果显示,无论在春季或秋季,小鱼组肝脏和肌肉中包含更多的表达上调的基因,表达量上调基因涉及蛋白转录、翻译以及细胞凋亡,造成了小鱼肌肉中较高的细胞周转率,从而导致体型差异。在具有不同生长率的珍珠贝中,通过分别对大小个体进行转录组分析发现,小个体组具有更多表达量上调的基因,包括与贝壳形成、能量代谢、肌肉生成等有关的基因,具有小个体追赶生长的趋势^[17]。

本实验中发现大量在极大个体和极小个体间表达量差异显著的基因,GH-IGF 通路受体基因 *GHR2*、*IGFR1*,GH-IGF 通路下游基因 4ebp (initiation factor 4E-binding protein 1)、转录延长因子,肌肉纤维组成基因 *Mhc* (myosin heavy chain)、*Mlc* (myosin light chain 1)、Troponin 等在极小个体的翘嘴鲌中表达量升高,但 MyoD1 在极大个体和极小个体间表达水平并无显著差异。通过对差异表达基因进行 KEGG 富集通路分析结果显示,大量的基因富集在与蛋白生成、消化有关的通路,与差异表达基因分析趋势一致。GH-IGF 是硬骨鱼中重要的生长调控通路,GH 促进肝脏分泌 IGFs,与 IGFR 结合,通过 PI3K/AKT 和 ERK/MAPK 两条通路调控生长,前者促进蛋白生成,后者促进细胞增生及增殖^[18]。PI3K 通路磷酸化,调节下游分子 4ebp,进而参与调节转录延长因子、转录起始因子以调控生长。通过在牙鲈饥饿再投喂实验中发现,硬骨鱼 PI3K 通路和 ERK/MAPK 通路在肌

肉生长中具有重要作用^[19]。然而 *GHR*、*IGFR* 表达量升高与生长率并非正相关,4 月龄的虹鳉用 GH 处理后出现生长抑制,而其 *GHR1* 和 *GHR2* 表达量则升高;虹鳉、翘嘴鲌等鱼类在经过饥饿后,*GHR2*、*IGFR1* 表达量升高。与本研究结果一致,在受到饥饿或生长抑制时,虽然生长率与 *GHR2*、*IGFR1* 基因的表达成反比趋势,可能参与了不利条件下肌肉能量储存代谢通路的激活^[20],同时有观点认为 *GHR2* 可能促进了 tGHR (truncated GH receptor)的生成,而 tGHR 诱导了某些分解反应,从而限制了 GH 信号通路^[21],小个体翘嘴鲌中,*GHR2* 表达量升高符合 GH 信号通路被抑制的趋势。*Mhc* 和 *Mlc* 是两种重要的组成肌肉纤维的蛋白链,肌钙蛋白(Troponin)是间质细胞决定分化为肌细胞后,所表达的肌肉特异性蛋白,参与调节肌肉收缩和舒张,Troponin 表达量增加利于增强肌肉收缩,进而通过促进肌纤维的合成^[22]。在本研究中,Troponin 在小个体中具有更高的表达量。与凡纳滨对虾研究结果一致,李喜莲通过对不同个体凡纳滨对虾肌肉中表达基因进行抑制性消减杂交发现,Troponin 在小个体中的表达量明显高于大个体^[23]。

肌肉中大量组成成分是蛋白质,鱼类的生长与蛋白合成及消化紧密相关。KEGG 聚类结果显示,富集差异表达基因最多的通路是内质网蛋白加工(protein processing in endoplasmic reticulum)、泛素调节的蛋白质降解(ubiquitin mediated proteolysis)以及 RNA 转运(RNA transport),分别是 119 条(3.77%)、101 条(3.2%)和 91 条(2.88%)差异表达基因(表 4)。RNA 转运是细胞基因表达的基础,而内质网蛋白质加工则帮助蛋白质的正确折叠,并对错误折叠的蛋白质进行降解,是蛋白生成的基础。与差异表达基因趋势一致,在小个体翘嘴鲌中大部分基因表达量更高,具有更活跃的表达模式。泛素调节的蛋白质降解通路是蛋白质降解的重要途径,通过与酶结合后产生级联反应达到蛋白质降解的目的^[24]。本研究中小个体翘嘴鲌蛋白质降解通路表达量增加,蛋白质积累减少,具有更低的生长率。其他鱼类研究显示,智利羽鳉(Cenyzterus chilensrs)在应激条件下,泛素调节的

蛋白质降解具有更高的基因表达,也证实了在应激条件下,鱼类的低生长率与蛋白质合成代谢有关^[25]。

4 结论

综上所述,来自同一家系翘嘴鲌个体在相同养殖条件下仍然产生明显的体型差异,通过对极大个体、极小个体肌肉组织进行转录组测序,比较基因表达差异发现, *GHR2*、*IGFRI*、*4ebp*、*Mhc*、*Mlc*、*Troponin* 等多个基因在极小个体中表达量增加,而大量差异表达基因富集在蛋白生成和消化相关通路,可能参与了翘嘴鲌生长调控。本实验通过转录组测序获得了大量翘嘴鲌转录本信息,研究结果为翘嘴鲌更深入的基因调控网络研究提供丰富的基因资源。

参考文献:

- [1] Li M F. Research progress on biology of mandarin fish[J]. Modern Fisheries Information, 2010, 25(7): 16-21. [李明锋. 鳊鱼生物学研究进展[J]. 现代渔业信息, 2010, 25(7): 16-21.]
- [2] Wang P F, Zeng S, Xu P, et al. Two HSP90 genes in mandarin fish *Siniperca chuatsi*: Identification, characterization and their specific expression profiles during embryogenesis and under stresses [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(4): 1123-1136.
- [3] Lu X, Gu Y M, Hou X C, et al. Molecular characterization, tissue distribution, and expression regulation from fasting and re-feeding of two growth hormone receptors in mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Fisheries Science, 2016, 82(1): 155-169.
- [4] Wang H F, Sun J J, Lu X, et al. Identification of insulin-like growth factor I gene polymorphisms using high-resolution melting and its effect on growth traits in sinipercid species[J]. Fisheries Science, 2013, 79(3): 439-446.
- [5] Zhu X, Li Y L, Chen D X, et al. Selection of reference genes for MicroRNA quantitative expression analysis in Chinese perch, *Siniperca chuatsi*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12): 8310-8323.
- [6] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1): 57-63.
- [7] Wang R J, Sun L Y, Bao L S, et al. Bulk segregant RNA-seq reveals expression and positional candidate genes and allele-specific expression for disease resistance against enteric septicemia of catfish[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 929.
- [8] Sun F Y, Liu S K, Gao X Y, et al. Male-biased genes in catfish as revealed by RNA-Seq analysis of the testis transcriptome[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68452.
- [9] Jeukens J, Renaut S, St-Cyr J, et al. The transcriptomics of sympatric dwarf and normal lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* spp., Salmonidae) divergence as revealed by next-generation sequencing[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(24): 5389-5403.
- [10] Dutta H. Growth in fishes[J]. Gerontology, 1994, 40(2-4): 97-112.
- [11] Liu P P, Chen X H, Zhong L Q, et al. Comparison of growth performance of different families of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2013, 36(1): 90-93. [刘朋朋, 陈校辉, 钟立强, 等. 黄颡鱼不同家系生长性能的比较[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2013, 36(1): 90-93.]
- [12] Wang X A, Ma A J, Lei J L, et al. Comparison of the growing performance of different families of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Marine Sciences, 2011, 35(4): 1-8. [王新安, 马爱军, 雷霖霖, 等. 大菱鲆不同家系生长性能的比较[J]. 海洋科学, 2011, 35(4): 1-8.]
- [13] Kocmarek A L, Ferguson M M, Danzmann R G. Differential gene expression in small and large rainbow trout derived from two seasonal spawning groups[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 57.
- [14] Wang B, Tian Y Y, Sun C F, et al. Analysis of microRNA transcriptome and identification of growth related miRNA of *Siniperca chuatsi*[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(2): 603-613. [王博, 田园园, 孙成飞, 等. 翘嘴鲌 microRNA 转录组分析及生长相关 miRNA 鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(2): 603-613.]
- [15] Fuentes E N, Valdés J A, Molina A, et al. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone – Insulin-like growth factor system[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 192: 136-148.
- [16] Patterson S E, Mook L B, Devoto S H. Growth in the larval zebrafish pectoral fin and trunk musculature[J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(2): 307-315.
- [17] Shi Y, He M X. Differential gene expression identified by RNA-Seq and qPCR in two sizes of pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. Gene, 2014, 538(2): 313-322.
- [18] Dai X Y, Zhang W, Zhuo Z J, et al. Neuroendocrine regulation of somatic growth in fishes[J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(2): 137-147.
- [19] Fuentes E N, Zuloaga R, Valdes J A, et al. Skeletal muscle plasticity induced by seasonal acclimatization involves IGF1 signaling: implications in ribosomal biogenesis and protein synthesis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2014, 176: 48-57.
- [20] Pierce A L, Fox B K, Davis L K, et al. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 154(1-3): 31-40.
- [21] Edens A, Talamantes F. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts[J]. Endocrine Reviews, 1998, 19(5): 559-582.
- [22] Sun Y. Transcriptomic studies on the growth superiorities in a grouper hybrid (*Epinephelus fuscogutatus* ♀) × (*Epinephelus lanceolatus* ♂)[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2016. [孙颖. 棕点石斑鱼(♀) × 鞍带石斑鱼(♂)杂

- 杂交 F1 代生长优势的转录组学研究[D]. 广州: 中山大学, 2016.]
- [23] Li X L. Screening, cloning, identifying and function analyzing of genes involved in body weight regular in abdominal muscles of white shrimp[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2011. [李喜莲. 凡纳滨对虾肌肉组织中体重调控相关基因的筛选、克隆鉴定及功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.]
- [24] Rechsteiner M C. Ubiquitin-mediated proteolysis: An ideal pathway for systems biology analysis[C]// Proceedings of the Conference on the Advances in Systems Biology. Boston: Springer, 2004: 49-59.
- [25] Aedo J E, Maldonado J, Aballai V, et al. mRNA-seq reveals skeletal muscle atrophy in response to handling stress in a marine teleost, the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*)[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1024.

Muscle transcriptome of *Siniperca chuatsi* with different weights from a full-sib family

ZENG Shuang, LIU Xuange, WANG Pengfei, XU Peng, ZENG Lei, ZHOU Lei, TANG Qindong, CHEN Zhi, LI Guifeng

College of Life Science, Sun Yat-sen University; Institute of Aquatic Economic Animals, Key Laboratory for Aquatic Economic Animals for Breeding and Reproduction, Guangdong Province; State Key Laboratory of Biocontrol, Guangzhou 510006, China

Abstract: *Siniperca chuatsi* is an important species in the Chinese economic aquaculture industry. Therefore, it is imperative for us to study the growth regulatory mechanisms of *S. chuatsi*, to help improve the growth trait and cultivate new varieties with higher growth rates. To learn more about the molecular mechanisms behind the growth of *S. chuatsi*, the muscle transcriptomes of fish with different weights were sequenced. Despite being cultivated under the same conditions, the *S. chuatsi* from full-sib families showed differences in the growth traits. After three months, 5 overweight and 5 underweight individuals were selected. The weight of the overweight group was 4 times heavier than the that of the underweight group. Muscle transcriptome sequencing was conducted to determine the differences in the gene expression patterns between the overweight and underweight groups. In all, 73353 unigenes were obtained with an average size of 703 bp. Then, 39005 unigenes were annotated by searching against NR, COG, Swissprot, and KEGG. After RPKM comparison, 8942 differentially expressed genes (DEGs) were confirmed, which were mainly found in the underweight group. *GHR2*, *IGFR1*, *4ebp*, *Mhc*, *Mlc*, and Troponin have a higher gene expression in the underweight group. According to the KEGG pathway, many different expression genes are enriched in pathways concerning protein processing in the endoplasmic reticulum, ubiquitin-mediated proteolysis, and RNA transport. The expression trends of genes relating to protein synthesis and muscle fiber synthesis appear to be consistent. In general, the study showed that *S. chuatsi* with different growing characteristics have different transcriptome expression patterns. The underweight fish are smaller in size and present higher gene expression activities. This data provides rich genetic resources for studies on the growth regulation of *S. chuatsi*.

Key words: *Siniperca chuatsi*; transcriptome; weight difference; different expression genes

Corresponding author: LI Guifeng. E-mail: liguif@mail.sysu.edu.cn