

## 牙鲆变态中甲状腺激素调控的靶基因

陶家康<sup>1</sup>, 付元帅<sup>1, 2, 3</sup>, 施志仪<sup>1, 2, 3</sup>

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 教育部水产遗传资源开发利用重点实验室, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 上海水生动物遗传育种协同创新中心, 上海 201306

**摘要:** 本研究旨在采用新的方法找出甲状腺激素受体(TRs)介导的甲状腺激素(TH)调控的靶基因。以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为实验样本, 表达并纯化了牙鲆 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  融合蛋白, 采用一种目的基因循环扩增与筛选的方法, 寻找 TH 直接调控的靶基因, 最终筛选得到 TR $\alpha$ A 的候选靶基因 11 个, TR $\beta$  的候选靶基因 12 个, 其中 TR $\alpha$ A 和 TR $\beta$  存在 4 个相同候选靶基因:*frizzled-3-like*、TBC1 结构域激酶(*tbck*)、氨酰 tRNA 合成酶复合多功能相互作用蛋白 1(*aimp1*)和 MYC 相关因子 X(*max*)。利用荧光定量 PCR 技术检验了这 4 个基因在牙鲆不同组织、不同变态发育期以及外源性甲状腺激素和硫脲处理后各个变态发育时期的表达情况, 发现在 TH 含量升高时, 靶基因表达量降低; TH 含量降低时, 靶基因的表达量上升, 从而验证靶基因受到 TH 的负向调控, 证实 TH 在促进牙鲆变态中也存在抑制靶基因转录的情况。本研究旨为研究 TH 调控牙鲆变态的发育网络提供基础资料。

**关键词:** 牙鲆; 甲状腺激素; 甲状腺激素受体; DNA-蛋白质互作; 靶基因

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)09-1010-11

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属于鲽形目(Pleuronectiformes), 鲽科(Bothidae), 牙鲆属, 为中国重要的海水养殖经济鱼类之一<sup>[1]</sup>。牙鲆在仔鱼阶段, 体态对称, 眼睛对称分布在身体左右两侧, 营浮游生活; 在稚鱼阶段, 体态出现不对称, 右眼移到身体左侧, 营底栖生活。在此期间, 组织、器官乃至生理各方面也都发生剧烈的变化<sup>[2]</sup>。牙鲆仔鱼与稚鱼这种形态和生活习性上的显著差异使它成为研究鱼类变态发育的模式生物<sup>[3-4]</sup>。

大量研究表明, 甲状腺激素(thyroid hormone, TH)在哺乳类和两栖类动物的早期变态发育过程中起着至关重要的作用<sup>[5-6]</sup>, 而在牙鲆的变态发育中这种调控更为明显<sup>[7-8]</sup>。TH 的作用主要是通过甲状腺激素受体(thyroid hormone receptors, TRs)介导进行, TRs 有 TR $\alpha$  和 TR $\beta$  两种亚型<sup>[9]</sup>。

已有研究表明, 在牙鲆变态中, TRs 介导 TH 调控有两条途径: 一是直接调控靶基因的转录, TRs 会结合到靶基因的 TRE 序列 AGGT(C/A)A 上<sup>[10-11]</sup>, TH 与 TRs 结合后导致 TRs 结构发生改变, 释放共抑制子, 招募共激活子, 从而开启转录<sup>[12-14]</sup>; 二是通过 microRNA 间接调控靶基因的转录, 成熟的 microRNA 能够结合在靶基因 3'UTR 的特定碱基上, 从而抑制转录<sup>[15-17]</sup>。进一步研究发现, 外源性 TH 能显著促进牙鲆仔鱼的变态, 增加牙鲆变态过程中仔鱼的成活率; 而外源性硫脲(thiourea, TU)则显著抑制仔鱼的变态, 未能完成变态的仔鱼会死亡<sup>[18]</sup>。

为了确定 TH 直接调控的靶基因, 本研究采用 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  重组质粒瞬时转染 293T 细胞, 含有目的蛋白的细胞裂解液通

收稿日期: 2019-12-14; 修订日期: 2020-02-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41676138, 41506159).

作者简介: 陶家康(1994-), 男, 硕士研究生, 从事水生动物细胞分子生物技术研究. E-mail: jk.tao@live.cn

通信作者: 施志仪, 教授, E-mail: zyshi@shou.edu.cn; 付元帅, 副教授, E-mail: ysfs@shou.edu.cn

过 Anti-DYKDDDDK G1 亲和树脂亲和纯化, 成功得到 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  重组融合蛋白; 构建双链随机识别文库, 再通过目的基因循环扩增与筛选(cyclic amplification and selection of target, CAST)的方法<sup>[19-20]</sup>, 利用 DNA-蛋白质结合体系, 使双链随机识别文库与融合蛋白互相作用, 反复 6 轮筛选出能够与目的蛋白结合的特异性序列, TA 克隆后将得到的特异性识别序列通过生物信息学方法比对牙鲆基因组, 筛选出启动子区域能匹配识别序列且含有 TRE 序列 AGGT(C/A)A 的基因, 从而确定这些基因受 TH 直接调控。这是一种近年来新发展的寻找调控靶基因的方法, 本实验旨在为完善 TH 调控牙鲆变态的发育网络提供基础性资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 实验材料** 实验用牙鲆仔鱼采自中国水产科学研究院北戴河中心实验站。仔鱼饲养条件为: 水温(17±2) °C, 海水盐度 30。将 13 dph (孵化后第 13 天) 仔鱼分为 3 组进行动物实验: (1)正常对照组(NC 组, 正常海水组); (2)甲状腺激素处理组(TH 组), 在海水中添加 0.1 mg/L 的 T<sub>4</sub> (L-Thyroxine); (3)硫脲处理组(TU 组), 在海水中添加 30 mg/L 的硫脲, TH 组与 TU 组定期换水保证水体药物浓度恒定, 其他喂养条件不变<sup>[21]</sup>。参照 Minami<sup>[22]</sup>的方法将牙鲆早期发育阶段分为 6 个时期: 17 dph (变态启动期), 20 dph (变态早期), 24 dph (变态早晚期), 28 dph (变态高峰期), 32 dph (变态晚期) 和 36 dph (稚鱼期)。依照上述分期对 NC 组、TH 组和 TU 组分别进行采样, 每个时期均采集 3 组平行样品作为生物学重复, 样品用 DEPC 清洗后放入含有 TRIzol 的管中, 于-80 °C 冰箱保存备用。

实验用牙鲆成鱼样品购自上海铜川路水产市场, 实验室喂养 1 周后断头处死, 分别采集脑、肌肉、心脏、鳃、肾脏、胃、肠和肝脏共 8 个组织<sup>[23]</sup>, 每个组织均采集 3 组平行样品作为生物学重复, 样品用 DEPC 冲洗后放入含有 TRIzol 的管中, 于-80 °C 冰箱保存备用。

**1.1.2 实验试剂** DMEM、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、0.25%胰酶-EDTA 购自 Gibco 公司; 反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司; 蛋白酶抑制剂、细胞裂解液、ECL 发光试剂盒购自上海威傲生物技术有限公司; Ex Taq<sup>TM</sup>、2×TB Green Premix Ex Taq II、pMD19-T Vector Cloning Kit 购自 TAKARA 公司; Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin、DYKDDDDK Peptide 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司; 细胞转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Transfection Reagent 购自 Thermo 公司; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 蛋白质上样缓冲液、蛋白质分子量标准、核酸染料、DNA 分子量标准购自上海生工生物工程有限公司; Hepes 预制胶、电泳缓冲液、封闭液、一抗稀释液购自碧云天生物科技有限公司; 外源性甲状腺激素、硫脲购自国药集团化学试剂有限公司; 实验过程中的引物合成与菌样测序均由上海迈浦生物科技有限公司完成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 总 RNA 提取及反转录** 按照 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 说明书中步骤提取各样品的总 RNA。用 NANODROP 2000C 测定 RNA 样品的浓度和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 均在 1.8~2.0。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性, 以总 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒合成 cDNA, cDNA 于-80 °C 冰箱保存备用。

**1.2.2 重组质粒表达、纯化及验证** 取实验室构建的 p3×Flag-TR $\alpha$ A、p3×Flag-TR $\beta$  重组质粒, 为验证其在 293T 细胞中的表达, 按照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Transfection Reagent 说明书中步骤将 p3×Flag-TR $\alpha$ A、p3×Flag-TR $\beta$  重组质粒转染 293T 细胞, 24 h 后提取细胞总蛋白, 取含有细胞总蛋白的裂解液, 按照 Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin 说明书中方法对其进行纯化, 分别收集裂解液过柱液、清洗液以及最后的洗脱液, 使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒, 在酶标仪波长 562 nm 处测定上述洗脱液的吸光度值, 按照“蛋白质浓度=(测定 OD 值-空白 OD 值)/(标准 OD 值-

空白 OD 值)×标准品浓度(563  $\mu\text{g/mL}$ )×样本测试前稀释倍数”计算蛋白浓度。利用小鼠抗 Flag 标签单抗以及 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 对上述所得细胞裂解液、裂解液过柱液、清洗液和洗脱液进行 Western Blot 验证, 按照 ECL 发光试剂盒说明书中步骤配制发光液, 使用化学发光成像分析仪检测目的蛋白对应的特异性条带。

**1.2.3 文库构建** 合成两条单链随机序列 oligo A、oligo B(表1)<sup>[24]</sup>，使用碧云天退火缓冲体系合

成双链随机识别文库，反应体系如下：Annealing Buffer for DNA Oligos(5×) 20 μL、DNA oligo A (50 μmol/L) 20 μL、DNA oligo B (50 μmol/L) 20 μL、Nuclease-Free Water 40 μL。混匀后放入 PCR 仪中进行退火反应，循环参数设置：94 °C 预变性 2 min；从 94 °C 开始，每 8 s 下降 0.1 °C，降至 25 °C，变性 90 min。结束后得到双链随机识别文库。使用小片段特异性核酸染料，3% 浓度的琼脂糖凝胶电泳验证产物。

表 1 本实验中所用序列信息  
Tab. 1 Sequence used in the experiment

序列号 sequence	DNA 序列(5'-3') DNA sequence (5'-3')
oligo A	AAAGCTGAGTATGCCGAGCTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTACGCACCTGGTTGAATGT
oligo B	ACATTCAACCAGGTGCGTAACNNNNNNNNNNNNNNNNNCAGCTGGCATACTCAGCTT

**1.2.4 目的基因循环扩增与筛选(CAST)** 使用碧云天 EMSA 蛋白质-探针结合体系分别将上述 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  融合蛋白与双链随机识别文库进行体外结合, 反应体系如下: Nuclease-Free water 5  $\mu$ L, EMSA 结合缓冲液 2  $\mu$ L, p3×Flag-TR $\alpha$ A/p3×Flag-TR $\beta$  融合蛋白 2  $\mu$ L, 文库 1  $\mu$ L, 共计 10  $\mu$ L, 混匀后室温静置 20 min。重悬 Anti-DYKDDDDK G1 亲和树脂, 取 20  $\mu$ L 混合液至干净的离心管中, 4  $^{\circ}$ C、6000 r/min 离心 30 s, 室温静置 2 min, 弃上清。加入 200  $\mu$ L pH 为 7.4 的 TBS (50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl), 重悬 Anti-DYKDDDDK G1 亲和树脂, 4  $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 再重复此步骤一次。加入蛋白质-DNA 结合反应液, 4  $^{\circ}$ C 孵育 12 h (为增加结合效率, 每 1 h 吹打一次混合液)。4  $^{\circ}$ C、6000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 加入 200  $\mu$ L TBS 清洗沉淀, 轻轻摇匀, 4  $^{\circ}$ C、6000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 再重复此步骤一次。加入 20  $\mu$ L pH 为 3.5 的 0.1 mol/L Gly-HCl, 室温孵育 5 min, 4  $^{\circ}$ C、6000 r/min 离心 30 s, 转移上清液至新管中。95  $^{\circ}$ C 加热上述所得上清液 10 min, 使用 OMEGA 胶回收试剂盒的过滤柱, 13000 r/min 离心 2 min 得到识别序列, 使用 TaKaRa 的 EX Taq 体系进行扩增。循环参数设为 94  $^{\circ}$ C, 预变性 2 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 15 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸

10 min。扩增产物用于下一轮筛选，共进行 6 轮筛选<sup>[24]</sup>，取每一轮扩增产物用 3% 浓度的琼脂糖凝胶电泳验证。

**1.2.5 TA 克隆、测序与筛选** 使用 OMEGA 胶回收试剂盒对上述最后一轮 PCR 产物胶回收纯化，将纯化产物连接到 PMD-19T 克隆载体，16 ℃连接 12 h 后转化到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌中，通过蓝白斑筛选挑取单菌落进行菌落 PCR 验证，确认阳性结果后送至上海迈浦生物科技有限公司测序。将测序结果利用生物信息学方法比对牙鲆基因组启动子区域(牙鲆基因组由中国水产科学研究院北戴河中心实验站提供)，筛选出启动子区域能匹配文库识别序列且含有 TRE 序列——AGGT(C/A)A 的候选靶基因。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR** 对筛选所得的 4 个候选靶基因进行牙鲆不同组织及变态发育期的相对定量分析, 4 个靶基因分别是 *frizzled-3-like*、TBC1 结构域激酶(TBC1 domain containing kinase, *tbck*)、氨酰 tRNA 合成酶复合多功能相互作用蛋白 1(aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1, *aimp1*)和 MYC 相关因子 X (MYC associated factor X, *max*)。使用 Primer Premier 5.0 设计定量引物(表 2), 利用 TaKaRa 公司的 2×TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)定量试剂在 CFX96 Touch<sup>TM</sup> Real-

表2 本实验中所用引物

Tab. 2 Primers used in the experiment

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
frizzled-3-like-F	TCACGATTCCCGCTACCCA
frizzled-3-like-R	CCGTCGAAGCCCTAAACC
tbck-F	AGACAAGGATACTCCCATT
tbck-R	ATAGACAAGGATACTCCCATT
aimp1-F	CGATTGGACCTGCGTATT
aimp1-R	CACTGTTCTGGGTGATGC
max-F	ATCGACGACTTGAAGAGGCA
max-R	TGCTGTCGGATGAGGAGTAG
18S-F	CTTAGTTGGTGGAGCGATTG
18S-R	CTCGGCGAAGGGTAGACCA

注: F 代表上游引物; R 代表下游引物。

Note: F means forward primers; R means reverse primers.

Time PCR Detection System (Bio-Rad, 美国)上进行双标准曲线法(以 18S rRNA 为内参基因)定量。反应体系如下: 2×TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL、cDNA 1 μL、上下游引物各 0.4 μL、ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。qPCR 程序采用两步法: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环, 然后进行熔解曲线扩增。每个样品设

置 3 个生物学重复和 2 个技术重复, 定量数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法分析, 数值采用平均值±标准误 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示( $n=3$ )。通过 SPSS Statistics 23 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)进行不同样品之间的差异分析, 使用 Dunnett's 多重比较进行数据差异性检验, 当  $P < 0.05$  时差异显著。采用 SigmaPlot 14 软件进行作图分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲状腺激素直接调控的靶基因筛选结果

**2.1.1 Western Blot 检测目的蛋白纯化结果** 通过 Expsy 网站预测得到 TR $\alpha$ A、TR $\beta$  和 3×Flag 的分子量分别为 48.2 kD、58.4 kD 和 2.8 kD, 因此 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  融合蛋白大小分别为 50 kD 和 60.2 kD。Western Blot 结果显示(图 1), 在细胞裂解液和洗脱液(泳道 1、4)中捕获了荧光信号, 而在裂解液过柱液和清洗液(泳道 2、3)中无信号。结果表明在 293T 细胞中成功得到了高纯度的 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  融合蛋白。

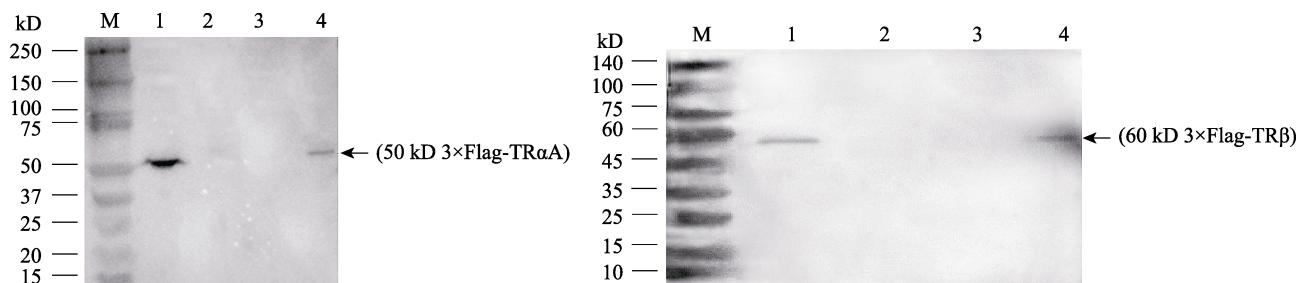


图 1 p3×Flag-TR $\alpha$ A 和 p3×Flag-TR $\beta$  融合蛋白表达验证

M: 蛋白质分子量标准; 1: 3×Flag-TR $\alpha$ A/p3×Flag-TR $\beta$  转染 293T 裂解液; 2: 裂解液过柱液; 3: 清洗液; 4: 洗脱液。

Fig. 1 Verification of 3×Flag-TR $\alpha$ A and p3×Flag-TR $\beta$  fusion protein expression

M: protein marker; 1: supernatant from 293T cells expressing 3×Flag-TR $\alpha$ A/p3×Flag-TR $\beta$ ; 2: effluent; 3: washing buffer; 4: eluent.

**2.1.2 文库构建** 电泳分析显示(图 2), 相同体积与浓度条件下, 双链随机识别文库(泳道 2)亮度相比单链随机识别文库(泳道 3、4)更亮; 由于双链 DNA 和单链 DNA 携带电荷量不同, 单链随机识别文库条带(泳道 3、4)相对滞后, 说明双链随机识别文库构建成功。

**2.1.3 凝胶电泳检测 CAST 所得序列** 电泳分析显示(图 3), 在 6 轮循环中, 首轮扩增产物由于特

异性不够强, 含有较多非特异性结合的识别序列, 导致第一轮条带较亮(泳道 1); 随着筛选的继续进行, 更多的非特异性识别序列被洗脱下来, 产物特异性增强, 但特异性识别序列的数量较少, 导致第三轮和第四轮条带较弱(泳道 3、4); 在最后一轮筛选中, 特异性识别序列的数量增多, 条带再次变亮(泳道 6)。

**2.1.4 TA 克隆测序结果** TR $\alpha$ A 识别文库中有

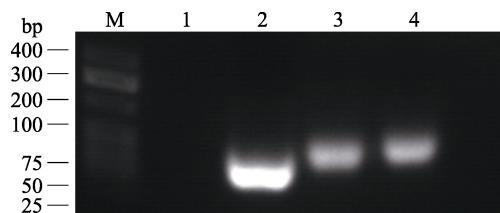


图 2 双链随机识别文库验证

M: DNA 分子量标准; 1: 空白对照; 2: DNA oligo A +DNA oligo B (50  $\mu\text{mol/L}$ ); 3: DNA oligo A (50  $\mu\text{mol/L}$ ); 4: DNA oligo B (50  $\mu\text{mol/L}$ ).

Fig. 2 Oligo recognition library verification  
M: DNA marker; 1: blank; 2: DNA oligo A+DNA oligo B (50  $\mu\text{mol/L}$ ); 3: DNA oligo A (50  $\mu\text{mol/L}$ ); 4: DNA oligo B (50  $\mu\text{mol/L}$ ).

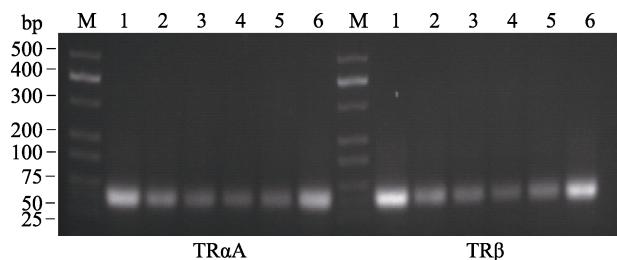


图 3 识别序列验证

M: DNA 分子量标准; 1-6: 6 轮 CAST 扩增产物.

Fig. 3 Recognition sequence verification

M: DNA marker; 1-6: 6 rounds of CAST amplification products.

11 个识别序列(表 3)含有 TRE 序列 AGGT(C/A)A; TR $\beta$  识别文库中有 12 个识别序列(表 4)含有 TRE 序列 AGGT(C/A)A; TR $\alpha$ A 和 TR $\beta$  识别文库中有 4 个部分重合的识别序列。

**2.1.5 基因组比对鉴定候选靶基因** TR $\alpha$ A 识别文库筛选得到 11 个启动子区域含有 TRE 序列 AGGT(C/A)A 的候选靶基因(表 5); TR $\beta$  识别文库筛选得到 12 个启动子区域含有 TRE 序列 AGGT(C/A)A 的候选靶基因(表 6)。其中 TR $\alpha$ A 与 TR $\beta$  识别文库筛选得到 4 个相同候选靶基因: *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max*。通过 KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 网站对基因功能进行了分析: *frizzled-3-like* 编码 mTOR 和 Wnt 信号通路中的转录因子, 负责调节脂类生成与分解、黑色素生成、细胞周期与基因转录; *tbck* 编码含有 TBC 结构域的蛋白质激酶, 参与免疫突触的形成、胞质分裂和细胞自噬; *aimp1* 参与 RNA 剪切与转运、转录与翻译调控、信号传导和免疫应答等多种生命活动; *max* 编码 MAPK 信号通路中的转录因子, 负

表 3 TR $\alpha$ A 识别文库测序结果  
Tab. 3 Sequencing results of the TR $\alpha$ A recognition library

序号 serial number	识别序列(5'-3') recognition sequence (5'-3')
1	TAGGAGG <u>AGGTCA</u> TATAAAA
2	CTGTAAA <u>AGGTCA</u> AAGCACA
3	ACAAGA <u>AGGTCA</u> GTGTCGCG
4	TACTGTAA <u>AGGTAA</u> ATAGTTC
5	CTGGAGGAGGTAA <u>AGGTCA</u> G
6	TACTGTAA <u>AGGTAA</u> ATAGTTC
7	TCAAAGGC <u>AGGTCA</u> ATTATA
8	TAT <u>AGGTAA</u> TTAACAGATAAA
9	CCTG <u>AGGTCA</u> TGTTTACTT
10	TGATGC <u>AGGTAA</u> CATTATTTC
11	TATA <u>AGGTAA</u> ACACTACGTC

注: 下划线部分表示 TRE 序列 AGGT(C/A)A.

Note: The sequence underlined is TRE sequence AGGT(C/A)A.

表 4 TR $\beta$  识别文库测序结果Tab. 4 Sequencing results of the TR $\beta$  recognition library

序号 serial number	识别序列(5'-3') recognition sequence (5'-3')
1	GAATT <u>AGGTAA</u> TAAGTGTG
2	GAGACGG <u>AGGTAA</u> GTAGGCT
3	GCAT <u>AGGTCA</u> ACAGAGATA
4	GCAGTC <u>AGGTAA</u> AGTTGCTG
5	CTATTAG <u>AGGTAA</u> CAAATGA
6	TCCAGGA <u>AGGTCA</u> GGAGATG
7	TGG <u>AGGTCA</u> GACTGAAGTGC
8	TGGAGT <u>AGGTCA</u> CAAACAAAC
9	<u>AAAGGTAA</u> TTAGAAGTTGA
10	GATAGGAGG <u>AGGTCA</u> TATAAA
11	GTAAAA <u>GGTCA</u> AAGCACAGC
12	TGCACAT <u>AGGTAA</u> AGTTTC

注: 下划线部分表示 TRE 序列 AGGT(C/A)A.

Note: The sequence underlined is TRE sequence AGGT(C/A)A.

责调节细胞的增殖分化与凋亡。预测这 4 个基因与牙鲆变态相关, 选取这 4 个候选靶基因完成后续验证实验, 基因信息来自中国水产科学研究院北戴河中心实验站提供的牙鲆基因组。

## 2.2 *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 基因在牙鲆不同组织及变态发育期的表达

### 2.2.1 牙鲆成鱼不同组织中的表达 荧光定量结

**表 5 TR $\alpha$ A 识别序列基因组启动子区匹配结果**  
**Tab. 5 Promoter region matching results of the TR $\alpha$ A recognition sequence**

识别序列(5'-3') recognition sequence (5'-3')	匹配的基因 ID subject ID	匹配位置 subject start-end	基因名称 gene description
TAGGAGG <u>AGGTCA</u> TATAAAA	GS_020482	1677-1658	TBC1 domain containing kinase
CTGTAAA <u>AGGTCA</u> AAGCACA	GS_020481	451-470	aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1
ACAAGA <u>AGGTCA</u> GTCGCG	GS_014374	334-316	mannose binding 2
TACTGTAA <u>AGGTAA</u> ATAGTTC	GS_017458	1770-1788	frizzled-3-like
CTGGAGGAGGTAA <u>AGGTCA</u> G	GS_012557	898-917	RAB GTPase activating protein 1
TACTGTAA <u>AGGTAA</u> ATAGTTC	GS_017452	459-450	MYC associated factor X
TCAAAGGC <u>AGGTCA</u> ATTATA	GS_019173	811-792	apoptosis-enhancing nuclease-like
TAT <u>AGGTAA</u> TTAACAGATAA	GS_005629	1135-1153	F-box and WD repeat domain containing 8
CCT <u>AGGTCA</u> TGTTTACTT	GS_000131	1602-1587	FAST kinase domain-containing protein 3, mitochondrial-like
TGATGC <u>AGGTAA</u> CATTATTTC	GS_004602	1887-1805	tousled like kinase 2
TATA <u>AGGTAA</u> ACACTACGTC	GS_011117	1449-1468	family with sequence similarity 198 member A

注: 下划线部分表示 TRE 序列 AGGT(C/A)A。

Note: The sequence underlined is TRE sequence AGGT(C/A)A.

**表 6 TR $\beta$  识别序列基因组启动子区匹配结果**  
**Tab. 6 Promoter region matching results of the TR $\beta$  recognition sequence**

识别序列(5'-3') recognition sequence (5'-3')	匹配的基因 ID subject ID	匹配位置 subject start-end	基因名称 gene description
GAATT <u>AGGTAA</u> TAAGTGTG	GS_014910	315-294	dual specificity protein phosphatase 7-like
GAGACGG <u>AGGTAA</u> GTAGGCT	GS_007653	675-656	serine/threonine-protein kinase 26-like
GCATG <u>AGGTCA</u> ACAGAGATA	GS_002741	1811-1793	syntaphilin-like
GCAGTC <u>AGGTAA</u> AGTTGCTG	GS_017458	1770-1788	frizzled-3-like
CTATTAG <u>AGGTAA</u> CAAATGA	GS_005943	1788-1703	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 10-like
TCCAGGA <u>AGGTCA</u> GAGATG	GS_012754	838-820	MAP kinase activating death domain
TGG <u>AGGTCA</u> GACTGAAGTGC	GS_017452	469-450	MYC associated factor X
TGGAGT <u>AGGTCA</u> CAAACAAAC	GS_014279	798-780	teratocarcinoma-derived growth factor-like
AA <u>AGGTAA</u> ATTAGAAGTTGA	GS_000697	244-263	phosphodiesterase 4D
GATAGGAGG <u>AGGTCA</u> TATAAA	GS_020482	1677-1658	TBC1 domain containing kinase
GTAAA <u>AGGTCA</u> AAGCACAGC	GS_020481	451-470	aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1
TGCACAT <u>AGGTAA</u> AGTTTC	GS_002837	1639-1629	pleckstrin homology domain-containing family A member 5-like

注: 下划线部分表示 TRE 序列 AGGT(C/A)A。

Note: The sequence underlined is TRE sequence AGGT(C/A)A.

结果显示, 4 个基因在成鱼各组织中的表达水平不同(图 4)。如图 4A 和 4C 所示, *frizzled-3-like* 和 *aimp1* 在成鱼各组织中均有相似的表达趋势, 两者均在脑组织中表达量最高( $P<0.05$ ), 肝脏组织表达量次之, 其他各组织表达无明显差异( $P>0.05$ ); 如图 4B 和 4D 所示, *tbck* 和 *max* 在成鱼各组织中均有相似的表达趋势, 两者均在脑组织中

表达量最高( $P<0.05$ ), 肾脏组织表达量次之, 其他各组织表达无明显差异( $P>0.05$ )。

**2.2.2 牙鲆仔鱼变态发育期的表达** 荧光定量结果显示, *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 在牙鲆仔鱼正常变态发育期具有类似的表达模式(图 5)。四者在 17 dph(变态启动期)表达量最高( $P<0.05$ ), 在 28 dph(变态高峰期)和 32 dph(变态

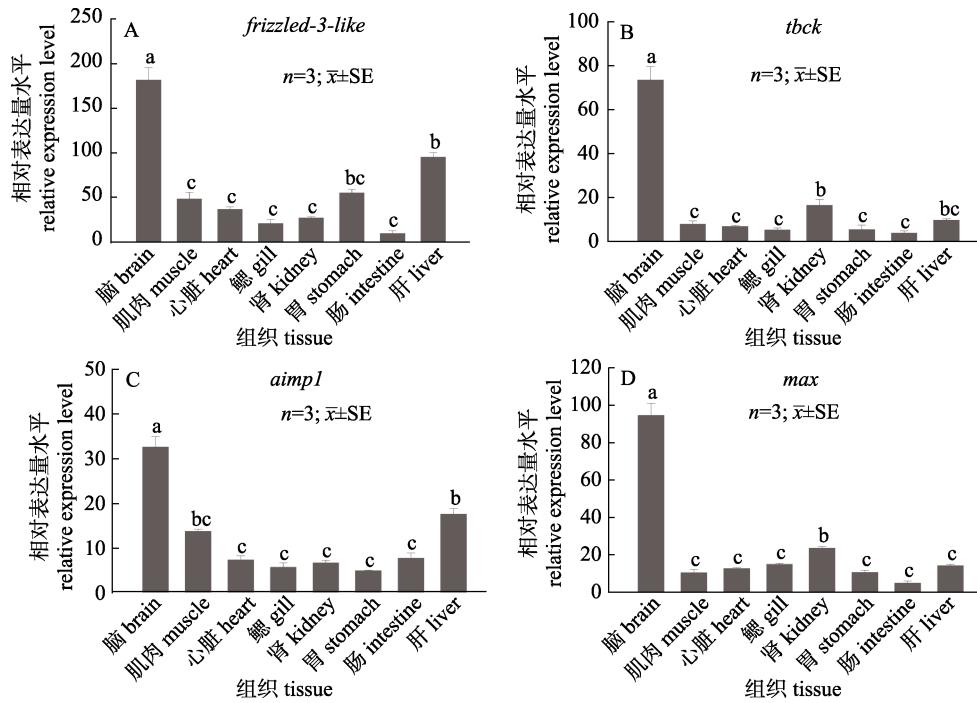


图 4 *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 基因在牙鲆成鱼组织中的表达  
不同字母代表各组织间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 4 The expression levels of *frizzled-3-like*, *tbck*, *aimp1* and *max* genes in adult tissues of *Paralichthys olivaceus*  
Different letters indicate significant difference between different tissues ( $P<0.05$ ).

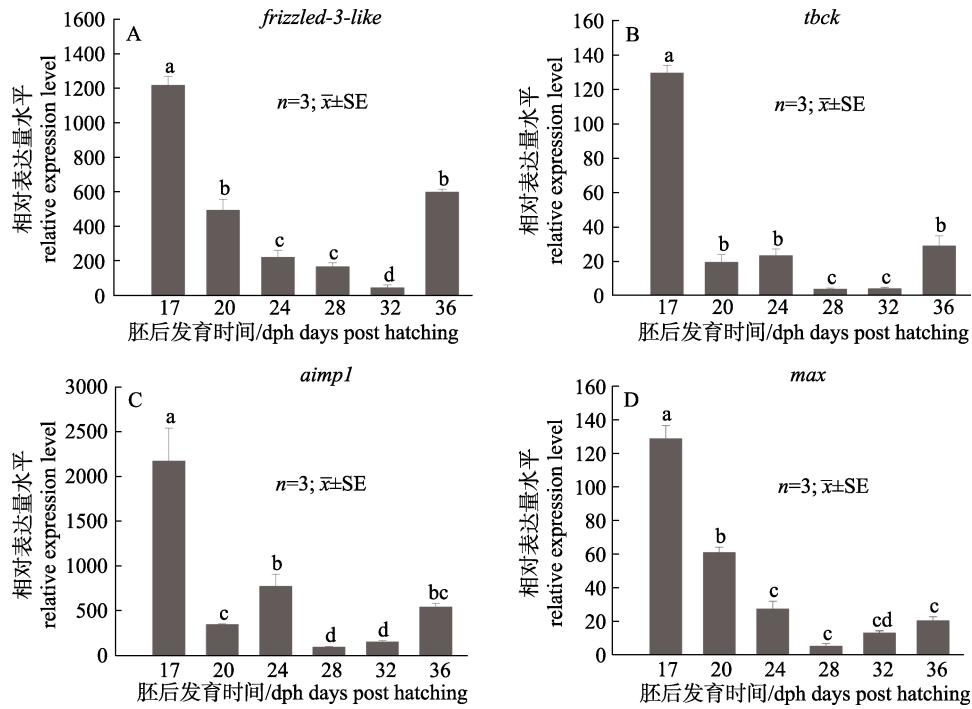


图 5 *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 基因在牙鲆变态发育期的表达  
不同字母代表各时期间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 5 The expression levels of *frizzled-3-like*, *tbck*, *aimp1* and *max* genes during metamorphic development stage of *Paralichthys olivaceus*  
Different letters indicate significant difference between different development stages ( $P<0.05$ ).

晚期)表达量最低( $P<0.05$ ), 在 36 dph (稚鱼期)时表达量升高。

**2.2.3 外源性甲状腺激素和硫脲对 *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 基因在牙鲆变态发育期的表达影响** 为了探究牙鲆变态发育期 TH 对 *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 的调控作用, 本实验使用外源性 TH 和 TU 处理未变态的牙鲆仔鱼, 对各个基因在仔鱼不同变态发育时期的表达量进行了研究。荧光定量结果显示, *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 的表达水平均受 TH 的影响(图 6)。如图 6A 所示, 在 17 dph、20 dph、24 dph、28 dph 和 36 dph, TH 组相较于 NC 组(对照组)的 *frizzled-3-like* 表达量显著降低( $P<0.05$ ), 在 32 dph, TH 组和 NC 组表达量无显著性差异( $P>0.05$ ); 而 TU 组相较于 TH 组, 各时期表达量均有小幅度上升, 但并无显著性差异( $P>0.05$ )。如图 6B 所示, TH 组相较于 NC 组的 *tbck* 表达量在 17 dph 显著降低( $P<0.05$ ), 在 20 dph、24 dph、28 dph, 32 dph 和 36 dph 表达量无显著性差异( $P>0.05$ ); 而 TU 组相

较于 TH 组, 各时期表达量均有小幅度上升, 但并无显著性差异( $P>0.05$ )。如图 6C 所示, 在 17 dph、20 dph、24 dph 和 36 dph, TH 处理组相较于 NC 组的 *aimp1* 表达量显著降低( $P<0.05$ ), 在 28 dph 和 32 dph 表达量无显著性差异( $P>0.05$ ); 而 TU 组相较于 TH 组, 各时期表达量均有小幅度上升, 但并无显著性差异( $P>0.05$ )。如图 6D 所示, TH 组相较于 NC 组的 *max* 各组表达量在 17 dph、20 dph、24 dph 显著降低( $P<0.05$ ), 28 dph、32 dph 和 36 dph 无显著性差异( $P>0.05$ ); 而 TU 组相较于 TH 组, 各时期表达量均有小幅度上升, 并无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

牙鲆变态发育是多种激素共同作用的结果, 其中 TH 对牙鲆仔鱼的变态起着决定性的作用<sup>[25]</sup>。养殖实验也证明, 未能变态成功的仔鱼在正常海水中饲养一段时间后会死亡, 而在甲状腺素(T<sub>4</sub>)处理的海水(0.1 mg/L)中会继续完成变态并发育

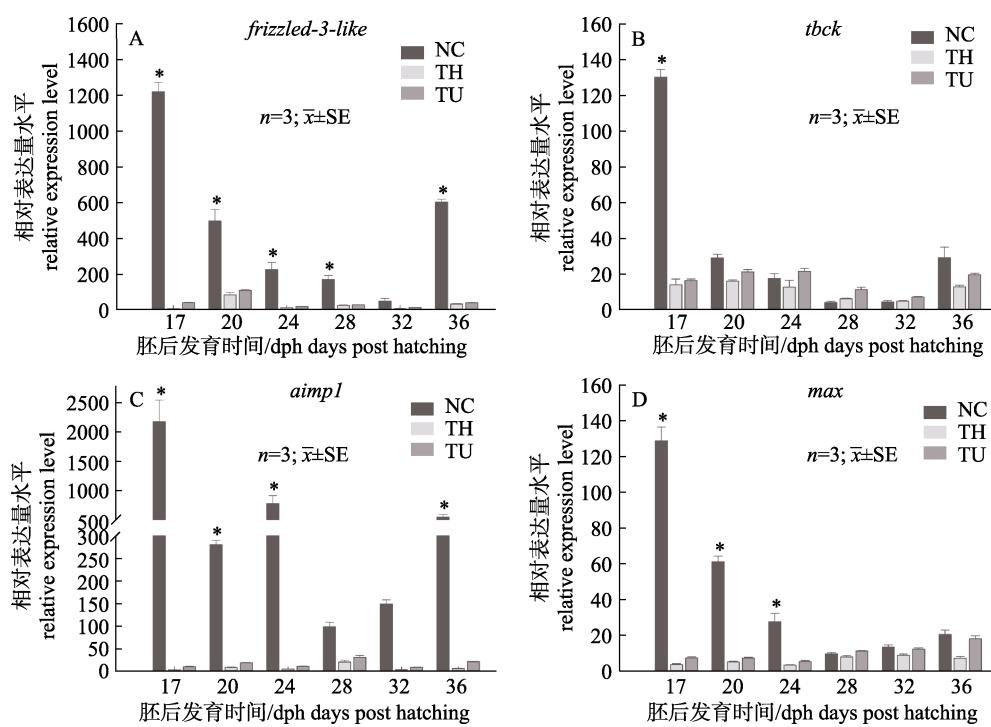


图 6 牙鲆变态期间 *frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 基因在外源性甲状腺激素(TH)和硫脲(TU)作用下的相对表达量  
\*表示 TH 组与对照(NC)组间有显著差异( $P<0.05$ )。

Fig. 6 Relative expression levels of *frizzled-3-like*, *tbck*, *aimp1* and *max* of *Paralichthys olivaceus* under exogenous thyroid hormone (TH) and thiourea (TU) treatment

Asterisk indicates that the corresponding values are significantly different between TH group and control (NC) group ( $P<0.05$ ).

为成鱼<sup>[26]</sup>。de Jesus 等<sup>[27]</sup>研究证明, TH 在牙鲆仔鱼变态之前含量极低, 变态发育开始后, TH 的含量显著升高, 在变态高峰期时含量最高; 变态完成后进入稚鱼期, TH 的含量降低。外源性 TH 能够显著促进牙鲆仔鱼的变态, 而 TU 则抑制仔鱼的变态进程<sup>[18]</sup>。

本研究利用 TH 直接调控的靶基因含有 TRE 序列——AGGT(C/A)A 的特性<sup>[10-11]</sup>和 DNA-蛋白质互相作用的技术方法, 筛选出 11 个 TR $\alpha$ A 的候选靶基因, 12 个 TR $\beta$  的候选靶基因, 其中 TR $\alpha$ A 和 TR $\beta$  存在 4 个相同候选靶基因。该方法是本实验室在结合之前相关 DNA-蛋白鉴定方法<sup>[19-20]</sup>的基础上, 又进一步改良后获得的一种鉴定蛋白质作用于 DNA 的有效方法, 双链随机识别文库的构建是一个创新点, 为今后的蛋白质-DNA 互作研究提供了一种有效的方法。

*frizzled-3-like*、*tbck*、*aimp1* 和 *max* 4 个候选靶基因在成鱼组织中的相对表达结果显示, 它们在脑组织中都显著高表达( $P<0.05$ ), 这提示它们可能在脑组织的生理和发育调控中发挥重要的作用。这 4 个候选靶基因在牙鲆变态发育期的表达结果显示, 它们在 17 dph (变态启动期) 表达量最高( $P<0.05$ ), 在 28 dph (变态高峰期) 和 32 dph (变态晚期) 表达量最低( $P<0.05$ ), 而在变态完成后的 36 dph (稚鱼期) 各基因的表达量会上升。变态期间 TH 的表达量会急剧上升并达到顶峰, 在变态发育完成后表达量降低<sup>[23]</sup>, 因此推断, 这 4 个基因的表达都受到 TH 的抑制作用。NC 组、TH 组和 TU 组各时期表达情况相比, 17 dph (变态启动期) 的 TH 组和 NC 组表达差异最大( $P<0.05$ ), 而 28 dph (变态高峰期) 和 32 dph (变态晚期) 的 NC 组和 TH 处理组表达差异最小( $P<0.05$ ); TU 组相较于 TH 组, 各时期的表达量均有小幅度的上升( $P>0.05$ ), 这些结果进一步证明了 4 个基因的表达都受到 TH 的抑制作用。

目前更多的还是 TH 激活基因转录的研究, 而 TH 的正向调控依赖于正性 TRE<sup>[28]</sup>, 冯绮文等<sup>[29]</sup>研究证明 TH 也能够抑制基因转录, 对靶基因转录的抑制作用则依赖于负性 TRE。目前负性 TRE 发挥转录抑制作用的分子机制尚不明确, 推测与

辅阻遏因子的功能有关<sup>[30-32]</sup>, 例如 TH 能抑制细胞增殖分化转录因子 AP-1 的活性<sup>[33]</sup>。本研究所发现的 4 个靶基因及其表达情况再次证实 TH 能够抑制基因转录, 然而 TH 是如何抑制这 4 个基因的表达还有待进一步的研究。

## 参考文献:

- Liu X D, Liu Z P, Wang Y N, et al. Analysis of one generation selective breeding on growth parameters of *Paralichthys olivaceus*[J]. Advances in Marine Science, 2012, 30(4): 548-555. [刘旭东, 刘志鹏, 王亚楠, 等. 对牙鲆进行一代选择之后的育种效果分析[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(4): 548-555.]
- Inui Y, Yamano K, Miwa S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder[J]. Aquaculture, 1995, 135(1-3): 87-98.
- Zhang Y T. Cloning and expression analysis of *IGFBPs* gene in Japanese flounder[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [张云彤. 牙鲆 *IGFBPs* 基因的克隆以及表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- Miwa S, Inui Y. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Cell and Tissue Research, 1987, 249(1): 117-123.
- Zhang Z Y, Bao B L. The effects of thyroid hormone on the early developmental stage of fish[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1999, 8(1): 68-75. [张臻宇, 鲍宝龙. 鱼类早期发育阶段甲状腺激素的作用[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 68-75.]
- Galay-Burgos M, Power D M, Llewellyn L, et al. Thyroid hormone receptor expression during metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008, 281(1-2): 56-63.
- Miwa S, Tagawa M, Inui Y, et al. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae[J]. General and Comparative Endocrinology, 1988, 70(1): 158-163.
- Yamano K. The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2005, 39(3): 161-168.
- Yen P M, Ando S, Feng X, et al. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 246(1-2): 121-127.
- Liao M G, Lyu C Y, Zhang L L, et al. Advances in the etiology and pathogenesis of thyroid cancer and breast cancer[J]. Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment, 2017, 9(6): 501-505. [廖曼各, 吕春艳, 张丽林, 等. 甲状腺癌和乳腺癌相关病因及发病机制进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2017, 9(6): 501-505.]
- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene

- expression[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3): 1269-1304.
- [12] Nygård M. Regulation of Gene Transcription by the Thyroid Hormone Receptors[M]. Stockholm: Karolinska University Press, 2006.
- [13] Zhang J L, Shi Z Y, Cheng Q, et al. Differential expression of *HSP90* genes and its relation with thyroid hormone during metamorphosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(10): 1478-1485. [张俊玲, 施志仪, 程琦, 等. 牙鲆变态中两种 *HSP90* 基因的不同表达及其与甲状腺激素的关系[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1478-1485.]
- [14] Zhang J L, Shi Z Y, Fu Y S, et al. Gene expression and thyroid hormone regulated transcript of *IGF-I* during metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 355-359. [张俊玲, 施志仪, 付元帅, 等. 牙鲆变态中 *IGF-I* 基因表达及甲状腺激素对其的调节作用[J]. 水生生物学报, 2011, 35(2): 355-359.]
- [15] Fu Y S, Shi Z Y. microRNA and the development of animal[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(1): 30-36, 43. [付元帅, 施志仪. microRNA 与动物发育[J]. 生物技术通报, 2010(1): 30-36, 43.]
- [16] Shang P, Fu Y S, Shi Z Y, et al. Interaction Analysis of Thyroid Hormone Receptor with Drosha Protein[J]. *Bio-technology Bulletin*, 2017, 33(8): 206-212. [尚攀, 付元帅, 施志仪, 等. 甲状腺激素受体与 Drosha 蛋白互作鉴定分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(8): 206-212.]
- [17] Shi Z Y, Wu M L, Fu Y S. Cloning, expression and target gene prediction of *let-7* in *Paralichthys olivaceus* metamorphosis[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1211-1218. [施志仪, 吴明林, 付元帅. 牙鲆 *let-7* 基因的克隆与表达及其靶基因预测[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1211-1218.]
- [18] Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1985, 60(3): 450-454.
- [19] Pollock R, Treisman R. A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(21): 6197-6204.
- [20] Wright W E, Binder M, Funk W. Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(8): 4104-4110.
- [21] Ji W Y, Fu Y S, Shi Z Y, et al. Expression of miR-124 and Otx2 during metamorphosis and verification of their targeting relationship in *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1040-1048. [季文瑶, 付元帅, 施志仪, 等. miR-124 和 Otx2 在牙鲆变态发育期间的表达调控及其靶向关系验证[J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1040-1048.]
- [22] Minami T. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1982, 48(11): 1581-1588.
- [23] Tian J, Shi Z Y. Expression of alkaline phosphatase (ALP) gene in tissues of *Scophthalmus maximus* and relationship between thyroid hormone and alkaline phosphatase[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(1): 208-213. [田娟, 施志仪. 碱性磷酸酶在大菱鲆不同组织的表达及其与甲状腺激素的关系[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 208-213.]
- [24] Morinaga T, Enomoto A, Shimono Y, et al. GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the *HOXA10* gene regulatory region[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(13): 4191-4201.
- [25] Schreiber A M, Specker J L. Metamorphosis in the summer flounder, *Paralichthys dentatus*: Thyroidal status influences salinity tolerance[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 284(4): 414-424.
- [26] Shi Y, Ju H, Yu J, et al. Expression regulation of *Paralichthys olivaceus NR4A1* gene in the metamorphic larvae induced by thyroid hormone[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(4): 433-442. [施杨, 居慧, 喻杰, 等. 牙鲆 *NR4A1* 基因在甲状腺素诱导仔鱼变态中的表达调控分析[J]. 海洋渔业, 2017, 39(4): 433-442.]
- [27] de Jesus E G, Hirano T, Inui Y. Flounder metamorphosis: its regulation by various hormones[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11: 323-328.
- [28] Xing X R, Liu Y B, Cheng Z K, et al. Transcription regulation by histone-modifying enzymes[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2008, 39(4): 314-318. [邢欣荣, 刘宇博, 程智逵, 等. 组蛋白修饰酶对基因转录的调控[J]. 生理科学进展, 2008, 39(4): 314-318.]
- [29] Feng Q W, Su Q. Progress in research on thyroid hormone receptor[J]. *Foreign Medical Sciences Endocrine Section*, 2003, 23(1): 44-46. [冯绮文, 苏青. 甲状腺激素受体研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2003, 23(1): 44-46.]
- [30] Hu J F, Su Q. Molecular mechanism of thyroid hormone regulating target gene transcription[J]. *Foreign Medical Sciences Endocrine Section*, 2003, 23(1): 42-44. [胡静芳, 苏青. 甲状腺激素调节靶基因转录的分子机制[J]. 国外医学内分泌学分册, 2003, 23(1): 42-44.]
- [31] Yen P M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3): 1097-1142.
- [32] Ling Y Q. Expression and regulation of thyroid hormonereceptor B1 gene in breast carcinoma[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009. [令亚琴. 甲状腺素受体 B1 基因在乳腺癌组织中的表达调控研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.]
- [33] Qiu J, Chen H, Huang B R. Transcriptional activation and

repression regulation in target gene by thyroid hormone receptors[J]. Chemistry of Life, 2009, 29(3): 370-373. [裘佳,

陈虹, 黄秉仁. 甲状腺激素受体在调节靶基因转录中的激活和抑制作用[J]. 生命的化学, 2009, 29(3): 370-373.]

## Target genes regulated by thyroid hormone during metamorphosis of *Paralichthys olivaceus*

TAO Jiakang<sup>1</sup>, FU Yuanshuai<sup>1, 2, 3</sup>, SHI Zhiyi<sup>1, 2, 3</sup>

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** There are large differences in morphology and living habits of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the early stages of metamorphic development. These differences make *P. olivaceus* an ideal model of metamorphosis in fish. The thyroid hormone (TH) plays a decisive role in the development of metamorphosis. The physiological role of TH is to regulate the transcription of target genes via the thyroid hormone receptors (TRs) and thyroid hormone response elements (TRE)—AGGT(C/A)A. In this study, *P. olivaceus* was used to investigate a new method for finding the target genes regulated by TH. We expressed and purified the p3×Flag-TR $\alpha$ A and p3×Flag-TR $\beta$  fusion proteins to identify the target genes downstream of TH by using a cyclic amplification and selection of target (CAST) method. We found 11 potential TR $\alpha$ A target genes and 12 potential TR $\beta$  target genes. TR $\alpha$ A and TR $\beta$  share 4 identical potential target genes, which are *frizzled-3-like*, TBC1 domain-containing kinase (*tbck*), aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1 (*aimp1*), and MYC associated factor X (*max*). The expression of these genes was tested in different adult tissues and different metamorphosis development stages of *P. olivaceus* in the NC (normal control), TH (thyroid hormone), and TU (thiourea) groups by real-time quantitative PCR. The expression of these genes was highest in the adult brain tissue ( $P<0.05$ ). The expression of these genes during early metamorphic development was highest at 17 dph (days post hatching) and lowest at 28 dph and 32 dph. The expression of these genes in the TH group was lower than in the NC group ( $P<0.05$ ). The difference between the NC group and the TH group at 17 dph was the largest ( $P<0.05$ ), while NC and TH groups had the smallest expression differences at 28 dph and 32 dph ( $P>0.05$ ). Compared to the TH group, the expression in the TU group increased slightly in each period ( $P>0.05$ ). These results indicate that *frizzled-3-like*, *tbck*, *aimp1*, and *max* are target genes directly regulated by TH and that the expression of these genes is inhibited by TH. This study successfully identified an effective method to locate the target genes of TH. TH can inhibit the transcription of the target genes during *P. olivaceus* metamorphosis. These results provide basic information for improving the thyroid hormone regulation network. However, further research is required to determine how TH inhibits the expression of these genes.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; thyroid hormone (TH); thyroid hormone receptors (TRs); DNA-protein interaction; target gene

**Corresponding author:** SHI Zhiyi, E-mail: zyshi@shou.edu.cn; FU Yuanshuai, E-mail: ysfsu@shou.edu.cn