

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20084

## 牛磺酸对红鳍东方鲀热应激转录调控机制的影响

石立冬<sup>1</sup>, 翟浩杰<sup>1</sup>, 卫力博<sup>1</sup>, 牟玉双<sup>1</sup>, 李卓<sup>1</sup>, 姜晨<sup>1,2</sup>, 任同军<sup>1,2</sup>, 韩雨哲<sup>1,2,3</sup>

1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学, 农业农村部海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023;

3. 大连海洋大学, 辽宁省北方鱼类应用生物学与增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

**摘要:** 为探究牛磺酸对红鳍东方鲀的热应激调控的影响, 以初始体重为( $32.28\pm0.20$ ) g 的红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)作为研究对象, 实验随机分为 3 组, 每组设置 3 个重复, 通过在低鱼粉饲料中分别添加 3 个水平的牛磺酸[0% (T1, 对照)、1.0% (T2) 和 5.0% (T3)], 配制 3 组实验饲料。养殖 56 d 后, 水温( $28\pm0.3$ ) °C, 急性热应激 30 min, 取肝脏。使用 RNA-Seq 测序技术对 3 组红鳍东方鲀肝脏转录组进行分析, 并分别对 3 个转录组测序文库进行两两比较, 设置显著差异基因筛选条件为  $P<0.05$ , 共获得 167 个差异表达基因, 其中上调基因 111 个, 下调基因 56 个。GO 功能分析发现, 在 T3vsT1 组中, 差异表达基因(DEGs)显著富集在蛋白质分解过程、丝氨酸型内肽酶活性、丝氨酸型肽酶活性、丝氨酸水解酶活性、内肽酶活性、L-氨基酸肽的肽酶活性和肽酶活性。KEGG 富集分析发现, T2vsT1 组中, 这些 DEGs 主要参与细胞黏附分子、神经活性配体-受体相互作用通路; 而 T3vsT1 组中, 这些 DEGs 主要参与神经活性配体受体相互作用和代谢途径。选取 3 个显著差异表达基因进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证, 结果证明, 转录组测序分析可靠; 饲料中添加牛磺酸后, 在急性热胁迫条件下, 红鳍东方鲀可通过细胞黏附分子和神经活性配体-受体相互作用通路调控机体对温度的响应; 随着牛磺酸添加量的升高, 红鳍东方鲀主要通过代谢调节、神经活性配体-受体相互作用通路调控机体对温度的响应。本研究旨为研究牛磺酸对红鳍东方鲀的热应激调控的影响和牛磺酸抗应激功能提供参考数据。

**关键词:** 红鳍东方鲀; 牛磺酸; 转录组测序; 调控机制; 热应激

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)10-1145-11

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)俗称河鲀, 是一种性情凶猛的底栖肉食性、狭温性鱼类<sup>[1]</sup>, 在工厂养殖过程中, 由于温度的升高易产生热应激反应, 致使养殖效益下降<sup>[2]</sup>。研究表明, 在遭受过强的应激后, 鱼类机体细胞内稳态和生理性能会遭到破坏, 进而引起其他免疫反应的变化<sup>[3]</sup>。热应激是动物体最基本的细胞保护机制, 生存环境温度的上升所导致的体温升高是机体经常出现的生理反应, 因而对活体动物各重要器官在热应激下的反应进行研究更具实用意义<sup>[4]</sup>。

牛磺酸(taurine), 又称牛胆素、牛胆碱, 为  $\beta$  型含硫氨基酸, 化学名为 2-氨基乙磺酸, 其相对分子质量为 125.15, 有独特酸味, 常温下为白色或黄色针状结晶, 易溶于水, 不溶于无水乙醇和乙醚, 在体内各组织、器官中含量丰富<sup>[5-7]</sup>, 主要存在于组织间液和细胞内液中<sup>[8]</sup>。

牛磺酸不仅能促进鱼类的生长, 提高其免疫能力<sup>[9-12]</sup>, 还能够提高鱼类抗胁迫能力。水产动物应激时的生理变化与机体营养状况密切相关, 研究表明, 牛磺酸可使日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)

收稿日期: 2020-04-01; 修订日期: 2020-04-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702336); 辽宁省海洋产业技术研究院项目(2018-CY-30).

作者简介: 石立冬(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: 719338322@qq.com

通信作者: 韩雨哲(1984-), 副教授, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: hanyuzhe@dlou.edu.cn

的生殖细胞不受氧化应激的影响<sup>[13]</sup>, 黄斑蓝子鱼(*Siganus canaliculatus*)<sup>[14]</sup>浸泡牛磺酸 2 d 后可提高鱼体抗急性拥挤胁迫能力。此外, 在青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)幼鱼饲料中添加牛磺酸可以增强其抗胁迫能力<sup>[15-16]</sup>, 在暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)饲料中添加牛磺酸可以增强机体的特异性免疫能力和非特异性免疫能力, 减少低温引起的氧化应激、细胞毒性和细胞凋亡, 从而增强其抗低温胁迫能力<sup>[17]</sup>。Frosini 等<sup>[18]</sup>的研究表明, 牛磺酸可能通过在细胞外液释放, 维持机体内环境的平衡, 在体温调节机制中起重要作用。因此, 牛磺酸作为一种内源性体温调节剂具有抗应激作用的潜在功能<sup>[19]</sup>。目前, 关于牛磺酸在水产动物热应激调节方面的研究有限, 且关于牛磺酸调节热应激的分子机制尚未见报道。因此, 本研究以红鳍东方鲀为研究对象, 探讨饲料中添加不同水平的牛磺酸对红鳍东方鲀热应激调控通路表达的影响, 为进一步研究牛磺酸对红鳍东方鲀的热应激调控机制的影响和牛磺酸抗应激能力的发掘提供基础参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计及饲养管理

实验用红鳍东方鲀幼鱼购自大连天正实业有限公司, 初始体重为(32.28±0.20) g, 于实验室暂养 14 d, 期间投喂 T1 组饲料(对照组饲料, 饲料中牛磺酸水平为 0%), 实验开始前, 停喂 24 h, 选取大小均匀、体表无伤、活力较好的红鳍东方鲀幼鱼 135 尾, 随机分为 3 个组, 每组 3 个重复, 每个重复 15 尾鱼, 放入 9 个 200 L 的方形聚乙烯水槽中。每天 8:00 和 17:00 投喂提前分装好的置于 4 °C 冰箱的实验饲料至表观饱食, 每天 9:30 和 18:30 换水, 换水量为总水体的 2/3。24 h 连续充气, 07:00~19:00 日光灯照明, 保持实验环境每天 12 h 光照 12 h 黑暗。实验期间及时捞出死亡鱼体并记录体重, 每天通过 YSI 多参数水质测量仪(维赛仪上海有限公司)测定水质, 温度 23.0~24.5 °C, 溶解氧浓度大于 6 mg/L, pH 为 7.3~7.8。

养殖 56 d 后, 以水温作为实验应激主效因子,

应激实验在 40 L 聚乙烯方形水槽中进行, 每个水槽加入曝气处理后的海水, 温控仪调节水温至(28±0.3) °C, 分别从每个重复中随机选取 3 尾个体相近、活力较好的红鳍东方鲀幼鱼直接放入应激试验水槽中急性升温 30 min 后采集样品, 应激试验期间连续充气。

### 1.2 实验饲料

以酪蛋白和鱼粉为主要蛋白质源, 以鱼油和大豆卵磷脂为主要脂肪源, 配制牛磺酸水平分别为 0% (T1, 对照)、1.0% (T2) 和 5.0% (T3) 的 3 种等能量等氮实验饲料, 用甘氨酸调平饲料中的含氮量。具体配方及营养成分见表 1, 原料过 60 目筛, 所有原料采用逐级混合法混合均匀, 制成直径为 4 mm 的软颗粒饲料于-20 °C 下保存备用。

### 1.3 样品采集

应激结束后, 用 MS-222 (100 mg/L) 进行麻醉, 用灭菌处理过的剪刀镊子分离出肝脏, 每 3 尾鱼的肝脏剪碎混合后放入液氮中冷冻, 待全部取样结束后于-80 °C 冰箱中保存, 用于后续 RNA-seq 转录组分析和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)。

### 1.4 RNA-seq 转录组分析

**1.4.1 文库构建** 用带有 Oligo(dT) 的磁珠, 通过 A-T 互补配对与 mRNA 的 polyA 尾结合的方式富集真核生物的 mRNA。随后加入破碎缓冲液(fragmentation buffer)将 mRNA 打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物(random hexamers)合成一链 cDNA, 然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA 聚合酶 I 合成二链 cDNA, 随后利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择, 最后进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 进行初步定量, 稀释文库至 1 ng/μL, 随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段长度(insert size)进行检测, 插入片段长度符合预期后, 使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>2 nmol/L), 以保证文库质量。库检合格后, 把不同文库按照有效浓度

及目标下机数据量的需求汇集后进行 HiSeq 测序。

表 1 实验基础饲料组成

Tab. 1 Composition of the experimental basic diets

%干物质基础 % dry matter basis

项目 item	T1 (对照 contr.)
原料 ingredient	
鱼粉 fishmeal	15
磷虾粉 krill meal	5
豆粕 soybean	10
小麦粉 flour	9
玉米蛋白粉 corn gluten meal	10
酪蛋白 casein	20
啤酒酵母 beer yeast	2
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch	8
羧甲基纤维素 carboxyl methyl cellulose	2.4
大豆卵磷脂 soybean lecithin	5
鱼油 fish oil	5
螺旋藻 Spirulina	1
甜菜碱 betaine	0.3
胆碱 choline	0.3
维生素混合物 <sup>a</sup> vitamin mixture <sup>a</sup>	1
矿物质混合物 <sup>b</sup> mineral mixture <sup>b</sup>	1
牛磺酸 taurine	0
甘氨酸 glycine	5
营养水平分析 nutrient analysis	
水分 moisture	31.33
粗蛋白 crude protein	47.28
粗脂肪 crude lipid	14.69
粗灰分 ash	7.26
牛磺酸 taurine	0.06

注: a. 维生素混合物(IU/kg 或 mg/kg 预混料): 维生素 A, 1000000 IU; 维生素 D<sub>3</sub>, 300000 IU; 维生素 E, 4000 IU; 维生素 K<sub>3</sub>, 1000 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 2000 mg; 维生素 B<sub>2</sub>, 1500 mg; 维生素 B<sub>6</sub>, 1000 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 5 mg; 烟酸, 1000 mg; 维生素 C, 5000 mg; 泛酸钙, 5000 mg; 叶酸, 100 mg; 肌醇, 10000 mg; 载体葡萄糖及水≤10%。b. 矿物质混合物(0.025 mg/g 预混料): NaCl, 107.79; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 380.02; NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 241.91; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 665.20; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 376.70; 柠檬酸铁, 82.38; 乳酸钙, 907.10; Al(OH)<sub>3</sub>, 0.52; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9.90; CuSO<sub>4</sub>, 0.28; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.22; Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.42; CoSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.77。

Note: a. Vitamin mixture (IU/kg or mg/kg of premix): vitamin A, 1000000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 300000 IU; vitamin E, 4000 IU; vitamin K<sub>3</sub>, 1000 mg; vitamin B<sub>1</sub>, 2000 mg; vitamin B<sub>2</sub>, 1500 mg; vitamin B<sub>6</sub>, 1000 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 5 mg; nicotinic acid, 1000 mg; vitamin C, 5000 mg; Ca pantothenate, 5000 mg; folic acid, 100 mg; inositol, 10000 mg; carrier glucose, H<sub>2</sub>O≤10%. b. Mineral mixture (0.025 mg/g of premix): NaCl, 107.79; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 380.02; NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 241.91; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 665.20; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 376.70; Fe citrate, 82.38; Ca lactate, 907.10; Al(OH)<sub>3</sub>, 0.52; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9.90; CuSO<sub>4</sub>, 0.28; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.22; Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.42; CoSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.77.

**1.4.2 测序数据及信息分析** 采用 Illumina 测序平台进行测序, 测序后每个样本得到的待分析数据(clean reads)不少于 6G, 将 clean reads 对比到参考基因组。进行基因定量分析和基于基因表达水平的各项分析, 并对筛选出的样本间差异表达基因进行 GO 功能显著性富集分析和 KEGG 显著性富集分析等。

### 1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

从转录组测序结果中选取 3 个差异表达显著的基因进行 RT-qPCR 验证, 选用  $\beta$ -actin 作为内参基因, 使用 Primer Premier 5.0 针对选定基因设计引物, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列如表 2 所示。

表 2 用于转录组数据验证的引物

Tab. 2 Genes and specific primers used for validation of RNA-seq data by real time PCR

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
SREBP-2-F	ATGGACACGACTTTAGCAGAAC
SREBP-2-R	TTAGGAGGCAGCAATGGTC
prss59.1-F	CGTGTGAAGTGCCTTGGCGA
prss59.1-R	GGTGAGGCTGGAGTAGGGCGTG
sat1b-F	AAAGAGTAAAAGAAGAAAATGGA
sat1b-R	GCGATGAGGCAATGGTAAACGG
$\beta$ -actin-F	AGTATTACGCTCAGGTGGG
$\beta$ -actin-R	ATCCGTAAGGACCTGTATGC

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序与生物信息学分析

**2.1.1 原始数据质量控制与参考序列对比分析** 对 3 组红鳍东方鲀肝脏 RNA-Seq 进行质量检测(表 3), 3 组测序数据在测序长度范围内碱基的错误率低于 0.03%; GC 比例在正常范围内; 碱基质量的 Q20 和 Q30 值均高于 94%, 表明本次测序质量较高, 满足后续分析要求。reads 与红鳍东方鲀参考基因组比对情况统计中, 3 组测序序列的定位百分比均高于 93%, 其中具有多重定位的测序序列百分比高于 11%, 具有唯一定位的测序序列百分比高于 79%。

表 3 转录测序产出数据质量评估及 reads 与参考基因组比对结果

Tab. 3 Summary of sequencing data quality and the statistics of the transcriptome assembly

样本名称 sample name	错误率 error rate	Q20 比例 Q20 ratio	Q30 比例 Q30 ratio	GC 比例 GC ratio	总定位百分比/% total mapped percentage	多重定位 multiply mapped percentage	唯一定位 unique mapped percentage
T1	0.02±0.00	98.06±0.10	94.64±0.20	53.01±0.57	93.87±0.15	11.04±1.20	82.84±1.26
T2	0.02±0.01	98.03±0.18	94.61±0.42	53.88±0.04	93.88±0.32	11.54±0.48	82.34±0.76
T3	0.02±0.01	97.93±0.16	94.36±0.42	54.66±0.27	93.85±0.26	14.29±0.37	79.56±0.15

注: T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组。

Note: T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

**2.1.2 基因表达水平分析** 根据定位到基因外显子区域或基因组区域的 reads 数可以估计基因的表达水平, FPKM (expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced) 是每百万碎片(fragment)中来自某一基因每千碱基长度的数目, FPKM 数值对基因表达水平估算则同时考虑了基因长度和 fragment 测序深度对 fragment 计数的影响。如表 4 所示, T1 组、T2 组、T3 组均在区间 0~1 内的比例最高。

表 4 不同表达水平区间的基因数量统计表

Tab. 4 FPKM intervals and the total genes of each library  
 $n=3; \bar{x} \pm SD; \%$ 

样品名称 sample name	基因表达水平区间 interval of gene expression level				
	0~1	1~3	3~15	15~60	>60
T1	37.38±2.15	15.47±1.02	31.52±1.15	11.41±1.52	4.21±0.22
T2	40.00±3.77	17.05±1.89	29.72±3.21	9.46±2.41	3.76±0.15
T3	42.46±2.56	19.46±1.53	27.67±2.05	7.46±1.72	2.94±0.42

注: T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组。

Note: T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

**2.1.3 差异基因表达分析** 如图 1 所示, 在急性热应激后, T2 vs T1 组共得到 13 个差异表达基因, 其中包括 11 个上调表达基因, 2 个下调表达基因; T3 vs T1 组共得到 154 个差异表达基因, 其中包括 100 个上调表达基因, 54 个下调表达基因。对所有基因进行 FPKM 层次聚类分析, 得到结果如图 2 所示。以  $\log_2(\text{ratios})$  值进行聚类, 图中红色代表基因高表达, 蓝色代表基因低表达, 从红到蓝

表明  $\log_2(\text{ratios})$  值从大到小, 即基因表达量从高到低。

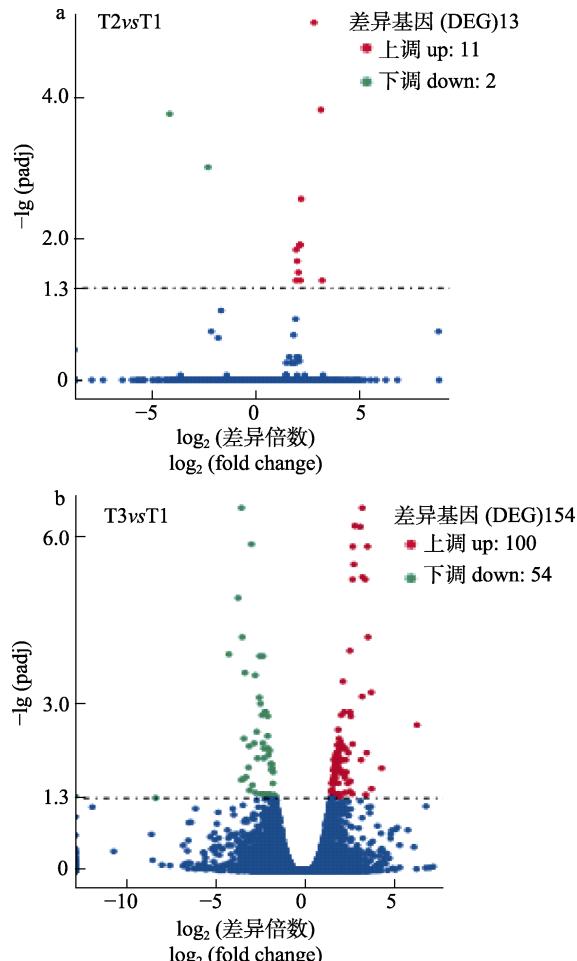


图 1 差异表达基因火山图

a. T2 vs T1 差异基因火山图; b. T3 vs T1 差异基因火山图。

T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组。

Fig. 1 Volcanic map of differentially expressed genes (DEG)  
a. Volcanic map of differential genes in T2 vs T1 group; b. Volcanic map of differential gene in T3 vs T1 group. T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

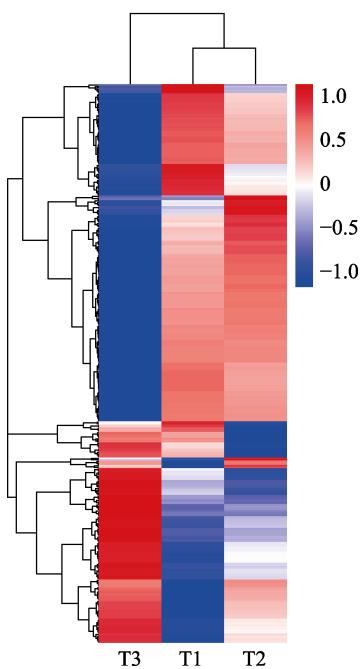


图 2 差异表达基因聚类图

T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组。

Fig. 2 Cluster map of differentially expressed genes  
T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups  
supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

**2.1.4 差异基因 GO 富集** GO 富集分类统计结果表明, 差异基因在生物过程、细胞组分和分子功能中均有分布(表 5), T2 vs T1 组经 GO 富集的生物过程的类别 121 个, 细胞组分的类别 13 个, 分子功能的类别 72 个; T3 vs T1 组经 GO 富集的生

表 5 差异基因 GO 富集分类  
Tab. 5 Go enrichment classification of  
differentially expressed genes

组别 group	类别 classification	功能信息数量 number of function information
T2 vs T1	生物过程 biological process	121
	细胞组分 cellular component	13
	分子功能 molecular function	72
T3 vs T1	生物过程 biological process	515
	细胞组分 cellular component	99
	分子功能 molecular function	245

注: T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组。

Note: T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

物过程的类别 515 个, 细胞组分的类别 99 个, 分子功能的类别 245 个。如图 3 所示, T3 vs T1 组中 7 条被富集的 GO 类别包括: 蛋白质分解过程、丝氨酸型内肽酶活性、丝氨酸型肽酶活性、丝氨酸水解酶活性、内肽酶活性、L-氨基酸肽的肽酶活性、肽酶活性。

**2.1.5 差异表达基因 KEGG 分析** 除对差异基因进行 GO 富集分析外, 还对其进行了 KEGG 通路富集分析, 选取 T2 vs T1 组中富集最显著的 4 条途径和 T3 vs T1 组中富集最显著的 20 条途径, 做 KEGG 富集散点图(图 4), 本实验测序结果中, 以  $P < 0.05$  为阈值, 热应激后, T2 vs T1 组中细胞黏附分子、神经活性配体-受体相互作用是显著富集的途径, 富集到的差异基因数量为 4, T3 vs T1 组中代谢过程、类固醇生物合成、神经活性配体-受体相互作用、牛磺酸与牛磺酸代谢的调节是显著富集的通路, 其中代谢途径和神经活性配体-受体相互作用富集的差异基因数量较多, 且其中 T2 vs T1 组细胞黏附分子、神经活性配体-受体相互作用通路中差异基因表达显著上调, T3 vs T1 组代谢过程、牛磺酸与牛磺酸代谢、类固醇生物合成通路差异基因表达量显著下调, 神经活性配体-受体相互作用通路差异基因表达显著上调。

## 2.2 RT-qPCR 验证

如图 5 所示, 为验证测序结果的准确性, 从转录组测序结果中选取 3 个差异表达基因, 进行 RT-qPCR 分析, 对转录组测序结果进行验证, RNA-seq 结果中基因表达差异倍数与 RT-qPCR 结果中基因表达差异倍数相近, 且两种结果的相关系数为 0.97, 表明了转录组测序分析结果的可靠性。

## 3 讨论

### 3.1 红鳍东方鲀转录组测序

在水产动物的研究中, 转录组测序技术作为研究生物生理机制的重要技术手段已经被广泛应用<sup>[20-24]</sup>, 李永娟<sup>[25]</sup>在基于 RNA-seq 技术探究热应激条件下虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肝脏和头肾转录组差异的过程中, 通过对 6 组肝脏样品进行转录组测序, 获得了 44643742~51705292 条原始数据(raw reads), 且碱基错误率均低于 0.1%, 并

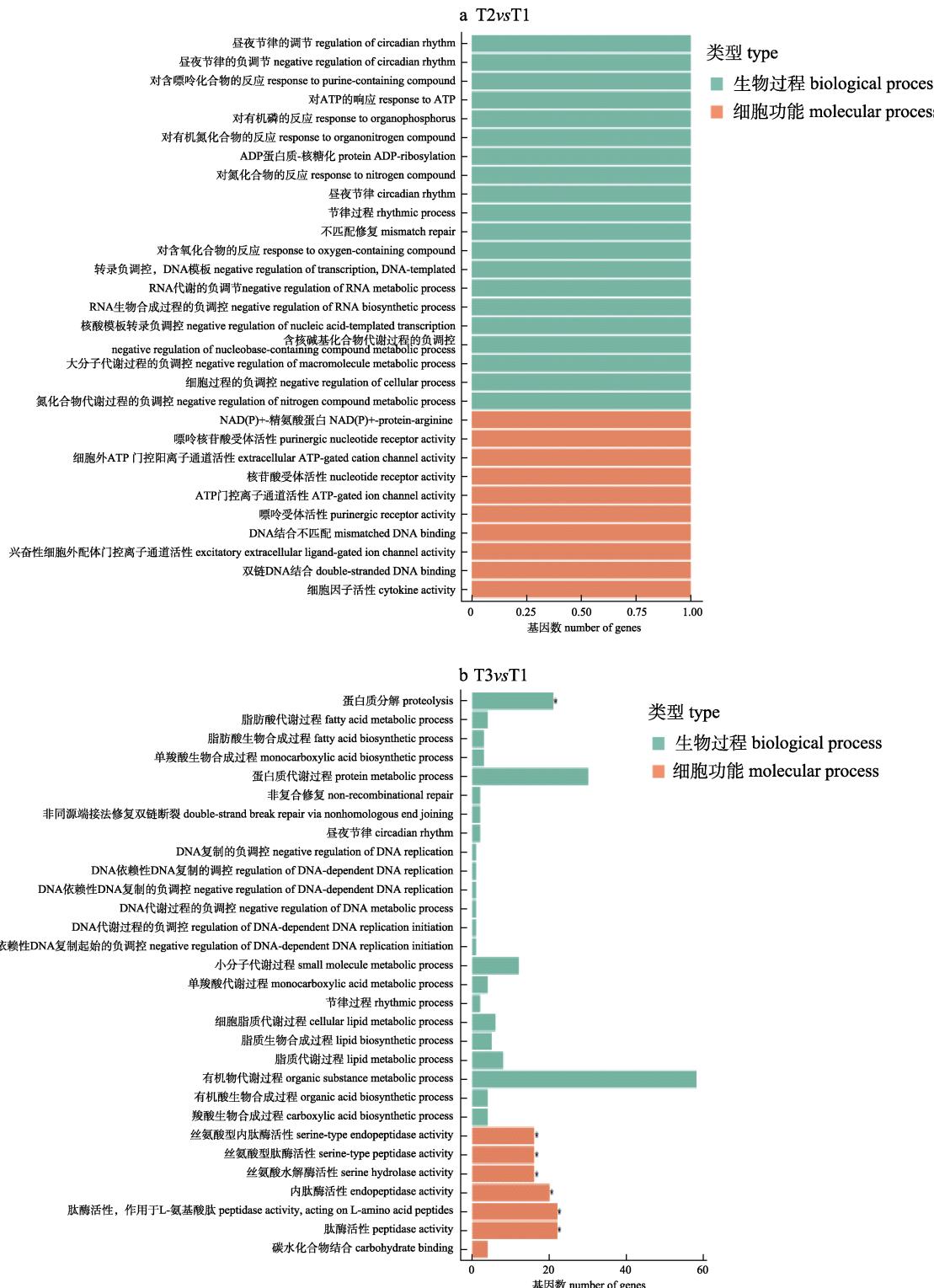


图 3 差异表达基因 GO 富集分析柱状图

a. T2 vs T1 组差异表达基因 GO 富集分析柱状图; b. T3 vs T1 组差异表达基因 GO 富集分析柱状图。  
T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组。

Fig. 3 GO enrichment results of differentially expressed genes

a. GO enrichment results of differentially expressed genes in T2 vs T1 group; b. GO enrichment results of differentially expressed genes in T3 vs T1 group. T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

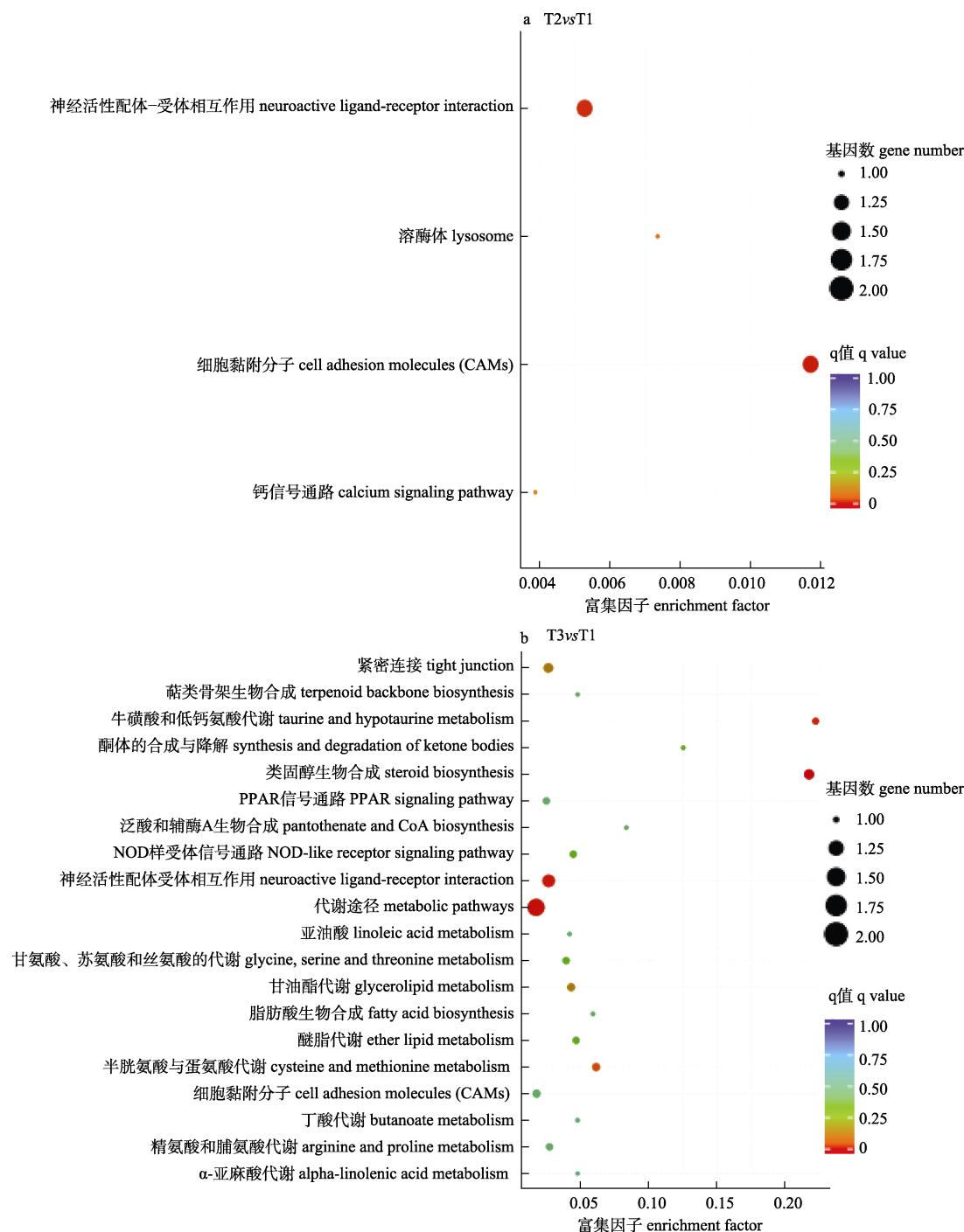


图 4 差异表达基因 KEGG 富集散点图

a. T2 vs T1 组差异基因 KEGG 富集散点图; b. T3 vs T1 组差异表达基因 KEGG 富集散点图.

T1、T2、T3 分别取自牛磺酸含量为 0% (对照)、1.0% 和 5.0% 的实验组.

Fig. 4 KEGG enrichment results of differentially expressed genes

a. KEGG enrichment results of differentially expressed genes in T2 vs T1 group; b. KEGG enrichment results of differentially expressed genes in T3 vs T1 group. T1, T2 and T3 denote the samples from the experiment groups supplemented with 0% (control), 1.0% and 5.0% taurine, respectively.

对热应激下肝脏的基因表达调控机制、代谢响应机制、肝脏免疫响应机制进行了深度分析；韩兆

方<sup>[26]</sup>通过对密集胁迫前后大黄鱼(*Larimichthys crocea*)腹部皮肤转录组进行测序分析，共获得

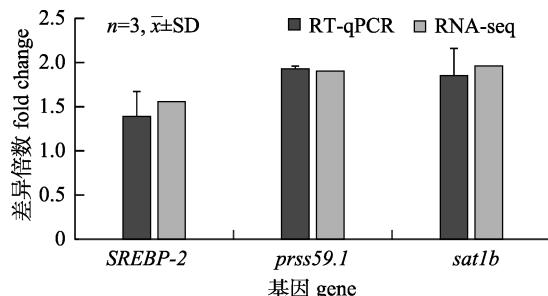


图 5 RT-qPCR 与 RNA-seq 检测基因差异倍数比较图

Fig. 5 Comparison of gene expression levels by using RNA-seq and RT-qPCR

$1.296 \times 10^8$  条 raw reads，并对密集胁迫下基因表达模式及应急通路进行了深入探讨。本研究对 3 组肝脏样品进行转录组测序，在测序长度范围内 3 组测序数据碱基的错误率低于 0.03%；GC 比例在正常范围内；碱基质量的 Q20 和 Q30 值均高于 94%，表明本次测序质量较高。本研究首次探讨了饲料中添加牛磺酸对红鳍东方鲀转录组的影响，通过对 3 组肝脏样品进行转录组测序及一系列的 GO、KEGG、差异基因筛选等分析，为红鳍东方鲀的急性热应激调控提供重要的分子信息。

### 3.2 转录组文库注释及分析

鱼类在应激时，为了维持机体内稳态，其生理机制必须做出适当的响应。杨凯<sup>[27]</sup>对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 热胁迫条件下的肝脏转录组进行分析得出，GO 注释中细胞进程、单生物代谢过程、代谢过程等 8 个 GO 类别富集到的差异基因较多，KEGG 注释中富集了包括代谢途径、遗传信息处理、细胞过程、环境信息和生物系统在内的 5 条途径。王骏<sup>[28]</sup>在转录组学水平上探讨暗纹东方鲀盐度耐受机制的研究中表明，通过 GO 分类注释，胞内细胞器、细胞器、高分子配合物和结构分子活性富集到的差异基因数量最多；KEGG 注释中共富集了 17 条通路，且其中胆汁分泌和甲状腺激素合成途径富集到的差异基因数量最多。赵永丽<sup>[29]</sup>在花斑裸鲤 (*Gymnocypris ecklonii*) 低氧胁迫后的转录组研究中得出，GO 功能富集分析中富集到的差异基因主要与分子功能、细胞组分和生物学过程相关；KEGG 注释中富集了糖酵解途径功能和糖异生作用途径。这些 GO 类别和 KEGG 通路的富集，为转录组水平的进一步研究

提供了一定的基础。本实验中，通过对 GO 类别进行显著性分析，发现 T3 vs T1 组中差异基因参与的过程主要包括蛋白质分解过程、丝氨酸型内肽酶活性等 7 个途径；KEGG 通路注释中共注释了细胞黏附分子、代谢途径、神经活性配体-受体相互作用、类固醇生物合成等多种途径，这些功能基因和通路途径的发现为红鳍东方鲀分子水平上应激机理的研究提供了较为全面的基础数据。

### 3.3 热应激下肝脏响应分析

鱼类的应激反应是具有损伤性的各种环境因子对鱼体产生超常刺激后，鱼体产生的一系列特异性和非特异性反应<sup>[30]</sup>。在温度作为环境胁迫因子的研究中发现，代谢通路的变化是鱼类机体胁迫响应的主要方式之一<sup>[31-33]</sup>。同时，细胞黏附分子在水产动物免疫防御中起着重要作用。细胞黏附分子是位于细胞膜表面的跨膜蛋白，在细胞识别、黏附等过程中具有重要作用<sup>[34]</sup>。本研究结果表明，高含量牛磺酸主要通过降低代谢过程、牛磺酸与牛磺酸代谢、类固醇生物合成，并增强神经活性配体-受体相互作用通路引起红鳍东方鲀温度响应，而低含量牛磺酸主要通过增强细胞黏附分子、神经活性配体-受体相互作用通路引起红鳍东方鲀温度响应。与此不同，文鑫<sup>[35]</sup>在探究暗纹东方鲀应对低温胁迫的分子机制的研究中发现，真核生物的核糖体合成、二羧酸代谢、RNA 转运、PPAR 信号通路、脂肪酸合成是暗纹东方鲀温度响应的重要通路。这表明饲料中添加牛磺酸可能改变了红鳍东方鲀的温度响应方式，且牛磺酸添加量不同时，其响应方式也存在一定差异。本实验中，在急性热应激的作用下，细胞黏附分子、神经活性配体-受体相互作用通路差异基因的表达量出现上调，与此相反，代谢通路的差异基因表达量出现下调，其中如 *itpkcb*、*chkb*、*urad*、*EXT1*、*hmgs1*、*ebp*、*hao2* 及一些新的代谢基因的转录水平出现下调，而鮰 (*Silurus asotus*)<sup>[36]</sup> 和胡瓜鱼 (*Osmerus mordax*)<sup>[37]</sup> 在受到热应激后，其代谢水平明显上调，饥饿斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[38]</sup> 在冷应激后，主要通过减少细胞损伤和改善能量代谢进行温度响应，但南极鱼 (*Pagothenia borchgrevinkii*)<sup>[39]</sup> 在热应激后没有明确的响应，这可能是由于不同

鱼类在受到环境因子刺激后存在不同的适应机制。

#### 4 结论

采用高通量测序技术对投喂牛磺酸添加量为0%、1.0%和5.0%饲料的红鳍东方鲀肝脏进行转录组测序分析,结果表明,随着饲料中牛磺酸添加量的增加,红鳍东方鲀的热应激调控机制出现变化,高添加量组中代谢调节、神经活性配体-受体相互作用是红鳍东方鲀温度响应的重要组成部分,低添加量组中细胞黏附分子、神经活性配体-受体相互作用是红鳍东方鲀温度响应的主要通路。

#### 参考文献:

- [1] Kikuchi K, Iwata N, Kawabata T, et al. Effect of feeding frequency, water temperature, and stocking density on the growth of tiger puffer, *Takifugu rubripes*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2006, 37(1): 12-20.
- [2] Ma Z Z, Jiang Z Y, Dong H B, et al. The study of heat stress injury and digestive tract immunity in fish[J]. Ocean and Fishery, 2019(7): 98-99. [马志洲, 姜志勇, 董宏标, 等. 鱼类的热应激损伤与消化道免疫研究[J]. 海洋与渔业, 2019(7): 98-99.]
- [3] Pan X H, Wang S Q, Niu T X. Study on the effect of stress on animal immune function[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1996, 32(1): 52-53. [潘兴华, 王水琴, 牛廷献. 应激对动物免疫功能影响的研究[J]. 中国兽医杂志, 1996, 32(1): 52-53.]
- [4] Zhang J J, Zhu J, Lin Z T. Changes in expression level of HSP70 protein of *Paa yunnanensis* in Lijiang under thermal acclimation[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2009, 29(4): 42-46. [张晶晶, 朱静, 林钟婷. 丽江双团棘胸蛙热驯化中 HSP70 表达量的变化[J]. 西南林学院学报, 2009, 29(4): 42-46.]
- [5] Huxtable R J. Physiological actions of taurine[J]. Physiological Reviews, 1992, 72(1): 101-163.
- [6] Dong X Q, Zhang D M, Ge C X. Research progress of taurine in fish nutrition[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(6): 125-127. [董晓庆, 张东鸣, 葛晨霞. 牛磺酸在鱼类营养上的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 125-127.]
- [7] Wang H W, Ye J D, Chen J C. Taurine: Effect in fish nutrition and application in fish feed[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(7): 1418-1428. [王和伟, 叶继丹, 陈建春. 牛磺酸在鱼类营养中的作用及其在鱼类饲料中的应用[J]. 动物营养学报, 2013, 25(7): 1418-1428.]
- [8] Yu G Q. Biological function and application of taurine[J]. Feed Review, 1997, 9(5): 33-34. [俞国乔. 牛磺酸的生物学功能及其应用[J]. 饲料博览, 1997, 9(5): 33-34.]
- [9] Pasantes-Morales H, Quesada O, Morán J. Taurine: An osmolyte in mammalian tissues[M]//Taurine 3. Boston: Springer, 1998, 442: 209-217.
- [10] Bkaily G, Haddad G, Jaalouk D, et al. Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  transport by taurine in heart and vascular smooth muscle[M]//Taurine 2. Boston: Springer, 1996, 403: 263-273.
- [11] Shim K S, Jung H J, Na C S, et al. Effects of taurine on lipid metabolism and protein synthesis in poultry and mice[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2009, 22(6): 865-870.
- [12] Yang H J, Tian L X, Huang J W, et al. Dietary taurine can improve the hypoxia-tolerance but not the growth performance in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(5): 1071-1078.
- [13] Higuchi M, Celino F T, Shimizu-Yamaguchi S, et al. Taurine plays an important role in the protection of spermatogonia from oxidative stress[J]. Amino Acids, 2012, 43(6): 2359-2369.
- [14] Lu Y B, You C H, Wang S Q, et al. Physiological changes in *Siganus canaliculatus* after shallow water stress and anti-stress effects of taurine[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 68-74. [卢玉标, 游翠红, 王树启, 等. 浅水应激后黄斑蓝子鱼生理指标变化及牛磺酸的抗应激作用[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 68-74.]
- [15] Tian Q Q, Hu Y, Mao P, et al. Effect of dietary taurine supplementation on growth, intestine structure and resistance to acute crowding stress in juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fed low fish meal diets[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(9): 1330-1339. [田芊芊, 胡毅, 毛盼, 等. 低鱼粉饲料中添加牛磺酸对青鱼幼鱼生长、肠道修复及抗急性拥挤胁迫的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(9): 1330-1339.]
- [16] Shi Y, Hu Y, Tian Q Q, et al. Effect of taurine supplementation on growth, immunity and resistance ability of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*) under different stocking densities[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(9): 4131-4143. [石勇, 胡毅, 田芊芊, 等. 饲料中添加牛磺酸对不同养殖密度下青鱼幼鱼生长、免疫及抗胁迫能力的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 4131-4143.]
- [17] Cheng C H, Guo Z X, Wang A L. The protective effects of taurine on oxidative stress, cytoplasmic free- $\text{Ca}^{2+}$  and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 77: 457-464.
- [18] Frosini M, Sesti C, Palmi M, et al. The possible role of taurine and gaba as endogenous cryogens in the rabbit[M]//Taurine 4. Boston: Springer, 2000, 483: 335-344.
- [19] Sgaragli G, Frosini M, Palmi M, et al. Calcium and taurine interaction in mammalian brain metabolism[M]//Taurine in

- Health and Disease. Boston: Springer, 1994, 359: 299-308.]
- [20] Sun M L. Revealing osmotic pressure regulating mechanism of *Takifugu rubripes* based on transcriptome technology[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017. [孙梦蕾. 基于转录组技术揭示红鳍东方鲀的渗透压调节机制[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.]
- [21] Liao X L, Cheng L, Xu P, et al. Transcriptome analysis of crucian carp (*Carassius auratus*), an important aquaculture and hypoxia-tolerant species[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e62308.
- [22] Liu J L, Deng S P, Jiang D N, et al. Screening of ovarian genes associated with reproduction in *Macrobrachium rosenbergii* and their changes in expression pattern in different development stages after *ERR* interference[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(3): 8-16. [刘金磊, 邓思平, 江东能, 等. *ERR*-dsRNA 对罗氏沼虾卵巢中 *ERR* 及生殖相关基因表达的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(3): 8-16.]
- [23] Shi D J, Hu J Y, Wang S S, et al. Transcriptome analysis of skin of red and white koi carp *Cyprinus carpio haematopterus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(4): 475-481. [史东杰, 胡金有, 王赛赛, 等. 红白锦鲤皮肤转录组测序分析[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 475-481.]
- [24] Luo H, Ye H, Xiao S J, et al. Application of transcriptomics technology to aquatic animal research[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(4): 598-607. [罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 598-607.]
- [25] Li Y J. Transcriptome analysis of liver and head kidney in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals the response to heat stress by RNA-seq[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2018. [李永娟. 基于 RNA-seq 的热应激条件下虹鳟肝脏和头肾转录组分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.]
- [26] Han Z F. Transcriptome profiling analysis and transforming upon acute overstocking stress in *Larimichthys crocea*[D]. Xiamen: Jimei University, 2016. [韩兆方. 大黄鱼转录组数据挖掘及密集胁迫前后皮肤转录组变化[D]. 厦门: 集美大学, 2016.]
- [27] Yang K. Analysis of functional genes related to heat stress in turbot and identification of shared markers in QTL intervals of high temperature tolerance[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [杨凯. 大菱鲆热胁迫相关功能基因分析及耐高温性状 QTL 区间内共享标记筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [28] Wang J. Effects of environmental factors on salinity tolerance of *Takifugu obscurus* and their differences at transcriptome level[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018. [王骏. 暗纹东方鲀耐受盐度能力的环境因子效应及其在转录组学水平上的差异[D]. 南京: 南京师范大学, 2018.]
- [29] Zhao Y L. Transcriptomics of *Gymnocypris ekcloni* under hypoxia and the expression regulation of major differentially genes[D]. Xining: Qinghai University, 2018. [赵永丽. 花斑裸鲤低氧胁迫转录组学及其主要差异基因表达调控研究[D]. 西宁: 青海大学, 2018.]
- [30] Kong S B, Jiang D Z, Zu X Q, et al. Advances in stress biology of fish[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015(16): 255-256. [孔淑碧, 江德中, 祖学勤, 等. 鱼类应激生物学研究进展[J]. 现代农业科技, 2015(16): 255-256.]
- [31] Vergauwen L, Benoot D, Blust R, et al. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 157(2): 149-157.
- [32] Hu J W, You F, Wang Q, et al. Transcriptional responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to low temperature[J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e108582.
- [33] Qian B Y, Xue L Y. Liver transcriptome sequencing and de novo annotation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under heat and cold stress[J]. Marine Genomics, 2016, 25: 95-102.
- [34] Edelman G M, Crossin K L. Cell adhesion molecules: Implications for a molecular histology[J]. Annual Review of Biochemistry, 1991, 60(1): 155-190.
- [35] Wen X. Study on physiological response and molecular mechanism of *Takifugu fasciatus* to low temperature stress[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019. [文鑫. 暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)应对低温胁迫的生理响应和分子机制研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2019.]
- [36] Liu S K, Wang X L, Sun F Y, et al. RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish[J]. Physiological Genomics, 2013, 45(12): 462-476.
- [37] Jeffries K M, Connon R E, Davis B E, et al. Effects of high temperatures on threatened estuarine fishes during periods of extreme drought[J]. The Journal of Experimental Biology, 2016, 219(11): 1705-1716.
- [38] Lu D L. Mechanisms of fasting enhance cold tolerance in zebrafish (*Danio rerio*)[D]. Shanghai: East China Normal University, 2019. [鲁栋梁. 饥饿提高斑马鱼(*Danio rerio*)冷应激耐受的机制探究[D]. 上海: 华东师范大学, 2019.]
- [39] Bilyk K T, Cheng C H C. RNA-seq analyses of cellular responses to elevated body temperature in the high Antarctic cryopelagic nototheniid fish *Pagothenia borchgrevinki*[J]. Marine Genomics, 2014, 18: 163-171.

## Transcriptome analysis of the response mechanisms to acute heat stress with dietary taurine supplementation in *Takifugu rubripes*

SHI Lidong<sup>1</sup>, ZHAI Haojie<sup>1</sup>, WEI Libo<sup>1</sup>, MU Yushuang<sup>1</sup>, LI Zhuo<sup>1</sup>, JIANG Chen<sup>1, 2</sup>, REN Tongjun<sup>1, 2</sup>, HAN Yuzhe<sup>1, 2, 3</sup>

1. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
3. Key Laboratory of Applied Biology and Aquaculture of Northern Fishes in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

**Abstract:** *Takifugu rubripes* is a fierce, benthic, carnivorous, and stenothermic fish species. With global warming, physiological reactions such as stress are more common, due to rising temperatures in factory cultures, which result in declined breeding benefits. Stress can disrupt intracellular homeostasis and cause changes in other physiological and immune responses. Temperature is an important environmental variable that affects immune responsiveness in fish. Among temperature stressors, heat stress is considered the most basic mechanism of cell protection in animals. Increased body temperature due to changes in the environmental temperature is a natural physiological response in fish, so it is practical to study the response of the vital organs of fish under heat stress. Taurine promotes fish growth, improves immune ability and stress resistance, and is closely related to the physiological and nutritional status of aquatic animals under stress. To explore the relationships between taurine and acute heat stress tolerance in fish, three diets of 0% (T1, control), 1.0% (T2), and 5.0% (T3) taurine were fed to *T. rubripes* [initial body weight: (32.28±0.20) g] for 56 d. At the end of the breeding experiment, a high-temperature [(28±0.3) °C] stress test was conducted for 30 min, and the three experimental groups were analyzed for their liver transcriptomes by RNA-Seq. The differentially expressed genes (DEGs) were screened with a threshold criterion of  $P<0.05$ . In total, 167 DEGs were identified under acute heat stress among which 111 genes were up-regulated and 56 genes were down-regulated. Gene ontology (GO) enrichment analysis showed that most of the DEGs in the T3 vs T1 group were significantly enriched in the proteolysis, serine-type peptidase activity, serine-type endopeptidase activity, serine hydrolase activity, endopeptidase activity, L-amino acid peptidase activity, and peptidase activity pathways. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis showed that most of the DEGs were involved in cell adhesion molecules and neuroactive ligand-receptor interaction pathways in T2 vs T1, while most of the DEGs were involved in the neuroactive ligand-receptor interaction and metabolic pathways in T3 vs T1. These results suggest that dietary taurine supplementation can change the temperature response of *T. rubripes* under acute heat stress and that the response varied with the amount of taurine. Real-time PCR (RT-PCR) was used to verify the transcriptome sequencing results, and the results showed similar expression patterns for 3 different genes in the RNA-seq and RT-PCR data. This indicates that the gene expression results of the transcriptome sequencing are credible. This study provides foundational information to further studying the effects of dietary taurine supplementation on the acute heat stress response in *T. rubripes*. This study also serves as an indicator of taurine's ability to resist heat stress.

**Key words:** *Takifugu rubripes*; taurine; transcriptome sequencing; response mechanism; heat stress

**Corresponding author:** HAN Yuzhe. E-mail: hanyuzhe@dlou.edu.cn