

光强对欧洲舌齿鲈稚鱼眼组织基因表达的影响

吴禹濛^{1,2}, 袁 震^{1,2}, 姜洁明^{1,2}, 张 磊^{1,2}, 任星月¹, 姚安琪¹, 宋昌斌³,
闫红伟^{1,2}, 刘 鹰^{1,2,4}

(1. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023; 2. 设施渔业教育部重点实验室, 辽宁 大连 116023; 3. 中国科学院半导体研究所, 北京 100083; 4. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 大多数海水鱼类靠视觉器官识别并捕捉饵料, 光强对其视觉器官基因表达影响的研究较少。为探究光照强度对鱼类眼内基因表达的影响, 本实验以孵化后 30 d 的欧洲舌齿鲈为研究对象, 在白光 2.0 W/m²(W 2.0)、1.0 W/m²(W 1.0)和 0.3 W/m²(W 0.3)条件下对其进行了为期 66 d 的养殖实验。实验结束后, 首先比较三组稚鱼的体长、湿重和存活率, 结果发现, W 2.0 组饲养的稚鱼体长和湿重显著低于 W 1.0 和 W 0.3 组稚鱼($P < 0.05$), 但三组之间的存活率无显著性差异($P > 0.05$)。然后, 我们构建了 W 2.0 和 W 0.3 组两组稚鱼眼组织的转录组文库并进行高通量测序, 结果共获得差异表达基因 368 个, 与 W 0.3 组相比, W 2.0 组中 234 个基因上调表达, 134 个基因下调表达。最后对筛选得到的晶状体纤维主要固有蛋白(lens fiber major intrinsic protein, *MIP*), 视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein, *RBP*), 维生素 A 脱氢异构酶(retinoid isomerohydrolase, *RPE65*), 热休克同源 70(heat shock cognate 70, *HSC70*), 伸长因子 1- α (elongation factor 1-alpha, *EF1A*)和葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphate isomerase, *GPI*) 6 个差异表达基因进行 qPCR 验证, 结果与转录组数据一致, 且它们可能在稚鱼响应光照强度的过程中起着重要作用。以上结果说明光照强度可以影响鱼类眼内基因的表达, 将为研究光照强度对鱼类视觉的影响机制提供基础数据, 同时也对欧洲舌齿鲈稚鱼的健康养殖具有一定的参考价值。

关键词: 欧洲舌齿鲈稚鱼; 光照; 生长; 眼睛; 转录组; 差异表达基因

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2021)02-0040-11

DOI: 10.11759/hyxx20200229002

光照是影响鱼类生长发育中的重要因素, 它对鱼类摄食、生长、发育和繁殖等都有一定影响^[1-2]。光照的三要素为光照强度、光谱和光周期^[3]。不同鱼类和鱼类发育的不同阶段对光照强度的需求均存在差异, 如 Vander 等^[4]研究了光照强度对大西洋鳕(*Gadus morhua*)生长的影响, 结果显示高光照强度下大西洋鳕生长更快、存活率更高。谢从新等^[5]也发现随着光照强度的增大, 乌鳢(*Channa argus*)幼鱼的摄食强度逐渐减小。一般认为, 大多数海水鱼靠视觉进行摄食, 无论其与食物的距离长短, 视觉在捕食过程中均非常关键, 在水产养殖中与鱼类视觉系统匹配的照明条件可以增加其对饵料的辨识度, 缩短搜索食物时间并最终促进生长和提高存活率^[6-7]。研究证实, 光照强度对不同鱼类的影响具有差异^[8-9], 光照强度过低或过高, 会影响鱼类的摄食行为, 从而对生长产生胁迫^[10-13]。有研究表明光照强度会影响鱼类的视觉系统, 将白化斑马鱼(*Danio rerio*)和白化

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)饲养在连续强光照条件下, 发现其视网膜受到光损伤, 主要表现为感光层细胞的凋亡^[14]。即使是对外界光胁迫抵抗能力较高的体色正常的鱼类, 如欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、大西洋鳕和大西洋鲑(*Salmo salar*), 24 h 持续照明条件下, 它们视网膜的感光层会变薄^[15]。因此, 鱼类在过高的光照强度下, 其视觉会受到损害, 进而有可能影响其摄食行为和生长。

在前人的研究中发现, 在蓝光照射下, 金鱼(*Carassius auratus*)的 TUNEL 测定结果显示, 视网膜有大量的细胞凋亡, 另外黑色素浓缩激素(melanin concentration hormone, MCH)和半胱天冬酶

收稿日期: 2020-02-29; 修回日期: 2020-04-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFB0404000)

[Foundation: National Key R&D Program of China, No. 2017YFB0404000]

作者简介: 吴禹濛(1995-), 女, 辽宁盘锦人, 在读研究生, 主要从事水产养殖研究, 电话: 15754038162, E-mail: 1102567594@qq.com; 闫红伟, 通信作者, E-mail: yanhongwei@dlou.edu.cn

-3(caspase-3)基因表达上调, MCH-R mRNA 的表达随着蓝光暴露和强度的增加而显著增加, 增加视网膜黑色素聚集, caspase-3 是广泛用于细胞凋亡的指标, 是细胞凋亡的核心作用酶, 以上两个基因上调表明蓝光照射下会对视网膜造成损伤, 这与 TUNEL 测定结果相符^[16]。而在另一项关于金鱼的研究表明, 在绿光处理下更有利于维持视网膜的稳定, 增强视网膜细胞的再生^[17]。但光照强度对鱼类视网膜内基因表达的影响还未见报道。

欧洲舌齿鲈, 或称舌齿鲈、狼鲈, 隶属鲈形目(Perciformes)、狼鲈科(Moronidae)、舌齿鲈属(*Dicentrarchus*)^[18], 欧洲舌齿鲈的含肉率高、营养价值高、抗病力强、适宜池塘和工厂化循环水养殖^[19], 是欧洲商业化养殖的第一个非鲑科海水鱼类, 是欧洲和地中海区域水产养殖业中的重要经济鱼类^[20]。2010 年, 中国科学院海洋研究所刘鹰研究员率先于 2010 年将其引种到我国进行人工养殖, 并于 2014 年突破其苗种繁育技术^[21]。为探究光照强度是否会影响欧洲舌齿鲈稚鱼的视觉系统, 本研究以孵化后 30 d 的欧洲舌齿鲈作为研究对象, 在白光 2.0 W/m²(W 2.0)、1.0 W/m²(W 1.0)和 0.3 W/m²(W 0.3)条件下对其进行为期 66 d 的养殖实验。实验结束后比较了 3 组稚鱼的体长、湿重和存活率, 根据结果构建了 W 2.0 和 W 0.3 两组稚鱼眼组织的转录组文库并进行了高通量测序, 以期查明光照强度对鱼类生长和视觉的影响机制提供基础数据, 并为养殖生产者提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验所用欧洲舌齿鲈(孵化后 30 d, 体长 12.52±1.34 mm, 湿重 92.35±4.77 mg)由大连富谷水产有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 养殖与光处理

首先将上述欧洲舌齿鲈稚鱼随机放置到 9 个 100 L 圆柱形桶(桶高 62 cm)中, 每桶养殖密度为 700 尾, 养殖周期为 66 d。根据鱼类生长情况投喂卤虫无节幼体(孵化后第 30 至 40 d)和卤虫成体(孵化后第 41 至 96 d), 每天投喂 6~8 次, 每次饱食投喂, 投喂前均使用强化剂(50 DE 微囊, 山东省升索渔用饲料研究中心)强化卤虫无节幼体。每天各养殖水桶统一换水数次, 并清洁养殖容器, 去除残饵粪便与

死亡幼体。保持各养殖水桶中盐度为 33, 温度为 18.5~19.5℃溶氧为 8 mg/L 以上, pH 7.9~8.1, NH₄-N < 0.2 mg/L, NO₂-N < 0.05 mg/L。

本实验采用人工 LED 光源(深圳市超频三科技股份有限公司)照明, 共设置 3 种不同的光照处理组(3 种光照强度)来开展养殖实验, 包括 0.3 W/m²、1.0 W/m²和 2.0 W/m²的白光(表示为: W 0.3, W 1.0, W 2.0)。由可调节光强的 3 盏 LED 灯提供光照, 每个光照处理组设置 3 个养殖平行(共在 9 个养殖水桶中开展实验)。采用不透光的灰色幕布将 2 个处理组进行隔离并防止外界光线的影响, 且每天使用光谱辐射分析仪(PLA-20, 杭州远方光电信息股份有限公司)在水面上进行测试一次, 确保实验期间光环境的稳定。

1.2.2 生长数据计算

在实验结束时随机每组选取 20 尾稚鱼, 冰上低温麻醉后, 测定其体长和湿重。每天计数表面和底部死亡鱼的个数, 存活率的测定参考 Yan 等的研究^[22]。

1.2.3 RNA 提取

根据生长数据结果, 为保证试验数据可靠性, 另取 W 0.3 和 W 2.0 组的稚鱼麻醉(20 尾/桶), 于低温条件下分离眼组织, 放入装有 RNA later 的离心管中, 之后在-80℃超低温冰箱中进行保存。眼组织的总 RNA 的提取采用 RNeasy Mini Kit 试剂盒(Qiagen, 德国), 根据说明书操作。采用 Agilent 2100 生物分析仪和 Nanodrop ND-1000 分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。

1.2.4 基因文库构建及转录组分析

样品检测合格后, 将之前提取的总 RNA 等量混合, 送样至北京诺禾致源生物有限公司进行文库构建和转录组测序。

测序产生的数据(reads)作为原始数据(raw data), 将带接头的、低质量的 reads 过滤除去进而得到高质量可用数据(clean reads)。利用组装软件 Trinity 对获得的高质量测序数据进行序列组装。

通过 BLASTX 将转录本与 NCBI、SwissProt、KEGG、GO、COG、KOG、EggNOG、Pfam9 个数据库比对。利用 Blast2 GO 软件进行基因本体(GO)注释, 并使用 TopGo 进行富集分析。序列也进一步与 COG 和 EggNOG 数据库进行比对, 并对基因序列进行功能预测和功能分类。利用 Perl script 进行 KEGG 通路的富集对基因产物在细胞中的功能及其代谢途径进行系统分析。通过在线 KEGG 自动注释服务(KAAS), 可以得到的每条序列的京都基因与基

基因组同源体系分析(KO)注释,并映射到相应的KEGG通路中。

1.2.5 差异表达基因的鉴定

利用 FPKM 值表示对应非重复序列基因(unigene)的表达丰度。FPKM 计算公式如下:

每一百万个 map 上的 reads 中 map 到外显子的每 1K 碱基上的 Fragments 个数(FPKM)=cDNA 片段(cDNA fragments)/图谱片段(百万)[mapped fragments (millions)]/转录长度[transcript lengths (kb)]。

筛选差异表达基因的标准为错误发现率(False Discovery Rate, FDR)≤0.01 和差异倍数(log₂ fold change, FC)>1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers used for PCR amplification of differentially expressed genes in *Dicentrarchus labrax*

基因名称	引物	引物序列	产物大小/bp
晶状体纤维主要固有蛋白	上游	TCGGTCCTCTTTTAAATGCC	194
	下游	GAGCGCAGCTGAGTTGACTT	
热休克同源 70	上游	AATGGCCTGGAGTCATATGC	226
	下游	CGGCACTCTGGTACAGCTTA	
葡萄糖-6-磷酸异构酶	上游	CAGCTGGAGTCTTTCCCTTC	166
	下游	CACGCCTTCTACCAGCTCAT	
伸长因子 1-α	上游	GATGACCTGGGCGTTGAAGT	161
	下游	TGGAGATGCACCACGAGTCT	
维生素 A 脱氢异构酶	上游	ACACATATGCCTACGGCCTG	179
	下游	CACGATGGTCAGCAGCACTC	
视黄醇结合蛋白 3	上游	CCGACATCTTCCTCAGCATC	180
	下游	CTGGCTTTGTTTCAGGACGTG	
β-actin	上游	GAAGATTCAAGGCATGCATTA	102 ^[21]
	下游	TAGCATACCCTATGAACTGGGT	

1.2.7 统计分析

实时荧光定量数据以 2^{-ΔΔCT} 法处理。采用统计软件 IBM SPSS 22.0(IBM, Armonk, NY, 美国)中的 *t* 检验分析眼内的基因表达的显著性差异,使用 Duncan 检验两个不同光照组之间稚鱼体长、湿重和存活率,显著性设定为 *P*<0.05 和 *P*<0.01。

2 结果

2.1 不同光强的白光对欧洲舌齿鲈稚鱼生长的影响

在实验结束时, W 2.0 组稚鱼的体长和湿重显著

1.2.6 实时定量 PCR

为了验证转录组数据的正确性,采用实时定量 PCR 检测晶状体纤维主要固有蛋白、视黄醇结合蛋白 3、维生素 A 脱氢异构酶、热休克同源 70、伸长因子 1-α 和葡萄糖-6-磷酸异构酶 6 个基因的表达。引物使用 Primer Premier 5.0 软件进行设计(表 1)。以提取的眼组织的 RNA 为模板,按照 SYBR FAST qPCR Kit Master Mix(2×)试剂盒说明书合成 cDNA,然后以其为模板,以 β-actin 为内参基因进行实时定量 PCR 扩增(Applied Biosystems 7900 HT Real-TimePCR 仪)。PCR 条件为: 95℃, 5 min; 95℃, 3 s 和 60℃, 20 s 共 40 个循环^[23]。

小于 W 0.3 和 W 1.0 处理组下饲养的稚鱼(*P*<0.05),但三组欧洲舌齿鲈稚鱼的存活率无显著性差异(*P*>0.05)(图 1)。

2.2 转录组测序与组装

经 Illumina Hiseq 2500 测序, W 0.3 处理组获得 raw reads(统计原始序列数据) 50 907 730 个, W 2.0 处理组获得 raw reads 50 265 736 个; W 0.3 处理组获得 clean reads 50 273 392 个, W 2.0 处理组获得 clean reads 49 277 200 个; W 0.3 处理组获得 clean bases(测序序列的个数乘以测序序列的长度) 7.54 GB, W 2.0 处理组获得 clean bases 7.39 GB。

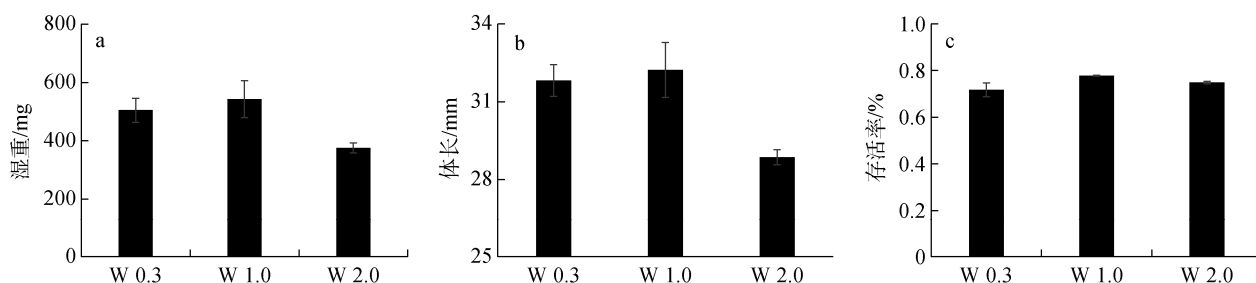


图 1 W 0.3、W 1.0 与 W 2.0 组欧洲舌齿鲈稚鱼的湿重、体长和存活率

Fig. 1 Wet weight, body length, and survival rate of *Dicentrarchus labrax* juveniles in the W 0.3, W 1.0, and W 2.0 groups

注: W: 白光, *: 差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 差异表达基因筛选及其功能富集分析

根据两个 RNA 样本基因的差异表达丰度来做差异表达分析。如图 2 所示, 共得到的差异表达基因有 368 个, 与 W 0.3 组相比, W 2.0 组中 234 个基因上调表达, 134 个基因下调表达(图 2)。

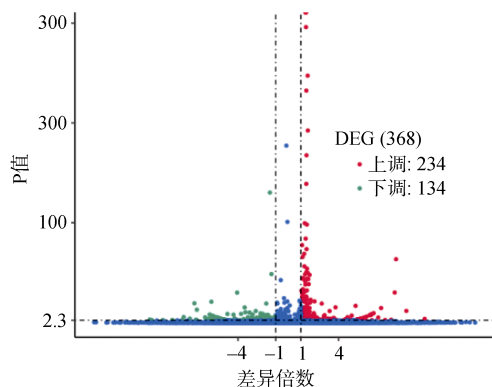


图 2 W 0.3 与 W 2.0 组欧洲舌齿鲈稚鱼眼内差异表达基因的火山图

Fig. 2 Volcano plot of differentially expressed genes in the eye of *D. labrax* between the W 0.3 and W 2.0 groups

注: 红色点代表表达上调的基因; 绿色点代表表达下调的基因; 蓝色点代表基因表达水平正常

在筛选得到的差异表达基因中, 晶状体纤维主要固有样蛋白(MIP), 晶状体纤维膜固有蛋白(lens fiber membrane intrinsic protein), 晶状体纤维膜固有蛋白(lens fiber membrane intrinsic protein), 晶状体纤维膜固有蛋白样亚型 X1(lens fiber membrane intrinsic protein-like isoform X1)等, rho 相关的 btb 结构域, 包含蛋白 2 样亚型 X1(rho-related BTB domain-containing protein 2-like isoform X1), 胰岛素样生长因子结合蛋白 1(insulin-like growth factor-binding protein 1), 维生素 A 脱氢异构酶(RPE65)等均在 W 2.0 组出现了上调(表 2)。

对得到的 368 个差异表达基因进行 GO 分析发现, 差异表达基因主要富集在分子功能(MF)和生物学功能(BP)上。其中在 MF 上差异表达基因主要分布在细胞黏附(cell adhesion)、生物黏附(biological adhesion)、磷酸化(phosphorylation)等通路上。而在 BP 上差异表达基因主要分布在葡萄糖-6-磷酸异构酶激活(glucose-6-phosphate isomerase activation)、分子内氧化还原酶(intramolecular oxidoreductase), 且分布较少(图 3)。

表 2 W 0.3 与 W 2.0 组欧洲舌齿鲈眼内代表性的差异表达基因

Tab. 2 Differentially expressed genes in the eye of *D. labrax* between the W 0.3 and W 2.0 groups

基因名	差异倍数(W 2.0/W 0.3)	注释
Cluster-12044.126948	2.14	晶状体纤维主要固有蛋白
Cluster-12044.66417	3.32	晶状体纤维膜固有蛋白
Cluster-12044.74718	2.60	晶状体纤维膜固有蛋白
Cluster-12044.75099	2.66	晶状体纤维膜固有蛋白亚型 X1
Cluster-12044.77564	2.38	晶状体纤维主要固有蛋白
Cluster-12044.77983	2.35	晶状体纤维主要固有蛋白
Cluster-12044.99465	2.51	晶状体纤维膜固有蛋白
Cluster-12044.76151	2.25	晶状体纤维膜固有蛋白

续表

基因名	差异倍数(W 2.0/W 0.3)	注释
Cluster-12044.75559	2.10	视网膜醛结合蛋白 1
Cluster-12044.78026	2.13	视黄醇结合蛋白 3
Cluster-12044.76857	6.23	视黄醇结合蛋白 3
Cluster-12044.127436	3.18	热休克同源 70
Cluster-12044.168690	2.04	视网膜 G 蛋白偶联受体样 RPE
Cluster-12044.172822	2.89	蛋白 2 样亚型 X1
Cluster-12044.187133	3.56	胰岛素样生长因子结合蛋白 1
Cluster-12044.196439	2.25	维生素 A 脱氢异构酶
Cluster-12044.72787	9.65	视锥视紫红质敏感 cGMP 3', 5'-环磷酸二酯酶亚单位 γ 样
Cluster-12044.202225	2.55	视网膜 G 蛋白偶联受体
Cluster-12044.193339	40.50	锥体 cGMP 特异性 3', 5'-环磷酸二酯酶亚单位 α

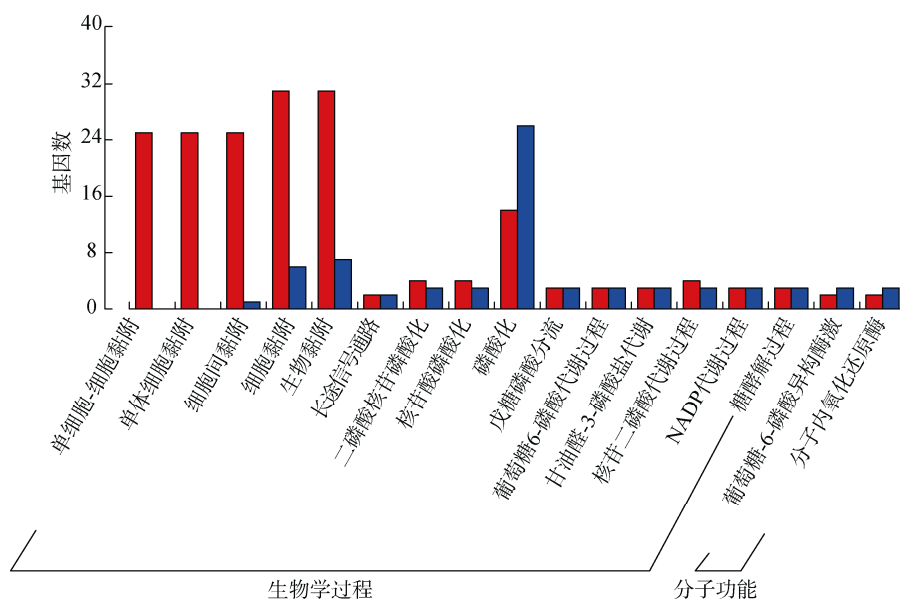


图 3 W 0.3 与 W 2.0 组欧洲舌齿鲈眼内差异表达基因的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in the eye of *D. labrax* between the W 0.3 and W 2.0 groups

KEGG 富集分析结果如图 4 所示, 差异基因富集在碳代谢(carbon metabolism), 乙醛酸盐和二羧酸盐代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism), RNA 转运(RNA transport), 氧化磷酸化(oxidative phosphorylation), 三羧酸循环 TCA 循环(citrate cycle TCA cycle), 淀粉和蔗糖的代谢(starch and sucrose metabolism), 军团杆菌病(legionellosis), 磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)等 20 个通路上。在这些通路中, RNA 转运、核糖体、氧化磷酸化和碳代谢上差异表达基因的分布相对较多。

2.4 qPCR 结果

对得到的 6 个差异表达基因进行验证, 结果显

示在 W 2.0 组稚鱼眼内 MIP、HSC70、RBP3、RPE65、EF1A 和 GPI 基因的表达都显著高于 W 0.3 组稚鱼 ($P < 0.05$, 图 5), 这与转录组结果一致。

3 讨论

许多海洋鱼类靠视觉觅食, 并且需要一个最低光照强度阈值; 但是对高光强影响稚鱼视觉, 进而影响其摄食和生长, 目前关于这方面的认识仍然不足。前人的研究主要集中在光照条件对眼睛, 尤其是视网膜的组织学上的观察, 而对眼内基因的相关性表达产生的影响的报道少之又少。Bayarri 等人研究发现影响欧洲舌齿鲈眼睛视网膜敏感性光阈值为 0.06 W/m^2 [24], Villamizar 等人设置光照强度为 0.42 W/m^2 ,

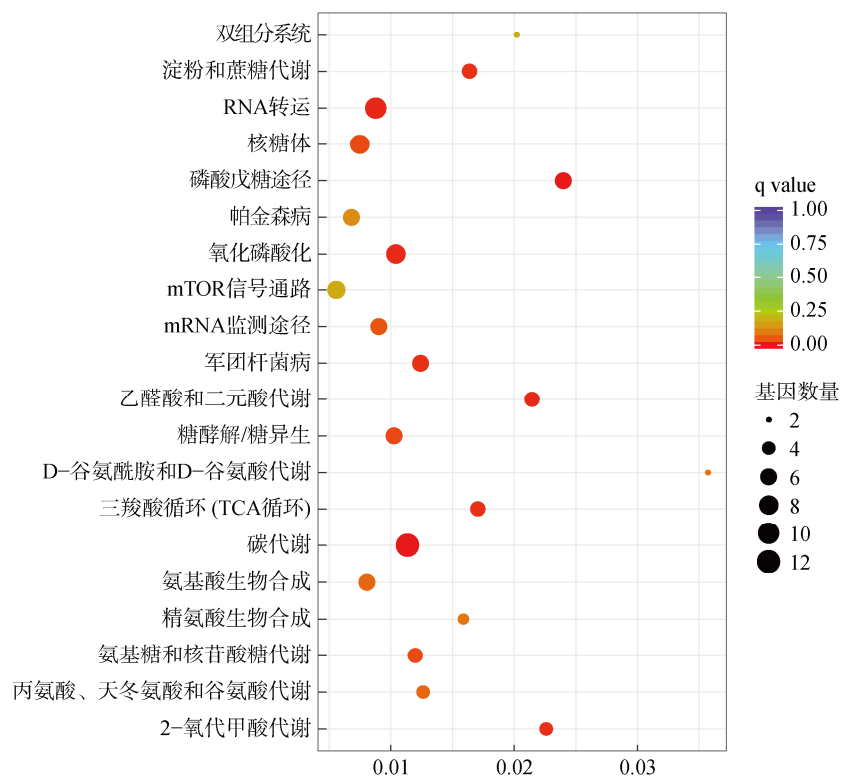


图 4 W 0.3 与 W 2.0 组欧洲舌齿鲈眼内差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in the eye of *D. labrax* between the W 0.3 and W 2.0 groups

注: qvalue: 差异显著性

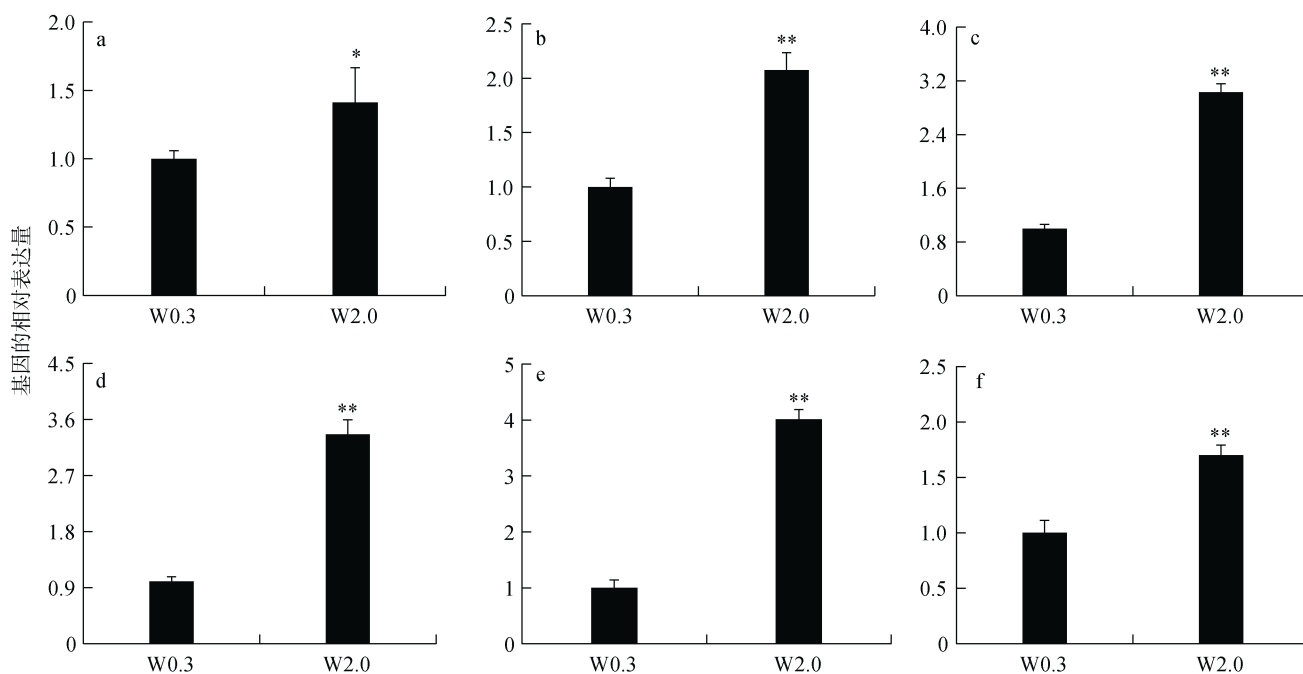


图 5 W 0.3 与 W 2.0 组欧洲舌齿鲈眼内 6 个基因表达

Fig. 5 Expression of six genes in the eye of *D. labrax* between the W 0.3 and W 2.0 groups

注: W: 白光, *: 差异显著 ($P < 0.05$), **: 差异极显著 ($P < 0.01$); 子图 a: MIP; b: HSC70; c: GP; d: RBP3; e: EFIA; f: RPE65

使欧洲舌齿鲈眼睛和血浆中褪黑激素含量产生变化^[25]。在本研究中,我们的研究任务是查明当光照强度增加时,欧洲舌齿鲈稚鱼的生长、存活和视觉是否受到影响。因此我们将稚鱼分别暴露于 0.3 W/m²、1.0 W/m² 和 2.0 W/m² 这 3 个光照强度下,形成 3 个处理组。实验结束时,在光照强度为 2.0 W/m² 下饲养的稚鱼的平均体长、湿重均显著小于 1.0 或 0.3 W/m² 下饲养的稚鱼($P<0.05$),而 1.0 和 0.3 W/m² 光照强度下饲养的稚鱼平均体长无显著差异($P>0.05$),3 个处理组之间的存活率无显著性差异($P>0.05$)。前人研究证明,漠斑牙鲈(*Paralichthys lethostigma*)暴露于 100 lx 的光照强度以下时生长和存活率都有所降低^[26]。金头鲷(*Sparus aurata*)在中等强度下生长较好,可能是由于这种光强下会刺激视网膜上的色素,增加其辨别猎物的能力^[27]。加州鲈鱼(*yellow perch*)的反应距离,随着光强的降低而逐渐降低,当光强度下降到小于 2 lx 时,最大平均反应距离显著下降,在黑暗中最小反应距离减小^[28]。另在禽类中,光照强度在 1~65 lx,对鸡的生长没有影响,而在 130~290 lx 的光照下会抑制鸡的生长^[29]。由此可见,因不同物种的生活环境不同,其对光强的适应范围各有不同,过低或者是过高的光强都会对其生长产生影响。因此,在养殖生产中,了解鱼类生长所需的合理光照强度至关重要。

一般认为大部分海水鱼是通过视觉来摄食,在 W 2.0 组稚鱼的生长较差,可能是因为 2.0 W/m² 对鱼类来说属于高光强,高光强可能会影响其视觉,进而对其生长产生影响。与高等脊椎动物相比,多数鱼类的眼睛无眼睑,不能调节瞳孔大小来控制入射视网膜的光强度,所以在高光强下鱼类的视网膜更容易受到伤害^[30]。研究表明,将大西洋鳕、大西洋鲑和欧洲舌齿鲈置于 24 h 高光强照明条件下,它们的视网膜会受到损伤^[15]。我们前期研究中发现,24 h 连续照明条件下,欧洲舌齿鲈稚鱼的视网膜各层厚度会受到影响,且感光层均会受到不同程度的损伤,相比 W 0.3 组, W 2.0 组稚鱼的视网膜感光层受损更为严重,除视杆细胞的损伤外,我们还发现视锥细胞外节出现缩短的现象,在肿胀的内节里出现细胞核溶解,这是一种细胞坏死的标志^[22]。研究发现,光诱导的光感受器细胞损伤是从外节末端开始的,这表明外节层是最先遭受损伤的,损伤的严重程度和膜盘的更新速度有关^[31]。赵颖熙研究发现,高光强可以引起豚鼠眼球眼轴增长减缓,对视网膜光感受器造成轻微损伤^[32]。然而,即使在哺乳动物中,光照对视

网膜造成的损伤的分子机制依旧不是十分清楚。

在本研究中,以高通量测序为研究手段,构建了 W 0.3 和 W 2.0 两组稚鱼的眼转录组文库,并筛选不同处理组之间的差异表达基因,以期从分子水平来解释光照强度对欧洲舌齿鲈视觉的影响。结果表明,共获得在 W 2.0 和 W 0.3 组稚鱼眼内差异表达的基因 368 个,与 W 0.3 组相比, W 2.0 组中 234 个基因上调表达, 134 个基因下调表达。在这些差异表达基因中,我们发现, MIP、RBP、RPE65、HSC70、EF1A 和 GPI 6 个基因均在 W 2.0 组高表达。这说明,这些基因的上调可能是对光照强度的响应,进而影响欧洲舌齿鲈稚鱼的视觉。

其中我们筛选得到的 MIP 为水通道蛋白的一种,主要在晶状体纤维细胞及视网膜中表达^[33]。截至目前,已经在植物、原生生物和脊椎动物中发现超过 200 种水通道蛋白^[33]。众所周知,人体内大部分器官,如肝、肾、眼等依赖于渗透压调节来维持各自的生理功能,所以水分对传递视觉信息,视网膜成像起着至关重要的作用^[33]。MIP 同时也具有结构性链接功能,它与晶状体正常代谢及透明度的维持密切相关。近年来的研究发现, MIP 也与白内障的发生密切相关^[33]。而白内障是由于晶状体病变而引起的疾病,晶状体在正常状态下是透明的,因不同原因引起的晶状体蛋白变性、水肿、纤维之间出现空泡,上皮细胞增生等,从而使晶状体透明性减弱,阻碍光线入射眼内,形成白内障,进而影响视力^[34-35]。HSC70 是 1999 年 Ballinger 等^[36]发现的具有辅助伴侣分子和泛素连接酶功能的蛋白质,可以通过其氨基端连接热休克蛋白调节蛋白质的重新折叠,同时通过其羧基端连接蛋白酶体促进底物的降解^[37]。HSC70 在所有的器官内几乎均有表达,但在代谢效率较高亦或是蛋白质更替较快的器官或组织中,如骨骼肌、心脏和脑中高表达,在胰腺、肺、肝、胎盘和肾脏中的表达水平相对较低^[37]。在正常情况下, HSC70 参与维持蛋白质的空间构象,起到细胞骨架等基本功能。可当细胞面临胁迫时,生物体会大量表达 HSC70 用于阻止变性蛋白质的积累,增加细胞的抗逆和保护机制^[38]。维生素 A 由视黄醇(维生素 A1)和 3-脱氢视黄醇(维生素 A2)组成,两者均为 20 碳的白芷酮环多烯醇一元醇,在动物体内,其多存在于肝脏中^[39]。在前人的研究中发现,维生素 A 是构成视觉细胞内感光物质的成分,是维持上皮组织健全所必须的物质,其不足时会引起维生素 A 缺乏综合征,如眼部视网

膜血管炎^[40]、夜盲症和干眼症^[41]。在我们筛选的基因中,我们发现,RBP3和RPE65两者均在W 2.0组稚鱼高表达,而RBP是维生素A的运载蛋白,在协助维生素发挥生理功能中起着不可替代的作用^[42]。综上,与W 0.3组相比,在W 2.0组中,上述基因在眼睛组织中的表达水平上升,可能是因为该光照条件对稚鱼视觉系统造成了胁迫,其作用机制尚需进一步研究。GPI又被称为磷酸葡萄糖异构酶,在所有真核生物和原核生物的细胞中普遍存在,是一类具有多功能生物活性的天然蛋白质^[43],它参与糖代谢的糖酵解作用^[44]。光电能的转换是视网膜组织的重要功能之一,这种转换过程需消耗大量的能量。这种能量的来源主要是依靠葡萄糖的酵解获得^[45]。因此,W 2.0组稚鱼的光电能的转换速率可能增加,进而使葡萄糖-6-磷酸异构酶表达水平升高。

4 结论

本研究以欧洲舌齿鲈稚鱼为研究对象,在白光光照强度为2.0 W/m²、1.0 W/m²和0.3 W/m²的条件下对其进行养殖。实验结束后比较了3组稚鱼的体长、湿重和存活率,且构建了W 0.3和W 2.0两组稚鱼眼组织的转录组文库并进行了高通量测序。研究发现白光饲养条件下,高光照强度会抑制欧洲舌齿鲈稚鱼的生长,这可能是由于高光照强度会对其视觉产生影响进而影响其摄食活动和生长。

参考文献:

- [1] Stuart K R, Drawbridge M. The effect of light intensity and green water on survival and growth of cultured larval California yellowtail (*Seriola lalandi*)[J]. Aquaculture, 2011, 321(1-2): 152-156.
- [2] Downing G, Litvak M K. The influence of light intensity on growth of larval haddock[J]. North American Journal of Aquaculture, 1999, 61(2): 135-140.
- [3] Villamizar N, Blanco-Vives B, Migaud H, et al. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review[J]. Aquaculture, 2010, 315(1-2): 86-94.
- [4] Vander M T, Jorstad K E. Growth and survival of Arctic - Norwegian and Norwegian coastal cod larvae (*Gadus morhua* L.) reared together in mesocosms under different light regimes[J]. Aquaculture Research, 2001, 32(7): 549-563.
- [5] 谢从新, 熊传喜. 不同光照强度下乌鳢幼鱼的摄食强度及动力学[J]. 水生生物学报, 1997, (3): 213-218.
- [6] Lee J S F, Britt L L, Cook M A, et al. Effect of light intensity and feed density on feeding behavior, growth and survival of larval sablefish *Anoplopoma fimbria*[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(8): 4438-4448.
- [7] Debose J L, Lema S C, Nevitt G A. Dimethyl-sulfoniopropionate as a foraging cue for reef fishes[J]. Science, 2008, 319(5868): 1356.
- [8] Bœuf G, Payan P. Does salinity have an influence on fish growth?[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A Molecular & Integrative Physiology, 2000, 126(1-4): 15-15.
- [9] Fielder D S, Bardsley W J, Allan G L, et al. Effect of photoperiod on growth and survival of snapper *Pagrus auratus* larvae[J]. Aquaculture, 2002, 211(1-4): 135-150.
- [10] Guroy D, Guroy B, Merrifield D L, et al. Effect of dietary Ulva and Spirulina on weight loss and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during a starvation period[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition volume, 2010, 95(3): 320-327.
- [11] De Silva S S, Anderson T A. Fish Nutrition in Aquaculture[M]. London: Chapman & Hall, 1995.
- [12] Strand A, Alanara A, Staffan F, et al. Effects of tank colour and light intensity on feed intake, growth rate and energy expenditure of juvenile Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L[J]. Aquaculture, 2007, 272(1-4): 312-318.
- [13] Wang T, Cheng Y Z, Liu Z P, et al. Effects of light intensity on husbandry parameters, digestive enzymes and whole body composition of juvenile *Epinephelus coioides* reared in artificial sea water[J]. Aquaculture Research, 2013, 46(4): 884-892.
- [14] Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, et al. Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death[J]. Journal of Experimental Biology, 2012, 215(21): 3799-3812.
- [15] Vera L M, Migaud H. Continuous high light intensity can induce retinal degeneration in Atlantic salmon, Atlantic cod and European sea bass[J]. Aquaculture, 2009, 296(1-2): 150-158.
- [16] Song J A, Choi C Y. Effects of blue light spectra on retinal stress and damage in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(1): 391-400.
- [17] Song J A, Kim N N, Choi Y J, et al. Effect of green light spectra on the reduction of retinal damage and

- stress in goldfish, *Carassius auratus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 476(2): 96-101.
- [18] 代明允, 任纪龙, 费凡, 等. LED 光色对欧洲舌齿鲈幼鱼抗氧化能力和消化能力的影响[J]. 海洋科学, 2019, 43(4): 16-21.
- Dai Mingyun, Ren Jilong, Fei Fan, et al. The effect of LED light color on the antioxidant capacity and digestive capacity of *Dicentrarchus labrax* larvae[J]. Marine Sciences, 2019, 43(4): 16-21.
- [19] Williams C, Carpenter G, Clark R, et al. Who gets to fish for sea bass? Using social, economic, and environmental criteria to determine access to the English sea bass fishery[J]. Marine Policy, 2018, 95: 199-208.
- [20] 郑纪盟, 张磊, 夏苏东, 等. 欧洲舌齿鲈人工繁育技术[J]. 科学养鱼, 2015, (4): 43-44.
- Zheng Jimeng, Zhang Lei, Xia Sudong, et al. Artificial breeding technology of *Dicentrarchus labrax*[J]. Scientific fish culture, 2015, (4): 43-44.
- [21] 高露, 徐承旭. 大连海洋大学工厂化繁育欧洲舌齿鲈苗种获得突破[J]. 水产科技情报, 2017, (5): 62.
- Gao Lu, Xu Chengxu. A breakthrough in the industrial breeding of *Dicentrarchus labrax* in Dalian Ocean University[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2017, (5): 62.
- [22] Yan H, Liu Q, Cui X, et al. Growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae cultured under different light spectra and intensities[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(8): 2066-2080.
- [23] 崔鑫. 光谱和光强对欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 幼鱼生长、存活和发育的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019.
- Cui Xin. Effects of spectrum and light intensity on the growth, survival and development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019.
- [24] Bayarri M J, Madrid J A, Sánchez-Vázquez F J. Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin[J]. Journal of Pineal Research, 2002, 32(1): 34-40.
- [25] Villamizar N, García-Alcazar A, Sánchez-Vázquez F J. Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae[J]. Aquaculture, 2009, 292(1-2): 80-86.
- [26] Henne J P, Watanabe W O. Effects of light intensity and salinity on growth, survival, and whole-body osmolality of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2003, 34(4): 450-465.
- [27] Saka S, Firat K, Süzer C. Effects of light intensity on early life development of gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*)[J]. The Israeli Journal of Aquaculture = Bamidgeh, 2001, 53(3): 139-146.
- [28] Richmond H E, Hrabik T R, Mensinger A F. Light intensity, prey detection and foraging mechanisms of age 0 year yellow perch[J]. Journal of Fish Biology, 2004, 65(1): 195-205.
- [29] 娜仁花, 红蕾. 光照对畜禽生产性能的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2005, 26(1): 36-38.
- Na Renhua, Hong Lei. The effect of light on the production performance of livestock and poultry[J]. Animal husbandry and feed science, 2005, 26(1): 36-38.
- [30] Kusmic C, Gualtieri P. Morphology and spectral sensitivities of retinal and extraretinal photoreceptors in freshwater teleosts[J]. Micron, 2000, 31(2): 183-200.
- [31] Wu J, Seregard S, Algvere P V. Photochemical damage of the retina[J]. Survey of Ophthalmology, 2006, 51(5): 461-481.
- [32] 赵颖熙. 光照强度对豚鼠屈光发育的影响及视网膜多巴胺变化研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- Zhao Yingxi. The effect of light intensity on refractive development and the change of dopamine in the retina of guinea pigs[D]. Shanghai: Fudan University, 2012.
- [33] 宋雨晨, 姚进, 蒋沁, 等. 水通道蛋白与眼科疾病[J]. 国际眼科纵览, 2015, 39(3): 200-205.
- Song Yuchen, Yao Jin, Jiang Qin, et al. Aquaporin and ophthalmic diseases[J]. International Review of Ophthalmology, 2015, 39(3): 200-205.
- [34] Wall A E. Cataracts in farmed *Atlantic salmon* (*Salmo salar*) in Ireland, Norway and Scotland from 1995 to 1997[J]. Veterinary Record, 1998, 142(23): 626-631.
- [35] 李凯彬, 常藕琴, 王芳, 等. BY-F 剑尾鱼白内障的观察[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(3): 7-8, 72-74.
- Li Kaibin, Chang Ouqin, Wang Fang, et al. Observation on cataract of BY-F swordtail[J]. Chinese Journal of experimental animals, 2006, 14(3): 7-8, 72-74.
- [36] Ballinger C A, Connell P, Wu Y, et al. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions[J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(6): 4535-4545.
- [37] 严伟倩, 王俊岭, 唐北沙. 热休克同源蛋白 70 羧基端作用蛋白的功能及其与神经退行性疾病的关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(4): 426-430.
- Yan Weiqian, Wang Junling, Tang Beisha. The function of heat shock cognate 70 and its relationship with neurodegenerative diseases[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2012, 29(4): 426-430.
- [38] 付万冬. 四种海藻热休克蛋白 70(HSP70)基因的克隆与表达分析[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.

- Fu Wandong. Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 (HSP70) genes from four seaweeds[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009.
- [39] 秦达念. 维生素 A 及其衍生物在生精过程中的作用[J]. 中国男科学杂志, 2006, 20(3): 71-74.
- Qin Danian. The role of vitamin A and its derivatives in spermatogenesis[J]. Chinese Journal of Andrology, 2006, 20(3): 71-74.
- [40] Tiwari A, Saxena S, Pant A B, et al. Protein-ligand interaction studies of retinol-binding protein 3 with herbal molecules using AutoDock for the management of Eales' disease[J]. Journal of Ocular Biology, Diseases and Informatics, 2012, 5(2): 40-43.
- [41] Lanska D J. Vitamin A-deficiency eye disease among soldiers in the U.S. civil war: spectrum of clinical disease[J]. Military Medicine, 2015, 180(7): 774-779.
- [42] Blomhoff R, Green M, Berg T, et al. Transport and storage of vitamin A[J]. Science, 1990, 250(4979): 399-404.
- [43] 张磊. 杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)GPI 多克隆抗体的制备及其在 MDCK 细胞中的定位[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- Zhang Lei. Preparation of GPI polyclonal antibody against *Dunaliella salina* and its localization in MDCK cells[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2010.
- [44] 韩龙, 杜翠红. 葡萄糖-6-磷酸异构酶研究进展[J]. 药物生物技术, 2012, 19(6): 96-99.
- Han Long, Du Cuihong. Research progress of glucose-6-phosphate isomerase[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2012, 19(6): 96-99.
- [45] 王守建, 严密, 罗成仁, 等. 补镁对糖尿病大鼠视网膜糖酵解限速酶活性的影响[J]. 眼科新进展, 2000, 20(2): 114-115.
- Wang Shoujian, Yan Mi, Luo Chengren, et al. Effect of magnesium supplementation on the activity of glycolytic rate limiting enzyme in the retina of diabetic rats[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2000, 20(2): 114-115.

Effect of light intensity on gene expression in the eyes of *Dicentrarchus labrax* juveniles

WU Yu-meng^{1, 2}, YUAN Zhen^{1, 2}, JIANG Jie-ming^{1, 2}, ZHANG Lei^{1, 2}, REN Xing-yue¹, YAO An-qi¹, SONG Chang-bin³, YAN Hong-wei^{1, 2}, LIU Ying^{1, 2, 4}

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Key Laboratory of Environment Controlled Aquaculture, Dalian 116023, China; 3. China Academy of Sciences Institute of Semiconductors, Beijing 100083, China; 4. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Received: Feb. 29, 2020

Key words: *Dicentrarchus labrax* juvenile; light; growth; eye; transcriptome; differently expressed genes

Abstract: Most marine fishes rely on their sensory organs to recognize and catch food, but there are few studies on the effect of light intensity on gene expression in the visual organ. In this study, to explore the effect of light intensity on gene expression in the eyes of fish, juvenile *Dicentrarchus labrax* at 30 days post hatching were used as research subjects, reared under white light at 2.0 W/m² (W 2.0), 1.0 W/m² (W 1.0), and 0.3 W/m² (W 0.3) for 66 days. At the end of the experiment, the body length, wet weight, and survival rate of the three groups were compared. The body length and wet weight of the W 2.0 group were significantly lower than those of the W 1.0 and W 0.3 groups ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the survival rate among the three groups ($P > 0.05$). Then, the transcriptome libraries of juvenile eyes of W 2.0 and W 0.3 groups were constructed and subjected to high-throughput sequencing. A total of 368 differentially expressed genes were obtained. Compared with the W 0.3 group, 234 genes were upregulated, and 134 genes were downregulated in the W 2.0 group. Finally, the expression of six differently expressed genes, including lens fiber member intrinsic protein, retina binding protein, retina isomerohydrolase, heat shock conjugate 70, elongation factor 1-alpha, and glucose-6-phosphate isomerase, were validated by qPCR(Quantitative Real-time PCR). The results were consistent with the transcriptomic data, and those genes may play a key role in the juvenile response to light intensity. These results indicate that light intensity can affect gene expression in fish eyes, and this study provides basic data on the mechanism by which light intensity modifies fish vision. It also serves as a reference for the healthy cultivation of *Dicentrarchus labrax* juveniles.

(本文编辑: 丛培秀)