

文章编号: 1000-0615(2016)06-0833-11

DOI: 10.11964/jfc.20151010134

不同光周期条件下日本牙鲆尾部神经分泌系统转录组分析

陈阿琴¹, 张影¹, 陈松林², 吕为群^{1*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 为发掘日本牙鲆响应光周期变化的重要功能基因, 采用新一代高通量测序RNA-seq技术分析8L:16D、12L:12D和16L:8D等3个光周期条件下日本牙鲆尾部神经分泌系统(caudal neurosecretory system, CNSS)的基因表达变化。转录组测序结果显示, 3个样品分别产生了5 807 622、6 147 140和6 116 872个Clean reads。分别对8L:16D、12L:12D和16L:8D条件下的文库进行两两比较, 共获得200个差异表达基因。GO分类分析表明, 差异表达基因属于生物学过程、细胞定位和分子功能的42个类别。KEGG Pathway显著性富集分析差异表达基因共涉及29条代谢途径, 包括糖酵解/糖异生、钙离子信号转导、血管平滑肌收缩和光信号转导等通路。上述结果不仅加深了对鱼类尾部神经分泌系统功能的认识, 也为进一步探索硬骨鱼类光信号转导机制提供了多方面多层次的信息。

关键词: 日本牙鲆; 尾部神经分泌系统; 光周期; 转录组

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

光照是鱼类生存的重要环境因子之一, 直接或间接地影响鱼类的生长、摄食和繁殖等生理活动。研究表明, 除眼睛外, 鱼类还可以通过松果体、中脑、下丘脑、皮肤褪黑素细胞中的光受体接收光信息输入。而在鱼类中枢系统内部接收光信息后, 对生理调控的途径和方式目前还不完全清楚^[1]。

尾部神经分泌系统(CNSS)是鱼类特有的神经内分泌系统, 由大型神经分泌细胞(Dahlgren细胞)、Dahlgren细胞发出的轴突和神经血管器官(尾垂体)组成。在真骨鱼类中, Dahlgren细胞位于尾部脊髓之中, 它们的轴突延伸到尾垂体, 将其分泌物——促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、尾紧张素I(urotensins I, UI)、尾紧张素II(urotensins II, U II)^[2-4]等转送到尾垂体存储, 再由此直接分泌进入尾静脉^[5-6], 以确保CRH、UI和U II迅速抵达各种靶器官发挥相应功能^[7]。CNSS是鱼类适应环境的关键,

其作为应激系统的一部分, 在鱼类生理和行为方式等方面发挥综合调节作用^[8]。研究表明, 欧洲川鲽(*Paralichthys flesus*)和樱鳟(*Masu salmon*)CNSS中CRH、UI和U II荷尔蒙或基因表达水平呈季节性变化^[9-10]。此外, CNSS中Dahlgren细胞大小、Dahlgren细胞中分泌颗粒的多少及蛋白质含量变化也随季节更替而发生改变, 且与鱼类卵巢发育有着极为明显的平行关系^[11]。这表明CNSS在鱼类适应季节性变化的环境因子中起重要作用。光周期改变是季节变化的主要因素之一, 目前还未见日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在响应不同光周期时尾部神经分泌系统转录组变化的研究。

日本牙鲆是我国重要的海水养殖品种。之前有关日本牙鲆的研究主要集中在遗传标记开发、遗传图谱构建、生长及免疫相关功能基因克隆和性别决定与分化机制等^[12-15], 对其适应环境变化的功能基因信息比较匮乏。Hu等^[13]通过

收稿日期: 2015-10-30 修回日期: 2016-03-09

资助项目: 国家自然科学基金(31072228, 41376134); 上海高校水产学高峰学科建设和知识服务平台项目; 上海市自然科学基金(14ZR1419900)

通信作者: 吕为群, E-mail: wqlv@shou.edu.cn

转录组分析了日本牙鲆脑区、肌肉和肝脏中响应冷应激的相关功能基因。本实验利用RNA-seq测序技术对不同光周期条件下日本牙鲆CNSS进行了转录组测序，初步分析后获得了牙鲆CNSS中响应光周期变化的差异表达基因序列及注释信息，为今后研究鲆鲽鱼类的功能基因组学研究提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

日本牙鲆来自中国水产科学院北戴河中心研究站，为一龄雌核发育牙鲆[体质量(600 ± 100)g]。循环水养殖，温度(21 ± 0.5)℃，pH8，光照强度100 lux，光照周期为12 h 光照12 h 黑暗(12L : 12D)。正式实验前在此条件下暂养2周。

1.2 实验方法

实验鱼处理及样品采集 为探究光周期对牙鲆尾部神经分泌系统分泌物的影响实验设计3个光周期，即8L : 16D，12L : 12D和16L : 8D，光照强度100 lux。每个光照周期条件下处理6尾鱼，光周期处理两周后进行采样，取其尾部神经分泌系统(倒数八节尾椎骨)的样品保存在RNA fix液体(TaKaRa，日本)中。

转录组文库制备 取冷冻的日本牙鲆CNSS参照RNAiso™Plus (TaKaRa)操作说明进行总RNA的提取，DNaseI消化去除样品中残留基因组DNA。将同一光周期处理后的6尾鱼CNSS总RNA进行混合。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)系统检测所提取RNA质量。所有RNA样品的RNA integrity numbers (RINs)均大于8.0。总RNA用含有oligo-dT的磁珠富集纯化出mRNA，然后用化学试剂加高温的方法片段化mRNA。以片段化mRNA为模板，用六碱基随机引物(random hexamers)合成第一条cDNA链，然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链，在经过纯化、末端修复、加poly(A)并连接测序接头后，用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择，最后进行PCR扩增，建好的测序文库用 Illumina HiSeq™ 2000进行测序。目的样品的转录组测序建库由华大基因公司完成。

转录组数据处理与分析 测序获得的原始数据首先经过数据整理，包括去除含有接头的

reads，N(不确定的碱基)比例大于10%及低质量的reads，得到相应的Clean reads数据库；然后将处理后的序列与日本牙鲆参考基因组(由华大基因公司提供，检测本实验中样品转录组时日本牙鲆基因组序列未公布)进行比对。用SOAP aligner/soap2软件将每个转录组的Clean reads分别比对到参考基因组序列。利用唯一比对上基因的reads数目和唯一比对上参考序列的总reads数计算基因表达量，具体方法为RPKM (reads per kb per million reads)法^[16]计算每个基因在样本中的表达量。

基因差异表达分析 参照Audi等^[17]的基于测序的差异基因检测方法，通过比较不同光周期条件下CNSS中表达的所有基因，从而筛选出差异表达的基因。通过FDR(false discovery rate)来决定P-value的阈值。同时根据基因的表达量计算该基因在不同光周期条件下的差异表达倍数。本研究中差异表达基因标准为FDR≤0.001且倍数差异不低于2倍。

基因功能注释及Pathway显著性富集分析 首先用Blast2GO软件(默认参数)对得到所有差异基因的GO注释信息，然后用WEGO软件对差异基因进行GO功能分类统计。GO总共有3个ontology，可以对基因的分子功能(molecular function)、所处的细胞位置(cellular component)和参与的生物过程(biological process)进行描述。把基因序列通过BLAST(参数：-p blastx -e 1e-5 -m 8)比对到KEGG数据库进行注释。

2 结果

2.1 序列评估

序列质量评估 日本牙鲆CNSS转录组测序共获得原始数据885 510 066 bp。3个文库中各类reads所占比例分布的情况见表1，其中8L : 16D、12L : 12D和16L : 8D条件下CNSS 3个样品的Clean reads分别有5 807 622、6 147 140和6 116 872条。不同光周期处理后可以比对到日本牙鲆基因组上的reads平均比例为76.82%，其中能完美比对上的reads所占平均比例为59.89%(表1)，仅比对到唯一位置的reads平均比例为75.25%。

测序饱和度 测序饱和度分析可以在一定程度上判断测序数据量是否满足需求，当测序量达到一定区间后其检测到的基因数增长速度趋于平缓，说明检测到的基因数趋于饱和(图1)。

表1 8L:16D、12L:12D和16L:8D条件下日本牙鲆CNSS文库测序数据与参考基因组比对结果

Tab. 1 Statistics of Japanese flounder CNSS kept in 8L:16D, 12L:12D and 16L:8D CNSS libraries to reference genome

	测序数(百分比) read number (percentage)		
	8L:16D	12L:12D	16L:8D
总测序数 total Reads	5 807 622(100.00%)	6 147 140(100.00%)	6 116 872(100.00%)
总碱基数 total Base Pairs	284 573 478(100.00%)	301 209 860(100.00%)	299 726 728(100.00%)
总定位测序数 total Mapped Reads	4 492 297(77.35%)	4 655 472(75.73%)	4 733 851(77.39%)
完美匹配 perfect match	3 510 006(60.44%)	3 623 545(58.95%)	3 704 191(60.56%)
≤3 bp mismatch	982 291(16.91%)	1 031 927(16.79%)	1 029 660(16.83%)
唯一匹配 unique match	4 400 036(75.76%)	4 560 478(74.19%)	4 637 217(75.81%)
多位点匹配 multi-position match	92 261(1.59%)	94 994(1.55%)	96 634(1.58%)
总未定位测序数 total Unmapped Reads	1 315 325(22.65%)	1 491 668(24.27%)	1 383 021(22.61%)

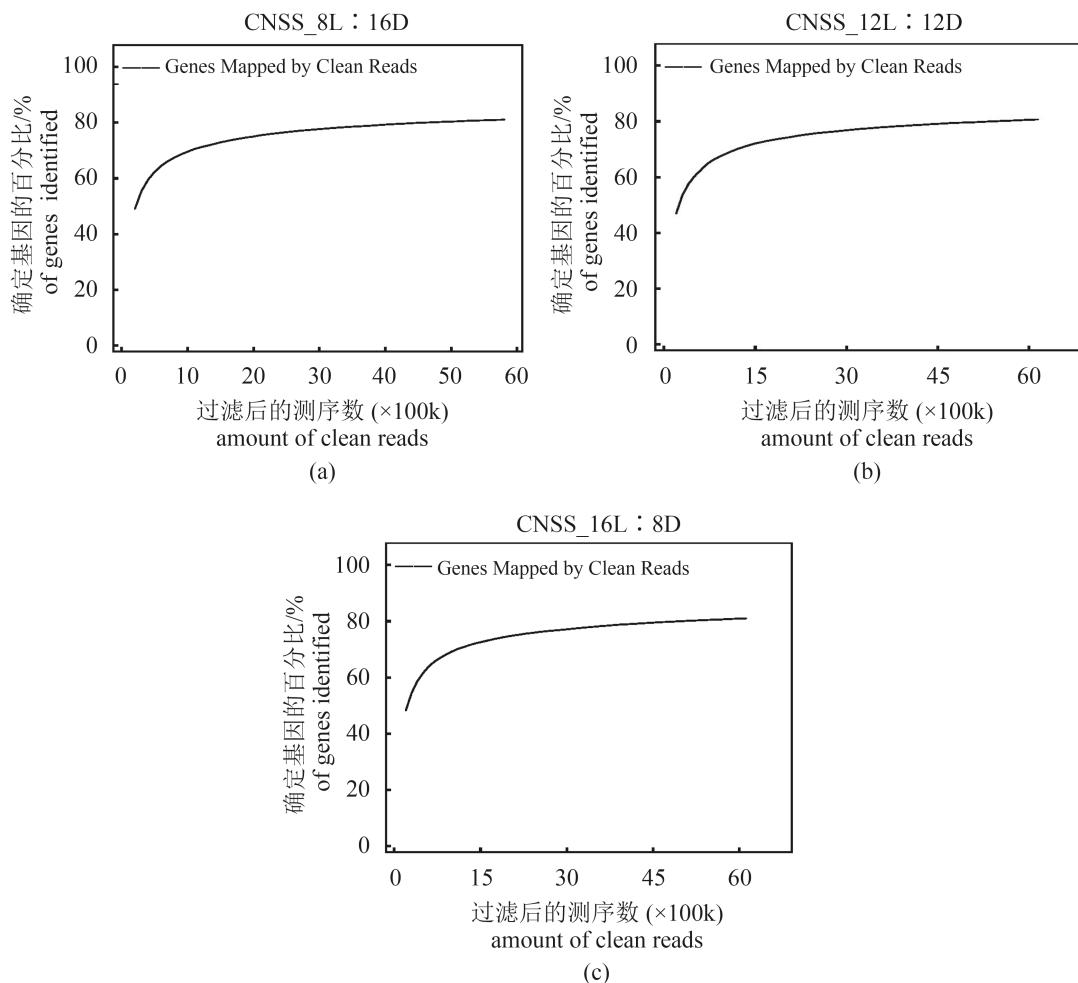


图1 8L:16D (a)、12L:12D (b)和16L:8D (c)条件下日本牙鲆CNSS序列饱和度分析

Fig. 1 Sequence saturability of Japanese flounder CNSS kept in 8L:16D (a), 12L:12D (b) and 16L:8D (c)

8L:16D、12L:12D和16L:8D条件下CNSS 3个样品饱和度结果相似,且Clean reads比对到的基因数几乎不再增加,说明测序序列数趋于饱和。

基因覆盖度分析 基因覆盖度指每个基因被reads覆盖的百分比,其值等于基因中unique mapping reads覆盖的碱基数跟该基因所有碱基数

的比值。8L : 12D、12L : 12D和16L : 8D 3个文库中覆盖度达到90%~100%的预测基因分别为2760个、2570个和2687个；测序基因覆盖度在

10%以下的序列数平均为1696个(图2)。能代表整个转录组的测序结果，满足转录组数据分析的要求。

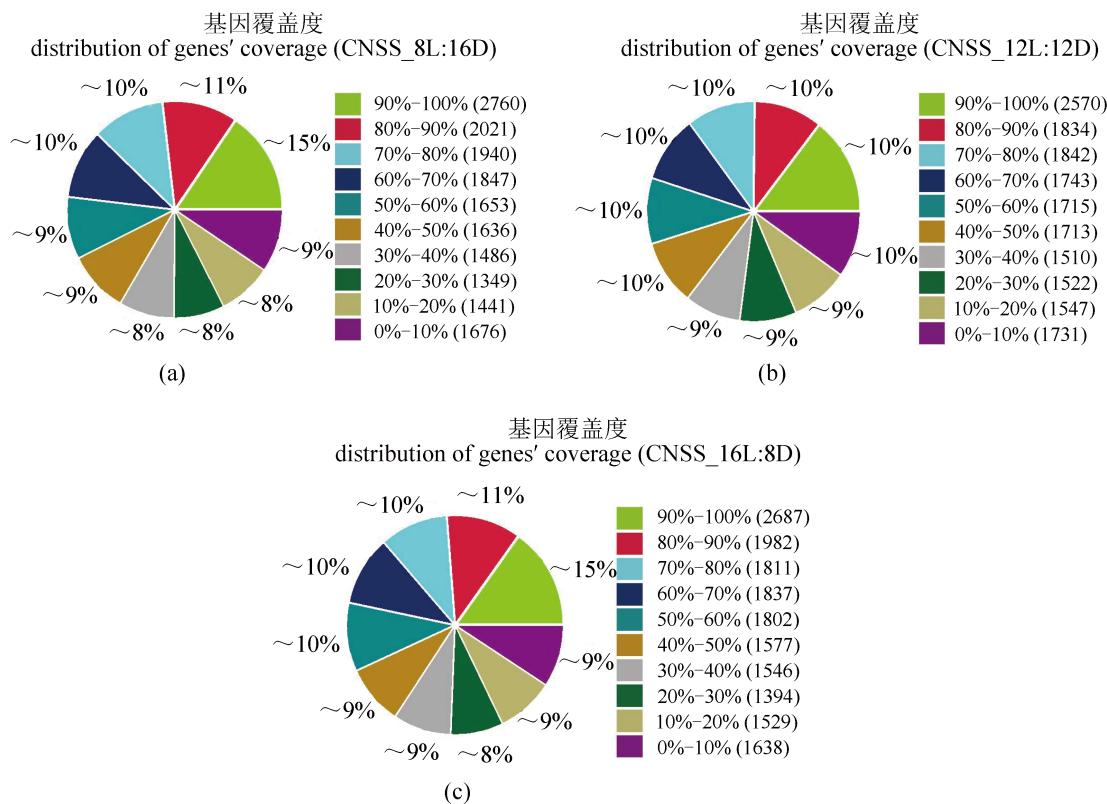


图2 8L : 16D(a)、12L : 12D(b)和16L : 8D(c)条件下日本牙鲆CNSS测序结果基因覆盖度统计
Fig. 2 Distribution of gene's coverage of sequencing results of Japanese flounder CNSS kept in 8L : 16D (a), 12L : 12D (b) and 16L : 8D (c)

2.2 差异表达基因

通过对3个文库之间基因差异表达情况进行两两比较分析，获得了不同光周期条件下CNSS的基因差异表达的基本信息。8L : 16D与12L : 12D文库比较，在12L : 12D文库中30个基因上调、21个基因下调；12L : 12D与16L : 8D文库比较，16L : 8D文库中有24个基因上调、49个基因下调；8L : 16D与16L : 8D文库比较，后者有32个基因上调、44个基因下调(图3)。

2.3 差异表达基因GO功能分类

结合Gene ontology数据库进行GO功能分类分析将8L : 16D、12L : 2D和16L : 8D文库中的差异表达基因归类到GO 3大本体(生物过程、细胞组分和分子功能)的42个类别中(图4)。在生物过程一类中，与生物过程(cellular process)、单生物过程(single-organism process)、多细胞生物过程

(multi-organism process)和代谢过程(metabolic process)相关的基因富集较多；在细胞组分一类中，与细胞组成(cell, cell part)相关的基因最多，其次为细胞器组成(organelle, organelle

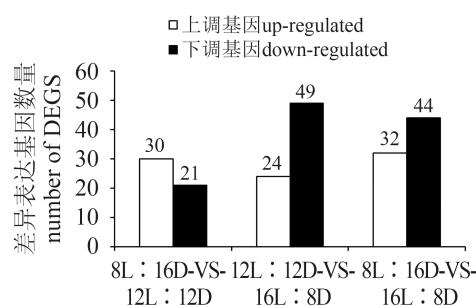


图3 8L : 16D、12L : 12D和16L : 8D条件下日本牙鲆CNSS中差异表达基因

Fig. 3 Differently-expressed genes of Japanese flounder CNSS kept in 8L : 16D, 12L : 12D and 16L : 8D

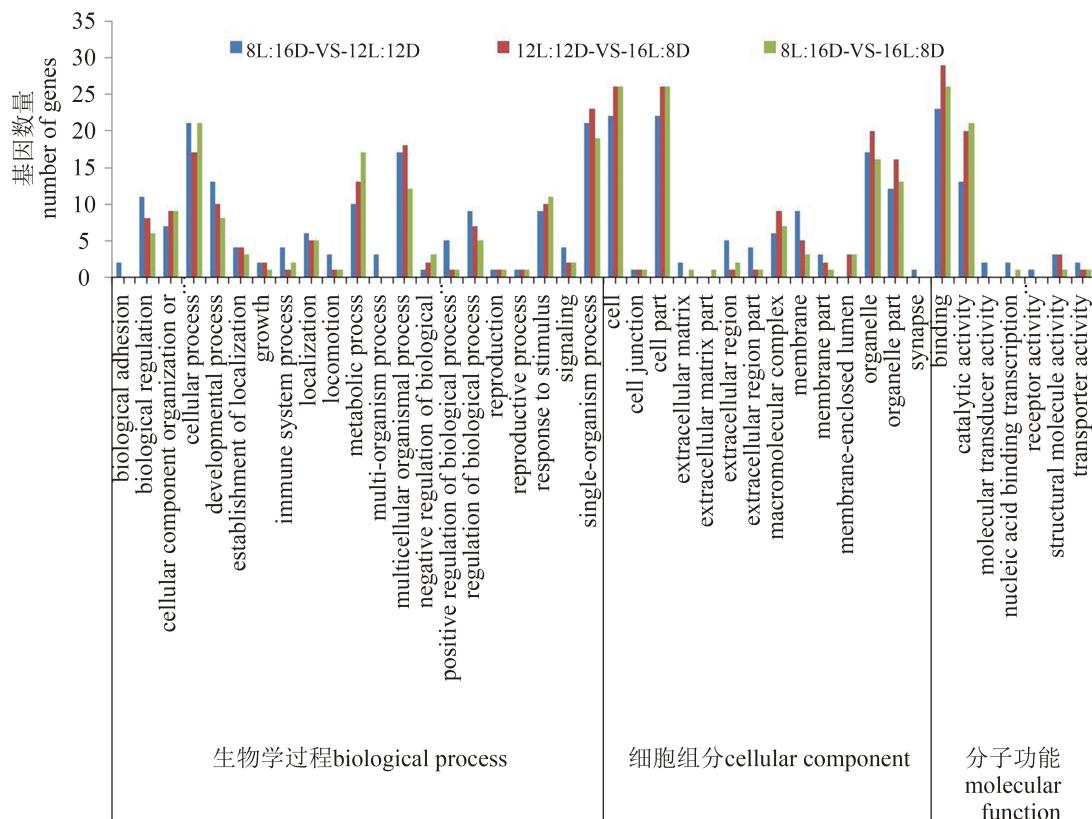


图4 8L:16D、12L:12D和16L:8D条件下日本牙鲆CNSS中显著差异表达基因的GO分类

Fig. 4 The function of the GO classification statistics of Japanese flounder CNSS kept in 8L:16D, 12L:12D and 16L:8D

part); 在分子功能一类中, 与结合功能(binding)相关的基因最多, 然后是催化活性(catalytic activity)。此外, 在8L:16D与12L:12D文库的比较中, 发现差异表达基因还富集在生物粘附(biological adhesion)、分子转导活性(molecular transducer activity)和受体活性中(receptor activity), 但在12L:12D与16L:8D和8L:12D与16L:8D文库的比较中, 未发现差异表达基因富集。在12L:12D与16L:8D的文库比较中, 发现基因在细胞外基质(extracellular matrix)和核酸结合转录因子活性(nucleic acid binding transcription factor activity)中富集, 但在8L:16D与12L:12D文库和8L:12D与16L:8D文库的比较中, 未发现基因富集。

2.4 KEGG Pathway显著性富集分析

为了进一步深入了解不同光周期条件下的差异表达基因之间的相互联系, 通过KEGG富集分析, 将3个文库中的差异表达基因定位到229个特定的KEGG代谢途径, 其Q-Value(FDR/Corrected P Value)值≤DR/C(表2)。不同光周期条件下的差异

表达基因在光传导(图5)、钙信号通路、血管平滑肌收缩、糖酵解/糖异生(图6)等通路上具有显著性差异富集。

3 讨论

近年来, 转录组学技术在水产动物中的研究受到广泛关注, 该技术已在水产动物免疫应答、生长发育、生物进化和毒理学等方面取得了大量的进展^[18]。本研究利用RNA-seq技术对8L:16D、12L:12D和16L:8D 3个光周期条件下日本牙鲆CNSS进行转录组测序, 结果获得大量的序列, 极大丰富了日本牙鲆的基因组资源。本研究发现钙调素(calmodulin, CaM)基因在16L:8D长光周期条件下表达下调, 说明CNSS中CaM的表达受光周期影响。钙调素是钙离子结合蛋白, 参与调控L型钙离子通道、信号转导和神经递质的合成与释放^[19], 及雌二醇受体的转录活性^[20]。此外, CaM还是光信号传导过程中环核苷酸门控离子通道(CNG)开放或关闭的主要调节因子之一^[21]。金鱼在排卵前(5月)下丘脑中CaM mRNA水平显著高于8月和10月, 且该基

表 2 8L : 16D、12L : 12D和16L : 8D条件下日本牙鲆CNSS差异表达基因KEGG Pathway 显著性富集结果

Tab. 2 Results of KEGG Pathway of Japanese flounder CNSS kept in 8L : 16D, 12L : 12D and 16L : 8D

通路名 pathway	通路中的差异表达基因数目 DEGs with pathway			通路ID pathway ID
	8L : 16D-VS-12L : 12D	12L : 12D-VS-16L : 8D	8L : 16D-VS-16L : 8D	
肥厚型心肌病 hypertrophic cardiomyopathy	11 (26.19%)	16 (26.23%)	8(17.39%)	ko05410
扩张型心肌病 dilated cardiomyopathy	11 (26.19%)	16 (26.23%)	10(17.24%)	ko05414
心肌收缩 cardiac muscle contraction	8 (19.05%)	12 (19.67%)	6 (10.34%)	ko04260
钙信号通路 calcium signaling pathway	-	-	7 (12.07%)	ko04020
紧密连接 tight junction	9 (21.43%)	11 (18.03%)	6 (10.34%)	ko04530
致心律失常性右室心肌病 arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	4 (9.52%)	-	-	ko05412
血管平滑肌收缩 vascular smooth muscle contraction	5 (11.9%)	8 (13.11%)	7 (12.07%)	ko04270
肌动蛋白骨架调节 regulation of actin cytoskeleton	6 (14.29%)	8 (13.11%)	-	ko04810
糖酵解/糖异生 glycolysis/gluconeogenesis	-	6 (9.84%)	6 (10.34%)	ko00010
致病性大肠杆菌感染 pathogenic <i>Escherichia coli</i> infection	-	5 (8.2%)	-	ko05130
志贺杆菌病 shigellosis	-	4 (6.56%)	-	ko05131
肺结核 tuberculosis	-		7 (12.07%)	ko05152
阿米巴病 amoebiasis		-	5 (8.62%)	ko05146
阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	-	-	5 (8.62%)	ko05010
哮喘 asthma	-	-	2 (3.45%)	ko05310
非洲锥虫病 African trypanosomiasis	-	-	3 (5.17%)	ko05143
金黄色葡萄球菌感染 <i>Staphylococcus aureus</i> infection	-	-	3 (5.17%)	ko05150
光传导 phototransduction-fly	-	-	3 (5.17%)	ko04745
胰岛素信号通路 insulin signaling pathway	-	-	5 (8.62%)	ko04910
唾液分泌 salivary secretion	-	-	4 (6.9%)	ko04970
光传导 phototransduction	-	-	3 (5.17%)	ko04744
同种异体移植排斥 allograft rejection	-	-	2 (3.45%)	ko05330
麻疹 measles	-	-	4 (6.9%)	ko05162
造血细胞系 hematopoietic cell lineage	-	-	3 (5.17%)	ko04640
系统性红斑狼疮 systemic lupus erythematosus	-	-	3 (5.17%)	ko05322
肠道免疫系统的IgA产生 intestinal immune network for IgA production	-	-	2 (3.45%)	ko04672

因的表达主要受光周期的调控^[22]。CNSS的神经分泌活动与钙离子密切相关。L-型Ca²⁺通道及Ca激活K⁺通道是CNSS中Dahlgren细胞爆发活动的基础^[23]。CNSS的多肽分泌量取决于Dahlgren细胞神经受体及离子通道的表达量^[24-25]。欧洲牙鲆CNSS中L-型Ca²⁺通道mRNA呈季节性表达变化^[10]。在本研究中，差异表达基因CaM可在钙信号通路、光传导通路和血管平滑肌收缩通路中富

集。这提示CNSS可能通过Ca²⁺参与的信号转导途径响应光周期的改变。此外，已有研究表明CNSS在维持机体钙稳态过程中起重要调节作用。斯钙素(stanniocalcin-1, STC-1)和钙敏感受体(Calcium-sensing receptor, CaSR)在硬骨鱼类CNSS中表达^[2, 26-27]，且去除CNSS后可使牙鲆血浆中总钙水平显著升高^[26]。CNSS是鱼类体内循环途径中CRH、U I 和U II 等神经肽的主要来

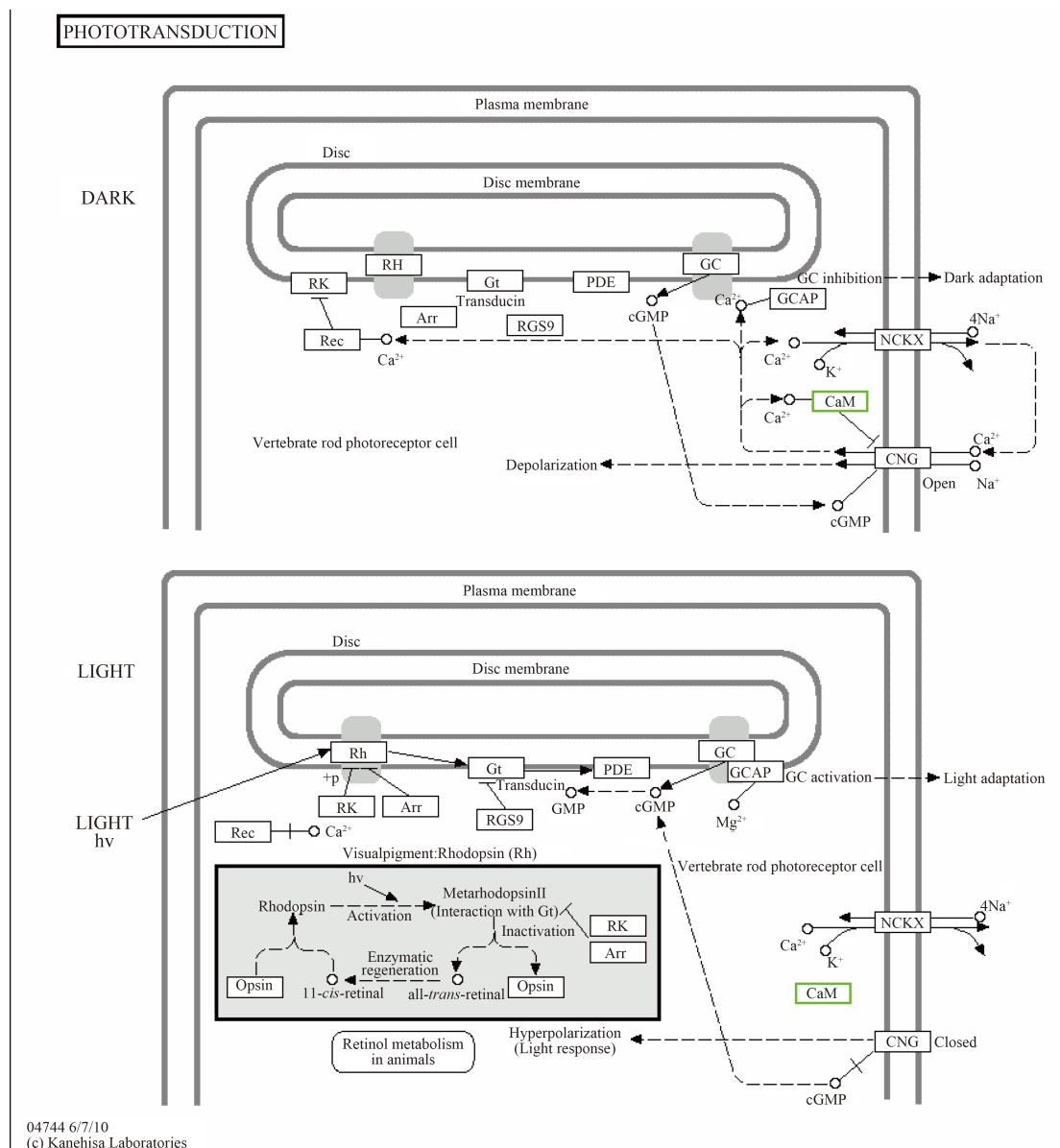


图5 8L:16D、12L:12D和16L:8D条件下日本牙鲆CNSS中差异表达基因在Phototransduction通路中的定位
绿色表示基因表达显著下调

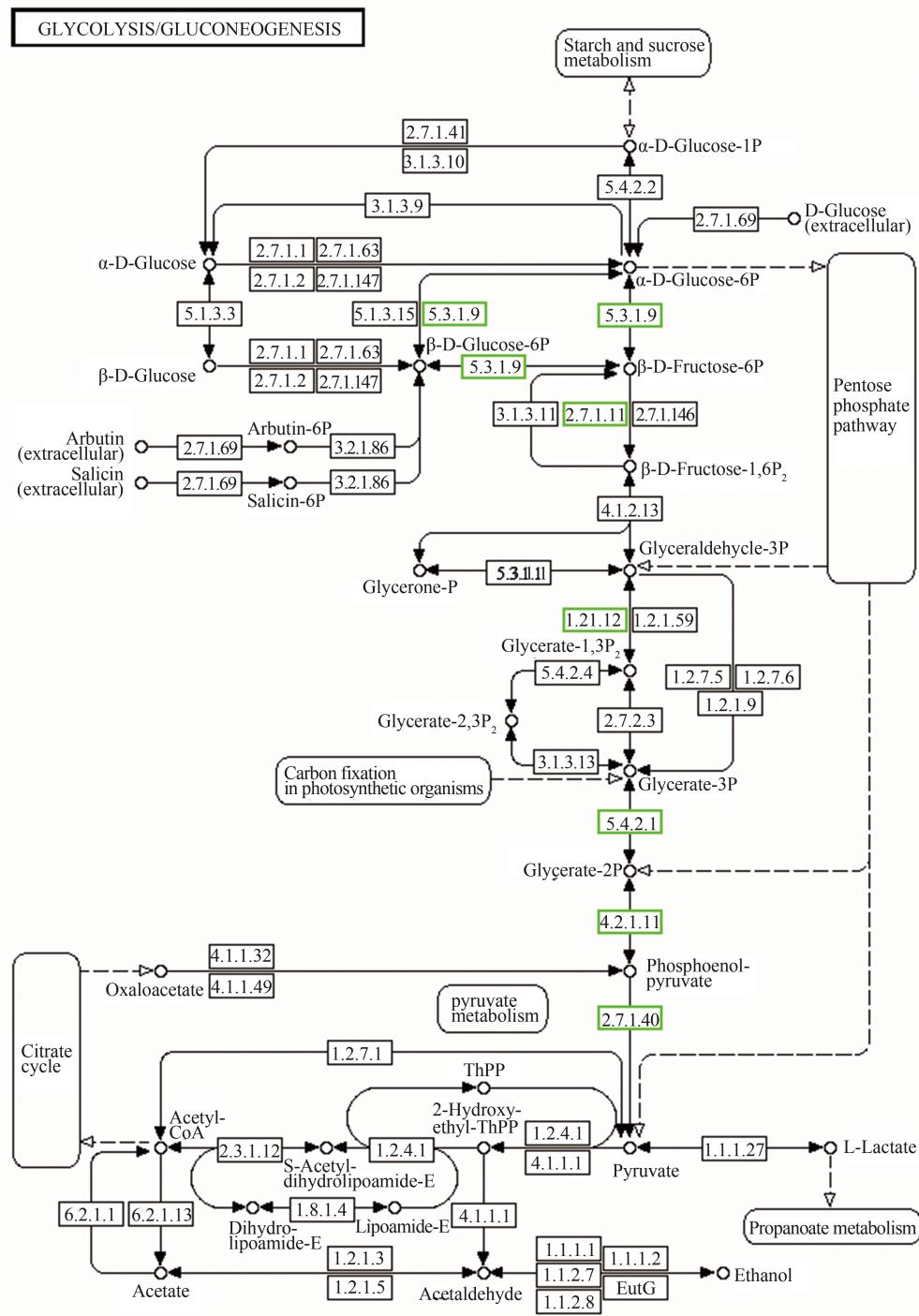
Fig. 5 DEG location in Phototransduction in Japanese flounder kept in 8L:16D, 12L:12D and 16L:8D

Down-regulated genes are marked by green rectangle

源。U II 可通过增加胞外钙流入和胞内贮存钙的释放，显著增加胞内Ca²⁺水平^[3, 28]。光周期对CNSS中CaM表达的调控，是否会影响机体内环境中钙离子的稳态还有待深入研究。

在自然条件的季节变化过程中，温度和光周期的改变紧密伴随，是调控动物代谢能力的两个重要因素^[29]。本研究对8L:16D和12L:12D条件下CNSS文库比较发现，差异表达基因没有在糖代谢途径富集，这提示短光周期条件下机体能量代谢过程未发生明显改变。但在12L:12D

与16L:8D及8L:16D和16L:8D进行两两比较时发现，葡萄糖-6-磷酸异构酶(EC 5.3.1.9)、6-磷酸果糖激酶(EC 2.1.1.11)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(EC 1.2.1.12)、磷酸甘油酸变位酶(EC 5.4.2.1)和烯醇化酶(EC 4.2.1.11)及丙酮酸激酶(EC : 2.7.1.40)等差异表达基因在长光周期条件下表达下调，并可在糖代谢通路中富集。这可能有2个方面的原因。一方面，这提示长光周期条件下CNSS中葡萄糖分解(糖酵解)或血糖水平(糖异生)发生改变，调控机体的能量代谢，满足机体细胞的营



00010 5/31/12
(c)Kanehisa Laboratories

图 6 8L : 16D、12L : 12D和16L : 8D条件下日本牙鲆CNSS中差异表达基因在Glycolysis/Gluconeogenesis通路中的定位

绿色表示基因表达显著下调

Fig. 6 DEGs location in Glycolysis/Gluconeogenesis in Japanese flounder kept in 8L : 16D, 12L : 12D and 16L : 8D
Down-regulated genes are marked by green rectangle

养需求，进而维持机体内环境的稳态。转录组分析表明，日本牙鲆在响应冷应激时，肝脏中糖酵解/糖异生、脂类代谢及蛋白质消化和吸收

等代谢途径中的关键酶表达发生改变^[13]。另一方面，丙酮酸是糖酵解途径的终产物，可进入三羧酸循环，作为神经递质谷氨酰胺合成的媒介

物。在哺乳动物中证实, 短光周期条件下, 下丘脑中脑室膜细胞中糖酵解途径的关键酶基因表达上调, 如催化果糖-6-磷酸生成果糖1,6-二磷酸的磷酸果糖激酶, 进而为下丘脑神经细胞提供营养或调节神经递质的合成^[30]。CNSS是硬骨鱼类CRH、UI和UII等神经肽合成和分泌的主要部位, 其神经分泌细胞的活动受神经递质的调节。光周期改变引起的CNSS中糖代谢相关基因表达变化对CNSS的神经分泌活动的影响还需进一步研究。

本研究还发现在不同光周期条件下, CNSS中热休克蛋白(HSP70)的表达发生变化。CNSS中HSP70在8L : 12D、12L : 12D和16L : 8D时的RPKM值分别为13.25、38.21和2.85, 且两两比较时存在显著性差异。HSP70是机体重要的热应激蛋白。不同光周期条件下HSP70表达改变, 提示机体可能通过(或部分通过)相同的通路响应光周期变化和热应激。此外, 载脂蛋白(apolipoprotein)A-1、皮层蛋白(cortactin)、肌动蛋白(myosin)、二磷酸核苷激酶(nucleoside-diphosphate kinase)等基因也被证实在不同光周期条件下差异表达, 并涉及动物免疫功能、细胞骨架调控、血管平滑肌收缩等。本研究结果说明, 光周期显著影响日本牙鲆CNSS中相关功能基因的表达, 利用高通量测序技术可有效检测出这些差异表达基因, 这些结果有助于深入研究硬骨鱼类CNSS在机体适应环境变化时的神经内分泌功能, 挖掘与硬骨鱼类光周期适应相关的基因及信号通路。

参考文献:

- [1] Peirson S N, Halford S, Foster R G. The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London-Seires B: Biological sciences, 2009, 364(1531): 2849-2865.
- [2] Lu W Q, Dow L, Gumusgoz S, et al. Coexpression of corticotropin-releasing hormone and urotensin i precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): a possible shared role in peripheral regulation[J]. Endocrinology, 2004, 145(12): 5786-5797.
- [3] Lu W Q, Greenwood M, Dow L, et al. Molecular characterization and expression of urotensin II and its receptor in the flounder (*Platichthys flesus*): a hormone system supporting body fluid homeostasis in euryhaline fish[J]. Endocrinology, 2006, 147(8): 3692-3708.
- [4] Lu W Q, Zhang Y, Xiong J H, et al. Daily rhythms of urotensin I and II gene expression and hormone secretion in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 188: 189-195.
- [5] Winter M J, Ashworth A, Bond H, et al. The caudal neurosecretory system: control and function of a novel neuroendocrine system in fish[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2000, 78(3): 193-203.
- [6] McCrohan C R, Lu W, Brierley M J, et al. Fish caudal neurosecretory system: a model for the study of neuroendocrine secretion[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 153(1-3): 243-250.
- [7] Arnold-Reed D E, Balment R J. Steroidogenic role of the caudal neurosecretory system in the flounder, *Platichthys flesus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1989, 76(2): 267-273.
- [8] 吕为群, 刘爽, 钟英斌. 鱼类尾部神经分泌系统研究进展[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(05): 743-749.
- [9] Lü W Q, Liu S, Zhong Y B. Research progress on the caudal neurosecretory system(CNSS) of fish[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(5): 743-749(in Chinese).
- [10] Westring C G, Ando H, Kitahashi T, et al. Seasonal changes in CRF-I and urotensin I transcript levels in masu salmon: correlation with cortisol secretion during spawning[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 155(1): 126-140.
- [11] Chen H, Mu R. Seasonal morphological and biochemical changes of Dahlgren cells implies a potential role of the caudal neurosecretory system (CNSS) in the reproduction cycle of teleostean fish[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2008, 34(1): 37-42.
- [12] Huang L, Li G Y, Mo Z L, et al. De Novo assembly of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) spleen transcriptome to identify putative genes involved in immunity[J]. PLoS ONE, 2015, 10(2): e0117642.

- [13] 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.
- [14] 牛余泽, 廖小林, 宋文涛, 等. 牙鲆遗传作图及生长性状QTL定位[J]. 水产学报, 2012, 36(11): 1640-1649.
- Niu Y Z, Liao X L, Song W T, et al. Genetic mapping and QTLs analysis of growth traits in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11): 1640-1649(in Chinese).
- [15] Shao C W, Niu Y C, Rastas P, et al. Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): applications to QTL mapping of *Vibrio anguillarum* disease resistance and comparative genomic analysis[J]. DNA Research, 2015, 22(2): 161-170.
- [16] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [17] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles[J]. Genome Research, 1997, 7(10): 986-995.
- [18] 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.
- 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(in Chinese).
- [19] Zhang J, Suneja S K, Potashner S J. Protein kinase A and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulate glycine and GABA release in auditory brain stem nuclei[J]. Journal of Neuroscience Research, 2004, 75(3): 361-370.
- [20] Li L, Li Z, Sacks D B. Calmodulin regulates the transcriptional activity of estrogen receptors. Selective inhibition of calmodulin function in subcellular compartments[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(2): 1195-1200.
- [21] Shi F X, Perez E, Wang T, et al. Stage- and cell-specific expression of soluble guanylyl cyclase alpha and beta subunits, cGMP-dependent protein kinase I alpha and beta, and cyclic nucleotide-gated channel subunit 1 in the rat testis[J]. Journal of Andrology, 2005, 26(2): 258-263.
- [22] Zhang D P, Xiong H L, Mennigen J A, et al. Defining global neuroendocrine gene expression patterns associated with reproductive seasonality in fish[J]. PLoS ONE, 2009, 4(6): e5816.
- [23] Brierley M J, Bauer C S, Lu W, et al. Voltage- and Ca²⁺-dependent burst generation in neuroendocrine Dahlgren cells in the teleost *Platichthys flesus*[J]. Journal of Neuroendocrinology, 2004, 16(10): 832-841.
- [24] Ashworth A J, Banks J R, Brierley M J, et al. Electrical activity of caudal neurosecretory neurons in seawater and freshwater-adapted *Platichthys flesus*, *in vivo*[J]. Journal of Experimental Biology, 2005, 208: 267-275.
- [25] Brierley M J, Ashworth A J, Craven T P, et al. Electrical activity of caudal neurosecretory neurons in seawater- and freshwater-adapted flounder: responses to cholinergic agonists[J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206: 4011-4020.
- [26] Greenwood M P, Flik G, Wagner G F, et al. The corpuscles of stannius, calcium-sensing receptor, and stanniocalcin: Responses to calcimimetics and physiological challenges[J]. Endocrinology, 2009, 150(7): 3002-3010.
- [27] Ingleton P M, Bendell L A, Flanagan J A, et al. Calcium-sensing receptors and parathyroid hormone-related protein in the caudal neurosecretory system of the flounder (*Platichthys flesus*)[J]. Journal of Anatomy, 2002, 200(5): 487-497.
- [28] Sun C Y, Duan D, Li B, et al. U II and UT in grouper: cloning and effects on the transcription of hormones related to growth control[J]. Journal of Endocrinology, 2014, 220(1): 35-48.
- [29] 闫玉莲, 谢小军. 温度及光照驯化对南方鲇线粒体代谢补偿调节的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 422-429.
- Yan Y L, Xie X J. Mitochondrial metabolic compensation of the southern catfish, *Silurus meridionalis* Chen, in response to acclimation of temperature and photoperiod[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(3): 422-429(in Chinese).
- [30] Nilaweera K, Herwig A, Bolborea M, et al. Photoperiodic regulation of glycogen metabolism, glycolysis, and glutamine synthesis in tanyocytes of the Siberian hamster suggests novel roles of tanyocytes in hypothalamic function[J]. Glia, 2011, 59(11): 1695-1705.

The transcriptome sequencing and functional analysis of CNSS in *Paralichthys olivaceus* treated with different photoperiods

CHEN Aqin¹, ZHANG Ying¹, CHEN Songlin², LÜ Weiqun^{1*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Focusing on discovery and cloning of important functional genes, we summarized a set of bioinformatics methods to efficiently dig for profound RNA-seq information. The results showed that 8L : 16D, 12L : 12D and 16L : 8D had 5 807 622, 6 147 140 and 6 116 872 Clean reads, respectively. Comparison between the sequencing data from 8L : 16D, 12L : 12D, and 16L : 8D revealed 200 differentially expressed genes(DEG). The DEG GO functions in the transcriptome library were broadly divided into biological process, cellular component and molecular function categories of 42 branches. Data in the transcriptome could be divided into 22 classes taking the KEGG database as a reference, according to the metabolic pathway, including glycogenesis/gluconeogenesis, phototransduction, calcium signaling pathway, and vascular smooth muscle. This study not only conveyed more useful information of CNSS function in flounder, but also provided multi-level information of phototransduction in teleost.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; CNSS; photoperiod; transcriptome

Corresponding author: LÜ Weiqun. E-mail: wqlv@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31072228,41376134); First Class Discipline Program for Fishery from the Shanghai Municipal Government, Shanghai Natural Science Foundation(14ZR1419900).