

马芳,刘哲,康玉军,等. 虹鳟肝组织新转录本分析及基因结构优化[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 135-142.

Ma F, Liu Z, Kang YJ, et al. Analysis of novel transcripts and optimization of the gene structure in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 135-142.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.002

虹鳟肝组织新转录本分析及基因结构优化

马芳,刘哲*,康玉军,权金强

(甘肃农业大学动物科学技术学院,兰州 730070)

【摘要】 目的 虹鳟热应激下肝 RNA-seq 数据中新转录本的分析及已注释基因结构优化。方法 以虹鳟肝为材料提取总 RNA,构建 cDNA 文库,并利用 Illumina 双端测序 Hiseq 2500 平台进行测序。运用 Cufflinks 软件对测序数据进行组装,将其与虹鳟参考基因组进行序列比对。结果 发掘新转录本 6555 个,其中 30 个新转录本在热应激前后差异表达($P < 0.05$)。与 GO 数据库比对对新转录本进行功能注释,获得 3097 个新转录本的注释。与 KEGG 数据库比对,共有 3617 个新转录本注释到 284 条代谢通路中。对 19 424 个已注释基因的结构进行优化,延伸了 14 719 个基因的 5'端和 14 796 个基因的 3'端。结论 通过对发掘的 6555 个新转录本分析,并对 19 424 个已注释基因结构优化,为虹鳟基因组注释信息的完善提供了有力的借鉴,并为进一步了解虹鳟热应激的机制提供更有力的理论基础。

【关键词】 虹鳟;转录组测序;新转录本;基因结构优化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0135-08

Analysis of novel transcripts and optimization of the gene structure in the liver of rainbow trout

MA Fang, LIU Zhe*, KANG Yujun, QUAN Jinqiang

(College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Corresponding author: LIU Zhe. E-mail: liuz@gsau.edu.cn

【Abstract】 Objective To discover novel transcripts from RNA-seq data of rainbow trout under heat stress and optimize the annotated gene structure. **Methods** Total RNA was extracted from the liver of rainbow trout and used to construct a cDNA library that was sequenced by the Illumina two-terminal sequencing Hiseq 2500 platform. Sequencing data were assembled by Cufflinks software and aligned with the rainbow trout genome. **Results** Among 6555 new transcripts, 30 were differentially expressed under heat stress ($P < 0.05$). A total of 3097 novel transcripts were annotated and blasted by the GO database. There were 3617 new transcripts annotated in 284 metabolic pathways by KEGG database. The structure of 19 424 annotated genes was optimized, and the 5'-ends of 14 719 genes and 3'-ends of 14 796 genes were extended. **Conclusions** Discovery and analysis of 6555 novel transcripts and 19 424 gene structure optimization provide a powerful reference optimizing the genome annotation information of rainbow trout, and a more powerful theoretical basis for further understanding the mechanism of heat stress in rainbow trout.

【Keywords】 rainbow trout; RNA-seq; novel transcript; gene structure optimization

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660735)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31660735).

[作者简介] 马芳(1981—),女,博士研究生,主要从事动物遗传育种与繁殖。Email: mafangfighting@163.com

[通信作者] 刘哲(1970—),男,教授,博士生导师。Email: liuz@gsau.edu.cn

转录组是指细胞在特定阶段产生的全部转录本,包括 mRNA、rRNA、sRNA 和 tRNA^[1]。转录组学已经被广泛用来研究生物体对环境的各种复杂反应,解释基因组的功能元素。随着 RNA-seq 变得越来越便宜,常常成为研究环境压力的方法。丰富的 RNA-seq 数据可以构建完整的转录组,提供丰富的差异基因表达信息,并可用于识别涉及热应激反应的生物通路。在鱼类中,通过利用 RNA-seq 识别不同鱼类温度适应机制的研究正在迅速增加。但是,现有数据库中对转录本的注释还不全面,通过 RNA-seq 技术,还能检测到新转录本。目前,越来越多的研究开始关注 RNA-seq 技术在新转录本预测和基因结构优化方面的应用^[2-3]。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)作为鲑科鱼类的一员,正迅速的成为水产养殖中的重要鱼类。作为典型的冷水鱼,最适的生活温度是 12 ~ 18℃。对于高温的耐受性低,当温度超过 24℃ 时免疫功能严重下降,组织受损^[4]。以前的研究利用微阵列技术验证了虹鳟对温度变化的反应^[5],并对虹鳟不同种类的热应激反应进行了比较^[6]。

本课题组前期应用 RNA-seq 技术对虹鳟热应激下肝组织中差异表达基因进行了鉴定^[7],本研究中,在前期研究的基础上运用生物信息学方法鉴定新的转录本并对已注释基因的结构进行优化及,为深入理解虹鳟热应激的机制奠定基础,同时为虹鳟基因组的进一步完善提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养

选择身体健壮,平均体重为(400 ± 10.5)g 的全同胞虹鳟 200 尾运送至实验室,置于一个 3000 L 的水箱在 18℃ 下驯养 7 d。试验前,随机挑选 120 尾分为六组,每组 20 尾,分别置于 6 个 300 L 的室内循环流水水箱中暂养一周。饲养期间严格按照虹鳟饲养标准饲喂,光照周期为 12 h 光照和 12 h 黑暗,严格按照虹鳟饲养标准饲喂。

1.2 热处理及采样

暂养结束后,选 3 组继续 18℃ 饲养,对其余 3 组进行热处理升温,从 18℃ 到 24℃ 以恒定的速率每 24 h 升高 1℃。然后随机从各组取 1 尾鱼采取肝组织,18℃ 作为对照组,24℃ 作为热处理组。采样时,用 0.05 g/L 的间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)对实验用鱼进行麻醉,采集肝组织,迅速贮存

到液氮中,然后-80℃ 保存备用。

1.3 RNA 提取

利用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)对肝组织的总 RNA 进行提取,用 NanoPhotometer[®] spectrophotometer (IMPLEN, CA, USA)和 1%琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 的纯度进行检测。用 Qubit 2.0 荧光光度计(LifeTechnologies, CA, USA)和 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA)检测提取的总 RNA 的浓度和完整性。样品检测合格后进行文库构建。

1.4 文库构建和转录组测序

应用 the NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit 构建 6 个测序文库。用带有 Oligo(d T)的磁珠纯化 mRNA,随后加入 NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer(5X)使 mRNA 打断成短片段,应用六聚体引物和 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-)合成一链 cDNA,随后用 RNase H 和 DNA polymerase I 合成二链 cDNA。利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA 选择 150~200 bp 的 cDNA 片段。最后通过 PCR 扩增得到 cDNA 文库。构建好的文库用 Agilent Bioanalyzer 2100 检测合格后,使用 Illumina HiSeq[™] 2500 平台进行测序获得 150 bp 的双末端原始数据。

1.5 新转录本预测

原始数据(raw reads)去除带接头(adapter)的 reads 和含 ploy-N 和低质量的 reads 后获得 clean data。同时计算 clean data 的 Q20a、Q30 和 GC 含量。后面的所有的分析都基于高质量的 clean data。应用 TopHat v2.0.12 将 clean data 比对到参考基因组,随后利用 Cufflinks v2.1.1 软件对比对结果进行组装,用 Cuffcompare 和已知的基因注释文件进行比较,寻找潜在的新转录本。利用 GOseq 软件对新转录本进行 GO 功能注释。KOBAS (2.0) 软件对 KEGG 注释通路进行分析。

1.6 新转录本热应激下基因表达分析

根据转录本的长度和新转录本的比对结果计算每个转录本的 FPKM (expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced 每百万片段中来自某一基因每千碱基长度的数目)作为表达量的单位,归一化处理后的数据用 log₂ 作为新转录本表达的数据。采用 DESeqR package (v1.18.0)对热处理组和对照组之间差异表达的新转录本进行分析, $P <$

0.05 的转录本为差异表达。

1.7 已知基因结构优化

组装的转录本与虹鳟基因注释信息进行对比,如果在已注释基因边界外的区域有连续的匹配读段,则将基因的 5'和 3'端进行延伸,优化已注释基因的结构。

2 结果

2.1 测序结果数据处理与分析

测序数据已提交 NCBI 数据库 (SRP092649)。6 个文库 (CL1、CL2、CL3 和 HL1、HL2、HL3) 总共产生了 287 277 772 条原始数据 (raw reads), 去除带接头的 reads, 去除 N 的比例大于 10% 的 reads 和去除低质量的 reads 后获得 277 680 702 条 clean reads。通过对碱基质量进行了评估和碱基组成的检测,可以保证下游分析的准确性。RNA-Seq 测序的碱基质量值是碱基识别出错概率的整数映射,使用

Phred 碱基质量值公式计算。碱基质量值越高表明碱基识别准确度越高,例如碱基质量值 10 (Q10)、20 (Q20)、30 (Q30) 和 40 (Q40) 分别表示碱基识别出错的概率为 10%、1%、0.1% 和 0.01%。6 个文库中碱基质量值 $\geq$ Q30 的碱基百分比分别为 90.17%、89.77%、89.62%、91.25%、91.47% 和 91.30%,说明碱基质量较高 (表 1)。6 个样品的碱基组成情况如图 1,各个碱基占的比例约为 25%,G 和 C 碱基及 A 和 T 碱基含量每个测序循环上分别相等,且整个测序过程稳定不变,呈水平线,不存在碱基分离现象。利用 Top Hat2 软件将 clean reads 与虹鳟参考基因组进行比对,由表 1 可知,6 个样品中 clean reads 与虹鳟参考基因组进行比对效率在 66.17% ~ 68.61% 之间,其中有单位点 (uniquely mapped) 比对率在 64.83% ~ 67.31% 之间,多位点 (multiple mapped) 比对率在 1.23% ~ 2.28% 之间,说明测序数据的比对率正常。

表 1 clean data 与参考基因组序列比对结果

Table 1 Comparison of clean data with the reference genome sequences

样品名 Sample names	测序序列总数 Clean reads	多位点比对率 Multiply mapped(%)	单位点比对率 Uniquely mapped(%)	比对上的测序序列占比 Mapped ratio (%)
CL1	47 823 894	1.33	64.83	66.16
CL2	50 237 614	1.29	65.73	67.02
CL3	46 223 266	1.5	65.37	66.87
HL1	47 431 982	1.23	65.83	67.05
HL2	46 589 672	2.28	65.91	68.19
HL3	39 374 274	1.29	67.32	68.61

2.2 新转录本的发掘

通过过滤掉少于 50 个氨基酸残基的编码肽链和只包含单个外显子的序列,共获得 6555 个新的转录本 (表 2)。其中表达量较低的 (≤ 10) 的基因为 1991 个,占 30.4%;高表达的 (>1000) 的基因为 133

个,占 2.03% (图 2)。新转录本的长度大都在 500 bp 以上,约占 62.1%,说明新鉴定的转录本主要为蛋白质编码基因 (图 3)。新转录本在染色体上的分布如图 4 所示,在 chrUn 染色体上分布最多,有 5411 条;在染色体 chrUn26 上最少,有 11 条。

表 2 利用 RNA-seq 技术鉴定的虹鳟新转录本

Table 2 Novel transcripts in the rainbow trout identified by RNA-Seq technology

基因编号 Gene ID	染色体编号 Chromosome ID	基因位置 Gene start and end /bp	+/- 链 +/- Strand	长度 Length (bp)
Novel 00028	chrUn	11 068 903-11 071 428	+	2246
Novel 05415	chrUn_1	5 997 819-5 998 679	+	762
Novel 05465	chrUn_10	2 436 161-2 442 857	+	2370
Novel 05511	chrUn_11	10 727 573-10 729 065	+	775
Novel 05586	chrUn_12	10 744 178-10 746 395	-	1942
Novel 05626	chrUn_13	8 246 060-8 254 386	-	3465
Novel 05637	chrUn_14	7 812 596-7 834 573	+	2345
Novel 05697	chrUn_15	11 949 929-11 958 556	-	6899
Novel 05719	chrUn_16	19 964 596-19 984 012	+	662
Novel 05771	chrUn_17	37 015 781-37 021 070	+	1823
Novel 05810	chrUn_18	22 777 751-22 789 789	+	804

注:部分数据未列出。
Note. Some data are not listed.

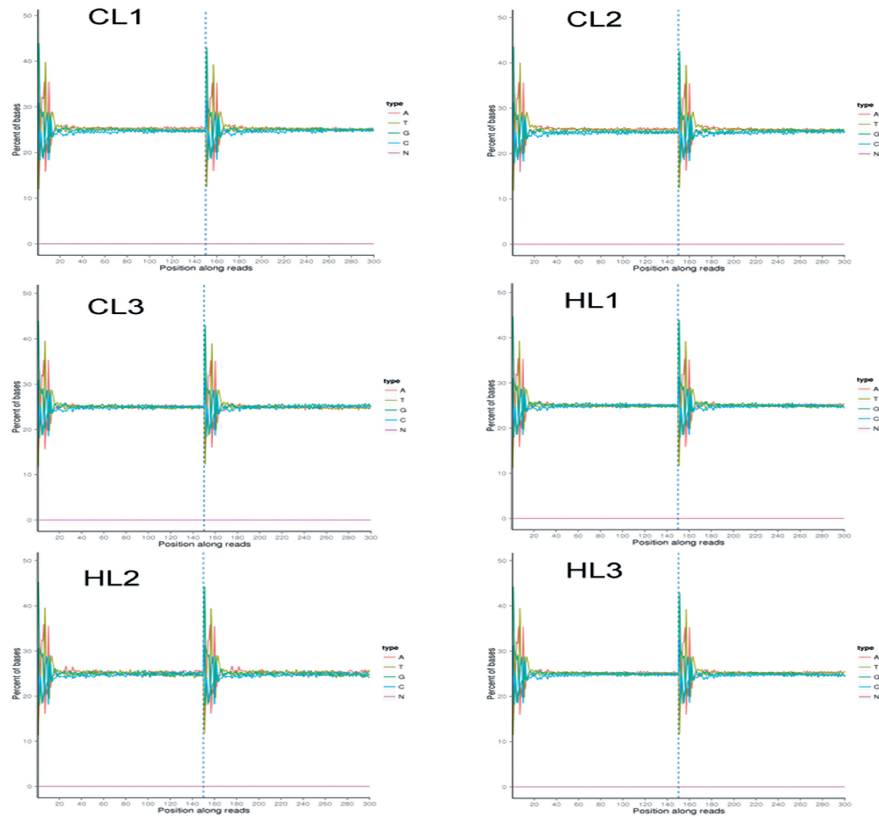


图 1 原始数据碱基组成
Figure 1 Base composition of raw data

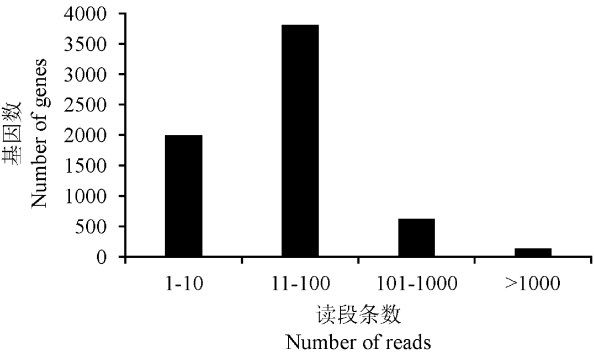


图 2 虹鳟肝新转录本表达量统计

Figure 2 Statistical data of the expression of new transcripts in the liver of rainbow trout

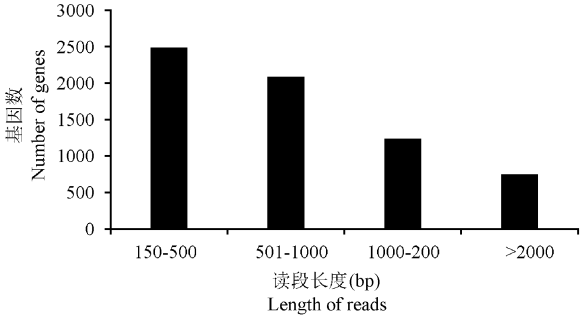


图 3 虹鳟肝新转录本的长度分布

Figure 3 Length distribution of the new transcripts in the liver of rainbow trout

2.3 新转录本的注释

利用 Blast2Go 软件对筛选到的新转录本进行 GO 富集分析,3097 个新转录本注释到细胞组成、生物学过程和分子功能。在分子功能中,绑定分子功能类别所占比例最多,其次是酶活性活性类别。在生物学过程中,代谢过程类别所占比例最多,其次是生物合成过程类别。在细胞组分中,胞外区类别所占比例最多(图 5)。

利用 KOBAS(2.0)软件对 KEGG 注释通路进行

分析,3617 个新转录本注释到 284 条代谢通路。主要的 10 条代谢途径见图 6, 分别是代谢途径 (metabolic pathways)、粘着斑 (focal adhesion)、内吞作用 (endocytosis)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway)、碳代谢 (carbon metabolism)、Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway)、AMPK 信号通路 (AMPK signaling pathway)、细菌侵入上皮细胞 (bacterial invasion of epithelial cells)。

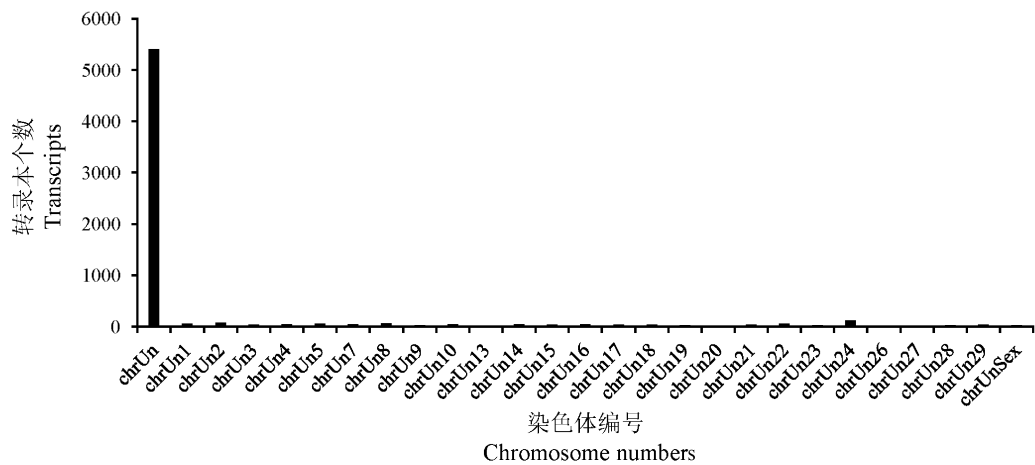


图 4 转录本在染色体上的分布

Figure 4 Distribution of the transcripts on chromosomes

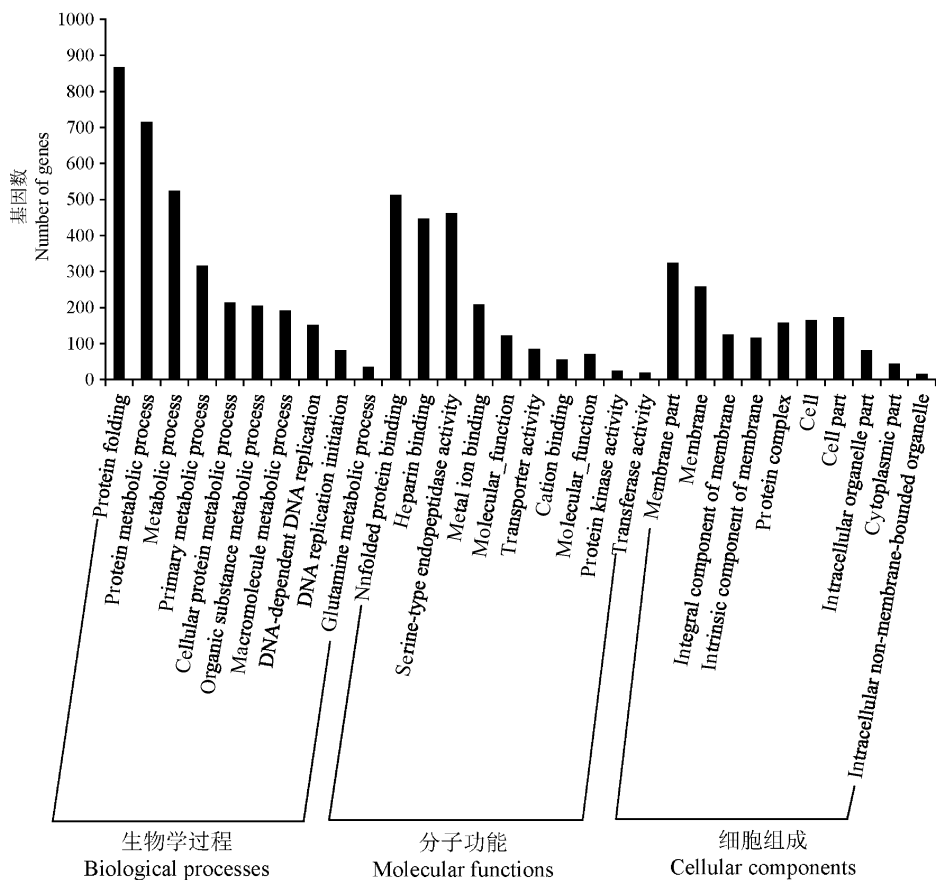


图 5 虹鳟肝新转录本 GO 注释结果

Figure 5 GO annotation results for the new transcripts in the liver of rainbow trout

2.4 新转录本表达谱分析

总共有 30 个新转录本在热应激下差异表达, 参与了虹鳟热应激。其中 15 个显著上调表达 (Novel00236、Novel00736、Novel01309、Novel01495、Novel02292、Novel02550、Novel02698、Novel03125、Novel03334、Novel03377、Novel03766、Novel04249、

Novel05645、Novel06326、Novel06367) ($P < 0.05$), 15 个显著下调 (Novel00295、Novel00475、Novel00942、Novel01074、Novel01430、Novel03158、Novel03185、Novel03283、Novel03815、Novel04339、Novel05149、Novel05519、Novel05701、Novel06040、Novel06166) ($P < 0.05$) (图 7)。

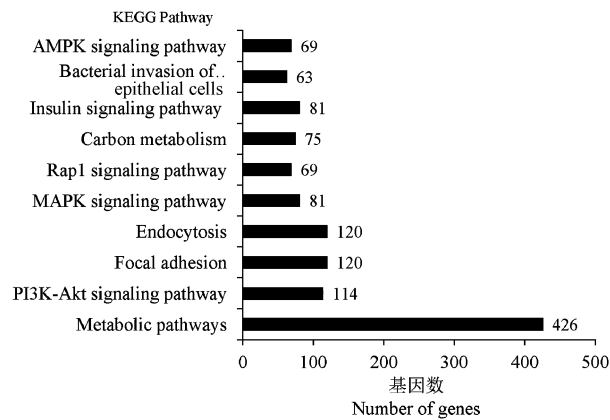


图 6 虹鳟肝新转录本 KEGG 分析

Figure 6 KEGG analysis for new transcripts in the liver of rainbow trout

2.5 已注释基因结构优化

利用 RNA-seq 测序结果对已注释基因的结构进一步优化。如果在已注释基因边界之外的区域有连续的匹配读段支持,则将基因的 UTR 区域向上游或向下游延伸,优化基因边界。基因结构优化结果显示,本研究中共有 19 424 个已注释基因 5'或 3'端在原有基础上发生了延伸(表 3)。其中 5'端为 14 719 个延伸,3'端为 14 796 个延伸(表 4)。

3 讨论

虹鳟作为典型的冷水性鱼,对高温的耐受能力差,随着全球气候的变暖,对虹鳟的养殖造成了越来越严重的影响,因此了解虹鳟热应激下的生存机制,提高虹鳟的抗逆性至关重要。目前,越来越多的研究深入的探索鱼类热应激的机制^[8-10]。对于虹鳟,转录水平上进行的热应激研究相对较少,一些研究采用活体^[11-13],或采用体外细胞培养的方法^[14-15],初步研究了热应激下虹鳟个别已知 mRNA

的表达水平变化,没有系统研究热应激调控机理。目前发展的高通量转录组测序技术 RNA-seq,在研究基因结构和功能方面具有突出的优势,通过 RNA-seq 可以全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的转录本信息。

表 3 基因 3'和 5'端延伸情况

Table 3 Extension of the 3' and 5' ends of genes					
染色体编号 Chromosome ID	5'端延伸 的基因数 Number of genes with 5'-end extension	3'端延伸 的基因数 Number of genes with 3'-end extension	转录本 Transcripts	+链 + strand	-链 - strand
chrUn	6256	6332	7381	3661	3720
chrUn_1	485	462	605	320	326
chrUn_2	497	486	620	296	324
chrUn_3	236	209	375	201	174
chrUn_4	396	410	516	257	259
chrUn_5	499	512	639	339	300
chrUn_6	432	409	551	274	277
chrUn_7	501	487	629	305	324
chrUn_8	478	452	563	301	262
chrUn_9	186	205	330	149	181
chrUn_10	341	335	462	257	205
chrUn_11	365	384	500	269	231
chrUn_12	511	489	646	336	310
chrUn_13	187	196	304	148	156
chrUn_14	253	267	383	204	179
chrUn_15	268	245	387	194	193
chrUn_16	415	408	546	268	278
chrUn_17	401	423	563	267	296
chrUn_18	226	251	363	197	166
chrUn_19	225	246	398	178	220
chrUn_20	156	135	296	147	149
chrUn_21	201	196	328	173	155
chrUn_22	155	178	290	166	124
chrUn_23	163	185	218	119	99
chrUn_24	175	152	213	106	107
chrUn_26	101	98	127	66	61
chrUn_27	162	157	280	130	150
chrUn_28	169	138	269	138	131
chrUn_29	241	224	381	193	188
chrUn_Sex	138	125	261	131	130

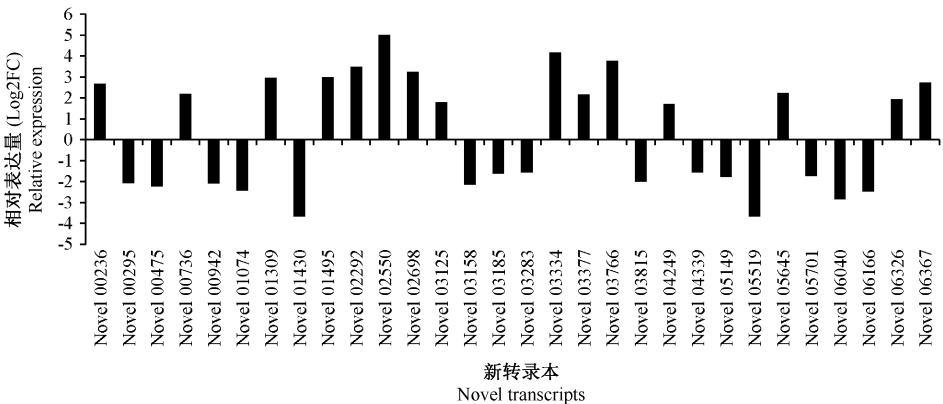


图 7 热应激后虹鳟肝新转录本的差异表达

Figure 7 Differential expression of new transcripts in the liver of rainbow trout after heat stress

表 4 部分 3'或 5'端延伸的基因
Table 4 Partial 3' or 5' extension genes

基因 ID Gene ID	染色体编号 Chromosome ID	+/-链 +/- Strand	3'/5' UTR 3'/5' UTR	优化前位置 Location before optimization	优化后位置 Location after optimization
GSONMT00081559001	chrUn_5	-	5'	22 725 110~22 791 990	22 725 008~22 791 990
GSONMT00081786001	chrUn_17	+	5'	13 633 837~13 644 273	13608498~13 644 273
GSONMT00081864001	chrUn_29	+	3'	29 795 758~29 895 978	29 795 758~29 896 041
GSONMT00000306001	chrUn_1	+	5'	25 974 245~25 998 220	25 973 720~25 998 220
GSONMT0000036001	chrUn	-	5'	369 153 556~369 160 040	369 152 785~369 160 040
GSONMT00000222001	chrUn_18	-	3'	13 568 251~13 585 651	13 568 251~13 585 742
GSONMT00000364001	chrUn_27	-	3'	17 773 309~17 774 923	17 773 309~17 776 899
GSONMT00000401001	chrUn_10	+	3'	14 938 835~14 959 250	14 938 835~14 961 085
GSONMT00000415001	chr_7	-	5'	9972~37 903	9649~37 903
GSONMT00000686001	chr_2	+	3'	1 107 793~1 141 846	1 107 793~1 142 329

随着转录组测序技术的快速发展,越来越多的新转录本被发现,但是,在现有的数据库中对新转录本的注释还不全面。猪基因组自基因图谱公布后,还有不少新的转录本被发现^[16]。利用 RNA-seq 技术对绵阳正常组合骨延迟愈合组合进行了测序,发现了 12 431 个新转录本^[3]。

本研究应用构建虹鳟热应激下的 6 个转录本序列,将虹鳟热应激下肝 RNA-seq 结果中的原始数据,去除带接头的 reads,去除 N 的比例大于 10% 的 reads 和去除低质量的 reads 后获得 277 680 702 条 clean reads。然后对将 clean data 比对到参考基因组,随后对比对结果进行组装,并与已知的基因注释文件进行比较,寻找潜在的新转录本。共发现 6555 个新转录本,表达量较低的(reads ≤ 10)的基因为 1991 个,说明虹鳟肝中至少表达了 4564 个新转录本,并且大多数是高表达^[7]。热应激下新转录本的表达谱分析揭示了这些新转录本也参与了虹鳟抗热应激过程。尽管关于虹鳟对热应激胁迫的分子机制已经有很多研究^[14, 17-18],但是还没有对这些未知因子在热应激下的作用机制进行深入分析,因此,本研究首次系统的分析了新转录本在热应激下的调控规律和作用。我们发现在肝中总共有 30 个新转录本受到热应激的调控,其中 15 个表达显著上调,15 个表达显著下调,这给了解虹鳟热应激的机制进一步奠定了基础。

RNA-seq 还在进一步完善基因结构信息方面发挥着重要的作用,将 clean data 比对到参考基因组后,发现共有 19 424 个已知基因的 5'或 3'UTR 区在原有基础上发生了不同的延伸。该结果表明,已知基因的 5'或 3'UTR 区预测不完全,而这些延伸优化了已知基因的结构。

本实验通过对 RNA-seq 结果进行生物信息学

分析,发现了 6555 个新转录本,30 个新转录本参与了虹鳟抗热应激过程。对已注释基因的结构进行了优化。这些结果使得虹鳟的全基因组更加全面,也为进一步了解虹鳟热应激的机制提供更有力的理论基础。

参 考 文 献(References)

[1] Suzuki Y, Sugano S. Transcriptome analyses of human genes and applications for proteome analyses [J]. Curr Protein Pept Sci, 2006, 7(2): 147-163.

[2] Chen C, Ai H, Ren J, et al. A global view of porcine transcriptome in three tissues from a full-sib pair with extreme phenotypes in growth and fat deposition by paired-end RNA sequencing [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 448.

[3] Jäger M, Ott CE, Grünhagen J, et al. Composite transcriptome assembly of RNA-Seq data in a sheep model for delayed bone healing [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 158.

[4] 夏斌鹏, 刘哲, 周彦静, 等. 慢性热应激对虹鳟部分血清非特异性免疫指标的影响[J] 农业生物技术学报, 2017, 25(7): 1078-1085.

Xia BP, Liu Z, Zhou YZ, et al. Effects of chronic heat stress on part of serum non-specific immunity parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Agric Biotechnol, 25(7): 1078-1085.

[5] Lewis JW, Hori TS, Rise ML, et al. Transcriptome responses to heat stress in the nucleated red blood cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Physiol Genomics, 2010, 42(3): 361-373.

[6] Verleih M, Borchel A, Krasnov A, et al. Impact of thermal stress on kidney-specific gene expression in farmed regional and imported rainbow trout [J]. Mar Biotechnol, 2015, 17(5): 576-592.

[7] Li YJ, Huang JQ, Liu Z. et al. Transcriptome analysis provides insights into hepatic responses to moderate heat stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Gene, 2017, 1119 (17): 30231-30237.

[8] Wang Y, Xu J, Sheng L. Field and laboratory investigations of the

- thermal influence on tissue-specific Hsp70 levels in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007, 148(4): 821–827.
- [9] Fangue NA, Hofmeister M, Schulte PM. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus* [J]. J Exp Biol, 2006, 209(15): 2859–2872.
- [10] Molina A, Biemar F, Müller F, et al. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish [J]. FEBS Lett, 2000, 474(1): 5–10.
- [11] Li Z, Liu Z, Wang YN, et al. Effects of heat stress on serum cortisol, alkaline phosphatase activity and heat shock protein 40 and 90βmRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Biologia, 2016, 71(1): 109–115.
- [12] Wang Y, Liu Z, Li Z, et al. Effects of heat stress on respiratory burst, oxidative damage and SERPINH1 (HSP47) mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Fish Physiol Biochem, 2016, 42(2): 701–710.
- [13] Shi HN, Liu Z, Zhang JP, et al. Effect of heat stress on heat-shock protein (Hsp60) mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5280–5286.
- [14] Boone AN, Vijayan MM. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes; effect of heat shock and heavy metal exposure [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2002, 132(2): 223–233.
- [15] Heredia-Middleton P, Brunelli J, Drew RE, et al. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008, 149(4): 552–556.
- [16] 秦彩艳, 霍金龙, 王配, 等. 猪新基因 KCNJ12 编码区电子克隆、RT-PCR 验证和组织表达分析[J]. 华北农学报, 2014, 29(1): 41–49.
- Qin CY, Huo JL, Wang P, et al. In silico cloning, RT-PCR verification and tissues expression of coding region sequence of novel swine gene KCNJ12 [J]. Acta Agric Boreali Sin, 2014, 29(1): 41–49.
- [17] Currie S, LeBlanc S, Watters MA, et al. Agonistic encounters and cellular angst: social interactions induce heat shock proteins in juvenile salmonid fish [J]. Proc Biol Sci, 2010, 277(1683): 905–913.
- [18] Ojima N. Rainbow trout hspb1 (hsp27): identification of two mRNA splice variants that show predominant expression in muscle tissues [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2007, 148(3): 277–285.

[收稿日期] 2018-12-11