

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190226001

http://www.yykxjz.cn/

陶筱帆, 谢婷婷, 李小霞, 罗军涛, 白雅静, 韩兵社, 张俊芳. 低温驯化下斑马鱼 *LINE1* 的表达检测. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 88–93

Tao XF, Xie TT, Li XX, Luo JT, Bai YJ, Han BS, Zhang JF. Expression of *LINE1* in zebrafish (*Danio rerio*) during cold acclimation. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 88–93

低温驯化下斑马鱼 *LINE1* 的表达检测*

陶筱帆¹ 谢婷婷¹ 李小霞¹ 罗军涛¹
白雅静^{1,2} 韩兵社^{1,2,3} 张俊芳^{1,2,3}①

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;

2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

3. 上海海洋大学 中国科学技术部海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306)

摘要 长散布核元件-1(Long spread nuclear element-1, *LINE1*)是跳跃基因。前期比较基因组研究发现, 南极鱼经历漫长的低温适应进化后, 与南极圈外的同亚目鱼类相比较, 在基因水平上 *LINE1* 的扩增效率高达 8~300 倍, 但 *LINE1* 的扩增与鱼类抵御寒冷之间的关系尚未明了。本实验对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎成纤维细胞 ZF4 进行了不同时间梯度的低温处理(18℃、5 d 和 18℃、30 d), 同时对斑马鱼成鱼也进行了不同时间的低温处理(10℃、3 h、6 h、1 d、3 d、5 d)。采用 RT-qPCR 检测了 *LINE1* 的 mRNA 水平, 并克隆了斑马鱼 *LINE1* 基因启动子区, 利用 Luciferase 双荧光报告系统, 在 ZF4 细胞中验证 *LINE1* 5'UTR 在低温压力下的生物活性。结果显示, 短时间低温处理下, ZF4 细胞中 *LINE1* mRNA 水平有所降低, 而在长时间低温处理中, *LINE1* 的 mRNA 水平显著升高。在成鱼中, 短时间低温处理下, *LINE1* mRNA 水平降低; 长期低温处理下, *LINE1* mRNA 水平显著升高。在 ZF4 细胞中发现, *LINE1* 5'UTR 具有生物活性。在低温处理(18℃, 3 d)下, 报告基因信号减弱, 间接表明 *LINE1* 启动子活性减弱。研究结果表明, 低温压力会影响 *LINE1* 在鱼类中的表达。本研究为进一步探究 *LINE1* 在鱼类适应低温环境中的作用机制奠定了基础。

关键词 *LINE1*; 低温; 斑马鱼; ZF4 细胞; 启动子

中图分类号 Q74 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0088-06

真核生物基因组中存在大量的转座子元件, 包含 *LINE1*、*Alu* 和 *SVA*。迄今为止, 3 种逆转座子依旧具有活性: *LINE1*、*Alu* 和 *SVA* 元素。*LINE1* 逆转座子包含 5'UTR、2 个开放阅读框及具有 PolyA 尾的 3'UTR (Dombroski *et al.*, 1991)。*LINE1* 属跳跃基因, 占人类

基因组约 17%, 为自主转座, 通过 RNA 中间体自我传播; 而 *Alu* 和 *SVA* 为非自主转座(Lander *et al.*, 2001)。它们利用“复制-粘贴”机制, 通过 RNA 中间体在整个基因组中繁殖, 这一过程称为逆转录(Lu *et al.*, 2016)。逆转座子的转座导致基因组改变, 多数时候给基因组

* 国家自然科学基金项目(31372516; 81770165)、上海市教育委员会“东方学者”计划和上海市人才发展资金项目(201457)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31372516; 81770165), and Project of Shanghai Education Commission “Oriental Scholars” Program, and Shanghai Talent Development Fund Project (201457)].

陶筱帆, E-mail: 512099587@qq.com

① 通讯作者: 张俊芳, 教授, E-mail: jfzhang@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-02-26, 收修改稿日期: 2019-03-14

带来负面影响,如:改变基因组结构、影响基因表达、改变基因调控方式等(Gilbert *et al*, 2005; Tubio *et al*, 2014)。因此,宿主基因会通过启动子区域甲基化或者小 RNA 干扰等机制来抑制转座(Kinomoto *et al*, 2007; Levin *et al*, 2011)。但研究表明,转座元件与基因组是互益的(Faulkner *et al*, 2009),逆转座子的转座可导致新基因产生,这对于物种多样性和物种进化具有积极意义(Hamon *et al*, 2011; Volf *et al*, 2000)。

鱼类作为变温动物,水温变化在很大程度上影响其生理及行为(Perry *et al*, 2005)。南极大陆经历了漫长降温,水温常年处于 0℃ 以下(Gordon, 2003),南极圈内与南极圈外同亚目鱼类相比较逆转座子的扩增倍率在 8 倍以上,有些甚至高达 300 倍(Chen *et al*, 2008)。这些基因可能参与了鱼类适应寒冷的过程,在漫长的历史进化中变化。同时,研究发现,在面对环境压力时,逆转座子 *LINE1* 的逆转座活性会受到环境因素影响(Butelli *et al*, 2012)。因此,推测寒冷可能会导致鱼类 *LINE1* 逆转座子扩增,并且可能与鱼类适应寒冷环境相关。

斑马鱼(*Danio rerio*)体型纤细,成体长为 3~4 cm,对水质要求不高。孵出后约 4 个月达到性成熟,成熟鱼每隔几天可产卵一次,卵子体外受精,体外发育,胚胎发育速度快,胚体透明、子代多、遗传背景清楚,容易进行实验操作,易于在实验室内繁殖饲养,与人类基因 87% 相似(Watanabe *et al*, 2016),作为一种模式生物应用于生物学中(Howe *et al*, 2013; Sollars *et al*,

2003)。斑马鱼 ZF4 细胞来自孵化后 1 d 的斑马鱼胚胎(Driever *et al*, 1993),被广泛用于生物学实验中(Hu *et al*, 2015)。为研究低温对 *LINE1* 的影响,本研究检测了斑马鱼 ZF4 细胞 18℃ 培养 5 d 和 30 d、10℃ 培养 3 h、6 h、1 d、3 d、5 d *LINE1* mRNA 水平以及通过报告基因监测 *LINE1* 基因 5'UTR 在 18℃ 3 d 的活性变化,为研究寒冷环境下鱼类基因组中 *LINE1* 的表达变化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 ZF4 细胞和斑马鱼

斑马鱼胚胎成纤维细胞 ZF4 购买于 ATCC (American Type Culture Collection)。斑马鱼由实验室斑马鱼鱼房饲养,恒温循环水系统,水温为 27℃~28℃, pH 为 6.8~7.8,用丰年虫(*Artemia salina*)饲养。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清和胰蛋白酶、DMEM:F12 液体培养基购于 Gibco 公司; T4 连接酶和限制性内切酶购于 New England; SYBR Green 购于罗氏公司; Lipofectamine3000 购于英潍捷基贸易有限公司; RT-qPCR 反转录试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司; 双荧光报告系统试剂盒购于 Promega 公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 扩增引物
Tab.1 PCR amplification primers

引物 Primer	正向引物序列 Sequence of primer F	反向引物序列 Sequence of primer R
<i>L1-1</i>	CTAGCTAGCGGGCGCTACTGAGCAGGCG	CGGGGTACCTTGGATTATAGAGAACC
<i>L1-1B</i>	CTAGCTAGCGCTTCCGGTTTGGTCGCGC	CGGGGTACCAGCCAATTAGGCTCGAGAAAG
<i>LINE1-1</i>	ATGGCGGGCAAACACTACGTAA	TCAGT GTGTTCGGCTFFCTC
<i>LINE1-1B</i>	ATGGCTG GCAAGCGCAA	GAGGACGAGCTC TTGGTTAGTT
β -actin	CGCGCAGGAGATGGGA ACC	CAACGGAAACGCTCATTGC

主要仪器:细胞低温培养箱(Galaxy170R, eppendorf)、LightCycler 480 II (罗氏); 酶标仪(Bio-Rad 公司); NanoDrop2000 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 实时荧光定量 PCR

应用 IDT 引物设计软件(<http://sg.idtdna.com/sessionTimeout.aspx>)设计 RT-qPCR 引物(*LINE1-1*, *LINE1-1B*, 表 1)。采用 Trizol 方法提取斑马鱼细胞和肌肉组织的 RNA,使用 TaKaRa 反转录试剂盒(货号:RR047A)进行反转录实验,以反转录的 cDNA 为模板,进行 SYBR Green 荧光定量 PCR 实验。PCR 条

件:95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。每个样品 3 个生物学重复, *LINE1* 相对表达量的计算方法用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算, β -actin 作为内参。

1.4 载体构建及报告基因检测

提取斑马鱼细胞基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,上下游引物(*L1-1*, *L1-1B*, 表 1)分别引入酶切位点 *Kpn* I 和 *Nhe* I, 利用 PCR 扩增基因 5'UTR, *Kpn* I、*Nhe* I 酶切后用 T4 连接酶连接至载体 PGL4.10 中,将重组质粒转化到大肠杆菌内。

选择生长状态良好的 ZF4 细胞接种于 6 孔板中, 次日细胞完全贴壁后弃除培养基, 按 Lipofectamine3000 说明书进行转染。

采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 进行双荧光报告基因活性检测, 按说明书进行测定。

1.5 统计分析方法

统计学分析应用 GraphPad Prism 5 (GraphPad software, 美国)软件分析。*LINE1* 的表达数据和双荧光检测数据均来自 3 次独立重复实验, 采用 Student's *t*-test 方法分析统计学差异, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼胚胎成纤维细胞(ZF4)和斑马鱼成鱼在低温处理下 *LINE1* 的表达变化

有研究表明, 长期生活在低温环境的南极鱼基因组与南极圈外同亚目鱼类的基因组相比较, *LINE* 转座家族发生了 8~300 倍的扩增(Chen *et al*, 2008)。本研究选取 *LINE1* 的 2 个基因 *LINE1-1* 和 *LINE1-1B* 进

行实时荧光定量 PCR。在斑马鱼成鱼中, 10°C 为斑马鱼低温生存的临界温度, 因此, 选取 10°C 作为鱼类低温处理温度。与在常温(28°C)饲养的成鱼相比, 在 10°C 低温处理 3 h 和 6 h 的成鱼肌肉组织中 *LINE1-1* 的 mRNA 水平(图 1A)有所下调, 而在 10°C 低温处理 1 d、3 d、5 d 的成鱼肌肉组织中 *LINE1-1* mRNA 水平显著上调, 在成鱼中 *LINE1-1B* 的 mRNA 水平(图 1B)与 *LINE1-1* 的 mRNA 有相同趋势; 在 ZF4 细胞中, 选取 18°C 作为低温环境(Han *et al*, 2016), 与常温(28°C)细胞对比, 在 18°C 低温处理 5 d 的细胞中 *LINE1-1* 的 mRNA 水平有所下调, 而在 18°C 低温处理 30 d 的细胞 *LINE1-1* 的 mRNA 水平显著上调(图 1C)。

2.2 重组质粒构建与检测

实验室前期研究发现, 低温环境会引起 *LINE1* CpG 位点甲基化的改变(Han *et al*, 2016)。猜测低温环境会影响 *LINE1* 5'UTR 区域启动子的活性, 以斑马鱼基因组 DNA 为模板, 将 2 个 *LINE1* 基因的 5'UTR 区域进行 PCR 扩增(图 2)。

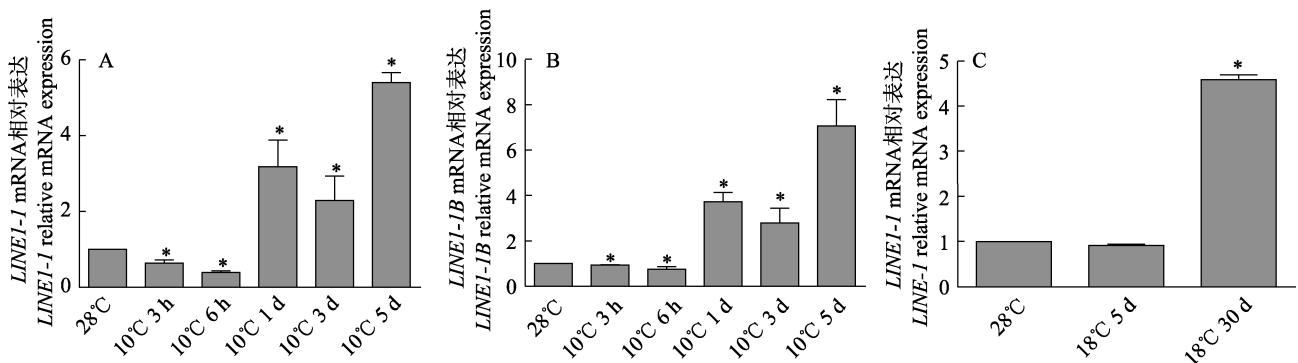


图 1 斑马鱼低温处理下 *LINE1* 表达的变化(*: $P < 0.05$,下同)

Fig.1 Expression changes of *LINE1* in zebrafish under low temperature treatment (*: $P < 0.05$. Same as below)

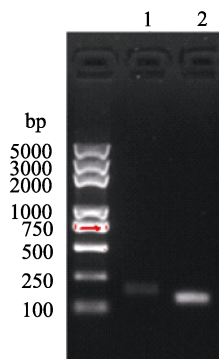


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 The agarose gel electrophoresis results of PCR products

1: *LINE1-1*-promoter; 2: *LINE1-1B*-promoter

载体 PGL4.10-basic 与 PCR 扩增片段经过 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 将 PCR 扩增产物插入 PGL4.10-basic 载体中(图 3), 将重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果与 PCR 扩增的基因序列相同, 重组质粒构建成功。

2.3 双荧光报告系统检测结果

通过检测相对荧光素酶活性, 间接检测 *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性, *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性越高, 荧光素酶活性发光值越高。海肾荧光素作为检测系统内参, 当 *LINE1* 5'UTR 区域启动子没有生物

学活性时,不能检测到荧光素酶活性发光值。将构建的重组质粒转染进常温(28℃)培养 ZF4 细胞中,结果显示,与阴性对照 PGL4.10-basic 相比,重组质粒均能检测到荧光素酶活性发光值,而 PGL4.10-basic 不能检测到荧光素酶发光值,表明 *LINE1* 5'UTR 具有启动子活性(图 4A)。将重组质粒与 PGL4.10-basic 和

PGL3- promoter 转染到 18℃ 低温处理 3 d 的 ZF4 细胞中, PGL4.10-basic 为阴性对照, PGL3-promoter 为阳性对照,结果显示,与常温(28℃)细胞相比,重组质粒在低温处理下荧光素酶活性发光值均有不同程度的下降,表明短期低温处理会影响 *LINE1* 基因 5'UTR 区域启动子活性(图 4B)。

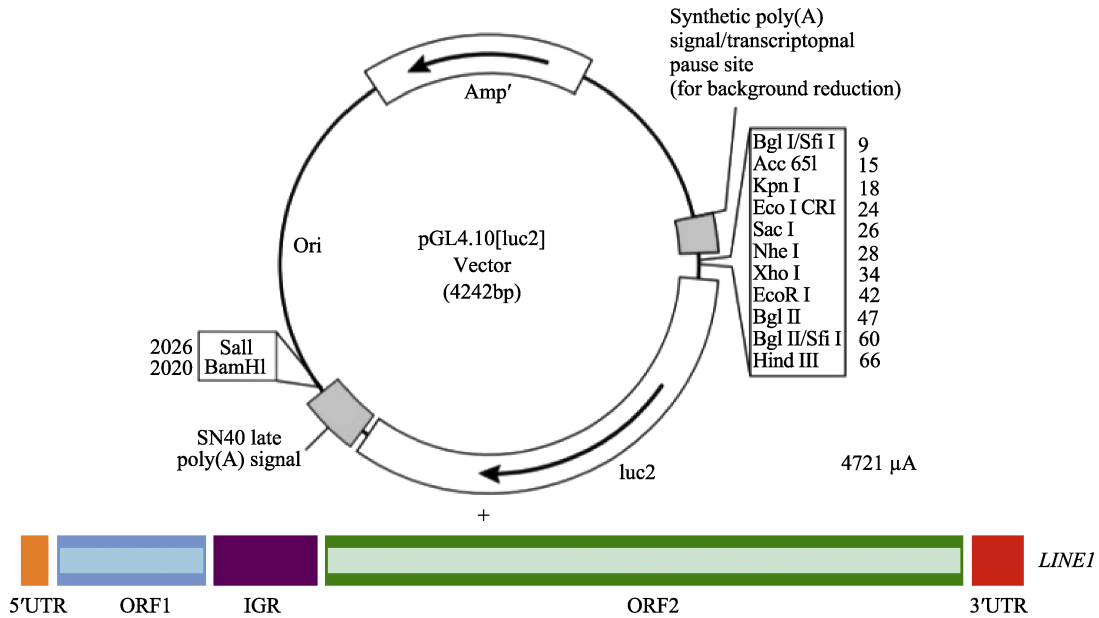


图 3 PGL4.10-*LINE1* 5'UTR 质粒构建

Fig.3 Plasmid construction map of PGL4.10-*LINE1* 5'UTR

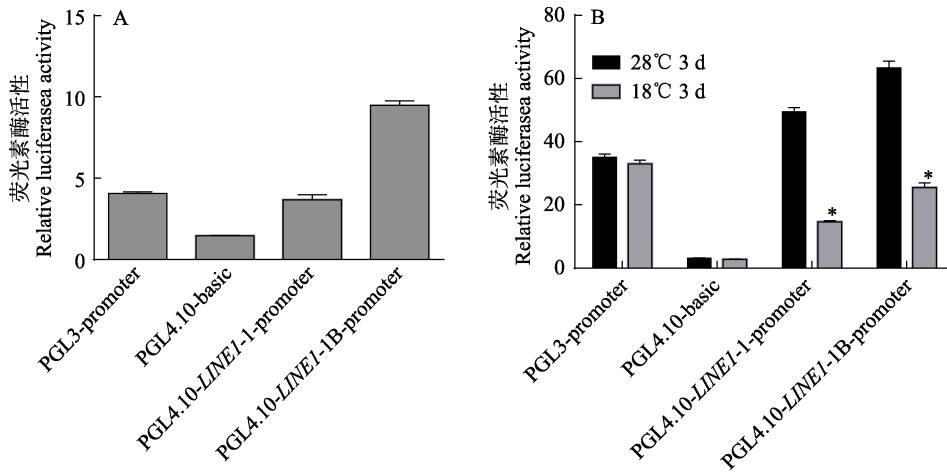


图 4 重组质粒 PGL4.10-*LINE1*-promoter 转染斑马鱼细胞后双荧光素酶相对活性分析

Fig.4 Analysis of relative activity of dual luciferase after transfection of zebrafish cells with recombinant plasmid PGL4.10-*LINE1*-promoter

3 讨论

LINE1 属于最丰富的一类自主转座因子。尽管多数 *LINE1* 被抑制活性,但依旧有很少一部分的 *LINE1* 具有活性, *LINE1* 的插入虽与疾病相关,但 *LINE1*

同样影响基因组的进化(Beck *et al*, 2011)。当面对环境因素刺激时,基因组进行自身进化诱导转座子转座(McClintock, 1984),使生物对环境变化做出适应性改变。在之前研究中发现,南极圈内物种与南极圈外物种转座子扩增效率存在巨大差异。在西西里血橙中,

寒冷诱导逆转座子的扩增(Butelli *et al.*, 2012)。这提示 *LINE1* 的扩增可能与生物体对长期寒冷环境的适应相关。为了研究逆转座子在长期低温环境下的大量扩增是否与生物体对寒冷环境的适应相关,将 ZF4 细胞培养在 18℃ 5 d,发现 ZF4 细胞生长明显停滞,而后 20 d 左右逐渐恢复生长状态,尽管相比 28℃ 依旧缓慢。本研究发现,短期低温处理诱导斑马鱼成鱼及斑马鱼 ZF4 细胞 *LINE1* 的 mRNA 水平下调,长期低温处理诱导斑马鱼成鱼及斑马鱼 ZF4 细胞 *LINE1* 的 mRNA 水平显著上调,推测 *LINE1* 对生物体适应外界低温环境压力可能有积极作用。生物体在寒冷环境下转座子转座水平升高,可能增加生物体基因型的多样性,使其对环境压力产生适应性进化。

在自然界中遵循着优胜劣汰的法则,从生物的进化开始,生物体内有益于适应环境、使生物体更好生存下去的基因会保留,垃圾基因会逐渐被淘汰,那么在长期寒冷环境中, L1 的显著扩增是否是生物体为了适应寒冷环境而选择的一种生物途径?在之前研究中发现, *LINE1* 启动子甲基化水平在低温环境下有所改变: 18℃ 低温处理 ZF4 细胞 5 d, *LINE1* 启动子甲基化水平升高,而低温处理 30 d 时,甲基化水平降低(Han *et al.*, 2016)。生物体会通过甲基化水平来调节 *LINE1* 表达水平, *LINE1* 与甲基化水平呈负相关关系(Hata *et al.*, 1997),因此,甲基化水平升高时, *LINE1* 被抑制, *LINE1* mRNA 水平呈下降趋势;当甲基化水平降低时, *LINE1* 激活, *LINE1* mRNA 水平呈上升趋势。据此推测,低温环境会通过影响 *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性,进而影响 *LINE1* 的扩增。构建重组质粒发现,低温确实能引起 *LINE1* 5'UTR 区域启动子活性改变,推测这种调节可能是生物体应对外界低温环境压力的方式之一, L1 对生物体适应外界低温环境压力可能有积极作用。生物体在寒冷环境下转座子转座水平升高,可能增加生物体基因型的多样性,使其对环境压力产生适应性进化。

总之,本研究通过对斑马鱼细胞以及斑马鱼成鱼不同时间的低温处理,研究 *LINE1* 的表达变化,为更好了解 *LINE1* 在鱼类寒冷适应中的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, *et al.* LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2011, 12: 187–215
- Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, *et al.* Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 1242–1255
- Chen Z, Cheng CH, Zhang J, *et al.* Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(35): 12944–12949
- Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, *et al.* Isolation of an active human transposable element. *Science*, 1991, 254(5039): 1805–1808
- Driever W, Rangini Z. Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 1993, 29(9): 749–754
- Faulkner GJ, Carninci P. Altruistic functions for selfish DNA. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 2009, 8(18): 2895–2900
- Gilbert N, Lutz S, Morrish TA, *et al.* Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(17): 7780–7795
- Gordon AL. Oceanography: The browniest retroflection. *Nature*, 2003, 421(6926): 904–905
- Hamon P, Duroy PO, Dubreuil-Tranchant C, *et al.* Two novel Ty1-copia retrotransposons isolated from coffee trees can effectively reveal evolutionary relationships in the Coffea genus (Rubiaceae). *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2011, 285(6): 447–460
- Han B, Li W, Chen Z, *et al.* Variation of DNA methylome of zebrafish cells under cold pressure. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160358
- Hata K, Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene*, 1997, 189(2): 227–234
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, 496(7446): 498–503
- Hu P, Liu M, Zhang D, *et al.* Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold response in zebrafish. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(19): 9198–213
- Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, *et al.* All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 2955–2964
- Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 860–921
- Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews. Genetics*, 2011, 12(9): 615–627
- Lu XJ, Xue HY, Qi XL, *et al.* LINE-1 in cancer: Multifaceted functions and potential clinical implications. *Genetics in Medicine*, 2016, 18(5): 431–439
- McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 1984, 226(4676): 792–801
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, *et al.* Climate change and distribution

- shifts in marine fishes. *Science*, 2005, 308(5730): 1912–1915
- Sollars V, Lu X, Xiao L, *et al.* Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nature Genetics*, 2003, 33(1): 70–74
- Tubio JMC, Li Y, Ju YS, *et al.* Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science*, 2014, 345(6196): 1251343
- Volff JN, Korting C, Scharl M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(11): 1673–1684
- Watanabe E, Mano S, Nomoto M, *et al.* HSP90 stabilizes auxin-responsive phenotypes by masking a mutation in the auxin receptor TIR1. *Plant & Cell Physiology*, 2016, 57(11): 2245–2254

(编辑 冯小花)

Expression of *LINE1* in Zebrafish (*Danio rerio*) During Cold Acclimation

TAO Xiaofan¹, XIE Tingting¹, LI Xiaoxia¹, LUO Juntao¹, BAI Yajing^{1,2},
HAN Bingshe^{1,2,3}, ZHANG Junfang^{1,2,3}①

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. International Research Center for Marine Biosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The long-spread nuclear element-1 (*LINE1*) retrotransposon is a mobile element in genome. Previous comparative genomic studies found that Antarctic Notothenioid fish underwent a long low-temperature adaptation evolution, and compared with Notothenioid fish outside the Antarctic circle, *LINE1* genes were duplicated by 8~300 fold. The link between this augmentation and the resistance of fish to cold is not known. In this study, zebrafish (*Danio rerio*) embryonic fibroblasts ZF4 were exposed to a low temperature (18°C) for 5 days and 30 days, and adult zebrafish were exposed to a low temperature (10°C) for 3 h, 6 h, 1 d, 3 d, and 5 d. The mRNA expression of *LINE1* was examined using RT-qPCR. The promoter regions of zebrafish *LINE1* gene were cloned and the biological activity of *LINE1* 5'UTR at low temperature were verified in ZF4 cells by using the dual-luciferase reporter system. The following results were obtained: (1) In ZF4 cells, *LINE1* mRNA expression was decreased by short-term low temperature treatment, but was significantly increased by long-term low temperature treatment. (2) In adult fish, *LINE1* mRNA expression was decreased by short-term low temperature treatment, but was significantly increased in long-term low temperature treatment. (3) The *LINE1* 5'UTR was found to be biologically active in ZF4 cells. (4) It was found that during low temperature treatment (18°C, 3 d), the reporter gene signal was weakened, which indirectly indicated that the *LINE1* promoter activity was weakened. The results showed that low temperature stress affected *LINE1* expression in fish, which presents a foundation for further study on the mechanism of action of *LINE1* in fish adaptation to a low temperature environment.

Key words *LINE1*; Low temperature; *Danio rerio*; ZF4 cells; Promoter

① Corresponding author: ZHANG Junfang, E-mail: jfzhang@shou.edu.cn