

黄河口与长江口近江牡蛎的比较转录组分析*

涂康,于红,孔令锋,李琪*

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室,山东青岛266101)

摘要:为进一步开发近江牡蛎的基因资源,探究黄河口与长江口近江牡蛎的遗传差异,采用Illumina测序平台对东营垦利和南通海门的近江牡蛎进行高通量转录组测序。对测序数据进行拼接后分别得到1.2 Gb和1.5 Gb的转录组数据,并对二者进行了基因功能注释和正选择基因的富集分析。结果表明,同源基因经筛选得到正选择基因108个,GO功能分析中共涉及到124个相关功能类别,其中有关到生物学过程的分类条目占比最多,为45项。总体上看,与细胞器、代谢过程、结合以及催化活性相关的类别占主导地位。KEGG富集分析表明,共涉及28个代谢通路,其中与核糖体、细胞凋亡相关的通路占比最大。上述结果不仅加深了对黄河口以及长江口近江牡蛎基因表达水平差异的认识,同时也为今后进行近江牡蛎各类遗传学分析和一些关键基因的克隆以及具体功能分析提供了基础数据。

关键词:近江牡蛎;黄河口;长江口;转录组;正选择基因

中图分类号:Q969.2;文献标志码:A文章编号:1673-2875(2019)04-0000-00

DOI:10.13984/j.cnki.cn37-1141.2019.04.011

引言

近江牡蛎(*Crassostrea angulata*),是世界性广分布种类,一般栖息于江河入海口的低盐海区,并由此而得名。广泛的分布性使近江牡蛎表现出了高度的遗传多样性,研究表明可能是由于地理隔离造成了基因流的阻塞,各地理群体为适应不同环境而产生新的性状^[1]。

河口生态系统处于河流与海洋的交汇处,是两种不同生态系统物质交换的重要场所,占全球沿海水域的10%,是一类非常重要的生态系统。黄河口位于山东省东营垦利县境内,地处渤海湾与莱州湾的交汇处,其水文因素较为单一,冲淡水受渤海水团影响较大^[2],故而水温与同纬度其他海域相比较低。长江口是我国最大的入海河口,其外海域受台湾暖流影响较大,其在夏季可为长江口带来高温暖流,水温较高。基于两地之间生态环境的差异,本实验将黄河口与长江口作为近江牡蛎研究区域具有一定的代表性。

随着分子生物学的发展,近江牡蛎与香港巨牡蛎之间混杂的分类关系以及近江牡蛎自身大跨度的维度适应性越来越引起研究人员的关注。本实验通过转录组测序技术对黄河口和长江口两海域近江牡蛎进行测序与分析,首次从转录组学角度探讨长江口与黄河口近江牡蛎以及渤海湾长牡蛎之间在基因表达水平的差异,同时也为有关近江牡蛎基因组学研究提供了基础数据。

材料与amp;方法

样品采集

本研究所用近江牡蛎分别于2018年取自山东东营垦利和江苏南通海门,均为健康成贝。每个取样点取一个个体,解剖后立即采集外套膜、鳃、闭壳肌、唇瓣和性腺组织。所有样品储藏在-80℃冰箱,以便后续使用。

* 基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2018YQ1000);山东省科技发展计划项目(2017YF001000);青岛市产业培育计划项目(2017-2018)资助

第一作者简介:涂康(1993-),男,硕士生,主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: 16732875@163.com

* 通讯作者:李琪(1988-),男,教授,主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: 16732875@163.com

收稿日期:2019-03-15

; ; 样品鉴定

每个样品取少量闭壳肌,以苯酚氯方法提取^{^2}。通过(1P扩增后对1W基因进行测序,并与21W基因库进行比对,确定两个个体均为近江牡蛎。

; ;< 总P2₁的提取与处理

每种组织取0.3g加入RNeasy Lysis Buffer试剂(Qiagen公司,美国),置于匀浆机中匀浆。按照操作说明分别提取垦利和海门近江牡蛎五种组织的总P2₁,使用RNase H处理去除总P2₁样品中残留的^{^2}。NanoDrop分光光度计(NanoDrop公司,美国)检测其质量和浓度均符合要求,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性符合要求。

; ;7 转录组文库制备

同一个体不同组织P2₁提取检测合格后等量混合,用带有poly(A)的磁珠富集OP2₁。随后加入RNase H将OP2₁打断成短片段,以OP2₁为模板,用六碱基随机引物合成单链cDNA,然后加入缓冲液、dNTPs和RNase H合成双链cDNA,再用Pfu I (Cat# 34.183250) (21

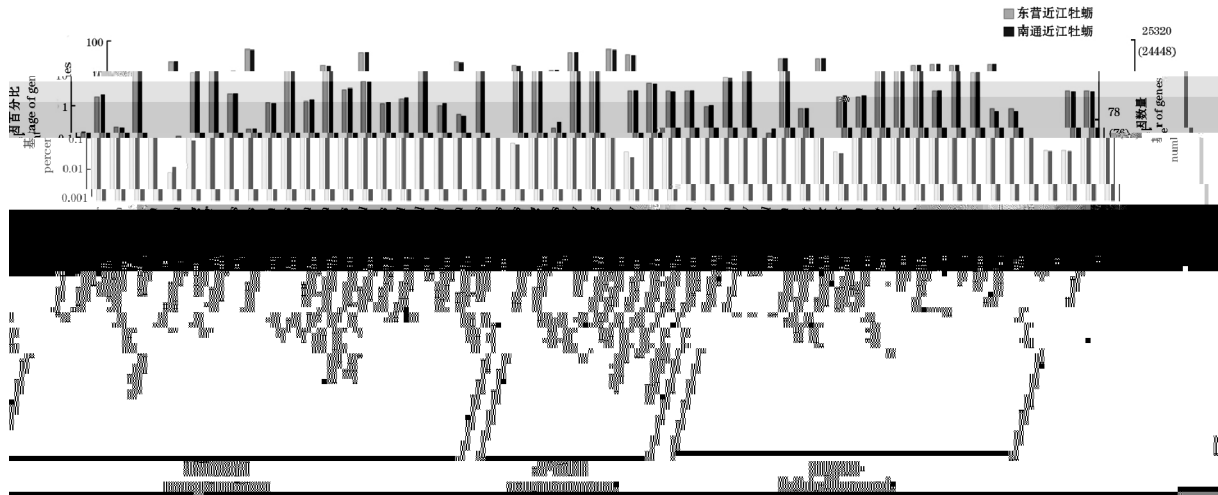


图1 垦利近江牡蛎与海门近江牡蛎基因 GO 功能分类

2.2.2 GO 功能分类与 KEGG 富集分析

对正选择基因进行 GO 功能分析。大致可以将基因归类到三大类别：细胞组分、生物学过程和分子功能。对垦利近江牡蛎与海门近江牡蛎正选择基因进行分析可以发现，在细胞组分分类中共有 10 个分类条目，代表类型为细胞成分、胞内受体和胞内组分等。富集到生物学过程的正选择基因最多，共 15 个分类条目，占主导地位。类别有细胞代谢过程、有机物生物合成过程等。分子功能分类涉及到 11 个分类条目，其中催化活性和结构分子活性占据优势地位。垦利近江牡蛎与海门近江牡蛎正选择基因 KEGG 富集分析结果显示一共涉及到 10 个代谢通路，其中核糖体通路最为富集，其次是过氧化物酶体通路。

表1 垦利近江牡蛎与海门近江牡蛎正选择基因 GO 注释中富集前 10 组分

ZIEF8: Z<T=89 [WGE=8Y<D8>D9<6=6CB=8O>+HT<ED8>88G8@Y8B>D9! O#'#) *\$D9' 89DE9@ BED89

GO 类别	功能描述	差异基因数目	P 值
细胞组分	细胞成分	8	*/8Q'*
	胞内受体	8	\$/8'Q'%
	胞内组分	15	!;*\$Q8%
	细胞器	10	!;*\$Q8
	细胞质	1	!;! \$Q8' O
	细胞质组分	18	O%Q8' O
	无膜细胞器	11	O;OQ8' *
	核糖核蛋白复合体	1	!;OQ8')
	核糖体	10	#;#/Q8')
生物学过程	类囊体	1	O;*\$Q8##
	代谢过程	1	O Q8Q' \$
	细胞代谢过程	8	#;#Q8' *
	有机物生物合成过程	10	#;#Q8' %
	生物合成过程	10	#;OQ8' %
	细胞生物合成过程	15	%&Q8' %
	基因表达	1	!;)Q8' *
	蛋白质代谢过程	10	/;#Q8' %
	细胞组分起源	1	/;OQ8' %
	细胞蛋白质代谢过程	1	#; \$Q8' *
单个有机体代谢过程	1	!; "%Q8' O	

分子功能 O:FBGFECH-P9GD9	催化活性 TE-EFAE-SEGEDDA	**	%/! Q'!
	结构分子活性 --CG?CF O:FBGFECH-SEGEDDA	#));8/Q' O
	核糖体的结构组成 --CG?CF G-9-D?B? 4-KD<<OB	#%	*;! Q' /
	氧化还原酶 WJ[D:GE-SEGEDDA)	\$/#&Q'#
	酶活性抑制剂 O:FAOBD-GE-SEGEDDA	/	*;O'Q'!
	双氧化活性 ^D]AV8E-SEGEDDA	!	!;"OQ' &
	顺式还原酮加双氧酶活性 , (O:EG-<B@]AV8E-8 [O:9U)C:BATD9] EGEDDA	!	#;*OQ' *
	翻译因子活性 ZCE9FE-D-9HG-CEGEDDA	!	!;! *Q'!
	辅因子结合 1+HG-CSD9Y	!	#;\$\$ Q'!
	半胱氨酸型肽链内切酶抑制剂活性 1A->B9B-AT89@T8T-EPE-SD9SD-CEGEDDA	!	O,O'Q' *

表* 垦利近江牡蛎与海门近江牡蛎正选择基因' Q [通路富集分析

ZESF8* Z68' Q [87D6O8? TE-6\EA> 4HT<ED8-8EG8@Y88-D9! O#'(##) *\$\$
D9' 87DG-OTECE@<! O#'(##) *\$\$D9 BHD89

通路J^ TE-6\EAJ^	信号通路 TE-6\EA	基因数目 Y889?O8C	3 值 3LIF?8
U' *' #'	核糖体 F5<<OB	\$	*;#SQ##
U' %9&	过氧化物酶体 (8]D<OB	!	!;! /Q'!
U' "!' /	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 1A->B9BE9@ OB-6@98 OBES-ED O	#	#;"&Q' O
U' "Q "	阿尔茨海默病, F6BD8@ @DE-8	#	*;\$\$Q' *
' <' **! "	过氧化物增生物激活受体信号通路 ((, P: D9ED9 TE-6\EA	#	%;SQQ'!
U' %8/O	雌激素受体信号传导通路 O-CY89-D9ED9 TE-6\EA	#	O;##Q'!

< 讨论

作为比较基因组学的一个热门分支,高通量比较转录组技术在水产动物遗传与进化中得到广泛应用^[9&]。相对于线粒体基因测序和核基因测序来说,转录组测序能更精准定位蛋白编码基因,在不借助参考基因组的情况下对所研究物种进行测序分析以研究生物在不同条件下基因的表达情况,进而高效而精确地定位表型相关基因。本研究通过对位于黄河口的垦利近江牡蛎和位于长江口的海门近江牡蛎的O种组织分别进行转录组文库构建,并在没有参考基因组的情况下使用JF?O9E ED84%" 进行测序,两组原始数据经过质控之后分别得到%Q) #' &和 *\$%QO# ' 条G8E9GE@。经过组装和拼接后,最终获得)*8)" 和/## 8\$ 条?QY88。将从头组装得到的?QY88 与七大数据库进行比对,分别有*) ;"#e () *8)" 条)和*#;*) e (/## 8\$ 条)的?QY88 能够匹配到已知的七大数据库中,其余基因与所选数据库中已知基因同源性较低,未被注释。推测其原因主要有两种,首先测序所得转录组数据中本身有一部分是属于非编码序列,不能编码蛋白质;其次是注释情况受限于数据库本身收录的相近物种的基因注释数据量,现有的牡蛎基因组注释完善程度不够充分,无法提供全面的注释信息。

[W功能分析是基因功能国际标准分类体系^[7],对 @D8Y89-(' E/ ' >>#) 基因进行 [W分析可以发掘出正选择基因在机体中所参与的生物过程、分子功能以及相关细胞组分。本研究运用 [W84^[5]对垦利近江牡蛎和海门近江牡蛎的正选择基因进行 [W功能分析表明,细胞组分类别中与细胞器相关的分类条目(细胞器、无膜细胞器)、与胞内活动相关的分类条目(胞内受体、胞内组分)以及与细胞质相关的分类条目(细胞质、细胞质组分)所占比例最大;生物学过程类别中与代谢过程以及生物合成相关的分类条目占据主导地位;在分子功能类别中,与各类结构分子活性作用相关的分类条目富集最为显著。这些富集结果可能与两地近江牡蛎的生存环境有关,相较于海门近江牡蛎,垦利地区近江牡蛎显然更能适应低温环境^[5]。研究表明,在一定的温度范围内,贝类代谢速率与外界温度变化成正相关^[#]。在两地差异温度条

件下机体为了维持生命活动而调节代谢速率,该过程主要在细胞质内进行,同时需要调节膜内外各项活功以及胞内各种细胞器的共同作用才能完成。低温或高温刺激会使生物机体体内各项合成、代谢过程发生紊乱,垦利近江牡蛎和海门近江牡蛎为响应不同温度条件,与能量代谢相关的通路差异化发展,同时有机体生物合成过程又需要各类催化因子的辅助作用,低温下酶活性抑制剂可以帮助降低特定酶活性以降低能量消耗,对抗外界环境因子作用。

KEGG 是有关 E-NCBI 的主要公共数据库^[5],可以用于获取差异表达基因所涉及的信号通路,通过对关键信号通路的分析进一步掌握其生物学功能。本研究通过 KEGG 软件^[6]对垦利近江牡蛎和海门近江牡蛎的正选择基因进行 KEGG 富集分析可以发现,富集最显著的是核糖体通路,核糖体是蛋白合成场所^[7],P2₁ 转运是核糖体与蛋白之间的桥梁,而蛋白则是机体各项生命活动的主要承担者,由此可知,核糖体合成蛋白在两地近江牡蛎适应不同环境时发挥了重要作用。除了核糖体以外,还有一些基因富集到了与氨基酸和糖类有关的代谢通路上(半胱氨酸和蛋氨酸代谢),这类代谢通路受环境影响作用较大^[8]。推测两地近江牡蛎在不同环境下,氨基酸与糖类的合成和代谢产生了不一样的变化。此外还有两项与过氧化物相关的通路(过氧化物酶体和过氧化物增生物激活受体信号通路),过氧化物酶体与脂质分解、生物合成相关,参与大部分代谢过程;过氧化物增生物激活受体信号通路与特定基因的转录相关,推测可能参与近江牡蛎在不同环境下的基因表达。富集通路中还有一项是阿尔茨海默病,看似与近江牡蛎的生理活动没有直接联系,其实该通路所导致的生理现象和细胞凋亡有关。细胞凋亡对于机体稳态的维持有重要作用^[9],内在或外在因素都会触发该程序,受到外界刺激作用时细胞会自发启动凋亡程序^[10],由此清除衰老或突变细胞,我们推测这可能和两地近江牡蛎在适应各自环境过程中的自我保护机制有关。

综上所述,对黄河口和长江口近江牡蛎的比较转录组分析可以发现,正选择基因主要集中于与细胞器相关、与代谢相关的功能上,以及与核糖体、细胞凋亡等相关的通路上。相关功能与通路可能与两地近江牡蛎在不同环境条件下应激表达有关。本研究从分子水平解释了黄河口与长江口近江牡蛎特定适应性的遗传机制,补充和完善了近江牡蛎基因数据库资源,为今后开展与近江牡蛎相关遗传学以及组学方面的研究提供了基础资料。

参考文献

- [1] 裴春, 王宇, 郭江, 等; 2020; *应用生态学报*; **31**(10): 1897-1903; doi:10.13733/j.cnki.1008-9202.2020.10.1897
- [2] - [6] [X-4V +; ' E9B0GFYA; ! @C@V8BY; -6XB(CB>!""! (D 16988);
- [*] 翟璐, 徐宾铎, 纪毓鹏, 等; 黄河口及其邻近水域夏季鱼类群落空间格局及其与环境因子的关系[N]; 沈阳: 应用生态学报, !"#0, !&(\$:!)O 3)Q;
- [8] KEY X. XEY a, +6? ' , 8-IF; Q1089B+CE4E-ED9<-6ZSSE9 (FE-4E? D9KCE4C-0 ZSSE9F-EG-CE9-CT=<O8>[N]; [8 9<OBVDFQL-F;! "#0. /((##):!\$" 3 \$)!;
- [O] '? _ , B<? [, -<9Y B, 8-IF; ZE9-CT=<O8E9FAD-SS\89D9LE-D8 (<CE9KCE9H0CFE-E E9D9ADY8?> 1DEY<IF?@9KCE4E89) >D GB8F>Y8<O6@03Y83BE9@0E9<4E OOG>E-8FD8--P CELB>[N]; V' 1 [89B, !"#0, #&(#): # ;
- [&] ' E _ , ^EDK , ' E9YN 8-IF; 1<O1G689D8-CE9-CT=<O8E9FAD-4+HJ GHD6>T8B>HC-0 E9EF-D?@BYCE@89-G8.8F->E4E-D88 L4?>D9D ZSSE9HDB>[N]; [* : [89B [89<O [89B, !"#&, &(#): #/#3#9];
- [/] , >6798C , ' VEF 1 , ' VFLBN , [89B<9-FYA: Z<-FHC-68?9BDE-D9+HSDFYA[N]; ZE [89B, !"" , !O#):!Q \$;
- [J] X<?9Y ' ^ , KEU888@' N - QA-6 [' , 8-IF; [89B<9-FYAE9FADHC2P, 3-84: EG?9E9YHC-89CD9SE>[N]; [89<OBVDF- !"# , ## : #3A ;
- [S] 张松, 于非, 刁新源, 等; 渤、黄、东海海面温度年际变化特征分析[N]; 青岛: 海洋科学; !""\$(,)):/&0) #;
- [#] 王俊, 姜祖辉, 唐启升, !""! ; 栉孔扇贝耗氧率和排氨率的研究; 沈阳: 应用生态学报, #* (\$): ##O'###& ;
- [##] ' E9BDE , [<<- ; ' Q [: ' A<< 89AG<T8B >+Y89 E9@Y8-OB[N]; 2788G, G@ PB, !"" , !)#):!/'3";
- [#] _B1 , ' E< _ , B?E9YN 8-IF; ' WW, -! ; " : E \S >8L8HCE99-ED9E9@O89BDE-D9+H80D6@TE-6EA E9@O8E-8>[N]; 2788GCE@ PB, !""###, *\$(>TTF-L) : K*##&K*!! ;
- [*] FECEUD6E9I ; R5<O8>CG?CBE9@-6B O89E9D0+4CE9FED9[N]; 18F, !""! , #) (%) : OY3O! ;

```
[#%] ' E1FE9. . ' <TUEN; BE>UBF ^ K. 8-F; QJ TF<DY =6-8OTBE?CB>CB> CBES-F<OB4H, CES@T<D[N]; (FE9-(6ADF.!""% #*&
(%): %#069#8) ;
[#0] ' 88C(, .D96, , QLE9[ , 8-F; , T<T<<D9@8.8<TOB9=[N]; 2E?CB.!"" , %/(8)"O: /$8)"#;
[#&] ' <<9' , +6?-X, a8B-B, 8-F; B-T/" E9@_J, ( EC8T<89DF USA O F87HC 08GE9D>GE?D9YDOTHE88@ET<T<<D E9@>8.88B
EG-8TE9G8EEED (, ()D91. 008[N]; (E9G8E>.!""/, *O: %#/;
```

85QTDADBK4! AD36FAT=E53DE #31E7CB5H *Crassostrea ariakensis* HA5Q
- 4E5N " BK4AD3> - D3Y<C4 " BK4A *G2DABG

ZM' E9Y, XM B<9Y, ' W2[aD9YH89Y, E9@aj RD*
(' 8A aES<E<CA <H' E02F?CB <H' D9>CA <HC@GE-D9; WGE9 MPD8CDA <H169E,
RD9@E<! &&" * , 169E)

```
#LGAD=: 1CE>><GE E0DLB9D> D9ESD> E \D8CE98 <HEE?@B; J9<C8C<H7G68C@8.8<T =6BY8
98E0C8<?CB <H! O#(#)' *$$(, E9@EJ TF<CB =6BY88E0@H8E98 <H! O#(#)' *$$(S8\889 X8F<\ FD3
8CE9@ XE9Y=8 PD8CO=?E0B>, P2, 384 E9@ SD9YHCOEED> E9FA D \88G<9@G8@< G<OIEC8=68
=CE9GDT<OB <H! O#(#)' *$$(HC<O ' 89D ^<9YADY E9@ BED089, 2E9<9Y; , =4F <H%$!O #' &
E9@$,%O.G# GEE9GE@ \88Y88E=8@HC<O! O#(#)' *$$(9' 89DE9@ BED089, C8T8GDL8A; , H8C
@89L<E>80FA, \8C88DL8@)* ,8)" E9@/#.! &$ ?9Y88, C8T8GDL8A; Z68G<OTF88>8> <H?92
Y88 \88488@EYED>=>8.89T?8TGE99<ED9@E=SE-8; Z689=68<G6F<Y<?> E9FA D E9@T<D
=DL8>88GD9 E9FA D \88G<9@G8@< D89DA =6T<EDL8A >88G@Y88; J9<4F, !O$ TE0> <H
?9Y88 \88D89H88@ \D6=68' E/' >CE D >#; Z68H9GD9F @8GDT-D9 <H68 [ W ([ 88<9<F<3
YA) E9@E9FA D <HOBES=H0TE=6\EA> <H' Q [ (' A<< 89AF<T8DE <HY88 E9@Y8<OB) @8.88F8@
=CE =6T<EDL8A >88G@Y88 \88 CED9FA 89D88@D9 =6TE=6\EA> G8E9Y < <YE98F8, OBES<3
FD0, C8><OB E9@ET<T<<D; Z6D >?@ 9=<FA 89E98@<?C?988>E9@9Y < Y88@H8E98E E J 3
TC8>D9 <H! O#(#)' *$$(9 X8F<\ FD8CO=?ECA E9@ XE9Y=8 PD8CO=?ECA, S?EF< TC<D88@SE8G
Y88C8<?CB HCG<99Y, H9GD9F E9FA D E9@ O F87HC Y88E0@C8.8C@8.8<TOB9 <H! O#(#)' 3
' *$$(;
```

M4? N5AG: 1CE>><GE E0DLB9D>; X8F<\ FD8CO=?ECA; XE9Y=8 PD8CO=?ECA; =CE9GDT<OB; T<D
=DL8A >88G@Y88