

红鳍东方鲀与杂交鲀的性腺转录组比较分析

荆笛¹, 张钰渤¹, 刘圣聪², 刘福君¹, 王秀利^{1*}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023; 2. 大连天正实业有限公司, 辽宁大连 116011)

摘要 为分析红鳍东方鲀与杂交鲀(菊黄东方鲀♀×红鳍东方鲀♂)性腺发育的分子机制, 该研究应用 Illumina 高通量测序技术对二者的卵巢和精巢组织进行转录组测序与生物信息学分析。结果表明: 通过分析并筛选共得到差异表达基因(DEGs)4 157 个(卵巢组织)和 8 260 个(精巢组织)。其中卵巢组织样本(O_2vsO_1)中表达上调的差异基因有 1 912 个, 表达下调的有 2 245 个; 精巢组织样本(T_2vsT_1)中表达上调的差异基因有 4 234 个, 表达下调的有 4 026 个。通过 GO 功能注释与 KEGG 富集分析, 在卵巢组织样本中(O_2vsO_1), 差异表达基因主要归纳为 93 个功能类别与 153 条代谢通路; 在精巢组织中(T_2vsT_1), 差异表达基因可以主要归纳为 73 个功能类别与 154 条代谢通路, 其中神经活性配体-受体相互作用过程、丝裂原活化蛋白激酶通路和钙信号通路的富集程度最高。该研究结果丰富了红鳍东方鲀与杂交鲀的转录组信息, 为后续相关研究提供了大量有价值的转录组数据。

关键词 红鳍东方鲀; 菊黄东方鲀; 性腺; 转录组; 高通量测序

中图分类号 S917 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)18-0112-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.18.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparative Transcriptome Analysis of Gonads in *Takifugu rubripes* and the Hybrid Puffer Fish

JING Di¹, ZHANG Yu-bo¹, LIU Sheng-cong² et al (1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023; 2. Dalian Tianzheng Industry Co., Ltd., Dalian, Liaoning 116011)

Abstract In this study, in order to analyze the molecule mechanism of gonad development between *Takifugu rubripes* and hybrid puffer (*Takifugu flavidus* ♀ × *Takifugu rubripes* ♂), the transcriptome and bioinformatics analysis were conducted for ovarian tissue and testis tissue by Illumina high-throughput sequencing technology. The results showed that a total of 4 157 (ovarian tissue) and 8 260 (testis tissue) differentially expression genes (DEGs) were obtained. Among them, 1 912 genes were up-regulated in ovarian tissue samples (O_2vsO_1), while 2 245 genes were down regulated. 4 234 genes were up regulated in testis tissue samples (T_2vsT_1), while 4 026 genes were down regulated. According to the analysis of GO function annotation and KEGG enrichment, the differentially expressed genes were mainly summarized in 93 functional categories and 153 metabolic pathways in ovarian tissue samples (O_2vsO_1). The differentially expressed genes can be divided into 73 functional categories and 154 metabolic pathways in testis tissue samples (T_2vsT_1). Among them, the enriched levels were the highest of the process of neuroactive ligand receptor interaction, mitogen activated protein kinase pathway and calcium signaling pathway. This study results enrich the transcriptome information of *Takifugu rubripes* and hybrid puffer fish, which provide much valuable information data for further research.

Key words *Takifugu rubripes*; *Takifugu flavidus*; Gonad; Transcriptome; High throughput sequencing

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是东方鲀属中个体最大的一种,也是被广泛养殖的一种优良鱼种。红鳍东方鲀肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富、蛋白含量高^[1],素有“百鱼之首”的美称,河鲀的内脏、卵巢、眼球、皮肤、血液均有毒,以卵巢、血液和肝脏毒性最大,处理不当或误食常可引起中毒,甚至死亡。菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)同为东方鲀属,主要分布于东海、黄海、渤海等海域,属于温带近海底层鱼类,是东方鲀属中商品鱼价格最高的海水养殖种类。菊黄东方鲀与红鳍东方鲀不同,菊黄东方鲀生性比较温和,残咬的现象较轻,但是菊黄东方鲀体形较粗短并且生长较慢^[2],为中大型东方鲀,体长可达 300 mm^[3]。

杂种优势是指 2 个遗传基础不同的亲本杂交,杂种一代在生长势、生活力、抗逆性、产量和品质等方面比双亲优越的现象。因为杂种优势的存在,杂交后代一般会具有比亲本更优秀的性状。尽管鱼类的杂交相较于其他脊椎动物而言较为容易,但是在众多鱼类杂交的结果中,很少有后代能正常发育并达到苗种阶段,属间杂交中具有杂种优势并可以用于

生产的有鲃鲂杂种、鲃鳊杂种、鲃湘华鲃杂种和鲫鲤杂种这 4 种杂交组合^[4-6]。已有相关研究显示红鳍东方鲀和菊黄东方鲀的杂交后代,生长速度明显快于菊黄东方鲀而接近红鳍东方鲀,人工养殖一年半以上,杂交鲀体重即可超过菊黄东方鲀,同时杂交鲀保持了与菊黄东方鲀相似的口感,而且杂交鲀对低水温、重金属离子、盐度的波动均有良好的抗逆性^[7-9],红鳍东方鲀与菊黄东方鲀具有显著的经济杂交价值,将两者的品质优势和生长优势进行整合,是改良菊黄东方鲀经济性状的良好途径。

该研究利用 Illumina 高通量测序技术对红鳍东方鲀及杂交鲀进行性腺组织的转录组测序与分析,筛选与性腺相关的差异表达基因,为今后提高繁育技术和对菊黄东方鲀进行遗传改良提供基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验用鱼于 2019 年 8 月 16 日取自大连天正实业有限公司,唐山市咀东养殖场的红鳍东方鲀和杂交鲀(菊黄东方鲀♀×红鳍东方鲀♂),同一批孵化及同条件饲养情况下的 18 月龄成鱼各 10 条,其中雌鱼 5 条、雄鱼 5 条。采样所需的剪、咬骨钳、镊子、刀等器械均事先经过高压灭菌锅进行 121 ℃,持续 2 h 灭菌,采样前使用乙醇(75%)擦拭且经火焰消毒。将试验鱼在现场进行解剖,分别取全脑及肾脏组织储

基金项目 国家海水鱼产业技术体系岗位科学家项目(CARS-47)。

作者简介 荆笛(1995—),男,湖南武冈人,硕士研究生,研究方向:水产养殖与分子生物学。*通信作者,教授,硕士生导师,从事分子生物学研究。

收稿日期 2020-03-03; **修回日期** 2020-04-03

存于 10 倍体积的 RNA later 中。经过液氮处理后存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 文库构建和测序 将取样组织置于液氮中研磨,利用 RNA 提取试剂盒提取红鳍东方鲀和杂交鲀(菊黄东方鲀♀ \times 红鳍东方鲀♂)的总 RNA。为了保证试验数据的高质量,上述提取的总 RNA 需要进行琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计和 Aglient 2100 方法检测。通过完整性及纯度检测后,使用 Oligo (dT) 磁珠纯化和进行 mRNA 的富集,随后进行 mRNA 的分离及片段化,合成一链和二链 cDNA。之后再行 3' 末端加 A,连接测序接头末端修复,而后用 AMPure XP beads 筛选 250~300 bp 的 cDNA,最后富集 cDNA 文库。将上述 cDNA 文库进行 Illumina 测序,首先过滤原始数据中低质量、末端质量低、含测序引物的 reads 后得到了 clean reads,然后再进行 de novo 拼接,最后通过 CAP3 软件拼接来获得最终 Unigene 序列集合^[10]。使用 DEGseq 软件找寻筛选差异表达基因(differentially expressed

genes, DEGs) 时以 $P < 0.05$ 作为标准(Anders S and Huber W)。

1.3 差异表达基因 GO 与 KEGG 富集分析 通过 FPKM 方法运用软件分析转录本与基因水平上的差异表达,在 GO 数据库和 KEGG 数据库中对比筛选,在数据库中注释结果来进一步分析。

2 结果与分析

2.1 测序质控分析 该研究分别取 18 月龄红鳍东方鲀与杂交鲀的性腺组织进行了转录组测序,在对数据进行初步分析后得知每个样本过滤后的序列数据不少于 4 500 万条,所测得的碱基长度不低于 6.79 G, Q20 均大于 97%, Q30 均大于 94%,其中卵巢的 GC 含量为 52.15%~52.67%,精巢的 GC 含量为 50.60%~50.81%,卵巢的 GC 含量略高于精巢(表 1)。表明测序所获得的数据真实可靠,具有优质的建库质量,数据可以用于后续分析(T_1 为红鳍东方鲀精巢, O_1 为红鳍东方鲀卵巢, T_2 为杂交鲀精巢, O_2 为杂交鲀卵巢)。

表 1 测序数据质量情况

Table 1 Sequencing data quality evaluation

样品名 Sample name	原始序列数据 Raw_reads	过滤数据 Clean_reads	Phred 值大于 20 的碱基比 例 Q20//%	Phred 值大于 30 的 碱基比例 Q30//%	GC 数量总和 比例 GC_pct//%
T_1	46 007 772	45 299 406	97.93	94.19	50.60
O_1	69 838 924	68 427 196	97.85	94.10	52.15
T_2	62 721 828	61 336 934	97.83	94.01	50.81
O_2	58 732 386	57 183 974	98.01	94.41	52.67

2.2 转录组与参考基因组的比对分析 测序片段 (fragments) 是 mRNA 随机打断的,为了确定这些片段由哪些基因转录而来,需要将质控后的 clean reads 比对到参考基因组上。HISAT2 比对软件是由约翰霍普金斯大学的一个实验室开发,采用全局和局部搜索的方法,利用大量 FM 索引,覆盖整个基因组,能够将 RNA-seq 测得的 reads 与基因组进行快速精确的比对。结果表明,4 个样品的 clean reads 与参考基

因组的 mapping 率为 91.32%~95.66%,单一位置的 mapping 率为 79.20%~89.27%,多位置 mapping 率都小于 12.12%,正链和负链的 mapping 率为 39.62%~44.66%(表 2),各 mapping 率比对应效率较高,体现参考基因组组装较好,样本与参考基因组的亲缘关系较近,说明样本的外源污染较少,样本整体测序数据质量较好。

表 2 转录组数据与基因组比对

Table 2 Transcriptome blast to the genome of *Takifugu rubripes*

样品名 Sample name	总序列数 Total_reads	对比到序列数(百分比) Total_map (percentage)	对比到单一位置序列数(百分比) Unique_map (percentage)	对比到多位置序列数(百分比) Multi_map (percentage)	对比到正链序列数(百分比) Positive_map (percentage)	对比到负链序列数(百分比) Negative_map (percentage)
T_1	45 299 406	43 245 352(95.47%)	40 439 461(89.27%)	2 805 891(6.19%)	20 207 420(44.61%)	20 232 041(44.66%)
O_1	68 427 196	65 459 372(95.66%)	57 975 136(84.73%)	7 484 236(10.94%)	28 977 215(42.35%)	28 997 921(42.38%)
T_2	61 336 934	57 029 662(92.98%)	53 483 703(87.20%)	3 545 959(5.78%)	26 725 117(43.57%)	26 758 586(43.63%)
O_2	57 183 974	52 219 063(91.32%)	45 289 374(79.20%)	6 929 689(12.12%)	22 656 037(39.62%)	22 633 337(39.58%)

2.3 差异基因分析 根据 FPKM 法对样品间的差异进行分析,结果显示共得到差异表达基因(DEGs)共 4 157 个(卵巢组织和 8 260 个(精巢组织)。其中杂交鲀的卵巢组织样本相对于红鳍东方鲀的卵巢组织样本表达上调的差异基因有 1 912 个,表达下调的有 2 245 个。根据各差异表达基因的水平不同(\log_2 FC 高度不同),差异水平变化主要存在于 0~2 (上调基因占 48.08%,下调基因占 51.92%),其次为 2~7 (上

调基因占 53.26%,下调基因占 46.74%),最后是 >7~15 (上调基因占 77.88%,下调基因占 22.12%);而杂交鲀的精巢组织样本相对于红鳍东方鲀的精巢组织样本表达上调的有 4 234 个,表达下调的有 4 026 个,同样主要集中在 0~2 (上调基因占 36.50%,下调基因占 63.50%),其次为 >2~7 (上调基因占 55.83%,下调基因占 44.17%),最后是 >7~15 (上调基因占 52.40%,下调基因占 47.60%) (表 3)。

火山图可直观展示每个比较组合的差异基因分布情况(图1)。图中横坐标表示基因在处理组和对照两组中的表达倍数变化(\log_2 FoldChange),纵坐标表示基因在处理组和对照两组中表达差异的显著性水平,上调基因用红色点表示,下调基因用绿色点表示。

2.4 差异基因 GO 功能富集分析 GO(Gene Ontology)是描述基因功能的综合性数据库,可分为生物过程(biological process)、细胞组成(cellular component)和分子功能(molecular function)3个部分。从GO富集分析结果中,选取最显著的30个Term绘制散点图进行展示(图2)。图中横坐标为注释到GO Term上的差异基因数与差异基因总数的比值,纵坐标为GO Term,点的大小代表注释到GO Term上的基因数,

颜色从红到紫代表富集的显著性大小。

表3 差异表达基因数目统计

Table 3 Number of differentially expressed genes

样本对比 Sample comparison	差异倍数对数值 \log_2 FC	上调基因 (百分比) Up-regulated gene (percentage)	下调基因 (百分比) Down-regulated gene (percentage)
T_2vsT_1	0~2	756(36.50%)	1 315(63.50%)
	>2~7	1 025(55.83%)	811(44.17%)
	>7~15	131(52.40%)	119(47.60%)
O_2vsO_1	0~2	2 033(48.08%)	2 195(51.92%)
	>2~7	2 032(53.26%)	1 783(46.74%)
	>7~15	169(77.88%)	48(22.12%)

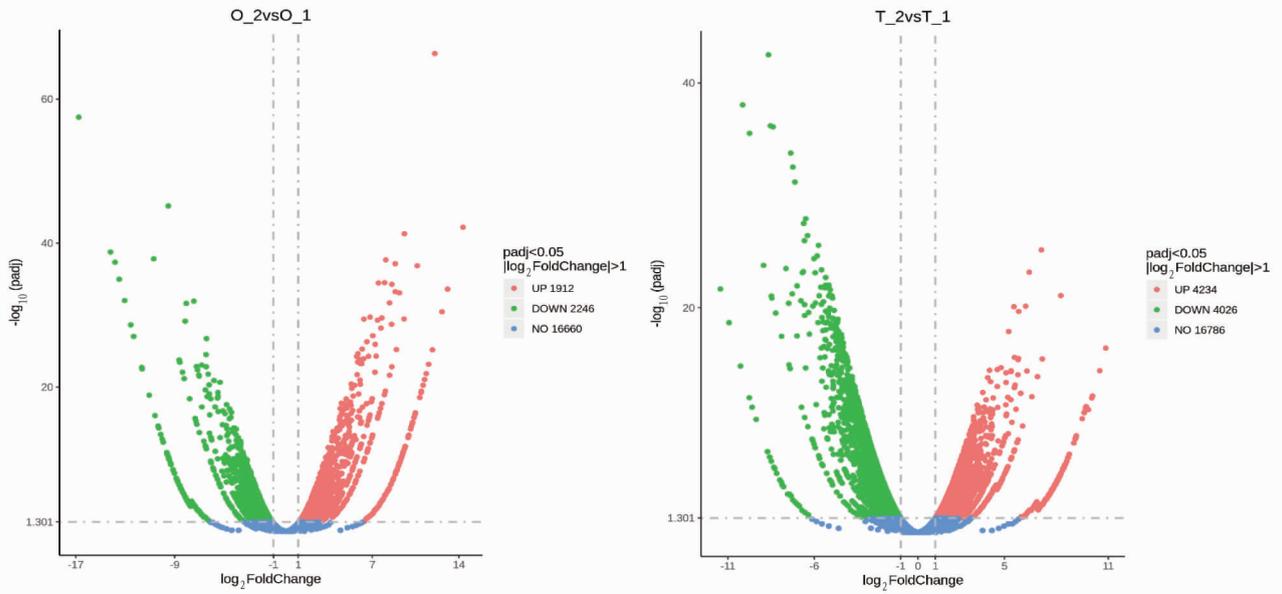


图1 杂交鲟红鳍东方鲟组织差异基因火山图

Fig.1 The volcano figure of differential gene expression in hybrid puffer and *Takifugu rubripes*

在卵巢组织样本中,差异表达基因主要归纳于58个生物过程、1个细胞组成和34个分子功能(图2A)。差异表达基因在分子功能中以跨膜转运蛋白活性(transmembrane transporter activity)(117个)居多;在生物过程上集中在生物附着(biological adhesion)(36个)及细胞附着(cell adhesion)(36个);在细胞组成上以细胞外区域(extracellular region)(70个)。这些富集基因的差异表达均已达到显著水平,且基因在表达中大多为上调。

在精巢组织中,差异表达基因主要归纳为8个生物过程,43个细胞组成,22个分子功能(图2B)。差异表达基因在分子功能中以三磷酸核苷酶活性(nucleoside-triphosphatase activity)(141个),DNA结合转录因子活性(DNA binding transcription factor activity)(158个),DNA序列特异性结合(sequence-specific DNA binding)(114个)为主;差异表达基因在生物学过程上以DNA代谢过程(DNA metabolic process)(75个)为主;差异表达基因在细胞组成上以细胞骨架(cytoskeletal)(106个),细胞骨架部分(cytoskeletal part)(89个),细胞外区域(extracellular region)(154个)为主。这

些富集基因的差异表达均已达到显著水平,其中DNA代谢过程(DNA metabolic process)、三磷酸核苷酶活性(nucleoside-triphosphatase activity)在表达中上调,DNA结合转录因子活性(DNA binding transcription factor activity),DNA序列特异性结合(sequence-specific DNA binding)细胞骨架(cytoskeletal),细胞骨架部分(cytoskeletal part),细胞外区域(extracellular region)在表达中下调。结果表明红鳍东方鲟和菊黄东方鲟的杂交后代在性腺发育上主要是通过以上富集途径的差异表达基因来调控的。

2.5 差异基因 KEGG 分析 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)是整合了基因组、化学和系统功能信息的综合性数据库。以KEGG数据库作为参考将红鳍东方鲟和杂交鲟的精巢卵巢进行两两比较,KEGG通路富集以padj小于0.05作为显著性富集的阈值,从KEGG富集结果中,选取最显著的20个KEGG通路绘制散点图进行展示(图3)。图中横坐标为注释到KEGG通路上的差异基因数与差异基因总数的比值,纵坐标为KEGG通路,点的大小代表注释到KEGG通路上的基因数,颜色从红到紫,代表富集的显著性大小。

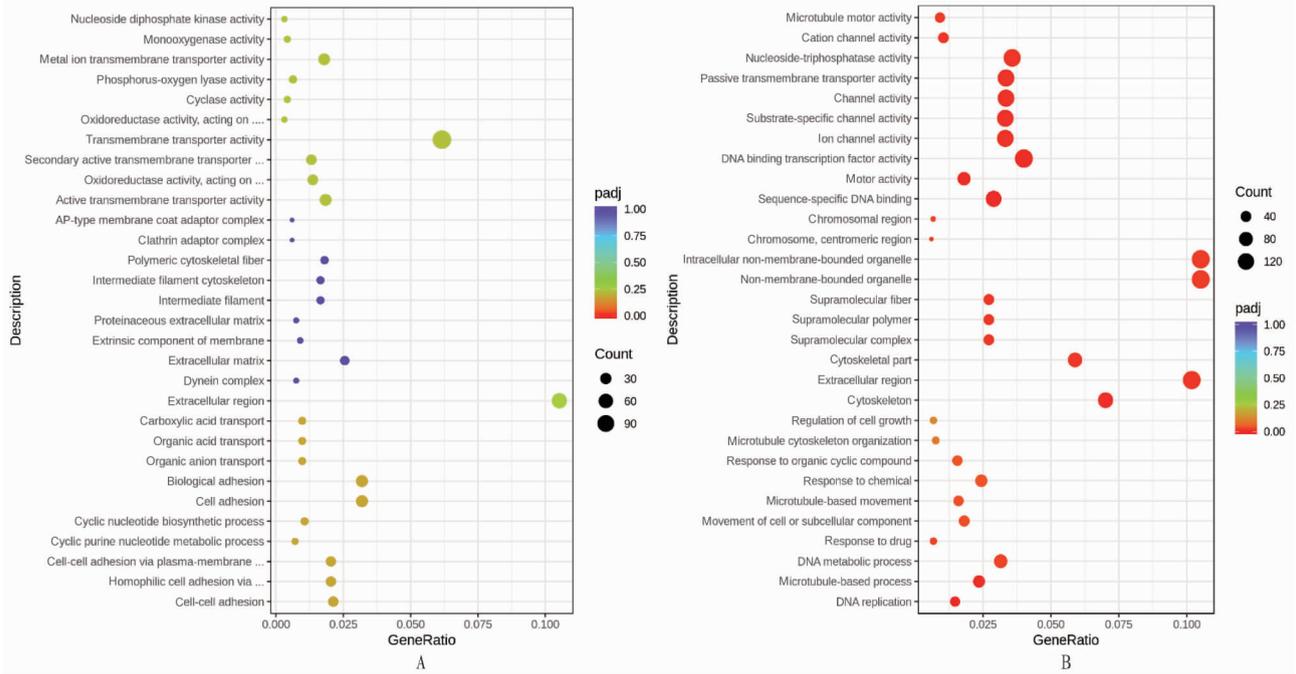


图 2 杂交鲀与红鳍东方鲀卵巢组织 (A) 与精巢样本 (B) 差异表达基因 GO 富集分析

Fig.2 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in ovary (A) and testis (B) of hybrid puffer and *Takifugu rubripes*

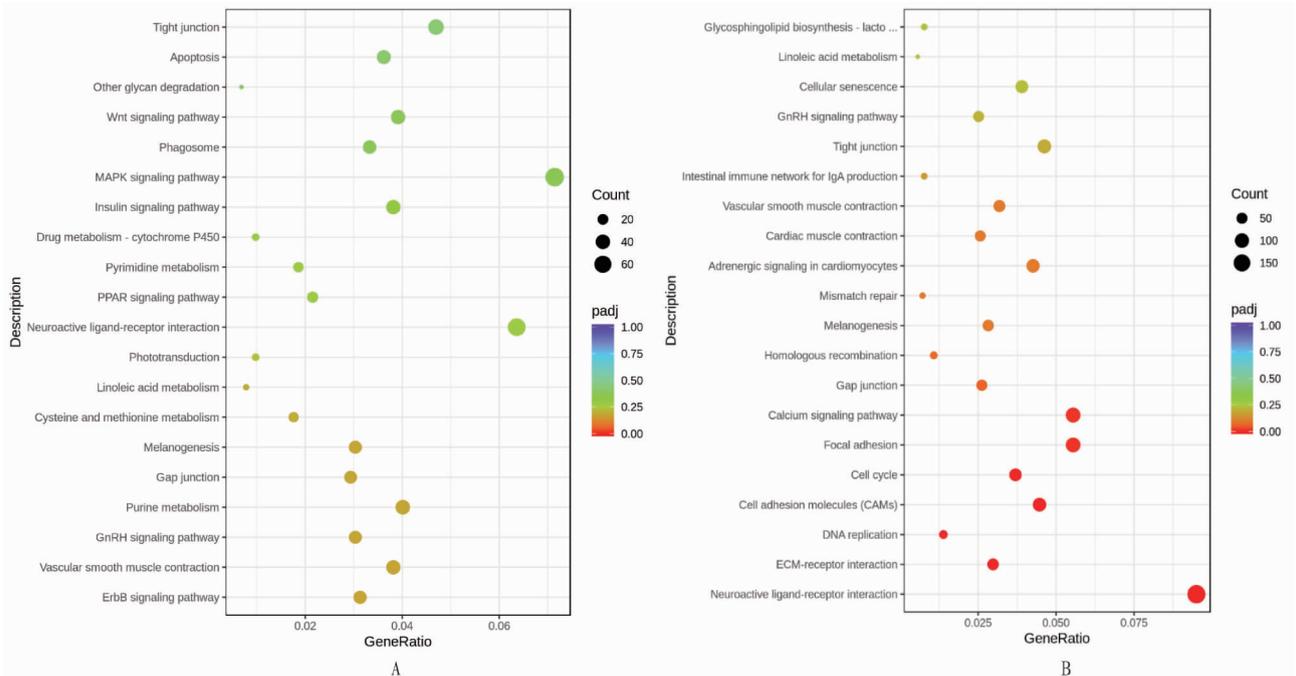


图 3 杂交鲀与红鳍东方鲀卵巢组织 (A) 与精巢样本 (B) 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.3 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in ovary (left) and testis (right) of hybrid puffer and *Takifugu rubripes*

结果显示,在 O_2 vs O_1 中有 2 286 个基因定位到 153 条代谢通路中,其中以丝裂原活化蛋白激酶通路 (MAPK signaling pathway) 中表达的基因最多,为 73 个,其次是神经活性配体-受体相互作用途径 (neuroactive ligand-receptor interaction),为 65 个 (图 3A)。在 T_2 vs T_1 中将 3 952 个基因定位到 154 条通路中,其中神经活性配体-受体相互作用途径 (neuroactive ligand-receptor interaction) 中包含的转录基因最多为 185 个,其次是钙信号通路 (calcium signaling pathway)

为 108 个 (图 3B)。

3 讨论

该研究应用 Illumina 高通量测序技术对红鳍东方鲀及杂交鲀 (菊黄东方鲀 ♀ × 红鳍东方鲀 ♂) 卵巢和精巢的转录组测序数据筛选到 2 286 个和 3 952 个差异表达基因进行 GO 富集分析和 KEGG 功能富集分析,结果显示杂交鲀与红鳍东方鲀的差异表达基因主要富集在神经活性配体-受体相互作用途径 (neuroactive ligand-receptor interaction),丝裂原活

化蛋白激酶通路(MAPK signaling pathway),钙信号通路(calcium signaling pathway)中差异基因富集程度最高。

在杂交鲢与红鳍东方鲢卵巢(O_{2vsO₁})的比较中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK signaling pathway)通路差异基因富集程度最高,其是细胞增殖、分化、凋亡等信号转导通路的一条重要共同交汇通路。已有研究发现 p38MAPK 参与了对文蛤的致病性弧菌的免疫反应^[11],微囊藻毒素通过调节斑马鱼 MAPK 途径破坏了减数分裂的正常进行^[12]。由此可以看出 MAPK 在水产动物正常的生长发育中起到重要作用。MAPK 的显著富集原因可能是许多种生长因子受体、营养相关因子受体等都需要 MAPK 的活化来完成信号转导过程。这说明在杂交鲢卵巢的发育过程中 MAPK 通路对杂交鲢卵巢的发育有重要作用。

在杂交鲢与红鳍东方鲢卵巢(O_{2vsO₁})与精巢(T_{2vsT₁})的比较中,神经活性配体-受体相互作用途径的差异基因富集程度都很高,其受到生长激素(growth hormone, GH)和催乳素(prolactin, prl)的调控^[13]。催乳素可以维持体内外电解质和水的平衡,调节内分泌与新陈代谢,脑功能和行为条件,免疫调节和保护,繁殖以及促进生长和发育^[14];而已有研究证实生长激素可以促进消化系统的氨基酸吸收及增加组织细胞的 RNA 合成进而促使鱼体蛋白质合成,提高食物转化率,还有调节鱼类生殖功能、促进体细胞分裂、增强鱼体免疫力和刺激骨骼肌肉组织发育等效果^[15-16],说明其在鱼的卵巢和精巢生长发育过程中都发挥了重要作用。初步推测神经活性配体-受体相互作用过程、丝裂原活化蛋白激酶通路和钙信号通路可能是杂交鲢杂交优势的主要由来,但还需要进一步研究证明。

该研究通过对红鳍东方鲢及杂交鲢的转录组比较分析,揭示了神经活性配体-受体相互作用途径可能参与调控出了

杂交鲢的杂交优势,丝裂原活化蛋白激酶通路与钙信号通路分别对杂交鲢的卵巢与精巢的发育有一定作用,为后期继续进行杂交鲢和红鳍东方鲢生长发育差异过程的相关分子调控机制的研究提供了初步理论依据与参考,有利于进一步提高杂交河鲢的经济价值。

参考文献

- [1] 韦众.河鲢鱼的生物学特性及其养殖(综述)[J].安徽农业大学学报,1999,26(4):436-439.
- [2] 李文敏.菊黄东方鲢的苗种培育与养殖[J].河北渔业,2002(1):17.
- [3] 孙赛红,王玉芳,姜志强,等.通过性腺形状和颜色鉴定红鳍东方鲢的性别[J].河北渔业,2014(2):13-15.
- [4] 楼允东.我国鱼类近缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J].水产学报,2007,31(4):532-538.
- [5] 马仲波,唐钢胜,张峰,等.鲤鱼三杂交[(荷包红鲤♀×元江鲤♂)♀×镜鲤♂]遗传改良与利用的研究[J].淡水渔业,1984(6):25-27.
- [6] 陈学年,郭玉娟,彭泽卿与兴国红鲤杂交优势的研究与利用[J].淡水渔业,2000,30(9):14-16.
- [7] 范文涛,刘海金,赵文江,等.菊黄东方鲢♀×红鳍东方鲢♂杂交后代早期形态特征及生长速度的比较[J].水产学报,2011,35(7):1065-1071.
- [8] 张福崇,王玉美,方笑,等.盐度对杂交东方鲢存活和摄食的影响[J].河北渔业,2012(12):2-6.
- [9] 张福崇,赵海涛,王玉美.杂交河鲢 F1 代苗种生产与养殖技术研究[J].河北渔业,2011(10):19-21.
- [10] 李琳,冯帅,汪莹,等.鼠伤寒沙门菌 ATCC13311 诱导耐药株的转录组测序和分析[J].中国兽医学报,2015,35(7):1088-1094.
- [11] ZHANG S J, YU J J, WANG H X, et al. p38 MAPK is involved in the immune response to pathogenic *Vibrio* in the clam *Meretrix petechialis* [J]. Fish & shellfish immunology, 2019, 95:456-463.
- [12] LIU W J, ZHAN C H, ZHANG T Z, et al. Microcystin-LR influences the *in vitro* oocyte maturation of zebrafish by activating the MAPK pathway [J/OL]. Aquatic toxicology, 2019, 215[2020-01-05]. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105261.
- [13] 李文深. 卵形鲳鲹生长激素(GH)和催乳素(PRL)基因克隆及原核表达[D].海口:海南大学,2016.
- [14] 左映平,曹劲松.鱼类体内催乳素的渗透调节作用[J].生命的化学,2007,27(5):455-457.
- [15] 匡刚桥,刘臻,鲁双庆.鱼类生长激素基因的研究现状及展望[J].水利渔业,2006,26(6):1-3.
- [16] 李晓东,时春明.鱼类生长激素研究及应用进展[J].黑龙江水产,2017(1):13-15.