

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16232

栉孔扇贝在镉污染胁迫下消化盲囊组织的转录组分析

张辉^{1,2}, 翟毓秀^{1,2}, 姚琳^{1,2}, 江艳华^{1,2}, 李凤铃^{1,2}

1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 农业部水产品质量安全风险评估实验室(青岛), 山东 青岛 266071

摘要: 镉(Cd)作为生物非必需、毒性极强的蓄积性重金属, 易通过食物链进入人体, 严重威胁人类健康。扇贝相对于其他贝类具有特异性蓄积镉的能力, 成为水产品质量安全领域关注的焦点。为了阐释扇贝高蓄积镉的分子机制, 本研究以镉胁迫的栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)消化盲囊组织为研究对象, 通过转录组测序技术进行基因转录水平分析。通过比较转录组拼接获得 105071 个 unigene 和 3800 个差异基因, 对所得 unigene 进行功能注释, 发现这些基因集中在蛋白绑定、细胞黏附、免疫应答、细胞凋亡和能量代谢等方面。对这些蛋白的分子功能进行注释, 发现该类蛋白主要属结合蛋白(40.45%)、催化活性蛋白(34.27%)和转运蛋白(5.62%)。这些功能基因和预测通路为理解扇贝体内解毒和免疫系统奠定了基础。获得的转录组数据为深入研究双壳贝类应对海洋污染物的分子机制提供了丰富的基因资源。

关键词: 栉孔扇贝; 镉; 比较转录组; 差异表达基因

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0802-09

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国北方沿海省份广泛养殖的重要经济物种。近年来, 由于各种原因, 比如高温或者人类活动引起的环境污染, 导致扇贝养殖被大规模破坏^[1]。很多化学污染物, 包括石油产物、生活和城市垃圾、有机氯化物、重金属等, 即使以低水平释放, 仍被认为对养殖环境具有严重的副作用^[2]。扇贝由于滤食特性对重金属具有生物累积性。之前针对贝类的相关研究主要集中在抗氧化酶活性^[3], 脂质过氧化^[4], 组织中生物累积量^[5], DNA 链断裂^[6], 基因标志物发掘等^[7-8]。然而, 这些研究受限于基因组资源的缺乏。对扇贝转录组表达谱的全面了解有助于深入阐释扇贝蓄积镉的机制。

镉(cadmium, Cd)是一种蓄积性重金属, 其污染可通过食物链传递、富集和放大, 是世界卫生组织(WHO)确定的优先研究的污染食品的 17 种毒物之一, 也是毒性最大的重金属之一^[9]。根据

2001—2005 年的生态评价, 渤海湾的镉污染非常严重^[10]。镉污染已经成为影响水产品质量与安全的主要问题之一, 尤其对于扇贝。因此, 理解扇贝的毒性机制极为必要。

近年来, 二代测序技术被成功应用于基因分析、差异基因筛选、无参考基因组信息或非模式生物中新转录本的发掘等^[11]。例如, RNA-seq 测序被应用于各种无脊椎动物中, 像中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、桔小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*), 以及其他双壳贝类等^[12-17]。

本研究主要目的是寻找镉蓄积相关的功能基因并阐明栉孔扇贝代谢和免疫通路潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成熟栉孔扇贝采集于青岛某养殖场。栉孔扇

收稿日期: 2016-08-16; 修订日期: 2017-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41506134).

作者简介: 张辉(1984-), 女, 博士后, 研究方向为环境毒理学. E-mail: zhangh0531@163.com

通信作者: 翟毓秀, 研究员. E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn

贝的养殖与组织取样参照涉及动物生化研究

的国际指导准则。选择健康有活力的个体进行实验。海水取自青岛鳌山卫海边, 过滤, 盐度 30, 温度(20±1)°C。日换水 100%, 扇贝投喂螺旋藻粉 3 g/(cm³海水·d)。

1.2 实验方法

1.2.1 镉暴露及 RNA 提取 将栉孔扇贝分为两组: 对照和 CdCl₂·2.5 H₂O 胁迫组。水中最终 Cd²⁺ 浓度为 0.2 mg/L, 为《中国渔业水质量标准》^[18] 中规定的 Cd²⁺ 浓度的 40 倍(Cd²⁺ ≤ 0.005 mg/L)。暴露 15 d, 从两组中各取 5 只扇贝的消化盲囊用于 RNA-seq。每组 2 个生物学平行(XC1 VS XC2; XD1 VS XD2; XC 为处理组, XD 为对照组)。总 RNA 的提取采用 TRIzol 法。分别采用 Agilent2100 和 NanoDrop 检测 RNA 的完整性和纯度。总 RNA 采用 DNase I 于 37°C 消化 1 h 除去 DNA 残留。

1.2.2 转录组测序及序列组装 样品检测合格后, 用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA。随后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 用随机引物合成一链 cDNA, 然后加入缓冲液、dNTPs、DNA polymerase I 和 RNase H, 合成二链 cDNA, 再用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 先进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 再用 AMPure XP beads 进行片段大小选择。最后进行 PCR 扩增, 并用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 得到最终文库。文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 进行初步定量, 稀释文库至 1.5 ng/μL, 随后使用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测, 使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 > 2 nmol/L), 以保证文库质量。得到的 raw data 里面含有带接头的、低质量的 reads, 对其过滤后得到 clean data。

1.2.3 功能注释 首先通过 blastn 程序将 unigenes 比对到 NCBI-Nt 核酸数据库。通过 blastx 程序将 unigenes 比对到蛋白质数据库。蛋白质数据库包括 NR、Swisse-Prot、KEGG、GO 和 KOG, $E < 10^{-5}$ 。其中, unigenes 通过 KOG、GO 和 KEGG 数据库的分类参考^[19]的方法。

1.2.4 差异表达基因分析 我们选取 FDR 值为

0.001 和 $|\log_2 \text{FoldChange}| \leq 1$ 作为评判基因表达差异是否显著的标准。所有的差异表达基因通过 KEGG 数据库进行通路富集分析。

1.2.5 荧光定量 PCR 验证 选取 6 个差异表达基因进行荧光定量 PCR 验证, 采用 SYBR Premix Ex Taq Kit 试剂盒法。 β -actin 作为内参基因。相对定量法参考^[20]。

2 结果与分析

2.1 转录组数据组装

采用 Illumina HiSeq 2000 高通量测序技术对栉孔扇贝消化盲囊组织转录组进行了测序,

共得到 227673 条转录本。裸数据上传至 NCBI SRA 数据库(序列号: SRR1563103)。采用 Trinity 软件去除 adapter 和低质量 reads 之后, 拼接得到 105,071 条 unigene, 平均长度 829 bp, N50 长度为 1573 bp(表 1)。其中 61828 条(58.84%)长度小于 500 bp, 19393 条(18.46%)长度在 500~1000 bp, 13377 条(12.73%)长度在 1000~2000 bp, 10473 条(9.97%)长度大于 2000 bp(图 1)。

表 1 栉孔扇贝消化盲囊 Illumina 转录组序列拼接概况
Tab. 1 Summary of Illumina transcriptome sequencing and assembly for digestive gland of *C. farreri*

分类 term	数目 numbers
总数 total number of reads	227673
总碱基数/bp total base pairs	260210188
平均长度/bp average read length	1143
unigenes 总数 total number of unigenes	105071
unigenes 平均长度/bp meanlength of unigenes	829
unigenes 的 N50 长度/bp N50 length of unigenes	1573

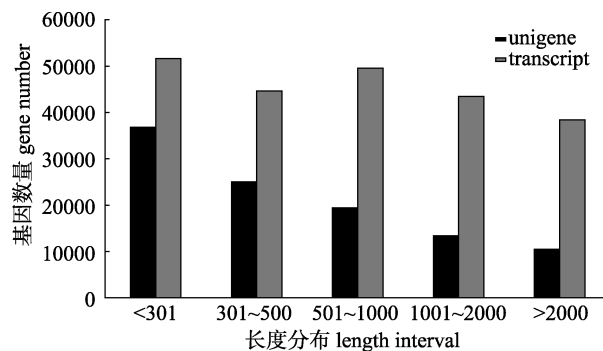


图 1 拼接 unigene 与转录本长度分布图

Fig. 1 Length distributions of clean reads

unigenes 序列通过 Transeq 程序翻译为蛋白序列, 然后与 NR 和 Swiss-Prot 蛋白数据库比对。24576 个 unigene 通过 NR 数据库比对注释。24493 个 unigene 通过 GO 功能分为三大类: 生物过程, 细胞成分, 分子功能。生物学过程中, 细胞过程 (10.41%)和代谢过程(8.68%)所占比重最大; 分子功能中, 绑定(9.81%)和催化活性(7.05%)是主要

组分; 细胞成分中, 细胞(5.41%)和细胞组分 (5.40%)是主要代表(图 2)。12028 个 unigene 被分为 26 个 KOG 功能家族, 包括生化代谢, 信号转导机制, 防御系统, 细胞结构, 和基因表达等(图 3)。7849 个 unigene 被分为不同的 KEGG 通路(图 4)。最有代表性的是信号转导通路(1349 个), 碳水化合物代谢(751 个), 运输和代谢(563 个)(表 2)。

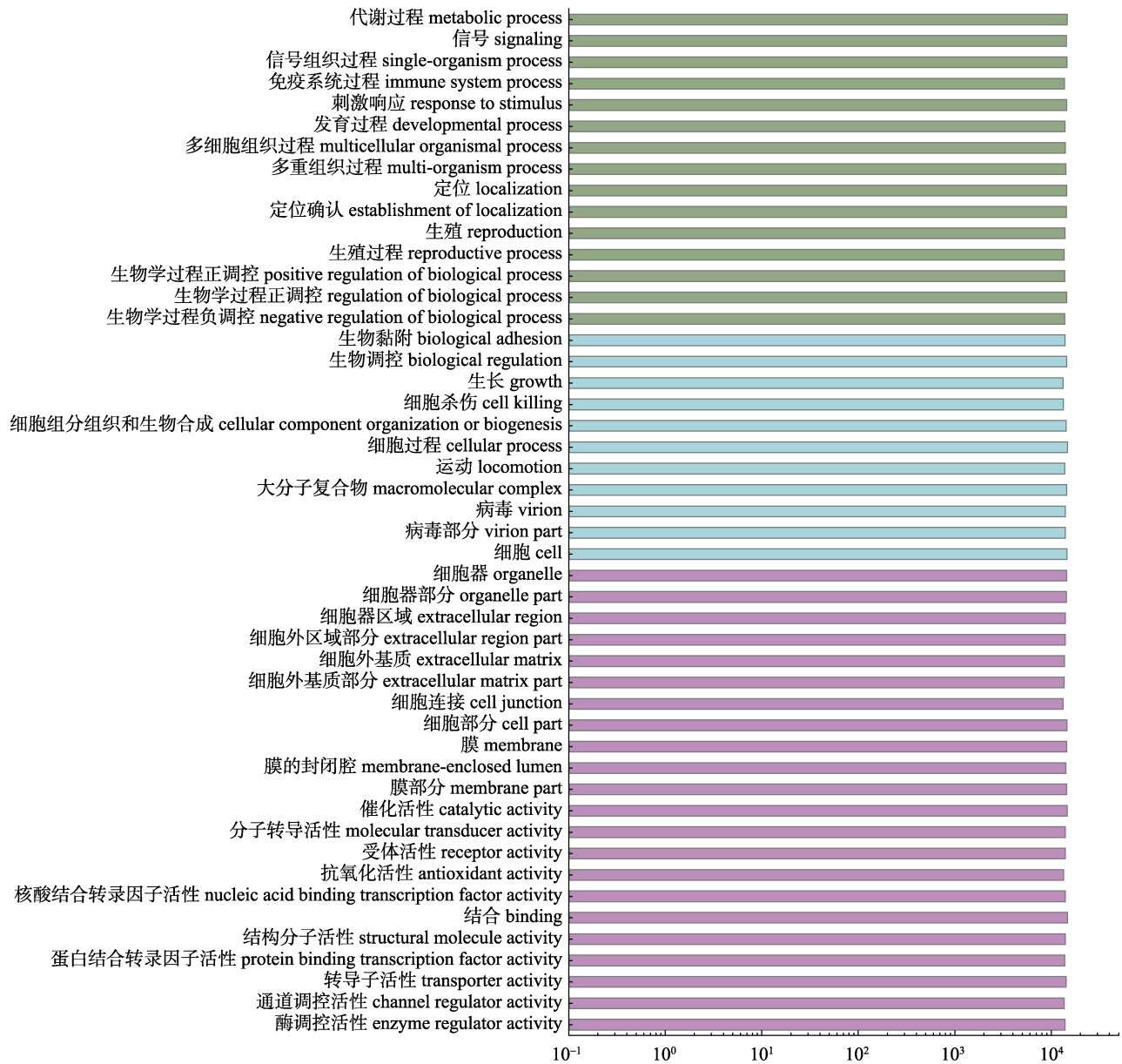


图 2 基因本体(GO)分类图

纵坐标为 GO 3 个大类的下一层级的 GO term, 横坐标为注释到该 term 下(包括该 term 的子 term)的基因个数及其个数占被注释上的基因总数的比例。3 种不同分类表示 Go term 的 3 种基本分类(从上往下依次为生物学过程, 细胞组分, 分子功能)。

Fig. 2 GO annotations of transcriptomic data in *C. farreri*

A total of 141273 contigs are assigned to three GO terms (Y axis) including biological process, cellular component and molecular function.

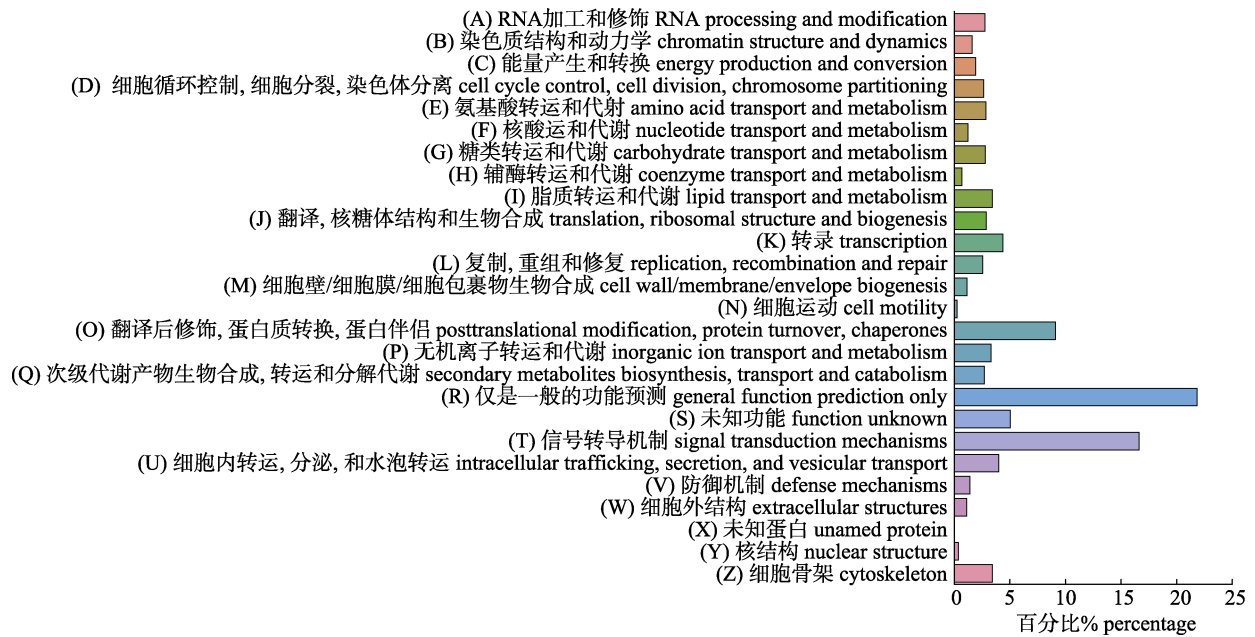


图 3 KOG 分类图

纵坐标为 KOG 的 26 个 group 的名称, 横坐标为注释到该 group 下的基因个数占被注释上的基因总数的比例。

Fig. 3 KOG classification of the 105071 unigenes

Possible functions of unigenes are classified and subdivided into 26 categories.

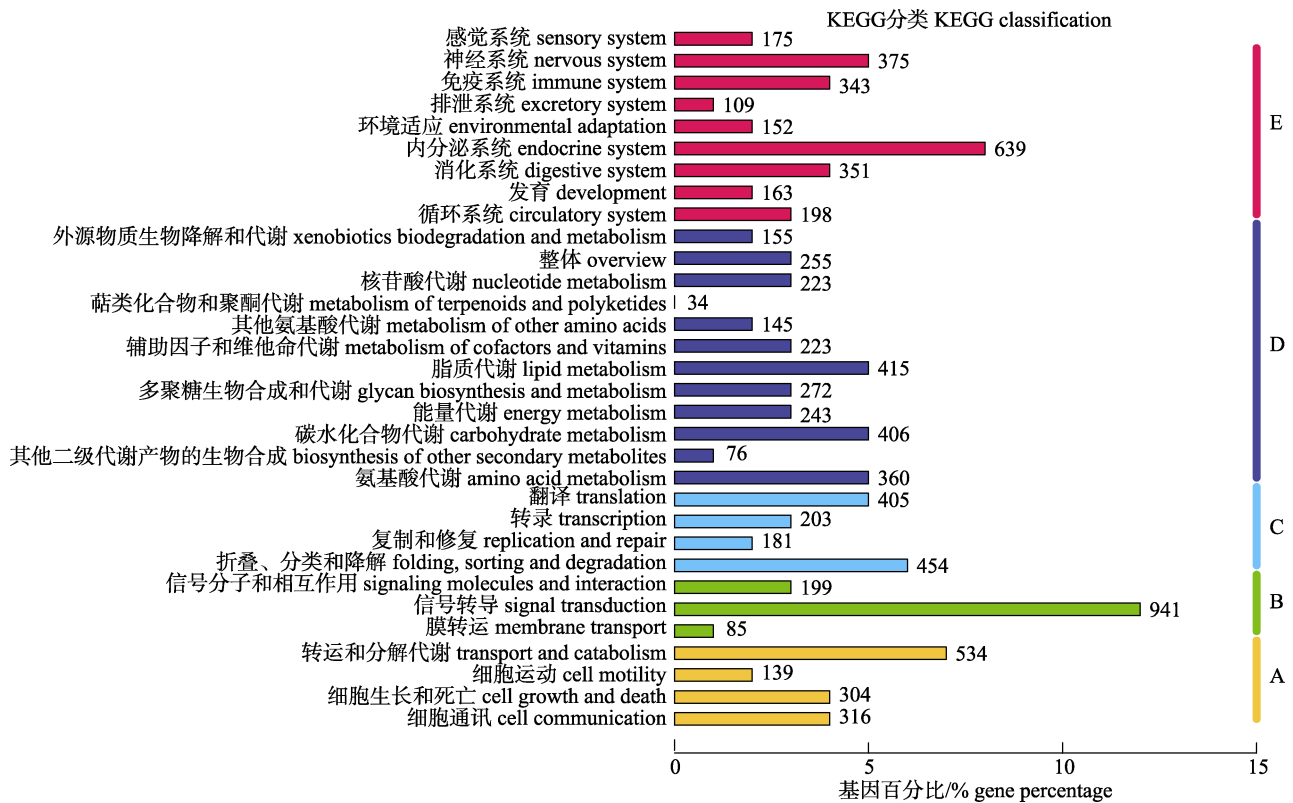


图 4 KEGG 分类图

纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称, 横坐标为注释到该通路下的基因个数及其个数占被注释上的基因总数的比例. 将基因根据参与的 KEGG 代谢通路分为 5 个分支: A-细胞过程, B-环境信息处理, C-遗传信息处理, D-代谢, E-有机系统。

Fig. 4 KEGG classification of the unigenes

Genes were divided into five branches according to the involvement of KEGG pathway. A-cellular processes; B-environmental information processing; C-genetic information processing; D-metabolism; E-organismal systems.

表 2 栉孔扇贝消化盲囊的 KEGG 生化图谱
Tab. 2 KEGG biochemical mappings for digestive gland of *C. farreri*

KEGG 分类	KEGG categories represented	总基因数	background number	样品数	sample number
代谢	metabolism				
碳水化合物代谢	carbohydrate metabolism	751		67	
能量代谢	energy metabolism	138		11	
脂质代谢	lipid metabolism	554		56	
核苷酸代谢	nucleotide metabolism	299		17	
氨基酸代谢	amino acid metabolism	514		48	
氨基酸生物合成	biosynthesis of amino acids	107		10	
其他氨基酸的代谢	metabolism of other amino acids	141		18	
多糖生物合成和代谢	glycan biosynthesis and metabolism	397		30	
辅助因子和维他命的代谢	metabolism of cofactors and vitamins	215		18	
萜类和酮类化合物代谢	metabolism of terpenoids and polyketides	20		4	
其他次级代谢物生物合成	biosynthesis of other secondary metabolites	38		8	
外源性生物降解和代谢	xenobiotic biodegradation and metabolism	201		19	
脂肪酸代谢	fatty acid metabolism	66		6	
甲烷代谢	methane metabolism	47		1	
基因信息过程	genetic information processing				
转录	transcription	176		8	
翻译	translation	331		12	
折叠, 分类, 降解	folding, sorting and degradation	488		57	
复制和修复	replication and repair	147		8	
膜转运	membrane transport				
ABC 转运子	ABC transporters	82		20	
信号转导	signal transduction	1349		207	
信号分子与交互作用	signal molecules and interaction	204		13	
细胞过程	cellular process				
转运和分解代谢	transport and catabolism	563		95	
细胞运动	cell motility	139		20	
细胞生长和死亡	cell growth and death	568		37	
细胞通讯	cell communication	427		51	
人类疾病	human diseases				
癌症	cancers	60		13	

2.2 差异表达基因的功能注释

共筛选出 3800 个差异表达序列(图 5)。大部分差异基因参与的生物学过程包含 ATP 结合转运子(ABC 蛋白)、氧化磷酸化、真核细胞的核糖体生物合成、MAPK 信号通路、谷胱甘肽代谢、丝氨酸和苏氨酸代谢、甾体激素生物合成。

2.3 差异表达基因的验证

选取 6 个差异表达基因进行荧光定量 PCR 验证, 引物如下表所示(表 3)。结果表明 6 个基因的电泳条带全部与预期大小一致, PCR 产物通过

Sanger 测序验证。全部 6 个基因的表达趋势与转录组数据一致(图 6)。

2.4 生物学重复

实验设置 2 个生物学重复。XC1 vs XC2 的 Pearson 系数为 0.852, XD1 vs XD2 的 Pearson 系数为 0.86(图 7)。

3 讨论

无脊椎动物由于缺乏免疫球蛋白发展了独特的生物防御系统(先天性免疫)^[21]。但是免疫系统

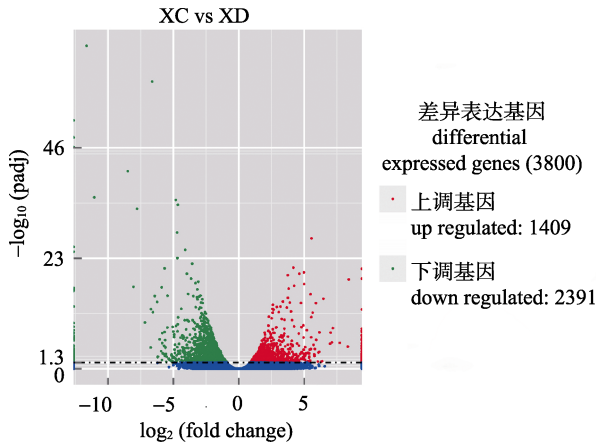


图 5 样品间基因差异表达分析火山图

横坐标代表基因在不同实验组中/不同样品中表达倍数变化; 纵坐标代表基因表达量变化的统计学显著程度, 校正后的 P 越小, $-\log_{10}$ (校正后的 P) 越大, 即差异越显著. 图中的散点代表各个基因, 蓝色圆点表示无显著性差异的基因, 红色圆点表示有显著性差异的上调基因, 绿色圆点表示有显著性差异的下调基因.

Fig. 5 Volcanic map of analysis of differentially expressed gene between samples

The X-axis indicates the fold change of gene expression in different samples. The Y-axis indicates the statistically significant degree of change in gene expression level. When corrected P is smaller, $-\log_{10}$ (corrected P) is bigger, which showing the more significant the difference of gene expression. The scatters represent genes. The blue dot indicates no significant difference, red one indicates significantly difference of up-regulated genes, green one indicates down-regulated genes significantly.

表 3 荧光定量 PCR 分析测定基因的引物

Tab. 3 Primer sequences of the tested genes used in the quantitative RT-PCR analysis

基因名称 gene name	引物(5'-3') primer (5'-3')	产物大小/bp products size
β -actin	F CTCCCTCACGCTATCCTCCG R CTGGGCACCTGAACCTTTCG	177
CYP3A	F CGAGGCTCGACCTTCAGA R TGGTCCACGCATTTGTCT	180
HSP70	F CAACCTGAAGTGGCTGGAC R CCGTATTTGACCCTCCCT	185
SULT	F CCTTTGACCGACTTCCAC R CCTCGACCTTCTCCCAGT	222
MT	F TAACTGCCCATGTCCAAG R GCCACAAGAGCAAGACCC	172
MTP	F CGGGTTTCATTACCGAGT R ACGATACCGGAGGCCAGA	195
DMT	F TAGCGGTGACGAAGACAT R GACGTGAATCGCAAGCAG	112

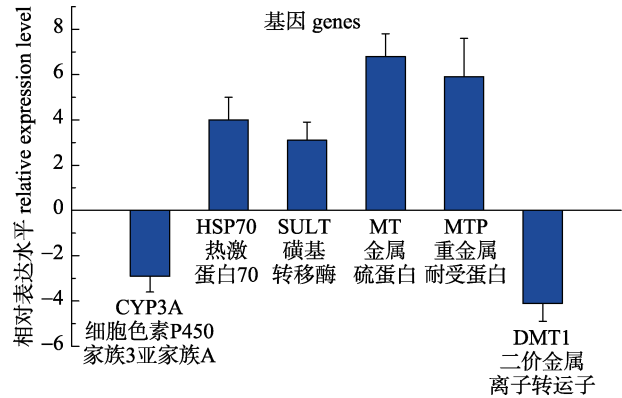


图 6 差异表达基因的荧光定量 PCR 验证

Fig. 6 Quantitative RT-PCR validation of differentially expressed genes between control and Cd exposure groups CYP3A: cyto-chrome P450, family 3, subfamily A; HSP70: heat shock protein 70; SULT: sulfotransferase; MT: metallothionein; MTP: metal tolerance protein; DMT1: divalent metal transporter 1. vertical bars represent the mean \pm SD ($n=3$) relative to the control.

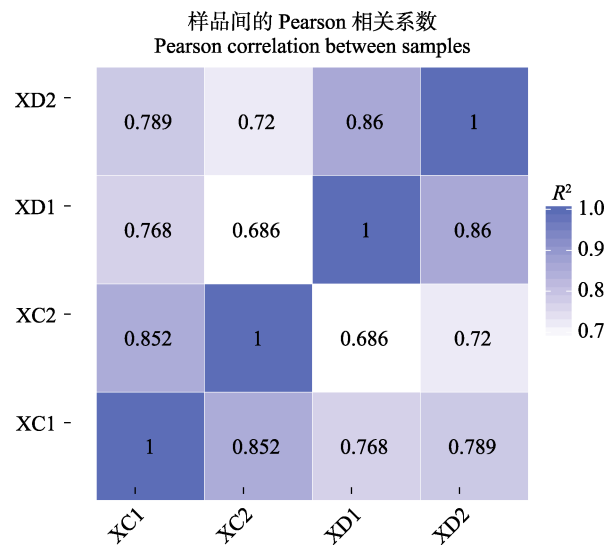


图 7 样品间基因表达量相关性分析

R^2 : Pearson 相关系数的平方.

X轴与 Y轴分别表示不同样品的 \log_{10} (FPKM+1)值.

Fig. 7 The Pearson correlation between samples

The X-axis and Y-axis represent \log_{10} (FPKM+1) of different samples. R^2 : square of Pearson correlation. rho: spearman correlation. tau: kendall-tau correlation.

准确的分子基础仍需进一步研究。例如, 一些 unigene 编码热激蛋白(HSP)家族, 包括 HSP22、HSP70、HSP90、HSP 转录因子, 参与很多物种的压力反应^[22]。HSP 家族转录本高表达与 Hou(2011)的研究一致^[23]。另外, 还检测到编码参与生物解毒代谢过程蛋白的 unigene, 例如 CYP 家族, 谷胱

甘肽硫转移酶, 谷胱甘肽过氧化物酶, 过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶。

尽管双壳贝类中免疫相关的基因信息有所增加, 可用的信息仍很缺乏^[24]。KEGG 分析鉴定免疫通路相关的 unigene, 像 Toll 样受体信号通路, 趋化因子信号通路, NOD 样受体信号通路, 补体和凝血级联反应。Toll 样受体是一个古老的模式识别受体家族, 在激活免疫系统和鉴别非己物质中发挥重要作用。我们鉴定到编码 C3 和 C1q 的 unigene, 其是构成机体蛋白紧密网络的补系统的重要组分, 在机体防御和炎症反应中发挥重要作用。另外, MAPK、PI3K、p38 基因, 在相关的通路中均被检测到, 在外界压力刺激和细胞反应中发挥重要作用。因此, 我们在转录组数据中鉴定出一系列免疫和代谢相关基因, 这些基因在栉孔扇贝防御中发挥重要作用, 这显著提高了我们对扇贝相关通路分子机制的全面理解。

镉暴露后, 栉孔扇贝消化盲囊组织中的 ABC 转运蛋白家族, HSP 家族和 CYP 家族的表达均上调。之前 Luckenbach 等^[25]的研究表明 ABCB 和 ABCC 型转运子在双壳贝类鳃中构成环境与组织的屏障, 起到抵抗多种外界物质的作用。这种保护机制被看作是水生生物体中普遍存在的。另外, Kingtong 等^[26]的研究表明, ABC 转运子在水生无脊椎动物对抗各种有毒化学物质的解毒代谢机制中起重要作用。这些研究可以解释消化盲囊中 ABC 家族表达显著上调的原因。细胞色素 P450 家族成员之一, CYP3A 被认为参与很多生物体内一系列毒物代谢过程, 同时被应用到很多结构上不相关的外源物质的代谢中^[27]。哺乳动物中, 红霉素 N-脱甲基酶 ERND(erythromycin-N-demethylase) 被认为与 CYP3A 部分相关, 是评价环境污染物的负面效应的有效生物标志物^[28]。之前的研究证明某些鱼中 CYP3A 的表达可以被某些外源物质诱导^[29-30]。然而, 本研究中消化盲囊中的 CYP3A 表达下调, 可能与不同的物种、组织、暴露时间、剂量或所用污染物有关。金属硫蛋白(MT)是一种富含丝氨酸的低分子量蛋白, 在重金属解毒代谢中起重要作用^[31]。据报道, MT 可以通过与金属颗粒结合作为水生环境中重金属污染的生物标志物。Geret 等^[32]研究发现, 暴露于 200 $\mu\text{g/L}$ 镉中 4 d 的紫贻贝

(*Mytilus edulis*), 其消化盲囊中 MT 蛋白表达水平明显上调。Zorita 研究表明, 暴露于 200 $\mu\text{g/L}$ 镉 2 d 和 9 d 的地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)消化盲囊中 MT 含量升高^[33]。斑马贻贝(*Dreissena polymorpha*)暴露于 34 $\mu\text{g/L}$ 镉 5 d 和 20 $\mu\text{g/L}$ 镉 63 d 后 MT 含量均被诱导升高^[34-35]。本实验中, MT 表达被 0.2 mg/L 镉显著诱导。因此, MT 合成被显著诱导可作为对抗镉毒性的保护机制。金属耐受性蛋白(MTP)属于阳离子扩散协助蛋白家族, 广泛存在于细菌, 真菌, 植物, 动物中。MTP 是二价阳离子转运子, 对于有效地转运 Zn、Cd, 和其他重金属十分必要^[36]。本研究中, Cd 诱导栉孔扇贝消化盲囊中 MTP 表达升高。肠腔表面非血红素离子的转运子是二价离子转运子(DMT1), 是一种 H^+ 偶联的电膜转运蛋白, 属于进化中高度保守的整合膜蛋白家族。该实验中, Cd 处理组 DMT1 的表达下降, 表明 Cd 抑制了离子转运, 该结果与之前 Desmond 等^[37]的研究一致。

4 结论

本研究基于 Illumina 测序平台生成了栉孔扇贝消化腺组织的转录组。共组装成 105071 个 unigene, 其中 24576 个得到明确的注释。很多基因参与解毒代谢免疫通路。这些结果大量补充了无参考基因组信息的栉孔扇贝现有基因组资源。另外, 差异表达基因被鉴定并得以注释。基因信息提供了海洋污染物胁迫下潜在的贝类分子生物标志物, 更好地理解参与代谢与免疫通路的分子机制。

参考文献:

- [1] Nagashima K, Sato M, Kawamata K, et al. Genetic structure of Japanese scallop population in Hokkaido, analyzed by mitochondrial haplotype distribution[J]. Mar Biotechnol, 2005, 7(1): 1-10.
- [2] Torres M A, Barros M P, Campos S C G, et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review[J]. Ecotox Environ Safe, 2008, 71(1): 1-15.
- [3] Shan Z, Li H, Bao X, et al. A selenium-dependent glutathione peroxidase in the Japanese scallop, *Mizuhopecten yessoensis*: cDNA cloning, promoter sequence analysis and mRNA expression[J]. Comp Biochem Phys B, 2011, 159(1): 1-9.
- [4] Lukyanova O N, Khotimchenko Y S. Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin

- Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle[J]. *Comp Biochem Phys B*, 1995, 110(2): 371–377.
- [5] Chelomin V, Bobkova E, Lukyanova O, et al. Cadmium induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Comp Biochem Phys C*, 1995, 110(3): 329–335.
- [6] Slobodskova V V, Zhukovskaya A F, Chelomin V P. DNA damage in the gill cells of the marine scallop *Mizuhopecten yessoensis* during anoxic stress and aerobic recovery[J]. *Ocean Sci*, 2012, 47(2): 95–100.
- [7] Sato M, Kawamata K, Zaslavskaya N, et al. Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study[J]. *Mar Biotechnol*, 2005, 7(6): 713–728.
- [8] Wang X J, Hu X L, Li J Q. Characterization of 38 EST-derived SNP markers in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their cross-species utility in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *Conserv Genet Resour*, 2012, 4(3): 747–753.
- [9] US EPA. Reviews of the environmental effects of pollutants: IV Cadmium USEnvironmental Protection Agency. ONRL/EIS-106, EPA-600/1-78-026, 1978: 251.
- [10] Peng S, Hu Y, Bai Z. Pollution assessment and ecological risk evaluation for heavy metals in the sediments of Bohai Bay[J]. *Journal of Waterway and Harbor*, 2009, 30(1): 57–60. [彭士涛, 胡焱弟, 白志鹏. 渤海湾底质重金属污染及其潜在生态风险评价[J]. *水道港口*, 2009, 30(1): 57–60.]
- [11] Garber M, Grabherr M G, Guttman M, et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(6): 469–477.
- [12] He L, Wang Q, Jin X, et al. Transcriptome profiling of testis during sexual maturation stages in *Eriocheir sinensis* using Illumina sequencing[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33735.
- [13] Ou J, Meng Q, Li Y, et al. Identification and comparative analysis of the *Eriocheir sinensis* microRNA transcriptome response to *Spiroplasma maericocheiris* infection using a deep sequencing approach[J]. *Fish Shellfish Immun*, 2012, 32(2): 345–352.
- [14] Hsu J C, Chien T Y, Hu C C, et al. Discovery of genes related to insecticide resistance in *Bactrocera dorsalis* by functional genomic analysis of a De Novo assembled transcriptome[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e40950.
- [15] Zhao X, Wang Q, Jiao Y, et al. Identification of genes potentially related to biomineralization and Immunity by transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. *Mar Biotechnol*, 2012, 14(6): 730–739.
- [16] Gavery M R, Roberts S B. Characterizing short read sequencing for gene discovery and RNA-Seq analysis in *Crassostrea gigas*[J]. *Comp Biochem Phys D*, 2012, 7(2): 94–99.
- [17] Meng X L, Tian X, Liu M, et al. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology[J]. *Fish Shellfish Immun*, 2014, 38(2): 287–293.
- [18] State Department of Environmental Conservation. Water Quality Standard. GB11607-89[S]. Beijing: China Standard Press, 1989. [国家环境保护局. 渔业水质标准 GB11607-89[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.]
- [19] Guttikonda S K, Trupti J, Bisht NC, et al. Whole genome coexpression analysis of soybean cytochrome P450 genes identifies nodulation-specific P450 monooxygenases[J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 243.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻DDCT method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [21] Iwanaga S, Lee B L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(2): 128–150.
- [22] Gupta S C, Sharma A, Mishra M, et al. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far?[J]. *Life Sci*, 2010, 86(11–12): 377–384.
- [23] Hou R, Bao Z, Wang S, et al. Transcriptome sequencing and De Novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21560.
- [24] Moreira R, Balseiro P, Planas J V, et al. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35009.
- [25] Luckenbach T, Epel D. ABCB- and ABCC-type transporters confer multidrug resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills[J]. *Am J Physiol-Reg I*, 2008, 294(6): 1919–1929.
- [26] Kingtong S, Chitramvong Y, Janvilisri T. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin[J]. *Aquat Toxicol*, 2007, 85(2): 124–132.
- [27] Hegelund T, Celander M C. Hepatic versus extrahepatic expression of CYP3A30 and CYP3A56 in adult killifish (*Fundulus heteroclitus*)[J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 64(3): 277–291.
- [28] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, et al. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 62(1): 27–33.
- [29] Hasselberg L, Meier S, Svardal A, et al. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 67(4): 303–313.
- [30] Meucci V, Arukwe A. The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Comp Biochem Phys C*, 2006, 142(1–2): 142–150.
- [31] Olsson P E, Larsson A, Maage A, et al. Induction of metallothionein synthesis in rainbow-trout, *Salmo gairdneri*, during long-term exposure to waterborne cadmium[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1989, 6(4): 221–229.

- [32] Geret F, Cosson R P. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury[J]. Arch Environ Con Tox, 2002, 42(1): 36–42.
- [33] Zorita I, Bilbao E, Schad A, et al. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR[J]. Toxicol Appl Pharm, 2007, 220(2): 186–196.
- [34] Lecoeur S, Videmann B, Berny P. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*[J]. Environ Res, 2004, 94(2): 184–191.
- [35] Faria M, Carrasco L, Diez S, et al. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals[J]. Comp Biochem Phys C, 2009, 149(3): 281–288.
- [36] Ricachenevsky F K, Menguer P K, Sperotto R A, et al. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in bio-fortification strategies[J]. Front Plant Sci, 2013, 4(7): 144.
- [37] Desmond I, Bannon R A. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(1): 402–402.

Discovery of genes associated with cadmium accumulation from the digestive gland of scallop *Chlamys farreri* by using high-throughput sequencing

ZHANG Hui^{1,2}, ZHAI Yuxiu^{1,2}, YAO Lin^{1,2}, JIANG Yanhua^{1,2}, LI Fengling^{1,2}

1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, China; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Qingdao), Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China

Abstract: Heavy metal pollution in food is one of the major problems affecting food safety. Cadmium is a kind of heavy metal that is non-essential, highly toxic, and easily accumulated. It enters the food chain and poisons animals and humans. Shellfish easily accumulate heavy metals because of their low metabolic rate. Scallops can accumulate high amounts of cadmium, especially compared to other shellfish, and the content of cadmium in the edible part of scallops was several times higher than that considered the national standard; hence, this has become the focus of attention. In order to understand the molecular mechanisms of high accumulation of cadmium, this study was designed to obtain transcript sequence data and assess gene expression in the digestive gland of the scallop *Chlamys farreri* exposed to cadmium by using molecular technology. In all, 105071 unigenes were obtained with an average size of 829 bp and a N50 length of 1573 bp. All the predicted protein sequences (unigene sequences were translated using the Transeq program of the EMBOSS suite) were searched against the NR and Swiss-Prot protein sequence databases for gene annotation. Further, 24493 unigenes were assigned to at least one GO term under one of the three categories: biological process, cellular component, and molecular function. A total of 12028 unigenes were classified functionally into 26 KOG families, including biochemical metabolism, signal transduction mechanism, defense system, cellular structure, and gene expression. Moreover, 7849 unigenes were assigned to different KEGG pathways. The most represented pathways were signal transduction (1349 members), carbohydrate metabolism (751 members), and transport and catabolism (563 members). Most of them were involved in biological progress, e.g., ATP-binding cassette transporters, oxidative phosphorylation, ribosome biogenesis in eukaryotes, MAPK signaling pathway, glutathione metabolism, serine and threonine metabolism, and steroid hormone biosynthesis. These data would provide potential molecular targets in bivalves exposed to marine pollutants for functional studies of genes and to better understand the molecular mechanisms involved in metabolic and immune pathways.

Key words: *Chlamys farreri*; cadmium; comparative transcriptomics; differentially expressed genes

Corresponding author: ZHAI Yuxiu. E-mail: zhayx@ysfri.ac.cn