

DOI: 10.12264/JFSC2022-0351

感染“褐色沉积症”虾夷扇贝的外套膜转录组测序及差异表达基因分析

于佐安, 李大成, 李华琳, 刘项峰, 滕炜鸣, 刘忠颖, 王庆志, 周遵春

辽宁省海洋水产科学研究院, 农业农村部水产种质资源保护与发掘利用重点实验室, 大连市海产贝类种质资源创新利用重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 为分析“褐色沉积症”形成分子机制, 探究筏式养殖虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)贝壳内侧褐色沉积症状形成原因, 采用 Illumina 高通量测序平台对感染“褐色沉积症”虾夷扇贝和健康虾夷扇贝外套膜组织进行转录组测序分析。结果显示, 患病和健康扇贝外套膜分别获得 43862251 和 41806737 条 clean reads。经参考基因组比对分析, 患病和健康扇贝外套膜表达基因数量分别为 17835 个和 16816 个, 差异表达基因 208 个, 其中上调基因 170 个, 下调基因 38 个。选取 6 个差异表达基因进行荧光定量 PCR (qRT-PCR)验证, 结果证明转录组测序分析可靠。GO 功能富集发现差异基因主要富集在几丁质代谢、含氨基葡萄糖化合物代谢、几丁质结合和氨基糖代谢等与几丁质合成代谢相关的通路; KEGG 通路富集分析发现差异基因主要参与内质网蛋白质合成、内吞作用、剪接体和谷胱甘肽代谢等途径; 对差异表达倍数显著的前 40 个基因分析发现, 编码类咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like, *CCOAOMT-L*)、类 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein, *ACCS-L*)、黄蛋白(protein yellow-like)、热休克蛋白 70 (*HSP70*)、过氧化物酶成熟因子(*DUOX1*)、多烯脂肪酸异构酶(poly enoic fatty acid isomerase, *PFI*)、Na⁺/Cl⁻依赖的甘氨酸转运蛋白(sodium-and chloride-dependent glycine transporter, *GlyTI*)、类酪氨酸酶(putative tyrosinase-like protein, *Putative Tyr-3*)、Toll 样受体(protein toll)等与蛋白质醌化、免疫、氧化、神经传递相关的基因与褐色沉积症形成密切相关, 揭示了虾夷扇贝外套膜褐色沉积症形成的内在原因。

关键词: 虾夷扇贝; 褐色沉积症; 转录组; 关键基因;

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)03-0284-13

外套膜是双壳贝类的重要器官组织, 它能够分泌形成贝壳, 帮助完成摄食、呼吸和排泄等多种生理功能, 还具有保护机体的免疫作用^[1]。由于它是贝壳形成的主要器官, 参与了贝壳生物矿化、壳色形成、贝壳生长等多种生理过程, 因此, 对外套膜开展转录组研究, 分析重要海产经济物种如牡蛎、栉孔扇贝、虾夷扇贝、厚壳贻贝、马氏珠母贝等贝类的贝壳形成, 挖掘参与贝壳形成

的蛋白和多糖等, 探索贝壳壳色成因、生长调控等内在机制, 一直是研究的热点^[2-7]。

随着测序技术的不断发展, 测序精度和深度不断提高, 有学者开始通过外套膜转录组的分析研究病灶位于外套膜或贝壳的双壳贝类疾病内在机制, 以及环境胁迫对贝类组织影响的分子机制。菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)褐环病(Brown Ring Disease, BRD)主要症状为褐色贝壳

收稿日期: 2022-11-01; 修订日期: 2022-12-25.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-49); 辽宁省渔业科技计划项目(201826); 大连市重点研发计划项目(2021YF16SN015, 2019J12SN60); 大连市揭榜挂帅科技攻关项目(2021JB11SN035).

作者简介: 于佐安(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为浅海贝类养殖模式及病害防控. E-mail: abc2033864320@sohu.com

通信作者: 周遵春, 研究员, 研究方向为水产动物分子遗传学. E-mail: zunchunz@hotmail.com

硬蛋白沉积在贝壳内侧,经研究发现致病菌为蛤弧菌(*Vibrio tapetis*)^[8]。Allam等^[9]利用转录组测序技术分析了患病和正常菲律宾蛤仔外套膜组织及外套膜与贝壳之间的腔隙液血细胞的分子响应机制及通路,结果发现显著调控的分子主要参与了病原识别、细胞凋亡和生物矿化等生物过程。才女虫病主要感染部位为贝类贝壳,对养殖生产有很大影响。Mao等^[10]对感染才女虫的虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)外套膜边缘、外套膜中间部位、组织液中血细胞进行了转录组分析,揭示了扇贝贝壳形成机制和免疫调节相关信息。2012年,Zhang等^[11]通过基因组和转录组分析发现双壳贝类的贝壳形成机制要比现有研究结论所发现的更加复杂,并揭示了不同环境胁迫条件下牡蛎基因的调控变化。其中HSP70和凋亡抑制因子调控对于环境胁迫条件下固着生活习性的牡蛎非常重要。

当前国内外研究领域,应用转录组测序双壳贝类外套膜组织,以分析贝类贝壳形成、壳色、生长的相关研究仍然占大多数,对贝类外套膜、贝壳类疾病进行相关研究的报道并不多见。虾夷扇贝“褐色沉积症”是多年来长海县海区筏养二龄虾夷扇贝大规模死亡的主要发病症状之一^[12-13]。病症主要特征为外套膜颜色异常发黄、贝壳内侧出现褐色沉积物质等。研究发现褐色沉积物质与扇贝间碰撞等物理因素无关,可能与病害密切相关^[14]。为探明虾夷扇贝褐色沉积症内在形成机制,挖掘相关关键基因,本研究对患病和健康虾夷扇贝外套膜进行转录组测序分析,对差异表达基因进行功能注释,通过与症状密切相关的关键基因进行研究,为病害诊断及预警奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

根据虾夷扇贝褐色沉积症流行病学调查结果^[14],2020年7月在长海县小长山岛镇英杰村虾夷扇贝筏式养殖海区采集100枚平均壳高为(7.02±0.22)cm的虾夷扇贝,解剖后观察虾夷扇贝贝壳内侧及外套膜症状,选择9枚贝壳内侧褐色沉积症状严重,且沉积部位颜色异常的外套膜边缘组织,每3份样品混合,共计3个生物学重复(BW1,

BW2, BW3);同时选择9枚健康虾夷扇贝外套膜边缘组织,采取同样策略作为对照组(JW1, JW2, JW3)。液氮速冻后,运送至实验室-80℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA制备、文库构建和高通量测序 利用Total RNA Extractor (TRIzol)试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取患病和健康扇贝外套膜外缘组织总RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品降解情况,采用Nanodrop2000、Qubit 2.0和Aglient 2100方法检测RNA样品纯度、浓度和完整性。

合格RNA样品送北京诺禾致源科技股份有限公司,采用Illumina公司的NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit完成cDNA文库的构建,并通过Illumina HiSeq 2500测序平台的125 bp paired-end模式进行转录组测序。

1.2.2 转录组质控和基因表达分析 使用FastQC对原始数据测序质量进行评估,用In-house perl scripts去除带头、无法确定碱基信息比例大于10%和低质量的序列从而得到有效数据clean reads。

以虾夷扇贝全基因组序列作为参考序列,利用Hisat2 v2.0.4软件将过滤后的测序序列进行基因组定位分析,确定clean reads比对到参考基因组的比例大于70%。运用HTSeq v0.9.1软件,通过定位到基因组区域或基因外显子的测序序列(reads)评估基因表达水平^[15]。根据FPKM(expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced)值判断基因是否表达(FPKM>1)^[16]。

1.2.3 差异表达基因筛选及功能注释 使用DESeq R package (1.18.0)^[17]软件检测差异表达基因(differentially expressed genes), $|\log_2(\text{FoldChange})|>0$ 且 P 值<0.005作为筛选标准。将差异表达基因与NR、NT、Swissport数据库进行对比和功能注释,对差异表达最显著的40个基因进行相关分析(P 值越小,差异越显著)。同时利用GOseq软件和KOBAS (2.0)软件进行GO富集分析和KEGG富集分析^[18-19]。

1.2.4 实时荧光定量RT-PCR分析 随机选择6个差异表达基因,以 β -actin作为内参基因。用

Primer 5.0 设计引物(表 1)。使用 Thermo 公司的 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将总 RNA 合成 cDNA, 以逆转录产物为模板, 使用 Agilent 公司的 G8830A 型实时荧光定量 PCR 仪进行定量分析。反应体系总体积 10 μ L: 稀释 10 倍后的 cDNA 模板 1.0 μ L, Faststart Universal SYBR Green Master 5.2 μ L, 正反向引物各 0.8 μ L, RNase-Free ddH₂O 2.2 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 65~95 $^{\circ}$ C 间制作熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因表达相对水平。

表 1 实时荧光定量 RT-PCR 引物
Tab. 1 Primers for qRT-PCR

显著差异基因(序列号) DEGs (ID)	正向引物序列(5'-3') forward (5'-3')	反向引物序列(5'-3') reverse (5'-3')
LOC110459823	CAACGGCTTACACGGAGGCATG	TAGGAATCATCACCTGGGCGACTC
LOC110462248	AACTGCCAAAGCCTCTTGATCCTG	TCATCTGCGATTGCCAGTGCTAC
LOC110445682	TCTCTAGCGACCAGGACCGTTTAC	TTGCCTTCATCCGCCATCTTGCG
LOC110457068	CACGCCGTATCCGAGATGTG	GCTGTGTCGCTCGACCAAAAT
LOC110456245	CGTTGGTCGGGCTAGGAATCATG	GTCTCCGCACTGGCTGTCAATC
LOC110449741	ACCGTGTTGGGCTGAGATGTATC	GGATCTATCGTGGTGCGGTATTG
LOC110459362	AGTCCCAATCTACGAAGGTTATG	CCAGTGATGAGGAGGAA GCAG

2 结果与分析

2.1 转录组测序和基因表达分析

通过 Illumina Hiseq 平台转录组测序褐色沉积症和健康虾夷扇贝外套膜组织, 分别获得平均 45142628 和 43041204 个原始数据, Phred 数值大于 20、30 的碱基(Q20、Q30)平均百分比超过 96.5% 和 92%, 数据质量满足后续分析条件。原始数据过滤后分别获得平均 43862251 和 41806737 个有

效数据(表 2)。

以虾夷扇贝全基因组为参考序列, 基因组定位分析过滤后序列, 患病组和健康组定位到基因组上的测序序列平均达到 78.14%和 78.45%, 其中比对到基因组外显子的平均比例分别为 74.3% 和 66.4%, 测序序列定位到基因组的比例超过 70%, 且比对到外显子的平均比例最高(与内含子和基因间区相比), 表明参考基因组选择较好, 转录组测序序列可用(表 3)。利用 HTSeq v0.9.1 软件

表 2 转录组测序数据信息
Tab. 2 Information of transcriptomic reads

组别 sample name	原始数据 raw reads	有效数据 clean reads	有效碱基/G clean bases	Q20 碱基比例/% Q20	Q30 碱基比例/% Q30	GC 碱基比例/% GC content
BW1	43520286	42718356	6.41	97.2	93.41	39.93
BW2	41516018	40446646	6.07	97.31	93.58	40.75
BW3	50391580	48421752	7.26	96.62	92.43	40.84
JW1	40550508	39677600	5.95	97.28	93.52	41.9
JW2	47455398	45331332	6.8	95.65	90.1	39.61
JW3	41117706	40411280	6.06	97.17	93.55	39.08

表 3 有效测序数据与参考基因组对比表
Tab. 3 Comparision of total reads and reference genomes

项目 item	BW1	BW2	BW3	JW1	JW2	JW3
有效数据 total reads	42718356	40446646	48421752	39677600	45331332	40411280
定位到基因组有效数据 total mapped reads	32817419 (76.82%)	32432185 (80.19%)	37484739 (77.41%)	32994196 (83.16%)	35573757 (78.47%)	29789659 (73.72%)
定位到基因组外显子比例 percent of reads mapped to exon of genome	70.40%	77.40%	75.10%	78.10%	66.20%	54.90%

计数定位到基因组区域或基因外显子的测序序列以评估基因表达水平, FPKM>1 作为基因表达水平阈值, 患病组扇贝外套膜表达基因 17835 个, 健康组表达基因 16816 个(表 4)。

表 4 不同表达水平区间的基因数量

Tab. 4 The number of genes in different expression intervals

FPKM 区间 FPKM Interval	BW1	BW2	BW3	JW1	JW2	JW3
0-1	12730	13256	12959	14752	15009	12242
1-3	4606	4893	4999	5787	5515	5193
3-15	9418	8990	9145	7546	7093	9571
15-60	3177	2778	2829	1835	2377	3057
>60	886	900	885	697	823	754
FPKM>1 (total)	18087	17561	18087	16065	15808	18575

2.2 差异表达基因注释及分析

应用 DESeq R package (1.18.0)软件对基因表达水平分析中得到的数据进行标准化, 计算假设检验概率(P -value), 多重假设检验校正后以 $|\log_2(\text{Fold-Change})|>0$ 且 $P<0.005$ 作为差异表达基因筛选标准。经统计分析后得到 208 个差异表达基因, 其中上调基因 170 个, 下调基因 38 个(图 1)。

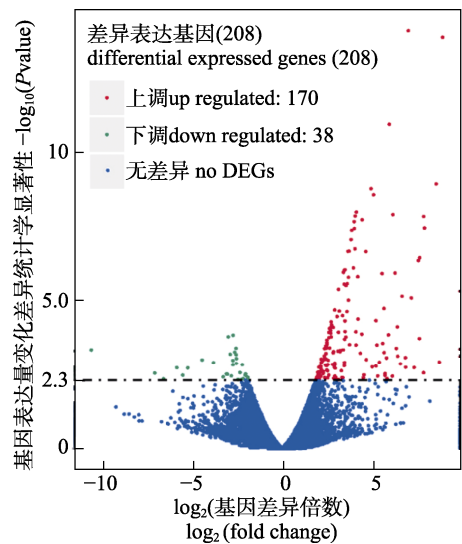


图 1 患病组和健康组虾夷扇贝外套膜组织差异表达基因分析

Fig. 1 Differentially expressed genes in mantle between diseased and healthy *Mizuhopecten yessoensis* group

将差异表达基因映射到 GO 数据库进行功能富集分析, 146 个差异表达基因共注释了 880 个

GO 通路, 其中包括生物过程 458 个, 细胞组成 134 个, 分子功能 288 个。富集程度最高的前 30 个 GO 功能注释中, 生物过程 13 个, 细胞组成 4 个, 分子功能 13 个, 显著富集的几丁质代谢过程、氨基葡萄糖代谢过程、几丁质结合、氨基糖代谢过程、氨基聚糖代谢过程 5 个 GO 功能注释均与几丁质相关。分子功能中氧化还原活性和细胞组成中细胞外区域部分差异表达基因数量较多(图 2)。

使用 KOBAS (2.0)软件对差异表达基因进行富集分析, 总计富集到 16 条 KEGG 通路, 均上调。校正后 P 值(corrected P -value) <0.05 时, 内质网蛋白质加工、细胞内吞、剪接体和谷胱甘肽代谢等 4 个 KEGG 通路显著密集(图 3)。其中除谷胱甘肽代谢以外 3 个通路的相关上调基因主要是热休克蛋白家族(HSP40、HSP70、HSP73)基因, 参与了内质网相关蛋白质降解途径(ERAD)、腔内伴侣蛋白识别、细胞质泛素化、网格蛋白囊泡、剪切因子 PRP19 等过程, 谷胱甘肽代谢通路中上调基因表达了氨肽酶 N。

2.3 与虾夷扇贝褐色沉积病相关的差异表达基因分析

为分析虾夷扇贝贝壳内侧褐色沉积症形成内在机制, 挖掘关键基因, 利用 NR、NT 和 Swiss 数据库对差异表达基因进行注释, 发现了 34 个新基因, 另有 65 个基因在 NR 数据库和 Swiss 数据库中没有明确的蛋白功能注释。根据 P 值大小, 对前 40 个差异表达显著的基因进行详细分析, 发现这 40 个基因与蛋白醌鞣化、几丁质代谢、活性氧自由基(ROS)代谢、脂质过氧化、免疫、神经反应调控、贝壳生物矿化等密切相关(表 5)。其中蛋白醌鞣化、几丁质代谢过程、贝类生物矿化作用与褐色沉积物质形成密切相关, 神经反应调控与褐色沉积症部位外套膜萎缩有关, ROS 代谢、脂质过氧化、免疫可能与扇贝死亡相关。

黄蛋白家族基因(protein yellow-like)、酪氨酸酶基因(*tyr-3*)、二乙酰壳二糖酶基因(chitinase)热休克蛋白 70 基因(*HSP70*)、双氧化物酶成熟因子基因(*DUOX1*)、多烯脂肪酸异构酶基因(*PFI*)、

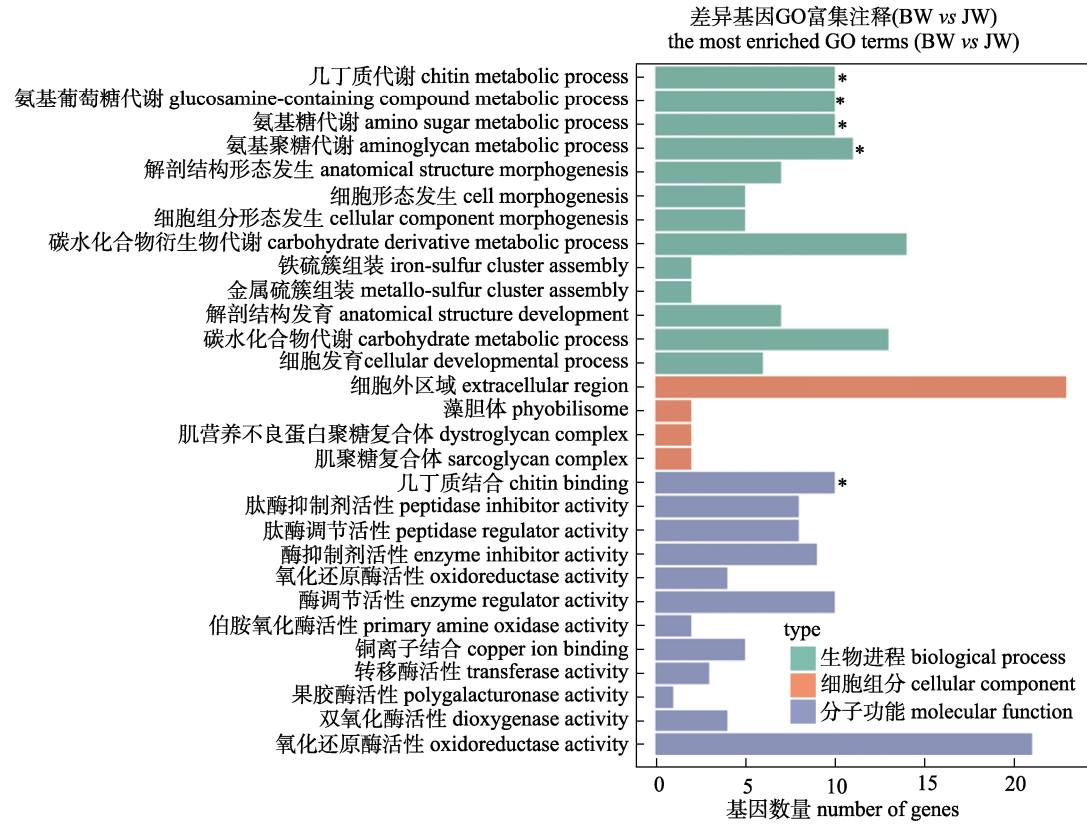


图 2 差异表达基因 GO 功能分类

*表示差异表达基因显著富集 GO.

Fig. 2 GO functional classification of differentially expressed genes

* represents the significantly enriched GO of differentially expressed genes.

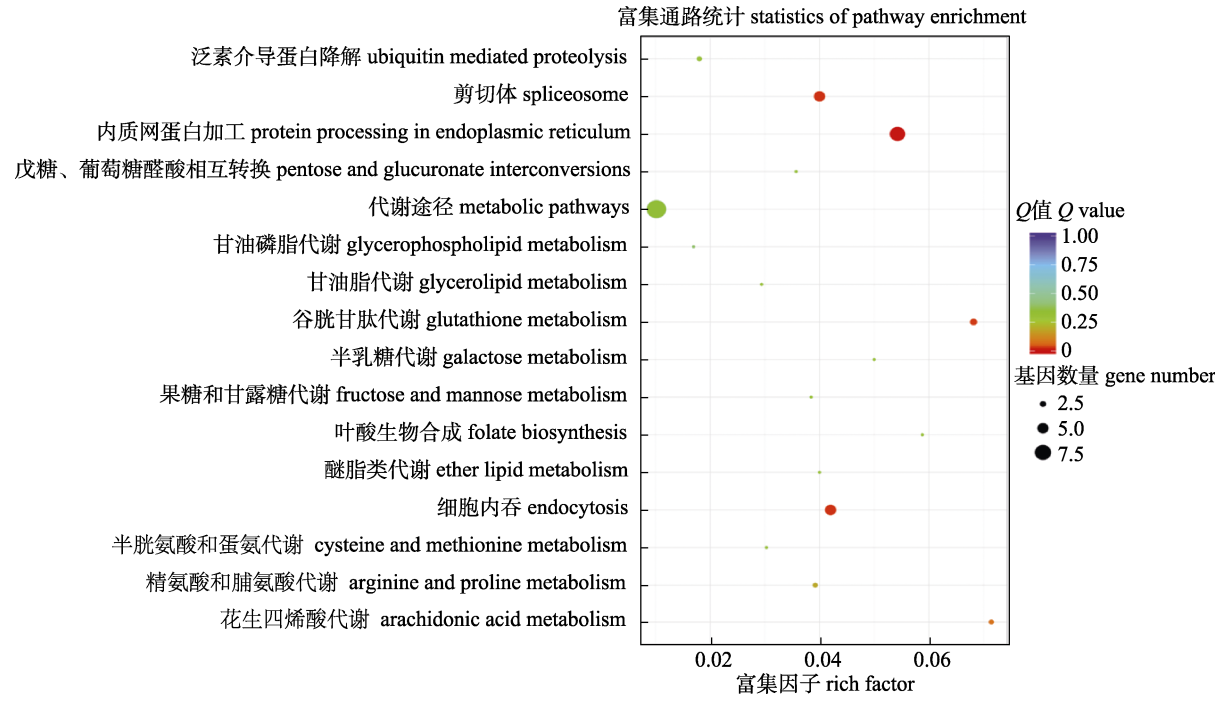


图 3 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

表 5 前 40 个差异表达基因功能注释
Tab. 5 Functional annotations of different expressed genes (top 40)

基因序列号 gene ID	蛋白注释 protein annotation	上调/下调 regulated	log ₂ (fold change)
蛋白质醌化 protein quinone tanning			
LOC110457068	黄蛋白 protein yellow	上调 up	8.488
LOC110457110	黄蛋白 protein yellow		5.8608
LOC110457069	王浆主蛋白 major royal jelly protein 1	上调 up	5.6167
LOC110467506	酪氨酸酶蛋白 3 tyrosinase-like protein tyr-3	上调 up	3.6264
LOC110463665	酪氨酸酶蛋白 1 tyrosinase-like protein 1	上调 up	7.1222
LOC110463727	推测酪氨酸酶蛋白 3 putative tyrosinase-like protein tyr-3	上调 up	6.3511
几丁质代谢 chitin metabolic			
LOC110445289	二乙酰壳二糖酶 chitobiase	上调 up	3.4267
LOC110453953	壳三糖酶-1 chitotriosidase-1	上调 up	3.4728
LOC110460862	推测 β-氨基己糖苷酶 putative beta-hexosaminidase	上调 up	2.8978
贝壳生物矿化 shell biomineralization			
LOC110440284	PIF 蛋白(具有几丁质结构域) protein PIF-like (region=chitin-binding domain type 2)	上调 up	5.1699
LOC110461399	非组织特异性碱性磷酸酶 alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	上调 up	2.6851
神经反应调控 regulation of neural response			
LOC110458922	Na ⁺ /Cl ⁻ 依赖的甘氨酸转运蛋白 sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2	上调 up	3.9848
LOC110453486	生电碳酸氢钠协同转运蛋白 electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1	上调 up	3.69
LOC110445459	室管膜相关蛋白 ependymin-related protein 1	上调 up	3.1075
LOC110463585	接触蛋白 contactin	上调 up	2.6927
活性氧自由基代谢 ROS metabolism			
LOC110456245	过氧化物酶成熟因子 dual oxidase maturation factor 1	上调 up	5.0418
LOC110456222	双氧化酶 dual oxidase	上调 up	3.6538
LOC110467306	含铜胺氧化酶 amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]	上调 up	3.0279
不饱和脂肪酸过氧化 unsaturated fatty acids peroxidation			
LOC110455312	多烯脂肪酸异构酶 polyenoic fatty acid isomerase	上调 up	4.0905
LOC110455271	多烯脂肪酸异构酶 polyenoic fatty acid isomerase		3.3336
谷胱甘肽代谢、乙烯合成 glutathione metaboli, ethylene biosynthesis			
LOC110459823	类咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like	上调 up	8.8456
LOC110462248	类 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein	上调 up	6.9525
LOC110443198	γ-谷氨酰转肽酶 gamma-glutamyltranspeptidase 1	上调 up	6.2203
LOC110464301	未知蛋白, 结构功能域为 s-腺苷甲硫氨酸转移酶 uncharacterized protein(region=S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases)	上调 up	2.6697
免疫及疾病相关 gene associated with immune and disease			
LOC110467297	前列腺素还原酶 prostaglandin reductase 1	上调 up	3.8402
LOC110441781	中性大氨基酸分子转运载体小亚基 large neutral amino acids transporter small subunit 2	上调 up	3.8006
LOC110459154	胆固醇结合膜糖蛋白 prominin-1/CD133	上调 up	4.6085
LOC110455319	类膜金属内肽酶 membrane metallo-endopeptidase-like 1	上调 up	3.462
LOC110457103	富含天冬酰胺蛋白 asparagine-rich protein	上调 up	2.7078
LOC110460103	未知蛋白, 与富含天冬酰胺蛋白同源性较高 uncharacterized protein, showed high homology with NRP	上调 up	4.1709
LOC110458258	CD109 抗原 CD109 antigen	上调 up	3.4318

(待续 to be continued)

(续表 5 Tab. 5 continued)

基因序列号 gene ID	蛋白注释 protein annotations	上调/下调 regulated	log ₂ (fold change)
LOC110442009	未知蛋白, 与 body wall muscle protein 蛋白同源 uncharacterized protein, showed high homology with body wall muscle protein	上调 up	3.5693
LOC110453361	Toll 样识别受体-6 Toll-like receptor 6	上调 up	3.9314
LOC110463603	Toll 样识别受体-6 Toll-like receptor 6		3.1543
LOC110444154	丝氨酸蛋白酶抑制剂 serine protease inhibitor dipetalogastin (Fragment)	上调 up	3.5173
LOC110461363	热休克蛋白 70 HSP70	上调 up	2.7283
LOC110450809	热休克蛋白 70 HSP70		2.6147
LOC110461399	非组织特异性碱性磷酸酶 alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	上调 up	2.6851
LOC110443026	凝集素-12 collectin-12	下调 down	-2.6942
功能未知 unknown function			
LOC110457094	未知蛋白 uncharacterized protein	上调 up	5.508

Na⁺/Cl⁻依赖的甘氨酸转运蛋白基因(*GlyTI*)、Toll样受体基因等关键基因广泛参与了蛋白醌鞣化、几丁质代谢、活性氧自由基代谢、脂质过氧化、谷胱甘肽代谢、免疫防护、神经反应调控等过程,与褐色沉积症形成密切相关。类咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因(*CCOAOMT-L*)、类 1-氨基环丙烷-1 羧酸合酶基因(*ACCS-L*)表达差异最显著,研究表明咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶和 1-氨基环丙烷-1 羧酸合酶是植物木质素合成和乙烯合成的关键酶^[20-21],但在动物体内的功能并不明确,分析可能参与甲基化、谷胱甘肽代谢和机体免疫等生理活动。另有一些基因编码前列腺素还原酶、CD133、CD109、膜金属内肽酶等,在人体内与肿瘤、血管类疾病、神经类疾病密切相关,但在无脊椎动物中的作用也不明确,推测与虾夷扇贝褐色沉积症的形成及扇贝死亡关联性很高。

2.4 实时荧光定量 RT-PCR 验证结果

为验证褐色沉积症组和健康组外套膜转录组测序可靠性,通过 qRT-PCR 验证患病组和健康组扇贝外套膜 6 个差异表达基因 LOC110459823 (*CCOAOMT-L*)、LOC110462248 (*ACCS-L*)、LOC110445682 (uncharacterized gene)、LOC110457068 (Protein yellow-like)、LOC110456245 (*DUOX1*)、LOC110450809 (*HSP70*)的表达结果,并与转录组测序结果进行比较。结果表明,6 个随机选择的差异表达基因在 qRT-PCR 中表达趋势

与转录组分析表达结果基本一致(图 4),表明患病组和健康组扇贝外套膜转录组测序结果可靠。

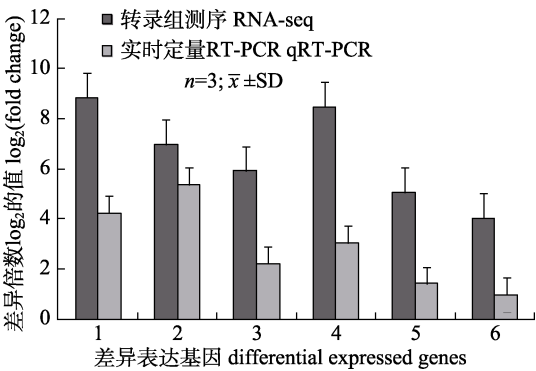


图 4 应用实时荧光定量 RT-PCR 与转录组对 6 个差异基因差异倍数的比较分析

1. 类咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因; 2. 类 1-氨基环丙烷-1 羧酸合酶基因; 3. 未知基因; 4. 黄蛋白家族基因; 5. 过氧化物酶成熟因子基因; 6. 热休克蛋白 70 基因。

Fig. 4 Comparative analysis of six DEGs by qRT-PCR and transcriptome
1. *CCOAOMT-L*; 2. *ACCS-L*; 3. vncharacterized gene; 4. protein yellow-like; 5. *DUOX1*; 6. *HSP70*.

3 讨论

3.1 褐色沉积症与蛋白质醌鞣化

“褐色沉积症”虾夷扇贝贝壳内侧沉积物质呈薄片状,初期颜色偏黄,严重时为褐色。经红外光谱分析主要成分为蛋白质^[14],这种硬化蛋白的形成可能与蛋白质醌鞣化相关。醌鞣化是复杂的蛋白质变性反应,角质层中 N-乙酰多巴胺(N-ace-

tyldopamine, NADA) 和 N- β -丙酰多巴胺(N- β -alanyldopamine, NBAD)在二酚氧化酶作用下形成相应酚类物质, 这些酚类化合物、蛋白质和几丁质则进一步形成相互作用联结成高度稳定网状结构^[22]。昆虫蜕皮和变态发育过程中的表皮黑化和硬化反应是最为常见的蛋白醌鞣化反应^[23]。

对褐色沉积症和对照组外套膜进行转录组测序, 发现编码酪氨酸酶和 Yellow 蛋白的基因显著上调。酪氨酸酶是醌鞣化过程中的硬化和黑化的关键酶, 在蛋白质醌鞣化过程, 能催化一元酚和邻酚羟基化^[23], 并把二酚氧化成醌, 与蛋白、几丁质相互作用交联在一起形成角质^[24], 酪氨酸酶是昆虫中唯一参与角质硬化的酶^[25]; 同时酪氨酸酶在黑色素生成及调控过程中也发挥了重要功能^[26-27], Sun 等^[4]、Yu 等^[5]发现其在贝类生物矿化和贝类色素沉积过程中显著上调。而 yellow 基因首次在双壳贝类中发现与褐色沉积物质形成密切相关。yellow 基因最早在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)成虫表皮和幼虫口器的异常黄色表型中被鉴别^[28-29], 它们编码的蛋白都具有一个王浆主蛋白(major royal jelly protein, MRJP)结构域, 因此, MRJP 蛋白家族与 Yellow 蛋白基因家族同源, 而且可能由后者进化而来^[30]。yellow 基因一开始在非昆虫的真核生物均未发现^[31-32], 随着全基因组序列数据库的逐渐完善, 虾夷扇贝、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)、黑鲍(*Haliotis rubra*)、红鲍螺(*Haliotis rufescens*)等双壳贝类也发现了类似的预测蛋白, 但功能尚未明确。而昆虫的 yellow 基因功能研究较多, 其编码的 Yellow 蛋白在色素形成、黑化(免疫反应)^[33]和蛋白质鞣化反应中^[22]中发挥重要作用。

褐色沉积物质与昆虫变硬黑化的表皮外观上相似, 结合转录组测序与蛋白质醌鞣化相关的显著上调差异表达基因, 分析虾夷扇贝贝壳内侧的褐色沉积物质很可能是蛋白质醌鞣化的产物。但蛋白质醌鞣化代谢通路比较复杂, 涉及多巴(DOPA)、NADA、NBAD、酪氨酸羟化酶等多个关键物质, 此次转录组测序仅发现编码酪氨酸酶和 yellow 蛋白的基因显著上调, 褐色沉积物质与

蛋白质醌鞣化的关系有待进一步深入研究。

3.2 褐色沉积症与几丁质代谢及贝壳生物矿化

高通量测序技术的应用已发现包括 Nacrein 蛋白、MSI60 蛋白、Prismalin-14 蛋白、PIF 蛋白等贝类基质蛋白, 几丁质等多糖类均与贝类生物矿化密切相关, 在贝类形成过程中起重要调控作用^[4,34]。褐色沉积症和对照组虾夷扇贝外套膜转录组测序结果发现编码 PIF 蛋白和非组织特异性碱性磷酸酶等基因上调表达, 说明褐色沉积症的形成与贝壳生物矿化有一定关系。但外套膜作为贝壳形成的主要组织, 其在本研究中显著上调表达的前 40 个基因参与贝壳生物矿化仅有 2 个, 这可能与褐色沉积症发病位置主要在外套膜边缘有关, 而边缘区的作用是负责分泌贝壳角质层以及棱柱层初始的成核过程^[35], 角质层和棱柱层初始成核过程中相关贝壳基质蛋白等参与相对较少。

贝壳角质层主要成分为蛋白质醌鞣化形成的硬蛋白^[36-37], 同时还包括黏多糖、脂类等物质^[38], 某些双壳贝类的角质层中还含有几丁质^[39]。差异表达基因的 GO 富集分析发现, 显著富集的通路均与几丁质代谢相关。编码二乙酰壳二糖酶、壳三糖酶-1、推测 β -氨基乙糖苷酶等与几丁质代谢密切相关的蛋白的基因也显著上调。说明褐色沉积物质的形成与贝壳生物矿化过程中的角质层形成及几丁质代谢有密切关系。进一步推测褐色沉积物质也许就是贝壳的角质层, 但健康扇贝的角质层在贝壳最外层, 而褐色沉积物质沉积在贝壳内侧, 其形成原因还需要进一步分析。

3.3 褐色沉积症与 ROS 代谢、脂质过氧化及谷胱甘肽代谢

活性氧(ROS)是氧直接或间接转变的氧自由基及其衍生物, 正常代谢时 ROS 是吞噬细胞发挥吞噬和杀伤作用的主要介质。但是在病理条件下, 活性氧浓度超过生理限度时就会损伤生物大分子, 其中就包括脂质过氧化、DNA 的氧化损伤等, 从而导致各种疾病发生^[40]。本研究发现过氧化物酶成熟因子、双氧化酶、含铜胺氧化酶等促进 ROS 代谢的基因显著上调, 说明患病虾夷扇贝组织内 ROS 可能过量。多烯脂肪酸异构酶是不饱和脂肪

酸氧化代谢的关键物质之一^[41], 其表达上调揭示了患病虾夷扇贝体内出现了脂质过氧化作用。相关研究表明, 脂质过氧化作用与机体衰老、癌症、溶血与贫血、炎症反应等密切相关^[42]。所以, 与 ROS 过量及脂质过氧化作用相关基因的上调表达, 揭示感染褐色沉积症的虾夷扇贝发生死亡可能与 ROS 过量及引起的脂质过氧化反应对机体造成的损伤相关。ROS 过量表达的原因与褐色沉积症形成的原因相似, 都有可能是极端环境刺激或病原微生物感染导致。

谷胱甘肽能够保护 DNA、蛋白质和其他生物分子抵抗氧化损伤^[43], 因此谷胱甘肽对于 ROS 过量表达和脂质过氧化能够起到防御作用^[42]。本研究与谷胱甘肽相关 KEGG 富集通路显著富集和相关基因的上调表达也证明了这点。显著上调的 *CCOAOMT-L* 基因编码类咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶, 以 S-腺苷甲硫氨酸为底物甲基化生成 S-腺苷半胱氨酸, 继而生成谷胱甘肽^[44]; γ -谷氨酰转肽酶是生物体内谷胱甘肽代谢的相关酶之一, 也是反应生物体代谢的一个重要指标^[45]; *ACCS-L* 基因编码的类 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶, 是植物乙烯合成的关键酶, 催化 S-腺苷甲硫氨酸生成乙烯, 而乙烯参与了植物生长、发育等多个过程^[21]。有研究发现乙烯可以作为人类炎症的早期标记物^[46]。但乙烯在贝类体内有无合成, *ACCS-L* 基因显著上调表达但其在褐色沉积症形成过程发挥的作用是否与在植物体内的相同, 还需要进一步研究。

3.4 褐色沉积症与神经反应调控、其他免疫因子及疾病

虾夷扇贝褐色沉积症部位外套膜除颜色异常症状外, 还有一典型特点, 即外套膜在褐色沉积部位萎缩而同一贝壳其他部位则正常外伸。研究发现编码 Na^+/Cl^- 依赖的甘氨酸转运蛋白、生电碳酸氢钠协同转运蛋白、室管膜相关蛋白和接触蛋白等 4 个蛋白的差异基因显著上调, 功能注释分析发现它们与神经调控密切相关。 Na^+/Cl^- 依赖的甘氨酸转运蛋白主要参与神经递质的重摄取跨膜转运, 维持突触间隙和细胞外神经递质的低浓度水平, 其功能失调与许多神经性疾病相关^[47]; 生

电碳酸氢钠协同转运蛋白对碳酸氢根高度敏感, 是细胞内外和突触 pH 的主要调节剂, 调节神经元兴奋性^[48]; 室管膜相关蛋白可能为一类新的抗细胞黏附分子, 在神经再生、分化、细胞迁移及建立特异的细胞联系中起关键作用^[49]; 而接触蛋白是免疫球蛋白超级家族接触蛋白亚组的一员, 定位于细胞膜和细胞质, 其主要功能是通过促进神经轴突的推进导向作用进而参与神经系统调节^[50]。褐色沉积症部位外套膜萎缩可能与这些基因表达上调有关。

患病组和对照组外套膜转录组测序差异表达显著上调的前 40 个基因中, 与免疫及疾病相关的基因注释结果最多。编码热休克蛋白家族基因广泛参与了内质网相关蛋白质降解、剪切子、细胞内吞等多个 KEGG 富集通路, 编码 HSP70 蛋白基因的显著上调也反映了其在扇贝体内发挥了分子伴侣功能, 增强细胞对损害的抵抗及加速异常蛋白质的降解^[51]。丝氨酸蛋白酶抑制剂、Toll 样受体、碱性磷酸酶和 C 型凝集素 12 作为典型免疫因子在无脊椎动物免疫反应中发挥重要作用^[52-55], 编码这些基因的显著上调揭示了扇贝机体对于褐色沉积症的免疫反应。

前列腺素还原酶可以调节内源性脂质介质的代谢过程, 是潜在的癌症早期检测生物指标和治疗癌症的靶分子^[56]; 中性大氨基酸分子转运载体小亚基是一种不依赖于 Na^+ 和 pH 的跨膜转运蛋白, 在哺乳动物中与肿瘤、中枢神经系统性疾病相关^[57]; Prominin-1 (CD133)、CD109 抗原、膜金属内肽酶等在人体内也与肿瘤、皮肤病、心力衰竭、心血管疾病和阿尔兹海默症等有关^[58-60]。编码这些蛋白的基因在虾夷扇贝褐色沉积症外套膜显著上调表达, 揭示了这些基因也许也可以作为褐色沉积症的分子标记物, 可为下一步病害预警预报提供关键分析指标。

参考文献:

- [1] Zhang X Y. Studies on the histology and histochemistry of the mantle of *Chlamys farreri* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006. [张晓彦. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 外套膜的组织学与组织化学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.]

- [2] Zeng D, Guo X M. Mantle transcriptome provides insights into biomineralization and growth regulation in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*)[J]. Marine Biotechnology, 2022, 24(1): 82-96.
- [3] Shi M J, Lin Y, Xu G R, et al. Characterization of the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) mantle transcriptome and identification of biomineralization-related genes[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(6): 706-715.
- [4] Sun X J, Yang A G, Wu B, et al. Characterization of the mantle transcriptome of yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): Identification of genes potentially involved in biomineralization and pigmentation[J]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0122967.
- [5] Yu W C. A preliminary study on the molecular mechanism of pigmentation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*[D]. Yantai: Ludong University, 2019. [于文超. 长牡蛎黑色素生成的分子机制的初步研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2019.]
- [6] Bao L F, Wang X X, He J Y, et al. Illumina-based transcriptome sequencing of mussel *Mytilus coruscus* mantle[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2015, 41(4): 394-406. [鲍林飞, 王新星, 何健瑜, 等. 基于 Illumina 平台的厚壳贻贝外套膜转录组从头测序[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2015, 41(4): 394-406.]
- [7] Zheng Z. The studies of biomineralization related genes based on multi-omic analyses in *Pinctada fucata martensii* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2017. [郑哲. 基于多组学分析的马氏珠母贝矿化相关基因研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017.]
- [8] Paillard C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*[J]. Aquatic Living Resources, 2004, 17(4): 467-475.
- [9] Allam B, Pales Espinosa E, Tanguy A, et al. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(1): 2-11.
- [10] Mao J X, Zhang W J, Zhang X S, et al. Transcriptional changes in the Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) shell infested by *Polydora* provide insights into the molecular mechanism of shell formation and immunomodulation[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1-14.
- [11] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490(7418): 49-54.
- [12] Yu Z A, Li D C, Wang X Y, et al. Reason of massive mortality of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in raft cultivation in coastal Changhai County[J]. Fisheries Science, 2019, 38(3): 420-427. [于佐安, 李大成, 王笑月, 等. 长海县筏养虾夷扇贝大规模死亡原因探讨[J]. 水产科学, 2019, 38(3): 420-427.]
- [13] Teng W M, Li W J, Zhang M, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 937-943. [滕炜鸣, 李文姬, 张明, 等. 虾夷扇贝脓胞病病原的分离、鉴定与致病性[J]. 水产学报, 2012, 36(6): 937-943.]
- [14] Yu Z A, Li D C, Wang Q Z, et al. Preliminary research on “brown deposition syndrome” of raft farmed scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(9): 1713-1720. [于佐安, 李大成, 王庆志, 等. 筏式养殖虾夷扇贝“褐色沉积症”形成原因初步研究[J]. 水产学报, 2022, 46(9): 1713-1720.]
- [15] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515.
- [16] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [17] Leng N, Dawson J A, Thomson J A, et al. EBSeq: An empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments[J]. Bioinformatics, 2013, 29(8): 1035-1043.
- [18] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias[J]. Genome Biology, 2010, 11(2): R14.
- [19] Mao X Z, Cai T, Olyarchuk J G, et al. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary[J]. Bioinformatics, 2005, 21(19): 3787-3793.
- [20] Wang H M, Yu Y C, Fu C X, et al. Progress of a key enzyme-caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in lignin biosynthesis[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(2): 458-466. [王华美, 于延冲, 付春祥, 等. 木质素合成关键酶咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 458-466.]
- [21] Chu X P. Cloning and expression analysis of Grape1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2014. [初雪鹏. 葡萄 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶基因的克隆和表达分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2014.]
- [22] Chen E H. Identification and functional analysis of genes coordinates with puparium tanning in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[D]. Chongqing: Southwest University, 2019. [陈二虎. 桔小实蝇蛹壳鞣化关键基因的

- 鉴定及其功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.]
- [23] Cao Z S. The molecular identification and functional study of *Laccase2* gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2014. [曹治珊. 棉铃虫漆酶 II 基因的分子鉴定及功能分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.]
- [24] Liu L P, Xi G S, Wang F, et al. Research progress of phenoloxidase in insects[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013, 25(4): 383-387. [刘丽萍, 奚耕思, 王芳, 等. 昆虫酚氧化酶的研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(4): 383-387.]
- [25] Chen Q X, Song K K. Tyrosinase: Recent prospects[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(5): 731-737. [陈清西, 宋康康. 酪氨酸酶的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(5): 731-737.]
- [26] Palumbo A. Melanogenesis in the ink gland of *Sepia officinalis*[J]. Pigment Cell Research, 2003, 16(5): 517-522.
- [27] Lemer S, Saulnier D, Gueguen Y, et al. Identification of genes associated with shell color in the black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 568.
- [28] Brehme K S. The effect of adult body color mutations upon the larva of *Drosophila melanogaster*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1941, 27(6): 254-261.
- [29] Biessmann H. Molecular analysis of the yellow gene (y) region of *Drosophila melanogaster*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82(21): 7369-7373.
- [30] Schmitzová J, Klaudivy J, Albert Š, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 1998, 54(9): 1020-1030.
- [31] Maleszka R, Kucharski R. Analysis of *Drosophila yellow-B* cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 270(3): 773-776.
- [32] Drapeau M D, Albert S, Kucharski R, et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees[J]. Genome Research, 2006, 16(11): 1385-1394.
- [33] Yan F. Expression profile analysis of yellow family genes in *Aedes aegypti* and functional analysis of the rAa-yc[D]. Guiyang: Guizhou Medical University, 2016. [颜凤. 埃及伊蚊 yellow 基因家族表达谱分析及 rAa-Yc 蛋白的功能初探[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2016.]
- [34] Song X R. Studies on proteins and genes involved in the shell formation of *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013. [宋小瑞. 长牡蛎贝壳形成相关蛋白及其基因的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2013.]
- [35] Checa A G. Physical and biological determinants of the fabrication of molluscan shell microstructures[J]. Frontiers in Marine Science, 2018, 5: 353.
- [36] Beedham G E. Observations on the mantle of the Lamelli-branchia[J]. Quarterly Journal of Microscopicalence, 1958, 99(2): 181-197.
- [37] Degens E T, Spencer D W, Parker R H. Paleobiochemistry of molluscan shell proteins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1967, 20(2): 553-579.
- [38] Hillman R E. Formation of the periostracum in *Mercenaria mercenaria*[J]. Science, 1961, 134(3492): 1754-1755.
- [39] Peters W. Occurrence of chitin in Mollusca[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1972, 41(3): 541-550.
- [40] Li Y, Kong L Q, Gao H, et al. Progress on free radical and diseases[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(4): 85-88. [李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88.]
- [41] Xie Y H. β oxidation of unsaturated fatty acids[J]. Chemistry of Life, 1994, 14(2): 46-48. [解用虹. 不饱和脂肪酸的 β 氧化[J]. 生命的化学(中国生物化学学会通讯), 1994, 14(2): 46-48.]
- [42] Cao X Q. Effects of lipid peroxidation on cells and organism[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1986, 13(2): 17-23. [曹锡清. 脂质过氧化对细胞与机体的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 13(2): 17-23.]
- [43] Wang W W, Tang L, Zhou W L, et al. Progress in the biosynthesis and metabolism of glutathione[J]. China Biotechnology, 2014, 34(7): 89-95. [王玮玮, 唐亮, 周文龙, 等. 谷胱甘肽生物合成及代谢相关酶的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(7): 89-95.]
- [44] Tang Y J, Li Y, Li D S, et al. Advance on the study of S-adenosyl-L-methionine[J]. Biotechnology Bulletin, 2007(2): 76-81. [汤亚杰, 李艳, 李冬生, 等. S-腺苷甲硫氨酸的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(2): 76-81.]
- [45] Meng P P, Liu D Y, Jiang M L, et al. Properties and applications progress of γ -glutamyltranspeptidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(9): 105-110. [孟佩佩, 刘冬英, 蒋敏丽, 等. γ -谷氨酰转肽酶的性质及其应用进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 105-110.]
- [46] Paardekooper L M, van den Bogaart G, Kox M, et al.

- Ethylene, an early marker of systemic inflammation in humans[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-10.
- [47] Ma Y H, Fei J, Guo L H. Na^+/Cl^- neurotransmitter transporter[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2000, 22(2): 53-58. [马映华, 费俭, 郭礼和. Na^+/Cl^- 神经递质转运蛋白[J]. 细胞生物学杂志, 2000, 22(2): 53-58.]
- [48] Parker M D, Boron W F. The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters[J]. Physiological Reviews, 2013, 93(2): 803-959.
- [49] McDougall C, Hammond M J, Dailey S C, et al. The evolution of ependymin-related proteins[J]. BMC Evolutionary Biology, 2018, 18(1): 182.
- [50] Zhang R J. The role and mechanism of contactin-1 in acquired multidrug resistance in lung adenocarcinoma[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2015. [张瑞婕. 接触蛋白-1 在肺腺癌获得性多药耐药中作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.]
- [51] Wang H H, Lei Z R. Current developments of heat shock proteins in insect[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(10): 2023-2034. [王海鸿, 雷仲仁. 昆虫热休克蛋白的研究进展[J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 2023-2034.]
- [52] Zhao L F, Tao M L, Pan G Q. Advances in serine protease inhibitors (serpin) superfamily[J]. Science of Sericulture, 2016, 42(3): 532-540. [赵丽芳, 陶美林, 潘国庆. 丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的研究进展[J]. 蚕业科学, 2016, 42(3): 532-540.]
- [53] Li L Y. The advance research of toll-like receptors[J]. Clinical Medical & Engineering, 2011, 18(3): 467-469. [李丽燕. Toll 样受体的研究进展[J]. 临床医学工程, 2011, 18(3): 467-469.]
- [54] Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: An overview[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2014, 29(3): 269-278.
- [55] Chen Z L, Zhao X Z. Collectin[J]. Foreign Medical Molecular Biology Volume, 1996, 18(1): 24-29. [陈政良, 赵修竹. 胶凝素[J]. 国外医学分子生物学分册, 1996, 18(1): 24-29.]
- [56] Zhang W T. The regulation role of *Porcine* prostaglandin reductase 1 (PTGR1) in inflammation and oxidative stress induced by PRRSV[D]. Tianjin: Tianjin University, 2020. [张文涛. 猪前列腺素还原酶 1 (PTGR1) 在 PRRSV 致炎及氧化应激中的调节作用[D]. 天津: 天津大学, 2020.]
- [57] Huang S S, Shi L H. Progress on L-type amino acid transporter-1 in tumor[J]. Chinese Clinical Oncology, 2012, 17(1): 85-88. [黄士隋, 史良会. 氨基酸转运载体 LAT1 在肿瘤中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(1): 85-88.]
- [58] Wang X T, Yu N, Quan J M, et al. Basic research and clinical study on CD133/prominin-1[J]. China Health Care & Nutrition, 2012, 22(22): 5485-5486. [王晓婷, 于娜, 全金梅, 等. CD133/prominin-1 分子的研究进展[J]. 中国保健营养, 2012, 22(22): 5485-5486.]
- [59] Hashimoto M, Ichihara M, Watanabe T, et al. Expression of CD109 in human cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(20): 3716-3720.
- [60] Ikeda K, Emoto N, Raharjo S B, et al. Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(45): 32469-32477.

Transcriptome sequencing and analysis of differentially expressed genes in the mantle tissues of scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) infected with Brown Deposition Syndrome

YU Zuo'an, LI Dacheng, LI Hualin, LIU Xiangfeng, TENG Weiming, LIU Zhongying, WANG Qingzhi, ZHOU Zunchun

Liaoning Ocean and Fisheries Research Institute; Key Laboratory of Protection and Utilization of Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Dalian Key Laboratory of Genetic Resources for Marine Shellfish, Dalian 116023, China

Abstract: During the past few years, outbreaks of brown deposition syndrome have caused massive mortality in the raft culture scallop, *Mizuhopecten yessoensis*, in Changhai, Liaoning. The moribund scallops exhibited severe disease signs including brown deposits on the inner shell. To analyze the molecular mechanism of brown deposit symptom and find the key genes, the transcriptomes of mantle tissues of scallop *M. yessoensis* infected with “Brown Deposition Syndrome” and healthy scallops were sequenced using the Illumina high-throughput sequencing platform, and the differentially expressed genes (DEGs) were analyzed. A total of 43862251 and 41806737 clean reads were obtained in the mantle tissue of diseased and healthy scallops. A total of 17835 genes and 16816 genes were obtained from the reference genome analysis. The degs were screened out with a threshold criterion of $|\log_2(\text{FoldChange})| > 0$ and $P\text{-value} < 0.005$. A total of 208 genes were identified, among which 170 genes were up-regulated and 38 genes were down-regulated. Six functional DEGs were randomly selected for qRT-PCR analysis, and the results confirmed that the transcriptome analysis was reliable. The result of gene ontology (GO) functional enrichment showed that the DEGs were significantly enriched in the chitin metabolic process, the glucosamine-containing compound metabolic process, the chitin binding process, and the amino sugar metabolic process. KEGG pathway enrichment suggested that the DEGs were enriched in protein processing in the endoplasmic reticulum, endocytosis, spliceosome and glutathione metabolism. The top 40 DEGs in NR, NT and Swissprot were identified and analyzed. The genes *CCOAOMT-L*, *ACCS-L*, protein yellow-like, *HSP70*, *DUOX1*, *PFI*, *GlyT1*, *Putative tyrosinase-like protein Tyr-3*, and *protein Toll* have been linked to Brown Deposition Syndrome. Protein Quinone tanning, ROS metabolism, lipid peroxidation, the immune system, and neurotransmission are regulated by these genes.

Key words: *Mizuhopecten yessoensis*; brown deposition symptom; transcriptome; key genes

Corresponding author: ZHOU Zunchun. E-mail: zunchunz@hotmail.com